



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
COMPUESTOS NATURALES EN *Bacillus megaterium*”**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Maestría en Ciencias Químicas

PRESENTA:

ANDREA CALDERÓN VILLEGAS

Director

Dra. Estibaliz Sansinenea Royano

Co-Asesor

Dr. José Aurelio Ortiz Márquez

H. PUEBLA DE Z, 2022

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Productos naturales y su papel en la naturaleza	5
2.2 Género Bacillus como productor de metabolitos secundarios	7
2.3 Bacillus megaterium y su potencial en la producción de metabolitos secundarios	8
2.4 Polihidroxicanoatos una solución verde a la problemática actual de los plásticos	10
3. OBJETIVOS	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5. PARTE EXPERIMENTAL	27
6. CONCLUSIONES	30
7. BIBLIOGRAFÍA	31

RESUMEN

En este trabajo se realiza una búsqueda de compuestos naturales en una bacteria específica llamada *Bacillus megaterium*, la cual ha sido reconocida por tener un gran potencial para la producción de metabolitos secundarios que poseen actividad biológica, y que pueden ser aprovechados por el ser humano en diferentes campos como el sector salud y el sector industrial. Se logró aislar e identificar compuestos de tipo polihidroxicarboxilatos.

1- INTRODUCCIÓN

El término producto natural ha sido utilizado desde finales del siglo XVIII hasta nuestros días, ya que desde ese tiempo se usaban procedimientos químicos para la extracción, aislamiento y caracterización estructural de las sustancias. Este

término se puede definir como cualquier sustancia aislada de organismos vivos, ya sean plantas, animales, hongos o bacterias. También se les ha denominado sustancias o compuestos secundarios, que no son esenciales para la supervivencia del microorganismo y se originan a partir del metabolismo secundario, y con el fin de enfatizar su origen biosintético se les ha llamado igualmente metabolitos secundarios.¹

Actualmente la búsqueda de compuestos naturales es cada vez más popular, ya que representan una buena alternativa para combatir problemáticas que parecen cada vez más difíciles de sobrellevar, como lo son los microorganismos patógenos que presentan resistencia a los antibióticos ya conocidos. Esta problemática ha obligado a que la sociedad busque nuevas opciones, que ahora tienen otros requerimientos, además de ser funcionales deben ser amigables con el medio ambiente ya que la sociedad se preocupa cada vez más por temáticas ambientales. Muchos de los productos naturales obtenidos de plantas y microorganismos cumplen con estas funciones, por lo que la implementación de este tipo de búsquedas es una opción favorable para diferentes problemáticas sociales.

Los estudios que se han realizado acerca de productos naturales en su mayoría son de plantas, ya que durante muchos años la ciencia se centró en estos organismos por los buenos resultados que se obtenían, sin embargo, se ha visto y demostrado que microorganismos como hongos y bacterias brindan resultados igual de eficientes que las plantas, por lo que es una excelente opción dirigir diferentes esfuerzos para estudiar este tipo de microorganismos prometedores.

La búsqueda de estos compuestos comienza con el aislamiento de la bacteria específica para llevarla a la producción de metabolitos secundarios, seguida de una purificación exhaustiva de estos para lograr obtener un extracto puro, el cual debe ser analizado con diferentes métodos espectroscópicos para llegar a una caracterización adecuada que permita la identificación de la molécula de interés biológico.

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. Entre los productos naturales, los polihidroxicanoatos han sido reportados como los plásticos verdes biosintetizados por bacterias como *Bacillus* sp.

En trabajos previos del laboratorio se obtuvo un extracto crudo de una cepa de *Bacillus megaterium* ELI24 que incluso mostró tener ácido succínico. El objetivo de este proyecto es extraer otros metabolitos secundarios de la cepa de *Bacillus megaterium* ELI24; para ello se realizará una separación cromatográfica en columna de gel de sílice con diferentes sistemas de mezcla de disolventes como eluyentes. De aquellas fracciones interesantes, se purificarán e identificarán diferentes compuestos orgánicos. Entre todos los compuestos se pretende extraer, purificar e identificar compuestos de tipo polihidroxicanoatos.

2- ANTECEDENTES

2.1- Productos naturales y su papel en la naturaleza

Para que una sustancia sea considerada bajo el término de producto natural, debe ser proveniente del metabolismo secundario de un organismo vivo como respuesta a estímulos externos, por ejemplo; estrés térmico, estrés hídrico, exceso de población o radiación. En general estas son respuestas ante situaciones como patógenos, plagas o simbiosis con otros organismos. El origen de la producción de estas sustancias ha sido ampliamente discutido y se tienen varias teorías del por

qué algunos organismos son más propensos a producir estos metabolitos que otros. De forma general se ha aceptado la idea de que su producción está relacionada con la supervivencia del mismo organismo, ya sea para ayudarse a sí mismo con tareas indispensables como la obtención de alimento o para alejar a otros organismos que compiten en un espacio en común. Por ejemplo, algunos flavonoides de plantas atraen, por medio de quimiotaxis, es decir atracción ejercida por ciertos compuestos hacia los mismos, a varias rizobacterias que intervienen en procesos como la fijación de nitrógeno, promoviendo así el desarrollo de la planta y de especies cercanas.²

En su mayoría los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular y de naturaleza química diversa, y debido a sus propiedades se han utilizado con diferentes fines como; fármacos, cosméticos, insecticidas entre otros. Algunos ejemplos son terpenoides, alcaloides, agliconas, glicósidos y flavonoides. También se han encontrado compuestos de alto peso molecular como péptidos, glicopéptidos y proteínas que se forman bajo circunstancias determinadas y no son producto del metabolismo primario.³

Los productos naturales permiten el intercambio de información entre los seres vivos, y presentan una o varias actividades biológicas. Tienen la capacidad de penetrar en los ambientes celulares de otros organismos para interactuar con un receptor, el cual generalmente es una proteína, un ácido nucleico o una membrana lipídica, con el fin de generar una respuesta favorable o desfavorable en el metabolismo del receptor.⁴

La importancia de estudiar distintos productos naturales viene de la gran diversidad estructural que presentan estas sustancias, lo cual les confiere la capacidad de desatar diferentes respuestas con actividad biológica. Estas situaciones forman parte de un delicado equilibrio natural, donde la ausencia o presencia de los productos naturales correlaciona un balance entre el organismo productor y el receptor.⁵

Actualmente se cuentan con innumerables casos estudiados en donde se prueba la virtud de los productos naturales. Un ejemplo conocido es la producción de

sustancias antibióticas por parte de *Streptomyces clavuligerus*, una bacteria Gram positiva que produce Inhibidores de beta-lactamasas como el ácido clavulánico, antibióticos beta-lactámicos como la cefamicina C y las clavamas y antibióticos no beta-lactámicos como la halomicina, como se muestra en la figura 1. La producción de sustancias antibióticas por parte de microorganismos como bacterias y hongos tiene mucho sentido al pensar que estos organismos están en constante competición con otros microorganismos por su propia supervivencia, ventaja que el hombre ha sabido aprovechar para la obtención de fármacos eficientes. ⁶

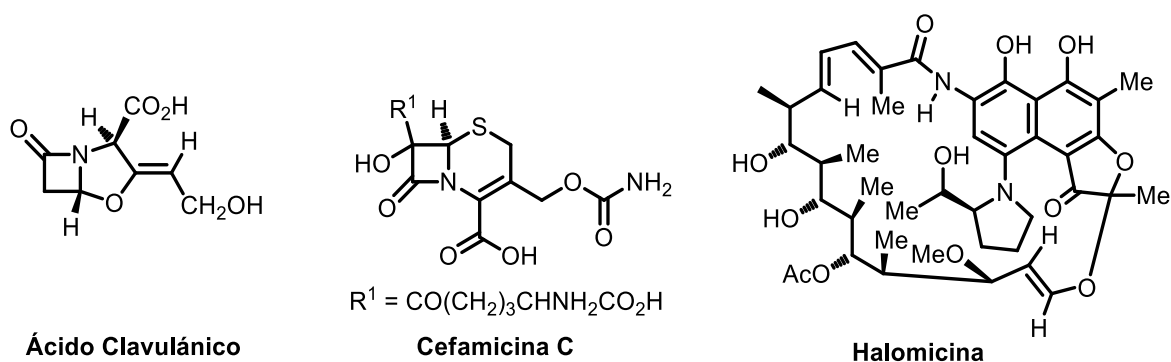


Figura 1. Inhibidores de beta-lactamasas

Además, los productos naturales se han aprovechado para diferentes usos en la industria alimenticia, cosmética, industria de polímeros entre otras. Por todo lo anterior mencionado se puede entender que el papel que juegan los productos naturales o metabolitos secundarios en la naturaleza es muy diverso. Hasta la fecha se ha estudiado apenas un pequeño porcentaje del mar de opciones que representan, sin embargo, se puede concluir que la producción de estas sustancias es de vital importancia para mantener un control ecológico en muchos ecosistemas, y para el ser humano brindan alternativas prometedoras para la resolución de problemáticas actuales y futuras.

2.2- Género *Bacillus* como productor de metabolitos secundarios

El género *Bacillus* fue reportado por primera vez por Cohn en 1872, quien lo describió como un grupo de bacterias capaces de producir endosporas resistentes

al calor. Entre las características del género *Bacillus* destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, Gram positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10 µm), su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 30 y 45 °C).

Actualmente se han reportado más de 336 especies de *Bacillus*, dos especies destacan por ser patógenos para el ser humano, los cuales son *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*. Por otro lado, algunas de las especies más representativas como una alternativa de control biológico y aprovechamiento industrial son; *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* entre otros.⁷

Las especies de *Bacillus* tienen la capacidad de formar endosporas, esta es una característica que les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats, tanto en ambientes terrestres como acuáticos e incluso en ecosistemas con condiciones de clima extremos, esto ha provocado que estas especies estén ampliamente distribuidas a nivel mundial. Pese a que se pueden encontrar *Bacillus* en diferentes ecosistemas, el terrestre se considera su principal reservorio.⁸

El género *Bacillus*, se ha visto como una buena opción para la obtención de productos naturales, ya que su desarrollo es relativamente sencillo, además que se han reportado diversos tipos de metabolitos secundarios con actividades diferentes que pueden ser aprovechados.⁹ 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. 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. 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.¹⁰ En la siguiente Figura 2 se observan algunas de las estructuras de los compuestos encontrados en diferentes especies del género *Bacillus*.

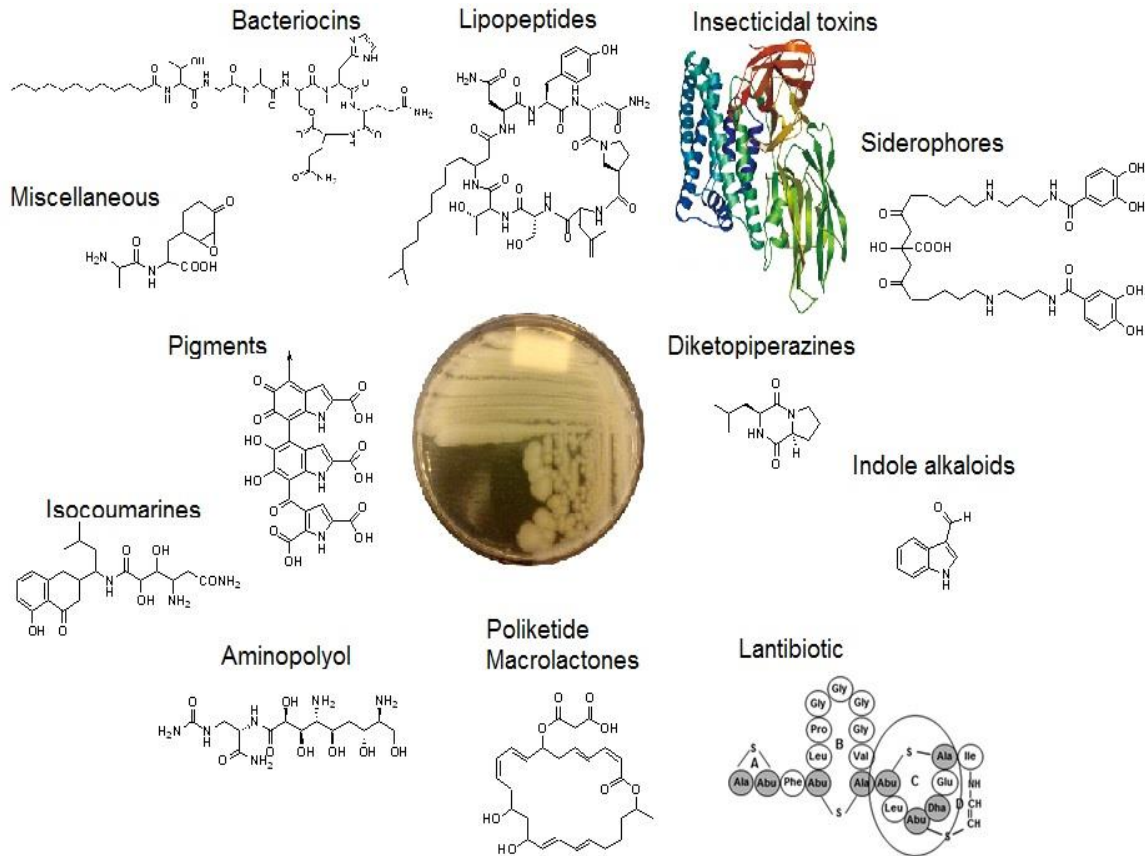


Figura 2. Estructuras de los compuestos encontrados en *Bacillus*

2.3- *Bacillus megaterium* y su potencial en la producción de metabolitos secundarios

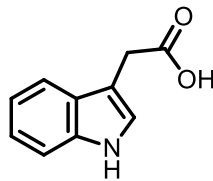
Bacillus megaterium es una bacteria Gram positiva aerobia, fue descrita por De Bary por primera vez en 1884, quien la denominó como “la gran bestia” debido a su gran tamaño celular, es uno de los microorganismos más grandes, midiendo aproximadamente 4 x 1.5 μm , por ello recibe el nombre de megaterium. Debido a su gran tamaño y su producción de esporas, ha sido aprovechada para la realización de estudios morfológicos, tales como la biosíntesis de la pared celular y la membrana citoplasmática, la esporulación, estructura de las esporas y la organización celular, la partición de ADN y la localización de proteínas. También se ha caracterizado por ser ubicua y presentar altos niveles de resistencia intrínseca a condiciones hostiles, incluyendo altas concentraciones de salinidad y exposición a metales. ¹¹



Figura 3. *Bacillus megaterium*

Desde hace más de 50 años se ha sabido aprovechar el conjunto de ventajas que presenta *Bacillus megaterium* a nivel industrial. Por ejemplo, se ha señalado a esta especie como uno de los primeros productores biotecnológicos de vitamina B12, debido a su capacidad de sintetizar esta vitamina tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. También se reportó que *Bacillus megaterium* tiene la capacidad de sintetizar ácido indol acético (AIA) (Fig. 3) que es un promotor del crecimiento celular de *Phaseolus vulgaris* o mejor conocida como la planta del frijol.

12



Ácido indol acético

Figura 4. Molécula promotora del crecimiento celular

Un estudio realizado en 2016 probó la capacidad de mejora industrial en *Bacillus megaterium*, se propuso la utilización de esta bacteria para aumentar la fuerza y resistencia del concreto clásico, se probaron diferentes diluciones del

microorganismo hasta encontrar la cantidad óptima para este propósito, a pesar de que en el estudio no se menciona la caracterización de metabolitos secundarios propios de la bacteria, se sabe que el aumento en la resistencia del material es causado por una serie de sustancias provenientes de *Bacillus megaterium*.¹³

Los usos que se le puede dar al aprovechamiento de *Bacillus megaterium* son diversos. En la agricultura se ha usado por su propiedad de solubilizar el fosfato utilizando esta bacteria como un buen biofertilizador mejorando el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Esta propiedad de solubilizar fosfatos ha sido asociada con la liberación de pequeños ácidos orgánicos de bajo peso molecular tal como el ácido succínico que fue aislado de esta bacteria por el grupo de trabajo.¹⁴ Estos ácidos a través de los grupos carboxilo e hidroxilo quelatan los cationes, sobre todo el calcio, unidos a los fosfatos convirtiéndolos en formas solubles.

2.4- Polihidroxicanoatos una solución verde a la problemática actual de los plásticos

Los plásticos son materiales poliméricos utilizados en casi todas las industrias manufactureras, siendo muy usados como materiales de empaquetamiento debido a su flexibilidad y resistencia química. Son producidos en gran magnitud y debido a su poca reciclabilidad se acumulan en cantidades muy tóxicas convirtiéndose en un gran contaminante ambiental¹⁵. Esto ha generado gran preocupación hasta el punto de limitar el uso de bolsas de plástico y otros utensilios de plástico. Por ello se buscan alternativas a los plásticos convencionales que tengan los mismos beneficios, pero sin la basura ambiental.

En este contexto, los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres, producidos en la naturaleza por numerosos microorganismos, que se almacenan dentro de las células sirviendo de fuente de energía y carbono. Más de 150 monómeros diferentes pueden ser combinados para obtener materiales con propiedades extremadamente diferentes. Los PHA son termoplásticos que pueden ser procesados y que tienen la gran ventaja de ser biodegradables sin poseer efectos en la salud, lo cual los hace una solución verde en la fabricación de plásticos^{16,17}. Los PHAs tienen un amplio rango de aplicaciones y se están utilizando en muchos sectores sobre todo en el

sector biomédico¹⁷. Sin embargo, también tienen algunas desventajas que limitan su uso como son propiedades mecánicas pobres, funcionalidades limitadas y alto costo de producción.

Para reducir costos de producción se han utilizado materiales de desecho como fuentes de carbono para una producción microbiana eficiente. Estos materiales pueden ser desechos de comida, desechos de las industrias de alimentos, aceite de cocina usado y un largo etcétera que abaratan el proceso.¹⁸⁻²¹ Sin embargo, hay que tener en cuenta que debido a la presencia de pequeñas impurezas al final del proceso podrían no ser óptimos para su uso en productos médicos. Los procesos de extracción también se han tratado de optimizar a nivel industrial.

Los PHAs son compuestos de almacenaje insolubles en agua que son sintetizados por microorganismos como gránulos bajo condiciones de estrés ambiental, como pueden ser, falta de alimento, altas o bajas temperaturas o radiación. Son poliésteres lineales que consisten en monómeros de ácido hidroxilo (HA) conectado por un grupo carboxilo de un monómero con el grupo hidroxilo de otro vecino²². Dependiendo del número de átomos de carbono en los monómeros, los PHAs se clasifican en dos grupos principales: PHAs de cadena corta y PHAs de cadena media, que a su vez pueden ser homopolímeros y copolímeros, tal y como se muestra en la Figura 4.

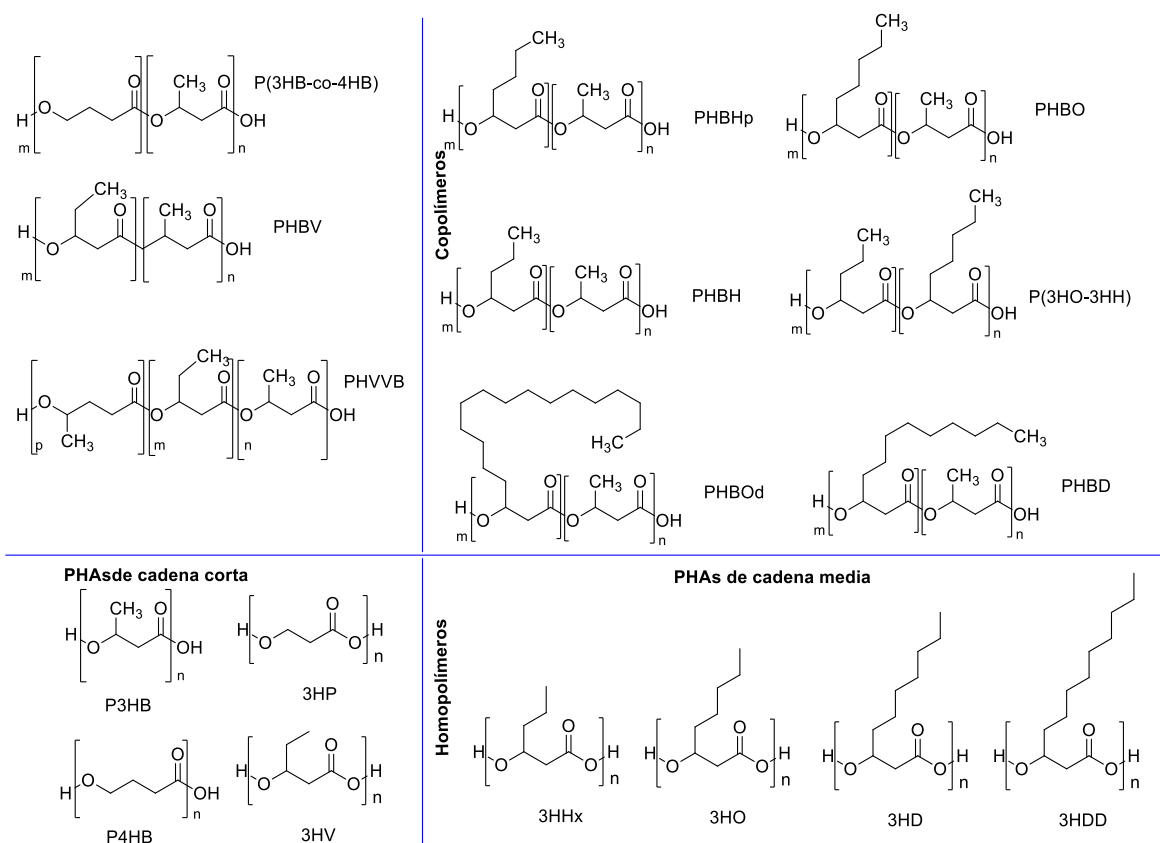


Figura 5. Estructura química de los PHAs

En general, los PHAs son biodegradables, aunque la biodegradación es afectada por el tipo y la composición del polímero, las condiciones ambientales y el tipo de microorganismo²³. Como son insolubles en agua tienen resistencia al ataque hidrofílico e incluso resistencia a la luz UV, y suelen ser solubles en cloroformo y otros solventes clorados. Sus temperaturas de fusión varían entre 40 °C y 180 °C.

Actualmente las rutas biosintéticas que usan los microorganismos para sintetizar este tipo de compuestos son conocidas. En general se puede decir que hay tres rutas metabólicas que generan los precursores de PHAs.^{24,25} Los PHAs de cadena corta como el PHB se sintetiza a través de la glucólisis de los azúcares para producir acetil coenzima A, aunque también pueden ser sintetizados por la ruta III a partir de fuentes de carbono simples como glucosa, fructosa, gluconato, glicerol, etanol y acetato, como se muestra en la Figura 5.

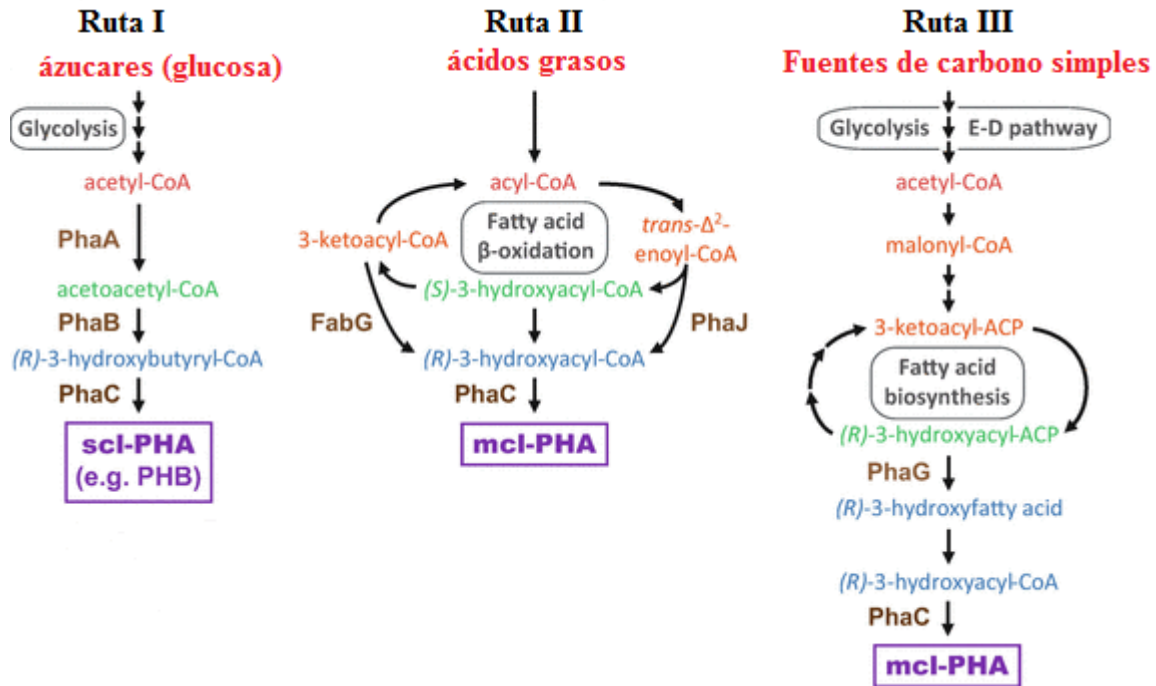


Figura 6. Rutas metabólicas involucradas en la síntesis de PHAs.

Debido a la versatilidad de los PHAs tienen un amplio rango de aplicaciones potenciales en el mercado (Figura 6). En los años recientes las compañías han mostrado interés en el uso de los PHAs en los sectores de empaquetamiento, uso médico y en la agricultura.



Figura 7. Productos fabricados con PHAs

En un inicio fueron empleados en la manufactura de los envases de cosméticos como son botellas de champú, en productos sanitarios y otros materiales. Sin embargo, debido a sus características especiales como son productos biodegradables, no tóxicos y su biocompatibilidad hacen que sean materiales muy prometedores en el campo biomédico ya que han sido empleados en los últimos años para fabricar productos cardiovasculares como válvulas de corazón, en el desarrollo de fármacos, como tabletas y en productos de manejo de heridas, como son hilos para suturar, así como en ortopedia con huesos fabricados con este material^{26,27}.

Su gran potencial de aplicaciones ha provocado un incremento en el mercado de los PHAs el cual ha crecido en los últimos años y se espera que siga creciendo en los siguientes años. En el mercado existen marcas registradas de algunos fabricantes como NodaxTM, BiocycleTM, BiomerTM, BioGreenTM, siendo Alemania, Italia, República Checa, Japón, China, USA y Canadá los países con un mercado más intenso.

Aunque los plásticos de origen microbiano son más ecológicos que los plásticos comunes, el principal problema que tienen es el alto costo de producción que está afectado por el tipo de fuente de carbono, proceso de fermentación y rendimientos de producción²⁸.

Una estrategia para reducir costos es trabajar con microorganismos hiperproductores. Otra estrategia es el utilizar material de desechos como fuentes de carbono²⁹. El utilizar materiales de desecho como fuentes de carbono ha reducido costos de producción, pero tiene el inconveniente de presentar impurezas produciendo variaciones en la composición de los materiales que hace que los rendimientos no sean siempre los óptimos y requieren procesos de purificación.³⁰

Los PHAs tienen algunas desventajas como son, propiedades mecánicas pobres, funcionalidades limitadas, alto costo de producción y susceptibilidad a la degradación térmica, por lo que sus aplicaciones son limitadas. Se debe de tener en cuenta que algunos polihidroxialcanoatos son amorfos y rígidos, poco elásticos. Con la intención de cambiar estas propiedades para encontrar mejores aplicaciones

los PHAs pueden ser expuestos a modificaciones que pueden ser transformaciones químicas y mezclas físicas.³¹

3- OBJETIVO

3.1- Objetivo general

Realizar la extracción, purificación e identificación de compuestos de tipo polihidroxicanoatos de la cepa de *B. megaterium* ELI24.

3.2- Objetivos particulares

- ❖ Se obtendrá un extracto crudo de un medio de cultivo inoculado con *B. megaterium* cepa ELI24.
- ❖ Del extracto crudo se procederá a separar y purificar metabolitos secundarios mediante cromatografías en columna de gel de sílice.
- ❖ 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- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención del extracto crudo y purificación en columna

Se seleccionó una cepa de *Bacillus megaterium* que se obtuvo de un suelo silvestre, el cual debió cumplir requisitos mínimos como un suelo limpio, lejos de fuentes de contaminación y cultivos.

La cepa se encuentra guardada en el cepario en forma de espora en palillo y primeramente se incubó durante 24 horas a 30 °C en una placa de tripticaseína de soya para tenerla limpia y pura. Posteriormente es incubada en el mismo medio pero líquido de tripticaseína de soya en matraces de 500 mL a 30°C y con una agitación constante de 180 rpm durante 7 días.

Al cumplirse el tiempo de incubación se procede a centrifugar a 6000 rpm durante 10 minutos con el fin de separar las células bacterianas del cultivo líquido por decantación.

Al sobrenadante se le realiza una extracción por triplicado con acetato de etilo en una relación 1:1 de volumen. Posteriormente la fase orgánica recolectada se seca con sulfato de sodio y se concentra a presión reducida (con rotavapor) obteniéndose un extracto crudo de aspecto viscoso de color marrón-amarillo de un olor penetrante en un rendimiento aproximado de 200 mg/L.

Este extracto sólido 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 y acetato de etilo (Tabla 1). Los sistemas empleados fueron los siguientes (Tabla 1).

FRACCIÓN	SISTEMA
1	hexano 100%
2	hexano 100%
3	hexano 98% acetato de etilo 2%
4	hexano 98% acetato de etilo 2%
5	hexano 96% acetato de etilo 4%
6	hexano 96% acetato de etilo 4%
7	hexano 94% acetato de etilo 6%
8	hexano 94% acetato de etilo 6%
9	hexano 92% acetato de etilo 8%
10	hexano 92% acetato de etilo 8%
11	hexano 90% acetato de etilo 10%
12	hexano 90% acetato de etilo 10%
13	hexano 85% acetato de etilo 15%
14	hexano 85% acetato de etilo 15%
15	hexano 80% acetato de etilo 20%
16	hexano 80% acetato de etilo 20%
17	hexano 75% acetato de etilo 25%
18	hexano 75% acetato de etilo 25%

Tabla 1. *Sistemas empleados para fraccionar el extracto crudo*

De este fraccionamiento se obtuvieron 18 fracciones, las cuales se analizaron en placas TLC para corroborar que las fracciones no fueran las mismas, en dado caso se debe seguir purificando el extracto hasta apreciar fracciones separadas. Se analizaron las fracciones individualmente y se purificó por completo la fracción seis.

4.2 Elucidación del compuesto

De la fracción seis se pudo identificar un compuesto de tipo polihidroxi butirato, llamado ácido 3-((3-((3-hidroxi butanoil)oxi)butanoil)oxi) butanoico (PHB) y con la estructura química que se muestra en la Figura 8. Se obtuvo como líquido viscoso y se pudo elucidar por los RMN de ^1H y ^{13}C junto con los de dos dimensiones.

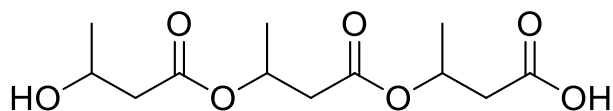


Figura 8. Estructura del compuesto PHB

En la figura se muestra el espectro de RMN de ^1H . Se observan cinco señales claras. En 6.63 ppm una señal ancha que integra para dos hidrógenos característica de grupos OH. En 5.34 ppm se observa una señal no definida que integra para 2 hidrógenos. En 4.25 ppm un múltiple que integra para un hidrógeno. Llama la atención las señales múltiples en 2.61-2.44 y 1.30-1.23 ppm que integran para seis y nueve hidrógenos respectivamente y que son claros de CH_2 y metilos respectivamente. Estas señales con las integraciones de seis y nueve hidrógenos hacen pensar en una molécula bastante repetitiva y probablemente polimérica.

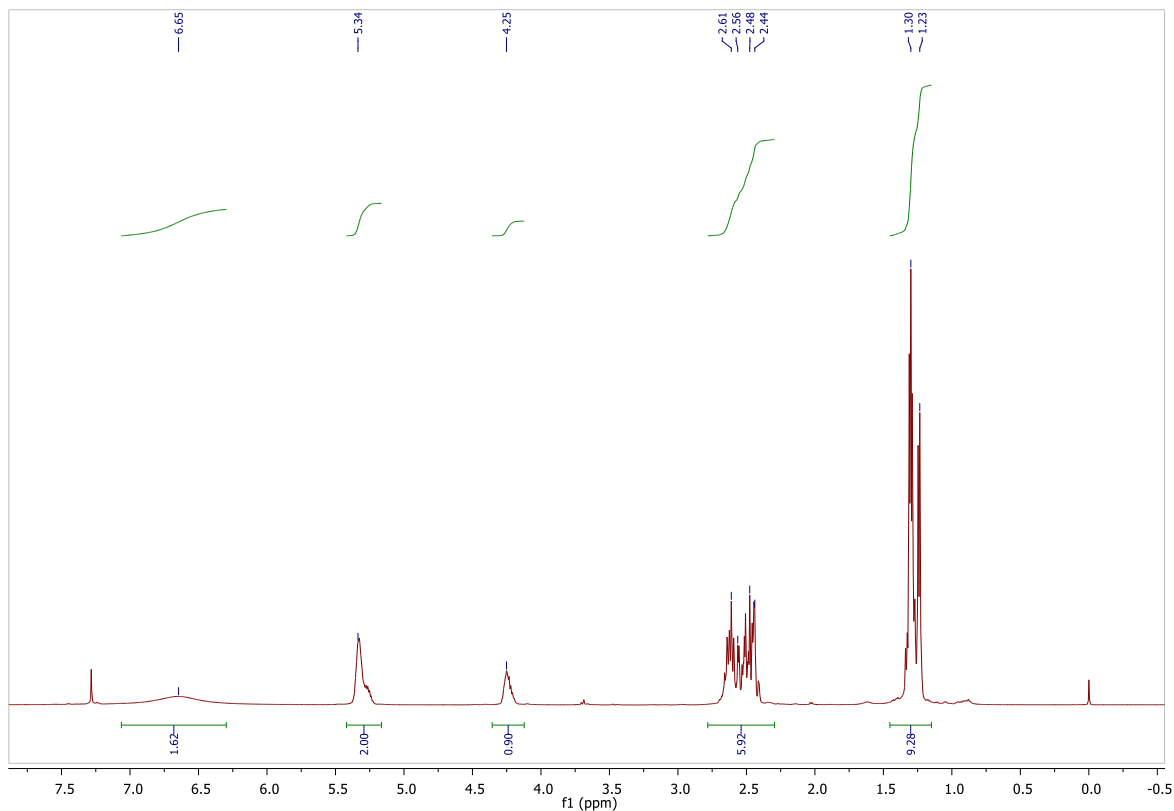


Figura 9. RMN de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del producto polihidroxicanoato.

En la figura 10 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C . Se pueden apreciar doce señales diferentes. Tres de estas señales se encuentran en 174.3, 171.5 y 169.6 ppm que son claramente señales de carbonos pertenecientes a grupos carbonilo. En 68.0, 67.7 y 64.5 ppm se encuentran tres señales que son ser CH. En 41.3, 40.7 y 40.3 ppm se observan tres señales que corresponden a metilenos. Finalmente en 22.4, 20.2 y 19.7 ppm tres señales que sugieren ser metilos. Las señales de los metilos y metilenos se encuentran más desplazadas a campo bajo de lo normal lo cual hace pensar en que tengan algún átomo electronegativo cerca, es decir un oxígeno.

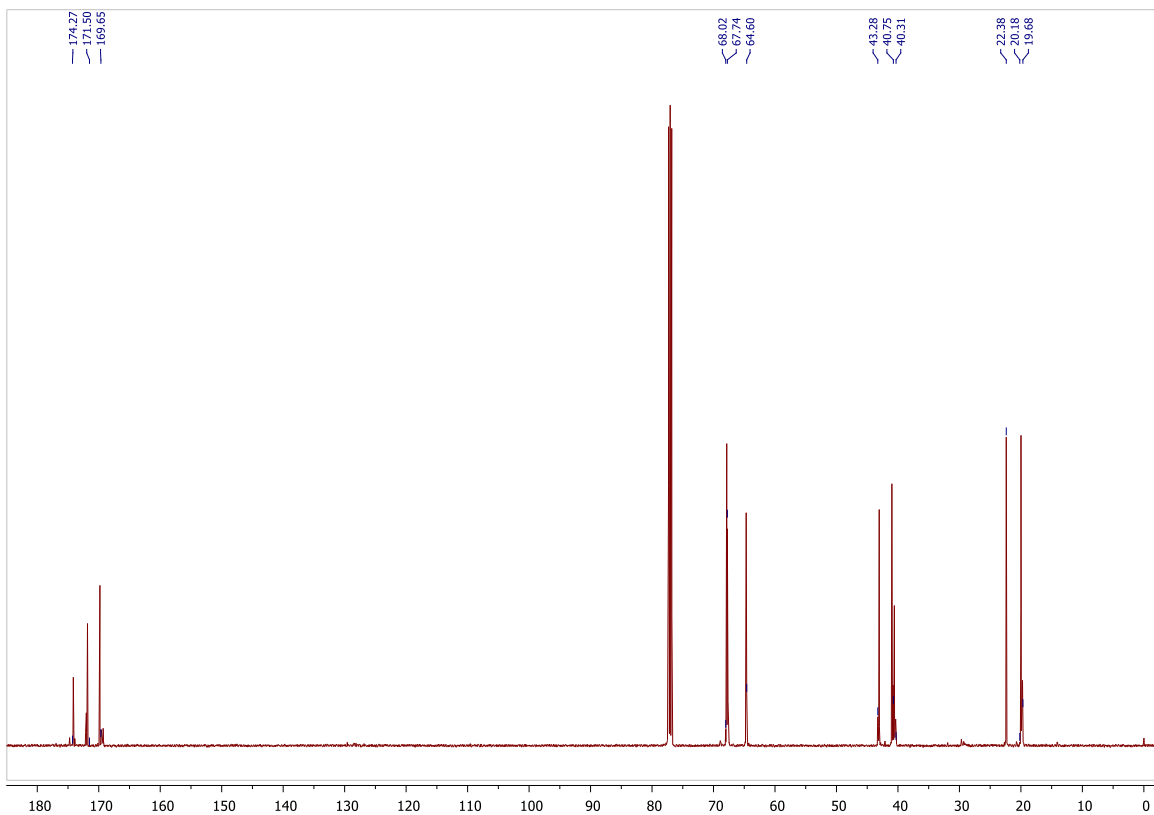


Figura 10. RMN de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del producto polihidroxicanoato.

Para poder establecer más claramente las señales si son CH o CH_2 se realizó un APT, como se observa en la figura 11, en donde los CH_2 se encuentran hacia abajo y los CH y CH_3 hacia arriba. Esto ayuda a establecer qué carbonos son CH_2 en la molécula.

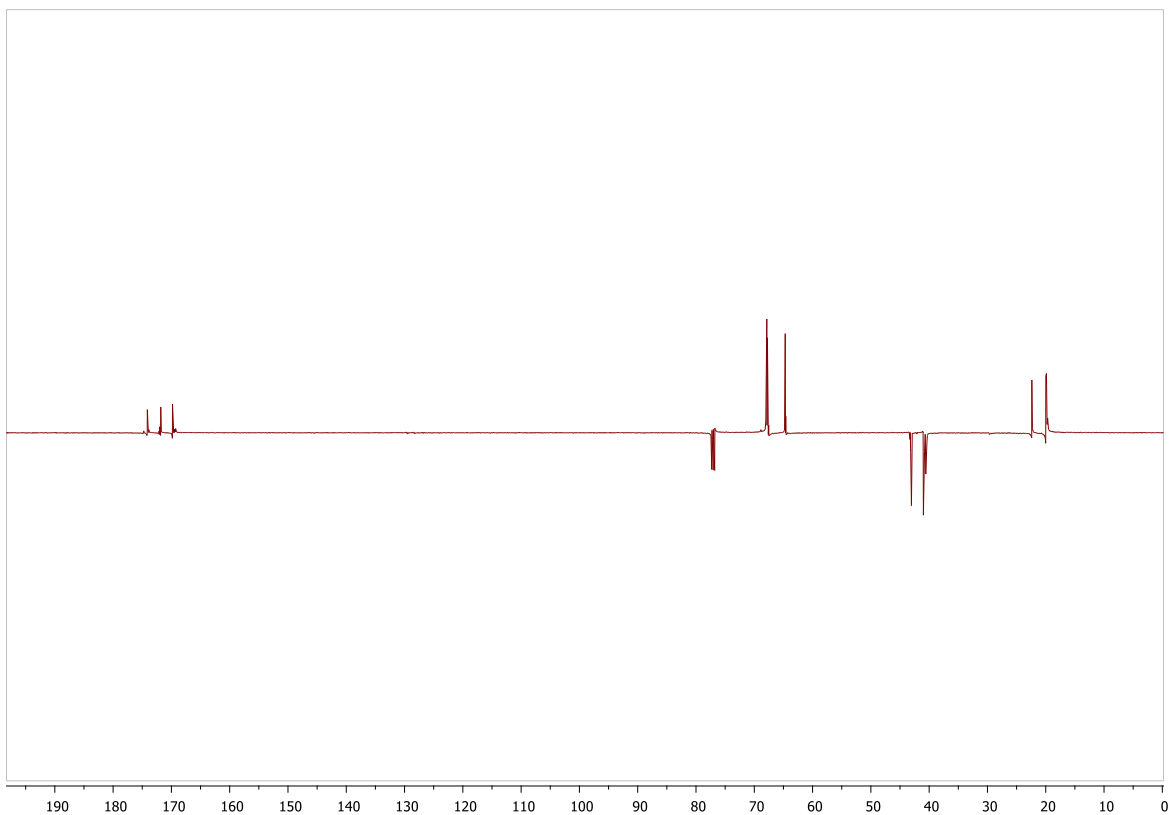


Figura 11. Espectro APT del producto polihidroxicanoato.

Para poder hacer una asignación inequívoca de los hidrógenos se procedió a obtener un espectro COSY, que se observa en la figura 12. Se puede observar que la señal en 5.34 ppm se acopla con los metilos que están en 1.30-1.23 ppm, pero al mismo tiempo se acopla con los CH₂ que se encuentran en 2.61-2.44 ppm. De la misma forma la señal que está en 4.25 ppm se acopla con los metilos y con los CH₂.

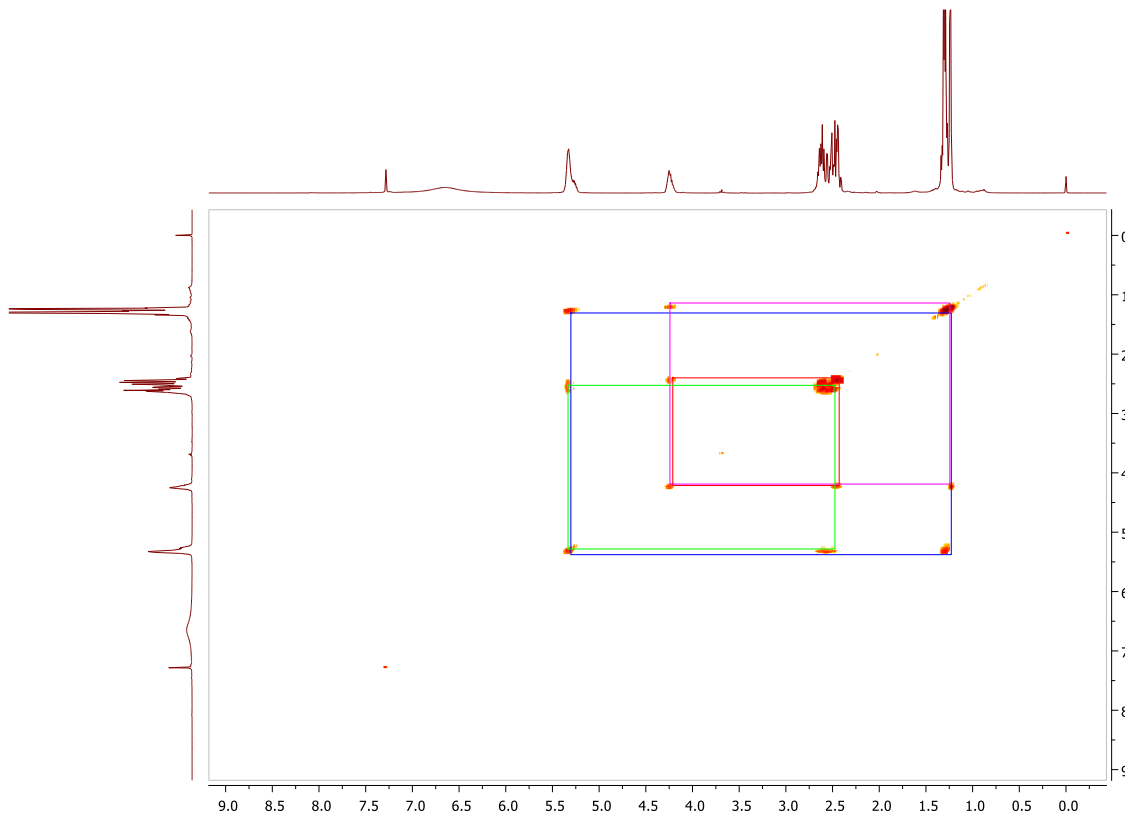


Figura 12. Espectro de RMN 2D COSY en CDCl_3 del producto polihidroxialcanoato.

Con la idea de asignar también de manera inequívoca los carbonos de la molécula se obtuvo el espectro de RMN 2D HSQC, como se muestra en la figura 13. Se pueden observar cómo las señales de hidrógeno que se encuentran en 2.61-2.44 ppm se acoplan con los carbonos que se encuentran en 41.3-40.3 ppm, lo que significa que esos carbonos se corresponden con los CH_2 . Asimismo, las señales de 5.34 y 4.25 ppm se acoplan con los carbonos de 68.0-67.7 y 64.5 ppm respectivamente lo cual corresponde con que sean CH. Por último, el grupo de señales que se encuentran en 1.30-1.23 ppm se acoplan con los carbonos de 22.4-19.7 ppm que corresponden a los metilos de la molécula.

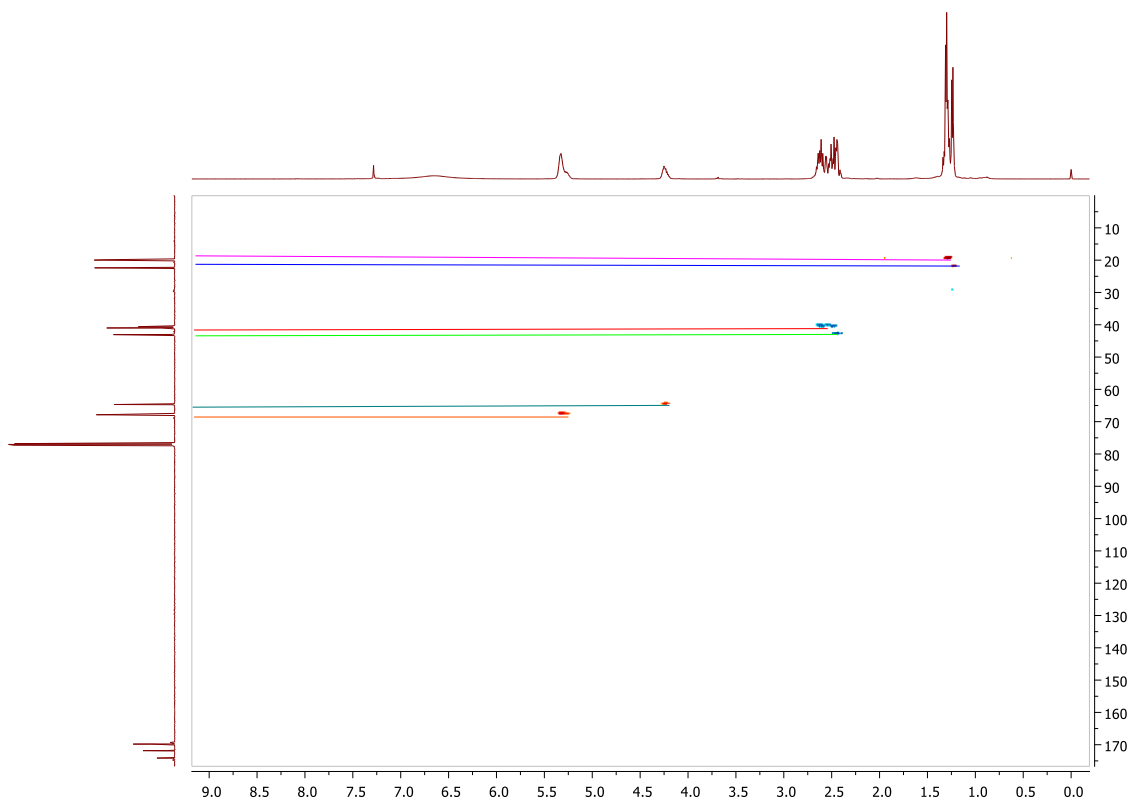


Figura 13. Espectro de RMN 2D HSQC en $CDCl_3$ del producto polihidroxialcanoato.

Finalmente, para poder observar las relaciones entre protones y carbonos a mayor distancia se obtuvo el espectro de HMBC, como se observa en la figura 14. Se puede ver que los carbonilos se enlazan con los hidrógenos que están en 2.61-2.44 ppm correspondientes a los CH_2 . Los carbonos que son CH que aparecen en 68.0, 67.7 y 64.5 ppm se acoplan con los hidrógenos que están en 2.61-2.44 ppm y al mismo tiempo con los que están en 1.30-1.23 ppm que son los CH_2 y CH_3 respectivamente. Al mismo tiempo los carbonos que se encuentran en 41.3, 40.7 y 40.3 ppm que son los CH_2 se acoplan con los hidrógenos que se encuentran en 1.30-1.23 ppm que son los metilos.

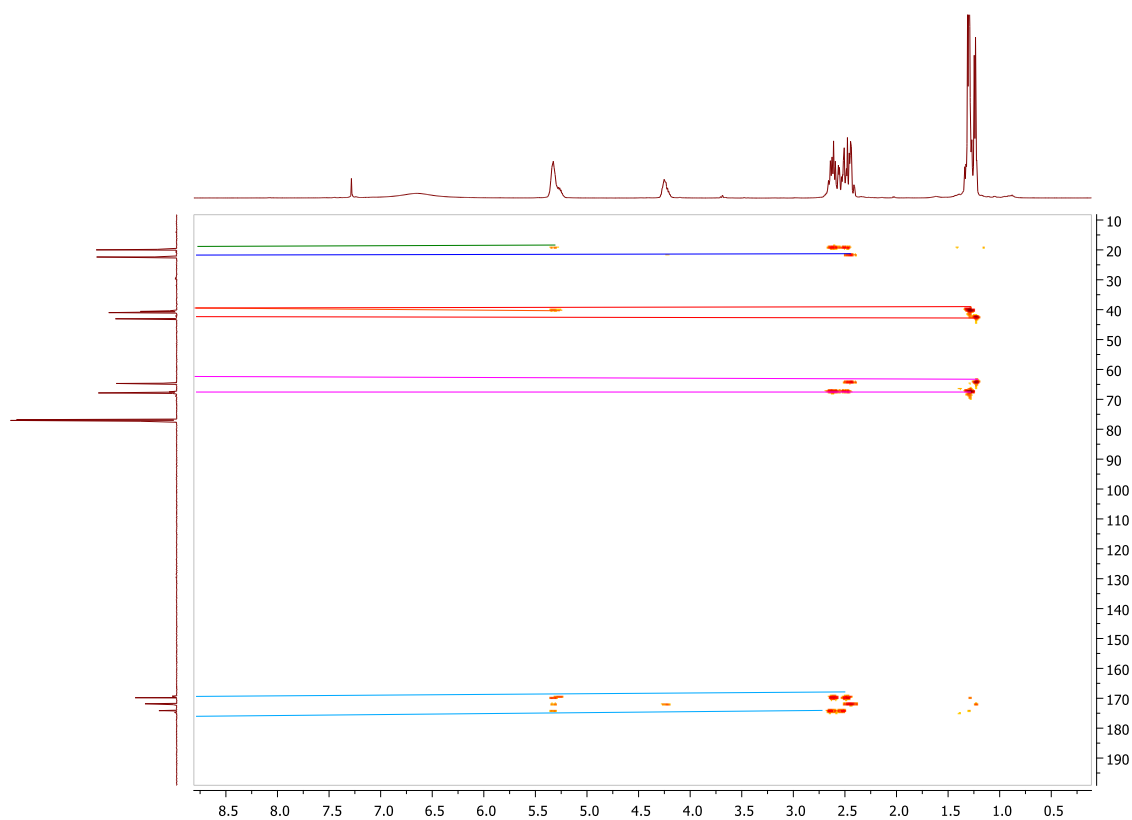


Figura 14. Espectro de RMN 2D HMBC en $CDCl_3$ del producto polihidroxicanoato.

Se obtuvo el espectro de masas con una masa de 277.9 g/mol, como se muestra en la figura 15. Con todos los datos de espectroscopia y espectrometría se logró obtener la estructura ácido 3-((3-((3-hidroxi)butanoil)oxi)butanoil)oxi) butanoico (PHB).

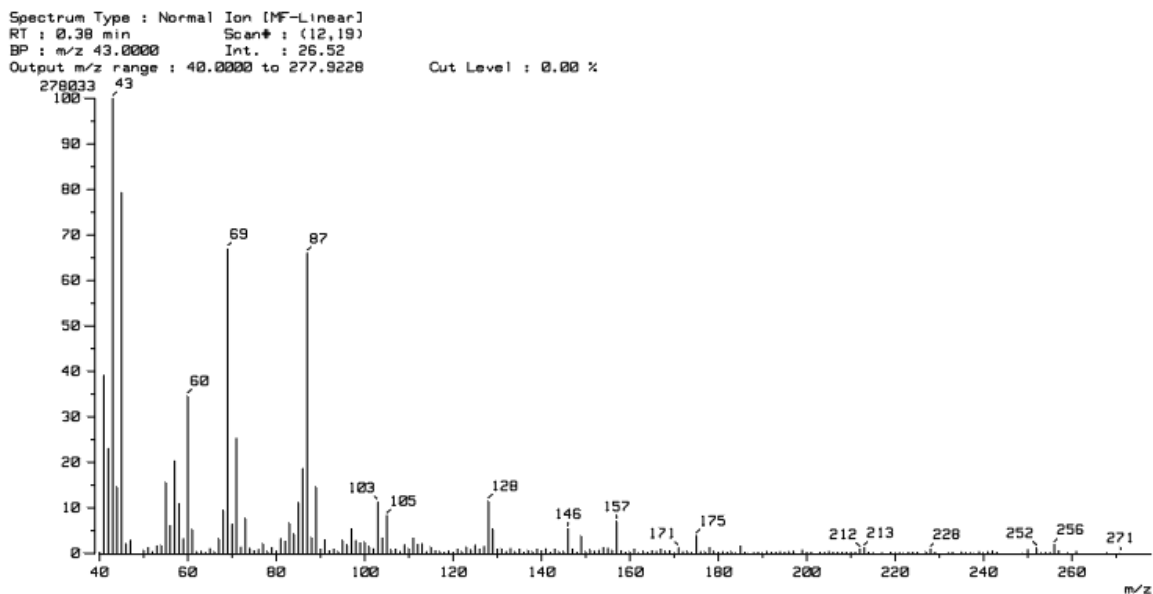


Figura 15. Espectrometría de masas por impacto electrónico (EI-MS) del compuesto

Cabe resaltar que se tienen indicios de tener productos similares, pero con diferentes números de carbonos (monómeros o dímeros) lo cual hace pensar en diferentes cadenas de este tipo de compuestos. Sin embargo, debido a la pandemia no se tuvo el tiempo para purificar estas muestras ni poder caracterizar más compuestos de este tipo.

5- METODOLOGIA

5.1 Elección de la cepa

Se tomó una cepa previamente identificada como *Bacillus megaterium*. Esta cepa forma parte de una colección de cepas presentes en el laboratorio de biotecnología, las cepas se encuentran en condiciones óptimas de frescura y pureza. La cepa de *Bacillus megaterium* empleada, se obtuvo de un suelo silvestre, el cual debió cumplir requisitos mínimos como un suelo limpio, lejos de fuentes de contaminación y cultivos.

5.2 Incubación de la cepa

Del cepario se toma una placa de *Bacillus megaterium*, se debe hacer una resiembra para que la cepa esté lo suficientemente pura para la incubación en caldo, se resiembró en una placa de tripticaseína de agar soya (TSA por sus siglas en inglés "Tryptic Soy Agar"), se deja incubando 24 horas a 30 °C. Al día siguiente se revisa de forma macroscópica que la cepa no muestre contaminación.

La cepa es incubada en el mismo medio de cultivo simple, de tripticaseína de caldo soya (TSB por sus siglas en inglés "Tryptic Soy Broth"), este medio de cultivo es líquido, es un medio simple que permite de forma adecuada el crecimiento microbiano ya que cuenta con las sustancias básicas para su desarrollo como lo son la peptona de carne y la caseína. Es un medio donde se puede dar el crecimiento de diferentes microorganismos por ello la pureza de la cepa es indispensable.

Se trabaja en condiciones de esterilidad, se procede a tomar con un asa bacteriológica una colonia, la cual se introduce en un matraz de 500 mL con 250 mL de medio de cultivo estéril. Los matraces con el inóculo se dejan incubando durante siete días a 30 °C, esto permite el desarrollo de la bacteria, así como un estrés de ésta al ir acabando con las fuentes de energía.

5.3 Extracción

Una vez transcurrido el tiempo necesario se procede a realizar la extracción de los metabolitos secundarios que ahora están presentes en el medio de cultivo. El primer paso es centrifugar el contenido de los matraces, con el objetivo de liberar del medio de cultivo la mayor parte de células bacterianas. La centrifugación se hace durante diez minutos a 6000 revoluciones por minuto. Se conserva el medio de cultivo y las células se desechan.

Con el medio de cultivo restante se hace una extracción de tipo discontinua, utilizando disolventes orgánicos, en este caso se empleó acetato de etilo, de cada matraz se obtienen tres volúmenes y cada uno es llevado a un rotavapor a presión reducida a temperatura menor a 40 °C, el resultado es un extracto crudo, el cual es colocado en un contenedor pequeño para ser pesado. Este extracto contiene los diferentes metabolitos secundarios que produjo la cepa de *Bacillus megaterium*.

5.4 Fraccionamiento del extracto

Debido a que el extracto crudo resultante cuenta con varios metabolitos secundarios se debe hacer una separación de estos para que puedan ser analizados adecuadamente. El primer paso es analizar el extracto crudo en cuanto a solubilidad, se ha visto que los extractos presentan diferentes solubilidades, es preciso encontrar el solvente o la combinación de solventes en donde el extracto tenga un mejor corrimiento en una placa de TLC. En este caso se encontró que el extracto utilizado presenta una solubilidad óptima con el sistema de solventes 80% hexano y 20% acetato de etilo.

Con la información anterior se procede a realizar una cromatografía en columna de gel de sílice, para la fase móvil se empieza usando hexano al 100%, el sistema se va modificando para hacer una combinación de hexano y acetato de etilo hasta llegar al sistema óptimo que es hexano 80%, acetato de etilo 20%.

De este fraccionamiento se obtuvieron 18 fracciones, las cuales se analizaron en placas TLC para corroborar que las fracciones no fueran las mismas, en dado caso se debe seguir purificando el extracto hasta apreciar fracciones separadas. Se analizaron las fracciones individualmente y se purificó por completo la fracción seis.

5.5 Análisis de la fracción seis

Para el análisis completo de la fracción seis, se utilizó el equipo de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y de carbono (RMN ^{13}C), también se emplearon los experimentos bidimensionales COSY y HSQC. Con en fin de complementar la información requerida se utilizaron técnicas de espectrometría de masas y de infrarrojo.

Los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C se obtuvieron en espectrómetros Varian 300 MHz y Bruker 500 MHz, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3), como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de los desplazamientos químicos se encuentran en partes por millón (ppm) respecto al TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Para la multiplicidad de las señales para un espectro de ^1H se utilizan las siguientes abreviaturas: (s) simple, (d) doble, (dd) doble de doble, (dq) doble de cuádruples, (ddq) doble de doble de cuádruples, (t) triple, (q) cuádruple, (m) múltiple, (sa) señal ancha.

Los espectros de masas se realizaron en el modo espectrometría de masas por impacto electrónico (EI-MS) y espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS) en el espectrómetro de masas Jeol JMS-700.

6- CONCLUSIONES

- ❖ Se lograron separar diferentes fracciones por cromatografía en columna en gel de sílice de un extracto crudo del cultivo de la bacteria *B. megaterium*.
- ❖ De una de las fracciones se logró aislar un compuesto que fue completamente identificado y caracterizado.
- ❖ Se pudo identificar el compuesto de tipo polihidroxi butirato, llamado ácido 3-((3-((3-hidroxi butanoil)oxi)butanoil)oxi) butanoico (PHB). Este compuesto es de gran importancia en la industria ya que podría sustituir a los polímeros sintéticos.
- ❖ Se tienen indicios de tener productos similares, pero con diferentes números de carbonos (monómeros o dímeros) lo cual hace pensar en diferentes cadenas de este tipo de compuestos. Sin embargo, debido a la pandemia no se tuvo el tiempo para purificar estas muestras ni poder caracterizar más compuestos de este tipo.

7- BIBLIOGRAFÍA

1. Karlovsky, P. Springer-Verlag . 2008, pp 1–19.
2. Gonzales, A., Castro, M. *Papel ecológico de los metabolitos secundarios. Lacandonia*, 2017, 123 (1).
3. Polinomio, A. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 2012, vol 46 (1).
4. Ferro Bertolotto, EA. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud.* 2015;13 (2):4-5
5. Gutiérrez-Ravelo, A.; Estévez-Braun, A. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*, 2009, 103, 409-419.
6. Liras P, Martín JF. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2021, 48: kuab072.
7. Castañeda, E., Sánchez, L. *Nova.* 2016, 14, 53-62
8. Kaur P, Bhardwaj NK, Sharma J. *Biocatal Agric Biotechnol*, (2016) 6, 159-167.
9. Sansinenea, E.; Ortiz, A. *Biotechnol. Lett.*, 2011, 33, 1523-1538.
10. Ortiz, A., Sansinenea, E. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2019, 19, 373-380.
11. Bell, A., Tórtolo, K. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)*, 2015, 49, 22-26 .
12. Grunennvaldt, R., Degenhardt, J., Cássia, J., Dos Santos, G., Aparecida, V., Deschamps, C. *Biotecnología vegetal*, (2018).18: 3-13.
13. Andalib, R., Abd Majid, M., Hussin, M., Ponraj, M., Keyvanfar, A., Mirza, J., Lee, H. (2016). *Construction and Building Materials*, vol 118 (1).
14. Ortiz A, Sansinenea E. *Nat Prod J.* 2020, 10, 153-157.
15. *PlasticsEurope (2017). Plastics – the Facts 2017 An analysis of European Plastics Production, Demand and Waste Data. Available at: https://www.plasticseurope.org/application/files/5715/1717/4180/Plastics_the_facts_2017_FINAL_for_website_one_page.pdf.*
16. Możejko-Ciesielska J, Kiewisz R, *Microbiol. Res.* 2016, 192, 271–282.
17. Dietrich K, Durmont M, Del Rio F, Orsat V. *Sustain. Prod. Consumpt.* 2017, 9, 58–70.
18. Nielsen C, Rahman A, Rehman AU, Walsh MK, Miller CD. *Microb. Biotechnol.* 2017, 10, 1338–1352.

19. Amaro TMM, Rosa D, Comi G, Iacumin L. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 992.
20. Koller M. *Bioengineering*, 2017, 4, 88.
21. Carucci A, Dionisi D, Majone M, Rolle E, Smurra P. *Water Res.* 2001, 35, 3833–3844.
22. Philip S, Keshavarz R, Roy I. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2007, 82, 233–247.
23. Boyandin AN, Prudnikova SV, Karpov VA, Ivonin VN, Do NL, Nguyen TH, Le TMH, Filichev NL, Levin AL, Filipenko ML, Volova TG, Gitelson II. *Int. Biodeterior. Biodegr.* 2013, 83, 77–84.
24. Kniewel R, Revelles Lopez O, Prieto MA, *Biogenesis of Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoates*, In: O. Geiger (ed.), *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*, (2019), Springer Nature Switzerland AG, 457-481.
25. Prieto A, Escapa IF, Martínez V, Dinjaski N, Herencias C, de la Peña F, Tarazona N, Revelles O. *Environ. Microbiol.* 2016, 18, 341–357.
26. Ali I, Jamil N. *Front. Biol.* 2016, 11, 19–27.
27. Levine AC, Sparano A, Twigg FF, Numata K, Nomura CT, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2015, 1, 567–576.
28. Lee GN, Na J. *Microb Cell Fact* 2013, 12: 54.
29. Amaro TMM, Rosa D, Comi G, Iacumin L. *Front Microbiol.* 2019, 10: 992.
30. Koller M, Maršálek L, de Sousa Dias MM, Braunegg G. *New Biotechnol* 2017, 37: 24–38.
31. Li Z, Yang J, Loh XJ. *NPG Asia Materials*, 2016, 8: e265.