

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS



**PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE
COMPUESTOS BIOACTIVOS EXTRAÍDOS DE LA
ACTINOBACTERIA MARINA *Salinispora pacífica***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

LIZBETH BERENICE AVIÑA MELGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

**PURIFICACIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE COMPUESTOS BIOACTIVOS
EXTRAÍDOS DE LA ACTINOBACTERIA MARINA *Salinispora pacifica***

T E S I S

QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA
OBTENER EN GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

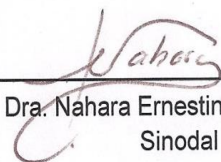
PRESENTA

LIZBETH BERENICE AVIÑA MELGOZA

Aprobada por:



Dra. Irma Esthela Soria Mercado
Directora de Tesis



Dra. Nahara Ernestina Ayala Sánchez
Sinodal



Mc. Ana María de Moncerrat Iñiguez Martínez
Sinodal

RESUMEN

Las actinobacterias marinas del género *Salinispora* sp. son productoras de compuestos altamente bioactivos. Partiendo de esto se analizó la presencia de metabolitos secundarios en la especie *S. pacifica*, a partir de la cepa AMS-365 CNY-331 aisladas de sedimentos del Golfo de California, con el fin de ser utilizados en áreas relevantes, como la farmacéutica. Se llevó a cabo el cultivo bacteriano, la preparación de extractos, el aislamiento, la purificación de compuestos y su elucidación estructural. Los compuestos obtenidos son 6 en total: 2-13, 4-4, 3C, 7-7, 11s, 42-12. El compuesto 2-13 de m/z 293 con FM $C_{16}H_{23}NO_4$ y el compuesto 4-4 de m/z 279 con FM $C_{15}H_{21}NO_4$, que al parecer serán nuevos registros para *S. pacifica*. Y los otros 4, compuesto 3C de m/z 279 con FM $C_{15}H_{21}NO_4$, compuesto 7-7 de m/z de 279 con FM $C_{15}H_{21}NO_4$, compuesto 11s de m/z 207 con FM $C_{13}H_{21}NO$ y el compuesto 42-12 m/z 259 con FM $C_{16}H_{21}NO_2$ que al parecer los dos primeros son o pueden ser análogos de Salinosporamides ya reportados. Generando que la cepa AMS-365 CNY-331 contenga compuestos de policétidos/péptidos no-ribosomales, reportados con anterioridad, y otros que podrían ser nuevos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California en particular a la Facultad de Ciencias Marinas y al Posgrado en Oceanografía costera por mi formación académica y el apoyo a este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el período de posgrado.

A mis padres, Carmen y Roberto por estar siempre a mi lado y apoyarme incondicionalmente en todos mis proyectos profesionales y de vida.

A mi Directora de Tesis la Dra. Irma Soria por todo el apoyo y cariño otorgado durante los varios años que llevamos conociéndonos.

A la Mc. Ana María Iñiguez por esas charlas en el laboratorio, apoyo durante el proceso de estrés de realización de la tesis.

A la Dra. Nahara Ayala por su voto de confianza y apoyo durante la realización de éste proyecto de tesis.

A la persona que hace que mi mundo sea más feliz Rigoberto, que andábamos sin buscarnos pero sabiendo que andábamos para encontrarnos.

A mi mejor amiga Ixetl, por su apoyo incondicional.

A mi mejor amigo Kike-chan por soportar toda mi neurosis durante la tesis.

A mis amigas Yaireb e Ivonne que siempre me están apoyando, y que están conmigo en las buenas y en las malas.

A mi compañera y amiga de laboratorio Dulce, que siempre está dispuesta ayudar, a la plática amena sobre química y por todos los momentos que pasamos en el laboratorio y dando clases.

A la Dra. Blanca y al Dr. Valentín por el apoyo otorgado en los análisis de muestras de RMN.

*“No creas lo que tu ojos dicen.
Solo muestran limitaciones.
Mira con el entendimiento,
Descubre lo que ya sabes,
Y hallarás la manera de poder volar”.*

Juan Salvador y Richard Bach.

ÍNDICE

	Página
Índice.....	i
Lista de figuras.....	iii
Lista de Tablas.....	V
Abreviaturas, fórmulas y acrónimos.....	Vi
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	8
2.1 Características generales de las Actinobacterias.....	8
2.2 Adaptaciones de las Actinobacterias Marinas.....	9
2.3 Actinobacterias Marinas.....	11
2.4 Características del género <i>Salinispora</i> sp.	15
2.4.1 <i>Salinispora tropica</i>	16
2.4.2 <i>Salinispora arenicola</i>	17
2.4.3 <i>Salinispora pacifica</i>	19
3. Hipótesis.....	22
4. Objetivos.....	22
4.1. Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos particulares.....	22
5. Metodología.....	23
5.1 Área de estudio	23
5.2 Colecta de sedimento.....	24
5.3 Aislamiento, cultivo y preparación de extracto AMS-365 CNY-331.....	25
5.4 Separación por cromatografía.....	27

Continuación del índice

5.4.1 AMS-365 CNY-331.....	29
5.5 Elucidación estructural.....	36
5.5.1Infrarrojo (IR).....	36
5.5.2 Resonancia Magnética Nuclear Protónica (RMN).....	36
5.4.3 Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas (LC/MS)	38
5.4.4 Estructura.....	39
6. Resultados y Discusión.....	40
6.1 Compuesto 2-2.5H-13.....	40
6.2 Compuesto 4-4.....	45
6.3 Compuestos no definidos en su totalidad.....	50
6.3.1 Compuesto 3C.....	50
6.3.2 Compuesto 7-7.....	53
6.3.3 Compuesto 11s.....	57
6.3.4 Compuesto 42-12.....	60
7. Discusión general.....	63
8. Conclusiones.....	65
9. Referencias.....	67
10. Anexos.....	72

Lista de figuras

Figura		Pagina
1	Cinética de crecimiento para microorganismos.....	4
2	Árbol radial que representa las relaciones filogenéticas de 13 filotipos de 6 familias de actinomicetos.....	13
3	Estructuras representativas de antibióticos de polienos-polioles del grupo <i>Marinispora</i>	15
4	Compuesto Salinosporamide A, producido únicamente por <i>S. tropica</i>	17
5	Compuesto solido amorfo, Arenicolide A producido únicamente por <i>S. arenicola</i>	19
6	Compuesto Cyanosporaside A producido únicamente por <i>S. pacifica</i>	20
7	Estructuras de compuestos producidos por <i>S. tropica</i> – Salinosporamide A (primero de izquierda a derecha), <i>S. pacifica</i> – Salinosporamide K (al centro) y por último <i>Streptomyces cinnabarinus</i> – Cinnabaramide A, 2C diferencia entre los tres compuestos.....	21
8	Área de estudio, Bahía de los Ángeles Baja California (Cuadro azul), estación de colecta de AMS-365 CNY-331 (E28-globo azul).....	24
9	Aislamiento y cultivo de actinobacterias, A) Estampando en círculo de actinobacterias en cajas Petri a manera de dilución. B) Cepa pura del género <i>Salinispora</i> sp. C) Medio de cultivo líquido en agitación constante.....	26
10	Proceso de obtención de fracciones, A) Cromatografía en columna B) Concentración de fracciones por destilación a presión reducida, C) purificación de compuestos por cromatografía en capa fina (placa de 20x20 cm) y D) Viales ámbar.....	28

Continuación de las figuras

Figura		Pagina
11	Diagrama de flujo, separación y purificación de compuestos del crudo AMS365 CNY331, (extracto1 , extracto2 , ambos extractos , compuestos puros , cristales , precipitado solido-blanco).....	34
12	Diagrama de flujo, separación y purificación de compuestos del crudo AMS365 CNY331, (extracto1 , extracto2 , ambos extractos , Compuestos puros).....	35
13	Compuesto 2-13 producido por AMS-365 CNY-331.....	40
14	Estructura propuesta para el compuesto 2-13 con base a las correlaciones observadas en los espectros de 2D-RMN.....	41
15	Comparación de compuestos por similitud de pesos moleculares: Salinosporamide E, Compuesto 2-13 y Salinispirone A.....	43
16	Compuesto 4-4 producido por AMS-365 CNY-331.....	45
17	Estructura propuesta para el compuesto 4-4 con base a las correlaciones observadas en los espectros de 2D-RMN.....	46
18	Comparación de compuestos por similitud de pesos moleculares y señales en RMN de Salinosporamide B, Salinosporamide C y el compuesto 3C.....	50
19	Compuesto 7-7 producido por AMS-365 CNY-331.....	53
20	Rompimiento de la β -propiolactona (C_2H_4COO) formando un ácido carboxílico ($COOH$) en el carbono 15 (C-15).....	55
21	Compuesto 11s producido por AMS-365 CNY-331.....	57
22	Compuesto 42-12 producido por AMS-365 CNY-331.....	60

Lista de tablas

Tabla		Pagina
I	Datos espectrales de RMN para el compuesto 2-13 a 400 MHz...	42
II	Datos espectrales de RMN para el compuesto 4-4 a 400 MHz.....	48
III	Datos espectrales de RMN para 1, 2 a 300MHz y el compuesto 3C a 400 MHz.....	51
IV	Datos espectrales de RMN para 1 a 300 MHz y el compuesto 7-7 a 400 MHz.....	54
V	Datos espectrales de RMN para el compuesto 11s a 400 MHz.....	58
VI	Datos espectrales de RMN para el compuesto 42-12 a 400 MHz...	61

Abreviaturas, fórmulas y acrónimos

16S RNAr	Método de secuencia de ADN	HSQC	Coherencia cuántica simple heteronuclear con detección de protón ^1H - ^{13}C
AcOet	Acetato de etilo	IR	Infrarrojo
ACN	Acetonitrilo	J	Constante de acoplamiento
ADN	Ácido desoxirribonucleico	LC/MS	Cromatógrafo de líquidos con detector de masas
AMS	Actinomiceto Marino Salinispora	M⁺	Ion molecular
ATP	Adenosín trifosfato	M	Multiplete
Atm	Atmósfera	m/z	Relación masa-carga
br	Señal ancha	Me	Metilo
C⁺⁴	Carbono	MeOH	Metanol
C₆H₁₄	Hexano	Mg	Miligramos
C₈H₈	Isooctano	MHz	Mega Hertz
CC	Cromatografía en columna	MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metacilina
CDCl₃	Deutocloroformo	MS	Espectrometría de masas
CNY	Control Número letra de secuencia del abecedario	N⁺³	Nitrógeno
COSY	Espectroscopia de correlación ^1H - ^1H	NCI	Instituto Nacional del Cáncer
CO₂	Dióxido de carbono	PF	Pentosa fosfato
Δ	Desplazamiento químico	pH	Potencial de hidrógeno
δC	Desplazamiento químico de carbono	PM	Peso molecular
δH	Desplazamiento químico de protón	ppm	Partes por millón
Δ	Incremento	Rf	Factor de retención
Δδ	Incremento en el desplazamiento químico	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
d	Doblete	RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono
DCM	Diclorometano	RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
dd	Doble de dobles	S	Singulete
ddd	Triple de dobles	SPE	Columna de extracción en fase sólida
dddd	Doble de dobles de doble de dobles	SSU RNAr	Subunidad pequeña del RNA ribosomal
DMSO	Dimetilsulfóxido	T	Triplete
dt	doble de triple	TLC	Cromatografía en capa fina
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas	TMS	Tetrametilsilano
FM	fórmula molecular	Tr	Tiempo de retención
GC	Golfo de California	UV	Ultra violeta
G+C	Guanina más citosina	VREF	<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomycin
gyrB	Marcador filogenético		
HMBC	Coherencia heteronuclear a múltiple enlace ^1H - ^{13}C		

1. INTRODUCCIÓN

El océano alberga la mayor cantidad de ecosistemas en la Tierra, siendo una fuente importante de productos naturales, que representan un gran grupo de compuestos o sustancias químicas únicas con actividad biológica. Estas sustancias se han encontrado principalmente en tejidos de plantas terrestres y en organismos marinos, en su mayoría invertebrados como esponjas, pepinos, estrellas, entre otros; así mismo, se ha descubierto que los caldos de fermentación de microorganismos (Bacterias y hongos) son fuente de dichos compuestos bioactivos.

Los compuestos naturales o sustancias producidas por la flora o fauna han sido y siguen siendo altamente utilizados en la farmacología, en la alimentación, la cosmetología, entre otros. Estos compuestos ofrecen una diversidad estructural enorme y estructuras son muy complejas que dificultan en muchas ocasiones su síntesis (Gordaliza 2008); la actividad biológica que presentan estos compuestos varía enormemente y puede ser aprovechada por sus efectos terapéuticos, actividad antiviral, bactericida, citotóxica u otras aplicaciones médicas (Valencia Ortiz 1995).

Los productos naturales, extraídos de diferentes individuos son considerados como compuestos medicinales que han sido utilizados durante miles de años en diferentes campos de la terapia, ya sea en forma de crudos, tinturas u otras formulaciones, o bien como fuente para la obtención de principios activos de interés biológico y farmacológico.

Los organismos vivos convierten las sustancias inorgánicas en compuestos orgánicos, por medio de rutas metabólicas en las cuales se generan compuestos por medio del conjunto de reacciones bioquímicas y/o procesos físico-químicos que ocurren en el organismo. Las rutas metabólicas pueden ser oxidantes y/o reductoras (el catabolismo y el anabolismo), mixtas o anfibólicas. Los procesos metabólicos están enfocados al desarrollo y crecimiento (metabolismo primario), en donde todas las rutas bioquímicas e intermediarios son los responsables de la reproducción celular y la viabilidad del organismo, así como generar energía en forma de ATP (adenosín trifosfato). Son necesarios para el crecimiento del organismo que lo produce, son productos únicos y no pueden perderse tan fácilmente por mutación espontánea (aminoácidos, vitaminas, nucleótidos, alcoholes, ácidos orgánicos, etc.). Así mismo, existen procesos que incluyen al metabolismo secundario el cual produce compuestos que en su mayoría son excretados al medio, obteniéndose a partir de la energía generada de los productos finales e intermediarios del metabolismo primario (Cortés-Sánchez y Mosqueda-Olivares 2013). Estos compuestos generalmente se producen como mezclas de productos muy relacionados químicamente entre sí. En donde la producción puede perderse fácilmente por mutación espontánea y cada uno de estos compuestos (antibióticos, toxinas, alcaloides, pigmentos, etc.) es producido por un grupo muy reducido de organismos. No presentan función determinada pero en su biosíntesis, ayudan a diferentes procesos como por ejemplo; la reproducción, alimentación, defensa, entre otros (Anaya-Lang 2003)

La investigación en el área de los productos naturales marinos ha sido enfocada en su mayoría a organismos invertebrados. Sin embargo, el problema más recurrente de los compuestos aislados es que presentan estructuras muy complicadas para ser sintetizadas y por lo tanto, resultan incosteables ya que las técnicas de producción de dichos organismos no son reproducibles en grandes cantidades; por esto, se han tomado otras alternativas para su desarrollo, como lo son los microorganismos ya que presentan una mayor facilidad de cultivo y su velocidad de crecimiento es alta, esto generó que los investigadores enfocaran su atención a los microorganismos, por ser una opción viable para la obtención de compuestos bioactivos novedosos.

Estudios realizados en la cinética de crecimiento de microorganismos viables han generado bastante polémica, con referencia a la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica. En donde se ha descubierto que el metabolismo primario es efectuado en la etapa activa del crecimiento o fase exponencial, involucrando a intermediarios como ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos entre otros, para un desarrollo óptimo del microorganismo también llamada trofase. Sin embargo, se ha demostrado que la gran mayoría de los metabolitos secundarios se generan al final de la trofase y el inicio de la ideofase en donde el microorganismo no crece, pero sigue metabólicamente activo (inicio de la fase estacionaria). Es decir, para generar un metabolito secundario primero hay que presentar ciertas condiciones óptimas en la trofase; como por ejemplo el mecanismo de defensa, el cual no comienza de inmediato al terminar la trofase, si no que presenta un tiempo de latencia en la ideofase que le

generará una adaptabilidad al microorganismo para inhibir o generar resistencia hacia su propio antibiótico. No se conocen bien los factores que disparan la proliferación de los metabolitos secundarios, solo se ha demostrado que en el cambio de fases se genera una limitación de nutrientes como carbono, nitrógeno o fósforo (C^{+4} , N^{+3} o P^{+3}) alterando el metabolismo primario y así mismo, activando procesos enzimáticos que darán lugar a los metabolitos secundarios (Fig. 1) (Decheco-Egúsquiza, 2011; Cortés-Sánchez & Mosqueda-Olivares, 2013).

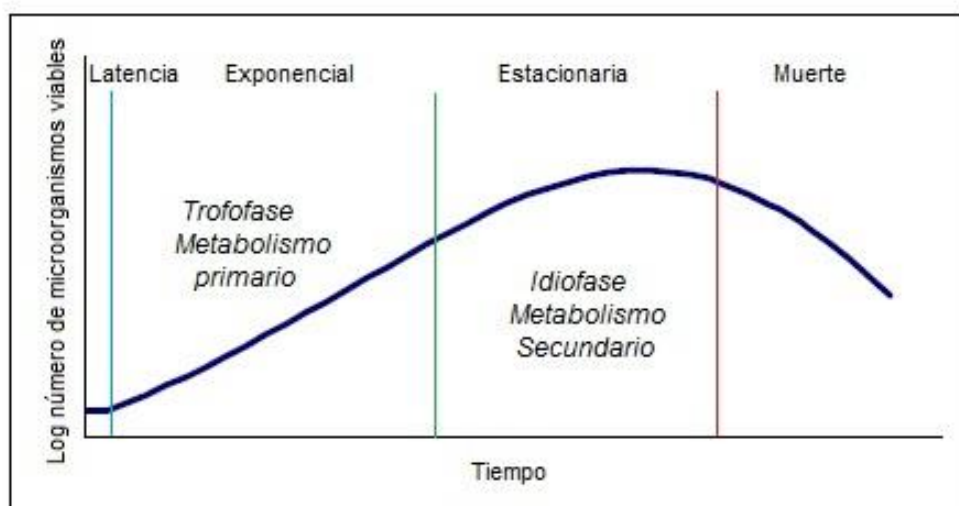


Figura 1. Cinética de crecimiento para microorganismos.

La producción de metabolitos secundarios en comparación con los metabolitos primarios no ha sido estudiada a fondo, pero existe evidencia de que algunos de los procesos de síntesis y regulación son similares en ambos casos. Los metabolitos secundarios son generados por diferentes rutas bioquímicas las cuales generan la siguiente clasificación: 1. Productos derivados de la glucosa, que son aquellos donde la

molécula de glucosa es parte de la estructura como es el caso de algunos antibióticos (estreptomicina y neomicina); 2. Productos relacionados con los nucleósidos, la cual utiliza la vía de la pentosa fosfato (PF) generando la ribosa para la síntesis de nucleósidos; 3. Productos derivados de la vía shikímato-corismato, donde se forma el ácido shikímico, a partir de la condensación de la eritrosa-4-fosfato obtenida de la vía PF con el fosfoenolpiruvato proveniente de la vía Emden- Meyerhof-Parnas (EMP) el cual es un intermediario para la formación de diversos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano); 4. Vía policétido, es muy similar a la de los ácidos grasos, en la cual intervienen complejos enzimáticos denominados policétido-sintetasas, ocurriendo la síntesis a partir de reacciones de condensación entre moléculas de acetato y malonato con la respectiva pérdida de dióxido de carbono (CO_2), produciéndose diferentes compuestos con actividad biológica importante; 5. Terpenos y esteroides, son compuestos sintetizados mediante reacciones de polimerización de moléculas de isopreno por la vía del ácido mevalónico, como en el caso de carotenoides (astaxantina) y por ultimo 6. Productos derivados de aminoácidos, los aminoácidos provienen de diferentes productos del catabolismo, por lo tanto, los metabolitos secundarios pueden estar formados de uno o más aminoácidos, como el caso de la hadacidina, que inhibe los tumores en plantas (Cortés-Sánchez y Mosqueda-Olivares 2013).

Los metabolitos microbianos han tenido un extraordinario impacto en la calidad de vida de la humanidad durante el pasado siglo; en antibióticos, antifúngicos,

inmunosupresores y agentes hipolipemiantes han sido utilizados en la clínica durante los últimos 50 años, contribuyendo así al bienestar de la humanidad y el aumento de la esperanza de vida observado durante la segunda mitad del siglo XX (Peláez y Genilloud 2009). Hasta ahora son conocidos diferentes mecanismos y/o procesos regulatorios para la biosíntesis de metabolitos secundarios microbianos; estos procesos pueden ser mediante síntesis y degradación de enzimas, donde las proteínas intracelulares se encuentran en constante recambio y su velocidad de síntesis debe ser superior a su degradación o inactivación. Otro mecanismo conocido es la inducción, que consiste en la presencia de un compuesto químico (sustrato), en la fase de crecimiento y puede ser considerado como precursor que actuará como inductor de algunas enzimas necesarias para la biosíntesis. También puede realizarse la regulación catabólica, donde se reprime la síntesis de enzimas necesarias para la producción de metabolitos, debido a la presencia de más de un sustrato útil para el crecimiento. Asimismo la regulación por retroalimentación, es otro tipo de mecanismo que controla la concentración de metabolitos mediante la síntesis. Y por último se considera otro mecanismo de regulación el controlar el ATP, ya que la concentración de fósforo es muy importante en la síntesis de metabolitos, siendo de mayor demanda en la producción de metabolitos primarios, la alta concentración es favorable para el crecimiento de las células (estimula la tasa de respiración, síntesis de ácidos y consumo de glucosa) (Cortés-Sánchez y Mosqueda-Olivares 2013).

Existe un grupo muy importante de microorganismos productores de una gran cantidad de compuestos con actividad biológica que pueden ser aprovechados en la industria farmacéutica. Este grupo se conoce como actinobacterias o actinomicetos (Olano, Mendez y Salas 2009). Poco se sabe de las actinobacterias encontradas en mares mexicanos y su aportación a la industria de los fármacos en México.

Por lo que, en el presente trabajo se llevó a cabo el cultivo, aislamiento, purificación y elucidación estructural de compuestos extraídos, de extractos orgánicos de una cepa actinobacteriana marina del género *Salinispora*; la tercera especie *Salinispora pacífica* (AMS-365 CNY-331), encontrada recientemente y por primera vez en sedimentos del Golfo de California (Torres-Beltrán, y otros 2012), con capacidad citotóxica y antimicrobiana.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características generales de las Actinobacterias

Los actinomicetos o actinobacterias presentan una adaptación muy antigua al suelo terrestre, siendo los más abundantes en la biomasa bacteriana. A estas bacterias se les consideraron como hongos en el pasado, pero actualmente se ha demostrado que corresponden al orden ***Actinomycetales*** del griego *aktino* (“rayo”) y *mikes* (“hongo”), por su conformación en forma radial de los gránulos formados en las lesiones de los tejidos. Son microorganismos bacilares de crecimiento lento, Gram-positivos. Presentan una membrana celular rígida que rodea la membrana plasmática, que da forma a la bacteria la cual soporta grandes presiones osmóticas; se le unen 4 ácidos (L-alanina, D-alanina, D-ácido glutámico y L-lisina) y se caracterizan por el peptidoglucano que incluye a polímeros de fosfato de glicerol, ácidos urónicos como la N-acetilglucosamida, ácidos lipotéicos como el fosfato de glicerol unido a un lípido y otros glucolípidos. Carecen de membrana externa por lo que adquieren un aspecto monoestratificado.

Las actinobacterias presentan una composición de bases de ADN de 63 a 78% de guanina más citosina (G+C), encontrándose en el extremo superior de este límite con el porcentaje de G+C más alto que cualquier otra bacteria, esta propiedad del genoma de enlazar 3 hidrógenos genera que el enlace formado sea más fuerte y resistente a la desnaturalización por efecto de la temperatura, por ende en los hipertermófilos y psicrófilos la cantidad de G+C tiende a ser mayor. Tienden a crecer

formando filamentos ramificados llamados hifas, estas a su vez, se subdividen en unidades producto de un crecimiento de la pared celular hacia el interior de la hifa en intervalos regulares a lo largo de la estructura; el conjunto de estas constituye una red denominada micelio que puede ser basal (en el sustrato) y/o aéreo (en la superficie). Al proceso de subdividir las hifas, se le denomina septación y cada uno de los septos resultantes contiene una molécula de ADN. Por lo cual, pueden producirse esporas externas o exoesporas a partir de la gemación o crecimiento externo de un micelio filamentoso. La mayoría de estos organismos son aerobios (oxidativos), aunque algunos de ellos son anaerobios facultativos u obligados (fermentativos) (Logan 1994). Así mismo, juegan un papel importante en la descomposición de materia orgánica, como la celulosa, la quitina, renuevan las reservas de nutrientes en la tierra y son esenciales en la formación de humus (Romero Cabello 2007).

2.2 Adaptaciones de las Actinobacterias Marinas

Las actinobacterias marinas son sometidas a condiciones extremas, como presión, temperatura, salinidad, escases de nutrientes, luz, entre otros. Sin embargo, se han adaptado a las condiciones físicas, químicas y biológicas del océano, modificando así su fisiología, al igual que sus propiedades bioquímicas para sobrevivir en este medio.

Son capaces de resistir una enorme presión hidrostática; si se considera que la presión aumenta 1 atmósfera (atm) cada 10 metros (m) de profundidad, los

microorganismos aislados a una profundidad de 2000m deberán soportar 200 atm de presión por lo cual se les considera barotolerantes. Por otra parte, las condiciones en temperatura son bajas, siendo un factor importante para el crecimiento bacteriano y la actividad metabólica de estos microorganismos, consiguiendo ser llamados psicrófilos facultativos. Sin embargo, la concentración de iones es relativamente alta, por lo cual la salinidad y en especial el sodio (Na^+) juegan un papel importante en la fisiología. Esto ha generado un requerimiento de este ion para un óptimo crecimiento, considerándolos como halófilos extremos. Para demostrar esto, se presenta un gradiente de Na^+ transmembranal con un potencial de energía que puede ser utilizado en varias funciones celulares incluyendo la generación de ATP, el transporte de muchos solutos, la respiración, la regulación del pH y la movilidad flagelar. Otros iones requeridos que mantienen la integridad celular son el potasio (K^+), magnesio (Mg^{+2}) y el calcio (Ca^{+2}) ya que son utilizados en el crecimiento y en la estabilidad osmótica (De Carvalho & Fernádes, 2010; Becerril-Espinosa, 2011; Torres-Beltrán, et al., 2012).

Las actinobacterias presentan cambios en la concentración de proteínas, esteroides, hopanoides y en su contenido de carotenoides, para mantener sus funciones biológicas bajo condiciones estresantes, pero principalmente presentan cambios en la composición lipídica de la membrana. Las células tratan de mantener la fluidez de la membrana realizando cambios en el grado de saturación de los ácidos grasos de los fosfolípidos a través de un mecanismo denominado “adaptación homeoviscous”. Por ejemplo, la alta salinidad puede causar un aumento en el contenido de fosfolípidos con

carga negativa a expensas de fosfolípidos neutros. Los polímeros extracelulares mejoran la capacidad de adaptación y la tasa de supervivencia, especialmente en condiciones extremas; siendo capaces de desarrollarse aún en condiciones oligotróficas (Surajit-Das, et al., 2006; De Carvalho & Fernandes, 2010).

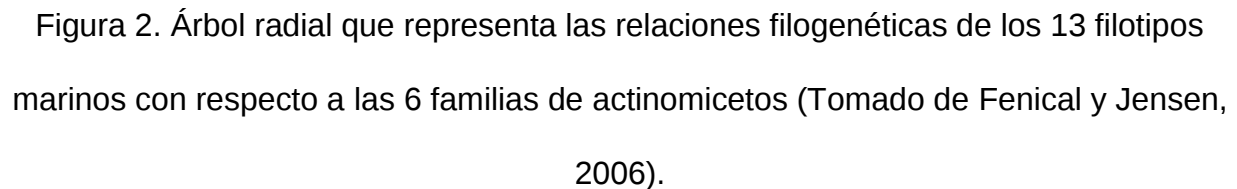
2.3 Actinobacterias Marinas

El océano constituye el 70% de la superficie de la tierra encontrándose en él la mayor diversidad del planeta. Las plantas y los invertebrados marinos han llamado la atención por la gran producción de productos naturales bioactivos descubiertos en ellos. Sin embargo, los microorganismos por otra parte han sido muy poco explorados en materia de diversidad, función, producción de metabolitos secundarios con actividad biológica, principalmente. Desde hace tiempo, se reconoce que los actinomicetos marinos se derivan de los terrestres ya que sus esporas son acarreadas al mar y se cree estas permanecieron en forma latente por años; especialmente las bacterias Gram positivas, que pueden inducir el estado de spora mediante el mecanismo de esporulación, logrando así resistencia contra la desecación, trituración, escasez de nutrientes, frío, calor, radiación, sal, etc. esto debido a su cubierta dura e impermeable. Esto ha generado la teoría de que para adaptarse al medio marino crean otras rutas metabólicas y por ende una mayor cantidad de metabolitos secundarios (Fenical, chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a New Resource 1993). Por lo tanto, las bacterias pueden subsistir ya sea en la columna de agua, en el sedimento o como simbiontes de otros organismos. Una peculiaridad de las actinobacterias reside en que

su biodiversidad en la columna de agua es menor a la comparada con el resto de las bacterias, por lo general, son habitantes habituales de las zonas aeróbicas del suelo marino donde contribuyen al proceso de degradación y reciclaje de nutrientes se ha reportado que existen más de un millón de células por gramos de sedimento (Prieto-Davó, Fenical y Jensen 2008) y poseen una capacidad enorme para producir antibióticos clínicamente útiles.

Okazali y colaboradores en 1975 aislaron el primer actinomiceto perteneciente a la familia *Streptomycetaceae*, la especie *Chainia purpurogena* de donde se obtuvo un antibiótico con estructura benzatraquinona, denominada SS-228 con la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas, el carcinoma de Ehrlich en ratones y la Dopamina- β -hidroxilasa, dicho actinomiceto fue aislado de bacterias presentes en el sedimento de la Bahía de Sagami, Japón (Okazali *et al.*, 1975).

El Conocimiento en el área de los productos naturales, en específico el descubrimiento de nuevas cepas de actinomicetos ha extendido su clasificación y aumentado la estimación de su número; mediante técnicas moleculares como el del gen 16S RNAr (Método de secuencia de ADN), *gyrB* (Marcador filogenético), entre otras. Como consecuencia, se ha ampliado el árbol filogenético de 6 familias (*Thermomonosporaceae*, *Nocardiopsaceae*, *Nocardiaceae*, *Micromonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae* y *Streptomycetaceae*) con al menos 13 filotipos nuevos que han sido codificados como MAR1 al 13 (Fig. 2). Los grupos MAR son estudiados



Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica*

encontrando 2 compuestos altamente citotóxicos Marinomycin A y B. Para el 2006 se propone el nombre de “Marinospora” por la relación filogenética que presenta con *Salinispora*, ha sido aislada de sedimentos de Guam, Golfo de California y de San Diego (Kwon, y otros 2006). La diversidad filogenética que presenta la familia *Streptomycetacea* sugiere que está compuesto por múltiples especies nuevas.

El género *Marinispora* (MAR2) posee compuestos de estructuras de policétidos derivados de polienos. Los primeros compuestos aislados fueron las marinomycinas A-D, con una estructura inusual de macrodiólidos formados de dímeros de lactonas ácidas de 2-hidroxi-6-alquenilo benzoico conjugados con cadenas de policétidos tetraeno-pentahidroxi, la cual se ejemplifica con marinomycina A (Figura 3) obtenida de la cepa CNQ-140 de una profundidad de 56 m de sedimentos marinos de La Jolla, C.A., compuesto color amarillo con fórmula molecular (FM) de $C_{58}H_{76}O_{14}$ y un peso molecular (PM) de 1019.5190 gr/mol, con actividad antibiótica de 0.1-0.6 μ M probada contra MRSA (*Staphylococcus aureus* por resistente a la metacilina) y contra VREF (*Enterococcus faecium* resistente a vancomycin), así también presenta inhibición de células cancerígenas con un IC_{50} (Concentración inhibitoria máxima media) de 0.2-2.7 μ M (Instituto Nacional de Cáncer-NCI), siendo altamente potente contra 60 líneas celulares y selectivo de ocho líneas celulares de mieloma atacando a seis (Kwon, y otros 2006). Otros compuestos son las marinisporolide A y B (Fig. 3) con estructuras de polienos-polioles relacionados con la clase roflamycina (flavomycina). Presentan en su mayoría estructuras de pesos moleculares grandes y sin ningún orden específico. Sin

embargo, aún no se conoce el mecanismo de acción en el cuerpo humano (Fenical & Jensen, 2006).

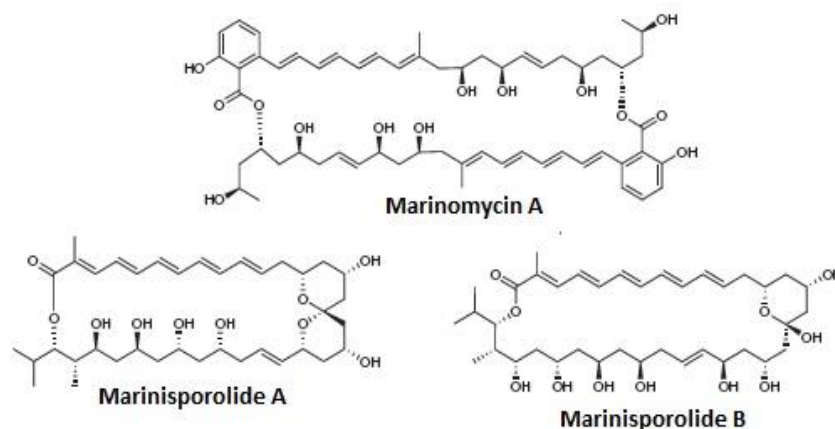


Figura 3. Estructuras representativas de antibióticos de polienos-polioles del grupo *Marinispora* (Tomado de Kwon *et al.*, 2006).

2.4 Características del género *Salinispora* sp.

El primer reporte de actinomicetos (del género *Salinispora*) en sedimentos marinos se realizó en el año 1991 en Bahamas; donde se aislaron actinobacterias que requieren agua de mar para crecer, pertenecientes a la familia *Micromonosporaceae* (Jensen, Dwight y Fenical 1991). Posteriormente, para el año 2002, este nuevo grupo es codificado como MAR1.

En el año 2003, es descubierto un compuesto altamente citotóxico obtenido de la cepa CNB-392 cambiando el nombre de MAR1 a “*Salinospora*” (Mincer, *et al.*, 2002; Feling, *et al.*, 2003). Sin embargo, no fue hasta el año 2005 que recibe la descripción

formal de *Salinispora sp.* por sus dos especies *Salinispora tropica* y *Salinispora arenicola* (Maldonado, y otros 2005). Asimismo, es propuesta una tercera especie “*Salinispora pacifica*” por Jensen y Mafnas en el 2006, pero no es hasta el 2013 que es descrita formalmente por Ahmed y colaboradores, como una tercera especie de *Salinispora spp.* por los metabolitos secundarios que produce y los estudios realizados desde el 2006 a la fecha, que recibe el nombre formal de *Salinispora pacifica* (Oh, et al., 2006; Freel, et al., 2011; Freel, et al., 2012; Torres-Beltrán, et al., 2012; Ahmed, et al., 2013). A partir de aquí, se han aislado miles de cepas de *Salinispora* en diferentes localidades de los océanos Pacífico y Atlántico, marcando una distribución biogeográfica en sedimentos pantropicales.

Las 3 especies de *Salinispora sp.* conocidas, están estrechamente relacionadas en un 99% de similitud de acuerdo con el 16S ARNr en donde solo difieren en 5 nucleótidos. Sin embargo, la única propiedad fenotípica que las diferencia son los metabolitos secundarios que producen (Fenical y Jensen, Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria 2006).

2.4.1 *Salinispora tropica*

La especie *S. tropica* fue aislada en el sedimento de Bahamas, presentando una distribución en el Caribe. Con un filotipo, el estándar (Freel, Edlund y Jensen 2012). En el año 2003, se informó del aislamiento de un agente anticancerígeno potente llamado Salinosporamide A (Fig. 4), de la cepa CNB-392 aislada de sedimento de

aproximadamente de 1m de profundidad, en el año 1989 de un ambiente de manglar en Chub Cay, Bahamas (Feling, et al., 2003; Fenical & Jensen, 2006). El cual resultó ser altamente citotóxico contra el carcinoma colorectal en humanos con un IC_{50} (Concentración inhibitoria máxima media) de 11 ngmL^{-1} . Asimismo, presenta una alta actividad selectiva contra 60 líneas celulares en NCI con un IG_{50} (Inhibición del crecimiento del 50%) de menos de 10 nM. Encontrándose, en fase clínica III para el tratamiento de cáncer (Feling, et al., 2003; Fenical, et al., 2009; Becerril-Espinosa, 2011), evaluado actualmente para su consumo y comercialización por los laboratorios farmacéuticos Nereus, con la autorización de la Universidad de California, San Diego. Sin embargo, también es productor de diversas Salinosporamides (B & C), Macrólidos clorados y Esporolidas (A & B) (Williams, et al., 2005; Dineshkumar, et al., 2014).

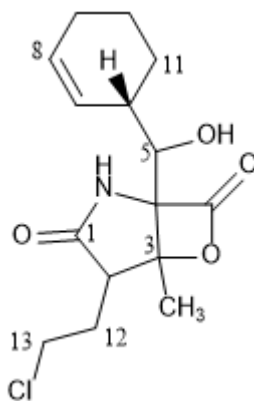


Figura 4. Compuesto Salinosporamide A, producido únicamente por *S. tropica*.

2.4.2 *Salinispora arenicola*

La especie *S. arenicola* está ampliamente distribuida geográficamente, ya que se ha aislado de 10 localidades: Hawaii, Costa Rica, el Mar Rojo, Islas Guam, Palau,

Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica*

Virginias, Bahamas, Fiji, Mar del Sur de China y del Golfo de California. Presentando 5 filotipos, el estándar del A-D. De estos, dos filotipos el A y B han sido aislados del Golfo de California, los cuales tan solo varían en 1 y 2 nucleótidos en el gen 16S ARNr (Freel , Edlund y Jensen 2012). Es reconocida como un productor de análogos de rifamicina y diversas estaurosporinas que inhiben la proteína quinasa. Williams y colaboradores en el 2007, aislaron un nuevo compuesto de estructura 1,4-Dimetil-2,8-dioxabicclico [3.2.1] octano-3-y1anillo, con FM de $C_{22}H_{37}NO_5$ y PM de 395 gr/mol (MH^+ 396.2760 gr/mol) de la cepa CNR-059, codificados como Saliniketales A y B, con su única diferencia en el C-18 ($R_A=H$ y $R_B=OH$). Estos compuestos presentan la facultad de ser quimio-preventivos contra cáncer, con valores de IC_{50} de 1.95 ± 0.37 y 7.83 ± 1.2 $\mu g/mL$ respectivamente (Williams , Asolkar, y otros 2007) (Guillén-Matus 2014).

Los compuestos más representativos de *S. arenicola* son las Arenicolidas; Arenicolide A (Fig. 5) es un compuesto solido amorfo de PM 804 gr/mol y FM $C_{45}H_{72}O_{12}$, esta especie presenta dos compuestos más Arenicolide B & C, el primero tiene un PM 790 gr/mol y FM $C_{44}H_{70}O_{12}$, siendo su única diferencia con A el radical que presente en el C-6 ($R_A=Me$ y $R_B=H$). Sin embargo, para Arenicolide C el PM como la FM es igual a Arenicolide A esto genera que se confirme que es un isómero de iguales proporciones pero distinta estructura química, con la diferencia del anillo tetrahidrofurano en los C-30 al C-33 (Williams, Miller, y otros 2007). Estos compuestos son producidos exclusivamente por esta especie, así también es un productor de

compuestos de las familias Ciclomarine, Arenumicine y Arenamide (Maldonado, y otros 2005).

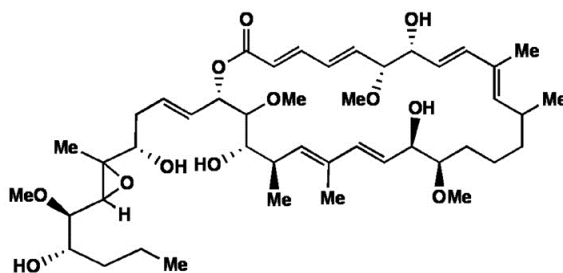


Figura 5. Compuesto solido amorfo, Arenicolide A producido únicamente por *S. arenícola*.

2.4.3 *Salinispora pacifica*

S. pacifica es la tercera especie detectada hasta el momento, es propuesta por Jensen y mafnas en el 2006 y descrita formalmente por Ahmed y colaboradores en el 2013. El primer reporte del aislamiento de una nueva especie que difiere de las 2 ya reportadas, es colectado de sedimentos marinos de las Islas Guam y es diferenciado por el 16S RNAr. Para el 2007 ya se había aislado de sedimentos de Palau por Gontang y colaboradores, en Fiji en el 2011 (Freel, y otros 2011) y para el 2012 son detectados actinomicentos que requieren agua de mar para crecer pertenecientes al género *Salinispora sp.*, en sedimentos marinos del Golfo de California (Becerril-Espinosa, 2011; Freel, et al., 2011; Torres-Beltrán, et al., 2012). Siendo un total de 7 localidades; Hawaii, Mar Rojo, La Gran Barrera de Coral, Islas Guam, Palau, Fiji y Golfo de California. Posee 13 filotipos el estándar, A-L, lo que revela un alto grado de

dispersión entre poblaciones y un soporte filogenético para la delineación de este linaje como una tercera especie (Freel *et al.*, 2012).

Del filotipo estándar, se han obtenido un alto número de compuestos nuevos e interesantes como cyanosporaside A (Fig. 6). De los filotipos A y B, el primero produce metabolitos polienos y el segundo produce series únicas de pirones los cuales son característicos de salinispyrone A (Becerril-Espinosa, 2011; Jensen *et al.*, 2007; Fenical & Jensen, 2006).

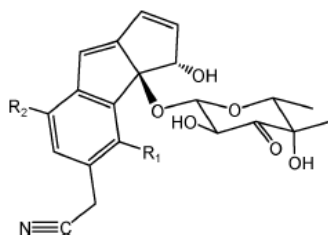


Figura 6. Compuesto Cyanosporaside A producido únicamente por *S. pacifica*.

Estudios realizados con la especie *S. pacifica* presenta una relación entre las especies de *S. tropica* y *Streptomyces cinnabarinus* determinada por medio del 16S RNAr y con la secuencia ceto-sintasa (KS). Se observó que *S. pacifica* presenta un compuesto similar a Salinosporamide A (Fig. 7) producido por *S. tropica*. Este compuesto similar a Salinosporamide A, fue extraído de la cepa CNT-133 y CNS-863 aisladas en Fiji, el compuesto Salinosporamide K en ambas cepas (Fig. 7). Este hallazgo indica la presencia de una asociación en la ruta biosintética de ambos organismos ya que presentan un ancestro común que posteriormente evolucionó independientemente en las 2 especies. La correlación de *S. pacifica* con *Streptomyces*

cinnabarinus se determinó por medio de la detección de la secuencia KS la cual revela niveles de recombinación interespecífica y una reciente característica con Cinnabaramide A (Fig. 7) en su ruta biosintética, esto demuestra una relación filogenética con la especie *S. pacifica* por medio de la secuencia KS con un 75 a 78% de similitud.

La diferencia estructural entre los compuestos producidos por estas 3 especies (*S. tropica*, *S. pacifica* y *Streptomyces cinnabarinus*) reside en su C-2 (Fig. 7), donde para Salinosporamide A es una cadena de dos carbonos con un cloro al final (C_2H_4Cl), Salinosporamide K son dos hidrógenos (H_2) y para Cinnabaramide A es una cadena carbonada de seis (C_6H_{13}) (Freel *et al.*, 2011).

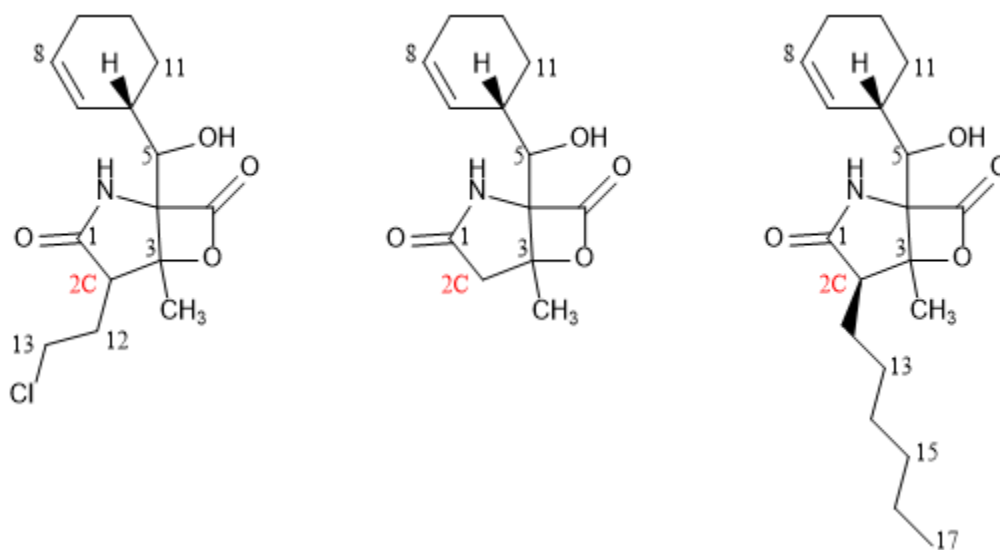


Figura 7. Estructuras de compuestos producidos por *S. tropica* – Salinosporamide A (primero de izquierda a derecha), *S. pacifica* – Salinosporamide K (al centro) y por último *Streptomyces cinnabarinus* – Cinnabaramide A, 2C diferencia entre los tres compuestos.

3. HIPÓTESIS

La cepa bioactiva AMS-365 CNY-331 identificada como *Salinispora pacífica* contendrá metabolitos secundarios nuevos.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo general

Llevar a cabo la purificación y elucidación estructural de compuestos obtenidos de la especie *Salinispora pacífica* (AMS-365 CNY-331), con actividad citotóxica y antimicrobiana.

4.2 Objetivos particulares

1. Realizar cultivo de la actinobacteria marina *Salinispora pacífica* de la cepa AMS-365 CNY-331.
2. Preparar extractos orgánicos y aislar los metabolitos secundarios presentes en ellos.
3. Llevar acabo la purificación y elucidación estructural de los compuestos puros obtenidos de la cepa AMS-365 CNY-331.

5. METODOLOGÍA

5.1 Área de estudio

El Golfo de California (GC) o Mar de Cortés, es una extensión del océano Pacífico, está ubicado entre la península de Baja California y los estados de Sonora y Sinaloa al noroeste de México. Tiene una longitud de 1100 Kilómetros (km) y su anchura varía entre los 80 y 209 km con un área aproximada de 210 000 km². Es un mar semicerrado subtropical, que contiene uno de los más grandes ecosistemas costero-marino con mayor productividad, diversidad biológica y endemismos en el mundo. Está caracterizado por un gradiente lateral fuerte de productividad biológica con niveles altos en el noroeste-centro y de moderada a baja en el sureste. Además, el potencial turístico y los recursos pesqueros lo convierten en una región económica y comercial muy importante para el país (Cervantes-Duarte, y otros 2000).

Las muestras fueron colectadas de Bahía de los Ángeles (Fig. 8) área marina protegida localizada en la región norte del GC. Es la bahía más profunda del GC con extensión marina de 3,879.57 Km² y profundidad promedio de 40 m, presenta ambientes de humedal y manglar (Bourillón y Torre 2012). Con valores de temperatura entre los 15 - 29.8 °C y de salinidad que varían entre 32.25 - 35.55. Las mareas son activas y fuertes a lo que posee características distintas a otras bahías y lagunas costeras de la región (Canino-Herrera, Gaxiola-Castro y Segovia-Zavala 1990).



Figura 8. Área de estudio, Bahía de los Ángeles Baja California (Cuadro azul), estación de colecta de AMS-365 CNY-331 (E28-globo azul).

5.2 Colecta de sedimento

Las muestras fueron colectadas en abril del 2008 (Torres-Beltrán, y otros 2012) mediante buceo libre o con el uso de una draga de acero inoxidable Kahlisco de 12 cm de diámetro. La técnica de recolección estuvo en función de la profundidad del sitio muestreado. Se tomaron 9 muestras de sedimento de Bahía de los Ángeles, dentro de estas muestras se aislaron diferentes actinobacterias entre ellas del Género *Salinispora* sp. la especie *S. pacífica* la cepa AMS-365 (Actinomiceto Marino *Salinispora*-AMS), codificada así para el cepario de la UABC y CNY-331 (Control Número Letra de secuencia (A,B,C...)-CNY) para el laboratorio del Center for Marine Botechnology and Biomedicine SCRIPPS Institution of Oceanography UCSD.

5.3 Aislamiento, cultivo y preparación del extracto AMS-365 CNY-331

La cepa AMS-365 CNY-331 fue colectada en Bahía de los Ángeles B.C. a una latitud de 28°57'11.46"N y longitud de 113°25'51.12"W para la estación E28 con una profundidad de 250m (Fig. 8). Una vez en el laboratorio, las muestras de sedimento se descongelaron y se tomaron sub-muestras de aproximadamente 5 g de sedimento; siendo transferidas a cajas Petri previamente esterilizadas. Todas las muestras se pusieron a secar bajo una campana de flujo laminar durante 24 h. Posteriormente, las muestras secas se pulverizan con un mortero estéril y se inoculan con la técnica de estampado en placa. Se posó una esponja estéril de 1 cm de diámetro sobre el sedimento para después estamparse sobre el medio de cultivo previsto en la caja Petri, enseguida se siguió estampando en forma de círculo hasta cubrir toda la caja Petri a manera de dilución, de tal manera que el primer círculo estampado contenía mucho más sedimento que el último (Fig. 9A) (Mincer *et al.*, 2002). Las cajas Petri se dejaron incubar por un periodo de 3 a 4 semanas hasta la aparición de colonias. Estas colonias fueron traspasadas a medio de cultivo sólido A1 (agar 18 gL⁻¹, almidón 10 gL⁻¹, peptona 2 gL⁻¹, levadura 4 gL⁻¹) (Fig. 9B). Finalmente, las cepas puras se transfirieron a 10 mL de medio líquido A1 y se incubaron a una temperatura de 25 °C con rotación continua de 215 rpm durante 3 a 5 días (Fig. 9C). Se procedió a realizar una inoculación con un volumen mayor a 1L y se dejó en agitación constante a 215 rpm con intervalos de temperatura de 25-28 °C, por un periodo de 8 a 10 días, para la obtención de extractos orgánicos.

Al llegar al periodo establecido de 8 a 10 días; se le adicionó amberlita XAD7 (20 a 30 gL⁻¹ de cultivo) al final del día 8 con duración de 12 a 18 horas, posteriormente se realizó la extracción al inicio del día 9, se filtró a través de gasas y por papel filtro Whatman grado 802 de 12.5 cm de diámetro. Al sólido que contiene la resina con las células bacterianas presentes en el filtro, se le realizó una extracción con un disolvente de polaridad media, acetona (C₃H₆O), a la parte acuosa se le aplica una segunda extracción con acetato de etilo (AcOet). Finalmente, el disolvente se evaporó mediante destilación a presión reducida (rotoevaporador marca Buchi modelo 461 con una bomba de vacío Vacuubrand modelo CVC2), y se colocó en un vial de vidrio borosilicato con capacidad de 20 mL, envuelto de aluminio y refrigerado a -20 °C para su posterior separación cromatográfica.

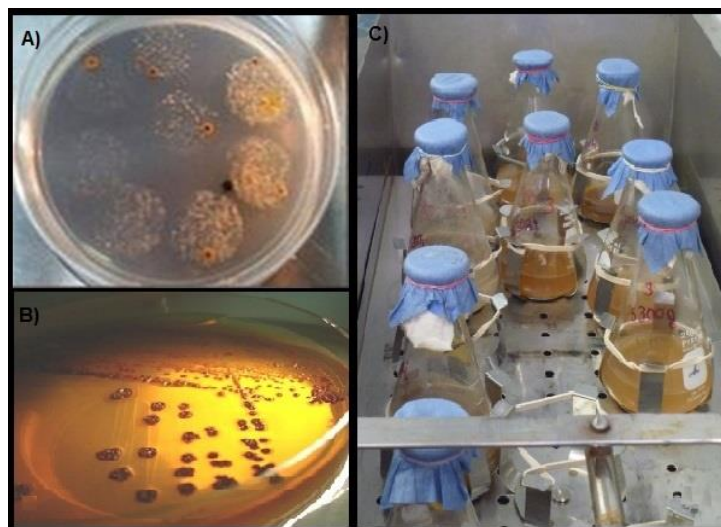


Figura 9. Aislamiento y cultivo de actinobacterias, A) Estampando en círculo de actinobacterias en cajas petri a manera de dilución. B) Cepa pura del género *Salinispora* sp. C) Medio de cultivo líquido en agitación constante.

5.4 Separación por cromatografía

El extracto crudo se pesó y se disolvió en AcOet, se le agregó una cantidad considerable de gel de sílice fase normal 60 Å de 0.2 mm, el disolvente es extraído por medio de destilación a presión reducida, para la obtención del extracto crudo en polvo (el cual se introdujo en la columna cromatográfica). Se armó el sistema de separación de cromatografía en columna (CC), utilizando una columna de vidrio marca Kontes glass de 40x450 mm con capacidad de 250 mL, con gel de sílice fase normal (gel de sílice 60Å de 0.2mm) hasta su capacidad media y finalmente se procedió a introducir el extracto crudo en la columna (Fig. 10A). Para el gradiente de disolventes, se utilizaron 3 de diferentes polaridades (baja, media y alta): isooctano (C_8H_{18}), acetato de etilo (AcOet) y acetonitrilo (ACN) para generar un gradiente en fase normal de polaridad menor a mayor, todo bajo condiciones de vacío (flash) para acelerar la obtención de fracciones. Se utilizó un volumen de 200 mL para cada fracción, se colectaron en matraces bola de vidrio de 250 mL marca Glassco de 14/20 y se llevaron a sequedad mediante destilación a presión reducida (Fig. 10B). Las fracciones resultantes se almacenaron en viales ámbar de vidrio borosilicato de 17x60 mm con capacidad de 7.5 mL (Fig. 10D). Las fracciones se monitorearon por medio de cromatografía en capa fina (Thin Layer Chromatography - TLC) placas de gel de sílice 60 Å F_{254} con una capa de espesor de 0.2 mm, de 7x3 cm. Las fracciones fueron punteadas con micropipetas de 0.4 mm y 64 mm de longitud. Para la detección de los compuestos se utilizaron dos

técnicas diferentes: luz Ultra Violeta (UV) (lámpara marca 5100 Walnut Grove) y vapores de yodo.

Las fracciones de interés (para un posterior análisis se debe de considerar su concentración (mg) y los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)) se purificaron por medio de TLC, placas de gel de sílice 60 Å F₂₅₄ de vidrio semipreparativas de 20x20 cm (Fig. 10C) y por cartuchos de extracción Alltech (Columna de extracción en fase solida (SPE)) Extraer-Clean™, fase normal de sílice 60 Å y 50 µm.

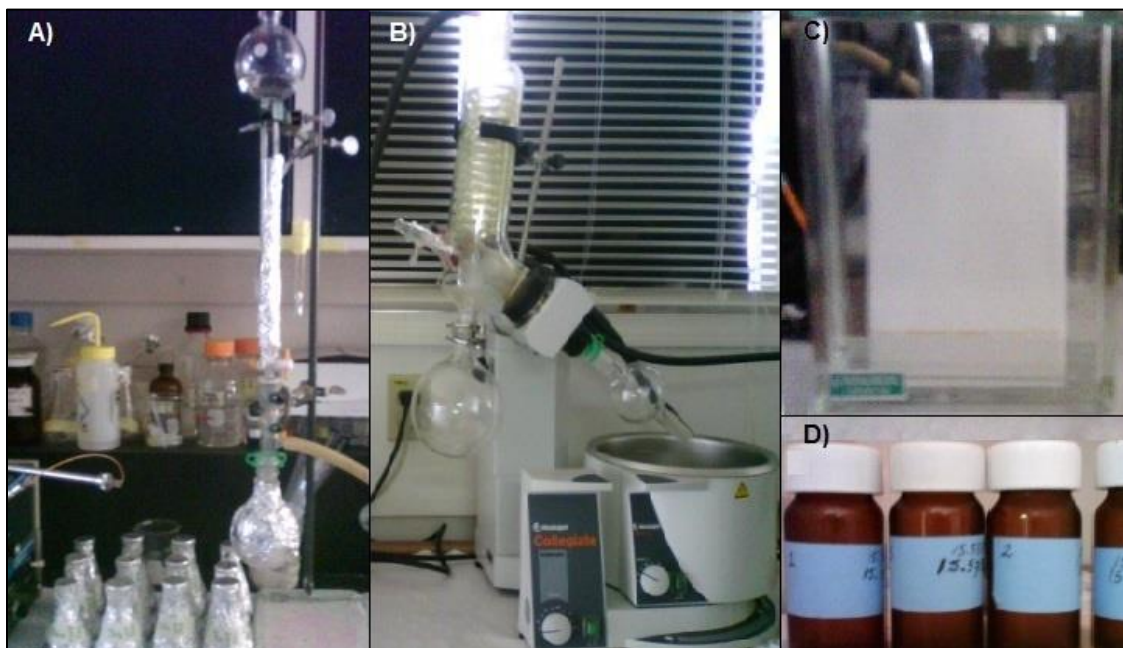


Figura 10. Proceso de obtención de fracciones, A) Cromatografía en columna B) Concentración de fracciones por destilación a presión reducida, C) purificación de compuestos por cromatografía en capa fina (placa de 20x20 cm) y D) Viales ámbar.

5.4.1 AMS-365 CNY-331

Debido a que la cepa AMS-365 CNY-331 se degrada con la luz y con el disolvente metanol (MeOH), las condiciones en el laboratorio deben ser cuidadas al extremo para asegurar la estabilidad de los compuestos dentro del extracto; durante la separación, purificación y finalmente en los análisis para la determinación estructural.

Se realizaron 3 metodologías de purificación con 3 extractos con relación al peso de los crudos (mg), el primer extracto (extracto1) de 35 mg, fue realizado el 29 de noviembre del 2011 (Fig. 11-color verde) en donde se encontraron 4 compuestos importantes de las fracciones 2, 10, 13 y 15 (Fig. 11), para la segunda separación el extracto2 de 47 mg es analizado el 07 de febrero del 2012 (Fig. 11-color azul), obteniendo 8 compuestos interesantes de las fracciones 2, 3, 4, 5, 7, 12, 14 y 15 (Fig. 11). Al coincidir 2 de estos 8 compuestos (Fig. 11-color morado) ya encontrados en noviembre 2011, se obtiene una guía de trabajo para la separación e identificación. Finalmente, para el 30 de enero del 2014 se tiene un extracto3 con una cantidad considerable de 751.5 mg para la realización de una metodología más completa (Fig. 11), obteniendo 11 compuestos puros del extracto crudo.

El extracto crudo (751.5 mg) fue fraccionado mediante CC fase normal en condiciones de vacío (flash), con cantidades puras (100% de disolvente) y mezclas de disolventes de 200 mL C₈H₁₈, AcOet y ACN (Fig. 11). Se obtuvieron 20 fracciones de la CC, para el proceso de purificación se seleccionaron aquellas que presentaban mayor

concentración y que sus espectros de RMN fueran interesantes* (*que su desplazamiento químico (δ) estuviera en campo medio a bajo, como señales para oxígenos, nitrógenos, alcoholes, alquenos, aromáticos, ácidos carboxílicos, entre otros).

El *factor de retención* (R_f), se adquiere por medio de TLC en donde se puntea el compuesto en placas de gel de sílice con base de aluminio fase normal de 7x3 cm (fase estacionaria). Se vierte aproximadamente 1 cm de disolvente (depende de la afinidad del compuesto a la fase móvil, será el disolvente a utilizar) en la cuba y se deja correr una distancia considerable la cual es marcada al finalizar la corrida. La distancia recorrida por el compuesto es medida desde el punto de aplicación hasta el centro de la mancha, el valor máximo que puede alcanzar el R_f es de 1, lo ideal es que presente valores de 0.5 a 0.7 siendo adimensional.

La retención y la selectividad en la separación dependen de la polaridad del compuesto y la naturaleza del disolvente, para calcular el R_f se aplica a la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por el compuesto (X)}}{\text{Distancia recorrida por el eluyente (y)}}$$

El compuesto 2-2.5H-13 (11.2 mg) (Color amarillo en UV y a la vista, con olor fuerte a extracto y un R_f de 0.4157), obtenido de la CC a 90:10 a C_8H_{18} :AcOet, se le realizó una separación sólido-disuelto ya que se observó un precipitado (sólido-blanco); todo lo que estaba disuelto se extrajo (2.5H) y se purificó por medio de TLC

semipreparativa de 20x20 cm con una mezcla de disolvente C_8H_{18} :AcOet 3:1, lo que reveló en UV (señales para 13 compuestos) es extraído de la sílice y colocado en viales ámbar previamente pesados. Posteriormente, se sometieron a análisis de RMN 1H , ^{13}C , 2D y espectrometría de Gases-Masas (MS) (Fig. 11).

El compuesto 3C (5.5 mg), Cristales en forma de aguja y Rf de 0.4716, obtenido inicialmente de CC con una polaridad de C_8H_{18} :AcOet 80:20, se separó por medio de gradiente al observar cristales, primero aquello que disolvió en Hexano (C_6H_{14}), seguido de C_8H_{18} y por último en cloroformo ($CHCl_3$). Los cristales se recrystalizaron hasta formar un cristal más grande y uniforme*. Finalmente, fueron sometidos a RMN 1H , ^{13}C y MS (Fig. 11).

Los compuestos 4-4 (1.1 mg), 4-6 (2.6 mg) y 4-7 (2.3 mg), estos compuestos se obtuvieron de CC con una polaridad de C_8H_{18} :AcOet a 75:25 y consecutivamente, se realizó una TLC de C_8H_{18} :AcOet de 3:1 en donde se observaron 11 compuestos en el UV, se extrajeron de la gel de sílice y se analizaron por RMN y MS. El compuesto 4-4, presentó un color amarillo en UV y a la vista con Rf de 0.6588, este compuesto se sometió a análisis de RMN 1H , ^{13}C , 2D y espectrometría de Gases-Masas (Fig. 11). El compuesto 4-6, presentó un color amarillo solo en onda corta en el UV con un Rf de 0.7529 se analizó en RMN 1H , ^{13}C y MS. Por último el compuesto 4-7 de color amarillo en UV y a la vista con olor fuerte al crudo tiene un Rf de 0.7529 se analizó en RMN 1H , ^{13}C y MS.

Los compuestos 7-4 (8 mg) y 7-7 (1.9 mg), al incrementar la polaridad en la CC a C_8H_{18} :AcOet 50:50, se obtuvo una fracción la cual se separó por gradiente con C_6H_{14} y el residuo $CHCl_3$. Posteriormente al residuo no disuelto de color blanco se disolvió con diclorometano (DCM). A la fracción de $CHCl_3$ se le realizó una separación mediante TLC semipreparativa 20x20 cm con una mezcla de C_8H_{18} :AcOet 1:4, en la cual se observaron 10 compuestos al irradiarse con luz UV, y por último se analizaron por RMN y MS. El compuesto 7-4, de color anaranjado en onda larga y amarillo a la vista con R_f de 0.45445 se analizó en RMN 1H , ^{13}C y MS. Y el compuesto 7-7, color amarillo en UV y a la vista con olor fuerte y R_f de 0.6181 se analizó en RMN 1H , ^{13}C y MS (Fig. 11).

El compuesto 9, 10, 11 (24.3 mg) y 12, Se obtuvieron de la CC a una polaridad de C_8H_{18} :AcOet de 45:65 a 10:90, por similitud de las fracciones en TLC en placas de 7x3 cm se juntaron en un vial ámbar. Después se separó por fase sólido y líquido por medio de DCM, la parte líquida disuelta en DCM es la fracción codificada como 41 y la parte no disuelta es la 11s, por último se analizaron por RMN y MS. El compuesto 11s, es un sólido amorfo de color blanco, se separó por medio de lavados con DCM hasta que se le fue el color anaranjado de la fracción 41, se analizó por medio de RMN 1H , ^{13}C y MS (Fig. 11).

Los compuestos 42-12 (4.4 mg) y 42-16 (8.2 mg), se obtuvieron de la CC de 3 fracciones, la 13 de AcOet 100%, la 14 de AcOet:ACN 95:5 y por último de la fracción 15 de AcOet:ACN 85:15, se puntaron en TLC en placas de 7x3 cm y resultaron ser iguales a lo cual se colocaron en un vial ámbar con la nomenclatura de 42-CNY331.

Posteriormente se procedió hacer una columna de extracción en fase sólida SPE, fase normal abierta por gravedad con gradiente de polaridad con 4 disolventes C₆H₁₄, C₈H₁₈, AcOet y ACN. La fracción 42 de cantidad de 56.5 mg se separó por SPE y obtuvieron 21 fracciones. El compuesto 42-12, color amarillo y olor fuerte a extracto, se obtuvo de la columna SPE con una polaridad de C₈H₁₈:AcOet 90:10 y por último se analizó por medio de RMN ¹H, ¹³C y MS. Para el compuesto 42-16, color amarillo, se obtuvo de la CC-SPE con una mezcla de C₈H₁₈:AcOet 50:50 y se analizó por RMN ¹H, ¹³C y MS (Fig. 12).

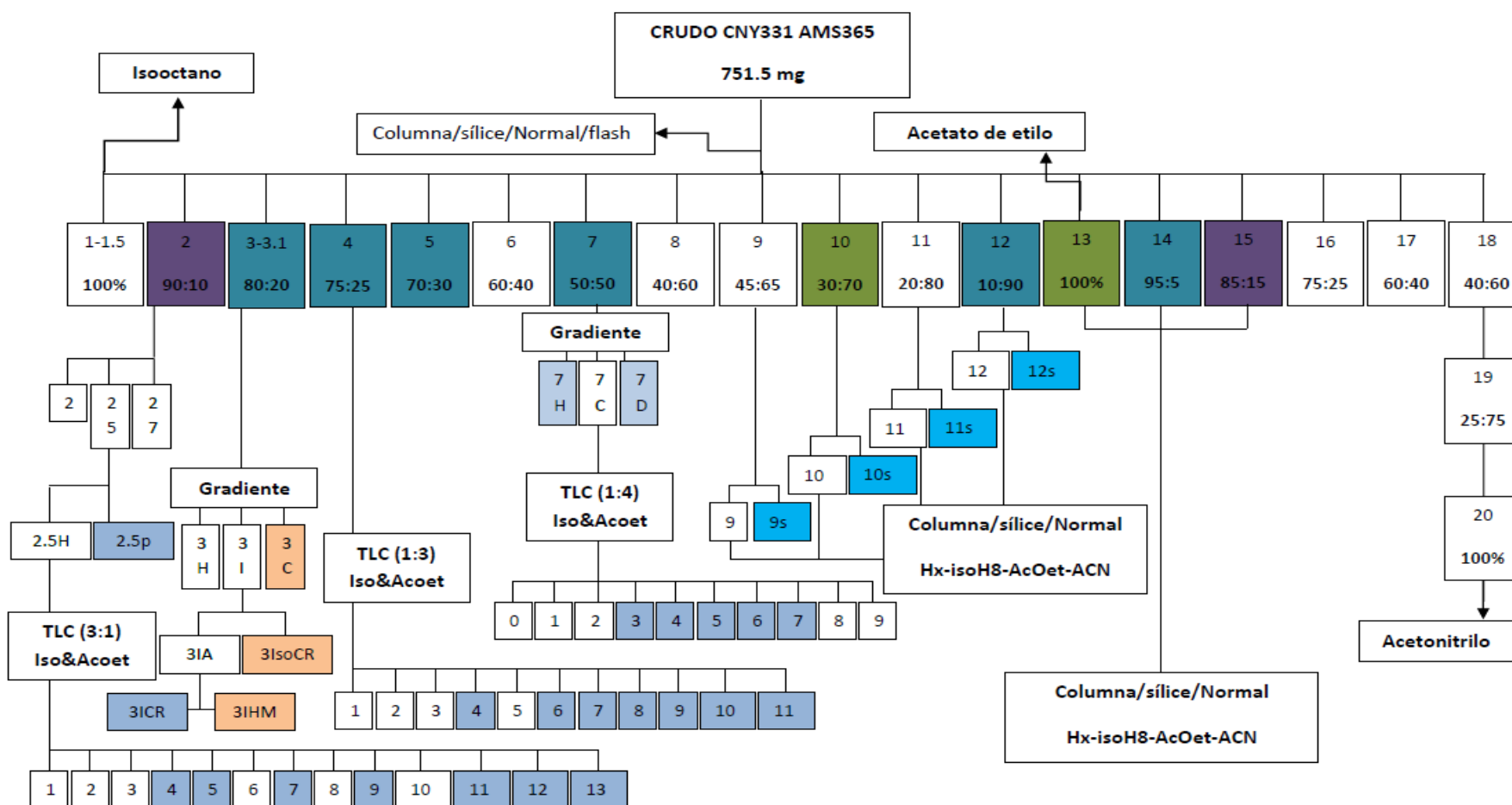


Figura 11. Diagrama de flujo, separación y purificación de compuestos del crudo AMS365 CNY331, ([extracto1](#), [extracto2](#), [ambos extractos](#), [compuestos puros](#), [cristales](#), [precipitado solido-blanco](#)).

Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica*

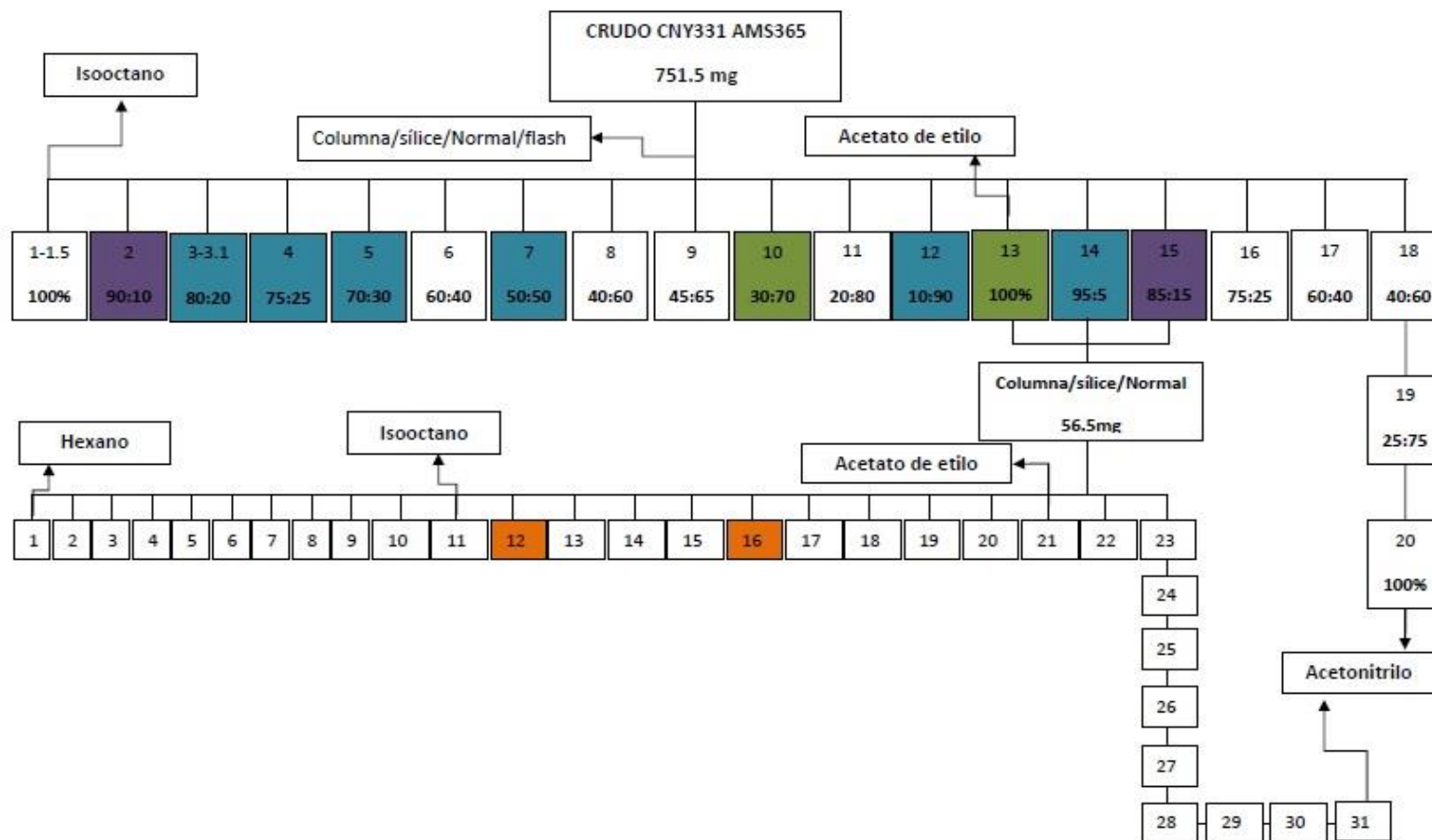


Figura 12. Diagrama de flujo, separación y purificación de compuestos del crudo AMS365 CNY331, ([extracto1](#), [extracto2](#), [ambos extractos](#), [Compuestos puros](#)).

5.5 Elucidación estructural

5.5.1 Infrarrojo

Con el fin de conocer los principales grupos funcionales de la estructura molecular de los compuestos se hicieron análisis de infrarrojo en un espectrofotómetro de IR, marca Perkin-Elmer modelo spectrum 100 FT-IR. Se utilizó el método de película que consiste en disolver la muestra en CHCl_3 y se agregan solo unas gotas a la placa de cloruro de sodio (NaCl) de 0.5 cm de espesor, se deja evaporar el disolvente por completo y finalmente se corre el espectro de la muestra. Obteniendo un espectro que indica los grupos funcionales en forma de bandas (débil, media y fuerte), con transmitancia (%) en el eje “x” y número de ondas ($\tilde{\nu} = \text{cm}^{-1}$) en el “y”.

5.5.2 Resonancia Magnética Nuclear

Es una técnica espectroscópica basada en las propiedades magnéticas de la materia y aplicada a cualquier sustancia química en estado líquido o sólido que contenga núcleos con espines nucleares. Los compuestos son sometidos a análisis en una dimensión (1D) y de dos dimensiones (2D), identificando átomos de hidrógeno y de carbono ya que son los más abundantes en los compuestos orgánicos. Los espectros de 1D nos ayudan a identificar los tipos de señales de hidrógenos (^1H) y carbonos (^{13}C) que se encuentran presentes en el compuesto. Asimismo, el 2D hace referencia a las correlaciones homonucleares (^1H - ^1H) y heteronucleares (^1H - ^{13}C).

La correlación espectroscópica (CORrelated SpectroscopY) de núcleos de la misma especie (^1H - ^1H -COSY), genera un diagrama de contornos protón vs protón en modo absoluto, empleando una relación $(\text{Real}^2 + \text{imaginario}^2)^{1/2}$ y no requiere de ajustar ninguna dimensión. Por otra parte, las correlaciones heteronucleares son detección indirecta en fase sensible, en donde se observa al protón que es el núcleo más sensible y lo incrementa al doble. La correlación heteronuclear a un enlace de distancia (^1H - ^{13}C -HSQC-Heteronuclear Simple Quantum Coherence), genera un espectro de contornos que relaciona hidrógenos y carbonos a un enlace de distancia y la correlación heteronuclear a dos y/o tres enlaces de distancia (^1H - ^{13}C -HMBC-Heteronuclear Multiple Bond Coherence), muestra la correlación de hidrógenos y carbonos a 2 o 3 enlaces por medio de un gráfico de contornos.

El equipo utilizado son espectrofotómetros Bruker, mod. Avance de 300, 400 y 500 megahertz (MHz), la muestra (se compone de un soluto y un solvente, el solvente debe de ser deuterado) fue colocada en tubos *Standard Series*TM NMR tipo 1 ASTM Clase B, comúnmente llamados N-51A de 500 MHz con 0.42 cm de diámetro y 17 a 20 cm de longitud. Como referencia a cero se emplea tetrametil silano ($\text{TMS}-(\text{CH}_3)_4\text{Si}$). Así mismo, las muestras son corridas con deuterocloroformo (CDCl_3), que tiene un δ de 7.27 (protón) y 77 (carbono) en unidades de partes por millón (ppm) ya establecidos. Para la adquisición del resultado burdo del equipo de RMN es un archivo de datos .FID, a lo que se utilizó el software ACDLABS 12.0 (Advanced Chemistry Development) para obtener los espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC y HMBC. Con un programa interno

llamado ACD/NMR 1D y 2D se procede a la determinación de δ , tipos de señales (singuletes, dobles, triples, etc.), constantes de acoplamiento (J-Hz), integraciones y demás información que ayude a la elucidación estructural.

5.5.3 Cromatografía Líquida/Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas (MS), es una técnica de análisis cualitativo, para la determinación de estructuras orgánicas, por medio del peso molecular (PM) y su patrón de fragmentación (PF), en consecuencia un MS es información bidimensional que representa un parámetro relacionado la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga. Con el objetivo de determinar el PM de los compuestos se realizaron MS por medio de un cromatógrafo de líquidos con detector de masas (LC/MS) Hewlett-packard MSD 1100 en una columna de C-18RP con el método estándar. Los MS obtenidos son procesados por el programa AMDIS_32 versión 2.71, ya que los espectros adquiridos directamente del aparato deben de ser convertidos de agilent.d a mzXML, así mismo se utilizó el programa insilicos versión 1.5.4 (Life Science Software) para una segunda confirmación del PM. Ambos programas AMDIS_32 e Insilicos sirven para el procesamiento del cromatograma y del espectro, en donde se observa el o los picos obtenidos en el cromatograma referenciados a un tiempo de retención (t_R , min) a lo que despliega un espectro específico del pico (t_R y PM) y así determinar el peso molecular (ion molecular, M^+) como las pérdidas lógicas dadas por el patrón de fragmentación para determinar la estructura del compuesto.

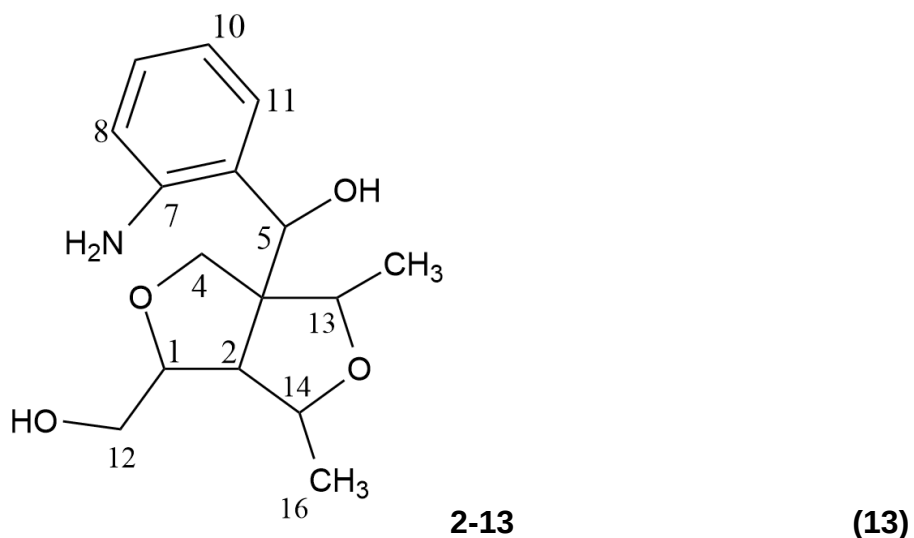
5.5.4 Estructura

Para la representación de la estructura química se utilizan los softwares ACDLABS 12.0 con el programa ChemSketch y ChemBioDraw Ultra 12.0, en donde se observa el orden espacial (geometría molecular) y el modo en que se enlazan los diferentes átomos o iones que forman la molécula (estructura molecular). El programa ChemSketch es una herramienta que facilita el ordenamiento de la estructura en un plano y en 3D, también le da movimiento a la estructura. Por otra parte, ChemBioDraw genera predicciones de espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de la estructura, proporcionando así sus δ , PM, fórmula química, iones importantes como M^+ , M^{+1} y M^{+2} (m/z).

6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Compuesto 2-2.5H-13

El compuesto 2-13 se aisló como un sólido amorfo color amarillo de 11.2 mg, con un olor característico al crudo y R_f de 0.4157. Por análisis de Gases-Masas se obtuvo un cromatograma que muestra un compuesto de mayor abundancia a los 28.64 min. En su MS se observa el pico padre o ion molecular a m/z 293 [M^+] y al pico base en m/z 149, que indica una fórmula molecular $C_{16}H_{23}NO_4$ con 6 grados de insaturación.



El espectro de $^1\text{HRMN}$ (400 MHz, CDCl_3) (Tabla I, Anexo 2) presentó una serie de señales a campo bajo en δ 8.0, 7.5 y 7.4 (dd, m y t) ppm las cuales son señales características de protones cercanos a nitrógenos (Amina primaria o secundaria, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}-$) y señales de protones aromáticos (C_6H_6). Señales a campo medio indican protones de enlaces vinílicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$), así como de grupos hidroxilo (OH) en δ 5.3,

4.5, 4.3-4.1 y 3.9-3.6 (m, m, dd-dd y dt-dt-dt) ppm. Sin embargo, la presencia de un singulete a δ de 1.26 ppm en campo alto es característico de un grupo metilo ($-\text{CH}_3$) o puede indicar la presencia de metilenos ($-\text{CH}_2$), ya sean dos o más con desplazamientos iguales. Así como señales característicos de metilos ($-\text{CH}_3$) en δ .1.62 y 0.90 (s br y m) ppm.

Por medio de la determinación del espectro de ^{13}C RMN (Tabla I, Anexo 2), se observan 16 carbonos, con señales en campo bajo para aromáticos (C_6H_6) y para protones de alquenos como enlaces vinílicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$) δ 132, 129 y 128 (s, dd y s) ppm. Así como señales de carbonos cercanos a oxígeno, nitrógeno y de dobles enlaces ($-\text{C}=\text{C}-$), con δ de 72, 69, 63, 62 y 61 ppm de grupos hidroxilo ($-\text{OH}$), amidas primarias o secundarias ($-\text{NH}-$) y de carbonos del tetrahidrofurano ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$). Por ultimo señales para metinos, metilenos y metilos en δ de 39 – 31, 29, 24-22 y 14 ppm ($=\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$).

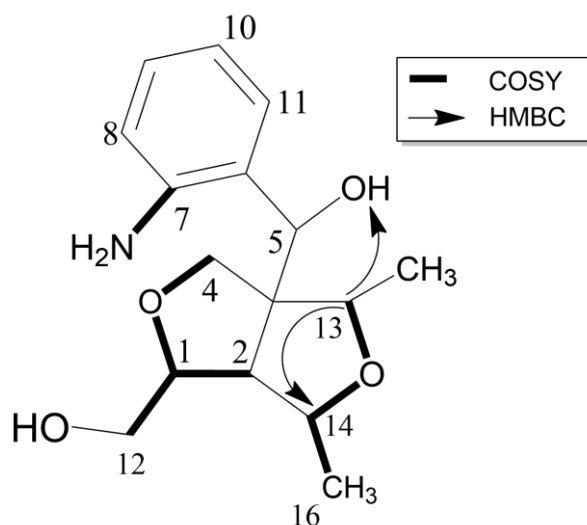


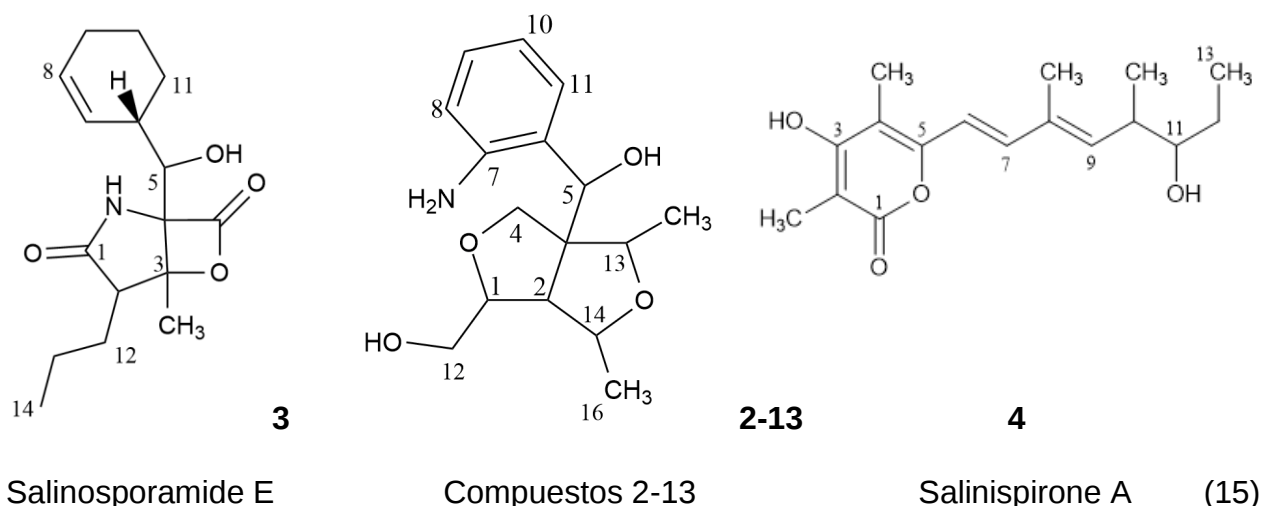
Figura 14. Estructura propuesta para el compuesto 2-13 con base a las correlaciones observadas en los espectros de 2D-RMN.

El análisis de 2D ^1H - ^1H COSY RMN (Tabla I, Anexo 3) presento correlaciones importantes que indicaron la conformación estructural del compuesto. La relación entre hidrógenos del tetrahidrofurano en C1, C2, C4 y con el C12 que es el radical que sostiene el hidroxilo. Así como la correlacion con el otro tetrahidrofurano conjugado en los carbonos C13, C14 y del C16 un radical metilo, demostrando así una correlación marcada en los ciclos. Asimismo se determinó que la amina primaria ($-\text{NH}_2$) se encontraba sostenida por el benceno en forma orto. El análisis de 2D ^1H - ^{13}C HMBC RMN (Anexo 3), se correlacionó el C13 con el OH^- de 5.3 ppm y el C14, generando que en el espacio estos elementos se encuentren del mismo lado.

Tabla I. Datos espectrales de RMN para el compuesto 2-13 a 400 MHz.

C/H	2-13 δH multiplicidad (J en Hz)	2-13 δC	COSY	HMBC
1	4.14 dd (12, 4)	63.9, CH	H1-H4	
2	3.73 dt (8.8, 2)	61.8, CH	H2-H1	
3		31.86, C		
4	4.29 dd (12, 4)	62.1, CH_2	H4-H1	
5	5.24 m	69, CH		
6		128.16, C		
7		132.8, C	H7-NH	
8	7.7, m	129.8, CH		
9	7.52, m	126.9, CH		
10	7.71, m	128.16, CH		
11	7.7, m	129.8, CH		
12	4.50 dt (9.6, 1.2)	63.9, CH_2	H15-H4	
13	3.62 dt (9.6, 1.2)	72.09, CH	H13-H14-H6	
14	3.88 dt (9.6, 1.2)	68.7, CH	H14, H15, H16	
15	1.24 s	29.5, CH_3		H13, H14-C13- OH_5
16	1.24 s	29.5, CH_3		H14, H13, C13- OH_5
NH_2	8.03 d (8.0)		NH-H7	
OH_5	5.3 m			OH_5 , H14, H13, C13
OH_{12}	2.16 s			

Se encontró que el compuesto aislado (2-13) es similar a los compuestos: Salinosporamide E (3) de *S. tropica* y Salinispironone A (4) de *S. pacifica*, en referencia a su masa molecular de 293 gr/mol. La fórmula molecular de **3** es de $C_{16}H_{23}NO_4$ con un PM 294.17 gr/mol $[MH^+]$ y el **4** tiene una FM de $C_{17}H_{24}O_4$ con PM 293.17 gr/mol $[MH^+]$ (4) (Reed, y otros 2007); (Oh, y otros 2006) (Fig. 15). Sin embargo, al evaluar los datos espectrales obtenidos del análisis de 1H , ^{13}C -RMN y 2D-RMN (COSY y HMBC) (Tabla 1), se comprobó que es un compuesto diferente a estos dos (3 y 4).



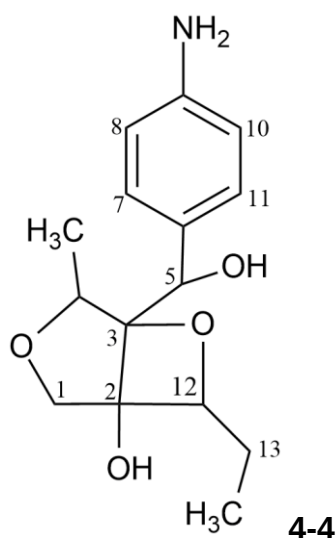
Analizando la información obtenida de la molécula tiene una masa molecular de 293.15 gr/mol, de los cuales 192 uma (unidades de masa atómica) corresponden a 16 carbonos, 23 uma a 23 hidrógenos, 14 uma de un nitrógeno de la amina primaria que sostiene como radical en forma orto el benceno. Y por último 64 uma a 4 oxígenos que se dividen en: 2 tetrahidrofuranos conjugados y a 2 grupos hidroxilos, uno como radical en el C5 y el otro como radical hidroximetil en C1. Lo que sugiere una fórmula molecular

de $C_{16}H_{23}NO_4$ con 6 grados de insaturación, lo cual concuerda con la estructura propuesta (2-13).

Aunque la molécula tenga el peso similar a Salinosporamide E de *S. tropica* y Salinispyrone A de *S. pacifica*, visualmente y por medio del análisis de RMN se comprueba que son diferentes, asimismo no hay registro de la similitud o igualdad en la estructura propuesta en relación con *S. tropica*, *S. pacifica* o con otro filotipo de la misma a lo que sugiere que sea un compuesto nuevo para *Salinispora* sp.

6.2 Compuesto 4-4

El compuesto 4-4 se aisló como un sólido amarillo de 1.1 mg, con un R_f de 0.6588. En el cromatograma obtenido de Gases-Masas se observa un pico mayoritario con tiempo de retención en 27.32 min. En el MS se observa el pico padre o ion molecular a m/z 279 $[M^+]$ y al pico base en m/z 149, que indica una FM de $C_{15}H_{21}NO_4$ con 6 grados de insaturación.



(16)

El espectro de $^1\text{HRMN}$ (400 MHz, CDCl_3) (Tabla II, Anexo 5) presentó una serie de señales a campo bajo en δ 7.7, 7.5 y 6.8 (dd, dd y s) ppm las cuales son señales características de protones cercanos a nitrógenos (Amina primaria o secundaria, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}-$) y de señales para protones de heterocíclicos saturados (Aromáticos, C_6H_6). Señales a campo medio que indican hidrógenos de enlaces vinílicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$), así como de protones cercanos a oxígenos, ya sea señal para tetrahidrofuranos ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$), oxetano (C_3H_6) y/o grupos hidroxilo (OH^-) en δ 4.4, 4.1, 3.8, 3.6 y 2.68 (dd, m, m, m, dd)

Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica*

ppm. Sin embargo, la presencia de un singulete a δ de 1.61 ppm en campo alto es característico de un grupo metilo ($-\text{CH}_3$), como para él desplazamiento de la multiplete en 0.96 ppm. La señal con δ en 1.66 (m) ppm indica la presencia de un metileno ($-\text{CH}_2-$). Lo que genera que la molécula tenga una variedad de conformaciones para metinos ($=\text{CH}-$), metilenos ($-\text{CH}_2-$) y metilos ($-\text{CH}_3$).

Por medio de la determinación del espectro de ^{13}C RMN (Tabla II, Anexo 6), se observan 14 carbonos, con señales en campo bajo para aromáticos (C_6H_6) y protones de alquenos como enlaces vinílicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$) δ 106 y 105 ppm. Así como señales de carbonos cercanos a oxígeno, nitrógeno y de dobles enlaces ($-\text{C}=\text{C}-$), con δ de 70 y 64 ppm de grupos hidroxilo ($-\text{OH}$), amidas secundarias ($-\text{NH}-$) y como de tetrahidrofurano ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$). Por ultimo señales para metinos, metilenos y metilos en δ de 35 – 31, 29, 27, 18 y 14 ppm ($=\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$).

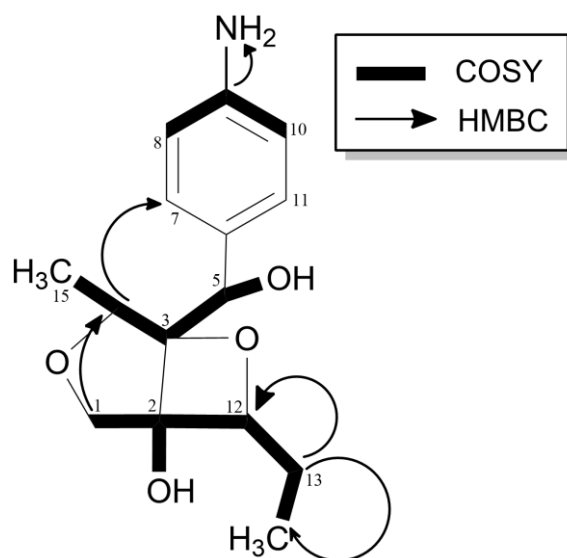


Figura 17. Estructura propuesta para el compuesto 4-4 con base a las correlaciones observadas en los espectros de 2D-RMN.

El análisis de 2D ^1H - ^1H COSY RMN (Tabla II, Anexo 7), muestra correlaciones que indican la conformación estructural del compuesto. La relación entre hidrógenos del benceno en C8 y C10, en donde se une la amida primaria ($-\text{NH}_2$) en el C9 en forma para. Así como la correlación en los hidrógenos del OH en C5, con el metino del C4 y el metilo en C-15. Asimismo, se observa la correlación entre el metileno C13 con el metilo en C14, el metino de C12 del oxetano y también con el grupo hidroxilo sostenido por el C2, así como C1 se correlaciona con el hidroxilo sostenido por C2.

El análisis de 2D ^1H - ^{13}C HMBC RMN (Anexo 7), se correlaciona carbonos con hidrógenos cercanos como en el caso del metileno en C13 correlaciona los hidrógenos del metil en C14 y metino en C12 del oxetano. Sin embargo, se correlaciona C1 con el hidrógeno del metino en C4 que se encuentra en el tetrahidrofurano, asimismo este hidrogeno en C4 se correlaciona con los hidrógenos de C7 del benceno. Y por último que él C9 observe los hidrógenos presentes en la amina primaria.

Tabla II. Datos espectrales de RMN para el compuesto 4-4 a 400 MHz

C/H	4-4 δ_H multiplicidad (J en Hz)	4-4 δ_C	COSY	HMBC
1	2.68, dd (18, 8.9)	76.12, CH	OH ₂	C4
2		84.46, C		
3		105.01, C		
4	4.24, dd (8.2, 5.4)	64.17, CH	H5, H15, OH ₅	C7
5	4.17, d (5.4)	70.23, CH	OH ₅ , H4	
6		105.71, C		
7	7.72, m	125, CH	H-8	C4
8	7.54, m	121.5, CH	NH ₂	
9		156.16, C		NH ₂
10	7.54, m	121.5, CH	NH ₂	
11	7.72, m	125.08, CH	H10	
12	4.4 dd (9.37, 7.42)	88.5, CH	H13, OH ₂	H12
13	1.66, m	35.92, CH ₂	H12, H14, OH ₂	H14, H13
14	0.96, m	13.63, CH ₃	H13	H13
15	1.61, s br	18.34, CH ₃	H4	
NH ₂	6.8, s		H8, H10	C9
OH ₅	3.8, m			
OH ₂	3.65, m			

Se encontró que el compuesto aislado (4-4) es similar al compuesto: Salinosporamide B (1) de *S. tropica*, en referencia a su masa molecular de 279 gr/mol. La fórmula molecular de **1** es de C₁₅H₂₁NO₄ con un PM 279.14 gr/mol [M⁺] (Williams, Buchanan, y otros 2005). Sin embargo, al evaluar los datos espectrales obtenidos del análisis de ¹H, ¹³C-RMN y 2D-RMN (COSY y HMBC), se puede decir que es un compuesto muy diferente a Salinosporamide B y que es nuevo para la especie *Salinispora pacifica* y por ende nuevo para el género *Salinispora sp.*

Analizando la información obtenida de la molécula tiene una masa molecular de 279.33 gr/mol, de los cuales 180 uma (unidades de masa atómica) corresponden a 15 carbonos, 21 uma a 21 hidrógenos, 14 uma de un nitrógeno de la amina primaria que sostiene el benceno en forma para. Y por último 64 uma a 4 oxígenos que se dividen en: 2 oxígenos en ciclos; uno como tetrahidrofurano y el otro como oxetano. Los otros 2 son de grupos hidroxilos, uno como radical en el C5 y el otro como radical en C2.

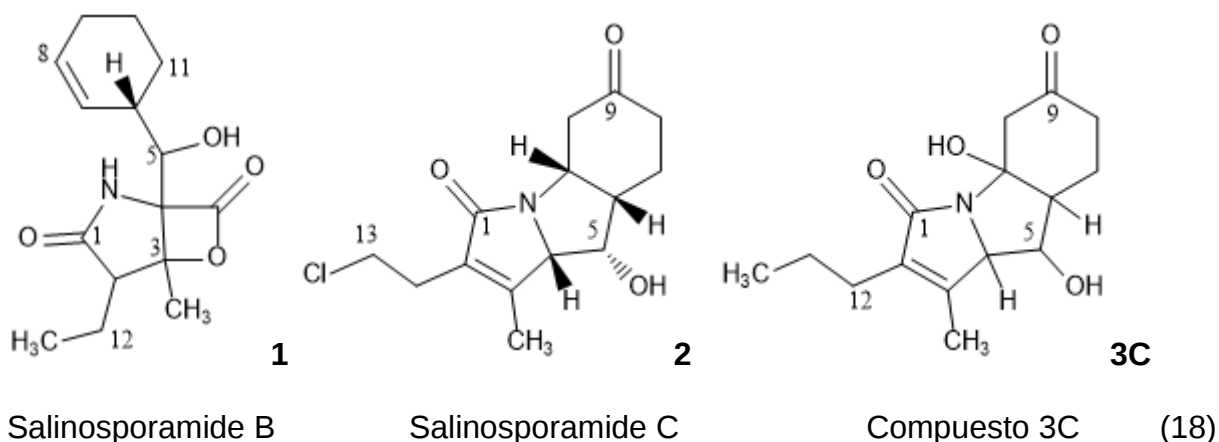
Lo que sugiere una fórmula molecular de $C_{15}H_{21}NO_4$ con 6 grados de insaturación, lo cual concuerda con la estructura propuesta (4-4).

Aunque la molécula tenga el peso similar a Salinosporamide B de *S. tropica*, visualmente y por de la conformación obtenida por medio de los análisis de RMN se comprueba que son diferentes. Asimismo, no hay registro de la similitud o igualdad en la estructura propuesta (4-4) en relación con las especies *S. tropica*, *S. pacifica* o con otro filotipo de la misma a lo que sugiere que sea un compuesto nuevo para el género *Salinispora sp.*

6.3 Compuestos no definidos en su totalidad

6.3.1 Compuesto 3C

El compuesto 3C se aisló como un cristal amorfo con forma de aguja con 5.5 mg, con un R_f de 0.4716. En el cromatograma se observa una señal de mayor abundancia con tiempo de retención de 25.453 min. Su MS establece que el pico padre o ion molecular a m/z 279 [M^+] y el pico base en m/z 149, que indica un PM de 279.33 gr/mol con una FM de $C_{15}H_{21}NO_4$, con 6 grados de insaturación.



El espectro de $^1\text{HRMN}$ (400 MHz, CDCl_3) (Tabla III, Anexo 9) presentó señales a campo bajo en δ 7.70 ppm la cual es señal características de protones cercanos a nitrógenos (Amina secundaria, $-\text{NH}-$) y/o aromáticos u oxígenos (C_6H_6 , $-\text{O}-$). Las señales a campo medio indican señales para protones con enlaces vinílicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$), grupos hidroxilo (OH) en δ 5.1- 5.5 y a 4.1 ppm. Así mismo, la presencia de un singulete a δ de 1.25 ppm en campo alto es característico de un grupo metilo ($-\text{CH}_3$).

Por medio de la determinación del espectro de ^{13}C RMN (Tabla III, Anexo 10), se observan 16 carbonos, con señales importantes en campo bajo para aldehídos, amidas y esterres con δ 208.79, 167.0 y 151.52 ppm (-HCO, -NH-, -O-). Así también señales importantes en δ 130.01 y 135.78 ppm para aromáticos y alquenos (-CH=CH-). Por ultimo señales para carbonos cuaternarios en δ de 63.90 – 67.32 ppm, metinos, metilenos y metilos en δ de 14.11 – 34.08 ppm (=CH-, -CH₂- y -CH₃).

Tabla III. Datos espectrales de RMN para 1, 2 a 300MHz y el compuesto 3C a 400 MHz.

C/H	1 $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ multiplicidad (J en Hz)	1 $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	2 $\delta_{\text{H}}^{\text{b}}$ multiplicidad (J en Hz)	2 $\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$	3C δ_{H} multiplicidad (J en Hz)	3C δ_{C}
1		176.9, C		176.9, C		166.99, C
2	2.72, dd (8.8, 5.8)	49.8, CH		128.5, C		135.78, C
3		86.3, C		157.2, C		130.01, C
4		79.3, C	4.23, d (8.2)	71.4, CH	4.14, m	67.32, CH
5	4.24, t (8.8)	70.4, CH	4.05, br t (8.2)	74.4, CH	3.72, d (2.3)	65.02, CH
6	2.90, m	38.7, CH	2.85, m	45.8, CH	1.63, br, m	37.05, CH
7	6.44, d (10.3)	128.2, CH	4.41, dt (6.4, 5.9)	53.7, CH		108.76, C
8	5.88, m	128.4, CH	3.0, m	45.5, CH ₂	5.31, m	63.91, CH ₂
9	1.92, m	24.7, CH ₂		210.1, C		208.79, C
10	1.39, m	21.1, CH ₂	2.34, m	38.5, CH ₂	2.05, m	31.91, CH ₂
11	1.72, m	25.9, CH ₂	2.35, m	20.5, CH ₂	2.35, t (7.4)	37.05, CH ₂
12	1.90, m	18.5, CH ₂	2.72, m	27.8, CH ₂	1.50, m	24.88, CH ₂
13	1.21, t (7.3)	12.3, CH ₂	3.83, m	43.6, CH ₂	1.30, m	22.66, CH ₂
14	2.05, s	20.2, CH ₃	2.09, br s	13.1, CH ₃	1.25, s	29.69, CH ₃
15		169.1, C			0.9, m	14.11, CH ₂
NH	10.42, br s					
OH					5.57, m	
OH	7.49, d (8.8)		7.47, br d		7.70, s	

^aSalinosporamide B y ^bSalinosporamide C, datos obtenidos de Williams y colaboradores del 2005.

Se encontró que el compuesto aislado es similar a Salinosporamide B (1) y salinosporamide C (2) de *S. tropica*, cuya fórmula molecular es de $C_{15}H_{21}NO_4$ con un PM 279.14 gr/mol (1) y FM de $C_{14}H_{19}ClNO_3$ con PM 284.10 gr/mol $[MH^+]$ (2) (Williams, Buchanan, y otros 2005). Ya que el compuesto aislado es un cristal amorfo (3C), puede ser un análogo o isómero de estos dos compuestos, por medio de la comparación de los análisis de MS y en sus S-RMN de 1H y ^{13}C . Para comprobar que es un análogo o un compuesto diferente a estos dos (1 y 2), hay que analizar el compuesto en 2D-RMN (COSY, HMBC y HSQC) y así mismo hay que determinar sus propiedades físicas, rotación específica, cambios en la absorción de lambda máxima, entre otras.

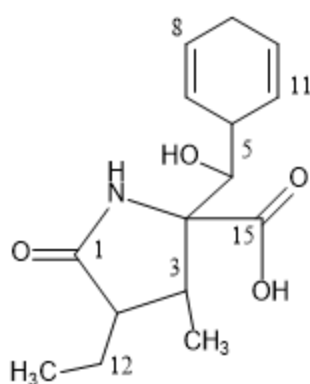
Analizando la información obtenida de la molécula tiene una masa molecular de 279.3315 gr/mol, de los cuales 180 uma (unidades de masa atómica) corresponden a 15 carbonos, 21 uma a 21 hidrógenos, 14 uma de un nitrógeno de una amina terciaria que se encuentra entre el ciclopentano y el ciclopenteno. Y por último 64 uma a 4 oxígenos que se dividen en: 2 carbonilos, uno en el ciclopenteno y el otro en ciclohexano. 2 grupos hidroxilos, uno en el ciclopentano y otro entre la conjugación del ciclohexano y el ciclopentano. Lo que sugiere una fórmula molecular de $C_{15}H_{21}NO_4$ con 6 grados de insaturación, lo cual concuerda con la estructura propuesta (3C).

Aunque la molécula tenga el peso similar a Salinosporamide B de *S. tropica* no hay registro de la similitud o igualdad de la estructura propuesta, en relación con *S. tropica* o con otro filotipo de *S. pacifica*, a lo que sugiere que sea un compuesto nuevo para *Salinispora* sp.

Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la Actinobacteria Marina *Salinispora pacifica*

6.3.2 Compuesto 7-7

El compuesto 7-7 se aisló como un sólido amarillo de 1.9 mg, con olor fuerte al extracto original y R_f de 0.6181. El cromatograma muestra una señal de mayor abundancia a 25.43 min que despliega un MS donde se observa que el pico padre o ion molecular es a m/z 279 [M^+] y al pico base en m/z 149, que indica un PM 279 gr/mol y FM de $C_{15}H_{21}NO_4$ con 6 grados de insaturación.



7-7

(19)

El espectro de 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) (Tabla IV, Anexo 12) presentó señales importantes ha campo bajo con δ 12.22, 10.54 y 7.52 ppm, con protones característicos de ácidos carboxílicos ($COOH$), carbonilos (CO), amidas secundarias ($-NH-$), aromáticos (C_6H_6) y para hidroxilos (OH) respectivamente. Señales ha campo medio que indican la presencia de protones cercanos a oxígenos (OH) con δ 4.11 ppm, así también los δ 6.09, 5.57 ppm pertenecen a enlaces vinílicos ($-CH=CH-$). Las señales a campo alto en δ 1.94 – 0.90 ppm son característicos de metinos ($=CH-$), metilenos ($-CH_2-$) y metilos ($-CH_3$).

En el espectro de ^{13}C RMN (Tabla IV, Anexo 13), se observan 14 carbonos, con señales importantes en campo bajo para ácidos carboxílicos (COOH), carbonos cercanos a amidas secundarias ($-\text{NH}-$) y oxígenos (OH^-) con δ de 181.78, 164.39 y 154.48 ppm, señales características de aromáticos y alquenos con enlaces vinílicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$) en δ de 125.75 ppm. Por ultimo las señales para carbonos cuaternarios en δ 64.68 ppm, como carbonos de metinos ($=\text{CH}-$), metilenos ($-\text{CH}_2-$) y metilos ($-\text{CH}_3$) en δ 13.34 – 29.70 ppm.

Tabla IV. Datos espectrales de RMN para 1 a 300 MHz y el compuesto 7-7 a 400 MHz.

C/H	1 $\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ multiplicidad (J en Hz)	1 $\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$	7-7 δ_{H} multiplicidad (J en Hz)	7-7 δ_{C}
1		176.9, C		164.39, C
2	2.72, dd (8.8, 5.8)	49.8, CH	2.05, s	49.73, CH
3		86.3, C	2.35, m	26.65, CH
4		79.3, C		64.68, C
5	4.24, t (8.8)	70.4, CH	4.11, s	73.48, CH
6	2.90, m	38.7, CH	2.70, m	38.87, CH
7	6.44, d (10.3)	128.2, CH	6.10, m	125.75, CH
8	5.88, m	128.4, CH	5.57, t (1.6)	125.8, CH
9	1.92, m	24.7, CH_2	2.70, m	25.32, CH_2
10	1.39, m	21.1, CH_2	6.10, m	125.75, CH
11	1.72, m	25.9, CH_2	5.57, t (1.6)	125.8, CH
12	1.90, m	18.5, CH_2	1.94, s	18.31, CH_2
13	1.21, t (7.3)	12.3, CH_2	0.9, m	13.34, CH_3
14	2.05, s	20.2, CH_3	1.25, s	29.70, CH_3
15		169.1, C	12.22, s	181.78, COOH
NH	10.42, br s		10.54, s	
OH	7.49, d (8.8)		7.52, s	

^aSalinosporamide B, datos obtenidos de Williams y colaboradores del 2005.

El compuesto 7-7 presenta una similitud con Salinosporamide B de *S. tropica* por el PM de 279 gr/mol de ambos compuestos. Así mismo, en los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C (Tabla IV) se puede observar la presencia de un compuesto secundario que puede estar generando el rompimiento de la β -propiolactona ($\text{C}_2\text{H}_4\text{COO}$) formando un ácido carboxílico (COOH) con δ de 12.22 ppm para el protón y 181.78 ppm para el carbono. Decretando que las diferencias radiquen en el carbono 15, C15 (Fig. 20) y en los carbonos 10 y 11 con un enlace vinílico ($-\text{CH}=\text{CH}-$) extra que no es apreciable en Salinosporamide B.

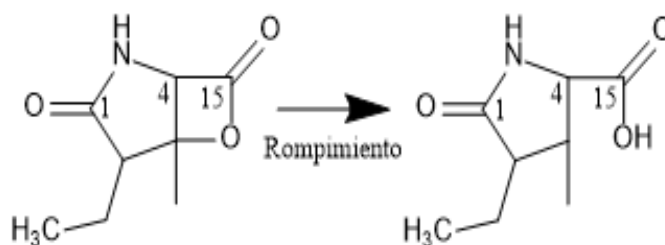


Figura 20. Rompimiento de la β -propiolactona ($\text{C}_2\text{H}_4\text{COO}$) formando un ácido carboxílico (COOH) en el carbono 15 (C15).

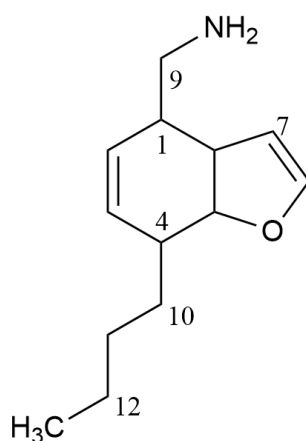
Examinando la información de la molécula, se tiene una masa molecular de 279.33 gr/mol, de los cuales 180 uma corresponden a 15 carbonos, 21 uma a 21 hidrógenos, 14 uma de un nitrógeno de la amina secundaria que se encuentra entre el ciclopentano y por último 64 uma de 4 oxígenos que se dividen en: 2 carbonilos, uno en el ciclopentano y el otro como un ácido carboxílico. Y 2 oxígenos que indican la presencia de grupos hidroxilos. Lo que sugiere una fórmula molecular de $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ con 6 grados de insaturación, los cuales concuerdan con la estructura propuesta (7-7).

Aunque la molécula tenga el peso similar a Salinosporamide B de *S. tropica* y al compuesto descrito anteriormente 3C de *S. pacifica*, no hay registro en la base de datos que designen su similitud o igualdad con la estructura que estamos proponiendo.

Por lo cual las señales de los espectros de RMN de hidrógenos y carbonos en las señales de los C-10, C-11 y C-15 decretan la diferencia con estos compuestos (1 y 3C), ya que los desplazamientos químicos son diferentes con los compuestos de *S. tropica* o con otro filotipo de *S. pacifica* indicando que sea un compuesto nuevo para la especie *Salinispora sp.*

6.3.3 Compuesto 11S

El compuesto 11s se aisló como un sólido amorfo blanco de 24.3 mg. El cromatograma obtenido del Gases-Masas, demuestra un pico mayoritario a un tiempo de retención de 17.31 min. En su MS se observa el pico padre o ion molecular a m/z de 207 $[M^+]$ y al pico base en m/z 113, que indica una FM de $C_{13}H_{21}NO$, con 4 grados de insaturación.



11s

(21)

El espectro de 1H RMN (400 MHz, MeOD) (Tabla V, Anexo 15) presentó señales importantes ha campo medio-bajo con δ 7.52, 5.61 y 4.38 ppm, los cuales son protones característicos de enlaces vinílicos ($-CH=CH-$) cercanos a nitrógenos, oxígenos y a ciclos – hexeno o penteno. Las señales ha campo medio indican la presencia de protones cercanos a oxígenos y/o nitrógenos con δ 5.36, 4.11, 3.86 y 3.48 ppm. Como por ejemplo, el δ de 5.36 ppm que corresponde para los hidrógenos que contiene la amina primaria ($R-NH_2$). Por último, se observan señales a campo alto en δ desde 2.41 a 0.90 ppm las cuales son señales característicos de metinos ($=CH-$), metilenos ($-CH_2-$) y metilos ($-CH_3$).

En el espectro de ^{13}C RMN (Tabla V, Anexo 16), se observan 20 carbonos a lo que se debe que este compuesto no este puro en su totalidad o a la multiplicidad de las mismas señales. Las señales importantes en campo bajo son para amidas, esteres y aromáticos con δ 143.67 ppm, que es para un protón cercano al oxígeno del ciclopenteno. Para un δ de 122, 101 ppm las señales son para enlaces vinílicos (-CH=CH-) o señales de aromáticos y alquenos. Así también, se observan señales para carbonos de metinos (=CH-), metilenos (-CH₂-) y metilos (CH₃-) con δ en 35.25 a 12.46 ppm.

Tabla V. Datos espectrales de RMN para el compuesto 11s a 400 MHz.

C/H	11s δ_{H} multiplicidad (J en Hz)	11s δ_{C}
1	2.25, m	35.25, CH
2	5.62, d (7.8)	122.92, CH
3	5.62, d (7.8)	122.92, CH
4	2.25, m	39.88, CH
5	3.86, m	71.83, CH
6	2.41, m	62.93, CH
7	4.38, d (7.8)	101.88, CH
8	7.39, d (7.8)	143.67, CH
9	3.48, m	41.31, CH ₂
10	1.29, s br	33.22, CH ₂
11	1.29, s br	30.88, CH ₂
12	1.55, m	20.34, CH ₂
13	0.90, m	12.46, CH ₃
NH ₂	5.36, m	

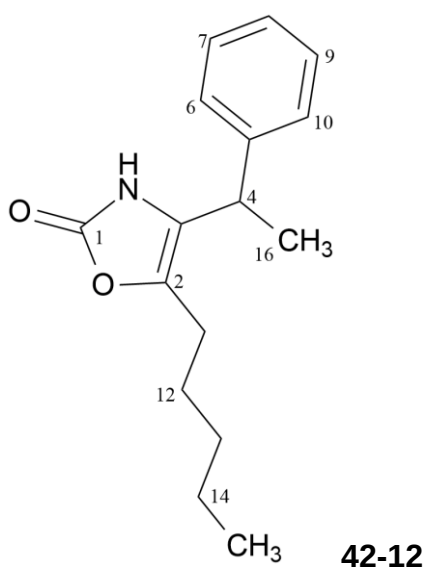
La información obtenida de la molécula, nos indica que tiene una masa molecular de 207.33 gr/mol, de los cuales 156 uma corresponden a 13 carbonos, 21 uma a 21 hidrógenos, 16 uma de un oxígeno que contiene al ciclopenteno conjugado al

ciclohexeno y a 14 uma de un nitrógeno de la amina primaria (-NH_2) que se encuentra como radical del ciclohexeno. Lo que sugiere una fórmula molecular de $\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}$ con 4 grados de insaturación, lo cual concuerdan con la estructura propuesta (11s).

Al revisar la base de datos de compuestos producidos por *Salinispora sp.* no se encontró molécula alguna que tuviera el mismo peso molecular o similitud en la estructura propuesta, a lo que se puede deber que sea una aportación nueva para esta especie.

6.3.4 Compuesto 42-12

El compuesto 42-12 se aisló como un sólido amarillo-oscuro de 4.4 mg, con olor característico al crudo. En el cromatograma obtenido por gases-masas se observa un pico con tiempo de retención de 23.41 min. En el MS el pico padre o ion molecular se encuentra en m/z 259 $[M^+]$ y el pico base en m/z 129, que indica una FM de $C_{16}H_{21}NO_2$, con 7 grados de insaturación.



(22)

El espectro de 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$) (Tabla VI, Anexo 18) Se observan señales ha campo bajo con δ de 8.05, 7.55 y 7.42 ppm, los cuales son protones característicos de enlaces aromáticos (7.52 ppm), como para enlaces vinílicos ($-CH=CH-$). Sin embargo, la señal en 8.05 ppm corresponde al protón de la amida secundaria cercano a un carbonilo ($R-CO-NH-R$). Las señales ha campo medio indican que hay presencia de protones cercanos a enlaces vinílicos ($-CH=CH-$), oxígenos y/o nitrógenos con δ 3.99 ppm. Por último, se observan señales a campo alto en δ desde

2.3 a 0.90 ppm las cuales son señales característicos de metinos ($=CH-$), metilenos ($-CH_2-$) y metilos ($-CH_3$).

En el espectro de ^{13}C RMN (Tabla VI, Anexo 19), se observan 16 carbonos, las señales ha campo bajo con δ de 173.77, 129.9, 128 y 105 ppm son para carbonilos (CO), carbonos cercanos a oxígenos (ésteres, $R-COO-R$), nitrógenos (amida, $-NH-$) y de carbonos aromáticos respectivamente. Una señal para un carbono cuaternario cercano a alquenos ($CH_2=CH_2$) o enlaces vinílicos en δ de 67.03 ppm. Y por último, se observan δ en 34 a 11 ppm para carbonos característicos de metinos ($=CH-$), metilenos ($-CH_2-$) y metilos ($-CH_3$).

Tabla VI. Datos espectrales de RMN para el compuesto 42-12 a 400 MHz.

C/H	42-12 δ_H multiplicidad (J en Hz)	42-12 δ_C
1		173.77, C
2		128.56, C
3		105.22, C
4	3.99, dd (5.7, 2.5)	38.97, CH
5		67.03, C
6	7.42, m	128.66, CH
7	7.56, m	129.9, CH
8	7.42, m	128.56, CH
9	7.56, m	128.66, CH
10	7.42, m	129.9, CH
11	2.3, m	34.23, CH_2
12	1.29, s br	29.20, CH_2
13	1.29, s br	24.05, CH_2
14	1.67, m	23.20, CH_2
15	0.90, m	14.30, CH_3
16	1.26, s	11.20, CH_3
NH	8.05, dd (8.2, 1.2)	

Analizando la información obtenida de la molécula, se determinó que tiene un peso molecular de 259.33 gr/mol, de los cuales 192 uma son de los 16 carbonos, 21 uma de los 21 hidrógenos, 14 uma de un nitrógeno que se encuentra en el ciclopenteno como amida secundaria (-NH-) y 32 uma de dos oxígenos, uno que corresponde al carbonilo que soporta el C-1 cercano a la amina secundaria y el segundo que es el oxígeno del éster (R-COO-R) en el ciclopenteno. Lo que indica una fórmula molecular de $C_{16}H_{21}NO_2$ con 7 grados de insaturación, a lo cual concuerda con la estructura propuesta (42-12)

Al analizar la base de datos de compuestos producidos por *Salinispora sp.* no se encontró molécula o estructura alguna que tuviera el mismo peso molecular o similitud en la estructura propuesta, esto quiere decir o indica que es una aportación de un compuesto nuevo para el género de *Salinispora sp* y por ende nuevo para la tercera especie *S. pacífica*.

7.0 DISCUSIÓN GENERAL

Los metabolitos secundarios que son aislados de diferentes especies de actinobacterias marinas, contribuyen con información para delimitar o ampliar el árbol filogenético, para la determinación de familias, géneros y/o especies que pertenecen. Así mismo, ayudan a describir nuevas especies o filotipos, ya que cada compuesto producido por un metabolito secundario es único.

Con lo mencionado por Freel y colaboradores en 2011 de la similitud de compuestos entre *S. pacifica* y *S. tropica*. En éste trabajo se observa dicho conocimiento acerca de estas dos especies, ya que los compuestos producidos por la cepa AMS-365 CNY-331 presenta una alta similitud con compuestos de la conformación de Salinosporamides. Presentando que la relación entre ambas especies de las cepas CNB-392 de *S. tropica*, CNT-133, CNS-863 en *S. pacifica*, determinado por medio del 16S RNAr y con la secuencia de cetosintetasa (KS), presenta una asociación en su ruta biosintética que es una mezcla de rutas en la policétido sintasa (PKs) y en la de péptidos no-ribosomales (NRPS) para ambas especies indicando la presencia de un ancestro en común que posteriormente evolucionó independientemente para cada especie. Dicho esto, la cepa CNY331 podría estar utilizando la misma ruta biosintética para generar estos compuestos similares a *S. tropica* con Salinosporamides de la A-J e isómeros de estos y con *S. pacifica* que su único compuesto hasta ahora es Salinosporamide K.

Como se mencionó anteriormente, los compuestos aislados de AMS-365 CNY-331 de este trabajo pertenecen a la familia Micromonosporaceae del género *Salinispora* sp. especie *S. pacifica*, los cuales son compuestos policétidos/péptidos no-ribosomales.

Se han encontrado compuestos de estructuras similares a Salinosporamides y dos compuestos que en base a los resultados obtenidos son nuevos, el compuestos 2-13 con peso molecular de m/z 293 con fórmula molecular de $C_{16}H_{23}NO_3$, con 6 grados de insaturación (Fig. 13) y el compuesto 4-4 con peso molecular de m/z 279 con fórmula molecular de $C_{15}H_{21}NO_4$ con 6 grados de insaturación (Fig. 16).

Así también se reportan 4 compuestos no definidos en su totalidad, que podrían ser nuevos los compuestos 3C, 7-7, 11s y 42-12. El compuesto 3C con peso molecular de m/z 279 con fórmula molecular de $C_{15}H_{21}NO_4$, con 6 grados de insaturación (Fig. 18). El compuesto 7-7 con peso molecular de m/z 279 y fórmula molecular de $C_{15}H_{21}NO_4$ con 6 grados de insaturación (Fig. 19). El compuesto 11s con peso molecular de m/z 207 con una fórmula molecular de $C_{13}H_{21}NO$, con 4 grados de insaturación (Fig. 21). Y por último, el compuesto 42-12 con peso molecular de m/z 259 y de fórmula molecular $C_{16}H_{21}NO_2$, con 7 grados de insaturación (Fig. 22).

Con base en la alta bioactividad registrada para Salinosporamides, los compuestos obtenidos en este trabajo, se les puede atribuir o relacionar con una actividad de amplio espectro para bioensayos anticancerígenos. Sin embargo, esta actividad se encuentra limitada para este trabajo por la longevidad de los resultados obtenidos.

8.0 CONCLUSIONES

1. La cepa AMS-365 CNY-331 aislada del sedimento marino del Golfo de California, específicamente de Bahía de Los Ángeles, presenta procesos de separación muy complejos debido a su inestabilidad ante disolventes como metanol y a la degradación por luz.
2. Es identificada de la familia Micromonosporaceae del género *Salinispora* sp. especie *S. pacífica*, la cual contiene compuestos de policétidos/péptidos no-ribosomales, reportados con anterioridad, y otros que podrían ser nuevos.
3. Los compuestos ya reportados con anterioridad y que presentan similitud con los compuestos encontrados en este trabajo son: (1) Salinosporamide B, (2) Salinosporamide C, (3) Salinosporamide E y (4) Salinispyrone A. Y dos compuestos que en base a los resultados obtenidos hasta el momento podrían ser nuevos, el compuesto 2-13 con un peso molecular de m/z 293 con fórmula molecular de $C_{16}H_{23}NO_3$, con 6 grados de insaturación (Fig. 13) y el compuesto 4-4 con peso molecular de m/z 279 con fórmula molecular de $C_{15}H_{21}NO_4$ con 6 grados de insaturación (Fig. 16).
4. Contribución importante de este trabajo al conocimiento de la química de las actinobacterias marinas del Golfo de California, es el haber encontrado 2 compuestos que podrían ser nuevos, en la cepa AMS-365 CNY-331 de *Salinispora pacífica* que fue reportada por primera vez en el trabajo que precede esta tesis y que se encuentra publicado por Becerril-Espinosa et al., 2013.

5. El Golfo de California es una fuente prolifera de metabolitos secundarios con actividad biológica que pueden ser explotados para la obtención de compuestos nuevos que podrían ser aplicados en la farmacéutica como tratamiento de algunos tipos de cáncer.

9.0 REFERENCIAS

- Ahmed, Lina; Jensen, Paul R.; Freel, Kelle C.; Brown, Ros; Jones, Amanda L.; Kim, Byung-Yong; Goodfellow, Michael. *Salinispora pacifica* sp. nov., an actinomycete from marine sediments. *Antonnie van Leeuwenhoek* 103 (2003):1069-1078
- Anaya-Lang, Ana Luisa. *Ecología Química*. México D.F.: Plaza y Valdez, 2003.
- Becerril-Espinosa, Amayali. «Actinobacterias aisladas del sedimento marino del golfo de California y de Bahía Todos Santos: Diversidad, bioactividad y Dominios cetosintetasa.» Ensenada, Baja California: FCM, IIO, 2011. 101.
- Beer, L. Laura, y Bradley S. Moore. «Biosynthetic Convergence of Salinosporamides A and B in the Marine Actinomycete *Salinispora tropica*.» *Organic LETTERS* 9, nº 5 (2007): 845-848.
- Bérdy, J. «Bioactive microbial metabolites.» *J Antibiot* 58 (2005): 1-26.
- Bourillón, Luis, y Jorge Torre. *Áreas marinas protegidas del Golfo de California para mitigar los efectos de pesca de arrastre en la biodiversidad: Limitaciones y propuesta de nuevo enfoque*. Guaymas, Sonora, México: Comunidad y Biodiversidad A.C., 2012.
- Buchanan, Greg O., Philip G. Williams, Robert H. Feling, Christopher A. Kauffman, Paul R. Jensen, y William Fenical. «Sporolides A and B: Structurally Unprecedented Halogenated Macrolides from the Marine Actinomycete *Salinispora tropica*.» *Organic letters* 7, nº 13 (2005): 2731-2734.
- Canino-Herrera, S R, G Gaxiola-Castro, y J A Segovia-Zavala. «Efecto de procesos físicos sobre la variación de clorofila, seston y productividad primaria en la ensenada norte de bahía de los Ángeles (verano 1986).» *Ciencias Marinas* 16, nº 2 (1990): 67-85.
- Cervantes-Duarte, R, J L Mueller, C C Trees, H Maske, S Alvarez-Borrego, y R Lara-Lara. «Profundidad de la zona eufótica, atenuación de la irradiancia y K490 de sensores remotos en provincia biópticas del Golfo de California.» *Ciencias Marinas* 26, nº 4 (2000): 533-560.
- Cortés-Sánchez, Alejandro De Jesús, y Tania Mosqueda-Olivares. «Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico.» *Química Viva* 12, nº 2 (2013).

- De Carvalho, Carla, y Pedro Fernandes. «Production of Metabolites as Bacterial Responses to the Marine Enviroment.» *Marine Drugs* 8 (2010): 705-727.
- Decheco-Egúsqiza, Alicia Cecilia. *Metabolismo microbiano*. Peru: Facultad de ingeniería y pesquera y de alimentos FIPA, 2011.
- Dineshkumar , Kesavan, Vasudevan Aparna, Kantilal Z. Madhuri, y Waheeta Hopper. «Biological Activity of sporolides A and B from *Salinispora tropica*: in silico target prediction using ligand-based pharmacophore mapping and in vitro activity validation on VIH-1 reverse transcriptase.» *Chemical Biology & Drug Design* 83, nº 3 (2014): 350-361.
- Feling, Robert H., Greg O. Buchanan, Tracy J. Mincer, Christopher A. Kauffman, Paul R. Jensen, y William Fenical. «Salinosporamide A: A Highly Cytotoxic Proteasome inhibitor from a Novel Microbial Source, a Marine Bacterium of the New Genus *Salinispora*.» *Angewandte Chemie* 42, nº 3 (2003): 355-357.
- Fenical, William. «chemical Studies of Marine Bacteria: Developping a New Resouce .» *Chem. Rev.* 93 (1993): 1673-1683.
- Fenical, William, Paul R Jensen, Michael A Palladino, Kin S Lamb, Kenneth Lloyd, y Barbara C Potts. «Discovery and Development of the Anticancer Agent Salinosporamide A.» *Bioorg. Med. Chem.* 17, nº 6 (2009).
- Fenical, William, y Paul R Jensen. «Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria.» *nature chemical biology* 2, nº 12 (2006): 666-673.
- Freel , Kelle C., Anna Edlund, y Paul R. Jensen. «Microdiversity and evidence for high dispersal rates in the marine actinomycete '*Salinispora pacifica*'.» *Environmental Microbiology* 14, nº 2 (2012): 480-493.
- Freel, Kelle C, Sang-Jip Nam, William Fenical, y Paul R Jensen. «Evolution of Secondary Metabolite Genes in Three Closely Related Marine Actinomycete Species.» *Applied and Environmental Microbiology* 77, nº 20 (2011): 7261-7270.
- Gordaliza, Marina. *Los compuestos naturales en el descubrimiento de fármacos*. España: Instituto de Estudios de la Ciencia y la Tecnología, 2008.
- Guillén-Matus, Dulce Guadalupe. *Producción de metabolitos secundarios por dos filotipos del actinomimceto marino *Salinispora arenicola**. Grado de M. en C. Ensenada, Baja California: UABC, FCM, IIO, 2014.

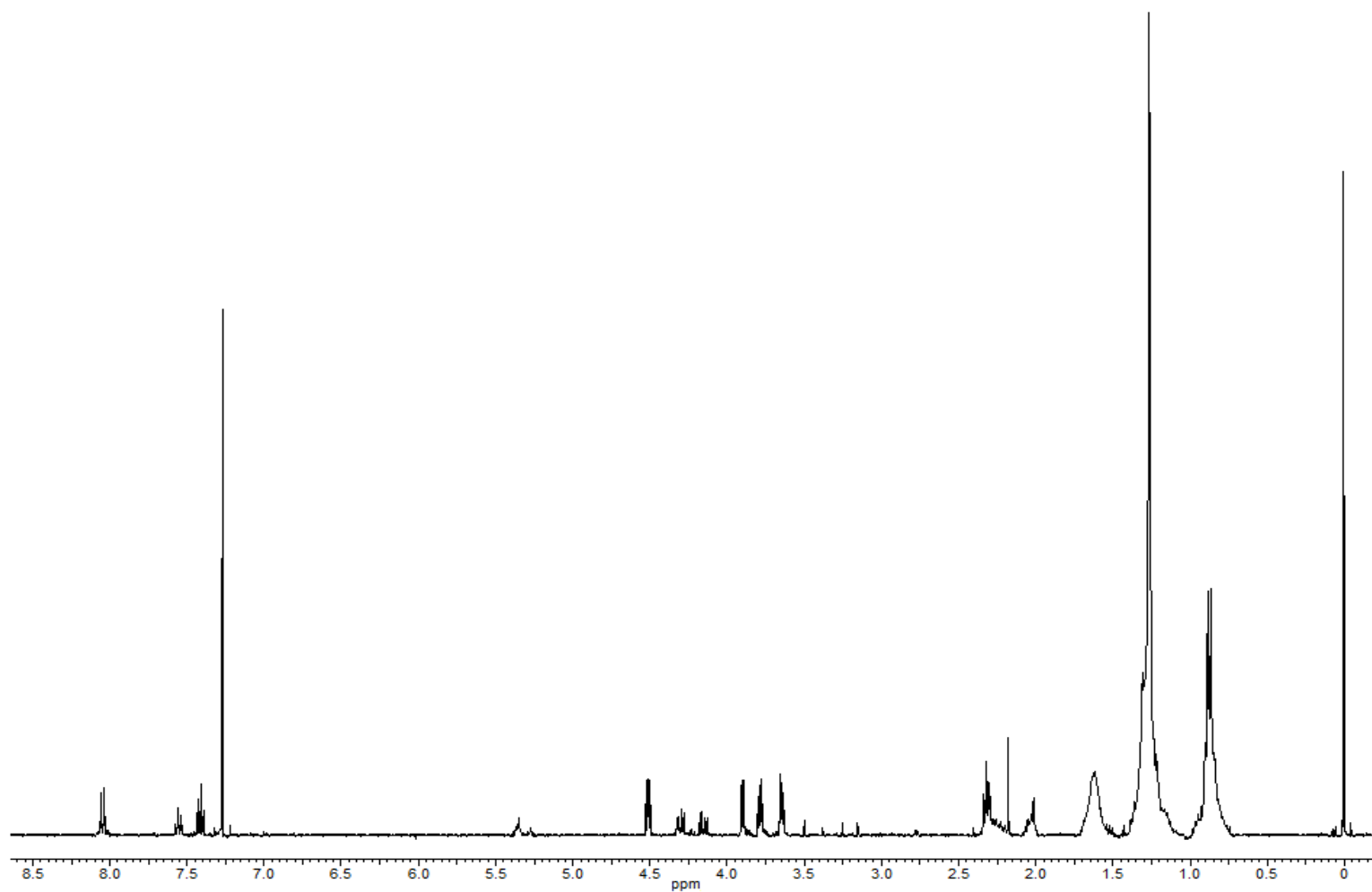
- Jensen, P. R., Tracy J. Mincer, Philip G. Williams, y William Fenical. «Marine actinomycete diversity and natural product discovery.» *Antonie van Leeuwenhoek* 87 (2005): 43-48.
- Jensen, Paul R. «Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic.» *Microbiol Biotech* 37 (2010): 219-224.
- Jensen, Paul R., Philip G. Williams, Dong-Chan Oh, Lisa zeigler, y William Fenical. «Species-Specific Secondary Metabolite Production in Marine Actinomycetes of the Genus *Salinispora*.» *Appl Environ Microbiol* 73, nº 4 (2007): 1146-1152.
- Jensen, Paul, R Dwight, y William Fenical. «Distrubution of actinomycetes in nearshore tropical marine sediments.» *Appl Environ Microbiol* 8 (1991): 1881-1888.
- Kwon, Cheol Hak, Christoopher A. Kauffman, Paul Jensen, y William Fenical. «Marinomycins A-D, Antitumor-Antibiotics of a new structure class from a marine Actinomycete of the recently discovered genus "*Marinispora*".» *JACS* 128 (2006): 1622-1632.
- Lizarazo Niño, Edmundo, y Diego Aristizábal Quintero. «Biodiversidad de la llanura inundable de Arauca.» 20. Santa Bárbara de Aruca: Pronatta, 2001.
- Logan, N. «Bacterial systematic.» *Blackwell scientific publications*, 1994: 272.
- Macleod, Robert A, y E Onefrey. «NUTRITION AND METABOLISM OF MARINE BACTERIA.» *The Fisheries Research Board of Canada* 71 (Octubre 1951): 661-667.
- Maldonado, L A, y otros. «*Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae.» *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 55 (2005): 1759-1766.
- Mayer, A. M. S., y V. K. B. Lehmann. «Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiportozoal and antiviral activities.» *Marine Pharmacologist* 42 (2000): 62-69.
- Mincer, Tracy J., Paul R. Jensen , Christopher A. Kauffman, y William Fenical. «Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments.» *APPLIED AND ENVIROMENTAL MICROBIOLOGY* 68, nº 10 (2002): 5005-5011.

- Oh, Dong-Chan, Philip Williams , Christopher A. Kauffman, Paul R. Jensen, y William Fenical. «Cyanosporasides A and B, Chloro-and Cyano-cyclopenta[a] Glycosides from the marine actinomycete "Salinispora pacifica".» *ORGANIC LETTERS* 8, nº 6 (2006): 1021-1024.
- Okazaki, Takao, Takeji Kitahara, y Okami Yoshiro. «A NEW ANTIBIOTIC SS-228 Y PRODUCED BY Chainia ISOLATED FROM SHALLOW SEA MUD.» *The journal of antibiotics* 28, nº 3 (1975): 176-184.
- Olano, C., C. Mendez, y J. Salas. «Antitumor compounds from marine actinomycetes.» *Mar Drugs* 7 (2009): 210-248.
- Peláez, Fernando, y Olga Genilloud. *Nuevos fármacos basados en productos naturales de origen microbiano*. España: Centro de Investigación Básica Merck, Sharp & Dohme de España, S.A., 2009.
- Prieto-Davó, Alejandra, William Fenical, y Paul R. Jensen . «Comparative actinomycete diversity in marine sediments.» *AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY* 52 (2008): 1-11.
- Pucci, Graciela N, Adián J Acuña, María L Llanes, Maria C Tiedemann, y Oscar H Pucci. «Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina.» *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 44, nº 1 (abril 2009): 49-48.
- Reed, Katherine A., y otros. «Salinosporamides D–J from the Marine Actinomycete *Salinispora tropica*, Bromosalinosporamide, and Thioester Derivatives Are Potent Inhibitors of the 20S Proteasome.» *JOURNAL OF Natural Products* 70, nº 2 (2007): 269-276.
- Romero Cabello, Raúl. *Microbiología y Parasitología Humana*. 3era Edición. España: Panamericana, 2007.
- Soria-Mercado, Irma Esthela. «Aislamiento y elucidación estructural de seminaftoquinonas bioactivas, a partir de un nuevo genero de actinomiceto marino de la familia Streptomyceae.» Ensenada Baja California: FCM & IIO , 2004.

- Surajit-Das, P., S. Lyla, y S. Ajmal-Khan. «Marine microbial diversity and ecology: Importance and future perspectives.» *Current Science* 98, nº 10 (2006): 1325-1335.
- Thompson , H. W. *Advances in spectroscopy*. Vol. II. London: Interscience Publishers Inc., 1961.
- Torres-Beltrán, Monica, Faviola Cardoso-Martínez, Natalie Millán-Aguiñaga, Amayali Becerril-Espinoca, y Irma Esthela Soria-Mercodo. «Evaluación del golfo de California como una fuente potencial de actinobacterias marinas bioactivas.» *Ciencias Marinas* 38, nº 4 (2012): 609-624.
- Valencia Ortiz, C. *Fundamentos de Fitoquímica*. México: Trillas, 1995.
- Walker, S., y H. Straw. *SPECTROSCOPY*. Vol. 1. Gran Bretaña: Science paperbacks, 1961.
- Walton, y Reyes. *Análisis químico e instrumental moderno*. Barcelona, España: REVERTÉ, 2005.
- Williams , Philip G., Ratnakar N. Asolkar, Tamara Kondratyuk, John M. Pezzuto, Paul R. Jensen, y William Fenical. «Saliniketals A and B, Bicyclic Polyketides from the Marine Actinomycete *Salinispora arenicola*.» *Journal of Natural Products* 70, nº 1 (2007): 83-88.
- Williams, Philip G., Eric D. Miller, Ratnakar N. Asolkar, Paul R. Jensen, y William Fenical. «Arenicolides A-C, 26-membered ring macrolides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola* .» *The Journal of Organic Chemistry* 72, nº 14 (2007): 5025-5034.
- Williams, Philip G., Greg O. Buchanan, Robert H. Feling, Christopher A. Kauffman, Paul R. Jensen, y William Fenical. «New citotoxic salinosporamides from the marine actinomycete *Salinispora tropica*.» *The Journal of Organic Chemistry* 70, nº 16 (2005): 6196-6203.

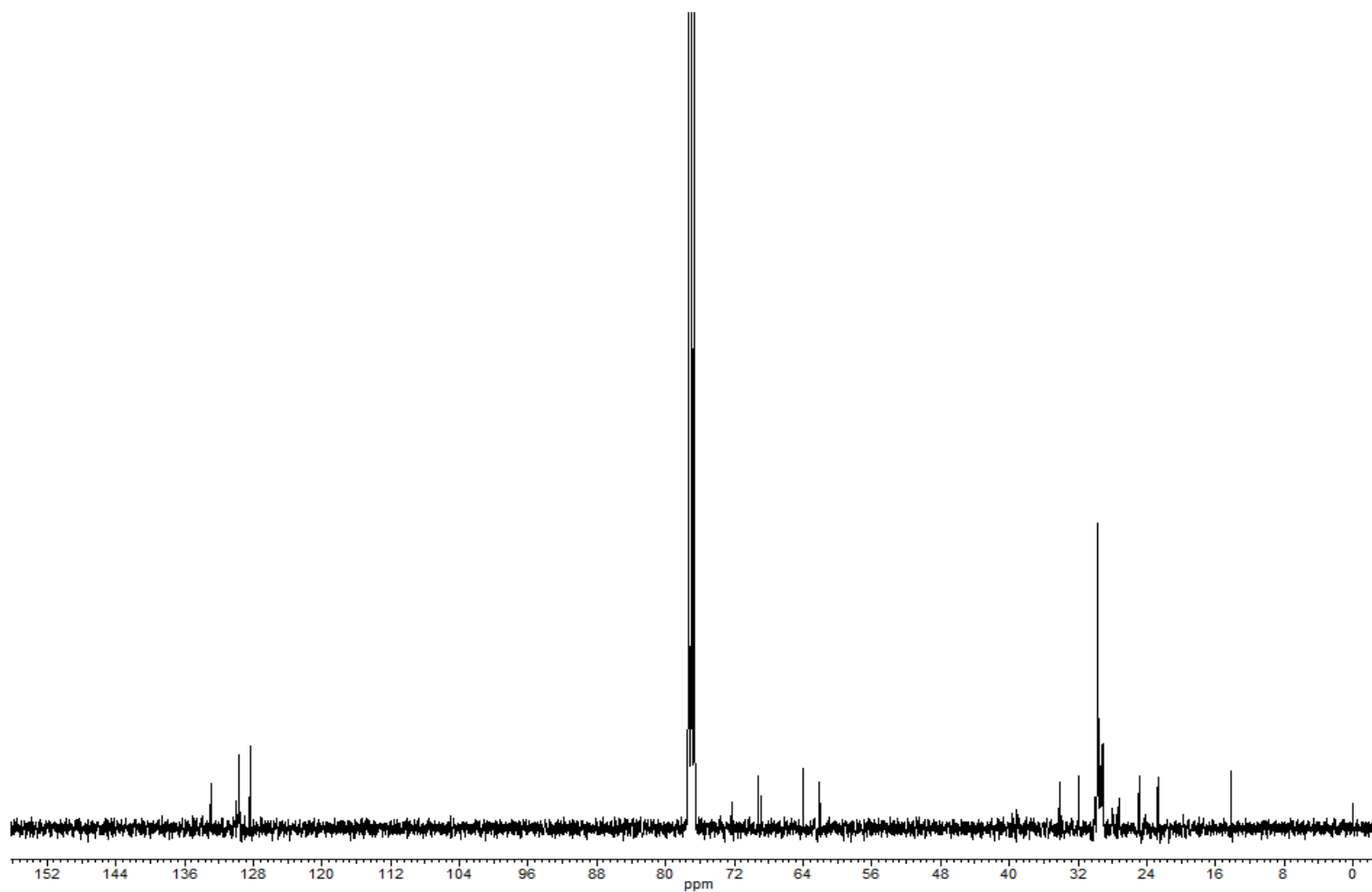
ANEXOS

Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica*



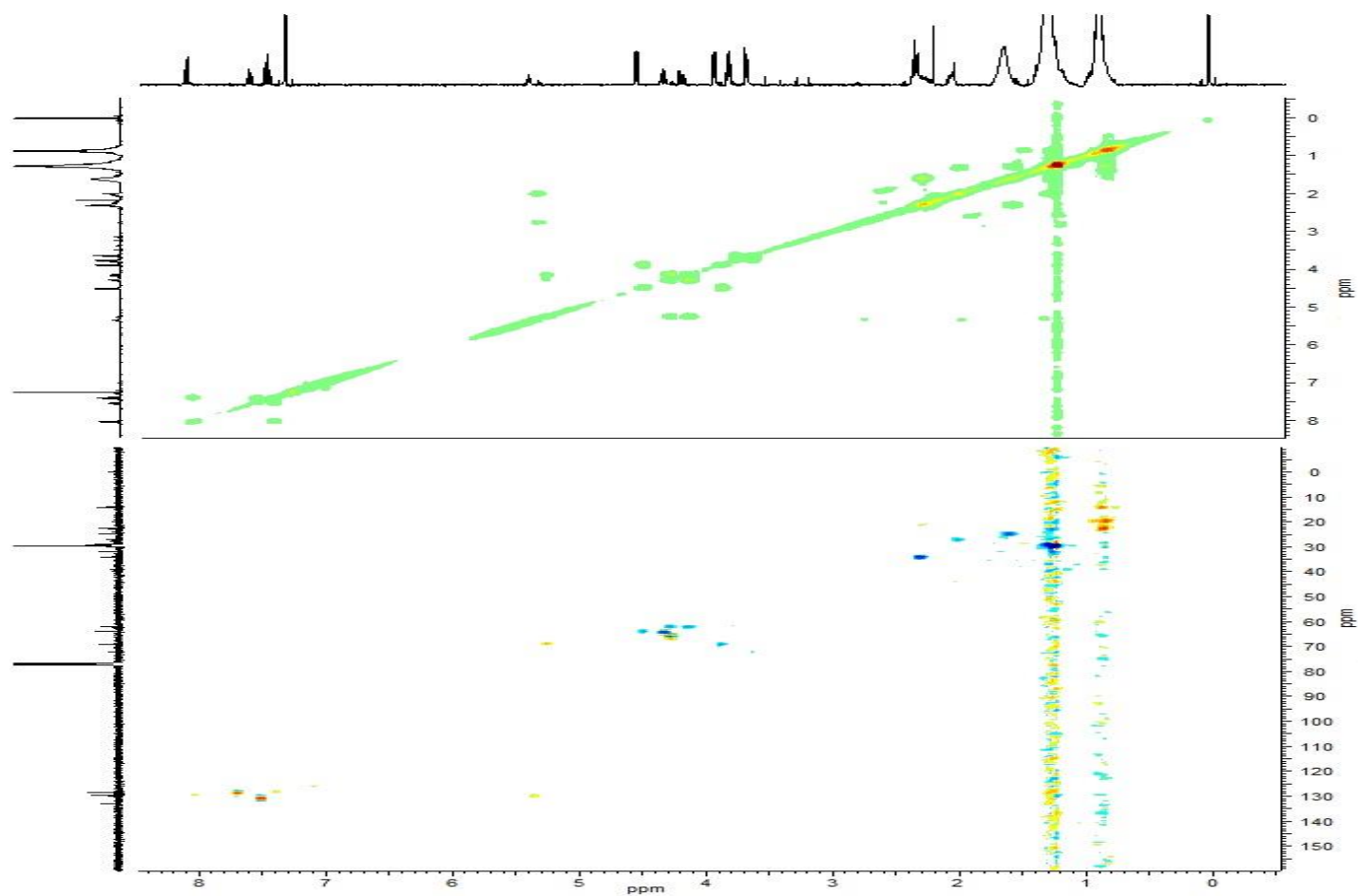
Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H para el compuesto 2-13 (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica****

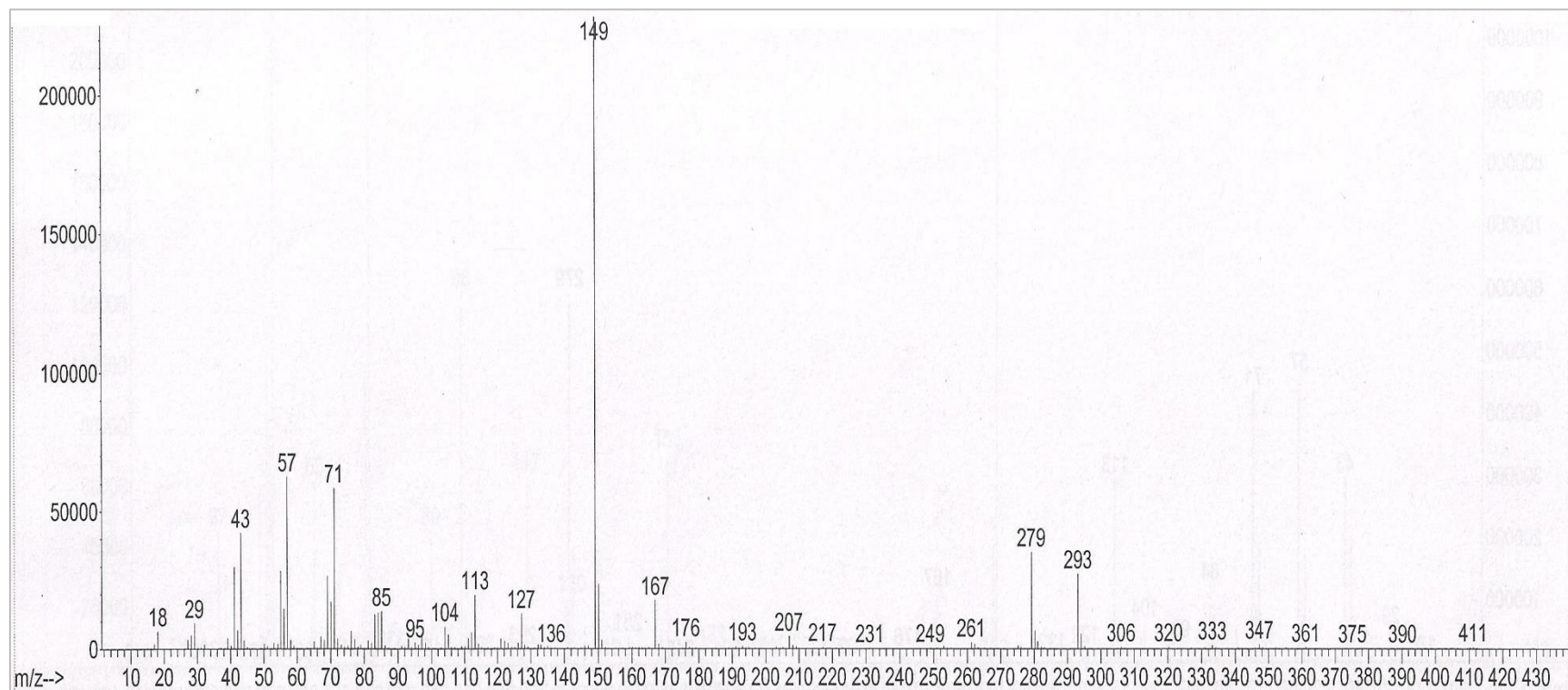


Anexo 2. Espectro de RMN de ^{13}C para el compuesto 2-13 (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).

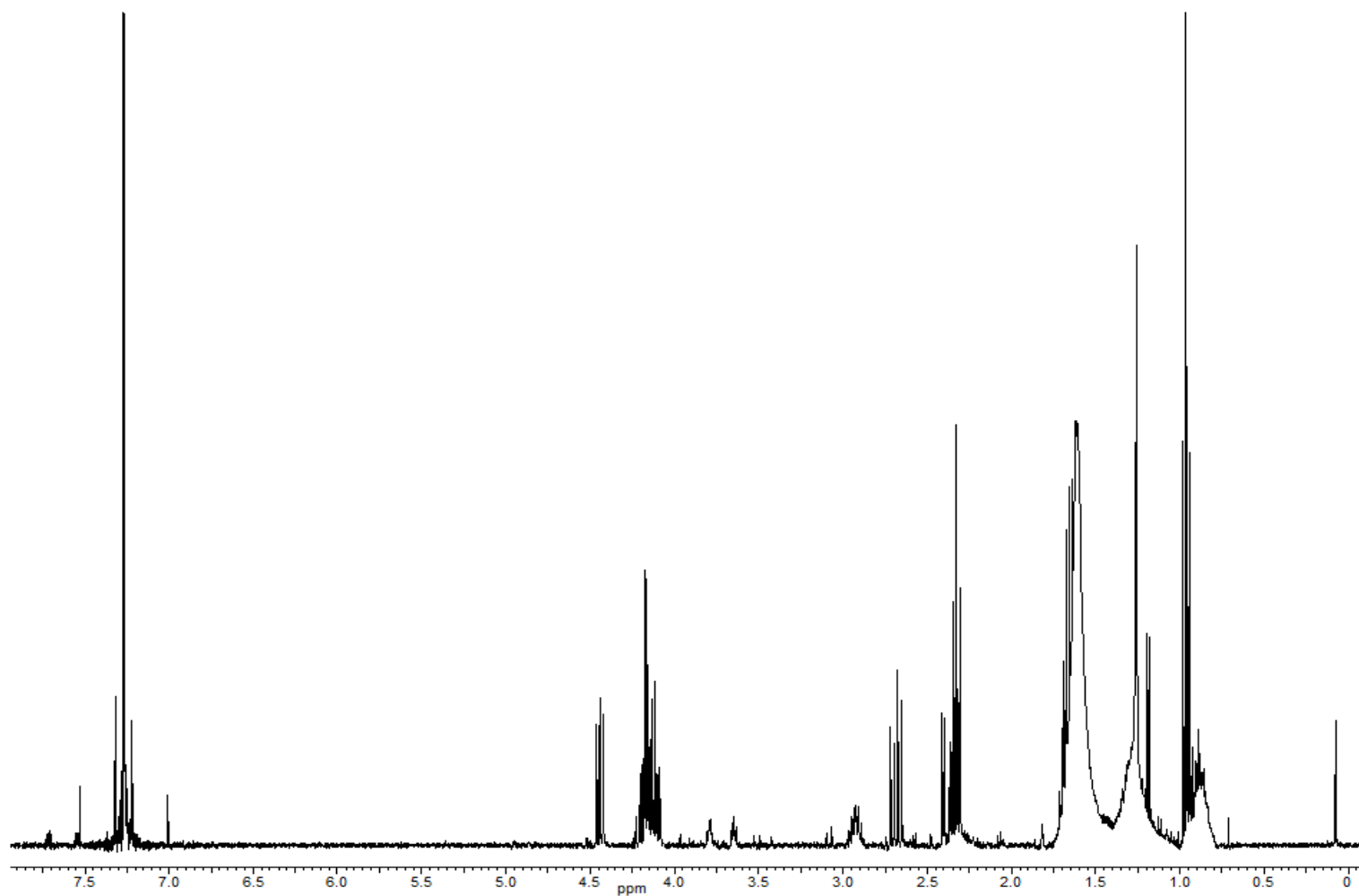
**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica****



Anexo 3. Espectros de 2D-RMN de ^1H - ^{13}C HSQC y ^1H - ^1H COSY de 2-13 (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).

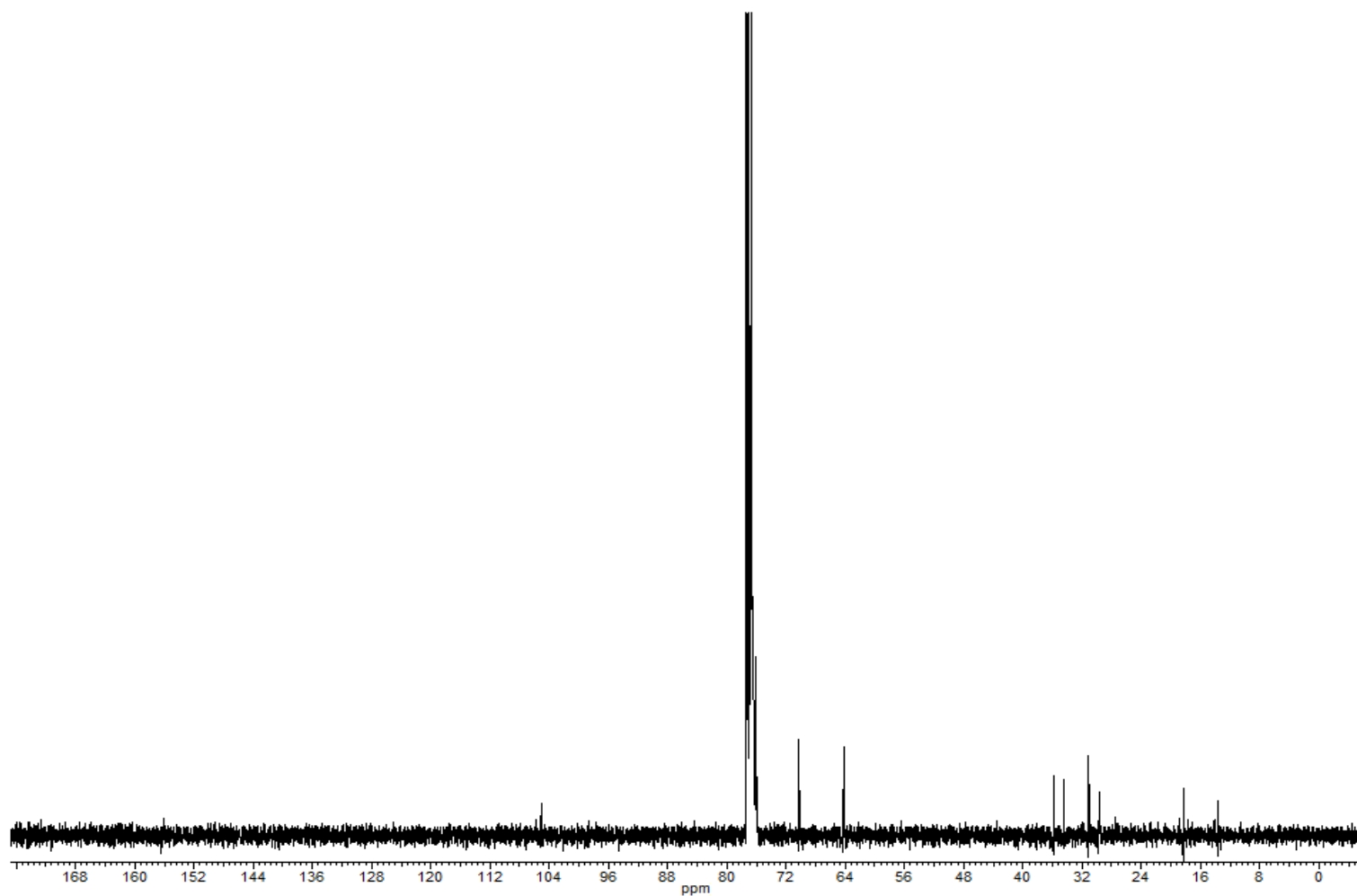


Anexo 4. Espectro de masas para el compuesto 2-13 (tr 28.64 min, PM 293 m/z).



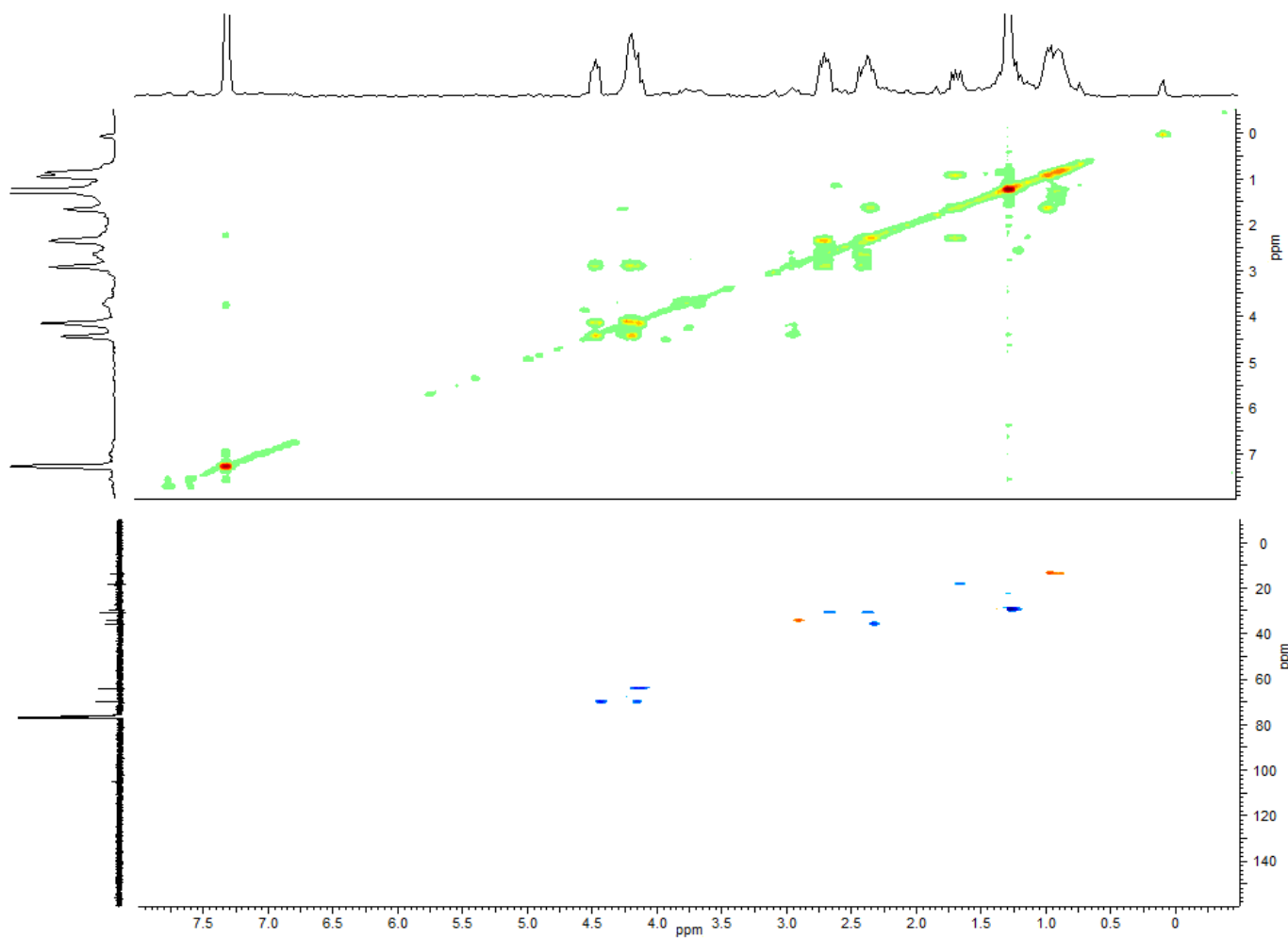
Anexo 5. Espectro de RMN de ^1H para el compuesto 4-4 (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica****



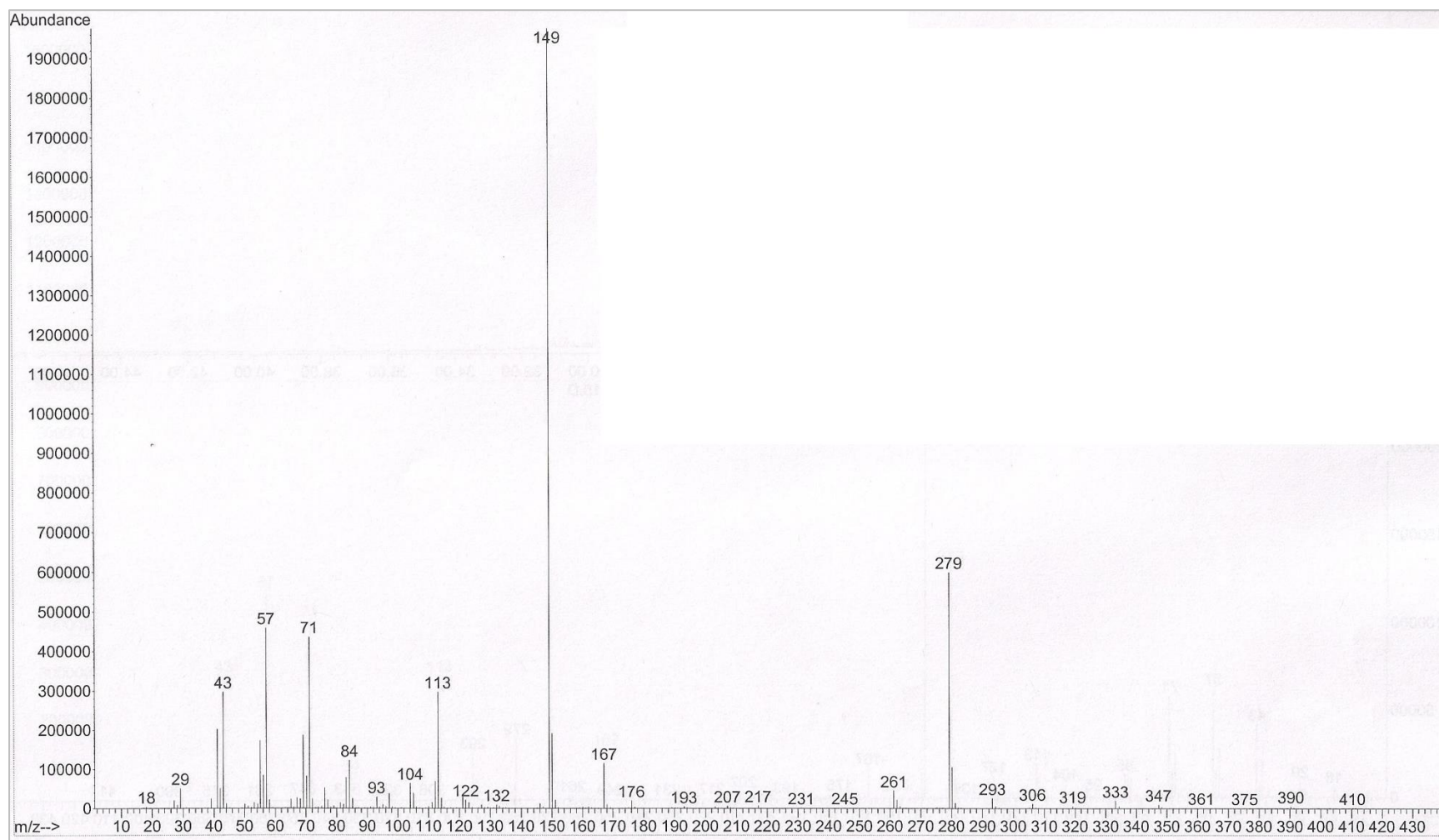
Anexo 6. Espectro de RMN de ^{13}C para el compuesto 4-4 (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica****



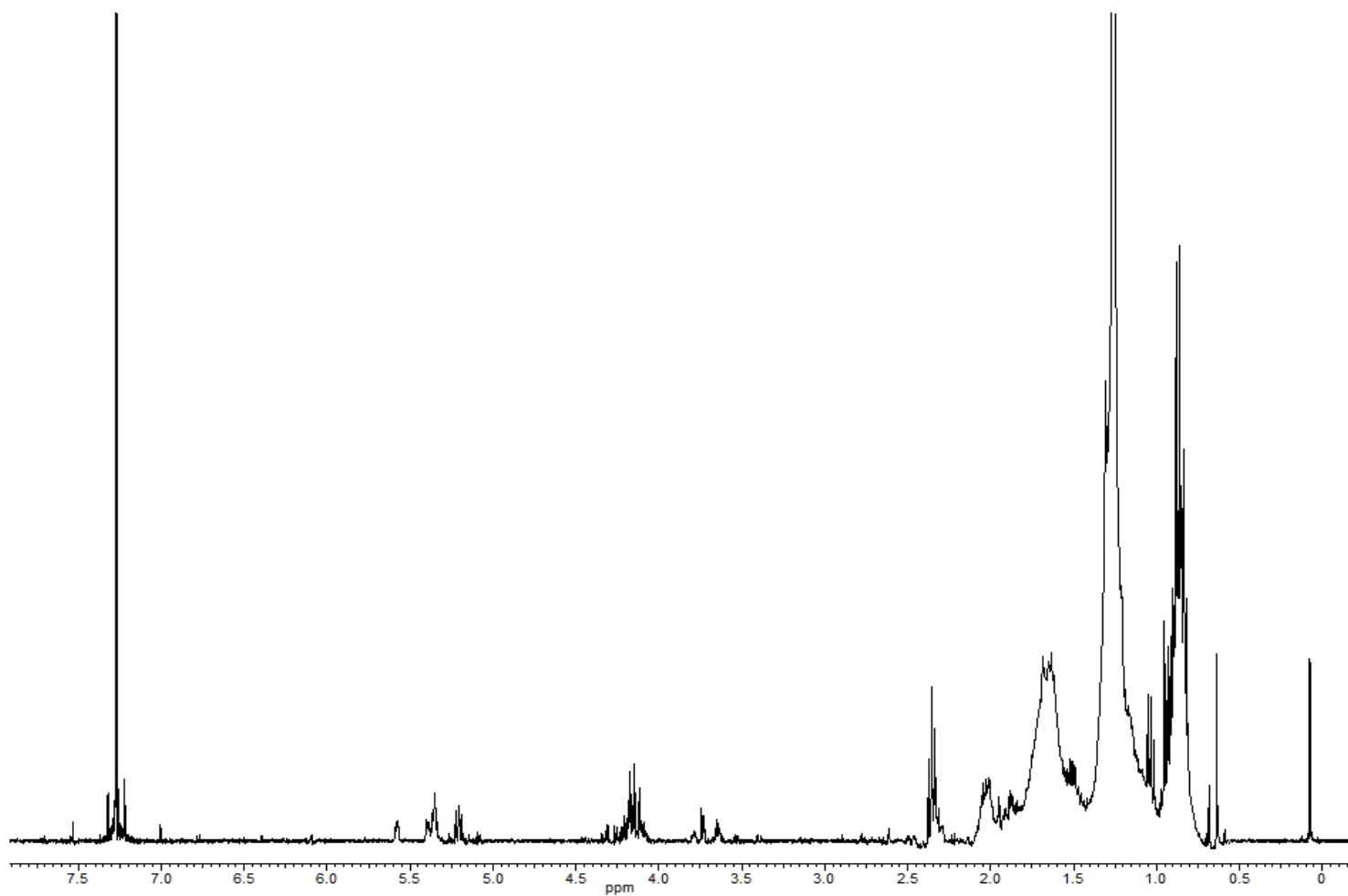
Anexo 7. Espectros de 2D-RMN de ^1H - ^1H COSY y ^1H - ^{13}C HSQC de 4-4 (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina Salinispora pacífica***

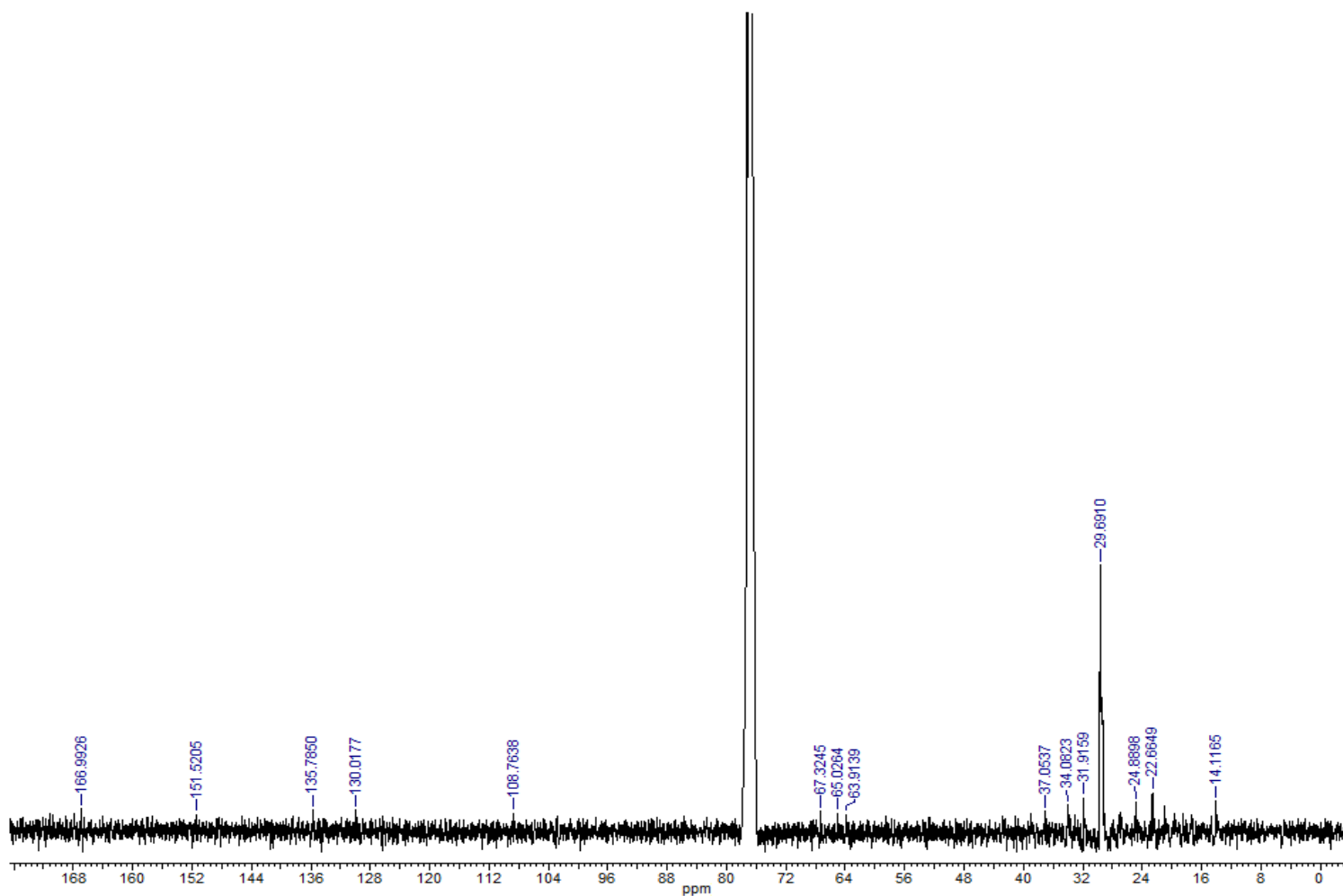


Anexo 8. Espectro de masas para el compuesto 4-4 (tr 27.32 min, PM 279 m/z).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina Salinispora pacífica***

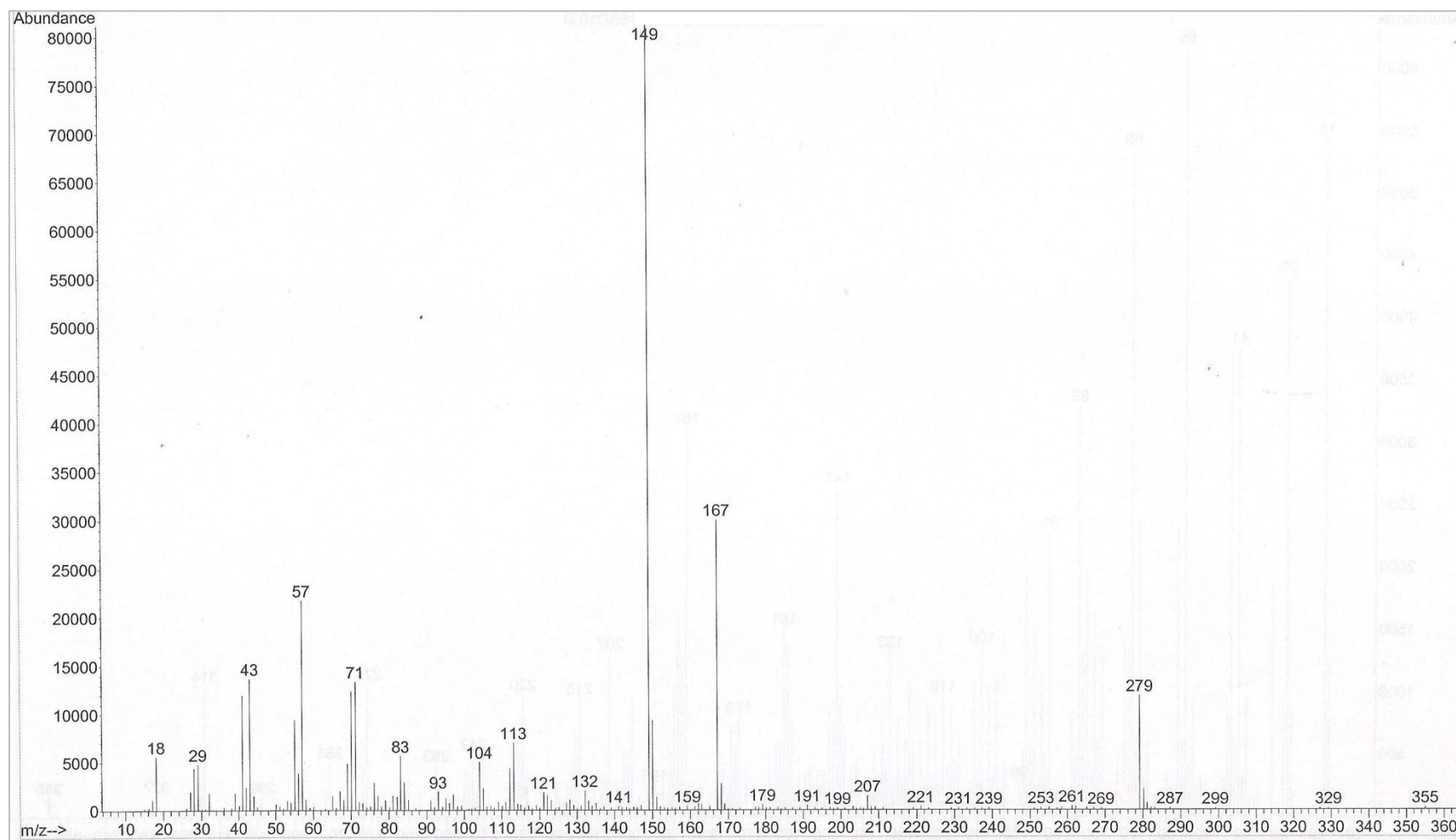


Anexo 9. Espectro de RMN de ^1H para el compuesto 3C (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).



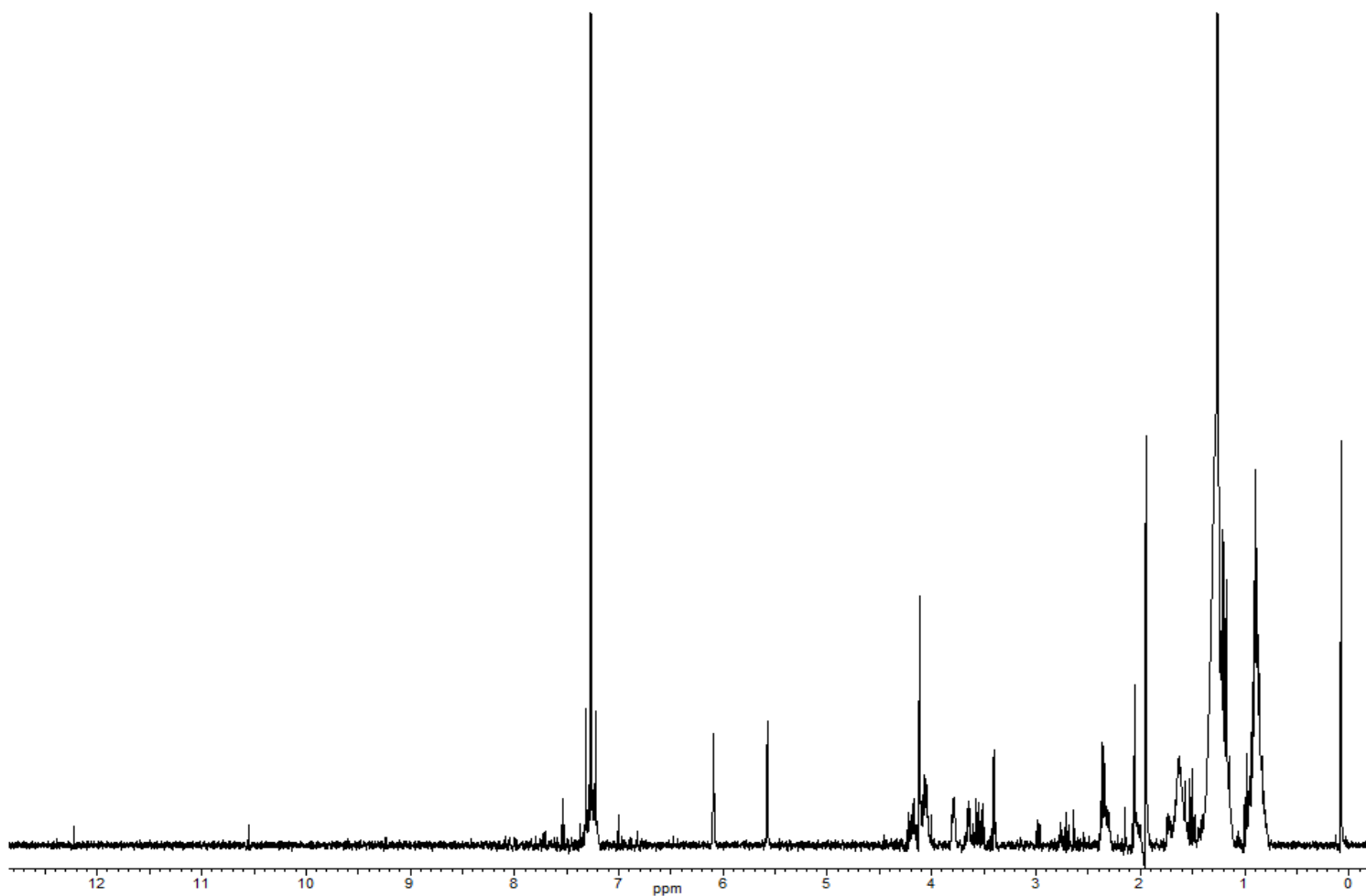
Anexo 10. Espectro de RMN de ^{13}C para el compuesto 3C (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica***

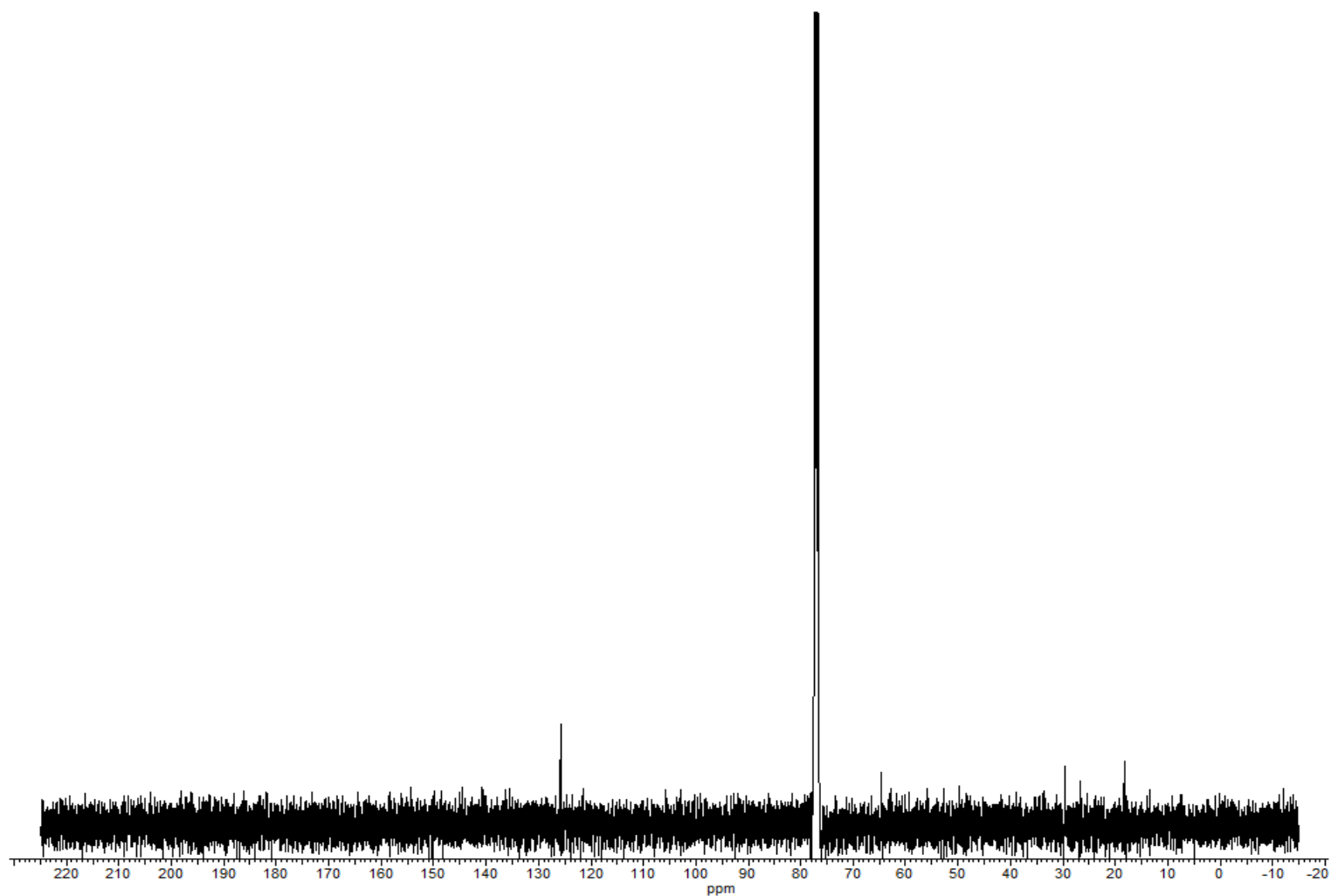


Anexo 11. Espectro de masas para el compuesto 3C (tr 25.453 min, PM 279 m/z).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina Salinispora pacífica***

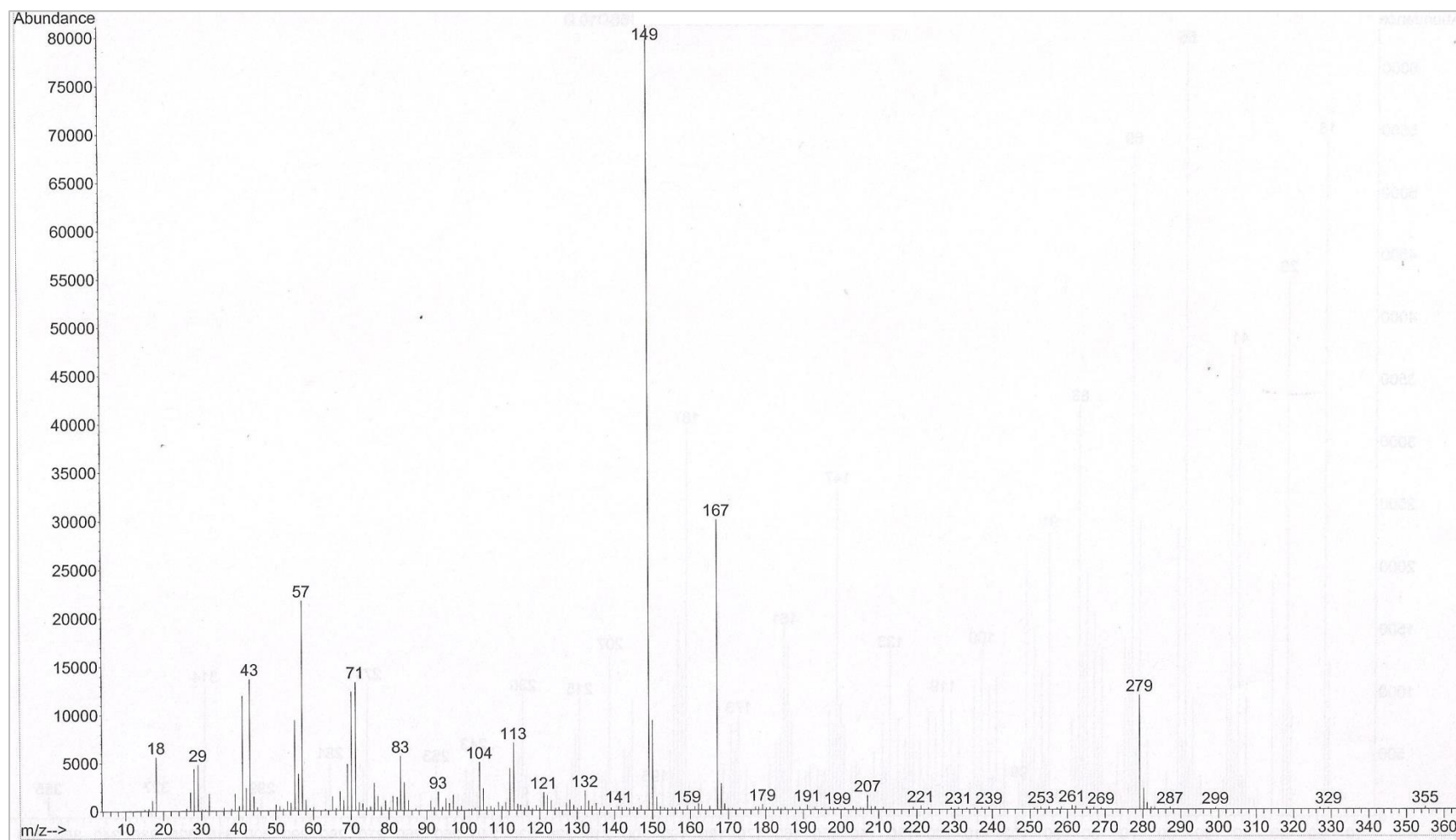


Anexo 12. Espectro de RMN de ^1H para el compuesto 7-7 (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).



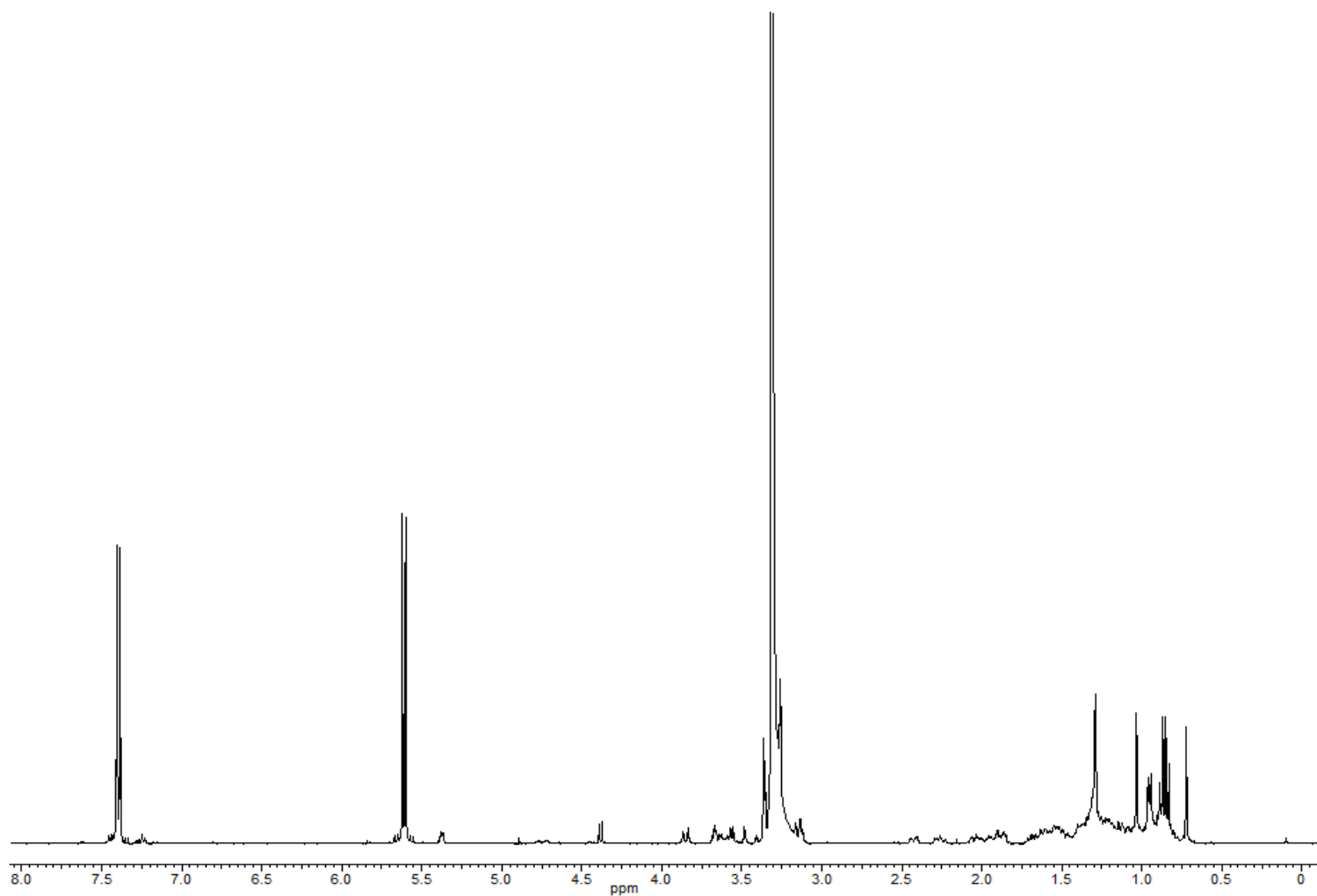
Anexo 13. Espectro de RMN de ^{13}C para el compuesto 7-7 (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica****



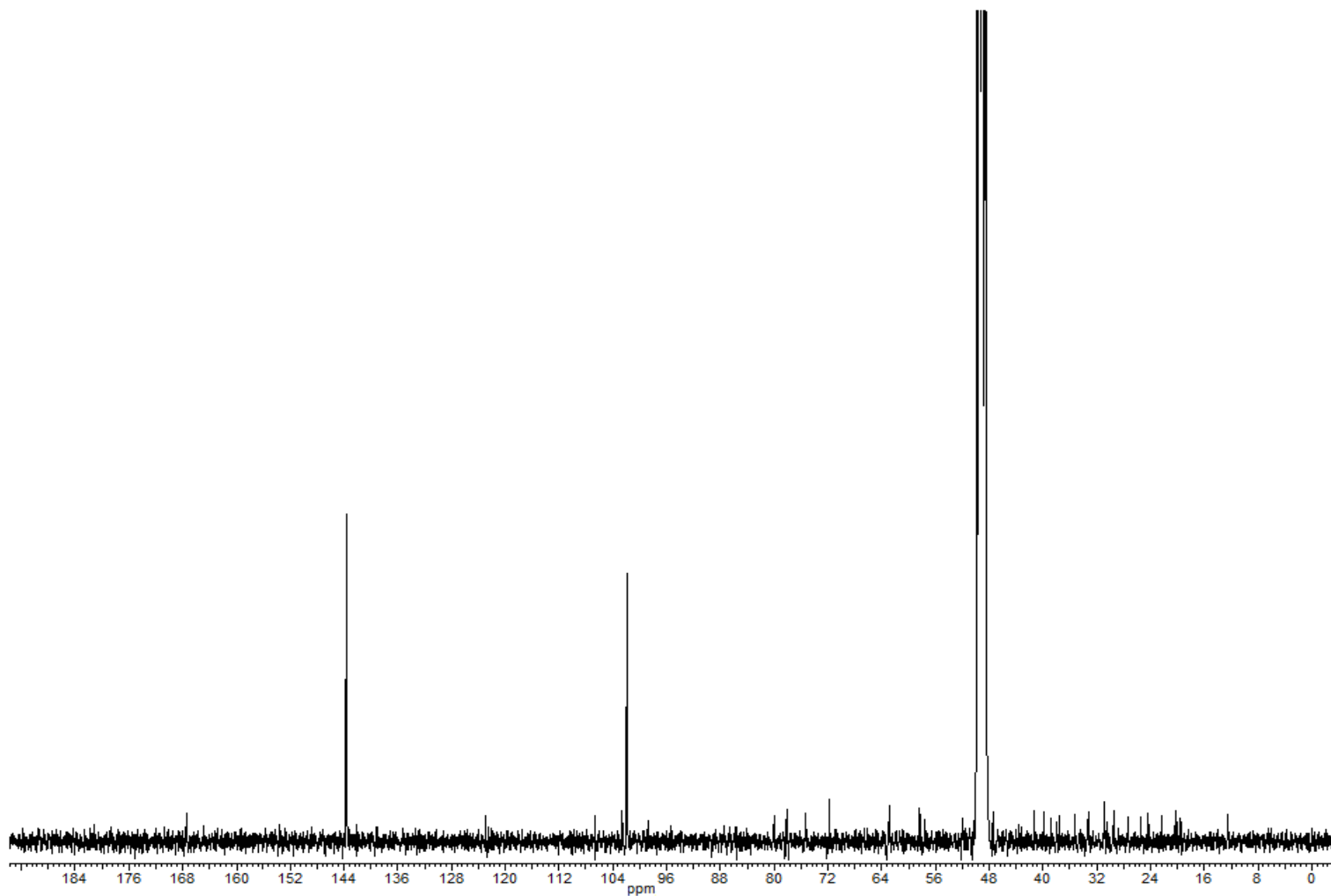
Anexo 14. Espectro de masas para el compuesto 7-7 (tr 25.45 min, PM 279 m/z).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina Salinispora pacífica***



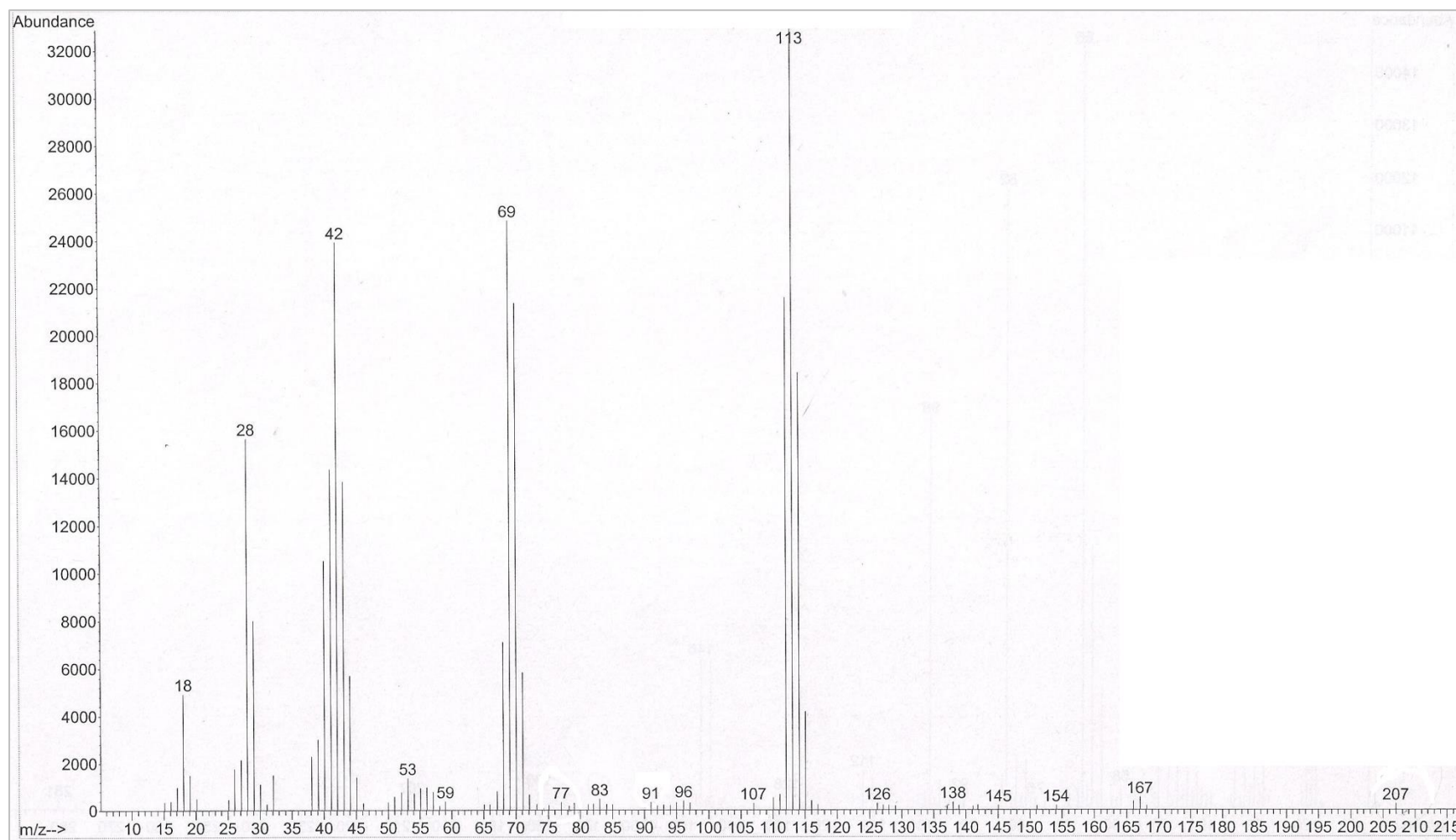
Anexo 15. Espectro de RMN de ^1H para el compuesto 11s (400 MHz, δ ppm, MeOD).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica****



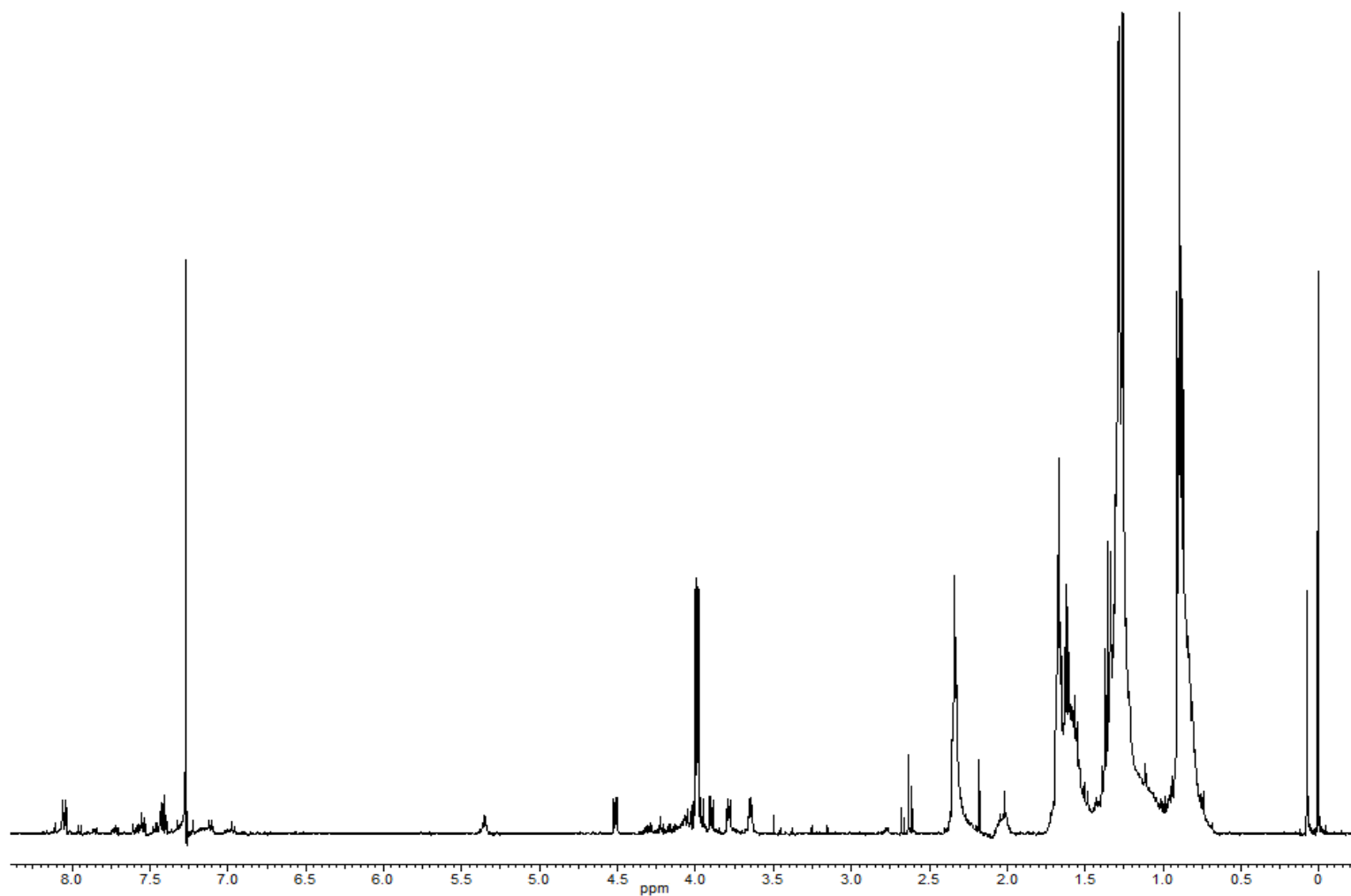
Anexo 16. Espectro de RMN de ^{13}C para el compuesto 11s (400 MHz, δ ppm, MeOD).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica****



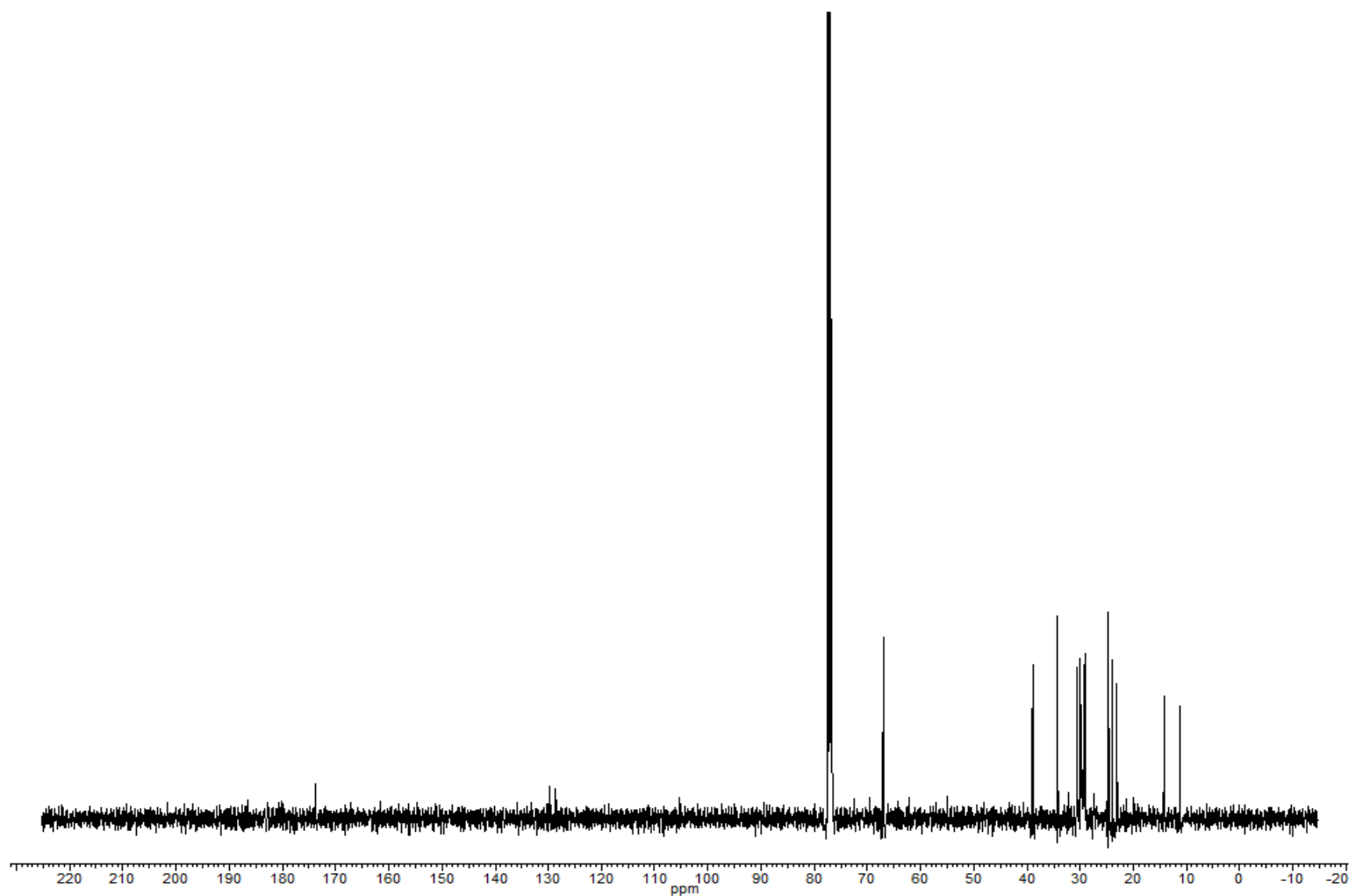
Anexo 17. Espectro de masas para el compuesto 11s (tr 17.280 min, PM 207 m/z).

Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica*



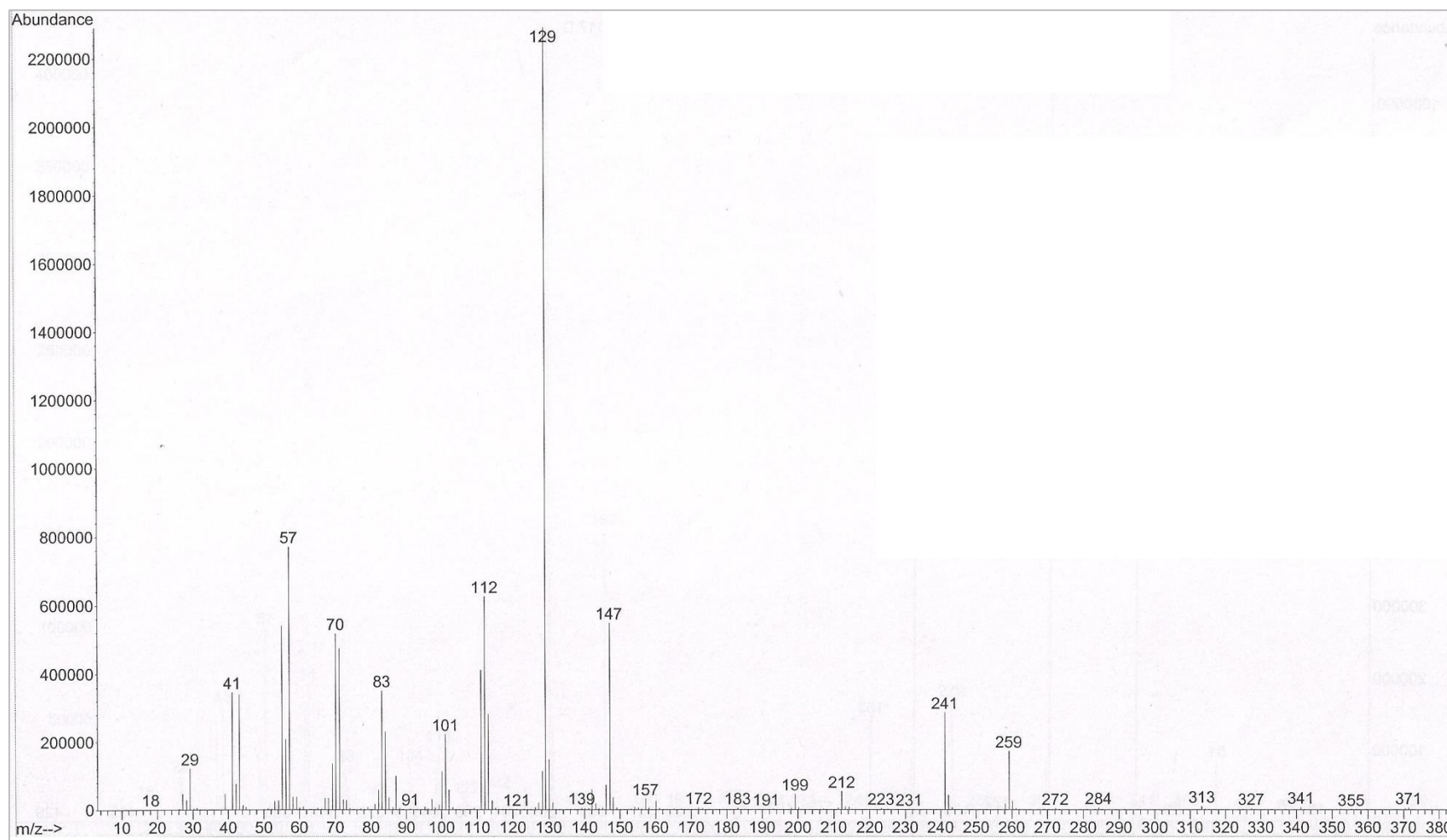
Anexo 18. Espectro de RMN de ^1H para el compuesto 42-12 (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica****



Anexo 19. Espectro de RMN de ^{13}C para el compuesto 42-12 (400 MHz, δ ppm, CDCl_3).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina *Salinispora pacífica****



Anexo 20. Espectro de masas para el compuesto 42-12 (tr 23.424 min, PM 259 m/z).

**Purificación y Elucidación Estructural de Compuestos Bioactivos Extraídos de la
*Actinobacteria Marina Salinispora pacífica***