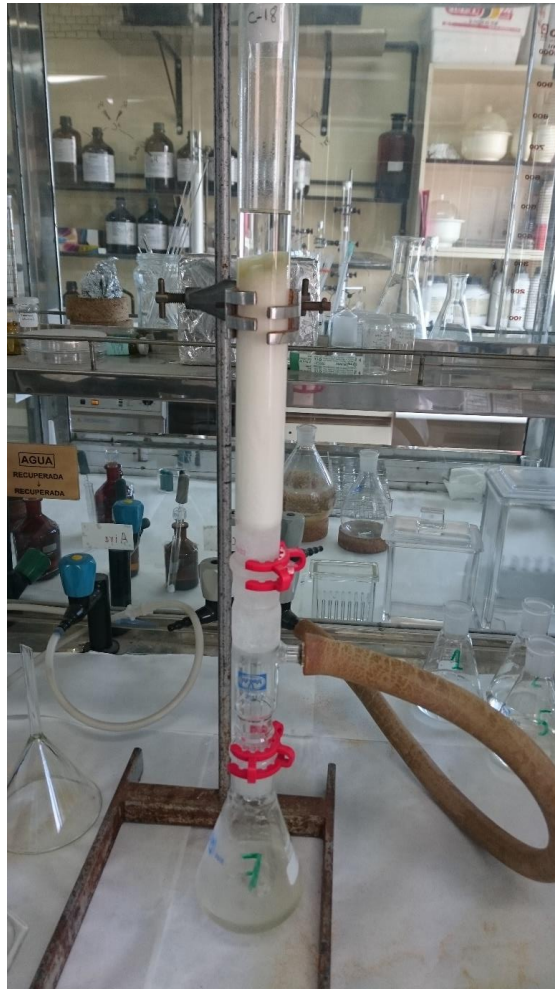


Estudio químico y actividad antimicrobiana de productos de bacterias obligadamente marinas.

**Chemical study and antimicrobial activity of products from obligated
marine bacteria**



Trabajo de Fin de Grado
RAFAEL SUÁREZ FUENTES

Grado en Biología. Julio. 2018

Universidad de La Laguna

Tutorizado por: Ángel M. Gutiérrez Navarro y Mercedes Cueto.

1. ÍNDICE

1. Resumen.....	3
1.1. Abstract.....	3
2. Objetivos.....	4
3. Introducción.....	5
4. Material y Métodos.....	6
4.1. Técnicas experimentales generales.....	6
4.2. Técnicas cromatográficas.....	7
4.3. Cultivo de microorganismos.....	7
4.4 Estudio cromatográfico de la Cepa CB08035 SYPA (<i>M. hydrocarbonoclasticus</i>).....	10
4.5 Análisis de la actividad biológica de los extractos, fracciones y productos.....	12
5. Resultados y Discusión.....	13
5.1 Identificación de productos.....	13
5.2 Resultados actividad biológica de las muestras.....	15
5.3 Discusión.....	17
6. Conclusiones.....	19
6.1 Conclusions.....	19
7. Bibliografía.....	20
8. Apéndices.....	21

1. RESUMEN

En las últimas décadas, la búsqueda de nuevas sustancias naturales con actividad biológica ha llevado a multitud de científicos a explorar los océanos, abriendo así la puerta al descubrimiento de miles de moléculas con un enorme potencial por su actividad biológica en el campo de la medicina, la industria agroalimentaria o la cosmética, entre otras.

En el presente estudio se ha trabajado con tres cepas de bacterias obligadamente marinas, primero mediante su cultivo; más tarde, con la extracción de sus productos con un disolvente orgánico, y a continuación aislando progresivamente estos productos mediante el uso de varias técnicas cromatográficas, y analizándolos mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los extractos/fracciones/productos obtenidos fueron sometidos a análisis de actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Campylobacter jejuni* ATCC 33560.

Palabras clave: Bacterias obligadamente marinas, productos naturales, actividad antimicrobiana, Resonancia Magnética Nuclear.

1.1 Abstract

Over the last decades, the search for new bioactive natural products has led several scientist to explore the oceans, opening the door to the discovery of thousands of molecules with a major potential in medicine, and in industries such as agro alimentary or cosmetic, among others.

In this study, we have worked with three strains of obligated marine bacteria, first by means of their cultivation, later, with the extraction of their products using an organic solvent, and finally isolating these products by using several chromatographic techniques, and analyzing them by Nuclear Magnetic Resonance.

The extracts/fractions/products obtained were tested for antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Campylobacter jejuni* ATCC 33560.

Keywords: Obligated marine bacteria, natural products, antimicrobial activity, Nuclear Magnetic Resonance.

2. OBJETIVOS

Este trabajo se enmarca dentro del 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 lleva a cabo actualmente por el Grupo de Química de Productos Marinos (GQPM) del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC).

La idea central del proyecto es el estudio de una colección de aislados bacterianos marinos que sólo pueden crecer en medios de cultivo que contienen agua de mar (bacterias obligadamente marinas), como productores de moléculas con potencial terapéutico, antimicrobiano (antibacteriano o antifúngico), mediante la identificación y caracterización de extractos e hidrolizados proteicos con potencial antimicrobiano para su posterior aplicación, en el sector agroalimentario. El fin último del proyecto es la creación de una “librería” de extractos o quimioteca que contenga una colección de moléculas químicas o extractos naturales, almacenados, catalogados y caracterizados según su estructura y actividad antimicrobiana frente a microorganismos diana (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., enterobacterias, bacterias lácticas, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp. y *Candida albicans* entre otros) y su citotoxicidad.

Los objetivos específicos de este TFG son:

- Cultivo de tres cepas de bacterias obligadamente marinas y la obtención de sus extractos crudos para el análisis de su actividad biológica.
- Obtener productos puros a partir de los extractos orgánicos, utilizando técnicas cromatográficas (Cromatografía en fase reversa, cromatografía de exclusión molecular Sephadex, Cromatografía en Capa Fina) y analíticas (Resonancia Magnética Nuclear).
- Análisis de la actividad biológica que presentan los extractos/fracciones/productos obtenidos, frente a microorganismos diana.

Este trabajo de fin de grado se ha desarrollado en el Grupo de Química de Productos Marinos del Departamento de Fitoquímica Aplicada y Ecología Química del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología del CSIC.

3. INTRODUCCIÓN

El medio marino representa la gran mayoría de la superficie terrestre, influye enormemente en el clima a nivel global, y aloja multitud de hábitats que dan sustento a una abrumadora variedad de seres vivos, que componen una biomasa enorme.

A pesar de ser un medio tan extenso, es en gran parte desconocido por el ser humano; como muestra de ello, se estima que tan solo el 2% de los fondos marinos han sido cartografiados. Este desconocimiento incluye a los seres que habitan en las aguas, seres que, desde el punto de vista bioquímico, suponen una ventana a nuevos productos naturales, muchos de ellos con potencial actividad biológica (antiviral, antimicrobiana, antitumoral...) y por lo tanto, con posibles aplicaciones en campos como la agricultura o la medicina.

A partir de la década de 1970, el creciente interés en la exploración del entorno marino, unido al auge del buceo, y al surgimiento de nuevos métodos y tecnologías tales como sumergibles tripulados o remotos, permitieron el descubrimiento de miles de nuevas moléculas bioactivas (Dias *et al.* 2012). Además, cada año se identifican por primera vez, de media, más de mil productos: 1378 en el año 2014 (Blunt *et al.* 2016), 1340 en el año 2015 (Blunt *et al.* 2017) y 1277 durante el 2016 (Blunt *et al.* 2018). Durante el año 2013, 7 de estos productos bioactivos eran usados y comercializados en tratamientos médicos, y otros 10 se encontraban en fase de prueba (Martins *et al.* 2014).

En este estudio hemos trabajado con microorganismos, en concreto bacterias obligadamente marinas, aisladas a partir de sedimentos costeros. El estudio de las bacterias de origen marino es un campo en continuo auge, que ha recibido una atención creciente como fuente de metabolitos secundarios bioactivos (Waters *et al.* 2010). Además, la obtención de productos a partir de la fermentación de los microorganismos es más rentable y sostenible, en comparación con el cultivo de macroorganismos, que presentan, por lo general, un crecimiento más lento (Waters *et al.* 2010). A diferencia de la mayoría de macroorganismos, éstos pueden cultivarse repetidamente en el laboratorio, por lo que no es necesario acudir continuamente al mar para su recolección.

En el medio marino existe una gran variedad de microorganismos, con una concentración estimada de más de un millón por mililitro de agua. En general, los grupos con mayor presencia en los océanos son las Proteobacterias, que incluye a más de la mitad de procariotas marinos; las Cianobacterias, y los Bacteroidetes (Madigan *et al.* 2015).

Al contrario que los invertebrados marinos, que están claramente definidos, existe un debate acerca de cuándo un microorganismo puede considerarse auténticamente marino, ya que del medio marino se aíslan cepas que pertenecen a especies típicamente terrestres. Las bacterias marinas están definidas por su requerimiento de agua marina, más específicamente por su necesidad de sodio (Macleod. 1965). La necesidad de encontrar nuevas sustancias activas frente bacterias resistentes a los antibióticos y para el tratamiento de otras enfermedades crónicas, unido al reislamiento de moléculas previamente conocidas aisladas de microorganismos terrestres, ha conducido al interés por explorar bacterias de ambientes poco estudiados, basándose en la premisa de que la adaptación a esos ambientes incluye el desarrollo de una maquinaria enzimática capaz de producir nuevos metabolitos secundarios (Letzel *et al.* 2013). En este contexto las bacterias marinas (obligadamente marinas) se presentan como una fuente de nuevas sustancias bioactivas y existen algunos ejemplos en la literatura que lo certifican (Jensen *et al.* 2015) (Williams. 2009).

Para este trabajo se seleccionaron tres cepas obligadamente marinas de la colección del GQPM del IPNA cuya clasificación taxonómica había sido determinada previamente. Dos de ellas del género *Marinobacter*, un grupo perteneciente al orden de las Alteromonadales, dentro de la clase de las Gamma-Proteobacterias: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (cepa CB08035) y *Marinobacter litoralis* (cepa CB08036). De *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, se han obtenido recientemente surfactantes relacionados con la solubilización de hidrocarburos (Zenati *et al.* 2018.). Mientras que de *Marinobacter litoralis*, se han aislado recientemente lipopolisacáridos que mostraron diversas actividades frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Sardar *et al.* 2015). La tercera cepa (cepa CB08016) pertenece a la especie *Roseomonas vinacea*, una Alfaproteobacteria perteneciente al grupo de las productoras de ácido acético (*Acetobacteraceae*), dentro de las Rhodospirillales. (Madigan *et al.* 2015).

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 para ^1H (500 MHz) ^{13}C (125.7 MHz). Los experimentos que se realizaron fueron:

- RMN de ^1H
- RMN de ^{13}C

-Experimento Mejoramiento sin Distorsión por Transferencia de Polarización (DEPT por sus siglas en inglés)

-Experimento de Coherencia Heteronuclear Cuántica Simple (HSQC por sus siglas en inglés)

-Experimento de Conectividad Heteronuclear a Enlaces Múltiples (HMBC por sus siglas en inglés)

Para la adquisición de los datos fue empleado cloroformo deuterado como disolvente y cloroformo como patrón de referencia interna (δ_H 7.25 ppm; δ_C 77.0 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: Esta técnica se desarrolló siguiendo la metodología descrita por Blunt *et al.* (1987). La fase estacionaria utilizada fue Gel de sílice 100 C 18 (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 eluyente metanol 100%.

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:

Oleum: pulverización con una disolución $H_2SO_4:H_2O:AcOH$ (1:4:20) y posterior calentamiento.

Detección por fluorescencia empleando una lámpara UV Vilbert Lourmat a una longitud de onda de 254 nm.

4.3 Cultivo de microorganismos

Para la manipulación de los medios de cultivo y microorganismos se utilizó una campana de bioseguridad (Telstar Bio-II-A/G), evitando de esta manera los problemas de contaminación microbiológica.

4.3.1 Cultivo en medio sólido

Las cepas seleccionadas, CB08016, CB08035 y CB08036, se encontraban criopreservadas a -80°C en viales en una solución de glicerol al 20%.

Las bacterias fueron reavivadas mediante su descongelación y siembra en los medios de aislamiento e incubación posterior. Para la siembra en placas se utilizó el método de siembra por agotamiento (en estrías) que facilitó la obtención de colonias aisladas y se dejaron crecer en una cámara de cultivo a 25°C durante una semana.

La preparación de los medios sólidos se llevó a cabo disolviendo sus componentes en agua de mar artificial, fabricada con sales marinas (Sigma S9883, 30.0 g/L) y agregando agar hasta una concentración de 15.0 g/L en la composición del medio correspondiente antes de su esterilización.

Los medios fueron dispensados en placas de Petri (aproximadamente 25 ml/placa) después de que se hubieran enfriado lo suficiente (45°C aproximadamente), para evitar así, la formación de gotas de agua por condensación sobre la tapa del recipiente.

La composición de los medios *Starch Casein Agar* (SCA) y *Starch Yeast Peptone Agar* (SYPA) utilizados para el crecimiento de los aislados, se muestra en las siguientes tablas:

Tabla 4.3.1.1. Medio SCA (300 ml)

Caseína	0.3 g
Almidón	3.0 g
Agar	4.5 g
Agua de mar	300 ml

Tabla 4.3.1.2. Medio SYPA (300 ml)

Extracto de levadura	1.2 g
Peptona de pescado	0.6 g
Almidón	3.0 g
Agar	4.5 g

4.3.2. Cultivo en medio líquido

Los cultivos en medio líquido se iniciaron a partir de precultivos en placas de Petri. Los cultivos en medio líquido se realizaron en agitación en un agitador orbital (Agitador orbital Certomat R Sartorius) a 150 revoluciones por minuto (rpm) y 25°C durante 15 días.

La preparación de los medios líquidos se llevó a cabo disolviendo sus componentes en agua de mar artificial, fabricada con sales marinas, (Sigma S9883, 30 g/L) en Erlenmeyers de 3L de capacidad. Se prepararon, por cada cepa, dos Erlenmeyers con 1L de medio, que fueron esterilizados en autoclave (1 kg/cm², 20 min, 121°C). Después de que se hubieran enfriado a temperatura ambiente cada bacteria se inoculó en medio líquido.

Tabla 4.3.2. Especie a la que pertenece cada cepa y medio en la que fue cultivada.

CEPA	MEDIO	ESPECIE
CB08036	SCA (2L)	<i>Marinobacter litoralis</i>
CB08035	SCA (2L)/SYPA (2L)	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>
CB08016	SYPA (2L)	<i>Roseomonas vinacea</i>

4.3.3 Extracción

Concluido el periodo de fermentación el caldo se separó de la masa celular mediante filtración y se llevó a cabo la extracción con acetato de etilo, renovando el disolvente hasta un total de tres veces. Una vez finalizada la operación de extracción las fases orgánicas reunidas fueron tratadas con un agente desecante, sulfato de sodio anhidro, se filtró la suspensión resultante y finalmente se eliminó el disolvente orgánico por rotoevaporación, empleando un rotavapor Buchi (Waterbath B-480). De esta forma se obtuvieron los extractos crudos.

A continuación, se muestra en una tabla la cantidad de extracto (en miligramos) obtenido para cada cepa:

Tabla 4.3.3. Cantidad de extracto obtenido por cepa.

CEPA	PESO (mg)
CB08035 (SYPA) (<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>)	358.0 mg
CB08035 (SCA) (<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>)	184.5 mg
CB08036 (<i>Marinobacter litoralis</i>)	89.1 mg
CB08016 (<i>Roseomonas vinacea</i>)	189.2 mg

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 la Cepa CB08035 (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*) cultivada en medio SYPA (358.0 mg).



Figura 4.3.3. Proceso de extracción de las fases orgánicas.

4.4 Estudio cromatográfico de la Cepa CB08035 SYPA (*M. hydrocarbonoclasticus*)

El extracto crudo de CB08035 SYPA (358.0 mg) fue fraccionado mediante cromatografía en columna, en fase reversa. El soporte usado fue gel de sílice 100 C-18, y el extracto fue incorporado a la columna adsorbido en el mismo soporte. Como fase móvil fueron usados 100 ml de agua, mezclas de agua y metanol, metanol al 100% y diclorometano al 100%. Fueron obtenidas 8 fracciones en erlenmeyers de 250 ml, desde donde fueron trasvasadas a viales pesados.

Cada una de las 8 fracciones obtenidas a partir del extracto crudo fue analizada mediante RMN de ^1H y por cromatografías en placa fina (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 de las capas finas, se usó el reactivo Oleum.

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

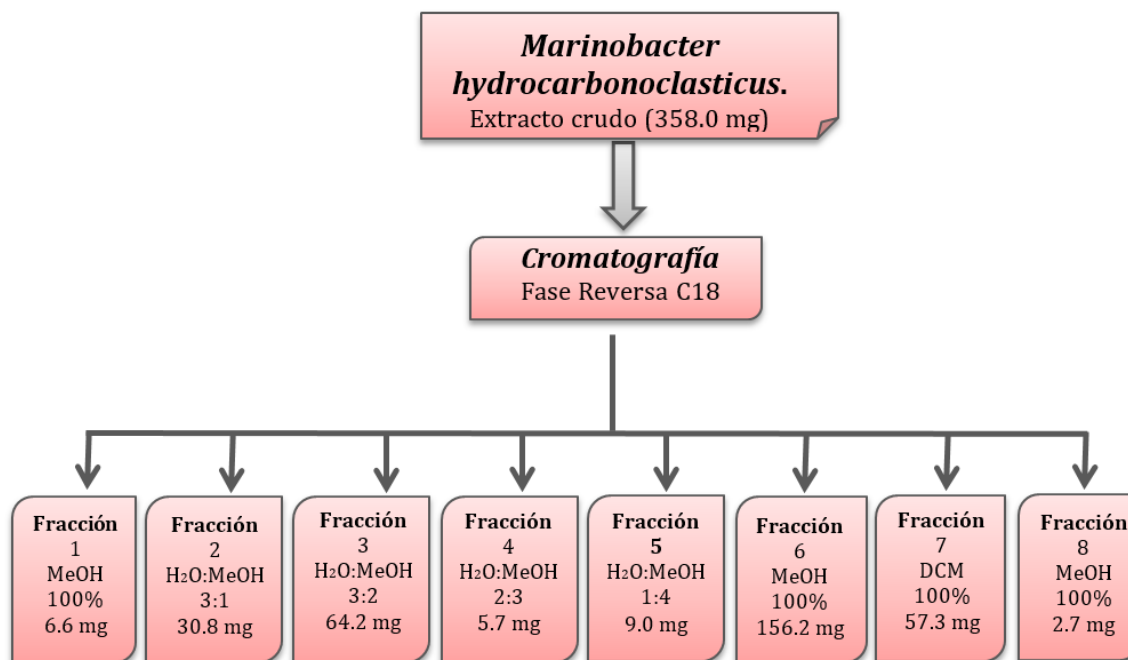


Figura 4.4. Fracciones obtenidas a partir del crudo. Peso expresado en mg.

4.4.1 Estudio de la fracción 2 (H₂O:MeOH 3:1, 30.8 mg)

La muestra se fraccionó utilizando una columna de exclusión molecular Sephadex LH-20 (\emptyset_{int} = 2.5 cm y h_{gel} = 20.0 cm) eluida con MeOH 100% obteniéndose 11 fracciones. El seguimiento de la separación se realizó por CCF y RMN de ¹H.

Los datos de RMN de ¹H y CCF, nos indicaron que la F2 (18) (0.5 mg) contenía un compuesto puro, que denominamos **P-1**, aislado anteriormente en el laboratorio, y cuya estructura se estableció por comparación de sus datos de RMN con los previamente publicados por Davis *et al.* (2005).

Por otra parte, la fracción F2 (14) (7.6 mg) consistía en una mezcla de dos compuestos mayoritarios, **P-2** y **P-3**. Posteriormente, observamos que **P-2** también fue aislado del estudio cromatográfico de F3 [H₂O:MeOH 3:2, (64.2 mg)] (ver apartado siguiente), por lo que procedimos al estudio por RMN de la mezcla de los dos compuestos mediante experimentos de RMN en 1D y 2D.

4.4.1 Estudio de la fracción 3 (H₂O:MeOH 3:2, 64.2 mg)

La muestra se fraccionó utilizando una columna de exclusión molecular Sephadex LH-20 (\emptyset_{int} = 2.5 cm y h_{gel} = 20.0 cm) eluida con MeOH 100% obteniéndose 7 fracciones. El seguimiento de la separación se realizó por CCF y RMN de ¹H.

Los datos de RMN de ^1H y CCF, nos indicaron la presencia del compuesto **P-2** puro en la fracción F3 (14+15) (32.9 mg), por lo que procedimos a su elucidación estructural mediante experimentos de RMN en 1D y 2D.



Figura 4.4.1. Fraccionamiento de la F-3 por Sephadex

4.5 Análisis de la actividad biológica de los extractos, fracciones y productos.

Paralelamente al trabajo de fraccionamiento, se reservó una pequeña cantidad de varias muestras para realizarles un ensayo de bioactividad antimicrobiana, llevado a cabo por el Servicio de Actividad Biológica del IPNA-CSIC. En la siguiente tabla se detallan las muestras y la cantidad (expresada en microgramos (μg)) ensayada para cada una de ellas:

Tabla 4.5.1. Muestras extractos crudos

Muestra	Cantidad
CB08016 SYPA	$1.6 \times 10^3 \mu\text{g}$
CB08035 SYPA	$2.3 \times 10^3 \mu\text{g}$
CB08035 SCA	$2.3 \times 10^3 \mu\text{g}$
CB08036 SCA	$1.9 \times 10^3 \mu\text{g}$

Tabla 4.5.2. Muestras CB08035 SYPA

Muestra	Cantidad
F-1	$1.7 \times 10^3 \mu\text{g}$
F-4	$2.1 \times 10^3 \mu\text{g}$
F-5	$1.4 \times 10^3 \mu\text{g}$
F-6	$1.4 \times 10^3 \mu\text{g}$
F-7	$3.9 \times 10^3 \mu\text{g}$
F-8	$2.1 \times 10^3 \mu\text{g}$
P-2	$2.1 \times 10^3 \mu\text{g}$

En dicho ensayo se determinó la actividad antimicrobiana frente a las siguientes cepas:

- Escherichia coli* ATCC 25922
- Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- Campylobacter jejuni* ATCC 33560

El análisis de actividad biológica se basa en una prueba cualitativa, la cual se manifiesta a través de la observación de un halo de inhibición. El protocolo seguido para la realización del ensayo es una adaptación del descrito por Matuschek *et al.* (2014).

El proceso se resume a continuación:

- Se inocula la cepa frente a la que se pretende testar la actividad biológica en una placa de Petri. Se deja crecer durante 30 minutos.
- Acto seguido, se añade 1 µL de una disolución con nuestra muestra.
- Se realizan tanto un control negativo (1 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO)) como uno positivo, con un antibiótico de referencia que presente actividad frente a la cepa con la que estamos ensayando.
- Tras 18 horas, se observa la placa, y se determina si ha aparecido o no un halo de inhibición en torno al lugar donde se añadió el extracto.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación de productos

5.1.1 Identificación de P-2

El compuesto **P-2** fue aislado como un aceite amarillento, que formaba agregados.

En su espectro RMN de ^{13}C (ver espectros de P-2 en Anexo B) se observan señales para ocho átomos de carbono cuyas multiplicidades se determinaron por experimentos DEPT: un metileno, señales para cinco metinos y dos carbonos cuaternarios (uno carboxílico, δ_{C} 177.9 ppm). El experimento HSQC nos permite unir cada carbono no cuaternario con los protones a

los que está unido directamente, tal y como se observa en la tabla 5.1. Los datos analizados sugieren que **P-2** debe contener un anillo aromático que presenta una sola posición sustituida. Las correlaciones HMBC a dos enlaces de C-1 y C-3 con H₂-2, permiten conectar el grupo carboxílico a C-2, por otra parte, las correlaciones a tres enlaces de C-4 y C-8 con H₂-2 nos permiten la conexión de C-2 y C-3. La estructura de **P-2** fue confirmada por comparación de sus datos espectroscópicos con los del ácido fenilacético aislado previamente (Hwang *et al.* 2001).

Tabla 5.1.1 Datos de RMN de ¹H, ¹³C y HMBC de **P-2** [500 MHz, δ ppm, (J), CDCl₃]

#	δ _C	δ _H	HMBC
1	177.9, C	---	
2	41.2, CH ₂	3.61 (s)	C-1, C-3, C-4, C-8
3	133.4, C	---	
4	129.5, CH	7.25 (m)	
5	128.8, CH	7.30 (m)	C-3, C-7
6	127.5, CH	7.25 (m)	
7	128.8, CH	7.30 (m)	C-3, C-5
8	129.5, CH	7.25 (m)	

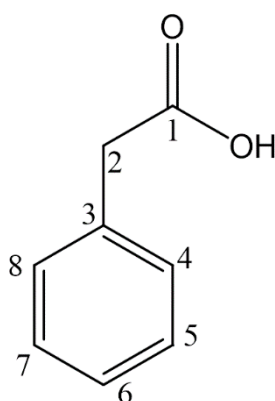


Figura 5.1. Ácido fenilacético (**P-2**).

5.1.2 Identificación de **P-3**

Una vez identificado **P-2**, los datos de RMN de la mezcla F-2(14), nos permitieron determinar la estructura de **P-3** por comparación de sus datos espectroscópicos con los del ácido 4-hidroxifenilacético (Behrens *et al.* 2014)

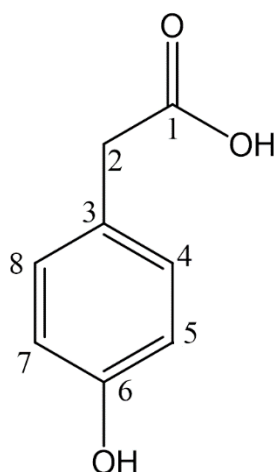


Figura 5.2. Ácido 4-hidroxifenilacético (**P-3**).

5.1.3 Identificación de P-1

El compuesto **P-1** fue identificado como el ácido 3-cloro-4-hidroxifenilacético, por comparación de sus datos espectroscópicos con los de un producto previamente aislado en el laboratorio y descrito anteriormente en la literatura científica (Davis *et al.* 2005).

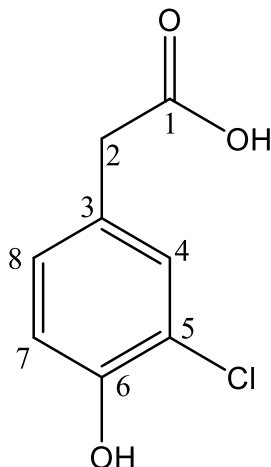


Figura 5.3. ácido 3-cloro-4-hidroxifenilacético (**P-1**)

5.2 Resultados análisis actividad biológica de las muestras.

Se realizó el ensayo de actividad antimicrobiana de los cuatro extractos obtenidos en este estudio y de seis de las ocho fracciones obtenidas de la cromatografía en fase reversa del extracto de CB08035 SYPA, así como del producto P-2, frente un panel de bacterias gram positivas y negativas (material y métodos). En la siguiente tabla, pueden observarse los resultados de dicho ensayo:

Tabla 5.2. Resultados de actividad antimicrobiana

Muestra	Concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>
CB08035 SCA	23	-	-	-	+	-
CB08035 SYPA	23	-	-	-	+	-
CB08016 SYPA	16	-	-	-	+	-
CB08036 SCA	19	-	-	-	+	-
CB08035 SYPA F-1	17	-	-	-	+	-
CB08035 SYPA F-4	21	+	+	-	-	+
CB08035 SYPA F-5	14	+	+	-	-	+
CB08035 SYPA F-6	14	-	+	-	+	-
CB08035 SYPA F-7	39	-	-	-	+	-
CB08035 SYPA F-8	21	-	-	-	+	-
P-2	21	-	-	-	++	-

Leyenda:

+ = con actividad / - = sin actividad

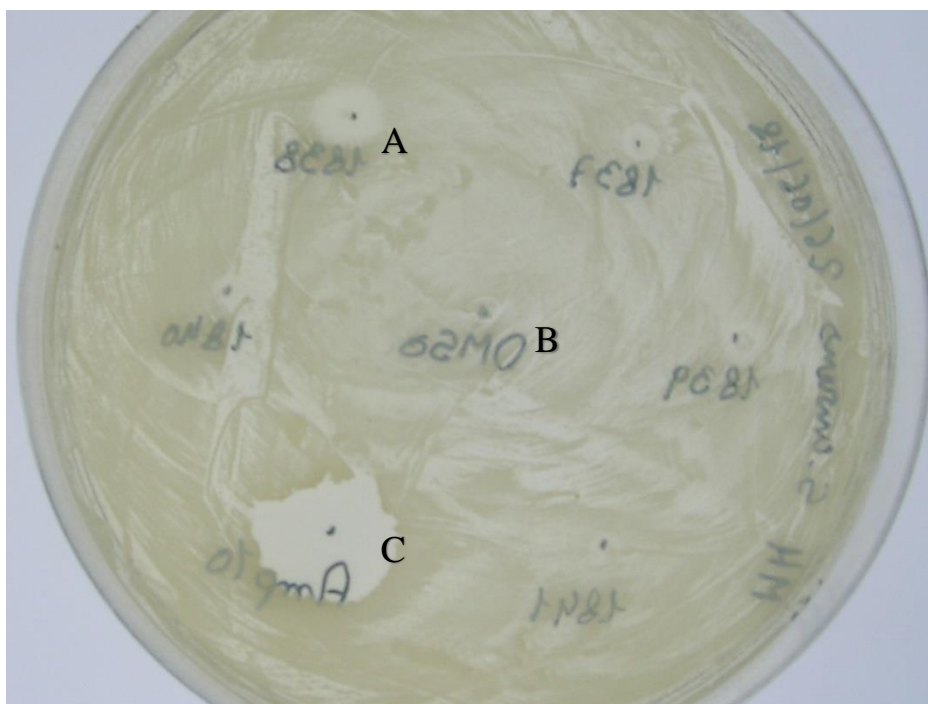


Figura 5.2. Halo de inhibición producido por 1 μ l de la fracción CB08035 SYPA F5 (14 μ g) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (A) comparado con el halo producido por 10 μ g del antibiótico control, ampicilina (C). En B se muestra el efecto, sin halo, del disolvente DMSO.

5.3 Discusión

Basándonos en la cantidad de extracto crudo obtenido para cada cepa, podemos destacar, y dado que se ha cultivado el mismo volumen para todas ellas, el buen rendimiento que ha ofrecido la cepa CB08035 (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus*) cultivada en medio SYPA, en comparación con las demás. Se ha comprobado, además, que el medio en el que las bacterias se desarrollan influye enormemente tanto en el crecimiento, como en los productos obtenidos y su cantidad, muestra de ello son las grandes diferencias entre la cepa CB08035 cultivada en medio SYPA y en medio SCA. A partir de estos datos podemos suponer, que, en la inmensidad del medio marino, una misma especie de bacteria puede encontrarse bajo una gran variedad de condiciones, en términos de nutrientes, temperatura, competencia, ... y que por lo tanto será capaz de producir un amplio abanico de moléculas en respuesta a estas condiciones; de esta manera, el potencial que presentan estos organismos para la búsqueda de nuevos productos es extremadamente elevado.

En cuanto a la cepa estudiada (CB08035 SYPA) llama la atención la cantidad de ácidos grasos que presenta el extracto crudo y que se concentran mayoritariamente en las fracciones 6 y 7, y que sumaban más de la mitad de la cantidad total del extracto (213.5 mg/358.0 mg).

Así mismo, también resulta interesante que el principal producto que se ha obtenido (ácido fenilacético) suponga casi el diez por ciento de la masa del extracto crudo; esto parece indicar que este producto juega un importante papel en la vida de esta cepa, además, que los otros dos productos identificados sean derivados del ácido fenilacético (ácido 4-hidroxifenilacético y ácido 3-cloro-4-hidroxifenilacético) respalda esta suposición.

En lo referente a los resultados del ensayo de actividad antimicrobiana, en la tabla 5.2 se observa que todos los extractos crudos producidos presentan actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

De los resultados de actividad de **P-2** y de las fracciones obtenidas del estudio químico de CB08035 SYP, destaca que la actividad de **P-2** frente a *P. aeruginosa* es mayor que la del extracto crudo del que fue aislado. Además, las fracciones F-1, F-6, F-7 y F-8, obtenidas del mismo extracto, también presentan actividad frente a *P. aeruginosa*, por lo tanto, serían fracciones interesantes para continuar con su estudio químico ya que sus CCF y su espectros de RMN de ^1H nos indican que deben contener productos con estructuras químicas diferentes a **P-2**. Destaca la actividad de las fracciones F-4 y F-5 frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Campylobacter jejuni*, pero no frente a *P. aeruginosa*; esto indica que este extracto es rico en sustancias con actividad antimicrobiana frente a un variado panel de bacterias y todas las fracciones obtenidas a partir de la primera cromatografía deberían ser estudiadas en un procedimiento de purificación bioguiada.

De cara a futuros estudios de actividad biológica de los productos **P-1**, **P-2** y **P-3**, y debido a que son productos ya conocidos, convendría realizar en primer lugar una búsqueda de la bibliografía científica existente, para así evaluar la posibilidad de continuar investigando, y si así fuera, de qué modo se abordaría el estudio. En estos casos, es necesario comprobar si los productos que pretendemos investigar han resultado citotóxicos en algún ensayo, puesto que esto supondría su descarte. En todo caso, y si las hubiera, se podrían relacionar las actividades de estos productos con sus respectivas estructuras químicas, algo especialmente interesante en este caso, puesto que sus diferencias estructurales son mínimas. Así mismo, hay que tener en cuenta que este es un ensayo cualitativo, así que **P-2** debería ser sometido a un ensayo cuantitativo para poder determinar su concentración mínima inhibitoria MIC frente *P. aeruginosa*.

6. CONCLUSIONES

Tras analizar los resultados obtenidos, hemos llegado a varias conclusiones:

- El medio en el que se desarrolla una cepa es determinante para el rendimiento de la misma.
- Tanto los ácidos grasos como el ácido fenilacético y derivados suponen la mayor parte de la fracción orgánica de la cepa CB08035, cultivada en medio SYPA.
- La cepa CB08035 SYPA (*M. hydrocarbonoclasticus*) según lo observado para varias de sus fracciones, presenta actividad frente a un panel de bacterias gram positivas y gram negativas. Los productos responsables de esta actividad deben ser identificados en estudios posteriores.
- El ácido fenilacético es uno de los responsables de la actividad presentada por CB08035 SYPA frente a *P. aeruginosa*; sin embargo, existen otros productos que también presentan actividad frente a *P. aeruginosa* y que deben identificarse en futuros estudios.
- Los resultados de actividad de los extractos crudos no son determinantes para definir si una cepa presenta productos activos o no. Por ello es necesario evaluar la actividad biológica de las fracciones.

6.1 Conclusions

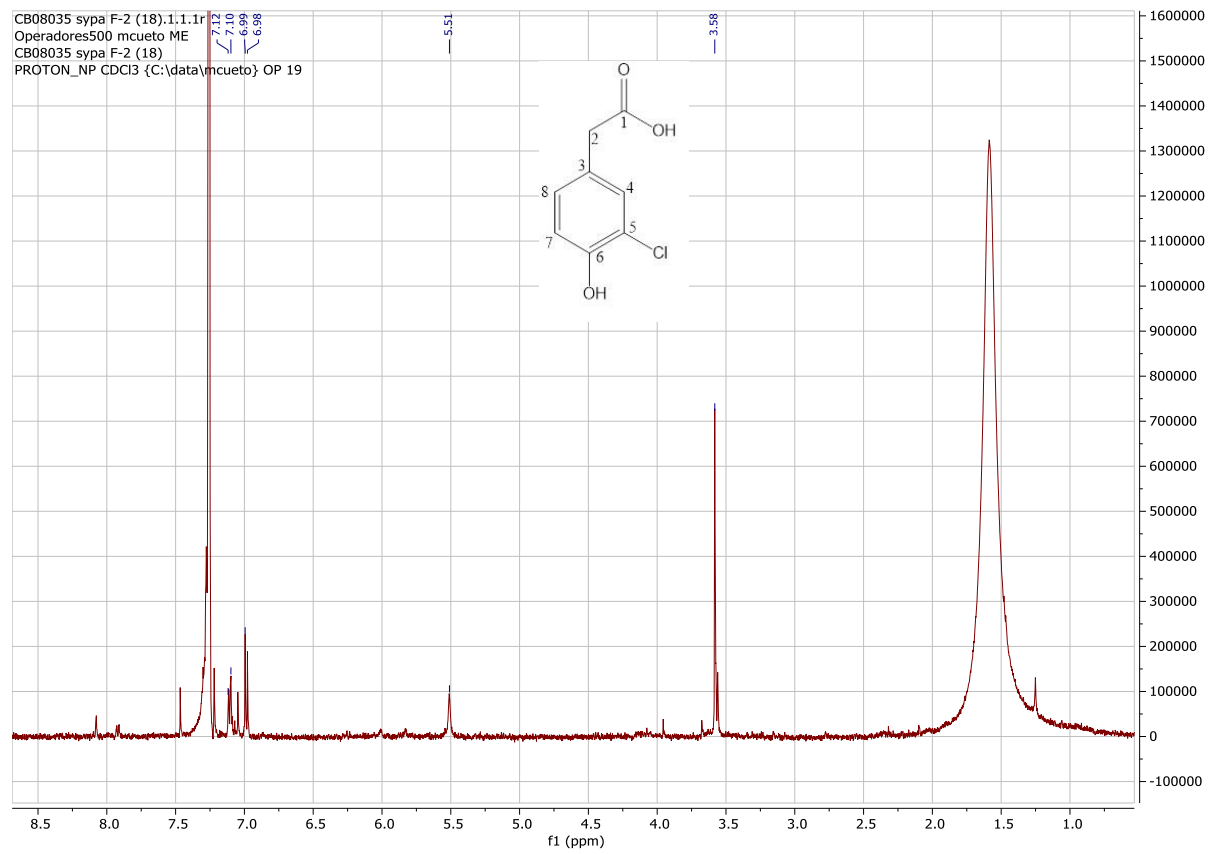
After analyzing the obtained results, we have reached several conclusions:

- The culture medium where a strain grows is determinant to its performance.
- Both fatty acids and phenylacetic acid and derivatives account for most of the organic fraction of strain CB08035, grown in SYPA medium.
- As seen for some of its fractions, the strain CB08035 SYPA (*M. hydrocarbonoclasticus*) is active against four strains of gram-positive and gram-negative bacteria. The responsible products must be identified in subsequent studies.
- Phenylacetic acid is one of the compounds responsible of the activity of CB08035 SYPA extract against *P. aeruginosa*; however, the extract possesses other antimicrobial products that must be identified in future studies.
- Activity results obtained from the crude extracts are not determinant to define if a strain has active compounds or not. It is necessary to test the biological activity of the fractions.

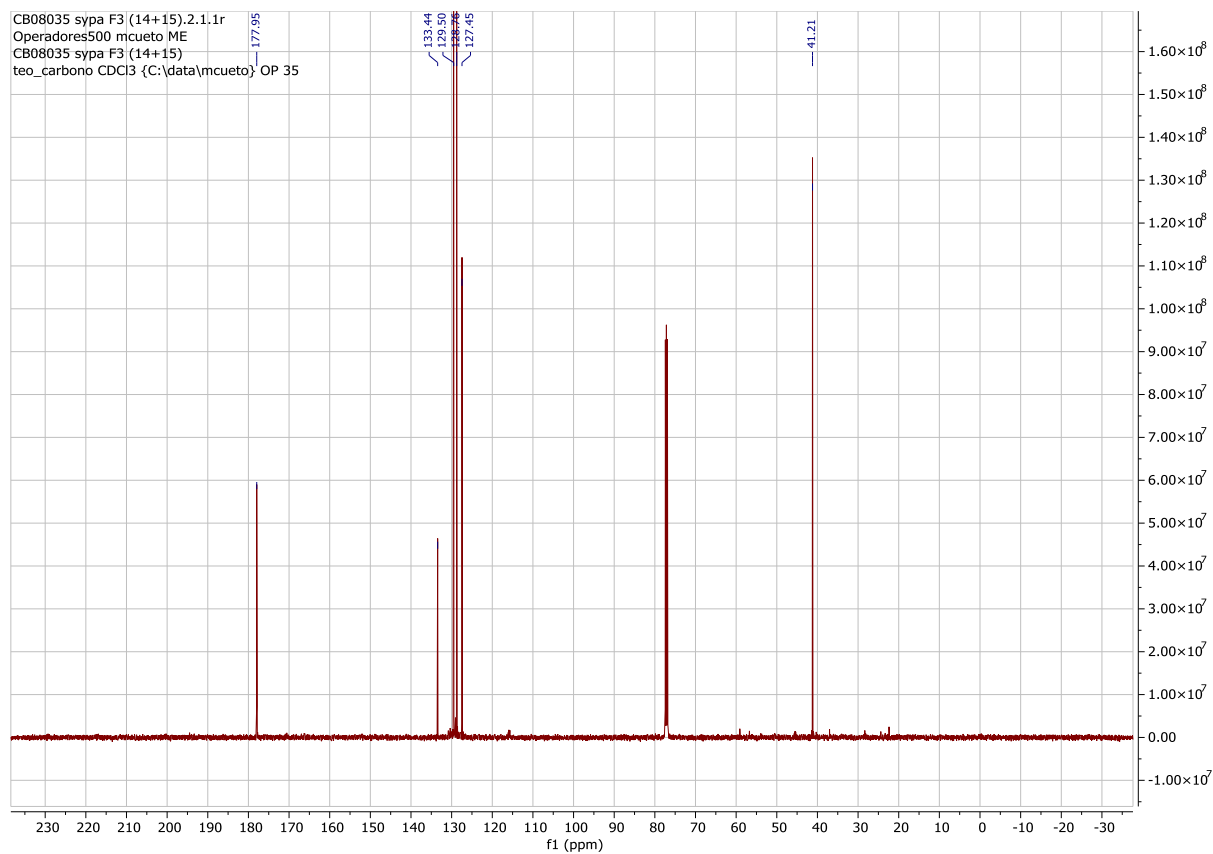
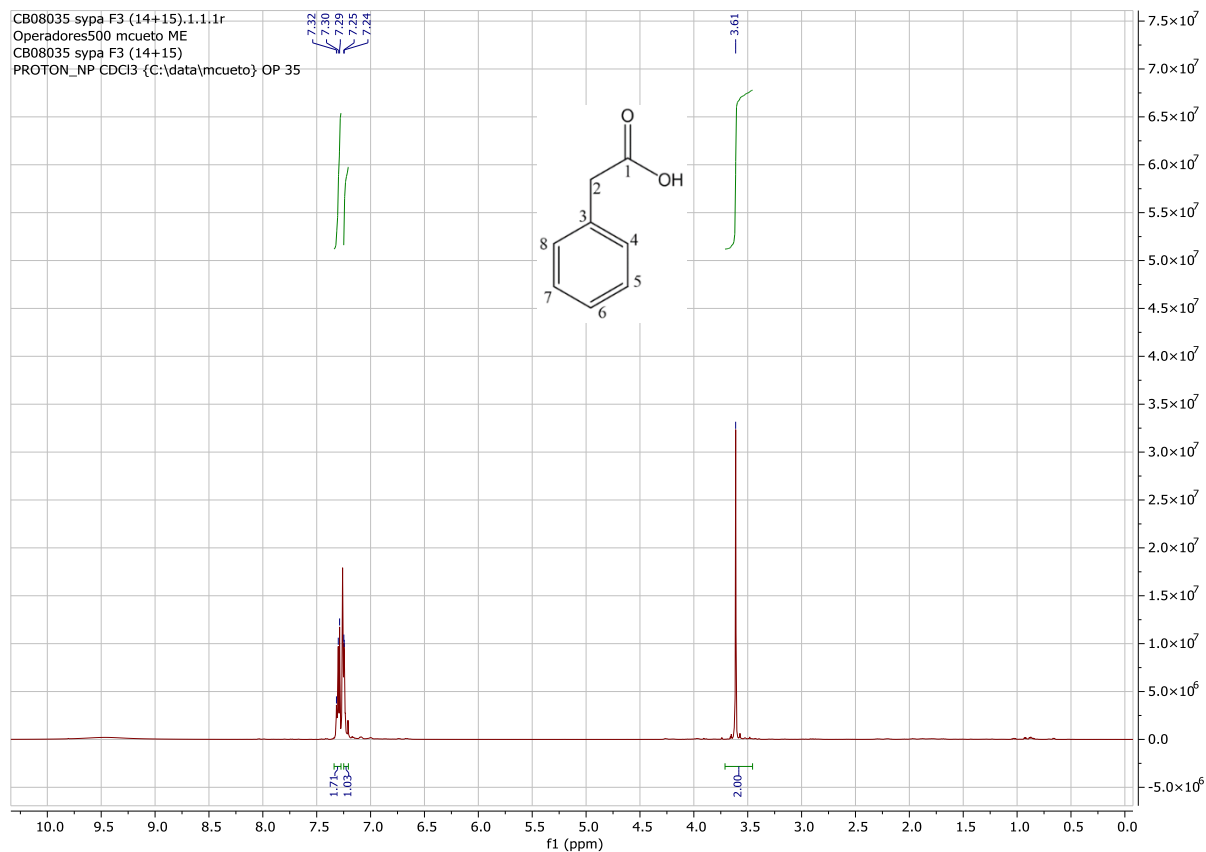
6. BIBLIOGRAFÍA

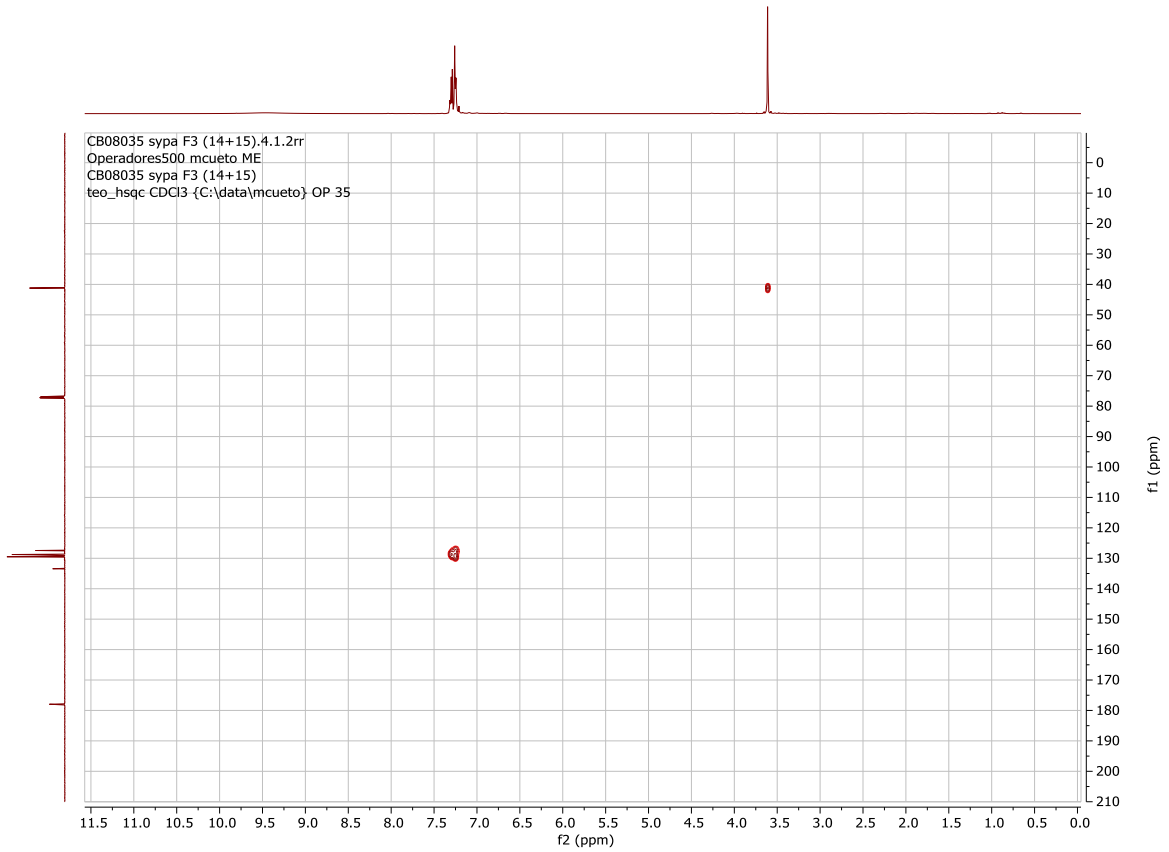
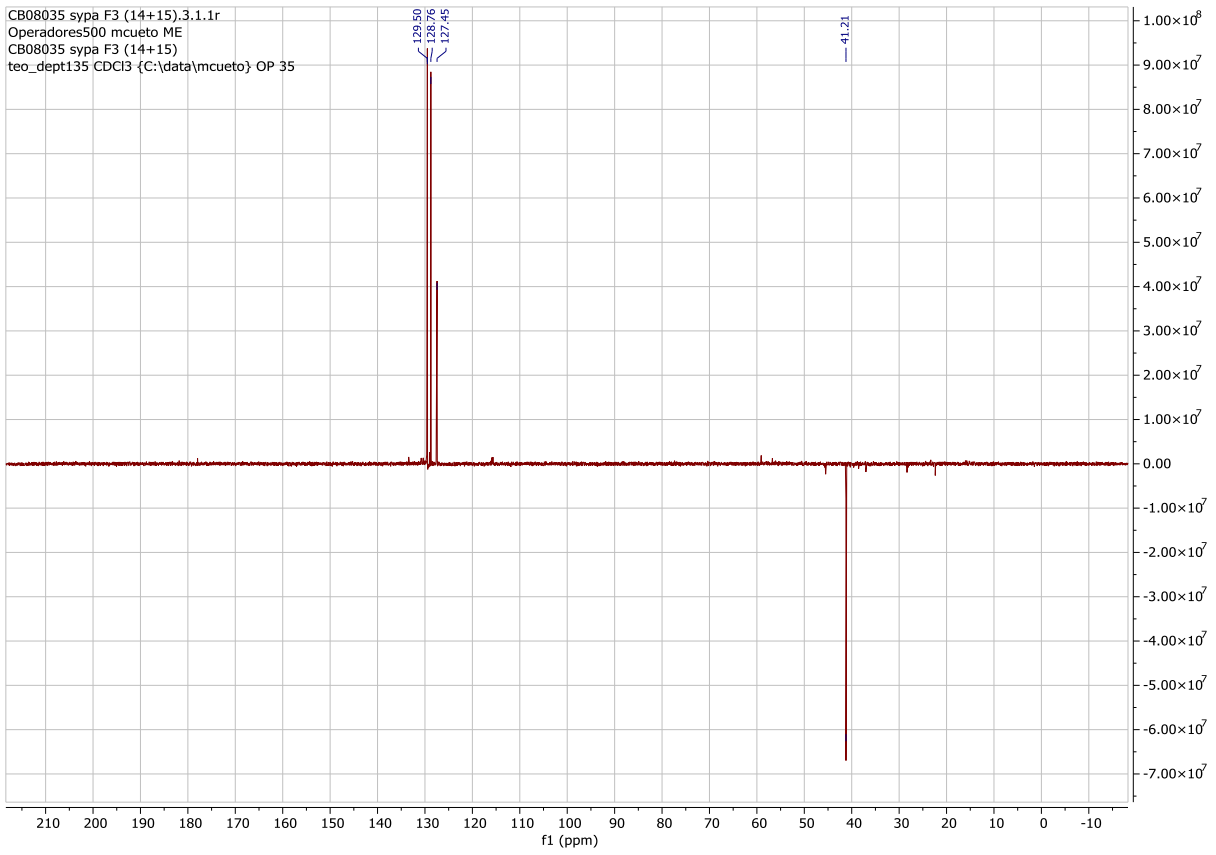
- Behrens, M., Frank, O., Rawel, H., Ahuja, G., Potting, C., Hofmann, T., Meyerhof, W., & Sigrun, K. (2014). ORA1, a Zebrafish Olfactory Receptor Ancestral to All Mammalian *VIR* Genes, Recognizes 4-Hydroxyphenylacetic Acid, a Putative Reproductive Pheromone. *Journal of Biological Chemistry*, 289, 19778-19788.
- Blunt, J. W., Calder, V. L., Fenwick, G. D., Lake, R. J., McCombs, J. D., Munro, M. H., & Perry, N. B. (1987). Reverse Phase Flash Chromatography: A Method for the Rapid Partitioning of Natural Products Extracts. *Journal of Natural Products*, 50(2), 290-292.
- Blunt, J. W., Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., & Prinsep, M. R. (2017). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 33, 382-431.
- Blunt, J. W., Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., & Prinsep, M. R. (2018). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 35, 8-53.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H., & Prinsep, M. R. (2016). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 32, 116-211.
- Davis, R. A., Watters, D., Healy, P. C. (2005). The isolation and synthesis of 3-chloro-4-hydroxyphenylacetamide produced by a plant-associated microfungus of the genus *Xylaria*. *Tetrahedron Letters*, 46, 919 – 921.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336.
- Hwang, B. K., Lim, S. W., Kim, B. S., Lee, J. Y., & Moon, S. S. (2001). Isolation and In Vivo and In Vitro Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(8), 3739-3745.
- Jensen, P. R., Moore, B. S., Fenical, W. (2015). The marine actinomycete genus *Salinispora*: a model organism for secondary metabolite discovery. *Natural Products Review* 32, 738-751.
- Letzel, A-C., Pidot, S. J., Hertweck C. (2013). A genomic approach to the cryptic secondary metabolome of the anaerobic world. *Natural Products Report* 30, 392-428.
- Macleod, R. A. (1965) The question of the existence of specific marine bacteria. *Bacteriol Rev.* 29, 9-23.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos (14ª Edición)*. Madrid: Pearson Educación, S.A.
- Malve, H. (2016). Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 8(2), 83–91.
- 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.
- Matuschek, E., Brown, D. F., & Kahlmeter, G. (2014). Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4), 255-266.
- Sardar, R. K., Kavita, K., & Jha, B. (2015). Lipopolysaccharide of *Marinobacter litoralis* inhibit swarming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Carbohydrate Polymers*, 123, 468-475.
- Waters, A. L., Hill, R. T., Place, A. R., & Hamann, M. T. (2010). The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(6), 780–786.
- Williams, P. (2009) Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol.*, 27, 45-52.
- Zenati, B., Chebbi, A., Badis, A., Eddouaouda, K., Boutoumi, H., El Hattab, M., Hentati, D., Chelbi, M., Sayadi, S., Chamkha, & M., Franzetti, A. (2018). A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 154, 100-107.

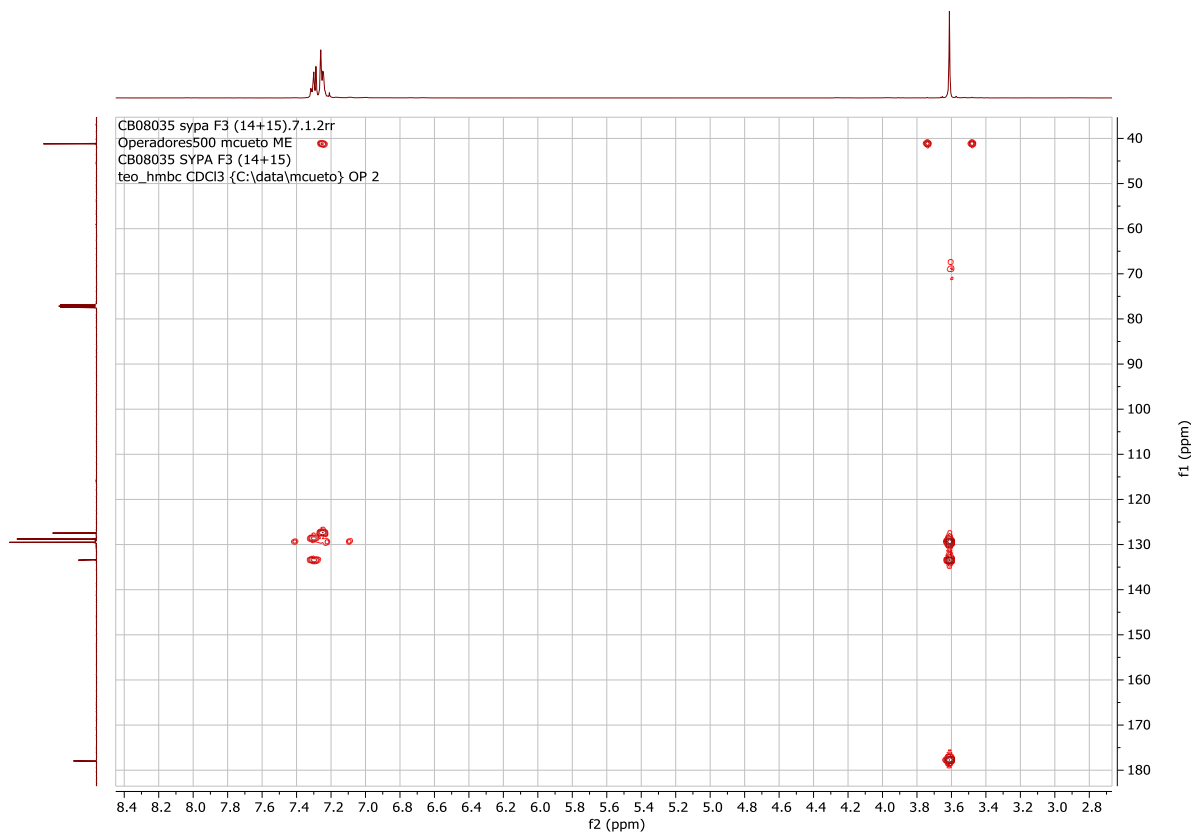
APÉNDICE A: ESPECTRO RMN DE P-1



APÉNDICE B: ESPECTROS RMN DE P-2.







APÉNDICE C: ESPECTROS RMN DE P-3.

