



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“EXTRACCIÓN Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE
METABOLITOS SECUNDARIOS A PARTIR DE *BACILLUS
THURINGIENSIS*”**

Tesis para obtener el Título de Maestro en Ciencias Químicas

PRESENTA:

QFB GADIEL GARCÍA GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ESTIBALIZ SANSINENEA ROYANO

H. PUEBLA DE Z. OCTUBRE 2019

AGRADECIMIENTOS

A todo el laboratorio de síntesis orgánica que en conjunto con el laboratorio de biotecnología microbiana se formó un gran equipo de trabajo, a la Dra Estibaliz por su constante apoyo y supervisión académica, a los compañeros de posgrado Francisco, Jessica, Miriam así como a los múltiples alumnos de servicio social, prácticas y proyectos por los buenos momentos vividos.

A cada una de las doctoras que componen el comité revisor, por su tiempo y dedicación.

Al CONACYT por la beca otorgada.

A cada uno de los integrantes del sector administrativo del Posgrado de Ciencias Químicas y del área de Química orgánica.

A mis padres, hermana, familia y amigos, en especial a Sandra Eli que siempre estuvo conmigo en los momentos más importantes, sin ti no sería nada.

Tabla de contenidos

Contenido	Página
Lista de figuras	I
Lista de esquemas	II
Lista de tablas	III
Abreviaturas	IV
Resumen	VII
1.- INTRODUCCIÓN.	1
2.- ANTECEDENTES.	3
2.1 Química de los productos naturales.	3
2.2 Metabolitos secundarios de <i>Bacillus</i> spp.	5
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> y su potencial biotecnológico.	8
2.4 Ftalato de bis 2-etilhexilo como compuesto natural más que un contaminante. 9	
2.5 Ácido antranílico (AA), un metabolito de suma importancia.	13
2.5.1 Biosíntesis del ácido antranílico.	14
2.5.1.1 Vía del ácido shikímico.	14
2.5.1.2 Ácidos benzoicos derivados del corismato.	16
2.5.2 Síntesis industrial de ácido antranílico y principales aplicaciones.	19
3.- OBJETIVOS.	21
4.- MATERIALES Y MÉTODOS.	22
4.1.- Medio de Cultivo.	22
4.2 Crecimiento de la cepa ELI52.	23
4.3 Extracción del cultivo sin células con disolventes orgánicos.	23
4.4 Fraccionamiento del extracto de la cepa ELI52 por columna cromatográfica. 24	
4.5 Purificación de la fracción 1: Obtención del ftalato de bis-2 etilhexilo.	24
4.6 Identificación y elucidación del compuesto de tipo ftalato.	25
4.7 Purificación de la fracción 2: Identificación del compuesto cristalino.	26
5.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	27

5.1 Extracción.....	27
5.2 Purificación.....	27
5.3 Caracterización	30
Compuesto 1	30
Compuesto 2	43
6- CONCLUSIONES.	51
7- BIBLIOGRAFÍA.	52

Lista de figuras

Página

Figura 1 Estructuras de los metabolitos aislados de <i>Bacillus spp</i>	6
Figura 2 Estructuras químicas de las melaninas feomelanina y la eumelanina	8
Figura 3 Estructuras de las DCPS aisladas de <i>B. thuringiensis</i>	9
Figura 4 Algunos de los productos bioactivos que pueden sintetizarse a partir de ácido antranílico	20
Figura 5 Fracciones principales obtenidas por cromatografía en columna de un extracto de <i>B. thuringiensis</i>	29
Figura 6 Fracciones principales obtenidas por cromatografía en columna de un extracto de <i>B. thuringiensis</i> Revelador UV 360 nm	29
Figura 7 Espectrometría de masas por impacto electrónico (EI-MS) del compuesto 1	30
Figura 8 Espectro de IR del compuesto 1	31
Figura 9 Espectro ^1H RMN 500 MHz en CDCl_3 del compuesto aislado de la fracción 1	32
Figura 10 Ampliación de la región 7.45-7.86 ppm del espectro de RMN ^1H	33
Figura 11 Ampliación de la señal en 4.22 ppm del espectro ^1H	34
Figura 12 Espectro de RMN de ^{13}C 500 MHz en CDCl_3 del compuesto aislado de la fracción 1	35
Figura 13 Espectro COSY 500 MHz en CDCl_3 del compuesto aislado de la fracción 1	36
Figura 14 Espectro COSY, correlación de los protones aromáticos	37
Figura 15 Espectro COSY, correlación entre las señales de los metilos y metilenos de compuesto desconocido fracción 1.	37
Figura 16 Espectro COSY, correlación entre la señal de un metileno unido al oxígeno y al centro quiral de compuesto desconocido fracción 1.	38
Figura 17 Estructura de ftalato de bis (2- etilhexilo).	38
Figura 18 Espectro RMN 2D HSQC en CDCl_3 para la asignación de señales de carbono e hidrógeno de los protones aromáticos	39
Figura 19 Espectro RMN 2D HSQC en CDCl_3 para la asignación de la señal del $\text{CH}_2\text{-O}$ unido al centro estereogénico.	39
Figura 20 Espectro RMN 2D HSQC en CDCl_3 para la asignación de las señales del centro estereogénico y las señales pertenecientes a los metilenos.	40



Figura 21 Espectro RMN 2D HSQC 500 MHz en CDCl_3 para la asignación de las señales de los metilos	40
Figura 22 Resumen de datos de la caracterización del compuesto.	42
Figura 23 Espectro de RMN de ^1H de la muestra de la fracción 2 que cristalizó..	43
Figura 24 Expansión del espectro ^1H de las señales de la fracción 2	44
Figura 25 Espectro ^{13}C a 125 MHz de la fracción 2.....	45
Figura 26 Espectro RMN 2D COSY ^1H - ^1H de la fracción 2.	46
Figura 27 Espectro RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C de la fracción 2.....	47
Figura 28 Estructura propuesta de acuerdo a la información obtenida con RMN, donde X y Y son dos heteroátomos distintos.	48
Figura 29 Espectro IR de la fracción 2.	49
Figura 30 Estructura propuesta de la fracción 2: Ácido 2-aminobenzoico.....	49
Figura 31 Estructura de rayos X obtenida mediante su difracción.....	50



Lista de esquemas

Página

Esquema 1. Síntesis de ftalato de 2-etilhexilo	10
Esquema 2. Degradación del índigo a ácido antranílico.....	13
Esquema 3. Ruta del ácido shikímico para la obtención del corismato.	16
Esquema 4. Ruta del corismato para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y otros metabolitos de importancia biológica	18
Esquema 5. Síntesis convencional de ácido antranílico	19
Esquema 6. Síntesis de derivados de AA vía isatinas sustituidas.....	19

Lista de tablas

Tabla 1. Sistemas para el fraccionamiento del extracto bacteriano	24
Tabla 2. Datos espectroscópicos de la fracción 2 cristalizada	44
Tabla 3. Correlaciones HSQC de la fracción 2	48



Lista de abreviaturas.

AA	Ácido antranílico
ADCL	Aminodeoxicorismato liasa
ADCS	Aminodeoxicorismato sintasa
ADP	Adenosín difosfato
AS	Antranilato sintasa
CDCI3	Cloroformo deuterado
CHCl3	Cloroformo
CM	Corismato mutasa
COSY	Correlation Spectroscopy
CS	Corismato sintasa
DAHPS	Ácido 3-deoxi-D-arabino-heptulosónico 7-fosfato sintasa
DAHP	Ácido 3-deoxi-D-arabino-heptulosónico 7-fosfato
DCHPS	Ácido 3-deoxi-D-arabino-heptulosónico 7-fosfato sintasa
DCP	Dicetopiperazina
dd	doble de dobles
ddq	doble de doble de cuádruples
DEHP	Ftalato de bis 2-(etilhexilo)
DHD	3-dehidroquinato deshidratasa
DHQ	Ácido 3-dehidroquínico
DHQS	3-dehidroquinato sintasa
DHS	Ácido 3-dehidroshikímico
DOP	Diocil ftalato
dq	doble de cuádruples
E4P	D-eritrosa-4-fosfato

EI-SM	Espectrometría de masas por impacto electrónico
EPSP	5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato
EPSPS	5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa
F.1-5	Fracciones del 1 al 5
FMNH ₂	Flavin mononucleótido reducido
HR-SM	Espectrometría de masas de alta resolución
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
ICS	Isocorismato sintasa
J	Constante de acoplamiento
K ₂ SO ₄	Sulfato de potasio
LB	Medio Luria Bertani
Leu	Leucina
m	Señal múltiple
MeOH	Metanol
SM	Espectrometría de masas
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sodio
NADPH	Nicotamida adenina dinucleótido fosfato reducido
PEP	Fosfoenolpiruvato
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
PVC	Policloruro de vinilo
q	Señal cuádruple
RMN	Resonancia Magnética Nuclear



s	Señal simple
S3P	Ácido shikímico 3-fosfato
SA	Ácido salicílico
SDH	Shikimato deshidrogenasa
SK	Shikimato sintasa
t	Señal triple
TiO ₂	Dióxido de titanio
TLC	Thin Layer Cromatography
TMS	Tetrametilsilano
Tyr	Tirosina
V ₂ O ₅	Pentóxido de vanadio
Val	Valina

RESUMEN

Los compuestos bioactivos que se obtienen a partir de organismos vivos se denominan **Productos Naturales**, los cuáles son metabolitos secundarios con amplia diversidad estructural y funcional. En el estudio de este tipo de productos, la química orgánica cumple un rol importante en la determinación de la estructura química.

En esta investigación, la bacteria *Bacillus thuringiensis* muy conocida por la síntesis de un cristal proteico utilizado como biopesticida se utiliza como modelo biológico debido a sus antecedentes obtenidos en el laboratorio como el aislamiento de dicetopiperazinas y compuestos del tipo melanina.

En la búsqueda de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus thuringiensis*, se logra obtener un extracto de la bacteria fraccionado por columna cromatográfica y purificado por otras técnicas cromatográficas, utilizando técnicas espectroscópicas para la elucidación estructural se consigue aislar e identificar un compuesto denominado como ftalato de bis 2-(etilhexilo) (DEHP por sus siglas en inglés), el cual tiene su origen en la industria de plásticos, siendo inicialmente considerado como artefacto del proceso metodológico, el análisis espectroscópico indica que es producido por la bacteria. También se pudo aislar el ácido antranílico, un precursor del aminoácido triptófano, que por sus propiedades químicas es un compuesto de suma utilidad tanto para síntesis orgánica como para biosíntesis de diversos compuestos con aplicaciones biotecnológicas, farmacológicas, sintéticas, entre muchas otras.

1.- INTRODUCCIÓN.

En la antigua civilización se utilizaron diversos organismos vivos para satisfacer muchas necesidades que abarcan desde la elaboración de ciertos alimentos hasta la obtención de remedios contra ciertos males obteniéndolos a partir de organismos macroscópicos como plantas y de organismos microscópicos como las levaduras, a pesar de que no conocían la ciencia exacta de estos procedimientos lograron obtener numerosos beneficios mejorando la técnica con el pasar de los años.

Esta utilización de organismos vivos para la obtención de productos y beneficios es a grandes rasgos la definición general de biotecnología que conforme surgieron más conocimientos científicos y nuevas tecnologías, fue tomando un rol más importante en la sociedad debido a las emergentes problemáticas de la población que incluyen los sectores alimenticios, agrícolas, biosanitarios, ecológicos, entre otros; siendo de tal manera un campo interdisciplinario objeto de numerosos estudios con el fin común de dar soluciones a la mayoría de problemas.

Los compuestos bioactivos que se obtienen a partir de organismos vivos se denominan **Productos Naturales**, los cuales son metabolitos secundarios con actividad biológica. En lo que a microorganismos se refiere, se definen como metabolitos secundarios a aquellos producidos en la fase estacionaria que no son imprescindibles para el crecimiento pero brindan protección y mecanismos de supervivencia en el ambiente que le rodea. La exploración de la diversidad microbiana y la cantidad de metabolitos secundarios producidos por hongos o bacterias ha llevado a considerarlos una fuente importante de productos naturales con propiedades biológicas como antibacterianos, antifúngicos, antitumorales, etc.

Uno de los géneros microbianos de mayor importancia biotecnológica es el género *Bacillus*, el cual es un género ubicuo del medio ambiente del que se han logrado aislar una cantidad importante de metabolitos secundarios con un amplio espectro de actividades. Estos metabolitos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas,

promotores de crecimiento y otros compuestos bioactivos que están diseñados para capacitar a la bacteria para sobrevivir en su ambiente.

Particularmente la especie *Bacillus thuringiensis* ha sido muy estudiada por la síntesis de un cristal proteico utilizado como biopesticida, no obstante se han logrado identificar numerosos compuestos como bacteriocinas, pigmentos, toxinas, etc. En la búsqueda de productos naturales de *Bacillus thuringiensis*, se logra aislar e identificar un compuesto denominado como ftalato de bis 2-(etilhexilo) (DEHP por sus siglas en inglés), el cual tiene su origen en la industria de plásticos pero que la producción del compuesto por este microorganismo (y otros) pone en debate si es un metabolito accesorio o si puede considerarse como producto natural. También se consigue aislar el ácido antranílico, un importante bloque de construcción de diversos compuestos con alta funcionalidad además de ser precursor del aminoácido triptófano.

Este trabajo está enfocado en la extracción de productos naturales, donde se pretende aislar metabolitos secundarios a partir de una cepa identificada como *B. thuringiensis* y la elucidación estructural con uso de técnicas espectroscópicas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de masas (EM).

2.- ANTECEDENTES.

2.1 Química de los Productos Naturales.

El metabolismo secundario es llevado a cabo por plantas y microorganismos y usualmente es específico de la especie; estos metabolitos parecen servir al organismo que la produce como 1) armas competitivas usados contra otros microorganismos, plantas, insectos y animales; 2) agentes transportadores de metales; 3) agentes de simbiosis planta-microbio y estimuladores de crecimiento vegetal; 4) hormonas sexuales y 5) factores de diferenciación.¹

De todos los productos tradicionales obtenidos por fermentación, los más importantes para la salud humana son los metabolitos secundarios; destacando a los antibióticos cuya biosíntesis se lleva a cabo 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 Carbono, Nitrógeno o Fósforo. 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.²

Muchos de los antibióticos “naturales” se sintetizan en muy pocas cantidades, además algunos poseen un pequeño margen de efecto antimicrobiano y en la mayoría de los casos tienen que ser modificados químicamente para producir agentes semisintéticos que mejoren su actividad; sin embargo, existen otros metabolitos secundarios con utilidades distintas al antibiótico como agentes antitumorales, ciertas toxinas, factores de crecimiento vegetal, pigmentos, inhibidores de proteasas/peptidasas, inhibidores de biosíntesis de colesterol, entre otros, así como inmunosupresores y moléculas que se unen a receptores específicos.³

La importancia de encontrar y utilizar metabolitos secundarios puede justificarse de dos maneras: 1) para conocer las sustancias naturales que podrían beneficiar a los humanos y 2) para identificar los organismos que producen esas sustancias porque éstos pueden ser los únicos portadores de compuesto útiles para combatir agentes patógenos. ⁴

La búsqueda de nuevos compuestos bioactivos involucra necesariamente un vasto estudio de los microorganismos, su hábitat y ciclo de vida. Es más conveniente diseñar técnicas de cultivo para cada uno de los diferentes géneros microbianos e identificar aquellos que producen compuestos con actividad biológica. También ayudará idear un plan para el uso y preservación de las especies escogidas. ⁵

Las investigaciones científicas en el campo de productos naturales se han enfatizado particularmente por los siguientes hechos:

1. Por encontrar compuestos biológicamente activos. La investigación de plantas y otros organismos así como de microorganismos son aprobados para el aislamiento e identificación metabolitos secundarios sólo si el extracto inicial del sistema biológico en cuestión muestra alguna actividad útil.
2. Debido a la búsqueda de organismos transgénicos específicos para metabolito de importancia comercial, el cual es una extensión del primer objetivo pero con modificaciones en la genética.
3. La reclasificación de una filogenia confusa. Los metabolitos secundarios de cada especie de un género son minuciosamente aislado, caracterizado y comparados con otros.

Los microorganismos, incluyendo ciertas bacterias, hongos y algas, producirán metabolitos secundarios con cierto grado de bioactividad, tanto contra otros microorganismos como contra ciertos estados fisiológicos en un cuerpo enfermo. Los compuestos bioactivos pueden prepararse por síntesis química o pueden aislarse de la naturaleza. El éxito de la búsqueda de productos naturales reside en su mayor eficiencia en contraste con algunos compuestos sintetizados dado que los compuestos naturales tienen configuraciones específicas y de cierta manera ya se

han involucrado en interacciones biológicas específicas, además muchos productos microbianos tienen similitudes con metabolitos de otros sistemas vivos, como por ejemplo, de mamíferos; permitiendo una mayor oportunidad de exhibir acciones tipo fármacos que puedan ser absorbidos y metabolizados, aunque la mayoría de ocasiones para que este efecto sea considerado importante es necesario realizar ciertas modificaciones estructurales del compuesto. ⁶

2.2 Metabolitos secundarios de *Bacillus* spp.

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 natural⁷. Esta amplia variabilidad de estructuras y actividades de los compuestos secundarios expande el potencial de la importancia industrial y biotecnológica del género *Bacillus* con sus especies relacionadas. Dentro de los metabolitos secundarios producidos por especies de *Bacillus* spp. se encuentran cuatro familias principales: bacteriocinas, lantibióticos, lipopéptidos y policétidos^{8,9}.

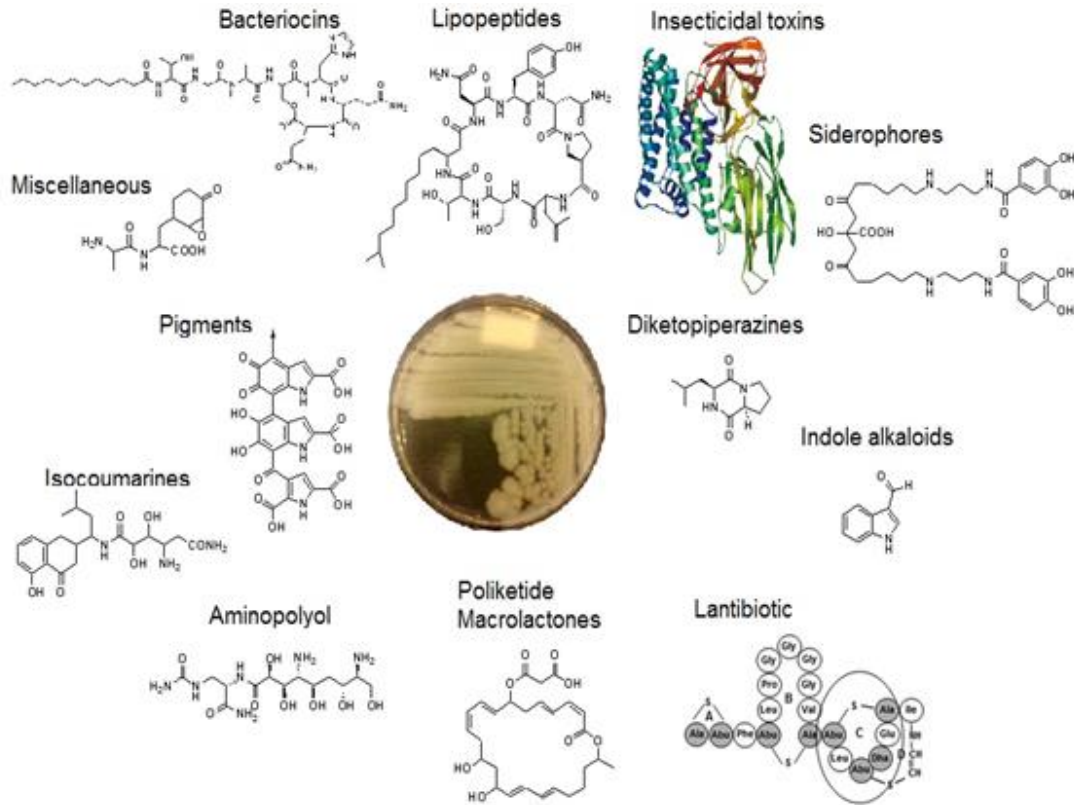


Figura 1. Estructuras de los metabolitos aislados de *Bacillus spp.*

Las bacteriocinas son péptidos con actividad bactericida que son producidos por síntesis ribosomal y segregados por un gran número de especies bacterianas como un mecanismo para inhibir el crecimiento de otras bacterias con las que compiten por el espacio y la fuente de nutrientes¹⁰. Pueden presentar pesos moleculares, propiedades bioquímicas, espectros y mecanismos de acción variables. Diversas especies del género *Bacillus spp.* producen bacteriocinas como la liquenina, megacina, coagulina y cereina. Algunos de estos péptidos y otros producidos por bacterias ácido lácticas, han mostrado una gran capacidad para el control de bacterias patógenas de los alimentos, hecho que ha permitido su empleo como bioconservadores de alimentos y bebidas. Las bacteriocinas también han sido empleadas como agentes de control biológico de bacterias fitopatógenas y como precursores de antibióticos¹¹. Los lantibióticos son péptidos antibióticos dentro de los que se encuentran a la subtilina y bacilisina. La primera es un lantibiótico pentacíclico de 32 aminoácidos producido por *B. subtilis*. La segunda, por su parte,

es un dipéptido compuesto de L-alanina y el aminoácido inusual L-anticapsina en el que recae su actividad antibiótica, pues éste es liberado por acción de las peptidasas y entra a las células susceptibles a través de permeasas, siendo conocida por su actividad antibacteriana y antifúngica. Existen otros lantibióticos tales como mersacidina, sublancina, subtilosina A y ericina⁸.

Los lipopéptidos son compuestos anfífilos sintetizados no ribosómicamente que exhiben un amplio espectro antimicrobiano debido a su actividad surfactante. Comparten una estructura cíclica común que consiste en un ácido graso β -amino o β -hidroxilo integrado a un residuo peptídico. Las diferencias en la secuencia aminoacídica y la ramificación del ácido graso permiten la clasificación de los lipopéptidos en tres familias llamadas iturinas, fengicinas y surfactinas:¹²

- Iturinas: Son un grupo de heptapéptidos unidos a ácidos grasos β -amino que se caracterizan por exhibir una alta actividad antifúngica y moderada actividad antibacteriana. Dentro de esta familia están la iturina A, la micosubtilina y la bacilomicina. La iturina A muestra específicamente una fuerte actividad antibacteriana y un amplio espectro antifúngico, haciéndolo un ideal y potente agente de control biológico. La basilomicina y micosubtilina poseen una actividad antifúngica poderosa y la capacidad de suprimir el crecimiento de hongos fitopatógenos.¹³
- Fengicinas: Son decapeptidos con un ácido graso β -hidroxilo que muestra propiedades inusuales como resultado de la presencia de ornitina en la porción peptídica. Presentan actividad antifúngica principalmente frente a hongos filamentosos.¹²
- Surfactinas: Consisten en heptapéptidos que contienen un ácido graso β -hidroxilo con un número de carbonos que va de los 13 a los 15. Muestran amplia actividad antiviral y anti-micoplásmica pero moderada actividad antifúngica. Poseen una actividad biosurfactante excepcional que provoca daños subletales a nivel de la membrana de los microorganismos sensibles, permitiendo así, un acceso más fácil a las iturinas; por lo anterior se dice que las surfactinas e iturinas muestran una actividad sinérgica.¹³

Los policétidos forman otra familia de los metabolitos secundarios que poseen relevantes actividades biológicas. Su síntesis es de tipo no ribosomal mediante vías que inician con precursores del acetyl-CoA. Dentro de los policétidos se encuentran la difididina y las macrolactinas. La difididina presenta una amplia actividad antibacteriana debido a que inhibe la síntesis proteica. Las macrolactinas son otros metabolitos con actividad antibacteriana; se han descrito al menos 17 de ellas, siendo la macrolactina A una de las más importantes debido a su efectividad contra patógenos Grampositivos.¹⁴

2.3 *Bacillus thuringiensis* y su potencial biotecnológico.

Una de las especies del género *Bacillus* spp. más reconocidas por su potencial como agente de control biológico es *B. thuringiensis*. Esta bacteria grampositiva, cuyo hábitat principal es el suelo, donde es considerado parte de la población bacteriana zimógena, no obstante también ha sido aislada de superficies de plantas, cadáveres de insectos y polvo de productos almacenados. Es una bacteria usada en la agricultura como ingrediente activo en los insecticidas biológicos y para el control de vectores de enfermedades como son los mosquitos y moscas negras en el caso de la variedad *israelensis*.¹⁵

B. thuringiensis puede secretar otros tipos de metabolitos secundarios de interés como toxinas, enzimas, pigmentos, entre otros. En nuestro laboratorio que se logró

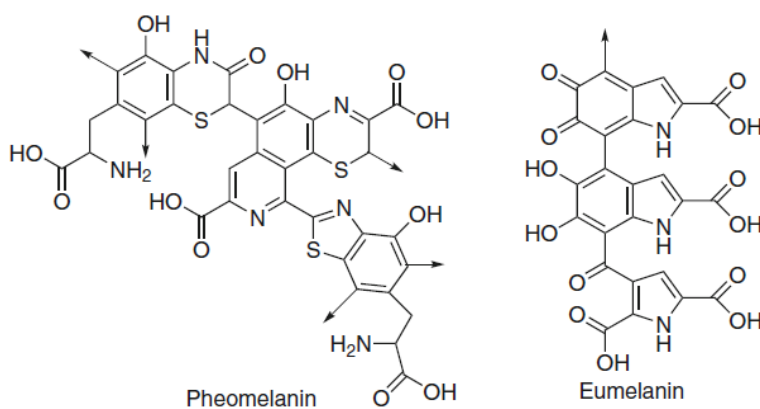


Figura 2: Estructuras químicas de las melaninas feomelanina y la eumelanina

aislar de una cepa de *B. thuringiensis* el pigmento melanina (figura 2) con resistencia a radiación UV que permite proteger a las fotosensibles proteínas Cry con actividad entomopatógena.¹⁶

También como antecedente directo del laboratorio se puede observar que esta bacteria también es capaz de sintetizar compuestos obtenidos por condensación de dos alfa-aminoácidos denominados Diketopiperazinas (Figura 3) que corresponden a los ciclos L-Pro-L-Leu **1**, L-Pro-L-Val **2**, L-Pro-L-Phe **3** y L-Pro-L-Tyr **4**.¹⁷ Estas diketopiperazinas pueden exhibir actividad de promotores de crecimiento vegetal,¹⁸ como antibacteriano,¹⁹ antifúngico²⁰ y antitumoral²¹.

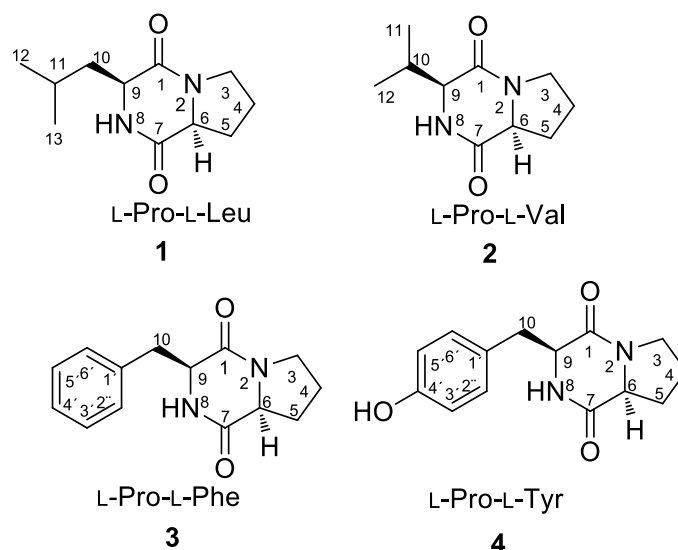


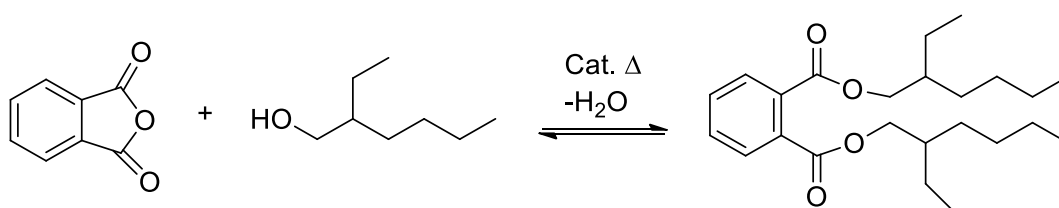
Figura 3: Estructuras de las DCP aisladas de *B. thuringiensis*

2.4 Ftalato de bis 2-etilhexilo como compuesto natural más que un contaminante

El ftalato de bis 2-etilhexilo (DEHP, por sus siglas en inglés) es el miembro más común de una clase de ftalatos, los cuales son utilizados como plastificantes en productos de polímeros para hacerlos más flexibles²² y también pueden encontrarse ampliamente como aditivos comunes en pinturas, lubricantes, adhesivos, insecticidas, empaques y cosméticos.²³ Este ftalato es utilizado en

diversos productos, éstos incluyen dispositivos médicos como bolsas intravenosas, catéteres, bolsas de sangre, bolsas de nutrición enteral, tubos nasogástricos y bolsas de diálisis peritoneal²⁴ además de ser utilizado ampliamente en empaques de alimentos y bebidas, productos de plástico suave como juguetes y productos para infantes,²⁵ en productos de decoración de hogares como colchones, mueblería, tapices; además de productos cosméticos y de cuidado personal para fijar fragancias.²⁶

DEHP, también conocido como dioctil ftalato (DOP, por sus siglas en inglés) es un compuesto líquido viscoso incoloro que consiste en un par de ésteres de 8 carbonos unidos a un anillo de ácido carboxílico bencénico con un peso molecular igual a 390.65 g/mol y fórmula química de $C_{24}H_{38}O_4$. Sintéticamente el compuesto se obtiene por esterificación de 2-etilhexanol con anhídrido ftálico, mientras que el obtenido a partir de fuentes naturales es una sustancia isomérica debido a la presencia de protones diastereotópicos adyacentes al centro estereogénico.²⁷ La producción industrial se lleva a cabo con la reacción de anhídrido ftálico con 2-etilhexanol. La esterificación del anhídrido por el alcohol toma lugar en dos fases. La primera es muy rápida que puede realizarse en ausencia de catalizador. Sin embargo, la esterificación del segundo grupo carboxílico es muy lento y necesita ser facilitado con catálisis ácida y el agua resultante debe ser removida de la mezcla de reacción para conseguir ftalato de bis 2-etilhexilo (Esquema 1).²⁸



Esquema 1. Síntesis de Ftalato de 2-etilhexilo

La síntesis es bastante sencilla; sin embargo, hay estudios acerca de cuál catalizador es el más conveniente para obtener mejores resultados. Los catalizadores más convencionales son ácido sulfúrico, ácido metano sulfónico,

ácido *p*-toluensulfónico y sulfato de sodio. Para sintetizar las materias primas hay varias rutas. Hay dos rutas principales para producir el anhídrido ftálico que consisten en la oxidación de *o*-xileno con aire o K_2SO_4 como un promotor y la oxidación de naftaleno de la misma forma usando en ambos casos diferente gel de sílice y catalizadores de titanio, siendo V_2O_5/TiO_2 el que obtiene mayor rendimiento.²⁹ Por otro lado, 2-etilhexanol es industrialmente producido a través de tres reacciones consecutivas que consisten en la hidroformilación de propileno a *n*-butiraldehído, la auto condensación de *n*-butiraldehído y una reacción típica de condensación aldólica que puede ser catalizada por un ácido, base o un catalizador bifuncional ácido-base para dar 2-etil-2-hexenal; por último se realiza una hidrogenación de este último compuesto, catalizada por un catalizador de cobre o níquel, para rendir 2-etilhexanol.³⁰

En general, DEHP es considerado como un plastificante comercializado a gran escala y al encontrarse en numerosos productos es capaz de migrar al ambiente o penetrar el cuerpo humano a través del agua, aire, alimentos y equipos médicos, por lo que puede considerarse como un contaminante debido a su baja hidrolización y fotodegradación en condiciones naturales. Como los plastificantes del tipo ftalato no están químicamente enlazados al PVC, pueden lixivarse, migrar o evaporar hacia el exterior y la atmósfera, materias primas agrícolas, etc.²⁴ Debido a su baja solubilidad en agua y a su disponibilidad en moléculas gaseosas es directamente absorbido en partículas de la atmósfera³¹ por lo que, debido al ciclo natural del agua, DEHP puede encontrarse en ríos, lagos, aguas residuales, suelo, lodos y sedimentos, incluso en suelos agrícolas, contaminando los productos vegetales causando un daño directo en la cadena alimenticia humana³². Hay diversos estudios que indican los posibles daños que ocasionan los ftalatos, principalmente DEHP, entre los que incluyen probables efectos carcinogénicos, disruptores endocrinos, toxico epigenético, incluso ha sido regulado por diversos países debido a casos de toxicidad ocasionados por este ftalato.³²

En la búsqueda de nuevos antibióticos para resolver actuales problemáticas sanitarias involucradas con la resistencia a antibióticos es necesario estudiar

distintas especies vivas para encontrar alternativas viables y ecológicamente amigables; cabe destacar que muchos de los metabolitos secundarios que se logran elucidar no tienen un efecto antimicrobiano; sin embargo presentan actividades biológicas muy variadas aplicables a otras áreas de conocimiento así como poseer estructuras químicas de sumo interés que pueden utilizarse como precursores en la síntesis de estructuras más grandes y complejas. Una de estas estructuras ha sido el ftalato de bis 2-etilhexilo que en contraste con su origen en la manufactura y los diversos estudios que proponen el efecto tóxico que ejerce en el ser humano, hay diversos organismos de los que se ha logrado aislar este compuesto, que más que un contaminante, parece ser un metabolito producido por ciertas especies aunque su función no está esclarecida. Ciertas plantas, bacterias y hongos son capaces de producir DEHP con diferentes actividades biológicas; por ejemplo, un estudio fitoquímico de la flor de *Calotropis gigantea* demuestra que es capaz de producir ftalato de bis 2-etilhexilo con actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, entre otros, así como actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus*.³³ Otro tipo de microorganismo capaz de producir este compuesto son los actinomicetos también conocidos como bacterias filamentosas, como *Streptomyces* sp. que produce un DEHP activo contra bacterias grampositivas y hongos.³⁴ Otro actinomiceto identificado como *Nocardia levis* produce este ftalato con una moderada actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas y levaduras.³⁵

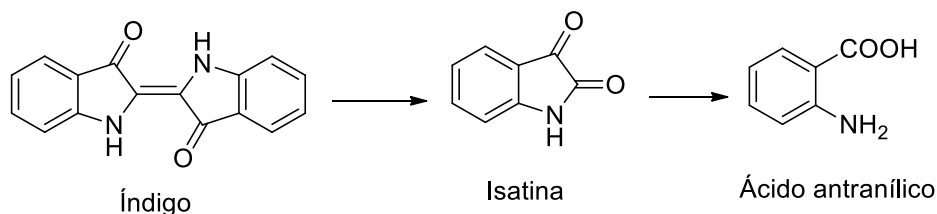
Hay muy pocos reportes sobre la producción de DEHP por otros géneros bacterianos; el único que se tiene es sobre *Bacillus cereus* simbióticamente asociado a un nematodo entomopatógeno, *Rhabditis (Oscheius)* sp. el cual secreta DEHP al cultivo exhibiendo actividad antimicrobiana.³⁶

Por otro lado hay especies fúngicas capaces de biosintetizar este ftalato, un ejemplo son las especies de *Penicillium* como *P. janthinellum* que produce DEHP como un compuesto mayoritario bioactivo en donde se reporta que tiene una potente actividad antitumoral dependiente de dosis contra células Ehrlich *in vivo*;³⁷ otro hongo capaz de sintetizar el compuesto es *Aspergillus fumigatus*³⁸ así como

Aspergillus awamori que produce una variedad de DEHP con actividad contra *Candida Albicans* y que al mismo tiempo exhibe actividad citotóxica contra algunas líneas celulares de carcinoma.³⁹

2.5 Ácido antranílico (AA), un metabolito de suma importancia.

La historia del ácido antranílico (AA) comienza con el químico Carl Julius Fritzsche (1808-1871) experimentando con la degradación del color de tinte índigo (Esquema 2). En 1840, Fritzsche identificó a un compuesto con propiedades básicas como uno de los productos de degradación del tratamiento del índigo con una base. A este producto lo llamó anilina por la palabra en español perteneciente al índigo, añil. De igual manera logró aislar un ácido a partir de esta degradación alcalina, el cual para analizar tuvo que degradarlo con ácidos minerales para rendir otro compuesto con propiedades ácidas. Llamó al compuesto “Anthranilsäure” del griego *anthrax* que significa carbón, *añil* por índigo y *säure* del alemán que significa ácido, ya que este compuesto se descompone en anilina y dióxido de carbono al calentar arriba del punto de fusión (145°C).⁴⁰



Esquema 2. Degradación del índigo a ácido antranílico.

De acuerdo a la literatura, el ácido antranílico por sí mismo exhibe actividades anticancerígenas, antimicrobianas, insecticidas, antivirales y antiinflamatorias.⁴¹ El ácido antranílico es de origen netamente natural siendo un metabolito intermediario en el anabolismo y catabolismo del triptófano, así como bloque de producción para diversos compuestos bioactivos. Industrialmente, es un intermediario en la producción de tintes, pigmentos, sacarina y junto a sus ésteres, es empleado en la preparación de perfumes (como aromas jazmín y naranja), fármacos (ej furosamida, compuestos quinazólicos, etc) y como absorbente UV.⁴²

2.5.1 Biosíntesis del ácido antranílico.

El ácido antranílico al ser un ácido benzoico es biosintetizado a través de la vía del ácido shikímico por medio del ácido corísmico. La vía del ácido shikímico presente únicamente en plantas y microorganismos es una serie de siete reacciones enzimáticas que biosintetizan compuestos fenólicos aromáticos así como la conversión de los intermediarios de las vías glicolíticas y pentosa-fosfato, fosfoenolpiruvato y D-eritrosa 4-fosfato a corismato, el cual es precursor de los aminoácidos L-fenilalanina (Phe), L-tirosina (Tyr) y L-triptófano (Trp).^{43,44}

2.5.1.1 Vía del ácido shikímico.

La ruta del ácido shikimico (Esquema 3) es esencial para el crecimiento de la bacteria o planta iniciando con una condensación tipo aldólica de fosfoenolpiruvato (PEP) y D-eritrosa-4-fosfato (E4P) para dar ácido 3-deoxi-D-*arabino*-heptulosónico 7-fosfato (DAHP) catalizado por la enzima 3-deoxi-D-*arabino*-heptulosoato 7-fosfato sintasa (DAHPS).⁴⁵ La segunda reacción es una reacción de ciclación intramolecular tipo aldólica, donde el enol (C6-C7) de DAHP ataca nucleofílicamente el grupo carbonilo C2, para producir un ciclo de 6 miembros, el ácido 3-dehidroquinico (DHQ) o 3- dehidroquinato catalizado por la enzima 3-dehidroquinato sintasa DHQS.^{43, 46,47}

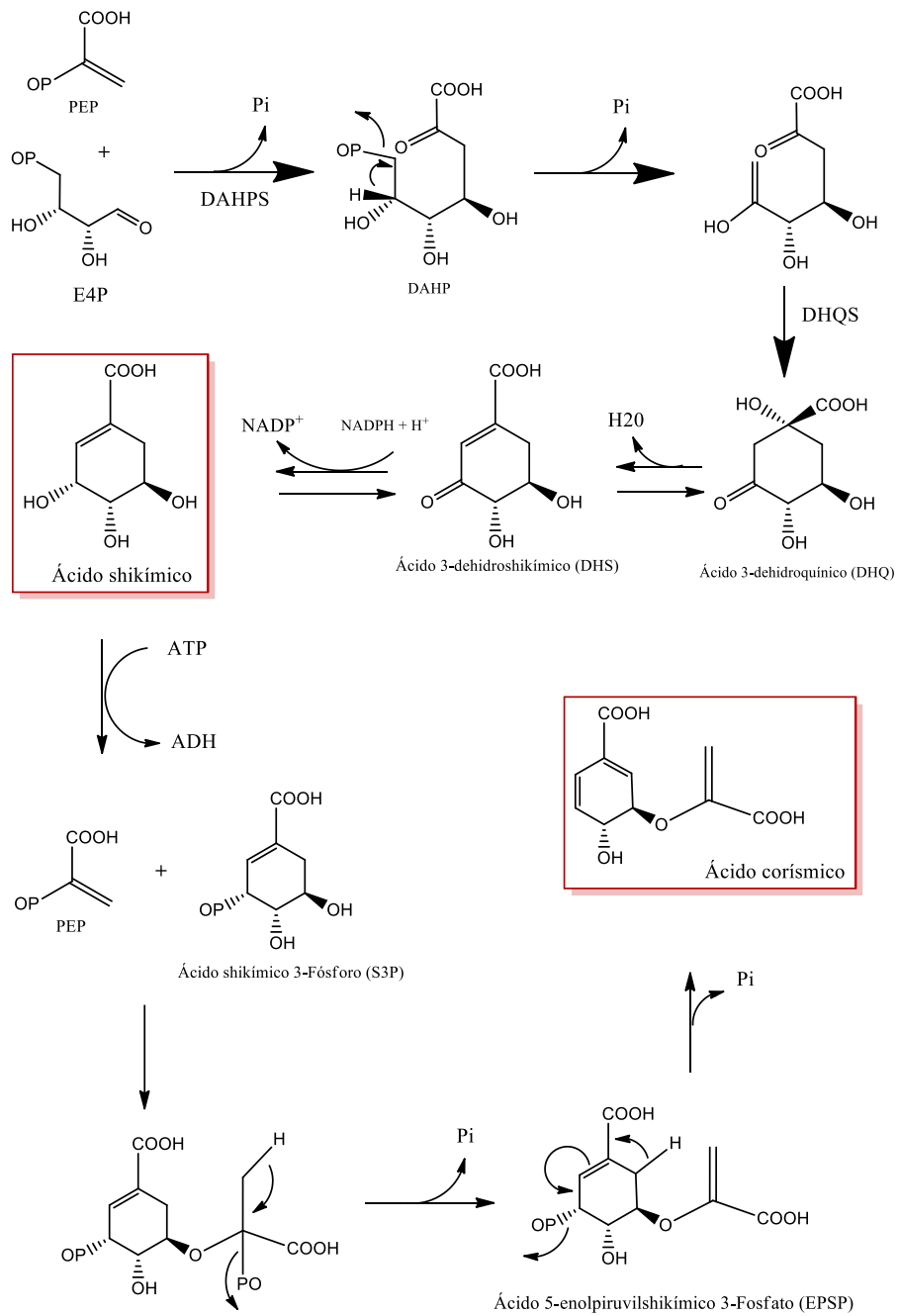
La tercera y cuarta reacción de la ruta son catalizados por enzimas bifuncionales: 3-dehidroquinato deshidratasa/Shikimato deshidrogenasa (DHD/SDH). La enzima DHD en el tercer paso de reacción convierte DHQ en ácido 3-dehidroshikimico (DHS) por eliminación de agua, siendo esta reacción reversible. El DHS es convertido a ácido shikímico en el cuarto paso de reacción, por la reducción del grupo carbonilo en C-5 por la acción catalítica de SDH con NADPH.^{48, 49}

La enzima shikimato quinasa (SK) cataliza la fosforilación del ácido shikímico, la quinta reacción de la ruta, y el producto es ácido shikímico 3-fosfato (S3P) y ADP.^{50,}

⁵¹ El 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa, también llamada aroA enzyme (EPSPS) cataliza la condensación de PEP al grupo 5-hidroxilo de S3P en la sexta

reacción de la ruta del shikimato para formar 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato (EPSP).⁴⁸

El séptimo y último paso de reacción de la ruta del shikimato es la eliminación 1,4-trans del grupo Pi en C-3 de EPSPS para sintetizar ácido corísmico. Este último paso es catalizado por la corismato sintasa (CS) que necesita flavin mononucleótido reducido (FMNH₂) como cofactor. El ácido corísmico, la molécula final de la ruta del shikimato es un punto de ramificación para rutas post- corismato para obtener L-Phe, L-Tyr y L-Trp.⁵²



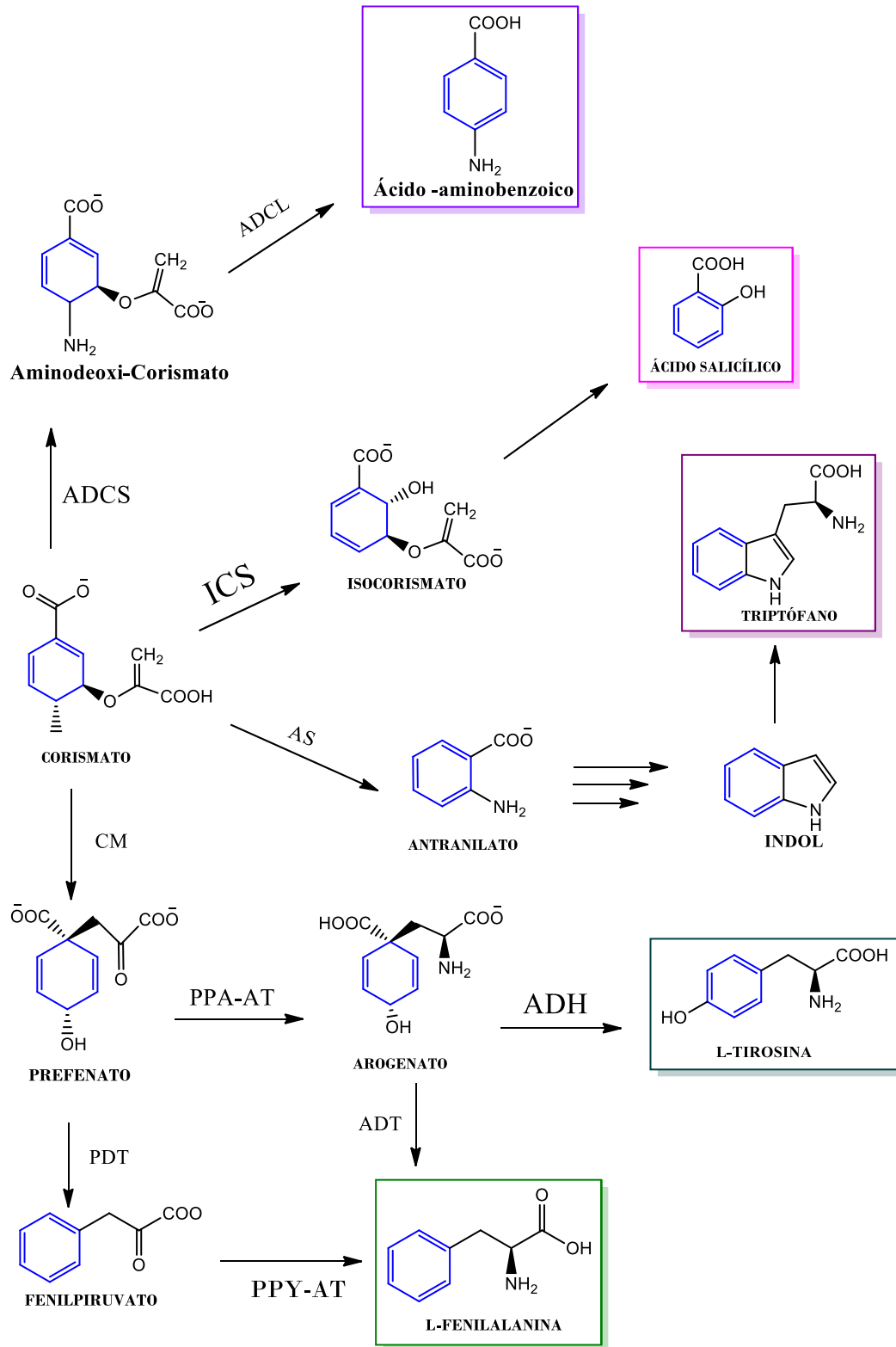
Esquema 3. Ruta del ácido shikímico para la obtención del corismato.

2.5.1.2 Ácidos benzoicos derivados del corismato.

Los aminoácidos aromáticos, folatos, ubiquinonas, enterobactinas y muchos metabolitos secundarios son biosintetizados en algunos pasos a partir de la vía del corismato (Esquema 4) utilizando al menos 4 tipos de enzimas como: aminodeoxicorismato sintasa (ADCS), antranilato sintasa (AS), isocorismato sintasa (ICS) y corismato mutasa (CM).^{53, 54}

ADCS convierte el corismato a aminodeoxicorismato, el cual se somete a una eliminación de su cadena piruvil por la aminodeoxicorismato liasa (ADCL) para formar ácido *p*-aminobenzoico.^{54, 55} La segunda enzima que actúa es la antranilato sintasa (AS) que sintetiza el ácido antranílico, un ácido benzoico amino sustituido importante por ser el primer intermediario para la biosíntesis del triptófano. El ácido antranílico puede difundir a través de las membranas intracelulares al citosol donde es objeto de modificaciones via hidroxilación, CoA ligación y metilación; convenientes como precursores para la síntesis de compuestos antranílicos como avenatramida.⁵⁴

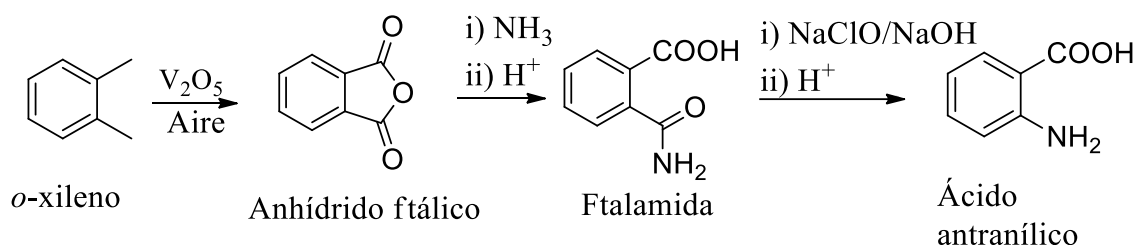
El tercer tipo de enzimas son las ICSs que catalizan la isomerización del corismato a isocorismato que sirve como un intermediario en la producción de ácido *orto*-succinilbenzoico, ácido salicílico (SA) y ácido 2,3- dihidroxibenzoico.^{55, 56} El cuarto tipo de enzima presente en la ruta del corismato es CM, el cual es responsable del primer paso en la síntesis de Phe y Tyr.^{57, 58}



Esquema 4. Ruta del corismato para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y otros metabolitos de importancia biológica.

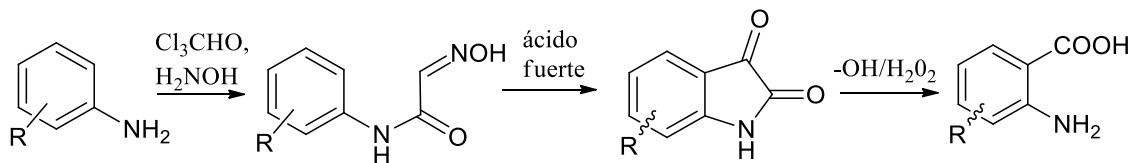
2.5.2 Síntesis industrial de ácido antranílico y principales aplicaciones.

La industria necesita de una gran cantidad de AA por ser muy útil para sintetizar un sinnúmero de productos químicos, por lo que la síntesis está basada en la oxidación de *o*-xileno dando anhídrido ftálico (Esquema 5). El anhídrido es abierto por amoníaco para formar ftalamida, el cual es tratado con hipoclorito de sodio bajo condiciones básicas para inducir un rearrreglo de Hofmann.⁴¹



Esquema 5. Síntesis convencional de ácido antranílico

Es posible obtener derivados del ácido antranílico sustituidos en su anillo aromático por la reacción de sus respectivas isatinas, con hidróxido de sodio y peróxido de hidrógeno (Esquema 6).⁴⁴ El procedimiento ha sido realizado con isatinas alquil, halo, alcoxi, trifluorometil, nitro y N-sustituidas con diversas actividades biológicas.⁵⁹ Las isatinas están disponibles a través de la síntesis de isatinas Sandmeyer con tratamiento de anilina con hidrato de cloral e hidroxilamina.⁶⁰



Esquema 6. Síntesis de derivados de AA vía isatinas sustituidas.

Consecuencia de la gran funcionalidad del ácido antranílico, es posible obtener una enorme cantidad de moléculas con diversas actividades biológicas (figura 4); ejemplo de ello son los derivados de ácido antranílico como el ácido 3-

3.- OBJETIVOS.

3.1.- Objetivo general.

Se aislarán y caracterizarán compuestos orgánicos aislados a partir de la bacteria *Bacillus thuringiensis* cepa ELI52.

3.2.- Objetivos particulares.

- Se obtendrá un extracto crudo de un medio de cultivo inoculado con *B. thuringiensis* cepa ELI52.
- 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.

4.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1.- Medio de Cultivo.

A partir de una colección de cepas de *Bacillus spp.* se eligió aquella con poder inhibitorio hacia algunas bacterias de interés médico (*E. coli*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *S. aureus*, por ejemplo) catalogada como ELI52, siendo identificada como *Bacillus thuringiensis* aislada a partir de una muestra de sustrato de Mérida, Yucatán. Para el crecimiento de la bacteria y la producción de metabolitos secundarios se utiliza el medio de cultivo LB (Luria Bertani) en su presentación líquida, también conocido como caldo LB, adicionado con 5% de almidón soluble. Un litro de caldo LB se compone de:

Extracto de levadura	5 gr
NaCl	10 gr
Peptona de caseína	2.5 gr
Almidón soluble	5 gr
Se ajusta pH 7	

Para placas de agar LB (medio sólido),

Agar bacteriológico	16 gr
---------------------	-------

Esterilización 20 min ,15 libras, 120°C.

El caldo LB debe contener el mismo porcentaje de almidón soluble en cada matraz, por tanto es pesado y añadido individualmente (1.25 g en 250 mL de medio). Los componentes del caldo LB se disuelven en 1 L de agua destilada agitando constantemente hasta obtener una mezcla homogénea y distribuir el volumen en 4 matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL del medio de cultivo en cada uno, tapar con aluminio y someter a esterilización por vapor a presión durante 20 minutos empleando una olla de presión de laboratorio que mantiene las condiciones de presión (15 libras) y temperatura (120°C). Al finalizar, enfriar a temperatura ambiente.

4.2 Crecimiento de la cepa ELI52.

La cepa ELI52 previamente identificada como *Bacillus thuringiensis* pertenece al cepario en palillo de *Bacillus spp.* del laboratorio de investigación que conserva a la bacteria utilizando una característica principal de este género bacteriano que consiste en la respuesta a los estímulos negativos formando unas estructuras conocidas como esporas que les confiere alta resistencia ambiental, manteniendo al microorganismo en un estado metabólicamente inactivo y consecuencia de su fácil dispersión puede reactivarse fácilmente en presencia de las condiciones adecuadas de temperatura y fuente de. Por tanto, para la producción de metabolitos secundarios es necesario reactivar a la bacteria a partir de la resiembra e incubación de esporas de ELI52 en una placa de agar LB proporcionando una fuente limitada de nutrientes, de modo que para mantener el estado activo de la bacteria es necesario proveer constantemente los nutrientes a través del resembrado en placas nuevas con la técnica de aislamiento por estría cruzada, por lo menos 24 horas antes de inocular en medio líquido, se incuba a 29°C y realizar la observación del crecimiento, debe distinguirse la morfología macroscópica de *B. thuringiensis* con colonias que varían de color blanco a marrón presentándose como un cultivo axénico, es decir libre de contaminación por alguna otra bacteria u hongo. Posteriormente, en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero bunsen) se procede a inocularla en los matraces esterilizados y atemperados con caldo LB adicionado con 5% de almidón soluble. Son incubados en una estufa a 29 °C con una agitación orbital de 175 rpm durante 4 días. Transcurrido el tiempo de incubación el medio es centrifugado a 6000 rpm durante 8 min con el objetivo de separar las células bacterianas del cultivo líquido, separando por decantación el botón celular del cultivo tratado previamente.

4.3 Extracción del cultivo sin células con disolventes orgánicos.

Al sobrenadante se le realiza una extracción por triplicado con el disolvente acetato de etilo en una relación de volumen 1:1. La fase orgánica recolectada se seca con Na₂SO₄, y se concentra a presión reducida obteniendo un extracto crudo

de aspecto viscoso de color marrón-amarillo de un olor penetrante en un rendimiento de 180 mg/L.

4.4 Fraccionamiento del extracto de la cepa ELI52 por columna cromatográfica.

El extracto de la bacteria es fraccionado por medio de columna cromatográfica de gel de sílice (Kieselgel 60, 0.04-0.063 mm). Los disolventes para la fase móvil que se encontraron adecuados para la separación consisten en:

Fase móvil	Acetato de etilo	Cloroformo	Metanol
1	6	4	0
2	6	3.5	0.5
3	6	3	1
4	6	2.5	1.5
5	5	4.5	0.5
6	5	4	1
7	5	3.5	1.5
8	5	3	2
9	4	4.5	0.5
10	4	5	1
11	4	4	2
12	4	3	3
13	3	2	5
14	0	0	10
15	0	0	10

Tabla 1. Sistemas para el fraccionamiento del extracto bacteriano

De este primer fraccionamiento se obtuvieron 5 fracciones de importancia, en donde la fracción 1 correspondió a un compuesto desconocido que presentó fluorescencia UV en onda corta y larga. Se trabajó en su purificación y en su posterior elucidación, así como también en la fracción 2.

4.5 Purificación de la fracción 1: Obtención del ftalato de bis (2-etilhexilo).

La fracción 1 tiene la característica de presentarse en forma de un líquido viscoso y espeso, el cual al analizarse por resonancia magnética indica señales importantes en la región de aromáticos, aunque a primera vista se nota que está mezclado con otros compuestos. Esta fracción se comporta muy bien con

disolventes pocos polares, por lo que su purificación se lleva a cabo con columna cromatográfica con diferentes proporciones de hexano y acetato de etilo, obteniendo un compuesto viscoso de incoloro a ligeramente amarillo con un aroma característico que asemeja al de los plásticos. Con apoyo en la cromatografía en placa fina se observa que en la purificación de la fracción se consigue aislar un sólo compuesto que lo convierte en una muestra adecuada para realizar su elucidación estructural con uso de técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear, Espectrometría de Masas y Espectroscopía infrarrojo.

4.6 Identificación y elucidación del compuesto de tipo ftalato.

El compuesto es analizado y elucidado por RMN ^1H y ^{13}C , así como sus experimentos bidimensionales COSY y HSQC. Las técnicas de espectrometría de masas y espectroscopía infrarrojo son utilizadas como técnicas auxiliares en la elucidación estructural.

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-SM) y espectrometría de masas de alta resolución (HR-SM) en el espectrómetro de masas Jeol *JMS-700*.

Las rotaciones ópticas se realizaron en el polarímetro Atago Modelo AP-300 y se expresan como valores específicos $[\alpha]$ (longitud de onda empleada: línea D del Na (589 nm)), con indicación del disolvente y la concentración utilizada en (g/100 mL). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.

4.7 Purificación de la fracción 2: Identificación del compuesto cristalino.

La fracción 2 posee un compuesto que presenta fluorescencia azul en onda corta y larga, pero viene mezclado con otros compuestos y principalmente grasa del extracto. La purificación se realiza con sistemas compuestos de Hexano y una mezcla de cloroformo y metanol en proporción 7:3.

Este compuesto cristaliza con una solución hecha con 80% Hexano: 20% Mezcla Cloroformo-Metanol 7:3, obteniéndose unos cristales finos en forma de aguja que se aglomeran, el aceite que le da una coloración amarilla al cristal es eliminado con la ayuda de éter etílico, el cual se lleva los cristales dejando la grasa/aceite adherido al vidrio del vial en donde estaba contenido.

La elucidación se lleva a cabo con los mismos equipos de RMN ^1H y ^{13}C utilizados para el análisis de la fracción 1, el cristal se mandó a analizar al laboratorio de difracción de rayos X del ICUAP y el punto de fusión se obtuvo con un fusiómetro digital IA-9100.

5.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

5.1 Extracción.

Para realizar la búsqueda de metabolitos secundarios se seleccionó una cepa ELI 52 identificada como *Bacillus thuringiensis*. En trabajos previos de laboratorio se había observado que esta cepa tiene una alta capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y hongos de interés agrícola.

Para el crecimiento de esta cepa, primeramente, se inoculó en un medio líquido LB (Luria Bertani) enriquecido con almidón soluble al 5%, esto en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero bunsen). Una vez inoculado el cultivo se incubó en una estufa a 29 °C y con una agitación orbital de 175 rpm durante 4 días. Pasado el tiempo de incubación se procedió a centrifugar a 6000 rpm durante 8 min separando por decantación el botón celular del cultivo ya tratado.

En el cultivo ya sin células, se realizó una extracción con acetato de etilo en una relación 1:1 de volumen, coadyuvado por un embudo de decantación. El extracto fue secado con sulfato de sodio (Na_2SO_4) y seguido se realizó un filtrado con ayuda de un embudo únicamente utilizando algodón y Na_2SO_4 . Seguido se concentró a presión reducida y 38 °C mediante un rotavapor.

Al mantenerse las condiciones óptimas para el desarrollo de la cepa *Bacillus thuringiensis* ELI52, se obtiene un extracto crudo de 170 mg L⁻¹, de color café y olor penetrante. Este extracto se ha recolectado varias veces para tener una cantidad apropiada para optimizar su separación.

5.2 Purificación

El extracto crudo fue separado mediante cromatografía de columna de 45 cm x 5.5 cm de diámetro con gel de sílice kieselgel 60 de 0.04-0.063 mm, mediante una fase móvil de acetato de etilo, cloroformo y metanol en diferentes concentraciones (desde 6:4:0 hasta 4:2:4) obteniendo diferentes fracciones. Se realizaron otras purificaciones mediante mini columnas con medida de 8 cm, en ella también fueron

utilizados diferentes sistemas de disolventes con distintas polaridades y concentraciones (Tabla 1).

Del análisis de estos tubos mediante placas TLC (Figuras 5 y 6) con una fase móvil de AcOet, CHCl₃, MeOH (5:4:1), se obtuvieron cualitativamente 5 fracciones. En cada fracción se obtuvieron diferentes bandas, algunas de ellas con fluorescencia en ambas longitudes de onda de luz UV y tenía fluorescencia azul intensa. Gran cantidad de compuestos de origen natural debido a su estructura química tienen la característica de emitir fluorescencia, siendo la Luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (360 nm) un revelador importante para la identificación y aislamiento de productos naturales a partir de técnicas cromatográficas.

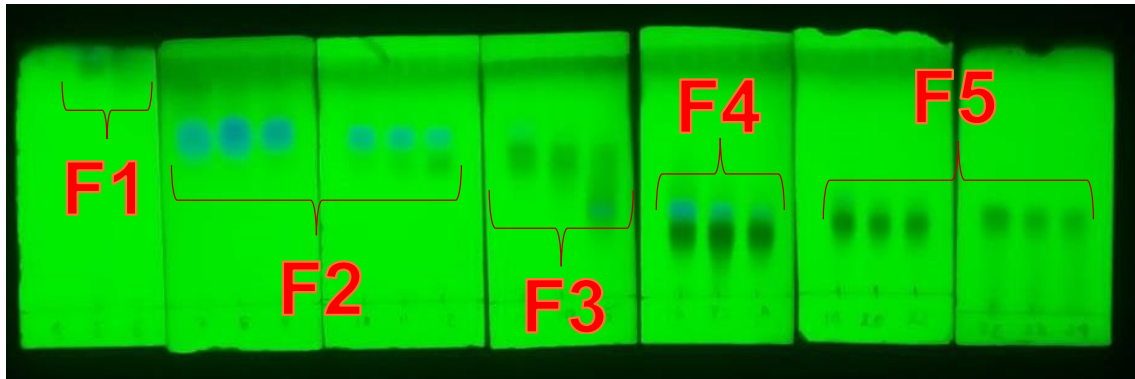


Figura 5. Fracciones principales obtenidas por cromatografía en columna de un extracto de *B. thuringiensis* Revelador UV 254 nm. Revelador: Luz UV 254 nm.

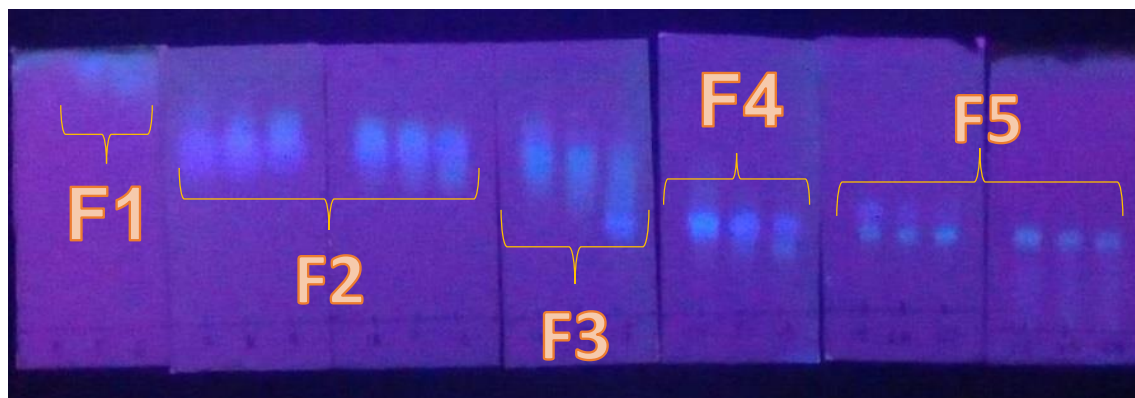


Figura 6. Fracciones principales obtenidas por cromatografía en columna de un extracto de *B. thuringiensis*. Revelador: Luz UV 360 nm.

5.3 Caracterización

Compuesto 1

La fracción catalogada como número 1 exhibe un compuesto que emite fluorescencia en onda corta y onda larga en combinación con otros compuestos. Esta fracción 1 es purificada con sistemas de hexano: acetato de etilo en distintas proporciones y se logra aislar un compuesto líquido viscoso e incoloro cuyo monitoreo por TLC indica una sola banda.

Se obtuvo el espectro de masas de alta resolución resultando en un peso molecular de 390.2779 g/mol; de igual manera se realizó un análisis elemental obteniéndose una fórmula química de $C_{24}H_{38}O_4$, tal y como se muestra en la figura

7.

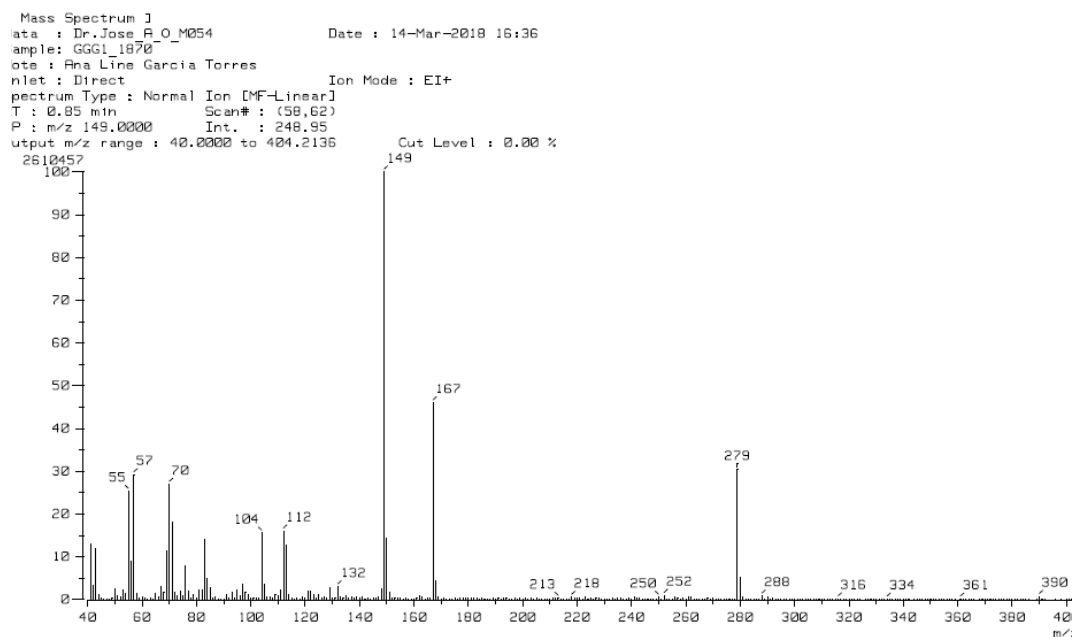


Figura 7. Espectrometría de masas por impacto electrónico (EI-MS) del compuesto 1

Con esta fórmula química se puede calcular el número de insaturaciones del compuesto de acuerdo a la fórmula $\frac{(2a+2)-b}{2}$ en donde C_aH_b , los átomos de nitrógeno son restados al número de hidrógenos, el número de oxígenos no afecta al valor y en caso de halógenos, éstos son sumados a la cantidad de hidrógeno. De acuerdo a este cálculo, $C_{24}H_{38}O_4$ tiene:

$$\frac{[(2 * 24) + 2] - 38}{2} = 6 \text{ insaturaciones}$$

Para determinar la presencia de los principales grupos funcionales se obtuvo el espectro de infrarrojo donde se observan bandas en 2963.4, 2927.6, 2861.0, 1718.4, 1465.1, 1271.6, 1120.8, 1066.0 y 739.9 cm^{-1} , como se observa en la figura 8.

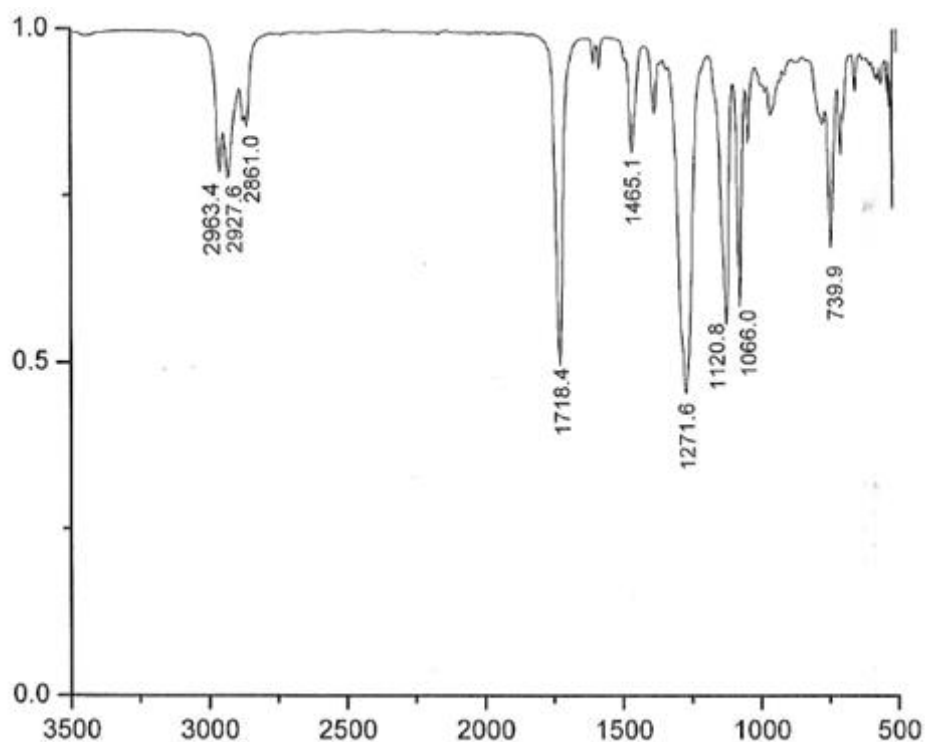


Figura 8. Espectro de IR del compuesto 1

La elucidación estructural del compuesto se realizó con espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión para obtener el espectro de hidrógeno (^1H) y el de carbono (^{13}C) así como de dos dimensiones que abarcan los experimentos RMN COSY y HSQC. El espectro de RMN ^1H 500 MHz en CDCl_3 del compuesto se muestra en la figura 9.

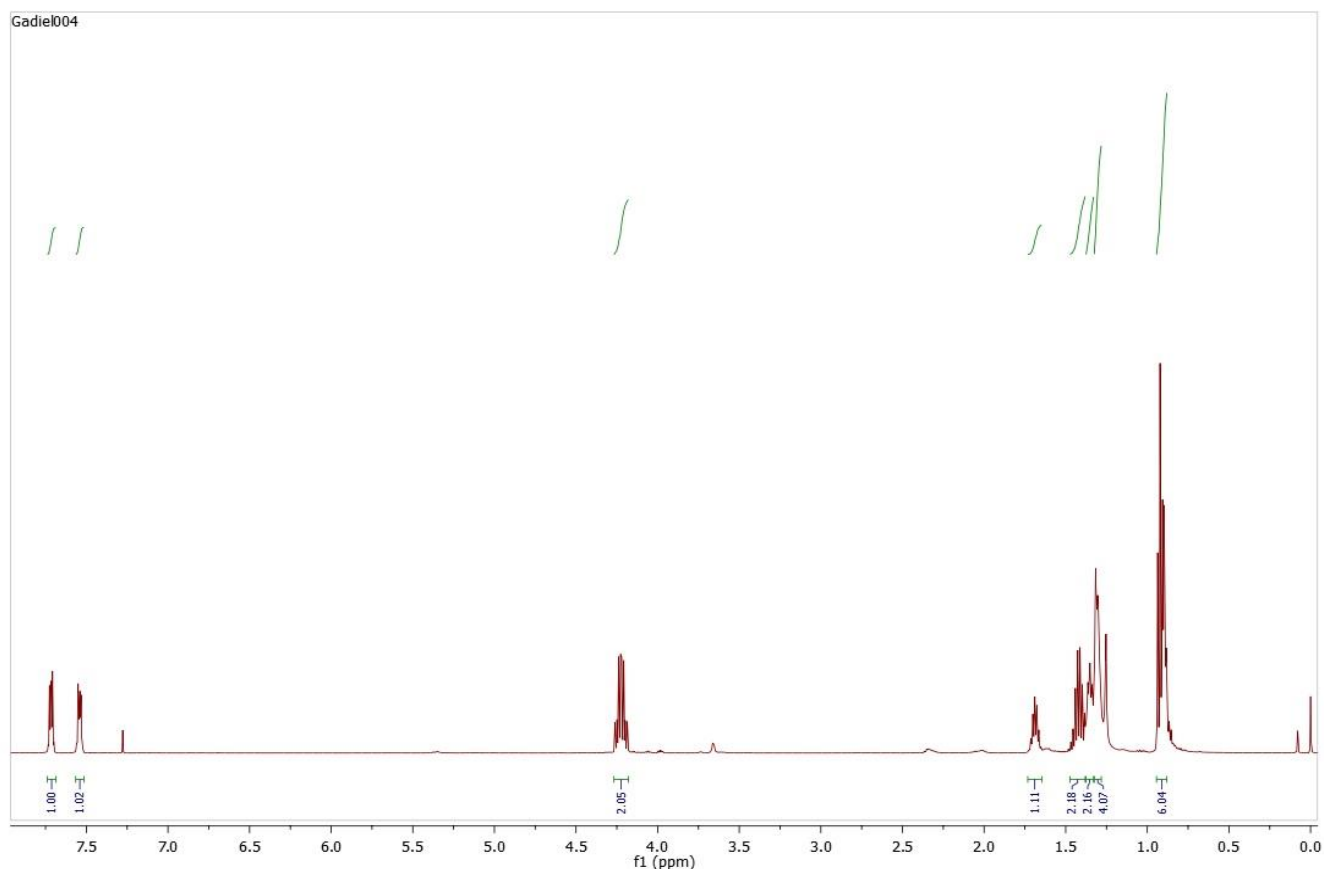


Figura 9. Espectro ^1H RMN 500 MHz en CDCl_3 del compuesto aislado de la fracción 1.

En el espectro RMN ^1H , se identifican las señales en 7.71 ppm (1 H, dd, $J = 3, 6$ Hz) y 7.54 ppm (1 H, dd, $J = 3, 6$ Hz) que indican la presencia de protones aromáticos. Estas dos señales presentan una multiplicidad denominada como dobles de dobles con constante de acoplamiento $J = 3, 6$ Hz (valor para protones vecinales *cis*) y cada una integra para un protón, la existencia de estos protones aromáticos sugiere la

presencia de un anillo de benceno *orto*-disustituido teniendo los mismos sustituyentes en ambas posiciones, como se observa en la figura 10.

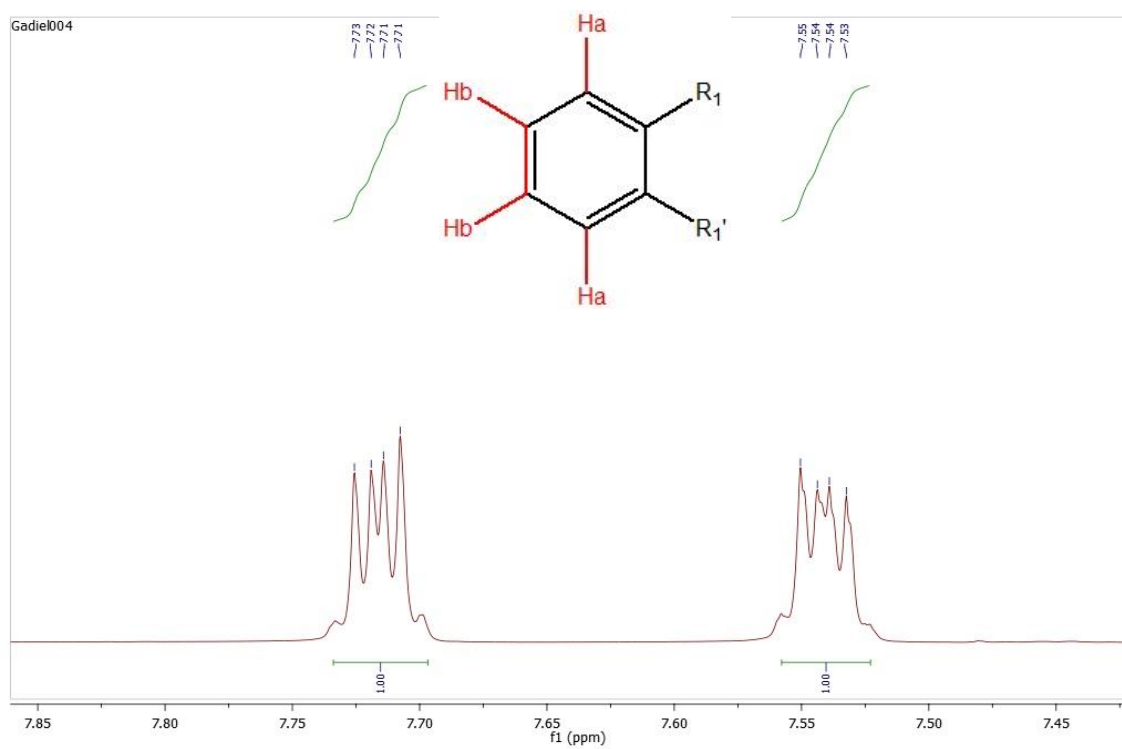


Figura 10. Ampliación de la región 7.45-7.86 ppm del espectro de RMN ¹H.

La señal de protón en 4.22 ppm (2H, dd, $J = 6, 17$ Hz) perteneciente a un metileno unido a un átomo electronegativo (para este caso es el oxígeno), tiene una multiplicidad compleja perteneciente a dos dobles de dobles solapados. Integra para dos hidrógenos H_a y H_b diastereotópicos, y que integre para dos hidrógenos diferentes significa que tiene un centro estereogénico adyacente, como se muestra en la figura 11.

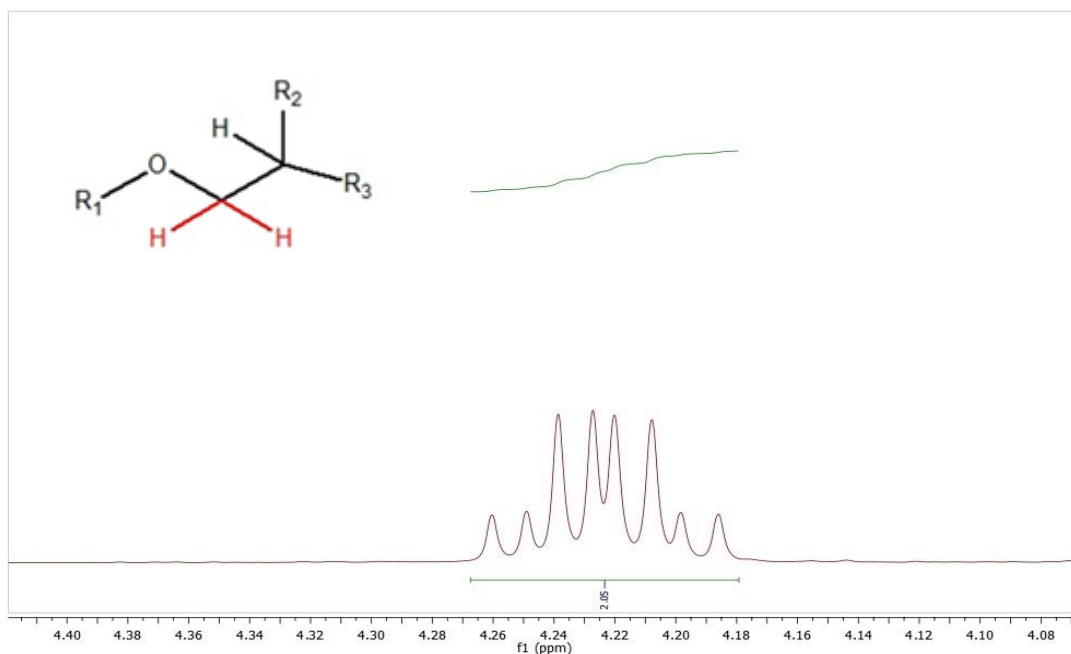


Figura 11. Ampliación de la señal en 4.22 ppm del espectro ^1H .

En 1.69 ppm aparece una señal séptuple con un acoplamiento de $J = 6$ y que integra para un protón, también se observan un grupo de señales que se encuentran en 1.30, 1.35 y 1.42 ppm que indican 4 metilenos y las señales de 0.90 y 0.93 ppm que corresponden a dos metilos diferentes.

Adicionalmente se obtuvo el espectro de RMN de ^{13}C en donde se observan 12 señales y destacan las señales en 167.8 ppm correspondiente a un carbonilo y en 68.1 ppm correspondiente a un metileno unido a un oxígeno y cuatro señales de carbonos cuaternarios, como se observa en la figura 12.

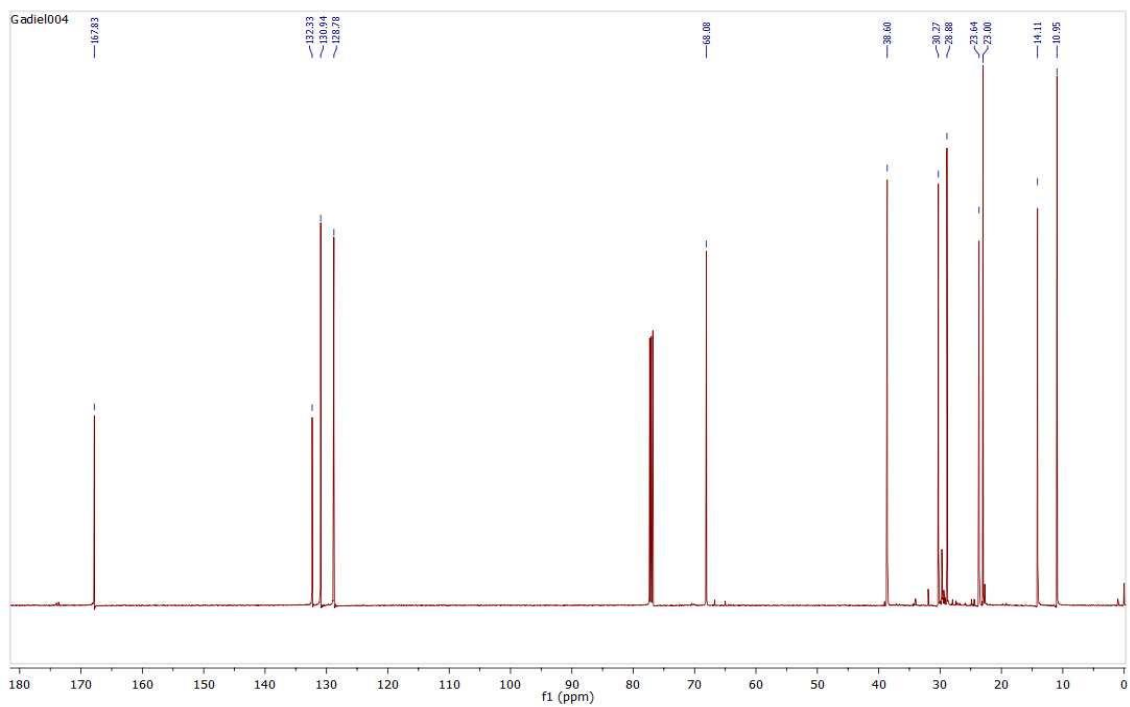


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C 125 MHz en CDCl_3 del compuesto 1.

El experimento RMN bidimensional COSY brinda información acerca de la correlación a un enlace de los diferentes tipos de hidrógenos pertenecientes a la molécula y esto sirve para asignar de manera confiable la posición de los hidrógenos en la estructura. El espectro COSY se muestra en la figura 13.

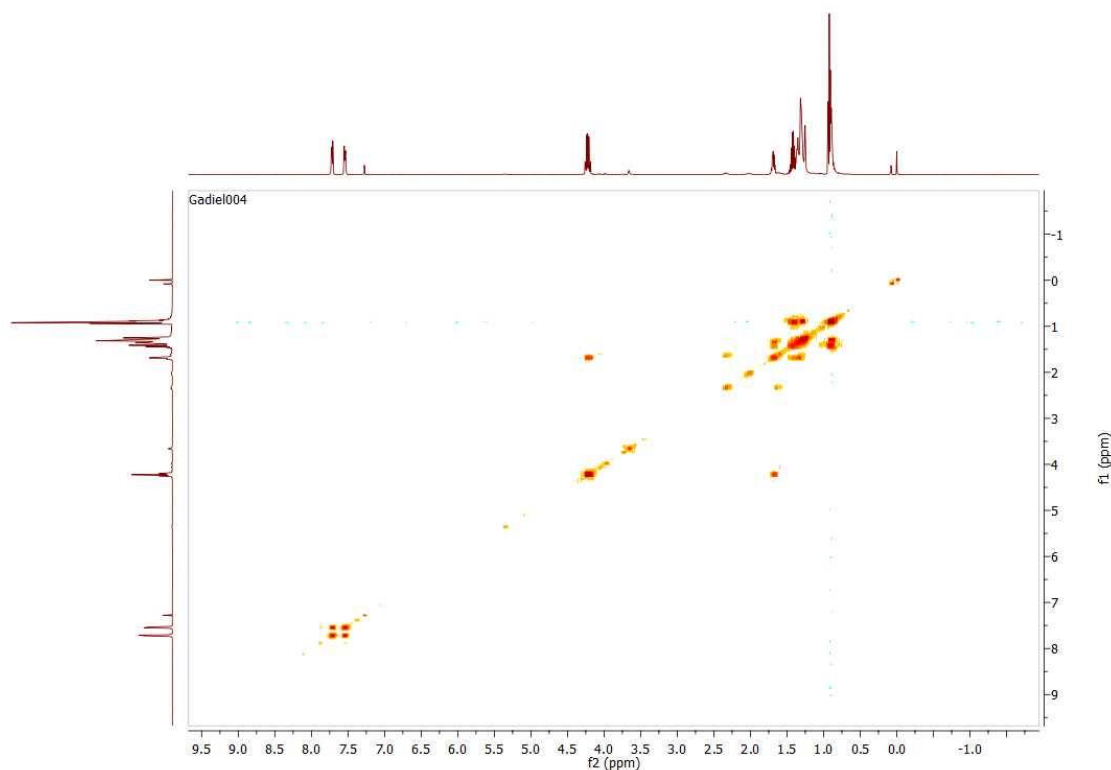


Figura 13. Espectro RMN 2D COSY en CDCl_3 del compuesto aislado de la fracción 1.

En la ampliación del espectro COSY en la región de aromáticos, se observa que ambas señales de hidrógeno pertenecientes a un anillo aromático se correlacionan únicamente entre sí dando a entender que la cadena radical está separada del anillo por algún grupo funcional (con oxígeno). Dada la información obtenida con el espectro de RMN ^{13}C se puede suponer que este grupo funcional es un carbonilo unido directamente al anillo por lo que las señales de protón aparecen más desplazadas en el campo debido al apantallamiento del grupo funcional al anillo aromático disustituido, como se muestra en la figura 14.

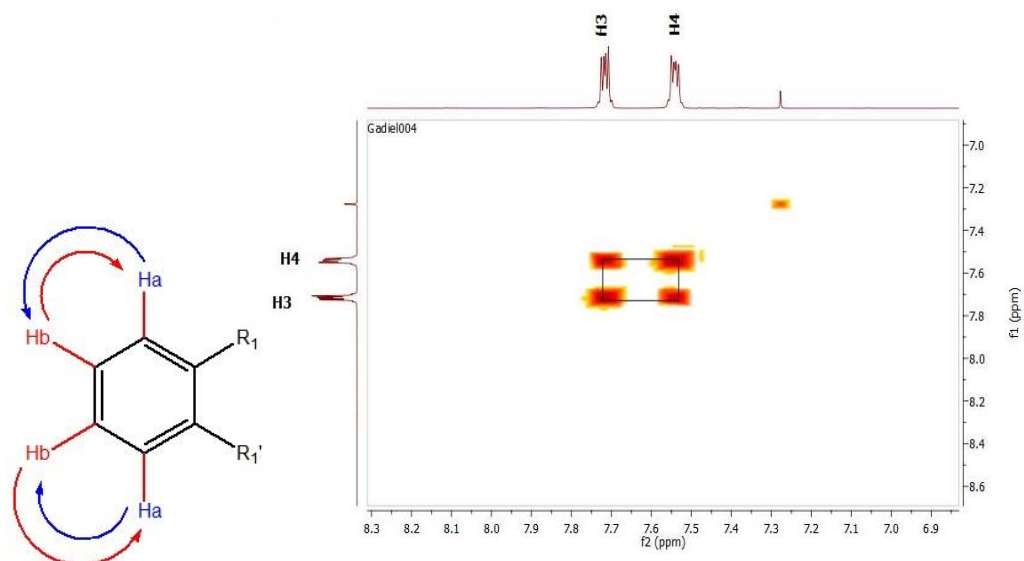


Figura 14. Espectro COSY, correlación de los protones aromáticos

En el espectro COSY se continúan observando las correlaciones de las señales en el rango de 0.8 a 1.8 ppm donde se destacan las correlaciones de los dos tipos de metilo con sus respectivos metilenos, indicando que estos metilos están separados y que a su vez hay unas señales de metileno correlacionadas con la señal de ^1H perteneciente a un centro estereogénico, como se observa en la figura 15.

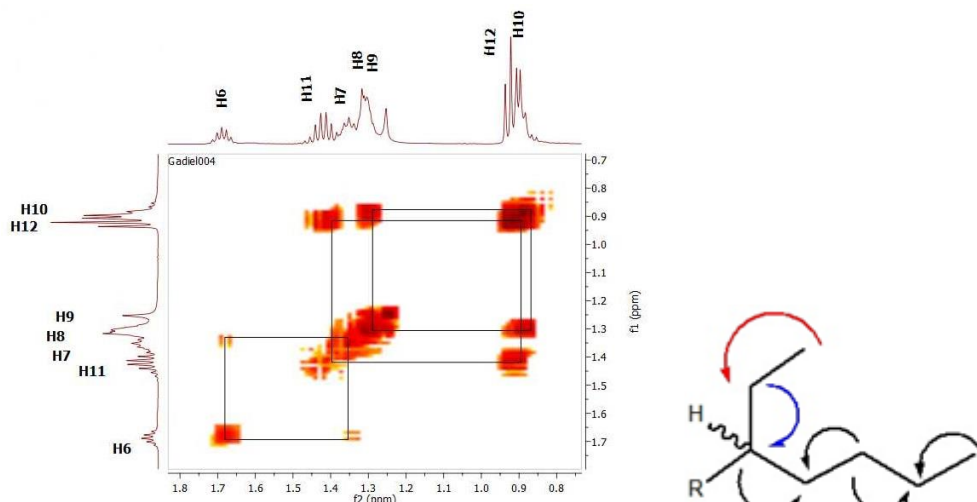


Figura 15. Espectro COSY, correlación entre las señales de los metilos y metilenos de compuesto 1.

En la siguiente correlación se observa la señal del centro estereogénico acoplado con un metileno con hidrógenos diferentes y que por su desplazamiento químico indica que está enlazado a un heteroátomo (oxígeno), como se muestra en la figura 16.

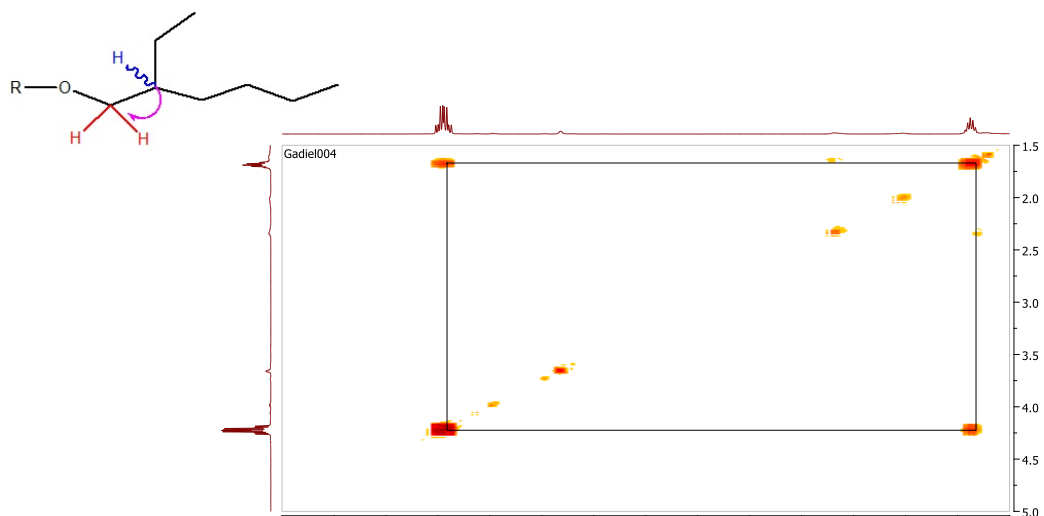


Figura 16. Espectro COSY, correlación entre la señal de un metileno unido al oxígeno y al centro estereogénico de compuesto 1.

Con la información obtenida con los espectros ^1H , ^{13}C y COSY se propone la siguiente estructura denominada como ftalato de bis (2-etilhexilo) (Figura 17).

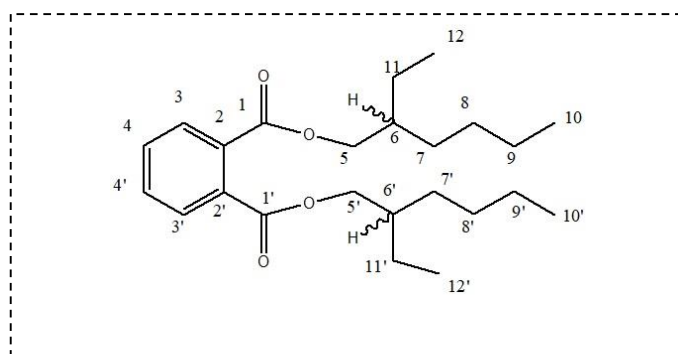


Figura 17. Estructura de ftalato de bis (2-etilhexilo).

Las señales de carbono se asignan inequívocamente de acuerdo a la información que proporciona el espectro RMN 2D HSQC (Figuras 18-21).

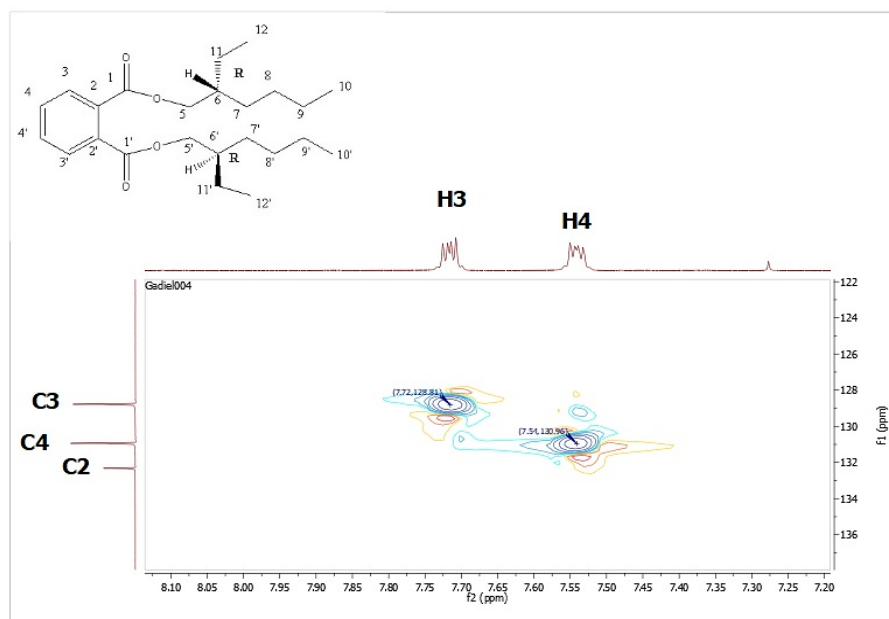


Figura 18. Espectro RMN 2D HSQC en CDCl_3 para la asignación de señales aromáticas de carbono e hidrógeno.

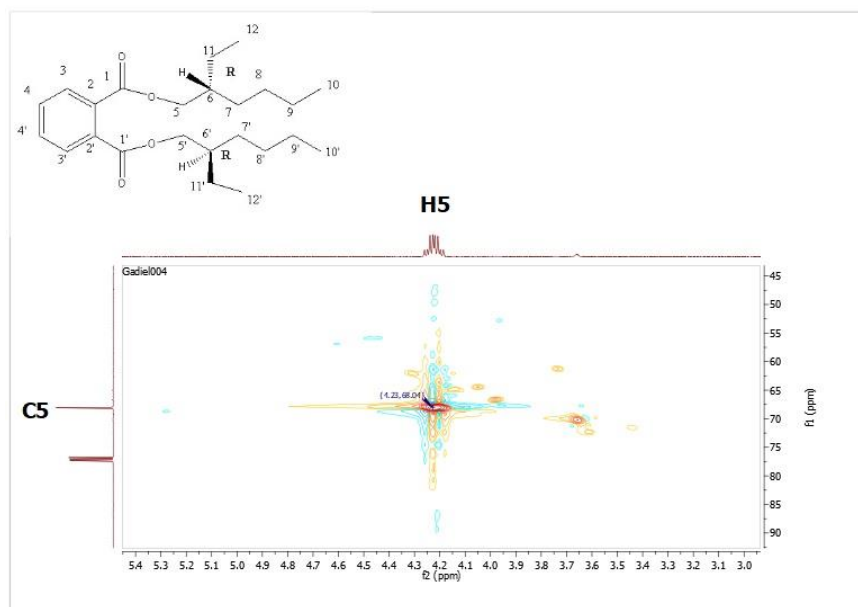


Figura 19. Espectro RMN 2D HSQC en CDCl_3 para la asignación de la señal del $\text{CH}_2\text{-O}$ unido al centro estereogénico.

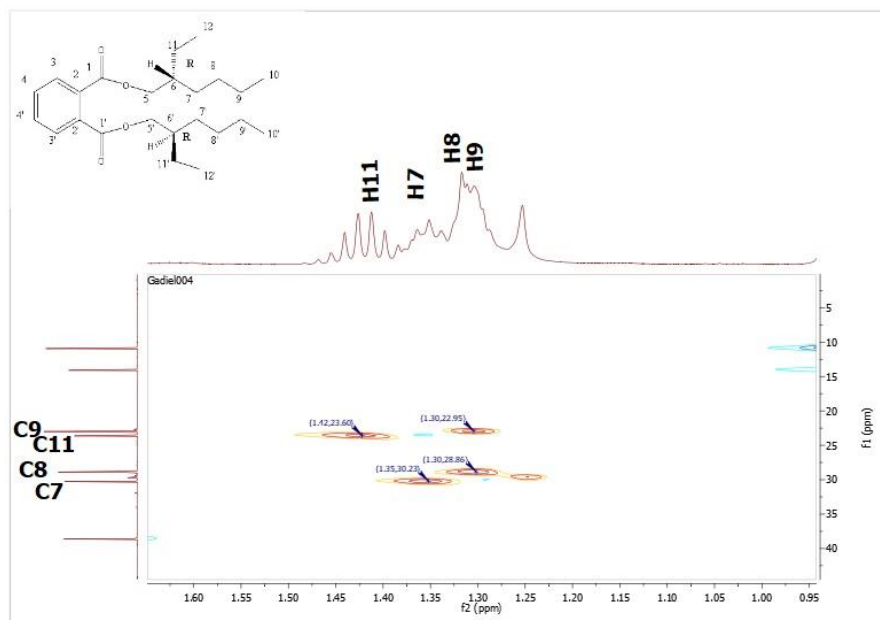


Figura 20. Espectro RMN 2D HSQC en CDCl_3 para la asignación de las señales del centro estereogénico y las pertenecientes a los metilenos.

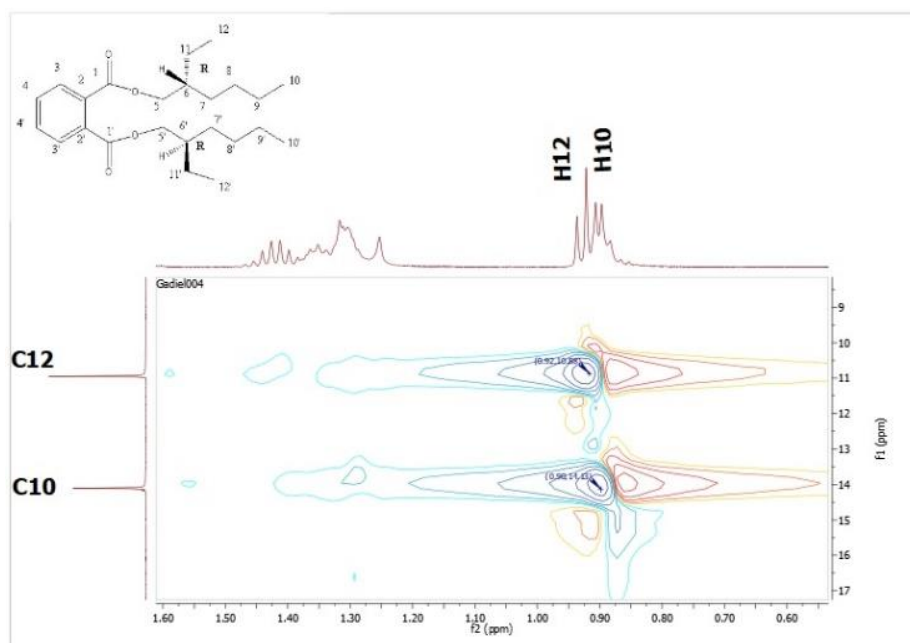


Figura 21. Espectro RMN 2D HSQC en CDCl_3 para la asignación de las señales de los metilos.

Al compuesto, se le determinó su rotación óptica, obteniéndose un resultado de $[\alpha]^{25}_D = -17.4$ (c 1.15, Hex) indicando que la molécula es ópticamente activa. Por comparación con datos de la literatura²⁷ se sugiere una configuración absoluta de *R*. Con todos los datos el compuesto fue identificado como ftalato de *bis* (2*R*-etilhexilo). Los datos espectroscópicos se resumen en la figura 22 con la estructura asignada y su estereoquímica correspondiente.

El hallazgo de este tipo de compuesto sintetizado por una bacteria es poco común debido a su origen en la manufactura y se conoce poco sobre su biosíntesis; sin embargo, existe un estudio realizado con di-*n*-butil ftalato (DBP) que demuestra la producción biológica por hongos filamentosos confirmando que la ruta del ácido shikímico es la que produce este compuesto ensamblando el ácido ftálico con el alcohol butílico a través de una esterificación. Este estudio es muy importante porque confirma la habilidad metabólica para la biosíntesis del DBP. Hasta hoy no existen estudios acerca de la ruta metabólica de otros ftalatos como es el DEHP, sin embargo, es muy probable que el comportamiento sea similar y que los microorganismos sean capaces de producir este compuesto a través de alguna vía metabólica.⁶⁵

Para corroborar que el ftalato no es un artefacto proveniente del medio de cultivo ni de su tratamiento químico con disolventes; se procedió a obtener un extracto del medio LB con la metodología en condiciones experimentales idénticas. El extracto crudo obtenido se analiza con espectroscopía RMN ¹H 300 MHz y se corroboró la ausencia de este compuesto, componente de plásticos no es un artefacto de algún plástico utilizado en la industria (envases de los medios de cultivo o disolventes), concluyendo que es sintetizado por la propia bacteria.

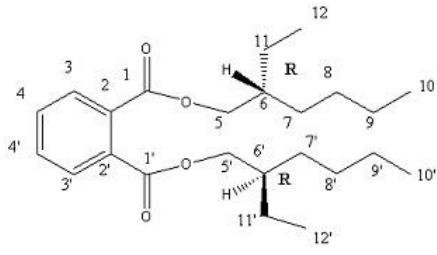
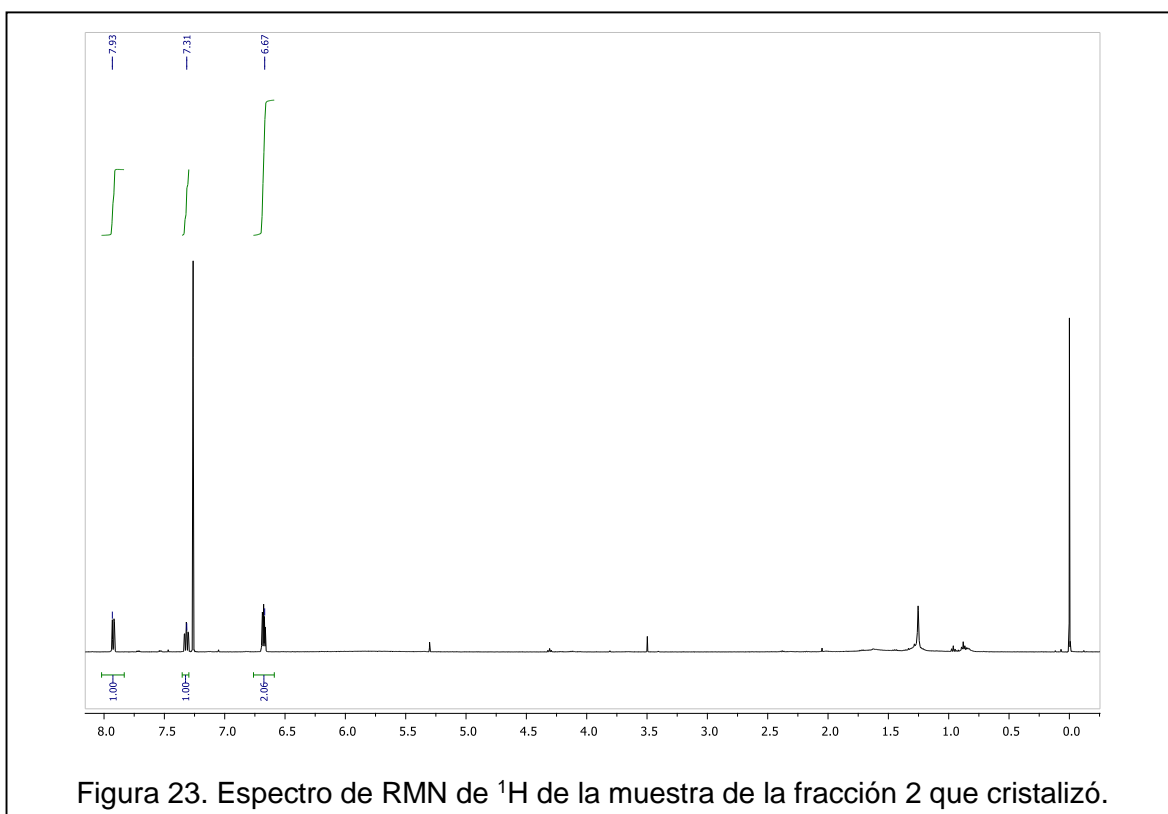
Compuesto		Nombre de identificación Ftalato de bis-R-(2- etilhexilo) (DEHP)				
		P.Mol (g/mol) 390.5561				
		Rendimiento 10 %				
		Punto de Fusión (°C) Líquido incoloro				
		[α] ²⁵ _D = -15.15 (c=1.32, Hex)				
Fórmula empírica C ₂₄ O ₄ H ₃₈	Análisis Elemental					
	Calculado (390.2770)			Experimental (390.2779)		
	C 24	H 38	O 4	C 24	H 38	O 4
IR (cm ⁻¹) ()						
MS m/z (int. Rel.)	149 (100%), 167 (45%), 279 (33%), 57 (30%), 71 (18%)					
¹ H RMN δ ppm (500MHz, CDCl ₃)			¹³ C RMN δ ppm (125MHz, CDCl ₃)			
7.71 (2H, dd, J = 3, 6 Hz) 7.54 (2H, dd, J = 3, 6 Hz) 4.22 (4H, dd, J = 5.5, 11 Hz) 1.69 (2H, 2d, J = 6 Hz) 1.42 (4H, dd, J = 7.5, 7 Hz) 1.35 (4H, t, J = 6 Hz) 1.30 (8H, m) 0.93 (6H, d, J = 7.5 Hz) 0.90 (6H, d, J = 7.5 Hz)			167.8 (C=O) 132.5 (Cq) 130.8 (CH) 128.8 (CH) 68.1 (CH ₂ -O) 38.4 (CH) 30.1 (CH ₂) 28.9 (CH ₂) 23.8 (CH ₂) 23.0 (CH ₂) 14.0 (CH ₃) 10.8 (CH ₃)			
Observaciones (color del compuesto, características) Líquido viscoso color transparente						

Figura 22. Resumen de datos de la caracterización del compuesto.

Compuesto 2

En la búsqueda de otra clase de metabolitos se procede a purificar la fracción 2 la cual posee una intensa absorbancia UV presentando un color azul muy notable pero con un grado de impureza alto. Esta fracción es purificada por columna cromatográfica con una serie de proporciones constituidos por Hexano y una mezcla de cloroformo:metanol (7:3). El compuesto obtenido logra cristalizar a pesar de estar mezclado con otros compuestos contaminantes como grasas propias del extracto bacteriano, sin embargo; éstos cristales son sometidos a lavados con éter etílico y a recristalización con un sistema de 80% Hexano: 20% Mezcla (CHCl_3 :MeOH, 7:3).

Este compuesto tuvo su dificultad en la purificación debido a que dicha fracción está constituida por diversos compuestos difíciles de separar y que prácticamente tienen los mismos valores de corrimiento (R_f). Sin embargo el compuesto logró cristalizar lo cual simplificó la purificación. En la siguiente figura 23 se observa el espectro de RMN de ^1H de este compuesto.



En la figura 24 se observan las expansiones de las diferentes señales.

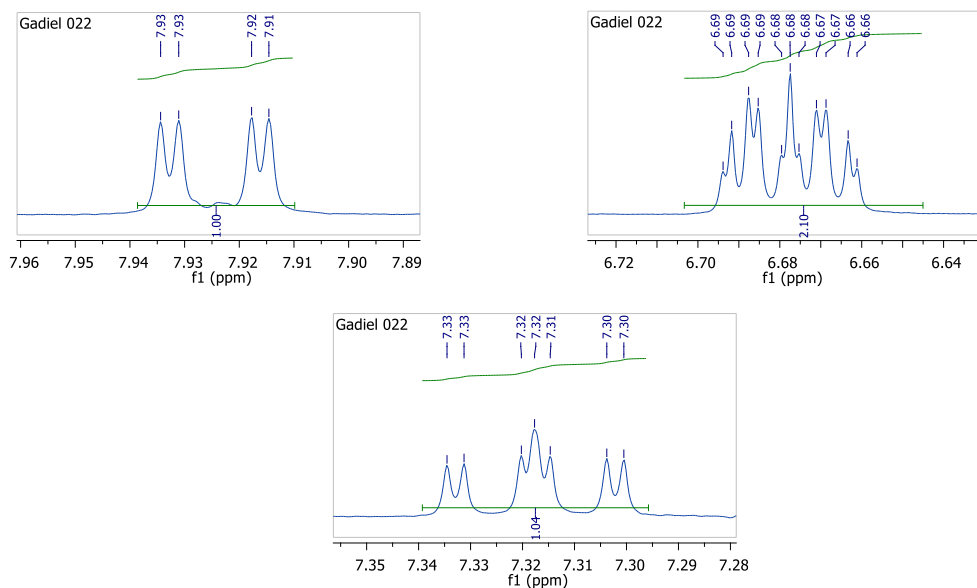


Figura 24. Expansión del espectro ^1H de las señales de la fracción 2

En el espectro de protón obtenido se observan señales que aparecen entre 6.5 y 8 ppm lo cual indica que el compuesto es de carácter aromático, las multiplicidades son complejas de las que se distinguen un doble de dobles y dos múltiples. La información espectroscópica se resume en la siguiente tabla:

No. Señal	Desplazamiento químico en ppm	Integración	Multiplicidad	Constante de acoplamiento (J).
1	7.924	1H	dd	1.5 y 8
2	7.318	1H	m	
3	6.677	2H	m	

Tabla 2. Datos espectroscópicos de la fracción 2 cristalizada

En el espectro de RMN de ^{13}C se observan siete señales de importancia, en 172.53 ppm hay una señal que puede pertenecer a un carbonilo del tipo éster o ácido carboxílico, en la región entre 110 y 160 ppm se observan el resto de las señales pertenecientes a carbonos aromáticos (Figura 25).

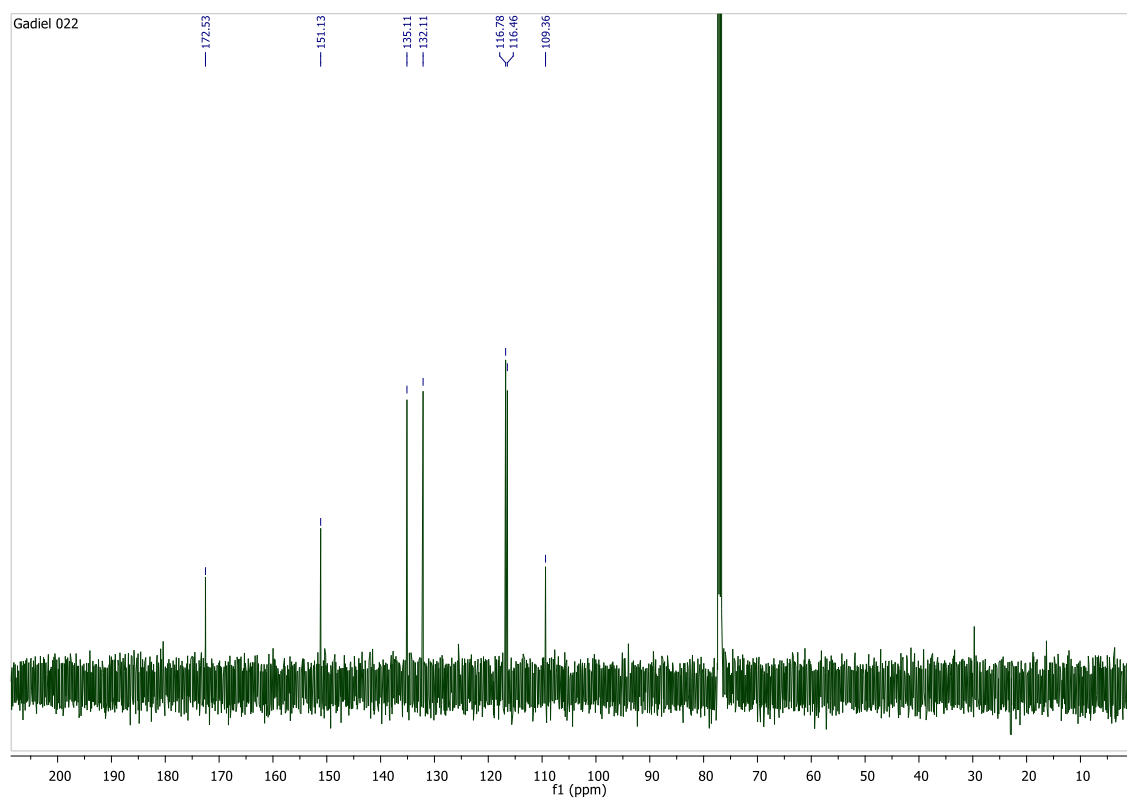


Figura 25. Espectro ^{13}C a 125 MHz de la fracción 2.

Con la ayuda del experimento RMN 2D COSY se observa la correlación de las señales de protón indicando que los protones enlazados al anillo aromático se correlacionan únicamente entre ellos (Figura 26).

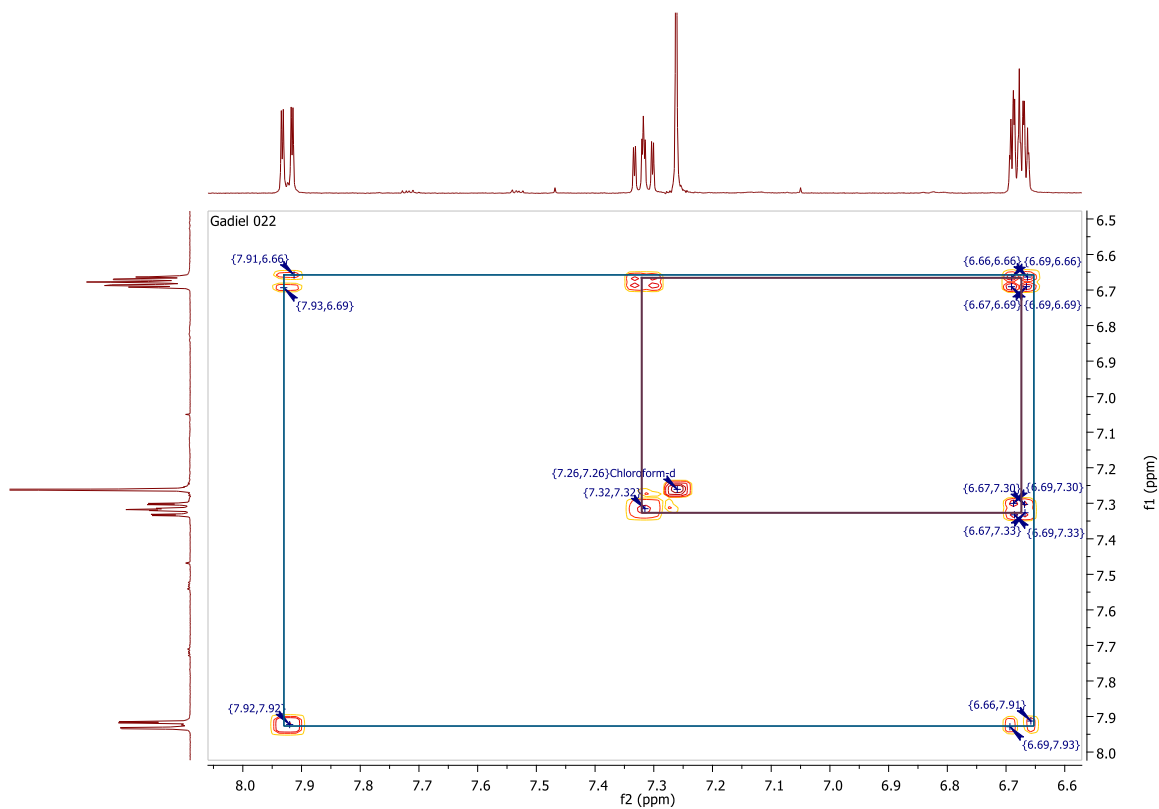


Figura 26. Espectro RMN 2D COSY ¹H-¹H de la fracción 2.

El espectro RMN 2D HSQC indica las correlaciones inequívocas entre las señales de protón y de carbono pertenecientes a las 4 señales aromáticas, dos carbonos cuaternarios pertenecientes al anillo aromático y un carbono perteneciente a un carbonilo (Figura 27).

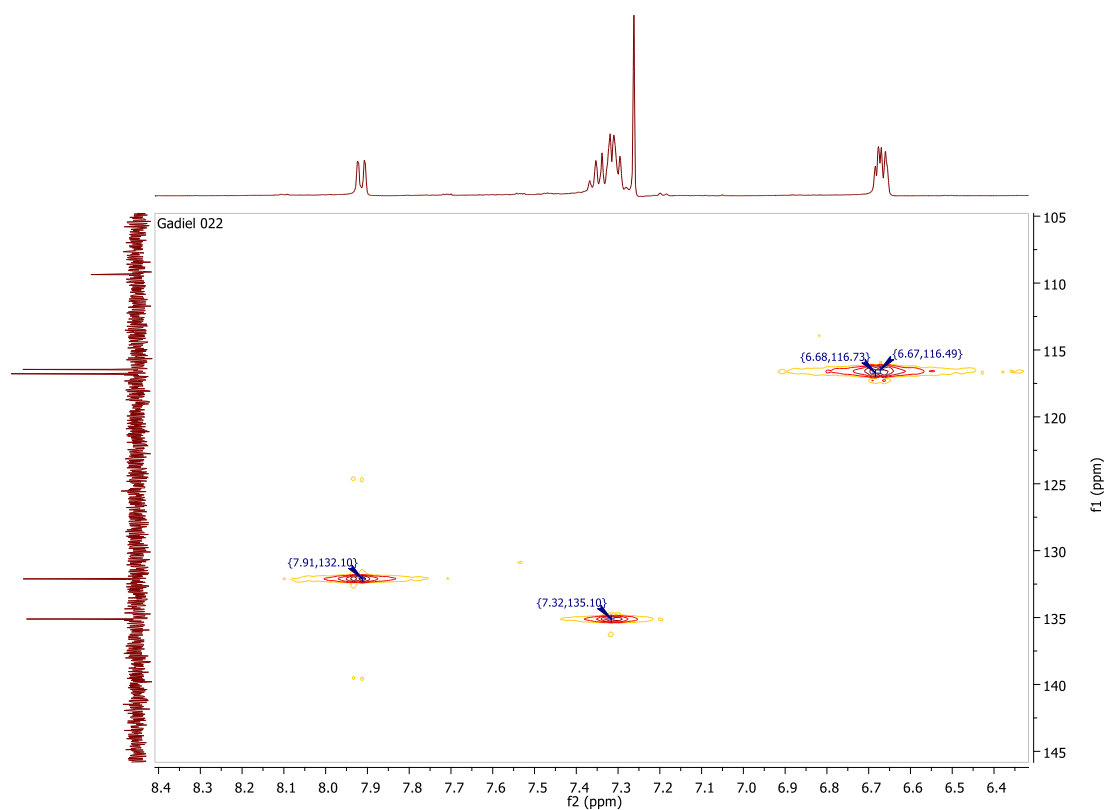


Figura 27. Espectro RMN 2D HSQC ^1H - ^{13}C de la fracción 2.

Las correlaciones se enmarcan en la tabla 3:

Señal de ^{13}C en ppm	Señal correspondiente de ^1H en ppm
172.53	Carbonilo
151.13	Carbono cuaternario
135.11	7.318
132.11	7.294
116.78	6.677
116.46	6.677
109.36	Cuaternario

Tabla 3. Correlaciones HSQC de la fracción 2.

Estas correlaciones indican que se trata de un anillo di sustituido en posición *orto*, donde un grupo funcional presenta un carbonilo ya sea del tipo éster o ácido carboxílico, mientras que el otro sustituyente parece ser algún otro tipo de grupo funcional electrodonador por el tipo de multiplicidad observado en el espectro de protón (Figura 28).

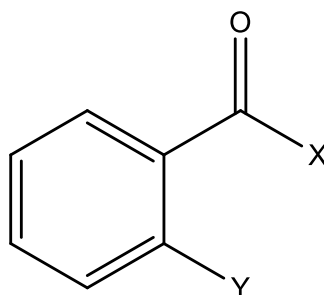


Figura 28. Estructura propuesta de acuerdo a la información obtenida con RMN, donde X y Y son dos heteroátomos distintos.

Con la información de RMN se logra elucidar parcialmente la estructura y debido a la sospecha de poseer dos tipos de grupos funcionales distintos, la muestra es analizada con espectroscopía IR para la identificación estos grupos funcionales. El espectro obtenido muestra una señal importante que se observa ancha y compleja alrededor de 2850 cm^{-1} , característico de la asociación de un ácido carboxílico y su enlace con hidrógeno, asimismo hay otra banda que caracteriza la existencia de una asociación de ácido carboxílico con su enlace O-H se encuentra en 1418 cm^{-1} mientras que las dos bandas que se encuentran en 3473.316 cm^{-1} , 3372.813 cm^{-1} son característicos de aminas primarias (Figura 29).

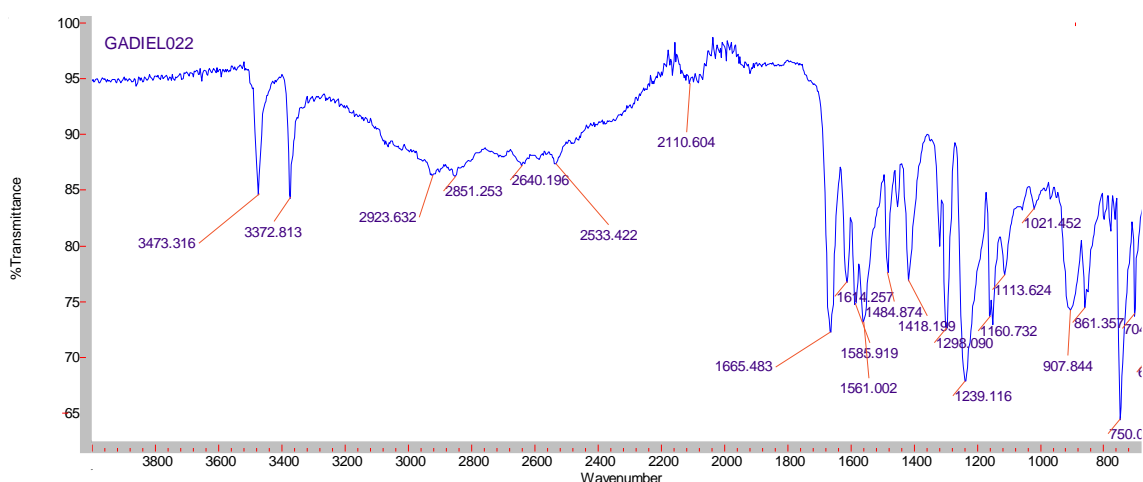


Figura 29. Espectro IR de la fracción 2.

Con la información obtenida se propone la siguiente estructura que se muestra en la figura 30:

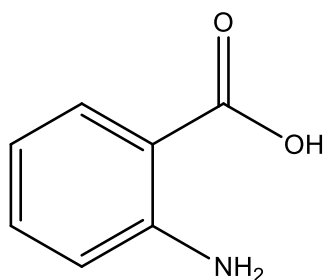


Figura 30. Estructura propuesta de la fracción 2: Ácido 2-aminobenzoico

Como se comentó se obtuvieron cristales que fueron enviados a rayos X y cuya difracción mostró la siguiente estructura (Figura 31). El punto de fusión obtenido experimentalmente resultó 141.4 °C.

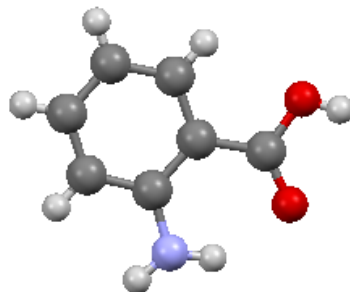


Figura 31: Estructura de rayos X obtenida mediante su difracción.

6- CONCLUSIONES.

- Se logró obtener un extracto crudo del medio de cultivo de la bacteria *Bacillus thuringiensis* cepa ELI52.
- Se lograron separar cinco fracciones interesantes de las cuales se estudiaron 2.
- Se separaron compuestos de la fracción 3 pero resultaron ser DCPs, compuestos previamente reportados en otros trabajos del laboratorio.
- Se logró separar, purificar e identificar un compuesto de la fracción 1 denominado Ftalato de Bis (2*R*-etilhexilo), un compuesto industrialmente interesante cuya aparición en sistemas biológicos es poco habitual produciéndose en su forma ópticamente activa.
- Se logró separar, purificar, cristalizar e identificar un compuesto de la fracción 2 denominado ácido antranílico el cual está implícito en varias rutas biosintéticas.

7- BIBLIOGRAFÍA.

1. Sanchez, S., Demain, A. L., (2011) Cap 1.12 “Secondary Metabolites”. In Moo-Young, M. (Ed.) *Comprehensive Biotechnology* (pp.155-167). USA: Elsevier.
2. Bèrdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, 58, pp. 1-26.
3. Glazer, A. N., Nikaido H. (2007). “Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology” (Second Edition). USA: Cambridge University Press.
4. Baskaran, R., Ganesamoorthy, S., Mohan, P. M., Nadda, A. K., (2014). Cap. 2 “Screening of microbial metabolites and bioactive components”. In Harzevili, F. D. y Chen H. (Ed.) *Microbial biotechnology Progress and Trends* (pp. 9-32). USA: CRC Press/Taylor & Francis Group.
5. Lim, A., Hai-Meng, T. (2013). Cap 1. “Microbial Screening”. In Kun Lee, Y. (Ed.) *Microbial Biotechnology: Principles and Applications* (pp. 3-19). Singapore: World Scientific.
6. Karlovsky P. (2008) Cap. 1 “Secondary metabolites in soil ecology”. In: Karlowsky, P. (Ed.) *Soil biology*, vol 14 (pp. 1-19). Berlin: Springer-Verlag.
7. Stein T. (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol. Microbiol.*, 56, pp. 845-857.
8. Sansinenea E., Ortiz A. (2011) Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol. Lett.*, 33, pp. 1523-1538.
9. Sansinenenea E.; Ortiz, A. (2019) Chemical Compounds Produced by *Bacillus* sp. Factories and Their Role in Nature. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 19 (5) pp. 373-380.
10. Monroy, M., Castro, T., Fernández, F. y Mayorga, L. (2009) Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS*, 73, pp. 63-72.
11. Bais, H., Fall, R., Vivanco, J. (2004) Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 134, pp. 307-319.

12. Romero, D., Vicente, A., Rakoptoaly, R. (2007). The iturin and fengycin families of polipeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *The American Phytopathology Society*, 20, pp. 431-440.
13. Ragazzo, J., Robles, A., Lomelí, L. Luna, G. (2011). Selección de cepas de *Bacillus spp.* productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.*, 17, pp. 1-7.
14. Romero, M., Jansen, R., Sylla. M., Lunsdorf, H., Hausbler, S., Santosa, D.A., Timmis, K.N. Molinari, G. (2006) 7-OMalonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis*-active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, pp. 1701–1709.
15. Sansinenea E. (2012). Cap 1 “Discovery and Description of *Bacillus thuringiensis*”. In Sansinenea E. (Ed) *Bacillus thuringiensis Biotechnology* (pp. 3-17). Berlin:Springer.
16. Sansinenea E., Salazar F., Ramirez M., Ortiz A. (2015). An ultra-Violet Tolerant Wild-Type Strain of Melanin-Producing *Bacillus thuringiensis*. *Jundishapur J. Microbiol.*, 8(7), e20910.
17. Sansinenea E., Salazar F., Jiménez J., Mendoza A., Ortiz A. (2016). Diketopiperazines derivatives isolated from *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus endophyticus*, establishment of their configuration by X-ray and their synthesis. *Tetrahedron Letters*, 57, pp. 2604-2607.
18. Ortiz-Castro, R.; Díaz-Pérez, C.; Martínez-Trujillo, M.; del Río, R. E.; Campos García, J.; López-Bucio. (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, pp. 7253–7258.
19. Fdhila, F.; Vazquez, V.; Sanchez, J. L.; Riguera, R. (2003). dd-diketopiperazines: antibiotics active against *Vibrio anguillarum* isolated from marine bacteria associated with cultures of *Pecten maximus*. *J. Nat. Prod.*, 66, pp. 1299–1301.

20. Houston, D. R.; Synstad, B.; Eijsink, V. G.; Stark, M. J.; Eggleston, I. M.; van Aalten, D. M. (2004). Structure-Based Exploration of Cyclic Dipeptide Chitinase Inhibitors. *J. Med. Chem.*, 47, pp. 5713–5720.
21. Nicholson, B.; Lloyd, G. K.; Miller, B. R.; Palladino, M. A.; Kiso, Y.; Hayashi, Y.; Neuteboom, S. T. (2006) NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: in-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent. *Anticancer Drugs*, 17, pp. 25–31.
22. Rowdhwal, S. S. S., Chen, j. (2018) “Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl phthalate: An Overview”. *BioMed Research International Hindawi*, vol. 2018, Article ID 1750368, 10 páginas.
23. Daiem, M. M. A., Rivera-Utrilla, J., Ocampo-Perez, R., Mendez-Diaz, J. D., Sanchez-Polo, M. (2012). Environmental impact of phthalic acid esters and their removal from water and sediments by different technologies—a review. *Journal of Environmental Management*, vol. 109, pp. 164–178.
24. Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V., Angerer, J. (2007) “Phthalates: Toxicology and exposure,” *International journal of hygiene and environmental health*, vol. 210, no. 5, pp. 623–634.
25. Fierens, T., Servaes, K., Van Holderbeke, M. (2012) “Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 50, no. 7, pp. 2575–2583.
26. Gao, D. W., Wen Z. D. (2016) “Phthalate esters in the environment: a critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes,” *Science of the Total Environment*, vol. 541, pp. 986–1001.
27. Semenov, A. A., Enikeev A. G., Snetkova L. V., Permyakov A. V., Sokolova N. A., Dudareva L. V. (2016) “Ortho-phthalic acid esters in Lipophilic Extract from the Cell Culture of *Aconitum baicalense* Turcz ex Rapaics 1907”. *Doklady Biochemistry and Biophysics*, vol 471, pp. 421-422.
28. Aurelio Ortiz, Estibaliz Sansinenea, "Di-2-ethylhexylphthalate May Be a Natural Product, Rather than a Pollutant," *Journal of Chemistry*, vol. 2018, Article ID 6040814, 7 pages, 2018.

29. Rindone, B., Saliu, F., Suarez-Bertoa, R. (2010). The synthesis of phthalic anhydride via ozonation of naphthalene," *Ozone: Science and Engineering*, vol. 32, no. 3, pp. 161–165.
30. Miao, S., An, H., Zhao, X., Wang, Y. (2018) Catalytic performance of Cu–Mg–Al in the one-step synthesis of 2-ethylhexanol from *n*-butyraldehyde," *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*.
31. Weschler, C.J., Salthammer, T., Fromme, H. (2008). Partitioning of phthalates among the gas phase, airborne particles and settled dust in indoor environments. *Atmos. Environ.* 42 (7), 1449–1460.
32. Annamalai, J., Namasivayam, V. (2015). Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: their effects on humans and wildlife. *Environ. Int.* 76, pp. 78–97.
33. Habib, M. R., Karim, M. R. (2012). Antitumour evaluation of di- (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) isolated from *Calotropis gigantea* L. flower," *Acta Pharmaceutica*, vol. 62, no. 4, pp. 607–615.
34. El-Sayed, M. H. (2012). Di-(2-ethylhexyl) phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from the culture filtrate of newly isolated soil streptomyces (*Streptomyces mirabilis* Strain NSQu-25)," *World Applied Sciences Journal*, vol. 20, pp. 1202–1212.
35. Kavitha, A., Prabhakar, P., Vijayalakshmi, M., Venkateswarlu, Y. (2009) "Production of bioactive metabolites by *Nocardia levis* MK-VL_113," *Letters in Applied Microbiology*, vol. 49, no. 4, pp. 484–490.
36. Anju, K. M., Archana, M. M., Mohandas, C., Nambisan, B. (2015) An antimicrobial phthalate derivative from *Bacillus cereus*, the symbiotic bacterium associated with a novel entomopathogenic nematode, *Rhabditis (Oscheius)* Sp., *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, vol. 7, pp. 238–242.
37. El-Sayed, O. H., Asker, M. M. S., Shash, S. M., Hamed, S. R. (2015) Isolation, structure elucidation and biological activity of di- (2-ethylhexyl) phthalate produced by *Penicillium janthinellum* 62, *International Journal of ChemTech Research*, vol. 8, pp. 58–66.

38. Abdel-Aziz, M. S., Ghareeb, M. A., Saad, A. M., Refahy, L. A., Hamed, A. A. (2017). Chromatographic isolation and structural elucidation of secondary metabolites from the soil-inhabiting fungus *Aspergillus fumigatus* 3T-EGY, *Acta Chromatographica*.
39. Lotfy, M. M., Hassan, H. M., Hetta, M. H., El-Gendy, A. O., Mohammed, R. (2018) Di-(2 ethylhexyl) Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from River Nile derived fungus *Aspergillus awamori*," *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 7, no. 3, pp. 263–269.
40. Wiklund, P., Bergman, J. (2006). The Chemistry of Anthranilic Acid. *Current Organic Synthesis*, 3, pp. 379-402.
41. Rio, G. F., Silva, B. V., Martínez, S. T., Pinto, A. C. (2014). Anthranilic acids from isatin: an efficient, versatile and environmentally friendly method. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87 (3), pp. 1525-1529.
42. Miltojevic, A. B., Radulovic, N. S. (2015). Complete assignment of ¹H and ¹³C spectra of anthranilic acid and its hydroxy derivatives and salicylic acid and its amino derivatives. *Physics, Chemistry and Technology*, Vol. 13, No. 2, pp. 121-132.
43. Santos, N. F., Salas, R., Hernández, B., Villanueva, C. Chapter Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. *From Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds*.
44. Rawat, G.; Tripathi, P.; Saxena, R. K. Expanding Horizons of Shikimic Acid. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 97, 4277–4287
45. Liu, D.F., Ai, G.M., Zheng, Q. X., Liu, C., Jiang, C. Y., Liu, L.X., Zhang, B., Liu, Y.M., Yang, C., Liu, S.J. (2014). Metabolic flux responses to genetic modification for shikimic acid production by *Bacillus subtilis* strains.
46. Ghosh, S.; Chisti, Y.; Banerjee, U. C. Production of Shikimic Acid. *Biotechnol. Adv.* 2012, 30, 1425–1431
47. Bochkov, D. V.; Sysolyatin, S. V.; Kalashnikov, A. I.; Surmacheva, I. A. Shikimic Acid: Review of its Analytical, Isolation, and Purification Techniques from Plant and Microbial Sources. *J. Chem. Biol.* 2012, 5, 5–17.

48. Maeda, H.; Dudareva, N. The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2012, 63, 73– 105
49. Nuno R. Candeias, Benedicta Assoah, Svilen P. Simeonov. Production and Synthetic Modifications of Shikimic Acid. *Chemical Reviews* 2018, 118(20) , 10458-10550.
50. Coracini JD, de Azevedo WF Jr. Shikimate kinase, a protein target for drug design. *Current Medicinal Chemistry.* 2014;21:592-604.
51. Ghosh, S.; Mohan, U.; Banerjee, U. C. Studies on the Production of Shikimic Acid Using the *aroK* Knockout Strain of *Bacillus megaterium*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 32, 127
52. Arcuri, H.A.; Palma, M.S. Understanding the structure, activity and inhibition of chorismate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr. Med. Chem.*, 2011, 18(9), 1311-1317.
53. Bongaerts, J., Esser, S., Lorbach, V., Al-Momani, L., Müller, A., Franke, D., Grondal, C., Kurutsch, A., Bujnicki, R., Takors, R., Raeven, L., Wubbolts, M., Bovenberg, R., Nieger, M., Schürmann, M., Trachtmann, N., Kozak, S., Sprenger, G. A., Müller, M. (2011). Diversity-Oriented Production of Metabolites Derived from Chorismate and Their Use in Organic Synthesis. *Angewandte Chemie*, 123(34), pp. 7927-7932.
54. Widhalm, J. R., Dudareva, N. (2015). A Familiar Ring to It: Biosynthesis of Plant Benzoic Acids. *Mol. Plant.* 8, pp. 83-97.
55. Bartsch, M., Bednarek, P., Vivancos, P. D., Schenider, B., von Roepenack-Lahaye, E., Foyer, C. H., Kombrink, E., Scheel, D., Parker, J. E. (2010). Accumulation of isochorismate-derived 2,3-dihydroxybenzoic 3-O-beta-d-xyloside in *Arabidopsis* resistance to pathogens and ageing of leaves. *J. Biol. Chem.* 285, 25654-25665.
56. Van Oostende, C., Widhalm, J.R., Furt, F., Ducluzeau, A.L., and Basset, G.J.C. (2011). Phylloquinone (vitamin K1): function, enzymes and genes. In *Advances in Botanical Research*, Vol. 59, F. Re´ beille´ and R. Douce, eds. (Amsterdam: Academic Press), pp. 229–261.

57. Tzin, V., and Galili, G. (2010). The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. In *The Arabidopsis Book*, K. Torii, ed. (Rockville, MD: The American Society of Plant Biologists), pp. 0132.
58. Westfall, C.S., Xu, A., and Jez, J.M. (2014). Structural evolution of differential amino acid effector regulation in plant chorismate mutases. *J. Biol. Chem.* 289:28619–28628.
59. Grewal, A. S. (2014) Isatin Derivatives with Several Biological Activities. *International Journal of Pharmaceutical Research*. Vol 6, 1, pp. 1-7.
60. Wang, Z., Sandmeyer Isatin Synthesis (2010). *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*.
61. Krause, D., Suh, H.S., Tarassishin, L., Cui, Q. L., Durafourt, B. A., Choi, N., Bauman, A., Cosenza-Nashat, M., Antel, J. P., Zhao, M. L., Lee, S. C. (2011). The Tryptophan Metabolite 3-Hydroxyanthranilic Acid Plays Anti-Inflammatory and Neuroprotective Roles During Inflammation. Role of Hemeoxygenase-I. *The American Journal of Pathology*, Vol. 179, No.3, pp. 1360-1372.
62. Kwon, L. S., Kwak, J. H., Pyo, S., Lee, H. W., Kim, A., Schmitz, F. J. (2017). Oscarellin, an Anthranilic Acid Derivative from a Philippine Sponge, *Oscarella stillans*, as an Inhibitor of inflammatory Cytokines in Macrophages. *Journal of Natural Products*, 80, pp. 149-155.
63. Vibhute, S., Jamale, D., Undare, S., Valekar, N., Patil, K., Kolekar, G., Anbhule, P. (2017). A bio-oriented anthranilic acid catalyzed synthesis of quinazolin-8 (4H)-one derivatives: Evaluation by green chemistry metrics. *Synthetic Communications*, 47:19, pp. 1747-1757.
64. Raza, S., Iqbal, Y., Hussian, I., Raza, M., Sua, S. (2013). Synthesis of Anthranilic Acid and Phtalic Andydride Ligand and their Metal Complexes. *Biochemistry and Analitical Biochemistry*, vol. 2:4, pp. 2-4.
65. Tian, C., Ni, J., Chang, F., Liu, S., Xu, N., Sun, W., Xie, Y., Guo, Y., Ma, Y., Yang, Z., Dang, C., Huang, Y., Tian Z., Wang, Y. (2016). "Bio-Source of di-n-butyl phthalate production by filamentous fungi", *Scientific Reports*, 6, pp 19791.

