BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Extracción e identificación de productos naturales a partir de la bacteria *Bacillus mycoides*

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

Q.F.B. YHARELY HERRERA NUÑEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ESTIBALIZ SANSINENEA ROYANO

ASESOR DE TESIS: DR. JOSÉ AURELIO ORTIZ MARQUEZ

PUEBLA, PUE. JUNIO DE 2023

—Cuando le escucho explicar sus razonamientos —comenté—, todo me parece
tan ridículamente simple que yo mismo podría haberlo hecho con facilidad;
y, sin embargo, siempre que le veo razonar me quedo perplejo hasta que
me explica usted el proceso. A pesar de que considero que mis ojos
ven tanto como los suyos.
—Desde luego —respondió, encendiendo un cigarrillo y
dejándose caer en una butaca—. Usted ve, pero no observa.
La diferencia es evidente.
Arthur Conan Doyle, LAS AVENTURAS DE SHERLOCK HOLMES

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología Microbiana y Síntesis Orgánica del posgrado en Ciencias químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), bajo la dirección de la Dra. Estibaliz Sansinenea Royano y Dr. J. Aurelio Ortíz Márquez, con el apoyo de la beca Nacional otorgada por CONACyT.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....1

RESUMEN.....3

ABSTRACT.....5

1. INTRODUCCIÓN.....7

2. ANTECEDENTES.....11
2.1 La Química Orgánica en la obtención de Productos Naturales.....11
2.2 La agricultura y el uso de biofungicidas.....12
2.3 *Bacillus sp.,* como Agente de Control Biológico.....14
2.4 Familia de *Bacillus*.....14
2.5 Metabolismo secundario como fuente de moléculas antibactericidas y antifúngicas.....15
2.6 Productos Naturales obtenidos de *Bacillus spp*.....18

3. OBJETIVO GENERAL.....26

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....26

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....27
4.1 Crecimiento de la cepa *Bacillus mycoides* Aca 5 Eli 220.....28
4.2 Extracción de PN.....28
4.3 Fraccionamiento General.....29
4.4 Purificación.....31
4.5 Identificación y Elucidación.....34
4.6 Pruebas biológicas de inhibición.....49

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....54

6. CONCLUSIONES.....60

7. BIBLIOGRAFÍA.....62

ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AG	Ácidos grasos
APT	Prueba de Protones Adjuntos
ARN	Ácido Ribonucleico
BCA	Agente de Control Biológico
br. S	Señal simple ancha
$CDCl_3$	Cloroformo Deuterado
COSY	Correlación espectroscópica homonuclear
DCM	Diclorometano
DCP's	Dicetopiperazina
dd	Señal doble de dobles
EI-MS	Espectroscopía de Masas por Impacto Electrónico
EPA	Agencia de Protección Ambiental
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g	Gramo
h	Hora
Hex	Hexano
HMBC	Conectividad Heteronuclear a Enlaces Múltiples
HR-MS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
HSQC	Espectroscopía de Correlación Heteronuclear de un Único Cuanto
Hz	Hertzios
IRS	Resistencia Sistémica Inducida
J	Constante de acoplamiento
kDa	Kilodalton
L	Litro
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LMB	Laboratorio de Biotecnología Microbiana
m	Señal múltiple
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Mega Hertzios

mL	Mililitro
mm	Milimetro
pf	Punto de fusión
nm	Nanómetro
NRPS	Sintetizador de Péptidos no Ribosomales
ºC	Grados Celsius
PDA	Agar Papa Dextrosa
pH	Potencial de Hidrógeno
PM	Peso molecular
PN	Producto Natural
ppm	Partes por millón
RMN 1D	Resonancia Magnética Nuclear de una dimensión
RMN 2D	Resonancia Magnética Nuclear de dos dimensiones
rpm	Revoluciones por minuto
SAR	Resistencia Sistémica Adquirida
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
t	Señal triple
T	Temperatura
TLC	Cromatografía en Placa Fina
UFC	Unidad Formadora de Colonias
UV	Ultravioleta
V	Voltio
δ	Desplazamiento químico
µl	Microlitro

RESUMEN

La presente tesis se ha realizado en el área de Química Orgánica, con un enfoque específico en el área de Productos Naturales.

Desde hace ya varios años se ha presentado un problema a nivel social e industrial/agrícola debido al uso desmedido de antibióticos y pesticidas, con ello se ha provocado que bacterias patógenas para el ser humano y hongos fitopatógenos que amenazan a cultivos agrícolas generen resistencia a una considerable cantidad de estos productos.

Es de gran interés la búsqueda de nuevas moléculas como alternativa en la eliminación de dichos patógenos. En este sentido, los Productos Naturales (PN) o sus derivados juegan un papel fundamental en el descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos estructurales diversos con una capacidad inhibitoria de bacterias y hongos, igual o mayor a la de los antibióticos y pesticidas que se encuentran actualmente en el mercado.

La familia de *Bacillus* contiene un amplio número de especies capaces de producir PN de naturaleza y estructura diferente debido a su diversidad y genética. En la actualidad muchas de estas especies son utilizadas como Agentes de Biocontrol (BCA, Biological Control Agents).

En esta tesis se analizó el extracto metanólico obtenido a partir del cultivo de *Bacillus mycoides.* La extracción se realizó usando la resina adsorbente Amberlita XAD-16 y MeOH como disolvente.

Del extracto crudo, mediante cromatografía en columna de gel de sílice y usando un gradiente de eluyentes Hex-AcOEt-DCM-MeOH se obtuvieron 26 fracciones diferentes (1A,1B,2A…13B). Cada fracción se analizó en búsqueda de Productos Naturales.

Empleando técnicas espectroscópicas de RMN 1D y 2D y espectrometría de masas se lograron identificar y dilucidar seis tipos de PN diferentes: Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo), un precursor indólico llamado Ácido antranílico, dicetopiperazinas (DCP's), lipopéptidos, bacteriocinas, y monoglicéridos. Los cinco primeros ya habían sido previamente identificados en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana (LBM), y el último que pertenece a la clase de monoglicéridos se identificó como Gliceril 1-

monopalmitato también conocido como α-monopalmitina, y se evaluó su actividad antifúngica en hongos fitopatógenos: *Fusarium solani*, *Mucor sp.* y *Aspergillus flavus.*

Los lipopéptidos fueron identificados mediante informes en la literatura y por trabajos previos del grupo de trabajo del Laboratorio, y se evaluó su actividad antifúngica.

Las bacteriocinas fueron analizadas por electroforesis en gel SDS-PAGE, se realizaron pruebas de sensibilidad al calor, pH y pruebas de actividad bactericida frente a bacterias de interés clínico.

ABSTRACT

This thesis has been carried out in the area of Organic Chemistry, with a specific focus on the area of Natural Products.

For several years now, there has been a problem at the social and industrial/agricultural level due to the excessive use of antibiotics and pesticides, which have been the cause that pathogenic bacteria for humans and phytopathogenic fungi have generated resistance to a considerable amount of agricultural crop of these products.

The search for new molecules as an alternative in the elimination of these pathogens is of great interest. In this sense, Natural Products (NP) or their derivatives play a fundamental role in the discovery and development of new diverse structural compounds with an inhibitory capacity for bacteria and fungi, equal to or greater than that of antibiotics and pesticides that are currently available in the market.

The *Bacillus* family contains many species capable of producing PN of a different nature and structure due to their diversity and genetics. Currently many of these species are used as Biocontrol Agents (BCA, Biological Control Agents).

In this thesis, the methanolic extract obtained from the culture of *Bacillus mycoides* was analyzed. Extraction was performed using Amberlite XAD-16 as adsorbent resin and MeOH as eluent.

From the crude extract, by means of column chromatography on silica gel and using a gradient of eluents Hex-AcOEt-DCM-MeOH, 26 different fractions (1A,1B,2A…13B) were obtained. Each fraction was analyzed in search of Natural Products.

Using 1D and 2D NMR spectroscopic techniques and mass spectrometry, it was possible to identify and elucidate six different types of PN: Bis-R-(2-ethylhexyl) phthalate, an indole precursor called anthranilic acid, diketopiperazines (DCP), lipopeptides, bacteriocins and monoglycerides. The first five had already been previously identified at the Microbial Biotechnology Laboratory (LBM), and the last one belonging to the monoglyceride class was identified as Glyceryl 1-monopalmitate, also known as α-monopalmitin, and its antifungal activity was evaluated in phytopathogenic fungi: *Fusarium solani*, *Mucor sp*. and *Aspergillus flavus.*

The lipopeptides were identified by reports in the literature and by previous work of the Laboratory's working group, and their antifungal activity was evaluated.

Bacteriocins were analyzed by SDS-PAGE gel electrophoresis, heat sensitivity tests, pH tests, and bactericidal activity tests against bacteria of clinical interest were performed.

1. INTRODUCCIÓN

La química orgánica en la actualidad es una disciplina en constante evolución y crecimiento. No se puede quedar anclada como ciencia en las reacciones clásicas descritas desde hace más de un siglo. Actualmente se exige que sea una ciencia aplicada en los temas de desarrollo que preocupan a nivel mundial como la salud o la agricultura. Para ello es necesario que se combine con otras áreas relacionadas para desarrollar soluciones innovadoras a los desafíos más importantes de la sociedad. En la actualidad, la química se aplica a una variedad de campos, desde la agricultura y la alimentación hasta la medicina y la energía. La química de productos naturales se está readaptando a esta necesidad.

Al mismo tiempo se usa esta disciplina junto con el área microbiológica con el fin de investigar nuevas moléculas con capacidades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias y/o antivirales, y que son un problema alarmante de salud pública, debido a la gran resistencia bacteriana que ha provocado el mal uso y la sobreexposición de fármacos antibacterianos.

En la agricultura, la química orgánica se había empleado con el uso de plaguicidas y pesticidas químicos, para evitar el desarrollo de plagas que afectaran las cosechas y así disminuir las pérdidas económicas de los agricultores. El uso de plaguicidas químicos como principal método de control de plagas y enfermedades en la agricultura, ha permitido incrementar significativamente la productividad agrícola en las últimas décadas; sin embargo, su uso excesivo ha originado resistencia a estos compuestos por microorganismos fitopatógenos, y a su vez se han asociado efectos nocivos a la salud humana, y al medio ambiente. Por ello, se hace evidente la necesidad de generar alternativas eficientes y amigables con el ambiente para reducir el uso de productos sintéticos, logrando de esta manera un manejo eficaz y sustentable del control de enfermedades en los cultivos agrícolas [1]. Por lo que aumenta el interés de la agricultura por la búsqueda de nuevos bioplaguicidas.

El imperativo uso de agentes antifúngicos benéficos y potentes se expande en analogía con la evolución existente e intensificada de fitopatógenos fúngicos resistentes a los remedios en curso [2]. Existe un notable interés de usar extractos de plantas para desarrollar antifúngicos y pesticidas que sean capaces de erradicar plagas [3]. Sin

embargo, el uso de biofungicidas basados en microbios ha ganado una atención significativa [4]. El biofungicida hace a la agricultura sostenible, aumenta la producción comercial y exhorta la conservación del medio ambiente [5].

Dentro de los bioplaguicidas microbianos disponibles comercialmente, *Bacillus* es el género más explotado en la biotecnología agrícola, con un 85% de los productos bacterianos, debido a su gran versatilidad metabólica que le permiten llevar a cabo el control biológico de plagas y enfermedades por diversos mecanismos. A estos productos bacterianos, provenientes de un metabolismo secundario y de una fuente natural, se les conocen como Productos Naturales. Además, este género bacteriano es capaz de producir endosporas, siendo éstas el principal ingrediente activo de los formulados, y confiriéndoles -como propiedad- una mayor viabilidad en el tiempo [6].

Pero… ¿A que nos referimos al hablar de metabolismo secundario?

Se consideran productos naturales o metabolitos secundarios a todos los compuestos orgánicos provenientes del metabolismo secundario, aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen una participación directa en el crecimiento o reproducción del organismo vivo. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia [7].

Independientemente de la estructura y peso molecular, los PN se producen en ese organismo vivo como respuesta ante las condiciones externas, ya sea: estrés hídrico, térmico, de superpoblación y radiante, siendo en general señales químicas frente a herbívoros, plagas, patógenos y simbiosis con otros organismos. La Química de Productos Naturales por su parte se refiere a la investigación en metabolitos secundarios de fuentes de origen vegetal, animal, marino, fúngico y bacteriano [8], la cual se ayuda y complementa con la Biotecnología.

Las especies del género *Bacillus* secretan muchos metabolitos secundarios, incluyendo; antibióticos, pigmentos, toxinas, promotores de crecimiento y otros compuestos bioactivos y están diseñados para capacitar a la bacteria para sobrevivir en su ambiente natural. La gran diversidad y la variabilidad genética de las especies de *Bacillus*, hace que este microorganismo genere una gran cantidad de metabolitos de diferente estructura química con variadas aplicaciones en el ambiente, la agricultura y la biotecnología industrial [9].

En general estos metabolitos sirven como: armas competitivas usadas contra otras bacterias, hongos, amebas, plantas e insectos, agentes transportadores de metales, efectores de simbiosis, hormonas sexuales y factores de diferenciación y crecimiento [10].

En la literatura se encuentran descritas moléculas de naturaleza, funciones y mecanismos de acción distintos, obtenidas de diferentes especies de *Bacillus,* por ejemplo: hormonas de crecimiento, toxinas insecticidas, sideróforos, macrolactinas, dicetopiperazinas, lipopéptidos y monoglicéridos.

B. mycoides es una bacteria Gram positiva, aerobia, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10 μm), formadora de endosporas, su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro y a temperatura entre 30-45 °C. Se ha usado como agente de control biológico (BCA) para mitigar las enfermedades en cultivos agrícolas.

Una cepa de *B. mycoides* que forma parte del cepario del Laboratorio de Biotecnología Microbiana (previamente aislada e identificada usando técnicas de biología molecular), se seleccionó para realizar el trabajo de investigación experimental. Esta cepa se clasificó y etiquetó internamente como *Bacillus mycoides* Aca 5 ELI 220.

Para aislar a la bacteria de interés se realizó un cultivo en placa de la cepa ELI 220 en un medio de cultivo LB (Luria Bertani), bajo óptimas condiciones de tiempo (24h) y temperatura (29 ºC). Con el objetivo de extraer, purificar y elucidar PN, un segundo cultivo a partir de la cepa aislada en placa se realizó en medio líquido LB bajo las siguientes condiciones: 29 °C durante siete días, a 200 rpm. La extracción se realizó con Amberlita XAD-16 y MeOH a partir del cultivo de siete días. Del extracto crudo obtenido se realizó una separación mediante cromatografía en columna con gel de sílice, obteniendo 26 fracciones diferentes (1A, 1B, 2A…13B). Cada fracción se analizó en búsqueda de Productos Naturales. La purificación de las 26 fracciones se realizó en columna cromatográfica de gel de sílice, la selección del gradiente de eluyentes (Hex, AcOEt, DCM, MeOH) se hizo con base en un análisis de Cromatografía en Placa Fina (TLC).

Empleando técnicas espectroscópicas de RMN 1D y 2D y espectrometría de masas se lograron identificar y elucidar seis tipos de PN diferentes: Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo), un precursor indólico llamado Ácido antranílico, dicetopiperazinas (DCP’s),

lipopéptidos, bacteriocinas, y monoglicéridos. Los cinco primeros ya habían sido previamente identificados en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana (LBM), y el último que pertenece a la clase de monoglicéridos se identificó como Gliceril 1-monopalmitato también conocido como α-monopalmitina, y se evaluó su actividad antifúngica en hongos fitopatógenos: *Fusarium solani, Mucor sp.* y *Aspergillus flavus.*

Los lipopéptidos fueron identificados mediante reportes en la literatura y por trabajos previos del grupo de trabajo del Laboratorio, y se evaluó su actividad antifúngica.

Las bacteriocinas fueron analizadas por electroforesis en gel SDS-PAGE, se le realizaron pruebas de sensibilidad al calor, pH y pruebas de actividad bactericida frente a bacterias de interés clínico.

2. ANTECEDENTES

2.1 La química orgánica en la obtención de Productos Naturales

La química orgánica se ha convertido en una herramienta importante para la obtención de Productos Naturales. Un producto natural es un compuesto químico o sustancia presente en una planta, un hongo, una bacteria, entre otros organismos, el cual es utilizado en beneficio del ser humano en diferentes sectores. La biotecnología hace uso de microorganismos vivos, células y moléculas para desarrollar nuevas tecnologías y productos para mejorar la calidad de la vida humana. La química orgánica es una herramienta necesaria en la biotecnología.

La química orgánica incluso ha tratado de mimetizar a la naturaleza ya que muchas veces ha tratado de establecer una ruta sintética para poder realizar la síntesis química del producto natural deseado y tenerlo en mayor escala. Sin embargo, a veces la ruta sintética es larga y llena de pasos que acortan el rendimiento químico óptimo. Además, hay que tomar en cuenta que muchos productos naturales tienen centros estereogénicos y eso hace que la síntesis sea asimétrica, por ende, más complicada. En cambio, la naturaleza siempre produce los compuestos ópticamente puros de forma más sencilla.

En la obtención de productos naturales, una parte de la química orgánica (la química de los productos naturales) se utiliza para identificar, aislar y producir compuestos bioactivos a partir de plantas, animales y microorganismos. Los compuestos bioactivos son sustancias que tienen propiedades terapéuticas y que se utilizan en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética y agrícola. Sin embargo, muchos de los componentes naturales presentes en las plantas se encuentran en concentraciones mínimas, por lo que su extracción, así como la producción de la fuente vegetal a gran escala pueden representar un reto para cubrir la demanda.

Por lo que un área de reciente desarrollo contempla los microorganismos como fuente de compuestos naturales. El empleo de microorganismos tiene la ventaja de que son una fuente inagotable de producción de compuestos siempre y cuando estén en constante crecimiento, algo que se puede lograr a nivel industrial con los fermentadores biológicos. Incluso se pueden optimizar las condiciones para mejorar la producción y concentración del compuesto químico deseado [11].

2.2 La agricultura y el uso de biofungicidas

La agricultura representa una actividad determinante en el desarrollo económico, social y ambiental del mundo, ya que contribuye con el 80% de los alimentos que se consumen (FAO, 2014). Sin embargo, aproximadamente entre el 20 y 30% de la producción agrícola anual es afectada por plagas y enfermedades, siendo los hongos, bacterias, nemátodos, virus e insectos los principales agentes causales. De esta manera, con el objetivo de combatir las enfermedades en los cultivos agrícolas se han utilizado ampliamente diversos compuestos químicos tales como pesticidas [1]. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) define los pesticidas como "cualquier sustancia o mezcla de sustancias utilizadas para prevenir, destruir y repeler cualquier tipo de plaga". Incluye herbicidas, fungicidas y rodenticidas (para matar roedores), que son agentes que matan virus, bacterias y organismos multicelulares que dañan los cultivos [12]. No obstante, el uso excesivo de estos compuestos ha impactado negativamente en la calidad de los suelos, ecosistemas y la salud humana, por ejemplo, el compuesto "captan" que es un fungicida utilizado en México, está prohibido en otros países por su efecto cancerígeno [13].

Es innegable que estos plaguicidas químicos han culminado en un amplio aumento de los rendimientos y fortalecido el sector agrícola. Sin embargo, se ha demostrado que muchos pesticidas son peligrosos para el medio ambiente porque se acumulan persistentemente en el suelo e incluso se filtran en las aguas subterráneas, contaminándolas. La exposición rutinaria a pesticidas se ha relacionado directamente con alergias, cánceres, enfermedades neurológicas, etc. [14]. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de emplear agentes ecológicos que puedan actuar como fungicidas sin causar efectos secundarios indeseables en la salud humana y ambiental. El mejoramiento de plantas resistentes a plagas y condiciones climáticas adversas es una de las mejores formas de mejorar los rendimientos y tener un suministro de alimentos sostenible [15].

Por otra parte, la incidencia de plagas y enfermedades puede ser minimizada por el uso de prácticas culturales, por ejemplo, la rotación de cultivos y el sistema de siembra por parcelas separadas; sin embargo, éstas no son completamente eficientes [16].

Desde hace ya varios años se ha destacado el uso de agentes de control biológico (BCA)

como una alternativa sustentable para mitigar los efectos negativos en la productividad y calidad de los cultivos agrícolas causada por distintas enfermedades, disminuyendo la resistencia de los organismos fitopatógenos, y reduciendo la contaminación de los suelos y mantos acuíferos. Lo cual permite la producción de alimentos inocuos, disminuye los costos de producción agrícola y disminuye pérdidas económicas por merma de los cultivos [17].

Los BCA son (micro) organismos vivos o productos naturales obtenidos del metabolismo secundario de estos. Desde hace varios años se han venido usando para mitigar las enfermedades en cultivos agrícolas (Figura 1).

Figura 1: Mecanismos biológicos desarrollados por los BCA

Los biofungicidas se pueden clasificar como microorganismos y sus compuestos naturales que son tóxicos contra los hongos fitopatógenos y que poseen la capacidad de controlar las enfermedades de las plantas [18]. Dado que los biofungicidas microbianos contienen organismos vivos, sus modos de acción difieren al de los fungicidas sintéticos [5].

2.3 *Bacillus spp.*, como Agente de Control Biológico

El género *Bacillus* se encuentra ampliamente distribuido en los agro-sistemas y una de sus principales aplicaciones es el control de enfermedades de cultivos agrícolas [19].

Se han descritos diferentes mecanismos de acción por parte de los BCA, por ejemplo: a) mecanismos de contacto como, hiperparasitismo y predación [20]; b) la producción de compuestos de bajo peso molecular con efecto directo sobre el crecimiento del patógeno como antibióticos (fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol, lipopéptidos cíclicos), enzimas líticas (quitinasas, glucanasas, proteasas), y productos de residuos no regulados (amoniaco, dióxido de carbono, cianuro de hidrógeno) [21] y c) mecanismos indirectos por competencia de espacio y nutrientes (consumo de lixiviados-exudados, producción de sideróforos, inducción a la respuesta sistémica en plantas mediante la producción de fitohormonas y patrones moleculares) [22].

Estos mecanismos de acción difieren considerablemente de los mecanismos de acción de los pesticidas y han sido observados en las cepas microbianas utilizadas como BCA, entre las cuales el género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado debido a su alta abundancia y diversidad en los agro-sistemas (suelo, agua y planta), siendo significativamente mayor su población en comparación a otros géneros microbianos, y además por sus diversas capacidades metabólicas, destacando su capacidad para producir antibióticos y otros metabolitos antimicrobianos y antifúngicos [23]. Por ejemplo, diversos estudios moleculares han revelado que un porcentaje significativo del genoma de cepas del género *Bacillus* está relacionado con la producción de metabolitos secundarios asociados al control de fitopatógenos, por ejemplo, el 8.5 y 4% del genoma de las cepas *B. amyloliquefaciens* FZB42 y *B. subtilis* 168, respectivamente [24]. Esto justifica el amplio uso de cepas de este género bacteriano como BCA para el control de enfermedades que afectan los cultivos agrícolas.

2.4 Familia de *Bacillus*

El modelo de estudio de este proyecto es el género bacteriano *Bacillus*. Entre las características de *Bacillus* destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, Gram positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10 μm), su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son

mesófilas (temperatura entre 30 y 45 °C). Además, destaca su capacidad de producir endosporas (ovales o cilíndricas) como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés. La presencia de endosporas le confiere al género de *Bacillus* su capacidad de diseminación y prevalencia en los ecosistemas, éstas se forman durante su segunda fase del ciclo de vida, el cual se encuentra conformado por una fase de crecimiento vegetativo y una fase de esporulación.

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. Sin embargo, 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, siendo ésta una matriz compleja para el establecimiento de una gran diversidad genética y funcional de especies microbianas.

B. mycoides es una bacteria Gram positiva, aerobia, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable, su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro y a temperatura entre 30-45 °C. Se ha usado como agente de control biológico (BCA) para mitigar las enfermedades en cultivos agrícolas. Por ejemplo, para tratar el control del crecimiento de *C. gloeosporioides* agente causal de antracnosis en cultivos de aguacate, produciendo metabolitos secundarios como proteasas, sideróforos, ácido indol acético [25] y dicetopiperazinas.

2.5 Metabolismo secundario como fuente de moléculas bactericidas y antifúngicas

El conjunto de reacciones específicas mediante el cual los organismos fabrican sus propias sustancias y mantiene la vida se conoce como metabolismo. Son considerados productos naturales, todos los compuestos orgánicos provenientes del metabolismo secundario, estos compuestos orgánicos no tienen una participación directa en el crecimiento o reproducción del organismo vivo. La ausencia de algún metabolito secundario (PN) no le impide la supervivencia, a diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, donde funciones vitales se ven limitadas o bloqueadas cuando un metabolito primario no se produce.

Existe un amplio número de PN con estructura y peso molecular diversos y pueden producirse uno o más PN en ese organismo vivo como respuesta ante las condiciones externas, ya sea: estrés hídrico, térmico, de superpoblación y radiante, siendo en general señales químicas frente a herbívoros, plagas, patógenos y simbiosis con otros organismos.

En las bacterias los PN se producen en la fase estacionaria. Considerando que estas progresan a través de cuatro fases de crecimiento: retraso, exponencial, estacionario y muerte, (Figura 2). Fase de retraso es el período de tiempo que tarda la bacteria en alcanzar un estado fisiológico capaz de crecimiento celular rápido y división. Este retraso se produce porque las bacterias tardan tiempo en adaptarse a su nuevo entorno. La fase exponencial es la etapa de crecimiento y división celular más rápido durante la cual la replicación del ADN, la transcripción del ARN y la producción de proteínas se producen a un ritmo constante y rápido. La fase estacionaria se caracteriza por una ralentización y meseta del crecimiento bacteriano debido a la limitación de nutrientes y/o acumulación intermedia tóxica. La fase de muerte es la etapa durante la cual la lisis celular ocurre como resultado de una limitación severa de nutrientes.

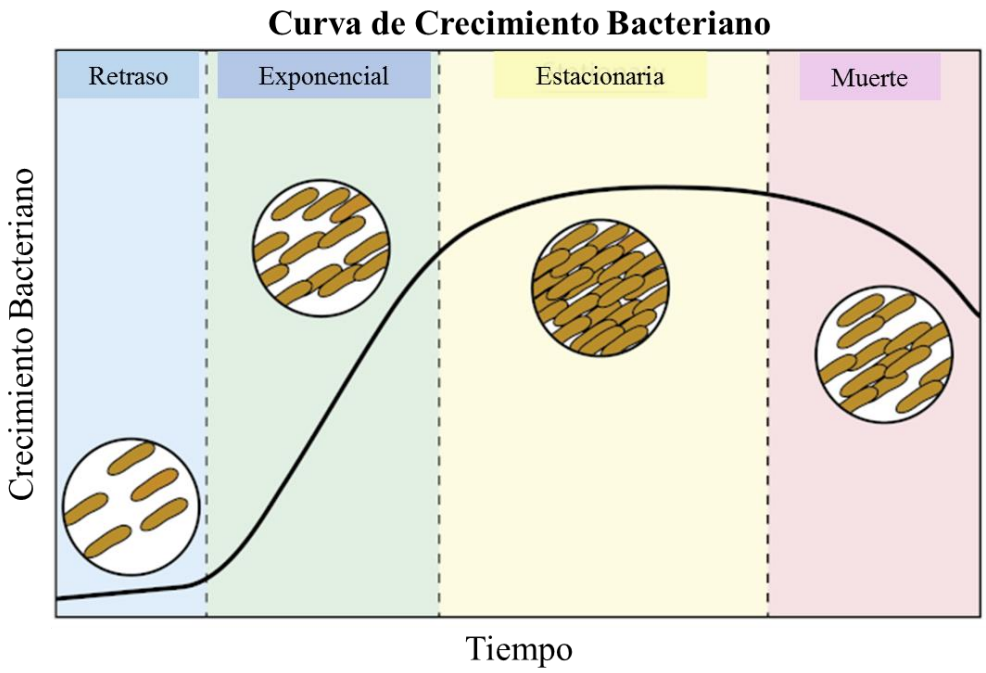


Figura 2: (Tomada de [46]): Curva de crecimiento bacteriano, excreción de PN en la fase estacionaria

Para que se produzca el o los PN, primero hay que asegurar unas condiciones óptimas durante la fase exponencial. Como mecanismo de defensa, la producción de PN no se

produce inmediatamente después de la conclusión de la fase exponencial. Primero, al comienzo de la fase estacionaria, deben hacerse resistentes a sus propios antibióticos. Se sabe que el paso de fase exponencial a fase estacionaria se produce cuando algún nutriente del medio es limitante. Suele tratarse de C, N o P. Al faltar algunos de estos factores, se altera la producción de PN y se originan inductores de enzimas que darán lugar a PN.

Por muchos años, el metabolismo secundario fue ignorado; el estudio de este tipo de metabolismo no esencial se dejó para los científicos de las industrias y los químicos académicos. Hoy en día la situación es diferente. La amplia variabilidad estructural de estos compuestos ha atraído la curiosidad de químicos y las actividades biológicas que poseen estos productos naturales han inspirado a la industria farmacéutica para buscar nuevas estructuras en cultivos microbianos, así como en plantas. Muchos de los productos microbianos que tienen un gran valor comercial y económico son PN.

La capacidad de *Bacillus* de secretar diversos metabolitos secundarios con una amplia variedad de estructuras y actividades biológicas es una de las características más importantes de este género y es la razón principal de sus extensas aplicaciones biotecnológicas. Es de destacar que, en promedio, alrededor del 5% de todo el genoma de *Bacillus spp.* se dedica a la síntesis de metabolitos secundarios [26, 27]. Estas moléculas son principalmente péptidos antimicrobianos. Incluso hay algunas especies con una mayor capacidad genómica para producir metabolitos secundarios químicamente diversos [28], como *B. amyloliquefaciens* [29]. La cepa FZB42, por ejemplo, dedica más del 10% de su capacidad genómica para la síntesis de metabolitos secundarios antimicrobianos [30].

En la Tabla 1, se muestran ejemplos de PN secretados por diversas especies de *Bacillus*, sus actividades bactericidas, antifúngicas o promotoras de crecimiento [5].

Tabla 1: (Tomada de [5]): PN producidos por diferentes especies de *Bacillus*

Clase estructural	Metabolito secundario	Fuente	Actividad biológica
Lipopéptidos cíclicos	Surfactin A-D Bacircine Halobacillin Isohalobacillin Lichenysin Daitocidin Pumilacidin Bacillomycin Iturin Fengycin Mycosubtilin	*B.subtilis* *B.amyloliquefaciens* *B.licheniformis* *B.licheniformis* *B.licheniformis* *B.pumilus* *B.pumilus* *B.amyloliquefaciens* *B.amyloliquefaciens* *B.amyloliquefaciens* *B.subtilis*	Antifúngico
Aminopolioles	Zwittermicin A	*B.cereus, B.thuringiensis*	Bactericida, antifúngico
Policétidos Macrolactinas	Macrolactin A 7-*O*-malonyl macrolactin A	*B.amyloliquefaciens* *B.subtilis*	Bactericida, antifúngico
Dicetopiperazinas	Cyclo (L-Pro-L-Leu) Cyclo (L-Pro-L-Phe) Cyclo (L-Pro-L-Val) Cyclo (L-Pro-L-Tyr)	*B. thuringiensis* *B. thuringiensis* *B. thuringiensis* *B. thuringiensis*	Antifúngico, Promotores del crecimeitno
Alcaloides indólicos	Indole Tryptamine *N*-acetyl tryptamine phenethylamine phenethyl acetamide 3-methyl-*N*-(2′-phenylethyl)butyramide	*B.velezensis* *B.thuringiensis* *B.velezensis* *B.thuringiensis* *B.thuringiensis* *B.velezensis*	Antifúngico
Otros	Bacilysin	*B. subtilis*	Bactericida, antifúngico

2.6 Productos Naturales obtenidos de *Bacillus spp.*

El género *Bacillus* tiene muchas especies con la capacidad de secretar una variedad de metabolitos secundarios bioactivos químicamente diversos con propiedades fungicidas (Tabla 1) y, por lo tanto, se usan ampliamente como agentes de biocontrol.

El estudio de esta capacidad de *Bacillus* se inició por el descubrimiento de la actividad insecticida de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis*; en la actualidad diversas especies del género *Bacillus (B. subtilis, B. pumilus, B. amyloliquefaciens y B.*

licheniformis) son ampliamente estudiadas para mitigar la incidencia de enfermedades de importancia agrícola [24]. Entre las principales vías por las cuales estas cepas evitan el establecimiento y desarrollo de organismos fitopatógenos es a través de diferentes mecanismos, que incluye la excreción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas, toxinas e induciendo la resistencia sistémica de la planta (IRS) [19] (Figura 3).

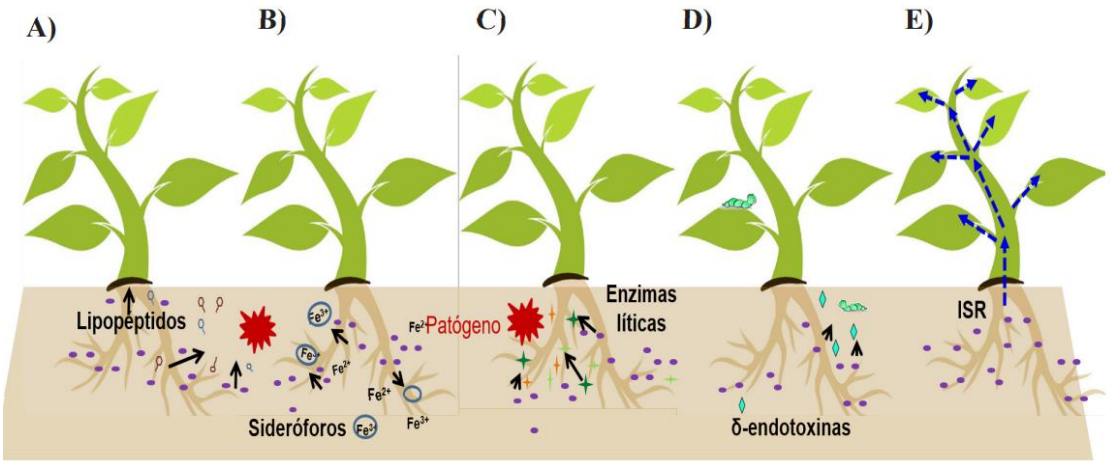


Figura 3: (Tomada de [31]): Principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus*. Producción de A) lipopéptidos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) δ-endotoxinas, E) inducción a la respuesta sistémica.

- **Producción de δ-endotoxinas**

La proteína Cry producida por *Bacillus thuringiensis* es la representativa de este grupo. Las δ-endotoxinas son cuerpos paraesporales proteicos conformados por unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares, desde 27 a 140 kDa. Las toxinas *Bt* son producidas durante la fase de esporulación, la proteína Cry (cristal) y la proteína Cyt (citolítica) son conocidas por sus efectos tóxicos específicos tóxicos sobre una gran variedad de insectos. Un ejemplo de su aplicación contra fitopatógenos es en cultivos de tomate que son afectados con la polilla del tomate (*Tuta absoluta*) (Figura 4). Aquellas plantas que no son tratadas con insecticidas llegan a tener pérdidas que van de un 60-100 % mientras que en ensayos realizados en hojas de tomate adicionadas con concentrados de proteínas Cry se logró la mortalidad entre un 20 y 60% de las larvas de *T. absoluta*, lo cual sugeriría la disminución de las pérdidas en un 12 y 60% [32].

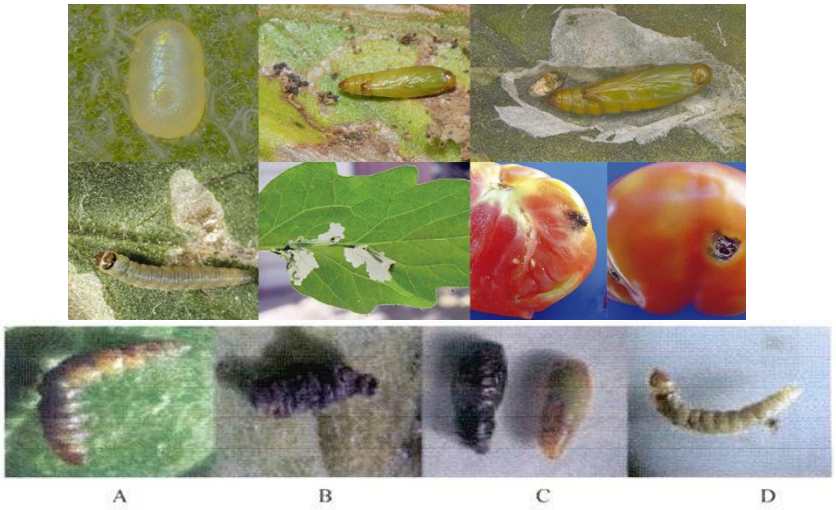


Figura 4: Superior: larvas de *T. absoluta*, hojas y frutos afectados. Inferior: Apariencia de larvas y pupas de *Tuta absoluta.* (A, B, C: después de ingerir *Bacillus thuringiensis* y D: larva no tratada).

- **Resistencia sistémica inducida**

A través del tiempo la gran variedad de organismos existentes ha desarrollado diversos y específicos mecanismos de defensa contra patógenos que comprometen su desarrollo y supervivencia. Estos mecanismos se conocen como resistencia sistémica adquirida (SAR) y se caracteriza por activarse no solo en el sitio de la infección, sino de manera sistémica en otros tejidos [33]. En las plantas este mecanismo se conoce como resistencia sistémica inducida (ISR) y es inducida por señales químicas de organismos benéficos, además es dependiente del ácido jasmónico y etileno [34].

Hay una amplia investigación y documentación sobre la protección de cultivos de importancia agrícola como lo son: tomate, pimiento, frijol y arroz mediante la inducción de respuesta sistémica cuando se utilizaron cepas de *Bacillus sp.* Los compuestos de tipo lipopéptidos, fitohormonas y compuestos volátiles han sido las moléculas elicitoras responsables de la ISR. *Bacillus sp.* Además de ISR por activación de genes, también puede otorgar protección de las plantas mediante otros mecanismos como: cambios estructurales en la pared celular mediante la acumulación de lignina [35] o la producción de metabolitos secundarios como flavonoides, fitoalexinas, auxinas o glucosinolatos en general [36].

- **Producción de enzimas líticas**

Estas enzimas están involucradas especialmente contra patógenos de origen fúngico. Actúan directamente contra la pared celular de agentes fitopatógenos, hidrolizando los enlaces glicosídicos de los polisacáridos que tienen un papel estructural determinante en la rigidez de la pared celular.

- **Producción de sideróforos**

El hierro tiene un papel importante en diversas funciones celulares esenciales, como en las reacciones redox de las proteínas con cofactores (Fe-S), como catalizador en reacciones enzimáticas y como transportador de electrones y de átomos de hidrógeno por parte de los citocromos en la cadena respiratoria. El ion ferroso Fe^{2+} es el hierro soluble y el que mejor se absorbe en las células, mientras que el ion férrico Fe^{3+} es de baja solubilidad y precipita, imposibilitando su uso por algunos seres vivos, además de que en ese estado puede resultar tóxico para las células.

Una desventaja es que este mineral es encontrado en la naturaleza principalmente en forma férrica, lo que limita su uso por algunos seres vivos. Una forma de enfrentar este problema es produciendo diversas estructuras proteicas receptoras, de bajo peso molecular y con alta afinidad por el hierro. A estas estructuras se les conoce como sideróforos, dicha capacidad es llevada a cabo por algunos microorganismos, facilitando así la captación de Fe^{3+}. Los sideróforos son metabolitos secundarios que actúan como quelantes de hierro. Una gran diversidad de cepas pertenecientes a *Bacillus*, en la que se incluye *B. subtilis*, han demostrado la capacidad de producir sideróforos [37].

- **Producción de antibióticos**

Algunas cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* producen zwittermicina A, que es un antibiótico de aminopoliol lineal con fuerte actividad contra algunos fitopatógenos potenciales como *Phytophthora medicaginis, P. nicotianae, Phytium aphanider matum* y *S. minor* [38].

- **Producción de macrolactinas**

Las macrolactinas son un grupo de compuestos macrólidos que contienen tres dienos separados en un anillo de lactona de 24 miembros que se han aislado de varias cepas de

Bacillus sp. Hay más de veinte derivados descritos [39]. El compuesto de macrolactina más reportado ha sido Macrolactina A (Figura 5), que fue el primero que se aisló. Las macrolactinas se han considerado compuestos antibióticos ya que son activas contra varias bacterias clínicamente importantes, especialmente bacterias patógenas grampositivas. Sin embargo, existe un informe reciente que estudia su actividad antifúngica. Específicamente, se probó que la macrolactina A y la 7-O-succinil macrolactina A son activas contra dos importantes hongos fitopatógenos como *F. oxysporum y Moniliophthora roreri,* que es un hongo basidiomiceto que causa la enfermedad de la pudrición helada de la vaina, uno de los más graves problemas para la producción de cacao en América Latina [40].

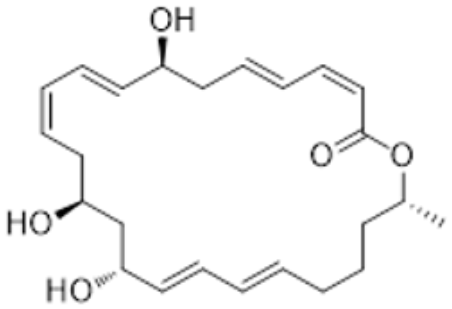


Figura 5: Estructura de la Macrolactina A

- **Producción de Dicetopiperazinas**

Los ciclodipéptidos y sus derivados las dicetopiperazinas constituyen una clase novedosa de moléculas pequeñas sintetizadas por microorganismos a las cuales se les ha encontrado diversas funciones biológicas tal como ser promotoras del crecimiento vegetal, antibacterial o antifúngica [7]. Las dicetopiperazinas (Figura 6) son compuestos relativamente simples que se encuentran en la naturaleza. Son dipéptidos cíclicos obtenidos por condensación de dos α-aminoácidos y aislados de microorganismos [41], esponjas y de tejidos y fluidos corporales. Pueden incluso ser parte de otras estructuras más complejas en una variedad de microorganismos. Poseen diferentes actividades biológicas tal como, antitumoral, antifúngico y bactericida, inclusive muchas de estas actividades con propiedades fisiológicas como: enzimas, anticuerpos y neurotransmisores [42], además tienen la habilidad de unirse a una amplia variedad de receptores por lo que estas estructuras se vuelven atractivas para el descubrimiento de nuevos compuestos como agentes terapéuticos.

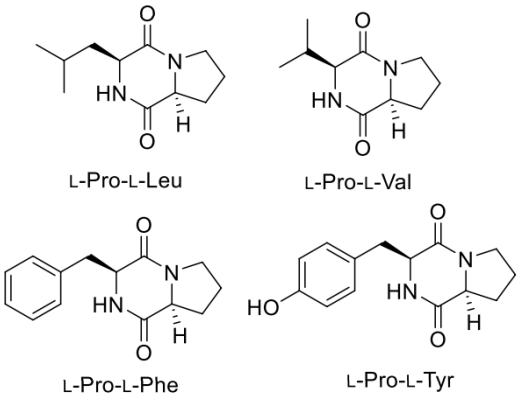


Figura 6: Ejemplos de Dicetopiperazinas con propiedades antifúngicas.

- **Producción de Lipopéptidos**

Estructuralmente es un péptido cíclico unido a una cadena de ácido graso β-hidroxi o β-amino. Se clasifican en tres familias: iturinas, fengicinas y surfactinas, de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y longitud del ácido graso.

Son sintetizados por complejos enzimáticos llamados sintetizadores de péptidos no ribosomales (NRPS), los cuales son independientes del RNA mensajero.

La actividad antimicrobiana de estos lipopéptidos tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células bacterianas o fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos [43]. Además de la antibiosis, los lipopéptidos influyen en el establecimiento e interacción de *Bacillus* con su planta hospedera mediante la regulación de procesos celulares como motilidad y formación de biopelículas.

- **Producción de Monoglicéridos**

Los ácidos grasos son biomoléculas constituidas por lípidos que se forman a partir de una cadena de hidrógeno y carbono lineal. Se encuentran presentes en las grasas, raramente libres, y casi siempre esterificando al glicerol y eventualmente a otros alcoholes. Son generalmente de cadena lineal y tienen un número par de átomos de carbono. La razón de esto es que, en el metabolismo de los eucariotas, las cadenas de ácido graso se sintetizan y se degradan mediante la adición o eliminación de unidades de acetato. No obstante, hay excepciones, ya que se encuentran ácidos grasos de número impar de átomos de carbono en la leche y grasa de los rumiantes, procedentes del metabolismo bacteriano del rumen, y también en algunos lípidos de vegetales, que no son utilizados comúnmente para la obtención de aceites.

Los acilglicéridos, lípidos neutros o sin carga, son los productos derivados de la reacción de esterificación entre el glicerol y una, dos o tres moléculas de ácidos grasos; que se caracterizan por poseer una fracción hidrofílica y otra lipofílica en su estructura química (Figura 7).

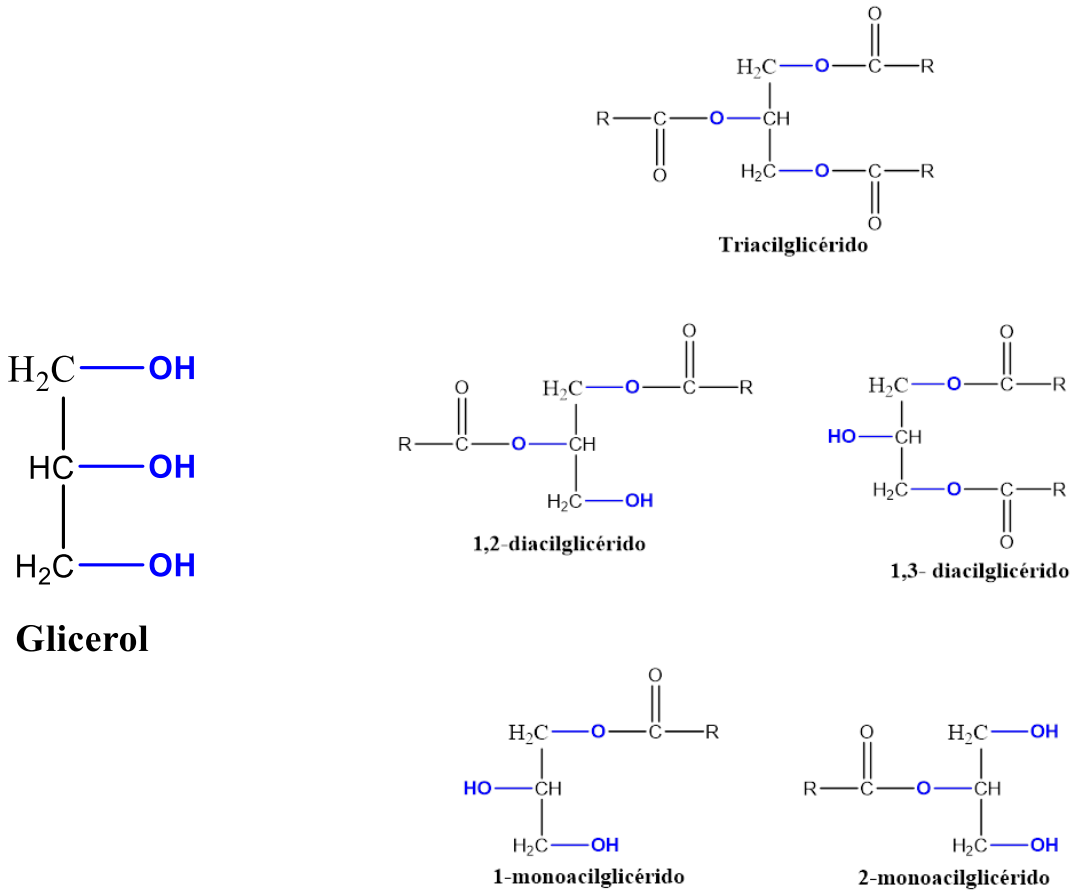


Figura 7: Estructura química general de los monos, di y tri acilglicéridos

La composición de ácidos grasos (AG) se encuentra entre los criterios esenciales utilizados para definir las especies de *Bacillus.* Algunos elementos de la composición del patrón AG son comunes a las especies de *Bacillus*, mientras que otros son específicos y se pueden categorizar en relación con los nichos ecológicos de la especie. Las especies de *Bacillus* pueden modificar sus patrones de AG para adaptarse a una amplia gama de cambios ambientales, incluidos cambios en el medio de crecimiento, la temperatura, las condiciones de procesamiento de alimentos y el pH.

Al igual que otras bacterias Gram-positivas, las especies de *Bacillus* tienen tres grupos principales de AG (ácidos grasos): AG de cadena ramificada, AG de cadena lineal y tipos de AG complejos (como los AG cíclicos, hidroxilo o epoxi). Los dos primeros

grupos desempeñan funciones vitales en la célula al formar parte de la membrana celular y contribuir a la fluidez de esta, mientras que los AG complejos independientemente de su saturación o estructura ramificada, se unen a polipéptidos y forman agentes tensioactivos y antimicrobianos y no se han descrito como componentes de la membrana de *Bacillus* [44].

Se ha reportado la excreción de ácidos grasos y monoglicéridos a partir de una cepa de *B. amyloliquefaciens*, entre los cuales se llega a describir al ácido esteárico ($C_{18}H_{36}O_2$), palmitato de metilo ($C_{17}H_{34}O_2$), hexadecanoato de 3,3-dihidroxipropilo ($C_{19}H_{38}O_4$), octadecanoato de 2,3-dihidroxipropilo ($C_{21}H_{42}O_4$), los cuales han demostrado tener actividad antibacterial, antifúngica, nematicida, insecticida, lubricante, antioxidante, hemolítica e incluso actividad anticancerígena [45].

3. OBJETIVO GENERAL

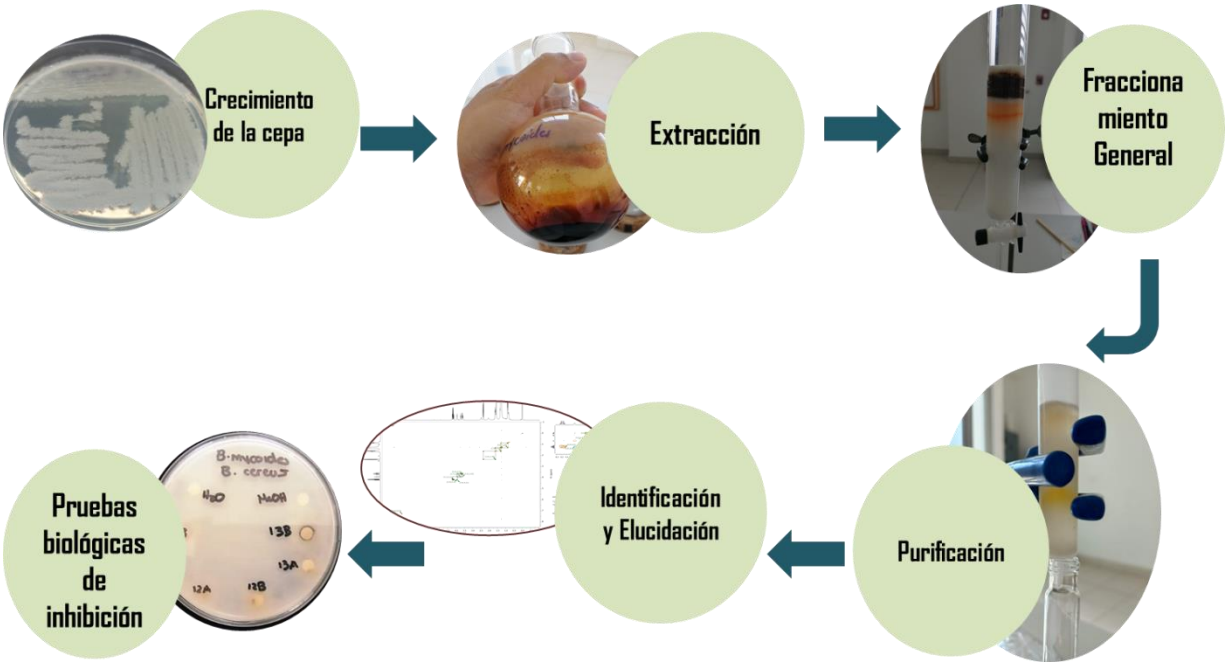
Aislar y caracterizar Productos Naturales a partir de la cepa de *Bacillus mycoides* ELI220 y evaluar su actividad biológica frente a bacterias patógenas de interés clínico y hongos fitopatógenos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener un extracto crudo de un medio de cultivo líquido inoculado con *B. mycoides* cepa Eli 220.
- A partir del extracto crudo, separar y purificar productos naturales mediante cromatografía en columna de gel de sílice.
- Identificar y elucidar estructuralmente los compuestos separados con técnicas espectroscópicas RMN 1D y 2D, y técnica espectrométrica EI-MS.
- Con los compuestos obtenidos realizar pruebas biológicas de inhibición a bacterias patógenas y hongos fitopatógenos.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

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



Esquema general de trabajo.

4.1 Crecimiento de la cepa *Bacillus mycoides* Aca 5 Eli 220

Para la elaboración de este estudio en primer lugar se hizo un cultivo en placa de la cepa de interés ELI 220 la cual fue identificada como *Bacillus mycoides.* El cultivo de esta cepa se realizó en agar LB bajo las siguientes condiciones: 29 °C durante 24 horas. En la Figura 8 se observa una placa de cultivo con colonias grandes, cerosas, color crema y de bordes rizoides característicos de *B. mycoides*. Y se analizó microscópicamente para corroborar que la placa estaba libre de contaminación por otras bacterias u hongos. (Figura 9)

Figura 8: Colonias de *B. mycoides* en agar LB

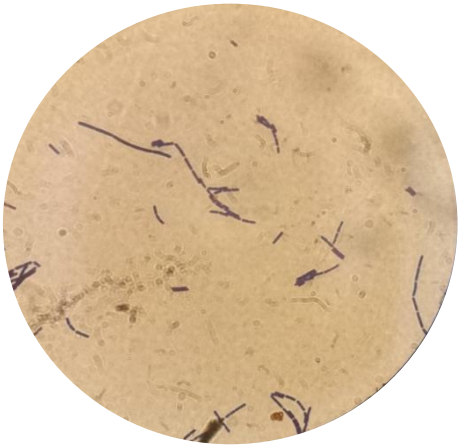


Figura 9: Morfología microscópica de *B. mycoides*

4.2 Extracción de Productos Naturales (PN)

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

Se pesaron 0.5 g de Amberlita por cada 100 mL de caldo de cultivo LB. La resina fue lavada con aproximadamente 60 mL de agua destilada y agitada constantemente durante 30 min con el objetivo de retirar las sales que contiene como conservadores. Posteriormente, la resina se lavó con aproximadamente 60 mL de metanol y agitada por media hora más para activarla y poder así introducirla en el caldo que previamente fue inoculado con una asada de la cepa de *Bacillus mycoides*. El cultivo se incubó a 29 °C durante 7 días con una agitación de 200 rpm. Esto con el objetivo de que la cepa llegue

a su fase estacionaria y excrete los PN. Se siguió la metodología descrita en la sección 6.4 de desarrollo experimental. Se colocó el extracto en viales etiquetados y pesados, los cuales se metieron en la estufa durante 48 h a 29 °C para logar el secado total del extracto crudo.

Se obtuvieron 735 mg de extracto por cada litro de medio de cultivo. En total se hicieron 13.2 litros de medio de cultivo LB teniendo así 9.712 g de extracto crudo.

4.3 Fraccionamiento general

Por cromatografía en placa fina se realizó un seguimiento cromatográfico para elegir el mejor gradiente de sistema que se utilizarán como fase móvil.

Se realizó un fraccionamiento general del extracto obtenido, mediante cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando un gradiente de eluyentes que va del menos al más polar, como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Eluyentes empleados para el fraccionamiento general, y miligramos obtenidos de cada fracción

Fracción	Polaridad	Miligramos (mg)
1A	Hex 100%	6.9
1B	Hex 100%	5.1
2A	Hex-AcOEt 10%	9.6
2B	Hex-AcOEt 10%	231.2
3A	Hex-AcOEt 25%	9.8
3B	Hex-AcOEt 25%	24
4A	Hex-AcOEt 50%	29.1
4B	Hex-AcOEt 50%	64
5A	AcOEt 100%	36.9
5B	AcOEt 100%	10.6
6A	AcOEt-MeOH 2%	9.2
6B	AcOEt-MeOH 2%	26.9
7A	AcOEt-MeOH 5%	57.4
7B	AcOEt-MeOH 5%	136.4
8A	AcOEt-MeOH 10%	122.8
8B	AcOEt-MeOH 10%	34.4
9A	DCM-MeOH 20%	51.5
9B	DCM-MeOH 20%	1106.5
10A	DCM-MeOH 50%	433.2
10B	DCM-MeOH 50%	809.9
11A	DCM-MeOH 80%	611.1
11B	DCM-MeOH 80%	1125.2
12A	MeOH 100%	862.1
12B	MeOH 100%	1455.8
13A	MeOH 100%	626.1
13B	MeOH 100%	315.3

Se realizó un seguimiento cromatográfico en placa fina de cada una de las fracciones y se reveló con luz UV de onda corta (254nm) y onda larga (365 nm). (Figura 10). También se analizó cada fracción por RMN de ^{1}H, de esta forma se corrobora la información que nos proporciona la placa TLC, al predecir cuantos compuestos diferentes hay en la mezcla presente en las fracciones.

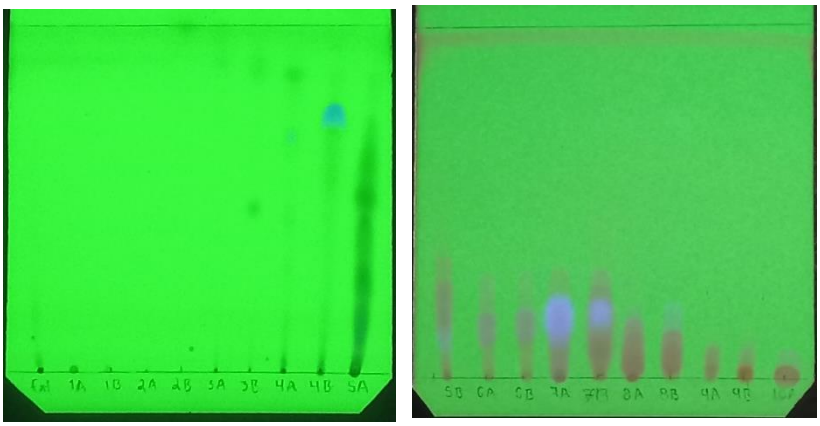


Figura 10: Seguimiento cromatográfico en TLC, revelador Luz UV 254 nm

El espectro de RMN de ^{1}H de la fracción 2A y 2B indicaba que el compuesto estaba casi puro. Por comparación con espectros obtenidos de otras cepas de *Bacillus* previamente analizadas por el grupo de trabajo del laboratorio se llegó a identificar estas dos fracciones como Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo).

Las fracciones 9A, 9B, 10A, 10B, 11A, 11B, 12A, 12B, 13A y 13B fueron insolubles en cloroformo deuterado ($CDCl_3$), con información obtenida anteriormente en el laboratorio se propuso que estas fracciones corresponden a Lipopéptidos y Bacteriocinas o mezcla de ambos, por lo que no se realizó una segunda columna cromatográfica, se guardaron estos viales para estudiar el peso molecular de las bacteriocinas, su estabilidad a diferentes temperaturas y valores de pH, así como su actividad bactericida y la actividad antifúngica de los lipopéptidos.

Las fracciones 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 5B, 6A, 6B, 7A, 7B, 8A, 8B se sometieron a una segunda cromatografía en columna con el objetivo de obtener compuestos puros.

4.4 Purificación

Para purificar cada una de las fracciones se utilizó una columna cromatográfica de gel de sílice como fase estacionaria, un gradiente de eluyentes que va de Hex-AcOEt-DCM-MeOH, el cual varía su volumen dependiendo de la cantidad de muestra de cada fracción.

A continuación, se describen los sistemas utilizados para purificar los compuestos de interés que se mencionan en esta tesis.

- **Fracción 3B**: se utilizaron sistemas Hex:AcOEt en diferentes proporciones, obteniendo el compuesto puro con el sistema Hex:AcOEt 66%, como se muestra en la Tabla 3.

- **Fracción 4A:** se utilizaron sistemas Hex:AcOEt y DCM:MeOH en diferentes proporciones, obteniendo el compuesto puro con el sistema Hex:AcOEt 30%, como se muestra en la Tabla 4.

- **Fracción 4B y 5A:** se utilizaron 250 mL de sistema Hex:AcOEt 25% y 24 mL de MeOH 100%, obteniendo el compuesto puro con el sistema MeOH 100%.

- **Fracción 6A:** se utilizaron sistemas Hex:AcOEt en diferentes proporciones, obteniendo el compuesto puro con el sistema Hex:AcOEt 30%, como se muestra en la Tabla 5.

- **Fracción 7B:** se usó un único sistema DCM:MeOH 5%, obteniendo dos compuestos puros utilizando diferentes volúmenes de sistema, como se muestra en la Tabla 6.

- **Fracción 8A:** se utilizaron sistemas DCM:MeOH en diferentes proporciones, obteniendo el compuesto puro con el sistema DCM:MeOH 2%, como se muestra en la Tabla 7.

- **Fracción 8B:** se utilizó un sistema DCM:MeOH 5%, obteniendo el compuesto puro después de usar 18 mL del sistema.

Sistema	Proporción %	Volumen (ml)
Hexano	100	12
Hex-AcOEt	80:20	12
Hex-AcOEt	70:30	24
Hex-AcOEt	60:40	12
Hex-AcOEt	55:45	24
Hex-AcOEt	50:50	12
Hex-AcOEt	45:55	12
Hex-AcOEt	40:60	12
Hex-AcOEt	38:62	12
Hex-AcOEt	36:64	12
Hex-AcOEt	34:66	12
Hex-AcOEt	32:68	12
Hex-AcOEt	30:70	12
AcOEt	100	24

Tabla 3: Sistemas utilizados para purificar la fracción 3B

Sistema	Proporción %	Volumen (ml)
Hexano	100	24
Hex:AcOEt	70:30	120
Hex:AcOEt	60:40	24
AcOEt	100	60
DCM:MeOH	95:5	48
DCM:MeOH	90:10	24
DCM:MeOH	80:20	12
DCM:MeOH	75:35	10
DCM:MeOH	50:50	20
DCM:MeOH	20:80	12
MeOH	100	12

Tabla 4: Sistemas utilizados para purificar la fracción 4A

Sistema	Proporción %	Volumen (ml)
Hexano	100	24
Hex-AcOEt	70:30	48
Hex-AcOEt	60:40	60
MeOH	100	24

Tabla 5: Sistemas utilizados para purificar la fracción 6A

Sistema	Proporción %	Volumen (ml)
Hexano	100	24
DCM-MeOH	95:5	24
DCM-MeOH	95:5	24
DCM-MeOH	95:5	24
DCM-MeOH	95:5	24
DCM-MeOH	95:5	24
DCM-MeOH	95:5	24
DCM-MeOH	95:5	24
DCM-MeOH	95:5	24
MeOH	100	24

Tabla 6: Sistemas utilizados para purificar la fracción 7B

Sistema	Proporción %	Volumen (ml)
Hexano	100	24
DCM:MeOH	98:2	50
DCM:MeOH	97:3	40
DCM:MeOH	96:4	45
DCM:MeOH	95:5	120
DCM:MeOH	94:6	70
MeOH	100	20

Tabla 7: Sistemas utilizados para purificar la fracción 8A

A continuación, se muestran las 26 fracciones obtenidas del extracto crudo y se indica el o los PN obtenidos en cada una. (Tabla 8). Resaltado en azul se indican los compuestos que se elucidaron por RMN ^{1}H y ^{13}C, comparando los espectros con los espectros obtenidos previamente en el LBM.

Las fracciones 12A-13B se analizaron por electroforesis en gel SDS-PAGE, resultando en dos bacteriocinas de diferente peso molecular. El PM se determinó siguiendo la metodología descrita en la sección 6.10 de Desarrollo experimental.

Las fracciones 9A-13B se analizaron para evaluar su capacidad antifúngica frente a hongos fitopatógenos.

El PN obtenido de la **fracción 3B** que en la sección 5.5 para fines prácticos se nombrará como **M1**, fue el único que se identificó y elucidó mediante RMN 1D y 2D, EI-MS.

Fracción	Polaridad	PN
1A	Hex 100%	Grasa
1B	Hex 100%	Grasa
2A	Hex-AcOEt 10%	Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo)
2B	Hex-AcOEt 10%	Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo)
3A	Hex-AcOEt 25%	********
3B	Hex-AcOEt 25%	1-Palmitil glicerol
4A	Hex-AcOEt 50%	Ácido antranílico
4B	Hex-AcOEt 50%	********
5A	AcOEt 100%	********
5B	AcOEt 100%	********
6A	AcOEt-MeOH 2%	Ciclo (L-Pro-L-Leu)
6B	AcOEt-MeOH 2%	********
7A	AcOEt-MeOH 5%	********
7B	AcOEt-MeOH 5%	Ciclo (L-Pro-L-Phe) Ciclo (L-Pro-L-Tyr)
8A	AcOEt-MeOH 10%	Ciclo (L-Pro-L-Phe)
8B	AcOEt-MeOH 10%	Ciclo (L-Pro-L-Tyr)
9A	DCM-MeOH 20%	Bioensayo vs hongos
9B	DCM-MeOH 20%	Bioensayo vs hongos
10A	DCM-MeOH 50%	Bioensayo vs hongos
10B	DCM-MeOH 50%	Bioensayo vs hongos
11A	DCM-MeOH 80%	Bioensayo vs hongos
11B	DCM-MeOH 80%	Bioensayo vs hongos
12A	MeOH 100%	Bacteriocina 3.39 kDa
12B	MeOH 100%	Bacteriocina 3.39 kDa
13A	MeOH 100%	Bacteriocina 2.91 kDa
13B	MeOH 100%	Bacteriocina 2.91 kDa

Tabla 8: Productos Naturales obtenidos de cada fracción

4.5 Identificación y Elucidación

Se procedió a realizar una caracterización completa del compuesto M1 que provenía de la fracción 3B. Se utilizaron diferentes técnicas espectroscópicas para elucidar la estructura. A continuación, se presentan los diferentes espectros de RMN de ^{1}H, ^{13}C, APT, COSY, HSQC Y HMBC, en ese orden.

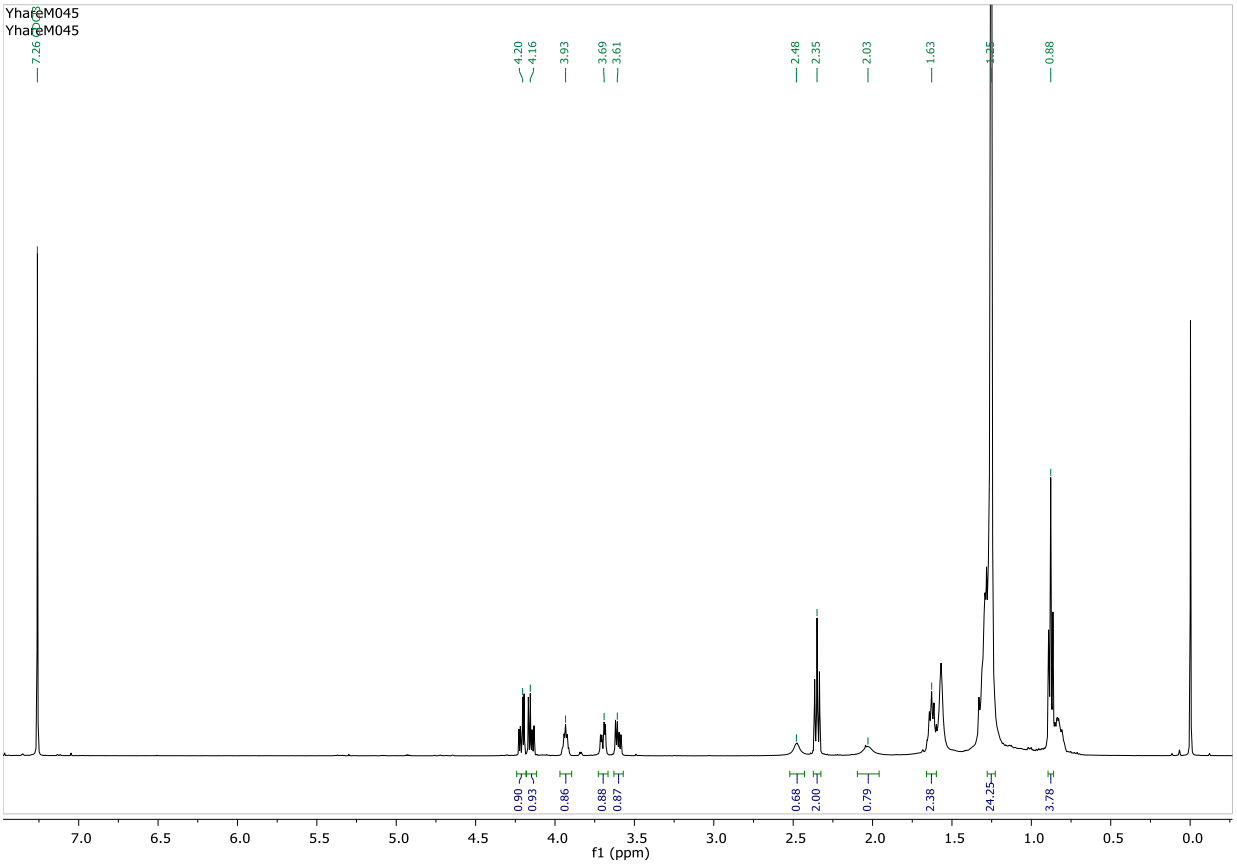


Figura 11: Espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$ de M1

En las figuras 11 y 12 (espectro completo y ampliaciones del espectro de RMN de ^{1}H respectivamente), se observan 11 señales diferentes en la región 4.5-0.8 ppm. Con este primer dato se empieza a descartar la presencia de grupos aromáticos.

Descripción de las señales de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$, δ, ppm, *J*/Hz): 4.20 (1H, dd, *J*=11.7, 4.5 Hz, H-1a), 4.16 (1H, dd, *J*=11.6, 6.2 Hz, H-1b), 3.93 (1H, q, *J*=5 Hz, H-2), 3.69 (1H, dd, *J*=11.4, 3.9 Hz, H-3a), 3.61 (1H, dd, *J*=11.4, 5.9 Hz, H-3b), 2.48 (1H, br. s, OH-3), 2.35 (2H, t, *J*=7.5, H-2'), 2.03 (1H, br. s, OH-2), 1.63 (2H, m, H-3'), 1.25 (24H, br. s, H-4'-15'), 0.88 (3H, t, *J*=6.8 Hz, H-16').

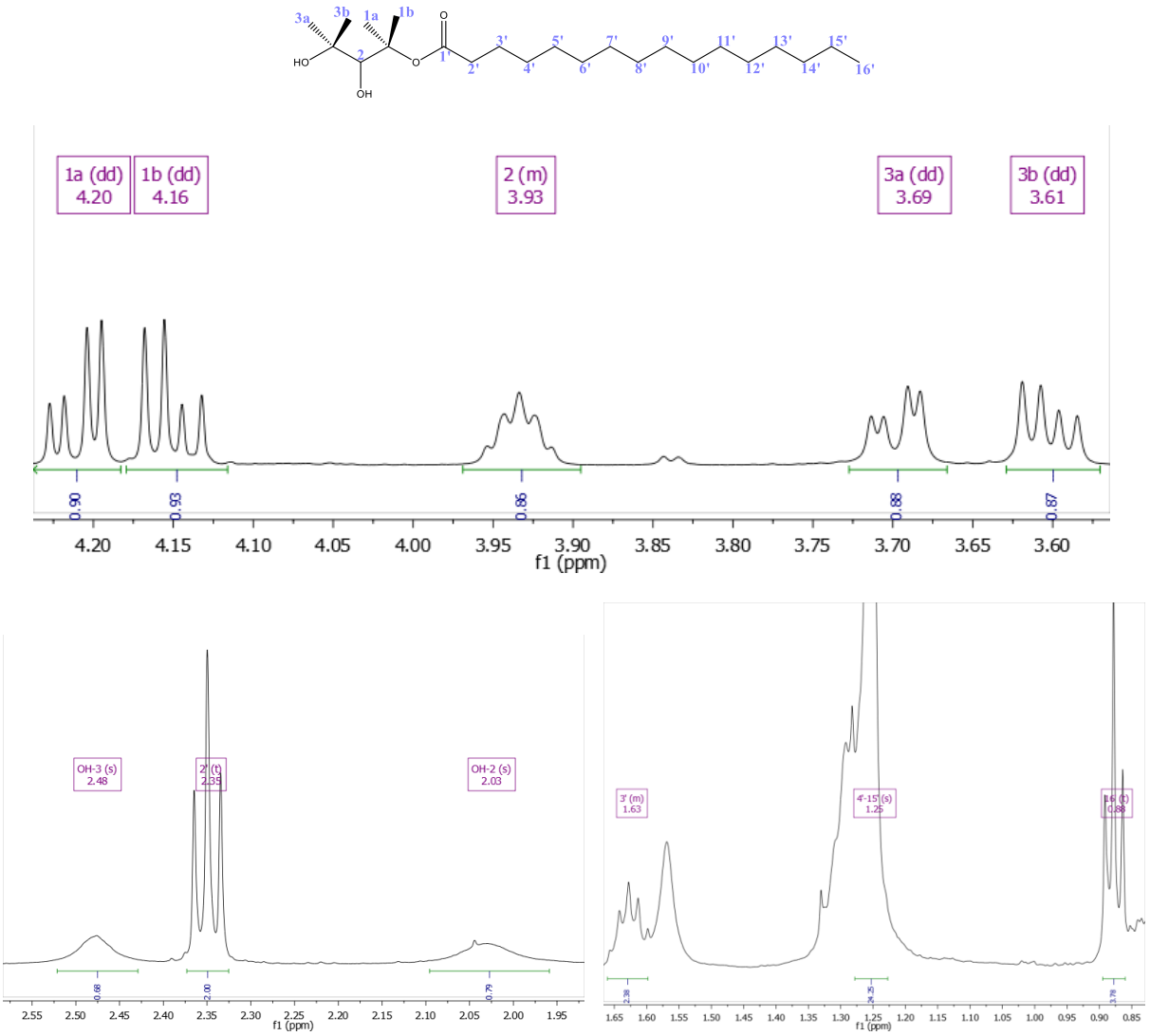


Figura 12: Ampliaciones del espectro de RMN de ^{1}H a 500 MHz en $CDCl_3$

La Integración de las señales indica que hay en total 38 hidrógenos. Las señales anchas en 2.48 y 2.03 ppm sugieren la presencia de grupos OH. Se observan 4 hidrógenos diasterotópicos en 4.20, 4.16, 3.69 y 3.61 ppm, debido a la presencia de un C estereogénico al que está unido el H en 3.93 ppm. Con las señales restantes se puede deducir que hay n-grupos metilenos y un metilo. Esta última información se confirma observando el espectro de ^{13}C y APT, descritos a continuación.

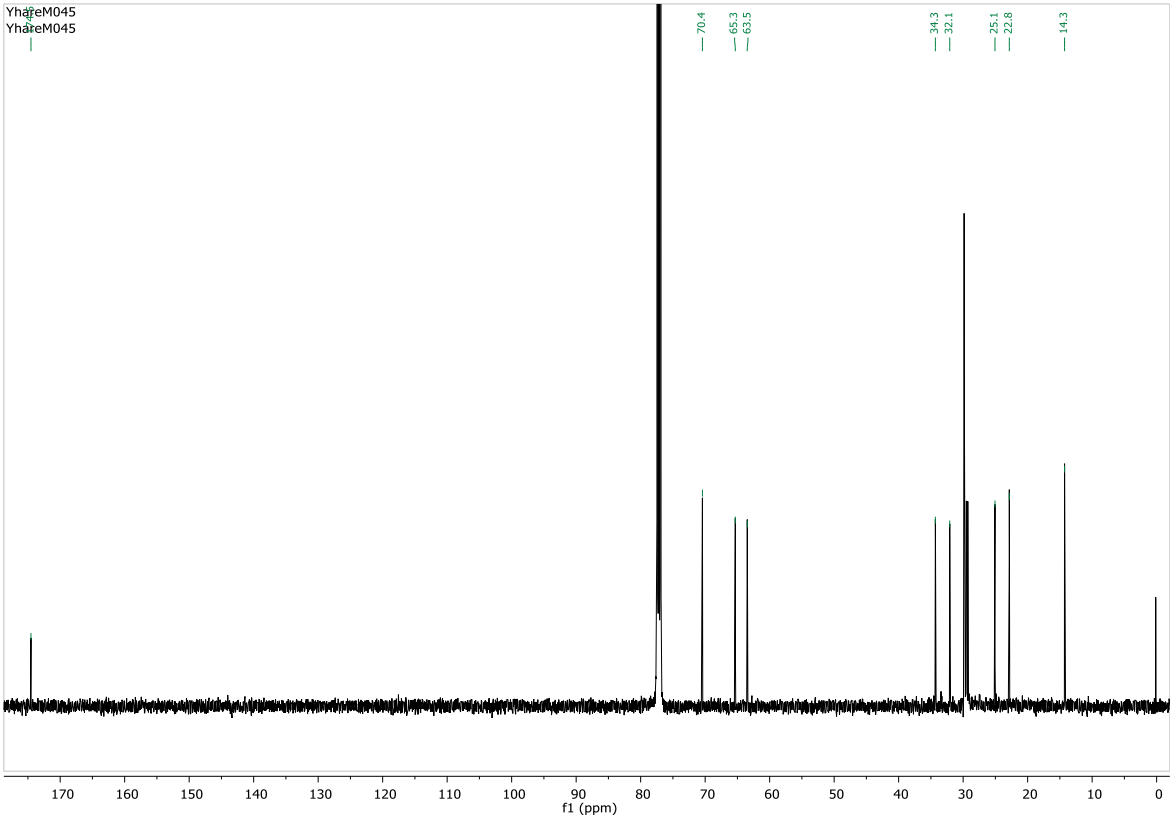


Figura 13: Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$ de M1

En este espectro (Figura 13) se observa la señal más desplazada a 174.5 ppm, lo cual indica que la molécula tiene un grupo carbonilo de éster. También se observan a simple vista 9 señales más, las cuales están en un rango de 70-14 ppm y se muestran ampliadas en la Figura 14. Con esta información y consultando tablas de referencia en la literatura se sugiere que la molécula contiene carbonos primarios y carbonos secundarios de alcanos, así como carbonos secundarios unidos a un átomo de oxígeno. Estas suposiciones se confirman con el espectro de APT (Figura 15).

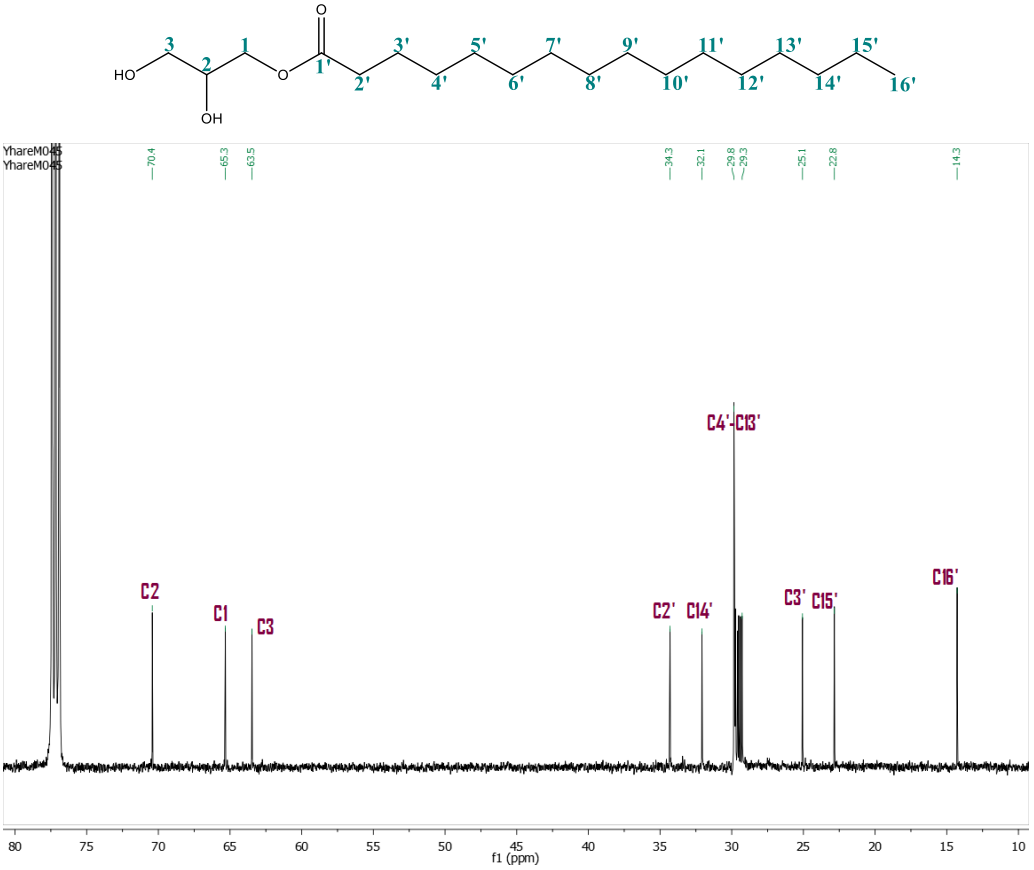


Figura 14: Ampliación del espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en $CDCl_3$

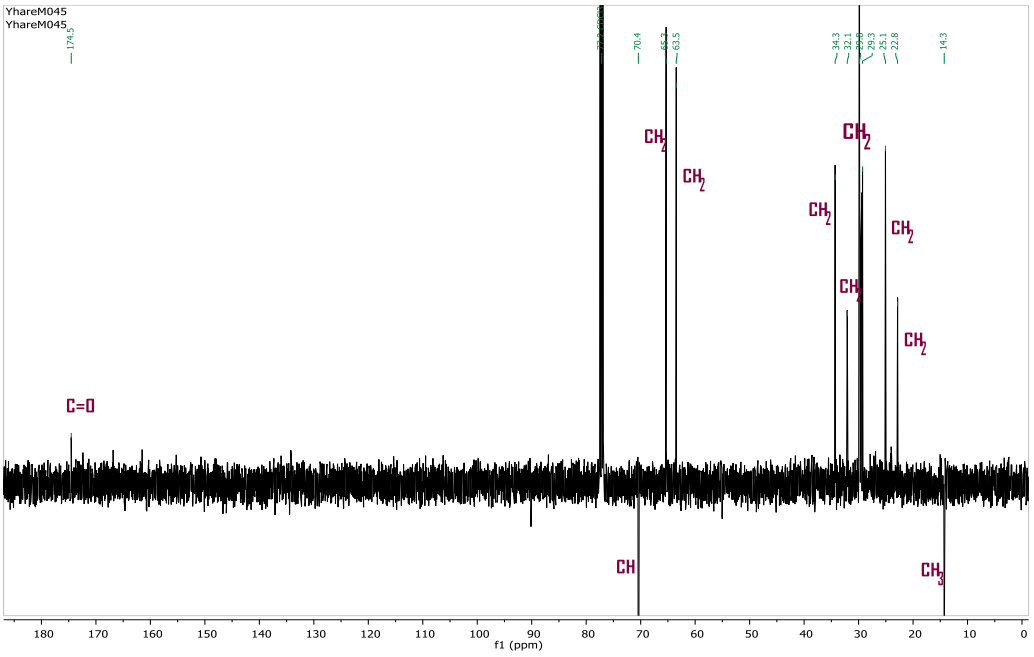


Figura 15: Espectro APT de M1, donde ↑= C, CH_2 ↓= CH, CH_3

Con esta información proporcionada por el espectro de APT se deduce que hay un carbono cuaternario el cual es de un grupo carbonilo de éster, un grupo metilo, un grupo metino y los carbonos restantes son de grupos metilenos. El resumen de señales se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9: Señales de ^{13}C en el espectro APT de M1

δ (ppm)	Orienteción de la señal	Tipo de Carbono
174.5	↑	Carbonilo de éster
70.4	↓	CH
65.3	↑	CH_2
63.5	↑	CH_2
34.3	↑	CH_2
32.1	↑	CH_2
29.8-29.3	↑	CH_2
25.1	↑	CH_2
22.8	↑	CH_2
14.3	↓	CH_3

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

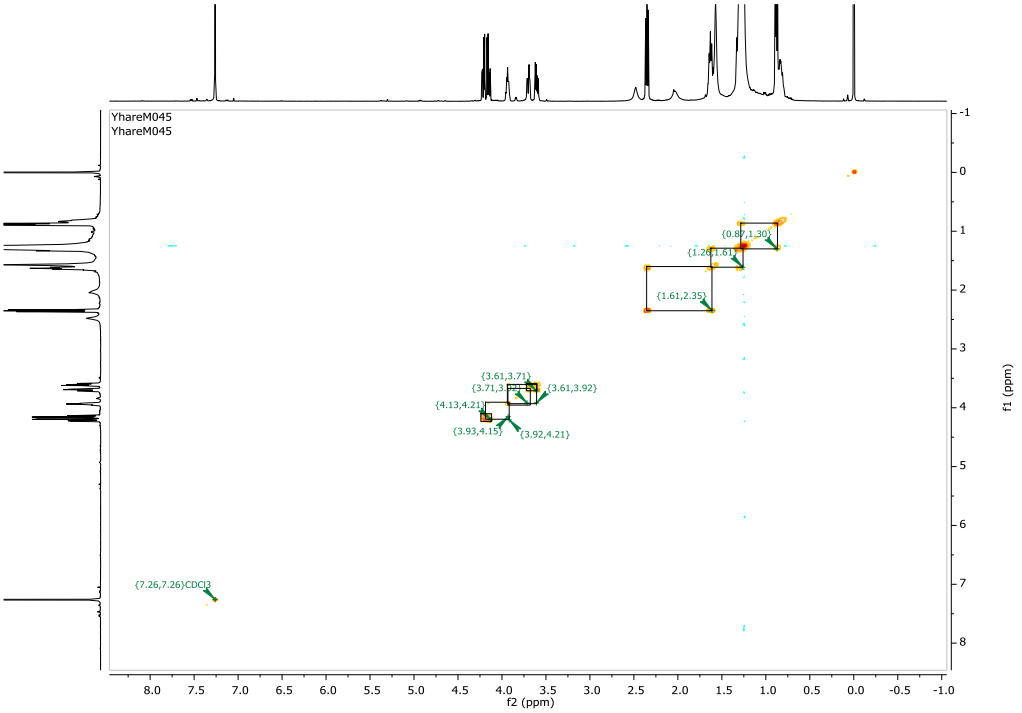


Figura 16: Espectro de RMN 2D COSY en $CDCl_3$ de M1

Para hacer una mejor observación y correcta correlación de los grupos de H se muestran las ampliaciones del espectro COSY. (Figuras 17 y 18)

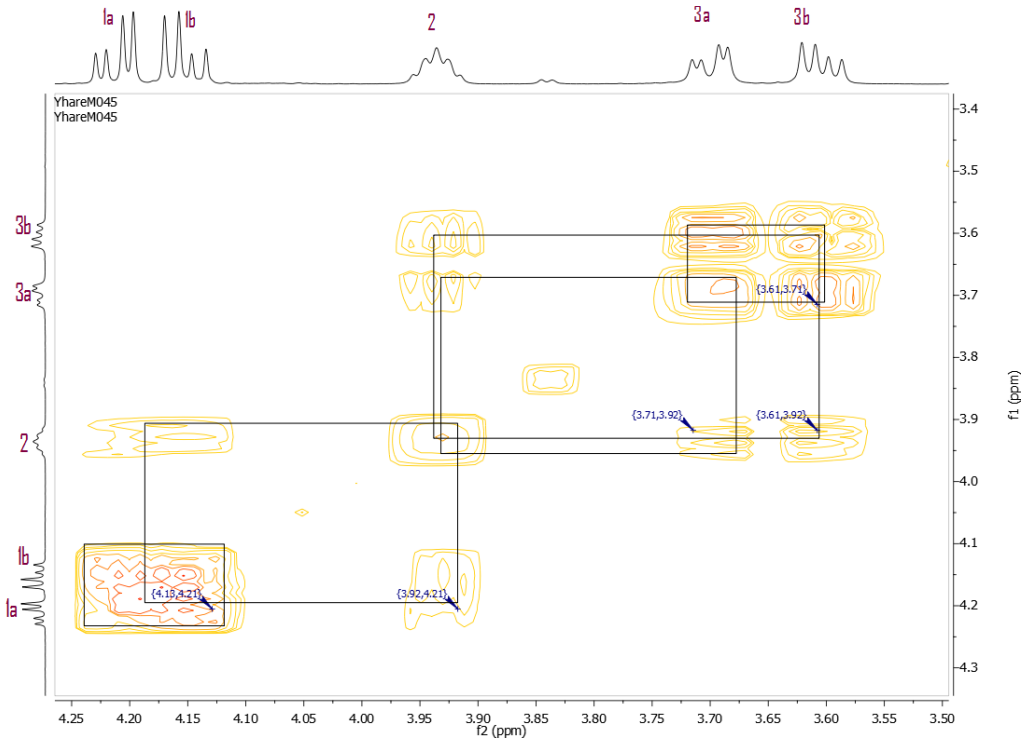


Figura 17: Ampliación del espectro COSY, región 4.3-3.5 ppm

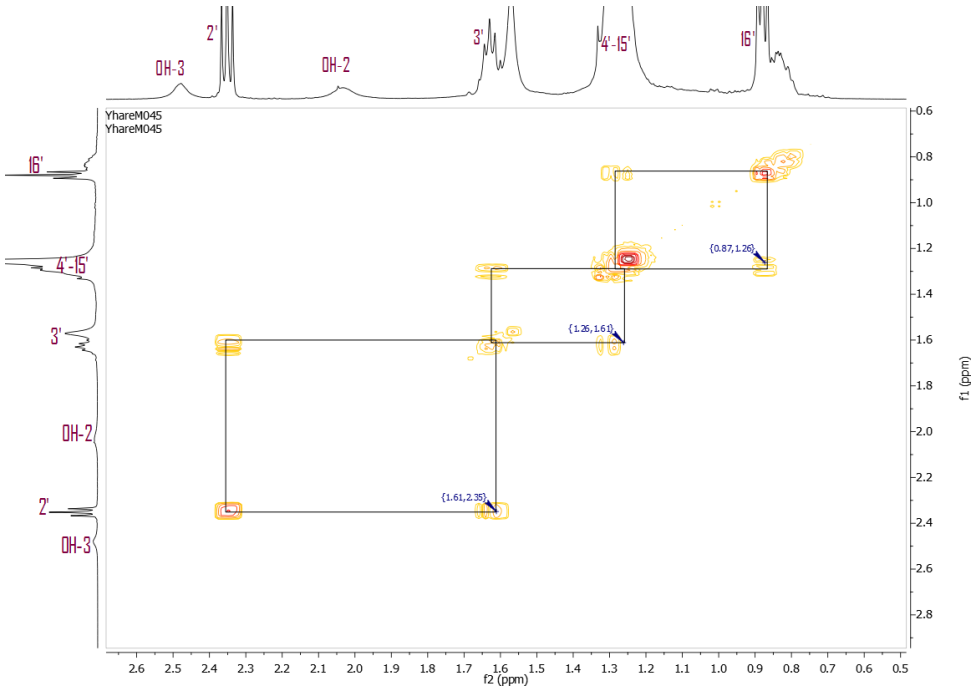


Figura 18: Ampliación del espectro COSY, región 2.5-0.5 ppm

En la figura 17 se observa que la señal en 4.20 ppm (1a) correlaciona con la señal que se encuentra en 4.15 ppm (1b). A su vez ambas señales, 1a y 1b, también correlacionan con la señal múltiple en 3.93 ppm (2) y esta señal múltiple también se correlaciona con las señales en 3.69 ppm (3a) y 3.61 ppm (3b). Al mismo tiempo 3a y 3b se están correlacionando entre ellas. Estas cinco señales no tienen ninguna correlación con las señales que se observan en 2.5-0.5 ppm (Figura 12), lo cual indica que la molécula es como si tuviera dos partes.

Observando las señales (Figura 18) ubicadas a menor desplazamiento químico; se correlaciona la señal triple en 2.35 ppm (2') con la señal múltiple en 1.63 ppm (3'), mientras que 3' se correlaciona con la señal H (4'-15'), 4'-15' se correlaciona con la señal tripe en 0.88 ppm (16'). También se observa que las señales en 2.48 y 2.03 ppm no tienen ninguna correlación.

Tabla 10: Correlaciones entre las señales de H

δ (ppm)	Correlación
4.2	4.16
4.2	3.93
4.16	3.93
3.93	3.69
3.93	3.61
3.69	3.61
2.35	1.63
1.63	1.25
1.25	0.88

Para una correcta asignación de los carbonos correlacionándolos con los hidrógenos, se procedió a la obtención del espectro 2D HSQC (Figura 19).

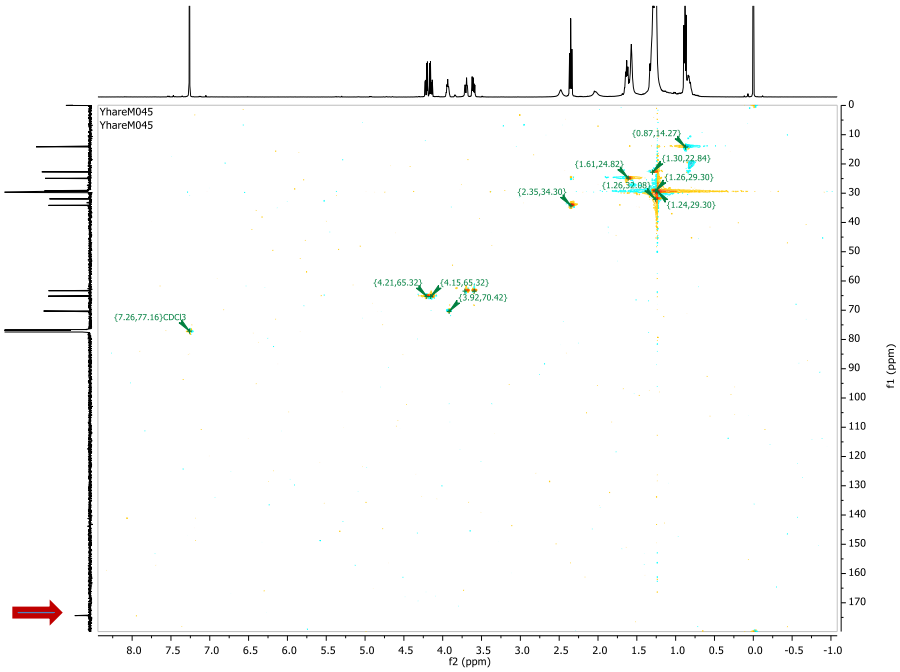


Figura 19: Espectro de RMN 2D HSQC de M1

Observando el espectro completo HSQC, inmediatamente se comprueba que el C en 174.5 ppm (flecha roja) pertenece a un grupo carbonilo de éster, ya que no se correlaciona con ninguna señal de hidrógeno. Se amplía el espectro para hacer las correctas asignaciones de H a su C correspondiente (Figuras 20 y 21).

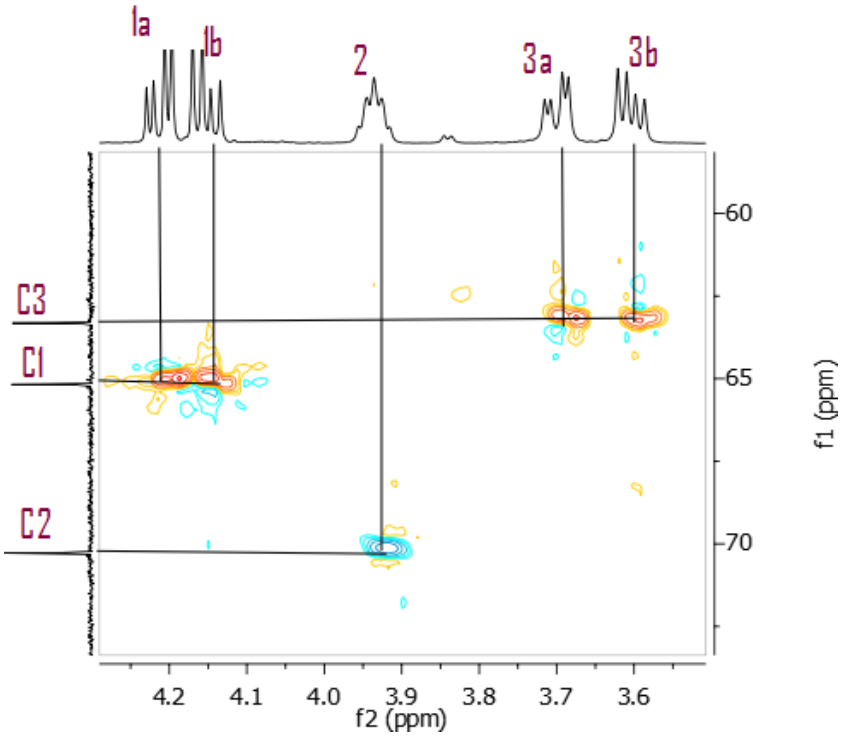


Figura 20: Ampliación del espectro HSQC, región 4.3-3.5-60-70 ppm

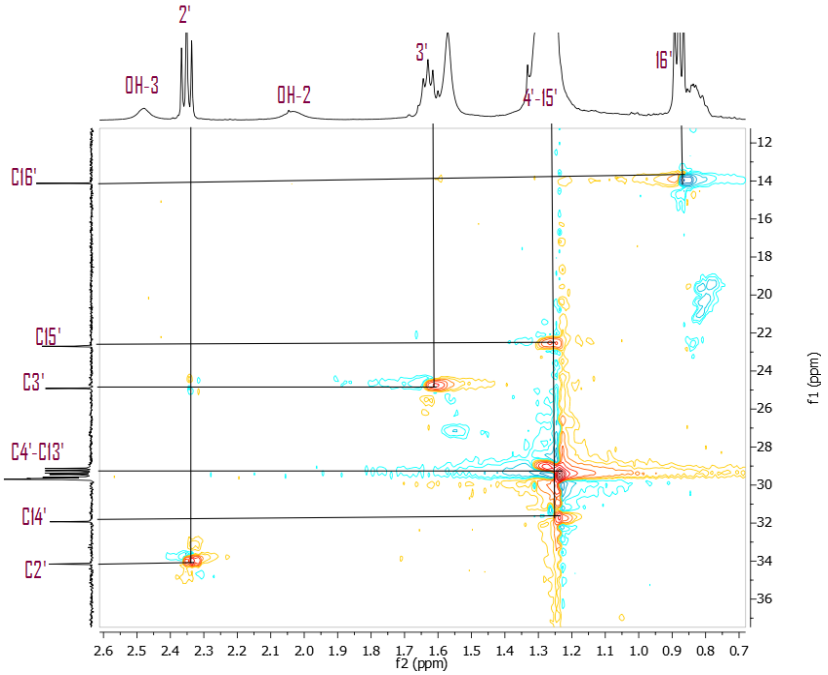


Figura 21: Ampliación del espectro HSQC, región 2.5-0.5-36-14 ppm

Tabla 11: Resumen de la información obtenida en los espectros de ^{1}H, ^{13}C, APT, COSY y HSQC.

δ (ppm)	Tipo de Carbono	Etiqueta	Correlación H	Integración	Etiqueta	Multiplicidad
174.5	Carbonilo tipo ester	C-1'	***	***	***	***
70.4	CH	C-2	3.93	1H	H-2	m
65.3	CH2	C-1	4.2	1H	H-1a	dd
65.3	CH2	C-1	4.16	1H	H-1b	dd
63.5	CH2	C-2	3.69	1H	H-3a	dd
63.5	CH2	C-2	3.61	1H	H-3b	dd
34.3	CH2	C-2'	2.35	2H	H-2'	t
32.1	CH2	C-14'	1.25			
29.8-29.3	CH2	C-4'-C13'	1.25	24H	H-4'-15'	br. S
22.8	CH2	C15'	1.31			
25.1	CH2	C-3'	1.63	2H	H-3'	m
14.3	CH3	C-16'	0.88	3H	H-16'	t

Conjuntamente con estos análisis espectroscópicos se realizó un análisis HMBC (Figura 22) para complementar la información obtenida y llegar a la correcta elucidación de la molécula.

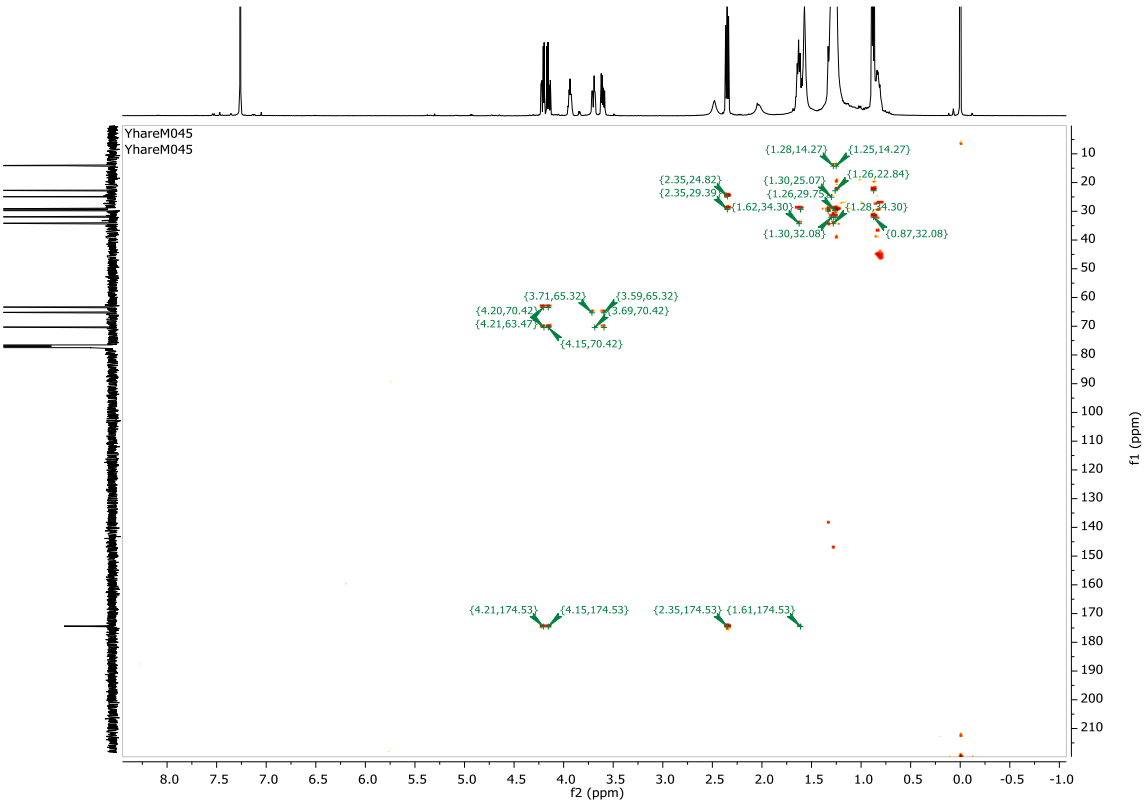


Figura 22: Espectro de RMN 2D HMBC de M1

Se amplía el espectro para hacer las correctas asignaciones de H a su C correspondiente, y predecir las interacciones C-H a 2-3-4 enlaces (Figuras 23, 24 y 25).

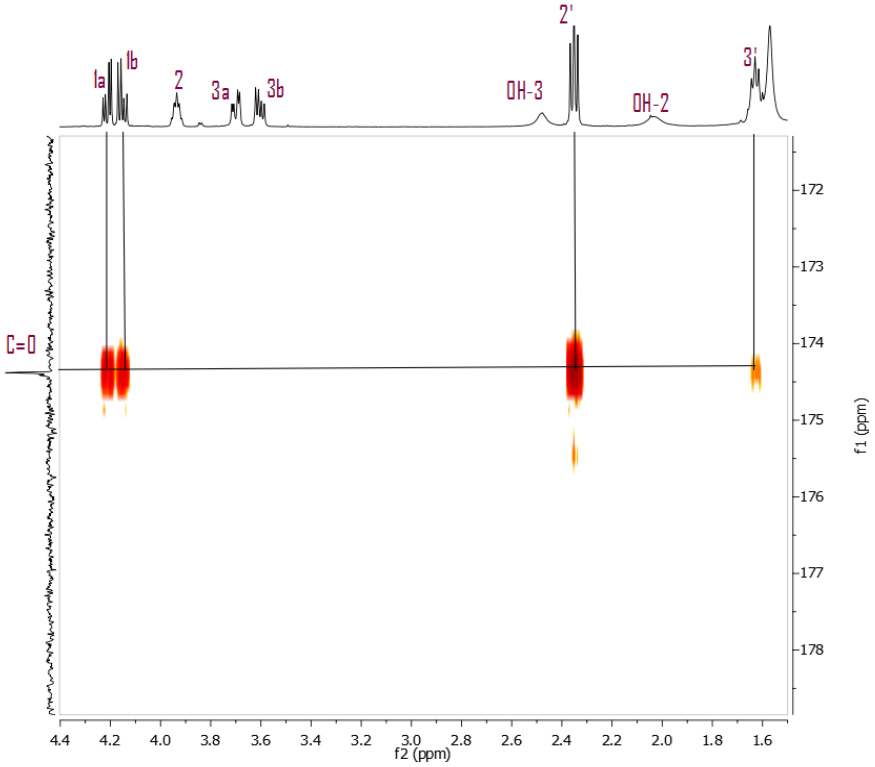


Figura 23: Ampliación del espectro HMBC, región del ^{13}C 170 ppm

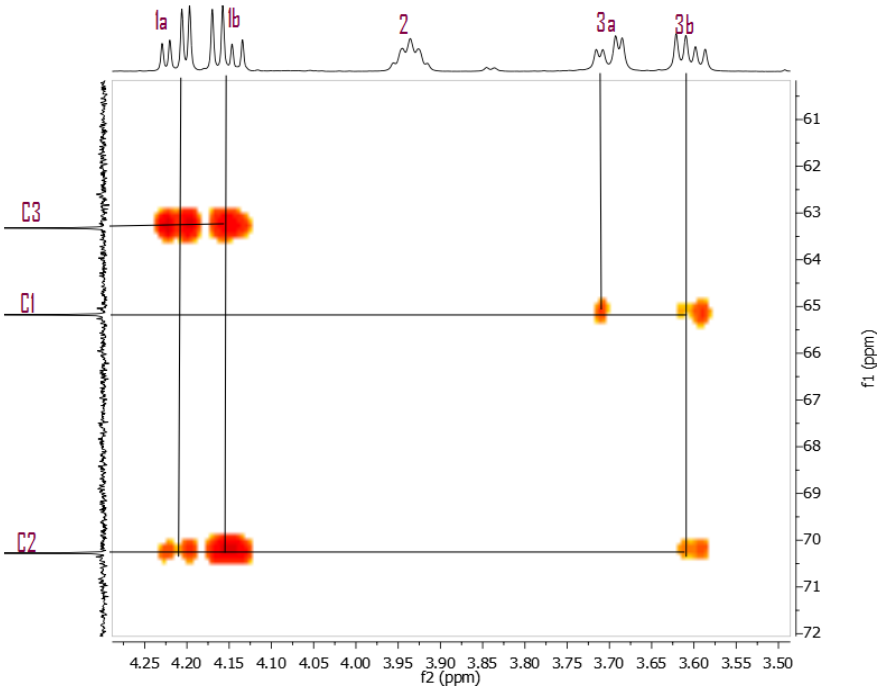


Figura 24: Ampliación del espectro HMBC, región del ^{13}C 70-60 ppm

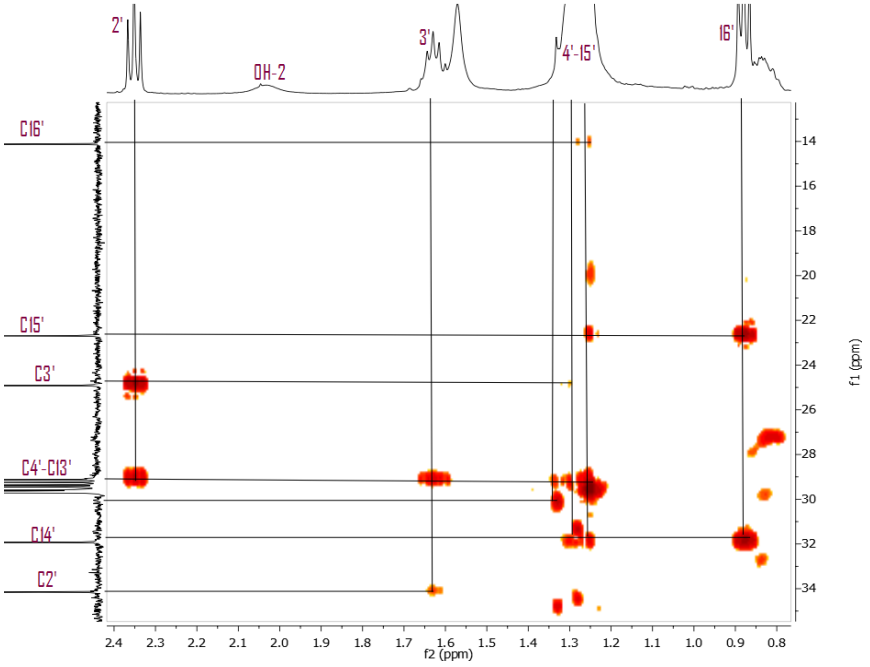


Figura 25: Ampliación del espectro HMBC, región del ^{13}C 35-14 ppm

En la tabla 12 se exponen a manera de resumen los datos obtenidos del espectro HMBC, en la cual se muestran las interacciones C-H a 2-3-4 enlaces.

Tabla 12: Correlaciones entre las señales C-H a 2-3-4 enlaces

C (ppm)	Interacción -H (ppm)	
174.5	4.2	4.16
	2.35	1.63
70.4	4.2	4.15
	3.69	3.61
65.3	3.69	3.61
63.5	4.2	4.16
34.3	1.63	1.25
32.1	1.31	1.25
	0.88	
29.8-29.3	2.35	1.63
	1.31	1.25
25.1	2.35	1.25
22.8	1.25	0.88
14.3	1.31	1.29

También se determinó el punto de fusión del compuesto 1, dando un resultado de 65.9 ºC.

Por lo ya comentado anteriormente debido a la presencia de los hidrógenos diastereotópicos es claro que la molécula tiene un centro estereogénico y por lo tanto actividad óptica. Por lo que, con ayuda de un polarímetro se determinó su actividad óptica dando un resultado de: $[\alpha]_D^{20}$= -1.16 (*c* 2.8, $CHCl_3$).

Después de este análisis, también se procedió a estudiar el espectro obtenido de la espectrometría de masas (EI-MS), el cual se muestra a continuación, en la figura 26.

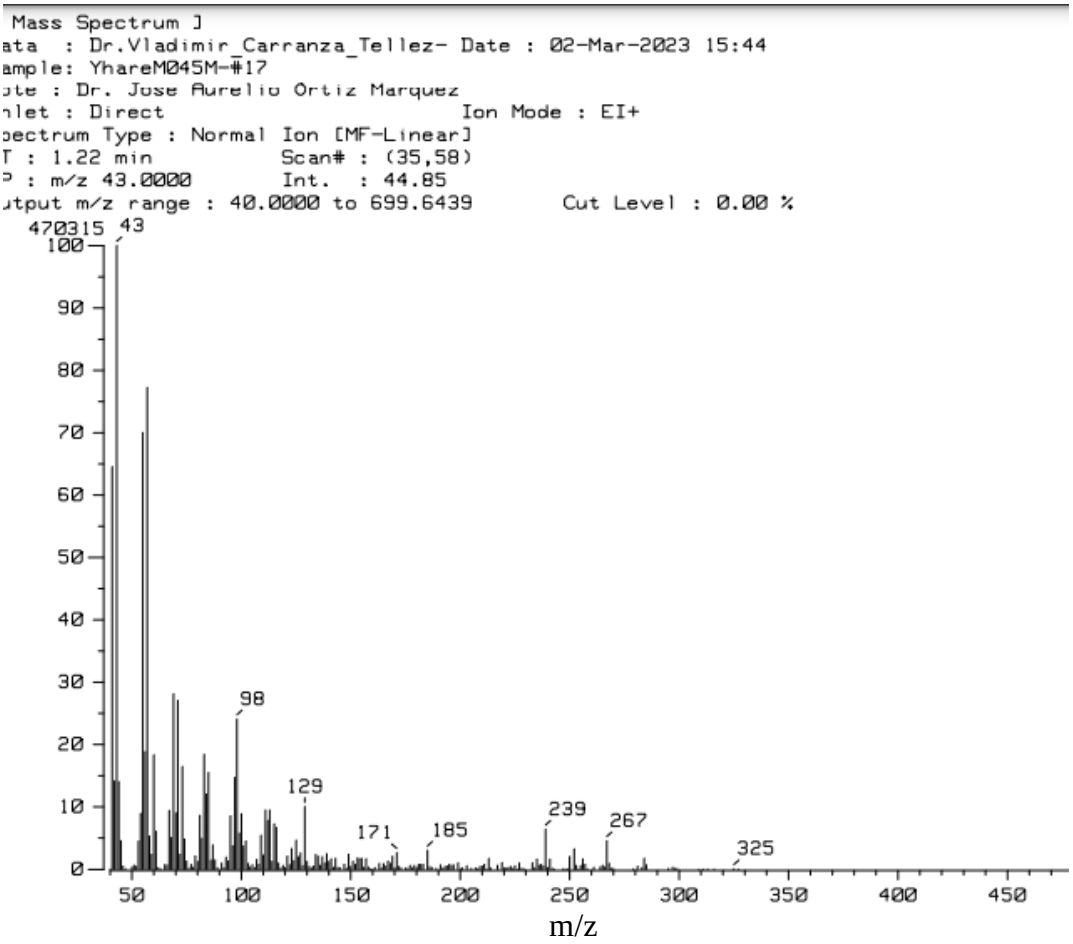


Figura 26: Espectrometría de masas por impacto electrónico (EI-MS) de M1

Debido a problemas técnicos y de cantidad de muestra no se pudo realizar un análisis de alta resolución (HR-MS), sin embargo, con los datos obtenidos en este espectro se pudo asignar cada pico con los fragmentos de la molécula.

El pico base se observa en m/z 43 el cual corresponde a un ion pequeño $[CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_3]^{\cdot+}$, el pico en m/z 239 se refiere al fragmento de ion acilio $[RCO]^{\cdot+}$, el pico en m/z 98 se refiere a un fragmento originado a partir de un reordenamiento del ion acilio, como se propone en la Figura 27. Estas fragmentaciones son comunes en los monoglicéridos, como por ejemplo en el 1-Palmitil glicerol.

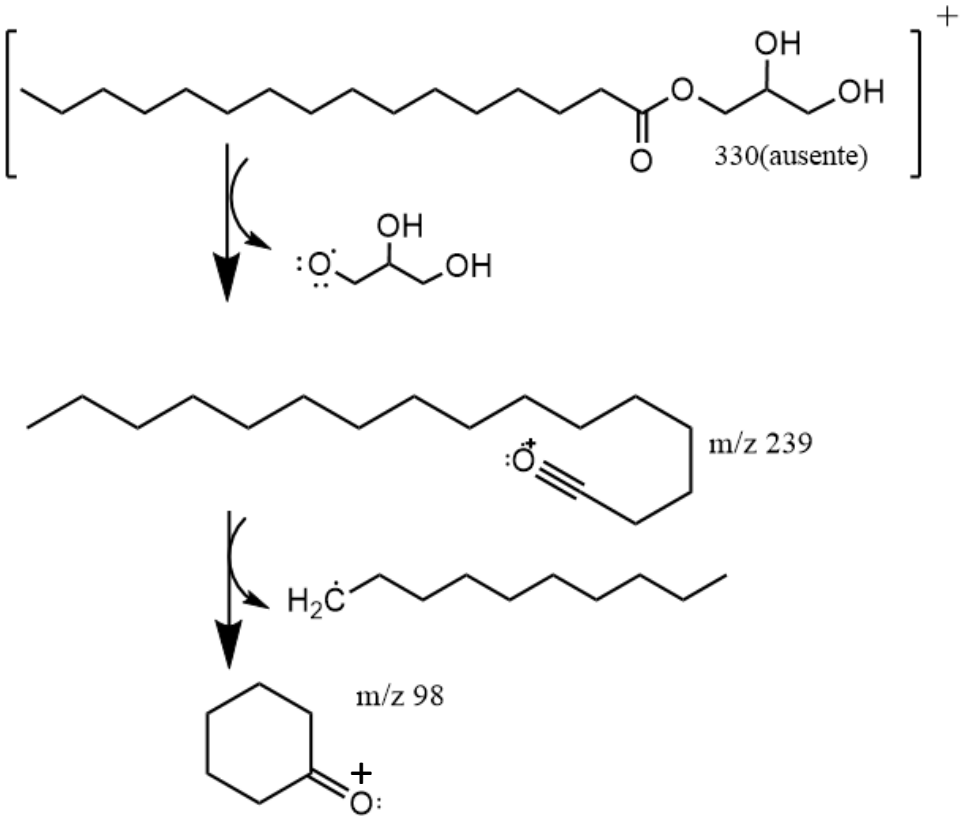


Figura 27: Fragmentaciones comunes en los monoglicéridos

Con esta información se llegó a la elucidación de la molécula M1 de la fracción 3B, la cual corresponde al 1-Palmitil glicerol (Figura 28). Se muestra una tabla del nombre y las propiedades químicas de la molécula en la tabla 13.

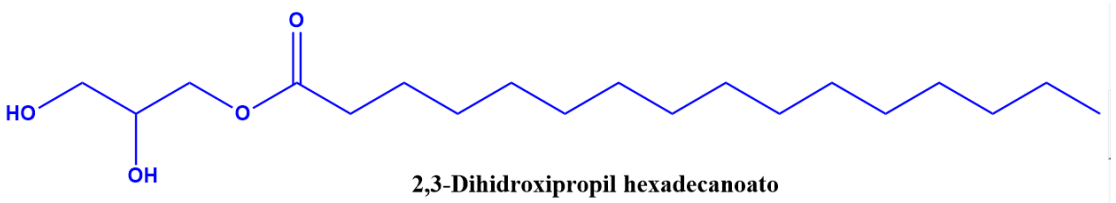
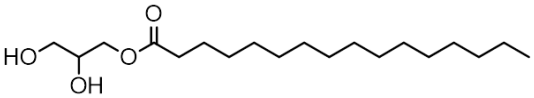


Figura 28: Estructura propuesta para la fracción 3B (M1)

Tabla 13: Estructura y propiedades químicas de la fracción 3B (M1)

Estructura propuesta:	**Nombre de identificación:**	**Peso molecular:**	**Actividad óptica**
	2,3-Dihidroxipropil Hexadecanoato (1-Palmitil glicerol) **Fórmula empírica:** $C_{19}H_{38}O_4$	330.5026 g/mol **Punto de fusión:** 65.9 °C	$[\alpha]_D^{20}$= -1.16

4.6 Pruebas biológicas de inhibición

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

Las bacterias utilizadas fueron: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella choleraesuis* y *Vibrio parahaemolyticus*. Se decidió utilizar estas bacterias debido a que son bacterias de interés clínico por las recurrentes infecciones que provocan en los seres humanos, algunas de ellas causan principalmente infecciones gastrointestinales a través de alimentos y otras provocan enfermedades respiratorias. Siendo así de gran importancia la búsqueda de nuevos compuestos que tengan actividad contra estas bacterias patógenas ya que en la actualidad hay una creciente problemática de resistencia bacteriana contra diferentes antibióticos por lo que encontrar algunas alternativas es de gran interés. Para probar dicha actividad se utilizó el método de difusión en agar Müeller Hinton, obteniendo así halos de inhibición los cuales indican si hay o no actividad bactericida. Los halos de inhibición se miden a las 24 horas de incubación.

Las fracciones evaluadas fueron: 11B, 12A, 12B, 13A y 13B. Los resultados se muestran en la Figura 29. Las medidas en milímetros de los halos de inhibición se muestran en la tabla 14.

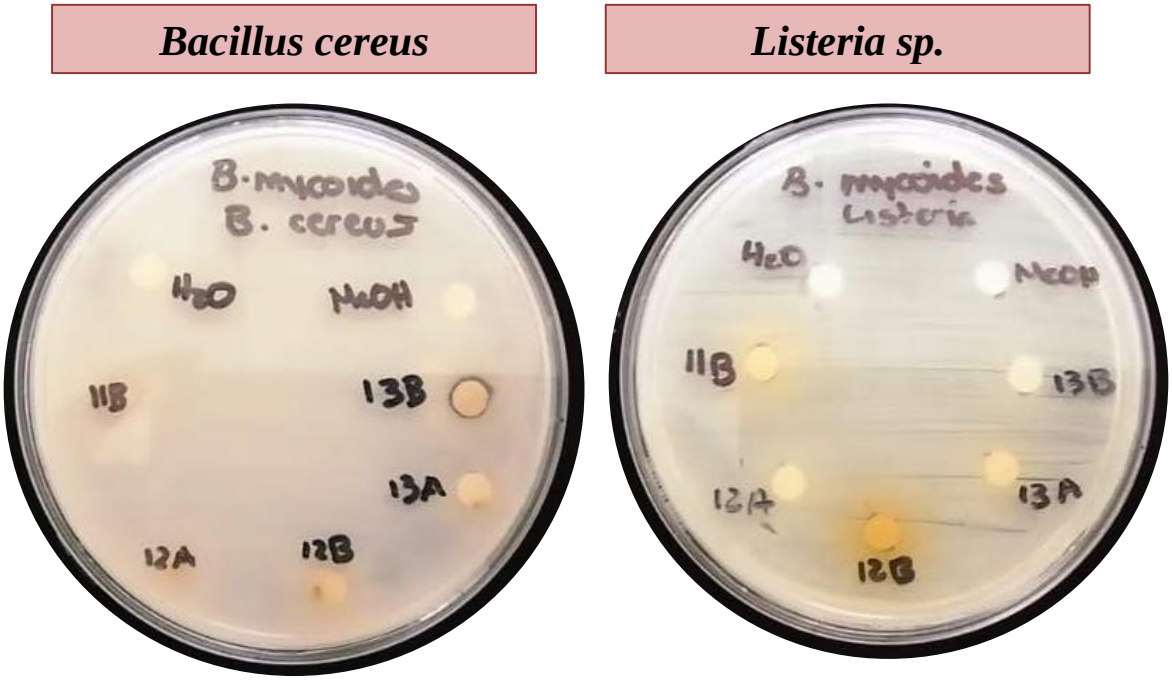


Figura 29: Pruebas de inhibición en bacterias

Tabla 14: Medidas de los halos de inhibición en centímetros de las fracciones de la cepa de *Bacillus mycoides*

Bacteria	11B	12A	12B	13A	13B
Listeria monocytogenes	0	0	0	1.8	1.8
Bacillus cereus	0	3.2	3.2	0	0
Salmonella cholerasius	0	0	0	0	0
Vibrio parahaemolyticus	0	0	0	0	0

De estos resultados se puede observar que las bacteriocinas tienen mayor poder inhibitorio contra bacterias Gram positivas, esto relacionado a la estructura de la pared bacteriana, siendo más compleja en las Gram negativas (doble membrana y espacio periplasmático) y por lo tanto son más difíciles de inhibir.

Las fracciones 12A y 12B se juntaron ya que se asumió que estas fracciones eran iguales al producir halos de inhibición iguales. Se hizo lo mismo con las fracciones 13A y 13B. Para efectos prácticos se nombrarán solo como 12B y 13B.

Posteriormente se realizó electroforesis en gel SDS-PAGE, como se explica detalladamente en la sección 6.10 de Desarrollo experimental.

Conociendo el peso molecular de las bacteriocinas se procedió a realizar pruebas de solubilidad y estabilidad. Obteniendo los siguientes resultados.

- **Fracción 12B (Bacteriocina 3.39 kDa)**

Estable a una temperatura de 60- 80 °C durante 10 minutos. A 100 °C la actividad se reduce un 50 %. 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 15).

Tabla 15: Prueba de solubilidad de la bacteriocina 12B

Disolvente	Solubilidad	Actividad
AcOEt	NO	***
DCM	NO	***
Acetona	NO	***
MeOH	SI	SI
H_2O	SI	SI

- **Fracción 13B (Bacteriocina 2.91 kDa)**

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 (Tabla 16).

Tabla 16: Prueba de solubilidad de la bacteriocina 13B

Disolvente	Solubilidad	Actividad
AcOEt	NO	***
DCM	NO	***
Acetona	NO	***
MeOH	SI	SI
H_2O	SI	SI

Para la evaluación del efecto antifúngico se utilizaron los hongos: *Fusarium solani, Mucor spp. Aspergillus flavus y Aspergillus niger,* Estos son hongos fitopatógenos que causan graves afecciones en plantas. Las cuales pueden conducir a grandes pérdidas económicas en la agricultura. Por esta razón el estudio de la actividad antifúngica de los

compuestos obtenidos contra estos hongos es importante y podría ser de gran ayuda en la búsqueda de nuevos antifúngicos naturales.

Para cada diana (fitopatógeno) las pruebas se hicieron por cuadruplicado en microplacas de cultivo tanto para el blanco como para los compuestos analizados. El medio de cultivo utilizado fue PDA (Agar Papa Dextrosa), los compuestos a estudiar fueron 9A-13B, M1 se prepararon a una concentración de 1 mg/mL. Como se explica en la sección 6.9 de Desarrollo experimental

Todo el material debe ser estéril y todo el procedimiento se hace en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero Bunsen). En la microplaca cada diana debe tener un blanco de referencia. Se prepararon 1400 µl en total de cada solución, a cada pozo de la microplaca se agregaron 300 µl y se dejó solidificar. Con un transfer se tomó parte del micelio periférico del hongo y se colocó sobre el medio de cultivo. Posteriormente todos los cultivos se incubaron en una estufa a 29 °C y la lectura se hizo a las 24 y 48 horas (Tabla 17 y 18). Es importante mencionar que M1 sólo se evaluó frente a 3 hongos (Tabla 19 y 20) y el experimento sólo se hizo por duplicado, debido a la pequeña cantidad de muestra.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Las fracciones 10B-13B muestran un porcentaje de inhibición significativo a las 24 horas contra *Fusarium solani*. Siendo 13A el compuesto con un mayor porcentaje de inhibición (57.5%).

A las 48 horas se observa el mismo efecto de las fracciones 10B-13B contra *F. solani*. Siendo 13A el compuesto con mayor porcentaje de inhibición (54%).

Considerando que las fracciones 12A, 12B, 13A y13B se analizaron por electroforésis y además se determinó que poseen actividad bactericida, se deduce que estas fracciones contienen una mezcla de bacteriocinas y lipopéptidos. Los lipopéptidos son los responsables de la actividad antifúngica.

Tabla 17: Porcentajes de inhibición de las fracciones 9A-13B, 24 horas

24 horas										
HONGO	**9A**	**9B**	**10A**	**10B**	**11A**	**11B**	**12A**	**12B**	**13A**	**13B**
Fusarium solani	1.4	1.2	1.3	18	25.7	27.2	15.8	46.3	57.5	47.8
Mucor sp	0.8	1	1.5	1	2.6	0.7	0.7	0.5	2.7	1.7
Aspergillus flavus	3.3	2.2	2.8	1.7	0.5	1.8	1.7	1.6	1.6	1.7
Aspergillus niger	1.1	0.9	1.1	2.6	1	1.1	1.2	1.1	1.6	1.2

Tabla 18: Porcentajes de inhibición de las fracciones 9A-13B, 48 horas

48 horas										
HONGO	9A	9B	10A	10B	11A	11B	12A	12B	13A	13B
Fusarium solani	0.3	0.2	0.3	17.7	26.1	24.3	19	40.7	54	47.6
Mucor sp	0.8	0.2	1.2	0.2	0.6	0.6	0.5	0.4	3	1
Aspergillus flavus	1.8	3.5	2	3.1	0.4	1.7	0.01	2.5	2	1.2
Aspergillus niger	1.6	1.4	2.7	1	2.8	2.2	2.5	1.3	2.3	1.7

Tabla 19: Porcentajes de inhibición de 1-Palmitil glicerol, 24 horas

24 horas			
MOLÉCULA	***F. solani***	***Mucor sp***	***A. flavus***
M1	0.1	0.01	0.3

Tabla 20: Porcentajes de inhibición de 1-Palmitil glicerol, 48 horas

48 horas			
MOLÉCULA	***F. solani***	***Mucor sp***	***A. flavus***
M1	0.03	0.05	0.1

El compuesto 1-Palmitil glicerol no presentó porcentajes de inhibición significativos, estos resultados podrían ser reafirmados obteniendo más cantidad del compuesto y haciendo el experimento por cuadruplicado, tal y como se hizo para las fracciones 9A-13B. Debido a la poca cantidad del compuesto ya no se pudieron hacer más ensayos con más cantidad o con otros hongos diferentes.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Cepa *Bacillus mycoides* Aca 5 ELI 220

Se utilizó la cepa ELI 220 que corresponde a *Bacillus mycoides* la cual fue inicialmente aislada de una muestra de tierra proveniente de Acapulco.

5.1 Medios de Cultivo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

posteriormente se decanta desechando el metanol, finalmente la Amberlita se agrega al caldo de cultivo que ha sido inoculado con la cepa Eli 220.

5.3 Crecimiento de la cepa *B. mycoides*

La cepa ELI 220 se creció primeramente en una placa de medio sólido LB durante 24 horas a 29 °C, se observó su morfología macroscópica, colonias grandes, cerosas, color crema, bordes rizoides (Figura 8) y se analizó microscópicamente para corroborar que la placa estaba libre de contaminación por otras bacterias u hongos. (Figura 9)

5.4 Extracción de Productos Naturales

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

Después de este tiempo, se recuperó la Amberlita por decantación (desechando la fase acuosa del medio de cultivo) y se colocó en un vaso de precipitado con 60 mL de metanol con agitación constante durante 20 min aproximadamente, este lavado con 60 mL de MeOH se hizo 4 veces o hasta que la Amberlita quedó de color blanco nuevamente y el metanol adquirió un color café claro. Todo el metanol recolectado se centrifugó durante 5 minutos a 6000 rpm con el propósito de obtener un sobrenadante libre de células bacterianas. El MeOH se recuperó nuevamente por decantación, y se colocó en un matraz de bola para evaporar hasta tener aproximadamente 10 mL del extracto. Se colocó el extracto en viales etiquetados y pesados, los cuales se metieron en la estufa durante 48 h a 29 °C para logar el secado total del extracto crudo.

5.5 Fraccionamiento general del extracto seco mediante cromatografía en columna

El extracto obtenido se aplica a una columna cromatográfica usando gel de sílice como fase estacionaria y como fase móvil se usó un gradiente de eluyentes que va del menos hasta el más polar: (Hex,AcOEt,DCM,MeOH). Todas las fracciones obtenidas se analizan en cromatografía en placa fina (TLC) para elegir el mejor sistema de elución y así lograr la purificación de PN.

5.6 Purificación

La purificación de las 26 fracciones se hizo por separado para cada una, mediante una segunda cromatografía en columna de gel de sílice, y como fase móvil sistemas de elución diferentes para cada fracción.

5.7 Identificación y elucidación de Productos Naturales

Por cromatografía en placa fina y revelador de luz UV se sugirió la reunión de aquellos tubos en donde se suponía había un compuesto puro. Mediante técnicas espectroscópicas de RMN 1D y 2D se confirmó la obtención de PN puros. Haciendo los análisis adecuados de los espectros en 1 y 2 dimensiones: ^{1}H, ^{13}C y COSY, APT, HSQC, HMBC, respectivamente, así como su análisis por espectrometría de masas (EI-MS) se logró la identificación y elucidación de los PN.

5.8 Evaluación de la capacidad bactericida de los PN obtenidos de *B. mycoides*

Las bacterias utilizadas fueron: *Salmonella* cholerasuis, *Vibrio parahaemolyticus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes y Bacillus cereus.* Estos microorganismos se incubaron en 3 mL de caldo LB, a una temperatura de 29 °C con agitación constante a 200 rpm durante 24 h, para alcanzar una densidad celular aproximada de $1x10^{8}$ unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro. De la suspensión se sembraron por estría masiva 100 µl en cajas Petri de 100 x 15 mm con agar Müller Hinton.

15 mg de cada fracción de interés (12B y 13B) obtenida mediante cromatografía en columna se disolvieron en 100 µl de MeOH, discos estériles de papel filtro se impregnaron con 5 µl de la solución anterior (0.75 mg), estos discos se colocaron en las placas que fueron inoculadas con las diferentes bacterias y se dejaron en incubación a 29º C durante 24 horas. Como controles negativos se utilizaron dos discos de papel filtro uno con 5 µl de agua y otro con 5 µl de MeOH y como control positivo discos con Vancomicina (para Gram positivas) y Ampicilina (para Gram negativas). Los halos de inhibición del crecimiento alrededor de los discos se midieron a las 24 horas de incubación.

5.9 Evaluación de la capacidad antifúngica de los PN obtenidos de *B. mycoides*

El ensayo biodirigido se realizó utilizando como diana hongos fitopatógenos. Para este ensayo se utilizaron cuatro hongos; *Fusarium solani*, *Mucor spp. Aspergillus flavus y Aspergillus niger*, los cuales se cultivaron en medio PDA. Cada cultivo debe ser fresco, con una antigüedad no mayor a 5 días.

Para cada diana se utilizaron 1.4 mg de cada fracción con probable actividad antifúngica (9A-13B, M1), disuelto en 35 µl de etanol. En un tubo Eppendorf se agregaron los 35 µl, más 1365 µl de agar PDA, obteniendo una concentración final de 1 mg/mL. Utilizando esta concentración final se agregaron 300 µl a cada pocillo de la microplaca de cultivo, procurando en todo momento que la distribución del agar fuera uniforme y no se formaran burbujas ni grumos. Esta cantidad final (1400 µl) fue suficiente para hacer el experimento por cuadruplicado.

Cada hongo se cortó con un transfer o popote de plástico duro, limpio y estéril. Cada "círculo de hongo" cortado se colocó con ayuda de una pinza sobre el agar contenido en el pocillo, de manera que la parte del micelio del hongo quedó tocando la superficie del agar. Se selló la microplaca de cultivo y se incubó a 29ºC.

Posteriormente se hizo un escaneado de la microplaca para saber la medida inicial del hongo y su evolución del crecimiento con el tiempo (24 y 48 h). La lectura del crecimiento a partir de las imágenes escaneadas se realizó utilizando el programa Image J. Mediante cálculos estadísticos se determinó el porcentaje de inhibición.

5.10 Electroforesis SDS-PAGE

Para realizar esta electroforesis en primer lugar se requiere el gel, el cual estará constituido de dos partes:

- Gel concentrador: gel de poliacrilamida con tamaño de poro grande. Este gel se preparó con un 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 de poro pequeño que se confeccionó 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:

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

Las cantidades de cada uno de estos reactivos se muestra en la siguiente tabla 21:

Tabla 21: Componentes del gel separador y concentrador

	Gel concentrador 4%	**Gel separador 12%**
30% bis acrilamida	1.98 ml	6 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	3.78 ml	----
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	---	3.75 ml
10% SDS	150 µl	150 µl
H2O	9 ml	5.03 ml
TEMED	15 µl	7.5 µl
10% PSA	75 µl	75 µl
Volumen total	15 ml	15 ml

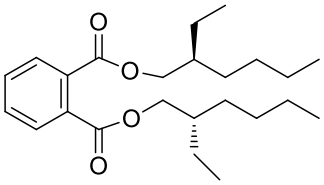
Con el gel preparado se colocaron 7-12 µl de la muestra previamente disuelta en el gel de carga. Se colocó dentro del recipiente, lo que permitió el paso continuo de la corriente eléctrica. Se encendió a 80 V y al pasar al gel concentrador se cambió a 120 V. Terminado el tiempo de corrimiento del gel, éste se tiñó con azul de Coomassie.

Con los geles obtenidos se puede conocer el peso molecular de los compuestos tomando en cuenta el marcador de peso molecular. Para ello, se utilizó el programa Gel Analyzer con el que se hicieron los cálculos correspondientes y así poder calcular el peso molecular de cada molécula.

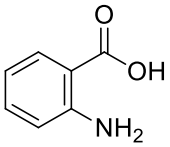
6. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un extracto crudo de la cepa de *B. mycoides* Aca 5 ELI 220
- Se lograron separar 26 diferentes fracciones por cromatografía en columna en gel de sílice.
- Se lograron identificar y caracterizar seis tipos de compuestos diferentes, de los cuales el monoglicérido 1-Palmitil glicerol o 2,3-dihidroxipropil hexadecanoato es un compuesto que no había sido aislado anteriormente y que incluso no existen reportes de su asilamiento a partir de *B.mycoides*.

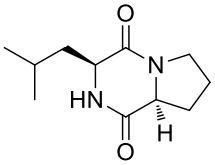
1) Ftalato de bis-*R*-(2-etilhexilo)



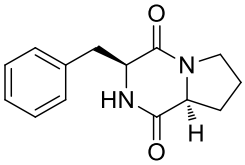
2) Ácido antranílico



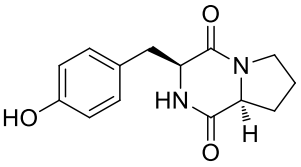
3) Dicetopiperazinas (L-Pro-L-Leu, L-Pro-L-Phe, L-Pro-L-Tyr)



L-Pro-L-Leu

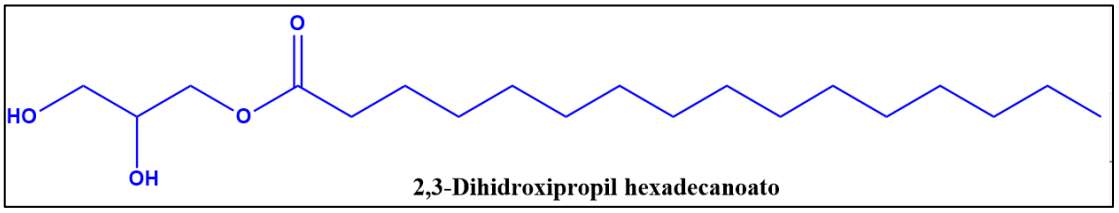


L-Pro-L-Phe



L-Pro-L-Tyr

4) Lipopéptidos
5) Bacteriocinas
6) Monoglicérido



2,3-Dihidroxipropil hexadecanoato

- Se evaluó la capacidad bactericida de las Bacteriocinas, mostrando inhibición vs *B. cereus* (12B) y *Listeria mmonocytogenes* (13B)

- Se evaluó la solubilidad y la estabilidad de las bacteriocinas a diferentes condiciones de T y pH, resultando ser estable a 60- 80 °C y en un rango de pH de 2-10. Y soluble en disolventes muy polares como MeOH y H_2O

- Se evaluó la capacidad antifúngica de los lipopéptidos y el monoglicérido 1-Palmitil glicerol, resultado en una considerable inhibición hacia *F. solani* por parte únicamente de los lipopéptidos.

7. BIBLIOGRAFÍA

[1] Pérez, A. (2011). Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. Current Opinion in Biotechnology, (2), pp 93-187.

[2] Jain, A. (2013). Biotic stress management in agricultural crops using microbial consortium. Bacteria in Agrobiology: Disease Management. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 427-448.

[3] Fuentefria, A.M. (2018). Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. Letters in Applied Microbiology, (66), pp 2-13.

[4] Anuagasi, C.L. (2017). The impact of biofungicides on agricultural yields and food security in Africa. International Journal of Agricultural Technology, (13), pp 953-978.

[5] Salazar, B. (2022). Bacillus spp. as Bio-factories for Antifungal Secondary Metabolites: Innovation Beyond Whole Organism Formulations. Microbial ecology.

[6] Ongena, M. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiolgy, (16), pp 115-125.

[7] Salazar, F.F. (2016). Extracción de dicetopiperazinas a partir de una cepa de *bacillus endophyticus* y su síntesis orgánica. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

[8] Pomilio, A.B. (2012). Investigación en Química de Productos Naturales en Argentina: Vinculación con la Bioquímica. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 46, pp 73-82.

[9] Herrera, Y. (2020). Extracción y caracterización de compuestos indólicos con actividad bactericida y antifúngica a partir de *Bacillus velezensis*. Tesis de licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

[10] Hayat, R. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Annals of Microbiology, (60), pp 579-598.

[11] Pastor, G. (2020). Biotecnología aplicada a productos naturales. INVDES.com.mx. Recuperado de https://invdes.com.mx/los-investigadores/biotecnologia-aplicada-a-productos-naturales

[12] Hayes, T.B. (2017). From silent spring to silent night: agrochemicals and the anthropocene. Elem Sci Anth 5, (57), pp 1-24.

[13] Arellano, O. (2016). La huella de los plaguicidas en México. E. Martínez. Greenpeace México A. C. pp 1-39. Recuperado de: https://www.greenpeace.org/static/planet4-mexico-stateless/2018/11/30b49459-30b49459-plaguicidas_en_agua_ok_em.pdf

[14] Mnif, W. (2011). Efect of endocrine disruptor pesticides: a review. Int J Environ Res Public Health, (8), pp 2265-2303.

[15] Smith C.M. (2020). Conventional breeding of insect-resistant crop plants: still the best way to feed the world population. Curr Opin Insect Sci, (45), pp 7-13

[16] Sainju U.M. (2016). Nitrogen balance in response to dryland crop rotations and cultural practices. Agriculture, Ecosystems and Environment, (233), pp 25-32.

[17] Reyes, A. (2015). Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. Revista Digital Universitaria UNAM, (16), pp 2-15.

[18] Abbey, J.A. (2019). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*) – prospects and challenges. Biocontrol Science and Technology, (29) pp 207-228.

[19] Villarreal, M.F. (2017). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. Revista Mexicana de Fitopatología, (36), pp 95-130.

[20] Ying-Yu, C. (2016). The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsica*. Biological Control, (98), pp 34-42.

[21] Liu, Y. (2011). Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. Chinese Journal Chemical Engineering, (19), pp 128-134.

[22] Kamal, A. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor, (1), pp 1-25.

[23] Tejera, B. (2011). Potencialidades del género Bacillus en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas, (43), pp 131-138.

[24] Raaijmakers, J.M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. Annual Reviews of Phytopathology, (50), pp 403-424.

[25] Guerrero, C. (2020). *Bacillus mycoides* A1 and *Bacillus tequilensis* A3 inhibit the growth of a member of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* species complex in avocado. Journal of the Science of Food and Agriculture, (100), pp 4049-4056.

[26] Ortiz, A. (2019). Chemical Compounds Produced by Bacillus sp. Factories and Their Role in Nature. Mini Rev Med Chem, (19), pp 373-380

[27] Sansinenea, E. (2011). Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. Biotechnol Lett, (33), pp 1523-1538.

[28] Borriss, R. (2019). Secondary metabolites of the plant growth promoting model rhizobacterium *Bacillus velezensis FZB42* are involved in direct suppression of plant pathogens and in stimulation of plant-induced systemic resistance. Springer Nature, pp 147-168.

[29] Dunlap, C.A. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp *plantarum* and *'Bacillus oryzicola'* are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. Int J Syst Evol Microbiol, (66), pp 1212-1217.

[30] Chen, X.H. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growthpromoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. Nat Biotechnol, (25), pp 1007-1014.

[31] Layton, C. (2011). *Bacillus spp*.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas, (9), pp 177-187.

[32] Niedmann, L. (2006). Evaluación de Cepas Nativas de Bacillus thuringiensis Como una Alternativa de Manejo Integrado de la Polilla del Tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. Agricultura Técnica, (66), pp 235-246.

[33] Pieterse, C.M.J. (2014). Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. Annual Review of Phytopathology, (52), pp 347-375.

[34] Pérez, F. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. Microbiological Research, (169), pp 325-336.

[35] Singh, U.B. (2016). Compatible salt-tolerant rhizosphere microbe-mediated induction of phenylpropanoid cascade and induced systemic responses against *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). Applied Soil Ecology, (108), pp 300-306.

[36] Pretali, L. (2016). Botanical and biological pesticides elicit a similar Induced Systemic Response in tomato (*Solanum lycopersicum*) secondary metabolism. Phytochemistry, (130), pp 56-63.

[37] Aguado, G.A. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. Revista Fitotecnia Mexicana, (35), pp 9-21.

[38] Sansinenea, E. (2012). Zwittermicin A: a promising aminopolyol antibiotic from biocontrol bacteria. Current Organic Chemistry, (16), pp 978-987.

[39] Ortiz, A. (2020). Macrolactin antibiotics: amazing natural products. Mini Rev Med Chem, (20), pp 584-600.

[40] Salazar, F. (2020). A strong antifungal activity of 7-O-succinyl macrolactin A vs Macrolactin A from *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149. Current microbiology, (77), pp 3409-3413.

[41] Sansinenea, E. (2016). Diketopiperazines derivatives isolated from *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus endophyticus*, establishment of their configuration by X-ray and their synthesis. Tetrahedron Letters, (57), pp 2604-2607.

[42] Ortiz, A. (2017). Cyclic Dipeptides: Secondary Metabolites Isolated from Different Microorganisms with Diverse Biological Activities. Current medicinal Chemistry, (24), pp 2773-2780.

[43] Aranda, F. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. Biochimica et biophysica acta, (1713), pp 51-56.

[44] Ongena, M. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in microbiology, (16), pp 115-125.

[45] Tadigiri, S. (2020). Isolation and characterization of chemical constituents from *B. amyloliquefaciens* and their nematicidal activity. Journal of Entomology and Zoology Studies, (8), pp 2062-2066.

[46] Van Alst, A. (2023). Curvas de crecimiento: Generación de curvas de crecimiento utilizando unidades formadoras de colonias y mediciones de densidad óptica. Microbiología. JoVE Science Education Database. Cambridge, MA.