



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA

“Extracción y caracterización de compuestos indólicos con actividad bactericida y antifúngica a partir de *Bacillus velezensis*”

MARZO, 2020

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICOFARMACOBIOLOGO**

PRESENTA:

Yharely Herrera Nuñez

Director de Tesis:

D.C. Estibaliz Sansinenea Royano

Asesor de Tesis:

D.C. Carmen María González Álvarez

Índice

1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Metabolismo secundario: fuente de productos antibactericidas y antifúngicos	3
2.2 Metabolitos secundarios de <i>Bacillus</i> spp.	4
2.3 Compuestos indólicos.....	6
3. OBJETIVOS	9
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	10
5. PARTE EXPERIMENTAL	¡Error! Marcador no definido.
6. CONCLUSIONES	47
7. REFERENCIAS	48

1. Introducción

La exploración de productos naturales a partir de microorganismos es una nueva frontera que está emergiendo de la unión de la biología y la química. El suelo es uno de los hábitats menos comprensivos de la tierra, ya que los humanos lo tratan como algo sucio o contaminado, sin embargo, éste es el hábitat más útil de la tierra, ya que en él se cultivan plantas, se desarrolla la minería (ya que se encuentran minerales de utilidad), la construcción de casas y edificios; algo más importante es el descubrimiento de productos químicos medicinales.

La química heterocíclica es una rama de la química orgánica muy valiosa, su aplicación se pueden encontrar nuevos compuestos con diversas actividades que podrían combatir algunos de los problemas en la actualidad. En el gran mundo de la química heterocíclica, el núcleo de indol es probablemente el anillo más importante para el desarrollo farmacéutico y ha sido considerado una estructura “privilegiada”.

Las especies del género *Bacillus* secretan muchos metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos y antifúngicos. La gran diversidad y la variabilidad genética de las especies de *Bacillus*, hace que este microorganismo genere una gran cantidad de metabolitos de diferente estructura química con variadas aplicaciones en el ambiente, la agricultura y la biotecnología industrial. Existen varios reportes de compuestos indólicos producidos por diferentes especies de *Bacillus* sp.

En trabajos previos del laboratorio se obtuvo un extracto con la matriz Amberlita XAD16N® de una cepa de *Bacillus velezensis* cuya actividad bactericida fue evaluada contra varias bacterias grampositivas y gramnegativas. El objetivo de este proyecto es extraer los metabolitos secundarios de la cepa de *Bacillus velezensis*; se realizará una separación cromatográfica en columna de gel de sílice con diferentes sistemas como eluyentes. De aquellas fracciones interesantes, se purificarán e identificarán diferentes compuestos orgánicos. Entre todos los compuestos se pretende extraer, purificar e identificar compuestos indólicos.

2. Antecedentes

2.1 Metabolismo secundario: fuente de productos bactericidas y antifúngicos

Los tejidos de plantas y animales y también de microorganismos siempre contienen varias clases de compuestos con estructuras diferentes. Cada clase contiene varios o muchos compuestos cercanamente relacionados en su estructura. La química de productos naturales comienza de la separación y aislamiento de un compuesto simple puro de muchos ingredientes similarmente relacionados. Los compuestos esenciales para los organismos vivos se llaman metabolitos primarios. Los demás compuestos presentes en un estrecho rango de especies se llaman metabolitos secundarios. El blanco de la química de productos naturales es generalmente los metabolitos secundarios.¹

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen una participación directa en el crecimiento o reproducción de este y se producen en la fase estacionaria de crecimiento. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia.

Los metabolitos secundarios mejor conocidos son los antibióticos, se producen en la fase estacionaria. Para que se produzca el metabolito secundario, primero hay que asegurar unas condiciones óptimas durante la fase exponencial. Como mecanismo de defensa, la producción de metabolitos secundarios no se produce inmediatamente después de la conclusión de la fase exponencial. Primero, al comienzo de la fase estacionaria, deben hacerse resistentes a sus propios antibióticos. Se sabe que el paso de fase exponencial a fase estacionaria se produce cuando algún nutriente del medio es limitante. Suele tratarse de C, N o P. Al faltar algunos de estos factores, se altera la producción de metabolitos primarios y se originan inductores de enzimas que darán lugar a metabolitos secundarios.

Por muchos años, el metabolismo secundario fue ignorado; el estudio de este tipo de metabolismo no esencial se dejó para los científicos de las industrias y los químicos académicos. Hoy en día la situación es diferente. La amplia variabilidad estructural de estos compuestos ha atraído la curiosidad de químicos y las actividades biológicas que poseen estos productos naturales han inspirado a la industria farmacéutica para buscar nuevas estructuras en cultivos microbianos, así como en plantas. Muchos de los productos microbianos que tienen un gran valor comercial y económico son metabolitos secundarios. La exploración de la diversidad microbiana y la cantidad de metabolitos secundarios producidos por bacterias ha llevado a considerarlos como una fuente importante de productos naturales con propiedades biológicas como antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, hipocolesterolémicos, inmunosupresores, antiparasitarios, herbicidas e insecticidas, entre otros. Los metabolitos secundarios son definidos como sustancias de bajo peso molecular, que no se producen en la vía metabólica primaria y que no juegan un papel fundamental en las funciones primarias o de crecimiento.²

2.2 Metabolitos secundarios de *Bacillus* spp.

Bacillus spp. secreta muchos metabolitos secundarios, incluyendo antibióticos, antifúngicos y sideróforos.³ Las especies de *Bacillus* son capaces de producir un amplio rango de metabolitos secundarios de naturaleza y estructura muy diferente mostrando un amplio espectro de actividades (figura 1). Estos metabolitos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, promotores de crecimiento y otros compuestos bioactivos y están diseñados para capacitar a la bacteria para sobrevivir en su ambiente natural.⁴ En general estos metabolitos sirven como: armas competitivas usadas contra otras bacterias, hongos, amebas, plantas e insectos, agentes transportadores de metales, efectores de simbiosis, hormonas sexuales y factores de diferenciación.⁵

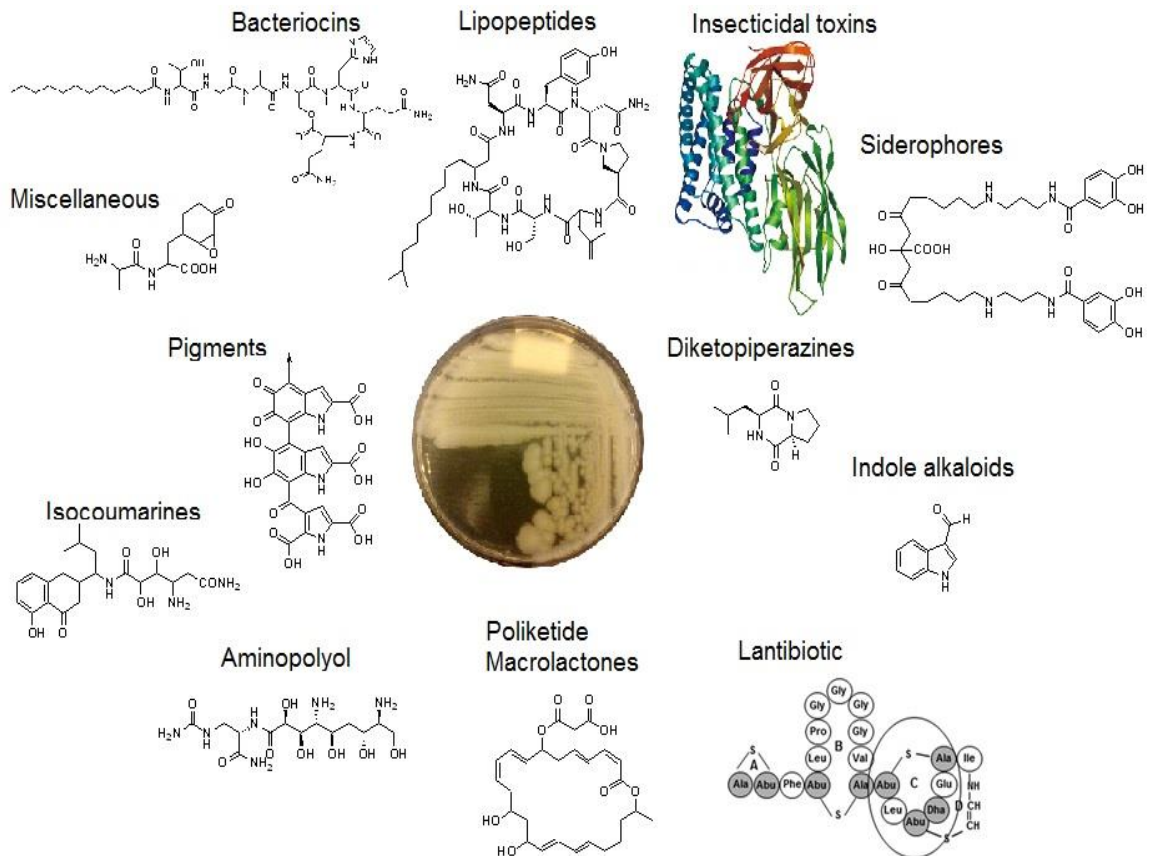


Figura 1: Estructuras de los compuestos encontrados en *Bacillus* spp.

Bacillus velezensis es una bacteria aeróbica, formadora de esporas que promueve el crecimiento vegetal. Numerosas cepas de esta especie han sido reportadas como inhibitorias contra el crecimiento de patógenos, incluyendo bacterias, hongos y nemátodos⁶. El análisis genómico de esta bacteria indica que posee clusters de genes especie específicos relacionados con la biosíntesis de metabolitos secundarios; específicamente para sintetizar lipopéptidos (por ejemplo, surfactina, bacillomycina D, fengicina y bacillibactin) y policétidos (por ejemplo, la macrolactina y la difficina)⁷.

2.3 Compuestos indólicos

Los compuestos con anillos heterocíclicos están presentes en los procesos más básicos de la vida. El indol es un compuesto incoloro cristalino con un olor de tipo naftaleno que está presente en una gran cantidad de compuestos importantes con importancia médica. El indol es además un precursor del triptófano, un aminoácido esencial el cual sirve como precursor biosintético para una amplia variedad de productos naturales que contienen el grupo triptamina indol y el grupo 2,3-dihidroindol⁸.

El triptófano puede ser degradado a triptamina⁹, el cual es la base para algunos anillos condensados de tipo alcaloides, vía una descarboxilación del L-triptófano utilizando la enzima aromática L-aminoácido descarboxilasa (AAADC)¹⁰. Sin embargo, la descarboxilación del triptófano es un evento raro entre las bacterias¹¹.

La triptamina es un alcaloide monoamina que se encuentra en plantas, hongos y animales. Contiene en su estructura un anillo indólico; está relacionada químicamente con el aminoácido triptófano, del cual deriva su nombre. La triptamina se encuentra como traza en el sistema nervioso de mamíferos y se cree que juega algún papel como neuromodulador o neurotransmisor¹². La triptamina es también el esqueleto de un grupo de compuestos conocidos colectivamente como triptaminas, muchos de ellos son biológicamente activos, incluyendo neurotransmisores y drogas psicodélicas. Los componentes mejor conocidos de esta familia son la serotonina, un neurotransmisor importante, y la melatonina, una hormona implicada en la regulación de las funciones fisiológicas diarias. Las triptaminas alcaloides naturales se usan normalmente por sus propiedades psicotrópicas. Por ejemplo, la psilocibina (extraída del "hongo mágico" *Psilocibes cubensis*) y la DMT (a partir de numerosas plantas, como la chacruna, utilizada en bebidas como la ayahuasca). Hay muchos compuestos sintéticos, como el sumatriptán usado como medicación contra la migraña¹³.

Las fenetilaminas son un grupo de sustancias aminas (que poseen nitrógeno) de las que derivan sustancias alucinógenas como el 1-(4-bromo-2,5-dimetoxifenilo)-2-aminopropano y que son agonistas selectivos de los receptores 5-HT_{2A/2C}¹⁴. Las estructuras químicas de los alucinógenos se pueden clasificar en dos grandes categorías: las triptaminas y las fenetilaminas. El prototipo de las fenetilaminas es la mescalina, compuesto natural y componente activo principal en el cactus peyote *Lophophora williamsii*¹⁵. Del grupo de las fenetilaminas, nace el grupo de las feniletilaminas (que también son sustancias endógenas) que dan origen, por síntesis, a compuestos reconocidos por sus efectos alucinógenos¹⁶. Dentro de este último grupo se encuentran:

- Mescalina
- Dimetoxianfetamina (DOM)
- Tenamfetamina (MDA) y
- Metilendioximetanfetamina o "éxtasis".

Estos compuestos tienen afinidad relativamente alta por los receptores 5-HT₂ de la serotonina y poseen efectos estimulantes lo mismo que psicodélicos.

El motivo de triptamida tiazol o tiazolina es clásico de los compuestos bacillamidas¹⁷ (Figura 2). Estos compuestos tienen múltiples actividades biológicas, por ejemplo, la bacillamida A y sus derivados poseen una actividad algicida sustancial contra un amplio rango de algas dinoflageladas¹⁸. Es interesante notar que las bacillamidas A-E contienen un bloque común de triptamina en sus estructuras mientras que en la neobacillamida A la porción de amina es reemplazada por el grupo de fenetilamina¹⁹. El rendimiento de las bacillamidas aisladas es muy bajo a pesar incluso de que la biosíntesis de la bacillamida C fuera optimizada¹⁷. Por lo tanto, investigar los bloques de construcción o los intermediarios de las bacillamidas²⁰ es esencial para su producción en masa e incluso para su síntesis orgánica²¹.

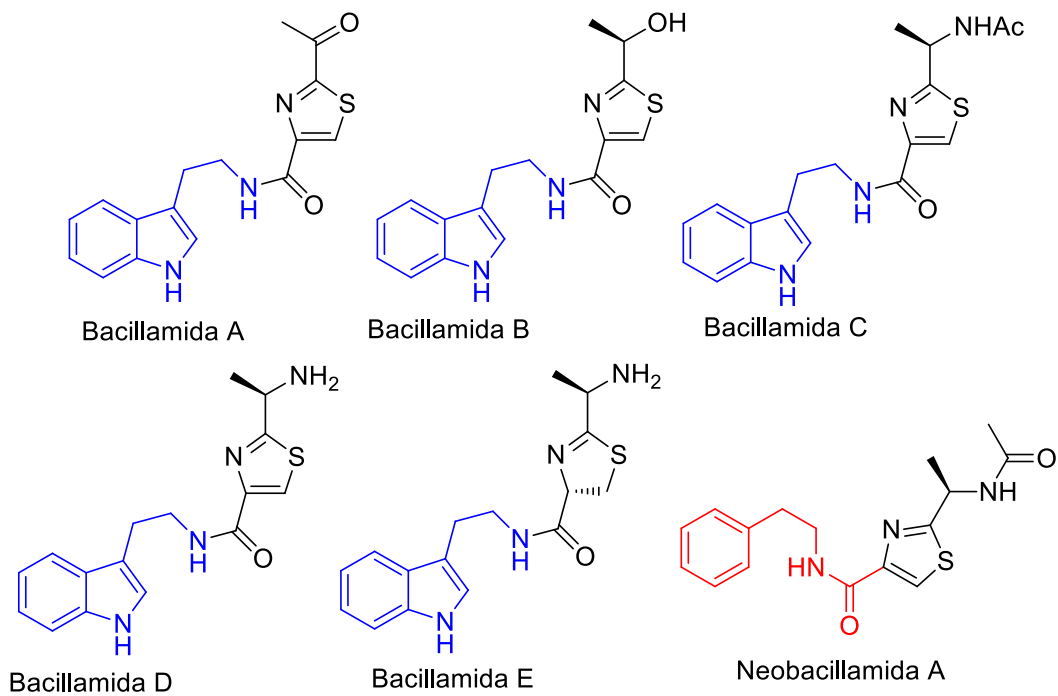


Figura 2. Estructuras de las bacillamidas conteniendo los grupos de triptamina (azul) y fenetilamina (rojo).

3. Objetivos

Objetivo general

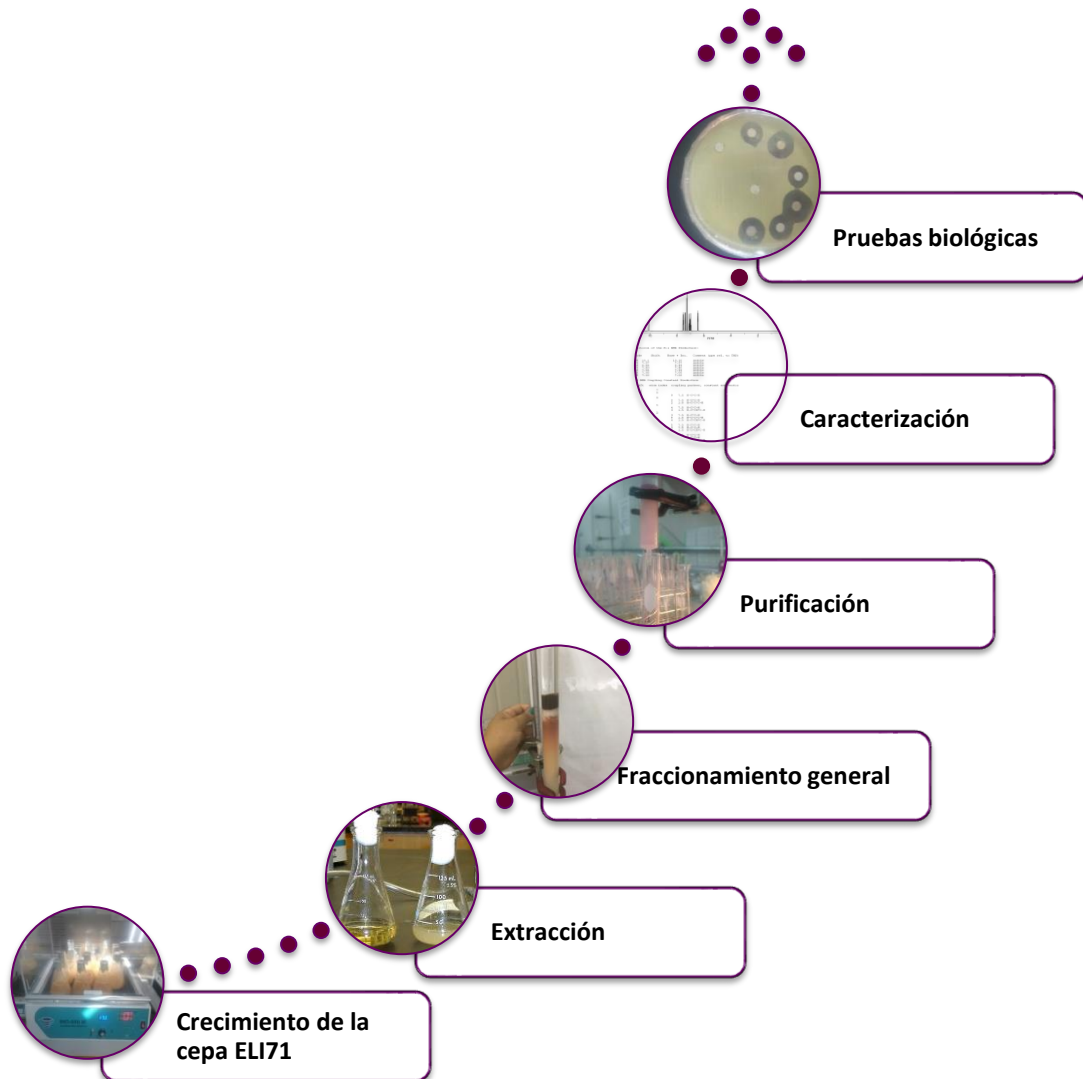
Se realizará la extracción, purificación e identificación de compuestos indólicos de un extracto crudo de *B. velezensis*.

Objetivos específicos

- Se obtendrá un extracto crudo de un medio de cultivo inoculado con *B. velezensis* cepa ELI71.
- Del extracto crudo se procederá a separar y purificar metabolitos secundarios mediante cromatografías en columna de gel de sílice y cromatografías en placa fina.
- Se identificarán y elucidarán estructuralmente los compuestos separados con técnicas espectroscópicas.
- Se realizarán pruebas biológicas de inhibición a otras bacterias y hongos con los compuestos obtenidos

4. Discusión de resultados

Para lograr los objetivos planteados se siguió una metodología de trabajo la cual se muestra a continuación en el esquema:



Esquema general de trabajo.

Crecimiento de la cepa ELI71

Para la elaboración de este estudio en primer lugar se hizo un cultivo en placa de la cepa de interés ELI71 la cual fue identificada como *Bacillus velezensis*. El cultivo de esta cepa se realizó en medio LB (Luria Bertani) bajo las siguientes condiciones: 29 °C durante 24 horas. En la Figura 3 se observa una placa de cultivo con colonias grandes, cerosas, color crema y de bordes irregulares, características de *B. velezensis*.



Figura 3: Cultivo de *B. velezensis* en placa.

Extracción

Para la extracción de los metabolitos secundarios se utilizó una resina conocida como Amberlita XAD-16® (Figura 4). Se pesaron 0.5 g de Amberlita por cada 100 ml de caldo de cultivo LB. La resina fue lavada con 50 ml de agua destilada y agitada constantemente durante 30 min con el objetivo de retirar las sales que contiene como conservadores. Posteriormente, la resina se lavó con 50 ml de metanol y agitada por media hora más para activarla y poder así introducirla en el caldo que previamente fue inoculado con una asada de la cepa de *Bacillus velezensis*. El cultivo se incubó a 29 °C durante 7 días con una agitación de 200 rpm (Figura 5), esto con el objetivo de que la cepa llegue a su fase estacionaria y excrete los metabolitos secundarios. Se siguió la metodología descrita en la

sección de parte experimental. Se rasparon los residuos del recipiente para obtener el extracto el cual se guardó en tubos rotulados (Figura 6). Se obtuvieron 536.8 mg de extracto por cada litro de medio de cultivo. En total se hicieron 4 litros de medio de cultivo LB teniendo así 2.6249 g.



Figura 4: Amberlita XAD-16®



Figura 5: Cultivos de *B. velezensis* en caldo LB.



Figura 6: Extracto seco de la cepa ELI71. 536.8 mg/L

Fraccionamiento general

Se realizó un fraccionamiento general del extracto obtenido, mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando diferentes disolventes como eluyentes como se muestra en la Tabla 1.

Eluyentes	Proporción (%)
Hexano	100
Hexano: Acetato de etilo	90:10
Hexano: Acetato de etilo	75:25
Hexano: Acetato de etilo	50:50
Acetato de etilo	100
Acetato de etilo: metanol	98:2
Acetato de etilo: metanol	95:5
Acetato de etilo: metanol	90:10
Diclorometano: metanol	80:20
Diclorometano: metanol	50:50
Diclorometano: metanol	20:80
Metanol	100

Tabla 1: Eluyentes empleados para el fraccionamiento general del extracto de la cepa ELI71.

En total se obtuvieron 12 fracciones (Figura 7), como se explica en la tabla 2.



Figura 7: Fracciones obtenidas por cromatografía en columna

Tabla 2: Peso de las fracciones obtenidas a partir de *B. velezensis*.

Fracción	Peso (mg)	Sistema
1	12.1	Hexano 100%
2	7	Hexano: AcOEt 10%
3	5.4	Hexano: AcOEt 25%
4	6.1	Hexano: AcOEt 50%
5	23.1	AcOEt 100%
6	21.3	AcOEt: MeOH 2%
7	45.4	AcOEt: MeOH 5%
8	6.8	AcOEt: MeOH 10%
9	34.9	DCM: MeOH 20%
10	340.9	DCM: MeOH 50%
11	491.9	DCM: MeOH 80%
12	836.1	MeOH 100%

Se realizó un seguimiento cromatográfico en placa fina (TLC) de cada una de las fracciones (Figura 8) posteriormente se utilizaron técnicas espectroscópicas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para comenzar a analizar las fracciones obtenidas, resaltando las fracciones 3, 4 y 7 como las más interesantes.

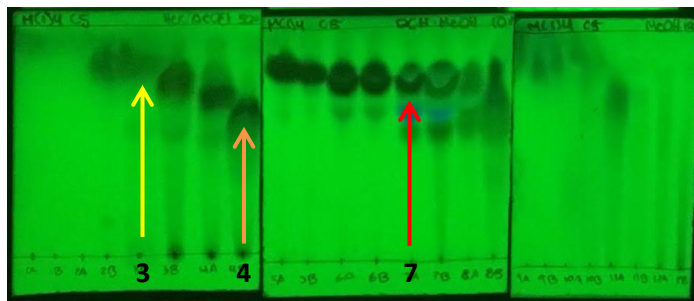


Figura 8: Cromatografía en capa fina de las fracciones del extracto de *B. velezensis*. Flecha amarilla: fracción 3, flecha naranja: fracción 4, flecha roja: fracción 7.

Purificación

La purificación de la fracción 3, 4 y 7 se hizo por cromatografía en columna, utilizando una columna cromatográfica cuya fase estacionaria fue gel de sílice y como fase móvil sistemas de elución diferentes para cada fracción.

Para purificar la fracción 3 se utilizaron sistemas Hexano:Acetato de etilo en diferentes proporciones, obteniendo el compuesto puro con el sistema Hexano:Acetato de etilo 50:50 como se muestra en la Tabla 3.

Para purificar la fracción 4 se utilizó una mezcla de Diclorometano:Metanol en una proporción 99:1, obteniendo el compuesto puro después de usar 57 ml del sistema.

La fracción 7 se purificó usando una mezcla de Diclorometano:Metanol a diferentes proporciones, obteniendo el compuesto puro con el sistema Diclorometano:Metanol 95:5. (Tabla 3.1)

Tabla 3: Sistemas usados para purificar la fracción 3.

Sistema	Proporción (%)	Volumen
DCM	100	60 ml
DCM:MeOH	99:1	20 ml
DCM:MeOH	98:2	20 ml
DCM:MeOH	97:3	20 ml
DCM:MeOH	96:4	60 ml
DCM:MeOH	95:5	60 ml
DCM:MeOH	94:6	60 ml
DCM:MeOH	93:7	20 ml
DCM:MeOH	92:8	20 ml
DCM:MeOH	91:9	20 ml

Tabla 3.1: Sistemas empleados para purificar la fracción 7.

Sistema	Proporción (%)	Volumen
Hexano	100	12 ml
Hex:AcOEt	90:10	12 ml
Hex:AcOEt	20	12 ml
Hex:AcOEt	30	12 ml
Hex:AcOEt	40	12 ml
Hex:AcOEt	50	12 ml
Hex:AcOEt	60	12 ml
Hex:AcOEt	70	12 ml
Hex:AcOEt	80	12 ml
Hex:AcOEt	90	12 ml
AcOEt	100	12 ml

Caracterización

Mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas se caracterizaron las fracciones 3, 4 y 7, de esta forma se pudo elucidar la estructura de cada compuesto.

Fracción 3

La fracción 3 resultó ser de interés ya que en placa TLC se observó una mancha color naranja, la cual al momento de colocarla en la placa era incolora y después de varios minutos se pudo observar a simple vista y sin usar algún revelador, además presentaba un olor característico a naftaleno por lo que se decidió purificarla y realizar estudios espectroscópicos para elucidar su estructura química.

A continuación, se presentan los espectros obtenidos por Resonancia Magnética Nuclear de la fracción 3.

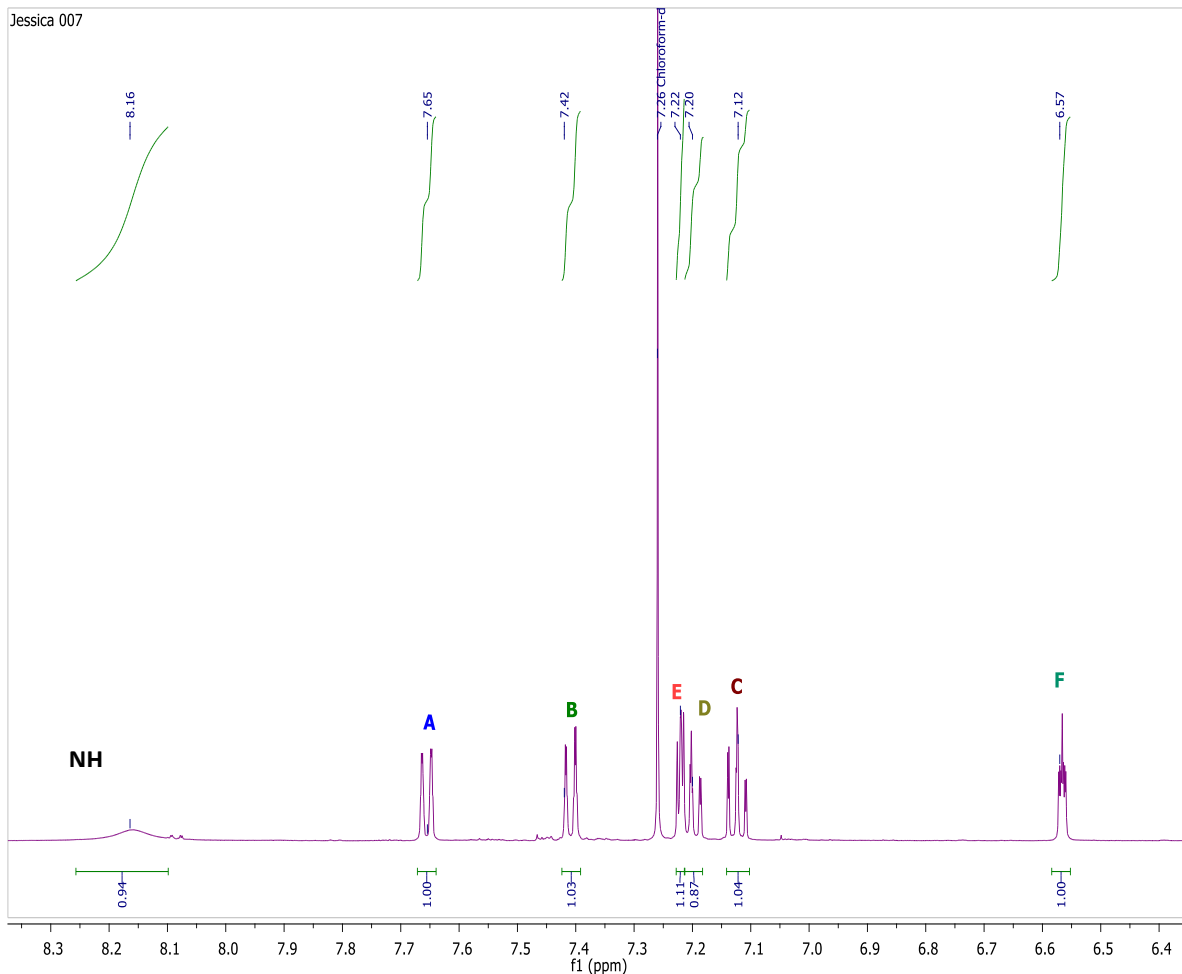


Figura 9: Espectro de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 de la fracción 3 de *B. velezensis*.

En el espectro de ^1H se observan siete señales diferentes las cuales describo a continuación:

La señal que aparece en 8.16 ppm es una señal ancha la cual integra para un hidrógeno, de acuerdo con la literatura este tipo de señales corresponde a hidrógenos unidos a átomos electronegativos como lo son el nitrógeno o el oxígeno. Además de esta señal se observan 6 señales en la región del espectro correspondiente a los hidrógenos de anillos aromáticos; en 7.65 ppm y 7.42 ppm dos dobles (marcadas como A y B) las cuales integran para un hidrógeno cada una; en 7.22-7.20 ppm una señal triple empalmada con otra triple (marcadas como E y D) las cuales integran para 1 hidrógeno cada una. La señal en 7.12 ppm

corresponde también a una triple (marcada como C) la cual integra para un protón; por último, la señal menos desplazada en 6.57 ppm (F) corresponde a una señal múltiple que integra para un protón, teniendo en total 6 protones que forman parte de un anillo aromático y otro protón unido a nitrógeno u oxígeno. Debido a esta nueva información se procedió a obtener un espectro 2D COSY con el fin de poder correlacionar los hidrógenos del compuesto, como se observa en la figura 10

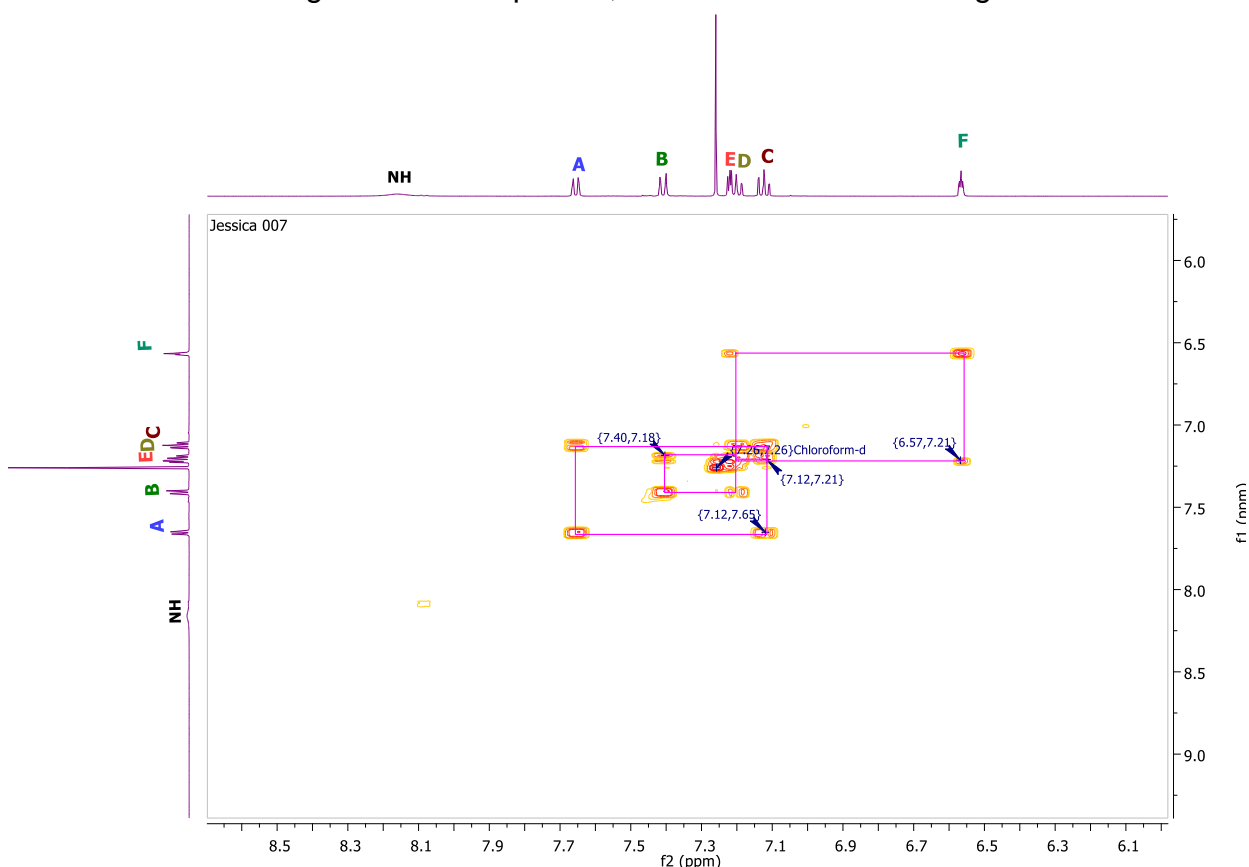


Figura 10: Espectro de RMN 2D COSY en CDCl_3 de la fracción 3 de *B. velezensis*.

En el espectro se observa que la señal en 7.65 ppm (A) se correlaciona con la señal que se encuentra en 7.12 ppm (C), la señal en 7.42 ppm (B) se correlaciona con la señal triple en 7.20 ppm (D) y esta a su vez se correlaciona con la señal triple en 7.12 ppm (C). Por último, la señal triple (E) se correlaciona con la señal triple en 6.57 ppm (F).

También se obtuvo un espectro de RMN de ^{13}C (Figura 11) donde se observa la presencia de 8 carbonos diferentes. La señal marcada como G se encuentra a 135.6 ppm, H en 127.6 ppm, E en 123.9 ppm, D en 121.8 ppm, A en 120.4 ppm, C en 119.6 ppm, B en 110.8 ppm y una última señal (F) en 102.6 ppm.

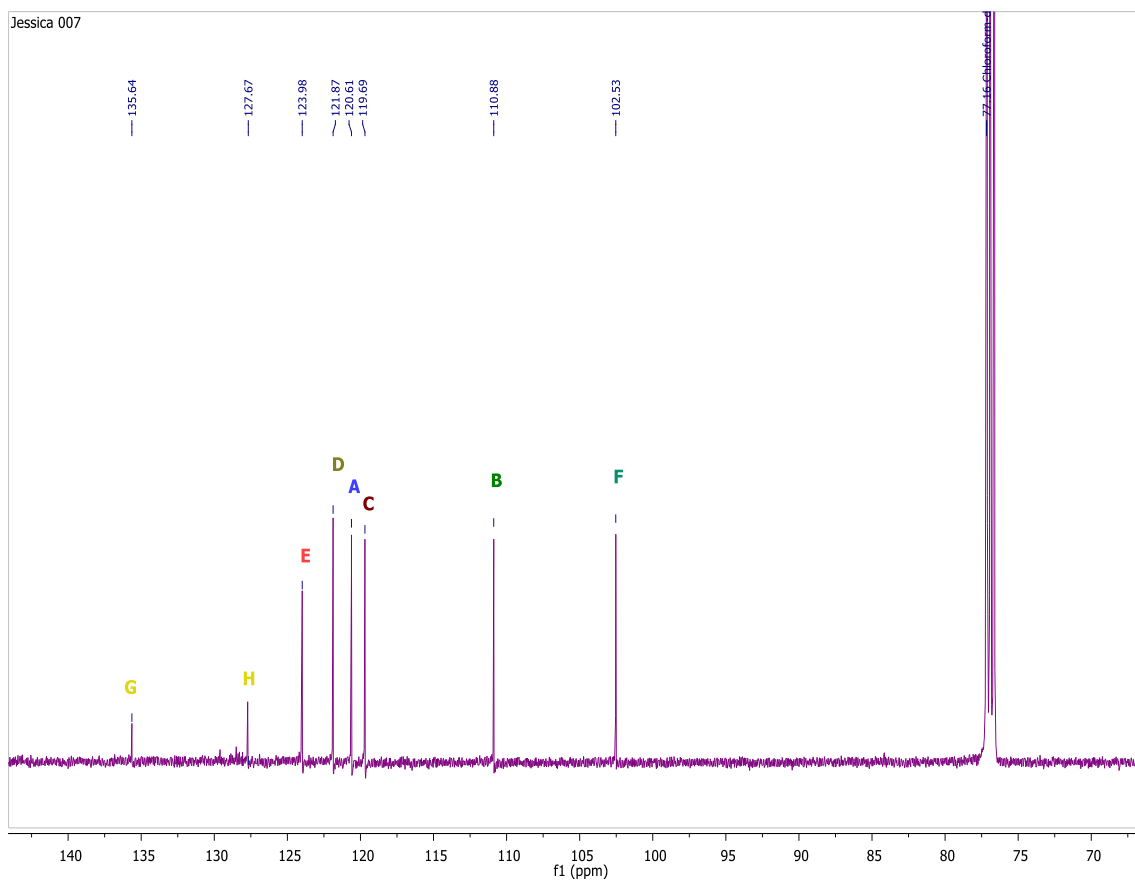


Figura 11: Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 de la fracción 3 de *B. velezensis*.

El espectro 2D HSQC (Figura 12) sirvió de ayuda para correlacionar cada carbono con su hidrógeno correspondiente.

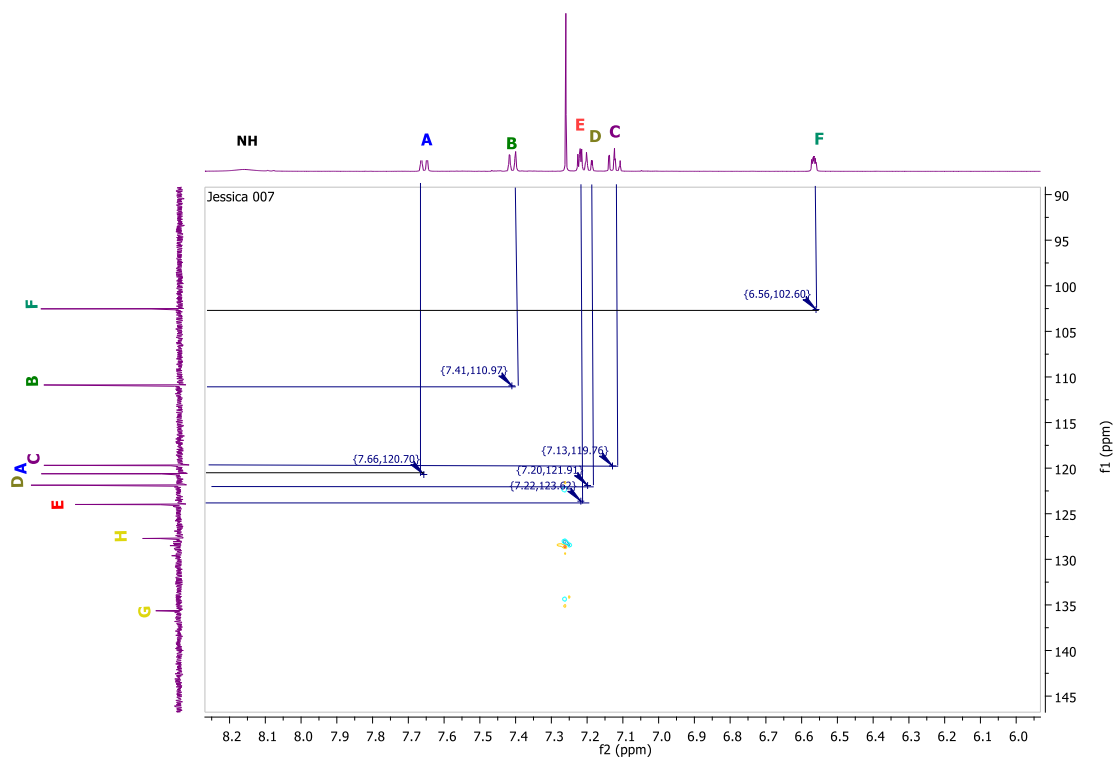


Figura 12: Espectro de RMN 2D HSQC en CDCl_3 de la fracción 3 de *B. velezensis*.

Las señales que se observan en el espectro de RMN de ^{13}C en 135.6 ppm (G) y 127.6 ppm (H) no tienen ninguna correlación con hidrógenos deduciendo que son carbonos cuaternarios, la señal de ^{13}C en 123.9 ppm se correlaciona con la señal en 7.22 ppm (E), la señal en 121.8 ppm se correlaciona con la señal en 7.20 ppm (D), la señal en 120.6 ppm se correlaciona con la señal en 7.65 ppm (A), la señal en 119.6 ppm se correlaciona con la señal triple en 7.12 ppm (C), la señal en 110.8 ppm se correlaciona con la señal en 7.42 (B) y la señal en 102.5 ppm se correlaciona con la señal en 6.57 ppm (F).

A continuación, se presenta su espectro infrarrojo el cual proporciona información sobre los posibles grupos funcionales presentes en la molécula.

Como se observa en la figura 13 aparece una banda en 3400 cm^{-1} que corresponde a una amina secundaria, en 2919 cm^{-1} aparece un pico que corresponde a CH de anillos aromáticos.

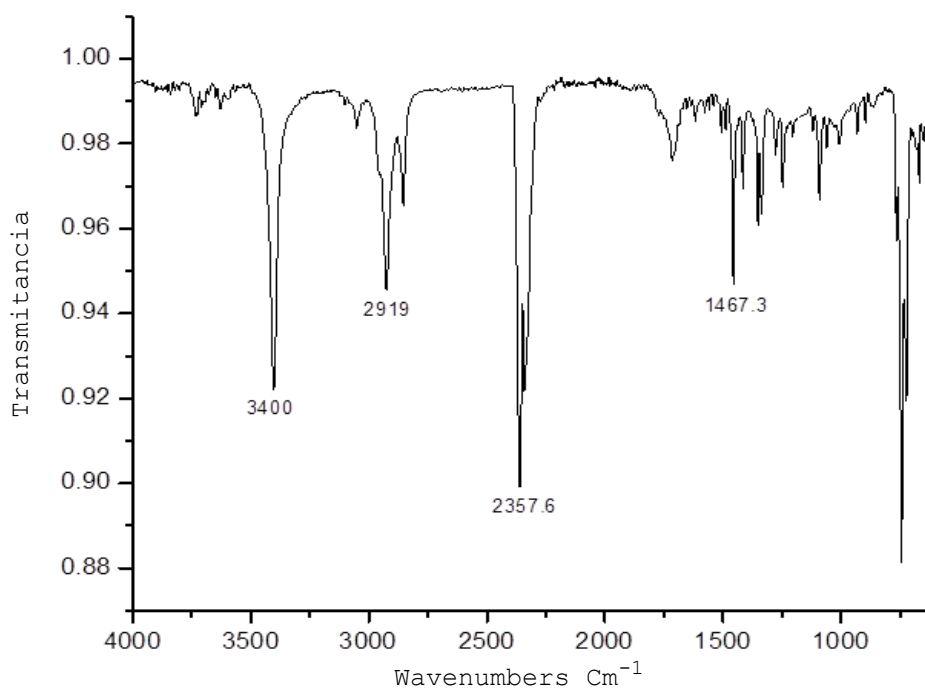


Figura 13: Espectro IR de la fracción 3 de *B. velezensis*.

Con toda la información obtenida se elucidó el compuesto de la fracción 3, para la cual se propuso la estructura mostrada en la figura 14, el nombre y las propiedades químicas de la molécula se describen en la tabla 4.

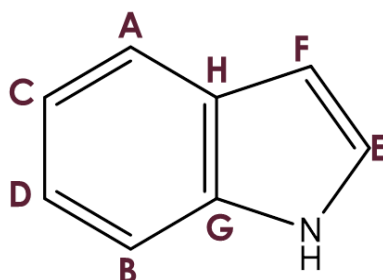


Figura 14: Estructura propuesta para la fracción 3.

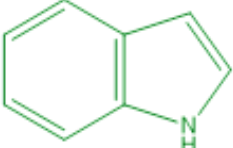
<p>Estructura propuesta:</p> 	<p>Nombre de identificación: 1H-Indol</p> <p>Fórmula empírica: C₈H₇N</p>	<p>Peso molecular: 117.1479 g/mol</p> <p>Punto de fusión: 52 °C</p>
---	--	---

Tabla 4: estructura y propiedades químicas de la fracción 3.

Muchas bacterias Gram positivas tienen las enzimas necesarias para producir Indol a partir de una desaminación reductiva del triptófano. Se genera el indol por una desaminación reductiva del triptófano vía la molécula intermediaria ácido indolpirúvico. Las triptofanasas catalizan la reacción de desaminación, durante el cual se remueve el grupo amino (NH₂) de la molécula de triptófano. Los productos finales de la reacción son el indol, ácido pirúvico, amoníaco (NH₃) y energía. Como coenzima de la reacción se requiere al fosfato de piridoxal. La prueba del indol es una prueba bioquímica realizada en especies bacterianas para determinar la habilidad del organismo de romper el indol del aminoácido triptófano. Esta división molecular es lograda por una serie de enzimas intracelulares diferentes, un sistema que en conjunto se le llama con frecuencia triptofanasa. Por lo que es importante resaltar que se realizó la prueba del Indol para demostrar que *B. velezensis* no produce el Indol a través de esta vía metabólica. La prueba se hizo en medio MIO (Motilidad-Indol-Ornitina) y con el reactivo de Kovac's (alcohol isoamílico, *p*-dimetilaminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado). El cultivo de la bacteria en estudio se incubó a 29 °C durante 24 horas y tras la incubación, se añadieron 3 gotas (50 µl) de reactivo de Kovac's. El indol producido reacciona con este reactivo generando una coloración rosa intensa, si la bacteria no produce indol por esta vía sólo se observa un anillo amarillo en la superficie del tubo. En nuestro caso se observó lo último (prueba negativa) asegurando que el indol generado no provenía de la ruta del triptófano, sino que la producía por otra ruta.

Fracción 4

A continuación, se presentan los espectros obtenidos por Resonancia Magnética Nuclear de la fracción 4.

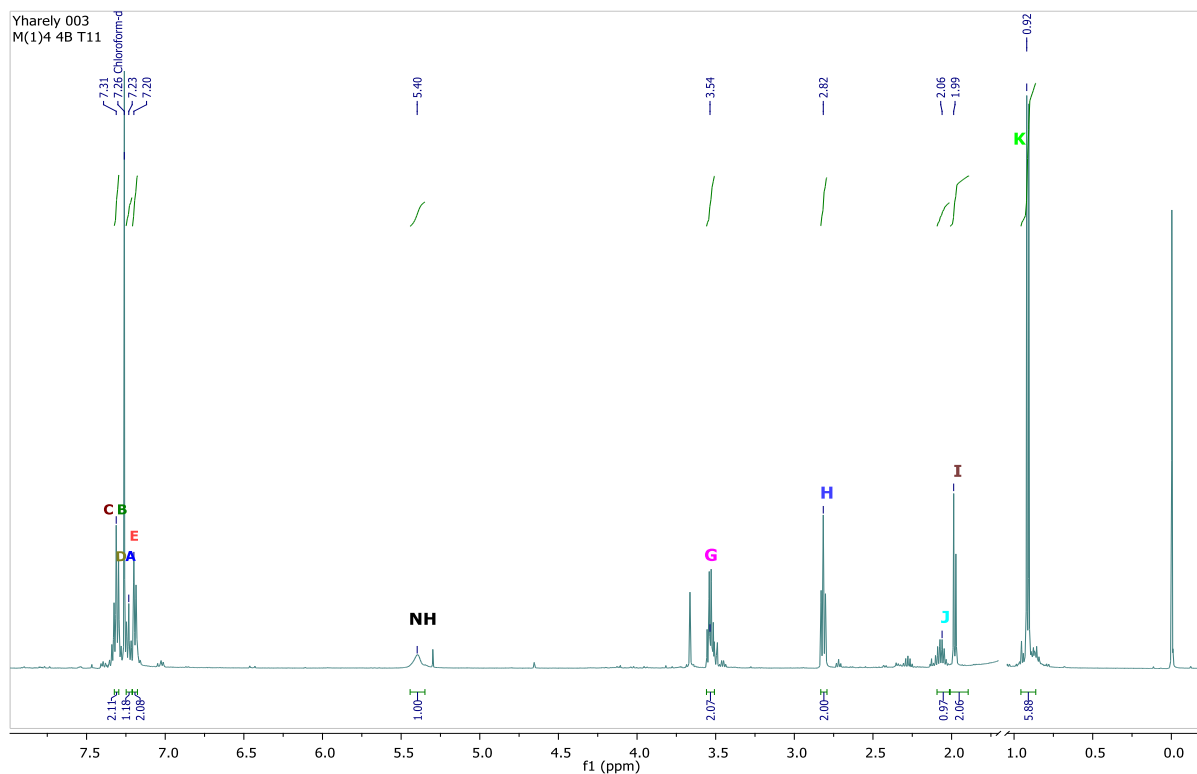


Figura 15: Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 de la fracción 4 de *B. velezensis*

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 15) se observan diferentes señales con sus multiplicidades para los diferentes hidrógenos. En la región que va de 7.20 ppm a 7.31 ppm a la cual incluye hidrógenos de anillos aromáticos se observan diferentes señales que integran para 5 hidrógenos en total. También se observa una señal ancha en 5.40 ppm (NH) la cual integra para un hidrógeno que se asume puede estar unido a un átomo de nitrógeno o a uno de oxígeno. En 3.54 ppm (G) hay una señal cuádruple que integra para dos hidrógenos, en 2.82 ppm (H) se observan una señal triple que integra para dos hidrógenos, una señal múltiple aparece en 2.06 ppm (J) e integra para un hidrógeno, en 1.99 ppm (I) se observa una señal doble que integra para dos hidrógenos, y una última señal doble en 0.92 ppm (K) que integra para 6 hidrógenos los cuales podrían pertenecer a grupos metilos. Se

procedió a obtener un espectro 2D COSY con el fin de poder asignar los hidrógenos del compuesto, como se observa en la figura 16.

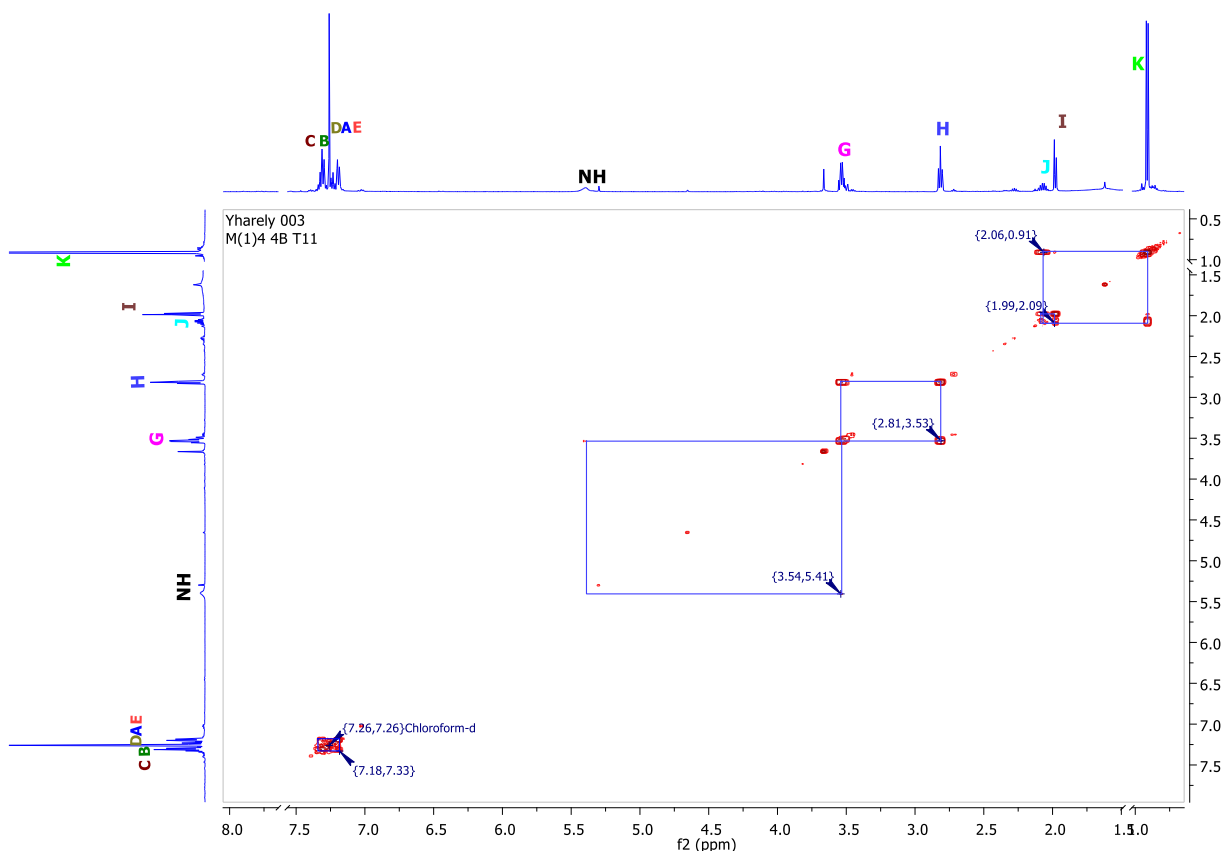


Figura 16: Espectro de RMN 2D COSY en CDCl_3 de la fracción 4 de *B. velezensis*

En el espectro se observa un cuadro muy separado de los demás. Éste representa la correlación entre los cinco hidrógenos del anillo aromático (C,B,D,A,E), la señal ancha en 5.40 ppm (NH) se correlaciona con la señal cuádruple en 3.54 ppm (G) esta a su vez tiene una relación con la señal triple en 2.82 ppm (H), en 1.99 ppm (I) la señal doble tiene relación con la señal múltiple en 2.06 ppm (J) esta señal también se correlaciona con la señal doble en 0.92 ppm (K). Este análisis permite asignar de manera inequívoca cada señal de hidrógeno que se encuentra en el compuesto y su correlación con los hidrógenos adyacentes.

Se obtuvo el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 17).

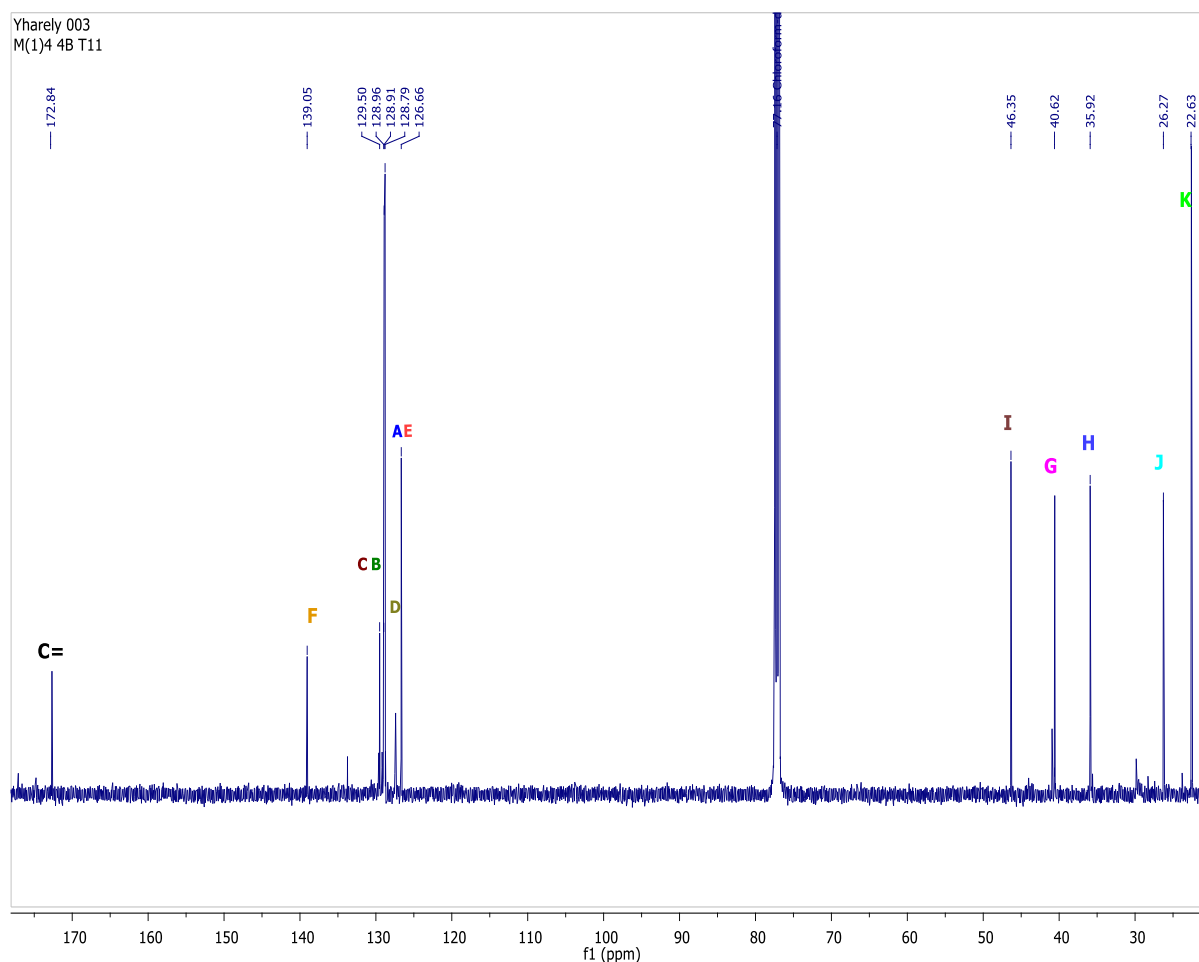


Figura 17: Espectro de ^{13}C de RMN a 125 MHz en CDCl_3 de la fracción 4 de *B. velezensis*

En el espectro de RMN de ^{13}C se observa la presencia de 12 carbonos diferentes los cuales se encuentran en los siguientes desplazamientos. 172.8 ppm hay una señal que se asume podría pertenecer a un grupo carbonilo de amida, la señal en 139.05 ppm (F) podría pertenecer a un carbono cuaternario, la señal marcada como C se observa en 129.5 ppm, la señal marcada como B aparece en 128.96 ppm, D se observa en 128.91 ppm, A en 128.7 ppm, E en 126.6 ppm, 5 señales menos alejadas en el espectro y marcadas como I,G,H,J,K se encuentra en 46.3 ppm, 40.6 ppm, 35.9 ppm, 26.2 ppm, y 22.6 ppm respectivamente.

En el espectro de RMN de ^1H se observó una señal doble que integra para seis hidrógenos lo que da una idea de que podrían ser dos metilos por lo tanto en el

espectro de RMN de ^{13}C dos carbonos pueden corresponder a la misma señal (K) debido a que podría ser un grupo isopropilo simétrico, teniendo así en total 13 carbonos y observando únicamente 12 señales.

Siguiendo la misma metodología de la fracción 3 se procedió a la obtención del espectro 2D HSQC para poder observar las correlaciones entre los carbonos con hidrógenos que se encuentran en la fracción 4. (Figura 18)

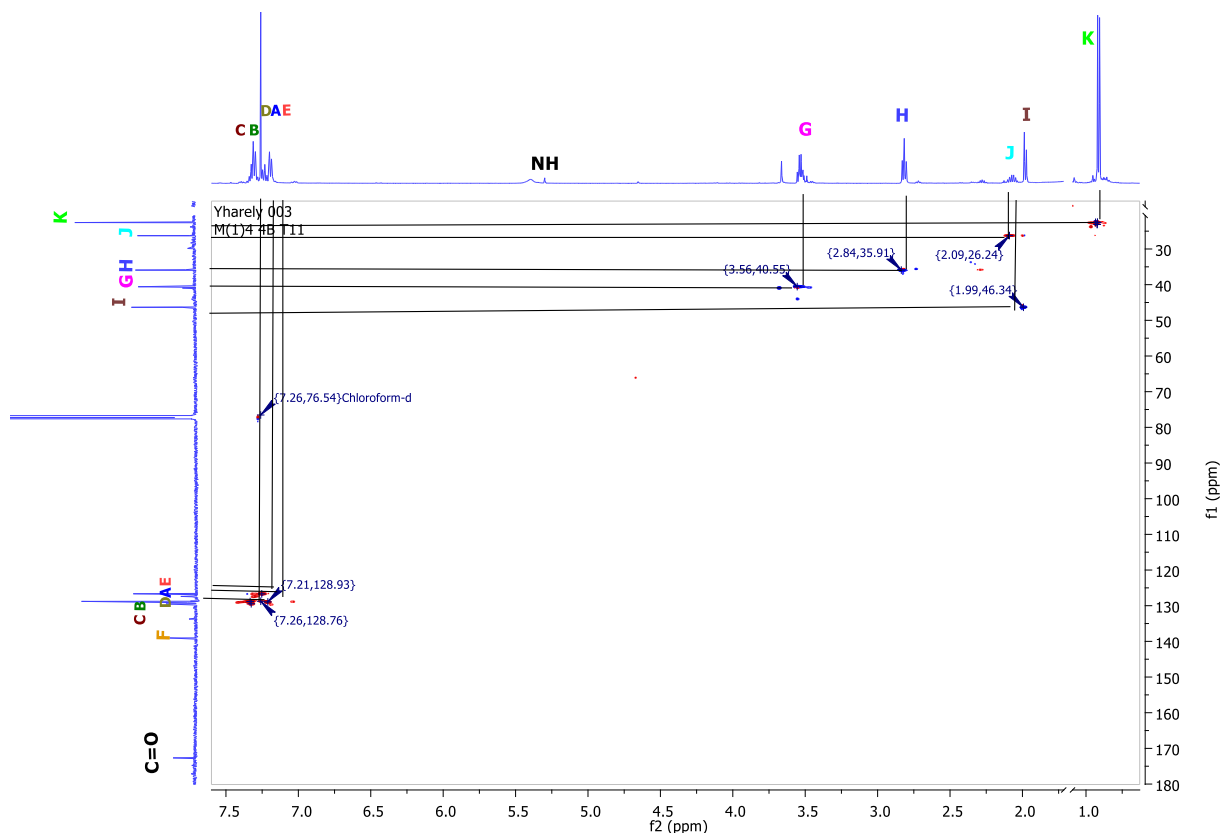


Figura 18: Espectro de RMN 2D HSQC en CDCl_3 de la fracción 4 de *B. velezensis*

Se observan dos señales una en 172.84 ppm y otra en 139.0 ppm que no se correlaciona con ningún hidrógeno, por lo que se puede decir que corresponden a carbonos cuaternarios, la de 172.84 ppm podría pertenecer a un grupo carbonilo de amida. Las 5 señales de RMN de ^{13}C entre 129.5-126.6 ppm se correlacionan con la señales que aparecen en el espectro de RMN de ^1H entre en 7.31-7.20 ppm (C,B,D,A,E) que forman parte del anillo aromático, la señal del espectro de RMN de ^1H en 5.40 ppm (NH) no tiene correlación con alguna señal del espectro de RMN de ^{13}C , una señal en 46.3 ppm se correlaciona con la señal doble del

espectro de RMN de ^1H en 1.99 ppm (I), la señal en 40.6 ppm se correlaciona con la señal cuádruple en 3.54 ppm (G), una señal en 35.92 ppm se correlaciona con la señal triple en 2.82 ppm (H), en 26.27 ppm la señal se correlaciona con la múltiple en 2.06 ppm (J) por último una señal en 22.63 ppm se correlaciona con la señal doble en 0.92 ppm (K).

Además, se realizó un espectro APT para poder recabar más información de ayuda (Figura 19). El espectro APT es de utilidad para determinar el tipo de carbonos que se obtienen ya que los CH_2 y carbonos cuaternarios tendrán una señal hacia arriba, en cambio los CH_3 y CH tendrán una señal negativa hacia abajo.

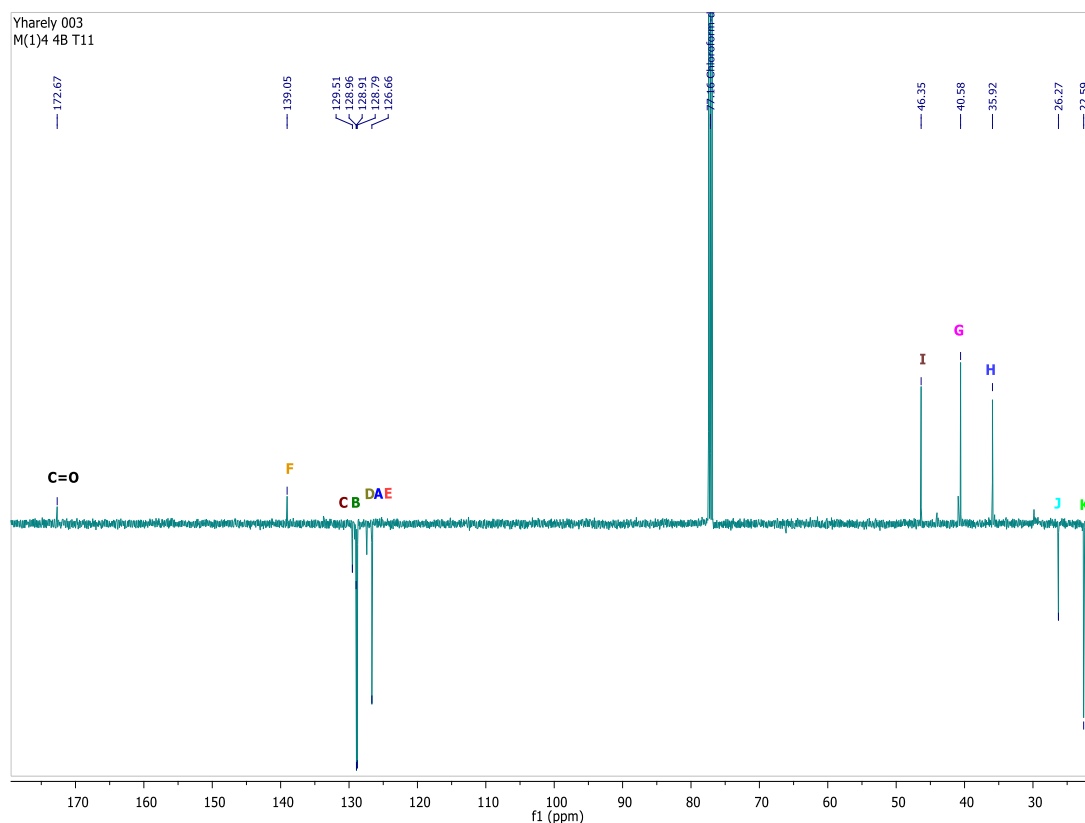


Figura 19: Espectro APT de la fracción 4 de *B. velezensis*

De acuerdo con el espectro la señal que aparece en 172 ppm asignada a un grupo $\text{C}=\text{O}$, está hacia arriba por lo que se confirma que es un carbono cuaternario de

un grupo carbonilo. La señal en 139 ppm asignada como F también está hacia arriba y de acuerdo con el espectro HSQC la señal F no tiene correlación con ningún protón por lo que confirmamos de la misma manera que es un carbono cuaternario. Por su parte las señales asignadas a I, G y H también están hacia arriba y observando el espectro de protón vemos que estas señales integran cada una para dos hidrógenos, lo que significa que son carbonos de grupos metilenos. Las señales de C,B,D,A,E están hacia abajo y debido a su desplazamiento químico y su correlación con señales de protón que juntas integran para 5 hidrógenos que se comprobó son señales de los CH que forman un anillo aromático. J está hacia abajo, en el espectro de protón esta señal integra para un hidrógeno lo que significa que es un CH, por último la señal K también está hacia abajo, de acuerdo con el espectro de protón la señal K integra para 6 hidrógenos por lo que confirmamos que son dos carbonos de grupos metilenos.

A continuación, se presenta su espectro infrarrojo el cual proporciona información sobre los posibles grupos funcionales presentes en la molécula. (Figura 20).



Figura 20: Espectro IR de la fracción 4 de *B. velezensis*

En la figura 19 se observa una banda ancha en 3285.205 cm^{-1} que pertenece a un grupo NH de amina. Por otro lado, en 2958.08 cm^{-1} se encuentra una banda

característica de CH de grupos aromáticos. En 1641.996 cm^{-1} hay una señal característica de un grupo carbonilo de amida. En 1367 cm^{-1} el pico corresponde a enlaces C-C y C-N. Las señales en 747.082 cm^{-1} y 697.216 cm^{-1} corresponden a señales Oop (Out of plane) característica de un grupo benceno monosustituido.

Con esta nueva información y con todo la anterior se puede elucidar el compuesto de la fracción 4, proponiendo la estructura de la figura 21, el nombre y las propiedades químicas de la molécula se describen en la tabla 5.

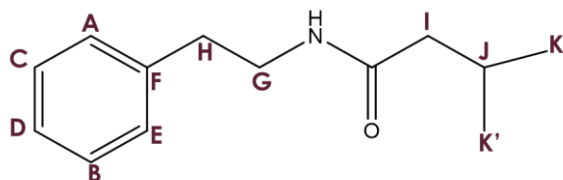


Figura 21: Estructura propuesta para la fracción 4.

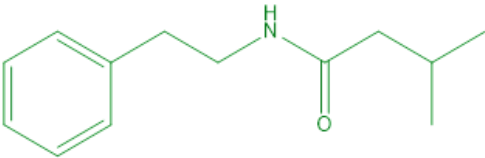
<p>Estructura propuesta:</p> 	<p>Nombre de identificación: 3-metil-N-fenetilbutanamida</p> <p>Fórmula empírica: $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}$</p>	<p>Peso molecular: 205.2961 g/mol</p> <p>Punto de fusión: 69-72 °C</p>
---	--	--

Tabla 5: Estructura y propiedades químicas de la fracción 4.

Fracción 7

Se procedió a realizar de manera similar pruebas espectroscópicas al compuesto de la fracción 7 para elucidar su estructura.

También se hizo el análisis de los espectros obtenidos por RMN como se muestra a continuación:

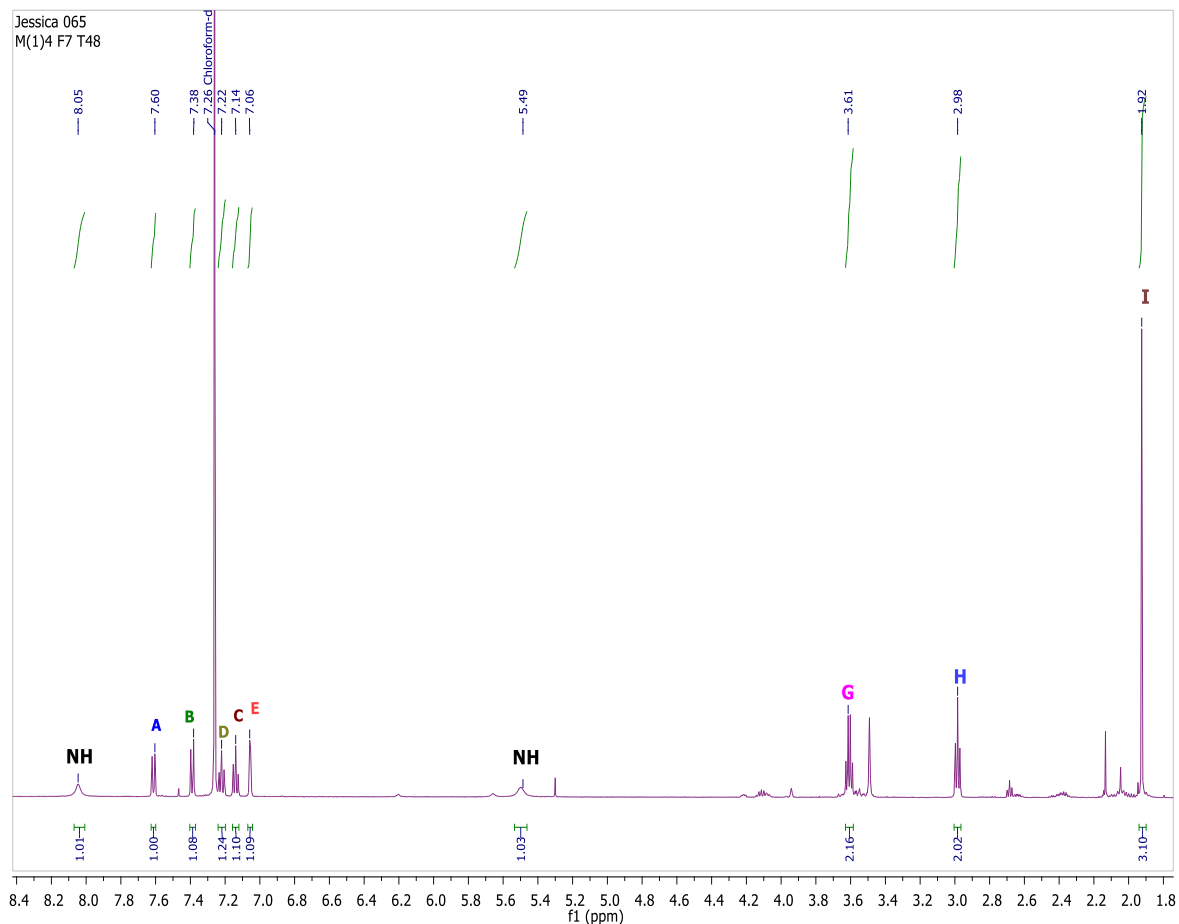


Figura 22: Espectro de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 de la fracción 7 de *B. velezensis*.

En el espectro de RMN de ^1H (Figura 22) se observan entre 7.60-7.06 ppm cinco señales las cuales integran para un protón cada una teniendo en total cinco protones cuyo desplazamiento nos permite deducir que pertenecen a un anillo aromático (A, B, D, C, E). En 7.60 ppm (A) se observa una señal doble al igual que la señal en 7.38 ppm (B), En 7.22 ppm (D) se encuentra una señal triple al igual

que en 7.14 ppm (C) y por último una señal simple en 7.06 ppm (E). Hay dos señales anchas una en 8.05 (NH) y otra en 5.49 ppm (NH) cada una integra para un hidrógeno los cuales podrían estar unidos a un átomo de N. Enseguida aparecen 3 señales, una cuádruple en 3.61 ppm (G) que integra para dos hidrógenos, una triple en 2.98 ppm (H) que integra para dos hidrógenos y una simple en 1.92 ppm (I) que integra para tres hidrógenos.

Se procedió a obtener un espectro 2D COSY con el fin de poder asignar los hidrógenos del compuesto, como se observa en la figura 23.

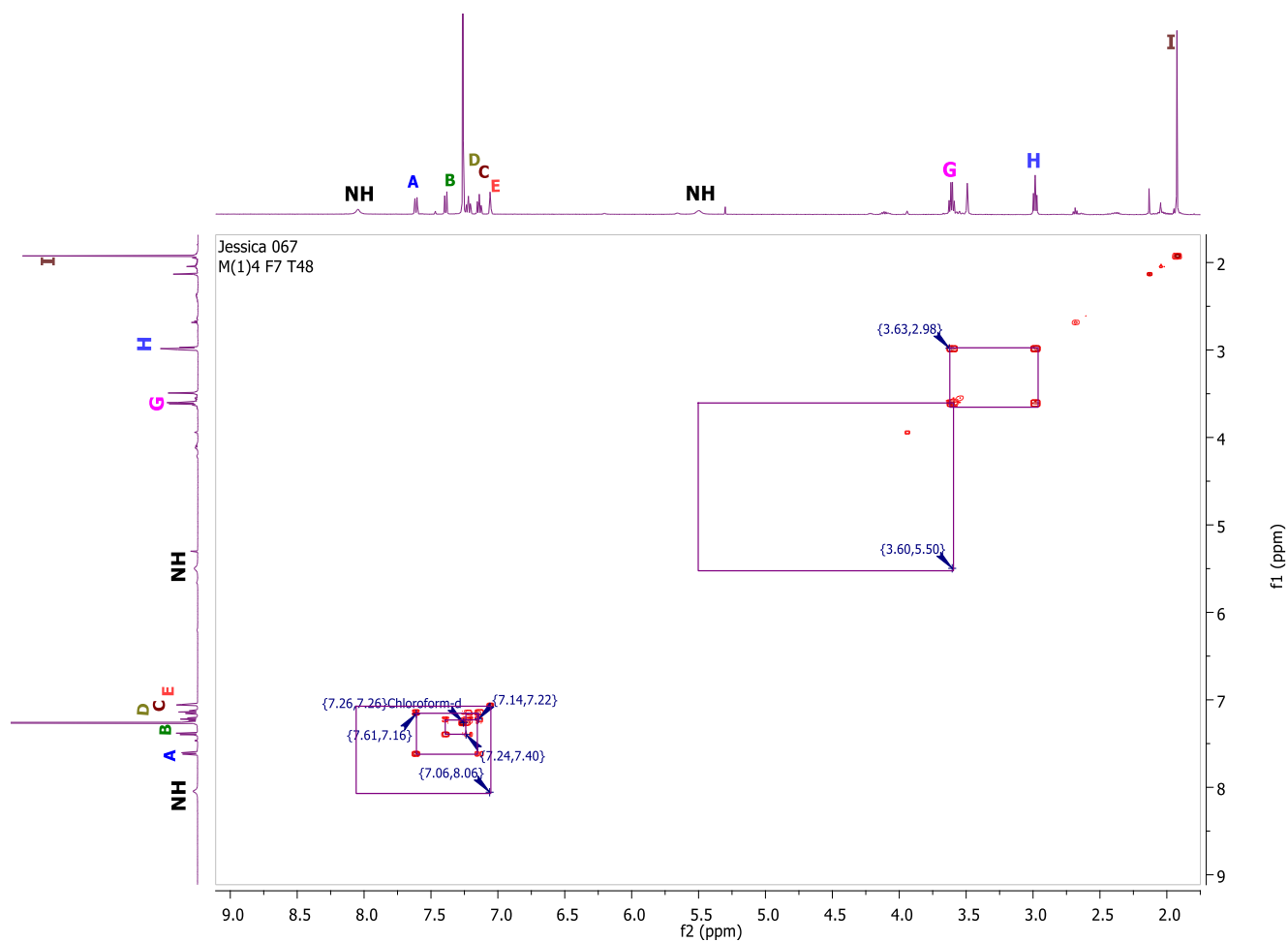


Figura 23: Espectro de RMN 2D COSY en CDCl_3 de la fracción 7 de *B. velezensis*.

En el espectro de la figura 23 se observa que la señal en 7.60 ppm (A) se correlaciona con la señal que se encuentra en 7.14 ppm (C), esta a su vez se correlaciona con la señal en 7.22 ppm (D), esta señal triple también se correlaciona con la señal en 7.40 ppm (B), por su parte la señal en 7.06 ppm (E) tiene relación con la señal ancha en 8.05 ppm (NH). Otra señal ancha en 5.49 ppm (NH) se correlaciona con la señal cuádruple en 3.61 ppm (G), que a su vez se correlaciona con una señal triple en 2.98 ppm (H). Una última señal simple en 1.92 ppm (I) que integra para tres hidrógenos no tiene relación con ninguna señal por lo que se deduce que pertenece a un grupo metilo unido a un carbono cuaternario.

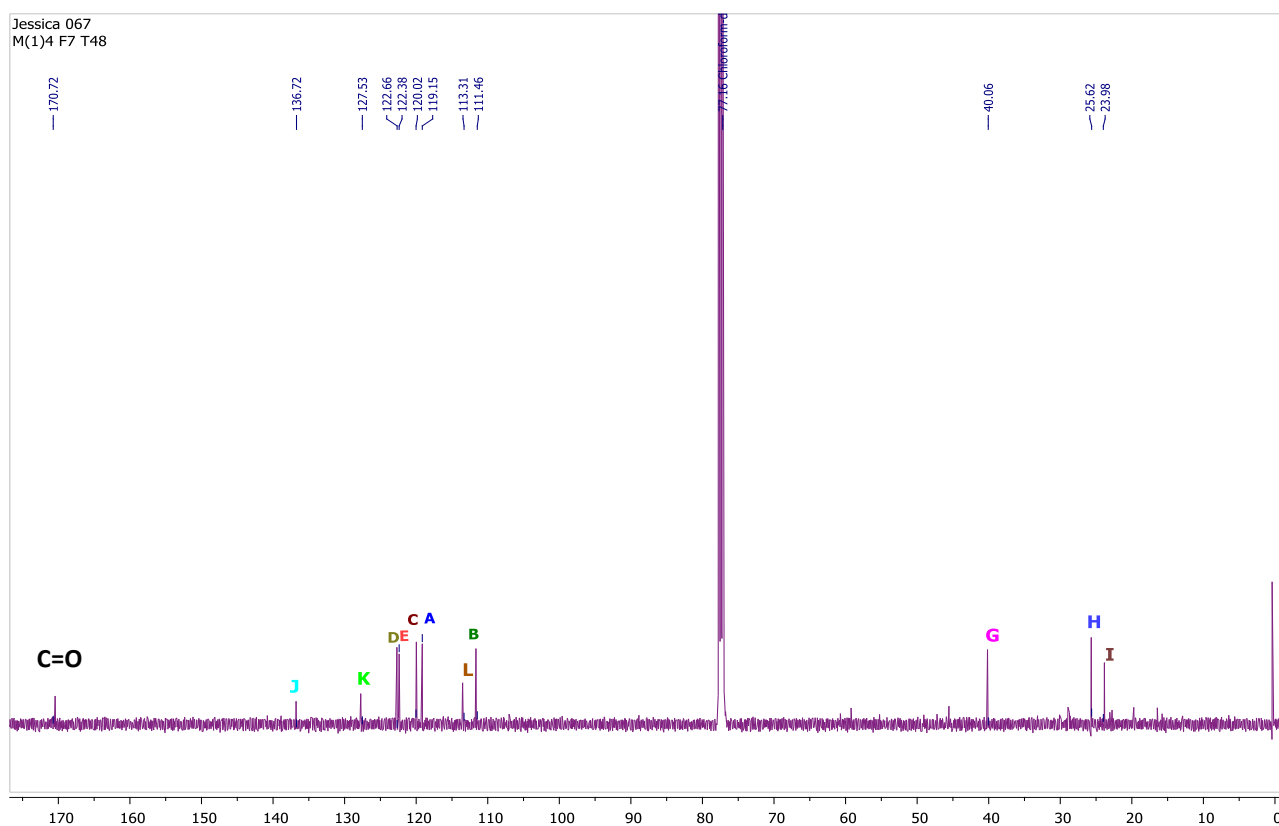


Figura 24: Espectro de RMN de ¹³C a 125 MHz en CDCl₃ de la fracción 7 de *B. velezensis*.

En este espectro de la figura 24 se observan 12 señales correspondientes a 12 carbonos. En 170.7 ppm asignada como C=O la cual aparece en la región donde aparecen las de grupos carbonilos. También se observan 8 señales más en la región de anillos aromáticos; una marcada como J en 136.7 ppm, K en 127.5 ppm, D en 122.6 ppm, E en 122.3 ppm, C en 120.0 ppm, A en 119.1 ppm, L en 113.3

ppm, B en 111.46 ppm, otras 3 señales menos desplazadas marcadas como; G en 40.0 ppm, H en 25.6 ppm e I en 23.9 ppm.

Para una correcta asignación de los carbonos correlacionándolos con los hidrógenos, se procedió a la obtención del espectro 2D HSQC (Figura 24).

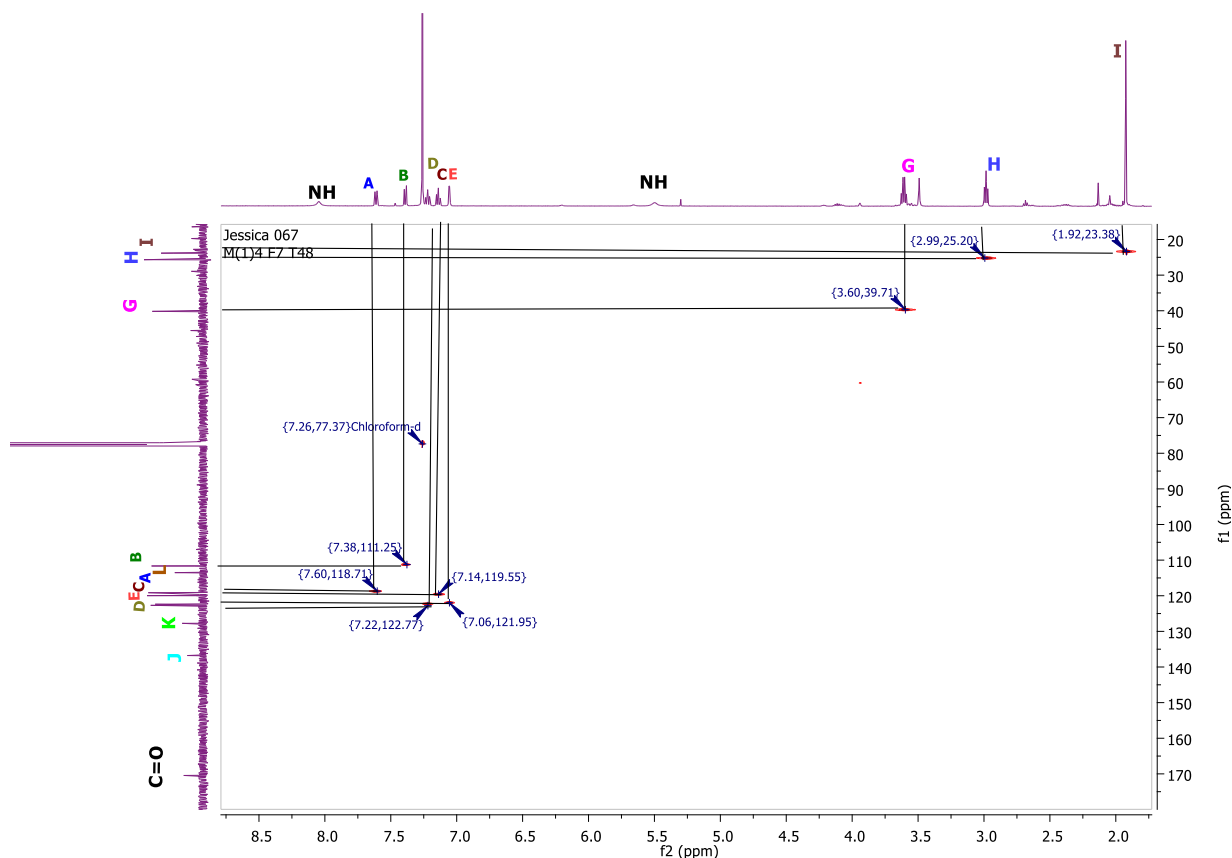


Figura 25: Espectro de RMN 2D HSQC en CDCl_3 de la fracción 7 de *B. velezensis*.

La primera señal en 170.72 ppm (C=O) no tiene relación con alguna señal del espectro de ^1H además por su desplazamiento se confirma que es un carbono cuaternario de un grupo carbonilo. Tres señales en 136.7 ppm (J), 127.5 ppm (K) y en 113.3 ppm (L) no se relacionan con ningún protón por lo que de igual manera se asume corresponden a carbonos cuaternarios, la señal en 122.6 ppm se correlaciona con la señal triple en 7.22 ppm (D), la señal en 122.3 ppm se correlaciona con la señal simple en 7.06 ppm (E), una señal en 120.0 ppm tiene

correlación con la señal triple en 7.14 ppm (C), la señal en 119.1 ppm se correlaciona con la señal doble en 7.62 ppm (A), otra señal en 111.4 ppm se relaciona con la señal doble en 7.38 ppm (B), por último tres señales menos desplazadas en 40.0 ppm, en 25.6 ppm y en 23.9 ppm se correlacionan con la señal cuádruple en 3.61 ppm (G), con la señal triple en 2.98 ppm (H) y con la señal simple en 1.92 ppm (I), respectivamente.

Además, se realizó un espectro APT (Figura 26) para poder reunir más información de ayuda y poder elucidar la estructura de la molécula.

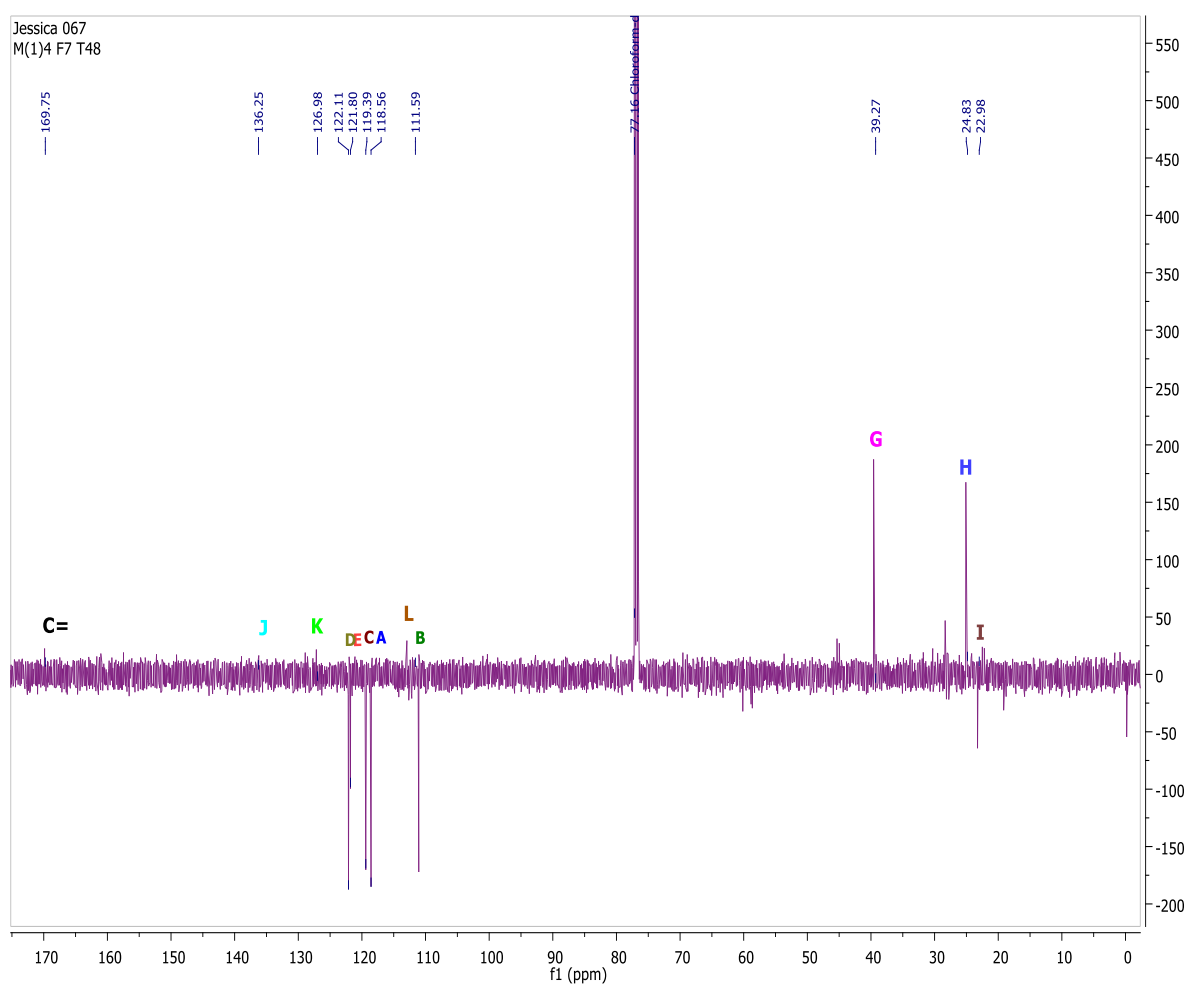


Figura 26: Espectro APT de la fracción 7 de *B. velezensis*.

En este espectro APT (Figura 26) se observa que la señal marcada como C=O, J, K y L están hacia arriba por lo que se confirma que son carbonos cuaternarios. En la región de carbonos pertenecientes al anillo aromático se observan cinco señales hacia abajo por lo que se reafirma que son los metinos que forman dicho anillo. Las señales G y H están hacia arriba, de acuerdo con el espectro de protón estas señales integran cada una para dos hidrógenos por lo que se ratifica que son dos metilenos. Por último, la señal I se observa hacia abajo, en el espectro de protón esta señal integra para tres hidrógenos por lo que confirmamos que pertenece a un CH₃.

A continuación, se presenta el análisis de la fracción 7 por espectroscopía infrarroja (Figura 27).

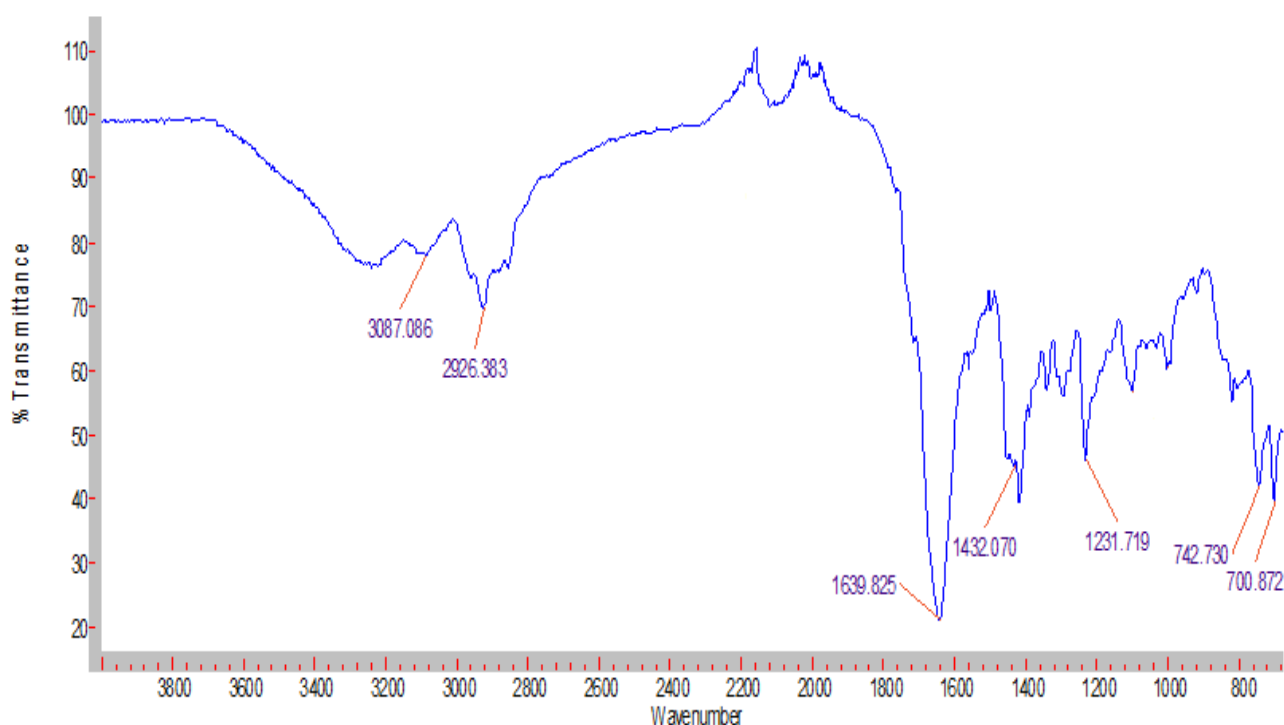


Figura 27: Espectro IR de la fracción 7 de *B. velezensis*

En el espectro IR se observa una banda ancha en 3087 cm⁻¹ que pertenece a un grupo NH de amina. Por otro lado, en 2926 cm⁻¹ se encuentra una banda característica de CH de grupos aromáticos. En 1639 cm⁻¹ hay una señal característica de un grupo carbonilo de amida. En 1432 cm⁻¹ la señal corresponde

a un CH₃ unido a una amina, en 1231 cm⁻¹ el pico corresponde a enlaces C-C y C-N, en la región de 700 cm⁻¹ corresponde a una señal Oop (Out of plane) característica de un grupo benceno disustituido.

Con esta nueva información y con toda la anterior se pudo elucidar la estructura de la fracción 7, la cual se propone en la figura 28. Se muestra una tabla del nombre y las propiedades químicas de la molécula en la tabla 6.

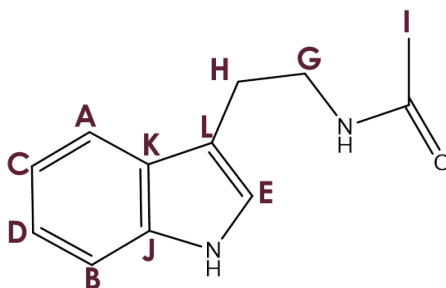


Figura 28: Estructura propuesta para la fracción 7.

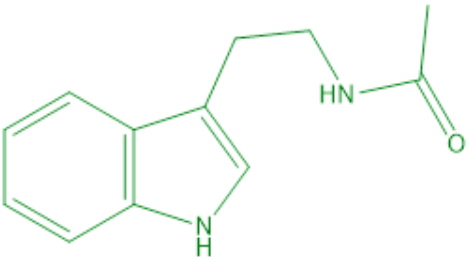
<p>Estructura propuesta:</p> 	<p>Nombre de identificación: N-acetil triptamina</p> <p>Fórmula empírica: C₁₂H₁₄N₂O</p>	<p>Peso molecular: 202.2524 g/mol</p> <p>Punto de fusión: 110 °C</p>
---	--	--

Tabla 6: Estructura y propiedades químicas de la fracción 7.

Pruebas biológicas

Para evaluar la actividad antimicrobiana y antifúngica de cada compuesto se realizaron las pruebas biológicas que se describen a continuación:

Las bacterias utilizadas fueron: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella cholerasuis*, *Serratia marcescens*, *Shigella* sp, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Se decidió utilizarlas debido a que son bacterias de interés clínico por las recurrentes infecciones que provocan en los seres humanos, algunas de ellas causan principalmente infecciones gastrointestinales a través de alimentos y otras provocan enfermedades respiratorias. Siendo así de gran importancia la búsqueda de nuevos compuestos que tengan actividad contra estas bacterias patógenas.

Estos microorganismos se incubaron en 3 mL de caldo LB, a una temperatura de 29 °C con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm) durante 24 h, para alcanzar una densidad celular aproximada de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. De la suspensión se sembraron (por estría masiva) 100 μ l en cajas Petri de 100 x 15 mm con agar Müller Hinton.

15 mg de cada fracción de interés (3, 4 y 7) obtenida mediante cromatografía en columna se disolvió en 100 μ l de MeOH, discos estériles de papel filtro se impregnaron con 5 μ l de la solución anterior, estos discos se colocaron en las placas que fueron inoculadas con las diferentes bacterias y se dejan en incubación a 29 °C durante 24 horas. Como controles negativos se utilizaron dos discos de papel filtro uno con 5 μ l de agua y otro con 5 μ l de metanol y como control positivo discos con Vancomicina (para Gram positivas) y Ampicilina (para Gram negativas). Los halos de inhibición del crecimiento alrededor de los discos se miden a las 24 horas de incubación. Figura 29a y 29b. La medida en mm de los halos de inhibición se muestra en la tabla 7.

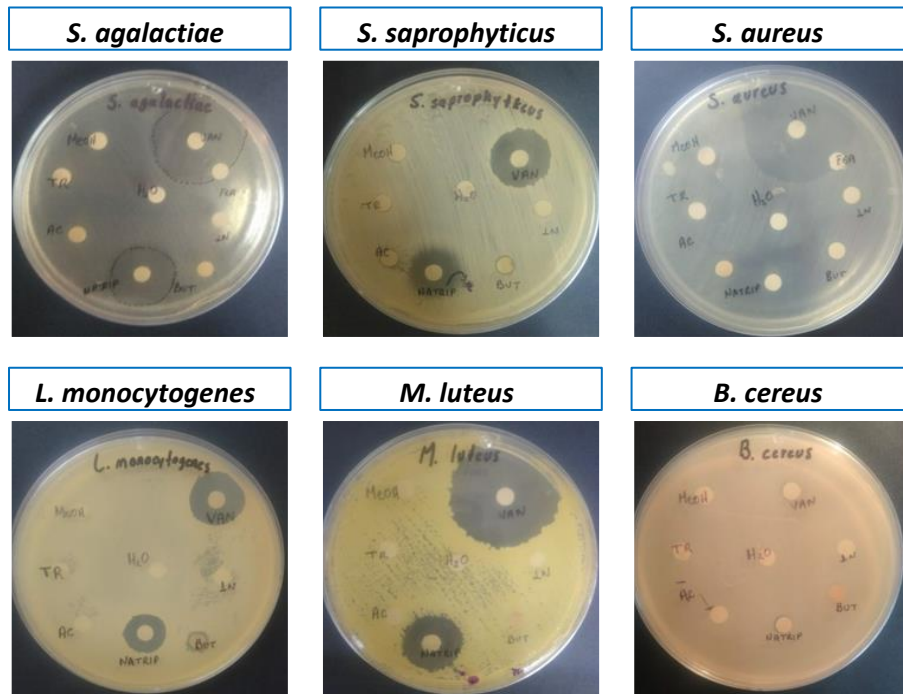


Figura 29a: Antibiograma con bacterias Gram positivas.

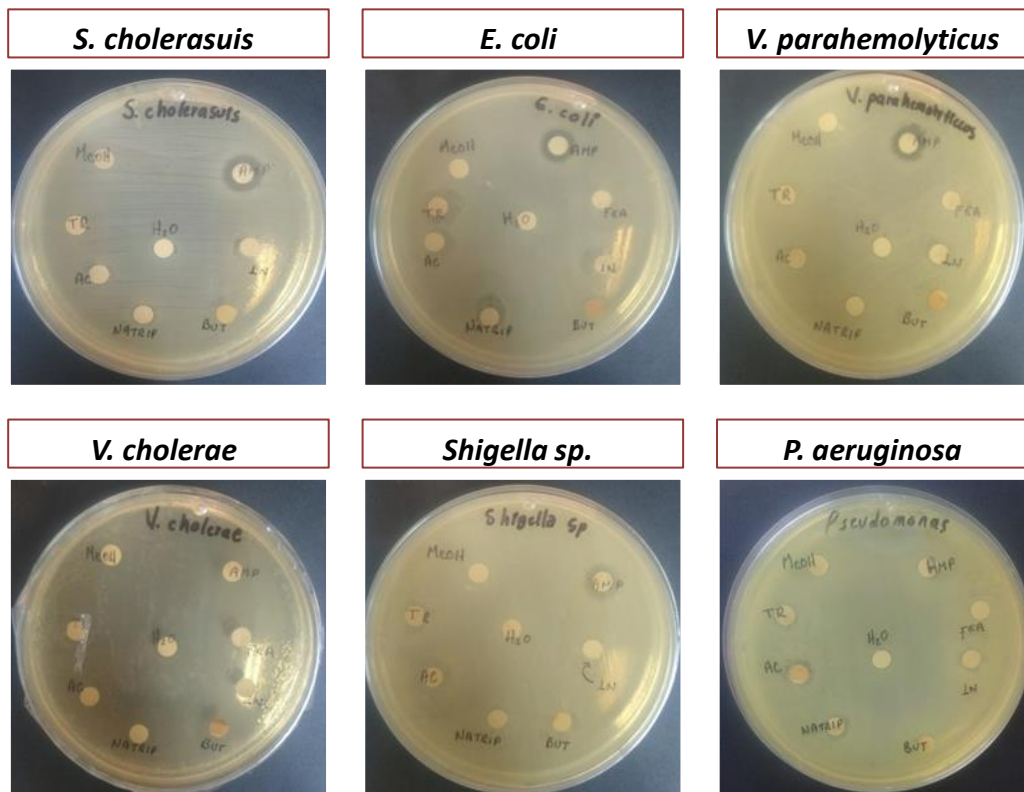


Figura 29b: Antibiograma con bacterias Gram negativas.

Tabla 7: Halos de inhibición producidos por las tres fracciones: 3 (IN), 4 (BUT), 7 (NATRIP)

Compuesto	Halos de inhibición en mm para cada bacteria												
	<i>S. agalactiae</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>M. luteus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>E. coli</i>	<i>parahaemolytic</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>Shigella sp</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. marcescens</i>
N-acetil-triptamina (NATRIP)	20	17	15	14	29	0	0	8*	0	0	0	0	20
Metil fenetilbutanamida (BUT)	0	0	0	9	0	0	9*	7*	0	10	0	0	7
Indol (IN)	0	0	0	0	0	0	8	7*	0	8	0	0	0
Vancomicina (VAN)	27	19	35	16	32	0							
Ampicilina (AMP)							10	9	10	0	7*	0	35
Nota:	* = bacteriostático												

Para la evaluación del efecto antifúngico se utilizaron los hongos: *Moniliophthora roreri*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp*. Estos son hongos fitopatógenos que causan graves afecciones en plantas como por ejemplo cacao, café y jitomate, las cuales pueden conducir a grandes pérdidas económicas en la agricultura. Por esta razón el estudio de la actividad antifúngica de los compuestos obtenidos contra estos hongos es importante y podría ser de gran ayuda en la búsqueda de nuevos antifúngicos naturales.

Para cada diana (fitopatógeno) las pruebas se hicieron por cuadruplicado en microplacas de cultivo tanto para el blanco como para los compuestos a estudiar. El medio de cultivo utilizado fue PDA (Agar Papa Dextrosa), se usó una solución salina (SS) estéril y los compuestos a estudiar (Indol y N-acetil triptamina) se prepararon a una concentración de 1 mg/mL.

Todo el material debe ser estéril y todo el procedimiento se hace en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero Bunsen). En la microplaca cada diana debe tener un blanco de referencia. Se prepararon 1400 µl en total de cada solución, a cada pozo de la microplaca se agregaron 300 µl y se

dejó solidificar. Con un transfer se tomó parte del micelio periférico del hongo y se colocó sobre el medio de cultivo. Posteriormente todos los cultivos se incubaron en una estufa a 29 °C y la lectura se hizo a las 24 y 48 horas (Tabla 8). Es importante mencionar que esta prueba solo se hizo con el Indol y con la N-acetil triptamina ya que para estas pruebas se necesitan como mínimo 5 mg de cada compuesto y después de utilizar la 3-metil-N-fenetil butanamida en los antibiogramas solo quedó 1 mg por lo que no fue posible realizar dicha prueba.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 9: resultados de la inhibición de los compuestos en hongos.

A las 24 hrs	Indol	N-acetiltriptamina	A las 48 hrs	Indol	N-acetiltriptamina
<i>M. roreri</i>	0.00%	36.29%	<i>M. roreri</i>	23.31%	28.99%
<i>F. oxysporum</i>	0.00%	26.31%	<i>F. oxysporum</i>	6.92%	35.02%
<i>Alternaria</i>	0.00%	40.27%	<i>Alternaria</i>	30.37%	38.54%

De acuerdo con los resultados la N-acetiltriptamina tiene un mayor poder antifúngico en comparación con el Indol. Se asume que esta diferencia en la actividad antifúngica se debe al sustituyente que presenta la N-acetil triptamina en el anillo indólico ya que otros estudios demuestran que el potencial antifúngico es diferente para cada sustituyente.

5. Parte experimental

Medios de cultivo

Cepa ELI71 *Bacillus velezensis*

Se utilizó la cepa ELI71 que corresponde a *Bacillus velezensis* la cual fue inicialmente aislada de una muestra de tierra proveniente de Moyotepec, Morelos.

Agar LB (Luria Bertani)

El medio sólido utilizado para el aislamiento inicial de *B. velezensis* fue LB (Luria Bertani) el cual por cada litro contiene:

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agar nutritivo	16 g

La peptona, el cloruro de sodio y el extracto de levadura se disuelven en 1 L de agua destilada y se coloca en 4 matraces Erlenmeyer de 500 mL depositando en cada uno de ellos 250 ml del medio de cultivo, posteriormente se agregan 4 g de agar nutritivo a cada matraz. Se procede a la esterilización en autoclave bajo las siguientes condiciones: 20 min, 15 libras de presión, 120 °C. Pasado el tiempo de esterilización se vacían aproximadamente 20-25 ml del medio de cultivo en placas Petri en ambiente estéril (campana de flujo laminar y mechero Bunsen) y se dejan de 10-15 minutos a temperatura ambiente para permitir que el medio solidifique.

Caldo LB (Luria Bertani)

El medio de cultivo líquido utilizado fue Luria Bertani (LB) el cual por cada litro contiene:

Peptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Extracto de levadura	5 g

Estos ingredientes se disuelven en 1 L de agua destilada y se coloca en 4 matraces Erlenmeyer de 500 ml depositando 250 ml caldo de cultivo en cada uno. Se procede a la esterilización en autoclave bajo las siguientes condiciones: 20 min, 15 libras de presión, 120 °C. Pasado el tiempo de esterilización se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Agar Müeller Hinton

El medio sólido utilizado para el cultivo de *B. velezensis* para el antibiograma fue Müeller Hinton el cual por cada litro contiene:

Infusión de carne	300* g
Peptona de caseína H	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar bacteriológico	16 g

*: La infusión de carne es equivalente a 3 g de polvo

Por cada litro de agua destilada se suspenden 38 g del medio. Calentar con agitación suave hasta completa disolución del polvo y hervir durante 1 minuto. Se procede a la esterilización en autoclave bajo las siguientes condiciones: 120 °C a 15 libras de presión por 20 minutos. Pasado el tiempo de esterilización se vacían aproximadamente 20-25 ml del medio de cultivo en placas Petri en ambiente estéril (campana de flujo laminar y mechero Bunsen) y se dejan de 10-15 minutos a temperatura ambiente para permitir que el medio solidifique.

Tratamiento de la Amberlita XAD-16® (Sigma Aldrich)

La extracción de los metabolitos secundarios se hizo con la resina Amberlita XAD-16® la cual es un polímero no iónico e hidrofóbico en forma de pequeñas perlas blancas. Su estructura entrecruzada, su fase continua y porosa, así como su gran área superficial y naturaleza aromática le confiere la capacidad de adsorber moléculas hidrofóbicas de bajo y mediano peso molecular a partir de solventes polares.

Por cada 100 ml de medio de cultivo se agrega 0.5g de Amberlita. La Amberlita debe recibir un tratamiento previo antes de agregarse al medio para eliminar el exceso de sales de carbonato de calcio y permitir la formación de su estructura entrecruzada. Este consiste en un primer lavado con 60 ml de agua destilada estéril con una agitación constante durante 30 minutos, pasado este tiempo se decanta y se desecha el agua, se hace un segundo lavado con 60 ml de metanol, se agita durante 30 minutos, posteriormente se decanta, se retira el metanol y la Amberlita se agrega al medio de cultivo.

Crecimiento de la cepa

La cepa ELI71 se creció primeramente en una placa de medio sólido LB durante 24 horas a 29 °C, se observó su morfología macroscópica (colonias grandes, cerosas, color crema, bordes irregulares) y se analizó cuidadosamente para corroborar que la placa estaba libre de contaminación por otras bacterias u hongos.

Extracción de los metabolitos secundarios

En condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero Bunsen) se inoculó en el medio de cultivo líquido LB y se agregó la Amberlita. El cultivo se incubó en una estufa a 29 °C y con una agitación orbital de 200 rpm durante 7 días, esto con el objetivo de que la cepa llegue a su fase estacionaria y excrete los metabolitos secundarios, que serán adsorbidos por la Amberlita.

Después de este tiempo, se recuperó la Amberlita por decantación y se colocó en un vaso de precipitado con 60 ml de metanol con agitación constante durante 20 min aproximadamente, hasta que la Amberlita quedó de color blanco nuevamente y el metanol adquirió un color café claro. Este metanol se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm con el propósito de obtener un sobrenadante casi libre de células bacterianas. El sobrenadante, se colocó en matraz de bola para evaporar hasta tener aproximadamente 10 ml del extracto, el cual se filtró con membranas de 0.45 μm para eliminar esporas y células. Se evaporó nuevamente hasta obtener aproximadamente 1 ml del extracto y se colocó el extracto en recipientes individuales etiquetados los cuales se secaron en la estufa durante 24 h a 29 °C. Pasado este tiempo se verificó que los residuos estuvieran completamente secos. Se rasparon los residuos del recipiente para obtener el extracto el cual se guardó en tubos rotulados

Fraccionamiento general del extracto seco mediante cromatografía en columna

El extracto obtenido se aplica a una columna cromatográfica usando gel de sílice como fase estacionaria y como fases móviles diferentes eluyentes de diferente polaridad (diferentes disolventes) tales como: Hexano, acetato de etilo, diclorometano y metanol. Se hace cromatografía en placa fina de cada una de las fracciones obtenidas y en base a las bandas observadas con luz UV y estudios realizados previamente en el laboratorio se eligieron 3 fracciones a las cuales se les realizó una caracterización y purificación. En este estudio las fracciones seleccionadas fueron: fracción 3, 4 y 7.

Purificación

La purificación de las fracciones 3, 4, 7 se hizo por cromatografía en columna, utilizando una columna cromatográfica cuya fase estacionaria fue gel de sílice y como fase móvil sistemas de elución diferentes para cada fracción.

Identificación de compuestos orgánicos

De las fracciones obtenidas, las de mayor interés son aquellas que presentan actividad antibacteriana y antifúngica por lo que a estas fracciones se les realizan diferentes análisis mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas: RMN ^1H , RMN ^{13}C , COSY, HSQC, APT. Mediante estas técnicas se puede elucidar e identificar la estructura química del compuesto presente en cada fracción, responsable de la actividad antibacteriana y/o antifúngica.

Evaluación del efecto antibacterial de los metabolitos extraídos de la cepa de *Bacillus velezensis*

Las bacterias utilizadas fueron: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens*, *Shigella* sp, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Estos microorganismos se incubaron en 3 mL de caldo LB, a una temperatura de 29 °C con agitación constante a 200 revoluciones por minuto (rpm) durante 24 h, para alcanzar una densidad celular aproximada de 1×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. De la suspensión se sembraron (por estría masiva) 100 μl en cajas Petri de 100 x 15 mm con agar Müller Hinton.

15 mg de cada fracción de interés (3, 4 y 7) obtenida mediante cromatografía en columna se disolvió en 100 μl de MeOH, discos estériles de papel filtro se impregnaron con 5 μl de la solución anterior (0.75 mg), estos discos se colocaron en las placas que fueron inoculadas con las diferentes bacterias y se dejan en incubación a 29 °C durante 24 horas. Como controles negativos se utilizaron dos discos de papel filtro uno con 5 μl de agua y otro con 5 μl de metanol y como control positivo discos con Vancomicina (para Gram positivas) y Ampicilina (para Gram negativas). Los halos de inhibición del crecimiento alrededor de los discos se miden a las 24 horas de incubación.

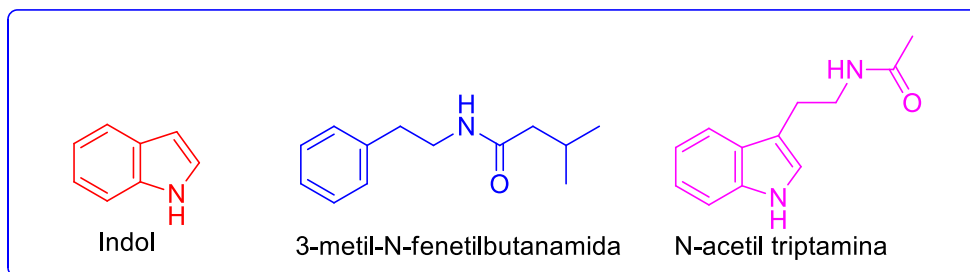
Evaluación del efecto antifúngico de los metabolitos extraídos de la cepa de *Bacillus velezensis*

Para esta prueba se utilizaron los siguientes hongos: *Moniliophthora roreri*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp.* Para la evaluación del efecto antifúngico se utilizaron los hongos: *Moniliophthora roreri*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria sp.* Para cada diana (fitopatógeno) las pruebas se hicieron por cuadruplicado en microplacas de cultivo tanto para el blanco como para los compuestos a estudiar. El medio de cultivo utilizado fue PDA (Agar Papa Dextrosa), se usó una solución salina (SS) estéril y los compuestos a estudiar (Indol y N-acetilriptamina) se prepararon a una concentración de 1 mg/mL.

Todo el material debe ser estéril y todo el procedimiento se hizo en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero Bunsen). En la microplaca cada diana debe tener un blanco de referencia. Se preparan 1400 µl en total de cada solución, a cada pozo de la microplaca se agregaron 300 µl, es decir 0.3 mg de cada compuesto y se dejó solidificar. Con un transfer se tomó parte del micelio periférico del hongo y se colocó sobre el medio de cultivo. Se incubó en una estufa a 29 °C y la lectura se hizo a las 24 y 48 horas.

6. Conclusiones

- Se obtuvo un extracto crudo de la cepa de *B. velezensis* ELI71.
- Se logró separar diferentes fracciones por cromatografía en columna en el de sílice.
- Se lograron identificar y caracterizar tres compuestos de tres fracciones diferentes, llamados Indol, 3-metil-N-fenetilbutanamida y N-acetil triptamina.



- Se realizaron pruebas biológicas de inhibición del crecimiento con los tres compuestos en bacterias y hongos, mostrando un mayor poder inhibitorio de la N-acetil triptamina hacia bacterias gram positivas y hongos fitopatógenos. Esto podría ser debido a que el grupo indólico necesita del sustituyente para mostrar mayor poder inhibitorio.

7. Referencias

1. Karlovsky, P. (2008), *Secondary Metabolites in Soil Ecology*. Berlin, Heidelberg, Springer. pp 1–19. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-540-74543-3>
2. Vining, L. C. (1990, Octubre). *FUNCTIONS OF SECONDARY METABOLITES*. Annual Review of Microbiology, 44 (1), pp. 395 – 427.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.002143>
3. Raaijmakers, J.M. and Mazzola, M. (2012, Septiembre) *Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria*. Annual Reviews of Phytopathology, 50 (1), pp. 403 - 424.
DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>
4. Sansinenea, E. and Ortiz, A. (2011, Agosto 29). *Secondary metabolites of soil Bacillus spp.* Biotechnol Lett, 33, pp. 1523 - 1538.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0617-5>
5. Hayat, R., Ali, S. and Amara, U. (2010, Julio 29) *Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review*. Annals of Microbiology, pp 60-79. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
6. Ongena, M. and Jaques, P. (2008, Marzo). *Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol*. Trends in Microbiology, 16 (3), pp 115 - 125. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
7. Wu, L., Wu, H., Qiao, J., Gao, X. and Borriss, R. (2015). *Novel Routes for Improving Biocontrol Activity of Bacillus Based Bioinoculants*. Front Microbiol, 10 (6), pp 6 - 1395. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01395>
8. Kaushik, N. K., et al. (2013, Junio 6). *Biomedical Importance of Indoles*. Molecules, 18 (6), pp. 6620 - 6662. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules18066620>
9. Jones, R. S. (1982, June 3) *Tryptamine: a neuromodulator or neurotransmitter in mammalian brain?* Progress in Neurobiology, 19 (1-2), pp. 117 - 139. DOI: [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(82\)90023-5](https://doi.org/10.1016/0301-0082(82)90023-5)
10. Yuwen, L., Zhang, F. L., Chen, H. Q., Lin, S. J., Zhao, Y. L. and Li, Z. Y. (2013). *The role of aromatic L-amino acid decarboxylase in bacillamide C biosynthesis by Bacillus atrophaeus C89*. Scientific reports. 3, pp. 1753. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep01753>

11. Williams, B.B. et al. (2014, Octubre 8). *Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine*. Cell Host Microbe, 16 (4), pp. 495 - 503.
DOI: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.chom.2014.09.001>
12. Jones, R. S. (1982, June 3) *Tryptamine: a neuromodulator or neurotransmitter in mammalian brain?* Progress in Neurobiology, 19 (1-2), pp. 117 - 139. DOI: [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(82\)90023-5](https://doi.org/10.1016/0301-0082(82)90023-5)
13. Abramovitch, R.A. and Shapiro, D. (1956). Triptaminas, carbolines, and related compounds. Part II. A convenient synthesis of triptaminas and β -carbolines. Journal of the Chemical Society, (0), pp. 4589 - 4592.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/JR9560004589>
14. Brunton, L.L. (Ed) (2006). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics* (11th ed.). McGraw-Hill Medical Publishing Division. pp. 533 - 538.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1036/0071422803>
15. Nichols, D.E. (2004). *Hallucinogens*. Pharmacology & Therapeutics, 101 (2), pp. 131 - 181. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.11.002>
16. Stolerman, I.P. and Price, L.H. (2015). Encyclopedia of Psychopharmacology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.p. 113. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-36172-2>
17. Yu, L., Hu, Z. and Ma, Z. (2015, Febrero 03) *Production of bioactive tryptamine derivatives by co-culture of marine Streptomyces with Bacillus mycoides*. Natural Product Research, 29 (22), pp. 2087 - 2091. DOI: <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1005619>
18. Jeong, S. Y., Ishida, K., Ito, Y., Okada, S. and Murakami, M. (2003, Octubre 20). *Bacillamide, a novel algicide from the marine bacterium, Bacillus sp. SY-1, against the harmful dinoflagellate, Cochlodinium polykrikoides*. Tetrahedron Letters, 44 (43), pp. 8005 - 8007.
DOI: <https://www.researchgate.net/deref/http%3A%2F%2Fdx.doi.org%2F10.1016%2Fj.tetlet.2003.08.115>
19. Yu, L.L., Li, Z. Y., Peng, C. S., Li, Z. Y. and Guo, Y. W. (2009, Marzo 25). *Neobacillamide A, a Novel Thiazole-Containing Alkaloid from the Marine Bacterium Bacillus vallismortis C89, Associated with South China Sea Sponge Dysidea avara*. Helvetica Chimica Acta, 92 (3), pp. 607- 612.
DOI: <https://doi.org/10.1002/hlca.200800349>

20. Zhang, F. et al. (2019, Febrero 20). *Biosynthesis in vitro of bacillamide intermediate-heterocyclic AlaCys_{thiazole} by heterologous expression of nonribosomal peptide synthetase (NRPS)*. Journal of Biotechnology, 292, pp. 5 - 11.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.11.024>
21. Figueira, V. B. C., Prabhakar, S. and Lobo, A. M. (2005, Mayo 15). *Synthesis of the algicide bacillamide*. ARKIVOC, 2005 (14) 14-19.