



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**POSGRADO DE CIENCIAS QUÍMICAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA**

---

**“Aislamiento de productos naturales de la bacteria *Bacillus toyonensis*”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**Maestría en Ciencias Químicas**

**En el área de Química Orgánica**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. JOSÉ ALEJANDRO HERNÁNDEZ ABUNDEZ**

**Director de tesis**

**Dra. Estibaliz Sansinenea Royano**

**Co-Asesor de tesis**

**Dr. José Aurelio Ortíz Marquéz**

H. PUEBLA DE Z, JUNIO 2023

*No puedo explicar la química. No tengo ni idea de qué se trata. Es como enamorarse. No se puede explicar por qué te enamoras o explicar por qué con esa persona en particular.*

*-Elaine Stritch*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres Alejandrina y Armando, quienes han sido los principales promotores de mis sueños, le doy gracias a ellos por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas. Gracias a ellos por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante este largo proceso.*

*A mi directora de tesis la Dra. Estibaliz por apoyarme en la elaboración de la tesis y brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo.*

*Agradezco a ella por ser parte de esta formación y que con su sabiduría me ha apoyado en la elaboración de este trabajo.*

*Así también agradezco a mi co-asesor el Dr. José Aurelio Ortiz Márquez por qué sin su ayuda en la resolución con problemas en la parte experimental no hubiera podido concluir de buena manera este trabajo de tesis.*

*A mis sinodales la Dra. Martha, Dra, Jessica, Dra, Gabriela y al Dr. David, quienes siempre estuvieron apoyándome en las correcciones pertinentes, y gracias a su disponibilidad en cada momento.*

## AGRADECIMIENTOS

*A mis amigos y compañeros de laboratorio Jessica, Francisco, Andrea, Daniel, Deyanira, Eridani, Debany y Yharely les agradezco no solo por estar en cada momento aportando cosas buenas en mi vida, sino por los grandes momentos de felicidad y de diversas emociones que siempre me han causado. De manera especial agradezco a Francisco quien me ha brindado su ayuda inclusive en los momentos y situaciones más tormentosas.*

*A Cintia quien ha sido mi mano derecha durante este tiempo; agradezco por su desinteresada ayuda y apoyo durante todos mis logros y fracasos.*

# Índice

Abreviaturas.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
1.- Introducción.....	9
2.- Antecedentes.....	11
2.1 Compuestos metabólicos secundarios.....	11
2.2 Bacterias del género <i>Bacillus</i> y sus productos naturales.....	13
2.3 Producción de lipopéptidos.....	15
2.4 Producción de bacteriocinas.....	19
2.5 Producción de dicetopiperazinas.....	20
2.6 Compuestos alcaloides indólicos.....	21
3.- Objetivos.....	23
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos específicos .....	23
4.- Discusión de resultados.....	24
4.1 Extracción.....	24
4.2 Fraccionamiento general.....	26
4.3 Purificación.....	28
4.4 Caracterización.....	32
4.5 Pruebas biológicas ( <i>R</i> )-2,3-dihidroxiopropil estearato y compuesto 2.....	62
4.6 Pruebas biológicas lipopéptidos.....	63
4.7 Pruebas biológicas bacteriocinas.....	66
5.- Desarrollo experimental.....	70
5.1 Cepa ELI73 <i>Bacillus toyonensis</i> .....	70
5.2 Crecimiento de la cepa.....	70
5.3 Medios de cultivo.....	70
5.4 Tratamiento de la resina Amberlita XAD-16 ® (Sigma Aldrich).....	71
5.5 Extracción de los metabolitos secundarios.....	72
5.6 Fraccionamiento general del extracto seco mediante cromatografía en columna	

de gel de sílice.....	73
5.7 Purificación.....	74
5.8 Identificación de compuestos orgánicos.....	74
5.9 Evaluación del efecto antibacterial de los productos naturales obtenidos a partir de la cepa ELI73 <i>Bacillus toyonensis</i> .....	74
5.10 Evaluación del efecto antifúngico de los productos naturales obtenidos a partir de la cepa ELI73 <i>Bacillus toyonensis</i> .....	75
5.11 Electroforesis SDS-PAGE.....	76
6.- Conclusiones.....	78
7.- Bibliografía.....	80

## *Abreviaturas*

$\mu\text{L}$	Micro litro
2 D	Dos dimensiones
AcOEt	Acetato de etilo
APT	Attached Proton Test
ATP	Adenosin Trifosfato
BAL	Bacterias lácticas
COSY	Correlación espectroscópica homonuclear
CPF	Cromatografía en placa fina
DCM	Diclorometano
DCP	Dicetopiperazina
Hbl	Hemolisina BL
HMBC	Correlación heteronuclear a enlaces múltiples
HSQC	Correlación Quantum Simple Heteronuclear
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria Bertani
LPs	Lipopéptidos
MeOH	Metanol
Nhe	Enterotoxina no hemolítica
PDA	Papa Dextrosa Agar
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis
Spp	Especies
Tyr	Tirosina

## *Resumen*

La presente tesis se realizó específicamente en el área de los productos naturales, también llamados metabolitos secundarios de fuentes de origen vegetal, animal, marino, fúngico y bacteriano.

En este proyecto de tesis se utilizó la bacteria *Bacillus toyonensis*. Esta bacteria cuando se incuba en el medio de cultivo apropiado y en condiciones adecuadas de temperatura y agitación produce compuestos de interés biológico y/o industrial. Estos compuestos se pueden obtener a través de una serie de procesos que incluyen: la extracción de los productos naturales con ayuda de una resina adsorbente polimérica XAD-16, la purificación de los compuestos utilizando la cromatografía, y por último la elucidación de las estructuras químicas mediante el empleo de técnicas espectrométricas y técnicas espectroscópicas.

De dicho proceso biotecnológico se obtuvieron diversos compuestos algunos de los cuales ya han sido previamente identificados en trabajos anteriores del grupo de investigación como son dos dicetopiperazinas ciclo (L-Pro-L-Phe) y ciclo (L-Pro-L-Tyr), y *N*-acetilriptriamina. También se obtuvieron estructuras nuevas como son: el ácido esteárico también llamado 1-monoestearato de glicerina, un compuesto 2 que por la complejidad no se ha podido obtener su correcta elucidación y dos bacteriocinas de 3.89 kDa y 3.83 kDa.

## *Abstract*

This thesis was carried out specifically in the area of Chemistry of natural products, which refers to research on secondary metabolites or sometimes called “special metabolites” from vegetable, animal, marine, fungal and bacterial sources.

In this project, *Bacillus toyonensis* bacterium was used. This bacterium when is grown in the appropriate culture medium and adequate conditions of temperature and agitation, produces compounds of biological and/or industrial interest. These compounds can be obtained through several processes, including: the extraction of natural products using the adsorbent polymeric resin XAD-16, the compounds’ purification using the chromatography, and finally the use of spectrometric techniques and spectroscopic techniques to elucidate the chemical structure of the compounds.

From this biotechnological process, some compounds were obtained some of which had been isolated and characterized from previous group works, such as, two diketopiperazines cycle (L-Pro-L-Phe) and cycle (L-Pro-Tyr), and *N*-acetyltryptamine. Besides, new structures were isolated such as stearic acid or glycerin 1-monostearate, a compound 2 that due to its complexity it has not been possible to obtain its correct elucidation and two bacteriocins of 3.89 kDa and 3.83 kDa

# 1.-Introducción

La química orgánica ha tratado de mimetizar a la naturaleza a través de realizar síntesis de compuestos que a veces naturalmente se extraen en cantidades muy pequeñas. Los compuestos químicos que naturalmente son sintetizados por la naturaleza se les conoce como **Productos Naturales**. La química de los productos naturales siempre ha sido un reto ya que se tienen que aislar e identificar compuestos químicos de fuentes naturales en proporciones bajas. Los microorganismos tienen una característica que los hace atractivos y es que pueden sintetizar productos naturales de forma rápida y constante. Estos productos naturales poseen una gran variabilidad de funciones de tal forma que pueden actuar como antibióticos, antitumorales, pigmentos, etc.

Los compuestos orgánicos son productos bioquímicos comercialmente importantes que exhiben enormes aplicaciones en los sectores alimentario, químico y farmacéutico. Se clasifican en dos categorías básicas con base en a su etapa de producción en los organismos vivos, como compuestos metabólicos primarios y secundarios, producidos por todos los organismos vivos.

Los compuestos metabólicos primarios intervienen en el crecimiento, desarrollo y reproducción de todas las células vivas, incluidos los microorganismos. Entre ellos, alcoholes, aminoácidos, biopolímeros, fármacos, ácidos orgánicos y azúcares simples son algunos de estos metabolitos. Los compuestos metabólicos secundarios son moléculas que no son esenciales para el crecimiento y el desarrollo del microorganismo, pero juegan papeles como la protección y supervivencia propia en el ambiente que lo rodea. En los microorganismos son habitualmente producidos al final de la fase exponencial de crecimiento y durante la fase estacionaria.

Las especies del género *Bacillus* son unas de las que tienen mayor producción de productos naturales, mostrando un amplio espectro de actividades así también una diversidad estructural muy amplia. Dentro de los productos naturales que produce el género *Bacillus* se incluyen pigmentos, toxinas, antibióticos, promotores del crecimiento y otros compuestos

bioactivos y todos estos productos naturales que produce *Bacillus* en un principio tienen como objetivo capacitar a la bacteria para sobrevivir en su ambiente natural.

Dentro del laboratorio de investigación de biotecnología microbiana se han identificado cepas de *Bacillus* con la capacidad de producción de productos naturales, es por ello que en este trabajo de tesis se ha propuesto la extracción de productos naturales y su purificación a partir de un extracto crudo de un cultivo celular de una cepa de *Bacillus toyonensis*.

A partir del extracto crudo se lograron aislar, purificar e identificar dos dicetopiperazinas (DCPS): ciclo (L-Pro-L-Phe) y ciclo (L-Pro-L-Tyr) que en estudios dentro del grupo de investigación se han obtenido también con la diferencia que ha sido en otra cepa de *Bacillus*, así también se obtuvo otra molécula que también se ha obtenido en otra cepa de *Bacillus* dentro del grupo de investigación y es N-acetilriptamina.

Además de estas estructuras que se obtuvieron dos moléculas nuevas el ácido esteárico también llamado 1-monoestearato de glicerina y un compuesto 2 además de dos bacteriocinas de 3.89 KDa y 3.83 KDa respectivamente. Las estructuras de estos compuestos se lograron establecer por métodos espectroscópicos tales como RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C, COSY, HSQC, HMBC, APT así también con el uso de técnicas espectrométricas como lo es la espectrometría de masas.

Se probó la actividad antifúngica de 1-monoestearato de glicerina contra varios hongos fitopatógenos causantes de plagas en cultivos agrícolas, como son *Mucor sp*, *Fusarium solani*, y *Aspergillus flavus*. En el caso de la molécula 2, por la poca cantidad obtenida sólo se probó la actividad antifúngica contra *Fusarium solani*.

## 2.-Antecedentes

La química orgánica es una ciencia muy amplia y diversa. En esta diversidad se encuentra el estudio de los productos naturales. La mayoría de los productos naturales se han aislado a partir de las plantas. Sin embargo, uno de los campos que se está desarrollando actualmente es el aislamiento de nuevos compuestos metabólicos secundarios a partir de microorganismos, los cuales son conocidos comúnmente como **Productos Naturales de origen microbiano**.<sup>1</sup>

### 2.1 Compuestos metabólicos secundarios

Por definición, los metabolitos primarios son aquellos que se producen durante la fase exponencial del desarrollo de los microorganismos y son necesarios para la supervivencia de éste. Mientras que los metabolitos secundarios son moléculas que no son esenciales para el crecimiento y el desarrollo del microorganismo y habitualmente son producidos al final de la fase exponencial de crecimiento y durante la fase estacionaria. La producción de los metabolitos secundarios en el microorganismo se da como respuesta ante las condiciones externas, ya sea: estrés hídrico, térmico, de superpoblación y radiante; como protección contra plagas y algunas otras veces como simbiosis con otros microorganismos.<sup>2</sup>

En las funciones de supervivencia por parte de los metabolitos secundarios, existen algunas que son dependientes de la actividad antibiótica y otras independientes de tal actividad. De hecho, en este último caso, la molécula puede poseer actividad antibiótica, pero puede ser empleado por un microorganismo productor para un propósito completamente diferente.<sup>3</sup>

Algunas de las características de los productos naturales son las siguientes:

- Los productos naturales tienen estructuras químicas, y vías biosintéticas complejas.
- Generalmente se producen como mezclas de productos que tienen bloques de construcción en común.

- La producción puede perderse fácilmente por mutación espontánea, por lo que son muy importantes las técnicas de conservación de estos microorganismos.
- Cada uno de estos productos naturales son producidos por un grupo muy reducido de organismos.<sup>3</sup>

Para realizar la síntesis de metabolitos secundarios la naturaleza utiliza una serie de unidades básicas conocidas como (building blocks). Éstos pueden poseer un átomo de carbono o más, pueden ser cíclicos o lineales, pueden contener otros heteroátomos, etc. Algo que llama poderosamente la atención es como a partir de estas moléculas sencillas se puede construir compuestos de extraordinaria complejidad y diversidad que además presentan quiralidad.<sup>4</sup>

La diversidad de metabolitos secundarios puede circunscribirse a una serie de grupos estructurales, la mayoría de estos compuestos orgánicos poseen peso molecular bajo o intermedio y están representados por terpenoides y sus glicósidos, alcaloides, agliconas naturales, O- y C-glicósidos de flavonoides, o bien, O-glicósidos acilados en distintas posiciones, biflavonoides, proantocianinas diméricas y oligoméricas, principalmente. También se incluyen compuestos de alto peso molecular, como, por ejemplo: glucopéptidos.

La metodología requerida para obtener los productos naturales de interés consiste en: 1) Extracción, 2) Aislamiento, 3) Purificación, 4) Determinación estructural. Una vez elucidadas las estructuras químicas, en el caso de ser nuevas es deseable realizar su síntesis, con la estereoquímica correcta y proceder a la comparación del producto sintético y del producto natural.<sup>2</sup>

## 2.2 Bacterias del género *Bacillus* y sus productos naturales

El género *Bacillus* tiene muchas especies con capacidad de secretar una gran variedad de productos naturales bioactivos químicamente diferentes con diversas propiedades biológicas. Este género fue reportado por primera vez por Cohn (1872), quien lo describió como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor.<sup>5</sup>

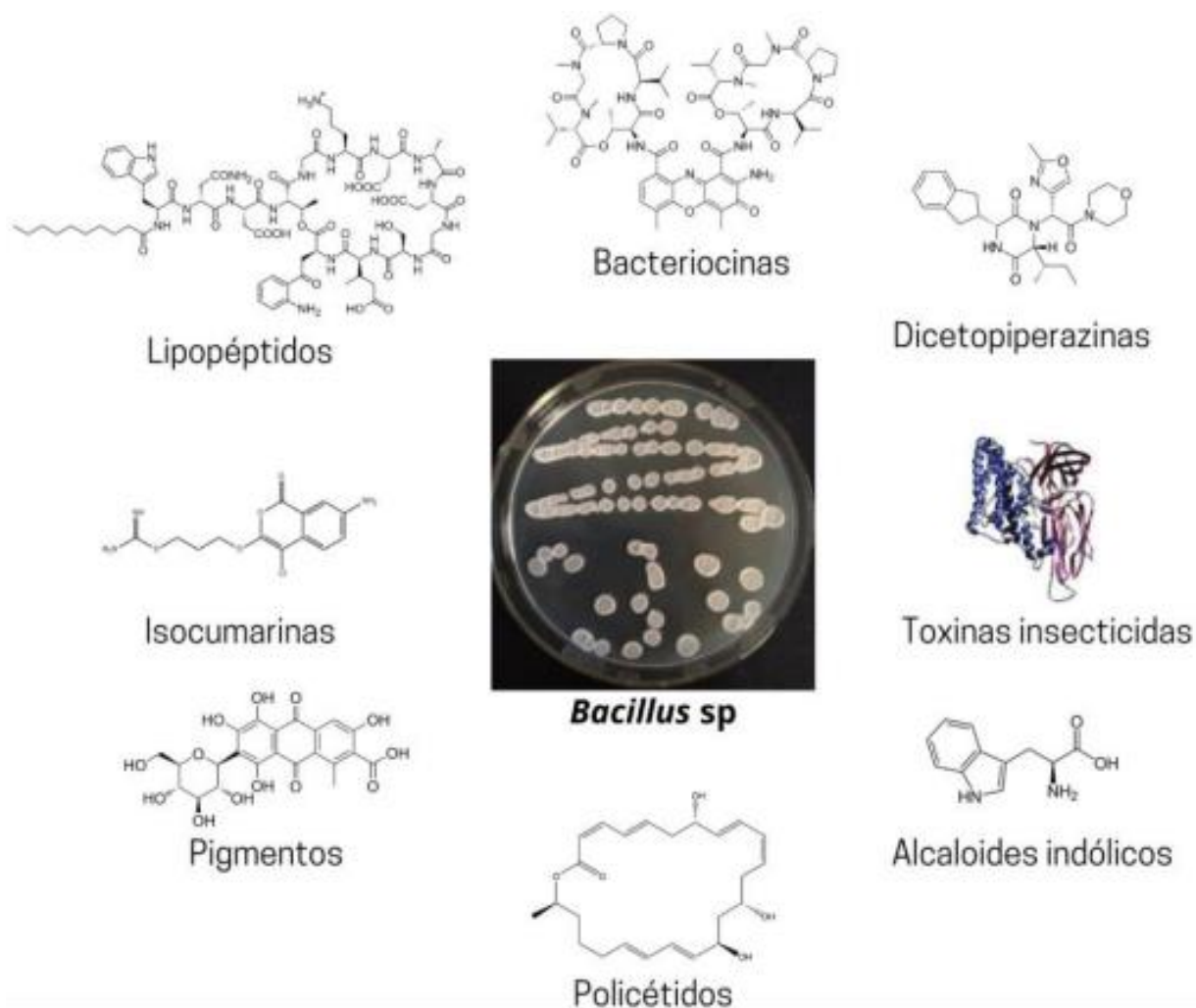
Las especies de *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial debido a su habilidad para formar endosporas, característica que les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats, tanto ecosistemas acuáticos como terrestres, e incluso en ambientes bajo condiciones extremas. El suelo es considerado el principal reservorio de este género bacteriano, debido a que la mayoría de las especies de *Bacillus* son saprófitas pudiendo utilizar la gran diversidad de sustratos orgánicos presentes en el suelo.

Entre las características del género *Bacillus* destacan: su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, Gram positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10  $\mu\text{m}$ ), 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  $^{\circ}\text{C}$ ), su diversidad metabólica asociada a la promoción del crecimiento vegetal y su capacidad de control de patógenos. La presencia de endosporas le confiere al género de *Bacillus* su capacidad de diseminación y prevalencia en los ecosistemas.<sup>6</sup>

Las especies de *Bacillus* tienen características especiales, que hacen que estas bacterias sean buenas candidatas como agentes de control biológico. En primer lugar, son bien conocidos como productores de antibióticos con actividad antagonista contra hongos y algunos patógenos bacterianos. Segundo, forman esporas que se pueden formular fácilmente, y tienen una alta viabilidad en comparación con las células vegetativas. En tercer lugar, se encuentran comúnmente en suelos.

*Bacillus spp.* parece ser una fuente relativamente abundante de antimicrobianos, ya que muchas especies de este género sintetizan péptidos antimicrobianos.<sup>7</sup> Es importante resaltar que este género bacteriano es capaz de producir diferentes metabolitos secundarios (Fig. 1), dentro de los que se encuentran moléculas que inhiben bacterias, hongos y parásitos.<sup>8</sup>

El potencial de *Bacillus subtilis* para producir antibióticos ha sido reconocido durante 50 años con los antibióticos peptídicos representando la clase predominante.<sup>7</sup>



**Fig. 1:** Diversidad de metabolitos secundarios producidos por el género *Bacillus* spp.

Varias bacteriocinas han sido reportadas tales como liquenina producida por *Bacillus licheniformis* cepa 26-103RA, megacin producido por cepas de *Bacillus megaterium*, coagulina antilisteria producida por *Bacillus coagulans*, polifermenticina SCD producida por *Bacillus polyfermenticus*.<sup>7</sup>

*Bacillus toyonensis* es un microorganismo aislado del suelo que se ha utilizado durante muchos años como aditivo en alimentos para animales. En un estudio reciente se

demonstró que *Bacillus toyonensis* posee los genes que codifican para la hemolisina BL (Hbl) y la enterotoxina no hemolítica (Nhe), los niveles de expresión de estos genes eran indetectables o muy bajos en comparación con *Bacillus cereus*, lo que sugiere que la capacidad para producir enterotoxinas funcionales es baja o poco probable.

Actualmente, la producción animal a nivel mundial enfrenta un sin número de desafíos, los aspectos de bienestar animal tienden a predominar, pero la nutrición y la salud también resultan ser problemáticas. Es por ello que en los sistemas de producción animal intensiva se introducen nuevos productos y tecnologías que permiten la obtención de alimentos más seguros y que al mismo tiempo contribuyan a producciones con una sostenibilidad económica adecuada. Toyocerin®, con más de 30 años en el mercado, es un probiótico a base de *Bacillus toyonensis* con una extensa base científica que demuestra su eficacia en diferentes especies y fases, con resultados positivos tanto a nivel sanitario como productivo que hacen de él un producto muy interesante para formar parte de cualquier estrategia de producción libre de antibióticos o de uso reducido, pero también en explotaciones con algún reto sanitario o productivo tanto en el sector porcino como en avicultura o especies menores.<sup>9</sup>

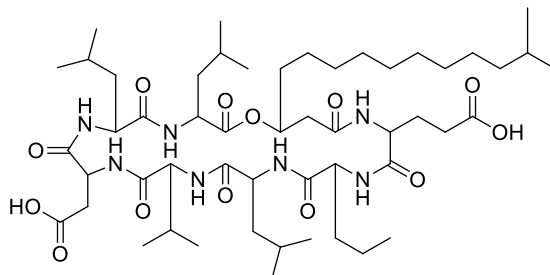
### 2.3 Producción de lipopéptidos

La agricultura siempre ha sido un método poderoso para satisfacer la demanda de comida a nivel mundial. Actualmente la población mundial está creciendo muy rápido y con ello es muy importante que la agricultura pueda responder esta demanda incrementando el rendimiento y la calidad de los cultivos. Pero las plantas sufren varias enfermedades y plagas ocasionadas por diversos microorganismos e insectos provocando pérdidas en las cosechas y terribles pérdidas económicas. Para paliar los efectos de las plagas se han venido utilizando durante varias décadas insecticidas y fungicidas químicos. Sin embargo, su uso a largo plazo ha provocado serios daños al ambiente y a la salud, provocando incluso resistencia de las plagas. Incluso origina mayores daños en el suelo volviéndolo infértil y provocando una disminución en las cosechas cada vez más acentuada. Por ello el mundo actual se ha volcado en el uso de biofertilizantes y biopesticidas que mejoran las cosechas, restauran la fertilidad de la tierra atacan a plagas y patógenos de los cultivos y todo ello sin provocar daño ni en el

medioambiente ni en la salud humana debido a su naturaleza de ser biológicos de origen natural.<sup>6</sup>

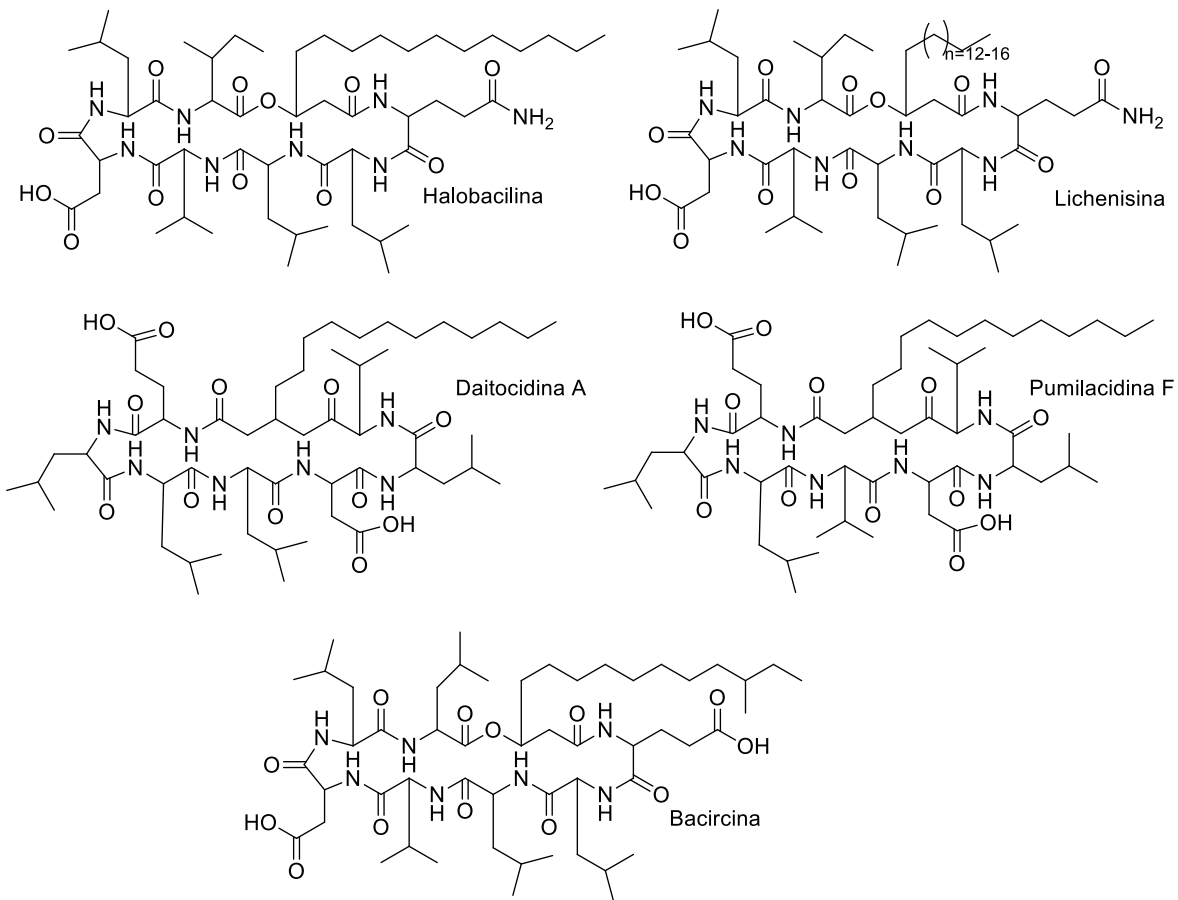
Una de las características más importantes del género *Bacillus* es la capacidad de producir una gran variedad de antifúngicos con capacidad de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, entre éstos, los lipopéptidos cíclicos no ribosomales han sido los más estudiados. Los lipopéptidos (LPs), estructuralmente consisten en un péptido cíclico unido a una cadena de ácido graso  $\beta$ -hidroxi o  $\beta$ -amino clasificándose en 3 diferentes familias (iturinas, fengicinas y surfactinas), de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y longitud del ácido graso.<sup>6</sup>

El lipoheptapéptido surfactina (Fig. 2) es un potente biosurfactante, ejerce una acción similar a la de un detergente sobre las membranas biológicas, y se distingue por sus excepcionales actividades emulsionantes, espumantes, antivirales y antimicoplasma.



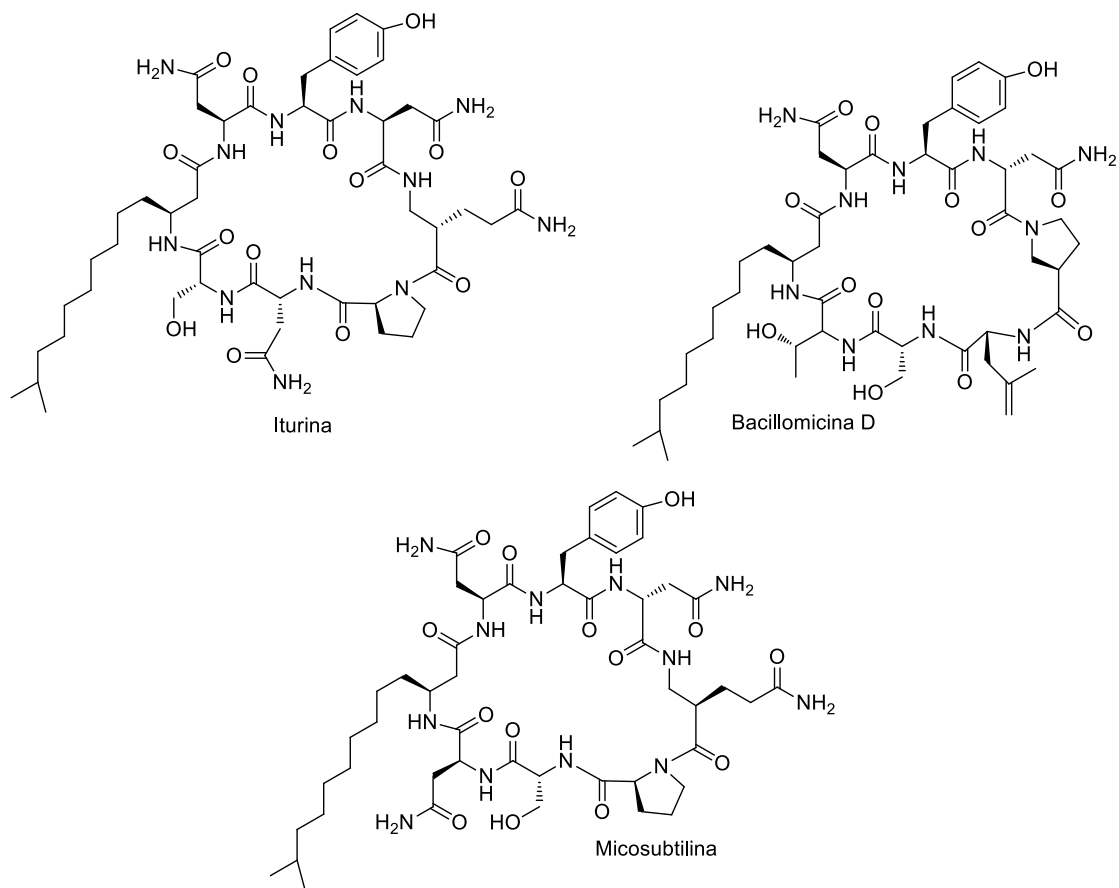
**Fig. 2:** Lipoheptapéptido surfactina.

Algunos biosurfactantes se pueden utilizar como alternativas a medicamentos sintéticos y agentes antimicrobianos. Su producción es ampliamente distribuida entre las cepas *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, y *B. amyloliquefaciens* y por lo tanto también existe una variedad de isoformas de la surfactina que se han descrito<sup>7</sup> (Fig.3).



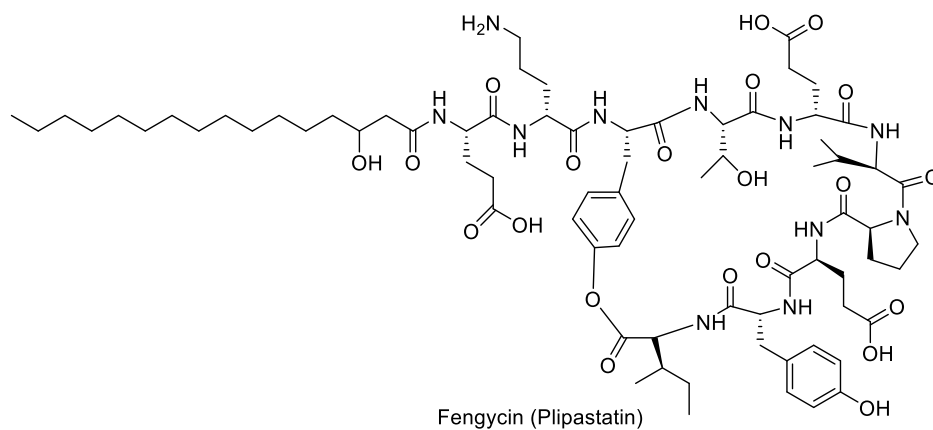
**Fig. 3:** Estructura química de las isoformas de la surfactina que se han descrito.

La familia de las iturinas abarca los lipopeptídicos cíclicos estrechamente relacionados que son micosubtilina, las iturinas, y las bacilomicinas (Fig. 4), que contienen un  $\beta$ -aminoácido graso y siete  $\alpha$ -aminoácidos, y exhibe fuertes actividades antifúngicas y hemolíticas. Los efectos biológicos de los péptidos de la familia iturina se deben a su capacidad de formar poros conductores de iones.



**Fig. 4:** Lipopéptidos familia de las iturinas.

El lipopéptido fengicina (Fig. 5) es específicamente activo contra hongos filamentosos.



**Fig. 5:** Fengicina.

## 2.4 Producción de bacteriocinas

Desde hace décadas se utilizan los antibióticos para tratar diversas infecciones causadas por bacterias. Sin embargo, el uso extendido e inadecuado de los antibióticos ha propiciado la resistencia de las bacterias patógenas a los mismos y esto se ha convertido un importante problema de salud. Por lo tanto, se necesitan con urgencia nuevos antibióticos necesarios para mejorar el manejo de las infecciones bacterianas. Se han identificado metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas utilizados en el tratamiento de infecciones inducidas por bacterias.

Una de las estrategias de defensa más antigua que se ha conservado a través del tiempo en los organismos eucariotas es la producción de péptidos con actividad antimicrobiana. Las bacteriocinas son péptidos biológicamente activos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de otros miembros de la misma especie productora o miembros de distintos géneros bacterianos y se ha observado que algunas de estas moléculas poseen mayor actividad que los péptidos antimicrobianos producidos por los eucariotas.<sup>10,11</sup> Una alternativa prometedora para combatir la farmacorresistencia a los antimicrobianos, es el uso de las bacteriocinas.<sup>10,12</sup>

Las bacteriocinas son sintetizadas por la gran mayoría de los grupos bacterianos, de hecho, se ha propuesto que el 99% de las bacterias producen al menos una bacteriocina, ya que éstas se han encontrado en la mayoría de las especies examinadas que abarcan los grupos de bacterias Gram positivas, Gram negativas y también en las Arqueas.<sup>11</sup> La mayoría de las bacteriocinas son efectivas contra microorganismos patógenos importantes involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos, tales como: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella spp.*<sup>13</sup>

Las diferentes especies y cepas del género *Bacillus spp.* son consideradas buenas productoras de sustancias antimicrobianas, como las bacteriocinas, las cuales se consideran como las segundas más importantes después de las bacteriocinas producidas por las bacterias del ácido láctico (BAL) debido a su uso seguro en alimentos e industria.<sup>10</sup>

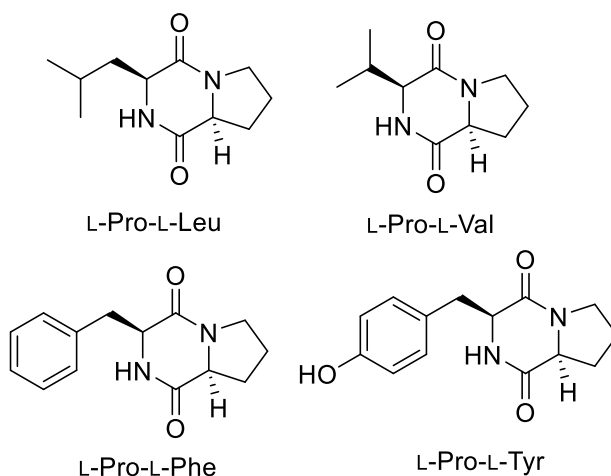
La producción de las bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de esta, guardando una relación directa con la biomasa

producida. Entre sus características principales destacan el ser estables al calor y a pH ácidos, ambas propiedades están estrechamente relacionadas: es decir, un incremento de pH reduce la estabilidad al calor.<sup>13</sup>

La mayoría de las bacteriocinas actúan sobre la membrana de células sensibles, desestabilizando y permeabilizando mediante la formación de canales o poros iónicos, que van a dar salida a compuestos como fosfato, potasio, aminoácidos, ATP, disminuyendo la síntesis de macromoléculas y por consecuencia la muerte celular.<sup>14,15</sup>

## 2.5 Producción de dicetopiperazinas

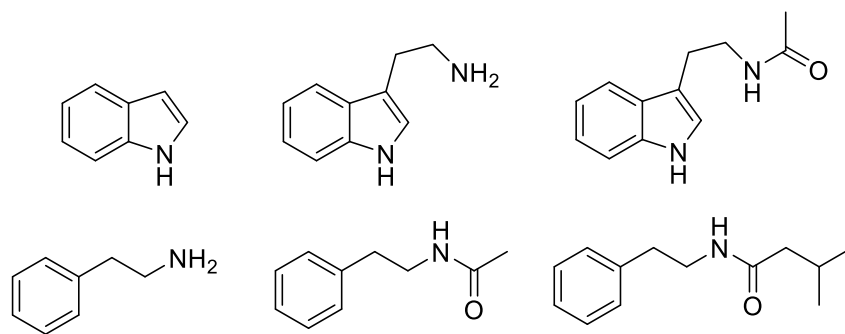
Las dicetopiperazinas, son ciclopéptidos simples que consisten en anillos de dos  $\alpha$ -aminoácidos condensados (Fig. 6), esta estructura cíclica les confiere una gran estabilidad. Tienen varias actividades biológicas, entre ellas ser inhibitorias contra diversas bacterias causantes de importantes enfermedades, así también son promotores del crecimiento vegetal e inhiben el crecimiento de algunos microorganismos. Son secretados por varios microorganismos como los hongos o bacterias incluyendo *Bacillus spp.* Varias cepas de *Bacillus* han sido capaces de producir estos ciclopéptidos con actividad antifúngica frente a algunos fitopatógenos como *F. oxysporum* y *Penicillium*.<sup>5</sup>



**Fig. 6:** Algunas dicetopiperazinas con actividad antifúngica.

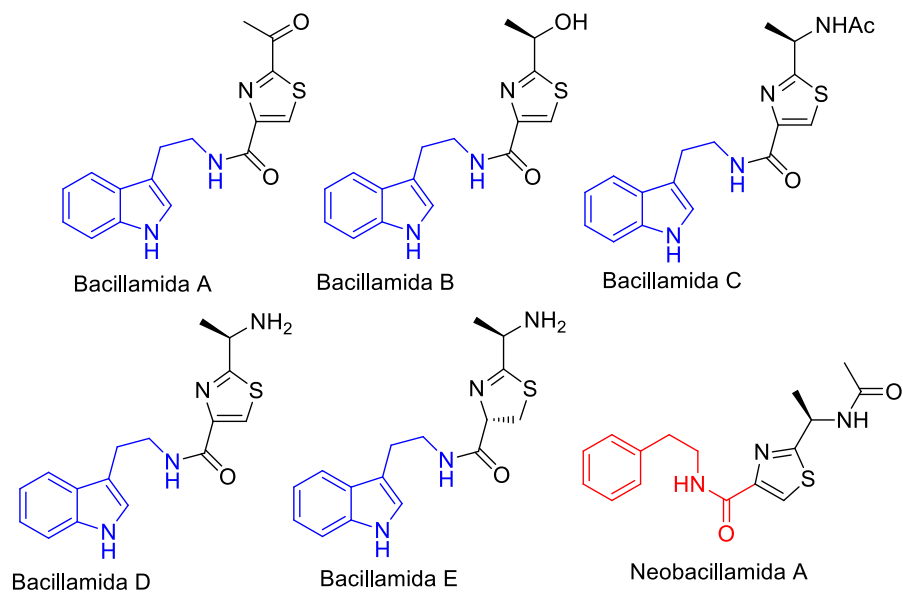
## 2.6 Compuestos alcaloides indólicos

Los indoles están omnipresentes en varios compuestos bioactivos de alcaloides, así como de productos agroquímicos y farmacéuticos. Los indoles son heterociclos importantes dentro del uso de fármacos. El sistema de anillo del indol (Fig. 7) es una estructura valiosa que tiene una amplia gama de actividades farmacológicas, como antihistamínico, antifúngico, antimicrobiano, antioxidante, regulador de crecimiento vegetal, anticonvulsivo, antiinflamatorio, analgésico, etc. Algunas de las fracciones importantes moléculas farmacológicas que contienen la fracción indol que se utilizan como agentes farmacéuticos son: sumatriptán, tadalafil, rizatriptán y fluvastatina.<sup>16</sup>



**Fig. 7:** Estructura del indol y derivados indólicos.

Otro tipo de moléculas que contienen el anillo indólico son los compuestos bacillamidas (Fig. 8). Es interesante notar que las Bacillamidas A-E contienen un bloque común de triptamina en sus estructuras mientras que en la Neobacillamida A la porción de amina es reemplazada por el grupo de fenetilamina.<sup>17</sup>



**Fig. 8:** Diferentes estructuras de las bacillamidas conteniendo los grupos de triptamina (azul) y fenetilamina (rojo).

Las bacillamidas poseen una alta actividad alguicida que ayuda a controlar la proliferación de algas nocivas, pero su bioactividad y las investigaciones sobre aplicaciones se vieron obstaculizadas por tasas de producción natural extremadamente bajas. De ahí la importancia investigar los bloques de construcción o los intermediarios de las bacillamidas para su producción en masa e incluso para su síntesis orgánica.<sup>18</sup>

# 3.- Objetivos

## **3.1 Objetivo general**

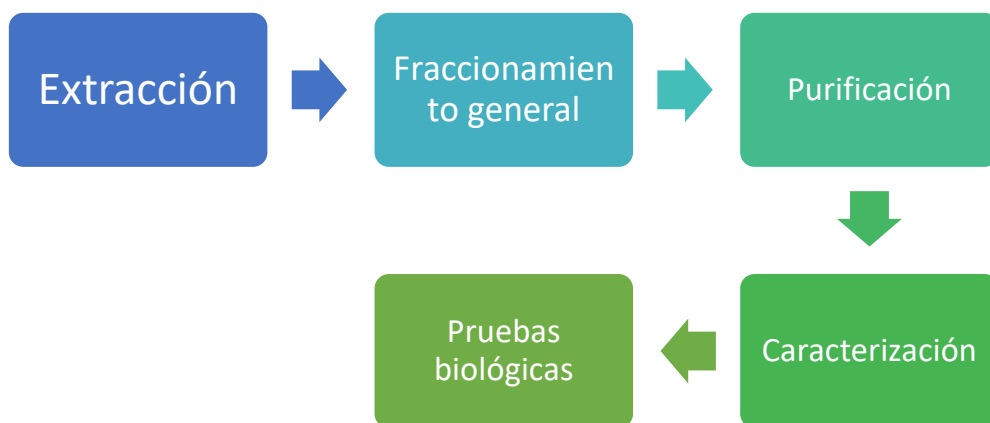
Se realizará el estudio de la producción de los compuestos químicos generados por la bacteria *B. toyonensis* en un medio de cultivo apropiado.

## **3.2 Objetivos específicos**

- Obtener un extracto crudo del cultivo bacteriano *Bacillus toyonensis*, mediante la extracción con la resina XAD-16
- Del extracto crudo se procederá a separar y purificar metabolitos secundarios mediante cromatografías en columna de gel de sílice y cromatografías en placa fina.
- Realizar la caracterización de los productos naturales obtenidos mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas (RMN, IR, Espectrometría de masas)
- Se realizarán pruebas biológicas de inhibición a hongos con los compuestos obtenidos

## 4.- *Discusión de resultados*

Con la finalidad de comenzar el estudio de los compuestos químicos generados por la bacteria *B. toyonensis* en un medio de cultivo apropiado, se sometió a un proceso que consiste en diferentes etapas que consiste en una extracción, un fraccionamiento general por polaridad, la purificación de los diferentes compuestos que fueron elucidados y caracterizados para conocer su posible estructura química, para finalmente realizar una evaluación de su diferente actividad biológica como se muestra en el siguiente esquema de trabajo:



### 4.1 Extracción

Para la extracción se utiliza la cepa ELI73 la cual fue previamente identificada en el laboratorio como *Bacillus toyonensis* y se realizó un cultivo en placa (Fig. 9). Esta cepa fue inicialmente aislada de una muestra de tierra proveniente de Moyotepec, Morelos.



**Fig. 9:** Cepa ELI73, *Bacillus toyonensis* colonias cerosas de borde irregular en agar Luria Bertani.

Como se puede observar en la Fig. 9 las colonias de *Bacillus toyonensis* son colonias de gran tamaño, de aspecto ceroso, de bordes irregulares y un color crema.

Para el crecimiento de la cepa ELI73 *Bacillus toyonensis* se realizó una siembra por estría cruzada en una placa de agar sólido con medio de cultivo Luria Bertani (LB), después de ello la placa se incubó a 29 °C, 24 h. Después de las 24h se realizó una siembra en medio de cultivo líquido LB a partir de una colonia aislada que se obtuvo en el medio de cultivo sólido LB, además de la inoculación del medio de cultivo se adicionó la resina conocida como Amberlita-XAD® para lograr la extracción de los productos naturales producidos por *Bacillus toyonensis*. El medio de cultivo líquido se incubó a 29 °C durante 7 días en agitación constante de 175 rpm.

Al término de los 7 días se realizó la separación de la resina Amberlita-XAD® y se procedió a realizar lavados con metanol para obtener los productos naturales que se encontraban adsorbidos en la resina. El rendimiento del extracto crudo (Fig. 10) es de 808.87 mg por cada litro de medio de cultivo.



**Fig. 10:** Extracto crudo de la cepa *Bacillus toyonensis*.

#### 4.2 Fraccionamiento general

Se realizó un fraccionamiento general del extracto crudo obtenido mediante la cromatografía en columna utilizando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron eluyentes o mezcla de ellos que fueron variando desde una baja polaridad hasta una polaridad mayor. Para la elección de los eluyentes o la mezcla de ellos que se iban a utilizar en la cromatografía en columna, se utilizó la cromatografía en placa fina (CPF). Los eluyentes seleccionados son los que se muestran en la tabla 1.

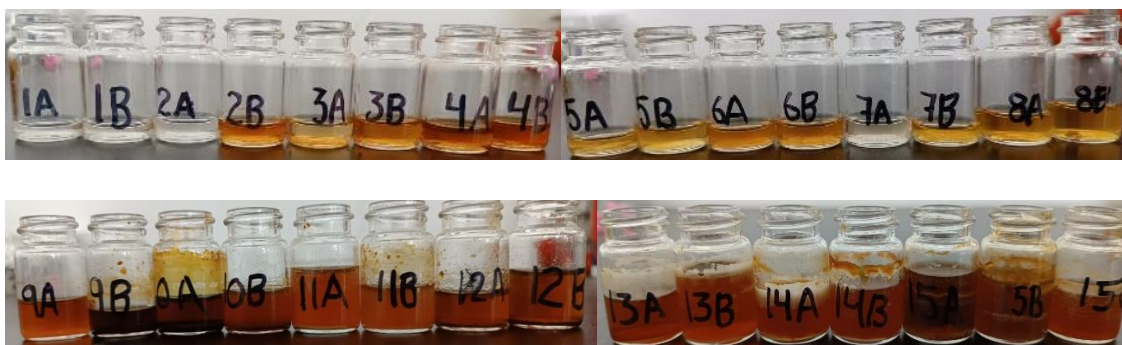
**Tabla 1:** Eluyentes y su proporción utilizados para el fraccionamiento general.

Eluyentes	Proporción %
Hexano	100
Hexano: AcOEt	90:10
Hexano: AcOEt	75:25
Hexano: AcOEt	50:50
AcOEt	100
AcOEt: MeOH	98:2
AcOEt: MeOH	95:5
AcOEt: MeOH	90:10
DCM:MeOH	80:20

DCM:MeOH	65:35
DCM:MeOH	50:50
DCM:MeOH	35:65
DCM:MeOH	25:75
DCM:MeOH	15:85
MeOH	100

AcOEt: Acetato de etilo, MeOH: Metanol, DCM: Diclorometano

Se recolectan diferentes fracciones (Fig.11) que se pesan para obtener la cantidad de cada uno de ellos.



**Fig. 11:** Fracciones generales resultado de la cromatografía en columna.

Se realizó un seguimiento cromatográfico en cromatografía en placa fina cada una de las fracciones, utilizando como revelador la luz UV de onda corta (254 nm) y onda larga (365 nm), con la finalidad de observar si existía similitud alguna entre fracciones para reunir las y tener mayor cantidad.

### 4.3 Purificación

Con el objetivo de purificar las fracciones obtenidas del fraccionamiento realizado, cada una de ellas fue analizada por RMN de  $^1\text{H}$ , de esta forma se podía apreciar la cantidad de señales que se observan. Este análisis preliminar ayuda para definir qué fracciones serán óptimas para comenzar su purificación. Para la purificación, se realizó un seguimiento cromatográfico en capa fina de cada una de las fracciones para la elección de los disolventes a utilizar en la cromatografía en columna.

#### **Fracción 4B y Fracción 5A (compuesto 1)**

La fracción 4B fue obtenida del fraccionamiento general de la cromatografía en columna con un sistema Hex:AcOEt 50:50. La purificación de la fracción 4B se realizó en una columna cromatográfica con los sistemas Hex:AcOEt 70:30, Hex:AcOEt 60:40 y Hex:AcOEt 50:50 y se obtuvo el compuesto **1**. La fracción 5A fue obtenida con un sistema AcOEt 100%. La purificación de la fracción 5A se realizó con los sistemas Hex:AcOEt 92:08, Hex:AcOEt 90:10 y Hex:AcOEt 85:15 y se obtuvo el compuesto **1**.

#### **Fracción 7A (compuesto 2)**

La fracción 7A fue obtenida con un sistema AcOEt:MeOH 98:02. La purificación de la fracción 7A se realizó con el último volumen adicionado que fue MeOH 100 y se obtuvo el compuesto **2**.

#### **Fracciones 9B, 10A, 10B, 11A, 11B, 12A y 12B (Lipopéptidos)**

De los trabajos previos en el grupo de trabajo se sabe que las últimas fracciones, que son más polares, son difíciles de analizar por RMN de  $^1\text{H}$  y suelen corresponder con compuestos de tipo lipopéptidos y bacteriocinas. Como se ha comentado en los antecedentes los lipopéptidos tiene la característica de que son de origen peptídico y de gran peso molecular. Además, tienen una actividad principalmente antifúngica. Con esto en mente, las fracciones 9B, 10A, 10B, 11A, 11B, 12A y 12B fueron procesadas de una forma diferente y se realizaron bioensayos para observar si cumplían la característica de lipopéptido inhibiendo el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos. Los sistemas con los cuales se obtuvieron cada una de las fracciones, son los siguientes: 9B-DCM:MeOH

80:20, 10A,10B-DCM:MeOH 65:35, 11A,11B-DCM:MeOH 50:50 y 12A,12B-DCM:MeOH 50:50.

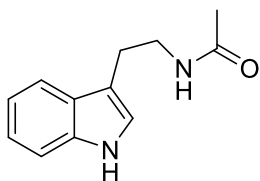
### **Fracciones 13A, 13B, 14A, 14B, 15A, 15B y 15C (Bacteriocina 3.83 kDa y Bacteriocina 3.89 kDa)**

Estas últimas fracciones tienen como característica que sólo se solubilizaban con solventes polares. De igual manera por la experiencia del grupo de trabajo se sospecha que podían ser bacteriocinas, las cuales son estructuras peptídicas con actividad antibacterial. Estas fracciones fueron sometidas a electroforesis en gel SDS-PAGE, teniendo como resultado dos bacteriocinas; la primer bacteriocina resultó de la reunión de las fracciones 13A, 13B, 14A y 14B con un peso de 3.83 kDa, las fracciones de esta reunión provenían de los siguiente sistemas de elución 13A,13B-DCM:MeOH 25:75 y 14A,14B-DCM:MeOH. En el caso de la segunda bacteriocina que se obtuvo resultó de la reunión de las fracciones 15A, 15B y 15C con un peso de 3.89 kDa, las fracciones de esta reunión provenían de un sistema de elución MeOH 100.

## **COMPUESTOS YA DESCRITOS POR EL GRUPO DE INVESTIGACIÓN**

### **Fracción 6A y 6B (*N*-acetiltriptamina)**

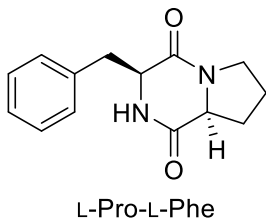
La fracción 6A y la fracción 6B ambas se obtuvieron con un sistema AcOEt:MeOH 98:02. En ambas fracciones, se observaron las señales características de una molécula que ya se ha descrito en el grupo de investigación y es la molécula *N*-acetiltriptamina.



*N*-acetiltriptamina

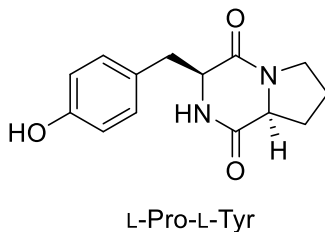
### **Fracción 7A y 7B (DCP L-Pro-L-Phe)**

La fracción 7A y la fracción 7B ambas se obtuvieron con un sistema AcOEt:MeOH 95:05. La purificación de la fracción 7A con el sistema Hex:AcOEt 20:80 generó dos moléculas: la molécula 2 y la molécula DCP L-Pro-L-Phe.



### Fracción 8A y 8B (DCP L-Pro-L-Tyr)

La fracción 8A y la fracción 8B ambas se obtuvieron con un sistema AcOEt:MeOH 90:10. La purificación de la fracción 8A se realizó con los sistemas AcOEt 100 y AcOEt:DCM 50:50 y se obtuvo la molécula DCP L-Pro-L-Tyr. La fracción 8B se purificó con el sistema AcOEt 100 de esta purificación también se obtuvo la molécula DCP L-Pro-L-Tyr.



En la tabla 2, se puede observar cada una de las fracciones obtenidas así también los sistemas de elución, la cantidad que se obtuvo de cada una de las fracciones y el resultado del proceso de purificación de cada una de las fracciones.

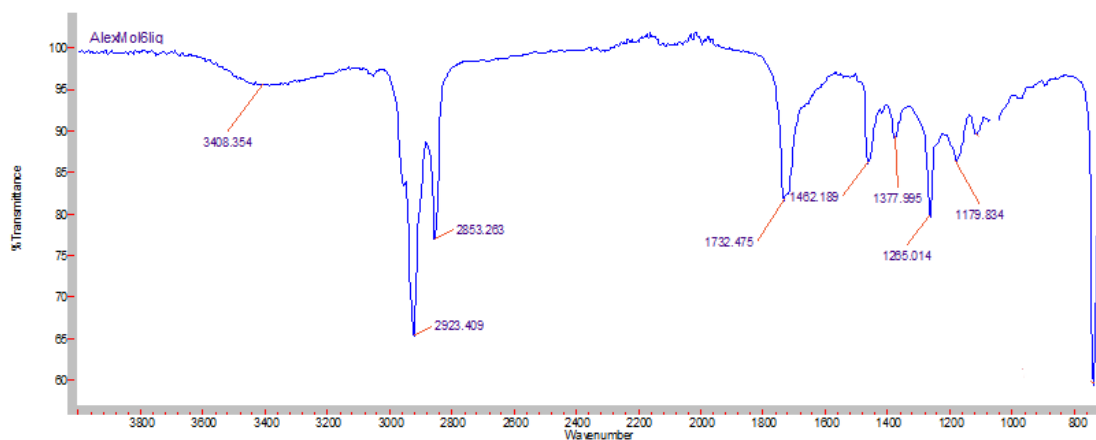
**Tabla 2:** Resumen de los resultados obtenidos a través del procesamiento de cada una de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento general de un extracto crudo de *Bacillus toyonensis*.

FRACCIÓN	POLARIDAD	PESO (mg)	RESULTADOS
1A	Hex 100%	4.3	GRASA
1B	Hex 100%	0.9	GRASA
2A	Hex/AcOEt 10%	3.2	-----
2B	Hex/AcOEt 10%	6.5	-----
3A	Hex/AcOEt 25%	9.1	-----
3B	Hex/AcOEt 25%	5.8	-----
4A	Hex/AcOEt 50%	17.4	-----
4B	Hex/AcOEt 50%	22.6	(R)-2,3-dihidroxiopropil estearato
5A	AcOEt 100%	27.7	(R)-2,3-dihidroxiopropil estearato
5B	AcOEt 100%	11.2	-----
6A	AcOEt/MeOH 2%	19	N-acetilriptamina
6B	AcOEt/MeOH 2%	32.5	N-acetilriptamina
7A	AcOEt/MeOH 5%	38.5	DCP L-Pro-L-Phe y compuesto 2
7B	AcOEt/MeOH 5%	70.6	DCP L-Pro-L-Phe
8A	AcOEt/MeOH 10%	62.9	DCP L-Pro-L-Tyr
8B	AcOEt/MeOH 10%	22.3	DCP L-Pro-L-Tyr
9A	DCM/MeOH 20%	29.5	-----
9B	DCM/MeOH 20%	98.7	LIPOPEPTIDOS
10A	DCM/MeOH 35%	297.3	LIPOPEPTIDOS
10B	DCM/MeOH 35%	296.8	LIPOPEPTIDOS
11A	DCM/MeOH 50%	282.6	LIPOPEPTIDOS
11B	DCM/MeOH 50%	147.7	LIPOPEPTIDOS
12A	DCM/MeOH 65%	191.9	LIPOPEPTIDOS
12B	DCM/MeOH 65%	211.5	LIPOPEPTIDOS
13A	DCM/MeOH 75%	369.2	Bacteriocina 3.83 KDa Esta reunión se nombró 13B
13B	DCM/MeOH 75%	426.4	
14A	DCM/MeOH 85%	350	
14B	DCM/MeOH 85%	305.2	Bacteriocina 3.89 KDa Esta reunión se nombró 15B
15A	MeOH 100%	335.7	
15B	MeOH 100%	235.7	
15C	MeOH 100%	113.1	

#### 4.4 Caracterización

##### Fracción 4B y 5A (Compuesto 1)

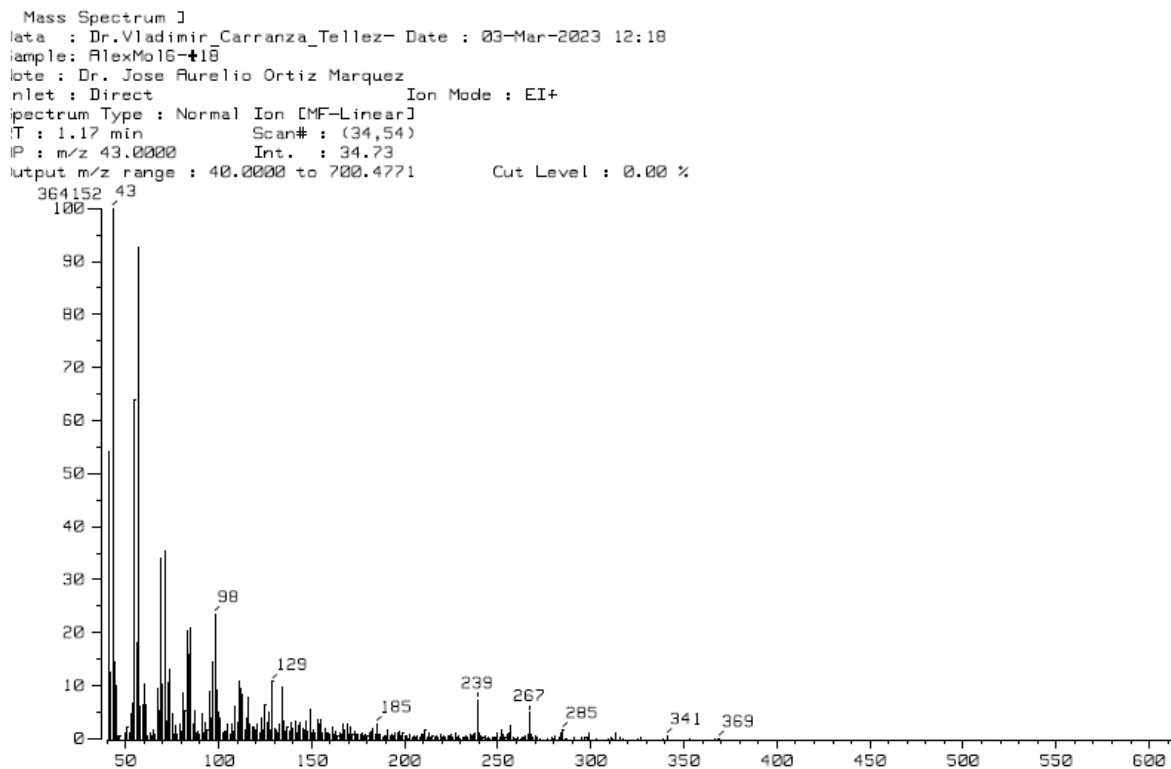
Se procedió a realizar una caracterización completa del compuesto **1** que provenía de dos fracciones diferentes 4B y 5A. Se utilizaron diferentes técnicas espectroscópicas para elucidar la estructura. A continuación, se presenta el espectro infrarrojo del compuesto **1** (Fig. 12) a través del cual se puede conocer qué grupos estructurales tiene la molécula.



**Fig. 12:** Espectro de IR del compuesto 1.

Como se observa en la figura 12 se encuentra una banda pequeña ancha en la región de  $3408.35 \text{ cm}^{-1}$  que es característico del grupo funcional OH. Las señales de las bandas que se encuentran en la región  $2923.40 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2853.26 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1462.18 \text{ cm}^{-1}$  y  $1377.99 \text{ cm}^{-1}$  pertenecen a enlaces C-H. Por último, la banda de la región  $1732.47 \text{ cm}^{-1}$  pertenece al grupo carbonilo (C=O) de un éster, las bandas de las regiones  $1265.01 \text{ cm}^{-1}$  y  $1179.83 \text{ cm}^{-1}$  que pertenecen al estiramiento simétrico y asimétrico del oxígeno adyacente al carbono del grupo carbonilo.

Otro experimento que se realizó al compuesto 1, fue espectrometría de masas que se muestra en la figura 13.



**Fig. 13:** Espectrometría de masas por impacto electrónico (EI-MS) del compuesto 1.

En el espectro de masas (Fig. 13) se pueden observar los diferentes picos que resultaron de la fragmentación por impacto electrónico del compuesto 1, de este espectro se puede resaltar el pico del ion molecular que corresponde a 358 m/z, así como el pico base que corresponde a 43 m/z. Con ayuda de este espectro se confirma el peso molecular del compuesto 1 y se obtiene la siguiente fórmula molecular  $C_{21}H_{42}O_4$ .

Con la fórmula molecular se puede calcular el número de insaturaciones (NI) que se encuentra en la molécula por lo tanto tenemos que:

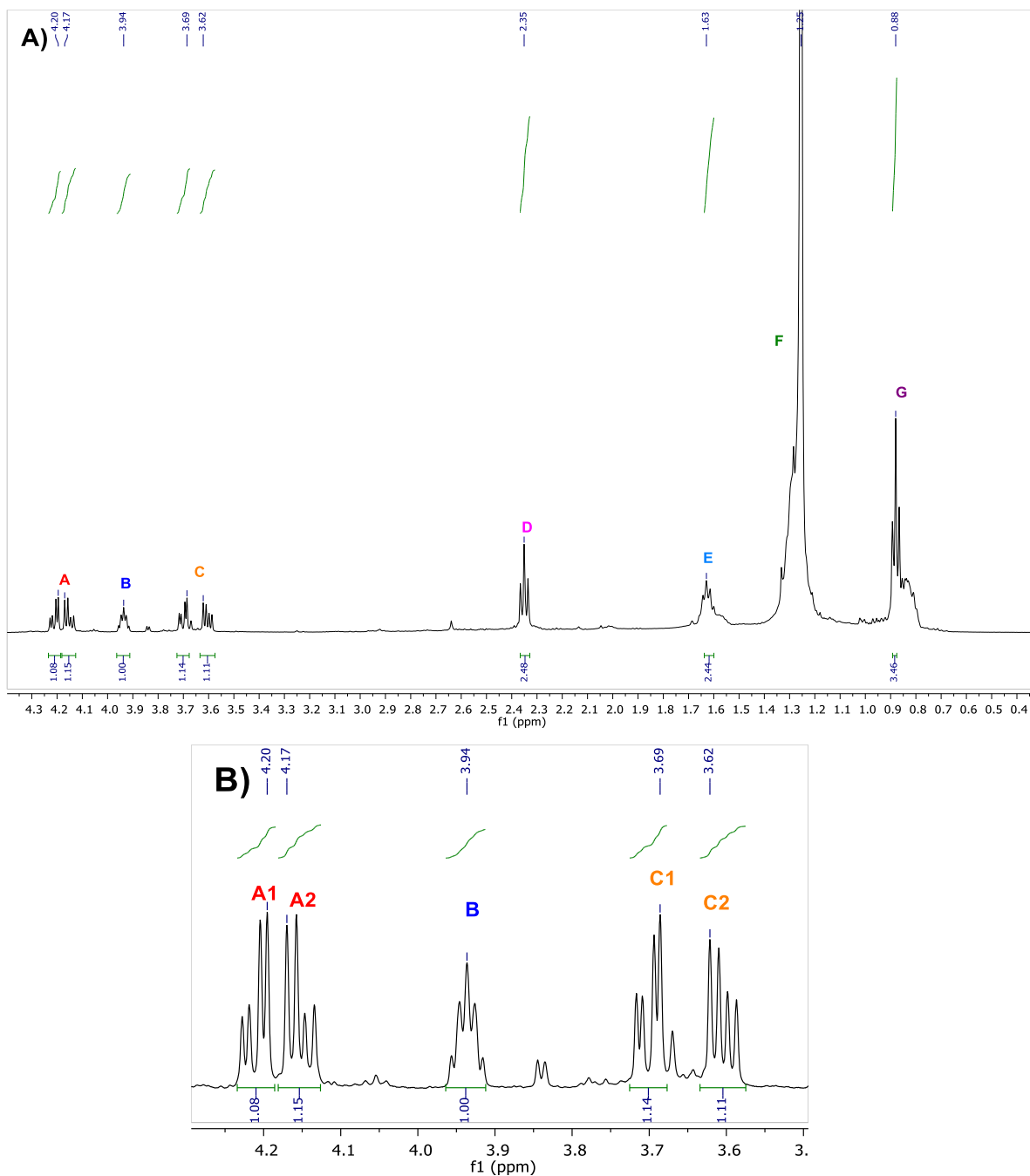
$$NI = \left( \frac{[2 \times C] - H + N - X + 2}{2} \right)$$

Donde: C= Carbonos, H= Hidrógenos, N= Nitrógenos y X=Haluros

Sustituyendo con la fórmula molecular

$$NI = \left( \frac{[2 \times 21] - 42 + 0 - 0 + 2}{2} \right) = 1 \text{ insaturación}$$

Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y se procedió a su análisis como se muestra en la figura 14.



**Fig. 14:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 1. A) Espectro de la región 0.4 a 4.3 ppm. B) Ampliación de la región 3.6 a 4.2 ppm.

En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observan las señales para los diferentes hidrógenos que contiene la estructura del compuesto 1. Se pueden apreciar dos señales una en 4.20 ppm y la otra en 4.17 ppm con una multiplicidad doble de dobles (dd) con  $J = 4.0$  y  $7.0$  Hz cada una y que integran para un protón cada una de ellas, asignadas como A1 y A2 respectivamente. Por el tipo de multiplicidad que presenta las señales A1 y A2 se infiere que son correspondientes a hidrógenos diasterotópicos. En la región de 3.94 ppm se observa una señal con una multiplicidad cuántuple con  $J = 4$  Hz y que integra para un hidrógeno a esta señal se le asignó la letra B como nomenclatura. Se observan dos señales en la región de 3.69 ppm y 3.62 ppm con una multiplicidad doble de dobles (dd) con  $J = 4.0$  y  $7.0$  Hz cada una, y que integran para un hidrógeno cada una de ellas asignadas como C1 y C2 respectivamente. Al igual que para las señales A se infiere que C1 y C2 pertenecen a hidrógenos diasterotópicos. En la región de 2.35 ppm se observa una señal con multiplicidad triple y  $J = 7.5$  Hz que integra para dos hidrógenos con la letra D asignada. En la región de 1.63 ppm se observa una señal cuántuple e integra para dos hidrógenos con  $J = 7.5$  Hz y asignada como E. En la región de 1.26 ppm se observa una señal múltiple que se le ha asignado la letra F que integra para varios hidrógenos, cuya cantidad es difícil de cuantificar ya que coincide con la señal de la grasa. Por último, en la región de 0.88 ppm se observa una señal con una multiplicidad triple y  $J = 7.0$  Hz que integra para tres hidrógenos, por el tipo de señal y la región en la que se encuentra se puede inferir que corresponde a un grupo metilo de una cadena alifática.

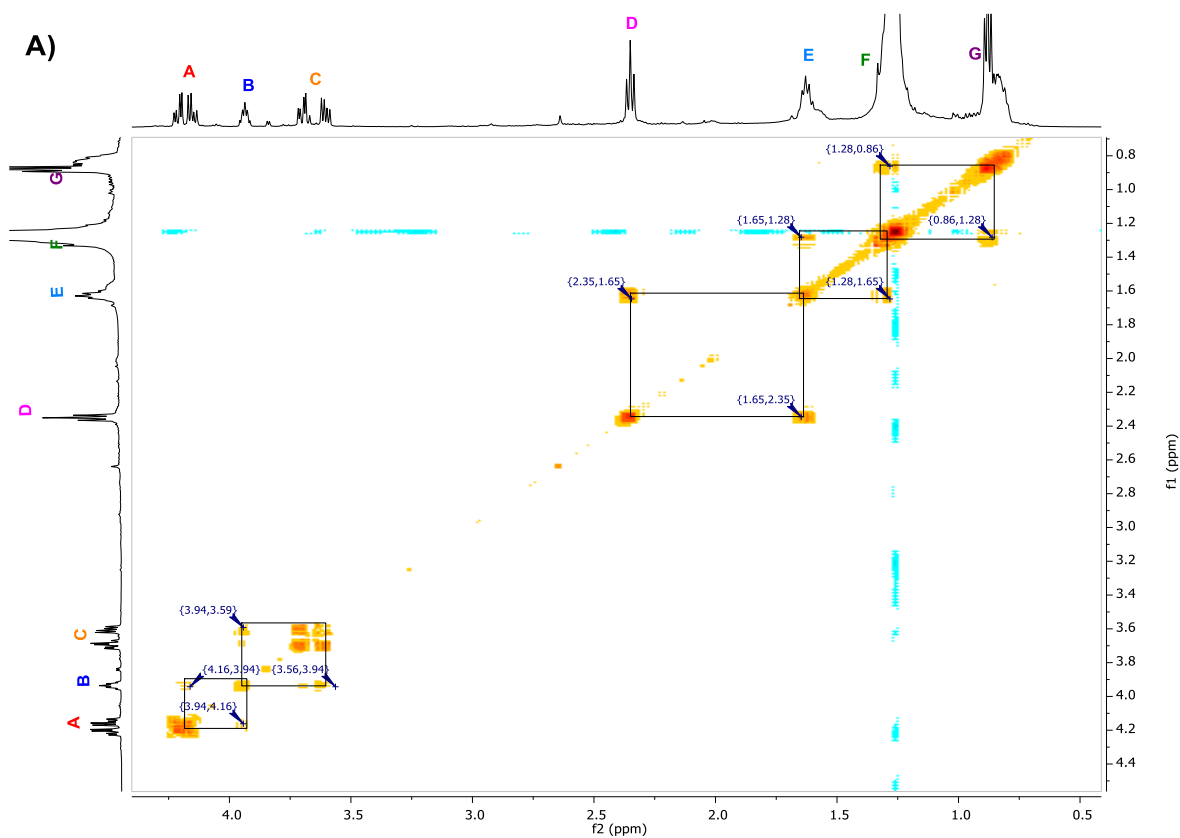
En la tabla 3 se observa un resumen de las señales del espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

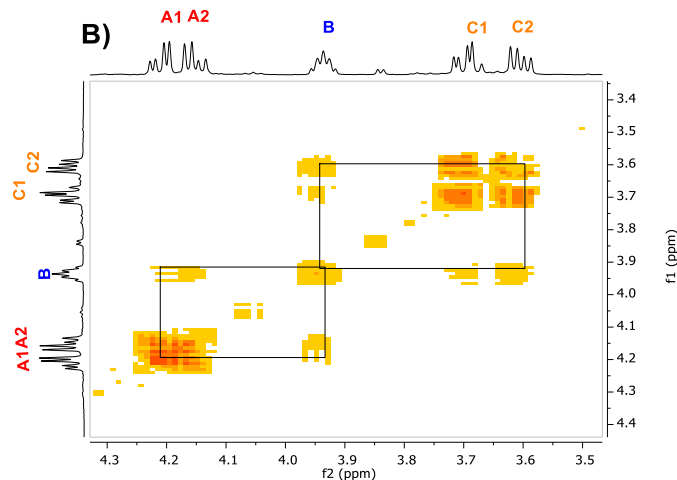
**Tabla 3:** Resumen de las señales de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto 1.

Nomenclatura	Región (ppm)	Integración	Tipo de señal
A1	4.20	1	dd
A2	4.17	1	dd
B	3.94	1	q
C1	3.69	1	dd
C2	3.62	1	dd
D	2.35	2	t
E	1.63	2	q

<b>F</b>	1.26		m
<b>G</b>	0.88	3	t

Después del análisis realizado al espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , para obtener la información de la conectividad de cada hidrógeno y poder así establecer una posible estructura, se obtuvo un espectro RMN 2D COSY (Fig. 15) para saber qué relación guardan entre si los hidrógenos del compuesto 1.

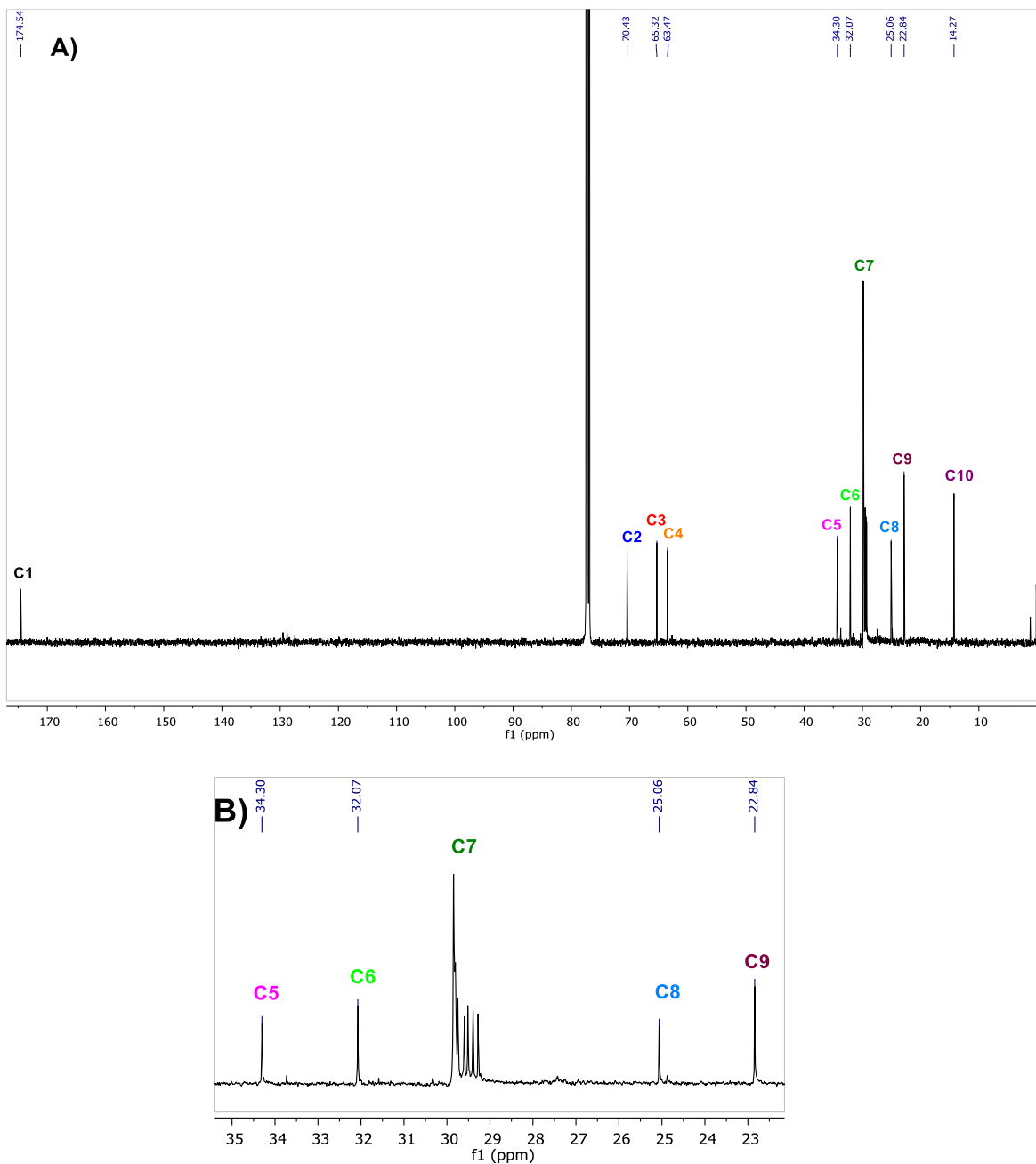




**Fig. 15:** Espectro de RMN 2D COSY en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 1. A) Espectro de la región 0.5 a 4.5 ppm. B) Ampliación de la región 3.5 a 4.3 ppm.

En el espectro de RMN 2D COSY (Fig. 15) se observa que la señal A en 4.20 y 4.17 ppm se correlaciona con la señal B que se encuentra en 3.94 ppm, y a su vez se observa que la señal B además de mostrar una correlación con la señal A, también se correlaciona con la señal C que se encuentra en 3.69 y 3.62 ppm. Con esta información se puede inferir que la señal B pertenece a un protón de un grupo metino que tiene como vecinos a un metileno correspondiente a la señal A y otro metileno correspondiente a la señal C. La señal de 2.35 ppm (D) se encuentra correlacionándose con la señal E en 1.63 ppm, y a su vez la señal E además de mostrar una correlación con la señal D también se encuentra correlacionándose con la señal F en 1.26 ppm. La señal F muestra una correlación con la señal D y la señal G en 0.88 ppm, sólo se correlaciona con la señal F.

Posteriormente se analiza el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 1, como se observa en la Figura 16.

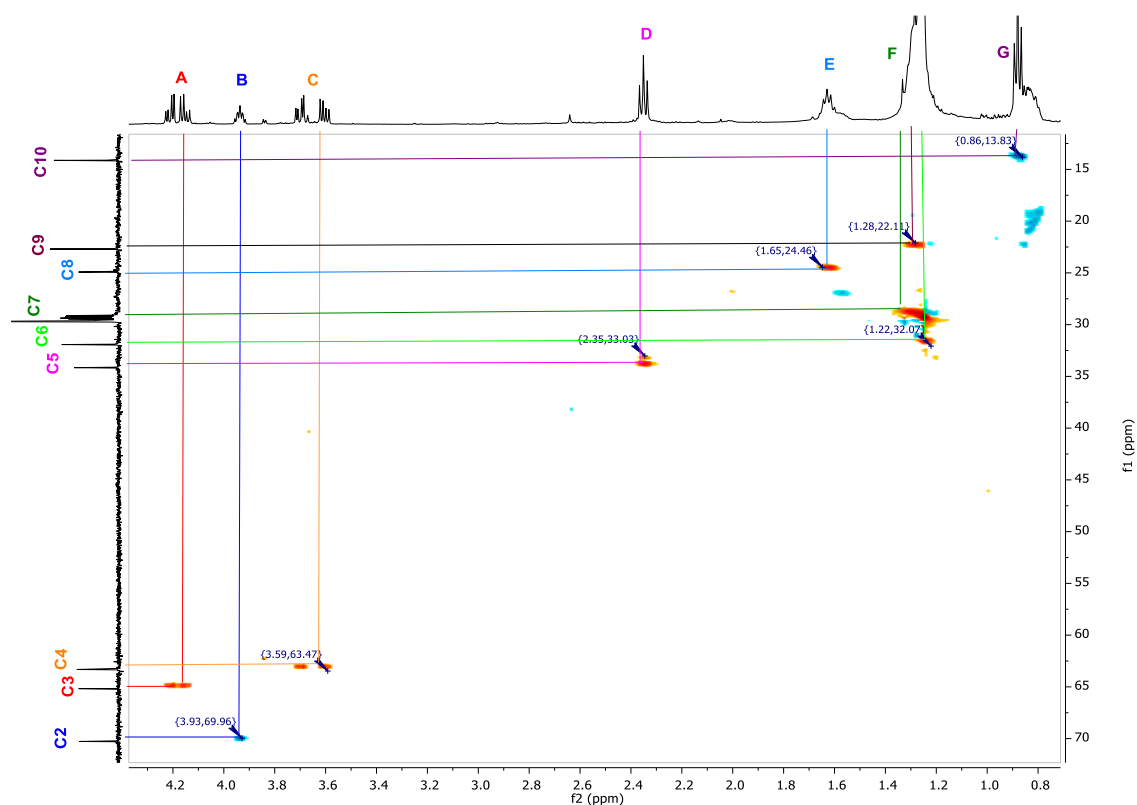


**Fig. 16:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 1. A) Espectro de la región 0 a 175 ppm. B) Ampliación de la región 22.5 a 35 ppm.

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 1 (Fig. 16), se pueden observar 10 señales de carbonos diferentes. En la región de 174.5 ppm se observa la señal C1 que pertenece al grupo carbonilo de un éster. En las regiones 70.4, 65.3, 63.4 ppm se observan

3 señales asignadas como C2, C3, C4 que podrían ser carbonos que se encuentran unidos a un elemento más electronegativo como es el oxígeno. En la región 34.3 y 32 ppm se encuentran las señales de carbono C5 y C6 respectivamente que pertenecen a carbonos de metilenos, así como también las señales de la región 29, 25 y 22.8 ppm asignadas como C7, C8 y C9 respectivamente que también pertenecen a carbonos de metilenos. Sin embargo, estos últimos se encuentran más alejados de elementos electronegativos dentro de la estructura del compuesto 1. Por último, la señal de la región 14.2 ppm asignada como C10 que pertenece a un carbono de tipo metílico.

Para una correcta asignación de los carbonos correlacionándolos con los hidrógenos correspondientes, se realizó un experimento de 2D HSQC (Fig. 17).



**Fig. 17:** Espectro RMN 2D HSQC en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 1.

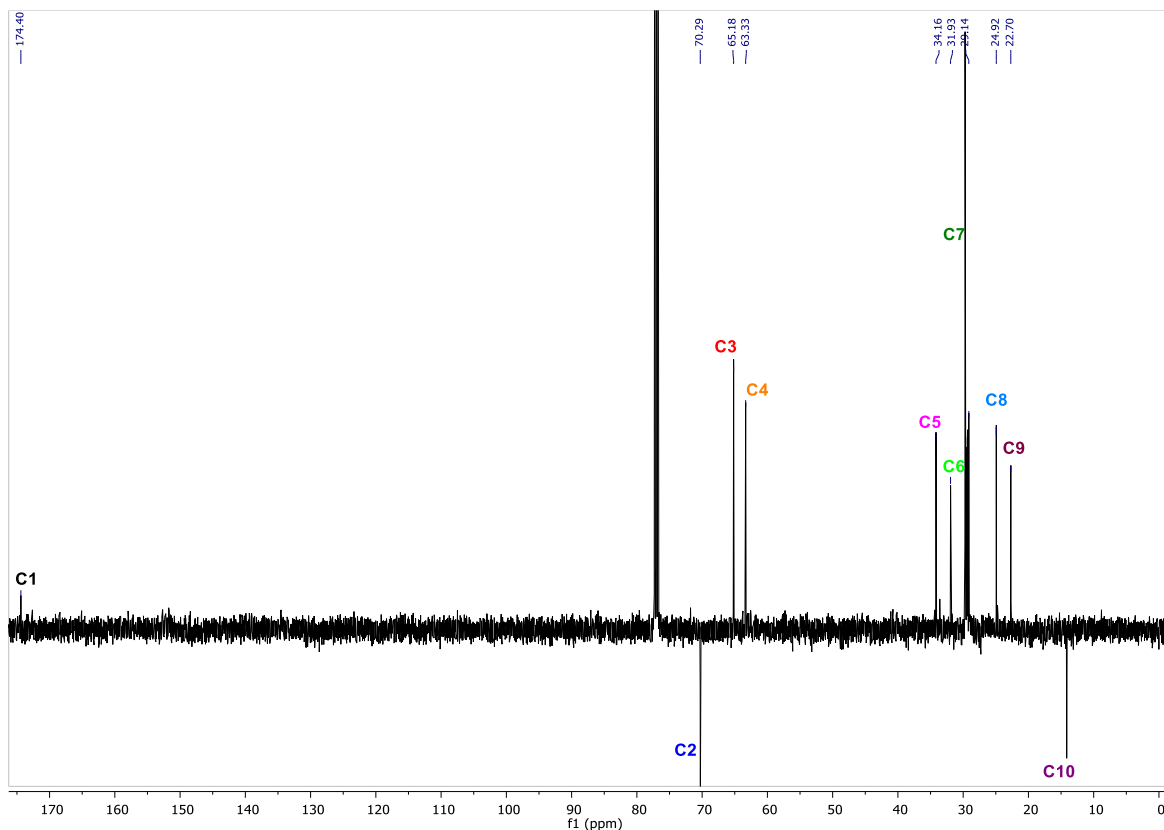
En el espectro se observa que la señal de carbono C1 de la región 174.5 ppm no muestra correlación alguna con ningún hidrógeno corroborando que es un carbono que pertenece a un grupo carbonilo de un éster. La señal de C2 de la región 70.4 ppm se está correlacionando con el hidrógeno B de la región 3.94 ppm confirmando que se trata de

un metino y no metileno. La señal de C3 de la región 65.3 ppm se está correlacionando con los hidrógenos diasterotópicos A de la región 4.20 y 4.17 ppm, y a su vez el C4 de la región 63.4 ppm se está correlacionando con los hidrógenos diasterotópicos C de la región 3.69 y 3.62 ppm confirmando que son metilenos. El C5 de la región 34.3 ppm se correlaciona con el hidrógeno D de la región 2.35 ppm, para el caso de C6, C7 y C9 de la región 32, 29 y 22.8 ppm respectivamente se correlacionan en la misma región de F 1.26 ppm, C8 de la región 25 ppm se correlaciona con el hidrógeno E de 1.63 ppm y por último el C10 de la región 14.2 ppm se correlaciona con el hidrógeno G de 0.88 ppm. A manera de resumen se observan las correlaciones existentes en la tabla 4.

**Tabla 4:** Resumen de las correlaciones obtenidas por HSQC.

HSQC	
<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>1</sup> H (ppm)
<b>C1</b> 174.5	-
<b>C2</b> 70.4	<b>B</b> 3.94
<b>C3</b> 65.3	<b>A</b> 4.2, 4.17
<b>C4</b> 63.4	<b>C</b> 3.68, 3.62
<b>C5</b> 34.3	<b>D</b> 2.35
<b>C6</b> 32	<b>F</b> 1.26
<b>C7</b> 29	<b>F</b> 1.26
<b>C8</b> 25	<b>E</b> 1.63
<b>C9</b> 22.8	<b>F</b> 1.26
<b>C10</b> 14.2	<b>G</b> 0.88

Para poder diferenciar un poco más entre el tipo de carbono que tiene la estructura, se realizó un experimento de APT que se muestra en la figura 18.



**Fig. 18:** Espectro de APT en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 1.

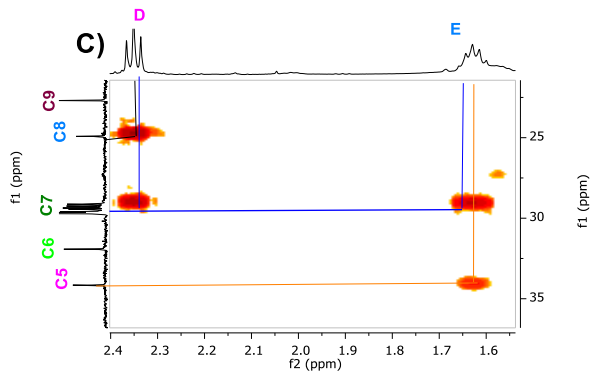
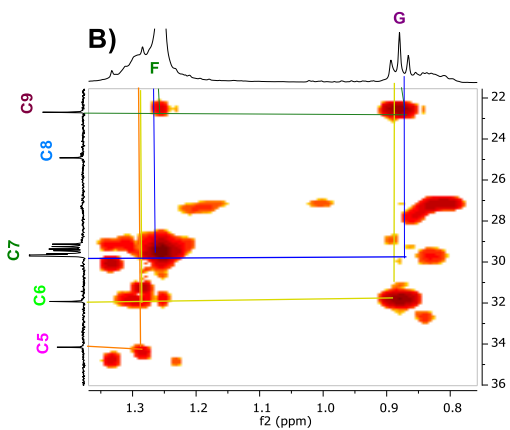
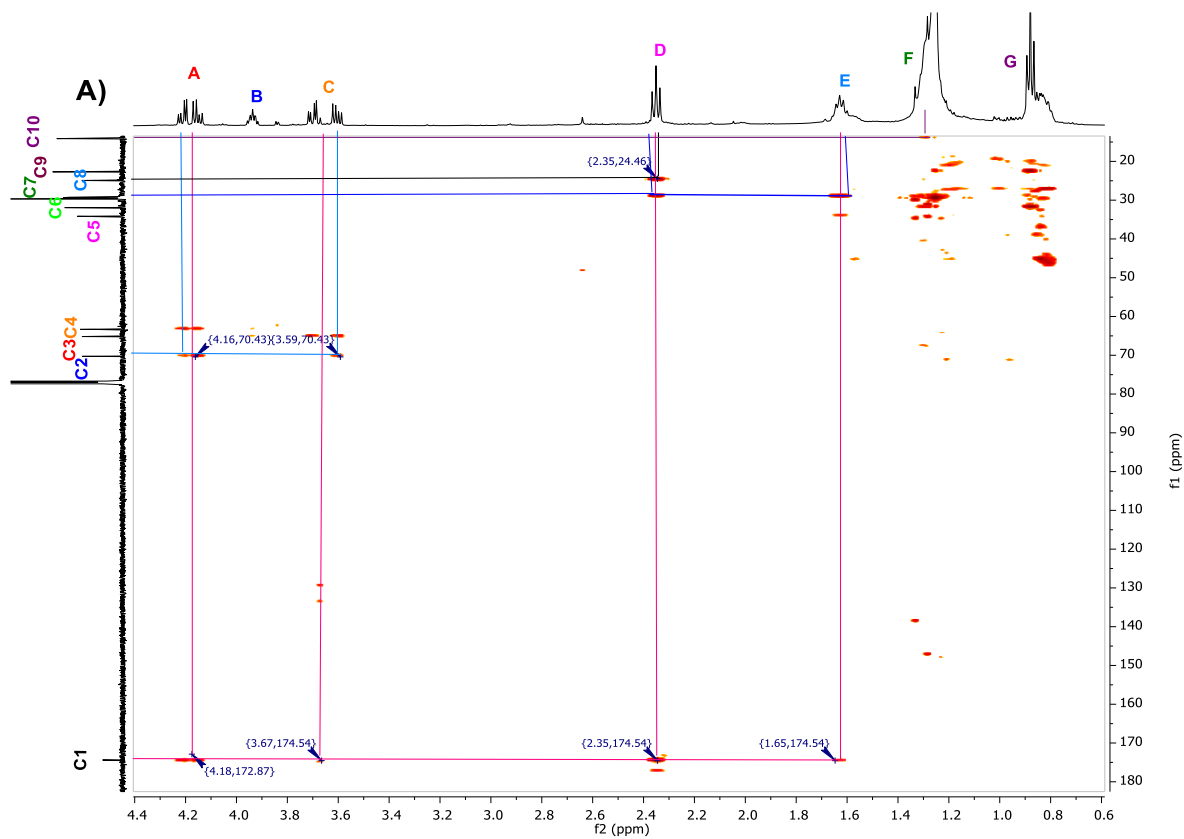
Con el espectro de RMN APT (Fig. 18) se puede observar qué tipo de carbono pertenece cada uno de los carbonos presentes en el compuesto 1. Las señales que se encuentran con un sentido positivo o hacia arriba, es indicativo de que el carbono puede ser del tipo carbonilo, cuaternario (C) o del tipo metileno ( $\text{CH}_2$ ) y si la señal se encuentra con un sentido negativo o hacia abajo, es indicativo de que el carbono puede ser del tipo metino (CH) o del tipo metilo ( $\text{CH}_3$ ). Se puede observar que la mayoría de las señales son de sentido positivo a excepción de la señal C2 y C10 que se encuentran en sentido negativo confirmando que C2 es un metino y C10 es un metilo. En la tabla 5 se muestra el resumen de los datos obtenidos en el experimento de APT.

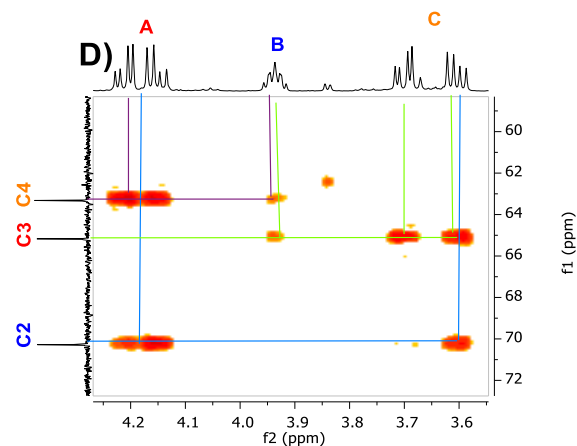
**Tabla 5:** Resumen de los resultados del experimento APT.

13C		
ppm	APT	INTERPRETACIÓN
<b>C1 174.5</b>	↑	Carbonilo éster
<b>C2 70.4</b>	↓	CH
<b>C3 65.3</b>	↑	CH <sub>2</sub>
<b>C4 63.4</b>	↑	CH <sub>2</sub>
<b>C5 34.3</b>	↑	CH <sub>2</sub>
<b>C6 32</b>	↑	CH <sub>2</sub>
<b>C7 29</b>	↑	CH <sub>2</sub>
<b>C8 25</b>	↑	CH <sub>2</sub>
<b>C9 22.8</b>	↑	CH <sub>2</sub>
<b>C10 14.27</b>	↓	CH <sub>3</sub>

Con los datos obtenidos en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC y APT, se puede concluir que el carbono C1 pertenece a un C del grupo carbonilo de un éster, el C2 pertenece a un metino por la correlación con B que integra para 1 protón, C3 pertenece a un metileno por la correlación con A que integra para 2 protones diasterotópicos, C4 pertenece a un metileno por la correlación con C que integra para 2 protones diasterotópicos. C5 pertenece a un metileno por la correlación con D que integra para 2 protones, C6, C7 y C9 se correlacionan con F que por la región y el sentido observado en el espectro de APT se infiere que esos carbonos pertenecen a metilenos de una cadena alifática extensa. C8 pertenece a un metileno por la correlación con E que integra para dos protones y por último el C10 pertenece a un metilo por la correlación que existe con G que integra para tres protones.

El último experimento que se realizó en RMN fue el experimento de HMBC que se muestra en la figura 19.





**Fig. 19:** Espectro de 2D HMBC en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 1. A) Espectro de la región  $^1\text{H}$  0.6 a 4.4 ppm y  $^{13}\text{C}$  13 a 180 ppm. B) Ampliación de la región  $^1\text{H}$  0.8 a 1.35 ppm y  $^{13}\text{C}$  22 a 36 ppm. C) Ampliación de la región  $^1\text{H}$  1.55 a 2.4 ppm y  $^{13}\text{C}$  22.5 a 35 ppm. D) Ampliación de la región  $^1\text{H}$  3.55 a 4.25 ppm y  $^{13}\text{C}$  59 a 72 ppm.

En el experimento HMBC se muestran las señales que proporcionan información acerca de la relación existente entre los núcleos de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  que se encuentran a una distancia de 2 y 3 enlaces, y en casos especiales hasta 4 enlaces. Para facilitar la descripción de la figura 19, se mencionarán por nomenclatura el C y el H, ya que la región en la que se encuentran cada uno de ellos ya se ha especificado en espectros anteriores.

Las relaciones existentes son: el C1 con los hidrógenos A, C, D y E, el C2 con los hidrógenos A y C. El C3 con los hidrógenos B y C y el C4 con los hidrógenos A y B. El C5 con los hidrógenos E y F, el C6 con los hidrógenos F y G, el C7 con los hidrógenos D, E, F y G y el C8 con los hidrógenos D. El C9 con los hidrógenos F y G y, por último, el C10 sólo tiene correlación con los hidrógenos F. En la tabla 6 se muestra el resumen de las relaciones existentes entre los núcleos de C y los núcleos de H observados en el espectro de HMBC.

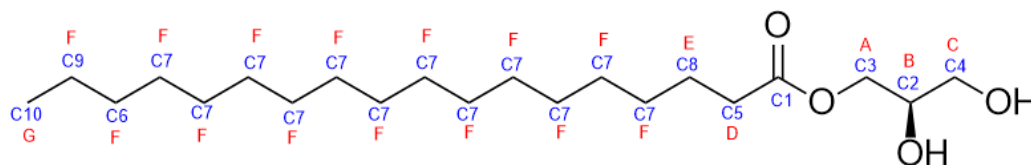
**Tabla 6:** Resumen de los resultados del experimento de HMBC del compuesto 1.

HMBC	
<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
Nomenclatura	Nomenclatura
C1	A, C, D, E
C2	A, C
C3	B, C
C4	A, B
C5	E, F
C6	F, G
C7	D, E, F, G
C8	D, F
C9	F, G
C10	F

Para complementar los experimentos para el **compuesto 1** se realizó la medición de su punto de fusión teniendo como resultado 67.3 °C. Además, se puede observar que dentro de la estructura se encuentra un carbono asimétrico que es el C2, entonces se procedió a obtener su rotación óptica por polarimetría utilizando como disolvente cloroformo destilado; su rotación específica fue  $[\alpha]_D^{25} = -22^\circ$  (*c* 1, CHCl<sub>3</sub>).

La estructura que se propone para el compuesto **1** es la que se muestra en la figura 20, *estearato de (R)-2,3-dihidroxiopilo* también llamado 1-monoestearato de glicerina. Este compuesto es del tipo de los monoacilgliceroles, que cambian según la longitud de la cadena alifática, encontrando compuestos como monolaurina, el cual es comúnmente usado en cosmética y como aditivo alimentario. El compuesto obtenido monoestearato de glicerilo, es usado en alimentación como espesante, emulsionante, y conservante. Cabe destacar que los datos obtenidos coinciden con los revisados en la literatura en donde reportan que su punto de fusión es de 65-70 °C. Los monoacilgliceroles son ópticamente activos y su rotación está reportada con diferentes cadenas siendo el isómero *S* el que

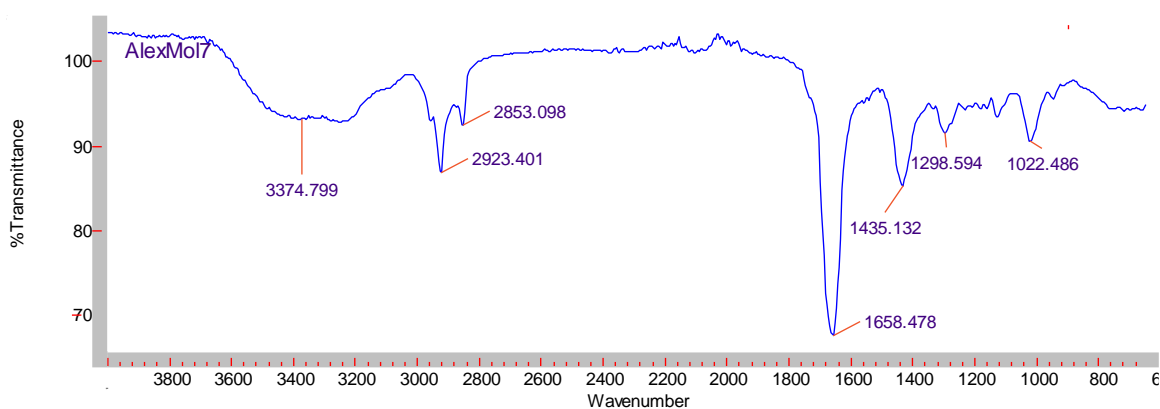
tiene una rotación óptica positiva (dextrógiro), por lo tanto, en este caso el isómero obtenido es el *R* donde su rotación óptica fue levogira.<sup>19, 20</sup>



**Fig. 20:** *Estearato de (R)-2,3-dihidroxi-propilo.* De color azul se puede observar la nomenclatura de cada uno de los carbonos asignados y en color rojo la nomenclatura de cada uno de los protones asignados.

## Fracción 7A (Compuesto 2)

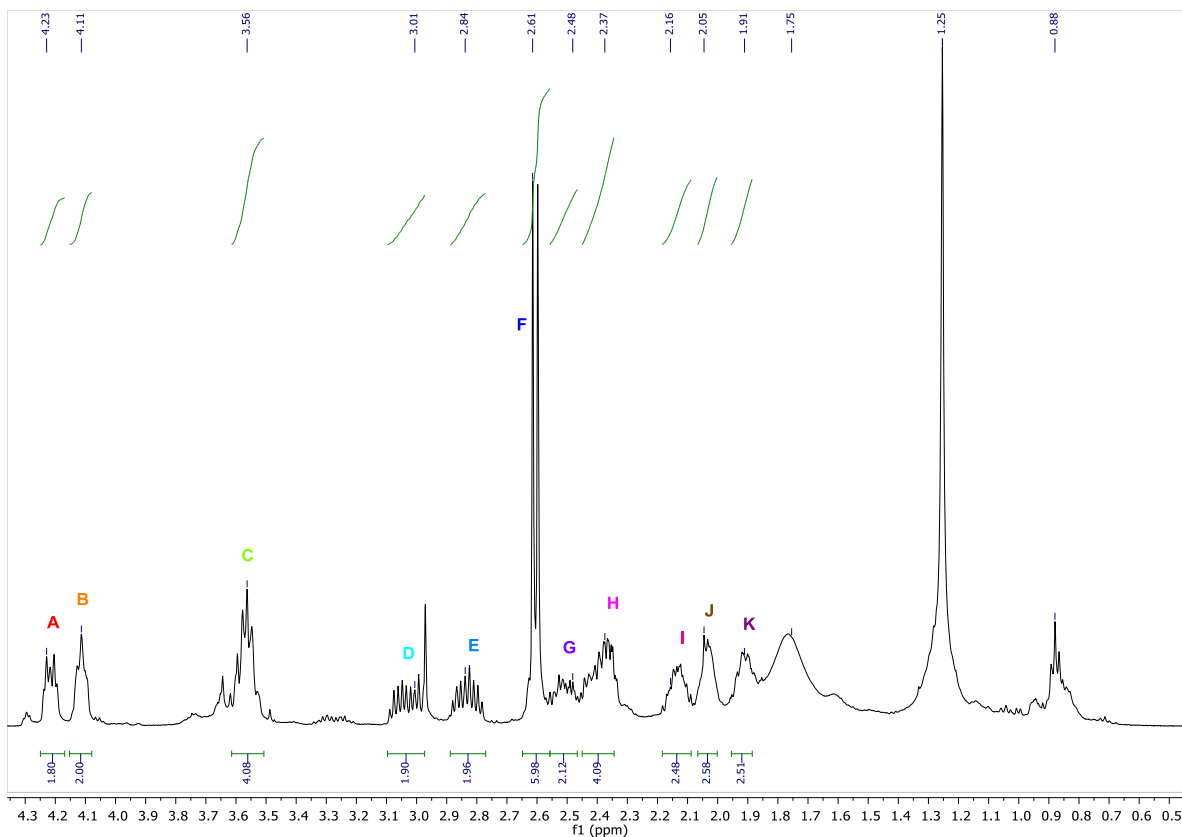
Se procedió a realizar una serie de experimentos mediante técnicas espectroscópicas para llevar a cabo la caracterización del compuesto **2**. De la fracción 7A se obtuvieron dos compuestos, una estructura conocida que es DCP L-Pro-L-Phe y el compuesto **2**. A continuación, se presenta el espectro infrarrojo del compuesto **2** (Fig. 21) el cual proporciona información acerca de los grupos funcionales que pueden encontrarse en el compuesto.



**Fig. 21:** Espectro IR del compuesto 2

Se observa en la figura 21 una banda pequeña ancha en la región de  $3374.79\text{ cm}^{-1}$  que es característico del grupo funcional OH. Las señales de las bandas que se encuentran en la región  $2923.40\text{ cm}^{-1}$ ,  $2853.09\text{ cm}^{-1}$  y  $1435.13\text{ cm}^{-1}$  pertenecen a enlaces C-H. Por último, la banda de la región  $1658.47\text{ cm}^{-1}$  pertenece al grupo carbonilo (C=O) de un éster, las bandas de las regiones  $1298.59\text{ cm}^{-1}$  y  $1022.48\text{ cm}^{-1}$  que pertenecen al estiramiento simétrico y asimétrico del oxígeno adyacente al carbono del grupo carbonilo.

Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  y se procedió a su análisis como se muestra en la figura 22.



**Fig. 22:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 2.

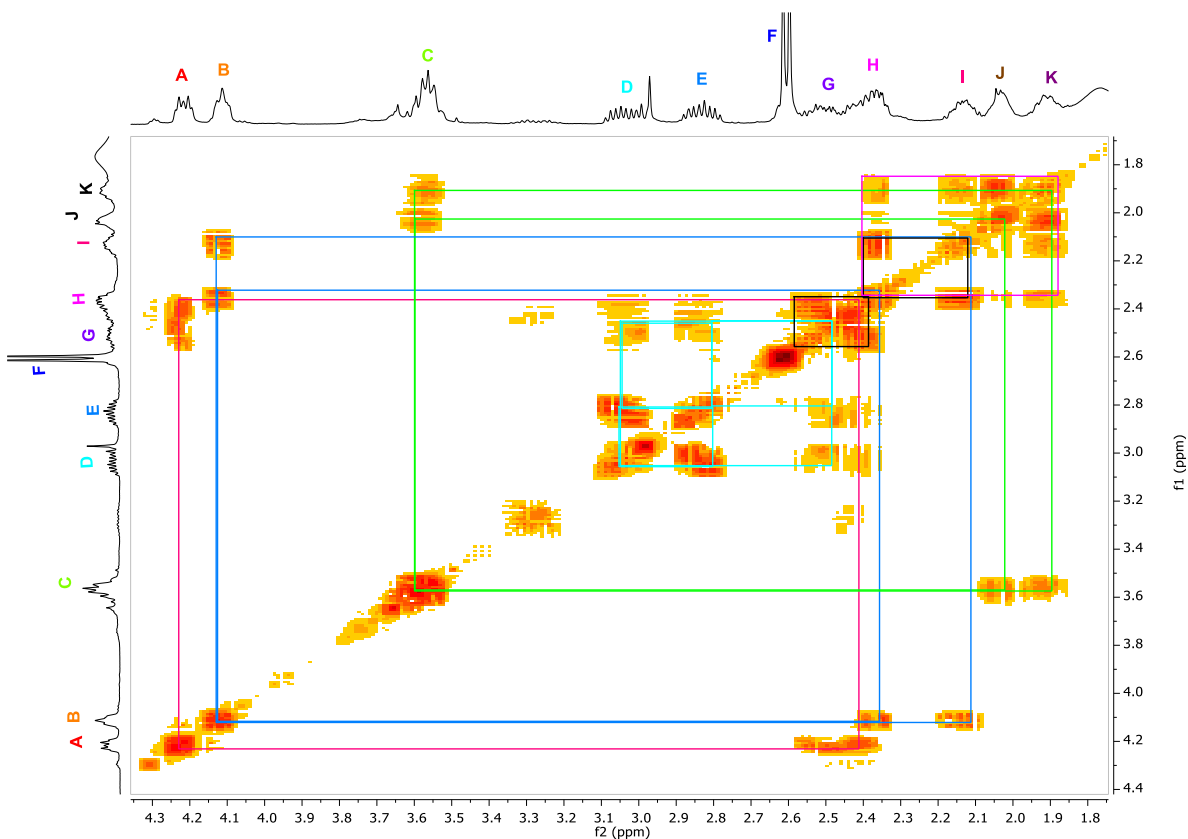
En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observan las señales para los diferentes hidrógenos que contiene la estructura del compuesto 2. Se puede apreciar en la región de 4.23 ppm una señal asignada como A que integra para dos hidrógenos, en la región de 4.11 ppm se encuentra una señal que integra para dos hidrógenos y se le asignó la nomenclatura de B, ambas señales pudieran ser metinos enlazados a átomos electronegativos como oxígenos. En la región de 3.56 ppm se observa una señal que se ha denominado C e integra para cuatro hidrógenos, con esta señal se infiere que se trata de hidrógenos de dos metilenos que convergen en la misma región del espectro. La señal de la región 3.01 ppm que se denominó D, integra para dos hidrógenos y la multiplicidad que se observa es múltiple, a su vez la señal E de la región 2.84 ppm integra también para dos hidrógenos y su multiplicidad también es del tipo múltiple. La señal que se encuentra en la región 2.61 ppm se le asignó el nombre de F y está señal parece tener una multiplicidad de doble e integra para 6 hidrógenos, la señal G en la región de 2.48 ppm se observa como una señal

múltiple que integra para dos hidrógenos, la señal H que se observa como una señal múltiple integra para cuatro hidrógenos. Las últimas señales I, J, K de las regiones 2.16, 2.05 y 1.91 ppm respectivamente, integran para dos hidrógenos cada señal y se observan como señales múltiples. En el espectro se observan otras señales que han sido descartadas para esta molécula ya que no guardan correlación alguna con las demás señales que se les ha asignado una nomenclatura. En la tabla 7 se observa un resumen de las señales del espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

**Tabla 7:** Resumen de las señales de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto 2.

Nomenclatura	Región (ppm)	Integración	Tipo de señal
<b>A</b>	4.23	2	
<b>B</b>	4.11	2	
<b>C</b>	3.56	4	
<b>D</b>	3.01	2	m
<b>E</b>	2.84	2	m
<b>F</b>	2.61	6	d
<b>G</b>	2.48	2	m
<b>H</b>	2.37	4	m
<b>I</b>	2.16	2	m
<b>J</b>	2.05	2	m
<b>K</b>	1.91	2	m

Después del análisis realizado al espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , para una asignación correcta de los hidrógenos, se obtuvo un espectro RMN 2D COSY (Fig. 23) para saber qué relación guardan entre si los hidrógenos del compuesto 2.

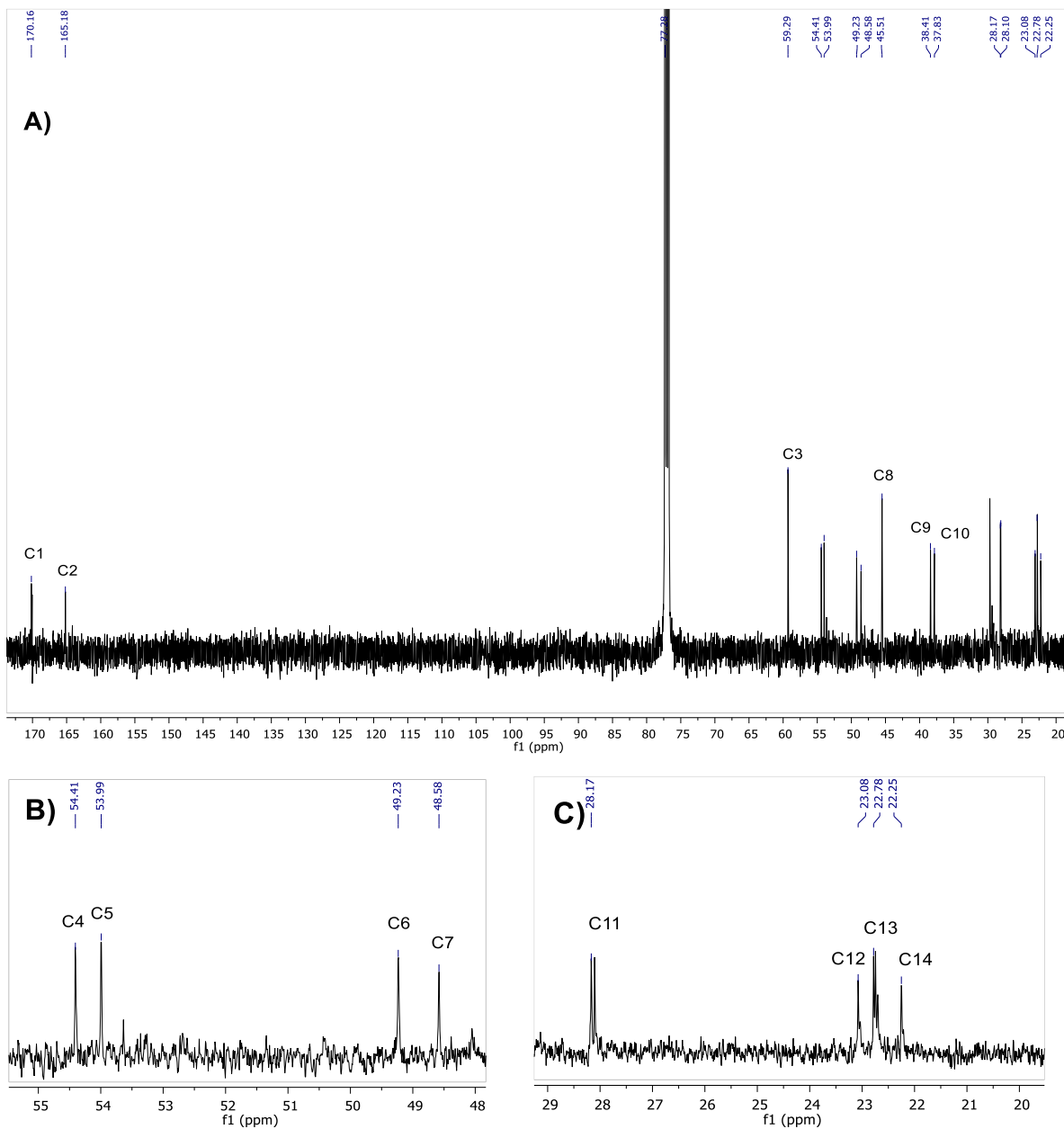


**Fig. 23:** Espectro de RMN 2D COSY en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 2.

En el espectro de RMN 2D COSY (Fig. 23) se observa que la señal A en 4.23 ppm se correlaciona con la señal G que se encuentra en 2.48 ppm y con la señal H en 2.37 ppm. La señal B en 4.11 ppm se correlaciona con las señales H e I en las regiones 2.37 y 2.16 ppm respectivamente. La señal C de la región 3.56 ppm se correlaciona con las señales J y K en las regiones 2.05 y 1.91 ppm respectivamente, para el caso de la señal D se correlaciona con las señales E en 2.84 ppm, la señal G en 2.48 ppm y la señal H en 2.37 ppm. La señal E en 2.84 ppm se correlaciona también con las señales G y H al igual que la señal D, se puede observar también la correlación mencionada antes entre la señal D y E. Para el caso de la señal F en 2.61 ppm no muestra correlación alguna lo cual indica que lo que aparenta ser una señal doble en realidad son dos simples empalmadas que no se acoplan con ningún hidrógeno. La señal G en la región 2.48 ppm se observan las correlaciones ya descritas con las señales A, D y E, además de estas correlaciones se observa una correlación con la señal H en la región 2.37 ppm. La señal H en 2.37 ppm además de mostrar las correlaciones ya descritas con las señales A y B, también se observa correlaciones con las señales I y K de las regiones

2.16 y 2.05 ppm respectivamente. Para el caso de la señal J en 2.05 ppm con anterioridad ya describió la correlación existente con las señales C y K. Por último, la señal K las correlaciones que tiene son con las señales C, H, I y J.

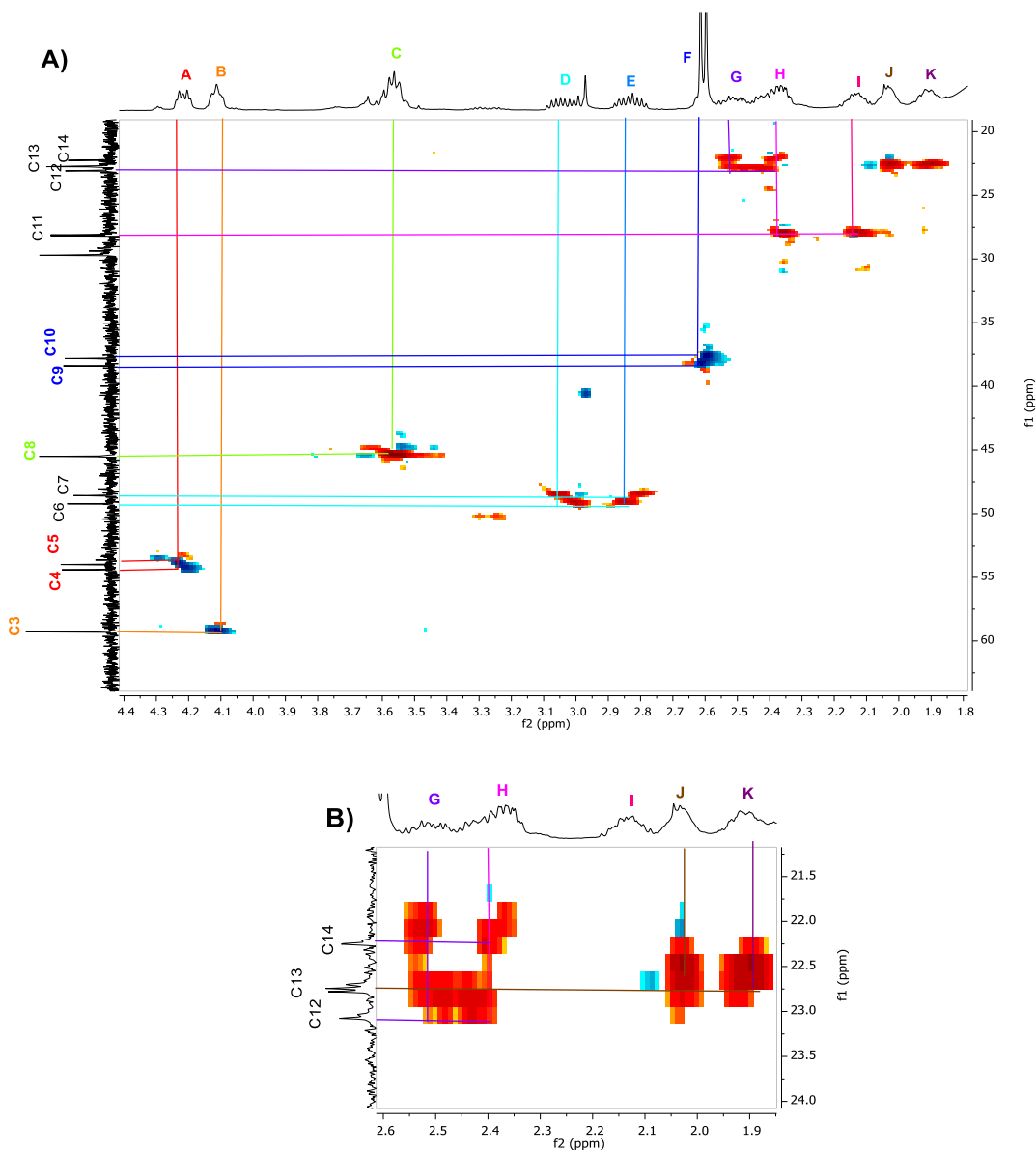
Posteriormente se analiza el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 2, como se observa en la Figura 24.



**Fig. 24:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 2. A) Espectro de la región 20 a 175 ppm. B) Ampliación de la región 48

En el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 2 (Fig. 24), se pueden observar 14 señales de carbonos diferentes. En la región de 170.1 se observa la señal C1 que por la región en la que se encuentra, se puede inferir que es un carbono que pertenece al grupo carbonilo de un éster, muy cercano a esta señal se encuentra la señal de C2 en la región de 165.18 ppm dicha señal pertenece a un carbono del tipo cuaternario lo cual se infiere por la región en la que se encuentra. En la región de 59.2 ppm se encuentra la señal C3 que cabe destacar que tiene el doble de altura, en 54.4 y 53.9 ppm se encuentran las señales de C4 y C5 dichas señales pueden pertenecer a carbonos de metino o metilenos cada uno. Avanzando un poco más sobre el espectro, se puede observar las señales C6, C7 y C8 de las regiones 49.2, 48.5 y 45.5 respectivamente las cuales corresponden a carbonos de metilenos y cabe destacar que al igual que antes la señal C8 tiene el doble de altura por lo que podría indicar un doble metileno. En el caso de las señales de las regiones 38.4 (C9) y 37.8 (C10) ppm pertenecen a carbonos de metilos unidos a un átomo electronegativo por eso están tan desplazados, y por último las señales C11, C12, C13 y C14 de las regiones 28.1, 23.0, 22.7 y 22.2 ppm respectivamente, pertenecen a carbonos de metilenos, cabe destacar que en las ampliaciones se ven que C11 y C13 son dobles.

Para una correcta asignación de los carbonos correlacionándolos con los hidrógenos correspondientes, se realizó un experimento de 2D HSQC (Fig. 25).



**Fig. 25:** Espectro RMN 2D HSQC en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 2. A) Espectro de la región  $^1\text{H}$  1.8 a 4.4 ppm y  $^{13}\text{C}$  de 20 a 65 ppm. B) Ampliación de la región  $^1\text{H}$  1.85 a 2.6 ppm y  $^{13}\text{C}$  de 21 a 24 ppm.

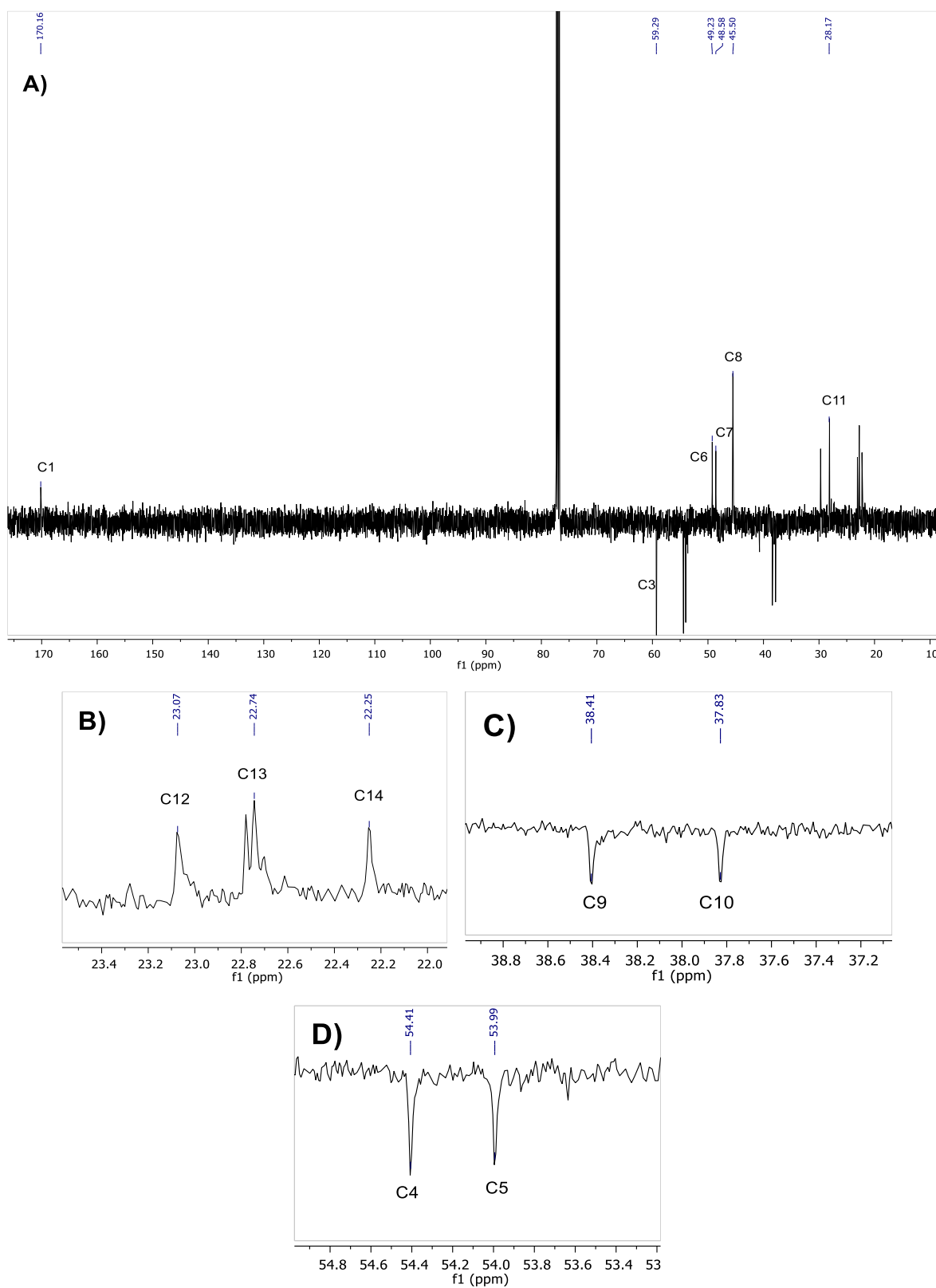
En el espectro de RMN 2D HSQC (Fig. 25) se observa que la señal de carbono C1 de la región 174.5 ppm y la señal del carbono C2 no muestra correlación alguna con ningún hidrógeno corroborando que ambos carbonos no se encuentran unidos a ningún hidrógeno. El C3 se correlaciona con los hidrógenos de B, pero se ve que son dos hidrógenos correlacionando con la misma señal de carbono que se ve el doble de alta, por lo que se concluye que son dos hidrógenos de metino. En el caso de C4 y C5 de las regiones 54.4 y

53.9 ppm ambos carbonos se correlacionan con los hidrógenos de A cuya integración es de 2 hidrógenos y es por ello que se infiere que C4 y C5 son carbonos metino cada uno. En el caso de C6 y C7 de las regiones 49.2 y 48.5 ppm respectivamente se correlacionan con los hidrógenos de D y E dichos hidrógenos integran para 2 cada uno de ellos, entonces con esta información se infiere que C6 y C7 son C de metileno cada uno, pero ambos son hidrógenos diastereotópicos, Ha y Hb cada uno. En el caso de C8 de la región 45.5 ppm se correlaciona con los hidrógenos de la señal C que integra para cuatro hidrógenos, es por ello que en C8 se encuentran dos metilenos, confirmando además por la altura del pico del carbono. Para el caso de C9 y C10 de las regiones 38.4 y 37.8 ppm respectivamente ambos carbonos se correlacionan con los hidrógenos de F que integra para 6 hidrógenos por lo que en ambos casos C9 y C10 son metilos, pero ligeramente diferentes que caen en la misma región. En la región 28.1 ppm se encuentra C11 que se correlaciona con los hidrógenos de H e I, C12 de la región 23.0 ppm se correlaciona con los hidrógenos de G y H, C13 de la región 22.7 ppm se correlaciona con los hidrógenos de J y K y la última señal C de la región 22.2 se correlaciona con los hidrógenos de G y H. A manera de resumen se observan las correlaciones existentes en la tabla 8.

**Tabla 8:** Resumen de las correlaciones obtenidas por HSQC del compuesto 2.

Nomenclatura	Región (ppm)	HSQC
<b>C1</b>	170.16	-----
<b>C2</b>	165.18	-----
<b>C3</b>	59.29	B
<b>C4</b>	54.41	A
<b>C5</b>	53.99	A
<b>C6</b>	49.23	D, E
<b>C7</b>	48.58	D, E
<b>C8</b>	45.51	C
<b>C9</b>	38.41	F
<b>C10</b>	37.83	F
<b>C11</b>	28.17	H, I
<b>C12</b>	23.08	G, H
<b>C13</b>	22.78	J, K
<b>C14</b>	22.25	G, H

Para poder diferenciar un poco más entre el tipo de carbono que tiene el compuesto 2, se realizó un experimento de APT que se muestra en la figura 26.



**Fig. 26:** Espectro de APT en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 2. A) Espectro de la región 10 a 175 rpm. B) Ampliación de la región 22 a 23.5 ppm. C) Ampliación de la región 37.2 a 38.9 ppm. D) Ampliación de la región 53 a 54.7 ppm.

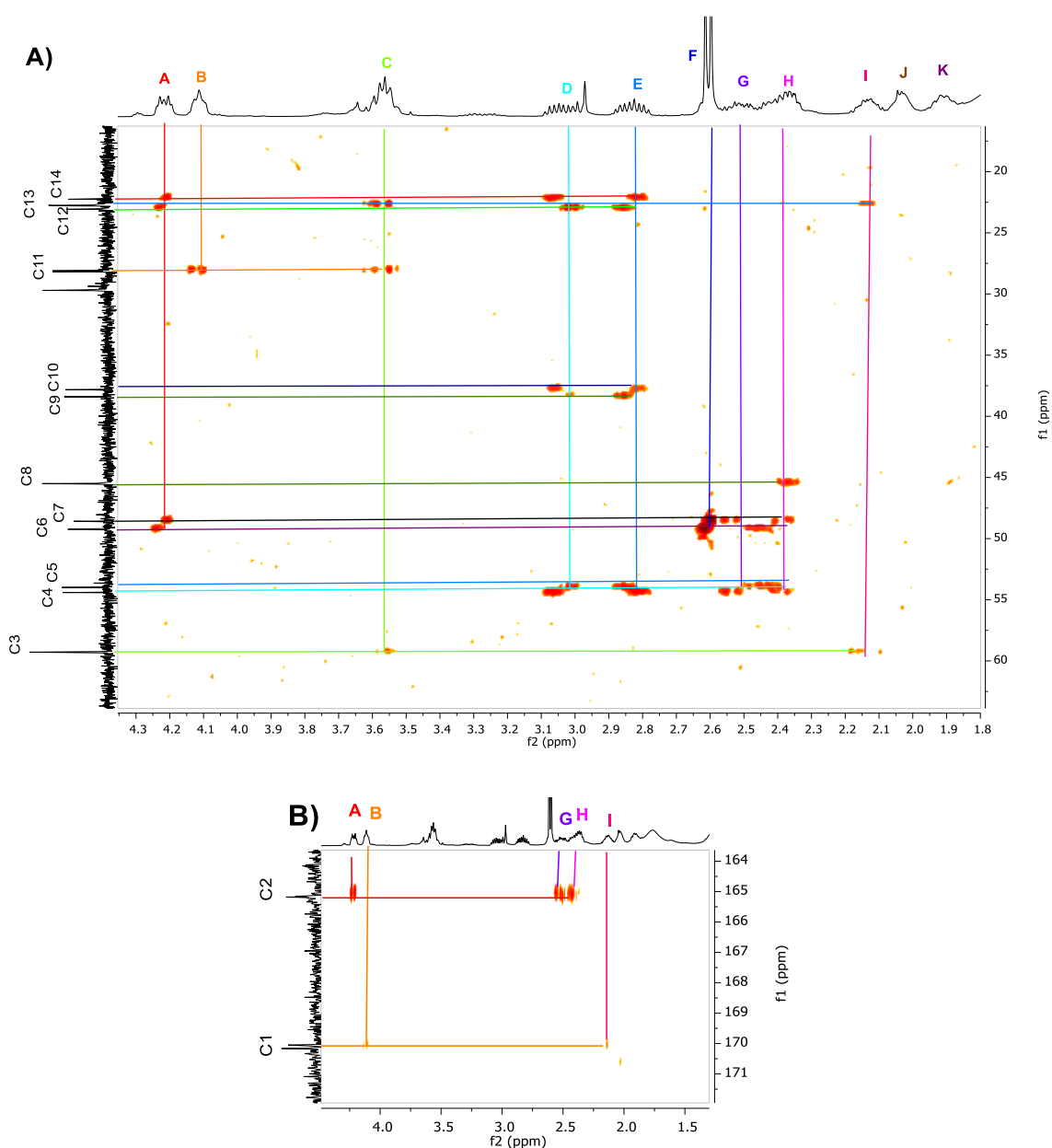
Con el espectro de RMN APT del compuesto 2 (Fig. 26) se puede observar qué tipo de carbono pertenece cada uno de los carbonos presentes en el compuesto 2. Las señales que se encuentran con un sentido positivo o se encuentran hacia arriba, son carbonos del tipo puede ser del tipo carbonilo, cuaternario (C) o del tipo metileno ( $\text{CH}_2$ ) y si la señal se encuentra con un sentido negativo o hacia abajo, es indicativo de que el carbono puede ser del tipo metino (CH) o del tipo metilo ( $\text{CH}_3$ ). Con base en el sentido de la señal que se muestra en el espectro de RMN APT, la correlación existente entre el espectro de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  y la integración observada en el espectro de  $^1\text{H}$  se puede saber qué tipo de carbono con exactitud es el que se tiene en cada una de las señales. En la tabla 9 se muestra el resumen de los datos obtenidos en el experimento de APT.

**Tabla 9:** Resumen de los resultados del experimento APT del compuesto 2

Nomenclatura	Región (ppm)	APT
<b>C1</b>	170.16	↑ CARBONILO ÉSTER
<b>C2</b>	165.18	CUATERNARIO
<b>C3</b>	59.29	↓ 2 CH
<b>C4</b>	54.41	↓ CH
<b>C5</b>	53.99	↓ CH
<b>C6</b>	49.23	↑ $\text{CH}_2$
<b>C7</b>	48.58	↑ $\text{CH}_2$
<b>C8</b>	45.51	↑ 2 $\text{CH}_2$
<b>C9</b>	38.41	↓ $\text{CH}_3$
<b>C10</b>	37.83	↓ $\text{CH}_3$
<b>C11</b>	28.17	↑ 2 $\text{CH}_2$
<b>C12</b>	23.08	↑ $\text{CH}_2$
<b>C13</b>	22.78	↑ 2 $\text{CH}_2$
<b>C14</b>	22.25	↑ $\text{CH}_2$

Con los datos obtenidos en los espectros  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC y APT, se puede concluir que el carbono C1 pertenece a un carbono del grupo carbonilo de un éster, C3 pertenece a dos metinos, para el caso de C8, C11 y C13 pertenecen a dos metilenos cada uno, para el caso de los carbonos C4 y C5 ambos son carbonos de metino, los carbonos C6, C7, C12, y C14 son señales de carbonos de metileno y por último las señales de C9 y C10 son señales de carbonos de metilo.

El último experimento que se realizó en RMN fue el experimento de HMBC que se muestra en la figura 27.



**Fig. 27:** Espectro de 2D HMBC en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 2. A) Espectro de la región  $^1\text{H}$  1.8 a 4.3 ppm y  $^{13}\text{C}$  de 15 a 65 ppm. B) Ampliación de la región  $^1\text{H}$  1.5 a 4.5 ppm y  $^{13}\text{C}$  164 a 171.5 ppm.

En el experimento HMBC se muestran las señales que proporcionan información acerca de la relación existente entre los núcleos de  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  que se encuentran a una distancia de 2 y 3 enlaces, y en casos especiales hasta 4 enlaces. Para facilitar la descripción de la figura 27, se mencionarán por nomenclatura el C y el H, ya que la región en la que se encuentran cada uno de ellos ya se ha especificado en espectros anteriores.

Las relaciones existentes son: El C1 con los hidrógenos B e I, el C2 con los hidrógenos de A, G y H, el C3 con los hidrógenos C y E, el C4 y C5 ambos se correlacionan con los hidrógenos D, E, G y H, en el caso de C6 y C7 ambos se correlacionan con los hidrógenos A, F y H en el caso de C7 además de esas correlaciones se muestra una correlación extra con los hidrógenos de G. El C8 solo se encuentra correlacionándose con una señal de los hidrógenos de H, para el caso de C9 y C10 ambos se correlacionan con los hidrógenos D y E, C11 se correlaciona con los hidrógenos de B y C, C12 y C14 tienen las mismas correlaciones con los hidrógenos A, D y E, por último, la señal de C13 se correlaciona con A, C e I. En la tabla 10 se muestra el resumen de las relaciones existentes entre los núcleos de C y los núcleos de H observados en el espectro de HMBC.

**Tabla 10:** Resumen de los resultados del experimento de HMBC del compuesto 2

HMBC	
<sup>13</sup> C Nomenclatura	<sup>1</sup> H Nomenclatura
C1	B, I
C2	A, G, H
C3	C, I
C4	D, E, G, H
C5	D, E, G, H
C6	A, F, H
C7	A, F, G, H
C8	H
C9	D, E
C10	D, E
C11	B, C
C12	A, D, E
C13	A, C, I,
C14	A, D, E

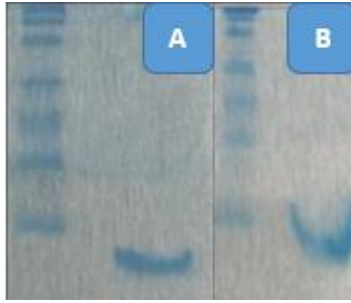
### **Fracciones 13A, 13B, 14A, 14B, 15A, 15B y 15C (Bacteriocina 3.83 kDa y 3.89 kDa)**

Las últimas fracciones en procesar fueron las fracciones 13A, 13B, 14A, 14B, 15A, 15B y 15C. Lo primero que se realizó fue obtener un espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de cada una de las fracciones, sin embargo, en ninguna de las fracciones se pudo obtener un espectro que pudiera dar información acerca de las estructuras que podrían encontrarse en cada una de las fracciones. Estas últimas fracciones tienen como característica que sólo se solubilizaban con solventes polares y en ellas recaía la mayor parte del fraccionamiento general. Por experiencia en el grupo de investigación se sabe que usualmente las últimas fracciones resultantes del fraccionamiento general cuando no se observan señales que ayuden a elucidar la estructura en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  es posible que se traten de estructuras de carácter peptídico y es por ello que estas fracciones fueron procesadas de diferente manera. La técnica que se utilizó para procesar estas fracciones fue la electroforesis en gel SDS-PAGE, que ayuda a detectar los compuestos peptídicos o proteicos, como se observa en la figura 28.



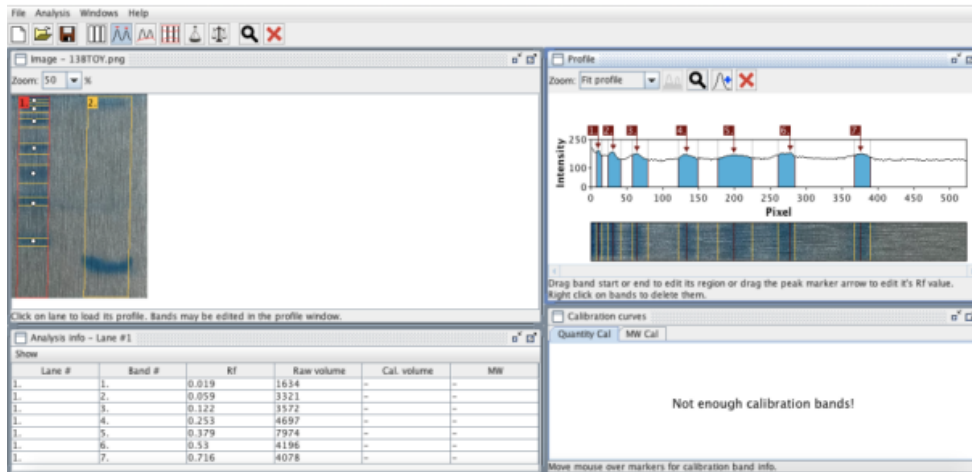
**Fig. 28:** Electroforesis en gel SDS-PAGE.

De la electroforesis se obtuvo como resultado que las fracciones 13A, 13B, 14A y 14B tienen las mismas características en el corrimiento electroforético así que estas fracciones se reunieron y se les asignó el nombre de 13B lo mismo sucedió con las fracciones 15A, 15B y 15C que presentaban las mismas características y se reunieron nombrándolas como 15B. En la figura 29 se puede observar el gel de electroforesis que se obtuvo de la reunión 13B y 15B.



**Fig. 29:** Geles teñidos con azul de Coomassie. Se muestra en a) la fracción 13B y en b) la fracción 15B.

Con los geles obtenidos de la electroforesis se puede obtener el peso molecular de los compuestos tomando en cuenta el marcador de peso molecular y utilizando el programa Gel Analyzer. Este programa ayuda para realizar los cálculos correspondientes y así obtener el peso molecular de cada una de las moléculas. En la figura 30 se puede observar el análisis de los geles con ayuda del programa Gel Analyzer. Como resultado se obtuvo que la reunión 13B tiene un peso de 3.83 kDa y la reunión 15B un peso de 3.89 kDa.



**Fig. 30:** Análisis del gel obtenido en la electroforesis de la fracción 13B, con ayuda del programa Gel Analyzer.

#### 4.5 Pruebas biológicas del estearato de (R)-2,3-dihidroxiopilo y compuesto 2

Como se ha descrito desde hace mucho tiempo, gran parte de los metabolitos secundarios producidos por el género *Bacillus* tienen la propiedad de inhibir el crecimiento de algunos hongos. Por lo que se realizaron ensayos de bioactividad por parte de la estructura de estearato de (R)-2,3-dihidroxiopilo biodirigido contra hongos fitopatógenos. Estos hongos fitopatógenos afectan seriamente el crecimiento de plantas importantes en la industria alimenticia. *Fusarium* es el agente causal de grandes destrozos en plantaciones tan importantes para México como el agave con el que se produce el tequila.

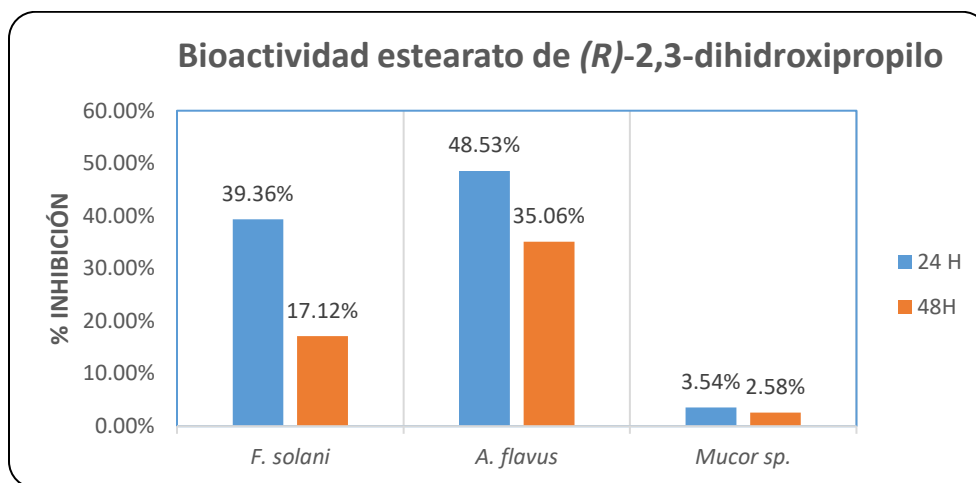
Se realizó el ensayo de antibiograma contra los hongos fitopatógenos: *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus* y *Mucor sp.* La inhibición en estos bioensayos se mide en porcentaje y se realizó la lectura a las 24 h y 48 h. Los resultados de las lecturas realizadas a las 24h y 48h se muestran en la tabla 11.

**Tabla 11:** Resultado de la prueba de bioactividad contra hongos fitopatógenos a las 24 h y 48 h.

Bioactividad estearato de (R)-2,3-dihidroxiopilo		
Hongo test	24 h	48 h
<i>Fusarium solani</i>	39.36 %	17.12 %
<i>Aspergillus flavus</i>	48.53%	35.06 %
<i>Mucor sp.</i>	3.54 %	2.58 %

El compuesto 2 por la poca cantidad obtenida en la purificación solo se realizó el ensayo de bioactividad contra el hongo *Fusarium solani* obteniendo una inhibición del 17.12% a las 24 horas y una inhibición de 13.86% a las 48 horas.

**Gráfico 1:** Porcentaje de inhibición a las 24 h y 48 h de estearato de (*R*)-2,3-dihidroxi-propilo vs hongos fitopatógenos.



Analizando los resultados se puede observar que se obtuvo un buen porcentaje de inhibición para 2 de los 3 hongos fitopatógenos que fueron utilizados en el bioensayo, se destaca que a las 24 h y 48 h el hongo que presentó un mayor porcentaje de inhibición fue el hongo *Aspergillus flavus*.

Para el caso del compuesto 2, se obtuvo inhibición en el crecimiento con el único hongo que se pudo hacer la prueba *Fusarium solani*.

#### 4.6 Pruebas biológicas de los lipopéptidos

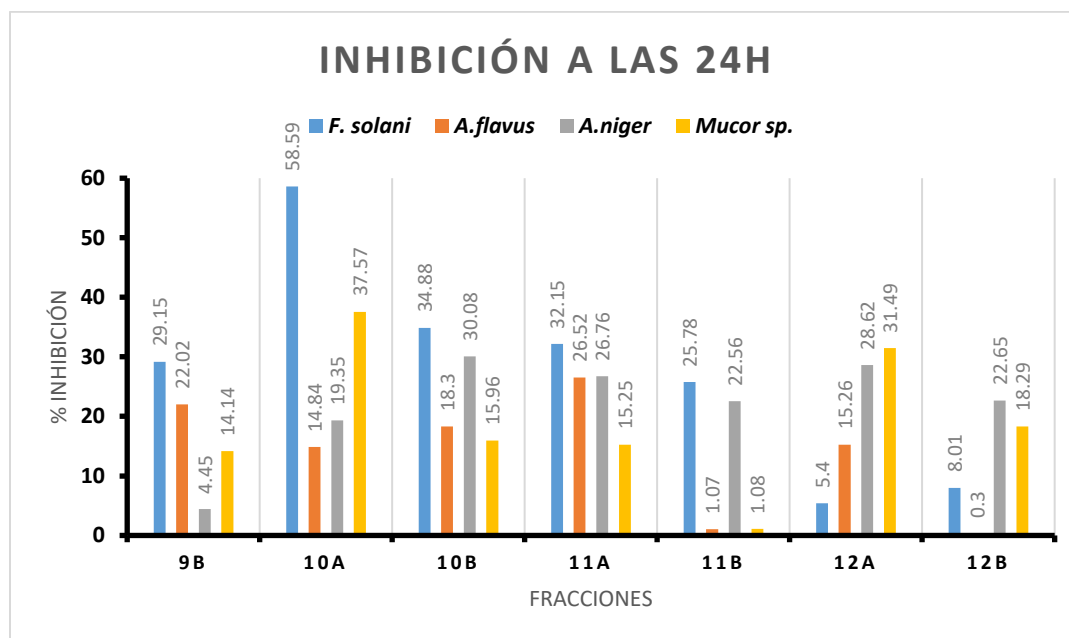
Al igual que para la molécula estearato de (*R*)-2,3-dihidroxi-propilo, se realizaron pruebas biológicas con las fracciones 9B, 10A, 10B, 11A, 11B, 12A, 12B, las cuales se sospechaba que eran lipopéptidos con actividad antifúngica. Se eligieron estas fracciones para realizar las pruebas biológicas contra hongos fitopatógenos ya que por la experiencia que se tiene en el laboratorio, estas fracciones tienen características como lo son la poca solubilidad en solventes poco polares, la formación aparente de cristales, la cantidad resultante del fraccionamiento, todas ellas características de la presencia de lipopéptidos en cada una de las fracciones. Cabe mencionar que los lipopéptidos usualmente inhiben el crecimiento de

hongos, los hongos fitopatógenos que fueron utilizados en este bioensayo fueron *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Mucor sp.* Los resultados a las 24 h se resumen en la tabla 12 y los resultados a las 48 h se resumen en la tabla 13.

**Tabla 12:** Resultado de la prueba de bioactividad de lipopéptidos vs hongos fitopatógenos a las 24 h. Los resultados obtenidos se miden en porcentaje.

FRACCIÓN DE TEST							
Hongo test	9B	10A	10B	11A	11B	12A	12B
<i>F. solani</i>	29.15	58.59	34.88	32.15	25.78	5.4	8.01
<i>A. flavus</i>	22.02	14.84	18.3	26.52	1.07	15.26	0.3
<i>A. niger</i>	4.45	19.35	30.08	26.76	22.56	28.62	22.65
<i>Mucor sp.</i>	14.14	37.57	15.96	15.25	1.08	31.49	18.29

**Gráfico 2:** Porcentaje de inhibición a las 24 h de lipopéptidos vs hongos fitopatógenos.

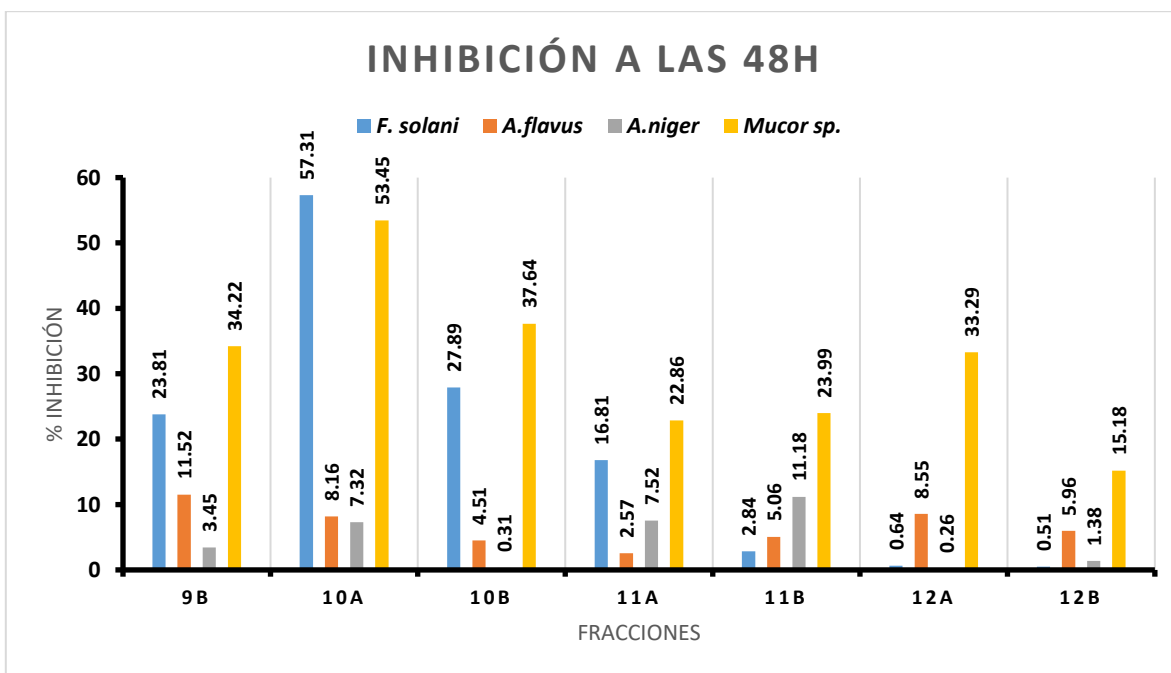


En el gráfico 2 se observa de mejor manera los diferentes porcentajes de inhibición por cada una de las fracciones analizadas a las 24 h. Se puede resaltar que el hongo que se vio más afectado en el crecimiento por la mayor parte de las fracciones es *Fusarium solani* también es de destacar que en este mismo hongo se dio el mayor porcentaje de inhibición principalmente por parte de la fracción 10A.

**Tabla 13:** Resultado de la prueba de bioactividad de lipopéptidos vs hongos fitopatógenos a las 48 h. Los resultados obtenidos se miden en porcentaje.

FRACCIÓN DE TEST							
Hongo test	9B	10A	10B	11A	11B	12A	12B
<i>F. solani</i>	23.81	57.31	27.89	16.81	2.84	0.64	0.51
<i>A.flavus</i>	11.52	8.16	4.51	2.57	5.06	8.55	5.96
<i>A.niger</i>	3.45	7.32	0.31	7.52	11.18	0.26	1.38
<i>Mucor sp</i>	34.22	53.45	37.64	22.86	23.99	33.29	15.18

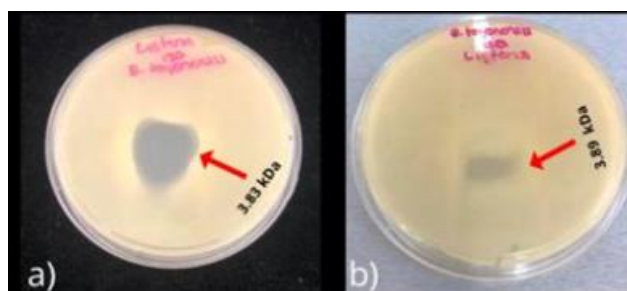
**Gráfico 3:** Porcentaje de inhibición a las 48 h de lipopéptidos vs hongos fitopatógenos.



En el gráfico 3 se puede observar que los hongos que fueron más afectados en su crecimiento son *Fusarium solani* y *Mucor sp.* y para el caso de los hongos *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* el porcentaje de inhibición a las 48 h ya no fue muy significativo.

#### 4.7 Pruebas biológicas de las bacteriocinas

Para corroborar que las bandas procesadas por SDS-PAGE efectivamente corresponden a las bacteriocinas que tienen actividad bactericida, se realizó el experimento de auto radiografía en multicapa. Se probaron las dos fracciones con la idea de corroborar que no fueran la misma bacteriocina. Este experimento consiste en colocar el gel que se obtuvo de la electroforesis SDS-PAGE en una placa que tenga agar, posteriormente se adicionaron 5 mL de agar semisólido inoculado con la bacteria que se va a utilizar para la prueba. Después de ello se procede a incubar por 24 h a 29°C. Para esta prueba se eligieron bacterias de importancia clínica de las cuales dos fueron bacterias gram positivas *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* y dos bacterias gram negativas *Salmonella cholerasuis* y *Vibrio parahemolyticus*. En la figura 31 y la figura 32 se observan resultados positivos de esta prueba.



**Fig. 31:** Experimento de auto radiografía en multicapa utilizando como prueba *Listeria monocytogenes*. a) Reunión 13B 3.83 kDa, b) Reunión 15B 3.89 kDa.



**Fig. 32:** Experimento de auto radiografía en multicapa utilizando como prueba *Bacillus cereus*, se muestra inhibición por parte de la reunión 3.83 kDa.

Los resultados de las medidas de los halos de inhibición en centímetros de las reuniones 13B y 15B se muestran en la Tabla 14.

**Tabla 14:** Medida de los halos de inhibición en cm.

BACTERIA	REUNIÓN 13B	REUNIÓN 15B
<i>Listeria monocytogenes</i>	2.4 cm	1 cm
<i>Bacillus cereus</i>	2.6 cm Bacteriostático	0
<i>Salmonella cholerasuis</i>	0	0
<i>Vibrio parahemolyticus</i>	0	0

Con los resultados obtenidos se puede concluir que las bacterias que presentan un porcentaje mayor de inhibición son las bacterias Gram positivas, esto se debe a que en comparación con las bacterias Gram negativas el grado de complejidad estructural en la pared celular de las bacterias Gram positivas es menor a comparación de las bacterias Gram negativas que es mayor la complejidad.

También se destaca que en un principio al observar las dos bacteriocinas con pesos similares 13B 3.83 kDa y 15B 3.89 kDa se podía inferir que eran las mismas bacteriocinas y que la pequeña diferencia en el peso se debía a la cuestión de medición. Sin embargo, se corrobora que son bacteriocinas diferentes ya que en el proceso de inhibición el resultado fue diferente, como lo fue en el caso de *B. cereus* donde la fracción 15B no inhibió el crecimiento en contraste con la fracción 13B que si lo hizo.

En la tabla 14 de los resultados se destaca también que existe un tipo de inhibición llamada bacteriostática. En esta parte se hace referencia que para el caso de que un elemento sea bactericida inhibe por completo el crecimiento bacteriano en una determinada zona y para el caso de un bacteriostático solo detiene el crecimiento poblacional. Esto se pudo visualizar en el ensayo ya que pasado el tiempo de inoculación para el caso de la acción bactericida se observó la formación de un halo de inhibición translúcido en su totalidad y para el caso de la acción de bacteriostático se puede observar la formación de un halo que no es totalmente translúcido.

Estas bacteriocinas fueron tratadas con diferentes solventes para probar su solubilidad y se evaluó su actividad biológica (Tablas 15 y 16).

**Tabla 15:** Prueba de solubilidad de la bacteriocina 13B

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD	ACTIVIDAD
Acetato de etilo	<b>NO</b>	----
Diclorometano	<b>NO</b>	----
Acetona	<b>NO</b>	----
Metanol	<b>SI</b>	<b>SI</b>
Agua	<b>SI</b>	<b>SI</b>

La bacteriocina 13B estable a una temperatura de 60- 80 °C durante 10 minutos. A 100 °C la actividad se reduce un 25 %. La actividad se pierde por completo a 121 °C por 20 minutos. La susceptibilidad de la bacteriocina a diferentes pH se midió, manteniéndose estable en un rango de pH de 2-10.

**Tabla 16:** Prueba de solubilidad de la bacteriocina 15B

DISOLVENTE	SOLUBILIDAD	ACTIVIDAD
Acetato de etilo	<b>NO</b>	----
Diclorometano	<b>NO</b>	----
Acetona	<b>NO</b>	----
Metanol	<b>SI</b>	<b>SI</b>
Agua	<b>SI</b>	<b>SI</b>

La bacteriocina 15 B estable a una temperatura de 60- 80 °C durante 10 minutos. A 100 °C la actividad se reduce un 15 %. La actividad se pierde por completo a 121 °C por 20 minutos. La susceptibilidad de la bacteriocina a diferentes pH se midió, manteniéndose estable en un rango de pH de 2-10.

# 5.- *Desarrollo experimental*

## 5.1 Cepa ELI73 *Bacillus toyonensis*

Se utilizó la cepa ELI73 que previamente fue caracterizada en el laboratorio de investigación como *Bacillus toyonensis* está fue inicialmente aislada de una muestra de tierra proveniente de Moyotepec, Morelos.

## 5.2 Crecimiento de la cepa

La cepa ELI73 se inoculó en una placa de medio sólido Luria Bertani (LB) y se colocó a incubación por 24 h a 29 °C, después de ello se observó que la placa estuviera libre de algún otro microorganismo contaminante.

## 5.3 Medios de cultivo

### **-Agar Luria Bertani (LB)**

El medio sólido que se utilizó para preparar las placas de aislamiento inicial de *B. toyonensis* fue medio LB, el cual su contenido por cada litro es el siguiente:

Extracto de levadura 5.0 g

Cloruro de sodio 10.0 g

Peptona de caseína 10.0 g

Agar bacteriológico 16.0 g

Los ingredientes se disuelven en un litro de agua destilada y se colocan en 4 matraces Erlenmeyer de 500 mL depositando en cada uno de ellos la cantidad de 250 mL del medio

preparado, posteriormente a cada uno de los matraces se les adiciona 4 g de agar bacteriológico.

Los matraces se procedieron a esterilizar por un método de esterilización húmedo con ayuda de una autoclave bajo las siguientes condiciones: 20 minutos, 15 libras de presión, 120 °C. Pasado el tiempo de esterilización se vaciaron aproximadamente 20-25 mL del medio de cultivo en placas Petri en un ambiente estéril (campana de flujo laminar y mechero Bunsen) y se dejaron durante 10-15 minutos a temperatura ambiente hasta que el medio solidificara.

### **-Caldo LB**

El medio de cultivo que se utilizó fue Luria Bertani (LB) el cual por cada litro de medio contiene:

Extracto de levadura 5.0 g

Cloruro de sodio 10.0 g

Peptona de caseína 10.0 g

Los ingredientes se disuelven en un litro de agua destilada y se colocan en 4 matraces Erlenmeyer de 500 mL depositando en cada uno de ellos la cantidad de 250 mL del medio preparado. Los matraces se procedieron a esterilizar por un método de esterilización húmedo con ayuda de una autoclave bajo las siguientes condiciones: 20 minutos, 15 libras de presión, 120 °C. Pasado el tiempo de esterilización se dejó enfriar a temperatura ambiente.

### **5.4 Tratamiento de la resina Amberlita XAD-16 ® (Sigma Aldrich)**

Para la extracción de los metabolitos secundarios producidos por *B. toyonensis* se utilizó la resina Amberlita XAD-16 ® la cual es un polímero reticulado hidrofóbico no iónico con propiedades de adsorción derivadas de una estructura macroporosa única. Su naturaleza de una estructura entrecruzada, su fase continua y porosa, le confiere la propiedad de adsorber moléculas hidrofóbicas de bajo y mediano peso molecular a partir de solventes polares.

Para el tratamiento de la resina se debe pesar la cantidad a utilizar, por cada 100 mL de medio de cultivo se agrega 0.5 g de Amberlita. La Amberlita antes de adicionarla se le debe dar un tratamiento para eliminar el exceso de las sales de carbonato de calcio y así permitir la formación de su estructura entrecruzada. El tratamiento de la resina inicia con un primer lavado con agua destilada estéril con una agitación constante durante 30 minutos, pasado el tiempo se decantó y se desechó el agua, se realizó un segundo lavado adicionando metanol y colocando en agitación durante 30 minutos, posteriormente se decantó el metanol y se desechó. En este punto la Amberlita ya se encuentra en condiciones para ser adicionada al medio de cultivo.

### 5.5 Extracción de los metabolitos secundarios

Una vez obtenido el crecimiento de *B. toyonensis* en una placa de agar sólido, en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero Bunsen) se procedió a inocular los matraces que contenían el medio de cultivo líquido LB y se agregó la Amberlita que previamente se le realizó el tratamiento adecuado para poder usarla. El cultivo se incubó en una estufa a 29 °C y con una agitación orbital de 200 rpm durante 7 días, esto con el objetivo de que la cepa llegue a su fase estacionaria y excrete los metabolitos secundarios, que serán adsorbidos por la Amberlita.

Después de los siete días se procedió a recuperar la Amberlita, en este paso se puede observar que el color de la Amberlita ha cambiado, al inicio de la adición el color era blanco y después de los siete días se puso de un color café. La recuperación de la Amberlita se realizó mediante la decantación del medio y la Amberlita después se colocó en un vaso de precipitado a la cual se le adicionó metanol y se colocó en una agitación constante durante 20 minutos. Al término de los 20 minutos se recolectó el metanol y se procedió a agregarle más cantidad de metanol a la Amberlita y repetir el proceso de agitación, este proceso se repite hasta que la Amberlita recupere su color original. Todo el metanol que se fue recuperando se puede observar que presenta un color café claro. El siguiente paso fue colocar el metanol recolectado en tubos Falcon para proceder a centrifugar durante 5 minutos a 5000 rpm con el propósito de obtener un sobrenadante casi libre de células bacterianas. Después del proceso de centrifugado, el sobrenadante se fue colocando en un matraz de bola para evaporarlo y así reducir la cantidad

de solvente contenido en el extracto crudo, sin embargo, para poder realizar la cromatografía en gel de sílice es necesario tener el extracto crudo así que se colocó en charolas lo que resultó de la evaporación y se dejó en la estufa bacteriológica durante 24 h a una temperatura de 29 °C para facilitar que se secase el extracto crudo (Figura 33). Pasado ese tiempo se verificó que los residuos estuvieran completamente secos. Se rasparon los residuos del recipiente para obtener el extracto.



**Fig. 33:** Extracto crudo de *B. toyonensis* que se colocó en charolas para facilitar su secado en la estufa bacteriológica.

#### 5.6 Fraccionamiento general del extracto seco mediante cromatografía en columna de gel de sílice

Para el comienzo del procesamiento del extracto crudo, lo primero que se realizó fue un fraccionamiento general esto con la finalidad de procesar todo el extracto crudo, pero por partes. El fraccionamiento general se realizó en una columna de gel de sílice teniendo como fase estacionaria gel de sílice y como fase eluyente disolventes o mezcla de ellos con un incremento gradual de la polaridad, los eluyentes que se utilizaron fueron Hexano, Acetato de etilo, Diclorometano y Metanol. Resultado del fraccionamiento general se obtuvieron 31 fracciones.

## 5.7 Purificación

Para la purificación de cada una de las fracciones lo primero que se realizó fue un seguimiento en cromatografía de placa fina (CPF) con la finalidad de observar cómo se comportaba cada una de las fracciones con los disolventes o mezcla de ellos con un incremento gradual de la polaridad y con ello realizar la elección de los sistemas a utilizar para la purificación.

## 5.8 Identificación de compuestos orgánicos

La identificación para los compuestos orgánicos una vez purificados se realizó mediante el uso de técnicas espectrométricas como lo son la espectrometría de masas y técnicas espectroscópicas como son RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, HMBC y APT.

Para el caso de las fracciones 9B, 10A, 10B, 11A, 11B, 12A y 12B se han identificado como probables lipopéptidos ya que cumple con las características como solubles en solventes polares e inhiben el crecimiento bacteriano.

Las bacteriocinas se han identificado mediante el uso de la electroforesis SDS-PAGE con la cual se obtuvo el peso de cada una de las fracciones y otra característica de las bacteriocinas es que inhiben el crecimiento de hongos, con lo cual corroboramos que efectivamente estas fracciones se trataban de bacteriocinas.

## 5.9 Evaluación del efecto antibacterial de los productos naturales obtenidos a partir de la cepa ELI73 *Bacillus toyonensis*

Para el caso de las bacteriocinas la evaluación del efecto antibacterial que usualmente se realiza como un bioensayo de antibiograma se realizó en forma de auto radiografía en multicapa, ya que el producto a testear que en este caso eran las bacteriocinas se purificaron a través de una electroforesis SDS-PAGE en la cual las bacteriocinas se encontraban retenidas en el gel. Las bacterias que se utilizaron en la evaluación antibacterial fueron: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis* y *Vibrio parahemolyticus*. La metodología para realizar la auto radiografía en multicapa consiste en colocar el gel obtenido de la electroforesis SDS-PAGE en una placa con agar sólido, posteriormente se

adicionó sobre esté 5 mL de agar semisólido que previamente tiene inoculado la bacteria a probar. Después de ello, se procedió a incubar durante 24 h a 29 °C con la finalidad de observar el crecimiento del microorganismo. Después de las 24 h de incubación se observó en la región donde se encuentra la banda de la bacteriocina si existió o no crecimiento de la bacteria, en caso de existir inhibición del crecimiento se procedió a medir.

#### 5.10 Evaluación del efecto antifúngico de los productos naturales obtenidos a partir de la cepa ELI 73 *Bacillus toyonensis*

Para la evaluación del efecto antifúngico se utilizaron los siguientes hongos: *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Mucor sp.* y para el caso en la evaluación con los lipopéptidos se agregó *Aspergillus niger* esto se debe a que la cantidad que se tenía para el caso de las fracciones era mucho mayor que en el caso de las moléculas obtenidas en la purificación. Para cada diana (fitopatógeno) las pruebas se realizaron por cuadruplicado en microplacas de cultivo tanto para la prueba blanco como la de prueba.

Los reactivos que se utilizaron en esta evaluación fueron: medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), etanol y el compuesto a evaluar, la concentración final del compuesto a evaluar es de 1 mg/mL. Todo el procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero Bunsen. En la microplaca cada diana debe de haber un blanco de referencia.

Lo primero que se debe realizar es la preparación de la solución stock la cual consiste en la mezcla del compuesto a evaluar con metanol, la concentración a la cual debe quedar esta solución stock es de 1.4mg/35 µl; en caso de tener más de 1.4 mg de compuesto, lo único que se realiza es el ajuste en la cantidad de MeOH por adicionar. Después de ello en tubos Eppendorf se colocaron 35 µl de la solución stock (SS) y 1365 µl de medio de cultivo PDA. Una vez homogenizado el contenido del tubo Eppendorf, se procedió a adicionar en cada uno de los 4 pocillos, la cantidad de 300 µl y se dejó solidificar; por último, con ayuda de un transfer se tomó parte del micelio periférico del hongo y se colocó sobre los pocillos con el medio ya solidificado. Se incubó en una estufa a 29 °C, 24 h y una vez pasado el tiempo de

incubación se procedió a realizar la lectura y la evaluación de la inhibición con ayuda del programa ImageJ.

### 5.11 Electroforesis SDS-PAGE

Para la electroforesis se requiere en primera instancia de un gel que se encuentra constituido por dos partes:

- Gel concentrador: gel de poliacrilamida, el cual se preparó con una solución tampón de Tris/HCl con un pH de 6.8, dos unidades de pH menor que el tampón de electroforesis (Tris/glicina).
- Gel separador: es un gel de poliacrilamida que se preparó utilizando un tampón Tris/HCl con un pH de 8,8. En el gel de resolución es donde las macromoléculas se separan de acuerdo con su tamaño.

Para el gel se utilizaron los siguientes reactivos:

- Persulfato amónico (PSA) ( $N_2H_8S_2O_8$ ).
- Glicina, o ácido aminoacético ( $C_2H_5NO_2$ ).
- Tris, nombre abreviado del tris (hidroximetil) aminometano ( $C_4H_{11}NO_3$ ).
- Bisacrilamida, o *N,N'*-metilenbisacrilamida ( $C_7H_{10}N_2O_2$ ).
- TEMED, acrónimo de *N,N,N',N'*-tetrametiletilenodiamina ( $C_6H_{16}N_2$ ).
- Dodecilsulfato sódico (SDS) ( $C_{12}H_{25}NaO_4S$ ).

Las cantidades utilizadas de cada uno de los reactivos se muestra en la tabla 17.

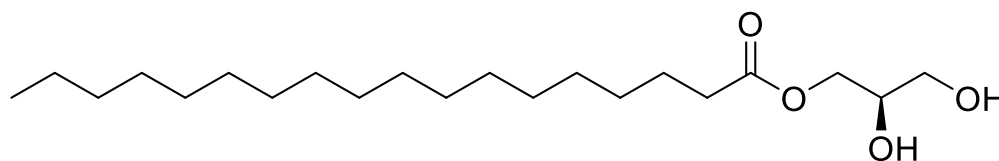
**Tabla 17:** Reactivos y cantidades utilizadas para la elaboración de los geles para la electroforesis SDS-PAGE

	Gel concentrador 4%	Gel separador 12%
<b>30% bis acrilamida</b>	1.98 mL	6 mL
<b>0.5 M Tris-HCl, pH 6.8</b>	3.78 mL	---
<b>1.5 M Tris-HCl, pH 8.8</b>	---	3.75 mL
<b>10% SDS</b>	150 µl	150 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	9 mL	5 mL
<b>TEMED</b>	15 µl	7.5 µl
<b>10% PSA</b>	75 µl	75 µl
<b>Volumen total</b>	15 mL	15 mL

Con el gel preparado se colocaron 7-12 µl de la muestra previamente disuelta en el gel de carga. Después de ello se colocó dentro del recipiente, lo que permitirá el paso continuo de la corriente eléctrica. El equipo espectrofotométrico se encendió a 80 V y cuando la muestra paso al gel concentrador se cambió el voltaje a 120 V. Terminado el tiempo de corrimiento del gel, este se tiñó con azul de Coomassie.

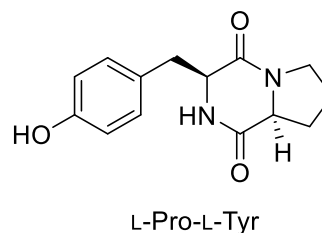
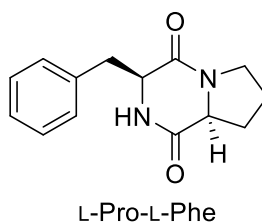
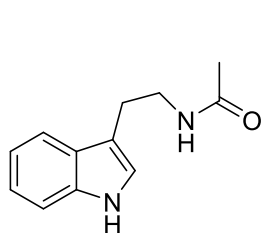
## 6- Conclusiones

- En la búsqueda de productos naturales a partir de la bacteria *Bacillus toyonensis* se obtuvo un extracto crudo a partir del crecimiento en medio LB y con la ayuda de la resina Amberlita XAD-16, el rendimiento del extracto crudo es de 808.87 mg/mL el cual posee actividad antimicrobiana.
- Se logró identificar y caracterizar el siguiente compuesto nuevo:



### Estearato de (R)-2,3-dihidroxiopilo

- Se obtuvo un compuesto 2 que aún no se ha caracterizado en su totalidad, pero ya se tienen algunos experimentos de técnicas espectroscópicas que ayudarán a elucidar la estructura.
- Se obtuvieron tres moléculas que previamente han sido caracterizadas dentro del grupo de investigación en trabajos anteriores y son: *N*-acetiltriptamina, DCP Ciclo L-Pro-L-Phe y DCP Ciclo L-Pro-L-Tyr.



- Se realizaron pruebas biológicas de inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos con estearato de (R)-2,3-dihidroxiopilo, y se observó un buen porcentaje de inhibición a las 24 y 48 h en los hongos *Fusarium solani* y *Aspergillus flavus*.

- Se realizó solo una prueba biológica por parte del compuesto 2 para evaluar la inhibición del crecimiento del hongo fitopatógeno *Fusarium solani*, y se observó un buen porcentaje de inhibición a las 24 y 48 h.
- Se realizaron pruebas biológicas de inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos con fracciones que por sus características y por la experiencia en el grupo de investigación se sospechaba de fracciones con carácter peptídico, los hongos que se utilizaron fueron: *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Mucor sp.* Se observó que las fracciones 9B, 10A, 10B, 11A, 11B, 12A y 12B efectivamente inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos, resaltando que los hongos que mayor porcentaje de inhibición en su crecimiento fueron *Fusarium solani* y *Mucor sp.*
- Se lograron identificar dos bacteriocinas una con un peso de 3.83 kDa y la otra con 3.89 kDa, mediante electroforesis en gel SDS-PAGE, las cuales se probó su actividad de inhibición del crecimiento contra bacterias del tipo Gram positivas y Gram negativas, teniendo como resultado la inhibición de las bacterias Gram positivas *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*.
- Se realizaron pruebas de solubilidad, temperatura y pH para conocer la estabilidad de la bacteriocina, la bacteriocina de 3.83 kDa con nomenclatura 13B es soluble en solventes polares como el MeOH y el agua, es estable a una temperatura de 60-80 °C y a un pH de 2-10; la bacteriocina de 3.89 kDa con nomenclatura 15B es soluble en solventes polares como el MeOH y el agua, es estable a una temperatura de 60-80 °C y a un pH de 2-10.

## 7- Bibliografía

1. Wilches Flórez, Á. M., (2010). La biotecnología en un mundo globalizado. *Revista Colombiana de Bioética*, 5(2),164-169. ISSN: 1900-6896
2. Pomilio, A. B., (2012). Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: Vinculación con la Bioquímica. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 46(1),73-82. ISSN: 0325-2957.
3. Demain, A.L.; Fang, A. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2000, 69:1–39
4. Gutiérrez-Ravelo, A.; Estevez-Braun, A. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*, 2009, 103, 409-419.
5. Salazar, B., Ortiz, A., Keswani, C., Minkina, T., Mandzhieva, S., Pratap Singh, S., Rekadwad, B., Borriss, R., Jain, A., Singh, H. B., & Sansinenea, E. (2022). *Bacillus* spp. As bio-factories for antifungal secondary metabolites: Innovation beyond whole organism formulations. *Microbial Ecology*.
6. Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología: la revista oficial de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*, 36(1).
7. Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*, 33(8), 1523–1538.
8. Demain, A. (2006). From natural products discovery to commercialization: a success story. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, (33), pp 486- 495.
9. Jimenez G., Urdiain M., Cifuentes A., Lopez-Lopez A., Blanch A. R., Tamames J., et al. (2013). Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. *Syst. Appl. Microbiol.* 36 (6), 383–391

10. Landinez Velandia S. M. (2020). Caracterización de bacteriocinas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 y *Pseudomonas extremaustralis* CMPUJ U515 en la perspectiva de control hacia patógenos humanos. Facultad de Ciencias Universidad Antonio Narro.
11. López M., J. E., Ochoa Z., A., Santoyo P., G., Anaya L., J. L., Medina M., E., Martínez T., M., & Loeza L., P. D. (2008). Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 39(3),49-57. ISSN: 1870-0195.
12. Vaca J, Ortiz A, Sansinenea E. (2022). *Bacillus* sp. Bacteriocins: Natural Weapons against Bacterial Enemies. *Current Medicinal Chemistry*, 29 (12), 2093-2108.
13. Beristain S. C., Palou E., López A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental, Universidad de las Américas Puebla. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 64 – 78.
14. Mondragón Preciado, G., EscalanteMinakata, P., Osuna Castro, J. A., Ibarra Junquera, V., Morlett Chávez, J. A., Aguilar González, C. N., & Rodríguez Herrera, R. (2013). Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos. *Investigación y Ciencia*, 21(59),64-70. ISSN: 1665-4412.
15. Salazar, F., Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2017). Characterisation of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial activity. *Journal of global antimicrobial resistance*, 11, 177–182.
16. Singh, T. P., & Singh, O. M. (2017). Recent progress in biological activities of indole and indole alkaloids. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 18(1).
17. Yu, L.L. (2009). Neobacillamide A, a Novel Thiazole-Containing Alkaloid from the Marine Bacterium *Bacillus vallismortis* C89, Associated with South China Sea Sponge *Dysidea avara*. *Helvetica Chimica Acta*, (92), pp 607-612.
18. Valdemar, B.C. (2004). Synthesis of the algicide bacillamide. *ARKIVOC*, (14), pp 14-19.
19. Qi, S. H., Zhang, S., Huang, J. S., Xiao, Z. H., Wu, J., & Long, L. J. (2004). Glycerol derivatives and sterols from *Sargassum parvivesiculosum*. *Chemical & pharmaceutical bulletin*, 52(8), 986–988.

20. Chen, C.-Y., Han, W.-B., Chen, H.-J., Wu, Y. and Gao, P. (2013), Optically Active Monoacylglycerols: Synthesis and Assessment of Purity. *Eur. J. Org. Chem.*, 2013: 4311-4318.