



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA**

---

**“Aislamiento e identificación de compuestos indólicos a  
partir de *Bacillus thuringiensis*”**

**MARZO 2020**

**TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL GRADO DE:  
LICENCIATURA EN QUÍMICOFARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**JOSÉ ALEJANDRO HERNÁNDEZ ABUNDEZ**

**Director de Tesis**

**Dra. Estibaliz Sansinenea Royano**

**Asesor de Tesis**

**Dra. Carmen María González Álvarez**

*Hay una molécula dentro de ti que está conectada con todo,  
toda persona, toda energía, cada cosa. La buscas, y cuando  
la encuentras, entonces permites que se magnifique y  
crezca y sea la química dominante dentro de ti.*

*-Forest Whitaker*

# AGRADECIMIENTOS

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

*A mi directora de tesis la Dra. Estibaliz por apoyarme en la elaboración de la tesis y brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Agradezco a ella por ser parte de esta formación y que con su sabiduría me ha apoyado.*

*A mi asesora la Dra. Carmen por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro.*

*A mis sinodales la Dra. Martha, Dra, Rosa y Dra, Guadalupe, quienes siempre estuvieron apoyándome en las correcciones pertinentes, y gracias a su disponibilidad en cada momento.*

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

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

# Tabla de contenidos

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	5
<b>2.1 Productos naturales de origen microbiano</b> .....	5
<b>2.2 Bacillus thuringiensis como productor de compuestos.</b> .....	7
<b>2.3 Compuestos alcaloides indólicos.</b> .....	8
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	10
<b>4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	11
<b>5. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	45
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	49
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	50

# 1- INTRODUCCIÓN

Los tejidos de plantas y animales y también de microorganismos siempre contienen varias clases de compuestos con estructuras diferentes. Cada clase contiene varios o muchos compuestos cercanamente relacionados en su estructura. La química de productos naturales comienza de la separación y aislamiento de un compuesto simple puro de muchos ingredientes similarmente relacionados. Los compuestos esenciales para los organismos vivos se llaman metabolitos primarios. Los demás compuestos presentes en un estrecho rango de especies se llaman metabolitos secundarios. El blanco de la química de productos naturales es generalmente los metabolitos secundarios.

Las especies de *Bacillus* son capaces de producir un amplio rango de metabolitos secundarios de naturaleza y estructura muy diferente mostrando un amplio espectro de actividades. Estos metabolitos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, promotores de crecimiento y otros compuestos bioactivos y están diseñados para capacitar a la bacteria para sobrevivir en su ambiente natural.

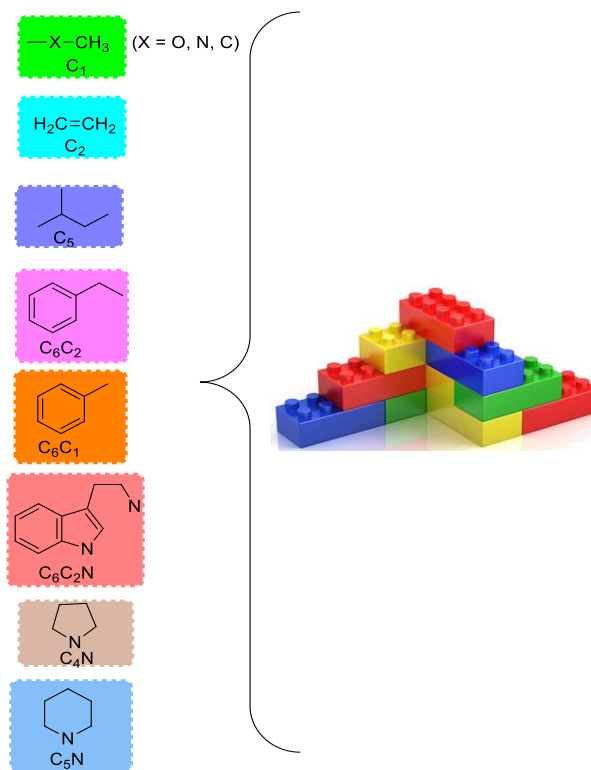
En el laboratorio se ha trabajado con una cepa de *Bacillus thuringiensis* cuya actividad bactericida fue evaluada contra varias bacterias grampositivas y gramnegativas. De esta cepa se han logrado obtener diferentes compuestos y en este trabajo se analizarán algunos compuestos de tipo indólicos y su evaluación biológica contra hongos y bacterias.

# 2- ANTECEDENTES

## 2. 1 Productos naturales de origen microbiano

Los productos naturales son moléculas pequeñas codificadas genéticamente que tienen un impacto profundo en muchas áreas de investigación, incluida la medicina, química orgánica y la biología celular. Numerosos proyectos describen la importancia de compuestos derivados de microorganismos, plantas y animales. Éstos compuestos mantienen una fuente importante para el descubrimiento de fármacos y continúa siendo una inspiración para la química sintética por su compleja arquitectura superlativa. Es importante destacar que aunque se cultiven cepas del mismo género y sean idénticas pueden producir productos naturales diferentes y alternativamente cepas que son diferentes pueden producir los mismos metabolitos secundarios.

Para realizar la síntesis de metabolitos secundarios la Naturaleza utiliza una serie de unidades básicas como material de construcción (building blocks). Éstos pueden poseer un átomo de carbono, dos, cinco, agrupamientos de seis y tres, de seis y dos, de cuatro átomos de carbono y uno de nitrógeno, etc. A partir de estas estructuras básicas se pueden sintetizar como en un modelo de construcción tipo LEGO® cualquier molécula por compleja que sea.<sup>1</sup>



**Figura 1:** Unidades básicas presentes en los productos naturales.

Algo que llama poderosamente la atención es como a partir de estas moléculas sencillas se puede construir compuestos de extraordinaria complejidad y diversidad que además presentan quiralidad. Estos compuestos de extraordinaria complejidad y que habitualmente la Naturaleza biosintetiza en forma enantioméricamente pura (no superponible con su imagen especular) utiliza algunas de las reacciones que los químicos han ido descubriendo a lo largo de la historia y que necesitan condiciones de laboratorio en muchos casos drásticas como son altas temperaturas o presiones o el uso de catalizadores en muchos casos, etc. Mientras que la Naturaleza produce la complejidad estructural, diversidad y quiralidad a través de una variedad de reacciones mediadas por enzimas.<sup>1</sup>

En muchas ocasiones la obtención de productos naturales en grandes cantidades resulta difícil puesto que se suelen aislar de fuentes naturales en muy pequeñas proporciones. Y por otro lado su síntesis suele ser complicada debido a la complejidad estructural. Por todo ello se recurre a dos grandes posibilidades:

- Producción biotecnológica de plantas
- Uso de microorganismos

Los microorganismos son maquinarias excelentes para la síntesis de metabolitos secundarios con extraordinarias estructuras tanto por su complejidad química como por su bioactividad. En el estado actual de la investigación químico farmacéutica resulta imposible abandonar el conocimiento que nos han suministrado tanto las plantas como los microorganismos como abandonar los productos que están en el mercado y que son de procedencia natural. El futuro está en aprovechar las excelentes propiedades biosintéticas de los seres vivos en beneficio de la salud.<sup>1</sup>

## 2.2 *Bacillus thuringiensis* como productor de compuestos

Las especies de *Bacillus* son capaces de producir un amplio rango de metabolitos secundarios de naturaleza y estructura muy diferente mostrando un amplio espectro de actividades. Estos metabolitos incluyen antibióticos, pigmentos, toxinas, promotores de crecimiento y otros compuestos bioactivos y están diseñados para capacitar a la bacteria para sobrevivir en su ambiente natural.<sup>2,3</sup> Esta amplia variabilidad de estructuras y actividades de los compuestos secundarios expande el potencial de la importancia industrial y biotecnológica del género *Bacillus* con sus especies relacionadas.<sup>4</sup>

Una de las especies del género *Bacillus* spp. más reconocida por su potencial como agente de control biológico es *B. thuringiensis*. *B. thuringiensis* es una bacteria grampositiva, cuyo hábitat principal es el suelo, donde es considerado parte de la población bacteriana zimógena,<sup>5</sup> aunque también ha sido aislada de superficies de plantas, cadáveres de insectos y polvo de productos almacenados. Es una bacteria usada como el ingrediente activo para la agricultura en los insecticidas biológicos y para el control de vectores de enfermedades como son los mosquitos y moscas negras en el caso de la variedad *israelensis*. Su ciclo de vida es simple. Cuando los nutrientes y las condiciones ambientales son suficientes para crecer, las esporas germinan produciendo células vegetativas que crecen y se reproducen por fisión binaria. Las células continúan multiplicándose hasta que uno o más nutrientes, como los azúcares, aminoácidos u oxígeno se vuelven insuficientes para continuar su crecimiento vegetativo. Bajo esas condiciones, la bacteria esporula produciendo una endospora y un cuerpo parasporal o



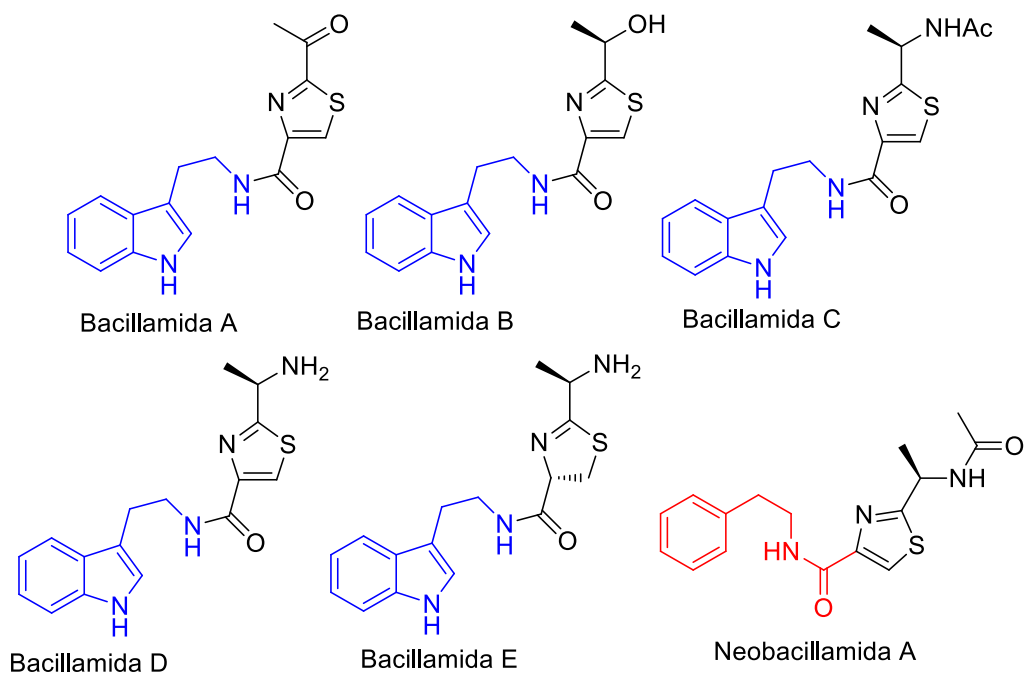
cuerpo de inclusión (cristal) en donde radica su actividad bioinsecticida. Estos cristales están constituidos de las denominadas  $\delta$ -endotoxinas o proteínas Cry, que se liberan sólo bajo lisis celular y se encuentran codificadas en plásmidos extracromosomales que se pueden replicar independientemente.

*B. thuringiensis* también secreta toxinas, enzimas y metabolitos secundarios que actúan contra otras bacterias, hongos, insectos y nemátodos. La producción de estos metabolitos es muy sensible a factores ambientales o a las condiciones de cultivo y por tanto, su producción in vitro depende de la composición del medio de cultivo en el que se hace crecer al microorganismo productor.<sup>6</sup>

### 2.3 Compuestos alcaloides indólicos

Los alcaloides son uno de los grupos de metabolitos secundarios más diversos encontrados en los organismos vivos. Este grupo incluye alrededor de 12,000 productos, entre los cuales se encuentran los alcaloides indólicos, alcaloides derivados del triptófano que conforman alrededor de la cuarta parte de todos ellos. Los alcaloides se han reportado en varias familias vegetales pero pueden aislarse de microorganismos.

El motivo de triptamida tiazol o tiazolina es clásico de los compuestos bacillamidas<sup>7</sup> (Figura 2). Estos compuestos tienen múltiples actividades biológicas, por ejemplo la bacillamida A y sus derivados poseen una actividad alguicida sustancial contra un amplio rango de algas dinoflageladas.<sup>8</sup> Es interesante notar que las bacillamidas A-E contienen un bloque común de triptamina en sus estructuras mientras que en la neobacillamida A la porción de amina es reemplazada por el grupo de fenetilamina.<sup>9</sup> El rendimiento de las bacillamidas aisladas es muy bajo a pesar incluso de que la biosíntesis de la bacillamida C fuera optimizada.<sup>7</sup> Por lo tanto investigar los bloques de construcción o los intermediarios de las bacillamidas<sup>10</sup> es esencial para su producción en masa e incluso para su síntesis orgánica.<sup>11</sup>



**Figura 2:** Estructuras de las bacillamidas conteniendo los grupos de triptamina (azul) y fenetilamina (rojo).

# 3- OBJETIVO

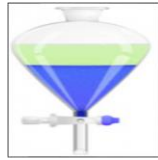
## Objetivo general

Se realizará la extracción, purificación e identificación de compuestos indólicos de un extracto crudo de *B. thuringiensis*.

## Objetivos específicos

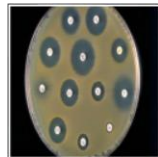
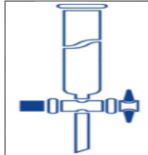
- Se obtendrá un extracto crudo de un medio de cultivo inoculado con *B. thuringiensis* cepa ELI52.
- Del extracto crudo se procederá a separar y purificar metabolitos secundarios mediante cromatografías en columna de gel de sílice y cromatografías en placa fina.
- Se identificarán y elucidarán estructuralmente los compuestos separados con técnicas espectroscópicas.
- Se realizarán pruebas biológicas de inhibición a otras bacterias y hongos con los compuestos obtenidos

# 4- Discusión de Resultados



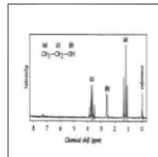
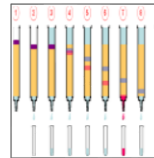
Extracción

Fraccionamiento  
general



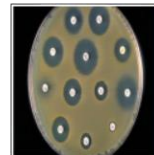
Ensayo  
biodirigido

Purificación



Caracterización

Pruebas  
biológicas



## 4.1 EXTRACCIÓN

Para la elaboración de este estudio en primer lugar se hizo un cultivo en placa de la cepa de interés ELI52 la cual fue identificada en trabajos previos como *Bacillus thuringiensis* (Figura 3).



**Figura 3:** *B. thuringiensis* ELI 52 donde se observan colonias cerosas de borde irregular.

Para el crecimiento de la cepa *B. thuringiensis* ELI 52 se realizó un siembra por estría cruzada en una placa de agar sólido LB (Luria Bertani) se incubó a 29 °C/24 h. Se inoculó una de las colonias aisladas de placa en medio líquido LB, y se procedió a incubar a 29 °C durante 7 días en una agitación constante de 175 rpm. Pasado los 7 días de incubación se procedió a una centrifugación a 6000 rpm durante 15 min, obteniéndose el cultivo sin células para su posterior extracción.

Con el sobrenadante obtenido en la centrifugación se realiza una extracción con acetato de etilo (AcOEt) en una relación de volumen 1:1 por triplicado. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio y se concentró a presión reducida, obteniendo finalmente un extracto crudo de un color amarillo-marrón con un rendimiento de 200 mg/L (Figura 4).



**Figura 4:** Extracto crudo de la cepa *Bacillus thuringiensis* ELI 52

## 4.2 FRACCIONAMIENTO GENERAL

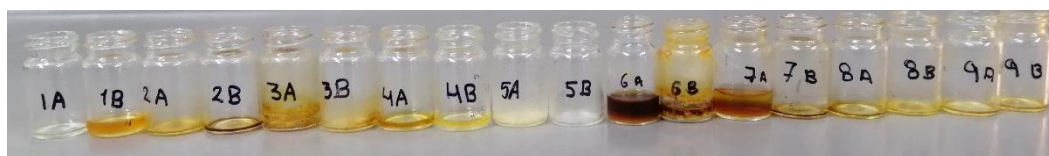
Se realizó mediante una cromatografía en gel de sílice, utilizando eluyentes que fueron variando desde una baja polaridad hasta una polaridad mayor. Para saber qué eluyente era el más adecuado, se utilizó la cromatografía en placa fina (CPF). Después de una búsqueda de varios sistemas y observando la separación que se daba en la CPF se eligieron los sistemas que aparecen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Eluyentes utilizados para el fraccionamiento general

Eluyentes	Proporción %
Hexano	100
Hexano: AcOEt	80:20
Hexano: AcOEt	50:50
AcOEt	100
AcOEt:DCM	50:50
DCM	100
DCM:MeOH	80:20
DCM:MeOH	50:50
DCM:MeOH	20:80
MeOH	100

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

Se recolectan diferentes fracciones que se pesan para obtener cada uno de los pesos y así saber qué cantidad se obtuvo de cada uno de ellos (Figura 5).



**Figura 5:** Cada una de las fracciones evaporadas se coloca en viales

Se realiza cromatografía en placa fina de cada una de las fracciones resultantes para observar si existe alguna similitud entre fracciones y así poder reunir las y tener una mayor cantidad de peso por fracción. Como revelador se usó una mezcla ácida (pH 1). Las reuniones según la similitud en CPF se puede observar en la tabla 2.

**Tabla 2:** Reuniones resultantes posterior a la elución en CPF

Reunión	Nombre de la fracción
1A+1B	1
2A+2B	2
3A	3A
3B	3B
4A+4B	4
5A+5B	5
6A+6B	6A
7A+7B+8A+8B+9A+9B	7A

### 4.3 SELECCIÓN BIODIRIGIDA

Con cada una de las reuniones se realiza una selección biodirigida mediante antibiogramas, esto con la finalidad de saber si alguna de las reuniones posee alguna actividad inhibitoria al crecimiento de bacterias de interés médico, del cepario se seleccionaron las bacterias gram (-) *Salmonella sp.*, *E. coli*, *Klebsiella sp.*, obteniendo los siguientes resultados en la tabla 3 y las bacterias gram (+) *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *S. agalactie* obteniendo los siguientes resultados en la tabla 4.

**Tabla 3:** Resultados del antibiograma en bacterias gram (-)

Fracción/Bacteria	<i>Salmonella sp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella sp.</i>
	Halo de inhibición en mm		
1	0	0	0
2	0	0	0
3A	0	0	0
3B	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6A	0	0	0
7A	0	0	0

**Tabla 4:** Resultados del antibiograma en bacterias gram (+)

Fracción/Bacteria	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactie</i>
	Halo de inhibición en mm		
1	0	0	0
2	0	0	0
3A	0	0	0
3B	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6A	0	0	0
7A	17	20	0

En la tabla 3 se puede apreciar que ninguna de las reuniones tiene la propiedad de inhibir el crecimiento de bacterias gram (-), en la tabla 4 se aprecia que si existe inhibición por parte de la fracción 7A contra las bacterias gram (+) *S. saprophyticus* y *S. aureus*, con un halo de inhibición de 17 mm y 20 mm respectivamente. La reunión 7A resulta muy interesante por la actividad inhibitoria que tiene.

#### 4.4 PURIFICACIÓN

La purificación se realizó seleccionando las fracciones obtenidas de las reuniones del fraccionamiento general que mostraban espectros interesantes en RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz. Algunas fracciones mostraron compuestos previamente aislados por el grupo de investigación por lo que esas fracciones no se tomaron en cuenta en este estudio. En este estudio se tomaron en cuenta las fracciones 4, 6A y 7A. La purificación de estas fracciones se hizo por cromatografía en columna, utilizando una columna cromatográfica cuya fase estacionaria fue gel de sílice y como fase móvil sistemas de elución diferentes para cada fracción.

##### **Fracción 4**

Esta fracción 4 fue obtenida del fraccionamiento general de la cromatografía en columna de gel de sílice con un sistema AcOEt:DCM 50:50 y posteriormente se realizaron purificaciones subsiguientes, obteniendo el compuesto 1 puro.

##### **Fracción 6A**

Esta fracción 6A fue obtenida del fraccionamiento general de la cromatografía en columna de gel de sílice con un sistema de DCM: MeOH 80:20 y posteriormente se realizaron purificaciones subsiguientes, obteniendo como resultado el compuesto 2 puro.

##### **Fracción 7A**

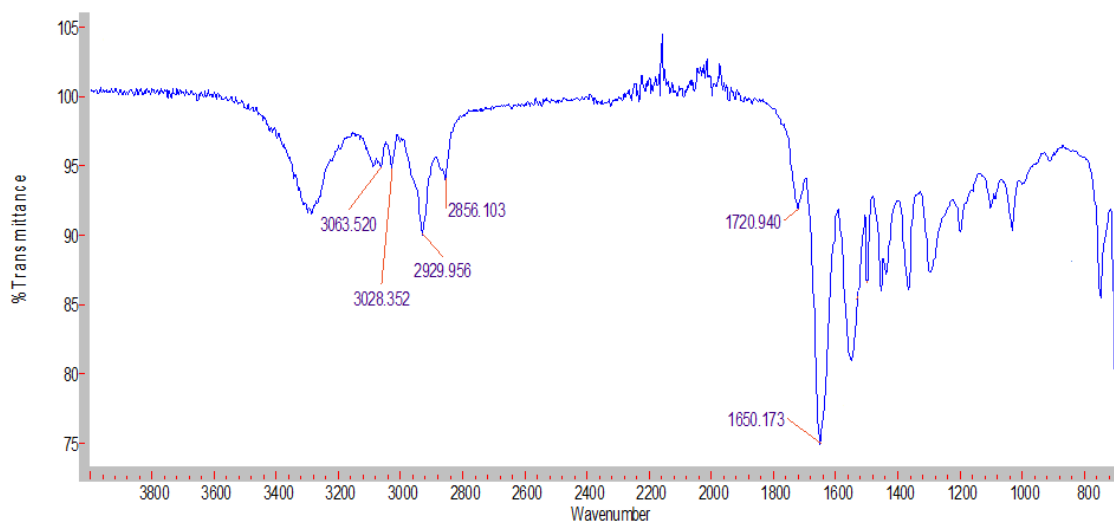
Para purificar la fracción 7A se utilizaron sistemas DCM: MeOH. Los compuestos 3 y 4 provienen de la fracción 7A la cual fue obtenida con un sistema de DCM:MeOH 50:50 y con una posterior purificación de ambos se pudo obtener el compuesto 3 (DCM:MeOH 80:20) y el compuesto 4 (DCM:MeOH 85:15).



## 4.5 CARACTERIZACIÓN

### Fracción 4 (Compuesto 1)

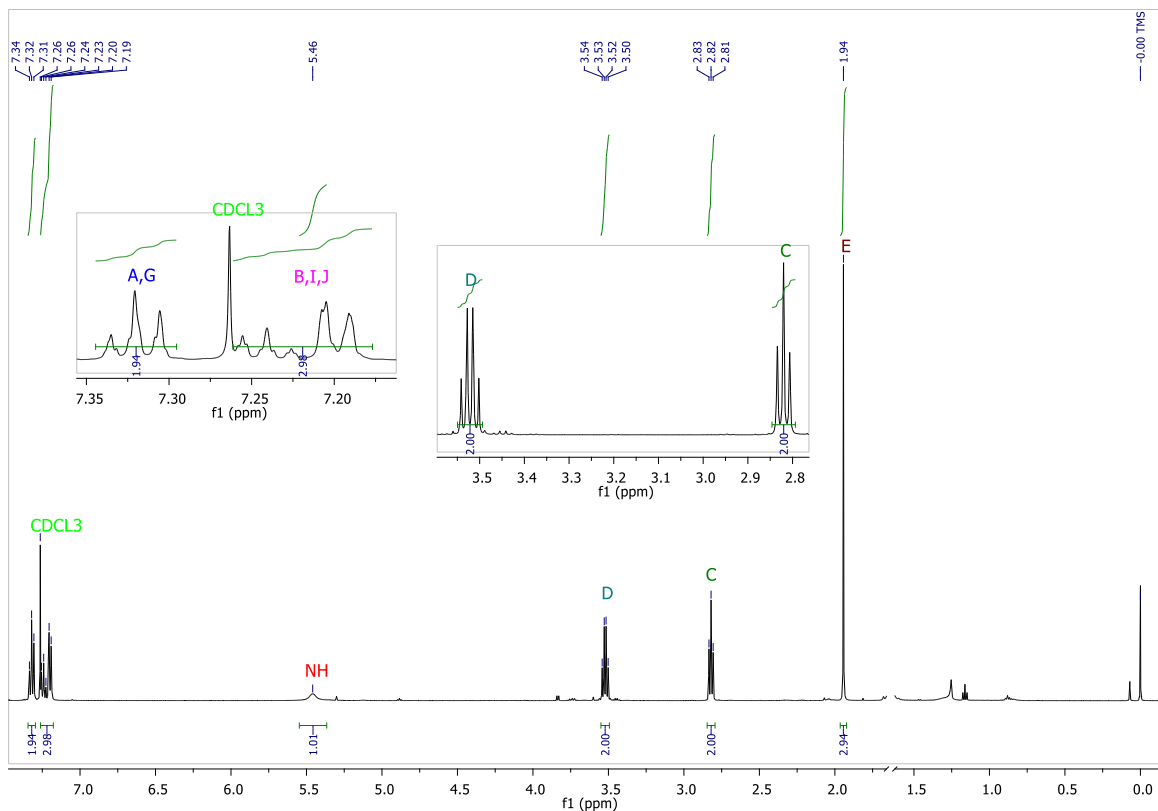
Se procedió a realizar una caracterización completa del compuesto **1** que provenía de la fracción 4 para elucidar su estructura. A continuación, se muestra el espectro de infrarrojo del compuesto 1 el cual proporciona información acerca de los grupos funcionales que pueden encontrarse en el compuesto.



**Figura 6:** Espectro de IR del compuesto 1.

En la región  $3063.52\text{ cm}^{-1}$  y  $3028.35\text{ cm}^{-1}$  se observan bandas que pueden pertenecer a un benceno monosustituido. Las señales de las bandas  $2929.95\text{ cm}^{-1}$  y  $2856.10\text{ cm}^{-1}$  por la región en la que se encuentran, se sabe que pertenecen a enlaces C-H. Las señales  $1720.94\text{ cm}^{-1}$  y  $1650.17\text{ cm}^{-1}$  pertenecen al grupo funcional amida secundaria, tal y como se muestra en la figura 6.

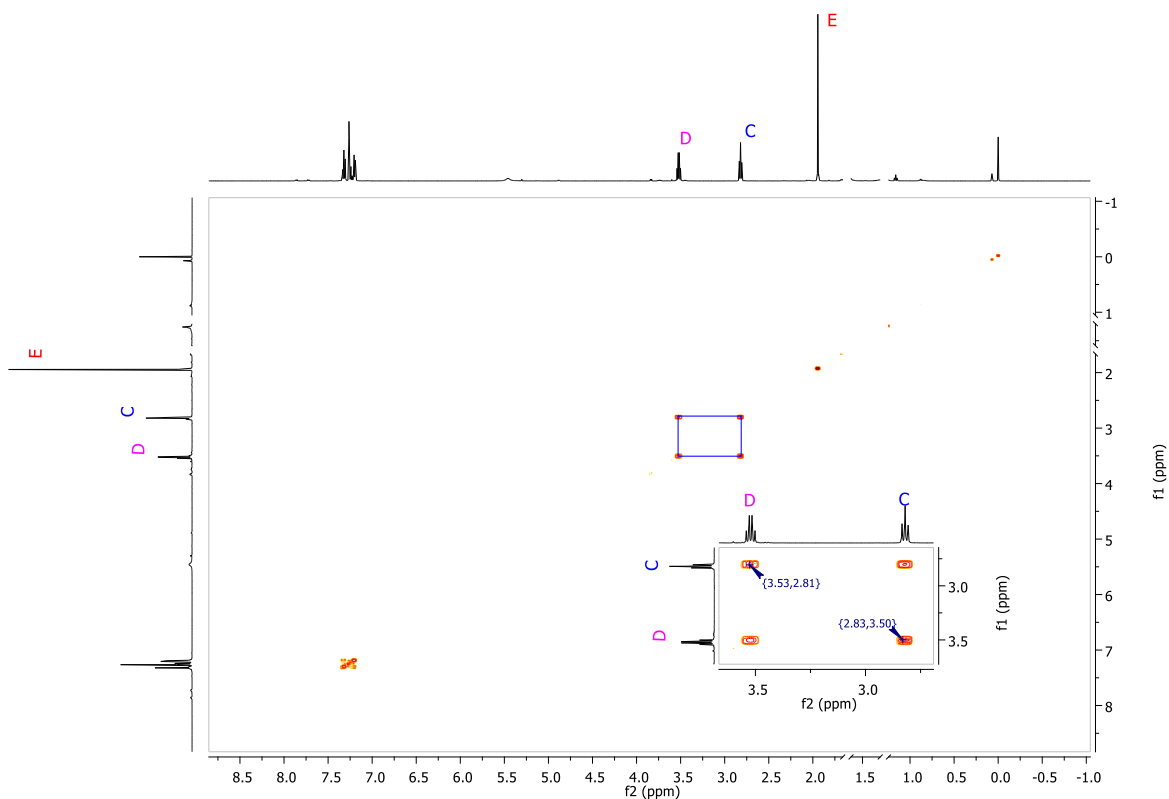
Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  a 500 MHz en  $\text{CDCl}_3$  y se procedió a su análisis como se muestra en la figura 7.



**Figura 7:** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 1.

Se puede apreciar una señal triple ancha en 7.32 ppm que integra para 2 hidrógenos, esa señal fue nombrada con las letras A y G, seguido a ella se muestra la señal residual del cloroformo deuterado en 7.26 ppm. En la región de 7.23 ppm se observa una señal múltiple ancha que integra para 3 hidrógenos, a esta señal se le asignaron las letras B, I, J. Por la región en la que se encuentran las señales y por la suma entre ellas de 5 hidrógenos, se deduce que esas señales pertenecen a un anillo de benceno monosustituido. En la región 5.46 ppm se observa una señal pequeña ancha que integra para 1 hidrógeno, por el tipo de señal presentada se sospecha que sea un NH. En 3.52 ppm se observa una señal cuádruple que integra para dos hidrógenos y en 2.82 ppm se encuentra una señal triple que integra para dos hidrógenos, por el desplazamiento y la integración de ambas señales se supone que cada una pertenece a un  $\text{CH}_2$ . Por último, se observa una señal simple en 1.94 ppm que integra para 3 hidrógenos, sospechando de un  $\text{CH}_3$ .

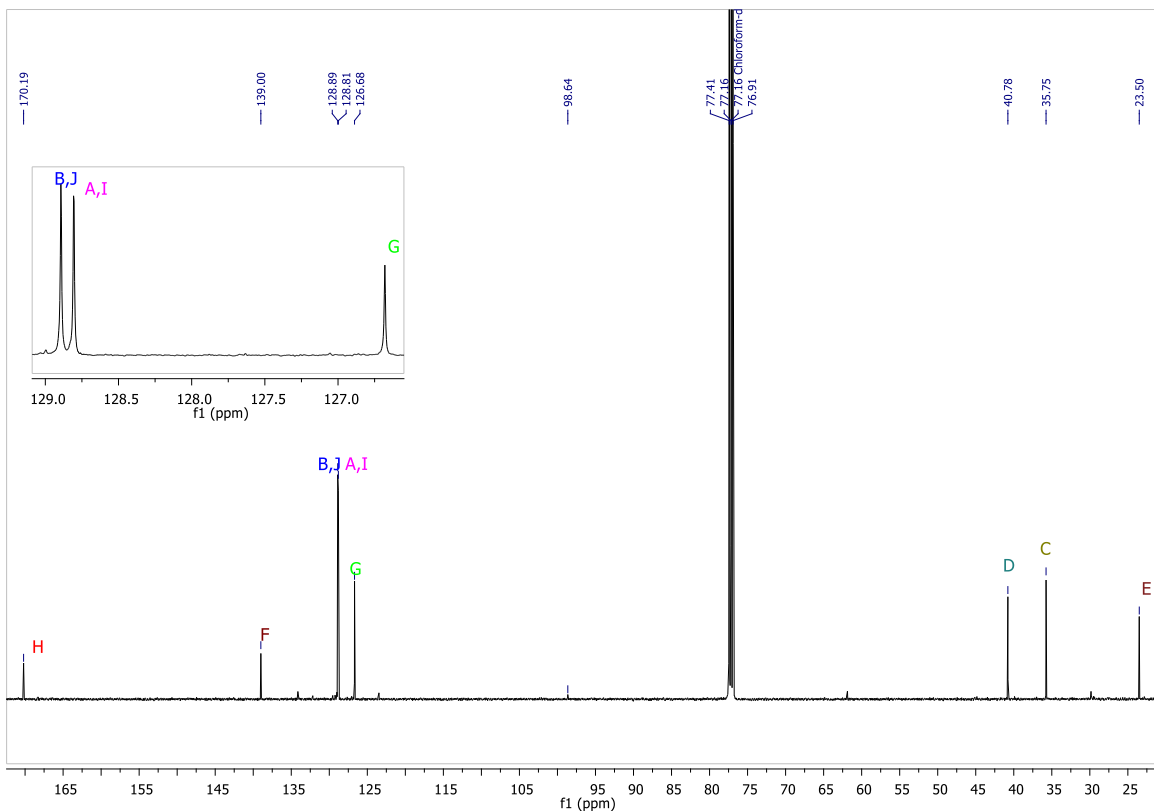
Después del análisis de este espectro, se obtiene un espectro RMN 2D COSY para saber qué relación guardan entre sí los hidrógenos (figura 8).



**Figura 8:** Espectro RMN 2D COSY del compuesto 1.

Se observa que la señal simple que se encuentra en la región 1.94 ppm no se correlaciona con ningún hidrógeno, esto nos supone que puede pertenecer a un metilo que está unido a algún núcleo que no contiene hidrógenos. La señal C de la región 2.82 ppm se está correlacionando con la señal D que se encuentra en la región 3.52 ppm, esto supone que ambos son metilenos unidos entre sí. En la región de las señales pertenecientes a un anillo aromático, se observa que existe una correlación entre las señales de 7.23 ppm y 7.32 ppm, esto supone que si son de un anillo aromático mono sustituido ya que ambas señales entre si integran para 5 hidrógenos.

También se obtiene un espectro de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz del compuesto 1, como se observa en la Figura 9.

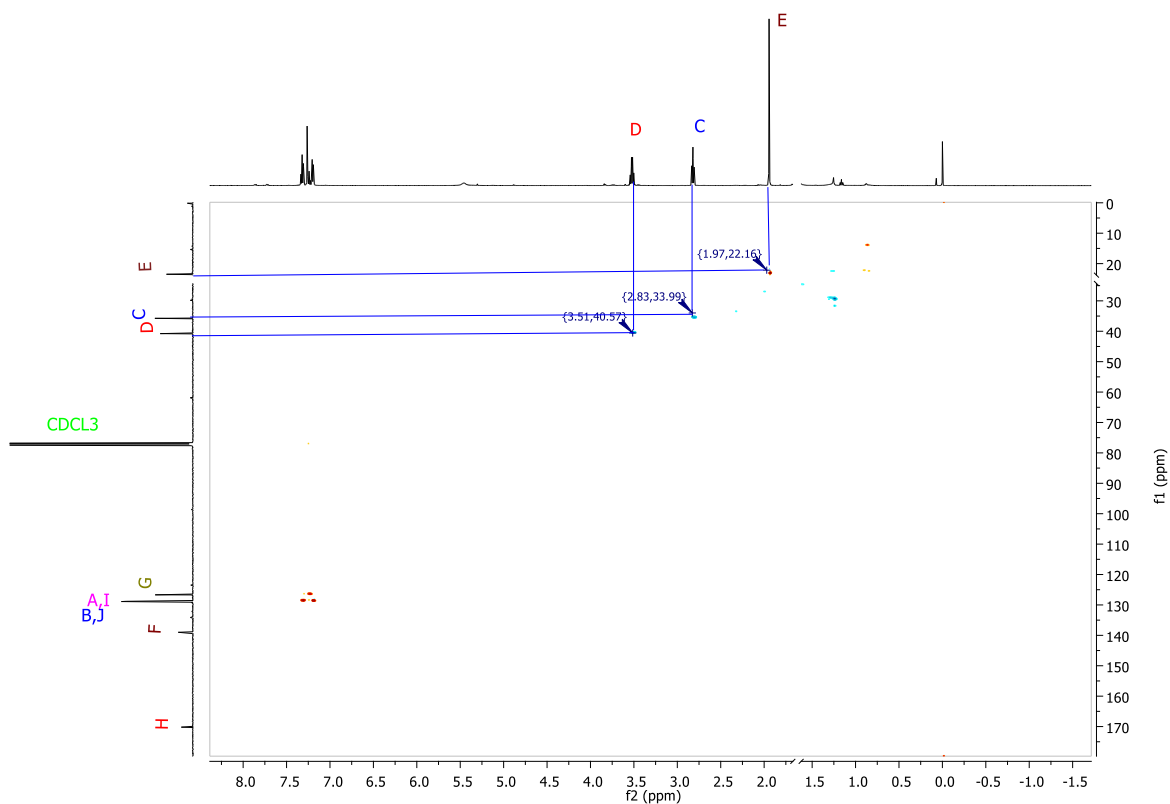


**Figura 9:** Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  A 125 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 1.

Se observan 8 señales de carbonos diferentes, haciendo denotar que existen en el espectro dos señales grandes las cuales corresponden a 2 carbonos cada una. En la región 170.1 ppm se observa una señal que se encuentra en la región de los carbonos que pertenecen a un grupo carbonilo la señal se nombra con la letra H, esto tiene correlación con el espectro de infrarrojo dado a que se observaban señales de una amida y cabe mencionar que dentro de la estructura de la amida se encuentra un grupo carbonilo. En 130.0 ppm se observa una señal perteneciente a un posible carbono cuaternario nombrando la señal con la letra F, seguido a esta señal se observan dos señales una en 128.8 ppm y 128.8 ppm ambas señales son de mayor tamaño y se deduce que cada una de ellas pertenece a dos carbonos que son similares en su ambiente químico y eléctrico, quedando que en la señal 128.8 ppm se denominan las letras B y J, como a su vez en la señal 128.81 ppm las letras A e I. En 126.68 ppm se encuentra otra señal denominada G, está señal en conjunto con las señales B, J, A, I darían un total de 5 carbonos, correlacionando que pertenecen a un anillo aromático monosustituido. La señal D y la señal C que se encuentran en las regiones 40.7 ppm y 35.7 ppm respectivamente, son

carbonos que pertenecen a metilenos. Por último, la señal E en la región 23.5 ppm corresponde a un carbono de un metilo.

En la figura 10 se observa el espectro que se obtuvo de 2D HSQC del compuesto 1, esto con la finalidad de asignar los carbonos e hidrógenos inequívocamente.



**Figura 10:** Espectro RMN 2D HSQC del compuesto 1.

Se observa que la señal H no tiene correlación con ningún hidrógeno, esto es porque la señal pertenece a un carbonilo del grupo amida del compuesto, la señal F no tiene correlación con algún hidrógeno, se confirma que es el carbono cuaternario correspondiente al anillo de benceno monosustituido.

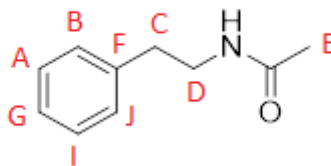
En la siguiente tabla se resumen las señales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

**Tabla 5:** Señales de los espectros del compuesto 1.

Correlación	
Señal $^1\text{H}$ ppm	Señal $^{13}\text{C}$ ppm
1.94	23.0
2.82	35.2
3.52	40.3
5.46	----
77.23	128.4 y 128.3
77.32	128.3 y 126.2
----	138.5
----	169.7

Como un último dato se obtuvo un espectro DEPT 135 experimento de  $^{13}\text{C}$  de RMN, para establecer que señales correspondían a  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}$ . Con el espectro DEPT 135 se puede saber qué carbonos son  $\text{CH}$  y  $\text{CH}_3$  los cuales tendrán una señal positiva (señal hacia arriba); en cambio los  $\text{CH}_2$  tendrán una señal negativa (señal hacia abajo).

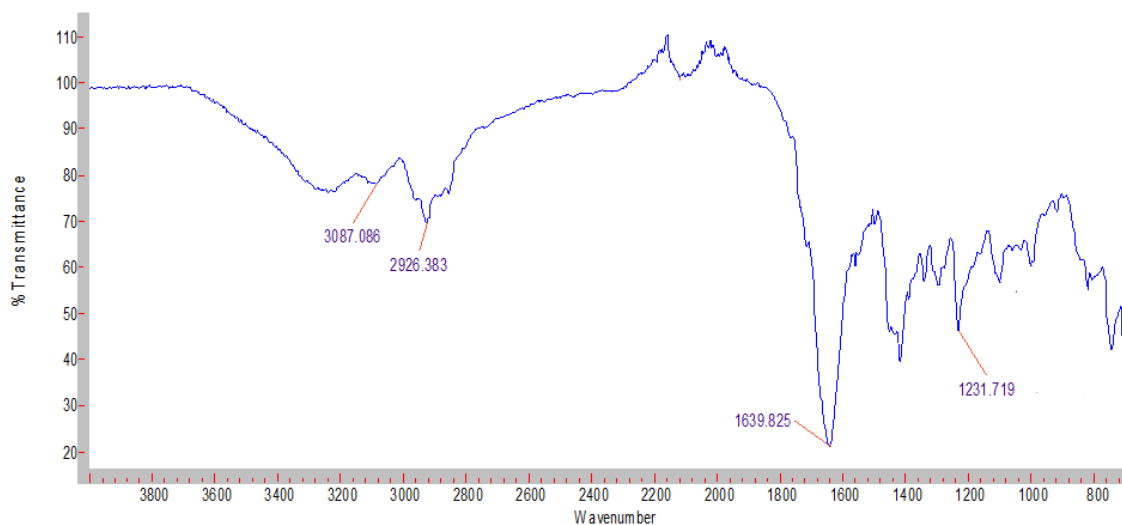
La estructura que se propone para el **compuesto 1** con ayuda de las técnicas espectroscópicas es la que se muestra en la figura 11, el nombre que se le asigna es *N*-fenetilacetamida.



**Figura 11:** *N*-fenetilacetamida

### **Fracción 6A (Compuesto 2)**

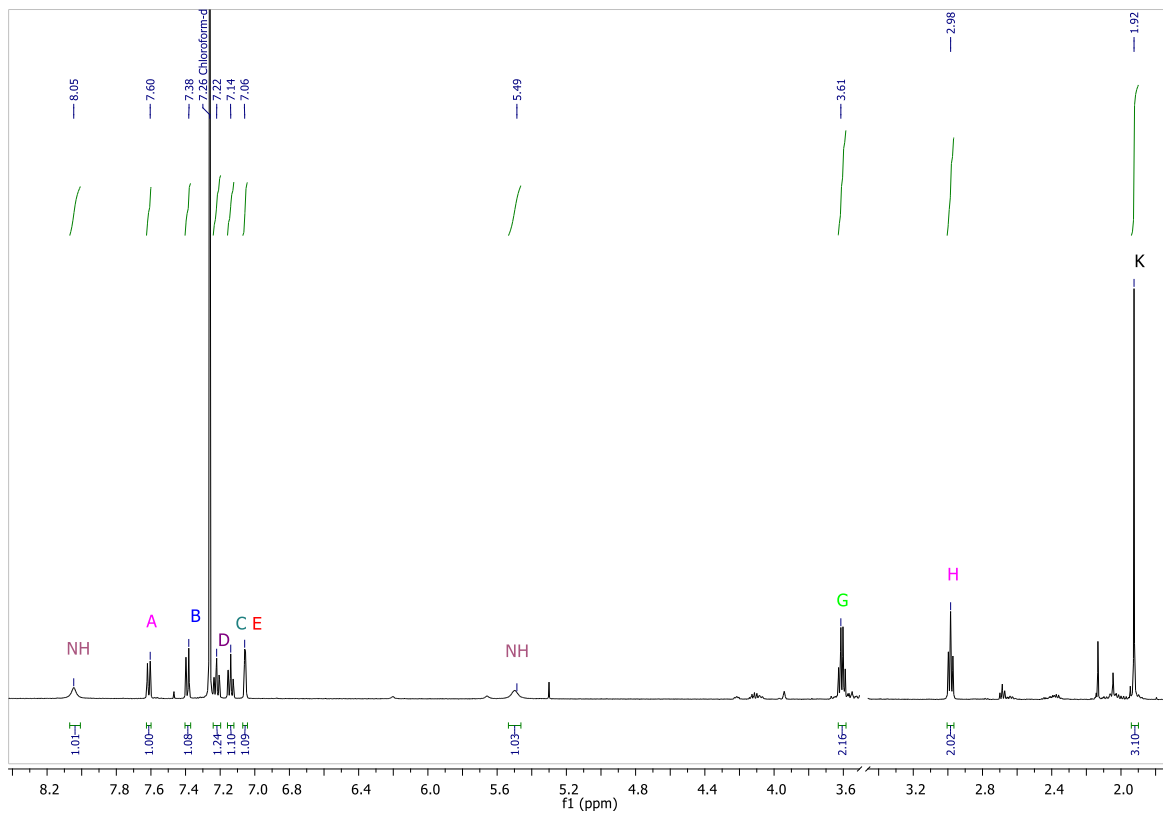
Se procedió a realizar una caracterización completa del compuesto **2** que provenía de la fracción 6A para elucidar su estructura. A continuación, se muestra el espectro de infrarrojo del compuesto **2** el cual proporciona información acerca de los grupos funcionales que pueden encontrarse en el compuesto (Figura 12).



**Figura 12:** Espectro de IR del compuesto **2**.

En la región  $3087.08 \text{ cm}^{-1}$  se muestra una banda que pertenece a un anillo de benceno doblemente sustituido en las posiciones 1,2. Continuando con la escala, se muestra una banda en la región  $2926.38 \text{ cm}^{-1}$  que es pertenecientes a alcanos, en la región  $1639.82 \text{ cm}^{-1}$  se puede observar una señal grande que supone pertenecer a un grupo amida, más adelante de esta señal se muestra una señal en la región  $1231.719 \text{ cm}^{-1}$  está banda pertenece muy probablemente a una amina secundaria aromática.

Se sigue trabajando en la elucidación del compuesto **2** y se obtiene un espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 500 MHz en  $\text{CDCl}_3$  el cual se muestra en la figura 13.

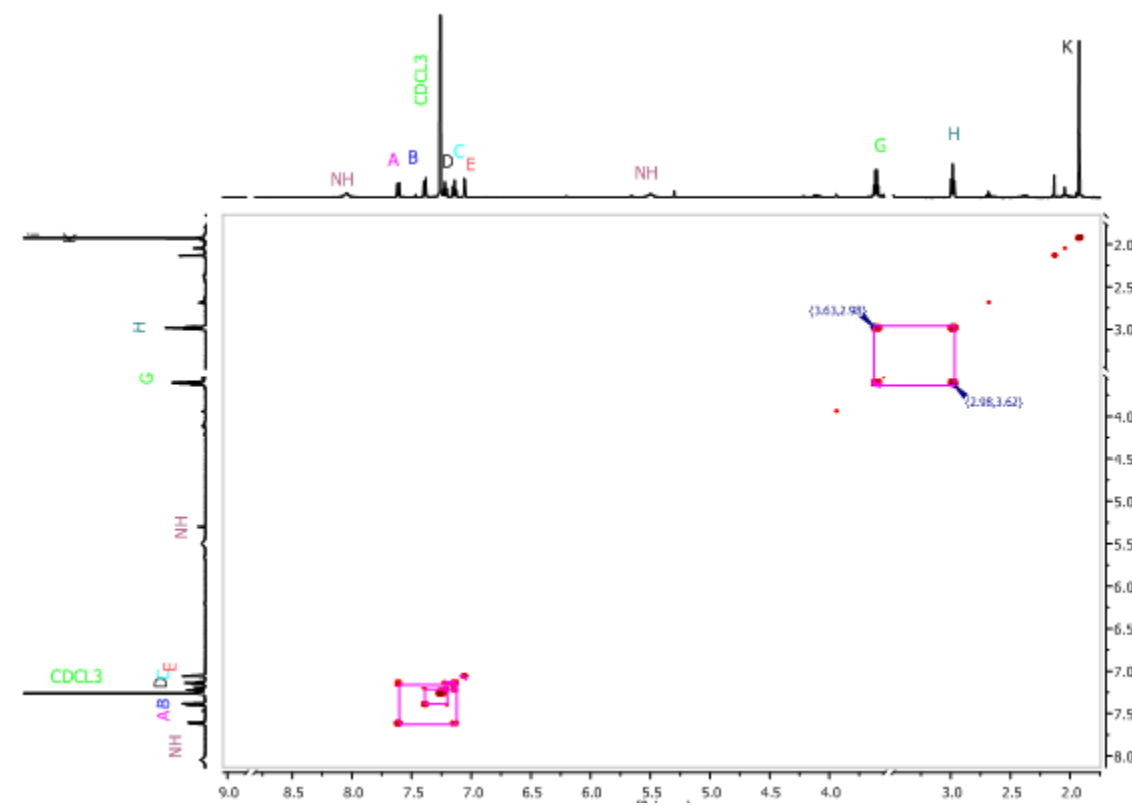


**Figura 13:** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 2.

En el espectro obtenido se observa una señal ancha en 8.05 ppm este tipo de señales anchas es característico de NH u OH. En 7.60 ppm se observa una señal doble, nombrada con la letra A, que integra para un hidrógeno; la señal en 7.38 ppm, la B, que es una señal doble e integra para un hidrógeno. Siguiendo en 7.22 ppm se observa una señal triple, señal D, que integra para 1 hidrógeno, la señal en 7.14 ppm, nombrada como C, es una señal triple que integra para un protón, la señal en 7.06 ppm es la E y es una señal doble que integra para un hidrógeno. Estas señales se encuentran en la región de aromáticos y se deduce que son perteneciente a algún anillo aromático. En 5.49 ppm se muestra otra señal similar a la de 8.05 ppm, es por ello que se deduce que ese hidrógeno pertenece a NH. Más adelante se puede observar la señal G que se encuentra en 3.61 ppm y es una señal cuádruple que integra para 2 hidrógenos, ambas señales pertenecen a un metileno cada una por la región en la que se encuentran. Menos desplazado está una señal simple que integra para 3 hidrógenos en 1.92 ppm por la integración y la región en la que está se deduce que es un metilo. Se procede a



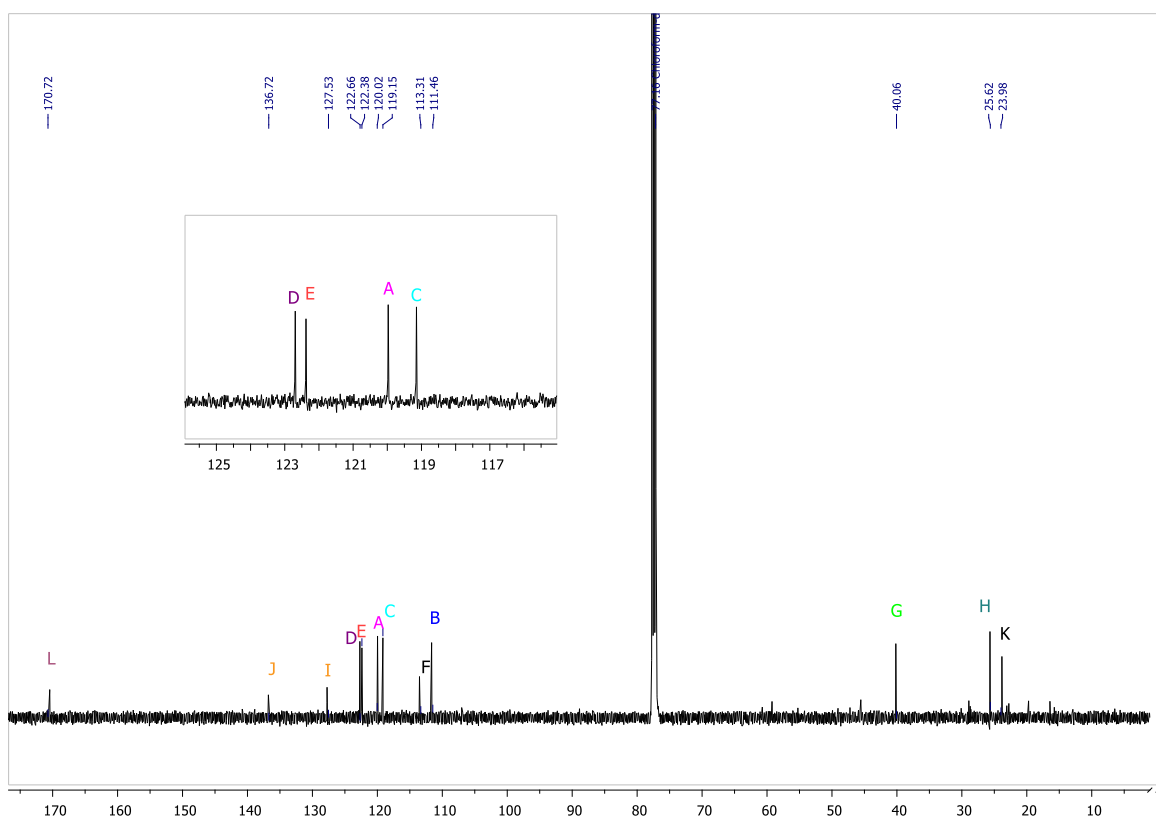
obtener un espectro 2D COSY con el fin de poder correlacionar los hidrógenos del compuesto, como se observa en la figura 14.



**Figura 14:** Espectro RMN 2D COSY del compuesto 2.

El hidrógeno A en 7.60 ppm esta correlacionándose con el hidrógeno C en 7.14 ppm, a su vez el hidrógeno C está correlacionándose con el hidrógeno D en 7.22 ppm y el hidrógeno D también presenta otra correlación la cual es con el hidrógeno B en 7.38 ppm. La correlación e integración que muestran estas señales hace pensar que se trata de un anillo de benceno doblemente sustituido en las posiciones 1 y 2 además de que estas señales se encuentran en la región de los compuestos aromáticos. Siguiendo se observa que la señal G en 3.61 ppm tiene una correlación con la señal H que se encuentra en 2.98 ppm; por la región que se encuentra la señal G y H, además de la correlación presentada se deduce que son dos metilenos unidos a un grupo electronegativo, probablemente NH. Por último, se observa la señal K que está en 1.92 ppm y no se correlaciona con nadie, esto indica que es un metilo unido a algún otro elemento que no posee hidrógenos.

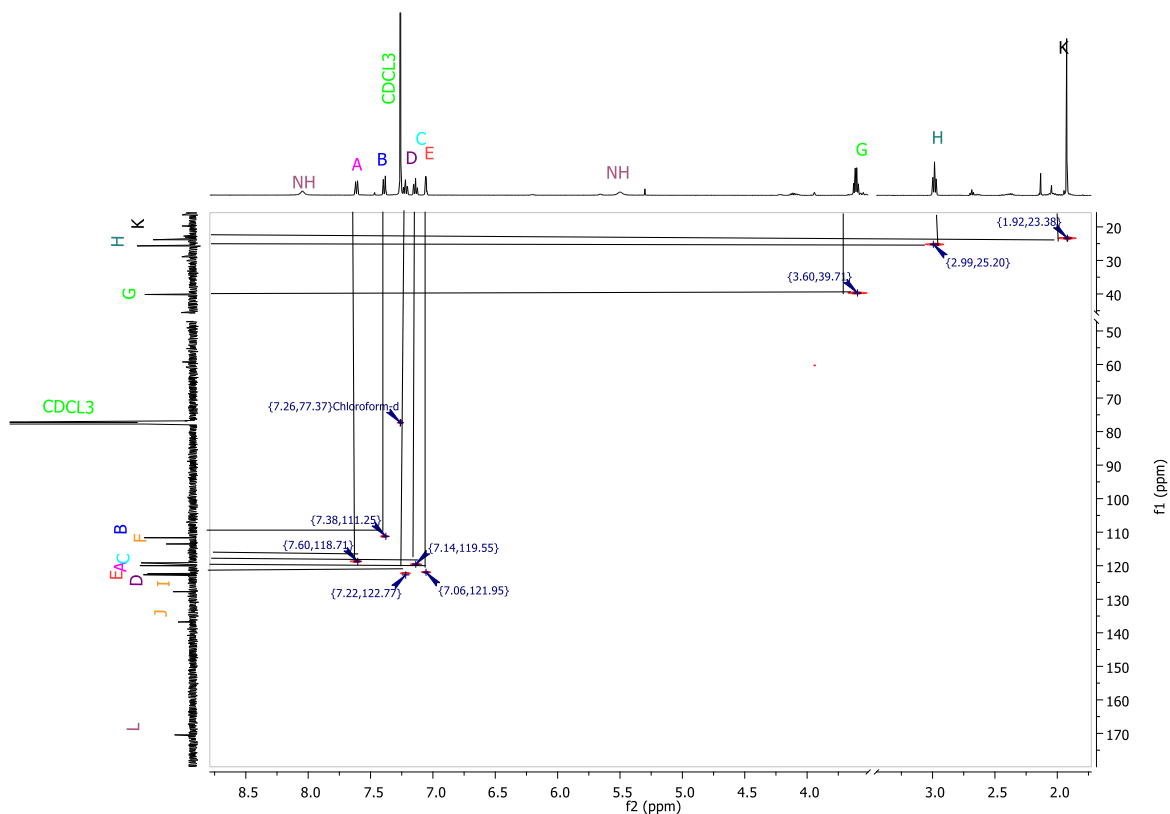
Se obtuvo el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 2 (Figura 15).



**Figura 15:** Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz en  $\text{CDCl}_3$  del compuesto 2.

Se observa en el espectro de 125 MHz de  $^{13}\text{C}$  12 señales de carbonos diferentes. En 170.7 ppm se observa una señal pequeña y es nombrada con la letra L, ese carbono pertenece a un carbonilo, este carbono es el de la amida que con anterioridad en infrarrojo se propone. La señal J en 136.7 ppm y la señal I en 127.5 ppm, son muy similares y ambas por la región en la que se encuentran pertenecen a carbonos cuaternarios del anillo de benceno. Se observan señales en el área de compuestos aromáticos esas señales son D en 122.6 ppm, E en 122.3 ppm, A 120.0 ppm, C en 119.2 ppm, F en 113.3 ppm y B en 111.4 ppm. Menos desplazada se encuentra la señal G en 40.0 ppm y la señal H en 25.6 ppm ambas señales pertenecen a carbonos de metilenos. Por último, la señal K en 23.9 ppm se encuentra cercano a la región de los metilos.

Para saber la correlación existente entre los carbonos e hidrógenos se obtiene un espectro RMN 2D HSQC del compuesto 2 (figura 16).



**Figura 16:** Espectro RMN 2D HSQC del compuesto 2.

La señal L del  $^{13}\text{C}$  en 170.7 ppm no se correlaciona con ningún hidrógeno, lo cual confirma que es un carbonilo perteneciente al grupo amida del compuesto. Las señales J en 136.7 ppm, I en 127.5 ppm y F en 113.3 ppm no presentan correlación alguna, estas tres señales indican que cada señal es perteneciente a un carbono cuaternario.

En la tabla 6 se muestra un resumen de la correlación existente entre las señales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

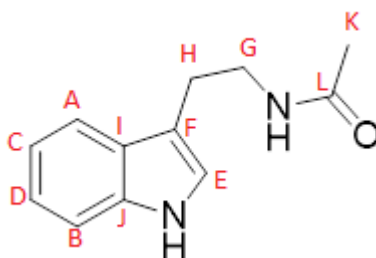
**Tabla 6:** Señales de los espectros del compuesto 2.

Correlación	
Señal $^1\text{H}$ ppm	Señal $^{13}\text{C}$ ppm
8.05	----
7.60	120.0
7.38	111.4
7.22	122.6
7.14	119.2

7.06	122.3
5.49	----
3.61	40.0
2.98	25.6
1.92	23.9
----	170.7
----	136.7
----	127.5
----	113.3

Como un último dato se obtuvo un análisis de RMN, un espectro DEPT 135, para establecer que señales correspondían a CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> y CH.

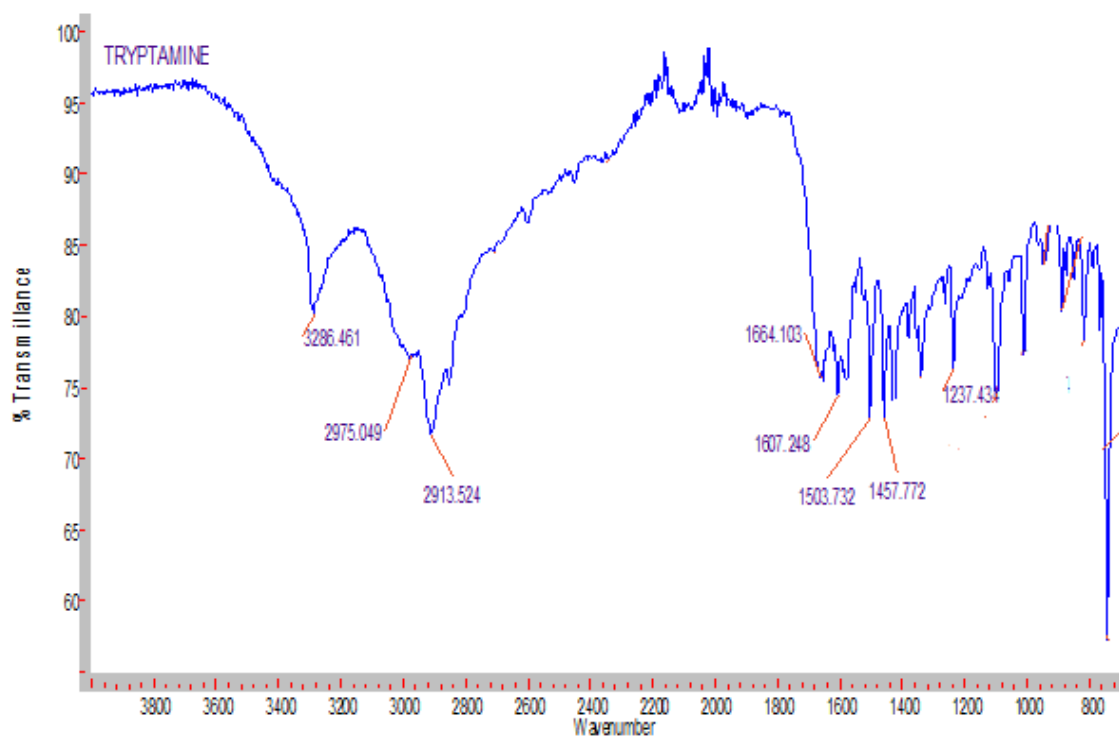
La estructura del compuesto 2 es la que se muestra en la figura 17 y el compuesto es llamado *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)acetamida o también conocida como *N*-acetil triptamina.



**Figura 17:** *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)acetamida

### **Fracción 7A (Compuestos 3 y 4)**

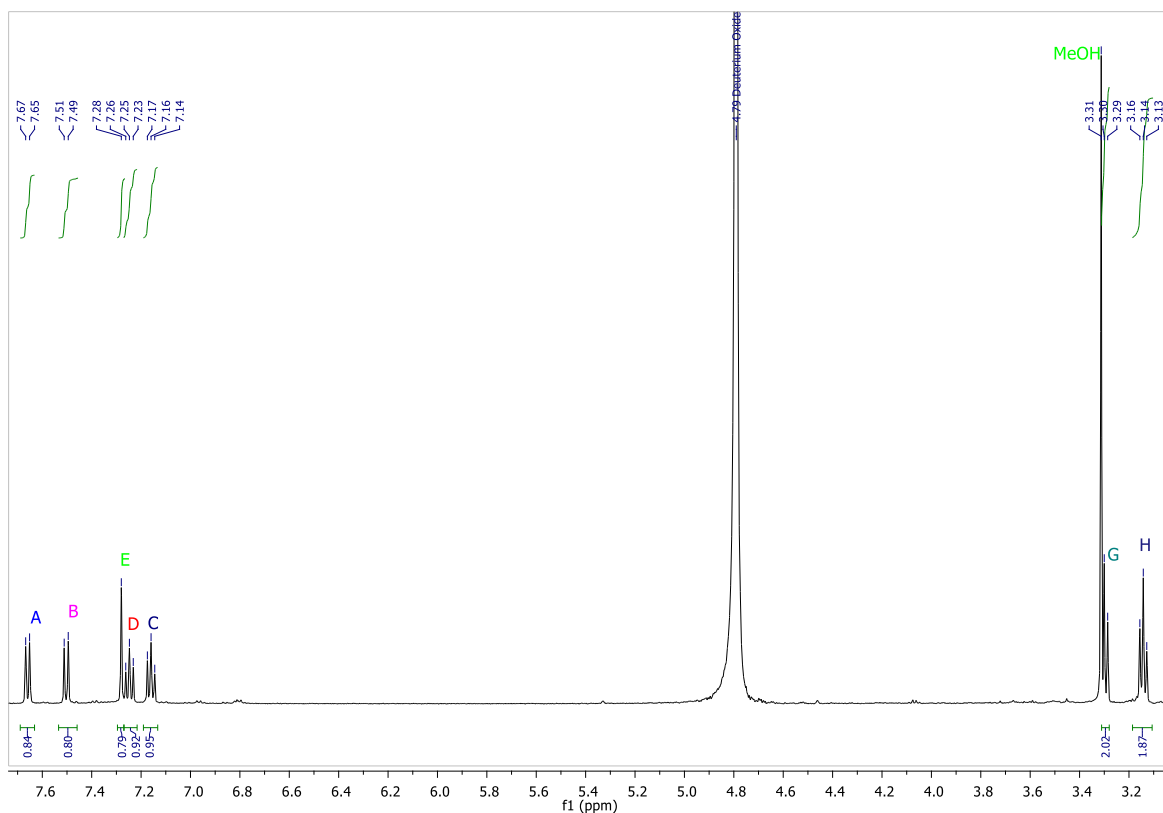
En esta fracción como ya se ha mencionado anteriormente se lograron purificar los compuestos 3 y 4. Como se ha realizado en los dos compuestos anteriores, la elucidación del compuesto 3 comienza con el análisis del espectro obtenido de infrarrojo el cual se puede observar en la figura 18.



**Figura 18:** Espectro de IR del compuesto 3.

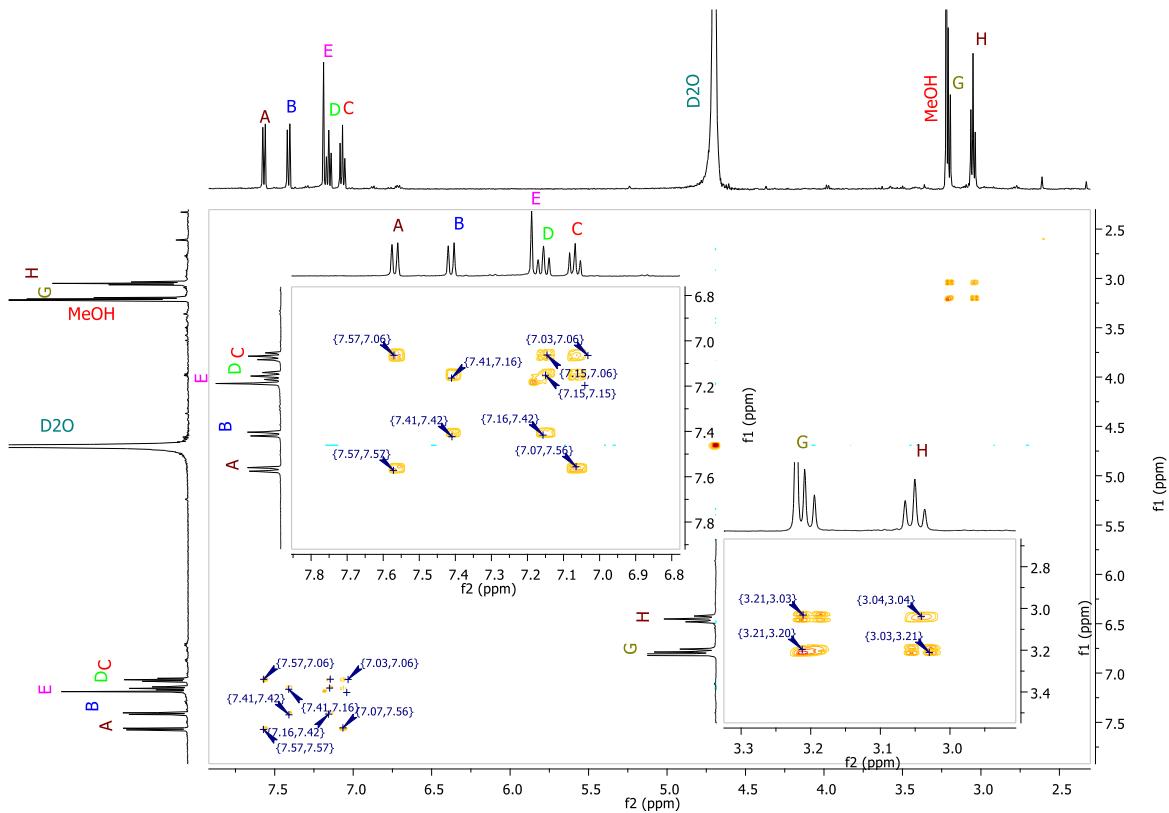
Se observa una banda en la región de  $3286.46 \text{ cm}^{-1}$  la cual puede pertenecer a una amina primaria, la región de  $2975.04 \text{ cm}^{-1}$  y  $2913.52 \text{ cm}^{-1}$  se puede observar una banda en cada uno, por la ubicación se dice que esas señales pertenecen a alcanos. Por otro lado, las bandas  $1664.10 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1607.24 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1503.73 \text{ cm}^{-1}$  y  $1457.71 \text{ cm}^{-1}$  pertenecen a un anillo de benceno disustituido en las posiciones 1,2. La señal que se encuentra en la posición  $1237.43 \text{ cm}^{-1}$  supone que pertenece a una amina secundaria.

Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  a 500 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$  y se procedió a su análisis como se muestra en la figura 19.



**Figura 19:** Espectro de  $^1\text{H}$  a 500 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$  del compuesto 3.

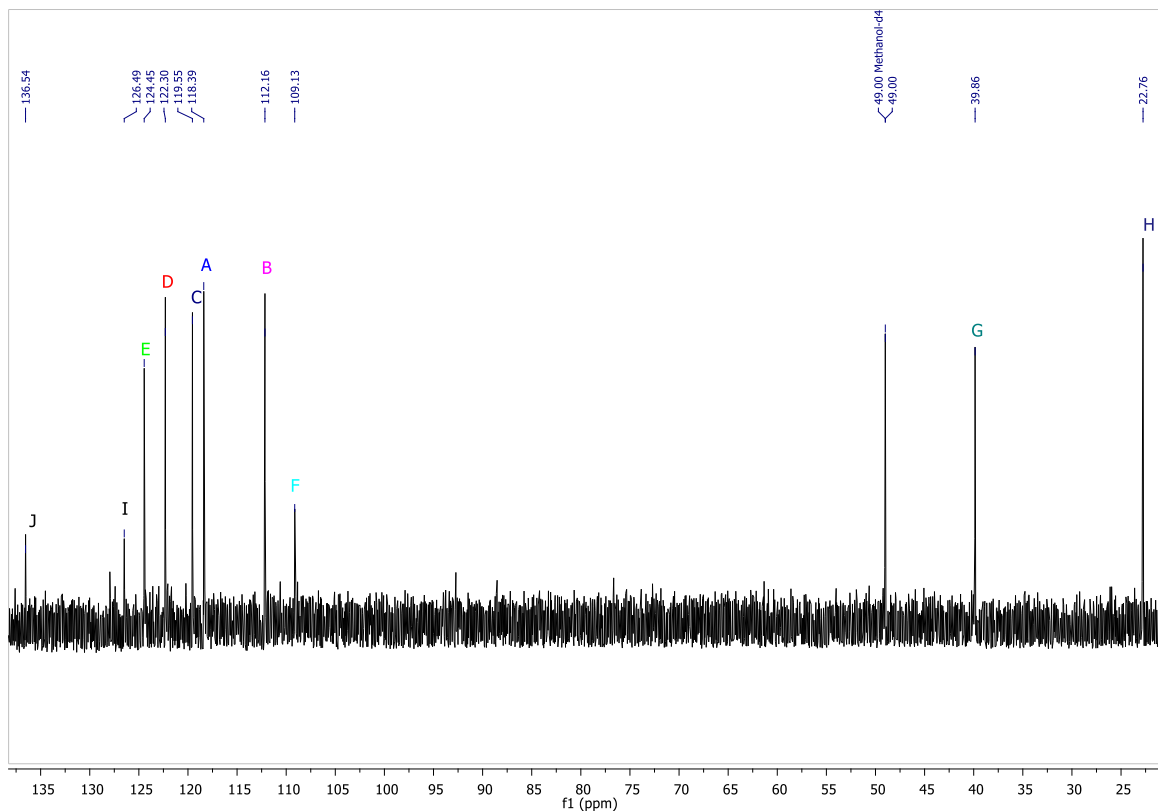
Se observa una señal doble en 7.67 ppm que integra para un hidrógeno se nombra con la letra A, la señal que se encuentra en 7.51 ppm, letra B, es una señal doble que integra para un hidrógeno. Después de estas dos señales dobles, en 7.28 ppm se encuentra la señal E que es una señal simple e integra para un hidrógeno. Cercano a esta señal simple, se encuentra en 7.25 ppm, señal D, que es una señal triple y que integra para un hidrógeno, y en 7.16 ppm se encuentra la señal triple, letra C, que integra para un hidrógeno. En 3.34 ppm se observa una señal residual, la cual es simple y corresponde al metanol. La señal que se encuentra en 3.29 ppm, letra G, es una señal triple que integra para dos hidrógenos; en 3.14 ppm se encuentra la señal H que es una señal triple que integra para dos hidrógenos. Por la región en la que se encuentra la señal G y H se cree que pertenecen a un metileno cada una. Se obtiene también el espectro 2D COSY del compuesto 3 para asignar correctamente los hidrógenos de la molécula (figura 20).



**Figura 20:** Espectro RMN 2D COSY del compuesto 3.

En el espectro RMN 2D COSY se puede apreciar que la señal A en 7.67 ppm se está correlacionando con la señal C en 7.16 ppm, la señal B que es una señal doble en la región 7.51 ppm se está correlacionando con la señal D que es una señal triple en 7.25 ppm. Esta señal D a su vez se encuentra correlacionándose con la señal C. La señal simple en 7.28 ppm denominada E, no muestra correlación alguna. Se infiere que por la región en la que se encuentran y la correlación que muestran, pertenecen a un anillo de benceno el cual se encuentra doblemente sustituido en la posición 1,2. La señal E probablemente pertenece a otro ciclo. Siguiendo con las señales, se muestra que la señal triple que integra para dos hidrógenos G tiene una correlación con la señal triple que correlaciona para 2 hidrógenos H. Con esta información se deduce que la señal G y H son dos metilenos unidos entre sí.

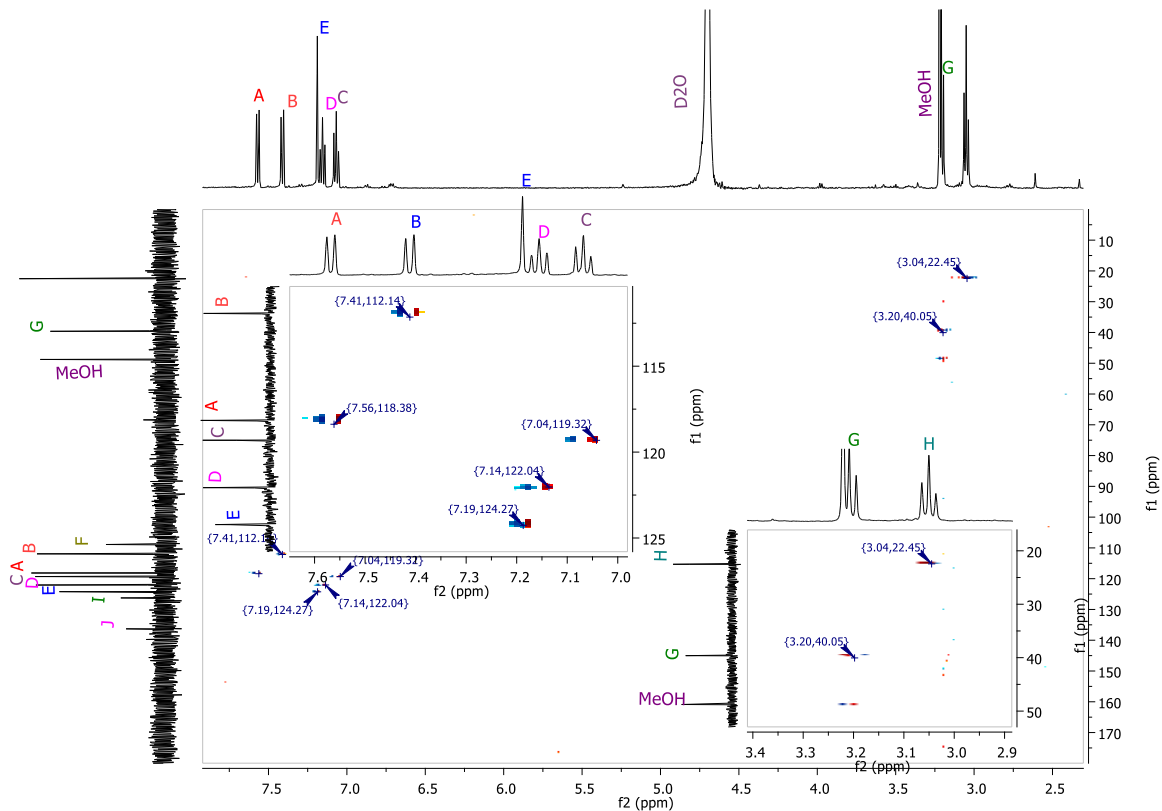
Se obtuvo el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 3 (Figura 21).



**Figura 21:** Espectro RMN<sup>13</sup>C de 125 MHz en D<sub>2</sub>O del compuesto 3.

Se observa en el espectro de 125 MHz de <sup>13</sup>C 10 señales de carbonos diferentes. Se observa una señal J en 136.4 ppm que presenta una similitud con la señal I en 126.4 ppm, ambas señales se encuentran desplazadas en la región de los carbonos cuaternarios pertenecientes a un anillo de benceno. Se observa también una señal en la región de 124.4 ppm que es la señal E, la señal D se encuentra en 122.2 ppm y seguido está la señal C en la región 119.4 ppm. La señal A está en 118.3 ppm y un poco separado de la señal A se encuentra la señal B en la región 112.1 ppm. Estas señales se corresponden con aromáticos, pero es necesario obtener el espectro RMN 2D HSQC para saber la correlación existente entre cada uno de los hidrógenos y los carbonos. En 49.0 ppm se muestra la señal residual del metanol. Siguiendo con el análisis se observa una señal G en 39.8 ppm y una señal H 22.7 ppm, ambas señales se encuentran en la región de los metilenos. Se obtiene el espectro RMN 2D HSQC del compuesto 3 (figura 22).





**Figura 22:** Espectro RMN 2D HSQC del compuesto 3.

Con el espectro RMN 2D HSQC se ve la correlación existente entre los carbonos y los hidrógenos del compuesto y así ir elucidando con mayor claridad. Desde la región del espectro de  $^{13}\text{C}$  se pueden observar señales que no tienen alguna correlación con los hidrógenos, esas señales que caben resaltar son la J en 136.48 ppm, I en 126.44 ppm y F en 109.05 ppm con esta información se deduce que estos tres carbonos son carbonos cuaternarios.

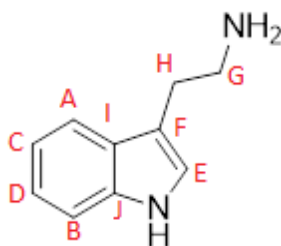
En la tabla 7 se muestra un resumen de la correlación existente entre las señales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ,

**Tabla 7:** Señales de los espectros del compuesto 3.

Correlación	
Señal $^1\text{H}$ ppm	Señal $^{13}\text{C}$ ppm
3.14	22.7
3.29	39.8
7.16	119.4
7.25	122.2
7.28	124.4
7.51	112.1
7.67	118.3
----	109.0
----	126.4
----	136.4

Como un último dato se obtuvo un análisis de RMN, un espectro DEPT 135, para establecer que señales correspondían a  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}$ .

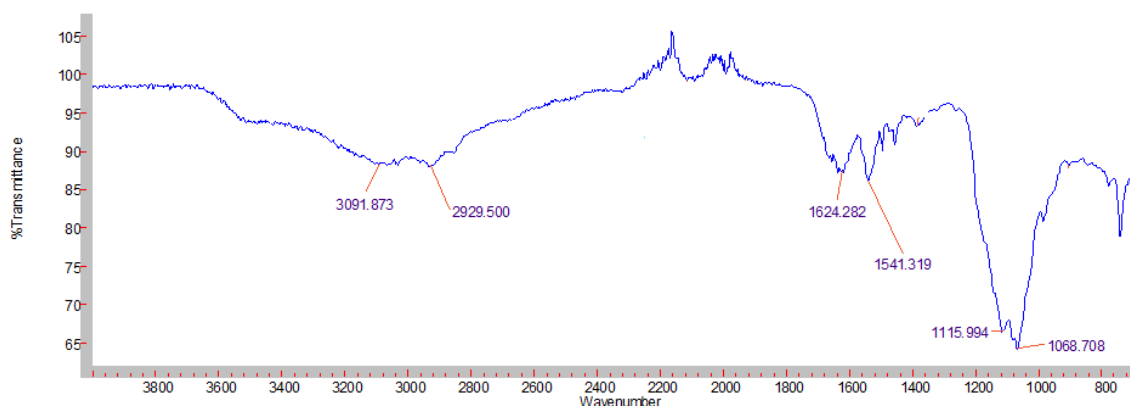
La estructura que se obtiene con ayuda de las técnicas espectroscópicas se muestra en la figura 23, esta estructura recibe el nombre de 2-(1-*H*-indol-3-il)etanamina también conocida como *Triptamina*.



**Figura 23:** 2-(1-*H*-indol-3-il)etanamina

### **Fración 7A (Compuesto 4)**

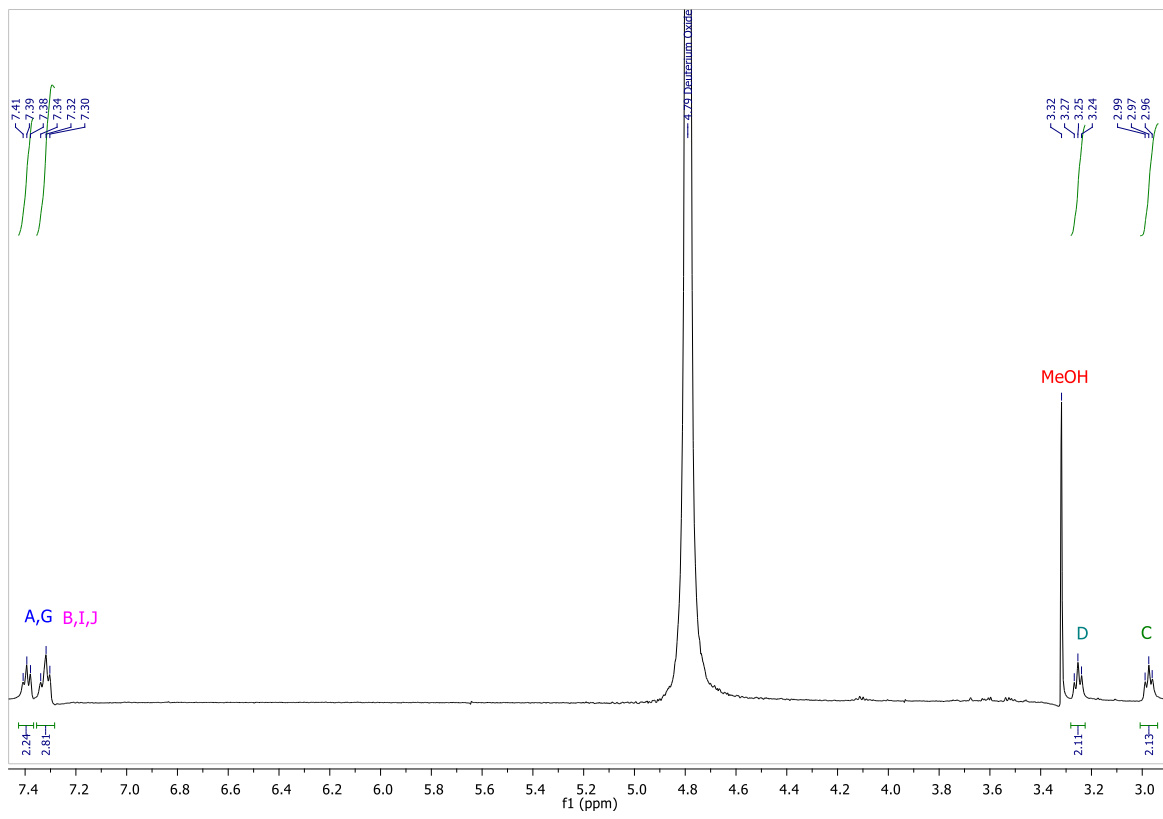
El último compuesto que se obtuvo fue el compuesto 4. A continuación, se muestra el espectro de infrarrojo (IR) el cual proporciona información sobre los posibles grupos funcionales del compuesto 4.



**Figura 24:** Espectro de IR del compuesto 4

Como se observa en la figura 24 en la región  $3091.873\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda que puede pertenecer a un benceno monosustituido, el valor  $1541.319\text{ cm}^{-1}$ ,  $1115.994\text{ cm}^{-1}$  y  $1068.708\text{ cm}^{-1}$  también podrían pertenecer al mismo benceno monosustituido. Por otro lado, la señal  $2929.5\text{ cm}^{-1}$  puede pertenecer a enlaces C-H. La señal en  $1541.319\text{ cm}^{-1}$  pertenecería muy probable a una amina primaria.

Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  a 500 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$  ya que no era soluble en cloroformo y se procedió a su análisis como se muestra en la figura 25.

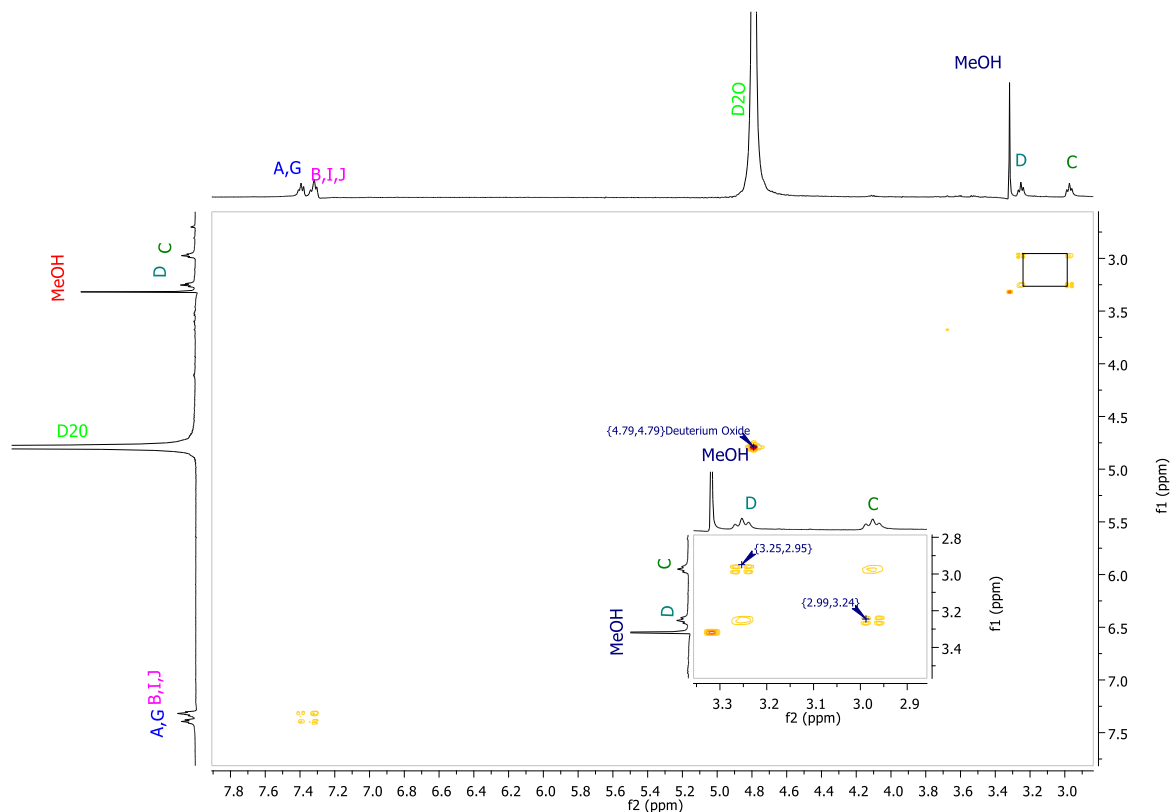


**Figura 25:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz en  $\text{D}_2\text{O}$  del compuesto 4

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 500 MHz permitió obtener un espectro en donde las señales muestran el desplazamiento químico y disposición de los hidrógenos de la molécula. Primero se realizó la integración de las señales de los hidrógenos que contiene la molécula.

Se puede apreciar una señal triple ancha en 7.39 ppm que integra para dos hidrógenos los cuales han sido nombrados con las letras A y G, enseguida de esta señal se puede apreciar una señal múltiple en 7.32 ppm que integra para 3 hidrógenos nombrados con las letras B,I,J; por la región en la cual se encuentran las señales y la suma de sus integrales que es 5, se propone que es un anillo de benceno monosustituido. En 3.32 ppm se observa una señal residual de MeOH. Así mismo se puede observar en la región 3.25 ppm una señal triple ancha que integra para dos hidrógenos nombrada con la letra D, enseguida de esta señal se encuentra otra señal triple ancha en la región 2.97 ppm que integra para 2 hidrógenos nombrada con la letra C; por la región en la cual se encuentran estas señales se cree que cada señal es perteneciente a un metileno ( $\text{CH}_2$ ) respectivamente.

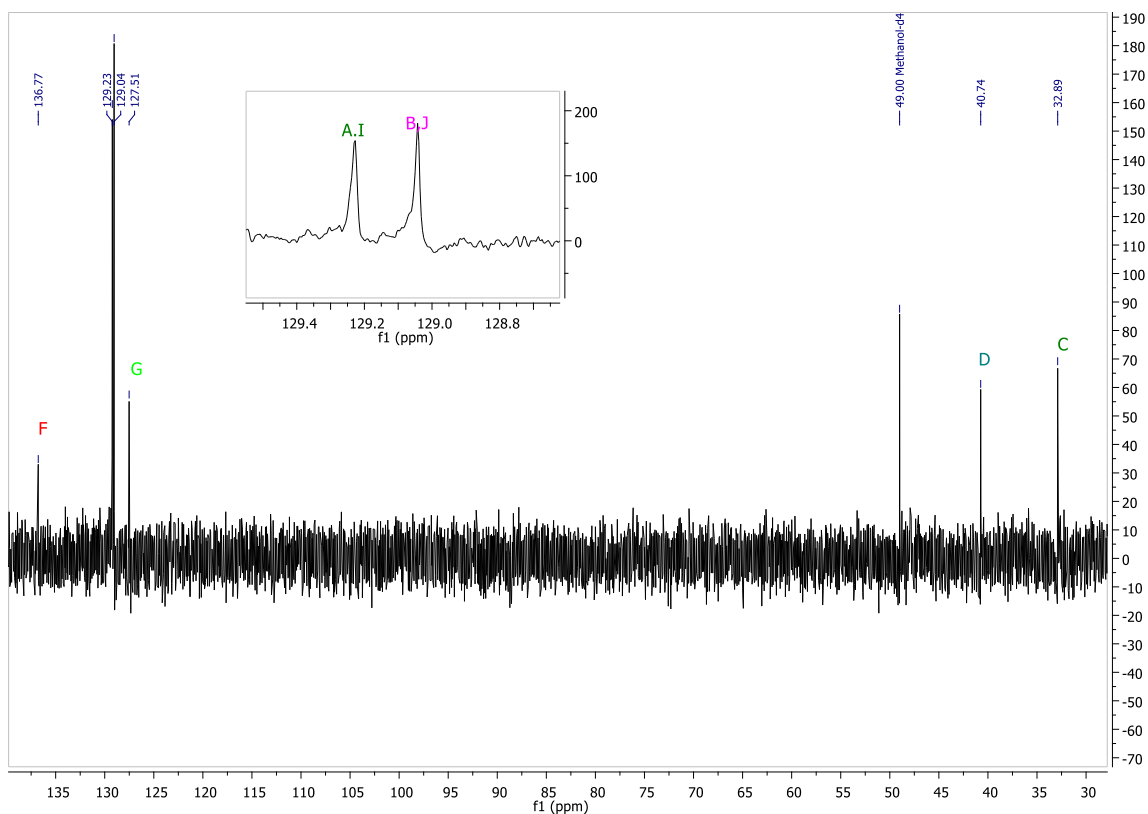
Después de analizar el espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 500 MHz, se procedió a obtener espectros de RMN 2D COSY con el fin de poder saber la relación que guardan entre si los hidrógenos y asignarlos inequívocamente (Figura 26).



**Figura 26:** Espectro RMN 2D COSY del compuesto 4.

Al realizar una expansión en el espectro de 2D COSY en la región 7.39 ppm y 7.32 ppm se observa una correlación entre estos hidrógenos los cuales pertenecerían al anillo de benceno monosustituido. Siguiendo con las señales, existe una correlación entre la señal D 3.25 ppm con la señal C 2.97 ppm, ambas señales integran para 2 hidrógenos. La relación que guarda la señal C y D hace pensar que posiblemente es una cadena de  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$  unida a un anillo de benceno.

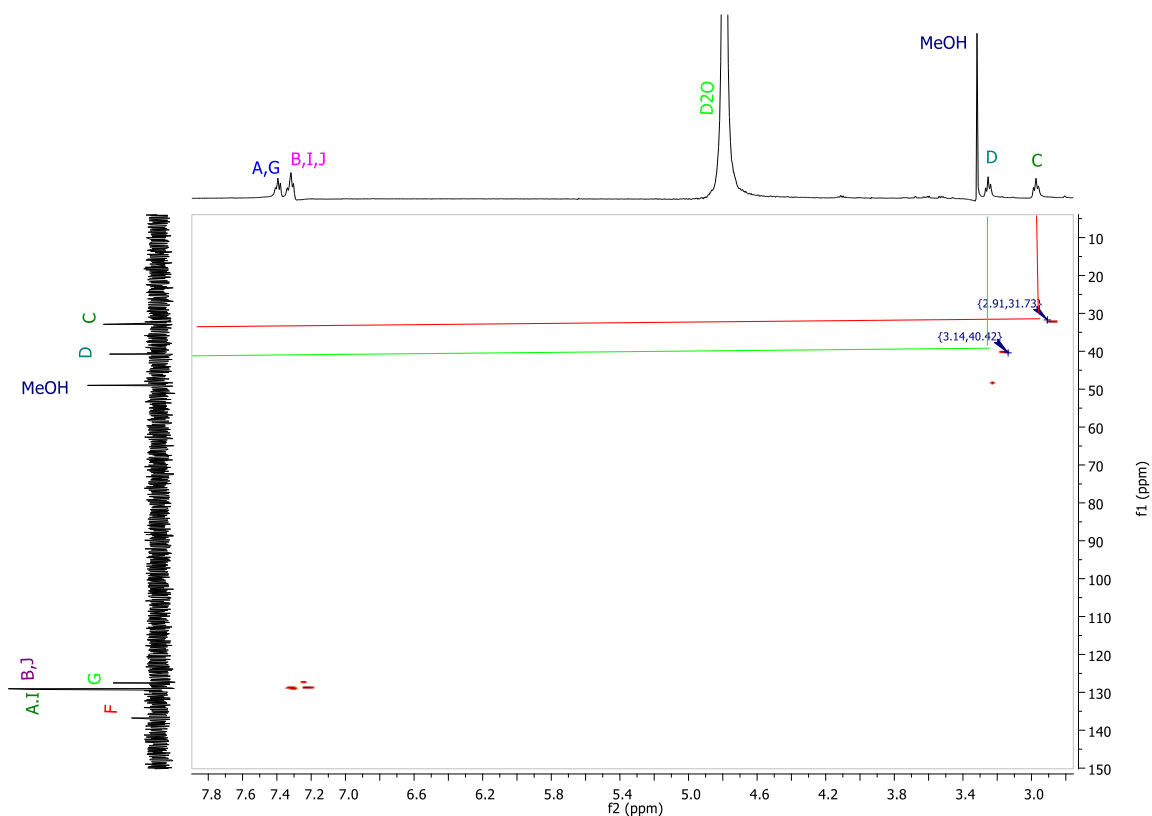
Posteriormente se obtuvo el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto 4 (Figura 27).



**Figura 27:** Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  a 125 MHz de en  $\text{D}_2\text{O}$  del compuesto 4.

Se observa en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  6 señales de carbonos diferentes, haciendo denotar que existen en el espectro dos señales altas a comparación de las demás señales. Se realiza una asignación primaria de los carbonos, por la región en la que se encuentran las señales se deduce que la señal en la región 136.7 ppm pertenece a un carbono cuaternario, las señales en 129.2 ppm, 129.0 ppm y 127.5 ppm se encuentran dentro de la región a la cual pertenecen los carbonos de anillo aromático; por último las señales en 40.7 ppm y 32.8 ppm pertenecen a carbonos de metilenos.

Para una correcta asignación de los carbonos correlacionándolos con los hidrógenos, se procedió a la obtención del espectro RMN 2D HSQC (Figura 28).



**Figura 28:** Espectro RMN 2D HSQC del compuesto 4.

La señal que se observa en el espectro de  $^{13}\text{C}$  en 136.7 ppm (F) no tiene correlación con ningún hidrógeno se concluye que es un carbono cuaternario.

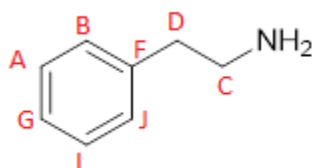
En la siguiente tabla se resumen las señales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ .

**Tabla 8:** Señales de los espectros del compuesto 4

Correlación	
Señal $^1\text{H}$ ppm	Señal $^{13}\text{C}$ ppm
2.97	32.8
3.25	40.7
7.32	127.5 y 129.0
7.39	129.2
-----	136.7

Como un último dato se obtuvo un análisis de RMN, un espectro DEPT 135, para establecer que señales correspondían a CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> y CH.

Con toda la información que ha sido obtenida mediante las técnicas espectroscópicas se elucidó la estructura del compuesto 4 (Figura 29). La estructura propuesta coincide con los espectros de RMN e IR, el nombre que recibe esta estructura es *2-fenetilamina*.



**Figura 29:** *2-fenetilamina*



## 4.6 PRUEBAS BIOLÓGICAS

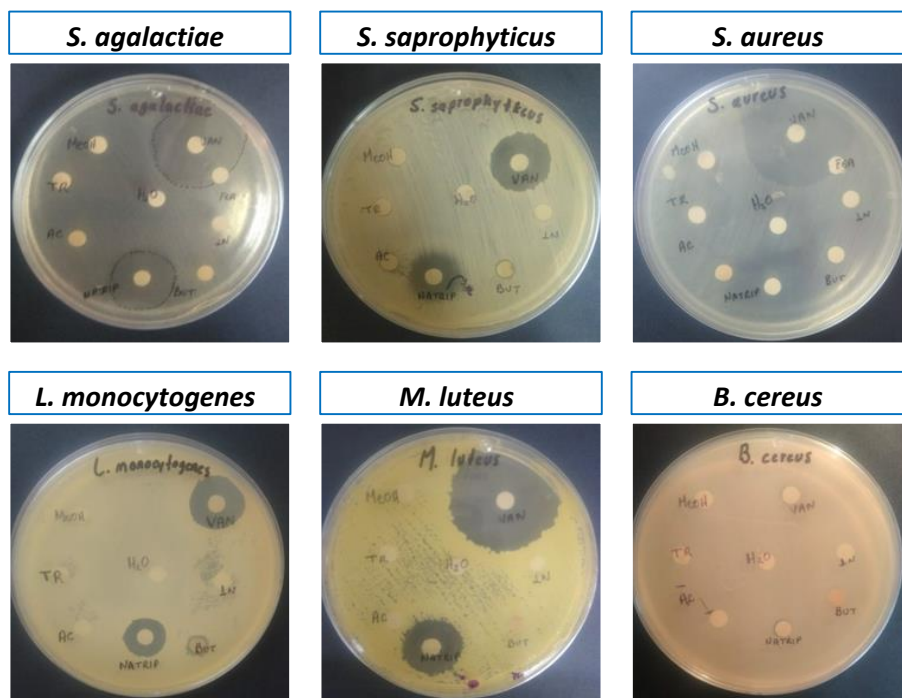
Teniendo la caracterización de cada uno de los compuestos se realizó un ensayo de antibiograma contra bacterias gram (+): *S. agalactie*, *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *M. luteus* y *B. cereus* por parte de las bacterias gram (-) se utilizaron: *S. cholerasuis*, *E. coli*, *V. parahemolyticus*, *V. cholerae*, *Shigella sp.* y *P. aeruginosa*.

Los resultados de las bacterias gram (+) se muestran en la tabla 9 y figura 30 y los resultados de las bacterias gram (-) se muestran en la tabla 10 y figura 31. Las lecturas se efectuaron a las 24 y 48 h obteniendo el mismo resultado.

**Tabla 9:** Resultados del antibiograma en bacterias gram (+)

Bacteria/Compuesto	Fenilacetamida <i>1</i>	Acetilriptamina <i>2</i>	Triptamina <i>3</i>	Fenilamina <i>4</i>
	<i>Halos de inhibición (mm)</i>			
<i>S. agalactie</i>	0	<b>20</b>	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	0	<b>17</b>	0	<b>8</b>
<i>S. aureus</i>	0	<b>15</b>	0	<b>4</b>
<i>L. monocytogenes</i>	0	<b>14</b>	0	0
<i>M. luteus</i>	0	<b>29</b>	0	<b>13</b>
<i>B. cereus</i>	0	0	0	0

En la tabla 9 se observa que el compuesto N-fenilacetamida **1** no inhibe el crecimiento de ninguna de las bacterias gram (+) al igual que la triptamina **3** tampoco tiene actividad inhibitoria contra estas bacterias. La fenilamina **4** no inhibe el crecimiento de *S. agalactie*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*. La N-acetilriptamina **2** es el compuesto que presentó mayor halo de inhibición contra la mayor parte de las bacterias utilizadas, solo contra *B. cereus* no inhibió su crecimiento. En la figura 30 se puede observar los resultados obtenidos de los antibiogramas.



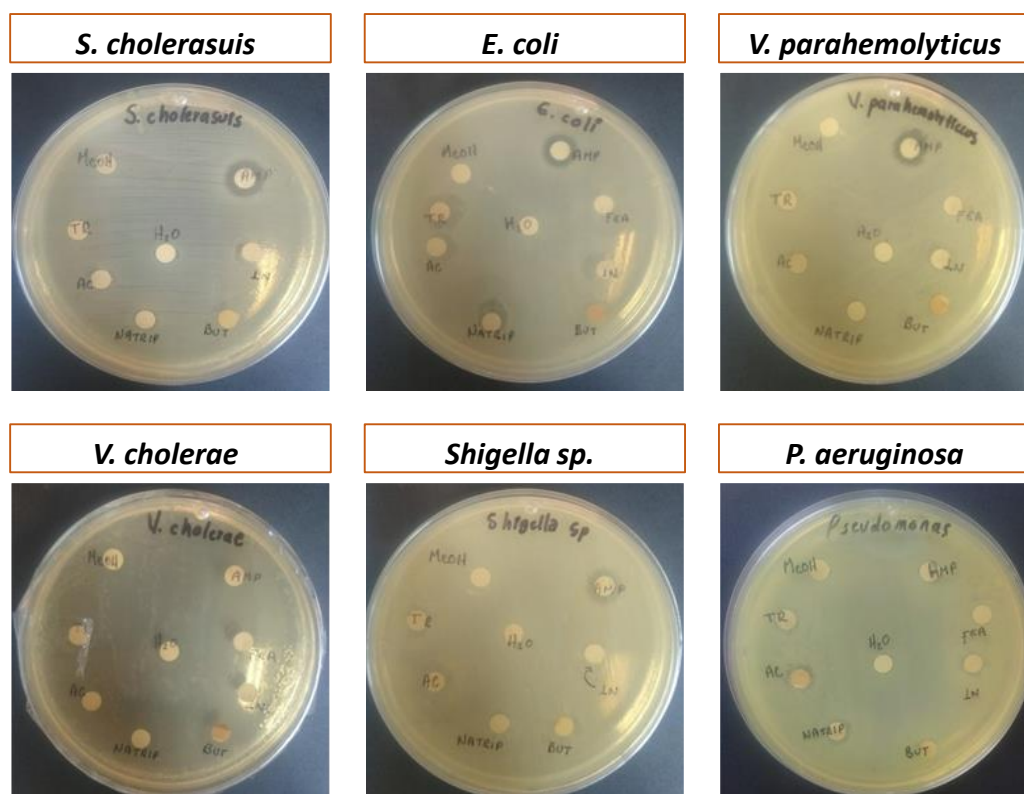
**Figura 30:** Resultados de antibiograma en bacterias gram (+)

**Tabla 10:** Resultados del antibiograma en bacterias gram (-)

Bacteria/Compuesto	Fenetilacetamida	acetiltriptamina	Triptamina	Fenetilamina
	1	2	3	4
	Halo de inhibición (mm)			
<i>S. cholerasuis</i>	0	0	14	0
<i>E. coli</i>	7	8	0	0
<i>V. parahemolyticus</i>	0	0	0	0
<i>V. cholerae</i>	7	0	9	8
<i>Shigella sp.</i>	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	8	0	0	0

En la tabla 10 se puede observar que los resultados de inhibición del crecimiento a comparación de las bacterias gram (+) es menor. Se podría destacar que el compuesto fenetilacetamida **1** inhibió el crecimiento de 3 bacterias las cuales son *E. coli*, *V. cholerae* y *P. aeruginosa*, la Triptamina **3** es el compuesto que inhibió en mayor cantidad a una bacteria

la cual es *S. cholerasuis* con 14 mm. En la figura 31 se observan los resultados del antibiograma en bacterias gram (-)



**Figura 31:** Resultados de antibiograma en bacterias gram (-)

Cabe señalar que los compuestos **3** y **4** (triptamina y fenetilamina) se encontraron en la fracción 7A que fue la fracción que mostró mayor actividad contra algunas bacterias. Esto puede ser debido a que la unión de ambos compuestos juntos en la misma fracción producía una fuerte inhibición contrario a los compuestos **1** y **2** que se encontraban en las fracciones 4 y 6A respectivamente las cuales no habían mostrado tanta inhibición.

Con el objetivo de completar aún más los ensayos de bioactividad por parte de cada uno de los compuestos obtenidos, se procedió a realizar un ensayo biodirigido contra hongos fitopatógenos los cuales afectan al crecimiento de plantas importantes en la industria alimenticias cada uno de los compuestos son testados en una concentración de 1 mg/mL.

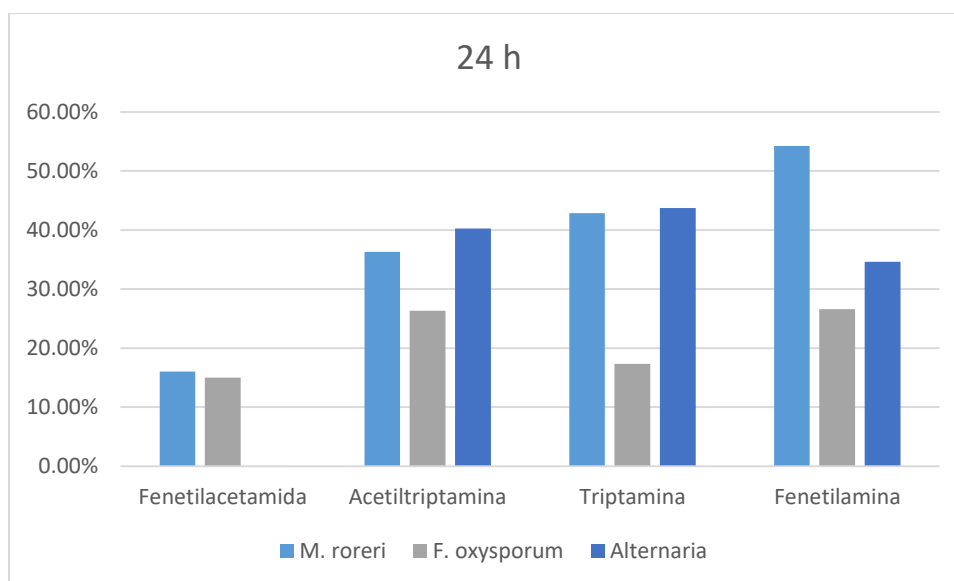
Se realizó el ensayo de antibiograma contra hongos fitopatógenos: *M. royeri*, *F. oxysporum* y *Alternaria alternata*. La metodología empleada para los fitopatógenos es diferente que con las bacterias, la inhibición en este caso se mide en porcentaje y la lectura fue efectuada a 24

y 48 h. Los resultados de la lectura a las 24 h se muestran en la tabla 11 y la gráfica 1, los resultados a las 48 h se muestran en la tabla 12 y la gráfica 2.

**Tabla 11:** Resultados del antibiograma a las 24 h contra hongos fitopatógenos

	Fenilacetamida 1	Acetilriptamina 2	Triptamina 3	Fenilamina 4
<i>M. royeri</i>	16.02%	36.29%	42.87%	54.23%
<i>F. oxysporum</i>	14.99%	26.31%	17.36%	26.58%
<i>A. alternata</i>	0.01%	40.27%	43.73%	34.64%

**Gráfico 1:** Porcentaje de inhibición a las 24 h

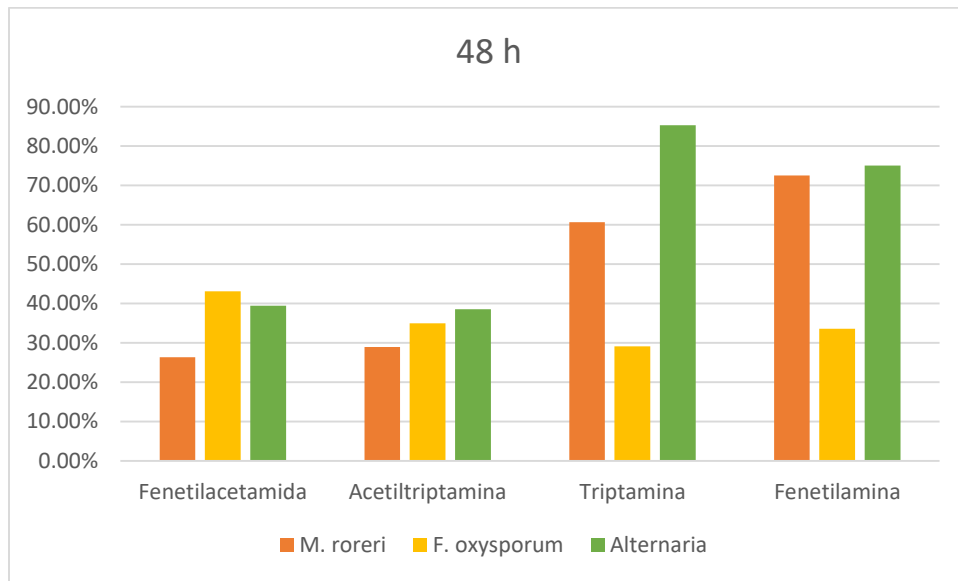


A las 24 h se observa que el compuesto que tiene un mayor poder inhibitorio del crecimiento bacteriano es la fenilamina 4 seguido de la triptamina 3 y la acetilriptamina 2. La fenil acetamida 1 no inhibe el crecimiento de *Alternaria* a las 24 h.

**Tabla 15:** Resultados del antibiograma a las 48 h contra hongos fitopatógenos

	Fenilacetamida 1	Acetilriptamina 2	Triptamina 3	Fenilamina 4
<i>M. royeri</i>	26.40%	28.99%	60.64%	72.54%
<i>F. oxysporum</i>	43.12%	35.02%	29.09%	33.60%
<i>A. alternata</i>	39.42%	38.54%	85.29%	75.07%

**Gráfico 2:** Porcentaje de inhibición a las 48 h



A las 48 h es la triptamina **3** quien inhibe en un mayor porcentaje el crecimiento de los hongos seguido de la fenetilamina **4** y fenetil acetamida **1**, la cual a las 48 h ya comienza a inhibir el crecimiento de *Alternaria*.

Por lo que se podría concluir que la fenetilamina **4** y la triptamina **3** son los compuestos que tiene mayor actividad frente a los hongos.

# 5- Desarrollo experimental

## Materiales y Métodos

En este trabajo se utilizó una cepa de *Bacillus thuringiensis* ELI 52, la cual ya ha sido previamente investigada en el grupo de trabajo.

En el medio de cultivo utilizado fue LB (Luria Bertani) el cual contiene:

Extracto de levadura	5.0 g.
NaCl	10.0 g
Peptona de caseína	10.0 g

Los ingredientes se disuelven en un litro de agua destilada y se coloca en 4 matraces Erlenmeyer de 500 ml, en cada matraz se colocan 250 mL del caldo de cultivo.

Los matraces se esterilizan en autoclave bajo las siguientes condiciones: 20 min, 15 libras, 120 °C. Pasado el tiempo de esterilización se dejó a enfriar a temperatura ambiente.

## Crecimiento de la cepa ELI 52

La cepa a emplear se hizo crecer en medio de cultivo sólido LB, durante 24 h, pasado el tiempo de incubación se observó que la cepa no presentara algún tipo de contaminación con otro microorganismo ya fuera hongo o bacteria. Posteriormente se procedió a inocular los matraces Erlenmeyer que contenían el medio de cultivo LB todo en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero bunsen). Después de inocular el medio de cultivo, los matraces se incubaron a 29 °C 175 rpm durante 7 días.

Con el fin de separar las células del cultivo, pasados los 7 días de incubación se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos; después se realizó una decantación separando el medio de cultivo del botón celular.

## Extracción del cultivo sin células con disolventes orgánicos

Al cultivo resultado de la decantación se le procedió a realizar una extracción con el disolvente acetato de etilo en una relación 1:1 de volumen, por triplicado.

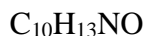
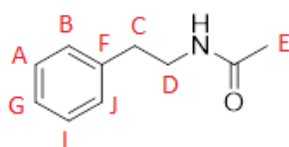
La extracción se realizó en embudo de separación por triplicado. Posteriormente la fase orgánica se recolectó y secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y con ayuda del rotavapor se concentró a presión reducida obteniendo un extracto crudo de aspecto viscoso color amarillo-marrón con un rendimiento de 200 mg/L.

## Purificación del extracto crudo de la cepa ELI 52

Al extracto crudo se le realizó un fraccionamiento general mediante cromatografía en columna de gel de sílice con sistemas o mezcla de sistemas que van desde Hexano 100% hasta Metanol 100%. Después del fraccionamiento general se realizaron nuevamente cromatografías en columna de gel de sílice para poder obtener compuestos con la menor cantidad de impurezas.

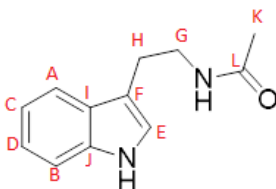
## Caracterización de los compuestos de interés

### 2-fenetilacetamida 1



Rendimiento 0.75% (0.0207g), sólido blanco-amarillo, RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.32 (2H, t, CH<sub>a</sub>, CH<sub>g</sub>), 7.23 (3H, m, CH<sub>b</sub>, CH<sub>i</sub>, CH<sub>j</sub>), 5.46 (1H, s, NH), 3.52 (2H, q,  $J=7$  Hz, CH<sub>2</sub>), 2.82 (2H, t,  $J=7$  Hz, CH<sub>2</sub>), 1.94 (3H, s, CH<sub>3</sub>). RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.1 (C=O), 139.0 (C), 128.9 (CH<sub>b</sub>, CH<sub>j</sub>), 128.8 (CH<sub>a</sub>, CH<sub>i</sub>), 126.7 (CH), 40.8 (CH<sub>2</sub>), 35.8 (CH<sub>2</sub>), 23.5 (CH<sub>3</sub>). IR<sub>max</sub>: 3063, 3028, 2929, 2856, 1720, 1650  $\text{cm}^{-1}$ .

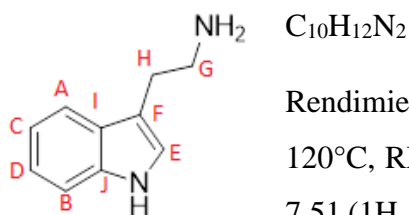
### N-(2-(1H-indol-3-il)etil) acetamida 2



Rendimiento 0.36% (0.010g) sólido blanco-amarillo, p.f.= 110-113°C, RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.05 (1H, s, NH), 7.60 (1H, d,  $J=8$  Hz, CH), 7.38 (1H, d,  $J=8$  Hz, CH), 7.22 (1H, t,  $J=8$  Hz,

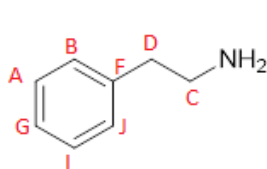
CH), 7.14 (1H, t,  $J=8$  Hz, CH), 7.06 (1H, d, CH), 5.49 (1H, s, NH), 3.61 (2H, q,  $J=7$  Hz CH<sub>2</sub>), 2.98 (2H, t,  $J=7$  Hz CH<sub>2</sub>), 1.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>). RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 170.7 (C=O), 136.7 (C), 127.5 (C), 122.7 (CH), 122.4 (CH), 120.0 (CH), 119.2 (CH), 113.3 (C), 111.5 (CH), 40.1 (CH<sub>2</sub>), 25.6 (CH<sub>2</sub>), 24.0 (CH<sub>3</sub>). IR<sub>max</sub>: 3087, 2926, 1639, 1231 cm<sup>-1</sup>.

### 2-(1-H-indol-3-il) etanamina 3



Rendimiento 0.81% (0.0225g), sólido blanco-amarillo, p.f.= 116-120°C, RMN <sup>1</sup>H (500 MHz D<sub>2</sub>O) δ 7.67. (1H, d,  $J=8$  Hz, CH), 7.51 (1H, d,  $J=8$  Hz, CH), 7.28 (1H, s, CH), 7.25 (1H, t,  $J=8$  Hz, CH), 7.16 (1H, t,  $J=8$  Hz, CH), 3.28 (2H, t,  $J=7$  Hz, CH<sub>2</sub>), 3.14 (2H, t,  $J=7$  Hz, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (125 MHz D<sub>2</sub>O) δ 136.54 (C), 126.49 (C), 124.45 (CH), 122.30 (CH), 119.55 (CH), 118.39 (CH), 112.16 (CH), 109.13 (C), 39.86 (CH<sub>2</sub>), 22.76 (CH<sub>2</sub>). IR<sub>max</sub>: 3286, 2975, 2913, 1664, 1607, 1503, 1457, 1237 cm<sup>-1</sup>.

### 2-fenetilamina 4



Rendimiento 0.33% (0.0093 g) sólido blanco-amarillo, RMN <sup>1</sup>H (500 MHz D<sub>2</sub>O) δ 7.39 (2H, ta, CH<sub>a</sub>, CH<sub>g</sub>), 7.32 (3H, m, CH<sub>b</sub>, CH<sub>i</sub>, CH<sub>j</sub>), 3.25 (2H, t,  $J=7$  Hz, CH<sub>2</sub>), 2.97 (2H, t,  $J=7$  Hz, CH<sub>2</sub>). RMN <sup>13</sup>C (125 MHz D<sub>2</sub>O) δ 136.77 (C), 129.23 (CH<sub>a</sub>, CH<sub>i</sub>), 129.04 (CH<sub>b</sub>, CH<sub>j</sub>), 127.51 (CH), 40.74 (CH<sub>2</sub>), 32.89 (CH<sub>2</sub>). IR<sub>max</sub>: 3091, 2929, 1624, 1115, 1068 cm<sup>-1</sup>.

### Pruebas biológicas

Para realizar estas pruebas se eligió el método de antibiograma el cual es una prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de un microorganismo (bacteria y hongo) a un compuesto o grupo de compuestos con actividad antibiótica u antimicrobiana. Se considera como antimicrobiano cualquier sustancia con capacidad de matar o al menos de inhibir el crecimiento de los microorganismos.

Se preparan cultivos en tubos Falcon cerrados estériles de 15 mL con una suspensión de las bacterias que se utilizaron en el ensayo (*S. agalactie*, *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *L.*



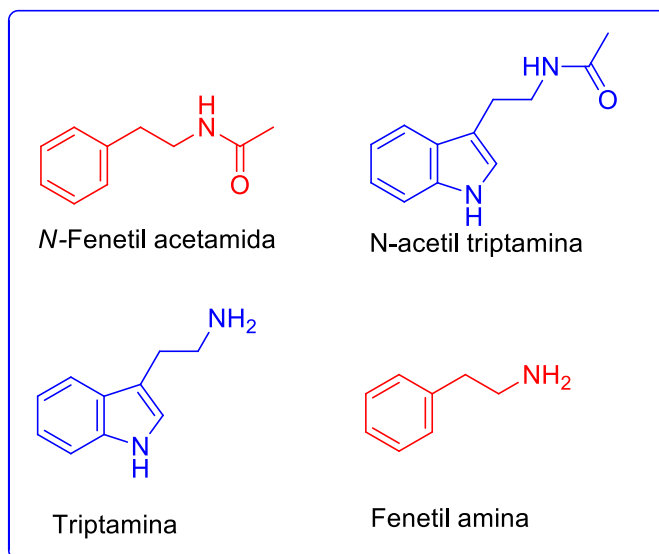
*monocytogenes*, *M. luteus*, *B. cereus*, *S. cholerasuis*, *E. coli*, *V. parahemolyticus*, *V. parahemolyticus*, *V. cholerae*, *Shigella sp.* *P. aeruginosa*) en 5 mL de cultivo líquido LB. Los tubos se incubaron a 29 °C por 24 h. Después de las 24 h se tomaron 100 µL del tubo falcon que contiene el cultivo y después se colocaron en una placa de medio de cultivo sólido, se realizó una estría masiva en condiciones de esterilidad.

Cada uno de los compuestos que se utilizaran en el antibiograma se diluyeron con metanol a una concentración de 15 mg/100 µL después de esto se ponen 5 µl de los compuestos a probar en el antibiograma y se impregnan en discos de papel filtro de aproximadamente 5 mm de diámetro previamente esterilizados y se colocan en las placas de medio de cultivo sólido donde se encuentra la bacteria estriada masivamente. En cada placa también se colocó un disco impregnado con metanol como control negativo, esto se hace porque el metanol fue el disolvente utilizado para cada uno de los compuestos. Estas placas se incubaron a 29 °C por 24 h. Después del tiempo de incubación se observó el crecimiento de cada placa y se midió el halo de inhibición que provoca el compuesto impregnado en el disco, esta lectura se realizó a las 24 y 48 h.

Para el ensayo de antibiograma en los hongos, se realizó de la siguiente manera: cada uno de los compuestos a utilizar se diluyeron con etanol a una concentración de 1 mg/mL. En una microplaca de 12 pocillos se selecciona una línea de 4 pocillos los cuales serán adicionados cada uno con 300 µL (30 µg) del compuesto inmerso en el medio PDA de manera homogénea evitando la formación de burbujas. En las mismas condiciones de esterilidad, a cada uno los hongos fitopatógenos (*Alternaria alternata.*, *F. oxysporum* y *M. roreri*) con ayuda de un transfer se le realiza cortes a cada uno de los hongos y se colocan en cada uno de los pocillos, la microplaca con los hongos se incuba a 29 °C, a las 24 h se realiza la lectura y se escanea, con el programa ImageJ y la estadística correspondiente se hace una relación de la inhibición del crecimiento de cada uno de los compuestos esto también se realiza a las 48 h, obteniendo el resultado en porcentaje de inhibición.

# 6- Conclusiones

- Se obtuvo un extracto crudo de la cepa de *B. thuringiensis* ELI52.
- Se logró separar diferentes fracciones por cromatografía en columna en el de sílice.
- Se lograron identificar y caracterizar cuatro compuestos de tres fracciones diferentes, llamados N- fenetil acetamida, N-acetil triptamina, Triptamina y Fenetilamina.



- Se realizaron pruebas biológicas de inhibición del crecimiento con los cuatro compuestos en bacterias y hongos. El compuesto *N*-acetil triptamina mostró un mayor poder inhibitorio hacia bacterias gram positivas. Contrariamente ese compuesto no mostró un poder inhibitorio significativo contra hongos. Sin embargo, los compuestos de triptamina y fenetilamina fueron los que lograron tener un gran poder inhibitorio contra los hongos. Esto podría ser debido a la presencia del grupo amino libre en el extremo de la molécula como sustituyente para mostrar mayor poder inhibitorio contra hongos.

# 7- Referencias

1. Gutiérrez-Ravelo, A.; Estevez-Braun, A. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)*, **2009**, *103*, 409-419.
2. Stein, T. *Mol. Microbiol.*, **2005**, *56*, 845-857.
3. Demain, A.L.; Fang, A. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2000**, *69*, 1-39.
4. Sansinenea, E.; Ortiz, A. *Biotechnol. Lett.*, **2011**, *33*, 1523-1538; Sansinenea E.; Ortiz, A. *Mini Rev. Med. Chem.*, **2019**, *19*, 373-380.
5. Meadows, M. P. **1993**. *Bacillus thuringiensis* in the environment: ecology and risk assessment. En: Enwiwistle, P, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S (eds). *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: Theory and Practice*. Wiley, New York, N.Y. pp: 193-220.
6. Demain, A.L. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1999**, *52*, 455-463.
7. Yu, L.Y.; Hu, Z.F.; Ma, Z.J. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29*, 2087–2091.
8. Jeong, S.-Y.; Ishida, K.; Ito, Y.; Okada, S.; Murakami, M. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 8005–8007.
9. Yu, L.L.; Li, Z.Y.; Peng, C.S.; Li, Z.Y.; Guo, Y.W. *Helv. Chim. Acta* **2009**, *92*, 607–612
10. Zhang, F.; Mulati, N.; Wang, Y.; Li, Y.; Gong, S.; Karthik, L.; Sun, W.; Li, Z. *J. Biotechnol.* **2019**, *292*, 5–11.
11. Figueira, V. B. C.; Prabhakar, S.; Lobo, A. M. *ARKIVOC*, **2005**, *14*, 14-19.