

Grado en Farmacia
Trabajo de Fin de grado

**Búsqueda de compuestos con actividad antimicrobiana en
extractos de bacterias obligadamente marinas.**



Lorena Cubillo de la Rosa

Tutores: José Manuel de la Rosa Reyes
Mercedes Cueto Prieto

Julio 2019
Universidad de la Laguna

1. ÍNDICE

1. Resumen	3
1.1. Abstract	3
2. Objetivos	4
3. Introducción	4
4. Material y métodos	6
4.1. Técnicas experimentales generales.....	6
4.2. Técnicas cromatográficas.....	7
4.3. Estudio químico de microorganismos de origen marino.....	8
4.4. Estudio cromatográfico de CB08007 en SYP.....	10
4.5. Análisis de la actividad antibiótica de fracciones y productos.....	12
5. Resultados y discusión	14
5.1. Identificación de los productos.....	14
5.2. Resultados de análisis de la actividad antimicrobiana.....	16
5.3. Discusión.....	18
6. Conclusiones	19
7. Bibliografía.....	21
8. Apéndices.....	23

1. RESUMEN

En los últimos años han aumentado los estudios del medio marino con la finalidad de encontrar nuevos productos naturales con actividad biológica que pudieran ser aplicados en diferentes sectores industriales como el farmacéutico, para el descubrimiento de nuevos fármacos, el alimentario, el cosmético y el agrícola entre otros.

Este trabajo se ha realizado con aislados de bacterias obligadamente marinas. Tras su cultivo, se ha obtenido de una de ellas un extracto crudo empleando un disolvente orgánico, el cual fue sometido a fraccionamiento químico y algunos de sus componentes fueron purificados mediante diferentes técnicas cromatográficas y analizados por Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Las distintas fracciones y productos fueron sometidos a un análisis de actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias de referencia. Se discutirán los resultados obtenidos.

Palabras clave: Extracto químico, productos naturales, bacterias obligadamente marinas, actividad antimicrobiana.

1.1 Abstract

In recent years, studies of the marine environment have increased in order to find out new natural products with biological activity that could be applied in different industrial sectors: pharmaceutical, for the discovery of new drugs, food, cosmetics and agriculture among others.

In this study we have worked with obligate marine bacteria isolates. After cultivation, a crude extract of one of them was obtained using an organic solvent, which was further analyzed by chemical fractionation and purification of some of its constituents using different chromatographic techniques and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The different fractions and products were tested for antimicrobial activity against several reference bacteria. Results will be discussed.

Key words: Chemical extract, natural products, obligate marine bacteria, antimicrobial activity

2. OBJETIVOS

Este trabajo se enmarca en el proyecto de investigación "Bacterias obligadamente marinas como productores de moléculas con potencial antimicrobiano (antibacteriano y antifúngico) para su aplicación en el sector agroalimentario (RTA2015-00010-C03-02)" que se realiza actualmente en el grupo de Química de Productos Naturales Marinos del Departamento de Fitoquímica Aplicada y Ecología Química del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA- CSIC).

En resumen, el TFG que se plantea persigue el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios con potencial antibacteriano. Se plantean, en concreto los siguientes objetivos:

- Realizar un cultivo a partir de aislados de origen marino.
- Obtener un extracto químico crudo a partir del sobrenadante del cultivo mediante la utilización de disolventes orgánicos.
- Fraccionar químicamente el crudo mediante diferentes técnicas cromatográficas (CCF, fase reversa, Sephadex, HPLC, etc.) y analizar las fracciones obtenidas mediante RMN.
- Evaluar la actividad biológica de las distintas fracciones y/o productos obtenidos, frente a un panel de diferentes bacterias patógenas de referencia.
- Purificar e identificar, en caso de que resultara de interés y siempre que fuera posible, la estructura de algún producto mediante diferentes técnicas RMN y espectrometría de masas.

3. INTRODUCCIÓN

Los océanos ocupan las tres cuartas partes del planeta y constituyen una fuente importante de productos naturales estructuralmente únicos, los cuales se acumulan generalmente en el interior de los organismos vivos: microorganismos, algas, invertebrados y, con menor frecuencia, vertebrados. El ambiente marino posee numerosas y variadas condiciones naturales (temperatura, presión, nutrientes, condiciones lumínicas, etc.) que han actuado como mecanismo facilitador y conductor de la especiación extensiva, necesaria para la adaptación de los organismos que lo habitan a su entorno, y han determinado la existencia de una

enorme biodiversidad (1): de los 36 Filos conocidos, 34 se encuentran representados en el medio marino y el 70-80% del total de las especies del planeta. Esta enorme biodiversidad excede por mucho la encontrada entre los organismos de los ambientes terrestres. A pesar de esto, sin embargo, la investigación en el campo de los productos naturales de origen marino se encuentra mucho menos desarrollada que la de los ambientes terrestres, en parte, al menos, debido a la dificultad en la recolección de las muestras. Actualmente, la mejora de las técnicas de bioprospección está impulsando la investigación del ecosistema marino.

Muchos de los compuestos procedentes de fuentes marinas han demostrado poseer actividades interesantes, algunos desde el punto de vista farmacológico, en el tratamiento de enfermedades humanas mortales como el cáncer, el SIDA o la artritis, otros son utilizados como analgésicos, antiinflamatorios, etc.. En la actualidad existen ocho sustancias procedentes del medio marino aprobadas como medicamentos y es de esperar que la lista se incremente en los próximos años ya que hay una lista creciente de sustancias marinas que se encuentran en estos momentos en estudios de fase clínica (2). Otros productos naturales marinos han encontrado aplicación en las industrias alimentaria (3), cosmética (4), agricultura (5), etc..

En las últimas décadas los microorganismos marinos han emergido como un recurso interesante para el descubrimiento de nuevas clases de productos terapéuticos. No en vano éstos han definido la química de los océanos y la atmósfera desde la perspectiva evolutiva. Miles de especies diferentes de bacterias, hongos y virus han desempeñado y desempeñan diferentes papeles en los ecosistemas marinos en términos de su ecología y bioquímica. Muchos de estos microorganismos viven en hábitats complejos expuestos a condiciones extremas y, para adaptarse a estos entornos tan hostiles y competitivos, son capaces de producir una amplia variedad de metabolitos biológicamente activos que no se encuentran en los organismos terrestres relacionados (6). Además de la producción de muchos metabolitos primarios, tales como aminoácidos, vitaminas, nucleótidos, etc., son capaces de producir metabolitos secundarios, que han dado origen a fármacos que han ejercido un importante impacto en el control de enfermedades infecciosas y otras condiciones médicas. Entre los muchos ejemplos que pueden citarse de metabolitos secundarios de microorganismos de origen marino, se encuentran las macrolactinas que han demostrado ser antivirales eficaces para los VHS-I y II o el VIH, ciertas toxinas para tratamientos

neurofarmacológicos (1), compuestos como las salinosporamidas, aisladas de *Salinospora* spp en estudio para el tratamiento de mielomas múltiples resistentes y frente a otros tres tipos de cánceres, en particular, salinosporamida A ha sido aprobada recientemente por la FDA como medicamento huérfano para el tratamiento del glaucoma maligno. [(7), (8), (9)], también antibióticos de la familia de los macrólidos han demostrado poseer actividad bactericida y antifúngica frente a patógenos resistentes a antibióticos, etc..

En la última década el desarrollo de resistencias, tanto entre los microorganismos patógenos como entre las células tumorales, se ha convertido en un serio problema y requiere de un gran esfuerzo e incentivación de la investigación (10). “*Poison kills the poison*” (“el veneno mata al veneno”), dice un conocido proverbio y es el principio que inspira a los investigadores de todo el mundo para diseñar procedimientos con el objetivo de hallar nuevos metabolitos de interés biomédico.

El énfasis principal se pone en la búsqueda de fármacos para enfermedades humanas mortales como cáncer o SIDA y los productos naturales marinos continúan siendo hoy una esperanza para encontrar remedio a muchas enfermedades frente a las que todavía no existen tratamientos eficaces (11).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Técnicas experimentales generales

4.1.1 Resonancia Magnética Nuclear (RMN): Los espectros de RMN se realizaron en los espectrómetros Bruker Avance 400 (400 MHz para ^1H) y Bruker AMX 500 (500 MHz para ^1H y 125.7 MHz para ^{13}C). Los experimentos que se realizaron fueron:

- RMN de ^1H .
- RMN de ^{13}C .
- DEPT (aumento sin distorsión por transferencia de polarización).
- HSQC (correlación heteronuclear cuántica simple).
- HMBC (correlación heteronuclear a enlaces múltiples).
- COSY (Correlación espectroscópica bidireccional protón/protón)

Para la adquisición de los datos se emplearon cloroformo o metanol deuterado como disolventes y cloroformo o metanol como patrones de referencia interna (δ_H 7.25 ppm; δ_C 77.0 ppm; δ_H 3.31 ppm; δ_C 49.0 ppm). Los valores de desplazamiento químico (δ) se expresan en partes por millón (ppm), en relación al disolvente empleado como referencia interna. La información espectroscópica fue procesada utilizando el programa MestReNova (versión 11.0, Mestrelab Research S. L. 2017).

4.2 Técnicas cromatográficas

4.2.1 Cromatografía en fase reversa: Se siguió la metodología descrita por Blunt *et al.* en 1987 (12). La fase estacionaria utilizada fue gel de sílice 100 C₁₈ (0.040-0.063 mm, 230-400 mesh ASTM) (Fluka, 60758).

4.2.2 Cromatografía de exclusión molecular: Como fase estacionaria se utilizó Sephadex LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals, 17-0090-01) y como eluyentes metanol 100% o hexano:metanol:diclorometano (3:1:1).

4.2.3 Cromatografía en Capa Fina (CCF): Se emplearon cromatofolios (20x20 cm) del gel de sílice Silicagel 60 F₂₅₄ con base de aluminio (Merck, 105554) para el seguimiento de las separaciones cromatográficas en columna. Para el revelado de la CCF se utilizó:

- Detección por fluorescencia empleando una lámpara UV Vilbert Lourmat a 254 nm).
- *Oleum*: pulverización con una disolución H₂SO₄:H₂O:AcOH (1:4:20) y posterior calentamiento.

4.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR): Se utilizó el cromatógrafo semipreparativo Agilent 1200 Series Quaternary LC System y una columna Ascentis C₁₈ (25 cm x 10 mm, 5 μ m) a flujo constante (3ml/min) y como eluyentes se utilizaron H₂O y metanol.

4.3 Estudio químico de microorganismos de origen marino.

Los aislados seleccionados para su estudio, CB08007, CB08033 y CB08096, se encontraban criopreservadas a -80°C en viales con glicerol 20%.

Para la manipulación de los microorganismos y los medios de cultivo se utilizó una campana de bioseguridad (Telstar Bio-II-A/G).

4.3.1 Cultivo en medio sólido

Las bacterias fueron reavivadas mediante descongelación, siembra e incubación posterior. Para la siembra en placas de Petri se utilizó el método de siembra por agotamiento para la obtención de colonias aisladas. Los cultivos permanecieron 7 días a 25°C en la cámara de cultivo.

La preparación de los medios sólidos se llevó a cabo resolviendo sus componentes en agua de mar artificial, conteniendo sales marinas (Sigma S9883, 30 g/L) y con agar 15 g/L en el medio correspondiente antes de su esterilización en autoclave. Seguidamente, una vez atemperados, fueron dispensados en placas de Petri.

Tabla 4.3.1.1. Medio SCA (1 L)

Caseína	1 g
Almidón	10 g
Agar	15 g
Agua de mar artificial	1000 ml

Tabla 4.3.1.3 Medio AIA(1 L)

Medios en polvo	22 g
Glicerol 20%	25 ml
Agua de mar artificial	1000 ml

Tabla 4.3.1.2. Medio SYPA (1 L)

Extracto de levadura	4g
Peptona de pescado	2g
Almidón	10g
Agar	15g
Agua de mar artificial	1000ml

4.3.2. Cultivo en medio líquido

Los cultivos líquidos se agitaron en un agitador orbital (Certomat R Sartorius) a 150 revoluciones por minuto (rpm) a 25°C durante 15 días.

La preparación de los medios líquidos se llevó a cabo disolviendo sus componentes en agua de mar artificial en diferentes erlenmeyers (1L/erlenmeyer). Se prepararon 4 litros de cultivo para cada aislado que fueron esterilizados en autoclave (1 kg/cm², 20 min, 121°C).

Tabla 4.3.2. Medios en los que fueron cultivados cada uno de los aislados.

AISLADO	MEDIO
CB08007	SYP (4L)
CB08096	SCA (4L)/SYP (4L).
CB08033	SYP (4L)/SCA(4L)

4.3.3 Extracción

La masa celular se separó mediante filtración y el caldo fue extraído con acetato de etilo, renovando el disolvente hasta un total de tres veces. Una vez finalizada la extracción las fases orgánicas fueron reunidas y tratadas con sulfato de sodio anhidro como agente desecante, filtradas y el disolvente orgánico eliminado por rotaevaporación (rotavapor Buchi Waterbath B-480). De esta forma se obtuvieron los extractos crudos.

La siguiente tabla muestra las cantidades obtenidas para cada aislado:

Tabla 4.3.3. Cantidad de extracto obtenido para cada aislado.

CULTIVO	PESO (mg)
CB08007 (SYP)	456.3 mg
CB08096 (SYP)	334.1 mg
CB08033(SYP)	541.3mg

Cada uno de los extractos fue analizado por Resonancia Magnética Nuclear RMN de ^1H .

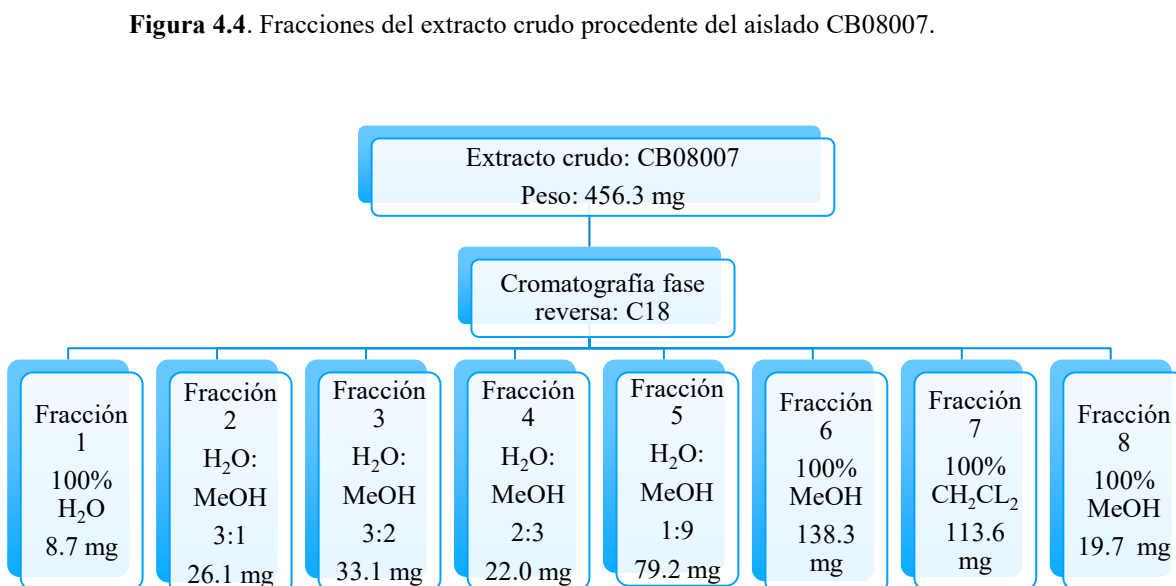
Basándonos en los espectros de RMN y en la cantidad disponible, decidimos trabajar con el aislado CB08007 cultivado en medio SYP (456.3 mg).

4.4 Estudio cromatográfico de CB08007 en SYP

El extracto crudo de CB08007 SYP (456.3 mg) fue fraccionado mediante cromatografía en columna en fase reversa. El soporte usado fue gel de sílice 100 C₁₈, y el extracto fue incorporado a la columna adsorbido en el mismo soporte. Como fase móvil se emplearon agua, mezclas de agua y metanol, metanol 100% y diclorometano 100%. Se obtuvieron 8 fracciones que fueron transferidas a viales previamente pesados.

Cada una de las fracciones obtenidas a partir del extracto crudo se analizó mediante RMN de ^1H y por CCF. Se realizaron dos CCF, en una de ellas se utilizó como eluyente una mezcla de diclorometano-metanol (9:1), y en la otra una mezcla de hexano-acetato de etilo (1:1). Para el revelado se usó *oleum*.

En el siguiente esquema se representan las fracciones obtenidas a partir del extracto crudo:



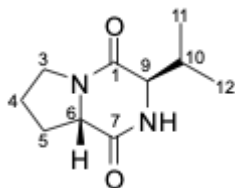
4.4.1 Estudio de la fracción 3 (3:2 H₂O:MeOH, 33.1 mg)

La muestra se fraccionó utilizando una columna de exclusión molecular Sephadex LH-20 (\varnothing_{int} = 2.5 cm y h_{gel} = 20.0 cm) eluida con MeOH 100% obteniéndose 30 fracciones. El seguimiento de la separación se realizó por CCF y RMN de ¹H y se procedió a unir las fracciones 10,11 y 12 (12.5 mg), que fue purificada luego mediante CLAR con el siguiente gradiente:

1. De H₂O:MeOH (9:1) hasta H₂O:MeOH (4:6) en 40 minutos
2. De H₂O:MeOH (4:6) hasta MeOH (100%) en 20 minutos

Se obtuvieron 31 fracciones y una vez comprobadas mediante CCF y RMN de ¹H, se unieron las fracciones 24, 25 y 26 (2.5 mg); (tr:38 minutos), que contenían una mezcla de los compuestos, **P-1** y **P-2**, cuyas estructuras se determinaron por RMN (¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HSQC y HMBC), espectrometría de masas y por comparación con la literatura.

Compuesto P-1 [Ciclo-(L-Val-L-Pro)]



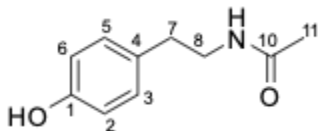
EM-ESI *m/z* (%) 219 [M+Na]⁺ (31).

EMAR-ESI *m/z* [M+Na]⁺ 219.1109 (calculado para C₁₀H₁₆N₂O₂Na, 219.1109).

RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) δ 0.94 (3H, d, *J*=7.9 Hz, H-11), 1.09 (3H, d, *J*=7.9 Hz, H-12), 1.93 (1H, m, H-4a), 1.95 (1H, m, H-5a), 2.02 (1H, m, H-4b), 2.32 (1H, m, H-5b), 2.48 (1H, m, H-10), 3.50 (1H, m, H-3a), 3.56 (1H, m, H-3b), 4.02 (1H, brs, H-9), 4.20 (1H, m, H-6).

RMN ¹³C (125.7 MHz CD₃OD) δ 16.7 (CH₃, C-11), 18.3 (CH₃, C-12), 23.3 (CH₂, C-4), 29.5 (CH₂, C-5), 29.9 (CH, C-10), 46.2 (CH₂, C-3), 60.0 (CH, C-6), 61.5 (CH, C-9), 167.6 (C, C-1), 172.6 (C, C-7).

Compuesto P-2 [N-Acetiltiramina]



EM-ESI m/z (%) 202 $[M+Na]^+$ (100).

EMAR-ESI m/z $[M+Na]^+$ 202.0840 (calculado para $C_{10}H_{13}NO_2Na$, 202.0844).

RMN 1H (500 MHz, CD_3OD) δ 1.90 (3H, s, C-11), 2.68 (2H, dd, $J=7.5$, 7.4 Hz, H-7), 3.33 (2H, m, H-8), 6.70 (2H, d, $J=7.5$, H-2, 6), 7.02 (2H, d, $J=7.5$, H-3, 5).

RMN ^{13}C (125.7 MHz CD_3OD) δ 22.6 (CH_3 , C-11), 35.6 (CH_2 , C-7), 42.4 (CH_2 , C-8), 116.2 (CH , C-2, 6), 130.7 (CH , C-3, 5), 131.3 (C, C-4), 156.9 (C, C-1), 173.8 (C, C-10).

4.4.2 Estudio de la fracción 6 (100% MeOH, 138.3mg)

La muestra se fraccionó utilizando una columna de exclusión molecular Sephadex LH-20 ($\varnothing_{int}= 2.5$ cm y $h_{gel}= 20.0$ cm) eluida con hexano:metanol:diclorometano (3:1:1), obteniéndose 48 fracciones. Después de realizar el seguimiento mediante CCF y RMN de 1H , se procedió a reunir las fracciones que se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4.4.2 Muestras obtenidas de F-6.

Fracciones	Peso (mg)
f1: (f 1-3)	2.7
f2: (f 4-6)	38.4
f3: (f 7-9)	32.8
f4: (f 10-12)	10.9
f5: (f 13-19)	11.1
f6: (f 20-26)	34.2
f7: (f 27-48)	4.1
f8: lavado metanol	3.1

4.5 Análisis de la actividad antibiótica de las fracciones y productos.

Paralelamente al trabajo de fraccionamiento, una pequeña cantidad de cada fracción se reservó para la determinación de su actividad antibiótica. Las muestras (ver tabla 4.5) fueron remitidas al Servicio de Actividad Biológica del IPNA. Se

evaluaron 8 fracciones del aislado CB08007 (456.3 mg), las fracciones obtenidas por Sephadex de la F-6 (138.3 mg) y la mezcla obtenida por CLAR que contenía los productos **P-1** y **P-2**.

Tabla 4.5. Muestras analizadas en actividad biológica.

Fracciones de C-18	F-6 SEPHADEX	CLAR
F-1 (30 µg/µl)	f1 (16 µg/µl)	P1+P2 (21 µg/µl)
F-2 (48 µg/µl)	f2 (12 µg/µl)	
F-3 (94 µg/µl)	f3 (33 µg/µl)	
F-4 (46 µg/µl)	f4 (42 µg/µl)	
F-5 (120 µg/µl)	f5 (19 µg/µl)	
F-6 (100 µg/µl)	f6 (12 µg/µl)	
F-7 (74 µg/µl)	f7 (21 µg/µl)	
F-8 (60 µg/µl)	f8 (31 µg/µl)	

En el ensayo de actividad antibiótica se determinó la capacidad de las muestras de inhibir el crecimiento de las siguientes estirpes bacterianas (patógenas oportunistas), utilizadas como referencia: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Campylobacter jejuni* ATCC 3356.

El protocolo seguido para la realización de este ensayo es una adaptación del de Matuschek *et al.* (13). Se trata de una prueba cualitativa basada en la presencia o ausencia de un halo de inhibición. Como control positivo se incluyó un antibiótico comercial y como negativo, el disolvente (DMSO) sin muestra. Los resultados se leen tras 18 horas de incubación a 37°C.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación de los productos.

Mediante CLAR se obtuvo una mezcla de dos productos (**P-1** y **P-2**) que pudieron ser identificados mediante RMN (ver espectros en Anexo A) y espectrometría de masas y por comparación con los datos previamente publicados.

5.1.1 Identificación de P-1

Para el compuesto **P-1**, en su espectro RMN de ^{13}C , se observan señales para diez átomos de carbono cuyas multiplicidades se determinaron por experimentos DEPT: dos metilos, tres metilenos, señales para tres metinos y dos carbonilos (δ_{C} 172.6 y 167.6 ppm). El experimento HSQC nos permitió unir cada carbono no cuaternario con los protones a los que está unido directamente, tal y como se observa en la tabla 5.1.1. El experimento COSY permitió establecer los fragmentos de C-3- C-6 y C-9- C-12. Las correlaciones HMBC del carbonilo C-1 (δ_{C} 167.6) con H-9 y H-10 y las del carbonilo C-7 (δ_{C} 172.6) con H₂-5 permitieron conectar ambos carbonilos al resto de la molécula. El espectro de masas de **P-1** [EMAR-ESI m/z [M+Na]⁺ 219.1109] estableció la fórmula molecular C₁₀H₁₆N₂O₂. Estos datos unidos a los fragmentos detectados por RMN sugieren que **P-1** debe ser una dicetopiperacina formada por valina y prolina. La estructura de **P-1**, mostrada en la figura 5.1.1, fue confirmada por comparación de sus datos espectroscópicos con los del Ciclo-(L-Val-L-Pro) aislado previamente (14).

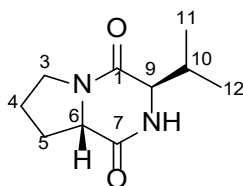


Figura 5.1.1. Ciclo-(L-Val-L-Pro)

Tabla 5.1.1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC de **P-1** [500 MHz, δ ppm, (J), MeOH- d_4]

#	δ_{C}	δ_{H}	COSY	HMBC
1	167.6, C	—		
3	46.2, CH ₂	a: 3.50 (m) b: 3.56 (m)	H-4a, H-4b	C-4
4	23.3, CH ₂	a: 1.93 (m) b: 2.02 (m)	H3a, H-3b, H-5a, H-5b	
5	29.5, CH ₂	a: 1.95 (m) b: 2.32 (m)	H-4a, H-4b, H-6	C-7
6	60.0, CH	4.20 (m)	H-5	C-5
7	172.6, C	—		
9	61.5, CH	4.02 (br s)	H-10	C-1, C-10, C-11
10	29.9, CH	2.48 (m)	H-9, H ₃ -11, H ₃ -12	C-1, C-9
11	16.7, CH ₃	0.94 (d, 7.9)	H-10	C-9, C-10, C-12
12	18.3, CH ₃	1.09 (d, 7.9)	H-10	C-9, C10, C-11

5.1.2 Identificación de P-2

En el espectro RMN de ^{13}C de **P-2** se observaron señales para diez átomos de carbono cuyas multiplicidades se determinaron por DEPT: un metilo, dos metilenos, señales para cuatro metinos y tres carbonos cuaternarios (uno de ellos carbonilo, δ_{C} 173.8 ppm). El experimento HSQC nos permitió unir cada carbono no cuaternario con los protones a los que está unido directamente, tal y como se observa en la tabla 5.1.2. Los datos analizados sugieren que **P-2** debe contener un anillo aromático simétrico, con dos posiciones sustituidas. Por otra parte, el COSY estableció la presencia del fragmento de C-7-C-8 mientras que las correlaciones HMBC de C-3, C-4 y C-5 con H-7 permitió conectar ese fragmento al anillo aromático. Las correlaciones de C-10 con H₃-11 y H₂-8 conectan el carbonilo al resto de la molécula. El espectro de masas de **P-2** [EMAR-ESI m/z $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 202.0840] estableció la fórmula molecular C₁₀H₁₃NO₂. Los desplazamientos químicos de C-1 y C-8 indican que el grupo hidroxilo debe encontrarse sobre C-1 mientras que el nitrógeno debe formar parte de una amida. La estructura de **P-2** fue confirmada por

comparación de sus datos espectroscópicos con *N*-Acetiltiramina aislada previamente (15) (figura 5.1.2).

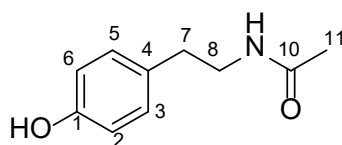


Figura 5.1.2. *N*-Acetiltiramina

Tabla 5.1.2. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y HMBC de **P-2** [500 MHz, δ ppm, (J), MeOH- d_4]

#	δ_{C}	δ_{H}	COSY	HMBC
1	156.9, C	—		
2	116.2, CH	6.70 (d, 7.5 Hz)	H-3	C-1, C-6
3	130.7, CH	7.02 (d, 7.5 Hz)	H-2	C-1, C-5, C-7
4	131.3, C	—		
5	130.7, CH	7.02 (d, 7.5 Hz)	H-6	C-1, C-3, C-7
6	116.2, CH	6.70 (d, 7.5 Hz)	H-5	C-1, C-2
7	35.6, CH ₂	2.68 (dd, 7.5, 7.4 Hz)	H-8	C-3, C-4, C-5, C-8
8	42.4, CH ₂	3.33 (m)	H-7	C-10
10	173.8, C	—		
11	22.6, CH ₃	1.90 (s)		C-10

5.2 Resultados del análisis de actividad antimicrobiana

Se realizó el ensayo de actividad antimicrobiana de las ocho fracciones obtenidas de la cromatografía en fase reversa del extracto de CB08007 SYP, así como de las ocho fracciones obtenidas por Sephadex LH-20 de la fracción 6, la única de ellas donde se detectó actividad (figura 5.2), y de la mezcla de los productos **P1+P2**. Se utilizó un panel de bacterias gram+ y gram- mediante el procedimiento indicado anteriormente.

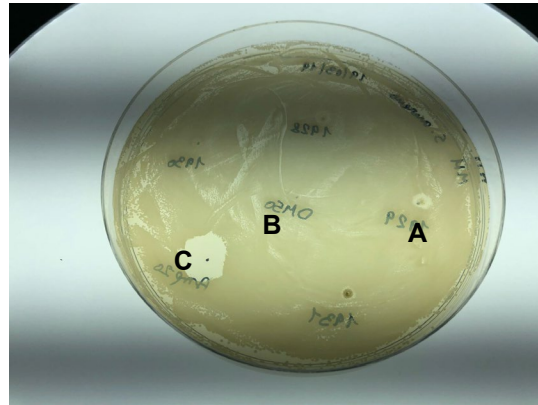


Figura 5.2. Inhibición del crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213, producido por 1 µl de CB08007 SYP F6 (0,1 ug) (B), comparado con el disolvente (DMSO), y el halo producido por el antibiótico control (ampicilina, 10 µg) (C).

Los resultados completos de dicho ensayo se muestran a continuación:

Tabla 5.2. Resultados del ensayo de actividad antimicrobiana.

Muestra	Concentración (µg/ml)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CB08007 F-1	30	-	-	-	-	-
CB08007 F-2	48	-	-	-	-	-
CB08007 F-3	94	-	-	-	-	-
CB08007 F-4	46	-	-	-	-	-
CB08007 F-5	120	-	-	-	-	-
CB08007 F-6	100	-	+	-	-	+
CB08007 F-7	74	-	-	-	-	-
CB08007 F-8	60	-	I	-	-	+
CB08007 F-6 (f1)	16	-	-	-	-	-
CB08007 F-6 (f2)	12	-	-	-	-	-
CB08007 F-6 (f3)	33	-	-	-	-	-

CB08007 F-6 (f4)	42	-	-	-	-	-
CB08007 F-6 (f5)	19	-	-	-	-	-
CB08007 F-6 (f6)	12	-	-	-	-	-
CB08007 F-6 (f7)	21	-	-	-	+	-
CB08007 F-6 (f8)	31	-	++	++	+	+
CB08007 (P1+P2)	21	-	-	-	-	-

Leyenda: +, con actividad; -, sin actividad; I, indeterminado

5.3 Discusión.

El análisis químico de los extractos mediante RMN de ^1H puso de manifiesto que los tres aislados produjeron diferentes compuestos, algunos de los cuales mostraron poseer cierta actividad antimicrobiana (tabla 5.2).

Se observó por ejemplo que la fracción F-6 obtenida mediante cromatografía en fase reversa del aislado CB08007 fue activa frente a las bacterias gram+ *Staphylococcus aureus* y la gram- *Campylobacter jejuni* mientras que la fracción F-8 sólo resultó activa para *C. jejuni*. Por ello, la fracción F-6 fue seleccionada para su subfraccionamiento cromatográfico mediante Sephadex. La subfracción f7 fue activa frente a *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que la subfracción f8 no solo retuvo la actividad antimicrobiana ya observada frente a *S. aureus* y *C. jejuni* con un incremento en su actividad específica sino que además resultó activa frente a *P. aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*. Sería interesante continuar con el estudio químico de esta fracción para determinar los compuestos responsables de esta actividad.

Por otra parte, se determinó la actividad antimicrobiana de la mezcla de productos purificados por CLAR (P1+P2) que provenían de la fracción 3 de la cromatografía en fase reversa, inicialmente sin actividad antimicrobiana. La mezcla de los

productos **P1** + **P2** también resultó negativa para dicha actividad frente a las bacterias indicadoras ensayadas.

La elucidación estructural de los productos **P-1** y **P-2** reveló que ambos son compuestos conocidos, la dicetopiperacina Cíclo-(L-Val-L-Pro) y la *N*-Acetiltiramina, respectivamente. Convendría realizar una búsqueda en la bibliografía existente, para determinar si hay ensayos que no han sido realizados con estos productos y cuáles pueden ser convenientes. En caso de encontrar alguna actividad farmacológica relevante, sería necesario por un lado llevar a cabo estudios de citotoxicidad, y, por otro, estudios donde se relacione las estructuras químicas con la actividad.

Por último, este trabajo se ha llevado a cabo en unas determinadas condiciones (temperatura, nutrientes, agitación, etc). Sería interesante investigar si la modificación de dichas condiciones conduciría a productos y/o actividades biológicas distintas. Se sabe que en un medio tan complejo como es el medio marino, los microorganismos se encuentran sometidos a una gran variedad de condiciones físico-químicas y biológicas, y en tales circunstancias, son capaces de adaptarse modulando su metabolismo en respuesta a tales condiciones y produciendo nuevos metabolitos.

6. CONCLUSIONES

1. Con objeto de obtener metabolitos nuevos y/o con actividad antimicrobiana, se obtuvieron extractos químicos crudos, a partir de la fracción no celular del cultivo de tres aislados bacterianos obligadamente marinos.

2. Tras someter uno de los extractos crudos a distintos procedimientos de separación química se determinó la actividad antimicrobiana de las distintas muestras obtenidas (fracciones/subfracciones y productos).

3. Las fracciones F6 y F8 procedentes del extracto de CB08007 mostraron actividad antimicrobiana frente a un panel de bacterias indicadoras gram+ y gram-. Varias de las subfracciones derivadas de F6 (f7 y f8) también mostraron tener actividad antimicrobiana, mejorando en algunos casos la actividad específica del extracto previo. Los productos responsables de la misma deberán ser identificados en estudios posteriores.

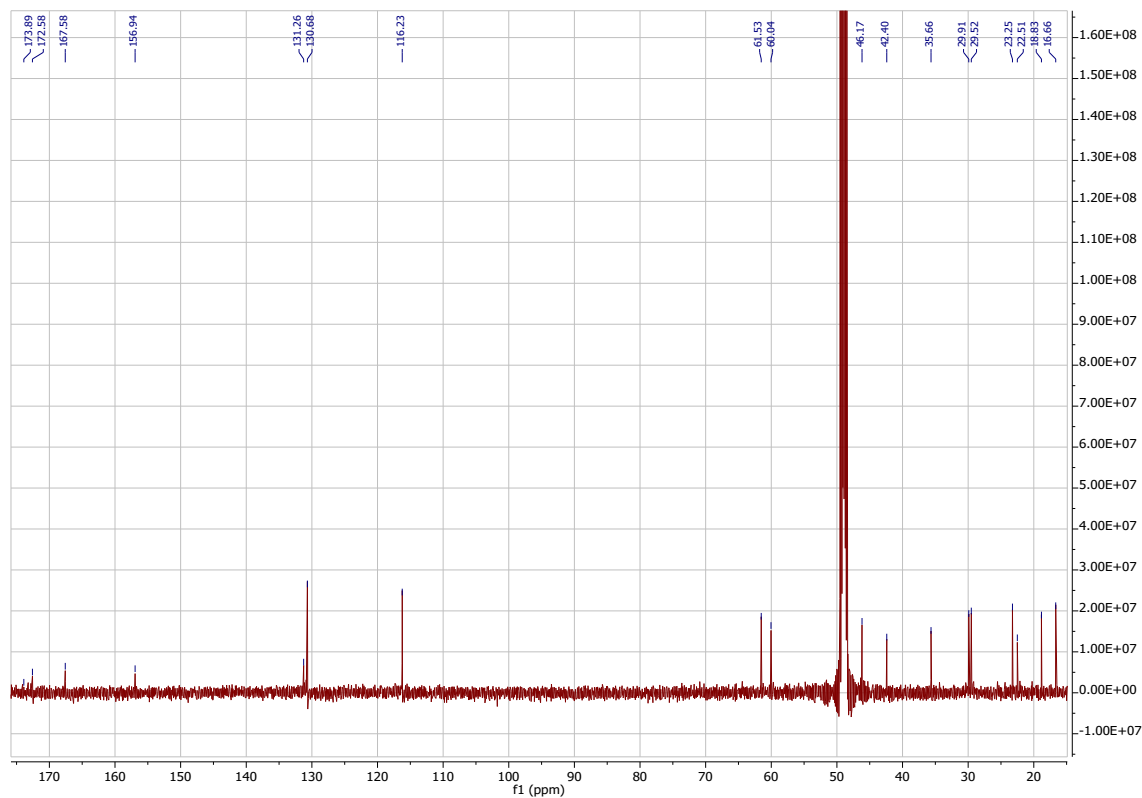
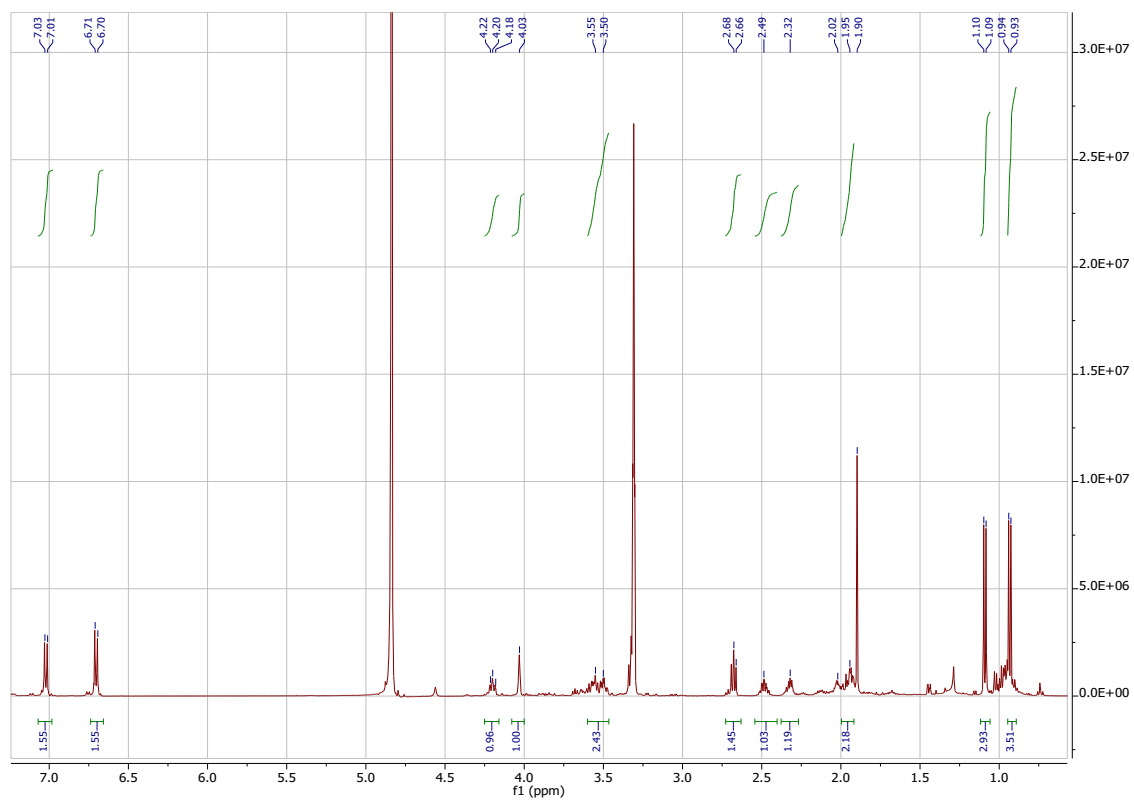
4. La primera purificación de la fracción 3 obtenida mediante cromatografía en fase reversa de CB08007 condujo a la obtención y elucidación estructural de dos compuestos químicos conocidos, la dicetopiperacina Ciclo-(L-Val-L-Pro) y la N-Aciltiramina que no mostraron, sin embargo, actividad antimicrobiana frente al panel de bacterias indicadoras ensayadas.

7. BIBLIOGRAFÍA

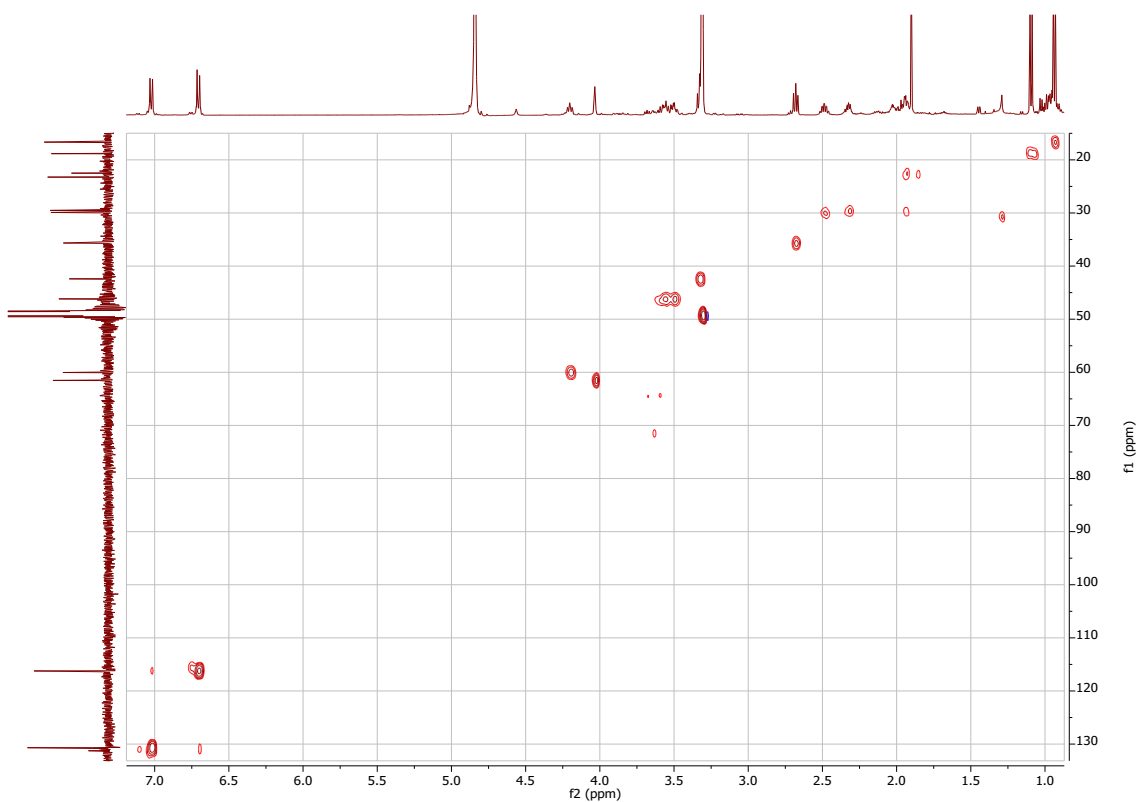
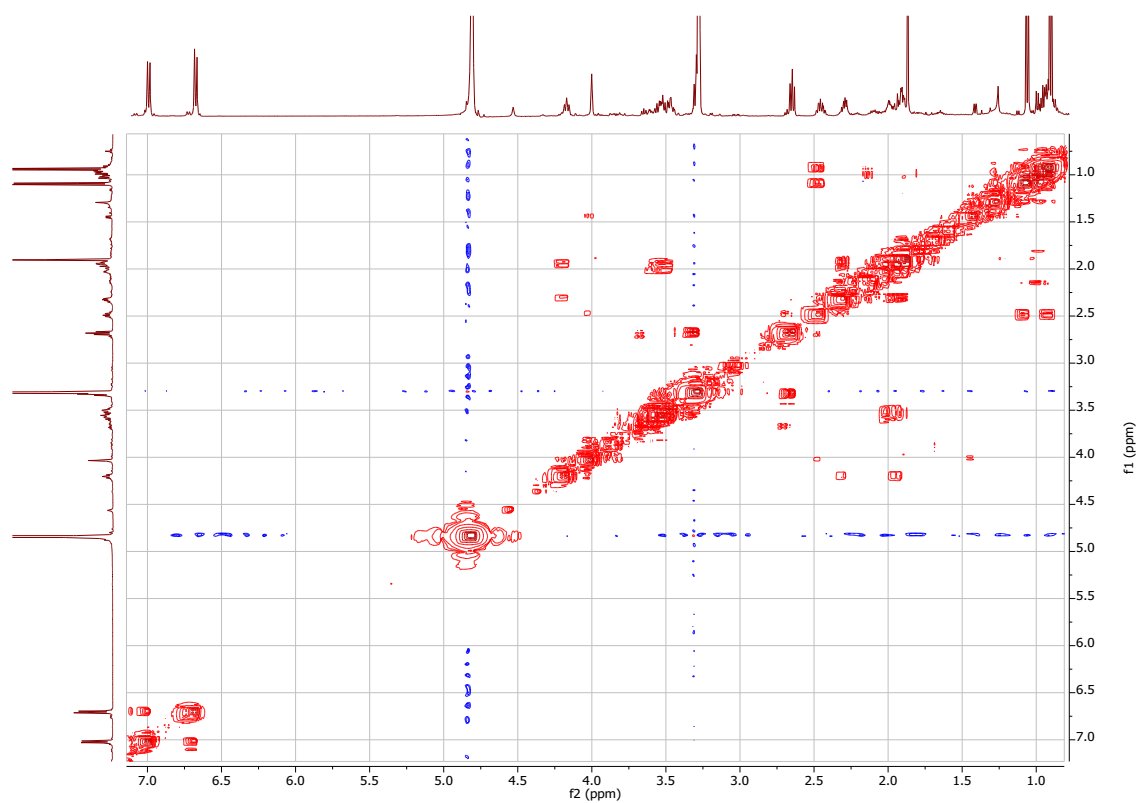
1. Jha RK, Zi-rong X. Biochemical compounds from marine organisms. *Mar Drugs*. 2010;8(4):123–146. DOI: 10.3390/md203123
2. Mayer A, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, McIntosh JM, Newman DJ, Potts BC, Shuster DE. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2010;31(6):255–265. DOI: 10.1016/j.tips.2010.02.005
3. Lordan S, Ross RP, Stanton C. Marine bioactives as functional food ingredients: Potential to reduce the incidence of chronic disease. *Mar Drugs*. 2011;9(6):1056–1100. DOI: 10.3390/md203123
4. Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed Marine Natural Products in the Pharmaceutical and Cosmeceutical Industries: Tips for Success. *Mar Drugs*. 2014;12(2):1066–1101. DOI:10.3390/md12021066.
5. Peng J, Shen X, El Sayed KA, Dunbar DC, Perry TL, Wilkins SP, et al. Marine Natural Products as Prototype Agrochemical Agents. *J Agric Food Chem*. 2003;51(8):2246–2252. DOI: 10.1021/jf0207880
6. Karpiński TM. Marine Macrolides with Antibacterial and/or Antifungal Activity. *Mar Drugs*. 2019;17(4):241–265. DOI: 10.3390/md12021066
7. Vignesh S, Raja A, Arthur Jam R. Marine Drugs: Implication and Future Studies. *Int J Pharmacol*. 2011;7(1):22–30. DOI: 10.392/ijp.2011.22.30
8. Groll M, Nguyen H, Vellalath S, Romo D. (–)-Homosalinosporamide A and Its Mode of Proteasome Inhibition: An X-ray Crystallographic Study. *Mar Drugs*. 2018;16(7):240. DOI: 10.3390/md16070240
9. Jensen PR, Moore BS, Fenical W. The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. *Nat Prod Rep*. 2015;32(5):738–751. DOI: 10.1039/c4np00167b
10. Thaker MN, Wang W, Spanogiannopoulos P, Waglechner N, King AM, Medina R, Hamann MT, Bobzin S, Huesing J, Camp R, Prinsen M, Krupa D, Wideman MA. Identifying producers of antibacterial compounds by screening for antibiotic resistance. *Nat Biotechnol* . 2013;31(10):922–927. DOI: 10.1038/nbt.2685
11. Blunt JW, Copp BR, Hu WP, Munro MHG, Northcote PT, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 2009;28(2),170–244. DOI: 10.1039/C005001F

12. Blunt JW, Calder VL, Fenwick GD, Lake RJ, McCombs JD, Munro MHG, Perry NB. Reverse phase flash chromatography. A Method for the rapid partitioning of natural product extracts. *J Nat Prod.* 1987;50(2):290–292. DOI: 10.1021/np50050a039
13. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(4):O255–O266. DOI: 10.1111/1469-0691.12373
14. Balasubramanian A, Bhattacharjee M, Sakthivel M, Thirumavalavan M, Madhavan T, Nagarajan Sk, Palaniyandi V, Raman P. Isolation, purification, and characterization of five active diketopiperazine derivatives from endophytic *Streptomyces* SUK 25 with antimicrobial and cytotoxic activities. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(7):1249–1256. DOI: 10.4014/jmb.1608.08032
15. Sun JF, Wu Y, Yang B, Liu Y. Chemical Constituents of Marine Sponge *Halichondria* sp. from South China Sea. *Chem Nat Compd.* 2015;51(5):975–977. DOI: 10.1007/s10600-015-1467-5

APÉNDICE A: Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de **P-1+P-2** (500 MHz, δ ppm CD_3OD).



APÉNDICE B: Espectro de RMN de COSY y HSQC de **P-1+P-2** (500 MHz, δ ppm CD_3OD).



APÉNDICE C: Espectro de RMN de HMBC de **P-1+P-2** (500 MHz, δ ppm CD₃OD)

