



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Química Orgánica

**(*R*)-2-etil-1-hexanol a partir de la
hidrólisis del Ftalato de
bis-*R*-(2-etilhexilo) (DEHP) aislado de
*Bacillus megaterium***

Tesis Presentada para Obtener el Grado de:
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta:

Samaria Alejandra Pérez Pérez

Directora de Tesis

Dra. Estibaliz Sansinenea Royano

Co-Asesor de Tesis

Dr. J. Aurelio Ortiz Márquez



H. Puebla de Z, Agosto 2023

Índice

1. Introducción	01
2. Antecedentes	03
2.1 Metabolitos primarios y secundarios: Productos naturales a partir de organismos vivos	03
2.2 <i>Bacillus megaterium</i> productor de metabolitos secundarios	05
2.3 Ftalato de bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo) como metabolito bioactivo	07
2.4 2-etilhexanol un compuesto quiral a partir de Ftalato de bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo)	12
3. Objetivos	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos particulares	16
4. Desarrollo experimental	17
4.1 Cepa ELI24 <i>Bacillus megaterium</i>	17
4.2 Crecimiento de la cepa ELI24 <i>Bacillus megaterium</i>	17
4.3 Medios de cultivo	17
4.3.1 Medio Luria Bertani (sólido)	17
4.3.2 Medio Luria Bertani modificado (líquido)	18
4.4 Extracción de los metabolitos secundarios	19
4.5 Fraccionamiento general del extracto crudo	19
4.6 Purificación de la fracción 2	19
4.7 Hidrólisis del compuesto de tipo ftalato	20
4.8 Caracterización de los compuestos orgánicos	20
4.8.1 Ftalato de bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo) (DEHP)	20
4.8.2 (<i>R</i>)-2-etil-1-hexanol	21
4.9 Pruebas biológicas	21
4.9.1 Evaluación del efecto antibacterial de los productos naturales aislados de la cepa ELI24 <i>Bacillus megaterium</i>	21
4.9.2 Evaluación del efecto antifúngico de los productos naturales aislados de la cepa ELI24 <i>Bacillus megaterium</i>	23

5. Discusión de resultados	24
5.1 Extracción	25
5.2 Fraccionamiento general	26
5.3 Purificación	29
5.4 Caracterización	30
5.4.1 Fracción 2 (Compuesto 1)	30
5.5 Hidrólisis del ftalato de bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo)	39
5.5.1 Fracción 2 (Compuesto 2)	40
5.6 Pruebas biológicas	47
5.6.1 Antibiograma en bacterias	47
5.6.2 Bioensayo en hongos fitopatógenos	51
6. Conclusiones	52
7. Bibliografía	54
8. Anexos	59

Índice de esquemas

Esquema 1. Síntesis de los ftalatos.	08
Esquema 2. Síntesis del ftalato de bis-(2-etilhexilo) (DEHP).	09
Esquema 3. Síntesis del 2-etilhexanol.	13
Esquema 4. Hidrólisis del ftalato de bis-(2-etilhexilo) (DEHP).	15
Esquema 5. Estructura del ftalato de bis-(2-etilhexilo) (DEHP).	38
Esquema 6. Hidrólisis del ftalato de bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo) (DEHP).	39
Esquema 7. Estructura del 2-etilhexanol.	46

Índice de figuras

Figura 1. Curva de crecimiento microbiano.	04
Figura 2. <i>Bacillus megaterium</i> . Morfología colonial y morfología celular.	06
Figura 3. Estructuras de diferentes ftalatos clasificados de acuerdo a la longitud de su cadena de carbonos.	08
Figura 4. Estereoisómeros del ftalato de bis-(2-etilhexilo).	10
Figura 5. <i>Bacillus megaterium</i> ELI24 en medio Luria Bertani (LB).	25
Figura 6. A) Cultivo en placa en medio LB de la cepa ELI24; B) Cultivo en medio líquido LB modificado de la cepa ELI24; C) Medio de cultivo sin células; D) Extracción con acetato de etilo.	25
Figura 7. Extracto crudo obtenido de la cepa ELI24.	26
Figura 8. Cromatografía en columna de gel de sílice del extracto crudo obtenido de la cepa ELI24.	26
Figura 9. Fracciones recolectadas de la cromatografía en columna de gel de sílice del extracto crudo obtenido de la cepa ELI24.	27
Figura 10. Seguimiento cromatográfico en placa fina de las fracciones obtenidas del extracto crudo de la cepa ELI24.	28
Figura 11. Seguimiento cromatográfico en placa fina de la fracción 2 obtenida del extracto crudo de la cepa ELI24.	29
Figura 12. A) Cromatografía en columna de gel de sílice de la fracción 2. B) Seguimiento cromatográfico en placa fina de la purificación de la fracción 2. C) Fracción 2 purificada.	30
Figura 13. Espectro de RMN 1D de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del compuesto 1 de <i>B. megaterium</i> .	31
Figura 14. Espectro de RMN 1D de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del compuesto 1 de <i>B. megaterium</i> .	32
Figura 15. Espectro de RMN 2D COSY en CDCl_3 del compuesto 1 de <i>B. megaterium</i> .	33
Figura 16. Espectro de RMN 2D HSQC en CDCl_3 del compuesto 1 de <i>B. megaterium</i> .	35
Figura 17. Espectro de RMN APT en CDCl_3 del compuesto 1 de <i>B. megaterium</i> .	37
Figura 18. Espectro de RMN 1D de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del compuesto 2.	40

Figura 19. Espectro de RMN 1D de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del compuesto 2.	41
Figura 20. Espectro de RMN 2D COSY en CDCl_3 del compuesto 2.	42
Figura 21. Espectro de RMN 2D HSQC en CDCl_3 del compuesto 2.	43
Figura 22. Espectro de RMN APT en CDCl_3 del compuesto 2.	45
Figura 23. Antibiograma en bacterias Gram-positivas.	49
Figura 24. Antibiograma en bacterias Gram-negativas.	50

Índice de tablas

Tabla 1. Sistemas de eluyentes utilizados en el fraccionamiento general del extracto crudo de la cepa ELI24.	27
Tabla 2. Peso (mg) de cada una de las fracciones obtenidas en el fraccionamiento general del extracto crudo de la cepa ELI24.	28
Tabla 3. Sistemas de eluyentes utilizados en la purificación de la fracción 2 obtenida del extracto crudo de la cepa ELI24.	30
Tabla 4. Correlación entre las señales del espectro de RMN de ^1H y de ^{13}C del compuesto 1 de <i>B. megaterium</i> .	36
Tabla 5. Caracterización completa del compuesto 1 identificado como ftalato de bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo) (DEHP).	39
Tabla 6. Correlación entre las señales del espectro de RMN de ^1H y de ^{13}C del compuesto 2.	44
Tabla 7. Caracterización completa del compuesto 2 identificado como (<i>R</i>)-2-etil-1-hexanol.	47
Tabla 8. Resultados del antibiograma en bacterias Gram-positivas.	48
Tabla 9. Resultados del antibiograma en bacterias Gram-negativas.	49
Tabla 10. Resultados del bioensayo en hongos fitopatógenos.	51
Tabla 11. Comparación rendimientos del extracto crudo de la cepa ELI24.	59
Tabla 12. Comparación entre los rendimientos obtenidos del DEHP.	60

1. Introducción

Los productos naturales son compuestos que son generados en organismos vivos producto de su metabolismo secundario los cuales son principalmente producidos como respuesta ante una diversa serie de condiciones externas a las que se pudiera estar afrentando el organismo vivo para su supervivencia en un determinado ambiente o ecosistema y que tienen una gran diversidad de estructuras.

La química de los productos naturales se refiere al estudio de los metabolitos secundarios o compuestos químicos provenientes de fuentes naturales.

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus spp.* son consideradas una excelente fuente de metabolitos secundarios, ya que producen una amplia gama de moléculas biológicamente activas, incluidos antibióticos, antifúngicos y sideróforos, generando así, nuevas y novedosas aplicaciones biotecnológicas de las diferentes cepas de *Bacillus spp.*

En los últimos años se ha señalado a *Bacillus megaterium* como productor de diversos metabolitos secundarios. Es catalogado como un microorganismo de gran importancia industrial debido a su actividad metabólica, ya que es una buena fuente de proteínas y produce una gran variedad de enzimas. En el campo de la investigación se han hallado numerosas proteínas aisladas de esta bacteria que se utilizan comúnmente con fines médicos y agrícolas.

Los ftalatos son compuestos químicos conformados por ácido ftálico y diferentes alcoholes. El ftalato de bis-(2-etilhexilo) (DEHP) es un éster del ácido ftálico perteneciente a la familia de los ftalatos. Se produce mediante una reacción de esterificación del 2-etilhexanol con anhídrido ftálico. También conocido como DOP (Ftalato de dioctilo), se usa principalmente como plastificador del PVC (Policloruro de vinilo), para suavizar y dotar de más flexibilidad.

En los últimos años se ha comprobado que este compuesto puede ser sintetizado por muchos organismos, lo cual han generado un importante debate acerca del

origen de este compuesto, cuestionando y poniendo en duda si es un contaminante o un metabolito bioactivo el cual podría ser de utilidad para el ser humano.

El 2-etilhexanol es un alcohol plastificante, empleado especialmente en la producción de ftalatos, principalmente en ftalato de bis-(2-etilhexilo). Industrialmente se produce a través de tres reacciones consecutivas: la hidroformilación de propileno a n-butiraldehído, la autocondensación de n-butiraldehído a 2-etil-2-hexenal y la hidrogenación de 2-etil-2-hexenal a 2-etilhexanol.

La síntesis orgánica de 2-etilhexanol comprende un conjunto de reacciones complejas las cuales se ven implicadas en diversas dificultades, tales como la baja selectividad y difícil separación del producto.

Una mejor opción sería obtener 2-etilhexanol a partir de otro compuesto, como el ftalato de bis-(2-etilhexilo), el cual se convierte en una excelente opción debido a que se ha comprobado que éste es sintetizado por diversos organismos vivos, ofreciendo una gran ventaja frente a la producción industrial de ambos compuestos.

A través de una hidrólisis del ftalato de bis-(2-etilhexilo) se pretende romper el enlace C-O del grupo éster para dar lugar al anhídrido ftálico y el alcohol 2-etilhexanol.

2. Antecedentes

2.1 Metabolitos primarios y secundarios: Productos naturales a partir de organismos vivos

Una particularidad fundamental de los organismos vivos es que realizan dos tipos de metabolismo: primario y secundario. Ambos metabolismos son procesos biológicos los cuales se efectúan en diversos organismos vivos tales como las plantas y microorganismos como bacterias, protozoos, algas y hongos.¹

El metabolismo primario se efectúa en las células de todos los seres vivos produciendo moléculas denominadas metabolitos primarios que se producen para la supervivencia de la célula. Los carbohidratos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, ácidos grasos y ácidos orgánicos son ejemplos de dichas moléculas las cuales se ven directamente involucradas en el crecimiento, desarrollo, reproducción, fotosíntesis (en el caso de las plantas) y respiración, así como la síntesis de proteínas y hormonas.²

El metabolismo secundario les permite a los organismos producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa, que aunque, no son imprescindibles para la vida como los primarios, desarrollan un papel muy importante de adaptación y defensa.

Específicamente para los microorganismos el metabolismo primario se lleva a cabo durante la fase exponencial de crecimiento, el cual es imprescindible para su supervivencia. El metabolismo secundario es un proceso posterior realizado durante la fase estacionaria en el que las moléculas sintetizadas no son prescindibles, por lo que no son necesarias en la biosíntesis celular. (Figura 1)

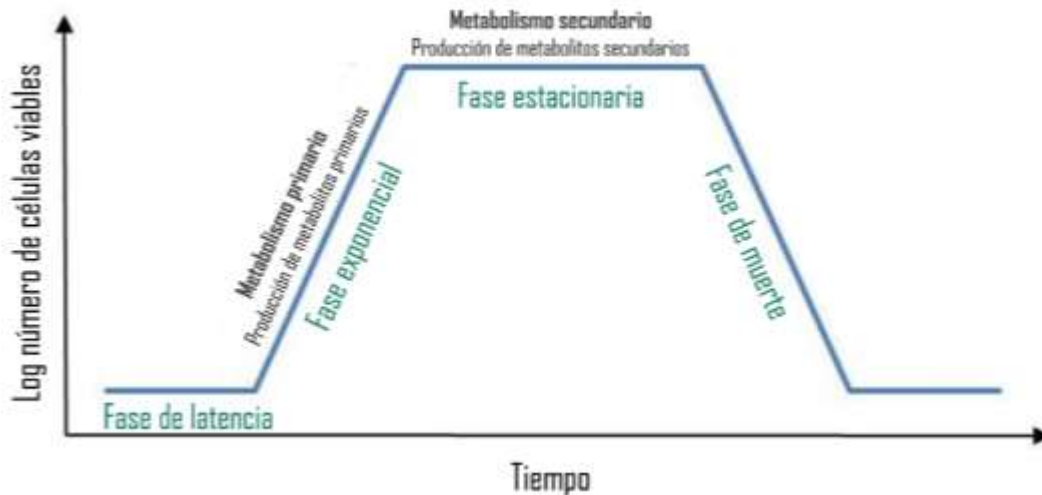


Figura 1. Curva de crecimiento microbiano. Producción de metabolitos primarios durante la fase exponencial y metabolitos secundarios en la fase estacionaria.

Los compuestos químicos resultantes se denominan metabolitos secundarios los cuales dan características particulares a cada especie.³ Como ejemplo de estos compuestos químicos se encuentran los flavonoides, carotenoides, esteroides, ácidos fenólicos, alcaloides y glucosinolatos, estos actúan como moléculas señaladoras en condiciones de estrés.² Estas moléculas no están presentes en cualquier organismo, algunos sólo se encuentran en una especie, en un género o en una familia.³

La amplia variabilidad estructural de estos compuestos ha atraído la curiosidad de diversas industrias, entre las que destacan la farmacéutica y agrícola. Debido a las actividades biológicas que poseen han inspirado a buscar estructuras en cultivos microbianos y extractos de plantas.^{4, 5}

Los metabolitos secundarios en el campo de la microbiología industrial pueden ser utilizados para obtener aminoácidos, desarrollar vacunas y antibióticos, y aislar los químicos necesarios para la síntesis orgánica.⁶

La funcionalidad de los metabolitos secundarios se puede ver reflejada como armas competitivas utilizadas contra otras bacterias, hongos, amebas, plantas, insectos y animales grandes; como transportadores de metales; como agentes de simbiosis entre microbios y plantas, nematodos, insectos y animales superiores; como hormonas sexuales; y como efectores de diferenciación.⁷

Las características bioquímicas y fisiológicas de algunos organismos vivos están fuertemente correlacionadas con la funcionalidad de los metabolitos secundarios.⁸ Ante la adaptación por el estrés ambiental que suelen sufrir algunos de los organismos vivos (como suelen ser las plantas), los metabolitos secundarios por lo general actúan como herramientas fundamentales previéndolos de fuertes habilidades contra agentes patógenos (actividades antifúngicas y/o bactericidas).⁹

2.2 *Bacillus megaterium* productor de metabolitos secundarios

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus spp.* representan una rica fuente de metabolitos secundarios, con estructuras químicas únicas que exhiben diferentes tipos de actividades biológicas, lo que les otorga algunas ventajas para su supervivencia en el medio ambiente. Estos compuestos tienen un gran potencial de aplicaciones en los diversos campos de las industrias, tal y como lo son la industria alimentaria, agrícola y farmacéutica.⁷

El género *Bacillus spp.*, debido a su capacidad metabólica, forma endosporas de fácil distribución en el medio ambiente otorgándole ventajas de supervivencia a la bacteria y que son altamente resistentes a condiciones ambientales desfavorables. Esto hace que sean buenas candidatas como agentes de control biológico.

Dentro de este género se encuentra la bacteria *Bacillus megaterium* que durante mucho tiempo se ha catalogado como un organismo de gran importancia industrial. Esto es debido a que es capaz de solubilizar fósforo y haciendo que, este nutriente del suelo esté disponible para las plantas. Por ello ha generado el interés de los agricultores en su utilización como inóculo del suelo, para mejorar el crecimiento y el rendimiento de las plantas.

Recientemente, un estudio reportó que una cepa de *B. megaterium* cultivada en medio Czapek, produjo cristales blancos los cuales fueron caracterizados como ácido succínico. El análisis fue desarrollado empleando técnicas espectroscópicas

y análisis de rayos X, mostrando una estructura del compuesto correspondiente al ácido succínico.¹⁰

B. megaterium es una bacteria formadora de esporas principalmente aeróbica, Gram-positiva, con una morfología celular de bacilos similares a un bastón de gran longitud, 1.2 a 1.5 μm de diámetro por 2 a 5 μm de longitud. Normalmente estos bacilos se observan en pares y cadenas, ya que las células se encuentran unidas por polisacáridos en las paredes celulares. Crece a temperaturas de 3 $^{\circ}\text{C}$ a 45 $^{\circ}\text{C}$, sin embargo, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra alrededor de 30 $^{\circ}\text{C}$. La morfología colonial que presenta *B. megaterium* en diversos medios de cultivo (como Luria Bertani o Agar Sangre) son: colonias brillantes, redondas a irregulares con márgenes enteros u ondulados. (Figura 2)

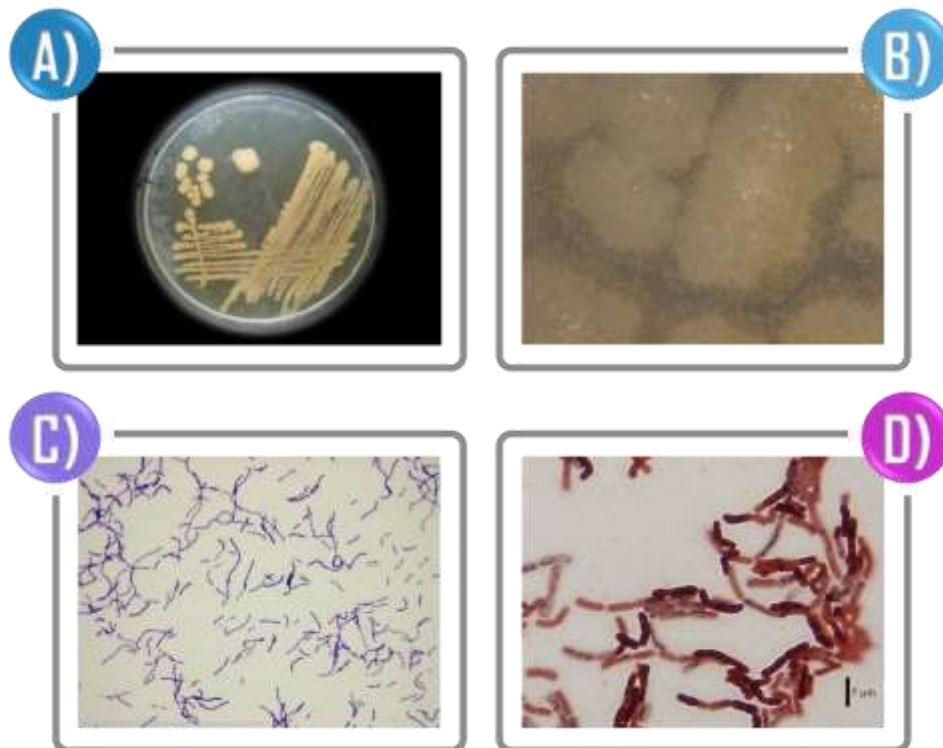


Figura 2. *Bacillus megaterium*. Morfología colonial: A) Aislada en medio Luria Bertani, B) Colonias brillantes, circulares a irregulares con bordes ondulados; Morfología celular: C) Bacilos en pares o cadena, D) Bacilos en forma de bastón, 1.5 μm de diámetro por 5 μm de longitud.

B. megaterium usualmente ha sido aislada del suelo, sin embargo, en su hábitat natural esta especie puede derivar del suelo, o de ambientes contaminados directa o indirectamente por suelo, agua de mar y sus sedimentos, cáscaras de arroz, alimentos secos y leche.¹¹

B. megaterium es una de las especies del género *Bacillus* de mayor tamaño, su nombre deriva de *Megaterium*, en griego "gran bestia". Fue descrita por primera vez por DeBary (1884).¹² Debido a su inmenso tamaño, ha sido de interés para estudiar la estructura, localización de proteínas y membranas de bacterias desde 1950.¹³

Diversas investigaciones han informado la presencia de metabolitos secundarios producidos por *B. megaterium*, como por ejemplo la megacina, una bacteriocina con propiedades bactericidas.^{14, 15}

Un estudio realizado por Khalil en 2009 demostró que para mejorar la actividad de una bacteriocina obtenida de una cepa aislada de *B. megaterium* influyen de manera significativa condiciones como la concentración y combinación-interacción de nutrientes, la aireación y otros factores físicos, incluidos el calor, los rayos UV, el pH y las condiciones de almacenamiento. Dicha bacteriocina presento una amplia gama de actividad inhibidora contra los microorganismos deterioradores de alimentos, incluidos *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*.¹⁶

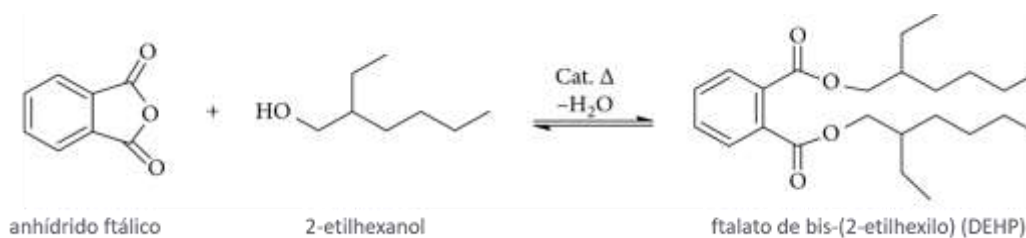
2.3 Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) como metabolito bioactivo

Se ha reportado que varias especies del género *Bacillus* presentan un gran potencial como productores de polihidroxicanoatos (PHAs).¹⁷

Los ftalatos **3** son compuestos químicos conformados por la unión de ácido ftálico **1** (ácido 1,2-bencenodicarboxílico) a diferentes alcoholes **2**. (Esquema 1)

El ftalato de bis-(2-etilhexilo) o DEHP, por sus siglas en inglés, es un éster del ácido ftálico perteneciente a la familia de los ftalatos. La estructura química del DEHP consta de un anillo de ácido 1,2-benzenodicarboxílico unido a un par de cadenas de ésteres de ocho carbonos. Posee una fórmula molecular de $C_{24}O_4H_{38}$ con un peso molecular igual a 390.56 g/mol. Físicamente es un líquido incoloro, viscoso y casi no tiene olor. Industrialmente se utiliza como agente plastificante en productos poliméricos proporcionando flexibilidad al plástico.¹⁹ Se caracteriza por ser poco soluble en agua, pero muy soluble en sangre y en lipoproteínas.²⁰

El DEHP se produce mediante una reacción de esterificación del 2-etilhexanol con anhídrido ftálico (Esquema 2). El compuesto obtenido es una sustancia isomérica debido a la presencia de protones diastereotópicos adyacentes al centro estereogénico.



Esquema 2. Síntesis del ftalato de bis-(2-etilhexilo) (DEHP).

La esterificación se lleva a cabo mediante dos fases. La primera fase es sumamente rápida, y se realiza en ausencia de catalizador. Mientras que en la segunda fase, la esterificación del segundo grupo carboxílico es muy lenta y debe ser facilitada por un catalizador ácido. El agua resultante debe removerse de la mezcla de reacción para finalmente obtener ftalato de bis-(2-etilhexilo).²¹

La síntesis parece sencilla, sin embargo, la complicación está en la segunda etapa ya que se han realizado algunas investigaciones para determinar qué catalizador es el más conveniente y apropiado, para así poder garantizar mejores rendimientos. Entre los catalizadores homogéneos más utilizados se encuentran el ácido sulfúrico, el ácido metanosulfónico, el ácido *p*-toluenosulfónico y el hidrogenosulfato de sodio. El ácido sulfúrico como ácido fuerte es uno de los más utilizados, tanto a nivel laboratorio como dentro de la industria. Por otro lado, la

producción de algunos subproductos ha llevado a sustituirlo por ácido *p*-toluenosulfónico, que aunque es un catalizador menos activo, es menos agresivo.^{22, 23}

Una comparación entre el catalizador homogéneo, ácido *p*-toluenosulfónico y catalizadores heterogéneos como zeolitas y zirconia sulfatada, demostró que los catalizadores heterogéneos presentan una alta eficiencia en las reacciones de esterificación.²¹

Un análisis, basado en la actividad óptica, acerca de los posibles estereoisómeros que puede tener el DEHP destaca la prevalencia de los siguientes tres estereoisómeros: ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo), ftalato de bis-*S*-(2-etilhexilo) y ftalato de bis-*rac*-(2-etilhexilo) como un estereoisómero racémico.²⁴ (Figura 4)

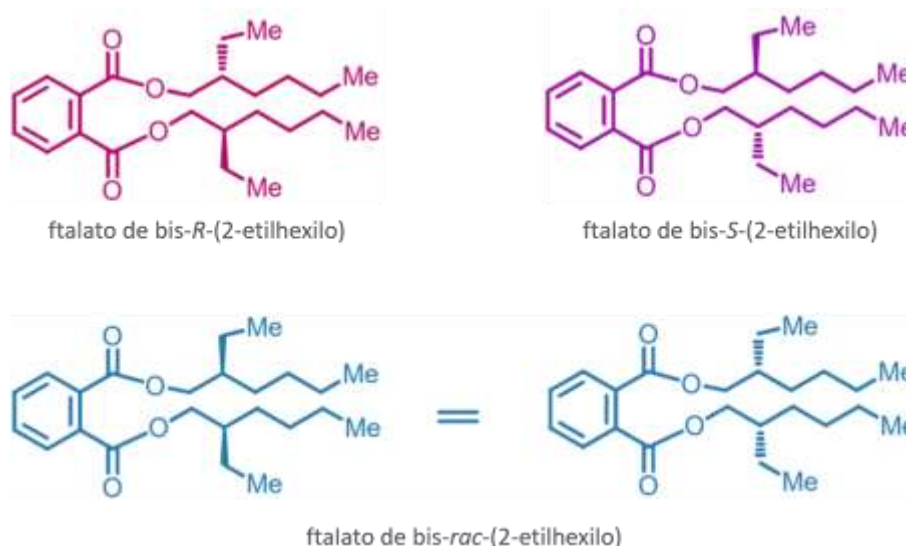


Figura 4. Estereoisómeros del ftalato de bis-(2-etilhexilo).

Esta sustancia, conocida tanto por las siglas internacionales DEHP o también denominado DOP (Ftalato de dioctilo), se usa ampliamente como plastificador del PMMA (Polimetilmetacrilato) y el PVC (Policloruro de vinilo), para suavizar y dotar de más flexibilidad.²⁵

Entre los usos y aplicaciones más frecuentes que tiene el DEHP como plastificante se destaca la fabricación de juguetes, el revestimiento para suelo y otros materiales de construcción, mobiliario y decoración, interiores de los

coches, cables y dispositivos médicos, como bolsas de sangre, tubos intravenosos, catéteres, sondas y bolsas de diálisis. También se destacan algunas otras aplicaciones inferiores como en tintas, adhesivos, pinturas, selladores y revestimiento de superficies.²⁶

Considerando el origen y amplio uso industrial del DEHP, su presencia cada día se ha hecho más evidente en diversos ambientes, principalmente terrestres y acuáticos, lo cual lo ha llevado a ser considerado como un agente contaminante de riesgo y tóxico para la salud humana.

En los últimos años se ha comprobado que este compuesto ha sido aislado de diversos organismos como plantas y microorganismos como bacterias y hongos, comprobando así que el DEHP puede ser sintetizado por muchos organismos. Dichas investigaciones han generado un importante debate acerca del origen de este compuesto, cuestionando y poniendo en duda si realmente es un contaminante o un metabolito bioactivo el cual podría ser de utilidad para el ser humano.²³ Además, este compuesto ha demostrado tener actividad antimicrobiana y en algunos casos también actividad antifúngica.

Se ha reportado que el género *Bacillus*, puede secretar este compuesto. Recientemente se reportó, el aislamiento de ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo), enantioméricamente puro, a partir de cepas de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis*, además de comprobar su actividad biológica contra bacterias y hongos.²⁷ Un análisis llevado a cabo en *Streptomyces mirabilis*, la señala como una bacteria de la cual se ha aislado el DEHP, y que además ha demostrado tener actividades antimicrobianas principalmente contra bacterias Gram-positivas y actividad antifúngica contra levaduras.²⁸

Dentro de los organismos que han sido considerados que pueden sintetizar al DEHP destacan los hongos, que hasta ahora son el mayor grupo microbiano reportado como secretor de este compuesto. Las especies de *Penicillium* producen una amplia gama de metabolitos secundarios bioactivos, entre los cuales se incluyen agentes antibacterianos, antifúngicos, inmunosupresores y reductores del colesterol. Entre algunas de las investigaciones realizadas anteriormente, se ha reportado el aislamiento del DEHP como un metabolito

bioactivo proveniente de un organismo identificado como una cepa de *Penicillium olsonii*.²⁹ Un estudio realizado en 2015, informó que *Penicillium janthinellum* produjo este mismo compuesto como un metabolito bioactivo principal, mostrando una potente actividad antitumoral dependiente de la dosis contra las células de Ehrlich in vivo.³⁰ Otra investigación recientemente realizada, demostró que el mismo compuesto fue aislado de *Aspergillus awamori*, presentando actividad contra el hongo *Candida albicans* y contra la bacteria *Sarcina lutea*, además de presentar actividad citotóxica contra algunas líneas celulares de carcinoma.³¹

Un estudio realizado en productos naturales de hongos de interés acuícola reporto la presencia de sustancias identificadas como ftalatos de dialquilo, específicamente la existencia del DEHP, en la biomasa fúngica de *Schizochytrium aggregatum*, al igual que en el micelio de *Paecilomyces variotii* y *Penicillium roqueforti*.²⁵

Las plantas son otros de los organismos vivos los cuales también han sido objetivo de estudio para poder demostrar que al igual que algunas bacterias y hongos, estas también tienen la capacidad de sintetizar al DEHP como un compuesto capaz de poseer actividades biológicas. Un estudio fotoquímico mostró el aislamiento del DEHP en la flor de *Calotropis gigantea*, además, presento actividad antibacteriana contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Escherchia coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella shiga* y *Shigella dysenteriae* y actividad antifúngica contra el hongo *Aspergillus flavus*.³²

2.4 2-etilhexanol un compuesto quiral a partir de Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo)

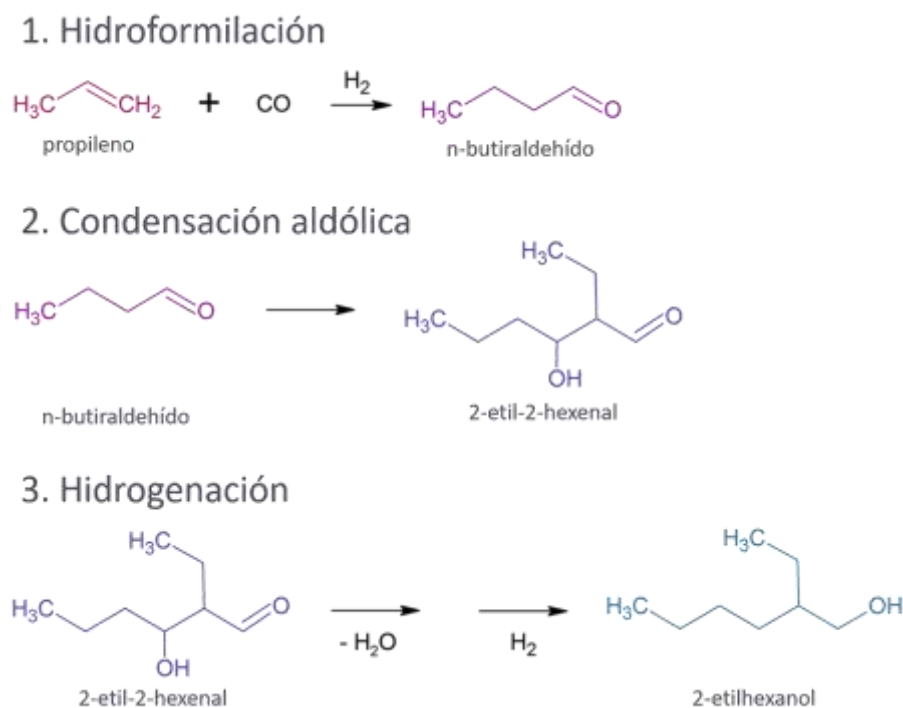
El 2-etilhexanol es un compuesto químico importante, considerado un conveniente alcohol plastificante; es empleado especialmente en la producción de ftalatos, convirtiéndose principalmente en ftalato de bis-(2-etilhexilo), el cual actúa como un plastificante excelente.

Es una materia prima importante la cual se emplea en la producción de antiespumantes, dispersantes y como agente en el procesamiento de minerales.

También se usa ampliamente en la producción de adhesivos, tensoactivos, antioxidantes, cosméticos y como aditivos de petróleo, diésel y aceite lubricante.

El 2-etilhexanol se produce a través de tres reacciones consecutivas (Esquema 3):

1. Hidroformilación de propileno a n-butiraldehído.
2. Condensación aldólica de n-butiraldehído a 2-etil-2-hexenal.
3. Hidrogenación de 2-etil-2-hexenal a 2-etilhexanol.



Esquema 3. Síntesis del 2-etilhexanol.

La segunda reacción de dicho proceso, durante la producción de 2-etil-2-hexenal a partir de la condensación aldólica de n-butiraldehído, utiliza una solución acuosa alcalina como catalizador, generando gran cantidad de aguas residuales, corrosión de los equipos y altos costos de producción. Se realiza una reacción típica de condensación aldólica, catalizada por un ácido, una base, o un catalizador bifuncional ácido-base, para obtener 2-etil-2-hexenal.

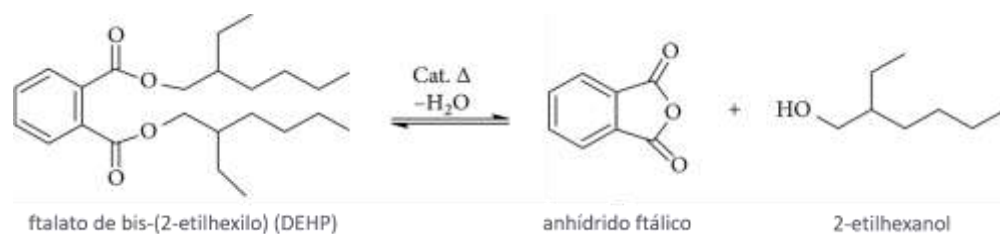
Finalmente la hidrogenación de 2-etil-2-hexenal a 2-etilhexanol, es catalizada por los catalizadores soportados de cobre (Cu) o níquel (Ni). Este proceso tiene

algunas desventajas, como el alto consumo de energía y la baja selectividad al producto.³³

Con la finalidad de mejorar el proceso se ha propuesto la utilización de otros catalizadores. Una propuesta ha sido llevar a cabo la reacción de hidrogenación de 2-etil-2-hexenal a 2-etilhexanol, en presencia de un catalizador de Ni/SiO₂, aunque su eficacia no resulto tan buena, debido a la baja actividad, fácil desactivación y difícil separación del producto.³⁴ El catalizador NiO-MnO₂/Nb₂O₅-TiO₂ da lugar a una selectividad bastante alta de 2-etilhexanol.³⁵ Recientemente algunas investigaciones han propuesto realizar la síntesis del 2-etilhexanol en un solo paso. Se pretende que esta se realice mediante el uso de un catalizador de Cu/Mg_{2.5}AlO_x. El catalizador Cu/Mg_{2.5}AlO_x tuvo un buen desempeño catalítico en la síntesis de 2-etilhexanol en un solo paso a partir de n-butiraldehído. El objetivo de la síntesis de un solo paso es simplificar el proceso, reducir los costos de equipo y operativos, para así mejorar la economía del proceso.³⁶

La síntesis orgánica de 2-etilhexanol implica realizar un conjunto de reacciones que tienen ciertas dificultades. Industrialmente la producción de 2-etilhexanol ha generado algunas desventajas, las cuales van desde el impacto ambiental que la fabricación de este causa, debido a la gran cantidad producida de aguas residuales que contienen álcali, la corrosión de los equipos, un alto consumo de energía, la baja selectividad y difícil separación del producto, además de los altos costos de producción que implica llevar a cabo este proceso. Aunado a todo lo anterior, se suma otra al momento de seleccionar cual es el catalizador más conveniente y eficaz para llevar a cabo las reacciones que implican este proceso.

Una opción menos compleja sería la obtención de 2-etilhexanol a partir de otro compuesto. Una buena propuesta podría ser obtenerlo a partir del DEHP, el cual se convierte en una excelente opción debido a que se ha comprobado que puede ser sintetizado por diversos organismos vivos, ofreciendo una gran ventaja frente a la producción industrial que cualquiera de ambos compuestos implica. A través de una hidrólisis del DEHP se pretende romper el enlace C-O del grupo éster para dar lugar al anhídrido ftálico y el alcohol 2-etilhexanol (Esquema 4).



Esquema 4. Hidrólisis del ftalato de bis-(2-etilhexilo) (DEHP).

Además la estructura del DEHP presenta un centro estereogénico, lo cual indica que puede tener tres posibles estereoisómeros: ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo), ftalato de bis-*S*-(2-etilhexilo) y ftalato de bis-*rac*-(2-etilhexilo).²⁴

Un estudio realizado en cepas de *B. thuringiensis*, *B. subtilis* y *B. velezensis*, logro el aislamiento de ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) enantioméricamente puro. Mediante la obtención de su rotación óptica $[\alpha]^{22.4}_D = -17.4$ (C 1.15, Hex), se logró determinar la configuración del centro asimétrico y se establece que el compuesto aislado tiene una configuración absoluta *R*.^{24, 37}

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Obtener (*R*)-2-etil-1-hexanol mediante la hidrólisis del ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) (DEHP), el cual es aislado a partir de la extracción, purificación e identificación en un extracto crudo de *Bacillus megaterium* (cepa ELI24). Además de evaluar su actividad biológica frente a bacterias y hongos fitopatógenos.

3.2 Objetivos particulares

- Obtener un extracto crudo de un cultivo bacteriano de la cepa ELI24 identificada como *Bacillus megaterium*, mediante una extracción a través de disolventes.
- Separar y purificar el extracto crudo a través de cromatografía en columna de gel de sílice y cromatografía en capa fina para obtener compuestos orgánicos.
- Identificar estructuralmente los compuestos orgánicos aislados mediante técnicas espectroscópicas.
- En base a identificar al ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) (DEHP) como un compuesto natural aislado de la bacteria *B. megaterium*, se realiza su hidrólisis con la finalidad de obtener (*R*)-2-etil-1-hexanol.
- Realizar pruebas biológicas de inhibición frente a bacterias y hongos fitopatógenos, de los compuestos orgánicos aislados para evaluar su efecto bactericida y fungicida.

4. Desarrollo experimental

4.1 Cepa ELI24 *Bacillus megaterium*

Se utilizó la cepa ELI24 previamente identificada en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana como *Bacillus megaterium*, y que fue aislada del suelo de una muestra de tierra proveniente de Atlixco, Puebla.

4.2 Crecimiento de la cepa ELI24 *Bacillus megaterium*

Se hizo un cultivo en placa de la cepa ELI24, para ello, la cepa de interés se inoculó en una placa de medio sólido Luria Bertani (LB) y se incubó a 29 °C durante 24 horas. Posteriormente se observó su morfología macroscópica y microscópica. En placa de medio LB presenta una morfología de colonias brillantes, circulares a irregulares con bordes ondulados. Al microscopio se observa una morfología celular de bacilos Gram-positivos en forma de bastón que se encuentran unidos en pares o cadena; además las colonias son formadoras de esporas.

Posteriormente bajo condiciones de esterilidad se inoculó una colonia aislada del cultivo en placa en medio líquido LB modificado, el cual se incubó a 29 °C durante 7 días con agitación constante de 175 rpm; terminado el periodo de incubación se procedió a centrifugar el cultivo líquido durante 10 minutos a 3 500 rpm con la finalidad de obtener un medio de cultivo sin células, separando mediante decantación el botón celular del cultivo líquido.

4.3 Medios de cultivo

4.3.1 Medio Luria Bertani (sólido)

El medio de cultivo sólido utilizado para el aislamiento en placa inicial de la cepa *B. megaterium* fue el medio Luria Bertani (LB), el cual por cada litro contiene:

Agar Luria Bertani Fórmula (en gramos por litro)	
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	10
Peptona de caseína	10
Agar bacteriológico	16

La preparación del medio de cultivo sólido LB implica: disolver el extracto de levadura (5 g), cloruro de sodio (10 g) y peptona de caseína (10 g) en un litro de agua purificada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Distribuir en matraces Erlenmeyer (con capacidad de 500 mL) depositando 250 mL del medio de cultivo preparado en cada matraz. Colocar 4 g de agar bacteriológico por cada 250 mL del medio de cultivo. Esterilizar en autoclave a 120 °C durante 20 minutos a 15 libras de presión. El medio esterilizado y enfriado a 45-50 °C se homogeneiza y distribuye en placas de Petri estériles. Dejar solidificar en un ambiente estéril el medio de cultivo durante 15 minutos a temperatura ambiente.

4.3.2 Medio Luria Bertani modificado (líquido)

El medio de cultivo líquido utilizado para el cultivo en caldo de la cepa *B. megaterium* fue el medio Luria Bertani (LB) modificado, el cual por cada litro contiene:

Caldo Luria Bertani Modificado Fórmula (en gramos por litro)	
Extracto de levadura	2.5
Peptona de caseína	2.5
Cloruro de sodio	5
Sucrosa	20

Las instrucciones de preparación del medio de cultivo líquido LB modificado son: disolver los 30 g de la fórmula en un litro de agua purificada. Mezclar y dejar reposar 5 minutos. Distribuir en matraces Erlenmeyer (con capacidad de 500 mL) depositando 250 mL del medio de cultivo preparado en cada matraz.

Esterilizar en autoclave a 120 °C durante 20 minutos a 15 libras de presión. El medio esterilizado se dejar enfriar a temperatura ambiente.

4.4 Extracción de los metabolitos secundarios

Al medio de cultivo sin células se le realizó una extracción de los metabolitos secundarios a través de disolventes.

La extracción se realizó con acetato de etilo ($C_4H_8O_2$) con una relación de volumen 1:1 por triplicado. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio (Na_2SO_4) y se evaporó a presión reducida para obtener un extracto crudo de aspecto viscoso de color amarillo-marrón con olor penetrante con un rendimiento de 796 mg/L.

4.5 Fraccionamiento general del extracto crudo

El extracto crudo se analizó realizando un fraccionamiento general para obtener una separación con base a las polaridades de los metabolitos secundarios.

El fraccionamiento general del extracto crudo se realizó mediante cromatografía en columna de gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron diferentes mezclas de eluyentes las cuales gradualmente incrementaron su polaridad.

Se obtuvieron un total de 25 fracciones, las cuales se analizaron a través de cromatografía en capa fina (TLC), usando como revelador luz UV. Destacando a la fracción 2 como una muestra de interés para la realización de este proyecto, por lo que se le dio seguimiento con la purificación y posterior caracterización de este compuesto.

4.6 Purificación de la fracción 2

La purificación de la fracción 2 se realizó a través de una cromatografía en columna de gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil se empleó el sistema de eluyentes Hexano:Acetato de etilo en una relación de volumen 96:4

como mejor sistema de purificación, logrando aislar un compuesto de aspecto líquido viscoso, incoloro e inodoro con un rendimiento de 86.97 mg/L.

4.7 Hidrólisis del compuesto de tipo ftalato

Para la reacción de hidrólisis, a 100 mg (0.256 mmol) de ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) se agregan 5 mL de metanol (CH₃OH) y 0.3 mL de una disolución 5N de hidróxido de sodio (NaOH). La reacción se mantuvo en agitación constante durante 10 horas. Finalizado el tiempo de reacción, se adicionan 20 mL de una solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) y 20 mL de agua destilada. La extracción se realizó con cloruro de metileno (CH₂Cl₂) con una relación de volumen 1:1 por triplicado, la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio (Na₂SO₄) y se evaporó a presión reducida obteniendo un compuesto líquido de aspecto aceitoso, incoloro con ligero olor penetrante con un rendimiento de 28.2 mg/100 mg (DEHP).

4.8 Caracterización de los compuestos orgánicos

La caracterización de los compuestos orgánicos obtenidos se hizo mediante el análisis espectroscópico de resonancia magnética nuclear (RMN). También se obtuvo la rotación óptica de los compuestos, para posteriormente determinar su configuración absoluta.

4.8.1 Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) (DEHP)

Rendimiento: 10.92 % (0.087 g, 0.22 mmol); líquido viscoso, incoloro e inodoro; $[\alpha]^{20}_D = -12.7$ (*c* 1.0, Hex); fórmula molecular: C₂₄O₄H₃₈; peso molecular: 390.56 g/mol; RMN ¹H (500 MHz en CDCl₃) δ: 7.71 (2H, dd, *J* = 3.6 Hz, 2CH), 7.52 (2H, dd, *J* = 3.6 Hz, 2CH), 4.22 (4H, 2dd, *J* = 6.1, 2CH₂), 1.69 (2H, sep, *J* = 6 Hz, 2CH), 1.42 (4H, dd, *J* = 7.5, 7 Hz, 2CH₂), 1.35 (4H, t, *J* = 6 Hz, 2CH₂), 1.31 (8H, m, 4CH₂), 0.93 (6H, d, *J* = 7.5 Hz, 2CH₃), 0.90 (6H, d, *J* = 7.5 Hz, 2CH₃); RMN ¹³C (125 MHz en CDCl₃) δ: 167.6 (C=O), 132.5 (Cq), 130.8 (CH), 128.8 (CH), 68.0 (CH₂-O), 38.7 (CH), 30.4 (CH₂), 28.9 (CH₂), 23.8 (CH₂), 23.0 (CH₂), 14.0 (CH₃), 10.9 (CH₃).

4.8.2 (R)-2-etil-1-hexanol

Rendimiento: 28.2 % (0.0282 g, 0.216 mmol); líquido aceitoso, incoloro con ligero olor penetrante; $[\alpha]_D^{20} = -1.6$ (c 1.0, CH₂Cl₂); fórmula molecular: C₈H₁₈O; peso molecular: 130.23 g/mol; RMN ¹H (500 MHz en CDCl₃) δ: 3.53 (2H, dd, CH₂), 2.19 (1H, s, OH), 1.39 (1H, sep, CH), 1.29 (8H, m, 4CH₂), 0.88 (3H, d, CH₃), 0.90 (3H, d, CH₃); RMN ¹³C (125 MHz en CDCl₃) δ: 65.1 (CH₂-OH), 41.9 (CH), 30.1 (CH₂), 29.1 (CH₂), 23.3 (CH₂), 23.1 (CH₂), 14.1 (CH₃), 11.0 (CH₃).

4.9 Pruebas biológicas

La actividad antibacterial y antifúngica de cada compuesto anteriormente identificado, se examinó a través de pruebas biológicas con la finalidad de evaluar la capacidad de sensibilidad o resistencia de un microorganismo frente a un agente antimicrobiano.

4.9.1 Evaluación del efecto antibacterial de los productos naturales aislados de la cepa ELI24 *Bacillus megaterium*

Para evaluar el efecto antibacterial que produce cada uno de los compuestos obtenidos se realizó un antibiograma de las bacterias Gram-positivas: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Streptococcus agalactiae*, y las bacterias Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Serratia sp.*, *Shigella sp.* y *Vibrio parahaemolyticus*.

Inicialmente se prepararon cultivos en tubos Falcon estériles (con capacidad de 15 mL) de cada una las bacterias que se probaron. Los cultivos se realizaron bajo condiciones de esterilidad colocando 5 mL de medio líquido LB el cual se inoculó con una colonia anteriormente aislada en placa de medio LB. Se incubó a 29 °C durante 24 horas. Posteriormente se tomaron 100 µL del cultivo y se colocaron en una placa de agar Müller-Hinton (MH) inoculando la placa mediante difusión en agar. Esto con cada una las bacterias que se probaron.

Para estandarizar la concentración de cada uno de los compuestos a evaluar en el antibiograma, estos se diluyeron en metanol a una concentración de 15 mg/100 μ L. En condiciones de esterilidad se impregnaron discos de papel filtro (de 6 mm de diámetro) previamente esterilizados con 5 μ L (c 0.75 mg) del compuesto a probar y se colocaron en forma de reloj, en las placas de agar MH anteriormente inoculadas con las bacterias de interés. Además a cada una de las placas se les colocó un disco de papel filtro impregnado con agua estéril y otro impregnado con metanol, como controles negativos, esto porque el metanol fue el disolvente utilizado en cada compuesto. Se incubaron a 29 °C durante 24 horas. Finalizado el tiempo de incubación se midió el halo de inhibición generado por cada uno de los compuestos.

El medio de cultivo líquido utilizado para el cultivo en caldo de cada una las bacterias que se probaron fue el medio Luria Bertani (LB), el cual por cada litro contiene:

Caldo Luria Bertani Fórmula (en gramos por litro)	
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	10
Peptona de caseína	10

El medio de cultivo sólido utilizado para la difusión en agar de cada una las bacterias que se probaron fue el agar Müller-Hinton (MH), el cual por cada litro contiene:

Agar Müller-Hinton Fórmula (en gramos por litro)	
Extracto de carne bovina	2
Hidrolizado ácido de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar	17

4.9.2 Evaluación del efecto antifúngico de los productos naturales aislados de la cepa ELI24 *Bacillus megaterium*

Para evaluar el efecto antifúngico que produce cada uno de los compuestos aislados se realizó un bioensayo en hongos, el cual se realizó en los hongos fitopatógenos: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani* y *Mucor sp.*

Cada diana debe tener un blanco de referencia y para cada una de ellas el ensayo se realizó por triplicado en microplacas de cultivo celular. Previamente se hizo un cultivo en placa en agar Papa-Dextrosa (PDA) de cada uno de los hongos fitopatógenos, se incubó a 29 °C durante 4 días.

Primero se preparó una solución stock (compuesto a evaluar diluido en etanol) a una concentración de 1.4 mg/35 µL. Bajo condiciones de esterilidad en un tubo Eppendorf estéril (con capacidad de 2 mL) se colocaron 35 µL de la solución stock y 1 365 µL de medio de cultivo PDA. La preparación con una concentración de 1 mg/mL se incorporó de manera homogénea para posteriormente agregar 300 µL en cada pocillo (cuatro pocillos) y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Del cultivo de hongos fitopatógenos en placa de PDA previamente realizado y con ayuda de un transfer se tomó una pequeña parte del micelio periférico del hongo fitopatógeno y se colocó sobre cada uno de los pocillos con agar PDA (cuatro pocillos). Se incubó a 29 °C durante 24 horas. Finalmente, la lectura se realizó a las 24 y 48 horas, evaluando la capacidad de inhibición de cada compuesto aislado, mediante un escaneo de la microplaca de cultivo celular y con ayuda del programa ImageJ, se determinó el porcentaje de inhibición.

El medio de cultivo sólido utilizado para el cultivo en placa de cada uno de los hongos fitopatógenos y en el bioensayo en hongos fue el agar Papa-Dextrosa (PDA), el cual por cada litro contiene:

Agar Papa-Dextrosa Fórmula (en gramos por litro)	
Infusión de Papa	4
Dextrosa	20
Agar	15

5. Discusión de resultados

La realización de este proyecto se llevó a cabo mediante la estructura y seguimiento del siguiente esquema de trabajo:



5.1 Extracción

La extracción se realizó utilizando la cepa ELI24, identificada como *Bacillus megaterium*. (Figura 5)



Figura 5. *Bacillus megaterium* ELI24 en medio Luria Bertani (LB).

Siguiendo la metodología descrita anteriormente se cultivó en placa en agar Luria Bertani (LB) la cepa de interés ELI24, se incubó a 29 °C durante 24 horas. Posteriormente se inoculó una colonia aislada de la placa en medio líquido LB modificado, se incubó a 29 °C durante 7 días con agitación constante a 175 rpm; finalizado el tiempo de incubación se centrifugó durante 10 minutos a 3 500 rpm para obtener un medio de cultivo sin células para posteriormente realizar la extracción. (Figura 6)



Figura 6. A) Cultivo en placa en medio LB de la cepa ELI24; B) Cultivo en medio líquido LB modificado de la cepa ELI24; C) Medio de cultivo sin células; D) Extracción con acetato de etilo.

La extracción se realizó con acetato de etilo ($C_4H_8O_2$) con una relación de volumen 1:1 por triplicado. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio (Na_2SO_4) y se evaporó a presión reducida para obtener un extracto crudo de aspecto viscoso de color amarillo-marrón con olor penetrante con un rendimiento de 796 mg/L. (Figura 7)



Figura 7. Extracto crudo obtenido de la cepa ELI24.

5.2 Fraccionamiento general

El fraccionamiento general del extracto crudo anteriormente obtenido se realizó mediante cromatografía en columna de gel de sílice como fase estacionaria (Figura 8); como fase móvil se utilizaron diferentes mezclas de disolventes las cuales iban desde una polaridad baja hasta una mayor polaridad. Para determinar que eluyentes eran los más adecuados se evaluaron diferentes sistemas de eluyentes (en distintas proporciones de volumen) en cromatografía en capa fina (TLC). Los sistemas en los que se observó una mejor separación de los posibles compuestos de la mezcla se muestran en la Tabla 1.



Figura 8. Cromatografía en columna de gel de sílice del extracto crudo obtenido de la cepa ELI24.

FRACCIONAMIENTO GENERAL	
SISTEMA DE ELUYENTES	PROPORCIÓN (%)
Hexano	100
Hex:AcOEt	90:10
Hex:AcOEt	75:25
Hex:AcOEt	50:50
AcOEt	100
AcOEt:MeOH	98:2
AcOEt:MeOH	95:5
AcOEt:MeOH	90:10
AcOEt:MeOH	80:20
AcOEt:MeOH	50:50
AcOEt:MeOH	20:80
MeOH	100

Tabla 1. Sistemas de eluyentes utilizados en el fraccionamiento general del extracto crudo de la cepa ELI24. Hexano (Hex), Acetato de etilo (AcOEt), Metanol (MeOH).

Se recolectaron diferentes fracciones (Figura 9), a las cuales se les realizó un seguimiento cromatográfico en placa fina a cada una, como revelador se usó luz UV de onda corta a 254 nm (UV-C) y de onda larga a 365 nm (UV-A), para observar una posible similitud entre ellas y reunir las para tener mayor cantidad de peso por fracción.

En total se obtuvieron 12 fracciones diferentes que se concentraron a presión reducida, finalmente se obtuvo el peso de cada una de las fracciones para conocer el rendimiento obtenido de cada una de ellas, los cuales se observan en la Tabla 2.



Figura 9. Fracciones recolectadas de la cromatografía en columna de gel de sílice del extracto crudo obtenido de la cepa ELI24.

FRACCIONAMIENTO GENERAL			
FRACCIÓN	SISTEMA DE ELUYENTES	PROPORCIÓN (%)	PESO (mg/L)
1	Hexano	100	0.6
2	Hex:AcOEt	90:10	162.8
3	Hex:AcOEt	75:25	8.7
4	Hex:AcOEt	50:50	40.4
5	AcOEt	100	116.2
6	AcOEt:MeOH	98:2	44.8
7	AcOEt:MeOH	95:5	28.9
8	AcOEt:MeOH	90:10	27.5
9	AcOEt:MeOH	80:20	34.8
10	AcOEt:MeOH	50:50	41.6
11	AcOEt:MeOH	20:80	12.3
12	MeOH	100	5

Tabla 2. Peso (mg/L) de cada una de las fracciones obtenidas en el fraccionamiento general del extracto crudo de la cepa ELI24.

Mediante el seguimiento cromatográfico en placa fina de cada una de las fracciones obtenidas, utilizando como revelador luz UV-C y luz UV-A, se observó que al utilizar como fase móvil el sistema de eluyentes Hex:AcOEt en una relación 90:10, la fracción 2 se destacaba como una fracción de interés, ya que aparentaba tener una mayor pureza (Figura 10). También se realizaron técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN) a las fracciones obtenidas, arrojando como resultado que la fracción 2 era una muestra de conveniencia para la realización de este proyecto, por lo que se le dio seguimiento con la purificación y posterior caracterización de este compuesto.

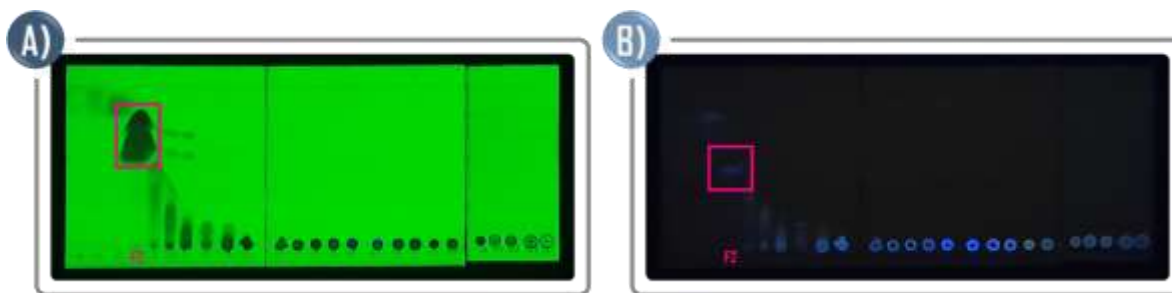


Figura 10. Seguimiento cromatográfico en placa fina de las fracciones obtenidas del extracto crudo de la cepa ELI24. Se observa la fracción 2 (F2) con revelador A) luz UV-C y B) luz UV-A, con una fase móvil del sistema de eluyentes Hex:AcOEt 90:10.

5.3 Purificación

La purificación se realizó después de una selección entre las fracciones obtenidas del fraccionamiento general por medio del análisis de los espectros de RMN de ^1H a 500 MHz.

La fracción 2 resultó ser de interés, físicamente presentaba una apariencia líquida viscosa. Se hizo un análisis por cromatografía en capa fina, donde se observó con revelador de luz UV-C una mancha aparentemente "limpia", aunque se observa una combinación con otro posible compuesto, mientras que en luz UV-A se logra apreciar una banda que emite fluorescencia azul intensa, por lo que se decidió purificar. (Figura 11)

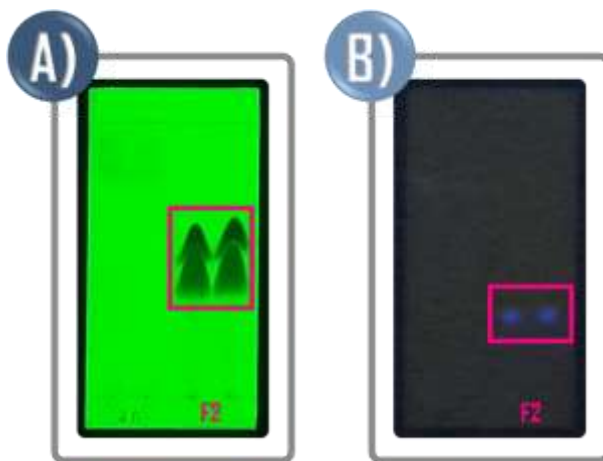


Figura 11. Seguimiento cromatográfico en placa fina de la fracción 2 obtenida del extracto crudo de la cepa ELI24, con revelador A) luz UV-C y B) luz UV-A, con fase móvil del sistema de eluyentes Hex:AcOEt 95:5.

Esta fracción se purificó mediante cromatografía en una mini columna de gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil se emplearon los sistemas que se muestran en la Tabla 3. El sistema Hex:AcOEt en una relación 96:4 demostró ser el mejor sistema de purificación, ya que se logró aislar un compuesto (Compuesto 1) de aspecto líquido viscoso, incoloro e inodoro con un rendimiento de 86.97 mg/L, cuyo monitoreo cromatográfico en placa fina indica la presencia de una sola banda. (Figura 12)

FRACCIONAMIENTO GENERAL	
SISTEMA DE ELUYENTES	PROPORCIÓN (%)
Hexano	100
Hex:AcOEt	98:2
Hex:AcOEt	96:4

Tabla 3. Sistemas de eluyentes utilizados en la purificación de la fracción 2 obtenida del extracto crudo de la cepa ELI24. Hexano (Hex), Acetato de etilo (AcOEt).

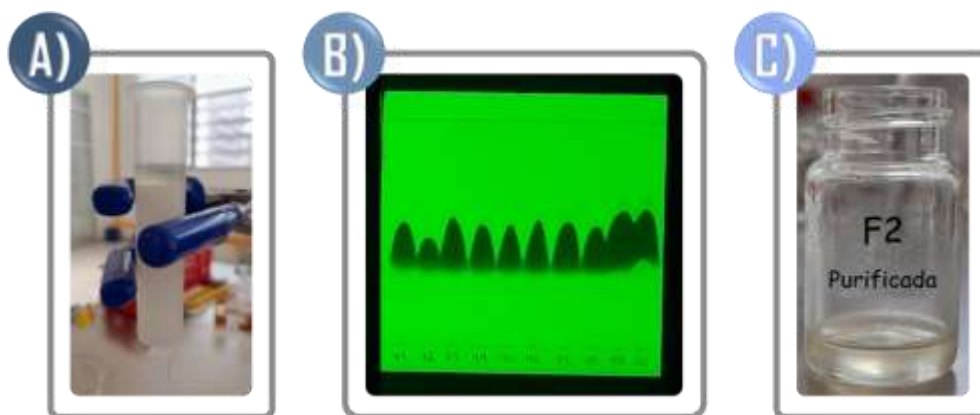


Figura 12. A) Cromatografía en mini columna de gel de sílice de la fracción 2 obtenida del extracto crudo de la cepa ELI24. B) Seguimiento cromatográfico en placa fina de la purificación de la fracción 2 obtenida del extracto crudo de la cepa ELI24, con revelador de luz UV-C, con fase móvil del sistema de eluyentes Hex:AcOEt 96:4. C) Fracción 2 purificada, aislando un compuesto líquido viscoso, incoloro e inodoro.

5.4 Caracterización

5.4.1 Fracción 2 (Compuesto 1)

Se procedió a realizar una caracterización completa del compuesto 1 proveniente de la fracción 2 mediante la realización de estudios espectroscópicos de resonancia magnética nuclear (RMN) para elucidar su estructura química.

Primero se obtuvo su espectro de RMN de una dimensión (1D) de ^1H . Se observó que era un espectro de interés por lo que se decidió realizar el espectro de RMN de ^{13}C , así como los experimentos de RMN de dos dimensiones (2D) COSY y

HSQC, para el análisis de su estructura. A continuación, se presentan los espectros de RMN obtenidos de la fracción 2:

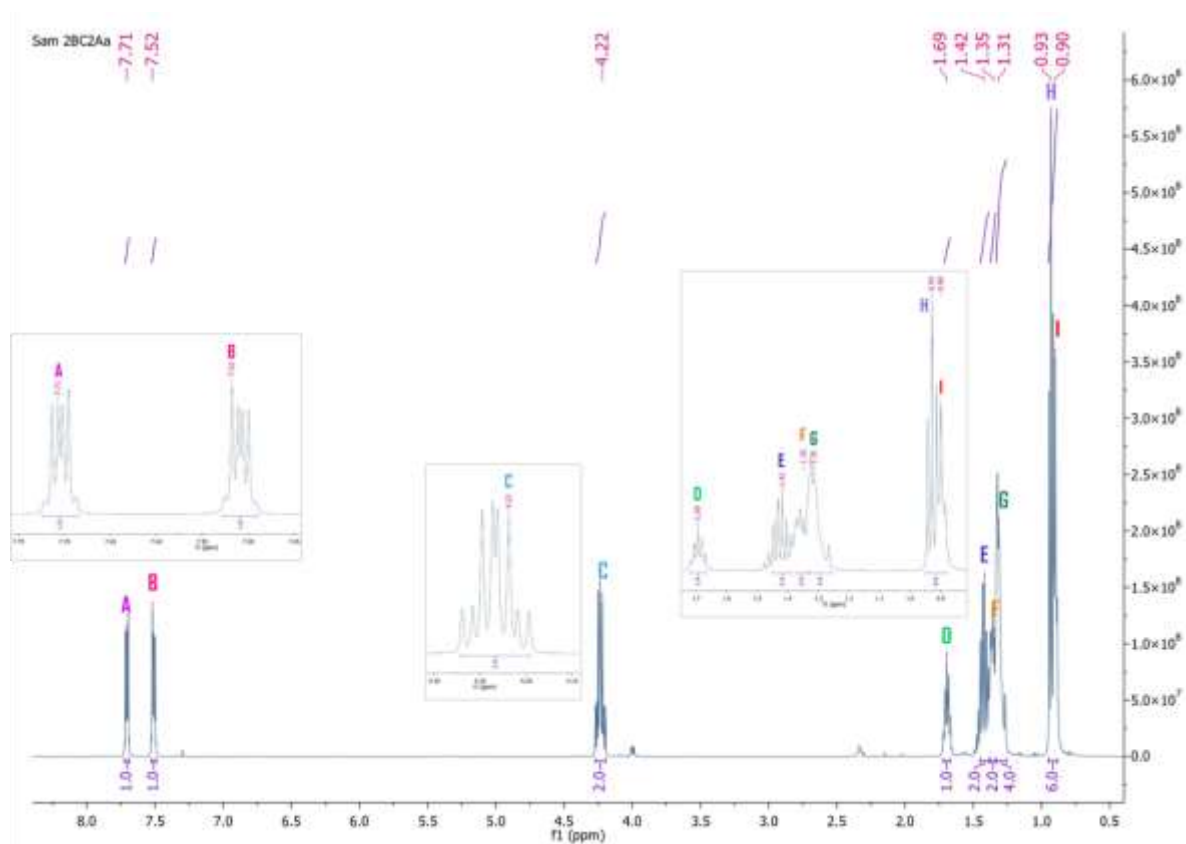


Figura 13. Espectro de RMN 1D de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del compuesto 1 de *B. megaterium*.

En el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz se observan nueve señales diferentes (Figura 13). En la región del espectro correspondiente a los hidrógenos del anillo aromático, en 7.71 ppm y 7.52 ppm se observan dos señales dobles de dobles (marcadas como A y B) las cuales integran para un hidrógeno cada una, sugiriendo la existencia de un anillo aromático *orto*-disustituido con los mismos sustituyentes en ambas posiciones, indicando una molécula simétrica. En 4.22 ppm se observa una señal de dos dobles de dobles (marcada como C) que integra para dos hidrógenos, señalando la presencia de hidrógenos diastereotópicos pertenecientes a un grupo metileno unido a un átomo electronegativo (un oxígeno), con un centro estereogénico adyacente. En 1.69 ppm se observa una señal séptuple (marcada como D) que integra para un hidrógeno. Se observa un grupo de señales: en 1.42 ppm se observa una señal

doble de dobles (marcada como E) que integra para dos hidrógenos; en 1.35 ppm se observa una señal triple (marcada como F) que integra para dos hidrógenos; en 1.31 ppm se observa una señal múltiple (marcada como G) (donde se encuentran dos señales empalmadas) que integra para cuatro hidrógenos; este grupo de señales indican la presencia de cuatro metilenos. Por último, en 0.93 ppm y 0.90 ppm se observan dos señales dobles (marcadas como H e I) las cuales integran para tres hidrógenos cada una, correspondientes a dos metilos diferentes.

Posterior al análisis del espectro de RMN de ^1H , para ver el número de carbonos que tenía la molécula se obtuvo un espectro de RMN de ^{13}C (Figura 14).

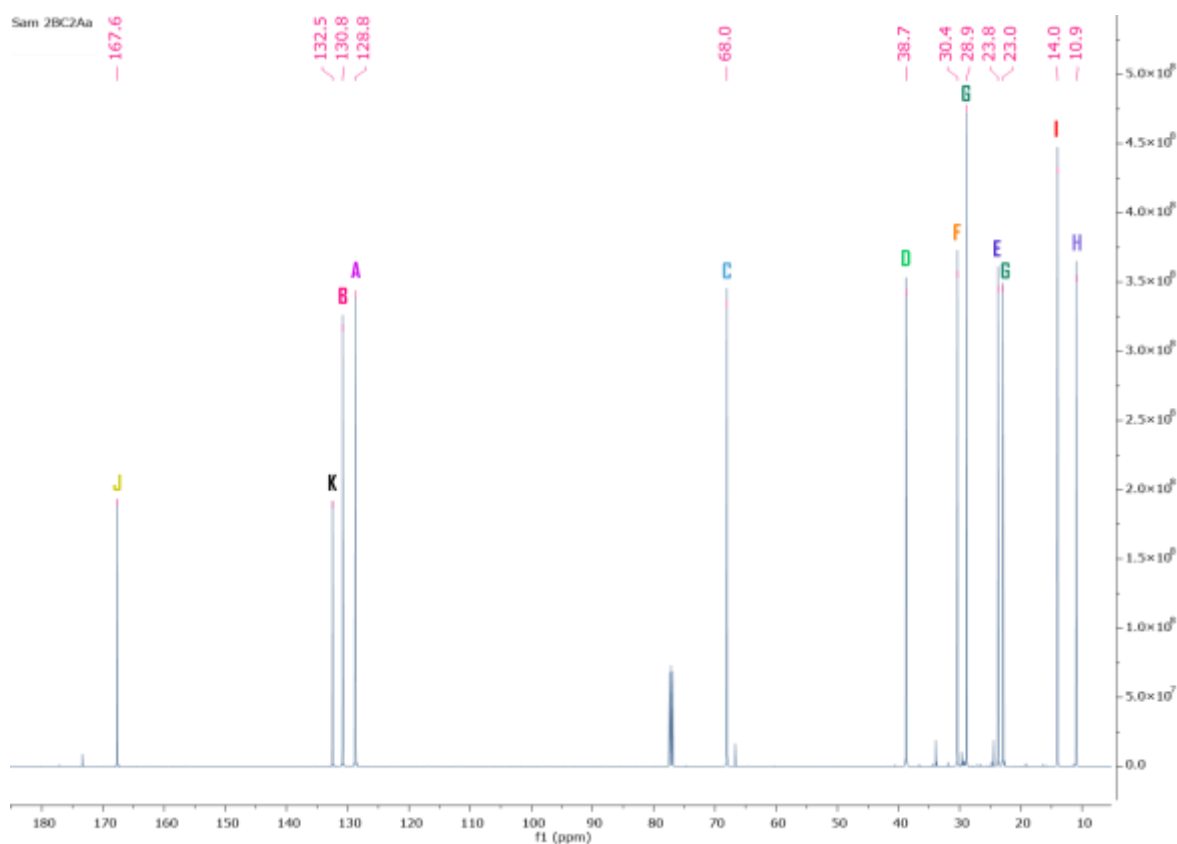


Figura 14. Espectro de RMN 1D de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del compuesto 1 de *B. megaterium*.

En el espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz se observan doce señales diferentes. En 167.6 ppm se observa una señal, que de acuerdo con su desplazamiento químico en la región del espectro, correspondería a un grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) (marcado como J); en 132.5 ppm se observa una señal que corresponde a un

carbono cuaternario (marcado como K); en 130.8 ppm, 128.8 ppm y 38.7 ppm se observan tres señales (marcadas como B, A y D) las cuales pertenecen a un carbono de un grupo metino cada una; en 68.0 ppm se observa una señal correspondiente a un grupo metileno unido a un átomo electronegativo (un oxígeno) (marcado como C); en un grupo de señales en: 30.4 ppm, 28.9 ppm, 23.8 ppm y 23.0 ppm se observan cuatro señales diferentes (marcadas como F, G, E y G) las cuales corresponden a carbonos de cuatro grupos metilenos diferentes. Por último, en 14.0 ppm y 10.9 se observan dos señales (marcadas como I y H) correspondientes a carbonos de dos grupos metilos diferentes.

Posteriormente se obtuvo un espectro de RMN 2D COSY para conocer la correlación que existe entre cada uno de los hidrógenos y así poder asignar de manera correcta la posición de los hidrógenos en la estructura (Figura 15).

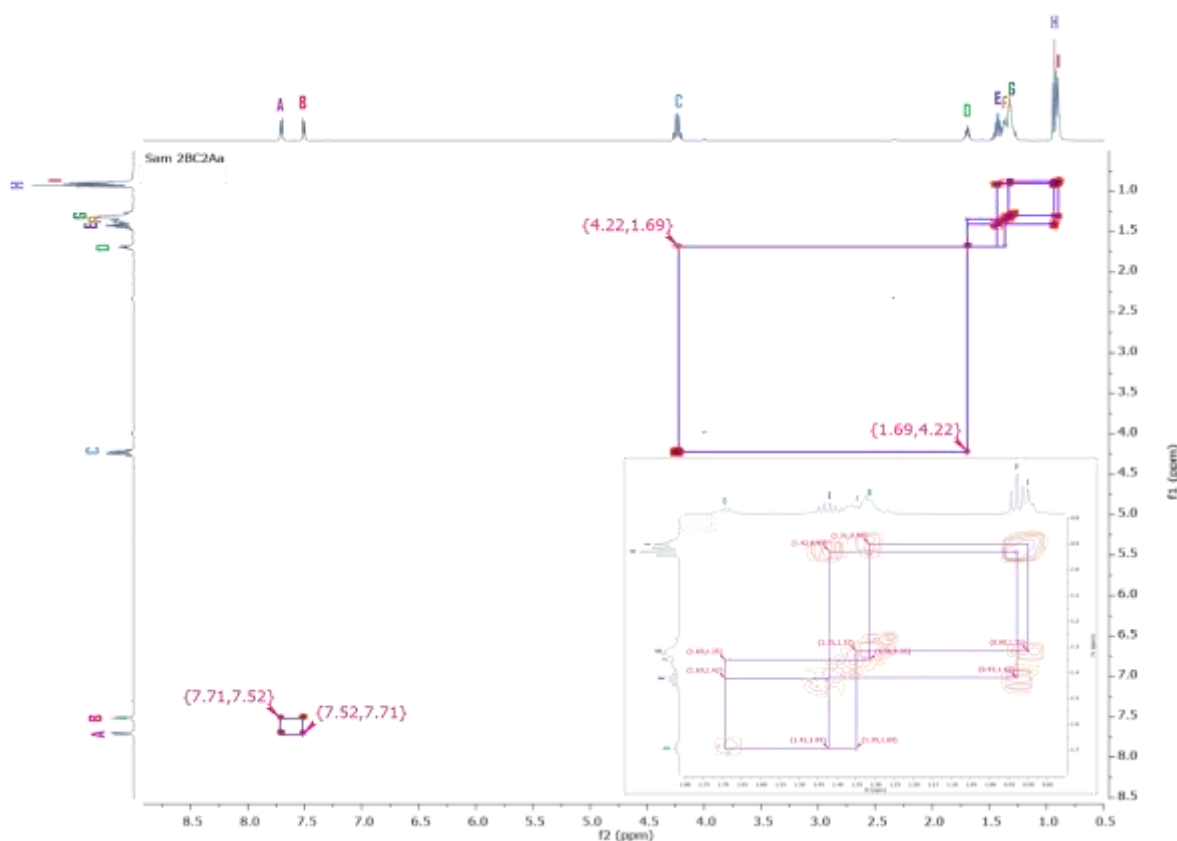


Figura 15. Espectro de RMN 2D COSY en $CDCl_3$ del compuesto 1 de *B. megaterium*.

En la región del espectro perteneciente a los hidrógenos del anillo aromático se observa una correlación entre las señales en 7.71 ppm y 7.52 ppm (marcadas como A y B), esto supone que ambos metinos se encuentran unidos únicamente entre sí, indicando así que la cadena radical se encuentra separada del anillo aromático por otro grupo funcional, que de acuerdo con el análisis del espectro de RMN de ^{13}C se podría tratar de un grupo carbonilo unido directamente al anillo aromático ($\text{C}_6\text{H}_4\text{-C=O}$).

Con respecto al resto de la estructura, se encuentran un conjunto de señales relacionadas entre sí, las cuales señalan la estructura de la cadena radical. En 1.69 ppm y 1.42 ppm (marcadas como D y E) se correlacionan las señales, dicha correlación se entrelaza con la correlación entre las señales en 1.69 ppm y 1.35 ppm (marcadas como D y F), deduciendo que el grupo metino se encuentra unido a dos metilenos ($\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$), lo cual indica que la señal en 1.69 ppm (marcada como D) es un centro estereogénico, ya que, las señales en 4.22 ppm y 1.69 ppm (marcadas como C y D) se encuentran correlacionadas, señalando que el centro estereogénico se encuentra unido a un metileno (marcado como C) con hidrógenos diastereotópicos, el cual de acuerdo con su desplazamiento químico se encuentra enlazado a un heteroátomo (un oxígeno) ($\text{O-CH}_2\text{-CH}$). La correlación entre las señales en 1.35 ppm y 1.31 ppm (marcadas como F y G), indican un enlace entre dos metilenos ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$). Por último las correlaciones de las señales en 1.42 ppm y 0.93 ppm (marcadas como E y H) y las señales en 1.31 ppm y 0.90 ppm (marcadas como G e I), destacan la unión de dos grupos metileno distintos con un metilo para cada uno respectivamente ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$).

Finalmente se obtuvo un espectro de RMN 2D HSQC para conocer la correlación que existe entre cada uno de los carbonos y los hidrógenos respectivamente (Figura 16).

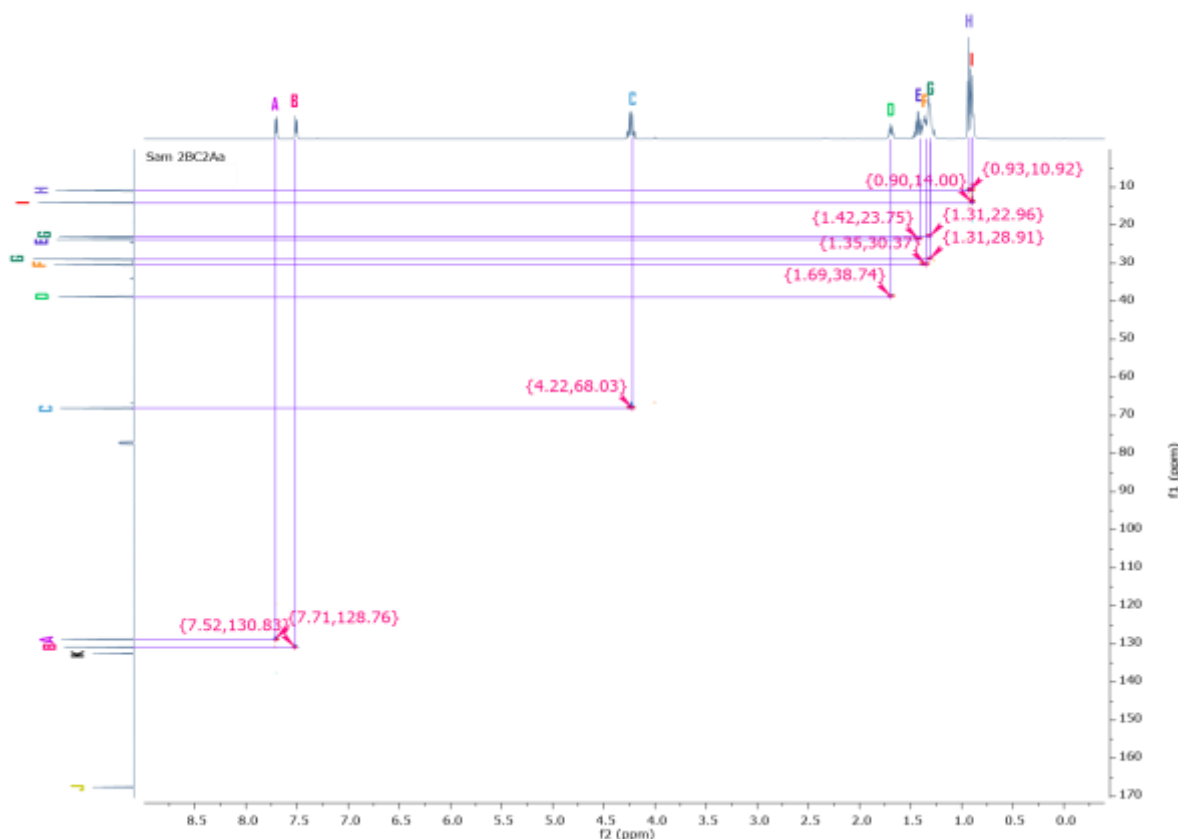


Figura 16. Espectro de RMN 2D HSQC en $CDCl_3$ del compuesto 1 de *B. megaterium*.

En el espectro de RMN de ^{13}C se observan dos señales que no se correlacionan con ningún hidrógeno, la primera señal se encuentra en 167.6 ppm, que de acuerdo con la región del espectro en la que se encuentra, corresponde a un grupo carbonilo (marcado como J) y la segunda señal se observa en 132.5 ppm, que de acuerdo con la información obtenida de los espectros de RMN antes analizados, corresponde a un carbono cuaternario (marcado como K).

La correlación que existe entre los hidrógenos (espectro de RMN de 1H) con respecto a cada uno de los carbonos (espectro de RMN de ^{13}C) se resume a continuación en la Tabla 4.



CORRELACIÓN ENTRE LAS SEÑALES DEL ESPECTRO DE RMN DE ^1H Y DE ^{13}C			
SEÑAL	DESPLAZAMIENTO EN ^1H	DESPLAZAMIENTO EN ^{13}C	GRUPO FUNCIONAL
A	7.71 ppm	128.8 ppm	CH de 
B	7.52 ppm	130.8 ppm	CH de 
C	4.22 ppm	68.0 ppm	O-CH ₂
D	1.69 ppm	38.7 ppm	CH
E	1.42 ppm	23.8 ppm	CH ₂
F	1.35 ppm	30.4 ppm	CH ₂
G	1.31 ppm	28.9 ppm	CH ₂
G	1.31 ppm	23.0 ppm	CH ₂
H	0.93 ppm	10.9 ppm	CH ₃
I	0.90 ppm	14.0 ppm	CH ₃
J	—	167.6 ppm	C=O
K	—	132.5 ppm	Carbono cuaternario

Tabla 4. Correlación entre las señales del espectro de RMN de ^1H y de ^{13}C del compuesto 1 de *B. megaterium*.

Como prueba complementaria se realizó un espectro de RMN APT con la finalidad de establecer que señales corresponden a los grupos CH, CH₂ y CH₃ (Figura 17).

En el espectro APT se puede observar que los carbonos que pertenecen a un grupo metileno (CH₂) presentan una señal positiva (señal con orientación hacia arriba), mientras que los carbonos que corresponden a un grupo metino (CH) o metilo (CH₃) tendrán una señal negativa (señal con orientación hacia abajo).

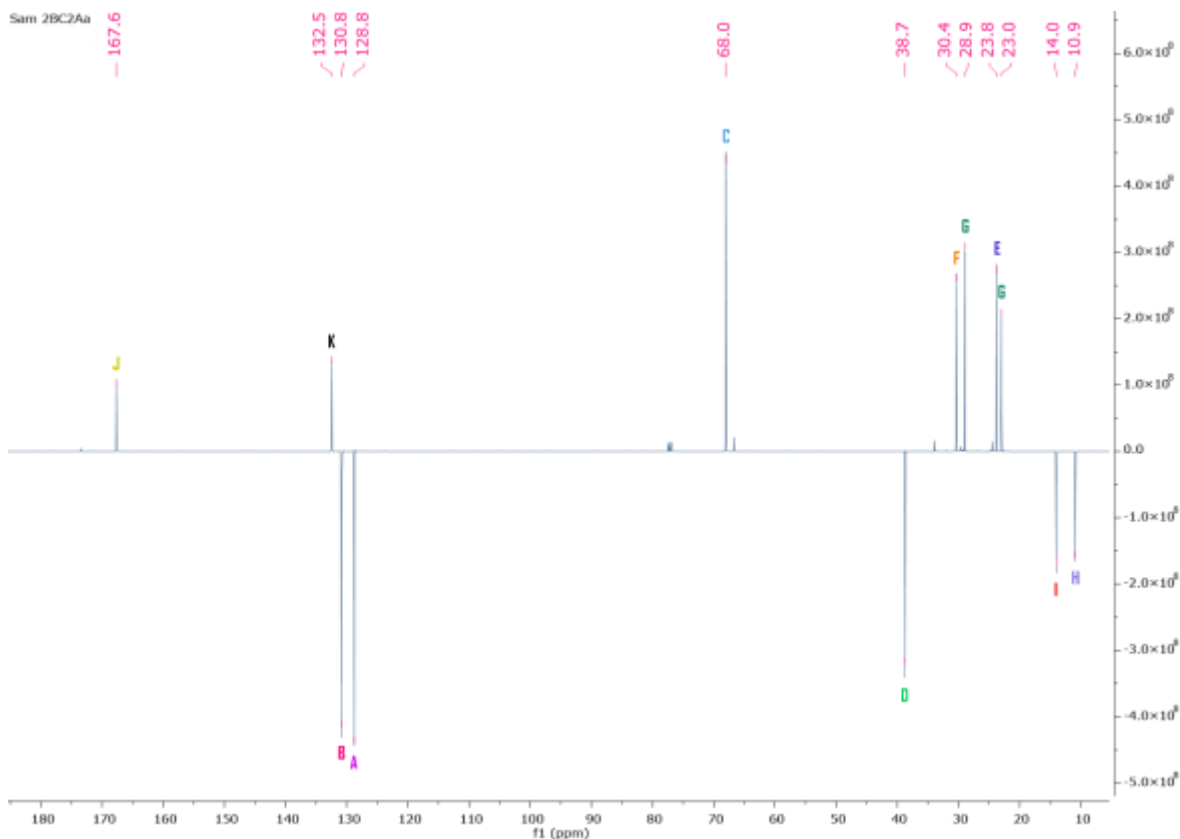
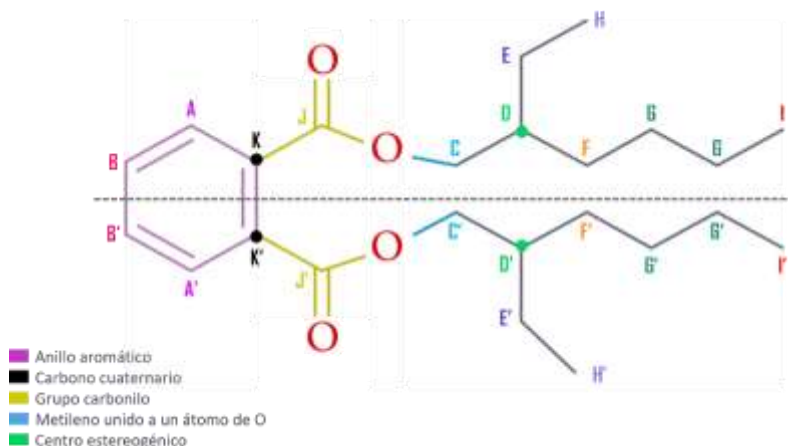


Figura 17. Espectro de RMN APT en $CDCl_3$ del compuesto 1 de *B. megaterium*.

En el espectro se observan un grupo de señales con orientación hacia arriba: la señal en 167.6 ppm corresponde a un grupo carbonilo ($C=O$) (marcado como J); en 132.5 ppm se aprecia una señal perteneciente a un carbono cuaternario (marcado como K); en 68.0 ppm se observa una señal que corresponde a un grupo metileno unido a un átomo de oxígeno (marcado como C); en 30.4 ppm, 28.9 ppm, 23.8 ppm y 23.0 ppm se observan cuatro señales las cuales corresponden a un grupo metileno cada una (marcadas como F, G, E y G). Por último, se encuentran un conjunto de señales orientadas hacia abajo: se observan tres señales en 130.8 ppm, 128.8 ppm y 38.7 ppm pertenecientes a un grupo metino cada una (marcadas como B, A y D); en 14.0 ppm y 10.9 se observan dos señales que corresponden a dos grupos metilos diferentes (marcadas como I y H).

De acuerdo con el análisis de la información obtenida de los espectros de RMN de 1D ^1H , ^{13}C , así como los espectros de RMN de 2D COSY y HSQC, se propone que el compuesto 1 presenta la siguiente estructura química (una molécula simétrica) correspondiente al ftalato de bis-(2-etilhexilo) (DEHP) (Esquema 5).

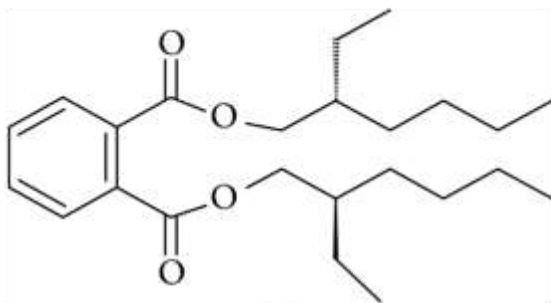


Esquema 5. Estructura del ftalato de bis-(2-etilhexilo) (DEHP).

Ya que la estructura del compuesto 1 presenta un centro estereogénico, supone que se trata de una molécula ópticamente activa. Mediante polarimetría se obtuvo la medición de la rotación óptica del compuesto. El valor obtenido fue de $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = -12.7$ (c 1.0, Hex), que de acuerdo con lo reportado en la literatura y por comparación de datos^{27, 37}, corresponde a una configuración absoluta R , por lo tanto, se concluye que el compuesto 1 es identificado como ftalato de bis- R -(2-etilhexilo) (DEHP).

CARACTERIZACIÓN COMPUESTO 1

Estructura del compuesto:



Nombre de identificación:

Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) (DEHP)

Fórmula empírica:

$C_{24}O_4H_{38}$

Peso molecular:

390.55792 g/mol

Rotación óptica:

$[\alpha]^{20}_D = -12.7$ (c 1.0, Hex)

Rendimiento:

10.92 % (86.97 mg/L)

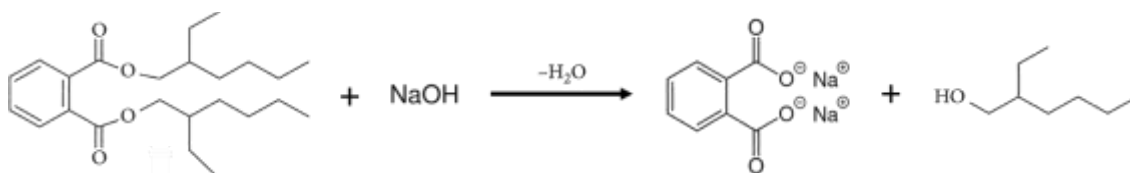
Características físicas:

Líquido de aspecto viscoso, incoloro e inodoro.

Tabla 5. Caracterización completa del compuesto 1 identificado como ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) (DEHP).

5.5 Hidrólisis del ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo)

En los antecedentes ya se mencionó que obtener el 2-etilhexanol de manera sintética implica una serie de etapas que pueden ser complicadas. Una buena propuesta podría ser obtener el 2-etilhexanol a partir del DEHP. Debido a que este compuesto fue obtenido en una cantidad considerable de manera natural a partir de la bacteria *B. megaterium*, se planteó realizar la hidrólisis del DEHP, con la cual se pretende romper el enlace C-O del grupo éster para dar lugar al anhídrido ftálico y el alcohol 2-etilhexanol (Esquema 6).



Esquema 6. Hidrólisis del ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) (DEHP).

Siguiendo la metodología reportada en la sección anterior a partir del compuesto ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) obtenido de manera natural de la bacteria *B. megaterium* se realizó la hidrólisis y se obtuvo el Compuesto 2 en forma líquida de aspecto aceitoso, incoloro con ligero olor penetrante con un rendimiento de 28.2 mg/100 mg (DEHP).

5.5.1 Fracción 2 (Compuesto 2)

Mediante la realización de estudios espectroscópicos de RMN se corroboró la estructura química del compuesto 2. Se obtuvieron sus espectros de RMN de 1D de ^1H y de ^{13}C , así como los experimentos de RMN de 2D COSY y HSQC, para el análisis de su estructura. A continuación, se presentan los espectros de RMN obtenidos del compuesto 2:

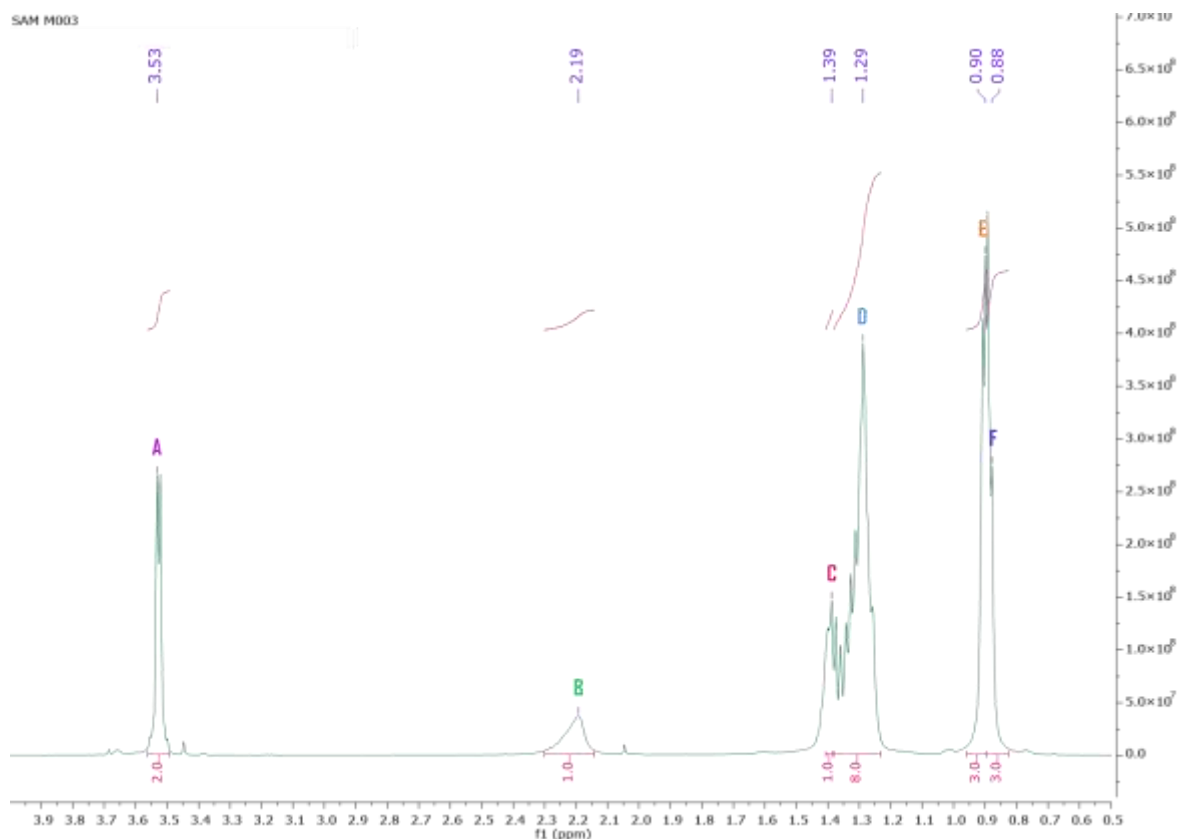


Figura 18. Espectro de RMN 1D de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del compuesto 2.

En el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz se observan seis señales diferentes (Figura 18). En 3.53 ppm se observa una señal doble de doble (marcada como A) que integra para dos hidrógenos. En 2.19 ppm se aprecia una señal ancha y

simple (marcada como B) que integra para un hidrógeno y que al ser ancha corresponde a un hidróxido (OH). En 1.39 ppm se observa una señal séptuple (marcada como C) que integra para un hidrógeno. En 1.29 ppm se observa una señal múltiple (marcada como D) (donde se encuentran cuatro señales empalmadas) que integra para ocho hidrógenos, indicando la presencia de cuatro metilenos. Por último, en 0.90 ppm y 0.88 ppm se observan dos señales dobles (marcadas como E y F) las cuales integran para tres hidrógenos cada una, correspondientes a dos metilos diferentes.

A diferencia del espectro del ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) las señales en la región de los aromáticos han desaparecido al igual que la señal de 4.22 ppm, apareciendo una señal en 3.53 ppm y la señal ancha de 2.19 ppm. Esto indica que la reacción de hidrólisis fue exitosa y se obtuvo el 2-etilhexanol.

Posteriormente se obtuvo un espectro de RMN de ^{13}C (Figura 19).

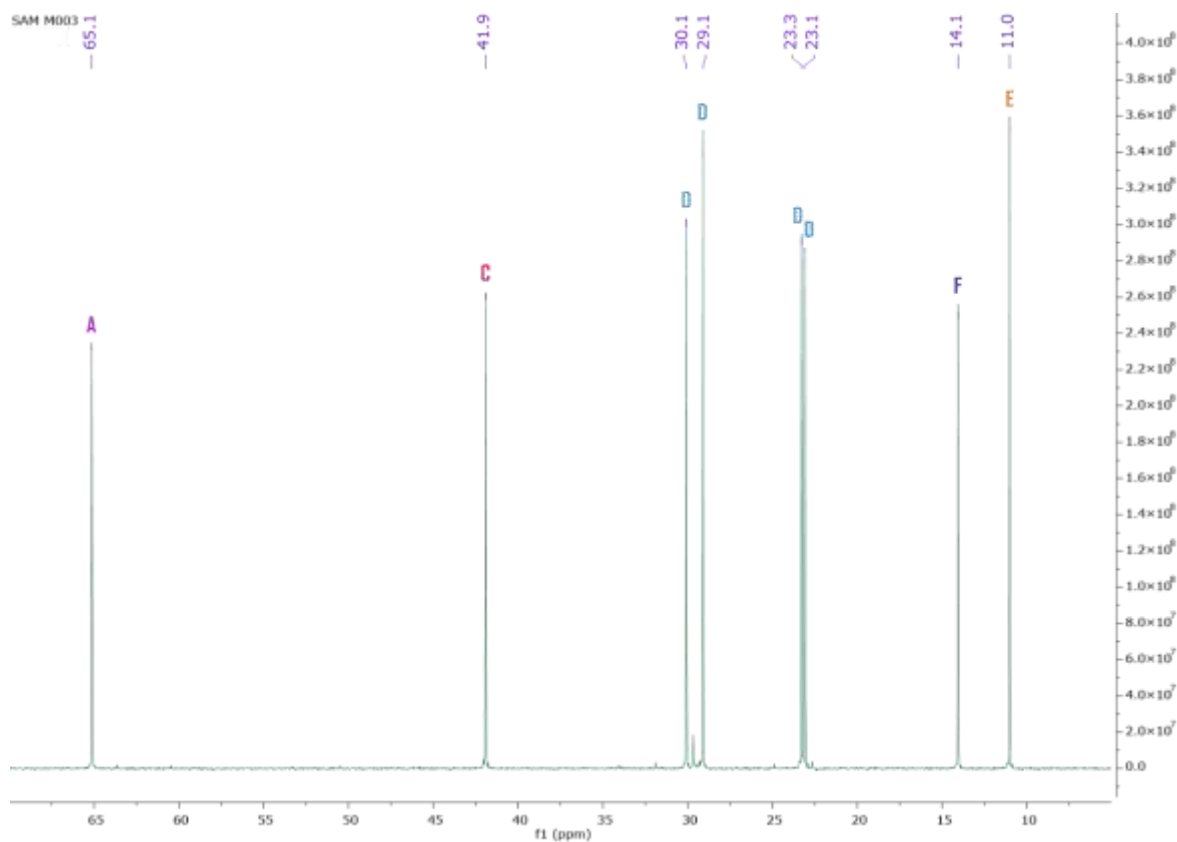


Figura 19. Espectro de RMN 1D de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del compuesto 2.

En el espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz se observan ocho señales diferentes. En 65.1 ppm se observa una señal correspondiente a un grupo metileno unido a un hidróxido correspondiente a un alcohol (marcado como A); en 41.9 ppm se observa una señal perteneciente a un carbono de un grupo metino (marcada como C); en un grupo de señales en: 30.1 ppm, 29.1 ppm, 23.3 ppm y 23.1 ppm se observan cuatro señales diferentes (marcadas como D) las cuales corresponden a carbonos de cuatro grupos metilenos diferentes. Por último, en 14.1 ppm y 11.0 se observan dos señales (marcadas como F y E) correspondientes a carbonos de dos grupos metilos diferentes.

Si se compara con el espectro de RMN de ^{13}C del ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) desaparecieron las señales de los carbonos aromáticos así como los carbonos cuaternarios y los grupos carbonilo, indicando que la ruptura fue exitosa.

También se obtuvo un espectro de RMN 2D COSY para percibir la correlación existente entre cada uno de los hidrógenos (Figura 20).

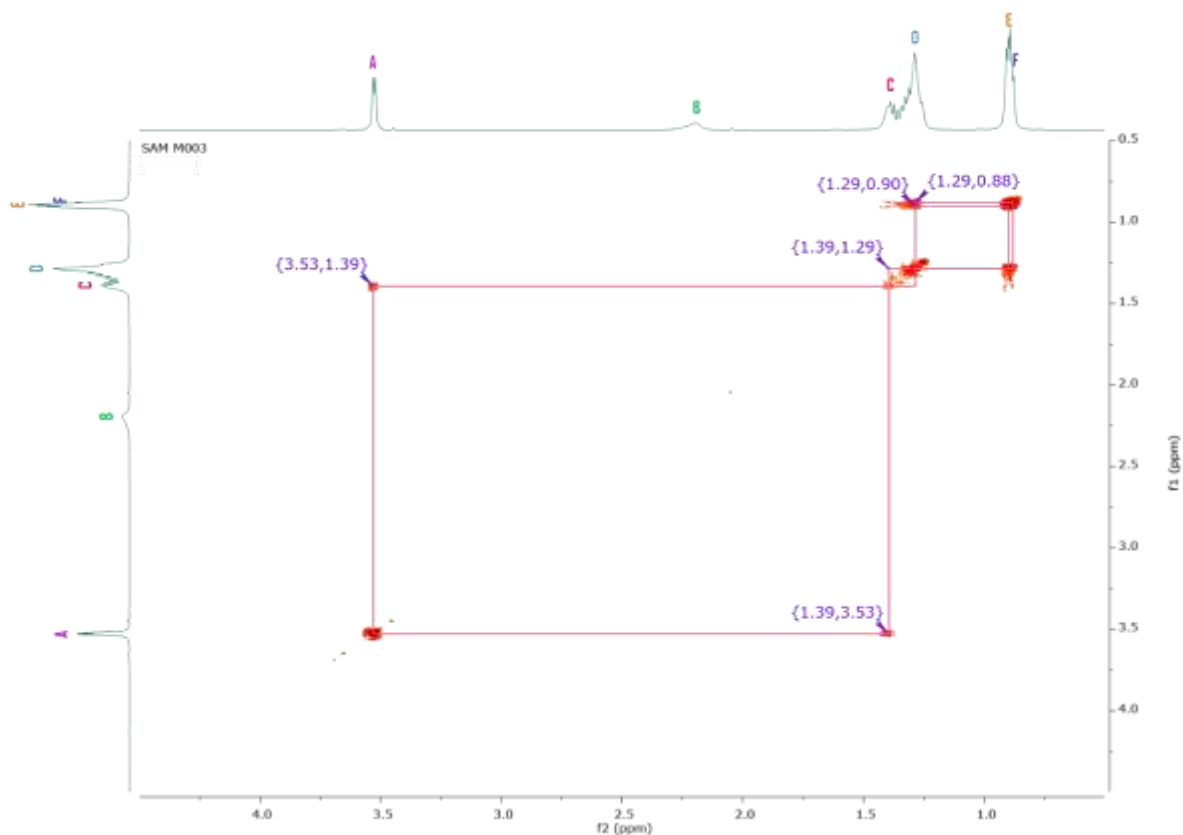


Figura 20. Espectro de RMN 2D COSY en CDCl_3 del compuesto 2.

Las señales en 3.53 ppm y 1.39 ppm (marcadas como A y C) se encuentran correlacionadas, infiriendo que el grupo metino se encuentra unido a un metileno ($\text{CH}_2\text{-CH}$). En 1.39 ppm y 1.29 ppm (marcadas como C y D) se correlacionan las señales, deduciendo que el grupo metino se encuentra unido a dos metilenos ($\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2$), lo cual indica que la señal en 1.39 ppm (marcada como C) es un centro estereogénico, señalando que el centro estereogénico se encuentra unido a un metileno (marcado como A) con hidrógenos diastereotópicos, el cual de acuerdo con su desplazamiento químico se encuentra enlazado a un hidróxido correspondiente a un alcohol ($\text{OH-CH}_2\text{-CH}$). Por último las correlaciones de las señales en 1.29 ppm y 0.90 ppm (marcadas como D y E) y las señales en 1.29 ppm y 0.88 ppm (marcadas como D y F), destacan la unión de dos grupos metileno distintos con un metilo para cada uno respectivamente ($\text{CH}_2\text{-CH}_3$).

Por último se obtuvo un espectro de RMN 2D HSQC para conocer la correlación entre los carbonos y los hidrógenos de la molécula (Figura 21).



Figura 21. Espectro de RMN 2D HSQC en CDCl_3 del compuesto 2.

La correlación que existe entre los hidrógenos (espectro de RMN de ^1H) con respecto a cada uno de los carbonos (espectro de RMN de ^{13}C) se resume a continuación en la Tabla 6.

CORRELACIÓN ENTRE LAS SEÑALES DEL ESPECTRO DE RMN DE ^1H Y DE ^{13}C			
SEÑAL	DESPLAZAMIENTO EN ^1H	DESPLAZAMIENTO EN ^{13}C	GRUPO FUNCIONAL
A	3.53 ppm	65.1 ppm	CH_2
B	2.19 ppm	—	OH
C	1.39 ppm	41.9 ppm	CH
D	1.29 ppm	30.1 ppm	CH_2
D	1.29 ppm	29.1 ppm	CH_2
D	1.29 ppm	23.3 ppm	CH_2
D	1.29 ppm	23.1 ppm	CH_2
E	0.90 ppm	11.0 ppm	CH_3
F	0.88 ppm	14.1 ppm	CH_3

Tabla 6. Correlación entre las señales del espectro de RMN de ^1H y de ^{13}C del compuesto 2.

Además se realizó un espectro de RMN APT para establecer que señales corresponden a los grupos CH, CH_2 y CH_3 (Figura 22).

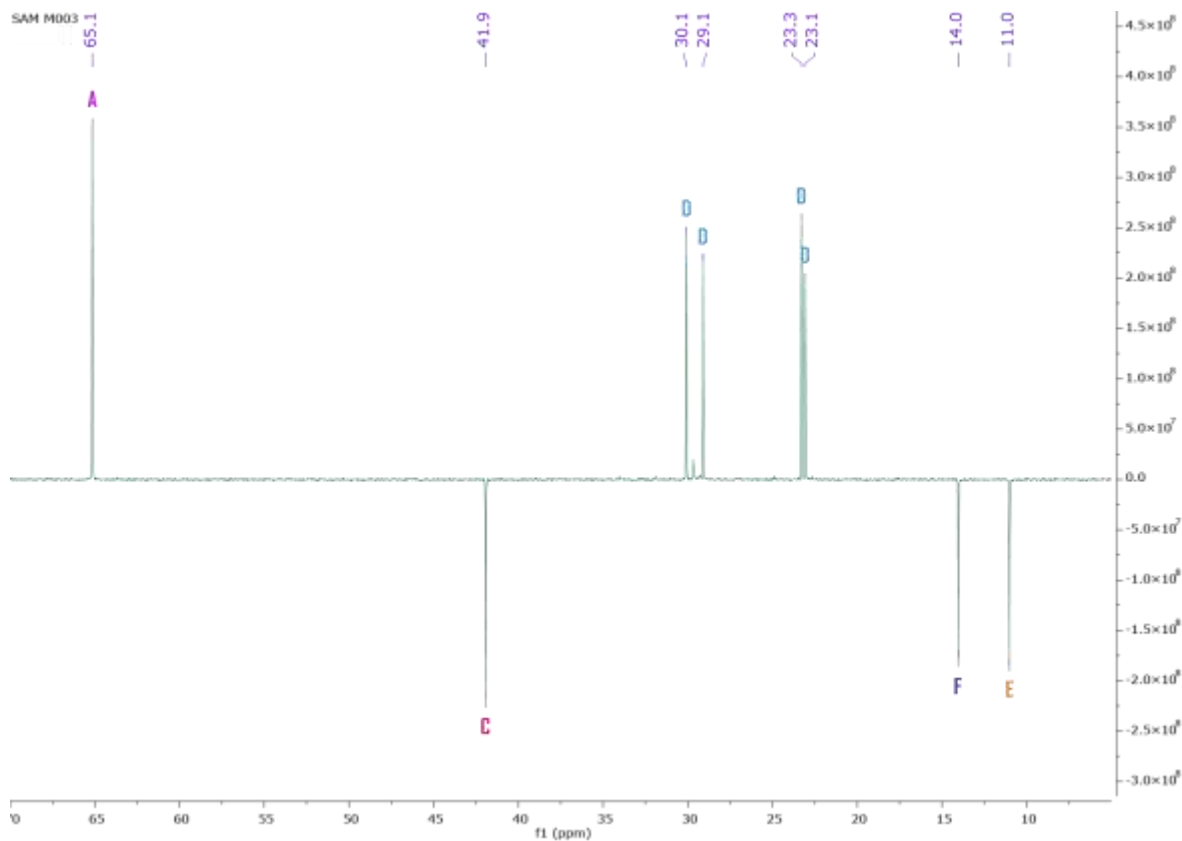
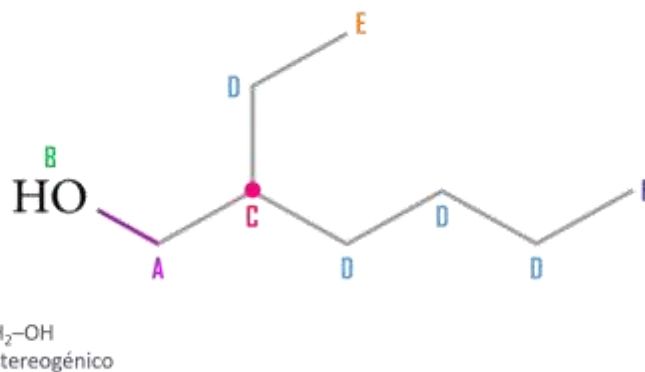


Figura 22. Espectro de RMN APT en $CDCl_3$ del compuesto 2.

En el espectro se observan un grupo de señales con orientación hacia arriba (señal positiva): la señal en 65.1 ppm pertenece a un grupo metileno unido a un hidróxido correspondiente a un alcohol (marcada como A); en 30.1 ppm, 29.1 ppm, 23.3 ppm y 23.1 ppm se aprecian cuatro señales correspondientes a un grupo metileno cada una (marcadas como D). Por último, se encuentran un conjunto de señales orientadas hacia abajo (señal negativa): se observan una señal en 41.9 ppm perteneciente a un grupo metino (marcadas como C); en 14.1 ppm y 11.0 se observan dos señales que corresponden a dos grupos metilos diferentes (marcadas como F y E).

Concluido el análisis de la información obtenida de los estudios espectroscópicos de RMN de 1D 1H , ^{13}C , en conjunto con los espectros de RMN de 2D COSY y HSQC, se determinó que el compuesto 2 presenta una estructura química correspondiente al 2-etilhexanol (Esquema 7).



Esquema 7. Estructura del 2-etilhexanol.

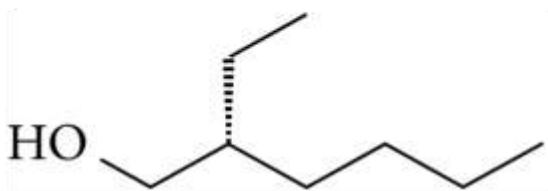
Debido a que la estructura del compuesto 2 presenta un centro estereogénico, se deduce que es una molécula ópticamente activa y debido a que proviene del compuesto quiral ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) se esperaría que conservara la misma configuración absoluta.

A través de la técnica de polarimetría se determinó el ángulo de rotación óptica del compuesto, obteniendo un valor de rotación óptica de $[\alpha]^{20}_D = -1.6$ (*c* 1.0, CH₂Cl₂).

La rotación óptica reportada en la literatura para este alcohol es de $[\alpha]^{22}_D = -2.0$ (*c* 1.0, CH₂Cl₂), por lo cual la asignación de la configuración es correcta y el compuesto 2 es identificado como (*R*)-2-etil-1-hexanol. ²⁷

CARACTERIZACIÓN COMPUESTO 2

Estructura del compuesto:



Nombre de identificación:

(R)-2-etil-1-hexanol

Fórmula empírica:

C₈H₁₈O

Peso molecular:

130.22812 g/mol

Rotación óptica:

$[\alpha]_D^{20} = -1.6$ (c 1.0, CH₂Cl₂)

Rendimiento:

28.2 % (28.2 mg/100 mg (DEHP))

Características físicas:

Líquido de aspecto aceitoso, incoloro con ligero olor penetrante.

Tabla 7. Caracterización completa del compuesto 2 identificado como (R)-2-etil-1-hexanol.

5.6 Pruebas biológicas

Las pruebas de sensibilidad o antibiogramas determinan la susceptibilidad o resistencia que pueda ser capaz de presentar un microorganismo frente a un agente antimicrobiano, mediante la exposición de este ante una concentración estandarizada del compuesto antimicrobiano.

La actividad antimicrobiana y antifúngica de cada compuesto, anteriormente purificado y caracterizado, se evaluó a través de pruebas biológicas.

5.6.1 Antibiograma en bacterias

Se realizó un bioensayo (antibiograma) de cada uno de los compuestos (1 y 2) aislados, a diferentes concentraciones, contra las bacterias Gram-positivas: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Streptococcus agalactiae*, y las bacterias Gram-negativas:

Escherichia coli, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella sp.*, *Serratia sp.*, *Shigella sp.* y *Vibrio parahaemolyticus*.

Los antibiogramas se realizaron bajo la técnica de Kirby-Bauer (o método de difusión en agar). A las 24 horas de incubación se efectuó la lectura de los halos de inhibición, arrojando los resultados que se muestran en la Tabla 8 para bacterias Gram-positivas y la Tabla 9 para bacterias Gram-negativas.

ANTIBIOGRAMA EN BACTERIAS GRAM-POSITIVAS								
BACTERIA	COMPUESTO 1 Ftalato de bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo)				COMPUESTO 2 (<i>R</i>)-2-etil-1-hexanol			
	0.45 mg		0.75 mg		0.45 mg		0.75 mg	
	I	HI (mm)	I	HI (mm)	I	HI (mm)	I	HI (mm)
<i>L. monocytogenes</i>	R	0	R	0	R	0	BE	18
<i>B. cereus</i>	R	0	R	0	R	0	BE	19
<i>S. aureus</i>	R	0	R	0	R	0	BE	34
<i>S. saprophyticus</i>	R	0	R	0	R	0	B	9
<i>S. agalactiae</i>	R	0	BE	8	R	0	R	0

Tabla 8. Resultados del antibiograma en bacterias Gram-positivas. Interpretación (I), Halo de inhibición (HI), Resistente (R), Bacteriostático (BE), Bactericida (B).

Respecto a las bacterias Gram-positivas, el ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) (compuesto 1) y el (*R*)-2-etil-1-hexanol (compuesto 2), ambos con una concentración de 0.45 mg en cada sensidisco (F1 y A1), no mostraron ningún tipo actividad inhibitoria contra el crecimiento de ninguna de la bacterias Gram-positivas. Ante una concentración de 0.75 mg por sensidisco (F2 y A2), el compuesto 1 presenta una pequeña inhibición de tipo bacteriostática ante *S. agalactiae*, mientras que en el compuesto 2 se observa una inhibición de tipo bacteriostática en *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *S. aureus* (en la cual se aprecia una mayor actividad bacteriostática) y actividad bactericida frente a *S. saprophyticus*. El resto de las bacterias presentan actividad resistente contra ambos compuestos. (Figura 23)

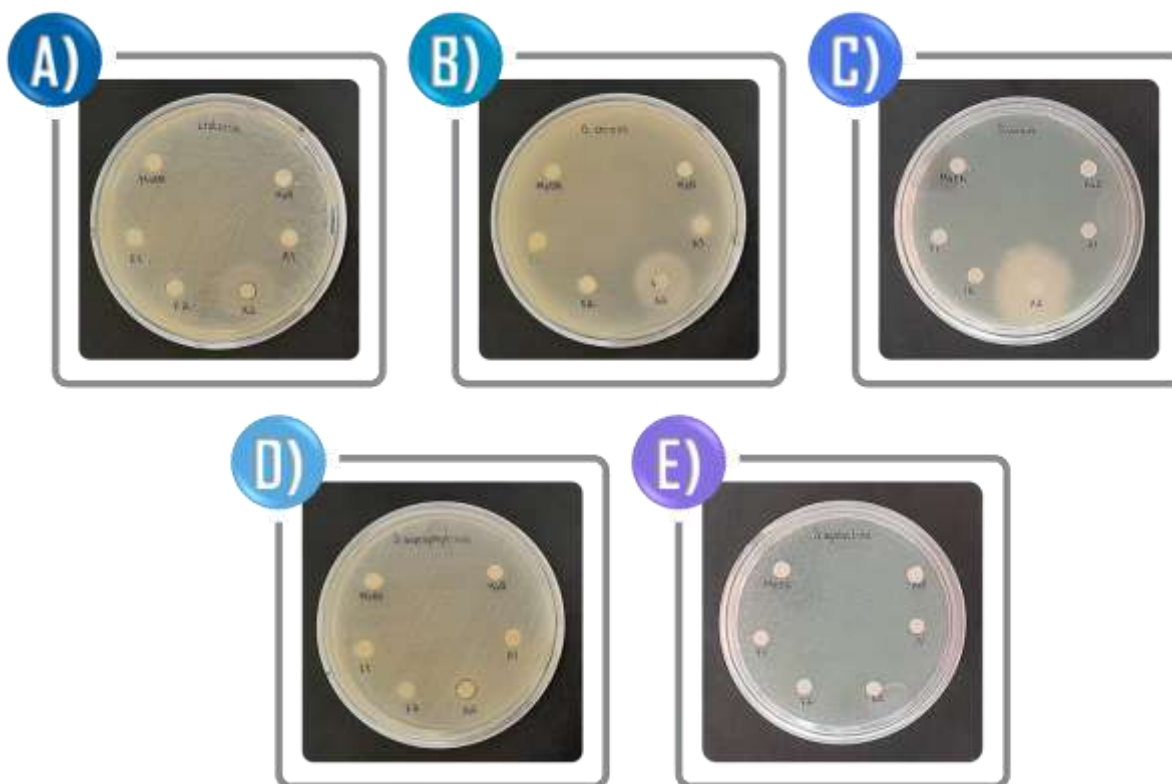


Figura 23. Antibiograma en bacterias Gram-positivas. A) *L. monocytogenes*; B) *B. cereus*; C) *S. aureus*; D) *S. saprophyticus*; E) *S. agalactiae*.

ANTIBIOGRAMA EN BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS								
BACTERIA	COMPUESTO 1 Ftalato de bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo)				COMPUESTO 2 (<i>R</i>)-2-etil-1-hexanol			
	0.45 mg		0.75 mg		0.45 mg		0.75 mg	
	I	HI (mm)	I	HI (mm)	I	HI (mm)	I	HI (mm)
<i>E. coli</i>	R	0	R	0	R	0	B	11
<i>K. pneumoniae</i>	R	0	R	0	R	0	R	0
<i>P. aeruginosa</i>	R	0	R	0	R	0	R	0
<i>Salmonella sp.</i>	R	0	BE	8	R	0	B	10
<i>Serratia sp.</i>	R	0	R	0	R	0	R	0
<i>Shigella sp.</i>	R	0	BE	8	R	0	B	7
<i>V. parahaemolyticus</i>	R	0	R	0	R	0	B	9

Tabla 9. Resultados del antibiograma en bacterias Gram-negativas. Interpretación (I), Halo de inhibición (HI), Resistente (R), Bacteriostático (BE), Bactericida (B).

Respecto a las bacterias Gram-negativas, el compuesto 1 y compuesto 2 a una concentración de 0.45 mg por sensidisco (F1 y A1), no presentaron ningún tipo

actividad inhibitoria contra ninguna de las bacterias Gram-negativas. A una concentración de 0.75 mg por sensidisco (F2 y A2), en el compuesto 1 se puede observar la presencia de actividad bacteriostática frente a *Salmonella sp.* y *Shigella sp.*, el compuesto 2 se comporta como un agente bactericida contra *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* y *V. parahaemolyticus*. El resto de las bacterias Gram-negativas no muestra ningún tipo de actividad inhibitoria contra el crecimiento bacteriano. (Figura 24)

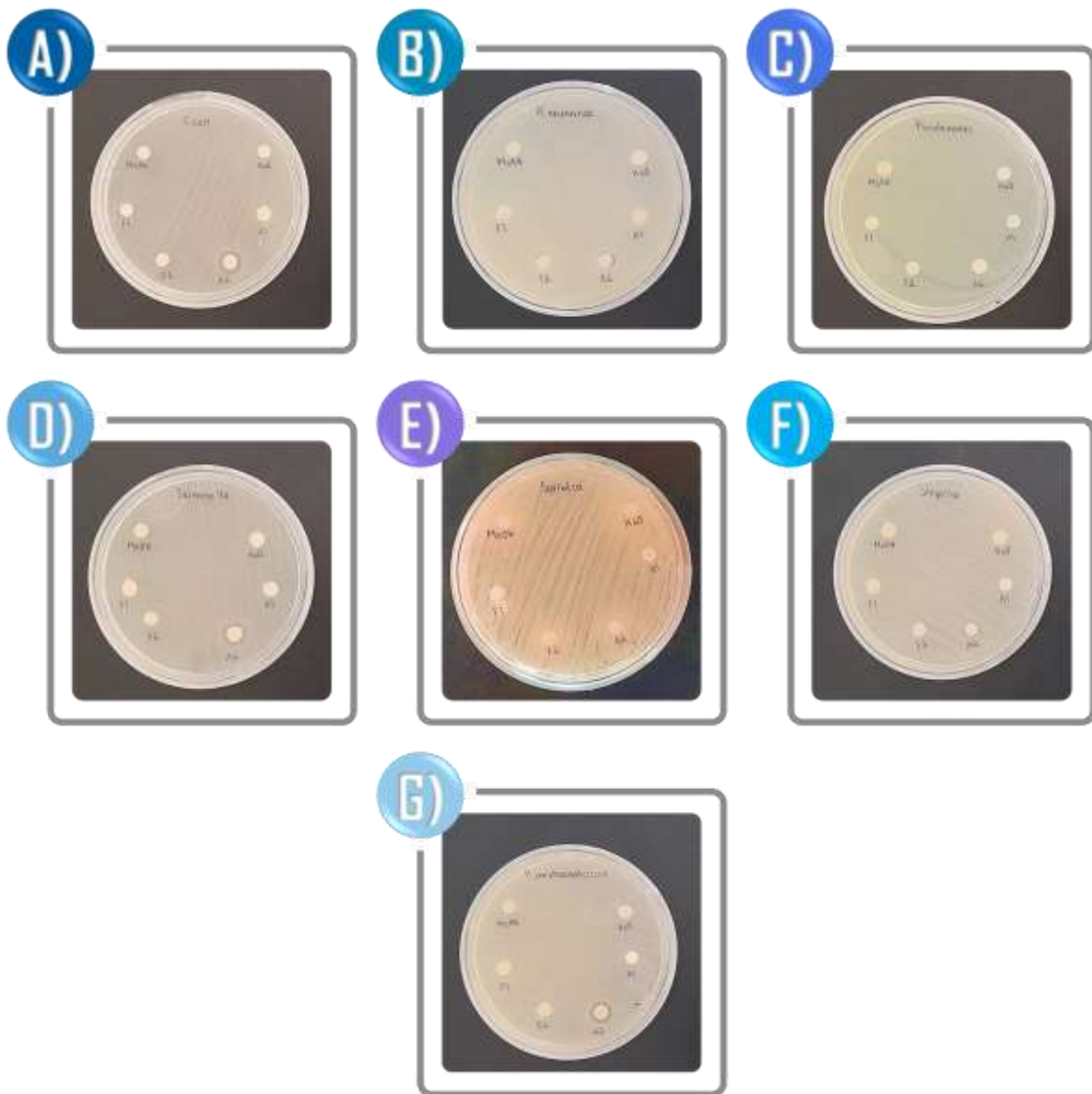


Figura 24. Antibiograma en bacterias Gram-negativas. A) *E. coli*; B) *K. pneumoniae*; C) *P. aeruginosa*; D) *Salmonella sp.*; E) *Serratia sp.*; F) *Shigella sp.*; G) *V. parahaemolyticus*.

5.6.2 Bioensayo en hongos fitopatógenos

El bioensayo se realizó en hongos fitopatógenos que se ven implicados de manera negativa en el crecimiento de plantas de importancia dentro de la industria alimentaria.

El bioensayo para evaluar el efecto antifúngico pretende comparar la reducción en el crecimiento de cada uno de los hongos frente a un agente antifúngico contra una muestra blanco, lo que permite medir la capacidad antifúngica de un compuesto.

Las pruebas biológicas (bioensayo) para evaluar la capacidad de inhibición de cada uno de los compuestos obtenidos (compuestos 1 y 2), se realizó contra los hongos fitopatógenos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani* y *Mucor sp.*, a una concentración de 1 mg/mL. La lectura se realizó a las 24 y 48 horas, determinando el porcentaje de inhibición. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10.

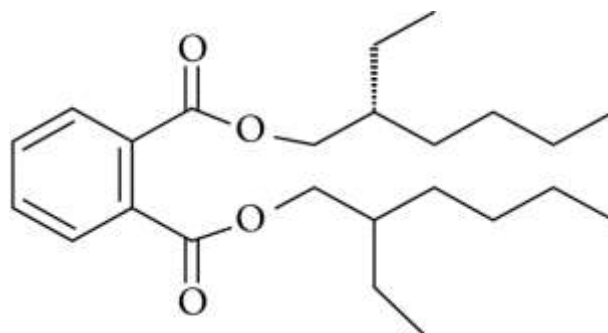
BIOENSAYO EN HONGOS FITOPATÓGENOS				
HONGO FITOPATÓGENO	COMPUESTO 1 Ftalato de bis- <i>R</i> -(2-etilhexilo)		COMPUESTO 2 (<i>R</i>)-2-etil-1-hexanol	
	1 mg/mL		1 mg/mL	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
<i>A. flavus</i>	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %
<i>A. niger</i>	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %
<i>F. solani</i>	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %
<i>Mucor sp.</i>	0.0 %	0.0 %	0.0 %	0.0 %

Tabla 10. Resultados del bioensayo en hongos fitopatógenos.

El compuesto 1 y compuesto 2 a una concentración de 1 mg/mL, no presentaron ningún tipo actividad antifúngica contra ninguno de los hongos fitopatógenos evaluados.

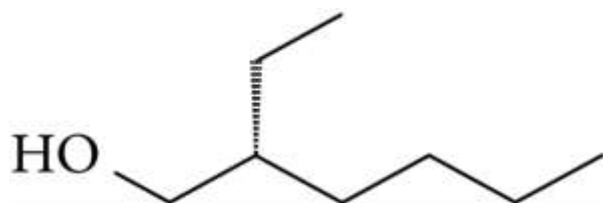
6. Conclusiones

- Se obtuvo un extracto crudo a partir de un cultivo en caldo LB modificado de la cepa ELI24 identificada como *Bacillus megaterium*, a través de una extracción con acetato de etilo, con un rendimiento de 796 mg/L.
- Se separó y purificó del extracto crudo un compuesto de interés, mediante cromatografía en columna de gel de sílice.
- Se logró identificar y caracterizar por medio de estudios espectroscópicos y polarimetría al ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) (DEHP) como un compuesto natural aislado de la bacteria *B. megaterium*.



Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) (DEHP)

- Se logró obtener (*R*)-2-etil-1-hexanol enantioméricamente puro de manera rápida y eficaz a partir del ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo) (DEHP), el cual fue producido naturalmente por *B. megaterium*, mediante una reacción de hidrólisis.



(*R*)-2-etil-1-hexanol

- La obtención del 2-etilhexanol a partir de un producto natural, como los microorganismos, en este caso una bacteria, resulta más eficaz que la síntesis orgánica.
- Se realizaron pruebas biológicas de inhibición frente a bacterias y hongos fitopatógenos, de los compuestos orgánicos aislados, los cuales demostraron tener diferentes efectos de inhibición bacteriana pero no presentaron actividad fungicida.
- Se realizó un antibiograma en bacterias evaluando la capacidad de inhibición del DEHP, a una concentración de 0.45 mg/mL no mostro actividad inhibitoria contra bacterias Gram-positivas ni Gram-negativas. A una concentración de 0.75 mg/mL en bacterias Gram-positivas presenta inhibición de tipo bacteriostática ante *S. agalactiae*. En bacterias Gram-negativas se observa actividad bacteriostática frente a *Salmonella sp.* y *Shigella sp.*
- La capacidad de inhibición del (*R*)-2-etil-1-hexanol al realizar un antibiograma en bacterias, a una concentración de 0.45 mg/mL no mostro ningún tipo de inhibición contra bacterias Gram-positivas ni Gram-negativas. A una concentración de 0.75 mg/mL en bacterias Gram-positivas presenta inhibición de tipo bacteriostática ante *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *S. aureus* y actividad bactericida frente a *S. saprophyticus*. En bacterias Gram-negativas presenta actividad bactericida contra *E. coli*, *Salmonella sp.*, *Shigella sp.* y *V. parahaemolyticus*.
- Se realizó un bioensayo en los hongos fitopatógenos *A. flavus*, *A. niger*, *F. solani* y *Mucor sp.*, a una concentración de 1 mg/mL. Ninguno de los compuestos evaluados (DEHP y (*R*)-2-etil-1-hexanol) presentaron actividad antifúngica contra ninguno de los hongos fitopatógenos.

7. Bibliografía

1. Garcia-Galaz, A., Gutiérrez-Millán, L. E., Acedo-Félix, E., Burgos-Hernández, A., López Torres, M., Valdés-Covarrubias, M., & Burboa-Zazueta, M. G. (2013). Las algas y otros organismos marinos como fuente de moléculas bioactivas. *Biotecnia*, 15(1), 25-32.
2. Hounsome, N., Hounsome, B., Tomos, D., & Edwards-Jones, G. (2008). Plant metabolites and nutritional quality of vegetables. *Journal of food science*, 73(4), 48-65.
3. Lustre Sánchez, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria*. 23(2).
4. Sansinenea, E., & Ortiz, A. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology lett*, 33, 1523–1538.
5. Karlovsky, P. (2008). *Secondary metabolites in soil ecology*. Springer Berlin Heidelberg, 1-19.
6. Microbiology. (2022). *Industrial Microbiology: Primary and Secondary Metabolites*. Boundless. Biology. LibreTexts. Recuperado de: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology\(Boundless\)/17%3A_Industrial_Microbiology](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Microbiology(Boundless)/17%3A_Industrial_Microbiology)
7. Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2019). Chemical compounds produced by *Bacillus* sp. factories and their role in nature. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 19(5), 373–380.
8. Guiño, M. (2010). Introduction: Biochemistry, Physiology and Ecological Functions of Secondary Metabolites. *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism, Second Edition*, 1-19.
9. García, A. Á., & Carril, E. P. U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
10. Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2020). Succinic acid production as secondary metabolite from *Bacillus megaterium* ELI24. *The Natural Products Journal*, 10(2), 153-157.

11. Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., & Whitman, W. B. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3*. Springer Science & Business Media, 3.
12. Vázquez, G. (1999). Análisis genético y bioquímico del metabolismo del poli (3-hidroxibutirato) (PHB) en *Bacillus megaterium*. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
13. Buitrago Villamil, J. D. (2018). Evaluación del impacto de la inoculación de *Bacillus megaterium* en suelos nitrificados de dos unidades ganaderas del Valle de Ubaté y Chiquinquirá, como mecanismo preventivo para disminuir la intoxicación por nitratos del ganado lechero. Tesis, Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente.
14. Holland I. B. (1961). The purification and properties of megacin, a bacteriocin from *Bacillus megaterium*. *The Biochemical journal*, 78(3), 641–648.
15. Lisboa, MP, Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, JA y Brandelli, A. (2006). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *Int Microbiol*, 9(2), 111-118.
16. Khalil, R., Djadouni, F., Elbahloul, Y., & Omar, S. (2009). The influence of cultural and physical conditions on the antimicrobial activity of bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 22 strain. *African J Food Sci*, 3(1), 011-022.
17. Moreno, S. A. S., Montoya, M. A. M., Martínez, A. L. M., & Pérez, M. D. S. Y. (2012). Identificación de bacterias productoras de polihidroxicanoatos (PHAs) en suelos contaminados con desechos de fique. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 89-100.
18. Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria. (2019). Ftalatos en materiales en contacto con los alimentos. Recuperado de: <https://acsa.gencat.cat/es/actualitat/butlletins/acsa-brief/ftalats-en-materials-en-contacte-amb-aliments/>

19. Rowdhwal, S. S. S., & Chen, J. (2018). Toxic effects of Di-2-ethylhexyl phthalate: An overview. *BioMed Research International*, 1–10.
20. Torres, R. M., Álvarez, J. C. D., Prado, B., & Cisneros, B. J. (2012). Retención de 4-nonilfenol y di (2-etilhexil) ftalato en suelos del Valle de Tula, Hidalgo, México. *Tecnología y ciencias del agua*, 3(4), 113-126.
21. Sejidov, F. T., Mansoori, Y., & Goodarzi, N. (2005). Esterification reaction using solid heterogeneous acid catalysts under solvent-less condition. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 240(1-2), 186-190.
22. Skrzypek, J., Lachowska, M., Kulawska, M., & Moroz, H. (2008). Synthesis of bis (2-ethylhexyl) phthalate over methane sulfonic acid catalyst. Kinetic investigations. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, 93, 281-286.
23. Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2018). Di-2-ethylhexylphthalate may be a natural product, rather than a pollutant. *Journal of Chemistry*.1-7.
24. Castro Gutiérrez, M. (2021). Identificación de productos naturales de *Bacillus thuringiensis* con actividad. Tesis Doctoral, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Área de Química Orgánica, Posgrado en Ciencias Químicas.
25. Mioso, R. (2010). Productos naturales de *Schizochytrium aggregatum*, *Paecilomyces variotii* y *Penicillium roqueforti*, hongos de interés acuícola. Tesis Doctoral, Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Departamento de Biología.
26. Muñoz, M. E. F. (2019). Estudio de la migración del ftalato di-(2-etilhexil) ftalate (DEHF) en botellas PET al agua embotellada consumida en la ciudad de Cuenca. Tesis de Maestría, Universidad de Cuenca.
27. Castro, M., Jiménez, J., Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2020). Di[(R)-2-ethylhexyl] phthalate, a bioactive metabolite first isolated from three different *Bacillus* species, and its synthesis. *Letters in Organic Chemistry*, 17(2), 90–95.
28. El-Sayed, M. H. (2012). Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from the culture filtrate of newly isolated soil *Streptomyces* (*Streptomyces mirabilis* strain NSQu-25). *World Applied Sciences Journal*, 20(9), 1202-1212.

29. Amade, P., Mallea, M. y Bouaicha, N. (1994). Isolation, structural identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartory. *The journal of antibiotic*. 47 (2), 201-207.
30. El-Sayed, O. H., Asker, M. M., Shash, S. M., & Hamed, S. R. (2015). Isolation, structure elucidation and biological activity of Di-(2-ethylhexyl) phthalate produced by *Penicillium janthinellum* 62. *International Journal of ChemTech Research*, 8(1), 58-66.
31. Lotfy, M. M., Hassan, H. M., Hetta, M. H., El-Gendy, A. O., & Mohammed, R. (2018). Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, a major bioactive metabolite with antimicrobial and cytotoxic activity isolated from River Nile derived fungus *Aspergillus awamori*. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(3), 263-269.
32. Habib, M. R., & Karim, M. R. (2009). Antimicrobial and cytotoxic activity of di-(2-ethylhexyl) phthalate and anhydrosophoradiol-3-acetate isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) flower. *Mycobiology*, 37(1), 31-36.
33. Liu, S., Xie, C., Yu, S., Liu, F., & Song, Z. (2011). Hydrogenation of 2-ethylhexenal using thermoregulated phase-transfer catalyst for production of 2-ethylhexanol. *Industrial & engineering chemistry research*, 50(4), 2478-2481.
34. Niklasson, C., & Smedler, G. (1987). Kinetics of adsorption and reaction for the consecutive hydrogenation of 2-ethylhexenal on a nickel/silica catalyst. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 26(3), 403-410.
35. Li, S., Zhang, J., An, H., Wang, G., Zhao, X., & Wang, Y. (2021). NiO-MnO₂/Nb₂O₅-TiO₂ catalyzed reaction integration of butanal self-condensation and successive hydrogenation and its kinetics. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 96(6), 1553-1560.
36. Miao, S., An, H., Zhao, X., & Wang, Y. (2018). Catalytic performance of Cu-Mg-Al in the one-step synthesis of 2-ethylhexanol from n-butylaldehyde. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 125, 773-788.

37. Semenov, A. A., Enikeev, A. G., Snetkova, L. V., Permyakov, A. V., Sokolova, N. A., & Dudareva, L. V. (2016). Ortho-phthalic acid esters in lipophilic extract from the cell culture of *Aconitum baicalense* Turcz ex Rapaics 1907. In *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 471, 421-422.

8. Anexos

Para el crecimiento de la cepa ELI24, identificada como *Bacillus megaterium*, se evaluaron los medios de cultivo líquidos: Luria Bertani (LB), Luria Bertani Modificado (LB modificado) y Tripticaseína de Soya (TSB).

Se analizaron dos métodos de extracción diferentes (en cada uno de los medios de cultivo anteriormente mencionados) para obtener un extracto crudo de la cepa ELI24. El primero se realizó con acetato de etilo (C₄H₈O₂), el segundo fue efectuado con una resina conocida como Amberlita XAD16. Los rendimientos obtenidos del extracto crudo se observan en la Tabla 11.

COMPARACIÓN ENTRE LOS RENDIMIENTOS OBTENIDOS DEL EXTRACTO CRUDO DE LA CEPA ELI24 CON DIVERSOS MEDIOS DE CULTIVO Y DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN		
MEDIO DE CULTIVO	EXTRACTO CRUDO DE LA CEPA ELI24	
	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	
	ACETATO DE ETILO (C ₄ H ₈ O ₂)	AMBERLITA XAD16
	RENDIMIENTO (mg/L)	RENDIMIENTO (mg/L)
Caldo Luria Bertani (LB)	382	343
Caldo Luria Bertani Modificado (LB modificado)	796	735
Caldo Tripticaseína de Soya (TSB)	378	594

Tabla 11. Comparación entre los rendimientos del extracto crudo de la cepa ELI24. Peso (mg/L) de cada uno de los rendimientos obtenidos de extracto crudo de la cepa ELI24, con diversos medios de cultivo y diferentes métodos de extracción.

A partir de los extractos crudos obtenidos se evaluó en cual se tuvo un mejor rendimiento de Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo).

COMPARACIÓN ENTRE LOS RENDIMIENTOS OBTENIDOS DEL Ftalato de bis-R-(2-etilhexilo) CON DIVERSOS MEDIOS DE CULTIVO Y DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN		
MEDIO DE CULTIVO	Ftalato de bis-R-(2-etilhexilo)	
	MÉTODO DE EXTRACCIÓN	
	ACETATO DE ETILO (C ₄ H ₈ O ₂)	AMBERLITA XAD16N
	RENDIMIENTO (mg/L)	RENDIMIENTO (mg/L)
Caldo Luria Bertani (LB)	3.12	2.8
Caldo Luria Bertani Modificado (LB modificado)	86.97	79.32
Caldo Soya Trypticaseína (TSB)	0.79	0.92

Tabla 12. Comparación entre los rendimientos del Ftalato de bis-R-(2-etilhexilo), aislado de la cepa ELI24. Peso (mg/L) de cada uno de los rendimientos obtenidos del Ftalato de bis-R-(2-etilhexilo), aislado de la cepa ELI24, con diversos medios de cultivo y diferentes métodos de extracción.

Tal y como se muestra en la Tabla 12, se evidencia que para obtener un mejor rendimiento de Ftalato de bis-R-(2-etilhexilo), el mejor medio de cultivo utilizado fue Luria Bertani Modificado (LB modificado), empleando acetato de etilo (C₄H₈O₂) como método de extracción.