

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



**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOMÉDICO DE LA CEPA
ACTINOBACTERIANA AMS165 CNY330 DEL GÉNERO *Salinispora*
pacifica.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFÍA COSTERA

PRESENTA

DORENY GUADALUPE BOBADILLA GÁMEZ

Ensenada, Baja California, México.

Enero, 2016.

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLÓGICAS
POSGRADO EN OCEANOGRAFÍA COSTERA
**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL BIOMÉDICO DE LA CEPA
ACTINOBACTERIANA AMS165 CNY330 DEL GÉNERO *Salinispora*
pacífica.**

TESIS

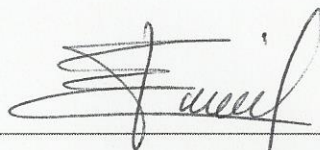
QUE PARA CUBRIR PARCIALMENTE LOS REQUISITOS NECESARIOS
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta

Doreny Guadalupe Bobadilla Gámez

Aprobada por:



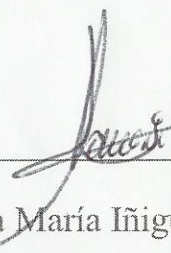
Dra. Irma Esthela Soria Mercado

Director de tesis



Dra. Roxana Rico Mora

Sinodal



M.C Ana María Iñiguez Martínez

Sinodal

Resumen

Se determinó la bioactividad y se separaron algunos de los compuestos de interés presentes en el extracto orgánico de la cepa actinobacteriana AMS165 CNY 330, aislada de sedimento marino de Bahía de los Ángeles, B.C. Para esto se preparó un extracto orgánico de la cepa y se probó la bioactividad de las fracciones del extracto crudo, a través de ensayos donde se observó la inhibición que estos tienen sobre líneas celulares de cáncer de colon (HCT-116), mama (MDA-MB-231) y pulmón (CRL-5872), así como sobre la bacteria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) y Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 11775). Las fracciones con mayor bioactividad se separaron utilizando diferentes técnicas de cromatografía (columna, capa delgada y de media presión) para la obtención de compuestos puros. Por último, los compuestos de interés se identificaron con métodos que permitieron la determinación de estructuras moleculares, como la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear. Se obtuvieron dos fracciones con bioactividad citotóxica contra HCT-116 (máxima concentración inhibitoria media igual a 4.95 µg/ml y 20.01 µg/ml) que corresponde a la línea celular de cáncer de colon y cuatro fracciones con actividad antibacteriana con concentraciones letales medias entre 120 y 170 µg/ml, además se encontró un compuesto puro que corresponde a un dipéptido cíclico con el nombre de Cyclo-L-Protil-L-Leucil que también ha sido aislado de un bacilo e inhibe la producción de aflatoxina por *A. parasiticus*.

Palabras clave: Bioactividad, citotóxica, antibacteriana, aflatoxina, cepa.

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.

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

A mi Directora de Tesis la Dra. Irma Soria por todo el apoyo, atención y cariño que me brindó sin miramientos, y convertirse con su fortaleza en un ejemplo de vida.

A la M.C Ana María Iñiguez por el apoyo durante el desarrollo del trabajo de tesis, por hacerme ver puntos importantes en varias ocasiones y aclararme las ideas de manera elocuente: “Te vas a equivocar” ☺

A la Dra. Roxana Rico por su apoyo y confianza durante la realización de este trabajo, por brindarme seguridad y enriquecer mi aprendizaje.

A mi familia, por su apoyo y paciencia: ¿No has apagado la luz?, ¿No has terminado?, ¿Sigues ahí?, ¡Apúrate que se te va a enfriar la comida! Jajajaj algunas de las frases motivadoras de toda mi vida como estudiante.

A mis buenas y lindas amistades por preocuparse por mi y apoyarme cuando lo necesité.

A mi perrito por ser el mejor compañero.

*Dios, dame la serenidad de aceptar las cosas que no puedo
cambiar; valor para cambiar las cosas que puedo; y
sabiduría para conocer la diferencia.*

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE.....	iv
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACIÓN	9
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL.....	10
OBJETIVOS PARTICULARES	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Separación cromatográfica de extracto actinobacteriano	12
Actividad antibiótica.....	14
Actividad citotóxica	15
Monitoreo de fracciones	17
Purificación de compuestos.....	19
RESULTADOS.....	20
Actividad citotóxica	22
Actividad antibacteriana.....	24
Análisis de RMN	26
Análisis con LC-MS.....	28
DISCUSIÓN	33
CONCLUSIONES.....	37
REFERENCIAS	38

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla I. Cromatografía en columna normal de sílice.	13
Tabla II. Datos proporcionados al instrumento de purificación (ACI), método de 18 min., con modo de detección Lambda-all.	19
Tabla III. Valores de concentración inhibitoria máxima media (IC ₅₀) obtenidos a partir del bioensayo de actividad citotóxica para la línea celular de carcinoma colorrectal (HCT-116).	23
Tabla IV. Respuestas obtenidas a partir del bioensayo citotóxico para la línea celular de cáncer de mama hormono-independiente, en forma prospectiva.	23
Tabla V. Respuestas obtenidas a partir de bioensayo citotóxico para la línea celular de carcinoma pulmonar, en forma prospectiva.	24
Tabla VI. Valores de la concentración letal media encontrados para las fracciones con mayor bioactividad frente a microorganismos patógenos.	25
Tabla VII. Datos de algunos desplazamientos de señales obtenidas de espectros (RMN- ¹ H) en monitoreo de fracciones.	26
Tabla VIII. Datos para la muestra CNY330-4 a partir de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos del análisis por LC-MS.	29
Tabla IX. Datos para la muestra CNY330-7 a partir de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos del análisis por LC-MS.	30
Tabla X. Datos para la muestra CNY330-13 a partir de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos del análisis por LC-MS.	30

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura. 1 Zona de colecta de sedimento marino, localizada en el Golfo de California (Latitud: 28.98995° N, Longitud: 113.3987167° O, marca amarilla) en julio de 2008.	12
Figura. 2 Diagrama del contenido de la metodología utilizada.	20
Figura. 3 Diagrama de primera selección de fracciones, interés en función de compuestos revelados en luz UV o por coloración ante vapores de lodo, en el monitoreo con placa (TLC) con su determinada fase móvil.	21
Figura. 4 Imagen del cristal obtenido de la separación de la muestra 330-9.	22
Figura. 5 Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN- ¹ H, 400 MHz) correspondiente al compuesto (3S,8Sa)-3-isobutilhexahidropirrol[1,2-a]pirazin-1,4-diona: (Ciclo L-leucil-L-prolil), en donde la señal alusiva a cada protón se representa con círculos y flechas de diferente color, exceptuando cuatro desplazamientos: 1.90 (1H, m, H-4), 1.98-2.09 (2H, m, H-4, H-10), 2.13 (1H, m, H-5), 2.35 (1H, H-5) pertenecientes al compuesto.	28
Figura. 6 Esquema de muestras obtenidas a partir de fraccionamiento del extracto crudo de la cepa actinobacteriana AMS165 CNY330.	32

INTRODUCCIÓN

El área de los productos naturales se ha desarrollado ampliamente a lo largo de la existencia de la humanidad, iniciando con el interés de los pueblos indígenas por el uso empírico que le dieron a las plantas y otros organismos para satisfacer sus necesidades de alimentación y salud, así como para el desarrollo de actividades religiosas. Con el paso del tiempo la confluencia de disciplinas científicas como la Botánica, Etnobotánica, Fitoquímica, Farmacología, etc. han dado soporte al estudio de los productos naturales que se obtienen de las plantas y otros organismos. Asimismo, una gran cantidad de fármacos provienen de los productos naturales que generan los organismos vivos.

Los metabolitos secundarios o productos naturales no son esenciales para el crecimiento de los organismos, pero generalmente se producen como mezclas de productos relacionados químicamente entre sí (Valencia-Ortiz, 1995). Su 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. Los metabolitos secundarios no presentan función determinada, pero en su biosíntesis, ayudan a diferentes procesos como por ejemplo la reproducción y alimentación (Anaya-Lang, 2003). Estos compuestos se presentan en buen porcentaje como sustancias bioactivas, que son aquellas que causan algún efecto sobre los

organismos vivos, entre los cuales se incluyen sustancias con valor importante en el tratamiento de enfermedades. Los organismos marinos representan una nueva fuente de compuestos biológicamente activos con interesantes propiedades tales como, antibacterianas, antimicóticas, citotóxicas, hemolisantes, entre otras. De tal manera, las especies marinas presentan un amplio espectro de nuevas sustancias, debido a la variabilidad química que reside dentro de la diversidad biológica de las mismas, puesto que los organismos necesitan desarrollarse y sobrevivir en un medio muy competitivo, y han desarrollado sofisticadas herramientas bioquímicas y fisiológicas para su química defensiva, ante las agresiones del medio. Esta variedad de estructuras químicas pueden ser utilizadas como herramientas para la síntesis de nuevas moléculas, con el fin de desarrollar productos útiles en la industria farmacéutica. Por otro lado, el incremento vertiginoso de patógenos fármaco-resistentes que pone en riesgo el futuro de las terapias antimicrobianas, ha motivado la búsqueda de nuevas cepas a partir de nuevas fuentes y el desarrollo de nuevas estrategias en la síntesis química y su aplicación antimicrobiana.

El caso de estudio que compete a este trabajo recae sobre la extracción de productos naturales a partir del cultivo de Actinobacterias, estos organismos presentan baja biodiversidad en la columna de agua comparada con el resto de las bacterias, de acuerdo a estudios realizados con el 16S ARN ribosomal usando unidades taxonómicas operacionales (UTOs) con un 97% de similitud,

además se observó un gradiente de la variedad de Actinobacterias, el cual va en aumento de los polos hacia el ecuador (Pommier et al. 2007).

Las Actinobacterias pertenecen al grupo Corineforme y al orden Actinomicetales, son Gram positivas cuya composición de bases de ADN es de 63 a 78 % 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. La mayoría de estos organismos son aerobios, aunque algunos de ellos son anaerobios facultativos u obligados (Logan, 1994). Son microorganismos filamentosos, que crecen en forma de red llamado micelio; esta estructura puede permanecer en la superficie y se le denomina micelio aéreo, o bien, unida a la superficie del sustrato y se llama micelio sustrato. Los filamentos individuales o hifas del micelio 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 esta estructura.

Después de casi tres décadas de investigación en el océano se han aislado Actinobacterias en el sedimento, en la columna de agua, en algas y animales marinos. El descubrimiento de Actinobacterias nuevas ha extendido su clasificación y aumentando la estimación de su abundancia.

Los informes describen que el aislamiento de actinobacterias de ambientes marinos ha estado dominado por especies de los géneros *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Streptomyces*. Estudios de cultivos han

demostrado que los ambientes marinos contienen una alta diversidad de actinobacterias, pero rara vez son recuperadas en su totalidad por los distintos métodos de cultivo (Maldonado et al. 2005).

El género *Salinispora* es el primer género de actinomicetos, reportado con un requerimiento estricto de agua de mar para sobrevivir y proliferarse (Jensen et al., 1991; Mincer et al., 2002). El nombre *Salinispora* proviene del latín *salinus*, salina y del griego *spora*, espora; el cual hace referencia a organismos formadores de esporas y de hábitat marino (Maldonado et al., 2005 y Mincer et al., 2005). Solamente tres especies de *Salinispora* han sido descritas, *Salinispora arenicola*, *Salinispora tropica* y *Salinispora pacifica* (Maldonado et al. 2005; Ahmed et al. 2013). Aunque las tres especies comparten más del 99% de identidad en sus secuencias del 16S rRNA, se distinguen en especies diferentes, a partir de la amplificación de la secuencia y basándose en la posición característica de los nucleótidos.

Aun cuando las especies están altamente relacionadas genéticamente, la presencia de rutas metabólicas específicas para cada especie sugiere que el metabolismo secundario es una característica muy importante, taxonómicamente hablando, para este grupo (Jensen, 2010).

Las especies de *Salinispora* tienen una distribución tropical y subtropical en los sedimentos marinos. Han sido aisladas de diferentes partes del mundo, incluyendo: el Mar Caribe, Mar rojo, del océano Atlántico tropical de las Bahamas, el océano Pacífico tropical de Guam y del Golfo de California.

Dentro de los compuestos más importantes para la industria biomédica se encuentran los antitumorales. *Salinispora sp.*, produce metabolitos pertenecientes a las familias de policétidos, péptidos no ribosomales, indolocarbazoles y sus mezclas, compuestos que presentan este tipo de actividad biológica. *Salinispora pacifica*, además de producir análogos de salinosporamida, a partir de sus cepas se han aislado compuestos como los glicósidos, cianosporacidas A y B, también salinipironas y pacificanonas (Oh *et al.*, 2006; Oh *et al.*, 2008).

ANTECEDENTES

La investigación química realizada durante las décadas pasadas, ha producido un conocimiento fundamental del metabolismo secundario marino, y estudios más recientes se han enfocado en las funciones biológicas de estos metabolitos (Fenical, 1982). Una especie puede contener más de 1000 entidades químicas únicas y esta variedad de estructuras pueden ser utilizadas para la síntesis de nuevas moléculas, con el fin de desarrollar productos útiles en la industria farmacéutica y agrícola (Faulkner, 2000). La diversidad de compuestos químicos en el ambiente marino puede deberse, en parte, a la extrema competencia entre los organismos por el espacio y los recursos. Esta hipótesis es referida a organismos sésiles, los cuales logran biosintetizar una diversidad de compuestos químicos o metabolitos secundarios, utilizados para la defensa en un medio muy competitivo, proporcionándoles ventajas evolutivas en la prevención de la depredación y adherencia. Igualmente, estos

compuestos son sustancias con valor terapéutico causando algún efecto sobre los organismos vivos (Darias-Jerez, 1998).

En años recientes, ha sido reportada una gran variedad de compuestos bioactivos extraídos de varios animales marinos como tunicados, esponjas, corales suaves, briozoos y moluscos, entre otros (Kijjoa y Sawangwong, 2004). Sin embargo, a pesar de que muchos organismos marinos han sido extensamente estudiados, tanto desde el punto de vista químico como biológico, todavía presentan grandes interrogantes para el hombre. Ellos poseen una gama de metabolitos secundarios (saponinas, terpenoides, esteroides, fenoles, alcaloides, entre otros) que han despertado el interés de muchos científicos, lo cual ha impulsado la colaboración multidisciplinaria entre grupos de investigadores para determinar su perfil farmacológico, ya que han demostrado su efectividad en tratamientos anticancerígenos, antiinflamatorios, antibacterianos, antitumorales entre otros, con estructuras orgánicas diferentes a los fármacos conocidos hasta ahora y con distintos mecanismos de acción (Hernández, 2005).

Se reconoce que los actinomicetos marinos se derivan de los terrestres ya que sus esporas son acarreadas al mar y que estas permanecieron en forma latente por años; 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, 1993). La 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, pero son habitantes habituales del suelo marino y poseen una capacidad enorme para producir antibióticos clínicamente útiles.

En los últimos años, el número de nuevos compuestos de interés médico farmacológico obtenidos de géneros de actinomicetos de origen terrestre ya conocidos ha decrecido; en cambio a partir de actinomicetos marinos principalmente de las familias *Streptomycetaceae* y *Micromonosporaceae* han ido en aumento, considerándose por ello como virtuales productores prolíficos de importantes metabolitos secundarios.

El primer actinomiceto aislado fue *Chainia purpurogena* de donde se obtuvo un antibiótico con estructura de benzatraquinona, fue denominada SS-228 y tiene la capacidad del 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 (Okazali *et al.*, 1975).

El descubrimiento de nuevas cepas de actinomicetos ha extendido su clasificación y aumentado la estimación de su número principalmente mediante técnicas moleculares como el estudio del gen 16SRNAr (Método de secuencia de ADN), entre otras. Como consecuencia, se ha ampliado el árbol filogenético de 6 familias con al menos 13 filotipos nuevos que han sido codificados como MAR 1 al 13. Los grupos MAR son estudiados actualmente por la alta producción de compuestos potentes como antibióticos e inhibidores del crecimiento de células cancerígenas (Fenical, 2006).

El género *Streptomyces* ha sido el más estudiado. A partir de él se han producido alrededor de 7600 compuestos bioactivos, incluyendo fármacos antitumorales (Bérdy, 2005). Uno de los grupos que destacan es el MAR2, perteneciente a la familia *Streptomycetaceae*, este grupo presenta una gran diversidad filogenética, lo que sugiere que está compuesto por múltiples especies nuevas. Las *Marinisporas* encontradas poseen policétidos derivados de polienos; los primeros compuestos aislados fueron las marinomicinas (A-C), con una estructura inusual de macrodiólidos formados de dímeros de lactonas ácidas. Otros miembros del grupo de *Marinispora* son las marinisporolide A y B, con estructuras de polienos-polioles relacionados con la clase roflamycina (flavomicina), la potencia y especificidad de estos compuestos contra algunas líneas celulares de cáncer sugiere que son muy selectivos, sin embargo, aún no se conoce el mecanismo de acción (Fenical & Jensen, 2006).

Para ilustrar la importancia de los organismos marinos, incluyendo los microorganismos, como fuentes de productos con aplicación comercial, se puede destacar que sólo en los Estados Unidos, existen al menos unas 90 compañías investigando productos naturales de organismos marinos. En 1998, la compañía PharmaMar había identificado 250 compuestos activos, de los cuales 30 culminaron en patentes. Además, en los Estados Unidos, para apoyar la investigación biotecnológica marina, el Departamento de Comercio creó el «Sea Grant Program», que busca nuevas drogas y compuestos químicos útiles al hombre. Un esfuerzo aún más ambicioso es el instaurado en Japón, donde el

Instituto de Biotecnología Marina ha reunido 24 compañías grandes, con presupuestos y embarcaciones de investigación propios (Manzi y Mayz, 2003). Así mismo, la división de búsqueda de bioactivos marinos (DBMR) del Instituto Harbor Branch Oceanographic (HBOI), una división de DBMR colecta muestras a través del Atlántico, el Caribe, el Pacífico y el Indo Pacífico donde se incluye a Venezuela como uno de sus sitios de muestreos, además, de las Bahamas, Jamaica, Antillas, Islas Vírgenes, Belice, Honduras, y Colombia, entre otros, donde la colección es de aproximadamente 24000 macroorganismos (Kumar y Zi-rong, 2004; McCarrthy y Pomponi, 2004).

JUSTIFICACIÓN

Los organismos marinos en toda su extensión pueden brindar un inmenso potencial biotecnológico. Estos por muy pequeños que sean, presentan estrategias para la supervivencia, mostrando que pueden ser utilizados para el beneficio del hombre en el campo de la biomedicina, farmacología marina y para la síntesis de nuevos compuestos a partir de innovadoras estructuras químicas. Actualmente, el estudio de los productos naturales está dado principalmente desde el punto de vista estructural, puesto que estos compuestos suponen retos importantes para la aplicación de estrategias analíticas que permitan elucidar su estructura química. Por otro lado, la actividad biológica presentada por muchos metabolitos secundarios y sus derivados los hace sumamente atractivos en la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos. Por lo tanto, en este trabajo se evalúa el potencial biomédico de una cepa actinobacteriana, en la búsqueda de nuevos compuestos con

actividad biológica, a partir de pruebas contra líneas celulares de carcinoma colorectal (HCT-116), pulmonar (CRL-5872) y mama (MDA-MB-231), así como también contra las bacterias patógenas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, donde eventualmente se detectan y purifican los compuestos antes mencionados.

HIPÓTESIS

El extracto crudo de la cepa actinobacteriana AMS 165 CNY 330 aislada de sedimento marino de Bahía de los Ángeles, B.C., presenta sustancias con función biológica de interés farmacológico:

- Efecto positivo contra líneas celulares de cáncer de colon (HCT-116), mama (MDA-MB-231) y pulmón (CRL-5872).
- Inhibición del crecimiento de la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* ATCC 11775.

OBJETIVO GENERAL: Determinar la bioactividad y la estructura de los compuestos de interés presentes en el extracto orgánico de la cepa actinobacteriana CNY 330, aislada de sedimento marino de Bahía de los Ángeles, B.C.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ✚ Fraccionamiento de extracto orgánico de la cepa AMS 165 CNY 330.

- ✚ Determinación de la actividad citotóxica de las fracciones del extracto orgánico frente a células de carcinoma colorectal (HCT-116), pulmonar (CRL-5872) y de mama (MDA-MB-231).
- ✚ Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos, frente a bacterias patógenas Gram + y Gram -.
- ✚ Aislamiento y elucidación estructural de compuestos a partir de las fracciones bioactivas.
- ✚ Determinación de actividad citotóxica y antibacteriana en compuestos puros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se utilizó el extracto crudo de una cepa de actinobacteria marina, AMS 165 CNY 330 identificada como *Salinispora pacífica*, aislada de sedimento colectado a 20 m de profundidad en julio de 2008 (Latitud:28.98995° N, Longitud: 113.3987167° O) en el Golfo de California (Fig.1), perteneciente a las colecciones de actinobacterias del laboratorio de Química Marina de la Facultad de Ciencias Marinas y del Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía de Scripps, en la Universidad de California, San Diego.



Fig. 1 Zona de colecta de sedimento marino, localizada en el Golfo de California (Latitud: 28.98995° N, Longitud: 113.3987167° O, marca amarilla) en julio de 2008.

Separación cromatográfica de extracto actinobacteriano

Se suspendió el extracto crudo con su disolvente de afinidad (Acetato de etilo), se mezcló con gel de sílice fase normal (60 Å de 0.2 mm) impregnada con isooctano, después se concentró mediante destilación a presión reducida con un rotaevaporador (Hei-VAP Value “The Collegiate”, Heidolp) hasta sequedad y se colocó en una columna cromatográfica (MARCA Y DIMENSIONES) empacada con resina de sílice (fase estacionaria) y conectada al sistema de vacío para acelerar el flujo del solvente (fase móvil). La columna armada se lavó con solventes de menor a mayor polaridad y también de manera inversa (Isooctano, Acetato de etilo y Acetonitrilo, grado HPLC, 200 mL por solvente). Se eluyó la columna con mezclas de solventes (Tabla I) y las

fracciones obtenidas del extracto se concentraron a sequedad mediante destilación a presión reducida.

Tabla I. Cromatografía en columna normal de sílice.

No. de fracción	Solvente	Porcentaje en la mezcla (%)
1	Isooctano	100
2	Isooctano : AcOEt.	90 : 10
3	Isooctano : AcOEt.	85 : 15
4	Isooctano : AcOEt.	80 : 20
5	Isooctano : AcOEt.	70 : 30
6	Isooctano : AcOEt.	50 : 50
7	Isooctano : AcOEt.	25 : 75
8	Isooctano : AcOEt.	15 : 85
9	Isooctano : AcOEt.	10 : 90
10	Acetato de etilo	100
11	AcOEt: ACN	95 : 5
12	AcOEt: ACN	90 : 10
13	AcOEt: ACN	85 : 15
14	AcOEt: ACN	75 : 25
15	AcOEt: ACN	60 : 40
16	AcOEt: ACN	40 : 60
17	AcOEt: ACN	25 : 75
18	Acetonitrilo	100
19	ACN : MeOH	70 : 30
20	ACN : MeOH	50 : 50
21	ACN : MeOH	30 : 70
22	Metanol	100

Cada fracción se monitoreó de manera particular mediante el uso de placas para cromatografía en capa fina (en inglés thin layer chromatography o TLC correspondientes a placas de gel de sílice 60 Å F254 con una capa de espesor de 0.2 mm), se utilizaron solventes de diferente polaridad (baja, intermedia y alta) y se empleó luz ultravioleta (lámpara marca 5100 Walnut Grove) para revelar los compuestos separados en estas placas, y también vapores de Iodo reactivo como agente cromogénico.

Actividad antibiótica

Se prepararon soluciones en sulfóxido de dimetilo (DMSO, grado analítico, Thermo Fisher Scientific Inc.) de cada una de las fracciones obtenidas, a una concentración de 10 mg/ml.

Los microorganismos utilizados corresponden a una cepa Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), y una cepa Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 11775), donadas por el Laboratorio de Bioprotección Costera, de la unidad de Química en Sisal. Las cepas ATCC, presentan patrones de sensibilidad conocidos, por lo que al montar una prueba de sensibilidad, ésta debe encontrarse dentro de los límites máximos o mínimos descritos por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014).

Como antimicrobiano de referencia se utilizó una solución de carbenicilina (Sigma-Aldrich) con una concentración de 10 mg/ml. El ensayo se realizó mediante el método de microdilución en caldo siguiendo las recomendaciones de Coyle, (2005).

Todo el material empleado fue manejado en condiciones de asepsia. Se dispensaron 100 μ l de medio de cultivo Mueller Hinton Broth (MHB) en cada uno de los pozos de la microplaca, adicionalmente se agregaron 92 μ L del MHB en los pozos de la primera fila. Después se agregaron 8 μ l de cada una de las muestras (soluciones preparadas de fracciones) en la misma fila.

Posteriormente, se realizaron diluciones (se transfirieron 100 μ L de la primera fila a la segunda, después se tomaron 100 μ L de la segunda fila y se llevaron a la siguiente, este paso se repite de manera sucesiva hasta la última fila, en ésta los 100 μ l sobrantes son desechados). Después, se adicionaron cuidadosamente 100 μ l del inóculo bacteriano ajustado a 1×10^6 UFC/ml en toda la microplaca, excepto en el pozo correspondiente al control negativo pues este sólo contiene medio de cultivo MHB, donde el control positivo contiene MHB más el inóculo bacteriano. El volumen final en cada uno de los pozos de la microplaca fue de 200 μ l.

Como control de pureza se tomaron 30 μ L del inóculo bacteriano ajustado y se colocaron en una placa de Agar Tripticasa Soya (ATS). Finalmente, se incubaron las microplacas a 35 °C por 24 horas, se midió la absorbancia en un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific Inc) a 620 nm y se obtuvo la concentración letal media (CL_{50}) a partir de la función estadística "Probit" del software Minitab 16.

Actividad citotóxica

Una vez obtenidas las fracciones del extracto actinobacteriano, cada una de ellas se preparó en solución con una concentración de 10 mg/ml en DMSO (grado analítico, Thermo Fisher Scientific Inc.).

Para realizar los bioensayos se llevó a cabo el crecimiento de diferentes células cancerígenas: colorrectales (HCT-116), pulmonares (CRL-5872) y de mama (MDA-MB-231). Las células se cultivaron en medio McCoy's 5A (RPMI 1640), suplementado con suero fetal bovino (Corning, Inc.) al 10%, solución tampón Hepes (Sigma-Aldrich Corp.) 1M y solución de penicilina-estreptomicina-anfotericina B (100x). Los cultivos se incubaron a 37 °C (Incubadora Thermo Scientific) con flujo de CO₂ (5%).

En una microplaca de 96 pozos (Corning, Inc.) se agregó una suspensión celular (células cancerígenas a una concentración de 2.5×10^4 células/ml.), se agregaron 175 µl a los pozos de la primera fila (A1 a A12) después se agregaron 150 µl de la misma, al resto de los pozos de cada microplaca, evitando los pozos correspondientes a los blancos, para realizar una incubación durante 24 horas. Se utilizó al estándar anticancerígeno Etoposide VP-16 (Sigma-Aldrich Corp.) como control positivo, DMSO como control negativo, y el medio de cultivo RPMI se usó como blanco.

Las muestras a probar (25 µl de cada fracción obtenida) se colocaron por pozo en la placa, de igual manera se agregó 25 µl de DMSO al pozo correspondiente al control negativo, y 25 µl del anticáncer Etopósido al pozo

correspondiente al control positivo, después se realizó una dilución serial de 50 μ l desde la primera fila hasta la última, sin los pozos utilizados como blancos y una vez terminadas las diluciones, las microplacas se incubaron por 72 horas.

El indicador del metabolismo celular activo, se preparó con sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS, Promega) y metosulfato de fenazina (MSF, Sigma-Aldrich Corp.) a una concentración de 0.92 mg/ml y 2.0 mg/ml respectivamente, en solución salina amortiguada con fosfatos de Dulbecco sin $MgCl_2$ y $CaCl_2$ (SSTD, Sigma-Aldrich Corp).

A cada pozo se le agregaron 20 μ l del indicador, se incubó cada microplaca por tres horas y se midieron las densidades ópticas en un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific Inc.) a 490 nm. Finalmente, se calculó la concentración inhibitoria máxima media CI_{50} , que representa la concentración necesaria de una sustancia para conseguir una inhibición del crecimiento celular en un 50% *in vitro*.

Monitoreo de fracciones

En el Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana se analizaron las fracciones obtenidas de cromatografía en columna, mediante espectrometría de resonancia magnética nuclear de protones (RMN- 1H). Las muestras se disolvieron en 0.6 mL de cloroformo deuterado (Sigma-aldrich) y se corrieron en un instrumento de RMN (Bruker,

Avance III HD, 400 MHz), de tal manera se obtuvieron los espectros que fueron visualizados en el software ACD/Labs (Advanced Chemistry Development, Inc.)

En el Centro de Biotecnología Marina y Biomedicina del Instituto de Oceanografía de Scripps se analizaron las fracciones mediante cromatografía líquida acoplada a un detector selectivo de masas (LC-MS/MS, Agilent 1260) de alta resolución, cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF por sus siglas en inglés) y una fuente de ionización por electrospray (ESI).

Las fracciones se filtraron por una luz de malla de 0.2 μm (filtros con jeringa Acrodisc PTFE, Pall Inc.), se disolvieron en metanol grado HPLC (High Purity Liquid Chromatography) para obtener una concentración de 1mg/ml y se llevaron a viales de 1 ml para su posterior inyección en el equipo cromatográfico anteriormente descrito. Se utilizó una columna de fase reversa C18, se inyectaron 10 μl bajo las siguientes condiciones de elución: 1–9 min: 10% Acetonitrilo (0.1% TFA) en H₂O (0.1% TFA), 9–13 min: 10–100% Acetonitrilo (0.1 % TFA), 13–15 min: 100 % Acetonitrilo (0.1 % TFA). La energía de colisión para el Q-TOF se fijó a 20 eV, descartando los primeros 5 minutos del flujo (0.7 ml/min). Los espectros de masas fueron generados en modo positivo y el rango de masas fue de 100-1700 unidades de masa/carga (m/z). Los datos se analizaron con ChemStation (Agilent), y los datos de masas con MassHunter (Agilent).

Nuevamente cada fracción se monitoreó mediante el uso de placas para cromatografía en capa fina, se utilizaron mezclas de solventes para obtener diferentes polaridades (baja, intermedia y alta) y también se empleó luz

UV y vapores de lodo reactivo, para revelar los compuestos separados en estas placas.

Purificación de compuestos

En el Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana se realizó la separación de los compuestos presentes en las fracciones de interés obtenidas a partir de la discriminación de las mismas en función de los bioensayos y los espectros de RMN- H^1 . Las muestras se disolvieron en cloruro de metileno y se mezclaron con partículas de sílice, poco a poco hasta conseguir la sequedad de la muestra, misma que se colocó en la parte superior de un cartucho (Biotage® SNAP KP-Sil) para cromatografía flash estándar, lleno de sílice de 50 μm con una superficie de contacto de 500 m^2/g . El cartucho se colocó en un equipo cromatográfico de aislamiento acelerado (ACI™) con las condiciones colocadas en la Tabla II.

Tabla II. Datos proporcionados al instrumento de purificación (ACI), método de 18 min., con modo de detección Lambda-all.

Muestra (fracción)	CNY330-4	CNY330-7	CNY330-13
Mezcla de eluyente	AcOEt/DCM	DCM/AcOEt	AcOEt/MeOH
Proporción	10 : 90	50 : 50	90 : 10
RF _{PRINCIPAL}	0.55	0.37	0.52
RF _{SUPERIOR}	0.84	0.59	0.73
RF _{INFERIOR}	0.11	0.18	0.39

Los productos obtenidos de la separación cromatográfica con las distintas mezclas de solventes, se concentraron a sequedad con un rotaevaporador para su posterior análisis de identificación. Finalmente, un esquema de las técnicas utilizadas en la metodología de este trabajo, se puede ver en la Figura 2.

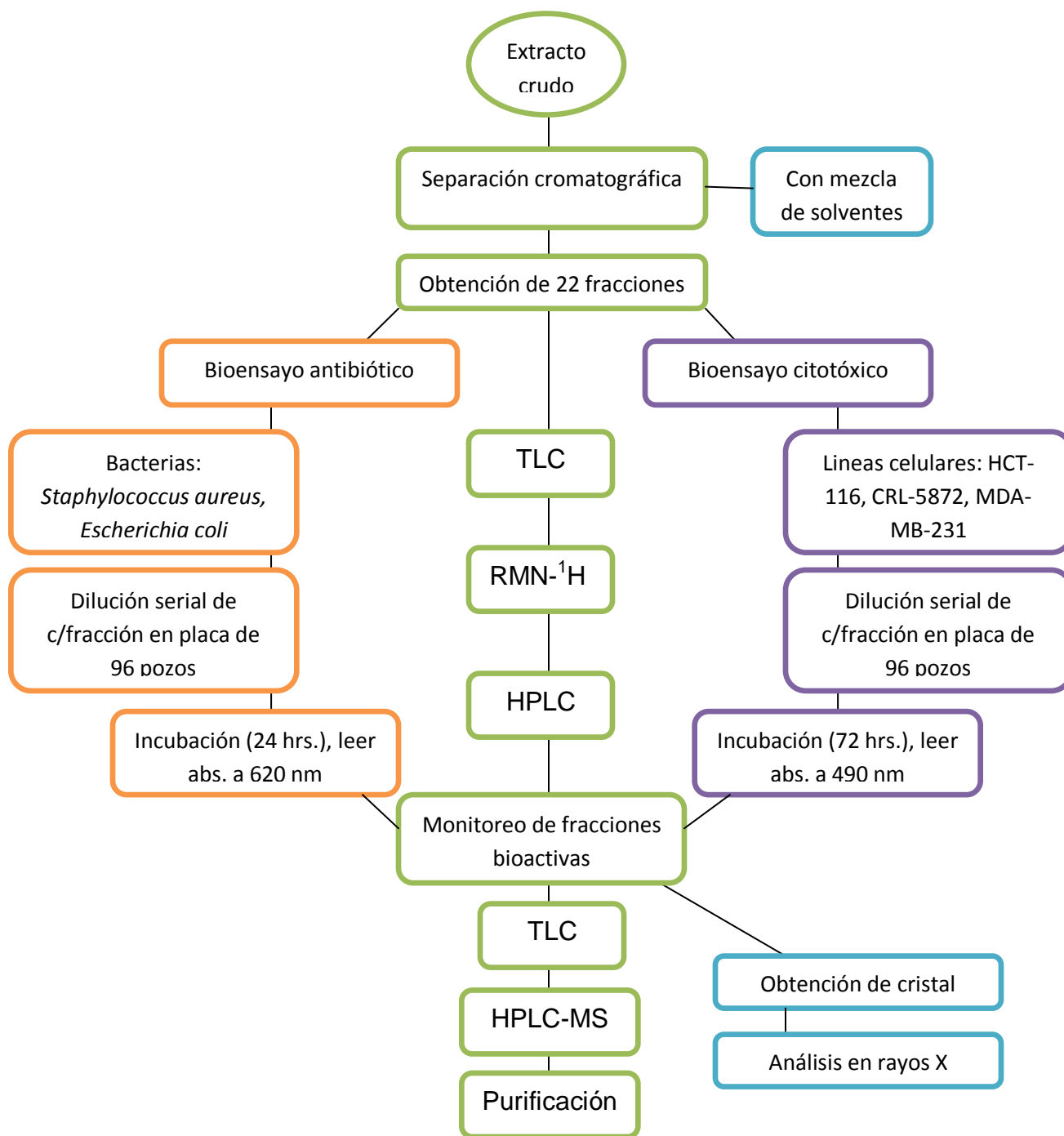


Fig. 2 Diagrama del contenido de la metodología utilizada.

RESULTADOS

A partir de la separación del extracto crudo en columna abierta (Tabla I), se obtuvieron 22 fracciones con diferentes características físicas (olor, color, textura) desde una baja a una alta polaridad.

En función del monitoreo en placa (TLC), que inició con una mezcla de los solventes Acetato de etilo y Acetonitrilo en una proporción 75 : 25 (después se aumento y disminuyó la polaridad) se encontraron compuestos que se revelan en forma muy evidente ante la luz UV y también con el uso del agente cromogénico, de tal manera se obtuvo la primera discriminación de grupos de fracciones que serían separadas posteriormente, (Fig. 2) correspondientes a las fracciones 330-2 a 330-9, 330-14 y 330-17 con su respectiva mezcla de solventes.

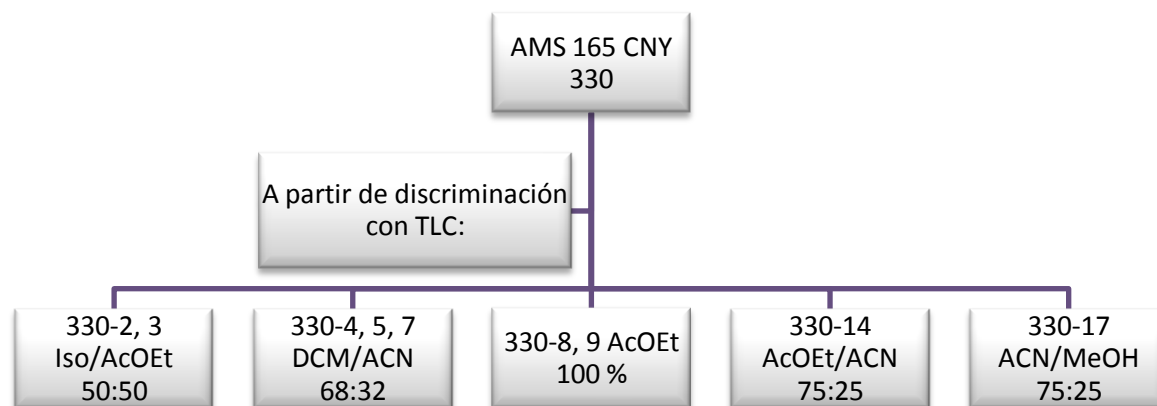


Fig. 3 Diagrama de primera selección de fracciones, interés en función de compuestos revelados en luz UV o por coloración ante vapores de iodo, en el monitoreo con placa (TLC) con su determinada fase móvil.

Las fracciones 330-9, 10, 11, y 14 se observaron como propensas a cristalizar, al realizar su monitoreo (suspensión de muestra y punteo en placa) con el uso de acetato de etilo, así que las muestras se quedaron en reposo y el sobrenadante se colocó con Isooctano en un nuevo vial, y sólo la parte de la muestra separada de la fracción 330-9 en el nuevo vial, se transformó en un sólido cristalino (Fig. 3), el cual fue analizado por cristalografía de rayos X y se determinó la estructura de la molécula, gracias a la difracción de la muestra.

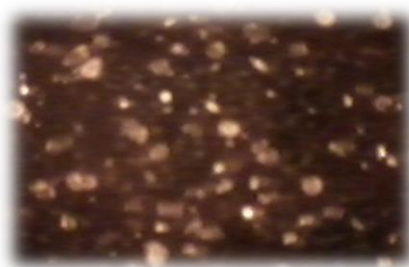


Fig. 4 Imagen del cristal obtenido de la separación de la muestra 330-9.

Actividad citotóxica

La primera prueba de actividad biológica se llevó a cabo contra la línea celular cancerígena HCT-116 (colorrectal); durante el tiempo de incubación las células cancerosas reducen la sal MTS tetrazolio a sal formazán (compuesto de color azul, soluble en el medio de cultivo celular). Por lo tanto, la cantidad de células metabólicamente activas es proporcional a la cantidad de formazán producido, si las células comienzan a morir la coloración cambia de azul a una tonalidad más clara, pues la producción de formazán no tiene lugar.

En este bioensayo se probaron las 22 fracciones de la separación cromatográfica, pero únicamente las fracciones 330-6 y 330-7 (Tabla III) obtuvieron respuesta favorecedora, con una concentración máxima inhibitoria media igual a 4.95 $\mu\text{g/ml}$ y 20.01 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Este resultado proporcionó otra característica para la evaluación de esta cepa en función de bioactividad, así como otra propiedad que otorgó un mayor porcentaje a la selección de las fracciones antes mencionadas, para su posterior purificación.

Tabla III. Valores de concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}) obtenidos a partir del bioensayo de actividad citotóxica para la línea celular de carcinoma colorrectal (HCT-116).

Muestra	IC_{50}
CNY 330-6	4.95 $\mu\text{g/ml}$
CNY 330-7	20.01 $\mu\text{g/ml}$

Todas las fracciones fueron probadas en forma prospectiva contra la línea celular de cáncer de mama hormono-independiente (MDA-MB-231), este bioensayo resultó positivo únicamente para aquellos compuestos que se encuentran mezclados en las fracciones 330-2, 330-6 y 330-8 puesto que estas muestras, con una concentración igual a 19.5 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla IV) consiguieron entre el 25 y 39 % de inhibición del crecimiento de la línea celular, donde la fracción con mayor porcentaje de bioactividad corresponde a la muestra 330-6.

Tabla IV. Respuestas obtenidas a partir del bioensayo citotóxico para la línea celular de cáncer de mama hormono-independiente, en forma prospectiva.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Sobrevivencia (%) de MDA-MB-231
CNY330-2	19.5	61.7

CNY330-6	19.5	60.8
CNY330-8	19.5	74.6

Las fracciones obtenidas también fueron probadas en forma prospectiva contra la línea celular de carcinoma pulmonar (CRL-5872), en este bioensayo las fracciones correspondientes a 330-6, 330-8 y 330-20 con una concentración igual a 19.5 µg/ml (Tabla V) consiguieron alrededor del 30 % de inhibición del crecimiento de la línea celular, donde la fracción con mayor porcentaje de bioactividad nuevamente corresponde a la muestra 330-6, con lo que se promueve una posterior purificación.

Tabla V. Respuestas obtenidas a partir de bioensayo citotóxico para la línea celular de carcinoma pulmonar, en forma prospectiva.

Muestra	Concentración (µg/ml)	Sobrevivencia (%) de CRL-5872
CNY330-6	19.5	69.6
CNY330-8	19.5	72.3
CNY330-20	19.5	70.1

Actividad antibacteriana

Se analizaron un total de 22 fracciones obtenidas del extracto crudo de *Salinispora pacifica* (CNY330 AMS165). El bioensayo realizado mostró que el 45.4% de las fracciones presentaron cierta bioactividad frente a bacterias (Gram-positivas y Gram-negativas) pues con valores de 100 a 500 µg/ml (Anexos Tabla I) inhibieron el crecimiento poblacional de estos microorganismos por arriba del 25 %.

De manera particular y en función de este bioensayo que evalúa la capacidad de los compuestos para inhibir *in vitro* el desarrollo bacteriano, las muestras 330-2, 330-9 y 330-13 fueron las mas bioactivas contra la bacteria Gram-positiva e indicaron que se requiere de una concentración de 176.79 µg/ml de la misma para conseguir inhibir el desarrollo del 50 % de la población de *Staphylococcus aureus* (Tabla VI), a partir del dato del percentil 50 obtenido del gráfico con la función Probit, con un intervalo de confianza del 95 %. La muestras 330-4 y 330-7 fueron las mas bioactivas contra la bacteria Gram-negativa e indicaron que se requiere de una concentración de 143.21 µg/ml y 191.44 µg/ml de las mismas para conseguir inhibir el desarrollo del 50 % de la población de *Escherichia coli* (Tabla VI), a partir de los valores porcentuales de mortandad arrojados experimentalmente por la exposición de este microorganismo a diferentes concentraciones de la muestras antes mencionadas.

Tabla VI. Valores de la concentración letal media encontrados para las fracciones con mayor bioactividad frente a microorganismos patógenos.

Muestra	CL ₅₀ (µg/ml)	Microorganismo probado
CNY330-2	176.79	<i>Staphylococcus aureus</i>
CNY330-9	120.77	<i>Staphylococcus aureus</i>
CNY330-13	156.83	<i>Staphylococcus aureus</i>
CNY330-4	143.21	<i>Escherichia coli</i>
CNY330-7	191.44	<i>Escherichia coli</i>

Análisis de RMN

Las 22 muestras obtenidas del fraccionamiento en columna se llevaron a resonancia magnética nuclear de protones para su monitoreo y aquellas que presentaron desplazamientos de protones asociados a dobles enlaces, o grupos funcionales tales como carboxilos e hidroxilos se consideraron como fracciones de interés. De tal manera, se consiguió la selección de las fracciones 330-6, 7, 8, 13 y 15, en función de los desplazamientos observados en sus respectivos espectros (Tabla V) se posicionaron como muestras con componentes interesantes.

Tabla VII. Datos de algunos desplazamientos de señales obtenidas de espectros (RMN-¹H) en monitoreo de fracciones.

Muestra	Desplazamiento químico (δ, ppm)	Grupo funcional al que pertenece el tipo de protón (respectivamente)
330-6	10.03, 8.29, 7.86, 6.12, 4.44	Ac. Carboxílico, Amina secundaria, Aromático, Alqueno, Hidroxilo
330-7	9.55, 8.06, 7.57, 6.08, 5.55, 5.11, 2.63	Aldehído o Amina, Amina secundaria, Aromático, Alqueno, Hidroxilo en arilo (ArOH), Amida, Alquino o Aldehído
330-8	7.8, 7.32, 7, 6.76, 5.89, 4.56, 3.65	Amina secundaria, Aromático, Aromático o Alqueno, ArOH, Alqueno, Hidroxilo, Hidroxilo
330-13	9.69, 8.30, 7.97, 7.06, 6.43, 4.55, 3.64	Aldehído o Amina, Amina secundaria, Amina secundaria, Aromático,

330-15	8.39, 8.23, 7.58, 7, 5.95, 4.54, 3.65, 2.80	Alqueno, Hidroxilo, Halogenuro de alquilo Amina secundaria, Amina secundaria, Aromático, Aromático, Alqueno, Hidroxilo, Hidroxilo, Alquino o Hidroxilo.
---------------	--	---

En el caso de la fracción CNY330-9 (muestra que fue obtenida en forma de cristal) el espectro de RMN-¹H mostró un desplazamiento (δ) a campo alto de 0.96 ppm que integra para tres protones (3H) con una señal doble o doblete (d), correspondiente al metilo del carbono número 11 en el compuesto, otra señal a δ = 1.00 ppm que integra para 3H, con señal d, del metilo en el carbono 12, una señal a δ = 1.52 ppm que integra para 1H, con señal doble doblete (ddd), del protón en el carbono 10, una señal múltiple (m) a δ = 1.74 ppm que integra para un protón (1H) en el carbono 11, una señal m δ = 1.90 ppm que integra para 1H en el carbono cuatro, una señal m a δ = 1.98-2.09 ppm que integra para dos protones (el otro protón en el carbono cuatro y el carbono 10), una señal m a δ = 2.13 ppm correspondiente a un protón en el carbono cinco, una señal doble de doble de doble de dobles (dddd) a δ = 2.35 ppm de otro protón en el carbono cinco, una señal m a δ = 3.56 ppm que integra para dos protones del carbono tres, una señal doble de dobles (dd) a δ = 4.01 ppm correspondiente a un protón en el carbono nueve, una señal triple (t) a δ = 4.11 ppm de un protón del carbono seis, y un δ = 5.86 ppm con una señal simple (s) para el protón enlazado al nitrógeno presente en el compuesto (Fig. 10).

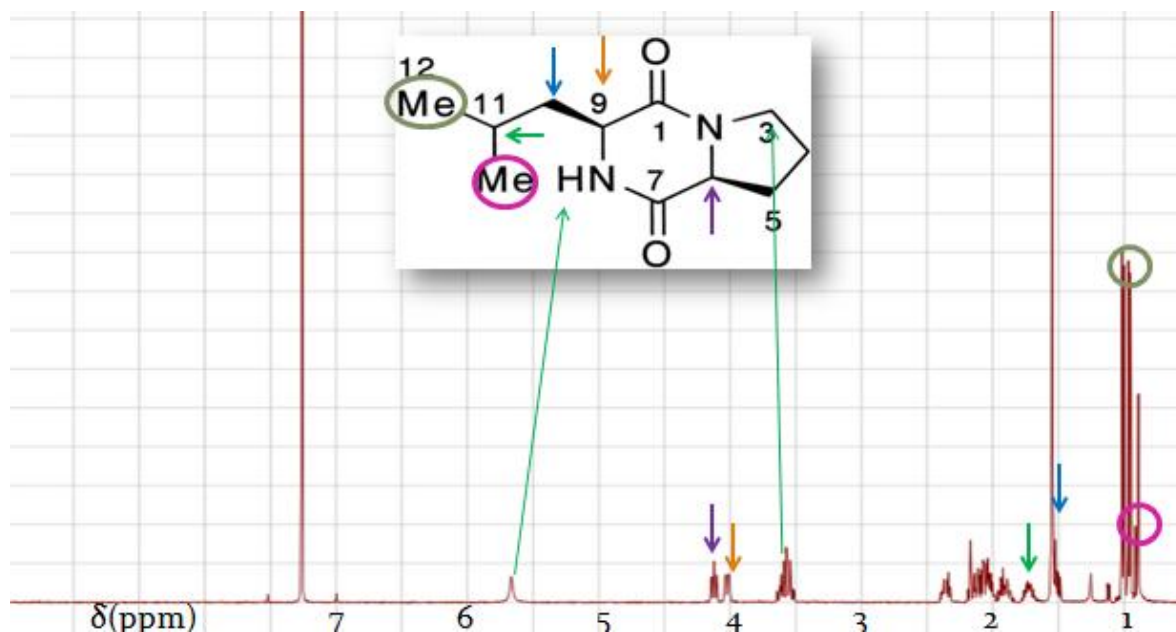


Fig. 5 Espectro de resonancia magnética nuclear de protones (RMN- ^1H , 400 MHz) correspondiente al compuesto (3S,8Sa)-3-isobutylhexahidropirrol[1,2-a]pirazin-1,4-diona: (Ciclo L-leucil-L-prolil), en donde la señal alusiva a cada protón se representa con círculos y flechas de diferente color, exceptuando cuatro desplazamientos: 1.90 (1H, m, H-4), 1.98-2.09 (2H, m, H-4, H-10), 2.13 (1H, m, H-5), 2.35 (1H, H-5) pertenecientes al compuesto.

Análisis con LC-MS

A partir del uso del equipo de cromatografía líquida acoplado a un detector selectivo de masas (LC-MS/MS, Agilent 1260), se obtuvieron cromatogramas de las 22 fracciones iniciales para conocer la respuesta ante el método utilizado. Después de manera selectiva y en función de la respuesta obtenida en los bioensayos antibacterianos, se analizaron los cromatogramas de las fracciones 330-4, 330-7 y 330-13 (la muestra correspondiente a 330-2, no fue evaluada a la par de las antes mencionadas por problemas técnicos). En el procesamiento del cromatograma se observaron las señales obtenidas referenciadas a un tiempo de retención (t_r , min) de donde se despliega un

espectro de masas del pico seleccionado y se determina el peso molecular (ion molecular, M^+) así como las pérdidas lógicas dadas por el patrón de fragmentación para dar lugar a la formula molecular del compuesto; señales relativas a masas moleculares correspondientes a diversos compuestos, pero se ordenaron en las Tablas VII, VIII y IX aquellos con mayor aproximación, en función de la sensibilidad y precisión del equipo utilizado,.

Tabla VIII. Datos para la muestra CNY330-4 a partir de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos del análisis por LC-MS.

Tiempo de retención (min.)	Masa (g)	Fórmula	Nombre
20.158	363.253021	n/e	Acetato de 1-hidroxi-1-isopropil-ciclopentil-3a,6,10-trimetil-11-oxo-7-cicloundecen-5,9-dieno: (3,7-dien-9-ona-5-acetil-12-hidroxidolabela)
18.209	489.197998	n/e	Ácido-14-amino-11-(3-amino-2-hidroxiopropil)-5,7,17-trihidroxi-10,13-dioxo-9,12-diazotriciclo[14.3.1 ^{2,6}]-hencosa-1(20),2(21)-3,5,16,18-hexaen-8-carboxílico: (Bifenomicina A)
17.876	399.237762	C ₂₁ H ₃₄ O ₇	8-etil-7,13-dihidroxi-1-metoxi-3,5,7,11-tetrametil-9-15-dioxabicyclo[11.2.2]hexadec-5-en-10,12-on: (Neorustmicina B)
16.643	433.149322	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	(2S,3R,4S,5S,6R)-2-[[6aR,11aR)-9-metoxi-6a,11a-dihidro-6H-[1]benzofura[3,2-c]cromen-3-il]oxi]-6-(hidroximetil)oxane-3,4,5-triol: (3-O-glucosilmedicarpina)
15.636	337.107086	C ₂₀ H ₁₆ O ₅	(3R,4R-4-hidroxi-8-metoxi-3-metil-3,4-dihidro-2H-benzo[a]antracen-1,7,12-triona: (Fujianmicina B)

13.421	293.174774	C ₁₇ H ₂₄ O ₄	(3Z,5R,6Z,9Z,13S,14R)-5-hidroxi-5,9,13,14-tetrametil-1-oxaciclotetradeca-3,6,9-trien-2,8-diona: (Dehidrocineromicina B)
11.414	358.164916	C ₂₀ H ₂₃ NO ₅	Ácido-3-[2R)-4-[(2E,4E,6E,8E,10E)-1-hidroxidodeca-2,4,6,8,10-pentaeniliden]-1-metil-3,5-dioxopirrolidin-2-il]propanóico: (Fuligorubin-A)
10.156	240.134262	C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₃	2-Imino-3-metilen-5-L(carboxi-L-valil)-pirrolidina

Tabla IX. Datos para la muestra CNY330-7 a partir de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos del análisis por LC-MS.

Tiempo de retención (min)	Masa (g)	Fórmula	Nombre
8.091	791.481977	C ₄₃ H ₆₉ NO ₁₂	Ascomycina
10.285	207.086318	C ₈ H ₁₄ O ₆	6-O-Acetil-2-deoxiglucosa
12.725	355.117614	C ₂₀ H ₁₈ O ₆	Citromicinona-g
17.880	399.248962	C ₂₀ H ₃₄ N ₂ O ₆	Eponemicina
20.278	319.263183	C ₂₁ H ₃₄ O ₂	1,3-Dihidroxi-5-(cis-8'-pentadecenil)benceno

Tabla X. Datos para la muestra CNY330-13 a partir de los cromatogramas y espectros de masas obtenidos del análisis por LC-MS.

Tiempo de retención (min)	Masa (g)	Fórmula	Nombre
10.294	283.154022	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	Anguidol
10.852	283.154022	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	6-O-Metilpapiiracona B
11.165	1445.414549	C ₆₆ H ₇₃ Cl ₂ N ₉ O ₂₄	Balhimicina

11.360	617.343261	$C_{33}H_{48}N_2O_9$	Compuesto F
11.976	558.363647	$C_{29}H_{51}NO_9$	Epicoccamida
13.025	460.248260	$C_{29}H_{33}NO_4$	Melanocrocina
15.648	337.107086	$C_{20}H_{16}O_5$	Fujianmicina B
17.131	316.263519	$C_{21}H_{33}NO$	Grenadamida
18.705	368.233276	$C_{22}H_{29}N_3O_2$	Brevicompanina A
19.879	344.196899	$C_{19}H_{25}N_3O_3$	14-O-Acetilindolactama

En un concentrado de información obtenida a partir del fraccionamiento y análisis del extracto crudo, en la Fig. 11 se denotan con color naranja las muestras con espectros (RMN- 1H) de interés, es decir, se encuentran señales para protones menos apantallados que resuenan a campos más bajos y frecuencias más altas; si en el esquema, la figura que engloba el nombre de la fracción se presenta como una elipse corresponde a muestras con actividad antibacteriana y si la línea de contorno de la figura es punteada, se indican muestras que presentan sustancias con actividad anticancerígena, esto en función de los bioensayos realizados. Así como también se indica a la fracción de la que se extrajo el compuesto correspondiente al cristal y se señalan las nuevas muestras obtenidas a través de la separación en cromatografía flash estándar por el equipo ACI.

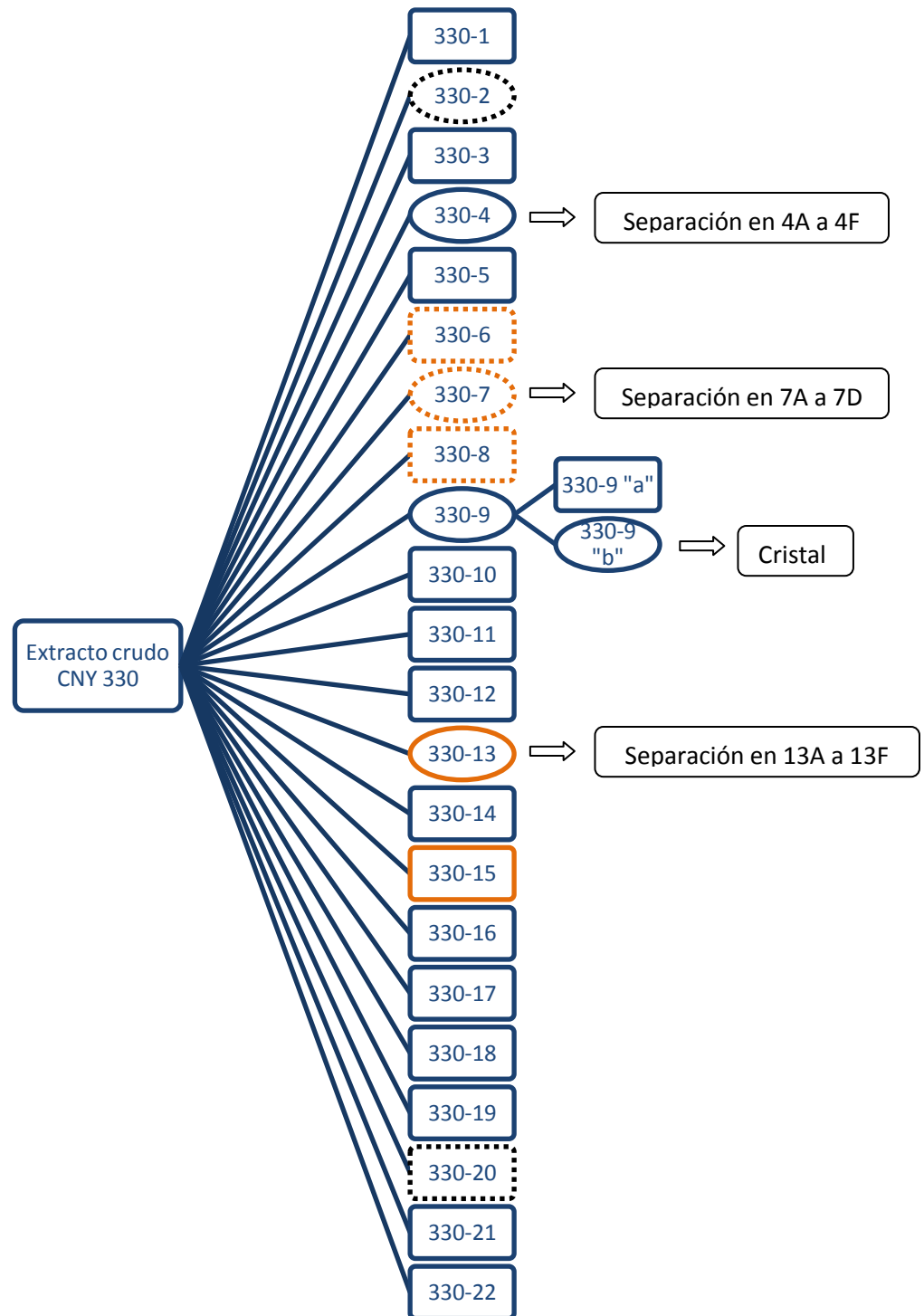


Fig. 6 Esquema de muestras obtenidas a partir de fraccionamiento del extracto crudo de la cepa actinobacteriana AMS165 CNY330.

DISCUSIÓN

El descubrimiento del género *Salinispora* ha generado el interés en diversas líneas de investigación. La primera cepa fue aislada de las Bahamas e identificada a través del gen 16S ARNr, actualmente cuenta con tres géneros descritos *S. tropica* y *S. arenicola*, (Maldonado et al. 2005) y *S. pacifica* (Jensen y Mafnas, 2006), siendo este último el caso que nos compete, puesto que este último género corresponde a la identificación de la cepa AMS165 CNY330, y en función del análisis, concentrado en la Fig. 6, se evaluó lo siguiente:

En la fracción 330-4 se detectaron como posibles compuestos presentes en la muestra y a los que podría deberse la bioactividad registrada (Tabla VIII), a Bifenomicina A el cual según Ezaki y colaboradores en 1985 encontraron como activo *in vitro* e *in vivo* (prueba en ratones) frente a la bacteria *S. aureus* (que es altamente resistentes a la ampicilina), con concentraciones inhibitorias medias de 0.1 y 0.56 µg/ml, respectivamente, débilmente activo contra las bacterias Gram- negativas, e inactivo contra los hongos. Así como también se propone a Neorustmicina B y Fujianmicina B, el primero fue aislado de un cultivo en caldo de *Micromonospora sp.*, encontrado como inhibidor de la enzima inositol fosfoceramida sintasa en células fúngicas (Se-Kwon, 2013) y el segundo no tuvo actividad registrada.

En la fracción 330-7 se detectó a los compuestos Ascomycina (Tabla IX) que presenta actividad inmunosupresora¹ y también a Eponemicina que según Oikawa y colaboradores (1991) es un potente inhibidor de la

angiogénesis (proceso fundamental en la transformación maligna del crecimiento tumoral), siendo esto congruente con la actividad citotóxica encontrada en esta muestra.

Dentro de los compuestos probablemente presentes en la fracción 330-13 se encuentra al compuesto Anguidol (Tabla X) que está registrado como micotoxina², así como el compuesto Balhimicina, que fue aislado de un cultivo de *Amycolatopsis* sp., y es conocido como un antibiótico glicopéptido, el cual se ha comparado con la actividad biológica que presenta la vancomicina contra *Staphylococcus* (como la actividad encontrada en este trabajo para esta muestra) además es superior a la vancomicina contra las especies de *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium* y especialmente contra especies de *Clostridium*, pero la actividad de ambos compuestos contra anaerobios Gram - negativos es pobre (Nadkarni, 1994). En esta muestra también se encontró el compuesto Grenadamide, al cual se le asocia con actividad citotóxica por su respuesta al bioensayo con *Artemia salina* (Avery, 2006) y el compuesto Brevicompanina A, que fue aislado de *Penicillium brevicompactum*, y presenta actividad biológica comprobada en plántulas de arroz y lechugas como un compuesto regulador del crecimiento vegetal (Kusano, 1998).

El compuesto sólido cristalino encontrado en este trabajo, correspondiente al dipéptido cíclico Ciclo L-leucil-L-prolil, fue registrado en 1971 por Isabella L. Karle; y en función de los bioensayos realizados en este trabajo, presentó actividad biológica contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*,

siendo la muestra más bioactiva de todas las fracciones analizadas, con una concentración letal media de 120.77 µg/ml. Este compuesto se reporta como aislado del bacilo Gram-negativo *Achromobacter xylosoxidans*, y con una concentración de 3.5 mg/ml inhibe por completo la producción de aflatoxina, una micotoxina producida en pequeñas cantidades de alta toxicidad y carcinogenicidad, por parte del moho *Aspergillus parasiticus* (Pei-Sheng et al., 2004). Este mismo compuesto también fue aislado de una cepa de *Streptomyces* y es bioactivo contra los enterococos resistentes a la vancomicina (Rhee, 2002).

Actualmente, los actinomicetos marinos están reconocidos por su alto potencial para generar metabolitos secundarios con diversas propiedades biológicas, esto se ve reflejado en nuevos compuestos como Salinosporamide A (Feling et al. 2003) que actualmente se encuentra en la etapa II en pruebas clínicas ya que es activo contra 60 líneas celulares de cáncer, y Arenomicina que es un potente anticancerígeno (Asolkar et al. 2010).

En manera selectiva, con la función Probit y con un intervalo de confianza del 95% se determinó la concentración letal media de las fracciones 330-2, 330-9 y 330-13 puesto que estas resultaron con mayor bioactividad frente a la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, de tal forma se obtuvieron concentraciones con valores de 176.79 µg/ml, 120.77 µg/ml y 156.83 µg/ml, respectivamente, donde la muestra correspondiente a 330-9 presentó la mayor bioactividad al requerir de una menor concentración para promover la

mortandad del 50% de la población bacteriana, seguida de la fracción 330-13 y después por 330-2. También en forma particular, se determinó la concentración letal media de las fracciones 330-4, 330-7 ya que estas resultaron con mayor bioactividad frente a la bacteria *Escherichia coli*, y se obtuvieron concentraciones con valores de 143.21 µg/ml y 191.44 µg/ml, respectivamente. La muestra que requirió de una menor concentración para producir la mortandad de la mitad de la población bacteriana, pero en este caso de la cepa Gram-negativas, correspondió a la muestra 330-4. Con esto se refuerza que los extractos derivados de actinobacterias marinas proporcionan una buena fuente para el descubrimiento de antibióticos, puesto que el extracto analizado presentó bioactividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, donde con concentraciones de 120.77 µg/ml y 143.21 µg/ml respectivamente, inhibieron el desarrollo del 50% de la población de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

A pesar de no obtenerse más compuestos puros de cada una de las muestras debido principalmente a la inestabilidad de las mismas, principalmente a la luz, y siendo estas fracciones bioactivas, se puede apreciar su potencial para conseguir el aislamiento de productos naturales nuevos y también como prototipo para dar lugar a compuestos modificados sintéticamente, que provean una mayor bioactividad frente a diferentes patógenos.

CONCLUSIONES

Del fraccionamiento realizado al extracto crudo CNY330 AMS165, se lograron identificar tres muestras 330-6, 330-8, 330-20 que son candidatas para el proceso de purificación y elucidación, debido a que presentan protones con desplazamientos a campo bajo que sugieren presencia de grupos funcionales interesantes en su estructura, además de verificarse cierta actividad biológica en las mismas, en función de los bioensayos realizados.

Las fracciones del extracto crudo de *S. pacífica* presentaron actividad biológica contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*, siendo la muestra más bioactiva la correspondiente a 330-9 con una dosis letal media de 120.77 $\mu\text{g/ml}$.

En función de la actividad antibiótica contra la bacteria *Escherichia coli*, se obtuvo que la fracción correspondiente a la muestra 330-4 presentó la menor concentración necesaria para inhibir el desarrollo de la población en un 50%, con un valor de 143.21 $\mu\text{g/ml}$.

A partir del bioensayo de actividad citotóxica para la línea celular de carcinoma colorrectal (HCT-116), se obtuvo que la fracción más bioactiva corresponde a 330-6 con una $\text{IC}_{50} = 4.95 \mu\text{g/ml}$.

En los bioensayos realizados en forma prospectiva contra las líneas celulares de cáncer de mama hormono-independiente (MDA-MB-231) y de carcinoma pulmonar (CRL-5872), las fracciones 330-2 y 330-6 con una concentración igual a 19.5 $\mu\text{g/ml}$ consiguieron entre el 30 y 40 % de inhibición

del crecimiento celular, donde la fracción con mayor porcentaje de bioactividad corresponde a la segunda muestra mencionada.

Se obtuvo un cristal puro que corresponde a un dipéptido cíclico Ciclo L-leucil-L-prolil, al cual se le evaluó su potencial bioactivo y además se tiene como primer registro en *Salinispora pacífica*.

Mediante prospección en Cromatografía de Líquidos acoplado a espectrometría de masas, se lograron identificar 23 compuestos conocidos.

Finalmente con este trabajo se resalta la importancia de la investigación sobre los productos naturales marinos, específicamente de metabolitos encontrados en actinobacterias, puesto que con la obtención de los compuestos con mayor bioactividad, se promueve la oportunidad de realizar nuevas pruebas de aplicación en otras líneas de acción además de la farmacéutica.

REFERENCIAS

Ahmed L., P. R. Jensen, K. C. Freel, R. Brown, A. L. Jones, B. Y. Kim, M.

Goodfellow. 2013. *Salinispora pacífica* sp. nov., an *actinomycete* from marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*.103:1069-1078.

Anaya-Lang, A. L., (2003). *Ecología Química*. México D.F.: Plaza y Valdez

- Avery, Thomas., Julie A. Culberta and Dennis K. Taylor (2006) The first total synthesis of natural grenadamide. *Org. Biomol. Chem.*, 4, 323-330.
- Bérdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*, Volumen 58, pp. 1-26.
- Darias-Jerez, J. 1998. La biodiversidad de las algas marinas como fuente de interés farmacológico. *Medio Ambiente Canarias* 9: 15-19.
- Ezaki, M., Iwami, M., Yamashita, M., Hashimoto, S., Komori, T., Umehara, K., Mine, Y., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H., (1991) Biphenomycins A and B, novel peptide antibiotics. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *J Antibiot (Tokyo)*. (11):1453-61.
- Faulkner, D. 2000. Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek* 77: 135-145.
- Fenical, W. 1982. Natural products chemistry in the marine environment. *Science* 215: 923-927.
- Fenical, W., 1993. chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a New Resouce. *Chem. Rev.*, Volumen 93, pp. 1673-1683.
- Fenical, W. & Jensen, P. R., 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *nature chemical biology*, 2(12), pp. 666-673.

- Hernández, V. & M. Hernández. 2005. Bioactivos marinos en Venezuela. *Saber* 17: 5-10.
- Jensen P. R., R. Dwight , Fenical W. 1991. Distribution of actinomycetes in nearshore marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1102-1108.
- Jensen P. R. 2010. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37:219-224.
- Kijjoa, A. & P. Sawangwong. 2004. Drugs and cosmetics from the sea. *Mar. Drugs* 2: 73-82.
- Kumar R. y Zi-rong, X. 2004. Biomedical compounds from marine organisms. *Mar. Drugs.* 2: 123-146.
- Logan, N., (1994). *Bacterial systematic*. Blackwell scientific publications, Oxford. pp. 272.
- Maldonado, L., Stach, J., Pathom-aree, W., Ward, A., Bull, A., Goodfellow, M. (2005). Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek* 87: 11-18.
- Maldonado L . A., Fenical W., Jensen P. R., Kauffman C. A., Mincer T. J., Ward A. C., Bull A. T., Goodfellow M. 2005. *Salinispora arencola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1759-1766.

- Manzi, L. y Mayz, J. 2003. Valorando los microorganismos. Rev Soc. Ven. Microbiol. 23(1): 18-23.
- Mccarrthy P., Pomponi S. 2004. A search fom new Pharmaceutical Drugs From marine organisms. Marine Biomed. Res. 1- 2.
- Mincer T. J., P. R. Jensen, C. A. Kauffman, W. Fenical. 2002. Widespread and Persistent Populations of a Major New Marine Actinomycete Taxon in Ocean Sediments. Appl. Environ. Microbiol. 68 (10): 5005-5011.
- Mincer T. J., W. Fenical, P. R. Jensen. 2005. Culture-Dependent and Culture-Independent Diversity within the Obligate Marine Actinomycete Genus *Salinispora*. Appl. Environ. Microbiol. 71(11): 7019-7028.
- Miyako, Kusano., Go, Sotoma., Hiroyuki, Koshino., Jun, Uzawa., Masao, Chijimatsu., Shozo, Fujioka., Tsuyoshi, Kawano. and Yasuo, Kimura. (1998) Brevicompanines A and B: new plant growth regulators produced by the fungus, *Penicillium brevicompactum* J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 2823-2826.
- Nadkarni, S. R., Patel, M. V., Chatterjee, S., Vijayakumar, E. K., Desikan, K. R., Blumbach, J., Ganguli, B. N., Limbert, M. (1994) Balhimycin, a new glycopeptide antibiotic produced by *Amycolatopsis* sp. Y-86,21022. Taxonomy, production, isolation and biological activity. 38(11):1453-61.
- Oh, Dong-Chan, Philip Williams , Christopher A. Kauffman, Paul R. Jensen, y William Fenical. (2006) Cyanosporasides A and B, Chloro-and Cyano-

cyclopenta[a] Glycosides from the marine actinomycete "*Salinispora pacifica*". *Organic letters* (6): 1021-1024.

Oikawa, T., Hasegawa, M., Shimamura, M., Ashino, H., Murota, S., Morita, I. (1991) Eponemycin, a novel antibiotic, is a highly powerful angiogenesis inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 181(3):1070-6.

Okazaki, T., Kitahara, T. & Yoshiro, O., 1975. A new antibiotic ss-228 produced by chainia isolated from shallow sea mud. *The journal of antibiotics*, 28(3), pp. 176-184.

Pommier, B., Canbäck, I., Riemann, K. H., Boström, K., Simu, P., Lundberg, A., Tunlid, H. (2007) Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Mol Ecol.* 16:867–880.

Se-Kwon, Kim. (2013) *Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications*. John Wiley & Sons. 550 pp.

Valencia-Ortiz, C., 1995. *Fundamentos de Fitoquímica*. México: Trillas

Yan, P. S., Song, Y., Sakuno, E., Nakajima, H., Nakagawa, H., Yabe, K., (2004) Cyclo(l-Leucyl-l-Prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology* 70(12):7466-7473.

Fuente:

- (1) National Center for Biotechnology Information. PubChem BioAssay Database; AID=221806, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/bioassay/221806> (visitada: 12/dic./2015).
- (2) www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc105.htm (visitada: 9/nov./2015).