

Potencial biotecnológico de microorganismos de hábitats marinos singulares

Biotechnological potential of microorganisms from unique marine habitats

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

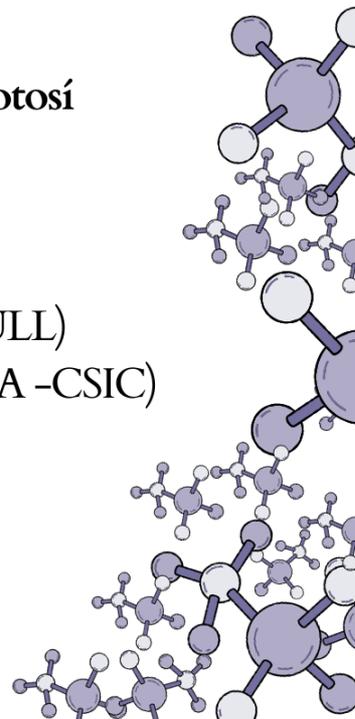
Máster en Biología Marina: Biodiversidad y Conservación

Elizabeth del Carmen Andrade Potosí

Tutor: Sara García Davis (IUBO-ULL)

Cotutor: Ana Raquel Díaz Marrero (IPNA -CSIC)

Enero 2024



Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15



La **Dra. Sara García Davis**, investigadora del Programa María Zambrano del Departamento de Química Orgánica, miembro del grupo de investigación de Productos Marinos del Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (IUBO-ULL) como Tutora Académica, y la **Dra. Ana Raquel Díaz Marrero**, Científica Titular del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC), como Tutora Externa,

DECLARAN:

Que la memoria presentada por **Elizabeth del Carmen Andrade Potosí**, titulada “**Potencial biotecnológico de microorganismos de hábitats marinos singulares**”, ha sido realizada bajo su dirección y consideran que reúne todas las condiciones de calidad y rigor científico requeridas para optar a su presentación como Trabajo de Fin de Máster en el Máster Oficial de Postgrado de Biología Marina: Biodiversidad y Conservación de la Universidad de la Laguna, curso 2021/2023.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente informe favorable en San Cristóbal de La Laguna a 16 de enero de 2024.

Fdo. Dra. Sara García Davis
Tutora Académica

Fdo. Dra. Ana Raquel Díaz Marrero
Tutora Externa

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

Agradecimiento

Quiero expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo:

A mis directoras de tesis, la Dra. Ana Raquel Díaz y la Dra. Sara García, gracias por su guía experta, tiempo, paciencia y apoyo constante a lo largo de este proceso. Sus conocimientos y dedicación han sido fundamentales para el éxito de este trabajo. Agradezco a mi profesor el Dr. José Javier Fernández, por su valioso conocimiento y orientación brindada durante el desarrollo de este trabajo. Quiero reconocer y agradecer la ayuda proporcionada por todo el personal de laboratorio, del grupo de investigación de Productos Marinos del Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González de la ULL, donde llevé a cabo la parte experimental de este trabajo.

A mi familia terrenal por su amor incondicional, apoyo emocional y comprensión en cada etapa de mi carrera académica, a mi familia espiritual que ya no me acompaña físicamente, pero que desde el lugar maravilloso donde se encuentran, me acompañan como las estrellas más brillantes del cielo. A mis mejores amigas, que a pesar de estar separadas por distintos husos horarios en tres continentes, han dedicado tiempo para acompañarme con risas y llantos.

Este logro no habría sido posible sin el respaldo de cada uno de ustedes. Gracias por ser parte fundamental de este capítulo importante en mi vida académica.

Finalmente, dedico este trabajo a aquellos valientes que enfrentan enfermedades mentales ocultas y diagnosticadas, que mantienen una batalla interna día tras día. Recordar que cada amanecer representa una victoria sobre nuestros propios miedos, una prueba fehaciente de que la luz puede surgir incluso en las noches más oscuras del alma. En este viaje llamado vida, se despliega un mapa peculiar marcado por desafíos internos, pero también por hitos personales alcanzados con esfuerzo y dedicación. Cada meta conquistada es un testimonio de la voluntad de enfrentar los pensamientos oscuros con una luz interna que nunca se apaga.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

Abreviaturas y Acrónimos

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ABTS^{•+}	Catión radical ABTS
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
AChEI	Inhibidor de la acetilcolinesterasa
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
BrK	Bromuro de potasio
CaCO₃	Carbonato de calcio
CCF	Cromatografía de capa fina
CHCl₃	Cloroformo
CoCl₂	Cloruro de cobalto
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNTB	Dinitrotiocianobenceno
Fe₂(SO₄)₃	Sulfato férrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
H₂O	Agua

i

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

H₂SO₄	Ácido sulfúrico
¹H-RMN	RMN de protón hidrógeno
IC₅₀	Concentración del extracto que inhibe el 50% del crecimiento celular
K₂S₂O₈	Persulfato de potasio
MeOH	Metanol
MeOH- d₄	Metanol deuterado
MS	Espectrometría de masas
OSMAC	One Strain-Many Compounds
PNM	Productos naturales marinos
QS	Quorum sensing
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
UV	Ultravioleta
UV-DAD	Detector Ultravioleta-Diode Array

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. Productos Naturales Marinos	3
1.1.1. Productos Naturales Marinos de Microorganismos	7
1.2. Bioprospección de Hábitats Singulares Marinos	8
1.3. Potencial Biotecnológico del Género <i>Halobacillus</i>	11
2. Objetivos	12
2.1. Generales	12
2.2. Específicos	12
3. Materiales y Métodos	13
3.1. Material Biológico	13
3.2. Preparación de Extractos	13
3.2.1. Medios de Cultivo	13
3.2.2. Cultivo	14
3.2.3. Extracción	15
3.3. Técnicas Cromatográficas	15
3.3.1. Cromatografía en Columna	15
3.3.1.1. Cromatografía de Filtración en Gel Sephadex LH-20	15
3.3.1.2. Cromatografía Media Presión	16
3.3.1.3. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia	17
	iii

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

3.3.2. Cromatografía en Capa Fina	18
3.3.3. Resonancia Magnética Nuclear	19
3.4. Ensayos de Actividad Biológica	19
3.4.1. Actividad Antiparasitaria	19
3.4.2. Actividad Antiproliferativa	20
3.4.3. Actividad Antioxidante	20
3.4.4. Actividad Inhibidora de Acetilcolinesterasa	21
4. Resultados y Discusión	22
4.1. Cultivo y Escalado de <i>Halobacillus</i> sp. AR14-06	22
4.2. Fraccionamiento Bioguiado	24
4.3. Evaluación del Potencial Biosintético de <i>Halobacillus</i> sp. AR14-06 en condiciones de cultivo oligotróficas	29
4.3.1. Evaluación de la Actividad Biológica	30
4.3.1.1. Actividad Antiproliferativa	30
4.3.1.2. Actividad Antioxidante e Inhibidora de Acetilcolinesterasa	31
4.4. Comparación de los Perfiles Químicos de los Extractos	32
4.4.1. Análisis del Perfil Cromatográfico por HPLC-UV-DAD	32
4.4.2. ¹ H-RMN	33
5. Conclusiones	36
6. Líneas Futuras de Investigación	38
7. Bibliografía	39

iv

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Zonación marino-costera y oceánica en función de la profundidad.	2
FIGURA 2. Representación gráfica temporal de descubrimiento de nuevos compuestos de origen marino.	4
FIGURA 3. (A). Bioprospección del Volcán Tagoro. (B). Distribución de géneros y clases de la colección de bacterias marinas aisladas del volcán Tagoro.	10
FIGURA 4. Material biológico. (A) Localización espacial de la Isla El Hierro y el volcán submarino Tagoro. (B) Muestras colectadas durante la expedición.	13
FIGURA 5. (A). <i>Halobacillus</i> sp AR14-06 criopreservada. (B). Cultivo de <i>Halobacillus</i> sp AR14-06 en medios A1/5 y A1.	14
FIGURA 6. Cromatografía de exclusión por tamaño en gel Sephadex-LH-20 (20 x 6 cm). (A). Columna acondicionada. (B). Preparación de extractos crudos. (C). Elución de la muestra 100% MeOH.	16
FIGURA 7. Sistema de cromatografía de media presión	16
FIGURA 8. Equipo de HPLC Agilent Technologies Serie 1200.	17
FIGURA 9. CCF observadas en luz $\lambda=254$ nm. (A). CCF fase normal CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O (4:6:1). (B). CCF en fase reversa H ₂ O:MeOH (6:4).	18
FIGURA 10. Equipo de RMN BRUKER® AVANCE 500 MHz.	19
FIGURA 11. Actividad antiproliferativa (IC ₅₀) del extracto A1.AR14-06 en $\mu\text{g/mL}$	23
FIGURA 12. Extractos A1.AR14-06B y A1.AR14-06M	23
FIGURA 13. Fraccionamiento bioguiado de la cepa <i>Halobacillus</i> sp AR14-06.	25
FIGURA 14. Cromatogramas a 254 nm de las fracciones A1.AR 14-06B.F3 y A1.AR 14-06 B.F4 a 10 mg/mL	27
FIGURA 15. Espectros de ¹ H-RMN de las fracciones A1.AR 14-06B.F3 y A1.AR 14-06B.F4.	27

v

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

FIGURA 16. Actividad antiproliferativa en IC ₅₀ (μg/mL) del extracto A1/5.AR14-06	30
FIGURA 17. Comparación del perfil cromatográfico a 254 nm de los extractos crudos de <i>Halobacillus</i> sp. AR14-06 a 10 mg/mL.	33
FIGURA 18. Espectros de ¹ H-RMN de los extractos crudos.	34

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. Medicamentos comercializados de origen marino	5
TABLA 2. Composición de medios A1 y A1/5	14
TABLA 3. Gradiente de elución (H ₂ O: ACN) en condiciones analíticas y semipreparativas	18
TABLA 4. Actividad antiproliferativa IC ₅₀ (µg/mL) de las fracciones de A1.AR 14-6B y A1.AR 14-6M frente a seis líneas celulares cancerígenas. Evaluadas a una concentración máxima de 250 µg/mL	25
TABLA 5. Inhibición de la actividad antioxidante de las fracciones activas A1.AR14-06B.F3 y A1.AR14-06B.F4	26
TABLA 6. Actividad antiproliferativa IC ₅₀ (µg/mL) de las fracciones de A1.AR 14-6B.F3 frente a seis líneas celulares cancerígenas. Evaluadas a una concentración máxima de 125 µg/mL	28
TABLA 7. Inhibición de la actividad antioxidante de las fracciones de A1.AR14-06BF4	28
TABLA 8. Actividad antiproliferativa IC ₅₀ (µg/mL) de extractos crudos frente a seis líneas celulares cancerígenas. Evaluadas a una concentración máxima de 250 µg/mL	30
TABLA 9. Comparación de la actividad antioxidante a 250 µg/mL y actividad de inhibición de acetilcolinesterasa a 50 µg/mL de los extractos crudos obtenidos del cultivo de <i>Halobacillus</i> sp.	31

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

Resumen

Los hábitats marinos singulares albergan una amplia diversidad de microorganismos con un potencial biotecnológico aún poco explorado, en el que las bacterias marinas suponen una extraordinaria fuente de compuestos bioactivos. En el presente trabajo se estudió la actividad biológica de extractos y fracciones de la cepa bacteriana *Halobacillus* sp. AR14-06, aislada de muestras ambientales de aguas profundas del volcán submarino Tagoro de la Isla de El Hierro. Mediante la implementación de técnicas microbiológicas se activó, inoculó e incubó la bacteria *Halobacillus* sp. AR14-06 en dos medios de cultivo bajo diferentes condiciones experimentales, obteniéndose cuatro extractos crudos, los cuales fueron cromatografiados y siguiendo un fraccionamiento bioguiado. Los resultados revelan que las fracciones del extracto de biomasa celular estudiadas presentan actividad antiproliferativa frente a seis líneas celulares y un potente efecto antioxidante, mientras que las fracciones del extracto de medio no mostraron actividad. Además, con el fin de explorar el potencial de la cepa *Halobacillus* sp. AR14-06, se evaluó la actividad biológica del extracto obtenido bajo condiciones oligotróficas, logrando mejorar la actividad antiproliferativa. Estos hallazgos proporcionan una base sólida para futuras investigaciones orientadas a la identificación y caracterización de los compuestos bioactivos con aplicaciones en salud humana, lo que destaca la importancia de conservar la riqueza química de estos ambientes marinos.

Palabras claves: Biotecnología, bioactividad, microorganismos marinos, productos naturales, *Halobacillus* sp.

Abstract

Unique marine habitats harbor a wide diversity of microorganisms with biotechnological potential that remains largely unexplored, with marine bacteria representing an extraordinary source of bioactive compounds. In this study, the biological activity of extracts and fractions from the bacterial strain *Halobacillus* sp. AR14-06, isolated from environmental samples of deep waters near the Tagoro submarine volcano off the coast of El Hierro Island, was investigated. By employing microbiological techniques, the strain *Halobacillus* sp. AR14-06 was activated, inoculated, and incubated in two different culture media under various experimental conditions, resulting in four crude extracts that were chromatographed and subjected to bio-guided fractionation. The results reveal that the studied fractions of the cellular biomass extract exhibit antiproliferative activity against six cell lines and a potent antioxidant effect, while fractions from the medium extract showed no activity. Additionally, to explore the potential of the strain *Halobacillus* sp. AR14-06, the biological activity of the extract obtained under oligotrophic conditions was evaluated, leading to an enhancement in antiproliferative activity. These findings represent an interesting starting point for future research focused on identifying and characterizing bioactive compounds with applications for human health, emphasizing the importance of preserving the chemical richness of marine environments.

Keywords: Biotechnology, bioactivity, marine microorganisms, natural products, *Halobacillus* sp.

1

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

1.Introducción

Una simple mirada sobre la superficie de nuestro planeta es suficiente para darnos cuenta de que los océanos ocupan gran parte de la superficie terrestre. Una observación más detallada nos revela que el océano, al no estar uniformemente distribuido sobre la tierra, estructura una diversidad de sistemas marinos ampliamente distribuidos dentro de la columna de agua (Prego, 1997; Guo et al.,2015; Altman, 2017; Jiménez, 2018). Los sistemas marinos están comprendidos desde la zona nerítica o aguas superficiales por encima de la plataforma continental hasta la zona abisopelágica conocida como océano profundo (FIGURA 1). Esta zonación está sujeta a la dinámica oceánica en función de la profundidad, por lo que presentan variaciones en los parámetros físico-químicos como la disminución gradual de la luz, oxígeno disuelto, presión, salinidad y temperatura, lo que constituye el entorno físico propicio para el desarrollo de formas de vida estructuradoras de hábitats (Lara et al., 2008; Hoshino et al., 2020; Rotter et al., 2021)

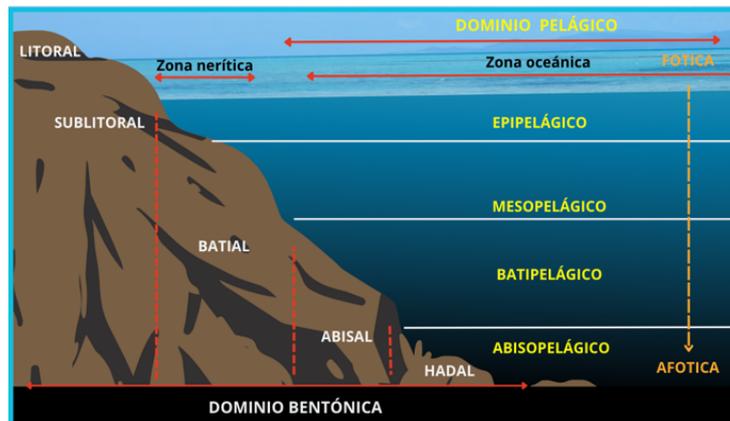


FIGURA 1. Zonación litoral costera y oceánica en función de la profundidad.

La distribución, asentamiento, desarrollo evolutivo y adaptativo de poblaciones marinas como el plancton, necton, peces pelágicos, demersales y bentónicos, así como macroinvertebrados sésiles (sin capacidad de movimiento) o con movimiento muy limitado, han permitido clasificar los hábitats marinos en litorales, fondos rocosos y arenosos, estuarios, bancos intermareales, lagunas costeras y neríticas, calas, bahías, arrecifes, praderas, estructuras submarinas originadas por la emisión de gases fríos, cuevas sumergidas o semisumergidas, termales

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

submarinas (fumarolas hidrotermales) asociadas a las grandes dorsales oceánicas, entre otros (Lara et al., 2008; Templado et al., 2012).

Dentro de estas comunidades marinas se establecen relaciones bióticas inter e intraespecíficas, formando ecosistemas mediados por la comunicación química y flujos de entrada y salida de materia y energía (Solbrig, 1991; Álvares y García, 1998; Lara et al., 2008; Darias et al., 2015). Se sabe que estas interacciones contribuyen a la producción de una gran diversidad de moléculas químicas denominadas metabolitos secundarios o productos naturales (Pérez et al., 2002; Darias et al., 2015). Estas sustancias son generadas por los organismos como respuesta al estrés ambiental y defensa para protegerse ante depredadores, evitar enfermedades, incrustaciones, competir por el espacio o paralizar a las presas (Pérez, 1993; Darias et al., 2015; Paul et al., 2011; Firsova et al., 2017).

1.1. Productos Naturales Marinos

Se estima que un individuo puede producir una gran cantidad de metabolitos secundarios, resultado de diversos mecanismos bioquímicos y fisiológicos que les permiten biosintetizar compuestos con una amplia variedad de estructuras químicas y propiedades bioactivas (Darias et al., 2015). Dada la vasta diversidad química que reside dentro de la diversidad biológica de especies marinas, en las últimas décadas ha despertado el interés en la exploración de los océanos en la búsqueda de nuevos productos naturales marinos (PNM) (Rotter et al, 2021).

El mundo marino ofrece un enorme tesoro para el descubrimiento de PNM, debido a la biodiversidad en gran parte inexplorada y a los hábitats únicos distintos de la tierra. Los compuestos bioactivos, como alcaloides, péptidos, terpenos, polisacáridos, quinonas, entre otros, son producidos por organismos ampliamente representados en los reinos monera, protista, fungi y animalia (Carroll et al., 2021) (FIGURA 2).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

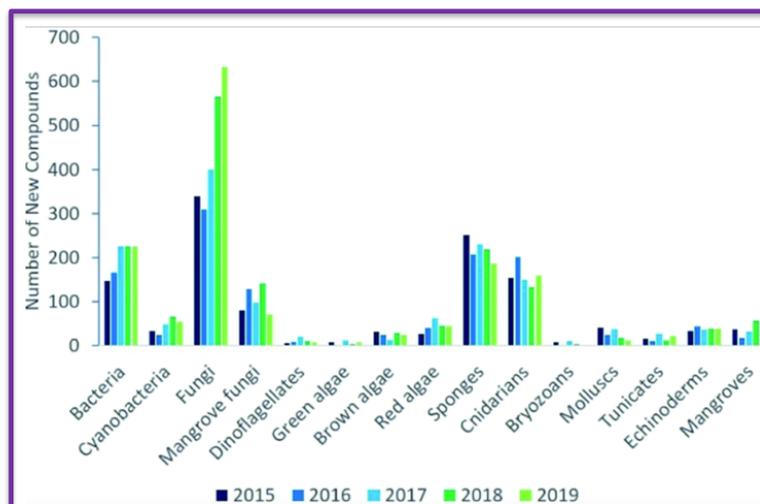


FIGURA 2. Representación gráfica temporal (2015-2019) del descubrimiento de nuevos compuestos de origen marino. (FUENTE: Carroll et al., 2021)

Avances tecnológicos dirigidos a la bioprospección de los océanos como el buceo científico, la biogeografía, oceanografía, ecología marina, así como, avances en taxonomía integrativa, técnicas cromatográficas, espectroscopia, ensayos de actividad biológica, síntesis, ingeniería genética, entre otros, han llevado a la identificación de una gran diversidad de estructuras químicas y mecanismos de acción únicos, útiles y de gran interés en el descubrimiento y desarrollo de fármacos (Zubia et al., 1997; Darias et al., 2015; Newman et al., 2016; Nowruzi et al., 2018; Barreca et al., 2020; Ghareeb et al., 2020; Shmuel, 2022; Mali, 2023).

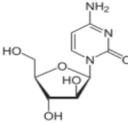
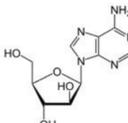
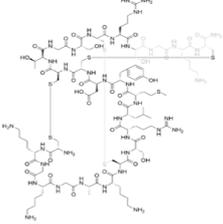
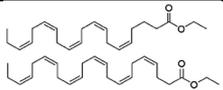
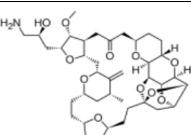
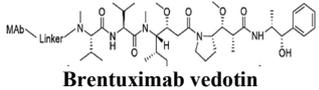
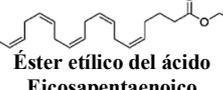
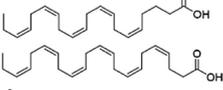
Hasta el momento, se han aislado más de 32000 PNM, muchos de ellos bioactivos, como antimicrobianos, anticancerígenos, antivirales, inmunosupresores, insecticidas, antiinflamatorios, inhibidores de proteinasas, antioxidantes, entre otros (Martins et al., 2014; Blunt et al., 2015; Alves et al., 2018; Matías, 2019; Ghareeb et al., 2020; Jiménez et al., 2020). Esto ha resultado en la aprobación de medicamentos de origen marino, además de muchos compuestos actualmente en estudios clínicos y preclínicos. Sin embargo, a pesar del éxito en el mercado farmacéutico, el descubrimiento y suministro de PNM ha sido un desafío dada su baja biodisponibilidad y complejidad estructural, ya que su obtención se basa principalmente en la extracción de fuentes naturales, o en procesos sintéticos complejos, asociados a altos costos, insostenibilidad y graves problemas ambientales (Papón et al., 2022).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
 Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

TABLA 1. Medicamentos comercializados de origen marino
(FUENTE: Marine Pharmacology, 2023)

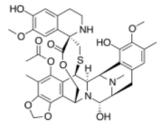
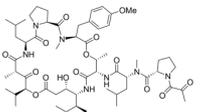
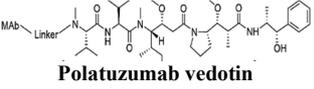
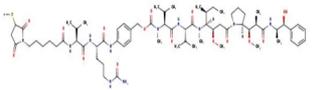
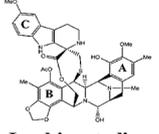
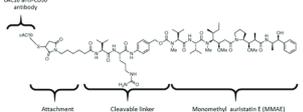
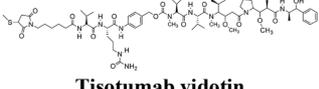
Organismo marino	Medicamento/ Año de aprobación	Estructura molecular/ Nombre del compuesto	Acción farmacológica
Esponja <i>Cryptotethya crypta</i>	Ara- C Cytosar-U® DepoCyt® (1969)	 Citarabina	Anticancerígeno
Esponja <i>Tethya cripta</i>	Vira-A® Ara -A® Arasena-A® (1976)	 Vidarabina	Antiviral
Molusco <i>Conus magus</i>	Prialt® (2004)	 Ziconotida	Dolor crónico intenso
Aceite de pescado	Lovaza® (2004)	 Ésteres etílicos del ácido ω-3	Tratamiento de la hipertrigliceridemia
Esponja <i>Halichondria okadai</i>	Halaven® (2010)	 Mesilato de eribulina	Anticancerígeno
Molusco <i>Dolabella auricularia</i> Cianobacteria <i>Symploca sp.</i>	Adcetris® (2011)	 Brentuximab vedotín	Anticancerígeno
Aceite de pescado	Vascepa® (2012)	 Éster etílico del ácido Eicosapentaenoico	Tratamiento de la hipertrigliceridemia
Aceite de pescado	Epanova® (2014) (descontinuado)	 Ésteres carboxílicos ω-3	Tratamiento de la hipertrigliceridemia

5

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

Tunicado <i>Ecteinascidia turbinata</i>	Yondelis® (2015)	 Trabectedina	Anticancerígeno
Tunicado <i>Aplidium albicans</i>	Aplidin® (2018)	 Plitidepsina	Anticancerígeno
Molusco <i>Dolabella auricularia</i> Cianobacterias	Polivy™ (2019)	 Polatuzumab vedotin	Anticancerígeno
Molusco <i>Dolabella auricularia</i>	PACDEV™ (2019)	 Enfortumab vedotin-ejfv	Anticancerígeno
Tunicado <i>Ecteinascidia turbinata</i>	Zepzelca™ (2020)	 Lurbinectedina	Anticancerígeno
Tunicados	Aidixi™ (2021)	 Disitamab vedotin	Anticancerígeno
Moluscos Cianobacterias	TIVDAK™ (2021)	 Tisotumab vedotin	Anticancerígeno

Actualmente, esfuerzos en investigación y desarrollo de diversas estrategias en biosíntesis, especialmente en la síntesis a gran escala de PNM complejos, han proporcionado material suficiente y evidencia química válida para la investigación de los PNM como modelos estructurales para la creación de análogos sintéticos (Valdés et al., 2010; Liang et al., 2019; Ghareeb et al., 2020; Papón et al., 2022).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

1.1.1. Productos naturales de microorganismos marinos

La historia evolutiva de los microorganismos marinos se remonta a más de 3500 millones de años. Desde entonces, los microorganismos, mediante sus propios metabolismos, constituyen un componente esencial en el estudio ecológico de las redes tróficas marinas, dada su participación en los ciclos biogeoquímicos, la regeneración de nutrientes, interacciones bióticas y abióticas, manteniendo el equilibrio y la dinámica en los ecosistemas y a la vida misma en el planeta. (López y Zaballos, 2005).

El estudio de los microorganismos marinos ha despertado gran interés, dada su capacidad de proliferar incluso en condiciones extremas como resultado de su adaptación, involucrando diversos mecanismos metabólicos enzimáticos de interés biotecnológico (Firsova et al., 2017). Resulta interesante comprender cómo estos microorganismos usan varios sustratos y rutas metabólicas para prosperar y sobrevivir. Se ha demostrado que los microorganismos marinos, sorprendentemente, son capaces de producir compuestos estructuralmente complejos (Elleuche et al., 2015, Velásquez et al., 2018; Schiraldi y De la Rosa, 2002). Desde principios del siglo XXI, la exploración de la biodiversidad microbiana marina (holobionte) ha sido impulsada por el desarrollo de la metagenómica y metabolómica (Shokralla et al., 2012; Seymour, 2019; Rotter et al., 2021), lo que ha permitido profundizar en el estudio del genoma bacteriano, así como de los compuestos químicos procedentes de muestras ambientales y del microbioma circundante (Margulis, 1997).

Los metabolismos microbianos son extremadamente versátiles y pueden degradar multitud de sustancias producidas de manera autóctona en el océano, así como sustancias producidas por los humanos como plásticos, petróleo, entre otros productos químicos (Gasol et al., 2022). En el caso de las bacterias marinas, éstas han mostrado una amplia capacidad metabólica para producir metabolitos secundarios química y biológicamente interesantes para el desarrollo y producción de nuevos compuestos con propiedades farmacológicas como antiparasitarias, antitumorales, antifúngicos, antioxidantes, inhibidoras del *quorum sensing* (QS), y biopolímeros y enzimas como amilasas, ADNasas, esterasas, proteasas, biopolímeros, entre otros (Ramírez et al., 2004; Delgado et al., 2012; Canales et al., 2014).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

La preocupación global ante actuales y futuras enfermedades ha motivado el estudio de los PNM en el biodescubrimiento de fármacos (Osinga et al., 2001; Rodríguez y Reul, 2010; Águila et al., 2011; Giddings y Newman, 2015; Littlechild, 2015; Coker, 2016). En este sentido, se estima que, para 2025, el mercado mundial de la biotecnología marina llegará a los 6400 millones de dólares, e incluirá una amplia gama de supuestos comerciales dentro de las industrias farmacéuticas (Gasol et al., 2022).

Desde el biodescubrimiento y comercialización de los primeros antibióticos producidos por la bacteria *Alteromonas* sp. (Barja et al., 1989) y el hongo *Cephalosporium* (Loder y Abraham, 1971), en los últimos años se ha incrementado sustancialmente la búsqueda de nuevos compuestos producidos por microorganismos de origen marino con propiedades terapéuticas, viendo reflejado su potencial en los diversos compuestos que se encuentran actualmente en ensayos clínicos farmacológicos (Williams, 2020). Específicamente, entre los compuestos que se encuentran actualmente comercializados (TABLA 1), y en ensayos clínicos fase tres destacan varios compuestos aislados de microorganismos, como la plinabulina (anticancerígeno), compuesto aislado del alga *Halimeda lacrimosa* simbiote del hongo *Aspergillus ustus* (Gutiérrez et al., 2014; Marine Pharmacology, 2023), o las salinosporamidas (anticancerígenos), aisladas de cultivos de *Salinospora* (Fenical y Jensen, 2006; Marine Pharmacology, 2023), entre otros. Este listado se estima que aumentará cada año, dado el interés biotecnológico del mercado farmacéutico global.

1.2. Bioprospección en hábitats marinos singulares

Los estudios de bioprospección y biodescubrimiento de los recursos marinos desde el punto de vista de búsqueda de nuevos compuestos químicos, se han centrado en la exploración de nuevos ecosistemas marinos. Entre ellos, hay que destacar los ambientes extremos: con temperaturas muy elevadas (55-121°C) o bajas (-2-20°C), alta salinidad (NaCl 2- 5M), alta alcalinidad (pH superior a 8) o alta acidez (pH inferior a 4) y presiones barométricas extremas. Los organismos que habitan en estas condiciones fisico-químicas extremas son denominados organismos extremófilos (Madigan y Marris, 1997; Rothschild y Manicynelli, 2001). Los microorganismos extremófilos han despertado el interés desde el punto de vista biotecnológico debido a la producción de biomoléculas, que presentan adaptaciones evolutivas para resistir a las agresivas condiciones de su entorno.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

Entre los ecosistemas marinos singulares, hábitats extremos como fumarolas de aguas profundas y volcanes submarinos constituyen ambientes únicos para estudios de bioprospección marina (Fraile-Nuez et al., 2012; Fraile-Nuez et al., 2016; García-Davis et al., 2021). Estos ambientes se caracterizan por sus importantes emisiones de gases y solutos que reaccionan con el agua de mar, provocando cambios físico-químicos que impactan al ecosistema (Farias et al., 2015). En este contexto, hay que destacar el estudio de bioprospección realizado por el grupo de investigación de Productos Marinos del IUBO en el entorno del volcán submarino Tagoro, localizado en el mar de Las Calmas, en la reserva marina de La Restinga en la Isla de El Hierro, Islas Canarias, que ha permitido estudiar la actividad antiproliferativa de una colección de extractos obtenidos por fermentación de bacterias marinas aisladas.

En este trabajo se aislaron microorganismos asociados tanto a muestras de rocas como de invertebrados de aguas profundas sobre el volcán submarino (FIGURA 3A). El estudio taxonómico de las bacterias aisladas dio como resultado una colección de 182 cepas, clasificadas en varios filos (FIGURA 3B), siendo el filo Proteobacteria el más abundante, representando un 70,2% entre todas las cepas aisladas, seguido de Firmicutes con un 19%, Actinobacteria con un 9.5% y Bacteroidetes con un 1.2%. En cuanto a los resultados de actividad antiproliferativa, los géneros *Halobacillus*, *Kangiella*, *Photobacterium* y *Halomonas*, presentaron valores de IC₅₀ más bajos, siendo el género *Halobacillus* el que mayor actividad antiproliferativa mostró sobre las líneas cancerígenas evaluadas.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

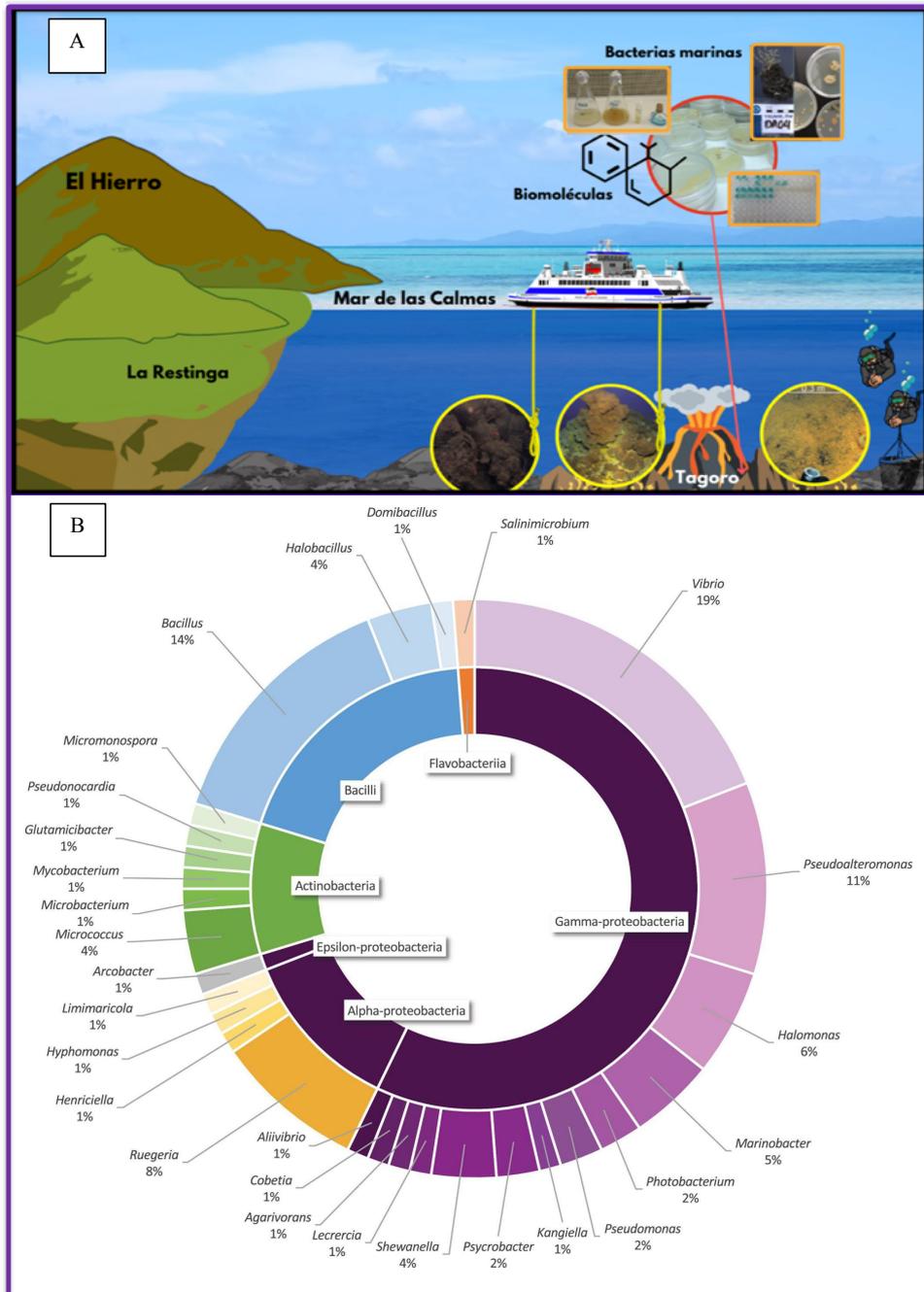


FIGURA 3. (A). Bioprospección del Volcán Tagoro. **(B).** Distribución de géneros y clases de la colección de bacterias marinas aisladas del volcán Tagoro (FUENTE: García-Davis et al., 2021).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

1.3. Potencial biotecnológico del género *Halobacillus*

Microorganismos del género *Halobacillus* han desarrollado adaptaciones fenotípicas y genotípicas que les permiten sobrevivir y prosperar en estas condiciones extremas (Madigan et al., 2003; Farias et al., 2015). Las bacterias marinas halófilas *Halobacillus* sp. están ampliamente distribuidas, y son consideradas bacterias altamente cultivables, dada su versatilidad y capacidad para formar endosporas resistentes, además de producir una variedad de compuestos con potencial biotecnológico (Gontang et al., 2007; Ettoumi et al., 2009; Al-Amoudi et al., 2016).

Entre los metabolitos secundarios aislados de bacterias del género *Halobacillus* se conocen compuestos como estabilizantes, en la elaboración de fermentos alimenticios (Margesin y Schinner, 2001), y como biosurfactantes, en la remediación de ambientes salinos contaminados con petróleo (Margesin y Schinner, 2001; Kheiralla et al., 2013). La industria farmacéutica también se ha visto beneficiada por diversos compuestos producidos por el género *Halobacillus*, como la feniletilamina, con actividad antibacteriana inhibidora del QS de patógenos bacterianos humanos como *Vibrio harveyi*, *Chromobacterium violaceum* y *Escherichia coli* (Teasdale et al., 2009). Otros ejemplos son las halolitorinas A, B y C, con actividad antifúngica sobre *Candida albicans* y *Tricophyton rubrum* (Yang et al., 2002).

Del estudio de bioprospección de bacterias marinas del volcán submarino Tagoro antes mencionado, destaca una cepa del género *Halobacillus* sp. por su actividad antiproliferativa frente a cinco de las seis líneas celulares cancerígenas evaluadas (García-Davis et al., 2021). Teniendo en consideración el potencial farmacológico del género *Halobacillus*, y con el objetivo de identificar compuestos bioactivos de microorganismos marinos de ambientes singulares, el presente trabajo se enfoca en el estudio de la actividad biológica de la cepa *Halobacillus* sp. AR14-06, aislada de muestras ambientales provenientes de aguas profundas sobre el volcán submarino Tagoro.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Teniendo en cuenta la importancia de los productos naturales marinos en el descubrimiento de nuevas sustancias bioactivas, unido al interés biotecnológico que poseen los microorganismos aislados de hábitats singulares, el objetivo principal de este trabajo se dirige al estudio de extractos obtenidos de la cepa *Halobacillus* sp. AR14-06, aislada de muestras ambientales provenientes de aguas profundas del volcán submarino Tagoro, como fuente de compuestos bioactivos con potencial biotecnológico.

2.2. Objetivos específicos

Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar la actividad antiproliferativa, antiparasitaria, antioxidante e inhibidora de acetilcolinesterasa de *Halobacillus* sp. AR14-06.
- Realizar el cultivo escalado de la cepa *Halobacillus* sp. AR14-06.
- Realizar el fraccionamiento bioguiado empleando técnicas cromatográficas para identificar las muestras con actividad biológica.
- Analizar la influencia del cultivo de *Halobacillus* sp. AR14-06 en condiciones oligotróficas en la actividad biológica y el contenido químico.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

3. Materiales y Métodos

3.1. Material Biológico

La cepa *Halobacillus* sp. AR14-06 (MW826704), perteneciente a la colección de microorganismos del IUBO-ULL, fue aislada de muestras ambientales provenientes de aguas profundas (-430 m) sobre el volcán submarino Tagoro (FIGURA 4), como parte de la campaña de investigación a bordo del crucero B/O Ángeles Alvariño, perteneciente al Instituto Español de Oceanografía en el marco del proyecto VULCANO- II (Fraile-Nuez et al, 2016; García-Davis et al., 2021).

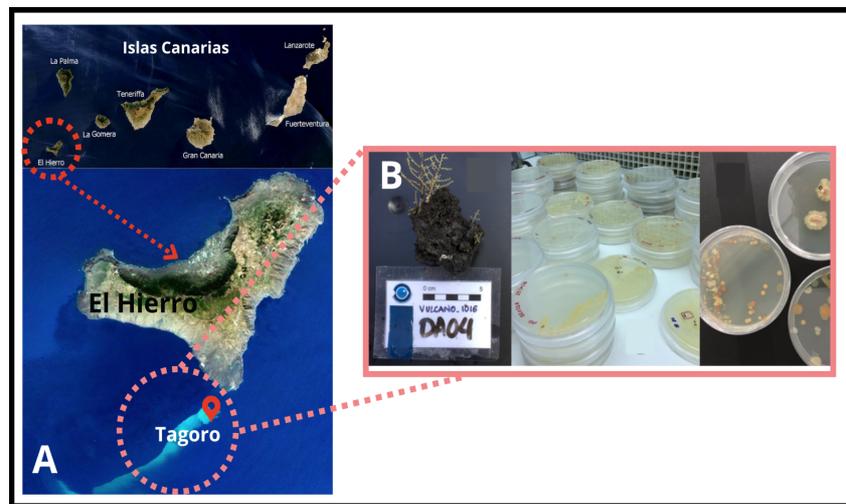


FIGURA 4. Material biológico. (A) Localización espacial de la Isla El Hierro y el volcán submarino Tagoro. (B) Muestras colectadas durante la expedición. (FUENTE: Fraile-Nuez et al., 2016)

3.2. Preparación de extractos

3.2.1. Medios de cultivo

Se prepararon tres medios de cultivo, dos medios de 300 mL uno un cultivo rico en nutrientes y otro pobre en nutrientes preparado a una relación de dilución 1:5 (A1/5), y un cultivo escalado en 4 L a base de agua de mar 75 % (A1) (TABLA 2).

TABLA 2. Composición de los medios A1 y A1/5

REACTIVOS	MEDIOS DE CULTIVO		
	A1	A1	A1/5
Agua de mar 75%	300 mL	4 L	300 mL
Almidón	3 g	40 g	0,6 g
Extracto de levadura	1.2 g	16 g	0.24 g
Proteosa peptona	0.6 g	8 g	0.12 g
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	0.3g	4 g	0,06 g
Bromuro de potasio (BrK) (67 mM)	1.5 mL	20 mL	0.3 mL
Sulfato férrico (Fe ₂ (SO ₄) ₃) (20 mM)	1.5 mL	20 mL	0.3 mL

3.2.2. Cultivo

La cepa *Halobacillus* sp. AR14-06 fue descongelada (FIGURA 5A) y activada en caldo marino (Marine Broth 2216, Panreac). El aislado bacteriano activo fue inoculado en condiciones de esterilidad en 300 mL de medio A1 y A1/5, en el caso de los cultivos a pequeña escala (FIGURA 5B), y en 4 L para el cultivo escalado en medio A1. Los cultivos se incubaron en condiciones de oscuridad con agitación constante, a 100 rpm en un agitador orbital (IKA KS501, Labortechnik) a 25°C, de 20 a 30 días de acuerdo a la metodología previamente descrita (García-Davis et al., 2021).

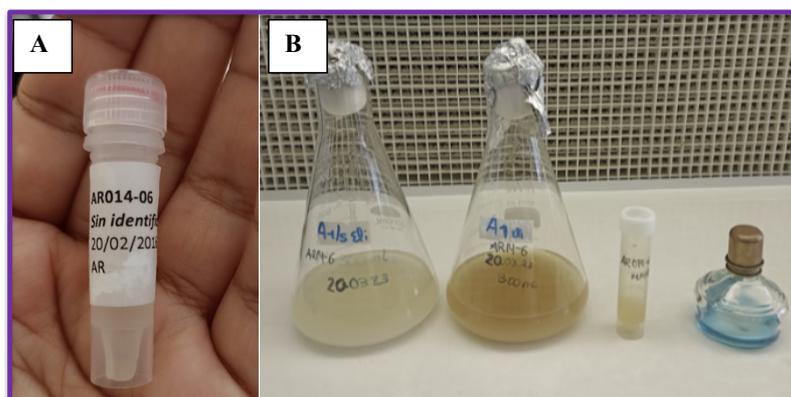


FIGURA 5. (A). *Halobacillus* sp AR14-06 criopreservada. (B). Cultivo de *Halobacillus* sp AR14-06 en medios A1/5 y A1.

3.2.3 Extracción

Se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo (AcOEt). El proceso de extracción de los cultivos a pequeña escala, A1.AR14-06 y A1/5.AR14-06, se repitió tres veces (3 x 100 mL AcOEt) por separado, el volumen total de las fases orgánicas se concentró en rotavapor.

Por otra parte, para la extracción del cultivo escalado, éste se centrifugó a 8000 rpm durante 8 minutos. Se separó el sobrenadante de las células por centrifugación y se trataron medio y células por separado: el sobrenadante (A1.AR14-06M) se extrajo utilizando AcOEt, mientras que las células (A1.AR14-06B) se extrajeron con metanol (MeOH). Finalmente, los dos extractos, A1.AR14-06B y A1.AR14-06M, se evaporaron y se concentraron en rotavapor para su posterior estudio cromatográfico.

3.3. Técnicas cromatográficas

3.3.1. Cromatografía en columna

3.3.1.1. Cromatografía de filtración en gel Sephadex LH-20

Los extractos de biomasa, A1.AR14-06B (1.70 g), y medio, A1.AR14-06M (810 mg), fueron fraccionados usando una columna de exclusión por tamaño con gel Sephadex LH-20 (20 x 6 cm) (FIGURA 6). La columna fue previamente lavada y acondicionada con MeOH 100% (Figura 6A). Los extractos fueron disueltos en MeOH y filtrados usando filtros Chromafil Xtra PTFE-45/25 de 0.45 µm (FIGURA 6B). Los extractos fueron concentrados a 5 mL e inyectados en la columna con la ayuda de una pipeta pasteur y eluidos con MeOH 100% (FIGURA 6C). Las fracciones se colectaron en tubos de ensayo y fueron combinadas en función de su perfil cromatográfico, monitorizado por cromatografía en capa fina (sección 3.3.2).

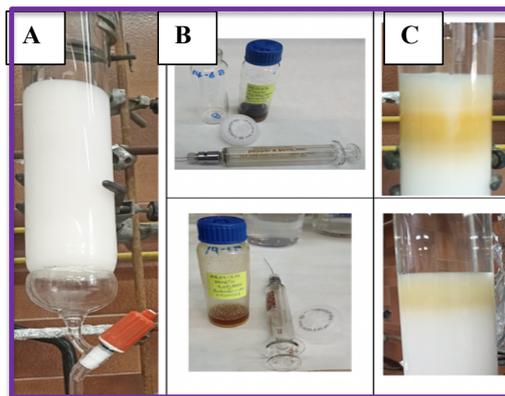


FIGURA 6. Cromatografía de exclusión por tamaño en gel Sephadex-LH-20 (20 x 6 cm). (A). Columna acondicionada. (B). Preparación de extractos crudos. (C). Elución de la muestra en MeOH 100%.

3.3.1.2. Cromatografía de media presión

La fracción A1.AR14-06 F3B (165 mg), fue fraccionada usando un sistema conformado por una bomba de media presión FLUID METERING®, un inyector acoplado a una columna sellada y preempaquetada Lobar® LiChroprep® RP-18 (40-63 μm), un detector ($\lambda=254\text{ nm}$) y un colector de fracciones (FIGURA 7). Previamente, la columna fue lavada con MeOH 100% y acondicionada con H₂O:MeOH (6:4). La misma mezcla de disolventes fue usada para disolver y filtrar la muestra. Una vez preparada la muestra se inyectó en la columna en un volumen de 200 μL usando una jeringa Hamilton y fue eluida igualmente con H₂O: MeOH (6:4) a un flujo de 1 mL/min. Se realizaron dos cromatografías, para lo cual se calculó el volumen muerto de inyección.



FIGURA 7. Sistema de cromatografía de media presión

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

3.3.1.3. Cromatografía líquida de alta eficacia

La cromatografía líquida de alta eficacia se realizó con un sistema HPLC Agilent Technologies Serie 1200 equipado con una bomba cuaternaria (G1311C), un automuestreador, un colector de fracciones automático (G1364C) y un detector UV DAD (190- 900 nm) (FIGURA 8).



FIGURA 8. Equipo de HPLC Agilent Technologies Serie 1200.

Extractos crudos y fracciones fueron disueltos en MeOH 100%, filtrados dos veces usando filtros de 0.45 μm y 0.22 μm . De igual manera, se ajustó el volumen de inyección de las muestras tanto para la obtención de perfiles en columna analítica (A1.AR14-06, A1/5.AR14-06, A1.AR14-06B, A1.AR14-06M, A1.AR14-06B.F3, y A1.AR14-06B.F4) como para el fraccionamiento en columna semipreparativa (A1.AR14-06B.F4). En la TABLA 3, se detallan las condiciones del método utilizado. Los disolventes utilizados son grado HPLC y antes de su uso deben ser filtrados y sonicados para evitar la presencia de burbujas de aire y partículas en suspensión. La botella que contiene el agua debe ser cubierta de la luz, preferiblemente usar botellas ámbar.

Los extractos y las fracciones se disolvieron en MeOH a una concentración de 10 mg/mL y se filtraron usando primero un filtro Gilson PTFE, 13 mm de 0.45 μm , y después por un filtro Gilson PTFE, 13 mm, 0.22 μm . Para realizar el análisis del perfil químico de las muestras se utilizó una columna analítica Luna C18 100Å (250 x 4.6 mm, 5 μm) con un volumen de inyección de 20 μL y un flujo de 1 mL/min. Para el fraccionamiento de las muestras se usó una columna semipreparativa Luna C18 100 Å (250 x 10 mm, 5 μm) con un volumen de inyección

17

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

de 200 μL y un flujo de 2.5 mL/min. Se utilizó un gradiente de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ de 95:5 a ACN 100% en 5 minutos, y se mantuvo en condiciones isocráticas durante 15 minutos con ACN 100%. Se usó las mismas condiciones y método para los perfiles analíticos (TABLA 3).

TABLA 3. Gradiente de elución ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$) en condiciones analíticas y semipreparativas

Tiempo (min)	A (% H_2O)	B (%ACN)
0	95	5
5	0	100
20	0	100

3.3.2. Cromatografía en capa fina

Las fracciones obtenidas de los diferentes procesos cromatográficos fueron analizadas por cromatografía en capa fina (CCF). Se utilizó la mezcla de elución $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:6:1) para cromatografía en fase normal (TLC - Merck®, gel de sílice 60 F254) (FIGURA 9A), mientras que para la fase reversa (TLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S), se utilizó la mezcla de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (6:4) (FIGURA 9B).

Las capas finas se visualizaron usando una lámpara UV $\lambda=254$ nm, y se revelaron con cloruro de cobalto 2% (CoCl_2) en ácido sulfúrico (H_2SO_4) 10%. Con esta técnica cromatográfica se logró reunir las fracciones de cada fraccionamiento, según el patrón observado.

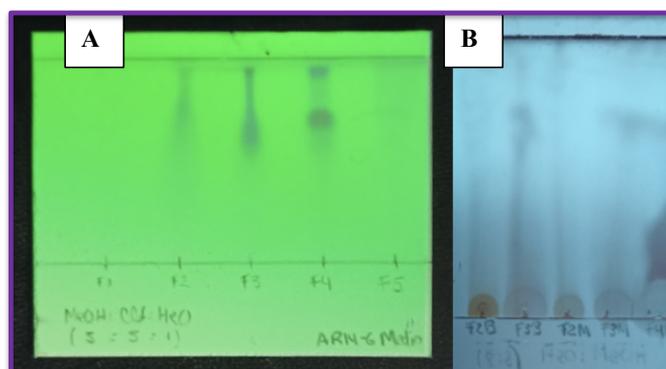


FIGURA 9. CCF observadas en luz $\lambda=254$ nm. (A). CCF fase normal $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (4:6:1). (B). CCF fase reversa $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (6:4).

3.3.3. Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El análisis del contenido químico de las muestras se analizó mediante ^1H -RMN. Se utilizó un equipo BRUKER® AVANCE 500 MHz (FIGURA 10). Las muestras se disolvieron en metanol deuterado ($\text{MeOH-}d_4$), y en tubos de RMN de 5 mm. Los experimentos de ^1H -RMN se referencian a la señal interna del disolvente deuterado y se expresan en ppm. Los experimentos fueron procesados y analizados con el software MestreNova (V.10).



FIGURA 10. Equipo de RMN BRUKER® AVANCE 500 MHz.

3.4. Ensayos de actividad biológica

3.4.1. Actividad antiparasitaria

Los ensayos de actividad antiparasitaria se llevaron a cabo en colaboración con el grupo de investigación en parasitología del Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias (IUETSPC) de la ULL. Se evaluó el efecto de los extractos A1.AR14-06B y A1.AR14-06M, frente a las amebas de vida libre *Acanthamoeba castellanii* y *Naegleria fowleri*, y frente a los kinetoplastos *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* y *Leishmania donovani*, con un tiempo incubación de 72 horas, a una concentración máxima de 200 $\mu\text{g/mL}$, en DMSO. La actividad antiparasitaria se expresa como inhibición del crecimiento del 50% (IC_{50}) (Bethencourt-Estrella et al., 2021; Rodríguez-Exposito et al., 2021).

3.4.2. Actividad antiproliferativa

Los ensayos de actividad antiproliferativa se realizaron en colaboración con el grupo de investigación BioLab del Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (IUBO-AG) de la ULL. Las muestras fueron disueltas en DMSO a una concentración de 125 y 250 µg/mL y fueron ensayadas frente a seis líneas celulares cancerígenas: A549 y SW 1573 de cáncer de pulmón, HBL-100 y T-47D de cáncer de mama, HeLa de cáncer de cuello uterino y WiDr de cáncer de colon, con un tiempo de incubación de 48 h (Monks et al., 1991; Lacret et al., 2022). La actividad antiproliferativa se expresa como inhibición del crecimiento del 50% (IC₅₀).

3.4.3. Actividad Antioxidante

La actividad antioxidante frente a ABTS (2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico]-sal de diamonio) se determinó utilizando un método modificado descrito originalmente por Re et al. (1999). Inicialmente, se preparó una mezcla acuosa de ABTS (7 mM) y persulfato de potasio (K₂S₂O₈) (2.5 mM), la solución se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 16 h. Posteriormente, esta solución se ajustó con MeOH a una absorbancia de 0.7± 0.02 a 734 nm (Payet et al., 2005; Damasceno et al., 2015).

Las muestras fueron diluidas en DMSO a una concentración final de 25 mg/mL. En una microplaca de 96 pocillos se colocó 200 µL de ABTS y 2 µL de muestra, se incubó durante 5 min en oscuridad, y se midió la absorbancia a 734 nm utilizando el lector de absorbancia de microplacas (Varioskan LUX Thermo Fisher Scientific).

La solución madre se preparó en el momento y todos los análisis se realizaron por triplicado. Como controles negativos se usó ABTS y DMSO, y como control positivo se usó hidroxitolueno (BHT) en DMSO (Nocchi et al., 2020). Los resultados obtenidos son expresados como el porcentaje de inhibición a 250 µg/ml.

El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente ecuación (Payet et al., 2005):

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - 100 (A_S \div A_0)$$

Donde: A_0 es la absorbancia del blanco y A_s es la absorbancia de la muestra a 734 nm. Los compuestos con capacidad antioxidante reaccionan directamente disminuyendo el color del catión radical ABTS, de azul claro a amarillo.

3.4.4. Actividad Inhibidora de Acetilcolinesterasa

Los ensayos de inhibición de acetilcolinesterasa se realizaron mediante el método Ellman, el cual se basa en detectar la presencia de tiocolina tras la hidrólisis del sustrato de acetiltiocolina (ATCh) por la enzima acetilcolinesterasa (Ellman et al., 1961). Las muestras fueron disueltas en DMSO a una concentración de 25 mg/mL.

Preparación de soluciones: Se preparó el reactivo DTNB una concentración 3 mM en tampón fosfato 0.1 mM, pH 8.0. La solución de disolución de yodato de acetilcolina 75 mM se preparó con agua destilada, adicionalmente la mezcla de reacción enzimática (MIX) se preparó con 2.5 μ L de la enzima 1000 mU, 5 μ L de DNTB y 237.5 μ L de tampón fosfato.

En una microplaca de 96 pocillos se agregan por triplicado: dos blancos, el primero sin enzima (B1) y el segundo sin acetilcolina (B2), un control con enzima, un vehículo (DMSO) y la muestra. Para ello, se añaden 0.5 μ L de cada una de las muestras, más 245 μ L de la solución de MIX, y se incubó en oscuridad durante 30 minutos con agitación. Por último, se agrega 5 μ L de yoduro de acetiltiocolina en cada pocillo y se lee la absorbancia a 412 nm durante 10 min con intervalos de lectura de 1 min. Se utilizó un lector de placas Varioskan LUX Thermo Fisher Scientific.

La actividad inhibidora de acetilcolinesterasa se expresa en porcentaje de inhibición siguiendo el cálculo de la pendiente representado como la velocidad de reacción de cada una de las muestras ensayadas en valores de absorbancia por cada intervalo. A todos los valores de pendiente se restó el valor de la pendiente del blanco sin enzima. Para hallar el porcentaje de inhibición primero se calcula el porcentaje de actividad de la acetilcolinesterasa con las siguientes fórmulas:

$$\%Actividad = \frac{\text{valor pendiente muestra}}{\text{valor pendiente vehículo}} \times 100$$

$$\% Inhibición = 100 - \% Actividad$$

21

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

Una vez calculado el porcentaje de inhibición para cada réplica se hace un promedio para cada una de las muestras.

4. Resultados y Discusión

En 2021, García-Davis y colaboradores realizaron un estudio de bioprospección antiproliferativa de bacterias marinas aisladas de muestras ambientales extraídas a más de 400 m de profundidad sobre el volcán submarino Tagoro. De este *screening*, se aisló la cepa *Halobacillus* sp. AR14-06, mostrando propiedades antiproliferativas con valores de $IC_{50} < 11 \mu\text{g/mL}$ en cinco de las seis líneas celulares evaluadas: SW1573 (1.7 $\mu\text{g/mL}$), A549 (3.3 $\mu\text{g/mL}$), HeLa (6.0 $\mu\text{g/mL}$), T-47D (7.7 $\mu\text{g/mL}$) y WiDr (11.0 $\mu\text{g/mL}$) (García-Davis et al, 2021).

4.1. Cultivo y escalado de *Halobacillus* sp. AR14-06

Diversos estudios señalan que el uso de un medio rico en nutrientes, suplementado con sales y condicionado en un máximo de 75% agua de mar estimula el crecimiento bacteriano y la producción de metabolitos (Barry y Wainright, 1997; Cruz López, 2015; Cartuche et al., 2015; Cartuche et al., 2019; Cartuche, 2020). Además, en el caso de bacterias gram positivas del género *Halobacillus* se ha observado que medios con ausencia de sales y disueltos en agua destilada presentan crecimiento deficiente, y ausencia o baja cantidad de metabolitos exudados (Yoon et al., 2003; Yoon et al., 2004; Liu et al., 2005; Gontang et al., 2007; Romano et al., 2008). En base a estos estudios, el objetivo del presente trabajo consistió en explorar el potencial biotecnológico de la cepa *Halobacillus* sp. AR14-06 cultivada en medio A1, el cual contiene fuentes complejas de nitrógeno como extracto de levadura y peptona, fuentes de carbono como almidón soluble, y suplementos como sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) y bromuro potásico (BrK) disueltos en agua de mar al 75%.

A partir del cultivo de *Halobacillus* sp. AR14-06 a pequeña escala (300 mL) en medio A1, se obtuvo el extracto orgánico A1.AR14-06 y se evaluó su actividad antiproliferativa, antioxidante e inhibidora de AChE. Sin embargo, a 250 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo 18.3% de inhibición del radical ABTS, y a 50 $\mu\text{g/mL}$ de concentración inhibió 7.7% la actividad de AChE.

En cuanto a la actividad antiproliferativa, el extracto A1.AR14-06 mostró valores de IC_{50} inferiores a 200 $\mu\text{g/mL}$ en todas las líneas cancerígenas evaluadas, destacando valores de

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

IC₅₀<110 µg/mL en cuatro de ellas: HBL-100 (82.0 µg/mL), HeLa (97.0 µg/mL), A549 (108.0 µg/mL) y SW1573 (110.0 µg/mL). Estos resultados exhiben el potencial antiproliferativo de *Halobacillus* sp. AR14-06 (FIGURA 11).

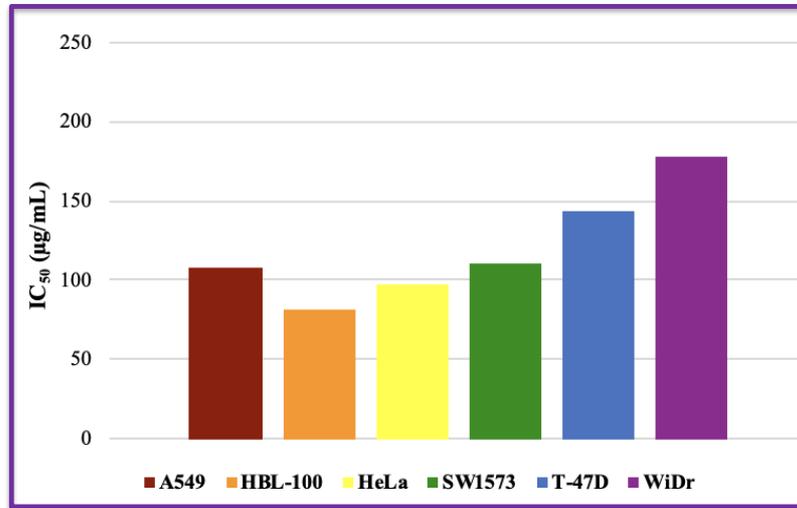


FIGURA 11. Actividad antiproliferativa (IC₅₀) del extracto A1.AR14-06 en µg/mL

Con la finalidad de optimizar las condiciones de crecimiento, incrementar la cantidad de biomasa y caracterizar las entidades químicas responsables de la actividad biológica (Pinzón-Espinosa, 2012; Latorre, 2007), se procedió a escalar el cultivo de *Halobacillus* sp. en 4 L de medio A1, y se extrajo por separado biomasa celular [A1.AR14-06B (1.7 g)] y medio de cultivo [A1.AR14-06M (810.0 mg)] (FIGURA 12).



FIGURA 12. Extractos A1.AR14-06B y A1.AR14-06M

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

4.2. Fraccionamiento bioguiado

La detección de la actividad biológica de extractos o compuestos puros es un paso importante para determinar su potencial biotecnológico (Rotter et al., 2020; Rotter et al., 2021). Dado que los extractos crudos contienen una mezcla compleja de compuestos, con el fin de identificar aquellos con actividad biológica, se llevaron a cabo una serie de etapas cromatográficas guiadas por su bioactividad (Ebada et al., 2008; White et al., 2019). Por ello, se evaluó la actividad antiproliferativa, antioxidante, inhibidora de AChE y antiparasitaria de los extractos A1.AR14-06B y A1.AR14-06M.

En los ensayos de actividad antiproliferativa y antiparasitaria, ambos extractos mostraron concentraciones inhibitorias medias mayores a 200 µg/mL. Mientras que, en el ensayo de actividad antioxidante, el extracto A1.AR14-06B presentó 27.2% de inhibición de ABTS⁺ a 250 µg/mL, siendo significativamente más activo que A1.AR14-06M (2.0%). En cuanto a la inhibición de AChE, ambos extractos mostraron alrededor de 30% de inhibición a 50 µg/mL. Estos resultados difieren de los del extracto obtenido del cultivo a pequeña escala, lo que podría deberse al proceso de extracción o a la interferencia de los componentes de un medio de cultivo enriquecido como el medio A1 (Ebada et al., 2008; Rizwan et al., 2018; Rotter et al., 2021).

Inicialmente, los extractos A1.AR14-06B (1.7 g) y A1.AR14-06M (810.0 mg) se fraccionaron en una columna de exclusión molecular Sephadex-LH-20 con MeOH 100%. Las fracciones resultantes fueron agrupadas mediante la observación por CCF. Del extracto A1.AR14-06B se obtuvieron cuatro fracciones: A1.AR14-06B.F1 (2.4 mg), A1.AR14-06B.F2 (1 g), A1.AR14-06B.F3 (165.0 mg) y A1.AR14-06B.F4 (16.0 mg). Del extracto procedente del medio de cultivo A1.AR14-06M, se obtuvieron cinco fracciones: A1.AR14-06B.M.F1 (5.8 mg), A1.AR14-06B.M.F2 (201.2 mg), A1.AR14-06B.M.F3 (33.4 mg), A1.AR14-06B.M4 (81.7 mg) y A1.AR14-06B.M5 (23.5 mg). De las fracciones obtenidas se evaluó la actividad antiproliferativa y antioxidante (FIGURA 13).

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

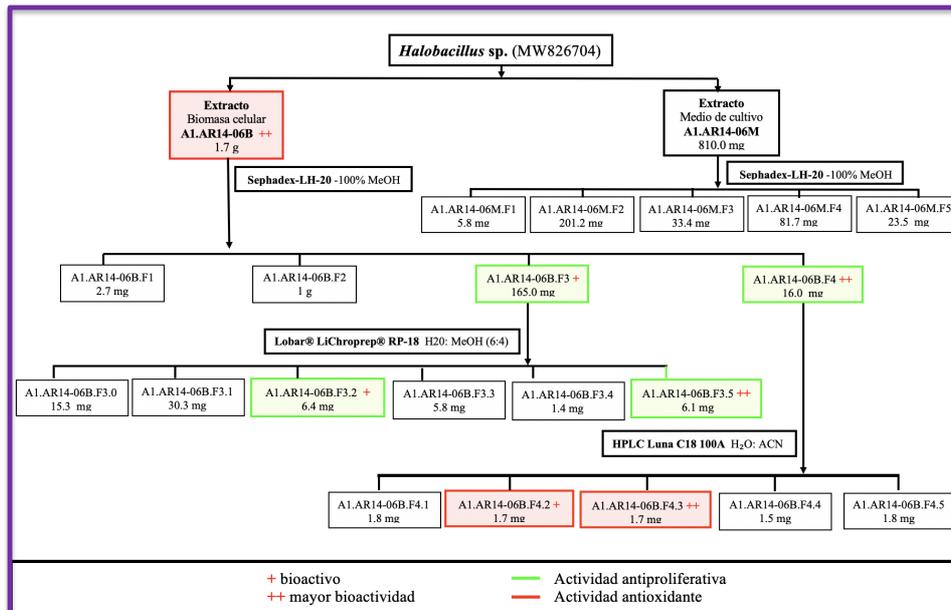


FIGURA 13. Fraccionamiento bioguiado de la cepa *Halobacillus* sp AR14-06.

Las fracciones del extracto de medio (A1.AR14-06M) no revelaron actividad antiproliferativa a la concentración máxima ensayada, sin embargo, resultaron activas las fracciones pertenecientes al extracto de biomasa celular: A1.AR14-06B.F3 y A1.AR14-06B.F4. La fracción A1.AR14-06B.F4 fue la más activa, presentando valores de IC₅₀ comprendidos entre 30-70 µg/mL sobre las seis líneas celulares evaluadas. La fracción A1.AR14-06B.F3 presentó valores de IC₅₀ entre 35-116 µg/mL sobre las seis líneas celulares evaluadas (TABLA 4).

TABLA 4. Actividad antiproliferativa IC₅₀ (µg/mL) de las fracciones de A1.AR 14-6B y A1.AR 14-6M frente a seis líneas celulares cancerígenas. Evaluadas a una concentración máxima de 250 µg/mL

Muestras	IC ₅₀ (µg/mL)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
A1.AR14-6B. F1	>250	>250	>250	>250	>250	>250
A1.AR14-6B. F2	>250	>250	>250	>250	>250	>250
A1.AR14-6B. F3	92	108	84	35	116	69
A1.AR14-6B. F4	52	55	59	69	43	30
A1.AR14-6M. F1	>250	>250	>250	>250	>250	>250
A1.AR14-6M. F2	>250	>250	>250	>250	>250	>250
A1.AR14-6M. F3	>250	>250	>250	>250	>250	>250
A1.AR14-6M. F4	>250	>250	>250	>250	>250	>250
A1.AR14-6M. F5	>250	>250	>250	>250	>250	>250

De la misma manera, según ¹H-RMN se eligieron las fracciones A1.AR14-06B.F3 y A1.AR14-06B.F4, para evaluar su actividad antioxidante. De las dos fracciones evaluadas, se observa que la fracción A1.AR14-06B.F4 exhibe el porcentaje más alto de inhibición de ABTS⁺, alcanzando un 69.5%, mientras que la fracción A1.AR14-06B.F3 registra un 19.7% de inhibición a X µg/mL (TABLA 5).

TABLA 5. Actividad antioxidante de las fracciones activas A1.AR14-06B.F3 y A1.AR14-06B.F4

Muestras	% Inhibición ABTS ⁺
A1.AR14-06B. F3	19.7 ± 0.06%
A1.AR14-06B. F4	69.5 ± 0.01%

Con el objetivo de complementar el fraccionamiento bioguiado, se analizaron los perfiles cromatográficos por HPLC-UV/DAD, a 254 nm, de las dos fracciones activas (A1.AR14-06B.F3 y A1.AR14-06B.F4) a una concentración 10 mg/mL. Ambos perfiles cromatográficos se obtuvieron en idénticas condiciones experimentales, empleando un gradiente de elusión de H₂O:ACN 95:5 a ACN 100%, con un volumen de inyección de 20 µL y un flujo de 1 mL/min en una columna analítica.

Los perfiles cromatográficos muestran ligeras diferencias en los tiempos de retención, y en el número e intensidad de las señales (FIGURA 14). El cromatograma de la fracción A1.AR14-06B.F3 muestra una fracción compleja con cinco picos mayoritarios claramente identificables, observándose un pico con mayor intensidad con un tiempo de retención de 5.8 min. Mientras que el cromatograma de la fracción A1.AR14-06B.F4 se observa un pico mayoritario con un tiempo de retención de 6.2 min.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

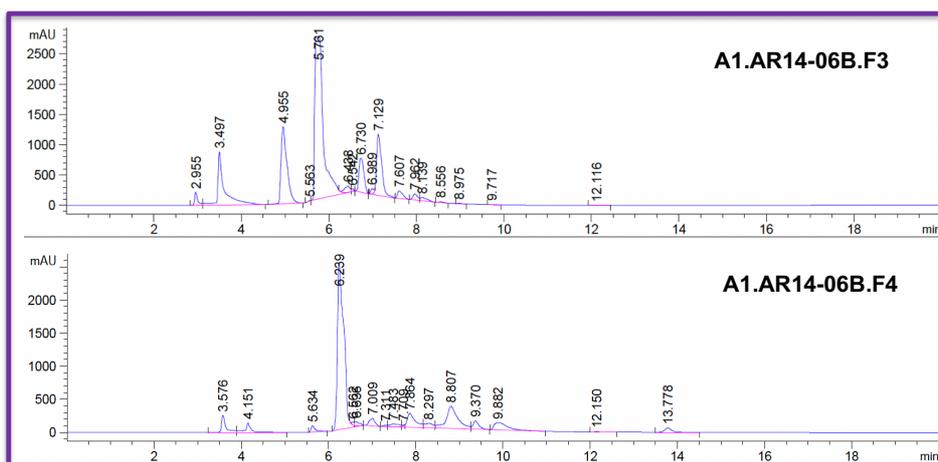


FIGURA 14. Cromatogramas a $\lambda=254$ nm de las fracciones A1.AR 14-06B.F3 y A1.AR 14-06 B.F4 a 10 mg/mL.

Por otra parte, las fracciones A1.AR14-06B.F3 y A1.AR14-06B.F4, disueltas en MeOH- d_4 , fueron analizadas por espectroscopía de ^1H -RMN mostrando diferencias entre ellas, principalmente a campos altos, en la región comprendida entre 1 y 5 ppm (FIGURA 15).

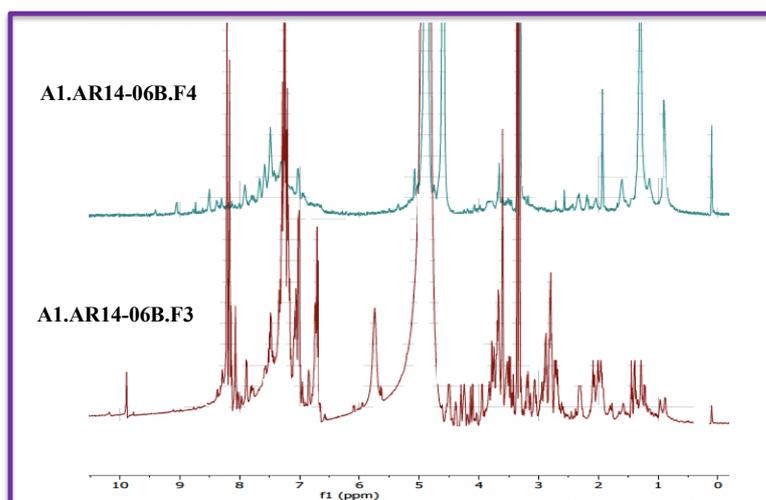


FIGURA 15. Espectros de ^1H -RMN de las fracciones A1.AR 14-06B.F3 y A1.AR 14-06B.F4.

Las fracciones A1.AR14-06B.F3 y A1.AR14-06B.F4 muestran diferente actividad antiproliferativa y antioxidante, así como diferente perfil por HPLC-UV/DAD y ^1H -RMN.

En base a los resultados de actividad antiproliferativa, la fracción A1.AR14-06B.F3 (165 mg) fue cromatografiada en una columna de media presión usando fase reversa C18 como fase estacionaria. Como resultado se obtuvieron seis fracciones: A1.AR14-06B.F3.0 (15.3 mg), A1.AR14-06B.F3.1 (30.3 mg), A1.AR14-06B.F3.2 (6.4 mg), A1.AR14-06B.F3.3 (5.8 mg), A1.AR14-06B.F3.4 (1.4 mg) y A1.AR14-06B.F3.5 (6.1 mg). Las fracciones fueron evaluadas para determinar su actividad antiproliferativa, destacando la fracción A1.AR14-06B.F3.5, con valores de IC₅₀ < 74 µg/mL sobre cinco de las seis líneas celulares ensayadas (TABLA 6).

TABLA 6. Actividad antiproliferativa IC₅₀ (µg/mL) de las fracciones de A1.AR 14-6B.F3 frente a seis líneas celulares cancerígenas. Evaluadas a una concentración máxima de 125 µg/mL

Muestras	IC ₅₀ (µg/mL)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
A1.AR 14-6B.F3.0	>125	>125	>125	>125	>125	>125
A1.AR14-6B.F3.1	>125	>125	>125	>125	>125	>125
A1.AR14-6B.F3.2	83	56	>125	>125	>125	>125
A1.AR14-6B.F3.3	>125	>125	>125	>125	>125	>125
A1.AR14-6B.F3.5	25	27	33	52	>125	74

Teniendo en cuenta la actividad antiproliferativa y antioxidante de la fracción A1.AR14-06B.F4 (16 mg), se abordó su fraccionamiento por HPLC fase reversa, usando una columna semipreparativa con un volumen de inyección de 200 µL, a un flujo de 2.5 mL/min, siguiendo un gradiente de elución de H₂O: ACN de 95:5 a ACN 100% en condiciones isocrática durante 20 minutos. Se obtuvieron cinco fracciones: AR14-06B.F4.1 (1.8 mg), AR14-06B.F4.2 (1.7 mg), AR14-06B.F4.3 (1.7 mg), AR14-06B.F4.4 (1.5 mg) y AR14-06B.F4.5 (1.8 mg), y se evaluó su actividad antioxidante (TABLA 7). Las fracciones A1.AR14-06B.F4.2 y A1.AR14-06B.F4.3 presentaron los mayores porcentajes de inhibición de ABTS⁺, con valores de 85.0% y 86.4% respectivamente, a 250 µg/mL. Con el fin de identificar los compuestos activos, estas fracciones serán analizadas por HPLC-MS.

TABLA 7. Inhibición de la actividad antioxidante de las fracciones de A1.AR14-06BF4

Muestras	% Inhibición ABTS ⁺
A1.AR14-06B.F4.1	0.0 ± 0.04 %
A1.AR14-06B.F4.2	85.0 ± 0.04 %
A1.AR14-06B.F4.3	86.4 ± 0.01 %
A1.AR14-06B.F4.4	39.5 ± 0.13 %
A1.AR14-06B.F4.5	24.9 ± 0.03 %

28

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

Entre los métodos utilizados para determinar la capacidad de un compuesto para captar radicales libres, el método de ABTS^{•+} es uno de los más aplicados, debido a su elevada sensibilidad, practicidad, rapidez y estabilidad (Arnao, 2000). Esta actividad antioxidante depende de la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de los componentes, así como del microambiente en el que se encuentran los compuestos (Robards et al., 1999; Katsube et al., 2003). La actividad antioxidante suele deberse a la presencia de compuestos fenólicos y carotenoides, producidos por macro y microorganismos, incluidas algunas bacterias marinas (Maoka, 2011; Carrión, 2019; Ezquerro-Brauer y Chan-Higuera, 2021).

4.3. Evaluación del potencial biosintético de *Halobacillus* sp AR14-06 en condiciones de cultivo oligotróficas

Estudios enfocados en explorar el potencial biosintético de microorganismos terrestres y marinos han puesto en manifiesto el potencial de la estrategia OSMAC (*One Strain-Many Compounds*). Esta estrategia ha revelado cómo pequeñas modificaciones en las condiciones de cultivo como pH, temperatura, cantidad de oxígeno, espacio, forma de los matraces, cantidad de nutrientes, tiempo de fermentación, cantidad de luz, agitación, adición de inhibidores de enzimas, adición de moléculas de señalización, co-cultivo con otras cepas microbianas, modificación de la composición del medio o cambios de parámetros físicos, entre otras, influyen no sólo sobre el crecimiento de los microorganismos, sino también sobre su metabolismo. De esta manera, los microorganismos pueden activar diversas vías biosintéticas, activando grupos de genes silenciados, y por consiguiente, producir un patrón de metabolitos completamente diferente (Bode et al., 2002; Gómez y Batista, 2006; Pinzón-Espenosa, 2012; Reen et al., 2015, Romano et al., 2018, Pan et al., 2019).

Con el fin de evaluar y comparar la actividad antiproliferativa y los perfiles químicos de extractos crudos procedentes del cultivo en medio A1, alto en nutrientes, con un extracto cultivado en medio oligotrófico, la cepa *Halobacillus* sp. AR14-06 se cultivó a pequeña escala (300 mL) en un medio A1 modificado, reduciendo a 1/5 la concentración de nutrientes. Las condiciones de cultivo y extracción fueron idénticas a las utilizadas para la obtención del extracto A1.AR14-06, obteniendo 17.4 mg de A1/5.AR14-06. Se esperaría que la cantidad limitada de nutrientes en el cultivo altere el metabolismo bacteriano.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

4.3.1 Evaluación de la actividad biológica

4.3.1.1. Actividad antiproliferativa

Se evaluó la actividad antiproliferativa del extracto A1/5.AR14-06, expresada como inhibición del crecimiento del 50% (IC₅₀) frente a seis líneas celulares cancerígenas (FIGURA 16), mostrando valores de IC₅₀ comprendidos entre 58 y 116 µg/mL.

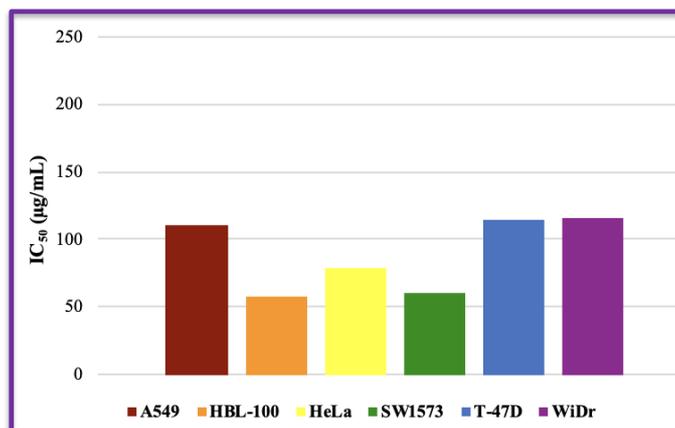


FIGURA 16. Actividad antiproliferativa en IC₅₀ (µg/mL) del extracto A1/5.AR14-06

En la TABLA 8 se compara la actividad antiproliferativa del extracto A1/5.AR14-06 y A1.AR14-06M, se puede observar que la mayor actividad antiproliferativa corresponde a A1/5.AR14-06. Estos resultados son coherentes con el estudio de bioprospección realizado en 2021 por García-Davis y colaboradores, donde las cepas cultivadas en el medio bajo en nutrientes mostraron valores de IC₅₀ más bajos que las mismas cepas cultivadas en un medio con mayor contenido en nutrientes. Cultivando *Halobacillus* sp. AR14-06 en condiciones oligotróficas, se mejora la actividad antiproliferativa en cinco de las seis líneas celulares ensayadas: HBL-100 (58 µg/mL), SW1573 (61 µg/mL), HeLa (79 µg/mL), T-47D (115 µg/mL) y WiDr (116 µg/mL).

TABLA 8. Actividad antiproliferativa IC₅₀ (µg/mL) de extractos crudos frente a seis líneas celulares cancerígenas. Evaluadas a una concentración máxima de 250 µg/mL

Muestras	IC ₅₀ (µg/mL)					
	A549	HBL-100	HeLa	SW1573	T-47D	WiDr
A1.AR14-06	108	82	97	110	143	178
A1/5.AR14-06	111	58	79	61	115	116

30

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

Varios estudios revelan que en la producción de metabolitos secundarios bacterianos los medios oligotróficos exhiben mayor rendimiento, ya que minimizan el aporte nutricional a la bacteria, causando estrés, lo que acorta su fase exponencial y estimula al microorganismo a mantenerse en fase estacionaria, momento en el cual se sintetizan muchos de los metabolitos secundarios (Barry y Wainright, 1997; Pinzón-Espenosa, 2012).

4.3.1.2. Actividad Antioxidante e inhibidora de acetilcolinesterasa

Entre los métodos utilizados para determinar la capacidad de un compuesto para captar radicales libres, el método de ABTS^{•+} es uno de los más aplicados, debido a su elevada sensibilidad, practicidad, rapidez y estabilidad (Arnao, 2000). Esta actividad antioxidante depende de la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de los componentes, así como del microambiente en el que se encuentran los compuestos (Robards et al., 1999; Katsube et al., 2003).

Con el fin de ampliar el estudio del potencial biotecnológico de *Halobacillus* sp. AR14-06, se evaluó la actividad antioxidante del extracto A1/5.AR14-06, obtenido bajo condiciones de cultivo oligotróficas. En este caso, como muestra la TABLA 9, la actividad antioxidante en el ensayo de inhibición de ABTS^{•+} disminuyó en comparación con la actividad del extracto del cultivo en A1.

TABLA 9. Comparación de la actividad antioxidante a 250 µg/mL y actividad de inhibición de acetilcolinesterasa a 50 µg/mL de los extractos crudos obtenidos del cultivo de *Halobacillus* sp. AR14-06

Muestra	% Inhibición ABTS ^{•+}	% Inhibición AChE
A1.AR14-06	18.3 ± 0.03 %	7.7 ± 1.87 %
A1/5.AR14-06	10.5 ± 0.04 %	24.3 ± 7.20 %

Por otra parte, la AChE es una de las enzimas más importantes en los seres vivos, ya que es la responsable de la sinapsis colinérgica y otros procesos nerviosos; no obstante, su inhibición ha encontrado aplicaciones farmacológicas en el tratamiento de diferentes enfermedades, así como en el control de plagas de insectos, por lo que la búsqueda de inhibidores de esta enzima (AChEI) es de interés para las ciencias biomédicas y agroquímicas (Castellanos, 2014).

En el ensayo de actividad inhibidora de acetilcolinesterasa (AChE) del extracto A1/5.AR14-06, éste mostró actividad (24.3%) significativamente mayor que la presentada por el extracto del cultivo en A1 (7.7%) (TABLA 9). Estos datos ponen de manifiesto, que en condiciones oligotróficas, la cepa *Halobacillus* sp. AR14-06 producen metabolitos con capacidad de inhibición de AChE.

4.4. Comparación de los perfiles químicos de los extractos

4.4.1. Análisis del perfil cromatográfico por HPLC-UV-DAD

En el curso de este trabajo se ha cultivado la cepa *Halobacillus* sp. AR14-06 bajo distintas condiciones experimentales, de los que se obtuvieron cuatro extractos: uno del cultivo a pequeña escala en medio A1 (A1.AR14-06), dos correspondientes al cultivo escalado y separando biomasa y medio (A1.AR14-06B y A1.AR14-06M), y uno correspondiente al cultivo en medio oligotrófico a pequeña escala (A1/5.AR14-06).

En la Figura 17 se comparan los perfiles químicos de los cuatro extractos por HPLC-UV-DAD, utilizando una columna analítica con un volumen de inyección de 20 µL y un flujo de 1 mL/min, y con un gradiente de elusión de H₂O:ACN de 95:5 a ACN 100%. Se observan diferencias en la intensidad, número y tiempo de retención de los picos. Los cromatogramas de A1.AR14-06B, A1.AR14-06M y A1.AR14-06 poseen una señal más intensa con tiempos de retención de 5.75, 5.77 y 5.47 minutos, respectivamente. El perfil químico del extracto A1/5.AR14-06 difiere de los anteriores mostrando un pico más intenso con un tiempo de retención de 7.04 minutos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

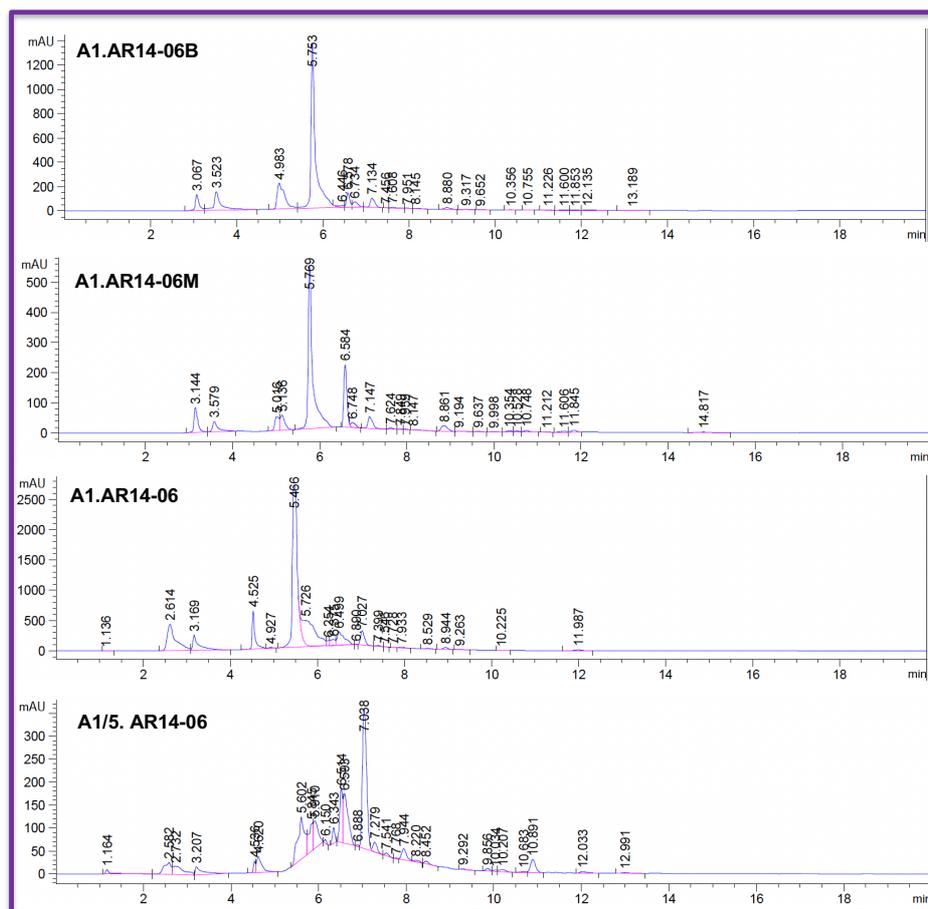


FIGURA 17. Comparación del perfil cromatográfico a $\lambda=254$ nm de los extractos crudos de *Halobacillus sp. AR14-06* a 10 mg/mL.

4.4.2. ¹H-RMN

Igualmente, se analizó y comparó el perfil químico de los cuatro extractos mediante RMN de ¹H (FIGURA 18). Los espectros que presentan mayor similitud entre sí son los extractos A1.AR14-06 y A1/5 AR14-06 pertenecientes a los medios de cultivos a pequeña escala, y extraídos biomasa y medio en conjunto. Sin embargo, se observaron diferencias en la intensidad de las señales en las regiones 1.0-2.0 ppm y 3.5-4.0 ppm. Por otra parte, el extracto A1.AR14-06B es el que presenta mayores diferencias en la intensidad y número de señales.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

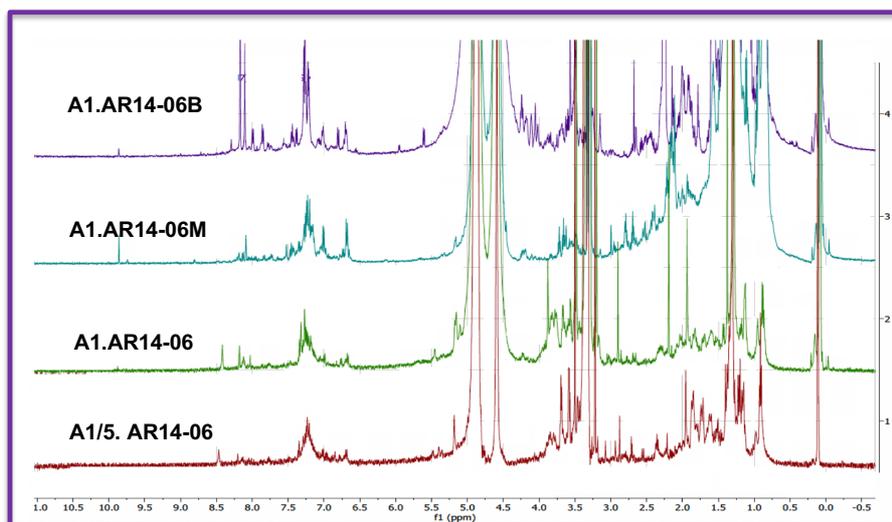


FIGURA 18. Espectros de ^1H -RMN de los extractos crudos.

De manera general, la composición de los medios y los procesos de extracción pueden tener un gran impacto en la obtención de productos naturales microbianos. Esto abre la puerta a futuras investigaciones no sólo en el estudio de diferentes procesos de extracción, sino también en la consideración de la estrategia OSMAC, que estimula la activación del metabolismo secundario a través de la variación de diversos parámetros de cultivo, permitiendo aprovechar el potencial biotecnológico de los microorganismos.

Para evaluar el potencial biotecnológico de los microorganismos marinos, como es el caso de las bacterias aisladas de hábitats marinos singulares, es crucial enfocar los esfuerzos en el estudio de diversas actividades biológicas, ampliando la posibilidad de identificar compuestos bioactivos. Hoy en día se implementan estrategias cada vez más atractivas en el estudio de nuevos compuestos con actividades biológicas terapéuticas como antiparasitarios, anticancerígenos, antifúngicos, inhibidores de la actividad antioxidante, entre otros. Con este fin la reutilización de compuestos no activos o con bioactividad conocida probados en nuevos ensayos, ha permitido descubrir nuevas propiedades terapéuticas no estudiadas en compuestos previamente evaluados (Pushpakom et al., 2019; Rotter et al., 2020; Rotter et al., 2021). Esta estrategia, además de reducir costos, y optimizar el tiempo de estudio, contribuye a la conservación de la biodiversidad y los servicios ecosistémicos marinos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

Se conoce que la actividad antropogénica ha jugado un papel crucial en la pérdida de ecosistemas y biodiversidad marina. Esto ha afectado directamente a la diversidad química marina, poniendo en riesgo la obtención de nuevos medicamentos para la prevención y el control de enfermedades actuales y futuras. Una estrategia para paliar esta problemática y optimizar en tiempo y recursos el estudio de nuevas moléculas con propiedades bioactivas, nace en el laboratorio, con la activación de bacterias marinas criopreservadas de colecciones existentes, de este modo se evitaría la necesidad de retirar nuevos especímenes del entorno marino y costero, contribuyendo a la conservación de la biodiversidad marina.

35

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

5. Conclusiones

- El estudio químico bioguiado de extractos de la cepa *Halobacillus* sp. AR14-06, aislada de muestras ambientales de aguas profundas del volcán submarino Tagoro, pone de manifiesto el potencial biotecnológico de una única cepa microbiana cultivada en diferentes condiciones experimentales para el descubrimiento de sustancias bioactivas de interés.
- En base a los resultados de actividad antiproliferativa y antioxidante evaluados, las fracciones resultantes del extracto de biomasa celular fueron las que mayor actividad mostraron, lo que sugiere que los metabolitos responsables de la actividad biológica de *Halobacillus* sp. AR14-06 se encuentran, principalmente, en la biomasa celular y no secretados en el medio de cultivo.
- En relación con la actividad antiproliferativa, los extractos obtenidos sin separar la biomasa celular y medio de cultivo, exhibieron mayor actividad que los de biomasa y medio separados. Esto representa una ventaja en cuanto al proceso de extracción, dado que permite optimizar el proceso experimental en tiempo y uso de disolventes.
- De todos los extractos analizados, el extracto A1/5.AR14-06, obtenido de la fermentación en un medio diluido, mostró mayor actividad antiproliferativa, confirmando la importancia de valorar las condiciones de cultivo y, en particular, el uso de los medios oligotróficos en la búsqueda de compuestos microbianos antiproliferativos.
- Una de las principales limitaciones en el estudio de los productos naturales es la disponibilidad de muestras. Si bien en este trabajo la cantidad de muestra ha sido un factor limitante para llegar a la caracterización de los compuestos responsables de la actividad biológica, los procesos de fermentación de microorganismos permiten el acceso a compuestos de interés de manera sostenible favoreciendo la biodiversidad y conservación de los ecosistemas marinos.

36

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

- La bioprospección de hábitats marinos singulares y el biodescubrimiento de nuevos productos biotecnológicos, contribuye a la conservación de la biodiversidad, al uso sostenible de los servicios ecosistémicos y a la economía azul.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

6. Líneas futuras de investigación

- El presente trabajo representa un punto de partida para el aislamiento e identificación de compuestos con actividad antiproliferativa y antioxidante a partir de cultivos de *Halobacillus* sp. AR14-06.
- Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de explorar diferentes protocolos de extracción y de cultivo, con el fin de explotar al máximo el potencial biosintético de los microorganismos.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

7. Bibliografía:

- Águila, R., Hernández, C., González, B. 2011. Potencial Biotecnológico de las esponjas en la producción de nuevos fármacos: perspectivas y limitaciones. *CICIMAR Océánides*. 26(2). 31-46.
- Al-Amoudi, S., Essack, M., Simões, M., Bougouffa, S., Soloviev, I., Archer, J., Lafi, F., Bajic, V. 2016. Bioprospecting Red Sea coastal ecosystems for culturable microorganisms and their antimicrobial potential. *Marine Drugs*. 14(9). 165.
- Altmann, K. 2017. Drugs from the oceans: Marine natural products as leads for drug discovery. *Chimia*. 71. 646 – 652.
- Álvarez, L., García, J. 1998 Defensa química en organismos marinos. III Jornadas de medio ambiente. Universidad de Cádiz. 61-69.
- Alves, C., Silva, J., Pinteus, S., Gaspar, H., Alpoim, M., Botana, L., Pedrosa, R. 2018. From marine origin to therapeutics: The antitumor potential of marine algae-derived compounds. *Frontiers in Pharmacology*. 9. 777.
- Arnao, M. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*. 11(11). 419-421.
- Barja, J., Lemos, M., Toranzo, A. 1989. Purification and characterization of an antibacterial substance produced by a marine *Alteromonas* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 33(10). 1674-1679.
- Barreca, M., Spanò, V., Montalbano, A., Cueto, M., Díaz-Marrero, A., Deniz, I., Erdogan, A., Lukic Bilela, L., Moulin, C., Taffin-de-Givenchy, E., Spriano, F., Perale, G., Mehiri, M., Rotter, A., Thomas, O., Barraja, P., Gaudêncio, S., Bertoni, F. 2020. Marine anticancer agents: An overview with a particular focus on their chemical classes. *Marine Drugs*. 18 (12). 619.
- Barry, K., Wainwright, N. 1997. Biosynthetic induction of a secondary metabolite by a marine bacterium under nutritional stress: potential role of the incomplete oxidation of an organic acid. *The Biological Bulletin*. 193 (2). 274-275.
- Benítez, X. 2021. Desarrollo de una plataforma automatizada de aislamiento mediante Dilución a Extinción para el cribado de bacterias no filamentosas productoras de compuestos con actividad antitumoral. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Bethencourt-Estrella, C., Nocchi, N., López-Arencibia, A., San Nicolás-Hernández, D., Souto, M., Suárez-Gómez, B., Díaz-Marrero, A., Fernández, J., Lorenzo-Morales, J., Piñero, J. 2021. Antikinetoplastid activity of sesquiterpenes isolated from the *Zoanthid Palythoa* aff. *clavata*. *Pharmaceuticals*. 14 (11).1095.
- Blunt, J., Copp, B., Keyzers, R., Munro, M., Prinsep, M. 2015. Marine natural products. *Natural Product Reports*. 32(2). 116-21
- Bode, HB, Bethe, B., Höfs, R., Zecek, A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem*. 3 (7). 619-627.
- Canales, P., Chávez-Hidalgo, E., Zavaleta, A. 2014. Caracterización de bacterias halófilas productoras de amilasas aisladas de las Salinas de San Blas en Junín. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 16(2). 150-157.
- Castellanos, F. 2014. Estudio de la inhibición de la acetilcolinesterasa y la relación estructura actividad de terpenoides aislados de organismos marinos del Caribe colombiano. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia.
- Carrión, T. 2019. Actividad antibiótica y antioxidante de fracciones del extracto crudo de *Marivirga* lumbricoides. Tesis de Grado en Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo. Perú.
- Carroll, A., Copp, B., Davis, R., Keyzers, R., Prinsep, M. 2021. Marine natural products. *Natural Product Reports*. 38(2). 362-413.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

- Cartuche, L., Cruz, D., Ramírez, M., Bailón, N., Malagón, O.** 2015. Antibacterial and cytotoxic activity from the extract and fractions of a marine derived bacterium from the *Streptomyces* genus. *Pharmaceutical biology*. 53 (12). 1826-1830.
- Cartuche, L., Sifaoui, I., Cruz, D., Reyes-Battle, M., López-Arencibia, A., Fernández, J., Díaz-Marrero, A., Piñero, J., Lorenzo-Morales, J.** 2019. Staurosporine from *Streptomyces sanyensis* activates programmed cell death in *Acanthamoeba* via the mitochondrial pathway and presents low in vitro cytotoxicity levels in a macrophage cell line. *Scientific Reports*. 9 (1). 11651.
- Cartuche, L.** 2020. Metabolitos secundarios con actividad Antiparasitaria de Actionobacterias de manglar de la costa ecuatoriana. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna. Islas Canarias, España.
- Coker, J.** 2016. Extremophiles and biotechnology: current uses and prospects. *F1000Research*. 5.
- Cruz-López, H.** 2015. Aislamiento de actinomicetos presentes en sedimentos marinos de Loreto, Baja California Sur y su evaluación como posible fuente de moléculas antimicrobianas. Tesis de Grado en Oceanografía Costera. Universidad Autónoma de Baja California, México.
- Damasceno, J., Giuberti, C., Gonçalves, R. y Kitagawa, R.** 2015. Preformulation study and influence of DMSO and propylene glycol on the antioxidant action of isocoumarin paepalantine isolated from *Paepalanthus bromelioides*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 25. 395-400.
- Darias, J., Cueto, M., Darias, M., D' Croz, L.** 2015. Biodiversidad marina y diversidad química: Algunos aspectos de su potencial. *V Congreso Nacional de Biodiversidad del I Festival Nacional Biodiversidad*. 367-379.
- Delgado- García, M., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar-González, C., Contreras-Esquivel, J., Rodríguez-Herrera, R.** 2012. Halophilic hydrolases as a new tool for the biotechnological industries. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 92(13). 2575- 2580.
- Ebada, S., Edrada, R., Lin, W., Proksch, P.** 2008. Methods for isolation, purification and structural elucidation of bioactive secondary metabolites from marine invertebrates. *Nature Protocols*. 3(12). 1820-1831.
- Elleuche, S., Schäfers, C., Blank, S., Schröder, C., Antranikian, G.** 2015. Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. *Current Opinion in Microbiology*. 25. 113-119.
- Ellman, G., Courtney, K., Andres, V., Featherstone, R.** 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochememical Pharmacology*. 7(2). 88-95.
- Ettoumi, B., Raddadi, N., Borin, S., Daffonchio, D., Boudabous, A., Cherif, A.** 2009. Diversity and phylogeny of culturable spore-forming Bacilli isolated from marine sediments. *Journal of Basic Microbiology*. 49(S1). S13-S23.
- Ezquerria-Brauer, J., Chan-Higuera, J.** 2021. Capacidad antioxidante y mecanismo de acción de pigmentos en organismos marinos. *Ciencia UAT*. 15(2). 186-197.
- Farias, P., Espírito Santo, C., Branco, R., Francisco, R., Santos, S., Hansen, L., Sorensen, S., Morais, P.** 2015. Natural hot spots for gain of multiple resistances: arsenic and antibiotic resistances in heterotrophic, aerobic bacteria from marine hydrothermal vent fields. *Applied and Environmental Microbiology*. 81(7). 2534-2543.
- Firsova, D., Mahajan, N., Solanki, H., Morrow, C., Thomas, O.** 2017. Current status and perspectives in marine biodiscovery. *Bioprospecting: Success, Potential and Constraints*, 29-50.
- Fraile-Nuez, E., González-Dávila, M., Santana-Casiano, J., Aristegui, J., Alonso-González, I., Hernández-León, S., Blanco, M., Rodríguez-Santana, A., Hernández-Guerra, A.,**
- Fraile-Nuez, E., Santana-Casiano, J., Vázquez, J., Fernández-Salas, L., López-González, N., Gómez-Ballesteros, M., Álvarez-Valero, A., Palomino, D., Tello-Antón, M., Catalán-Morollón, M., Díaz-Marrero, A., Presas-Navarro, C., Balagué, M., Castro-Álamo, A., Báez-Hernández, M., León-Santos, G., Lozano-**

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

- Bilbao, E., Pozo-Blasco, J., Herrera, I.** 2016. Informe de Campaña-Vulcano-II-1016-octubre 2016. Centro Oceanográfico de Canarias.
- García-Davis, S., Reyes, C., Lagunes, I., Padrón, J., Fraile-Nuez, E., Fernández, J., Díaz-Marrero, A.** 2021. Bioprospecting antiproliferative marine microbiota from submarine Volcano Tagoro. *Frontiers in Marine Science*. 8. 687701.
- Gasol, J., Massana, R., Sala, M., Sebastián, M., Logares, R., Sánchez, P., Acinas, S.** 2022. Ocean microbes and blue biotechnology. Instituto de ciencias del mar. CSIC. Barcelona.
- Gellado-Caballero, M., Eugenio, F., Marcello, J., De Armas, A., Domínguez-Yanes, J., Montero, M., Laetsch, D., Vélez-Belchí, P., Ramos, A., Ariza, A., Comas-Rodríguez, I., Benítez-Barrios, V.** 2012. The submarine volcano eruption at the island of El Hierro: physical-chemical perturbation and biological response. *Scientific Reports*. 2(1). 486.
- Ghareeb, M., Tammam, M., El-Demerdash, A., Atanasov, A.** 2020. Insights about clinically approved and Preclinically investigated marine natural products. *Current Research in Biotechnology*. 2. 88-102.
- Giddings, L., Newman, D.** 2015. Bioactive compounds from marine extremophiles. *Springer International Publishing*. 1-124.
- Gontang, E., Fenical, W., Jensen, P.** 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(10). 3272-3282.
- Gómez, G., Batista, C.** 2006. Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales*. 27 (3). 17-24.
- Gontang, E. A., Fenical, W., Jensen, P. R.** 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(10). 3272-3282.
- Guo, Y., Ding, Y., Xu, F., Liu, B., Kou, Z., Xiao, W., Zhu, J.** 2015. Systems pharmacology-based drug discovery for marine resources: An example using sea cucumber (Holothurians). *Journal of Ethnopharmacology*. 165. 61-72.
- Hoshino, T., Doi, H., Uramoto, G., Wörmer, L., Adhikari, R., Xiao, N., Inagaki, F.** 2020. Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 117(44). 27587-27597.
- Jiménez, C.** 2018. Marine natural products in medicinal chemistry. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 9(10). 959-961.
- Jiménez, P., Wilke, D., Branco, P., Bauermeister, A., Rezende, P., Gaudêncio, S., Costa, L.** 2020. Enriching cancer pharmacology with drugs of marine origin. *British Journal of Pharmacology*. 177(1). 3-27.
- Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M.** 2003. Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(1). 68-75.
- Kheiralla, Z., Ashour, S., Rushdy, A., Ahmed, H.** 2013. Characterization of biosurfactants produced by *Halobacillus dabanensis* and *Pontibacillus chungwhensi* isolated from oil-contaminated mangrove ecosystem in Egypt. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 49. 263-269.
- Lacret, R., Puerta, A., Granica, S., González-Bakker, A., Hevia, D., Teng, Y., Sánchez-Mateo, C., Pérez de Paz, P., Padrón, J.** 2022. Bioactive potential: a pharmacognostic definition through the screening of four *Hypericum* species from the Canary Islands. *Molecules*. 27(18). 6101.
- Lara, J., Arenas, V., Bazán, C., Díaz, V., Escobar, E., García, M. Gaxiola, G., Robles, G., Sosa, R., Soto, L., Tapia, M., Valdez, J.** 2008. Los ecosistemas marinos. *Capital Natural de México*. 1.135-159.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

- Latorre Barrios, N.** 2007. Evaluación de medios de cultivo altos y bajos en nutrientes para la recuperación de heterótrofos edáficos en la ecorregión cafetera de los andes. Tesis de Grado en Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- Liang, X., Luo, D., Luesch, H.** 2019. Advances in exploring the therapeutic potential of marine natural products. *Pharmacological Research*. 147. 104373.
- Littlechild, J.** 2015. Archaeal enzymes and applications in industrial biocatalysts. *Archaea*. 147671.
- Liu, W., Zeng, J., Wang, L., Dou, Y., Yang, S.** 2005. *Halobacillus dabanensis* sp. nov. and *Halobacillus aidingensis* sp. nov., isolated from salt lakes in Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55 (5). 1991-1996.
- Loder, P., Abraham, E.** 1971. Isolation and nature of intracellular peptides from a cephalosporin C-producing *Cephalosporium* sp. *Biochemical Journal*. 123(3). 471-476.
- López, A., Zaballos, M.** 2005. Diversidad y actividad procariótica en ecosistemas marinos. *Ecosistemas*. 14(2).
- Madigan M., Marris B.** 1997. Extremophiles. *Scientific American*. 3(276). 82-87
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D.** 2003. Biology of Microorganisms. *Southem Illinois University Carbondale*. 370-633.
- Mali, S.** 2023. Cancer treatment: Role of natural products. Time to have a serious rethink. *Oral Oncology Reports*. 6. 100040.
- Margesin, R., Schinner, F.** 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5(2). 73-83.
- Margulis, L.** 1997. Words as battle cries—symbiogenesis and the new field of endocytobiology. In *Slanted Truths: Essays on Gaia. Symbiosis and Evolution*. 295-305.
- Marine Pharmacology.** 2023. Clinical Pipeline: Approved Marine Drugs and Phase 3 Drugs. [En línea]. [Consultado Enero 2023]. Disponible en: <https://www.marinepharmacology.org/approved>
- Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., Santos, S.** 2014. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. *Marine Drugs*. 12(2). 1066-1101
- Maoka, T.** 2011. Carotenoids in marine animals. *Marine Drugs*. 9 (2). 278-293.
- Matías, N.** 2019. Avances en la investigación de productos naturales de origen marino frente al Cáncer. Tesis de Grado en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M.** 1991. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 83(11). 757-766.
- Newman, D., Cragg, G.** 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 79(3). 629-661.
- Nocchi, N., Duarte, H., Pereira, R., Konno, T., Soares, A.** 2020. Effects of UV-B radiation on secondary metabolite production, antioxidant activity, photosynthesis and herbivory interactions in *Nymphoides humboldtiana* (Menyanthaceae). *Journal of Photochemistry and Photobiology: Biology*. 212.112021.
- Nowruzi, B., Haghghat, S., Fahimi, H., Mohammadi, E.** 2018. Nostoc cyanobacteria species: a new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Pharmaceutical Health Services Research*. 9(1). 5-12.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

- Ocio, E., Oriol, A., Bladé, J., Teruel, A., Martín, J., de la Rubia, J., Gutiérrez, N., Rodríguez, J., Martínez, S., Coronado, C., Fernández, E., Diguero, M., Fernández, C., San Miguel, J. 2015. Phase I/II study of weekly PM00104 (Zalypsis®) in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 172(4). 625-628.
- Osinga, R., Armstrong, E., Grant-Burgess, J., Hoffmann, F., Reitner, J., Schumann-Kindel, G., 2001. Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia*. 461:55–62.
- Pan, R., Bai, X., Chen, J., Zhang, H., Wang, H. 2019. Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. *Frontiers in Microbiology*. 10. 294.
- Papón, N., Copp, B., Courdavault, V. 2022. Marine drugs: Biology, pipelines, current and future prospects for production. *Biotechnology Advances*. 54. 107871.
- Paul, V., Ritson-Williams, R., Sharp, K. 2011. Marine chemical ecology in benthic environments. *Natural Product Reports*. 28(2). 345-387.
- Payet, B., Shum Cheong Sing, A., Smadja, J. 2005. Assessment of antioxidant activity of cane brown sugars by ABTS and DPPH radical scavenging assays: Determination of their polyphenolic and volatile constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53(26).10074-10079.
- Pérez, J. 1993. La conservación de los recursos genéticos de organismos acuáticos. *Interciencia*. 18(4). 190-194.
- Pérez, J., Alfonsi, C., Nirchio, M. 2002. Biopiratería en organismos marinos. *Biomedicina*. 14(1). 105-112.
- Pinzón-Espinosa, A. 2012. Metabolitos mayoritarios y evaluación de actividad antimicrobiana de bacterias aisladas del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* del Caribe colombiano. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia.
- Prego, R. 1997. La biogeoquímica marina, una nueva visión de los océanos. *Seminario de Química Marina*. 7. 13-26.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P., Escott, K., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Williams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., Pirmohamed, M. 2019. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nature Reviews Drug Discovery*. 18 (1). 41-58.
- Ramírez, N., Sandoval, A., Serrano, J. 2004. Las bacterias halófilas y sus aplicaciones biotecnológicas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 24(1-2). 12-23.
- Ramírez, N., Serrano, J. A., Sandoval, H. 2006. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 37(3). 56-71.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolourisation assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26. 1231-1237.
- Reen, F., Romano, S., Dobson, A., O’Gara, F. 2015. The sound of silence: activating silent biosynthetic gene clusters in marine microorganisms. *Marine Drugs*. 13(8). 4754-4783.
- Rizwan, M., Mujtaba, G., Memon, S., Lee, K., Rashid, N. 2018. Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 92. 394-404.
- Robards, K., Prenzler, P., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*. 66(4). 401-436.
- Rodríguez, J., Reul, A. 2010. Biodiversidad y servicios de los ecosistemas marinos. *UMA/SEDOC*. 34-37.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

Rodriguez-Exposito, R., Nocchi, N., Reyes-Battle, M., Sifaoui, I., Suarez-Gomez, B., Diaz-Marrero, A. R., Souto, M., Piñero, J., Fernández, J., Lorenzo-Morales, J. 2021. Antiamoebic effects of sesquiterpene lactones isolated from the zoanthid *Palythoa* aff. *clavata*. *Bioorganic chemistry*, 108, 104682

Romano, I., Finore, I., Nicolaus, G., Huertas, F., Lama, L., Nicolaus, B., Poli, A. 2008. *Halobacillus alkaliphilus* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a salt lake in Fuente de Piedra, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58(4). 886–890.

Romano, S., Jackson, S. A., Patry, S., Dobson, A. 2018. Extending the “one strain many compounds”(OSMAC) principle to marine microorganisms. *Marine Drugs*. 16(7). 244.

Rothschild, L., Manicynelli, R. 2001. Life in extreme environments. *Nature*. 409. 1092-1101.

Rotter, A., Bacu, A., Barbier, M., Bertoni, F., Bones, A., Cancela, M., Carlsson, J., Carvalho, M., Ceglowska, M., Conk Dalay, M., Dailianis, T., Deniz, I., Drakulovic, D., Dubnika, A., Einarsson, H., Erdogan, A., Tufan Eroldogan, O., Ezra, D., Fazi, S., FitzGerald, R., Gargan, L., Gaudêncio, S., Ivošević DeNardis, N., Joksimovic, D., Kataržyte, M., Kotta, J., Mandalakis, M., Matijošyte, I., Mazur-Marzec, H., Massa-Gallucci, A., Mehiri, M., Laurentius Nielsen, S., Novoveská, L., Overlinge, D., Portman, M., Pyrc, K., Rebours, C., Reinsch, T., Reyes, F., Rinkevich, B., Robbins, J., Rudovica, V., Sabotic, J., Safarik, I., Talve, S., Tasdemir, D., Theodotou Schneider, X., Thomas, O., Torunska-Sitarz, A., Varese G., Vasquez, M. 2020. A new network for the advancement of marine biotechnology in Europe and beyond. *Frontiers in Marine Science*. 7. 278.

Rotter, A., Barbier, M., Bertoni, F., Bones, A., Cancela, M., Carlsson, J., Carvalho, M., Ceglowska, M., Chirivella-Martorell, J., Conk Dalay, M., Cueto, M., Dailianis, T., Deniz, I., Díaz-Marrero, A., Drakulovic, D., Dubnika, A., Edwards, C., Einarsson, H., Erdogan, A., Tufan Eroldogan, O., Ezra, D., Fazi, S., FitzGerald, R., Gargan, L., Gaudêncio, S., Gligora Udovic, M., Ivošević DeNardis, N., Jónsdóttir, R., Kataržyte, M., Klun, K., Kotta, J., Ktari, L., Ljubešić, Z., Lukic Bilela, L., Mandalakis, M., Massa-Gallucci, A., Matijošyte, I., Mazur-Marzec, H., Mehiri, M., Nielsen, S., Novoveská, L., Overlinge, D., Perale41, G., Ramasamy, P., Rebours, C., Reinsch, T., Reyes, F., Rinkevich, B., Robbins, J., Röttinger, E., Rudovica, V., Sabotic, J., Safarik, I., Talve, S., Tasdemir, D., Schneider, X., Thomas, O., Torunska-Sitarz, A., Varese, G., Vasquez, M. 2021. The Essentials of Marine Biotechnology. *Frontiers in Marine Science*. 8. 2296-7745.

Schiraldi, C., De Rosa, M. 2002. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *TRENDS in Biotechnology*. 20(12). 515-521.

Seymour, M. 2019. Rapid progression and future of environmental DNA research. *Communications Biology*. 2(1). 80.

Shin, H. 2013. Anticancer compounds from marine microorganisms. *Marine pharmacognosy: trends and applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group. 409-419.

Shmuel, K. 2022. Urgency and Mechanism of Biosynthesis of Marine Microbial Secondary Metabolites. *International Journal of Science and Society*. 2(4). 159-166.

Shokralla, S., Spall, J., Gibson, J., Hajibabaei, M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*. 21(8). 1794-1805.

Singh, A., Palladino, M., Lloyd, G., Potts, B., Chauhan, D., Anderson, K. 2010. Pharmacodynamic and efficacy studies of the novel proteasome inhibitor NPI-0052 (marizomib) in a human plasmacytoma xenograft murine model. *British journal of haematology*. 149(4). 550-559.

Singh, A., Bandi, M., Raje, N., Richardson, P., Palladino, M., Chauhan, D., Anderson, K. 2011. A novel vascular disrupting agent plinabulin triggers JNK-mediated apoptosis and inhibits angiogenesis in multiple myeloma cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 117(21). 5692-5700.

Solbrig, O. 1991. From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity: report of a IUBS-SCOPE-UNESCO. *Workshop Harvard Forest*. Petersham. USA

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15

- Teasdale, M., Liu, J., Wallace, J., Akhlaghi, F., Rowley, D.** 2009. Secondary metabolites produced by the marine bacterium *Halobacillus salinus* that inhibit quorum sensing-controlled phenotypes in gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(3). 567-572.
- Templado, J., Ballesteros, E., Galparsoro, I., Borja, Á., Serrano, A., Martín, L., & Brito, A.** 2012. Guía interpretativa. Inventario español de hábitats marinos. 11-120
- Valdés, O., Pérez-Gil, R., Colom, Y.** 2010. Actividad antitumoral de los organismos marinos. *Cuba: Medio Ambiente y Desarrollo*, 10(19).
- Velásquez, A., Quintero, M., Jiménez-Vergar, E., Blandón, L., Gómez-León, J.** 2018. Microorganismos marinos extremófilos con potencial interés en estudios de bioprospección. *Revista de la Facultad de Ciencias*. 7(2). 1-40.
- Williams, D., Andersen, R.** 2020. Biologically active marine natural products and their molecular targets discovered using a chemical genetics approach. *Natural Product Reports*. 37(5). 617-633.
- White, J., Abodeely, M., Ahmed, S., Debaue, G., Johnson, E., Meyer, D., Mozier, N., Naumer, M., Pepe, A., Qahwash, I., Rocnik, I., Smith, J., Stokes, E., Talbot, J., Wong, P.** 2019. Best practices in bioassay development to support registration of biopharmaceuticals. *BioTechniques*, 67(3). 126-137.
- Yang, L., Tan, R., Wang, Q., Huang, W. Y., Yin, Y.** 2002. Antifungal cyclopeptides from *Halobacillus litoralis* YS3106 of marine origin. *Tetrahedron Letters*. 43(37). 6545-6548.
- Yoon, J., Kang, K., Park, Y.** 2003. *Halobacillus locisalis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a marine solar saltern of the Yellow Sea in Korea. *Extremophiles*. 53 (3). 687-693.
- Yoon, J., Kang, K., Oh, T., Park, Y.** 2004. *Halobacillus locisalis* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a marine solar saltern of the Yellow Sea in Korea. *Extremophiles*. 8(1). 23–28.
- Zubia, E., Ortega, M., Salva, J.** 1997. Productos naturales marinos bioactivos de organismos procedentes del litoral andaluz. *Seminario de Química Marina*. 7. 267-270.

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.
Su autenticidad puede ser contrastada en la siguiente dirección <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 6109762 Código de verificación: 0ax5Sk7u

Firmado por: Sara García Davis UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	Fecha 16/01/2024 18:18:18
Ana Raquel Díaz Marrero UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 18:22:12
ELIZABETH DEL CARMEN ANDRADE POTOSI UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA	16/01/2024 22:08:15