

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**AISLAMIENTO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EXTRAÍDOS DE
LA ACTINOBACTERIA MARINA *Salinispora pacífica* FILOTIPO
ESTÁNDAR**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

OCEANÓLOGO

PRESENTA

LIZBETH BERENICE AVIÑA MELGOZA

ENSENADA, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO. DICIEMBRE DEL 2012

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

OCEANOLOGÍA

**AISLAMIENTO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS EXTRAÍDOS DE
LA ACTINOBACTERIA MARINA *Salinispora pacífica* FILOTIPO
ESTÁNDAR**

TESIS

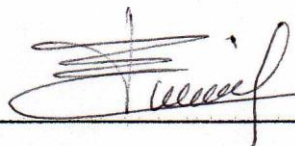
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

OCEANÓLOGO

PRESENTA


LIZBETH BERENICE AVIÑA MELGOZA

Aprobada por:



Dr. Irma E. Soria Mercado

Director de tesis



Mc. Ana María de Moncerrat Iñiguez Martínez

Sinodal



Mc. Natalie Millán Aguirreaga

Sinodal

RESUMEN

El género *Salinispora* es un gran productor de metabolitos secundarios, partiendo de esto se analizó la especie *S. pacifica*, a partir de dos cepas la CNY331 AMS365 y CNY330 AMS165, pero ambos crudos son muy inestables ya que se degradan con el disolvente de Metanol y con la luz. Los resultados obtenidos para el crudo de CNY331 AMS365 se descubrió que presenta similitud con compuestos ya registrados en el caso de la fracción 58 se asocia al compuesto Mareineosin A y con Dihydroxybenzoylserin-trimer, para la fracción 64 se relacionó con el compuesto FLOCCOSIN y con CNQ617.409A, también se obtuvieron cristales de las fracciones 8'' y 19' pero su cantidad fue insuficiente, así que no se pudo determinar una estructura molecular. En la cepa CNY330 AMS165 se le asocio a compuestos ya establecidos, la fracción 3 que se asocia al compuesto Gamma-Rubromycin y la fracción 6 se le relaciona con el compuesto Setomycin, esta cepa resulto altamente bioactiva contra células cancerígenas de pulmón H460.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Carmen y Roberto que siempre están conmigo, por todo el apoyo y paciencia durante la tesis, y sobre todo por darme el don de vivir y sobre todo por el amor que me dan.

A Dios, gracias por darme la oportunidad de vivir en este tiempo y conocer a personas muy especiales e importantes para mí, y por supuesto de concluir la licenciatura y llenarme de paz y amor cuando más lo ocupe. Y gracias, sobre todo a esa persona tan especial que no esta en cuerpo conmigo pero que esta con dios, a mi tía Bere que yo sé que siempre esta ahí y que me apoya y me ama, y que permanecerá en mi corazón por siempre, al igual que ese pequeño ángel que aunque estuvo poco tiempo se robo mi corazón.

A la Dra. Irma Soria que me enseñó que si quieres algo en la vida hay que luchar por ello y nunca rendirse, gracias por apoyándome y darme su cariño, siempre tendrá toda mi admiración y respeto.

A la Mc. Ana María Iñiguez por esas charlas en el laboratorio, y por su apoyo durante el proceso de estrés en el trabajo del laboratorio.

En general a mi comité de tesis, muchas gracias por el apoyo y el voto de confianza.

Un especial agradecimiento a mi mejor amiga Beatriz Ixetl García Gómez, por su apoyo incondicional ya que siempre esta conmigo en todos los momentos, y por ser una persona muy generosa, amable y sobre todo porque me soporta.

A mi tía Rosy que siempre me apoya en todas las formas posibles y ser una persona que respeto y quiero mucho.

A mis abuelitos (Abuelita Petra, nana Lilia y tata Chuy) que aunque no entiendan lo que hago y para que lo hago muchas gracias por estar siempre apoyándome y quererme como lo hacen.

A mis amigas Ivonne y yaireb que siempre me están apoyando, y que han estado conmigo desde que empezamos la carrera, muchas gracias.

Al sindicato (Rodrigo (chiapas), Arturo (yama), Anaid, Ricardo, stef, Antonio (toño)) que siempre están ahí cuando se les necesita.

En especial un agradecimiento a mi tutor académico Dr. Héctor Bustos de quien estoy bastante orgullosa y puedo decir que es el mejor tutor del mundo, gracias por su amistad y apoyo incondicional durante la licenciatura.

Al tío vic el Dr. Víctor Zavala por su apoyo y amistad, siempre dispuesto a escuchar, y tener una buena plática.

A mis compañeras de laboratorio Dulce y Fátima, que siempre están dispuestas ayudar y por los momentos que pasamos en el laboratorio. Y en especial al único niño que nos ayuda Enrique (kike), por estar siempre apoyándome y ayudando pero sobre todo por su amistad.

A mi familia que siempre esta al pendiente de mi, en todos los aspectos y sobre todo en mi progresó en la licenciatura y sobre todo en la tesis.

Para agradecer y escribir todo lo que siento, a todas las personas que me apoyan y las ya nombradas anteriormente, me faltarían hojas, palabras e incluso formas físicas para expresarlo así que solo puedo decir MUCHAS GRACIAS!!.

ÍNDICE

	Página
Índice.....	I
Lista de figuras.....	iii
Lista de Tablas.....	vii
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	5
2.1 Características generales de las Actinobacterias.....	5
2.2 Actinobacterias Marinas.....	6
2.3 Adaptaciones de las Actinobacterias marinas.....	9
2.4 Características del género <i>Salinispora</i>	11
3. Hipótesis.....	16
4. Objetivos.....	16
4.1. Objetivo general.....	16
4.2. Objetivos particulares.....	16
5. Metodología.....	17
5.1 Colecta de sedimento.....	17
5.2 Cultivo y preparación de extracto AMS165 CNY330 y AMS365 CNY331.....	18
5.3 Separación por cromatografía.....	20
5.3.1 AMS365 CNY331.....	20
5.3.2 AMS165 CNY330.....	25
5.4 Análisis espectroscópico.....	28
5.4.1 Infrarrojo (IR).....	28
5.4.2 Resonancia Magnética Nuclear Protónica (¹ HRMN).....	28

Continuación del índice

5.4.3 Cromatografía Líquida con Espectrometría de Masas (LC/MS).	28
5.5 Ensayos biológicos.....	29
5.5.1 Bioensayos anticancerígenos de AMS165 CNY330.....	29
6. Resultados y discusión.....	30
6.1 Infrarrojo de AMS365 CNY331.....	30
6.2 Resonancia Magnética Nuclear de AMS365 CNY331.....	31
6.3 Espectrometría de masas de AMS365 CNY331.....	38
6.4 Resonancia Magnética Nuclear de AMS165 CNY330.....	46
6.5 Espectrometría de masas de AMS165 CNY330.....	52
6.6 Bioensayo anticancerígeno para AMS165 CNY330.....	57
7. Discusión general.....	59
7.1 AMS365 CNY33.....	59
7.2 AMS165 CNY330.....	60
8. Conclusiones.....	61
9. Referencias.....	62

Lista de figuras

Figura		Pagina
1	Cinética de crecimiento para microorganismos.....	3
2	Árbol radial que representa las relaciones filogenéticas de 13 filotipos de 6 familias de actinomicetos.....	8
3	Estructuras representativas de antibióticos de polienos-polioles del grupo <i>Marinispora</i>	9
4	Estructuras de metabolitos secundarios obtenidos del género <i>Salinispora tropica</i> , <i>S. arenicola</i> y <i>S. pacifica</i>	12
5	Estructuras de compuestos producidos por <i>S. pacifica</i> y <i>Streptomyces cinnabarinus</i>	15
6	Localidades donde se realizaron las colectas.....	17
7	Estaciones de colecta de sedimento marino en Loreto (S4-7), Baja California (playa Juncalito (S3), playa Ensenada Blanca (S4), Isla Danzantes (S5), Zona A 200 m (S6) y B 300 m (S7)).....	18
8	Medios de cultivo, A) Aislamiento de las Actinobacterias en cajas Petri. B) Cepa pura y aislada del género <i>Salinispora</i> . C) Medio de cultivo líquido en agitación constante.....	20
9	Proceso de obtención de fracciones purificadas a partir de la cepa CNY331 AMS365, A) Cromatografía en Columna, B) Concentración de fracciones por medio de destilación a presión reducida, C) Cromatografía en Capa Delgada y D) Fracciones obtenidas.....	22
10	Diagrama de flujo para la separación del crudo AMS365 CNY331 (Ruta 1).....	23
11	Diagrama de flujo para la separación del crudo AMS365 CNY331 (Ruta 2).....	24
12	Proceso de obtención de fracciones purificadas a partir de la cepa AMS165 CNY330, A) Cromatografía en columna B) Concentración de fracciones por destilación a presión reducida, C) Cromatografía en capa fina (2 placas de 5x20cm) y D) Fracciones obtenidas.	26

Continuación de las figuras

Figura		Pagina
13	Diagrama de flujo para la separación del crudo AMS165 CNY330.....	27
14	Espectro de IR para la fracción 19' (Con disolvente Acetato de etilo).....	30
15	Espectros de ¹ H RMN para 2 fracciones obtenidas con 10:90 de isooctano y acetato de etilo (AcOet) del crudo AMS365 CNY331 A) Fracción 19', extraída por una segunda CC (menor cantidad de crudo) a 500MHz y B) Fracción 8'', extraída de CC (con mayor cantidad) a 300MHz.	33
16	Espectro de ¹ H RMN para la fracción 4'' obtenida de 70:30 de isooctano y AcOet del crudo AMS365 CNY331, a 500MHz, A) Cloroformo B) Aguas madres C) Hexano.....	36
17	Espectro de ¹ H RMN para la fracción 17'' obtenida de 100% de MeOH del crudo AMS365 CNY331 a 500MHz	37
18	Espectro de ¹ H RMN para la fracción 11' obtenida de 50:50 a 15:85 de isooctano y AcOet a 300MHz del rudo AMS365 CNY331.....	38
19	Espectros de Ultravioleta de compuestos obtenidos del LC/MS de la fracción 58, de la primer banda a un tiempo de retención de 8.313min (línea roja nuestra muestra, línea azul Mareineosin A), del rudo AMS365 CNY331.....	39
20	Espectros de Ultravioleta de los compuestos obtenidos del LC/MS de la fracción 58, segunda banda adquirida un tiempo de retención de 9.833min (línea azul nuestra muestra, línea roja dihydroxybenzoylserin-trimer), aislados del crudo AMS365 CNY33.....	39
21	Datos espectrales de masas (MS) de la fracción 58, para el segundo pico (Fig. 20), obtenida del crudo AMS365 CNY331.....	41

Continuación de las figuras

Figura		Página
22	Espectro de masas de la fracción 58, continuación de la figura 21, aislada del crudo AMS365 CNY331.....	41
23	Espectros de Ultravioleta obtenidos del LC/MS de la fracción 64, segundo pico adquirido a un tiempo de retención de 9.836min (línea azul nuestra muestra, línea roja floccosin), aislados del crudo AMS365 CNY331.....	42
24	Espectro de masas de la fracción 64, segundo pico obtenido (Fig.23), aislado del crudo AMS365 CNY331.....	43
25	Cromatograma de LC/MS de la fracción 67 en una longitud de onda de 254.6nm, primer pico a un tiempo de retención de 8.432 min y segundo pico en 9.902 min, aislados del crudo AMS365 CNY331.....	44
26	Espectro de masas de alta resolución para la fracción 67, primer pico con un tiempo de retención de 8.44-8.47min, aislado del crudo AMS365 CNY331.....	45
27	Espectro de masas de alta resolución para la fracción 67, segundo pico con un tiempo de retención de 9.91-9.93min, aislado del crudo AMS365 CNY331.....	45
28	Espectros de RMN de las fracciones 1 y 1.5 obtenidas con 100% de isooctano del crudo CNY330 AMS165	46
29	Espectro de ¹ H RMN para la fracción 2 extraída con 90:10 de isooctano & AcOet del crudo AMS165 CNY330.....	47
30	Espectro de ¹ H RMN de la fracción 3 extraída con 85:15 de isooctano y AcOet del crudo AMS165 CNY330.....	48
31	Espectro de ¹ H RMN de la fracción 5 extraída con 70:30 de isooctano y AcOet del crudo AMS165 CNY330.....	49
32	Espectro de ¹ H RMN de la fracción 13 extraída con 85:15 de AcOet y ACN del crudo AMS165 CNY330.....	49

Continuación de las figuras

Figura		Pagina
33	Espectro de ^1H RMN de la fracción 17 extraída con 25:75 de AcOet y ACN del crudo AMS165 CNY330.....	50
34	Espectro de ^1H RMN de la fracción 21 extraída con 100% de H_2O del crudo AMS165 CNY330.....	51
35	Cromatograma LC/MS de la fracción 3 en una longitud de onda de 254.8nm, (círculo azul) a un tiempo de retención de 20.524min, del crudo AMS165 CNY330.....	52
36	Espectros de Ultravioleta de compuestos obtenidos del LC/MS de la fracción 3, pico marcado con un círculo azul en la figura 35 con longitud de 254.8nm con un tiempo de retención de 20.524min (línea azul fracción 3, línea roja gama-rubromycin), del crudo AMS165 CNY330.....	53
37	Espectro de masas de la fracción 3, del compuesto de la figura 36, con un tiempo de retención de 20.717 y PM de 285.9, del crudo AMS165 CNY330.....	54
38	Cromatograma de LC/MS de la fracción 6 a una longitud de onda de 254.8nm, pico interesante (círculo azul) a un tiempo de retención de 13.262min, del crudo AMS165 CNY330.....	55
39	Espectros de Ultravioleta de compuestos obtenidos del LC/MS de la fracción 6, pico marcado con un círculo azul con longitud de 254.8nm con un tiempo de retención de 13.262min (línea azul nuestra muestra, línea roja Setomimycin), del crudo AMS165 CNY330.....	56
40	Espectro de masas de la fracción 6, del compuesto de la figura 39, con un tiempo de retención 13.340 y un PM de 729, del crudo AMS165 CNY330.....	57

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Datos obtenidos del IR de la fracción 19' del extracto AMS365 CNY331, utilizados para determinar los grupos funcionales presentes.....	31
II	Bioactividad de 20 fracciones del crudo AMS165 CNY330 contra células de cáncer de pulmón H460.....	58

1. INTRODUCCIÓN

El océano alberga la mayor cantidad de ecosistemas de la tierra, siendo una importante fuente de compuestos que representan un gran grupo de productos naturales con actividad biológica, que se acumulan principalmente en los invertebrados (esponjas, pepinos, estrellas, etc.); así mismo, se ha encontrado que también los microorganismos son fuente de estos compuestos bioactivos.

Los compuestos naturales ofrecen una diversidad estructural enorme y por ello en muchas ocasiones resulta difícil su síntesis (Gordaliza, 2008); la actividad biológica que presentan varía enormemente y puede ser aprovechada por sus efectos terapéuticos, actividad antiviral, bactericida y otras aplicaciones médicas (Valencia-Ortiz, 1995).

Los compuestos químicos extraídos de fauna o flora han sido por muchos años una fuente importante de fármacos y de productos usados en la alimentación, la cosmética, entre otros. Los organismos medicinales 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 metabolitos primarios son moléculas de bajo peso molecular que intervienen, como productos finales o como intermediarios en las distintas rutas anabólicas y catabólicas. Estos son necesarios para el crecimiento del organismo que los produce, son productos únicos y no pueden perderse tan fácilmente por mutación espontánea (aminoácidos, vitaminas, nucleótidos, alcoholes, ácidos

orgánicos, etc.). Los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento, 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, alimentación, etcétera (Anaya-Lang, 2003).

La investigación en el campo de productos naturales ha sido enfocada en su mayoría a organismos marinos (invertebrados), sin embargo, el problema más recurrente es que los compuestos aislados 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 cada fase del crecimiento de un microorganismo ha revelado que la mayoría de los metabolitos secundarios se generen al inicio de la fase estacionaria, quizá debido a que el microorganismo ya no gasta su energía en crecimiento (fase exponencial) y utiliza otras rutas metabólicas para producir los metabolitos secundarios (Fig. 1).

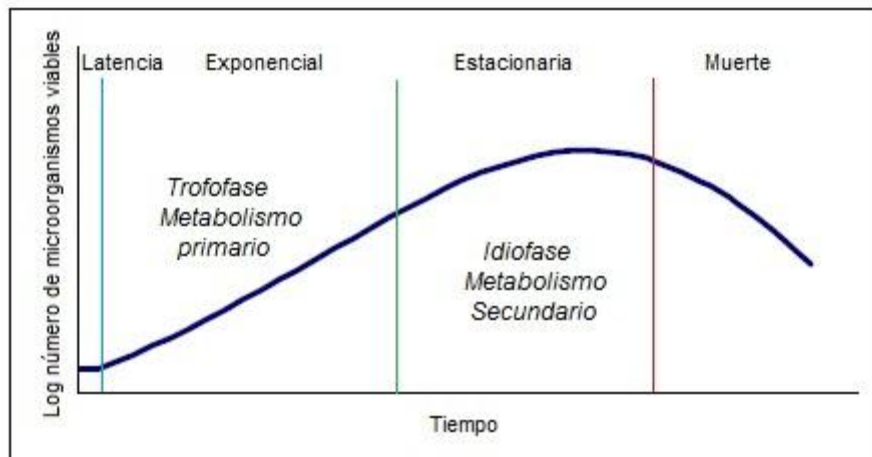


Figura 1. Cinética de crecimiento para microorganismos.

Los metabolitos microbianos han tenido un extraordinario impacto en la calidad de vida de la humanidad durante el siglo pasado, contribuyendo así al bienestar de la humanidad y al aumento de la esperanza de vida, debido a su aplicación como antibióticos, antifúngicos, inmunosupresores y agentes hipolipemiantes; estos han sido utilizados en el área de medicina durante los últimos 50 años (Peláez & Genilloud, 2009).

Dentro de los microorganismos marinos, las Actinobacterias son proveedoras de una gran cantidad de productos naturales nuevos con actividades biológicas que pueden ser aprovechados en la industria farmacéutica (Oleano *et al.*, 2009). Sin embargo, se conoce poco de su diversidad y del papel ecológico que desarrollan en el océano.

Con base en lo anterior, en el presente trabajo se llevó a cabo el aislamiento de compuestos de dos cepas de actinobacterias del género *Salinispora*; la especie *Salinispora pacífica*, encontrada recientemente y por

primera vez en sedimentos del Golfo de California (Becerril-Espinosa *et al.*, 2013), y se determinó su actividad anticancerígena frente a células de cáncer de pulmón H460.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características generales de las Actinobacterias

Los actinomicetos son bacterias que se consideraron como hongos en el pasado, pero actualmente se ha demostrado que corresponden al orden ***Actinomycetales*** del griego *aktino* (“rayo”) y *mikes* (“hongo”), por la 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% 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. Tienden a ramificar y juegan un papel importante en la descomposición de materia orgánica, como la celulosa y la quitina (Romero-Cabello, 2007).

Estos organismos son un grupo numeroso de bacterias las cuales crecen 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 una de las septas resultantes contiene una molécula de ADN. La mayoría de estos organismos son aerobios (oxidativos), aunque algunos de ellos son anaerobios facultativos u obligados (fermentativos) (Logan, 1994). Los actinomicetos son una fuente prolifera de metabolitos secundarios estructuralmente diversos, incluyendo a muchos que poseen actividades biológicas relevantes farmacéuticamente (Romero-Cabello, 2007).

2.2 Actinobacterias Marinas

El océano constituye el 70% de la superficie de la tierra encontrándose en él la mayor diversidad del planeta. Las plantas marinas y los invertebrados han llamado la atención por la alta cantidad de productos naturales bioactivos descubiertos en ellos. Por otra parte, los microorganismos han sido relativamente inexplorados en materia de diversidad, función, etc. Las bacterias pueden subsistir en la columna de agua, en el sedimento o como simbioses de otros organismos.

Desde hace tiempo, 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.

El primer actinomiceto aislado fue *Chainia purpurogena* de donde se obtuvo un antibiótico con estructura 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 (Fig. 2). Los grupos MAR son estudiados actualmente por la alta producción de compuestos potentes como antibióticos e inhibidores del crecimiento de células cancerígenas (Fenical & Jensen, 2006).

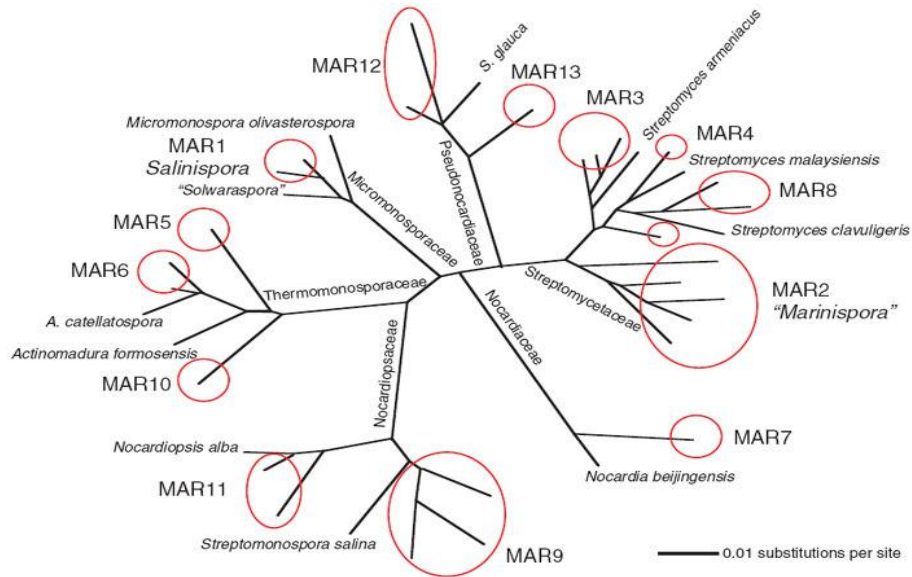


Figura 2. Árbol radial que representa las relaciones filogenéticas de los 13 filotipos marinos con respecto a las 6 familias de actinomicetos (Tomado de Fenical y Jensen, 2006).

El género *Streptomyces* ha sido el más estudiado. A 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 aquí poseen policétidos derivados de polienos; los primeros compuestos aislados fueron las marinomycinas, con una estructura inusual de macrodiólidos formados de dímeros de lactonas ácidas la cual se ejemplifica con marinomycina A (Fig.3). Otros miembros del grupo de *Marinispora* son las marinisporolide A y B (Fig. 3) con estructuras de polienos-polioles relacionados con la clase roflamycina (flavomycina), 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).

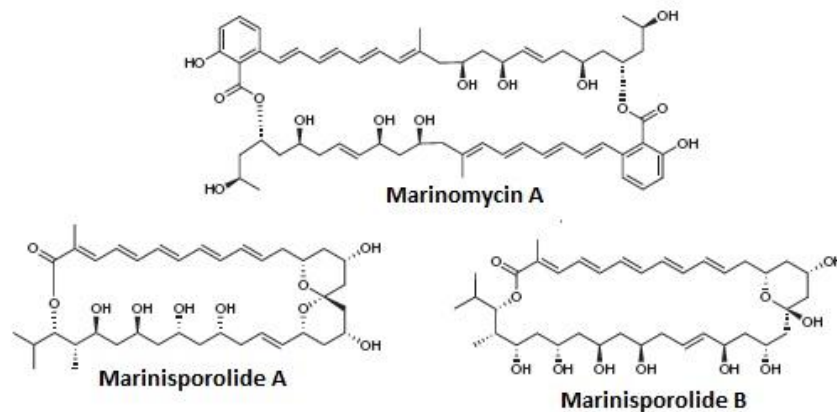


Figura 3. Estructuras representativas de antibióticos de polienos-polioles del grupo *Marinispora* (Tomado de Kwon *et al.*, 2006).

2.3 Adaptaciones de las Actinobacterias marinas

Las bacterias en ambientes marinos se encuentran sometidas a condiciones extremas, como presión, temperatura, salinidad y escases de nutrientes. Debido a esto, se han adaptado a las condiciones físicas, químicas y biológicas del océano, modificando su fisiología, al igual que sus propiedades bioquímicas, las cuales se ven afectadas por la presión, esto se puede atribuir a que el aumento en la presión disminuye la capacidad de fijación de las enzimas a sus sustratos.

Estas bacterias son capaces de resistir una enorme presión hidrostática, si se considera que la presión aumenta 1 atmósfera (atm) cada 10m de profundidad,

los microorganismos aislados a una profundidad de 2000m deberán soportar 200atm de presión por lo cual se les considera barotolerantes. Además las condiciones en temperatura son muy bajas, a diferencia de las concentraciones de iones que son relativamente altas, por lo cual la salinidad y en especial el sodio (Na^+) juega un papel importante en la fisiología. Esto ha generado un requerimiento de este ion para su óptimo crecimiento ya que se les considera halófilos extremos. Para demostrar esto, se presenta un gradiente de Na^+ transmembranal con un potencial de energía que puede ser utilizado para 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, magnesio y el calcio ya que son utilizados en el crecimiento y en la estabilidad osmótica (De Carvalho & Fernández, 2010; Becerril-Espinosa, 2011).

Una de las habilidades que presentan estas bacterias para mantener sus funciones biológicas bajo condiciones estresantes son cambios en las proteínas, esteroides, hopanoides y contenido de carotenoides, pero principalmente 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”. En general, 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.

Las sustancias exopoliméricas cambian los microambientes de forma física y biogeoquímica alrededor de la célula (De Carvalho & Fernandes, 2010).

2.4 Características del género *Salinispora*

El primer aislamiento y distribución de actinomicetos presentes en el sedimento marino se realizó en el año 1991 en Bahamas. Se encontraron Actinobacterias que requieren agua de mar para crecer y pertenecen a la familia *Micromonosporaceae* (Jensen *et al.*, 1991). Posteriormente, en el año 2002, este nuevo grupo codificado entonces como MAR1, es llamado "*Salinispora*"; pero no fue hasta el año 2005 que recibe la descripción formal de *Salinispora* por las dos especies *S. arenícola* y *S. tropica* (Maldonado *et al.*, 2005), y una tercera especie "*S. pacifica*" propuesta por Jensen y Mafnas (2006). 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* conocidas, están estrechamente relacionadas en un 99% de similitud de acuerdo con el 16SARNr en donde solo difieren en 5 nucleótidos, sin embargo, la única propiedad fenotípica que las diferencia son los metabolitos secundarios que producen (Fenical & Jensen, 2006). En general, la especie *arenícola* se reconoce como un productor de diversas estaurosporinas y análogos de rifamicina.

La distribución de *S. tropica* y *S. arenícola* es muy amplia, ya que va de la zona subtropical a los trópicos. Por otra parte la especie *S. tropica* solo se ha

aislado en el sedimento de Bahamas, presentando una distribución solo en el Caribe, a diferencia del filotipo *S. arenicola* que tiene un amplio rango geográfico ya que se ha aislado de varias localidades como el Mar Rojo, Islas Guam, Palau, Virginias, Bahamas y Fiji. En el Golfo de California se han encontrado 2 filotipos diferentes de *S. arenicola* que varían tan solo en 1 y 2 nucleótidos en el gen 16S ARNr. En el año 2003, se informó del aislamiento de un agente anticancerígeno potente llamado salinosporamide A (Fig.4 - 1) de la especie *S. tropica* (Fenical & Jensen, 2006), el cual se encuentra en fase clínica II para el tratamiento de cáncer, (Becerril-Espinosa, 2011) el cual resulto ser bioactivo contra varios tipos de cáncer, pero fue primero sometido a líneas celulares de colon HCT-116 (Fenical, et al., 2009). Este compuesto actualmente está siendo evaluado para su consumo y comercialización por los laboratorios farmacéuticos Nereus, con autorización de la Universidad de California San Diego.

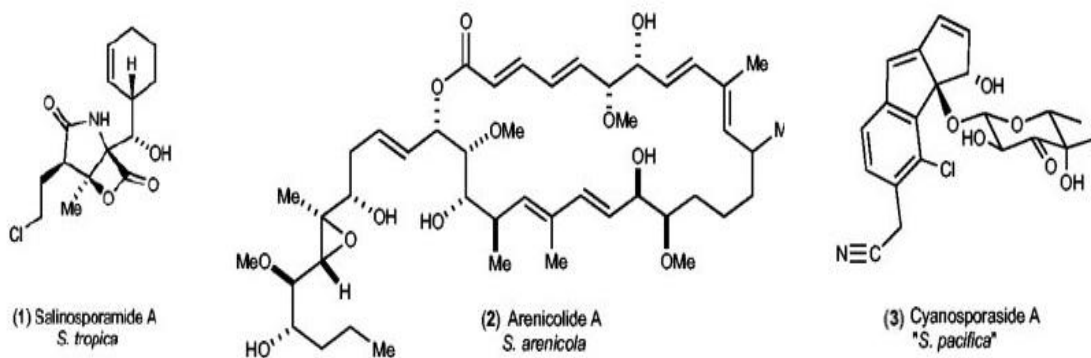


Figura 4. Estructuras de metabolitos secundarios producidos por extractos de *Salinispora tropica*, *S. arenicola* y *S. pacifica*.

Uno de los compuestos que se ha encontrado en *S. arenicola* colectada en las Islas Guam es un policétido derivado del macrólido arenicolide A (Fig. 4 - 2),

este compuesto es producido exclusivamente por esta especie, que genera también una serie de heptapéptidos cíclicos.

“*S. pacifica*” es la tercera especie detectada hasta el momento, aunque no es tan frecuente y no presenta una distribución tan amplia como *S. arenicola*, si posee una alta diversidad filogenética. Se ha aislado en el Atlántico, Islas de Palau, Guam, Hawaii, Fiji y recientemente en el Mar de Cortez. Hasta la fecha solo se han encontrado 3 filotipos. Del filotipo estándar (aisladas de sedimentos colectados en Islas Guam, Palau y del Mar Rojo), se han obtenido un alto número de compuestos nuevos e interesantes como cyanosporaside A (Fig. 4 - 3). Los otros dos filotipos son *S. pacifica* filotipo 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).

En el año 2012 se realizó un recuento de las localidades de donde se aislaron las especies de *Salinispora* spp. Se encontraron un total de 11 sitios de colecta: Hawaii, Mar de Cortez, Costa Rica, Bahamas, Islas Vírgenes, Mar Rojo, La Gran Barrera de Coral, Guam, Palau, Mar del Sur de China y Fiji (Freel , *et al.*, 2012) . La distribución y los filotipos que presentan cada una de las especies de *Salinispora* es muy variada. *S. arenicola* presenta 5 filotipos el estándar, A-D; de estos, los filotipos A y B han sido aislados del Mar de Cortez. Para *S. tropica* solo se ha aislado de las Bahamas, un filotipo el estándar. *S. pacifica* se ha aislado de múltiples localidades (excepto en el Caribe), posee 13 filotipos el estándar, A-L, lo

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

Estudios realizados con el género *S. pacifica* presentan una relación entre las especies de *S. tropica* y *Streptomyces cinnabarinus determinada* por medio del 16SRNAr y con la secuencia de KS. Se observó que *S. pacifica* presenta un compuesto similar a salinisporamide A (Fig.4 - 1) producido por *S. tropica*. Este compuesto fue extraído de la cepa CNT133 aislada de la isla Fiji al igual que la cepa CNS863, y corresponde al compuesto salinosporamide K en ambas cepas (Fig.5 - A). 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. 5 – B) en su ruta biosintética. Esto demuestra una relación filogenética con las especies de *Salinispora* en 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 carbono 2 (C - 2) (Freel *et al.*, 2011).

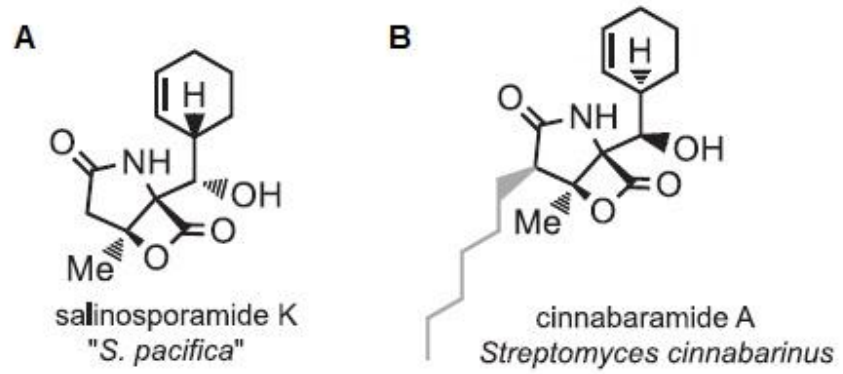


Figura 5. Estructuras de compuestos producidos por *S. pacifica* (A) y *Streptomyces cinnabarinus* (B).

3. HIPÓTESIS

Salinispora pacífica filotipo estándar contiene metabolitos secundarios con actividad anticancerígena.

4. OBJETIVO

4.1 Objetivo general

Llevar a cabo el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en extractos orgánicos de *Salinispora pacífica* y determinar su actividad anticancerígena.

4.2 Objetivos Particulares

- 1.- Realizar un cultivo de la Actinobacteria marina *Salinispora pacífica*.
- 2.- Preparar extractos orgánicos y aislar los metabolitos secundarios presentes en ellos.
- 3.- Realizar bioensayos para probar bioactividad anticancerígena de los metabolitos aislados con células de cáncer pulmón H460.

5. METODOLOGÍA

5.1 Colecta de sedimento marino

El sedimento se colectó en el Golfo de California, también llamado Mar de Cortés; el cual es una extensión del océano Pacífico y se ubica entre la península de California y los estados de Sonora y Sinaloa presentando una longitud de 1100 km y su anchura varía entre los 80 y 209 km con un área aproximada de 210 000 km² (Fig. 6). Los sedimentos fueron obtenidos de profundidades de 20 a 300m dependiendo de la batimetría de la localidad y para ello se utilizó una draga de acero inoxidable Khalisco de 12cm de longitud (Becerril-Espinosa *et al.*, 2013).

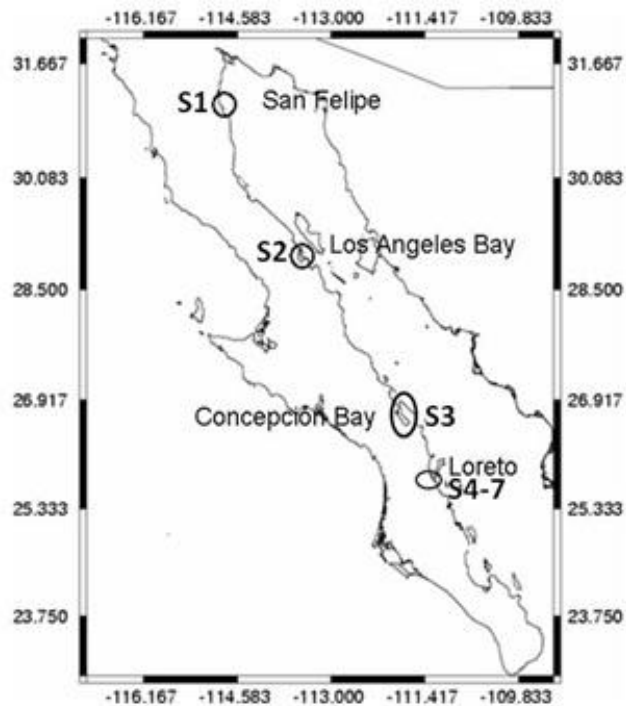


Figura 6. Localidades donde se realizaron las colectas.

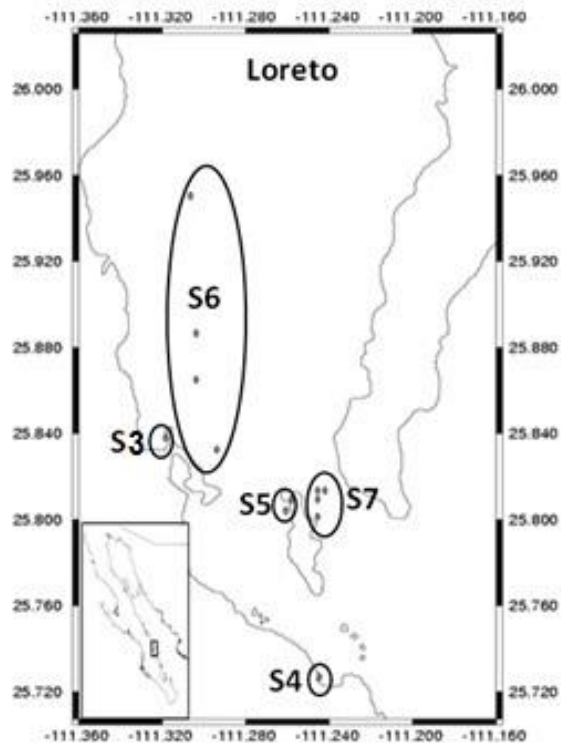


Figura 7. Estaciones de colecta de sedimento marino en Loreto (S4-7), Baja California (playa Juncalito (S3), playa Ensenada Blanca (S4), Isla Danzantes (S5), Zona A 200 m (S6) y B 300 m (S7)).

5.2 Cultivo y preparación de extracto de AMS365 CNY331 y AMS165 CNY330

Las cepas AMS365 CNY331 y AMS165 CNY330 fueron colectadas de Loreto B.C. a una profundidad de 20m a 300m (Fig.7). Una vez en el laboratorio las muestras de sedimento se descongelaron y se tomaron sub-muestras de aproximadamente 5 g de sedimento y cada una fue trasferida a una caja Petri estéril. Todas las muestras se dejaron secar bajo una campana de flujo laminar

durante 24 Hrs. Una vez secas las muestras se maceraron y se inocularon con la técnica de estampado en placa, para lo cual se tomó una esponja estéril de 1 cm de diámetro y se posó 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 (Mincer *et al.*, 2002). El medio de cultivo A1 (agar 18 gL⁻¹, almidón 10.0 gL⁻¹, peptona 2.0 gL⁻¹, levadura 4.0 gL⁻¹), a 27 °C (Fig.9 - A). Para pasar de medio sólido a medio líquido, se inoculó en 10mL de medio líquido A1 (10g de almidón, 2g de extracto de levadura, 2g de bactopectona y 16-18g de agar en 1L de agua de mar), se dejó crecer por 3 o 5 días a 25°C con rotación continua a 215rpm (Fig.8 - C). Después se inoculó 1L, se dejó en agitación constante a 215rpm con un intervalo de 25-28°C, por un periodo de 8 días. Al llegar al octavo día se le adicionó amberlita XAD7 (20 a 30 mg/L de cultivo) y se agitó por 2hrs. Después se filtró a través de gasas y finalmente a través de papel filtro Whatman grado 802 de 12.5 cm de diámetro. Al sólido que se quedó en el filtro, el cual contiene la resina con las células bacterianas, se le realizó una extracción con acetona y finalmente el disolvente se evaporó mediante destilación a presión reducida (rotoevaporador marca Buchi modelo 461 con una bomba de vacío Vacuubrand modelo CVC2).

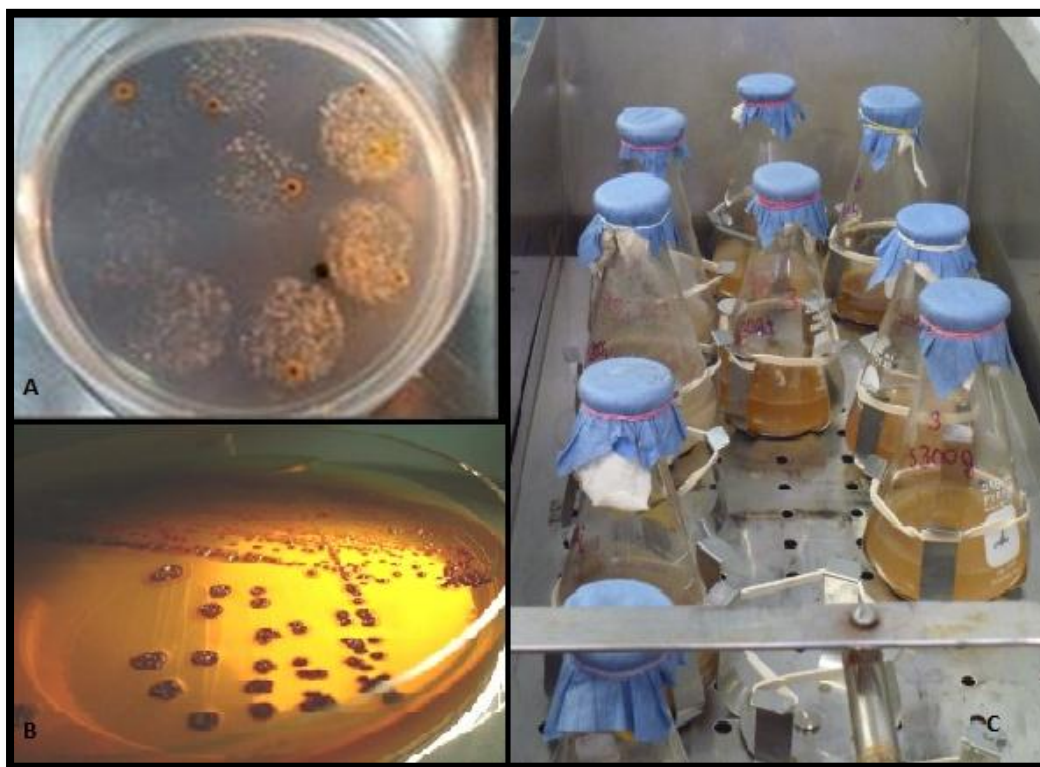


Figura 8. Medios de cultivo, A) Aislamiento de las Actinobacterias en cajas Petri. B) Cepa pura y aislada del género *Salinispora*. C) Medio de cultivo líquido en agitación constante.

5.3 Separación por cromatografía

5.3.1 AMS365 CNY331

La muestra se pesó y se disolvió en acetato de etilo (AcOet), se le agregó una pequeña cantidad de gel de sílice fase normal, el disolvente se evaporó totalmente por medio de destilación a presión reducida (rotoevaporador marca Heidelph, collegiate, brinkmann) (Fig. 9-B) para obtener el extracto en polvo (el cual se introdujo en la columna). Se armó una columna de vidrio (marca Kontes glass de 250mL) con gel de sílice fase normal (gel de sílice 60 de 0.2mm) hasta su

capacidad media y se colocó la muestra (Fig. 9-A), se utilizaron 3 disolventes; isooctano, Acetato de etilo y metanol (MeOH) para generar un gradiente de polaridad de menor a mayor (Fase normal). Las fracciones obtenidas se colectaron en tubos de ensaye por medio de gravedad. Posteriormente, se rotaevaporaron a sequedad todas las fracciones (Fig. 9-D). Para separar los componentes de las fracciones se utilizó la técnica de cromatografía de capa delgada (TLC) empleando placas de aluminio de gel de sílice 60 F₂₅₄ con una capa de espesor de 0.2mm, de 7x3cm dependiendo de la similitud de las fracciones, estas fueron punteadas con micropipetas de 0.4mm y 64 de longitud (Fig. 9-C). Para la detección de los compuestos se utilizaron tres técnicas diferentes: luz Ultra Violeta (UV) (lámpara marca 5100 Walnut Grove), sulfato cérico Ce(SO₄)₂ al 2% en H₂SO₄ 2N y vapores de yodo. Las fracciones de interés se purificaron por medio de TLC en placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ de vidrio con tamaño 20x20cm y para otra fracción se realizó una segunda cromatografía en columna (CC) con vacío fase normal (isooctano, AcOet y MeOH). Así mismo para una fracción obtenida de la segunda CC, se le realizó una CC en fase reversa C18 utilizando Agua (H₂O), MeOH, Acetonitrilo (ACN), AcOet y diclorometano (DCM) como fase móvil. Las fracciones resultantes se colectaron en matraces bola de vidrio y se rotaevaporaron a sequedad. De estas fracciones se eligieron las de mayor interés considerando su concentración y espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se purificaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) empleando un instrumento semipreparativo Acuflo[®] Serie II con un detector de índice de refracción marca Waters modelo R401 y una columna fase

normal Dynamax 250*10mm (L*ID) 60-8SI, con diferentes preparados de disolventes con grado HPLC (Fig. 10 & 11).

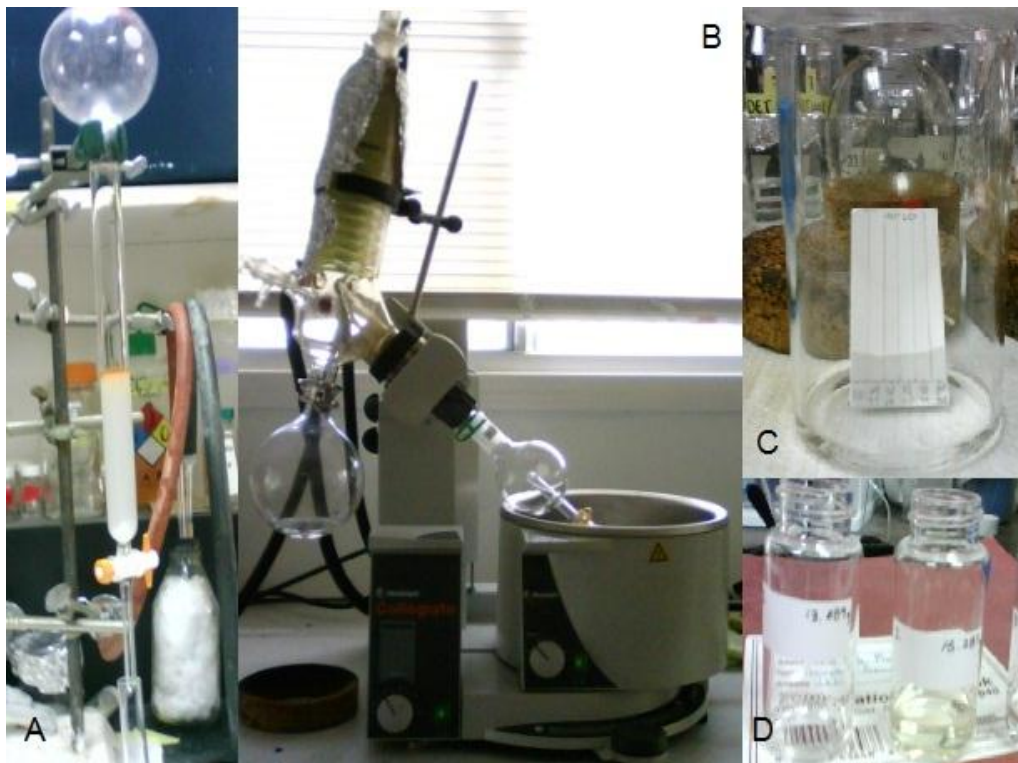


Figura 9. Proceso de obtención de fracciones purificadas a partir de la cepa AMS365 CNY331, A) Cromatografía en Columna, B) Concentración de fracciones por medio de destilación a presión reducida, C) Cromatografía en Capa Delgada y D) Fracciones obtenidas.

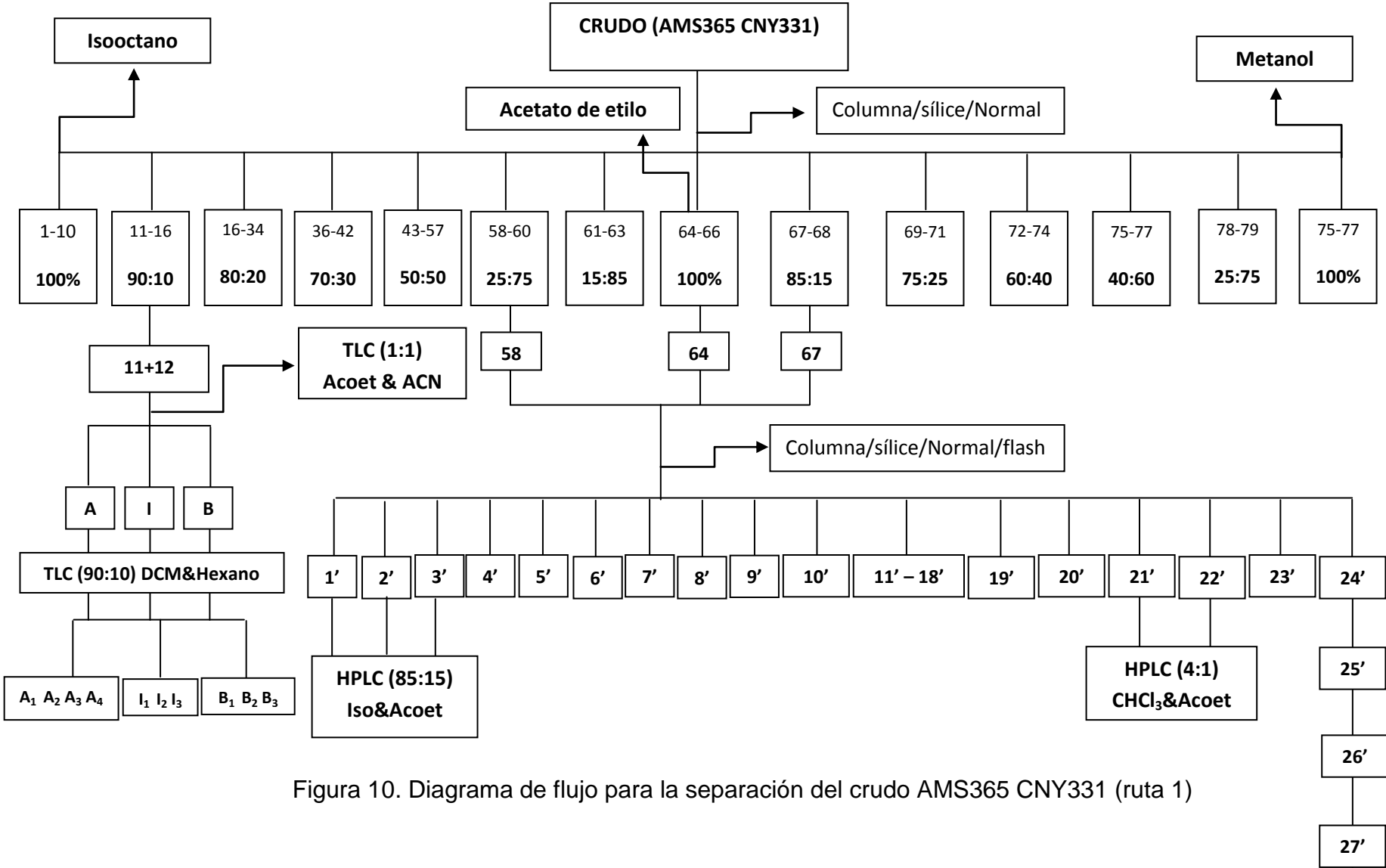


Figura 10. Diagrama de flujo para la separación del crudo AMS365 CNY331 (ruta 1)

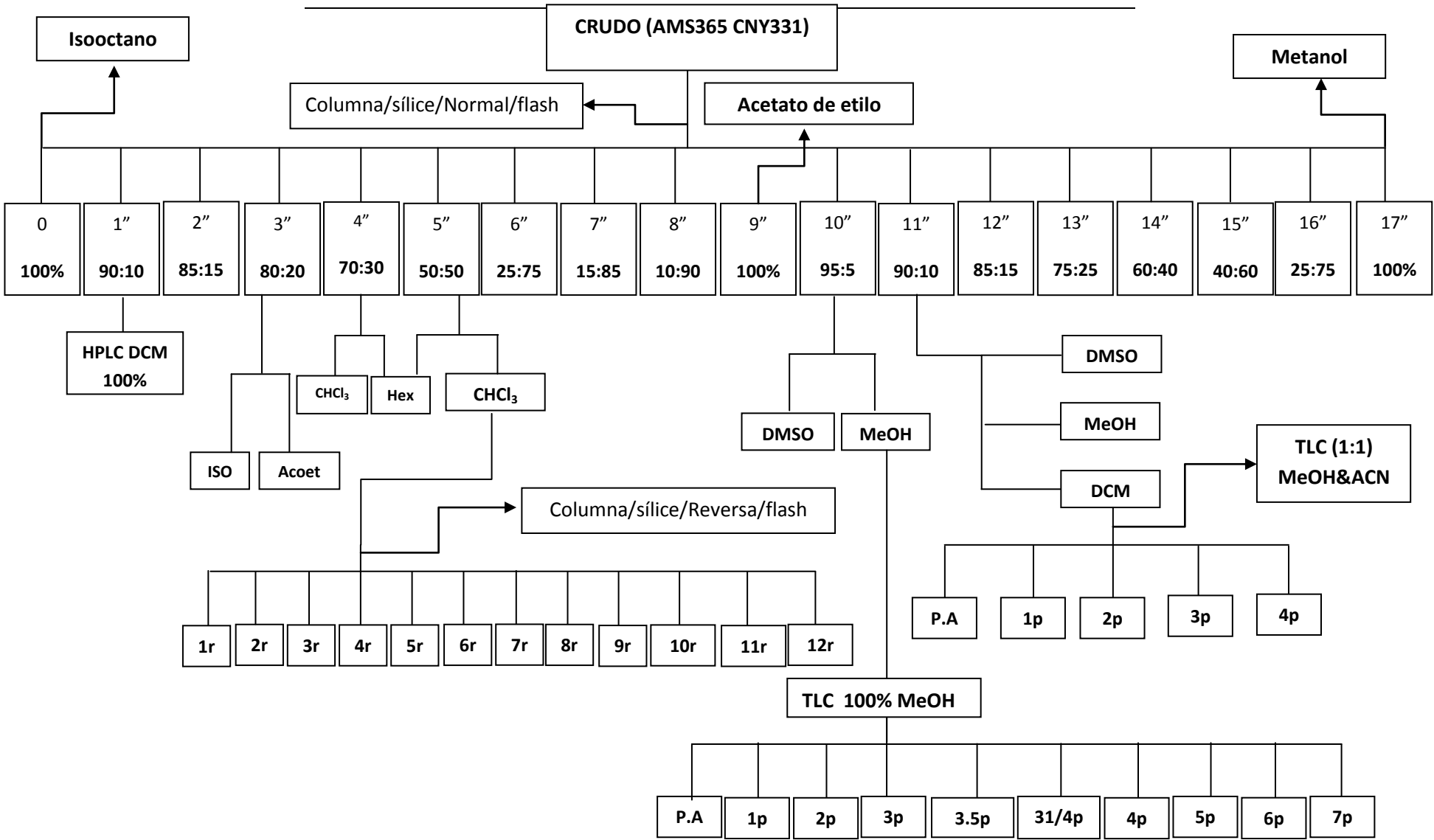


Figura 11. Diagrama de flujo para la separación del crudo AMS365 CNY331 (Ruta 2).

5.3.2 AMS165 CNY330

Debido a que la cepa AMS165 CNY330 es fotosensible, las condiciones en el laboratorio deben ser cuidadas al extremo para asegurar la estabilidad de los compuestos dentro del extracto. La muestra se pesó y se disolvió en acetato de etilo (AcOet). Se colocó una pequeña cantidad de gel de sílice fase normal, el disolvente se evaporó totalmente por medio de destilación a presión reducida (rotoevaporador marca Heidolph, collegiate brinkmann) (Fig.12-B) para obtener el extracto en polvo. Se armó una columna de vidrio (marca Kontes glass de 250mL) con gel de sílice fase normal (gel sílice 60 de 0.2mm) hasta su capacidad media, posteriormente se colocó la muestra y se aplicó vacío para acelerar la obtención de las fracciones (Fig.12-A). Se utilizaron 200mL de isooctano, AcOet, ACN y H₂O con el fin de generar un gradiente de polaridad. Las fracciones resultantes se colectaron en matraces bola de vidrio de 250mL y se concentraron por rotaevaporación. Las fracciones resultantes se almacenaron en viales ámbar (Fig.12-D). Las fracciones se monitorearon en placas de TLC en gel de sílice 60 F₂₅₄ con una capa de espesor de 0.2mm, de 7x3cm, estas fueron punteadas con micropipetas de 0.4mm y 64 de longitud. Se utilizaron luz UV y vapores de yodo como reveladores. Las fracciones de interés se purificaron por medio de TLC placas de gel de sílice 60 F₂₅₄ de 5x20cm (Fig.12-C) y en otra fracción previamente obtenida se realizó una segunda cromatografía en columna (CC) con flash y un gradiente de polaridad en fase normal de isooctano, AcOet y ACN. Se colectaron en matraz bola de vidrio y se rotaevaporaron a sequedad. Se eligieron

las fracciones de mayor interés y se purificaron mediante HPLC empleando una mezcla de 2:1 de isooctano & AcOet como fase móvil.

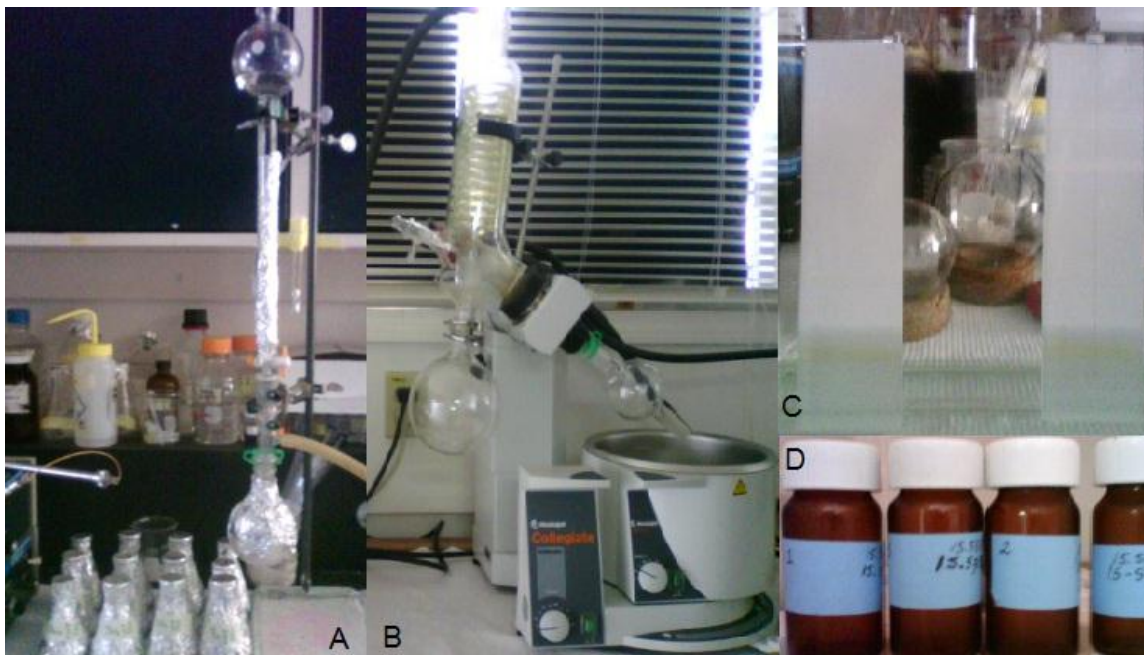


Figura 12. Proceso de obtención de fracciones purificadas a partir de la cepa AMS165 CNY330, A) Cromatografía en columna B) Concentración de fracciones por destilación a presión reducida, C) Cromatografía en capa fina (2 placas de 5x20cm) y D) Fracciones obtenidas.

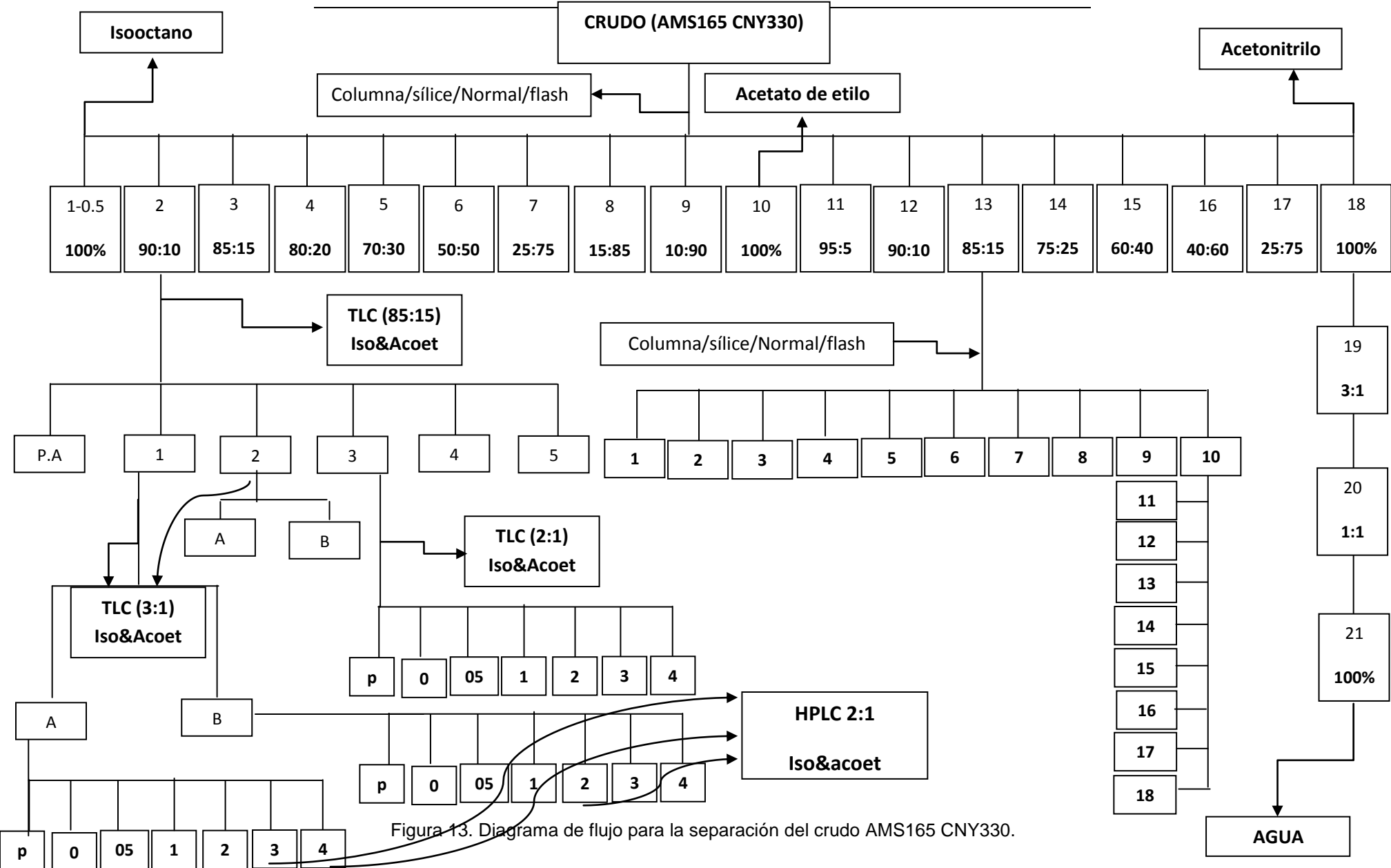


Figura 13. Diagrama de flujo para la separación del crudo AMS165 CNY330.

5.4 Análisis espectroscópico

5.4.1 Infrarrojo

Con el fin de conocer los principales grupos funcionales de la estructura molecular de las fracciones de interés 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 en cloroformo (CHCl_3) la muestra y se agregan solo unas gotas a la placa de cloruro de sodio (NaCl) y se deja evaporar el disolvente por completo y finalmente se corre el espectro.

5.4.2 Resonancia Magnética nuclear Protónica

Es una técnica espectroscópica que se utiliza para estudiar los núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos), de las fracciones se realizaron análisis de Resonancia Magnética Nuclear protónica ($^1\text{HRMN}$) en espectrofotómetros Varian de 300 y 500 megahertz (MHz), estos espectros fueron corridos con deuterocloroformo (CDCl_3) y deuterometanol (CD_3OD), los desplazamientos químicos (δ) fueron referenciados a las señales obtenidas de los disolventes en unidades de partes por millón (ppm) a $\delta=7.24\text{ppm}$ para el CDCl_3 y para el CD_3OD $\delta=4.78\text{ppm}$.

5.4.3 Cromatografía líquida/espectrometría de masas

Con el fin de determinar la masa de las fracciones de interés obtenidas de ambas cepas realizaron espectro de masas (MS) 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.

5.5 Ensayos biológicos

5.5.1 Bioensayos anticancerígenos de AMS165 CNY330

Algunas fracciones fueron sometidas a bioensayo, para ser probadas contra células de cáncer de pulmón H460 a una concentración 10mg/mL en sulfóxido de dimetilo (DMSO), empleando un método de dilución y después de 72 horas de incubación se leyó su absorbancia a 495nm. A partir del cual se obtuvo el porcentaje de sobrevivencia.

6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Infrarrojo de AMS365 CNY331

La figura 14 representa el espectro de Infrarrojo de la fracción 19' obtenida de la cepa AMS365 CNY331. Esta muestra en forma sólida fue disuelta en AcOet y se obtuvo el espectro que mostró una banda ancha e intensa característica de alcoholes en 3463.63cm^{-1} , dicha absorción representa la tensión del grupo O-H; así mismo, se puede ver una banda intensa a los 2984.56cm^{-1} que es característica de alcanos. Las cetonas, aldehídos y ácidos carboxílicos producen señales alrededor de 1736.13cm^{-1} y 1644.46cm^{-1} generadas por la presencia del grupo funcional carbonilo (C=O). La señal en 1736.13cm^{-1} presente en la fracción 19'. También se observa una señal generada por la torsión con el hidrógeno (C-H) del aldehído en 2086.42cm^{-1} . Se evidencia una banda intensa para éteres (R-O-R') tanto para aromáticos como alifáticos en 1240.07cm^{-1} , así como otra banda intensa en los 786.64cm^{-1} asociada a compuestos aromáticos (Tabla I).

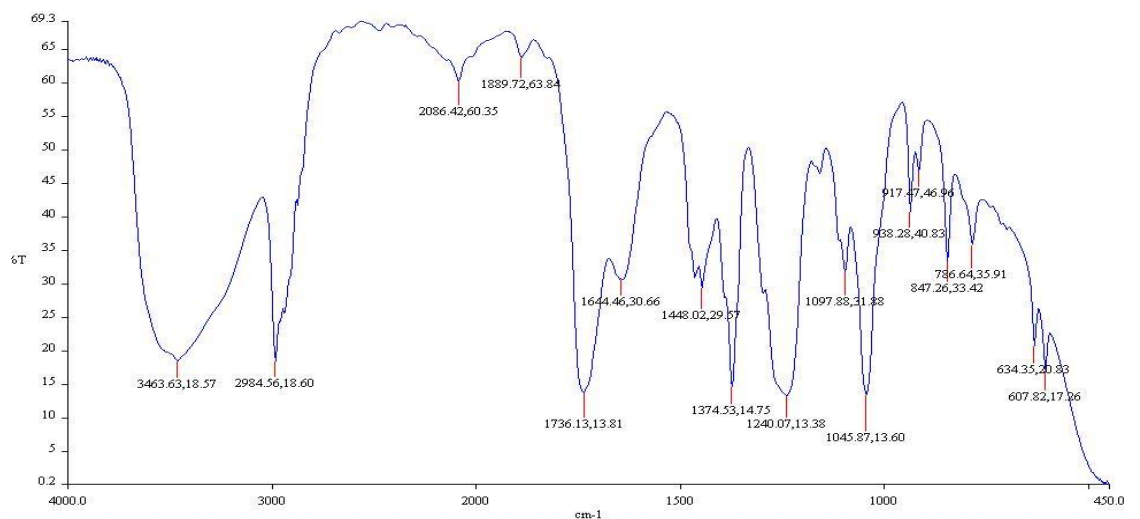


Figura 14. Espectro de IR para la fracción 19', (con disolvente de AcOet).

Tabla I. Datos obtenidos del IR de la fracción 19' del extracto AMS365 CNY331, utilizados para determinar los grupos funcionales presentes.

Bandas cm^{-1}	Tipo	Grupo	Bandas cm^{-1}	Tipo	Grupo
3463.63	I	Alcoholes	1097.88	M	Alcanos
	I	Aminas		D	Aromáticos
2984.56	I	Alcanos	1045.87	I	Alcoholes
	I	Alquenos		M	Aldehídos
	M	Ácidos		D	Alcanos
2086.42		-	938.28 y 917.47	I	Alquenos
1889.72		-		M	Aldehídos
1736.13	I	Esteres	847.26	I	Alquenos
	I	Anhídridos		I	Aromáticos
1644.46	I	Aminas	786.64	M	Aldehídos
	M	Alquenos		M y I	Aminas
	I	Alcanos		I	Alquenos
1448.02	I	Alquenos	634.35 y 607.82	M	Aminas
	D	Alcoholes 1°		I	Aromáticos
	M	Alcoholes 2°		I	Alquenos
	M	Aldehídos		M	Éteres Ar
1374.53	M	Alcanos	*El disolvente AcOet no se evaporó por completo así que hay señales de $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$.	I	Alquinos
	M	Alcoholes			
	M	Aldehídos Ar alifáticos			
1240.07	M	Alcanos			
	I	Éteres Ar			
	I	Alcoholes Ar			
	I	Esteres			
	M	Cetonas			
	I	Anhídridos			

El tipo de señal indica si es intensa (I), mediana (M) y débil (D)

6.2 Resonancia Magnética Nuclear protónica de AMS365 CNY331

En la figura 15 se puede observar que aunque las fracciones fueron extraídas de diferente forma, se consideran iguales o muy similares, ya que sus espectros presentan una gran similitud. El espectro de la fracción 19' presenta señales en 0.7-0.9ppm asociadas a protones (^1H) de metilo ($-\text{CH}_3$), en 1.25ppm para

metilenos (-CH₂-), en 3.05ppm que se puede atribuir a metinos (CH) que a su vez esté cercano a ¹H de aromáticos (Ar), en 4.15, 4.2 y 4.5ppm asignados a ¹H vinílicos (HC=CH), una señal de 7.5 y 7.68ppm para ¹H de Ar y por último una señal en 8.05ppm que se asocia a H-CO-O ó a H-Ar. Las señales anteriores, a diferencia de las señales del CD₃OD son muy débiles debido a la poca cantidad de muestra (Fig.15-A). En el espectro de 8" se observan señales múltiples en δ 0.9-1.18 asignadas a grupos -CH₃, en 1.3-1.45ppm para grupos -CH₂-, en 1.9-2.1 y 2.3-2.4ppm que se atribuyen a CH₃ cercanos a grupos carbonilo (CO), así como señales para HC=CH a 5.62-5.68ppm y por último una señal doble para Ar-H en 7.39-7.43ppm; este espectro presenta una contaminación por ftalatos evidentes en δ ~ 4.29, 7.58, 7.74ppm (Fig.15-B). Ambas fracciones cristalizaron al ser concentradas. Al realizar la curva de integración del espectro de la fracción 8" se puede calcular el número de átomos de hidrógeno que dan origen a cada señal. La primera señal es múltiple y se ubica a 0.925-1.023ppm presenta un ¹H asociado a -CH₃, se observo también un triplete en 1.073, 1.097 y 1.123ppm que puede pertenecer a un CH₂ ó un CH₃-C-C=C, una señal múltiple en 1.308-1.450ppm que se relaciona con -C-CH₂-C (Cíclico) ó -CH₂-, otra señal múltiple en 1.864-1.999ppm que pueden representar protones de C=C-CH₂ ó C-CH₂-C-O, un múltiple en 2.34-2.355ppm asociado a CH₃-Ar, CH₃-N ó C=C-CH₂, y la última señal corresponde a un múltiple en 3.46-3.67ppm para ¹H de C-CH₂-O-R ó -H. Además, existen señales de dobles en δ de 4.051 y 4.088ppm CH₂-O-CO-R, 5.612 y 5.638ppm HC=CH y 7.393 y 7.419ppm Ar-H.

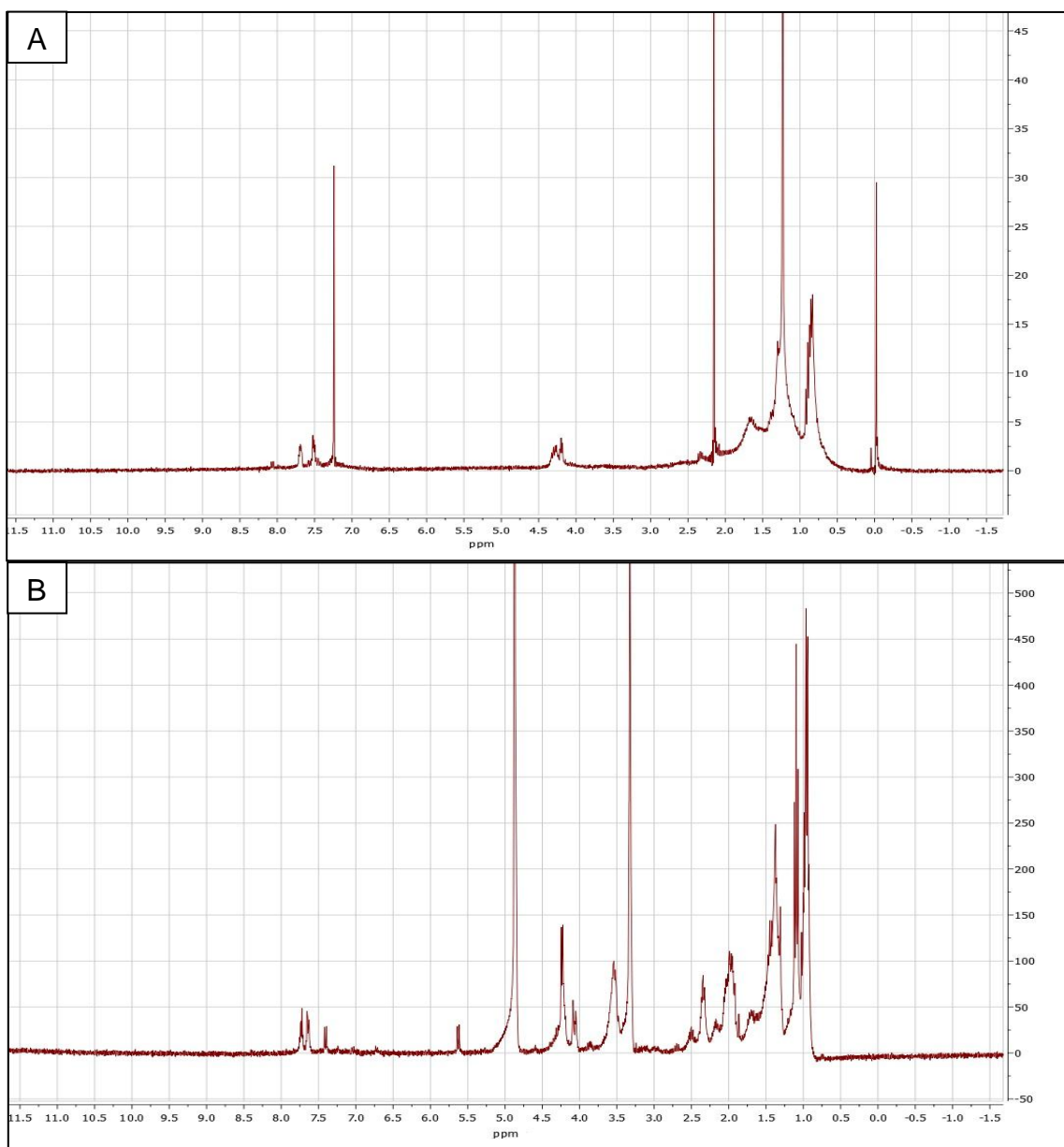


Figura 15. Espectros de ^1H RMN para 2 fracciones obtenidas con 10:90 de isooctano y acetato de etilo del crudo AMS365 CNY331 A) Fracción 19', extraída por una segunda Cromatografía en Columna (menor cantidad de crudo) a 500MHz y B) Fracción 8'', extraída de Cromatografía en Columna (con mayor cantidad) a 300MHz.

La fracción 4'' fue extraída con dos disolventes, cloroformo (CHCl_3) y hexano (C_6H_{14}). El espectro de la fracción de CHCl_3 presenta señales en δ de 0.849-1.17ppm que pueden ser atribuidas a ^1H de $-\text{CH}_3$, $\text{CH}_3\text{-C-C}=\text{C}$ y $-\text{CH}_2^-$, se observan otras señales en un intervalo de 1.41-1.62ppm que se asocian a $\text{CH}_3\text{-CO}$, $\text{C}=\text{C-CH}_2$ ó $\equiv\text{CH}$, una señal múltiple en 2.01-2.02ppm asociada a protones de $\text{CH}_3\text{-COO-R}$ ó C-CH-CO , un triplete muy bien definido en 2.32, 2.35 y 2.37ppm que pueden ser ^1H relacionados a $\text{C-CH}_2\text{-C}=\text{C}$, $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ó $\text{CH}_3\text{-N}$, una señal múltiple en 3.57-3.72ppm para protones de C-CH-OH , un multiplete en 4.15-4.229ppm asociados a $\text{C-CH}_2\text{-O-CO-R}$ y por último, una señal simple de 5.34ppm con protones de $\text{C}=\text{CH}_2$ ó $\text{HC}=\text{CH}$ (Fig.16-A). A partir de las aguas madres de esta fracción cristalizada, se obtuvieron unos cristales secundarios muy similares a los anteriores y en su espectro de RMN se observa la presencia de grupos asociados a protones de metilos en 0.84-0.88, 1.12-1.28 y 1.42ppm presentando una señal múltiple con ^1H como $-\text{CH}_3$, $\text{CH}_3\text{-C-C}=\text{C}$, $\text{CH}_3\text{-CO}$, $-\text{CH}_2^-$ que pueden ser cíclicos y $\equiv\text{CH}$. Así mismo se observan señales dobles en 1.62 y 2.03ppm que pueden ser atribuidas a $\text{CH}_3\text{-C}=\text{C}$ y $\text{CH}_3\text{-COO-R}$. En 2.23 y 2.36ppm se observan dos tripletes asociados a protones de $\text{C-CH}_2\text{-C}=\text{C}$, C-CH-CO y $\text{C-CH}_2\text{-COOR}$, un multiplete asociado a protones de C-CH-O-R en 3.56-3.76ppm, un triplete de 3.9-3.95ppm que se puede relacionar con ^1H de C-CH-O-H , una señal doble en 4.74-4.78ppm que puede ser asignada a $-\text{C-CH-NO}_3$ y por último una señal triple en 5.32, 5.34 y 5.38ppm que pueden ser atribuidas a protones de $-\text{C}=\text{CH}_2$ ó $\text{HC}=\text{CH}$ (Fig.16-B). Para el caso de la fracción 4'' de C_6H_{14} (Fig. 16C) se presentan señales de múltiples en 0.85-0.90 y 0.125-1.55ppm asociadas a $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2^-$, $\equiv\text{CH}$, $\text{CH}_3\text{-C-}$

C=C, una señal simple en 2.01ppm relacionada a ^1H de $\text{CH}_3\text{-CO-O-R}$ ó C-CH-CO , un doblete de 2.22ppm que se puede atribuir a C=C-CH_2 , un triplete con δ de 2.34, 2.35, 2.37ppm que son desplazamientos comunes de $\text{CH}_3\text{-Ar}$ ó $\text{C-CH}_2\text{-C=C}$, una señal doble en 2.45ppm que se atribuye a $\text{CH}_3\text{-CO-O-Ar}$, una señal en 3.59-3.7ppm que se relaciona a protones de C-CH-O-R , así también una señal en 3.71ppm que asemejan a protones de $\text{CH}_3\text{-O-CO-R}$ ó C-CH-O-R , una señal triple de 3.94-3.95ppm con ^1H de C-CH-OR , una señal múltiple en 4.14 - 4.17ppm que se asocia con protones de $\text{C-CH}_2\text{-O-CO-R}$ y tres señales simples en 5.35ppm que se relaciona con C=CH_2 y finalmente dos señales en 7.05 y 7.26-7.28ppm que son protones asociados a compuestos aromáticos.

La fracción 17” se obtuvo como un sólido amorfo. En la figura 17 se puede observar una señal múltiple en 0.74-0.88ppm que se atribuye a $-\text{CH}_3$ al igual que la señal doble en 0.97-0.99ppm, se observa también tres señales simples que pueden representar grupos $\text{CH}_3\text{-C-C=C}$, $\text{CH}_3\text{-C=C}$ y C=C-CH_2 a 1.19, 1.69 y 1.92ppm respectivamente. Se aprecia la presencia de un triplete muy pequeño a los 2.02, 2.04 y 2.09ppm $-\text{C-CH-CO}$ que puede ser considerada también como una señal simple. A los 5.09ppm se encuentra una señal simple que puede presentar ^1H de C=CH-CO-CH_3 . Es evidente la presencia de una señal doble y una simple en 5.52, 5.54 y 5.63ppm que representa un ^1H asociado a HC=CH ; y por último una doble a 7.3 y 7.32 señal para aromáticos y al igual que una simple presente a 8.44ppm.

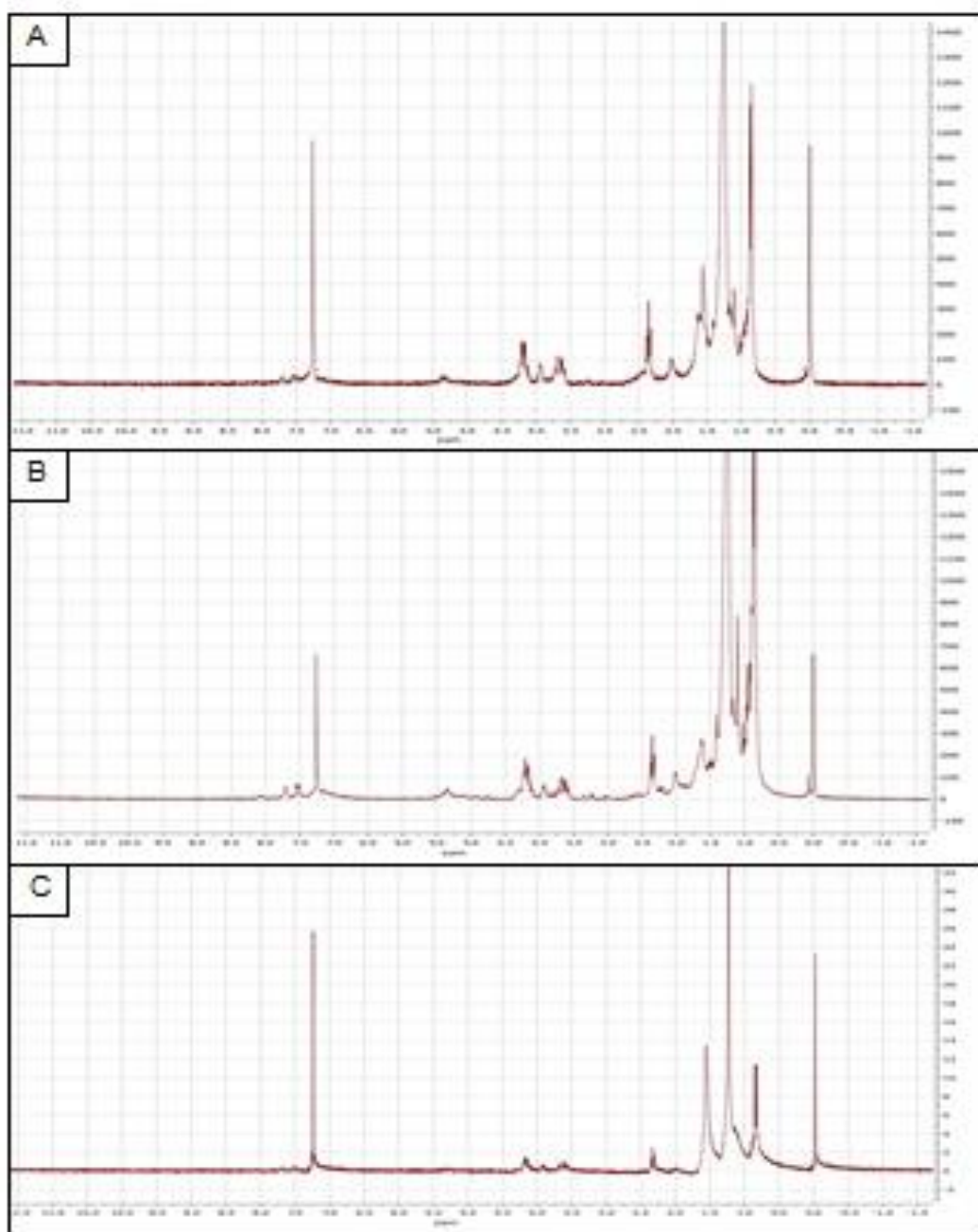


Figura 16. Espectro de ^1H RMN para la fracción 4'' obtenida de 70:30 de isooctano y AcOet del crudo AMS365 CNY331, a 500MHz, A) Cloroformo B) Aguas madres C) Hexano.

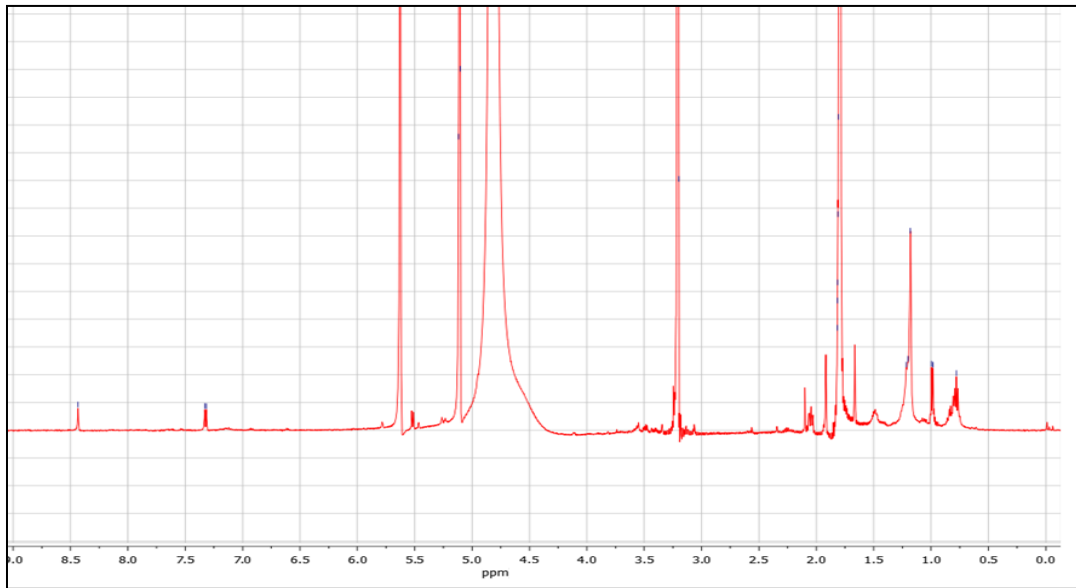


Figura 17. Espectro de ^1H RMN para la fracción 17'' obtenida de 100% de MeOH del crudo AMS365 CNY331 a 500MHz.

El espectro de la fracción 11' muestran señales múltiples en 0.81-1.21ppm asociadas a protones de $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, $\equiv\text{CH}$ y $\text{CH}_3-\text{C}-\text{C}=\text{C}$, otras señales múltiples asociadas a grupos vinílicos como $\text{HC}=\text{C}-\text{CH}_2$ ó $-\text{C}-\text{CH}-\text{CO}$ en 1.23-2.0ppm, una señal simple en 3.63ppm relacionadas a $\text{C}-\text{CH}_2-\text{OH}$, un doblete en 5.23-5.34ppm que se atribuyen a $-\text{C}=\text{CH}_2$ ó $-\text{C}=\text{CH}$, dos señales múltiples en 7.07-7.22ppm y 8.05-8.08ppm que se asocian a ^1H de Ar-H y $\text{HCO}-\text{O}$ ó $\text{HCO}-\text{N}$ respectivamente (Fig.18).

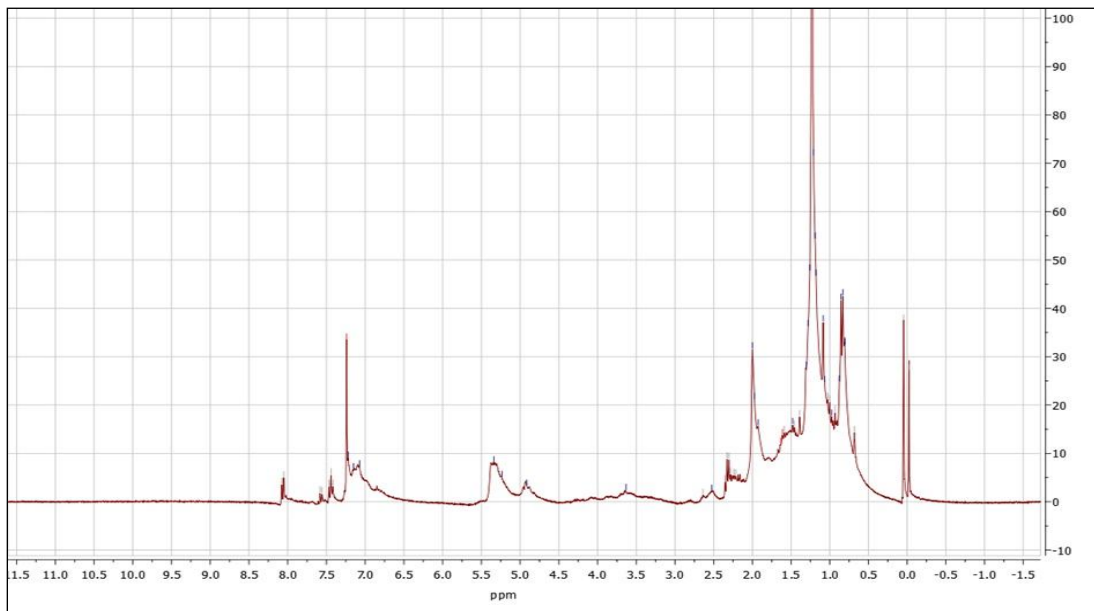


Figura 18. Espectro de ^1H RMN para la fracción 11' obtenida de 50:50 a 15:85 de isoocetano y AcOet a 300MHz del rudo AMS365 CNY331.

6.3 Cromatografía líquida con espectrometría de masas de AMS365 CNY331

Se realizaron análisis de LC/MS de las fracciones 58, 64 y 67 con isoocetano:AcOet (25:75), AcOet, (100%) y AcOet:MeOH (85:15) respectivamente.

El cromatograma de la fracción 58 presentó 2 bandas con tiempos de retención de 8.313 min y 9.833 min. Para el primer pico se observa una absorción en el ultravioleta (UV) a 254.8nm, con una amplitud de 26.9mAU (Fig.19). Esta fracción posee una similitud con el compuesto de CNQ617.409A denominado Mareinosin A. Debido a la incapacidad de ionizarse de la muestra, no se obtuvieron datos espectrales de masas (MS). En el segundo pico (Fig.20) se observó a una absorción en el UV a 254.8nm con una amplitud de 23.7mAU, para este segundo pico se obtuvo una similitud con el compuesto

dihydroxybenzoylserin-trimer, por comparación con su longitud de onda de máxima absorción y su espectro de masas.

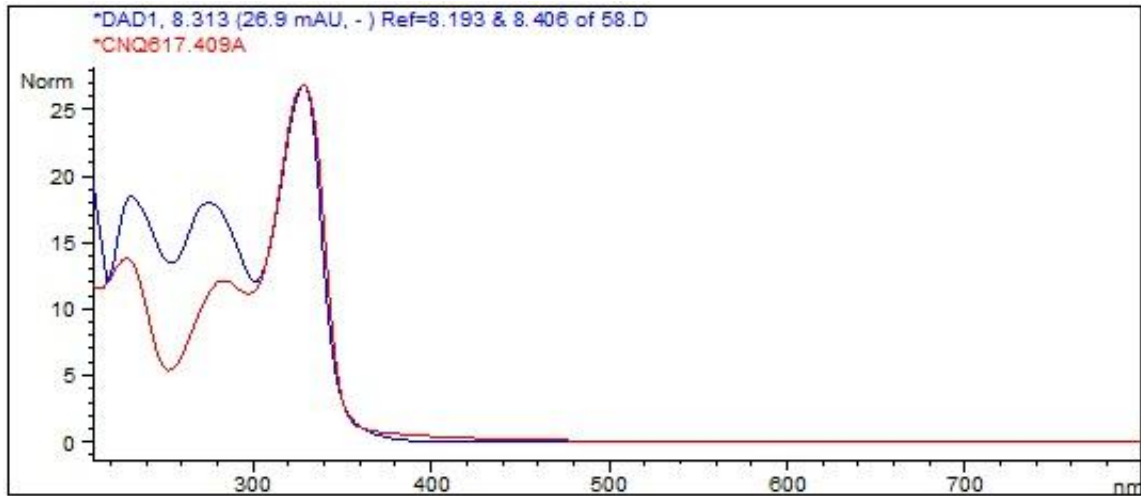


Figura 19. Espectros de Ultravioleta de compuestos obtenidos del LC/MS de la fracción 58, de la primer banda a un tiempo de retención de 8.313min (línea roja nuestra muestra, línea azul Mareineosin A), del crudo AMS365 CNY331.

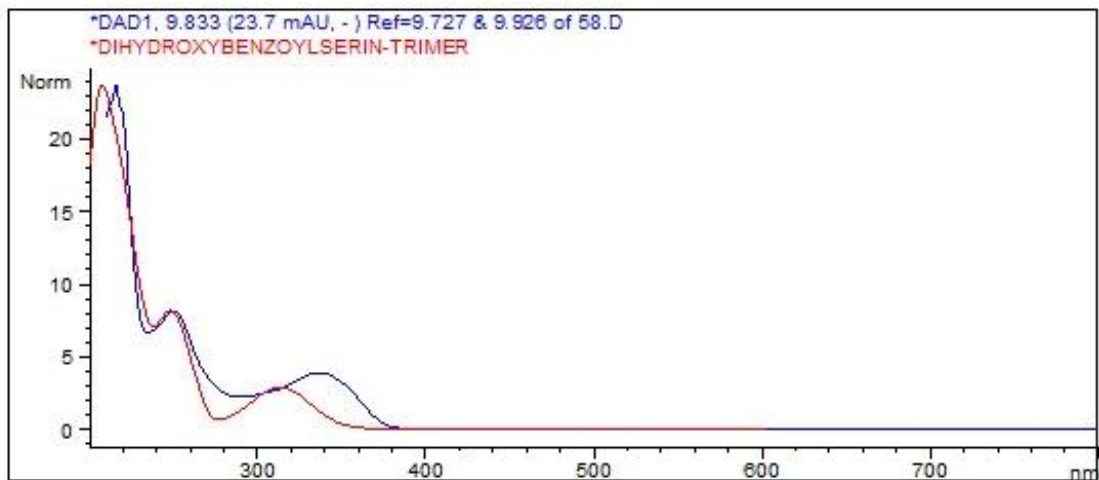


Figura 20. Espectros de Ultravioleta de los compuestos obtenidos del LC/MS de la fracción 58, segunda banda adquirida un tiempo de retención de 9.833min (línea azul nuestra muestra, línea roja dihydroxybenzoylserin-trimer), aislados del crudo AMS365 CNY331.

La figura 21, muestra los resultados del espectro de masas para la segunda banda de la fracción 58, en él se puede observar un pico base a m/e 405.2 que se asocia al ion molecular más un hidrógeno más un sodio ($[M + H + Na]^+$), lo que significa que el peso molecular del compuesto debe ser de 383 unidades; así mismo los fragmentos obtenidos proporcionan información de las características de la molécula como lo es una pérdida de 44 unidades que puede asociarse a CO_2 , CH_3CHOH , al igual que otra pérdida de 67 unidades que se relaciona con una pérdida de C_5H_7 .

En la figura 22 la cual es la continuación del MS, se pueden observar 2 grandes picos relacionados con la duplicidad de la molécula a m/e 808.4 y 830.4 que se asocian a $[2M + Cl + H]^+$ y $[2M + Cl + Na]^+$ respectivamente, la pérdida de 14 unidades está asociada a un CH_2 para $[2M + Cl + H]^+$ para el primer pico, para el segundo pico se asocian pérdidas de fragmentos en 13 y 14 m/e que se atribuyen a un CH y un CH_2 respectivamente. Finalmente se observa una pérdida de 18 m/e correspondientes a una molécula de H_2O para el caso de $[2M + Cl + Na]^+$.

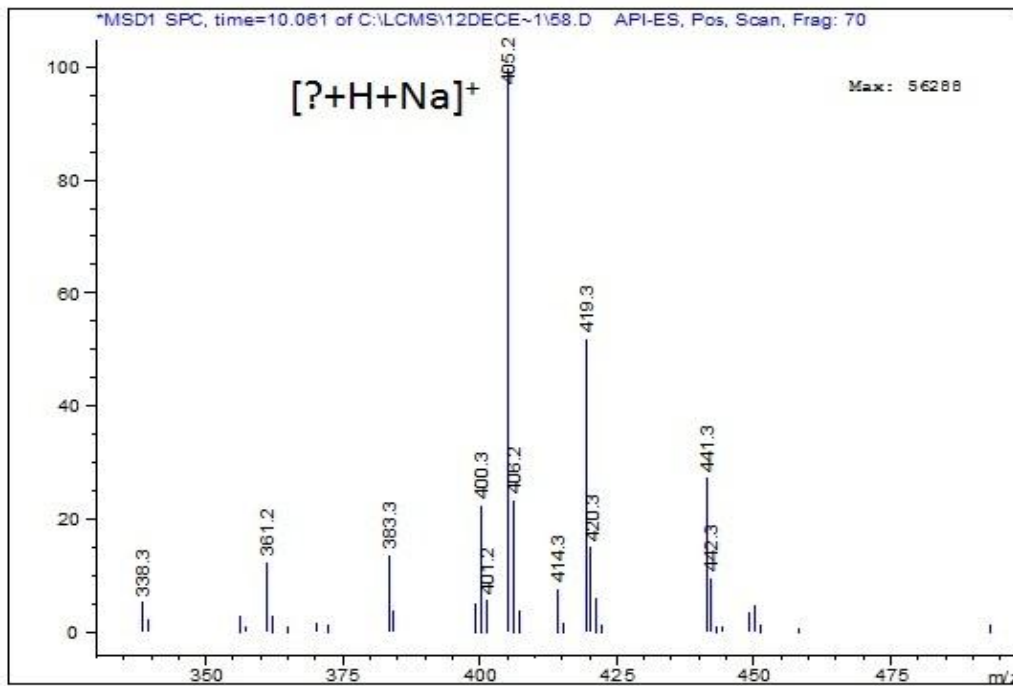


Figura 21. Datos espectrales de masas (MS) de la fracción 58, para el segundo pico (Fig. 20), obtenida del crudo AMS365 CNY331.

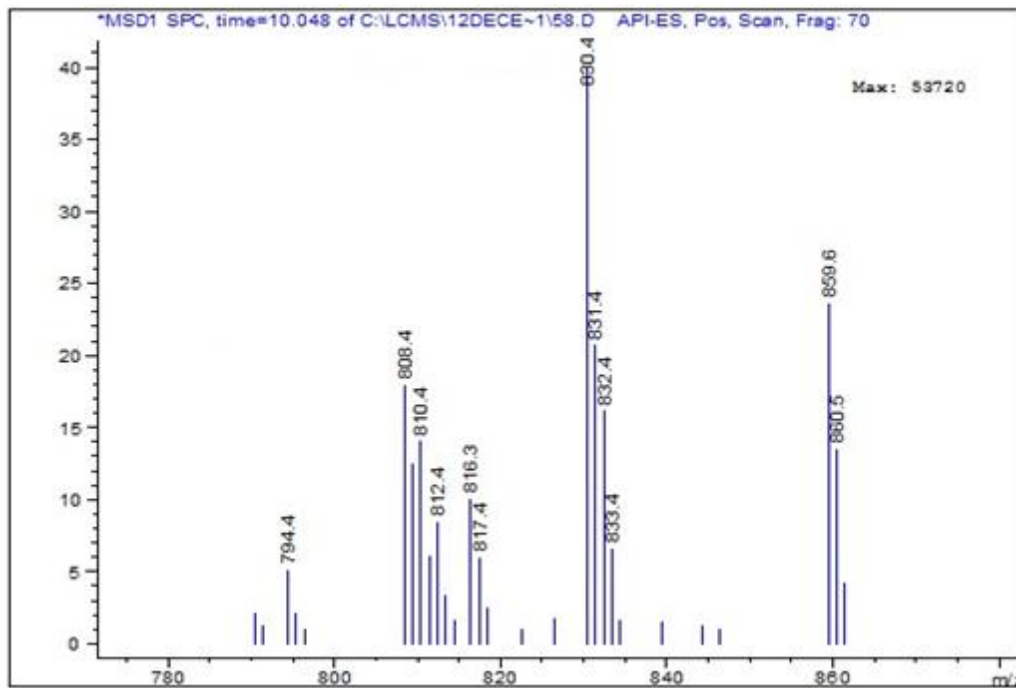


Figura 22. Espectro de masas de la fracción 58, continuación de la figura 21, aislada del crudo AMS365 CNY331.

En el cromatograma de la fracción 64 se encontraron 2 picos a un tiempo de retención de 8.330 min y 9.836 min. El primero de ellos presentó una absorción a longitud de onda de 254.8nm, que se relacionó con la figura 20, ya que su tiempo de retención y absorción en el UV es el mismo y solo varía la amplitud de la onda. El segundo pico de 9.836 min de tiempo de retención y de amplitud de 118mAU, está relacionado con el compuesto FLOCCOSIN (Fig. 23), para este compuesto si se obtuvo datos de MS.

En la figura 24 se puede observar un ion molecular a m/e 405.2, semejante al d la fracción 58, esto significa que su PM puede ser igual pero la fragmentación de los iones es distinta, debido quizá al grado de pureza de las muestras.

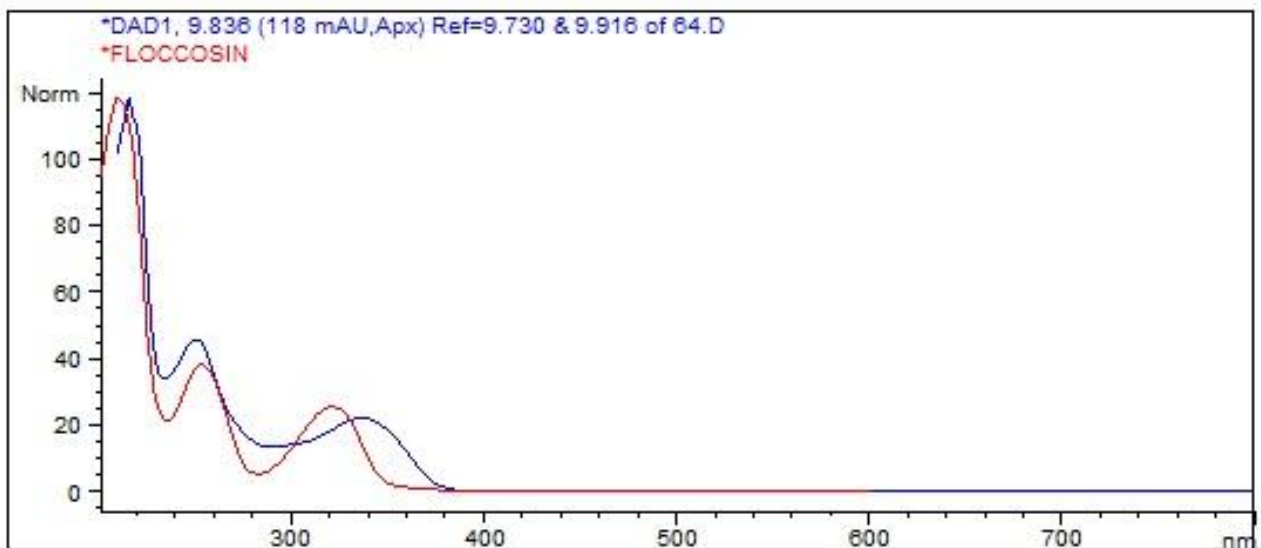


Figura 23. Espectros de Ultravioleta obtenidos del LC/MS de la fracción 64, segundo pico adquirido a un tiempo de retención de 9.836min (línea azul nuestra muestra, línea roja floccosin), aislados del crudo AMS365 CNY331.

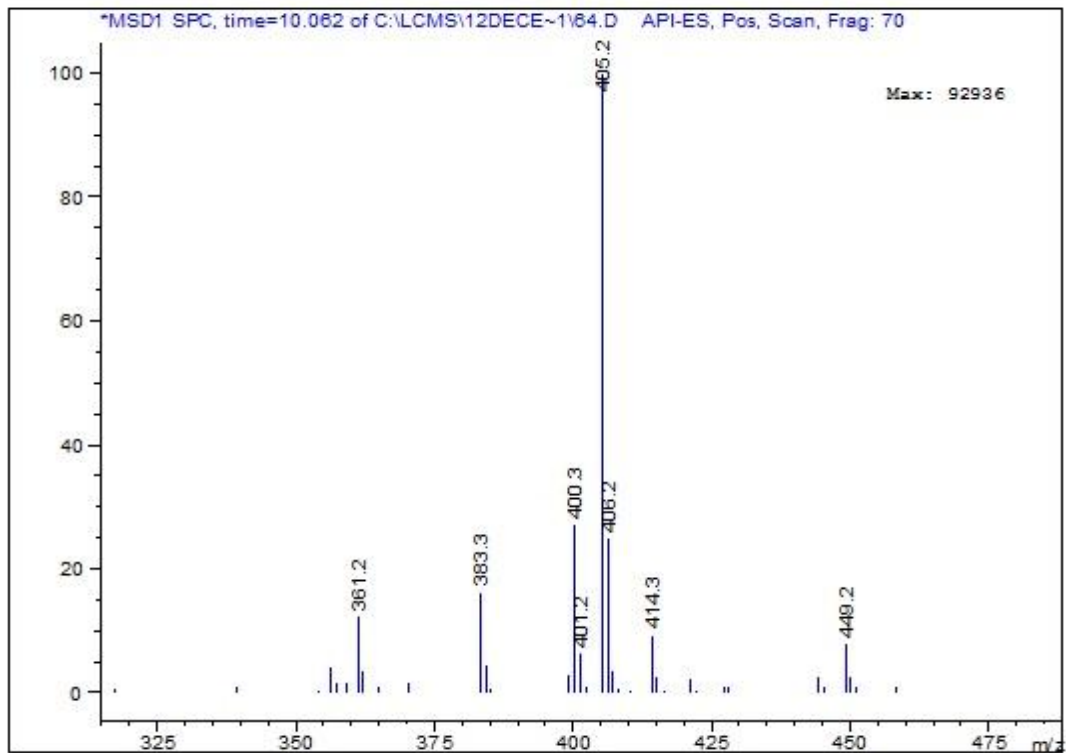


Figura 24. Espectro de masas de la fracción 64, segundo pico obtenido (Fig.23), aislado del crudo AMS365 CNY331.

Análisis realizados a la fracción 67 arrojaron como resultado la presencia de los mismos 2 picos que en la fracción 64, El gráfico del primer pico es el mismo que las dos fracciones la 58 y la 64, pero el segundo pico solo presentó la similitud con la fracción 64. Se realizó un segundo análisis en la fracción 67 donde se encontró nuevamente dos picos a longitud de onda de 254.6nm. El primer pico se presentó a una amplitud mayor de ~ 84mAU con un tiempo de retención de 8.432min y el segundo pico con un tiempo de retención de 9.902 min y una amplitud de ~ 24mAU (Fig. 25).

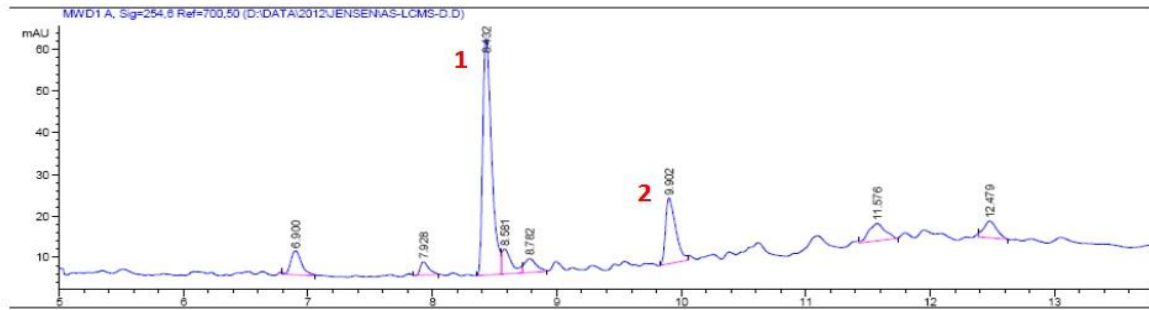


Figura 25. Cromatograma de LC/MS de la fracción 67 en una longitud de onda de 254.6nm, primer pico a un tiempo de retención de 8.432 min y segundo pico en 9.902 min, aislados del crudo AMS365 CNY331.

Se realizó el espectro de masas de alta resolución para la fracción 67, para ambos picos mediante el método de ionización por electrospray (ESI-MS) en modo positivo y se observó para el caso de la señal con tiempo de retención de 8.44-8.47min y amplitud de ~ 84mAU, un pico base de m/e 372.35, siendo éste el ion molecular más un hidrógeno. También se encontró la pérdida de fragmentos de 16 unidades que se asocian a una molécula de oxígeno, una pérdida de 36 unidades que se asocia a HCl ó a $2H_2O$, y por último una pérdida de 99 unidades que se atribuyen a $C_6H_{11}O$ ó C_7H_{15} (Fig.26), en este espectro de masas también se observa un segundo pico correspondiente quizá a un compuesto mezclado con el anterior que presenta un ion molecular más un hidrógeno a una m/e de 570.91 y su patrón de fragmentación presenta pérdidas de 2 en 2 unidades con abundancias relativas que indican que el compuesto podría contener un bromo o 2 cloros.

Para el segundo pico de esta misma fracción (67), localizado a 9.91-9.84min de tiempo de retención, se encontró un ion molecular más un hidrógeno a

m/e 427.32, un fragmento a m/e 444.25 que hace referencia al incremento de un ion amonio, un fragmento a m/e 449 para el ion molecular más sodio (Fig.27).

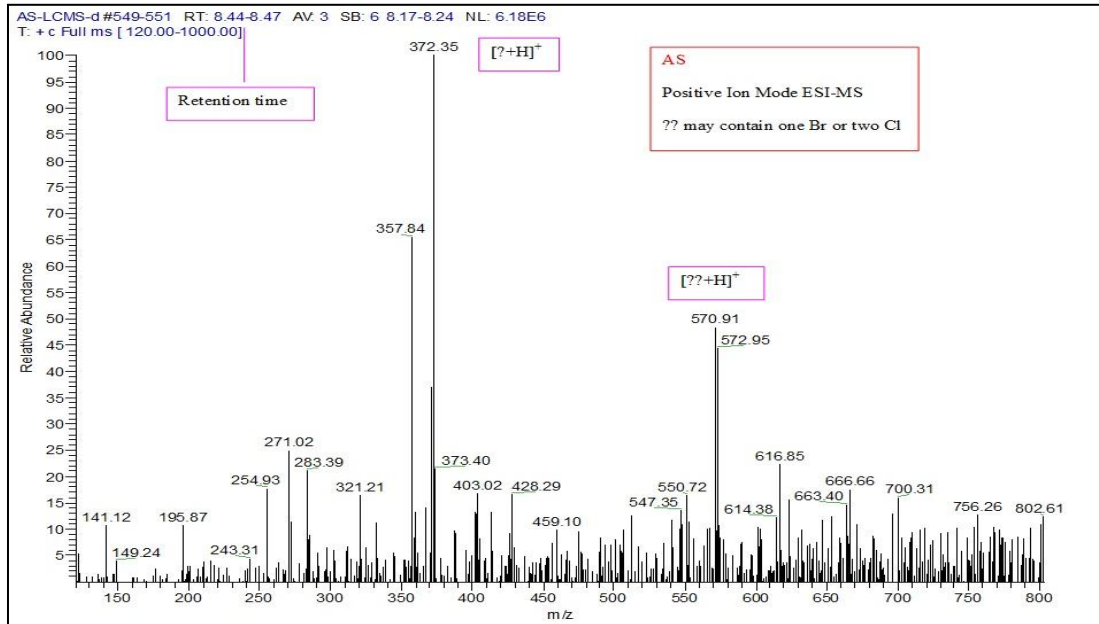


Figura 26. Espectro de masas de alta resolución para la fracción 67, primer pico con un tiempo de retención de 8.44-8.47min, aislado del crudo AMS365 CNY331.

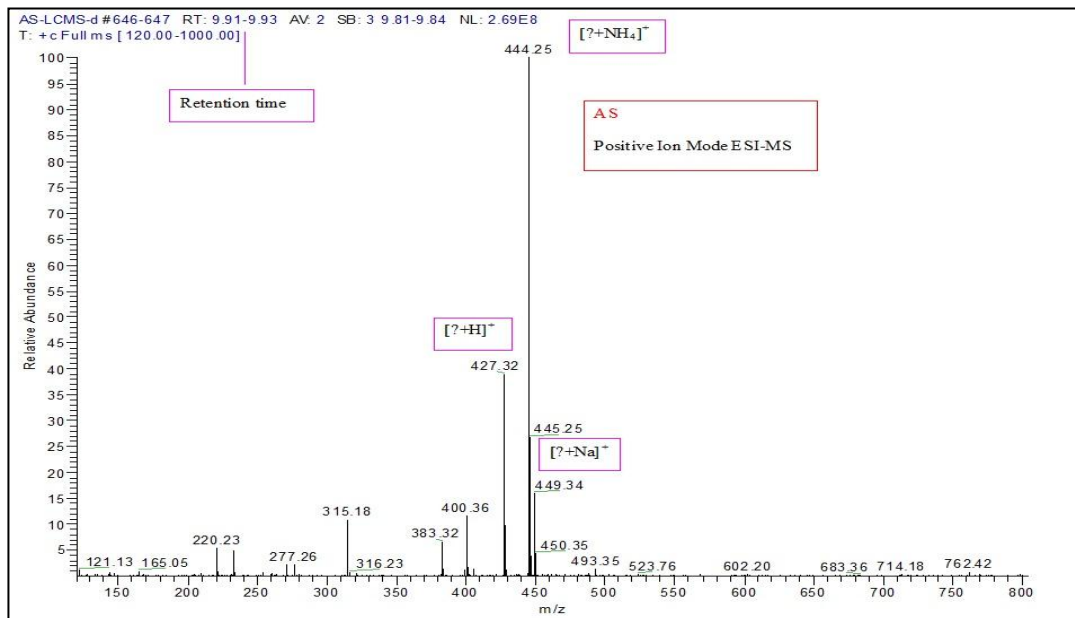


Figura 27. Espectro de masas de alta resolución para la fracción 67, segundo pico con un tiempo de retención de 9.91-9.93min, aislado del crudo AMS365 CNY331.

6.4 Resonancia Magnética Nuclear protónica de AMS165 CNY330

Los espectros de ^1H RMN de 500MHz fueron obtenidas en CDCl_3 por la afinidad a este disolvente con cada muestra. Los 2 espectros de las fracciones 1 y 1.5 son muy similares, en la figura 28 se observan señales en 0.8, 1.25, 1.55 y 2ppm características de metilos ($-\text{CH}_3$), metilenos ($-\text{CH}_2-$) y metinos ($\equiv\text{CH}$) lo que podría sugerir la presencia de una pequeña cadena hidrocarbonada. También se aprecian insaturaciones entre 4 y 5 ppm que podrían ser parte del compuesto o algunas impurezas dada su poca intensidad.

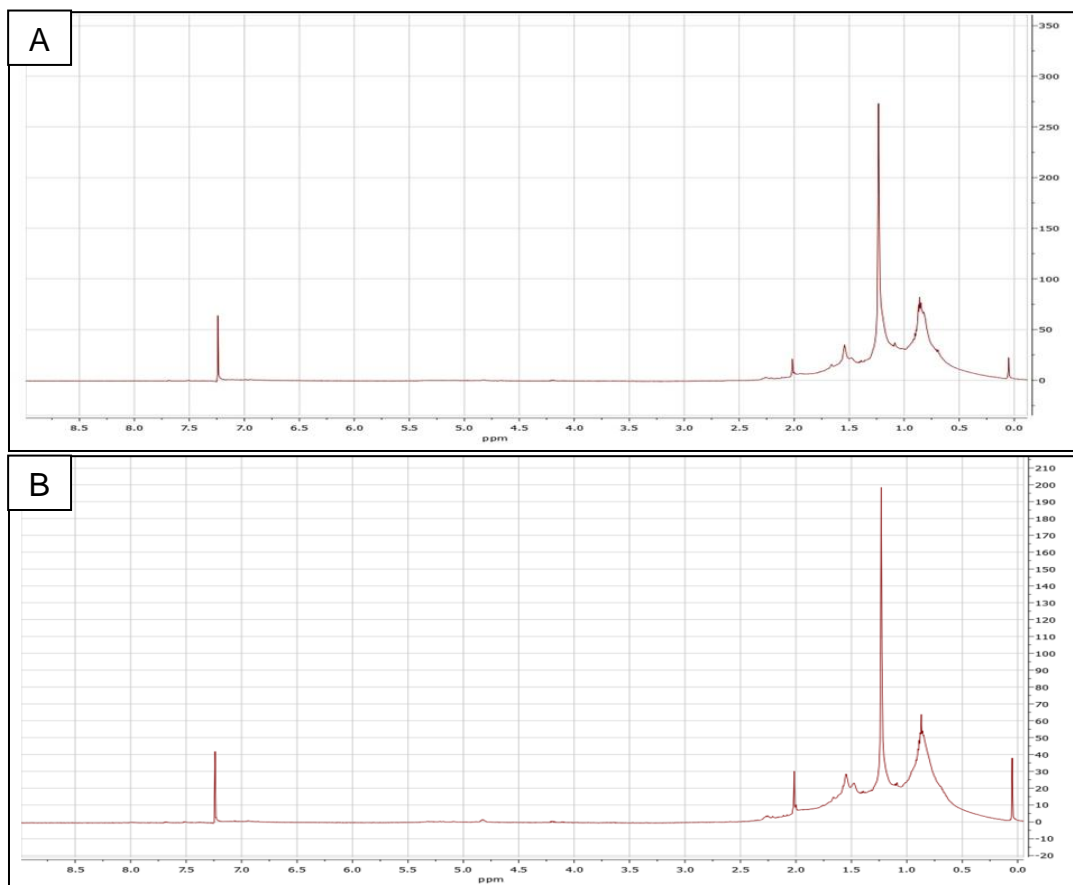


Figura 28. Espectros de ^1H RMN para 2 fracciones obtenidas con 100% de isooctano del crudo AMS165 CNY330 A) Fracción 1 y B) Fracción 1.5.

La figura 29 muestra el espectro para la fracción 2, la cual presenta varios dobles de dobles con un δ de 4.2-4.3, 5.1-5.15 5.25-5.3 y 6.25-6.3 6.35-6.4 ppm que se puede atribuir a una estructura de varios vinilos ($\text{HC}=\text{CH}$), como por ejemplo para un desplazamiento de 4.2-4.3ppm se asocia con protones de $\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}$ y en el intervalo de 5.1- 5.3ppm que se relaciona con $\text{C}=\text{CH}_2$. Así mismo, se encuentran señales simples y múltiples que pueden hacer referencia a $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}$ y $\text{CH}_3-\text{C}-\text{C}=\text{C}$ con δ de 0.8, 1.3, 1.6 y 1.7ppm.

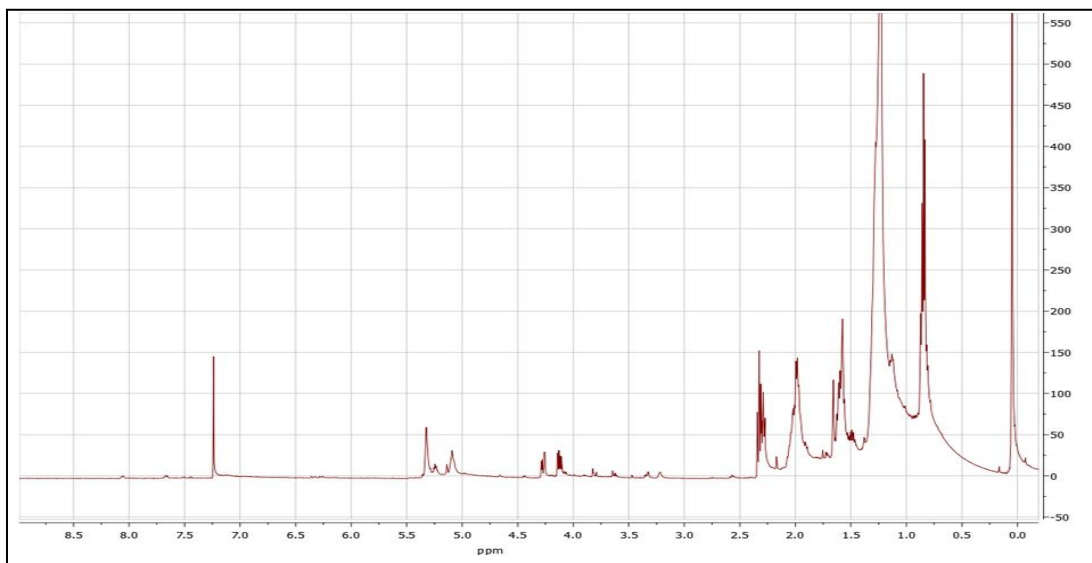


Figura 29. Espectro de ^1H RMN para la fracción 2 extraída con 90:10 de isooctano & AcOet del crudo AMS165 CNY330.

Las señales de un espectro pueden variar en el caso de la figura 30 tiende a presentar una mayor cantidad de señales simples con δ muy similar a las anteriores para el intervalo de 0.5 a 2.5ppm, estas señales son asociadas a CH_3 , $-\text{CH}_2$, $\equiv \text{CH}$ y $\text{CH}_3-\text{C}-\text{C}=\text{C}$. La cualidad que presenta este espectro es la multiplicidad en 4.1 a 4.3ppm y otra pero de menor tamaño en 5.1 a 5.2ppm que

se asocian a $C=CH_2$ ó $-C=CH$ y una simple en 5.3ppm, esto se puede interpretar como dobles enlaces ($HC=CH$).

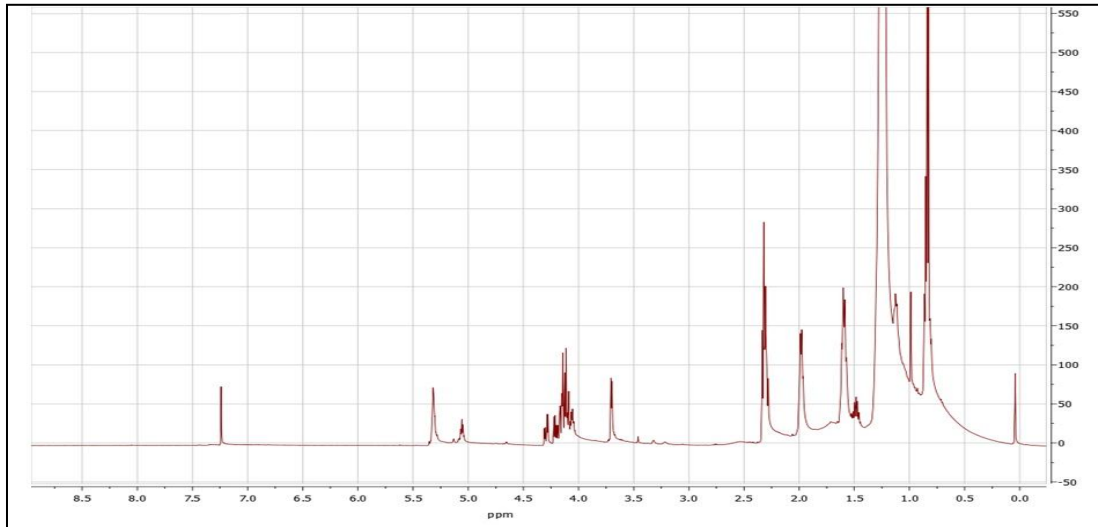


Figura 30. Espectro de 1H RMN de la fracción 3 extraída con 85:15 de isooctano y AcOet del crudo AMS165 CNY330.

En la figura 31, se observan grupos $-CH_3$, $-CH_2-$, $\equiv CH$, $CH_3-C-C=C$ en un intervalo de 0.5 a 2.5ppm, al igual que una serie de señales simples en un desplazamiento químico de 3.2, 3.3 y 3.7ppm que se pueden asociar a protones cercanos a un halógeno como bromo, cloro ó yodo, así mismo se asocian a protones de $CH_3-O-CO-R$ ó $C-CH-O-R$, un δ de 5.1-5.2ppm se puede atribuir a protones vinílicos ($HC=CH$); también se observan señales a campo bajo características de protones aromáticos en 7.3-8.1ppm.

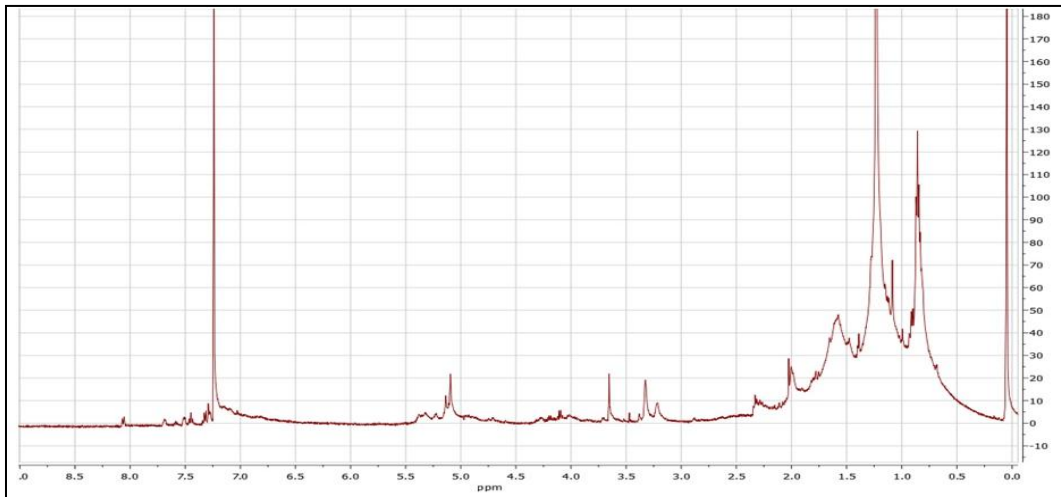


Figura 31. Espectro de ^1H RMN de la fracción 5 extraída con 70:30 de isooctano y AcOet del crudo AMS165 CNY330.

El espectro de la figura 32, la cual es la fracción 13 se observa señales con un δ característico en 0.7, 0.8, 1.3 y 2ppm que se asocian a grupos $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, $\equiv\text{CH}$, $\text{CH}_3-\text{C}-\text{C}=\text{C}$. También se puede señalar que hay evidencia de alquenos ($\text{HC}=\text{CH}$) en 4.9-5 y 5.3-5.4ppm, e igualmente compuestos aromáticos en 7.4, 7.6 y 8.1ppm. Así mismo se observan muchas perturbaciones en la resonancia lo que indica la presencia de impurezas en la fracción.

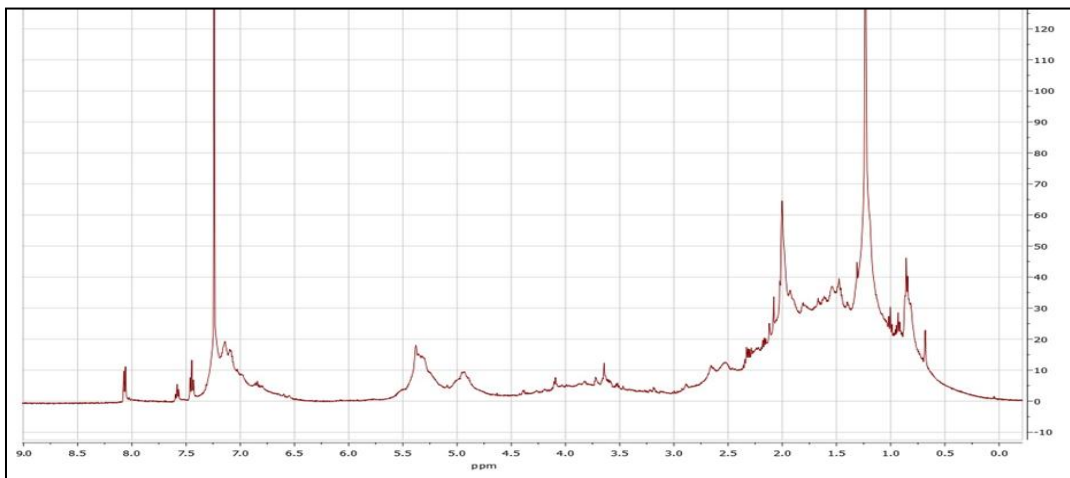


Figura 32. Espectro de ^1H RMN de la fracción 13 extraída con 85:15 de AcOet y ACN del crudo AMS165 CNY330.

En la figura 33 se observan señales simples para los δ de 0.7, 0.8, 1.25 y 2ppm que se asocian a grupos $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-$, $\equiv\text{CH}$, $\text{CH}_3-\text{C}=\text{C}$ al igual que señales múltiples en 3.55, 3.6, 3.9ppm que se relaciona a protones de $\text{C}-\text{CH}-\text{O}-\text{R}$ y 4.1, 4.25, 4.5 y 4.6ppm que se asocia con protones de $\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}$, también se relacionan con ^1H unidos a carbonos que a su vez se unen a halogenados como Cl^{-1} , Br^{-1} y I^{-1} y la segunda serie de δ corresponden a señales para dobles enlaces. Se observa la presencia de señales simples combinadas con unos tripletes a campo bajo en donde se asume la presencia de aromáticos en 7.4, 7.5, 7.6, 7.7 y 8.1ppm.

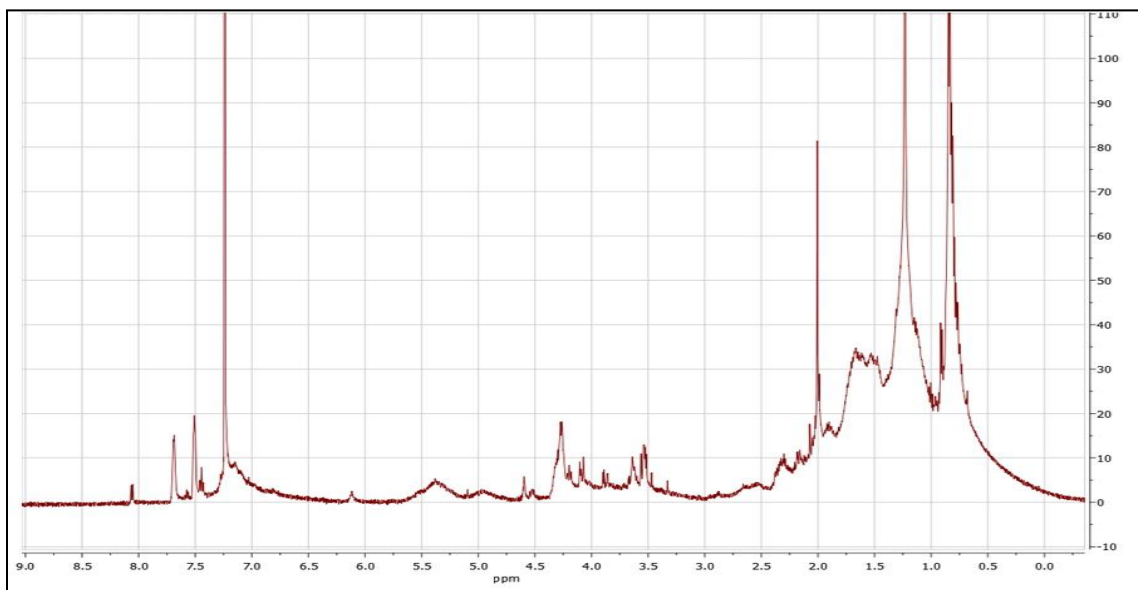


Figura 33. Espectro de ^1H RMN de la fracción 17 extraída con 25:75 de AcOet y ACN del crudo AMS165 CNY330.

En la figura 34, la fracción 21 es un sólido amorfo que se intentó cristalizar por varios métodos y no se logró que los cristales difractaran en Rayos X. Su espectro de RMN (Fig. 34) presenta señales de intensidad media de ^1H asociados

a metinos y otra señal simple muy intensa en 2.65ppm que se puede asociar a un ^1H sustituidos a carbonos halogenados.

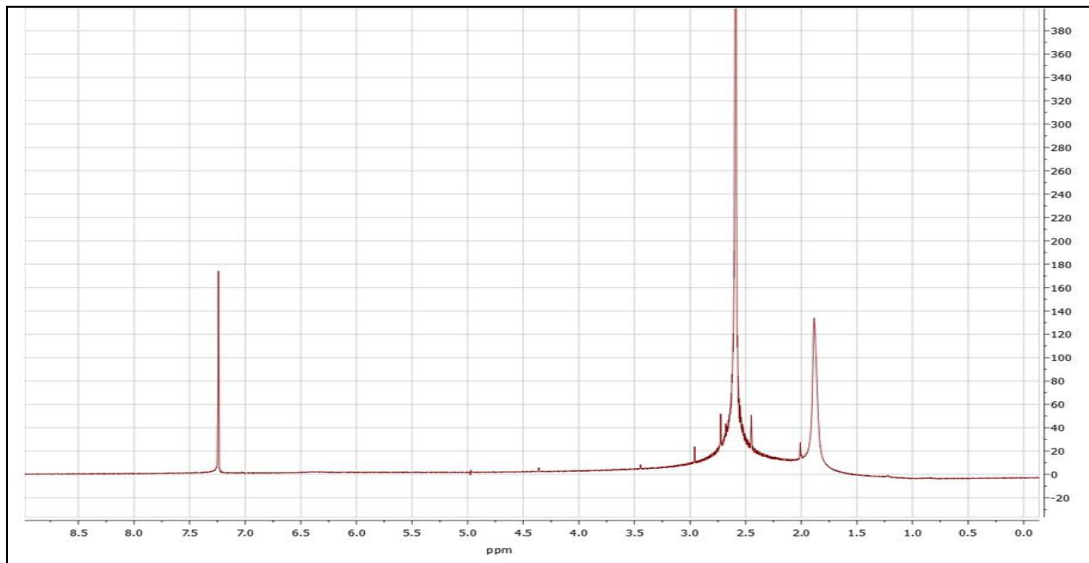


Figura 34. Espectro de ^1H RMN de la fracción 21 extraída con 100% de H_2O del crudo AMS165 CNY330.

6.5 Cromatografía líquida con espectrometría de masas de AMS165 CNY330

El espectro de masas para la fracción 3 de 85:15 de isooctano y AcOet, en él se observa una banda interesante a una longitud de onda de 254.8nm con una amplitud de ~44mAU y 20.524min de tiempo de retención (círculo azul) (Fig.35).

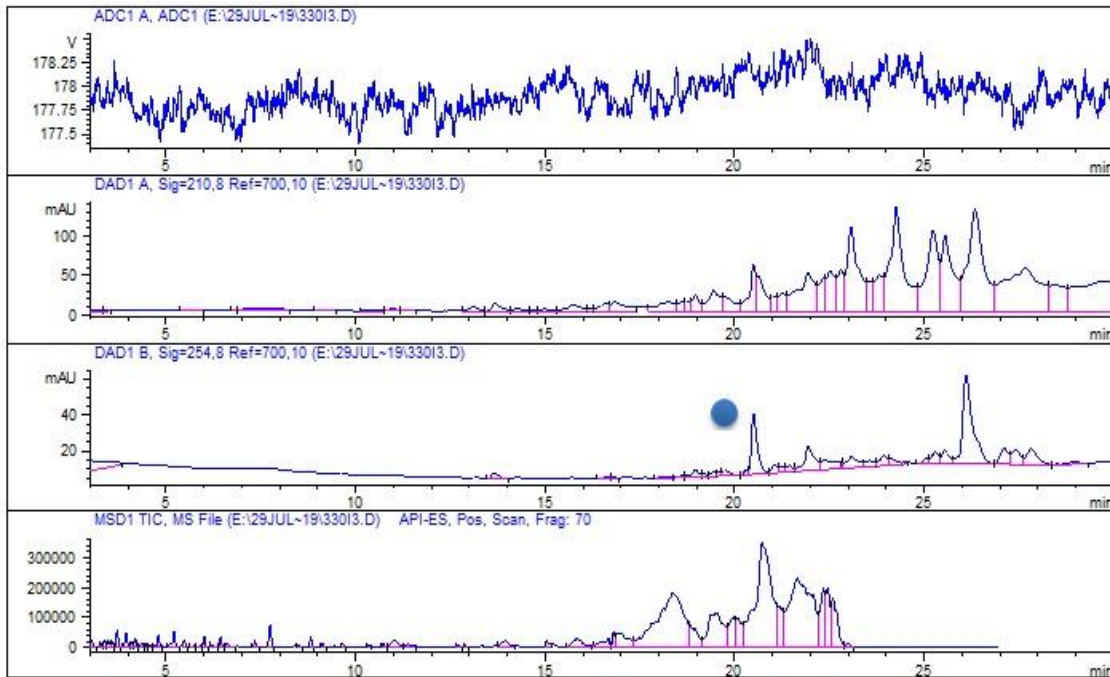


Figura 35. Cromatograma LC/MS de la fracción 3 en una longitud de onda de 254.8nm, (círculo azul) a un tiempo de retención de 20.524min, del crudo AMS165 CNY330.

La fracción 3, denotada por un círculo azul (Fig.36), presenta una similitud con el compuesto gamma-rubromycin (línea roja) ya que presenta un tiempo de retención de referencia de 20.337-20.711min, mientras que la fracción 3 posee un tiempo de retención de 20.524min y una amplitud de 68.1mAU (línea azul).

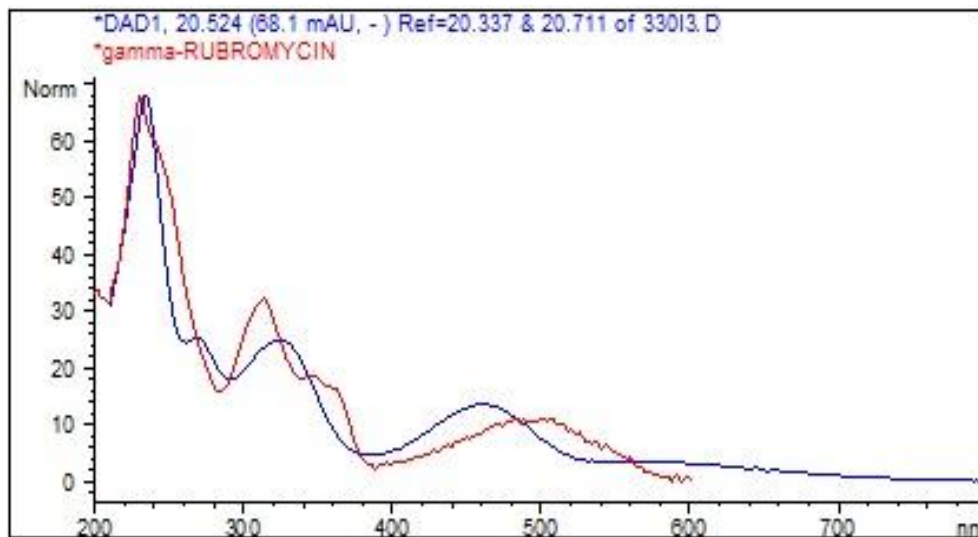


Figura 36. Espectros de Ultravioleta de compuestos obtenidos del LC/MS de la fracción 3, pico marcado con un círculo azul en la figura 35 con longitud de 254.8nm con un tiempo de retención de 20.524min (línea azul fracción 3, línea roja gama-rubromycin), del crudo AMS165 CNY330.

En la figura 37 se observa un pico padre a m/e 285.9 el cual podría ser el peso molecular de la fracción 3. Se observa la pérdida de 45 unidades que se asocia a C_2H_4OH ó C_2H_5 , y otra pérdida de 71 unidades que se relacionan a iones de C_5H_{11} . También se observa un pico mediano en 427.6 y la relación de pérdidas de fragmentos muestran que 69 unidades las cuales hacen referencia a C_5H_9 ó CF_3 y 70 m/e se asocian a C_5H_{10} .

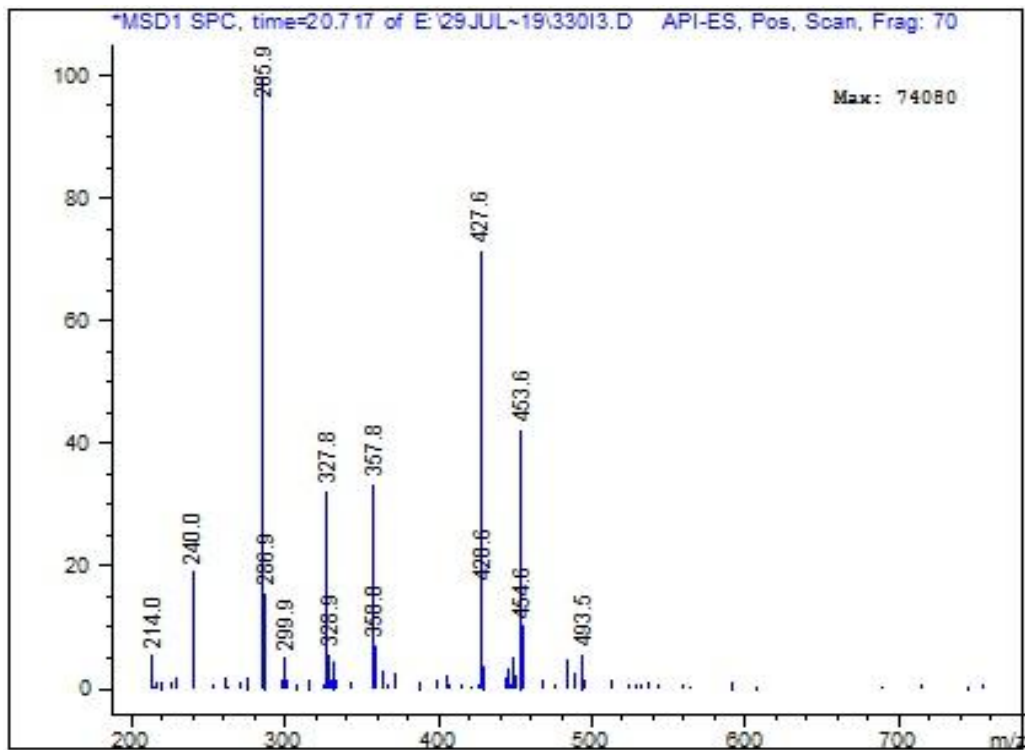


Figura 37. Espectro de masas de la fracción 3, del compuesto de la figura 36, con un tiempo de retención de 20.717 y PM de 285.9, del crudo AMS165 CNY330.

El espectro se obtuvo a dos longitudes de onda a 210.8 y 254.8nm en donde para la fracción 6 de 50:50 de isooctano y AcOet, se observa una banda interesante en ambas longitudes de onda. La absorción a 254.8nm se presentó una amplitud de 828mAU y 13.262min de tiempo de retención (círculo azul) (Fig.38).

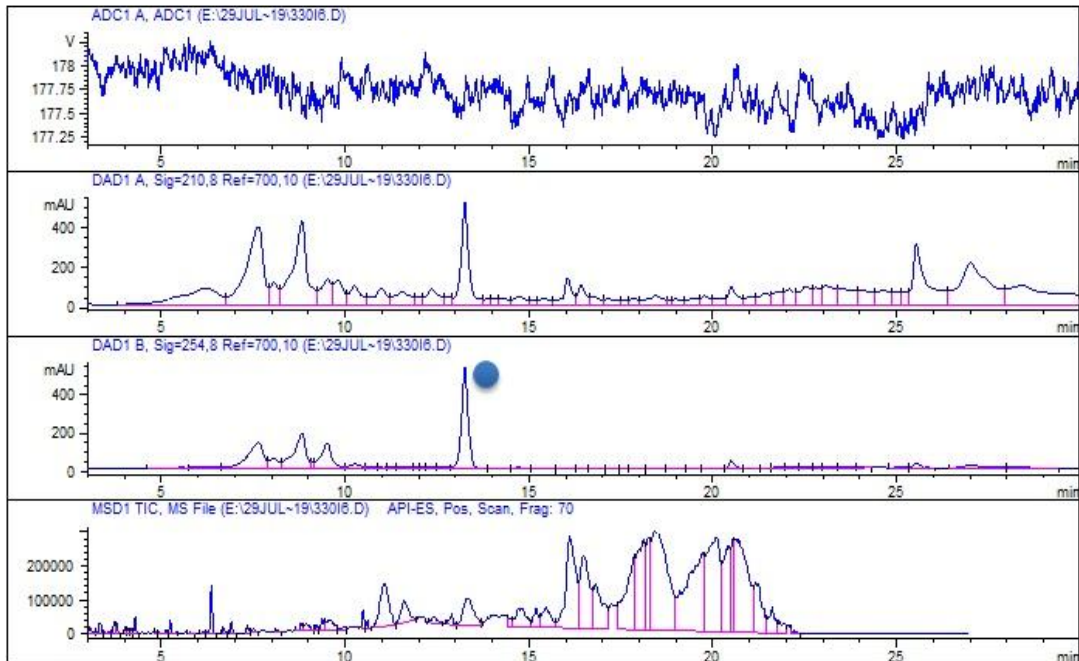


Figura 38. Cromatograma de LC/MS de la fracción 6 a una longitud de onda de 254.8nm, pico interesante (círculo azul) a un tiempo de retención de 13.262min, del crudo AMS165 CNY330.

La fracción 6 (Círculo azul), presenta una similitud con el compuesto Setomycin (línea roja). Ambos tiempos de retención son semejantes, el de referencia para el caso de Setomycin es de 12.849-13.595min y para la fracción 6 (línea azul) es de 13.262min y una amplitud de 828mAU (Fig.39).

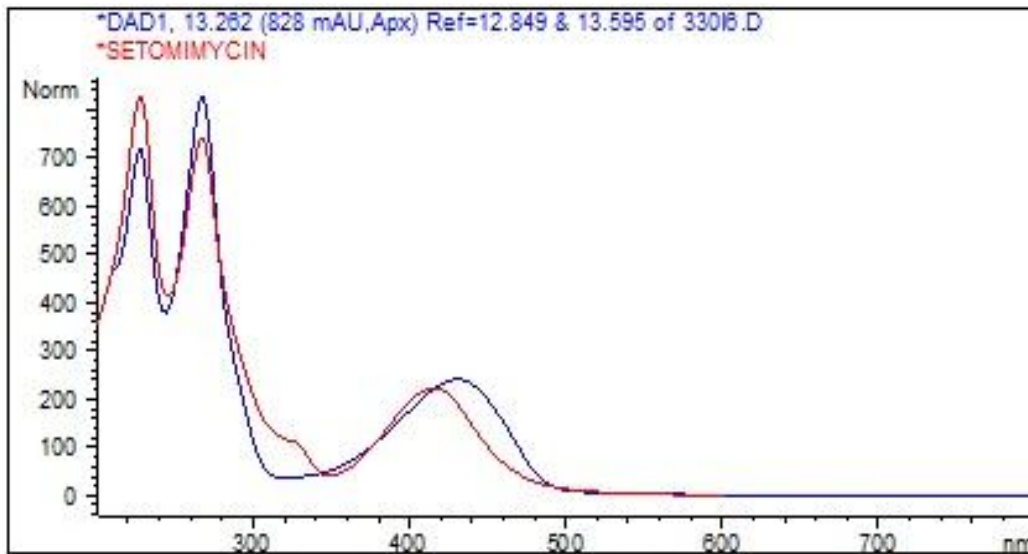


Figura 39. Espectros de Ultravioleta de compuestos obtenidos del LC/MS de la fracción 6, pico marcado con un círculo azul con longitud de 254.8nm con un tiempo de retención de 13.262min (línea azul nuestra muestra, línea roja Setomimycin), del crudo AMS165 CNY330.

En la figura 40, se observan una serie de bandas características de iones moleculares y podría tratarse de una mezcla de compuestos a m/e 729, 558.3 y 351. Ya que el pico padre encontrado de 729, su fragmentación no hay presenta iones, a diferencia del pico que se encuentra en 351.8 en donde su pérdida es de 48 unidades que se asocian a grupos de CH_3SH , SO ó O_3 .

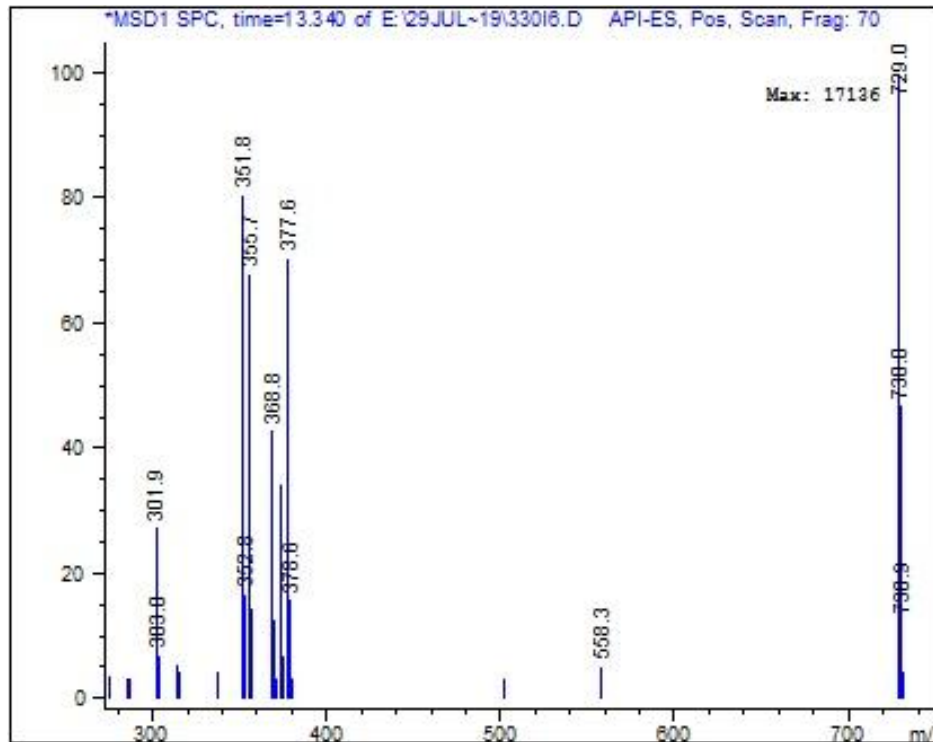


Figura 40. Espectro de masas de la fracción 6, del compuesto de la figura 39, con un tiempo de retención 13.340 y un PM de 729, del crudo AMS165 CNY330.

6.6 Bioensayo anticancerígeno para AMS165 CNY330

Para el presente trabajo se seleccionaron las fracciones más abundantes para realizar el bioensayo con células de cáncer de pulmón H460. De las 20 fracciones sometidas 15 resultaron bioactivas contra estas células. La consideración que se hizo fue que aquellas muestras que presentaran una sobrevivencias de células cancerosas menor al 50 % eran positivas, claro está que entre más bajo sea este valor, el compuesto tendrá una mayor bioactividad (Tabla II). En esta tabla se observa que la fracción 1 presentó una bioactividad moderada a diferencia de la fracción 1.5 que presentó una actividad intensa, con un 14.76% de sobrevivencia de estas células, para el caso de la fracción 2 y 3, estas

presentaron una bioactividad con 15% y 12% respectivamente. Así mismo, las fracciones 5 y 13 presentaron bioactividad de 12 y 26 %.

Tabla II. Bioactividad de 20 fracciones del crudo AMS165 CNY330 contra células de cáncer de pulmón H460.

Pulmón H460				
Blanco	1.305	1.466	1.173	1.3147
DMSO	0.229	0.278	1.2278	0.5783
Muestra	Absorbancia 495nm		%Sobrevivencia	
1	0.954	0.954	72.6027	
1.5	0.194		14.764	
2	0.205		15.6012	
3	0.165		12.557	
4	0.209		15.9056	
5	0.16		12.1765	
6	0.317		24.1248	
7	0.257		19.5586	
8	0.274		20.8523	
9	0.242		18.417	
10	0.92		0.92	70.0152
11	0.278		21.1567	
12	0.55		41.8569	
13	0.345		26.2557	
14	0.264		20.0913	
15	0.435		33.105	
16	1.103	1.103	83.9421	
17	0.221		16.8188	
18	1.517		115.449	
21	0.795		0.795	60.5022

*Color rosa sombreado son fracciones que presentan bioactividad considerable, en donde la sobrevivencia es menor al 50%.

7.0 DISCUSIÓN GENERAL

Las Actinobacterias marinas son una fuente prolifera de nuevos metabolitos secundarios, generando un gran interés por sus propiedades anticancerígenas, antivirales, antibacterianas, antibióticos, antifúngicos (Fenical & Jensen, 2006); (Olano, et al., 2009).

7.1 AMS365 CNY331

La cepa AMS365 CNY331 se separó mediante dos procesos (Fig. 10 y 11) utilizando diferentes tiempos y variando la cantidad de crudo. En el primer proceso se obtuvieron fracciones importantes como la 58, 64 y 67 de donde se obtuvieron los LC/MS, encontrando similitudes con compuestos ya reportados. La fracción 58 se relaciona con el compuesto Mareineosin A y con Dihydroxybenzoylserin-trimer, para la fracción 64 se asocia con un compuesto no descrito formalmente que es CNQ617.409A y con el FLOCCOSIN, al igual que con la fracción 67 ya que presentan los mismos compuestos. De dichas fracciones se realizó una segunda separación en CC y se obtuvo la fracción 19' la cual se presentó en forma de cristales, por las características presentadas en los espectros de IR y RMN se puede concluir la presencia de alcanos, alquenos, aromáticos y alcoholes, pero no se puede obtener una estructura molecular definida por el momento pues la cantidad de muestra es de solamente 0.2 mg. Para el caso de la segunda separación (fig.11), se obtuvieron varias fracciones interesantes 4'', 8'', 11'' y 17'', de la fracción 4'' solo se obtuvo su ¹HRMN pero señales bastante interesantes; la fracción 8'' presenta la peculiaridad de ser igual que la fracción 19' (de igual polaridad y relación frontal (Rf) en TLC) ambas forman cristales. La fracción 11'' se

separó en 3 disolventes diferentes DMSO, MeOH y DCM, en donde su $^1\text{HRMN}$ resultó bastante interesante. La fracción 17” es una molécula pequeña (cadena carbonada). Se obtuvieron varias fracciones de ambas separaciones, pero se descubrió que los compuestos se degradan con MeOH y son sensibles a la luz, y los compuestos encontrados se pierden durante el transcurso de las separaciones.

7.2 AMS165 CNY330

Cuando se obtuvo el extracto crudo de esta cepa, ya se tenía contemplado que los compuestos se degradan con MeOH y que son fotosensibles. A partir de este extracto se extrajeron varias fracciones en donde las más destacadas fueron 1, 1.5, 2, 3, 5, 13, 17 y 21 ya que en sus $^1\text{HRMN}$ se observaron señales muy interesantes. Las fracciones 1 y 1.5 resultaron ser similares, sin embargo, sólo la fracción 1.5 presentó bioactividad. Los análisis de LC/MS permitieron relacionar a la fracción 3 con el compuesto Gamma-Rubromycin descrito previamente. Así mismo los análisis de RMN permitieron observar similitudes existentes entre las fracciones 5 y 6, la cual se asocia con el compuesto Setomycin. Se realizó un bioensayo con el fin de evaluar de manera preliminar la actividad que los compuestos presentan contra células cancerígenas de pulmón H460. Se probaron 20 fracciones y se encontró bioactividad en 15 ellas. Aunque se tomó en consideración que los compuestos se degradan con MeOH y son fotosensibles aun así en la purificación de la fracción el compuesto desaparece.

8.0 CONCLUSIONES

1. Las cepas AMS365 CNY331 y AMS165 CNY330 presentan procesos de separación muy complejos debido a su inestabilidad ante disolventes como metanol y la luz.
2. Por el momento se han encontrado similitudes en compuestos químicos ya establecidos por medio de las ¹HRMN, LC/MS y otros que al parecer pueden ser nuevos.
3. La cepa AMS165 CNY330 presenta una alta bioactividad contra células cancerígenas de pulmón H460.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Anaya-Lang, A. L., 2003. *Ecología Química*. México D.F.: Plaza y Valdez.
- Becerril-Espinosa, A., 2011. *Actinobacterias aisladas del sedimento marino del golfo de California y de Bahía Todos Santos: Diversidad, bioactividad y Dominios cetosintetasa*. Ensenada, Baja California: FCM, IIO.
- Bérdy, J., 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*, Volumen 58, pp. 1-26.
- De Carvalho, C. & Fernandes, P., 2010. Production of Metabolites as Bacterial Responses to the Marine Environment. *Marine Drugs*, Volumen 8, pp. 705-727.
- Fenical, W., 1993. Chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a New Resource. *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.
- Fenical, W. y otros, 2009. Discovery and Development of the Anticancer Agent Salinosporamide A. *Bioorg. Med. Chem.*, 17(6).
- Freel, K. C., Edlund, A. & Jensen, P. R., 2012. Microdiversity and evidence for high dispersal rates in the marine actinomycete 'Salinispora pacifica'. *Environmental Microbiology*, 14(2), pp. 480-493.
- Freel, K. C., Nam, S.-J., Fenical, W. & Jensen, P. R., 2011. Evolution of Secondary Metabolite Genes in Three Closely Related Marine Actinomycete Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), pp. 7261-7270.
- Gordaliza, M., 2008. *Los compuestos naturales en el descubrimiento de fármacos*, España: Instituto de Estudios de la Ciencia y la Tecnología.
- Jensen, P., Dwight, R. & Fenical, W., 1991. Distribution of actinomycetes in nearshore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, Volumen 8, pp. 1881-1888.
- Jensen, P. R., 2010. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic. *Microbiol Biotech*, Volumen 37, pp. 219-224.
- Jensen, P. R. y otros, 2007. Species-Specific Secondary Metabolite Production in Marine Actinomycetes of the Genus Salinispora. *Appl Environ Microbiol*, 73(4), pp. 1146-1152.
- Lizarazo Niño, E. & Aristizábal Quintero, D., 2001. Biodiversidad de la llanura inundable de Arauca. En: Santa Bárbara de Arauca: Pronatta, p. 20.
- Logan, N., 1994. Bacterial systematic. *Blackwell scientific publications*, p. 272.

- Macleod, R. A. & Onefrey, E., 1951. NUTRITION AND METABOLISM OF MARINE BACTERIA. *The Fisheries Research Board of Canada*, 21 Octubre, Volumen 71, pp. 661-667.
- Maldonado, L. A. y otros, 2005. *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*, Volumen 55, pp. 1759-1766.
- Mayer, A. M. S. & Lehmann, V. K. B., 2000. Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiportozoal and antiviral activities. *Marine Pharmacologist*, Volumen 42, pp. 62-69.
- Okazaki, T., Kitahara, T. & Yoshiro, O., 1975. A NEW ANTIBIOTIC SS-228 Y PRODUCED BY *Chainia* ISOLATED FROM SHALLOW SEA MUD. *The journal of antibiotics*, 28(3), pp. 176-184.
- Olano, C., Mendez, C. & Salas, J., 2009. Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Mar Drugs*, Volumen 7, pp. 210-248.
- Peláez, F. & Genilloud, O., 2009. *Nuevos fármacos basados en productos naturales de origen microbiano*, España: Centro de Investigación Básica Merck, Sharp & Dohme de España, S.A..
- Pucci, G. N. y otros, 2009. Identificación de bacterias marinas cultivables de la ciudad costera Comodoro Rivadavia, Argentina. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, abril, 44(1), pp. 49-48.
- Romero Cabello, R., 2007. *Microbiología y Parasitología Humana*. 3era Edición ed. España: Panamericana.
- Skoog, West, Holler & Crouch, 2005. *Fundamentos de Química analítica*. México, DF: Thomson.
- Soria-Mercado, I. E., 2004. *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 .
- Valencia-Ortiz, C., 1995. *Fundamentos de Fitoquímica*. México: Trillas.
- Walton & Reyes, 2005. *Análisis químico e instrumental moderno*. Barcelona, España: REVERTÉ.