



**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ**

**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO (VIP)**

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**PROGRAMA CONJUNTO DE MAESTRÍA ACADÉMICA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS DEL**

**COCULTIVO DE *Pseudoalteromonas sp* VS. *Aspergillus fumigatus* y *Emericella***

***unguis***

**ANDRÉS RIVERA MONDRAGÓN**

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL**

**GRADO DE MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ**

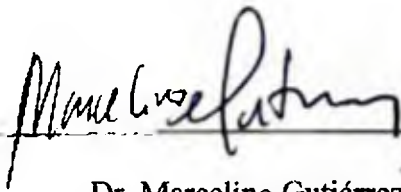
**2013**

18 MAR 2014

Ok.

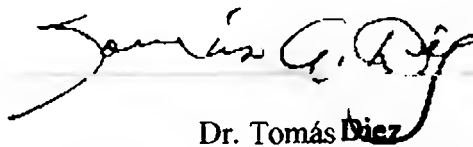
## HOJA DE APROBACIÓN

Los miembros del Jurado Calificador encargado de evaluar el Proyecto de Tesis titulado: “Actividad biológica de metabolitos secundarios obtenidos del cocultivo de *Pseudoalteromonas sp.* vs. *Aspergillus fumigatus* y *Emericella unguis*”, realizada en el Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP) por Andrés Rivera Mondragón, certifican de manera satisfactoria la calidad de este trabajo de investigación y recomiendan que sea publicada.



Dr. Marcelino Gutiérrez G.

Presidente del Jurado y Asesor de Tesis



Dr. Tomás Díez

Miembro del Jurado



Dr. Armando Durant

Miembro del Jurado

# **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo de investigación a Dios Todopoderoso y creador, quien siempre ha guiado mi camino y me ha dado la fortaleza para seguir adelante y no desmayar frente a las adversidades.

A mis padres por todo su amor. A quienes por su sacrificio y enseñanza atribuyo todos mis éxitos así como la perseverancia y coraje para alcanzar mis objetivos. A mi madre Silvana Mondragón por su apoyo, consejos y comprensión. A Edwin Rivera, mi padre, por su respaldo incondicional.

A mi hermano, Edwin Rivera, por estar siempre presente y acompañarme cuándo más necesitaba de su ayuda y solidaridad.

A toda mi familia por su voz de aliento.

# **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi gratitud al Dr Marcelino Gutiérrez G, mi asesor de tesis, por su sincero apoyo, dedicación y su gran capacidad para orientarme en el desarrollo de este trabajo de graduación. Ha sido un verdadero privilegio poder contar con su ayuda y guía. Quiero agradecer al Dr Jagannatha Rao K., director del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP), por autorizar la realización de mi proyecto de Tesis en los laboratorios de esta prestigiosa institución.

Al Dr. Tomás Díez, Coordinador del Programa de Maestría en Biotecnología, por impulsar hacia adelante con mucho esfuerzo y valentía a los estudiantes de este programa académico.

Agradezco profundamente, a mis compañeros de laboratorio y amigos Ricardo Santamaría, Juan Fernández y Melissa Macías por sus consejos, por escucharme, por soportarme y especialmente por su gran apoyo incondicional. Mi gratitud al equipo de profesionales de los laboratorios de Química y Microbiología. A Daniel Torres, Javier Ballesteros, Ana Salazar, Christopher Boya, Joel Sánchez y Librada Atencio por ofrecer una excelente atmósfera de trabajo y buena disposición a la colaboración.

Al Centro de Biología Celular y Molecular de Enfermedades de INDICASAT-AIP liderado por la Dra. Carmenza Spadafora por la evaluación de la actividad biológica de mis extractos.

Mi sincero agradecimiento al Dr. Armando Durant y Johant Lakey por sus sabios consejos.

*Y por encima de todo, y con todo mi cariño, gracias a mi familia por estar siempre conmigo todo este tiempo. ¡Gracias por todo!*

# **ÍNDICE GENERAL**

	<b>Página</b>
PORTADA. ....	1
APROBACIÓN DEL JURADO CALIFICADOR ..	11
DEDICATORIA. . . . .	111
AGRADECIMIENTO. . . . .	v
ÍNDICE GENERAL .. . . .	viii
ÍNDICE DE CUADROS . . . . .	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS . . . . .	xvi
ABREVIATURAS UTILIZADAS... ..	xxii
RESUMEN . . . . .	1
ABSTRACT . . . . .	4
1. Introducción. ... ..	7
2 Revisión bibliográfica. .... ..	11
2.1 Situación actual del Cáncer, Enfermedades Tropicales y Resistencia a antibióticos. La necesidad urgente de nuevos medicamentos . . . . .	12
2.1.1 Cáncer . . . . .	12
2.1.2. Las Enfermedades Tropicales desatendidas .. . . .	13
2.1.3. Antibióticos: Una breve descripción histórica ... ..	16
2.1.4. Resistencia a antibióticos y la urgencia de nuevos medicamentos .	18
2.2. Productos Naturales Una fuente prometedora para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos. . . . .	20

2.2.1 Hongos endófitos. . . . .	21
2.2.2. Bacterias asociadas a invertebrados marinos. . . . .	23
2.2.3. Cocultivos de microorganismos. Una estrategia útil para la producción de metabolitos secundarios no expresados en condiciones estándar de laboratorio.....	25
3 Objetivos.....	28
3.1 Objetivos Generales . . . . .	29
3.2 Objetivos Específicos. . . . .	29
4 Materiales . . . . .	30
4.1. Cristalería . . . . .	31
4.2 Materiales de laboratorio. . . . .	31
4.3. Reactivos . . . . .	32
4.4. Aparatos y Equipos . . . . .	33
5. Metodología . . . . .	36
5.1 Preparación de soluciones, medios de cultivos e inóculos bacterianos y fúngicos.. . . . .	37
5.1.1 Soluciones . . . . .	37
5.1.2. Medios de cultivo . . . . .	37
5.1.3. Inóculos bacterianos y fúngicos . . . . .	40
5.2 Colecta, aislamiento e identificación de microorganismos. . . . .	41
5.2.1. Bacterias asociadas a invertebrados marinos . . . . .	42
5.2.2. Hongos endófitos . . . . .	43

5.3	Fermentación de microorganismos en gran escala. . . . .	44
5.3.1	Cocultivos en medio líquido . . . . .	44
5.3.2	Cocultivos en medio sólido . . . . .	45
5.4	Extracción de los cocultivos. . . . .	46
5.4.1	Cocultivos en medio líquido . . . . .	46
5.4.2	Cocultivos en medio sólido. . . . .	46
5.5	Fraccionamiento por extracción en fase sólida (EFS)... . . . .	47
5.6	Evaluación de la actividad biológica .. . . .	48
5.6.1	Bioensayos anticancerígenos y contra enfermedades causadas por parásitos tropicales .. . . .	48
5.6.2	Bioensayos antimicrobianos . . . . .	49
5.7	Purificación de fracciones por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) . . . . .	54
5.8	Elucidación estructural de compuestos . . . . .	55
6	Resultados y Discusión.. . . .	57
6.1	Colecta, aislamiento e identificación de microorganismos .. . . .	58
6.1.1	<i>Pseudoalteromonas sp</i> (GA204) . . . . .	58
6.1.2	<i>Aspergillus fumigatus</i> (F0075) y <i>Emericella unguis</i> (F2803).. . . .	59
6.2	Fermentación, extracción y fraccionamiento de los cultivos en medio líquido y sólido.... . . . .	60
6.2.1	Fermentación . . . . .	60
6.2.2	Extracción y fraccionamiento . . . . .	62

6.3. Purificación y actividad biológica de los extractos.....	65
6.4. Elucidación estructural de los compuestos.....	72
6.4.1. Compuesto 1.....	72
6.4.2. Compuesto 2.....	77
6.4.3. Compuesto 3.....	82
6.4.4. Compuesto 4.....	86
6.4.5. Compuesto 5.....	91
6.5. Actividad Biológica de los compuestos .....	95
7. Conclusiones.....	99
8. Recomendaciones.....	101
9. Referencias Bibliográficas.....	102
10. Apéndice.....	109
10.1. Comparación de fracciones de los extractos de cultivos individuales y cocultivos de los microorganismos.....	110
10.2. Análisis de comparación de compuestos químicos aislados.....	115
10.3. Análisis bi-dimensional de resonancia magnética nuclear (RMN).....	122
10.4. Resultados de los bioensayos anticancerígenos y contra enfermedades causadas por parásitos tropicales.....	137

# **ÍNDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro 2.1.</b>	Compuestos bioactivos aislados de hongos endófitos. .... . . . .	23
<b>Cuadro 5.1.</b>	Esquema de inoculación de cultivos individuales y cocultivos en medio líquido. . . . .	44
<b>Cuadro 5.2.</b>	Fraccionamiento por extracción en fase sólida (EFS). .... . . . .	47
<b>Cuadro 5.3.</b>	Parámetros de los ensayos anticancerígeno y contra enfermedades tropicales . . . . .	48
<b>Cuadro 5.4.</b>	Preparación del plato de 96 pocillos para el ensayo antibacteriano . . . . .	51
<b>Cuadro 5.5.</b>	Preparación de discos para el ensayo antifúngico . . . . .	52
<b>Cuadro 5.6.</b>	Condiciones cromatográficas estándar para la purificación de fracciones activas..... . . . .	54
<b>Cuadro 5.7.</b>	Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) . . . . .	56
<b>Cuadro 6.1.</b>	Fraccionamiento de cultivos en medio líquido . . . . .	64
<b>Cuadro 6.2.</b>	Fraccionamiento de cultivos en medio sólido.. . . . .	64
<b>Cuadro 6.3.</b>	Metabolitos secundarios aislados de cocultivos en medio líquido y sólido . . . . .	51
<b>Cuadro 6.4.</b>	Comparación de los desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ -RMN de Gliotoxina y del compuesto 1. .... . . . .	75
<b>Cuadro 6.5.</b>	Comparación de desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ -RMN de Bis(metil)gliotoxina y del compuesto 2 .. .... . . . .	80
<b>Cuadro 6.6.</b>	Comparación de los desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ -RMN de isatín y del compuesto 3 ..... . . . .	84

<b>Cuadro 6.7.</b>	Comparación de los desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ -RMN de Fumiquinazolina C y del compuesto 4.....	89
<b>Cuadro 6.8.</b>	Desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 5....	94
<b>Cuadro 6.9.</b>	Actividad biológica de los compuestos aislados.....	97
<b>Cuadro 10.1.</b>	Asignaciones espectroscópicas del Compuesto 1 en $\text{CDCl}_3$ .....	125
<b>Cuadro 10.2.</b>	Asignaciones espectroscópicas de RMN del compuesto 3 en $\text{CDCl}_3$ .....	129
<b>Cuadro 10.3.</b>	Asignaciones espectroscópicas de RMN del compuesto 4 en $\text{CDCl}_3$ .....	133
<b>Cuadro 10.4.</b>	Resultados de los bioensayos de los cultivos en medio líquido....	137
<b>Cuadro 10.5.</b>	Resultados de los bioensayos de los cocultivos en medio líquido..	138
<b>Cuadro 10.6.</b>	Resultados de los bioensayos de los cultivos en medio sólido.....	139
<b>Cuadro 10.7.</b>	Resultados de los bioensayos de los cocultivos en medio sólido..	140

# **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 2.1.</b>	Mortalidad por cáncer: Una vista al futuro . . . . .	13
<b>Figura 2.2.</b>	Vectores y agentes etiológicos de la enfermedad de Chagas, leishmaniasis y malaria . . . . .	15
<b>Figure 2.3.</b>	Introducción de nuevas clases de antibióticos y la aparición de resistencia bacteriana . . . . .	17
<b>Figura 2.4.</b>	Estructura química de la penicilina y taxol. . . . .	20
<b>Figura 2.5.</b>	Organismos marinos y fármacos derivados . . . . .	24
<b>Figura 5.1.</b>	Esquema de inoculación de cultivos en medio sólido. . . . .	45
<b>Figura 5.2.</b>	Configuración del plato de 96 pocillos para el ensayo antibacteriano de microdilución . . . . .	50
<b>Figura 5.3.</b>	Flujograma de trabajo para la preparación del ensayo antifúngico de difusión por disco . . . . .	53
<b>Figura 6.1.</b>	<i>Muriceopsis bayeriana</i> . . . . .	58
<b>Figura 6.2.</b>	<i>Pseudoalteromonas sp</i> (GA204) . . . . .	59
<b>Figura 6.3.</b>	Hongos endófitos y plantas hospederas . . . . .	60
<b>Figura 6.4.</b>	Fermentación, extracción y fraccionamiento de los cultivos en medio líquido y sólido. . . . .	61
<b>Figura 6.5.</b>	Descripción cronológica del cocultivo de <i>Pseudoalteromonas sp</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i> en medio sólido. . . . .	62
<b>Figura 6.6.</b>	Extracción y fraccionamiento de los cultivos en medio líquido y sólido. . . . .	63

<b>Figura 6.7.</b>	Esquema de purificación del extracto crudo del cocultivo de <i>Pseudoalteromonas sp</i> vs <i>Aspergillus fumigatus</i> (GL0278) fermentado en medio líquido M1 .. .. .	66
<b>Figura 6.8.</b>	Cromatograma de HPLC para la purificación de la fracción GL0278 B.. .. .	66
<b>Figura 6.9.</b>	Esquema de purificación del extracto crudo del cocultivo de <i>Pseudoalteromonas sp</i> vs <i>Emericella unguis</i> (GL0279) fermentado en medio líquido M1 .. .. .	67
<b>Figura 6.10.</b>	Cromatograma de HPLC para la purificación de la fracción GL0279 C. . . . .	67
<b>Figura 6.11.</b>	Esquema de purificación del extracto crudo del cocultivo de <i>Pseudoalteromonas sp</i> vs. <i>Emericella unguis</i> (GL0279-2) fermentado en medio líquido M1. . . . .	68
<b>Figura 6.12.</b>	Cromatograma de HPLC para la purificación de la fracción GL0279-2 C . . . . .	69
<b>Figura 6.13.</b>	Esquema de purificación del extracto crudo del cocultivo de <i>Pseudoalteromonas sp</i> vs. <i>Aspergillus fumigatus</i> (GL0278 MS 1) fermentado en medio sólido M1 . . . . .	69
<b>Figura 6.14.</b>	Cromatograma de HPLC para la purificación de la fracción GL0278 MS 1 C.. .. .	70
<b>Figura 6.15.</b>	Espectro de masas de alta resolución del compuesto 1 .. .. .	72
<b>Figura 6.16.</b>	Espectro de <sup>1</sup> H-RMN del compuesto 1 en CDCl <sub>3</sub> .. .. .	73

<b>Figura 6.17.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 1 en $\text{CDCl}_3$ . . . . .	74
<b>Figura 6.18.</b>	Estructura química de Gliotoxina. . . . .	75
<b>Figura 6.19.</b>	Espectro de masas de alta resolución del compuesto 2. . . . .	76
<b>Figura 6.20.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 2 en $\text{CDCl}_3$ . . . . .	78
<b>Figura 6.21.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 2 en $\text{CDCl}_3$ . . . . .	79
<b>Figura 6.22.</b>	Estructura química de Bis(metil)gliotoxina . . . . .	81
<b>Figura 6.23.</b>	Espectro de masas de alta resolución del compuesto 3. . . . .	82
<b>Figura 6.24.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 3 en $\text{CDCl}_3$ . . . . .	83
<b>Figura 6.25.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 3 en $\text{CDCl}_3$ . . . . .	83
<b>Figura 6.26.</b>	Estructura química de Isatín . . . . .	84
<b>Figura 6.27.</b>	Espectro de masas de alta resolución del compuesto 4 . . . . .	86
<b>Figura 6.28.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 4 en $\text{CDCl}_3$ . . . . .	87
<b>Figura 6.29.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 4 en $\text{CDCl}_3$ . . . . .	88
<b>Figura 6.30.</b>	Estructura química de Fumiquinazolina C. . . . .	90
<b>Figura 6.31.</b>	Espectro de masas de alta resolución del compuesto 5. . . . .	91
<b>Figura 6.32.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 5 en $\text{CDCl}_3$ . . . . .	92
<b>Figura 6.33.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 5 en $\text{CDCl}_3$ . . . . .	93
<b>Figura 6.34.</b>	Estructura química del compuesto 5 . . . . .	95
<b>Figura 10.1.</b>	Comparación de los espectros $^1\text{H}$ -RMN de las fracciones B de los extractos de cultivos en medio líquido . . . . .	110
<b>Figura 10.2.</b>	Comparación de los espectros de $^1\text{H}$ -RMN de las fracciones C de los extractos de cultivos en medio líquido. . . . .	110

<b>Figura 10.3.</b>	Comparación de los espectros de $^1\text{H}$ -RMN de las fracciones D de los extractos de cultivos en medio líquido .. . . . . .	111
<b>Figura 10.4.</b>	Comparación de los espectros de $^1\text{H}$ -RMN de las fracciones C de los extractos de cultivos en medio sólido . . . . .	111
<b>Figura 10.5.</b>	Comparación de cromatogramas de HPLC fracciones B de los extractos de cultivos en medio líquido.... . . . .	112
<b>Figura 10.6.</b>	Comparación de cromatogramas de HPLC fracciones C de los extractos de cultivos en medio líquido . . . . .	113
<b>Figura 10.7.</b>	Comparación de cromatogramas de HPLC fracciones C de los extractos de cultivos en medio sólido .. . . . .	114
<b>Figura 10.8.</b>	Comparación de los cromatogramas y espectro UV de las fracciones activas GL0278 B, GL0279 C y GL0279-2 C.... . . .	115
<b>Figura 10.9.</b>	Comparación de espectros de protones y carbono de GL0278 B P6, GL0279 C P3 y GL0279-2 C P5 . . . . .	116
<b>Figura 10.10.</b>	Comparación de espectro de masas de GL0278 B P6, GL0279 C P3 y GL0279-2 C P5 . . . . .	117
<b>Figura 10.11.</b>	Comparación de los cromatogramas de las fracciones GL0278 B y GL0279 C. . . . .	118
<b>Figura 10.12.</b>	Comparación de los cromatogramas de las fracciones GL0278 B, GL0279 C y GL0279-2 C . . . . .	119
<b>Figura 10.13.</b>	Comparación de los cromatogramas de las fracciones GL0279-2 C y GL0278 MS 1 C. . . . .	120

<b>Figura10.14.</b>	Comparación de los cromatogramas de las fracciones GL0278 B, GL0279 C y GL0278 MS1.....	121
<b>Figura10.15.</b>	COSY del Compuesto 1 en CDCl <sub>3</sub> .....	122
<b>Figura 10.16.</b>	HSQC del compuesto 1 en CDCl <sub>3</sub> .....	123
<b>Figura 10.17.</b>	HMBC del compuesto 1 en CDCl <sub>3</sub> .....	124
<b>Figura 10.18.</b>	COSY del compuesto 3 en CDCl <sub>3</sub> .....	126
<b>Figura 10.19.</b>	HSQC del compuesto 3 en CDCl <sub>3</sub> .....	127
<b>Figura10.20.</b>	HMBC del compuesto 3 en CDCl <sub>3</sub> .....	128
<b>Figura 10.21.</b>	COSY del compuesto 4 en CDCl <sub>3</sub> .....	130
<b>Figura 10.22.</b>	HSQC del compuesto 4 en CDCl <sub>3</sub> .....	131
<b>Figura 10.23.</b>	HMBC del compuesto 4 en CDCl <sub>3</sub> .....	132
<b>Figura 10.24.</b>	COSY del compuesto 5 en CDCl <sub>3</sub> .....	134
<b>Figura 10.25.</b>	HSQC del compuesto 5 en CDCl <sub>3</sub> .....	135
<b>Figura10.26.</b>	HMBC del compuesto 5 en CDCl <sub>3</sub> .....	136

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

MCF-7	Michigan Cancer Foundation-7 (Células humanas de adenocarcinoma de mama)
DMSO	Dimetilsulfóxido
TCA	Ácido tricloroacético
SRB	Sulforodamina B
ESF	Extracción en fase sólida
CPRG	Clorofenol rojo- $\beta$ -D-galactopiranosido, por sus siglas en inglés
RPS	Medio stock RPMI + suero humano O+. Roswell Park Memorial Institute, es un medio celular usado para cultivos celulares.
% IC	Porcentaje de inhibición de crecimiento (ensayo de chagas, leishmania y malaria)
% C	Porcentaje de crecimiento (ensayo de cáncer)
FBS	Suero fetal bovino, por sus siglas en inglés
EM	Extracto de malta
MH	Müller-Hinton
LB	Luria Bertani
AM	Agar Marino
PYG	Peptone Yeast Glucose
GA204	Galeta 204. Código asignado a la bacteria marina <i>Pseudoalteromonas sp.</i>
ATTC	American Type Culture Collection
ICBG	International Cooperative Biodiversity Group

# RESUMEN

## Actividad biológica de metabolitos secundarios obtenidos del cocultivo de

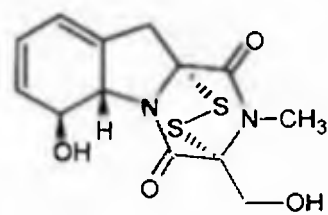
### *Pseudoalteromonas sp.* vs. *Aspergillus fumigatus* y *Emericella unguis*

*Pseudoalteromonas sp.*, una bacteria marina aislada del coral *Muriocepsis bayeriana* colectado en Punta Galeta (provincia de Colón), fue co-cultivada en medio de cultivo líquido y sólido con los hongos endófitos *Aspergillus fumigatus* y *Emericella unguis* asociados a hojas maduras de plantas colectadas en bosques tropicales panameños. Los metabolitos secundarios bioactivos fueron extraídos con acetato de etilo y aislados mediante fraccionamiento biodirigido utilizando ensayos *in vitro* contra cáncer, parásitos de enfermedades tropicales y bacterias patógenas. La estructura química de los compuestos aislados fue determinada mediante espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

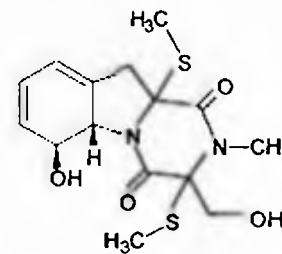
Como resultado, fueron obtenidos cinco compuestos (1-5). El compuesto 1, identificado como gliotoxina, es producido tanto por *A. fumigatus* como por *E. unguis* en medio de cultivo líquido, más no en medio sólido. Resultó activo contra cáncer (MCF-7, 0.2% de C), *Trypanosoma cruzi* (83.7% de IC), *Plasmodium falciparum* (88.4% de IC) y moderadamente activo contra *Leishmania donovani* (66.8% de IC). Además, presentó una significativa actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.* y *Vibrio sp.* El compuesto 3, identificado como Isatín, fue producido por *Pseudoalteromonas sp.* únicamente en medio de cultivo líquido. Demostró actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus sp.*, *Enterobacter sp.* y *Vibrio sp.* Los compuestos 2, 4 y 5, fueron identificados como

Bis(metil)gliotoxina, Fumiquinazolina C y Pseurotin A, respectivamente. No demostraron actividad biológica en los ensayos disponibles en el laboratorio

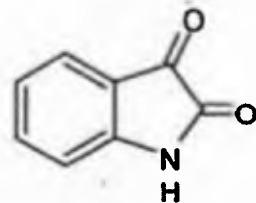
Los compuestos descritos en este trabajo solo fueron encontrados en el co-cultivo de los microorganismos y no se detectaron en los cultivos individuales. Estos resultados sugieren que la interacción de la bacteria marina con los hongos endófitos en el medio de cultivo induce la activación de rutas biosintéticas silenciadas o crípticas cuando son cultivados individualmente. Por lo tanto, queda demostrado que el empleo de cocultivos entre microorganismos ofrece un gran potencial como herramienta para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos.



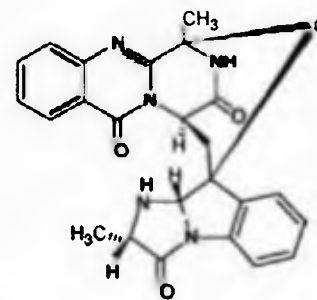
1



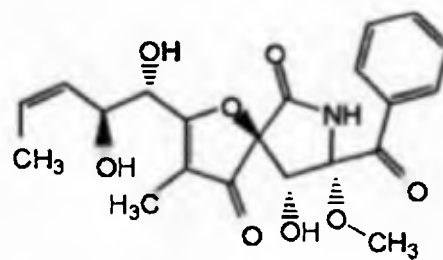
2



3



4



5

Estructura química de los compuestos 1-5.

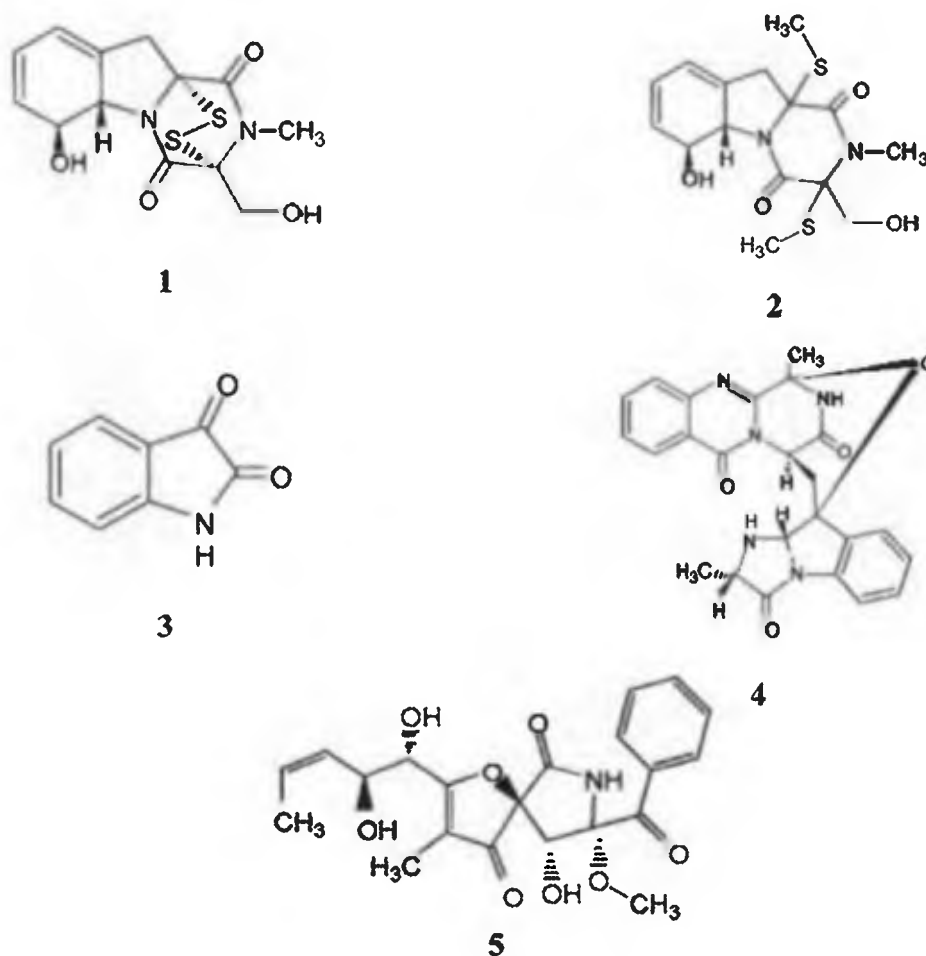
# ABSTRACT

**Biological activity of secondary metabolites from *Pseudoalteromonas sp.* vs.**

***Aspergillus fumigatus* y *Emericella unguis***

*Pseudoalteromonas sp.*, a marine bacteria isolated from coral *Muriceopsis bayeriana* collected in Punta Galeta (Colón) was co-cultured in liquid and solid growth media with *Aspergillus fumigatus* and *Emericella unguis*, two endophytic fungi associated with mature leaves of plants collected in Panamanian rainforests. Active secondary metabolites were extracted with ethyl acetate followed by bioassay guided fractionation. In order to explore their structures, the compounds were isolated and then subjected to high resolution mass spectrometry (HRMS) and nuclear magnetic resonance (RMN). Five compounds (1-5) were obtained. Compound 1, identified as gliotoxin, was produced by both *A. fumigatus* and *E. unguis* in liquid growth media but not on solid growth media. Compound 1 was active against cancer (MCF-7, 0.2% GI), *Trypanosoma cruzi* (83.7% GI), *Plasmodium falciparum* (88.4% GI) and mildly active against *Leishmania donovani* (66.8% GI). Furthermore, it showed significant antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus sp.*, *Bacillus sp.*, and *Vibrio sp.* Compound 3, identified as isatin, was produced by *Pseudoalteromonas sp.* only in liquid growth media. It was active against *Staphylococcus sp.*, *Enterobacter sp.* y *Vibrio sp.* Compounds 2, 4, and 5 were identified as bis(methyl)gliotoxin, fumiquinazoline C, and pseurotin A, respectively. They did not show any biological activity against *in vitro* bioassays available in the laboratory. Compounds 1-5 were found only in microbial co-culture fermentations but not in individual cultures. This result suggests that the interaction between marine bacteria and

endophytic fungi induces the activation of cryptic biosynthetic pathways which are silenced in individual cultures. Therefore, this result shows that the co-cultures of microorganisms offer great potential as tools for the discovery of new bioactive compounds.



Chemical structures of compounds 1-5.

# **1. INTRODUCCIÓN**

Existe una urgente necesidad por el descubrimiento de nuevos agentes quimioterapéuticos, especialmente novedosos anticancerígenos, antiparasitarios y antibióticos, para combatir enfermedades y patógenos resistentes a los medicamentos ya existentes con el objetivo de mejorar el tratamiento de una variedad de afecciones humanas que en la actualidad representan problemas alarmantes de salud pública (Needham, 1994; Cragg et al., 1997).

El descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos a partir de productos naturales ha jugado un rol significativo durante las últimas décadas. Más del 28% de las nuevas entidades químicas y 42% de los medicamentos anticancerígenos introducidos al mercado provienen de fuentes naturales (Xiong et. al., 2013). En particular, el área terapéutica de las enfermedades infecciosas y oncología han sido beneficiados de numerosas clases de drogas de origen natural. El creciente interés en el estudio de los productos naturales, ha alcanzado un progreso significativo en la identificación de nuevos antibióticos, nuevas alternativas para la terapia oncológica y otros medicamentos útiles para mejorar la salud humana (Baker et. al., 2007).

Además de las plantas y animales, los microorganismos son un recurso importante para el descubrimiento de nuevas drogas. Más de 50,000 productos naturales de origen microbiano han sido aislados y han jugado un rol determinante en el descubrimiento de medicamentos. La mayoría de estos compuestos han sido obtenidos de microorganismos de origen terrestre (Xiong et. al., 2013). Sin embargo, el redescubrimiento de los mismos compuestos provenientes de estos microorganismos ha hecho cada vez menos atractivo su estudio durante los últimos años. Por otra parte, las bacterias aisladas de entornos marinos han recibido considerable atención en la actualidad debido a la diversidad estructural y

actividades biológicas únicas de sus metabolitos secundarios. Estos microorganismos marinos son productores muy eficientes de nuevas entidades químicas con un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos, antitumorales, citotóxicos, citostáticos, antiinflamatorios, antiparasitarios, antimaláricos, antivirales, antioxidantes, entre otros (Al-Zereini, 2006 y Anivasagan et al., 2013). Sin embargo, la búsqueda de nuevos compuestos provenientes del mar apenas ha comenzado (Li y Qin, 2005).

En este trabajo se describe la investigación química guiada por la actividad biológica de los extractos del cocultivo de la bacteria marina *Pseudoalteromonas sp.* (GA0204) aislada del coral *Muriceopsis bayeriana* colectado en Punta Galeta (Colón) versus los hongos endófitos *Aspergillus fumigatus* (F0075) y *Emericella unguis* (F2803), con énfasis en el aislamiento y la elucidación estructural de los metabolitos secundarios con actividad biológica contra cáncer, enfermedades tropicales y bacterias patógenas.

Estos microorganismos fueron fermentados en conjunto en medio de cultivo líquido y sólido. Los cocultivos fueron incubados a temperatura ambiente por 10 días y posteriormente fueron extraídos con acetato de etilo. Los extractos crudos secos se fraccionaron empleando cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) de fase reversa y la muestra se eluyó usando gradientes escalonados de metanol en agua para obtener fracciones menos complejas. La purificación de los compuestos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) equipado con una columna de fase normal y fase móvil compuesta por hexano y acetato de etilo.

La evaluación de la actividad biológica de los extractos, fracciones y compuestos puros en cuanto a sus propiedades anticancerígenas y contra los parásitos causantes de

enfermedades tropicales se determinó contra la línea celular de cáncer de mama (MCF-7), *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* y *Leishmania donovani*. La actividad antibacteriana de los compuestos en estudio se determinó mediante el ensayo basado en el método de microdilución para el screening de productos naturales contra bacterias (Zgoda y Porter, 2001). La estructura química de los compuestos fue determinada mediante un espectrómetro de masas de alta resolución (HRMS) equipado con un ionizador químico a presión atmosférica en modo positivo (APCI<sup>+</sup>), un espectrómetro de resonancia magnética nuclear de 400 MHz, mediante la comparación de los datos espectroscópicos con bases de datos de productos naturales (AntiMarin y MarinLit)

A continuación se presenta el marco teórico de este trabajo el cual refleja el contexto, razón y antecedentes de este trabajo de investigación. Posteriormente los objetivos, materiales y metodología para el aislamiento e identificación de los compuestos obtenidos de los cocultivos de los microorganismos en estudio. Más adelante los resultados, discusión y conclusión. Por último se plantean las recomendaciones así como el apéndice que provee información complementaria de este trabajo.

## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **2.1. Situación actual del Cáncer, Enfermedades Tropicales y Resistencia a antibióticos: La necesidad urgente de nuevos medicamentos**

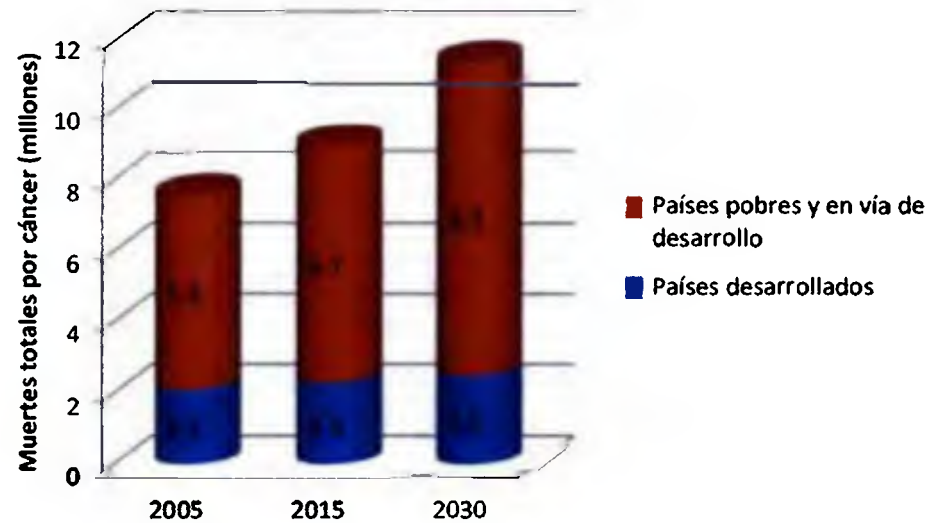
### **2.1.1. Cáncer**

El cáncer es un término genérico utilizado para referirse a un grupo numeroso de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. Una de las características que define al cáncer es la rápida generación de células anormales que se dividen sin control más allá de sus límites habituales, las cuales pueden invadir zonas adyacentes del organismo y diseminar a otros tejidos y órganos (OMS, 2013).

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo y fue responsable de 7.6 millones de defunciones (alrededor del 13% de todas las muertes) en el año 2008, en donde aproximadamente el 70% de estas muertes ocurren en países en vías de desarrollo. A pesar de que a menudo se considera una enfermedad propia de los países desarrollados, se está convirtiendo rápidamente en una catástrofe para la salud pública en los países tercermundistas (OMS, 2013).

Cada minuto, mueren 14 personas debido a esta enfermedad, y la cual produce más muertes que el SIDA, tuberculosis y malaria juntas. Sin embargo más de un tercio de estos casos podrían ser prevenidos y un tercio podría ser curado si es detectado y *tratado* con una terapia adecuada. El mundo se enfrenta a una crisis global del cáncer. Si no se toman las medidas necesarias, 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad en los próximos 10 años (PACT, 2011). En la figura 2.1 se presenta una vista

al futuro de la mortalidad por cáncer en países desarrollados, pobres y en vías de desarrollo.



**Figura 2.1** Mortalidad por cáncer: Una vista al futuro (PACT, 2011).

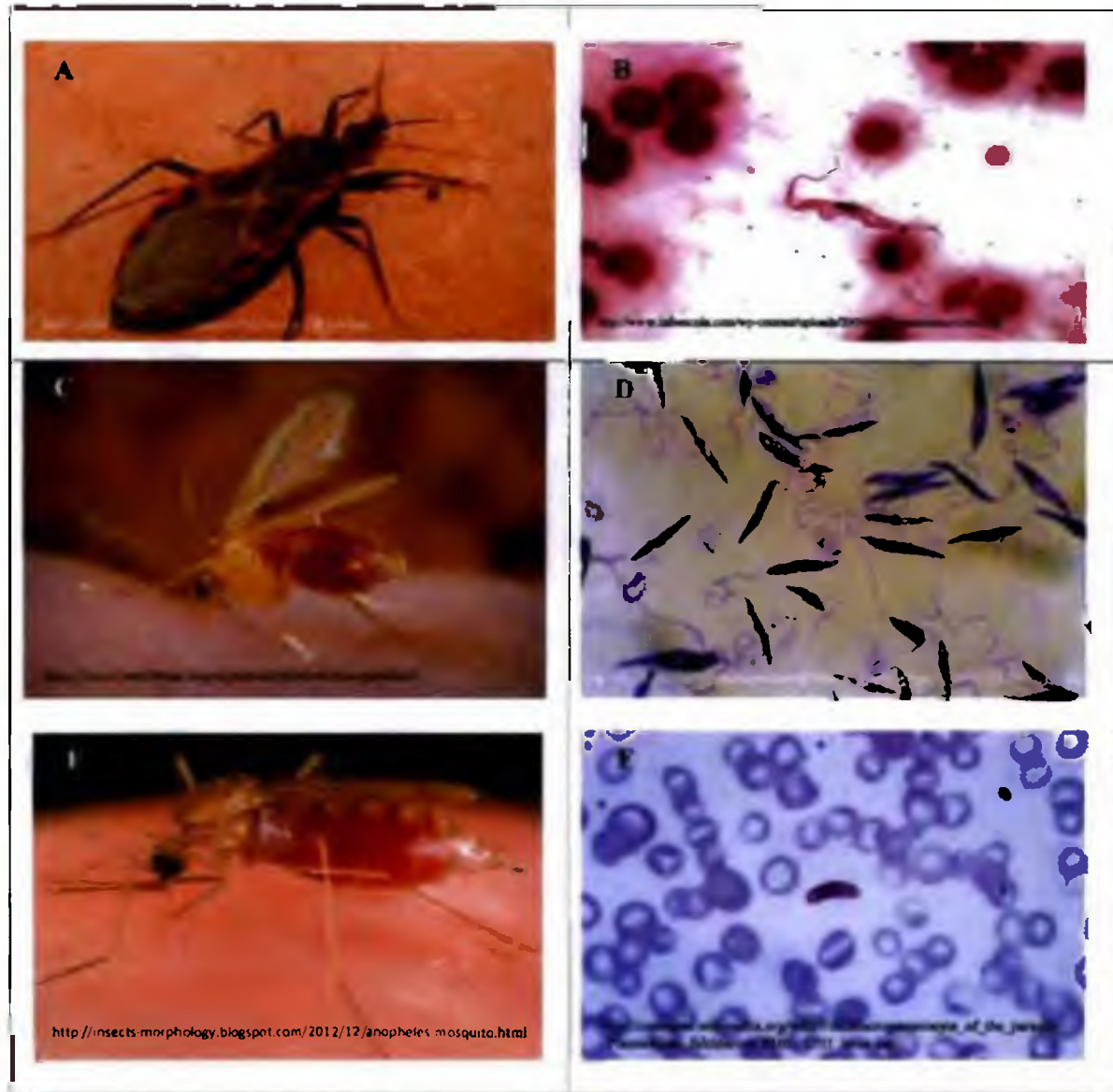
### 2.1.2. Las Enfermedades Tropicales Desatendidas

Las Enfermedades Tropicales Desatendidas abarcan un grupo de infecciones crónicas y degenerantes causadas por parásitos, bacterias y virus, que representan una de las causas más comunes de padecimiento de toda la humanidad (Hotez et al., 2008). Afectan un estimado de 3 billones de personas y causan alrededor de 500,000 muertes anualmente. Se producen en áreas donde los suministros de agua y sistemas sanitarios son rudimentarios; y los insectos y otros vectores de enfermedades conviven con el ser humano. De hecho, el vínculo de estas enfermedades con la pobreza es tan fuerte que sus prevalencias sirven como un indicador del nivel de desarrollo socioeconómico (OMS, 2006).

Las enfermedades tropicales han sido desatendidas, ya que hay muy poco incentivo para las industrias farmacéuticas para el desarrollo de medicamentos y vacunas dirigidos a mercados que no los pueden pagar. Sin embargo, en los últimos años estas enfermedades han suscitado un creciente interés, tanto por su impacto en la salud pública como por el problema que entrañan en materia de derechos humanos (Rosa et al., 2011)

La Organización Mundial de la Salud ha determinado 17 enfermedades tropicales desatendidas, de las cuales entre las más importantes se encuentran la lepra, la enfermedad de Chagas, leishmaniasis, dengue, rabia entre otras. La leishmaniasis es una enfermedad causada por el parásito protozoario *Leishmania* y transmitido por la picadura de moscas del género *Phlebotomus* (Rosa et al., 2011). Aproximadamente 350 millones de personas están en riesgo de contraer esta enfermedad, y más de 2 millones de casos ocurren anualmente (OMS, 2010). En la actualidad no hay vacunas para la leishmaniasis; aunque los fármacos disponibles para su tratamiento son tóxicos, caros y algunas veces inefectivos, representan la única manera para tratar todas las formas de esta terrible enfermedad (Croft & Coombs, 2003). La enfermedad de Chagas, endémica de Latinoamérica, es causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* y es transmitido a los seres humanos por los vectores triatomíneos hematófagos (denominados comúnmente besuconas), transfusión de sangre y por transmisión congénita. De ocho a nueve millones de personas están infectadas con el parásito y 25 millones permanecen con el riesgo de ser contagiados (WHO, 2002). Existe evidencia de que el tratamiento con fármacos como Nifurtimox (5-nitrofurano) e imidazol pueden curar la enfermedad causada por *T. cruzi*, pero se requieren con urgencia desarrollar nuevos medicamentos con menor toxicidad y efectos adversos (Rosa et al., 2011). La malaria aunque no es considerada

una enfermedad desatendida por la OMS, es una infección tropical endémica de 106 países causada por parásitos del género *Plasmodium* y transmitida por mosquitos, que mata a más de un millón de personas cada año, la mayoría niños africanos menores de 5 años (WHO, 2010). En la figura 2.2 se detallan los vectores y agentes etiológicos de la enfermedad de Chagas, leishmaniasis y malaria.



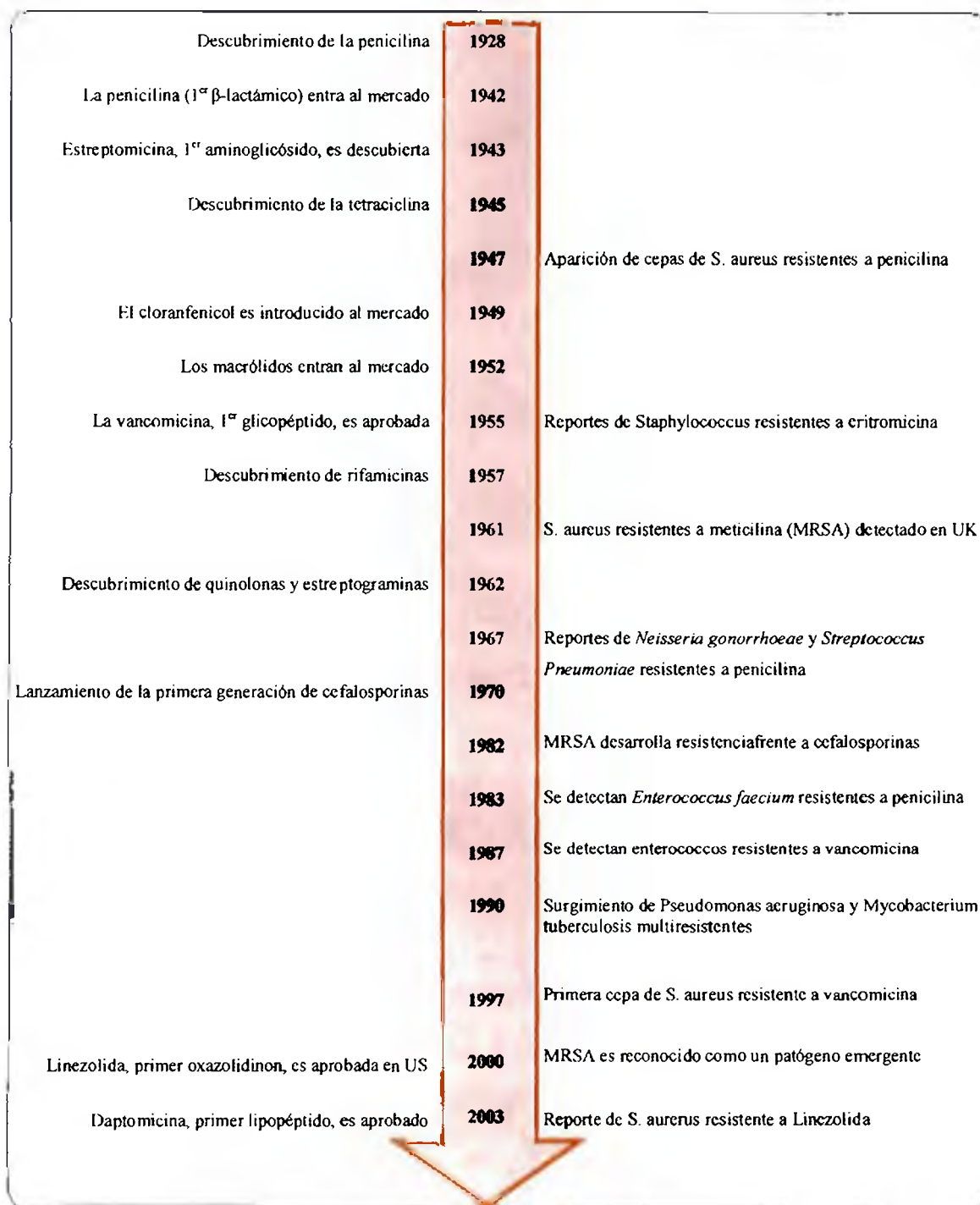
**Figura 2.2.** Vectores y agentes etiológicos de la enfermedad de Chagas, leishmaniasis y malaria (A) *Triatoma infestans* (B) *Trypanosoma cruzi* (C) *Phlebotomus* (D) *Leishmania donovani* (E) Mosquito *Anopheles* (F) *Plasmodium falciparum*

### 2.1.3. Antibióticos: Una breve descripción histórica

La era moderna de la quimioterapia antibiótica empezó con la introducción de la penicilina en la práctica clínica en la década de 1940 para el tratamiento de enfermedades infecciosas en seres humanos. La penicilina fue descubierta en 1928 como un metabolito secundario derivado del moho común *Penicillium notatum*. El descubrimiento de gramisidina en 1939 – el primer agente bactericida aislado de una bacteria asociada al suelo (*Bacillus brevis*) – inició el aislamiento y cribado sistemático de bacterias y hongos terrestres para encontrar nuevos antibióticos. El descubrimiento de estreptomisina en 1943 puso a las bacterias del orden de los actinomicetos en el centro de atención de descubrimiento de fármacos antibióticos (Engelhardt, 2010).

En el curso de los años 1940 y 1950, la mayoría de las clases de los antibióticos conocidos hoy día, incluyendo los  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas, aminoglicósidos y macrólidos, fueron introducidas en la clínica (ver figura 2.3). Con el descubrimiento de las estreptograminas y quinolonas en 1962 esta “Era Dorada” del descubrimiento de antibióticos de origen microbiano se detuvo. Mientras el número de nuevos compuestos aun siguió incrementándose, debido a la producción de análogos por derivatización química de moléculas ya conocidas, ninguna clase nueva de antibióticos con nuevos mecanismos de acción fueron aprobados durante las siguientes tres décadas (1970-2000) (Berdy, 2005). Solo en el periodo comprendido entre 2000-2003 dos tipos de moléculas pertenecientes a nuevas clases de antibióticos fueron descubiertos: El antibiótico sintético linezolid (oxazolidinona) y el metabolito secundario daptomicina (lipopéptido cíclico).

(O'Shea, 2008). En la figura 2.3 se presenta una breve reseña histórica de la introducción de nuevos antibióticos y la aparición consecuente de resistencia bacteriana.



**Figura 2.3.** Introducción de nuevas clases de antibióticos y la aparición de resistencia bacteriana (adaptado de Nature News Feature, 2007; Wright, 2007 y Engelhardt, 2010).

#### **2.1.4. Resistencia a antibióticos y la urgencia de nuevos medicamentos**

La introducción de los antibióticos ha tenido un tremendo impacto en la calidad y expectativa de vida del ser humano. Las bacterias responsables de infecciones como la neumonía, cólera, sífilis y tuberculosis, que una vez representaron las primeras causas de muerte alrededor del mundo, hoy día pueden ser efectivamente tratadas con los nuevos medicamentos disponibles (Engelhardt, 2010). Con el uso generalizado y usualmente injustificado de los antibióticos una nueva amenaza empezó a surgir, la aparición y propagación de resistencia de bacterias a los antibióticos comúnmente utilizados (ver figura 2.3). Mientras que los determinantes de la resistencia a los antibióticos son un fenómeno biológico que ocurre naturalmente, especialmente en microorganismos productores de antibióticos donde los mecanismos de auto resistencia usualmente preexisten acoplados a las rutas biosintéticas de los mismos, el uso indiscriminado de estos medicamentos favorece la difusión de mecanismos de resistencia a través y entre poblaciones bacterianas (Hopwood, 2007).

El advenimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a penicilina apenas a unos pocos años después de la introducción de este antibiótico (Spink y Ferris, 1945), se tomó con poca preocupación debido al suministro constante de nuevos medicamentos y el desarrollo de cuantiosos análogos de moléculas ya conocidas. Pero inclusive la introducción de análogos semi-sintéticos tales como la meticilina (derivada de la penicilina) en los años 1960, el cual había sido desarrollado para confrontar a los patógenos resistentes productores de lactamasas, pronto fue seguido por la aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (Jevons et al., 1963).

En nuestros días, la aparición de resistencia a antibióticos en microorganismos patógenos, tales como el *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Pseudomonas aeruginosa* han tomado lugar en los hospitales y comunidades y con la aparición de estas bacterias resistentes a todos los antibióticos disponibles, las opciones terapéuticas regresan a menudo nuevamente a la era pre-antibiótica con resultados terapéuticos poco efectivos (Xiong et al., 2013).

Aunque la resistencia a antibióticos ha sido un problema desde que fuesen introducidos a la terapia en seres humanos, siguen incrementando en número, diversidad y rango de microorganismos resistentes que causan esta actual situación precaria. Una nueva generación completa de patógenos oportunistas tales como cepas gram negativas multiresistentes de *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Burkholderia cepacia* en la actualidad están amenazando una población cada vez mayor de pacientes susceptibles con sistemas inmunes comprometidos (Wright, 2007).

A pesar de esta alarmante situación, la lista de nuevos antibióticos con nuevos mecanismos de acción es muy corta. Desde el 2006, solamente un nuevo agente antibacteriano (doripenem) ha sido aprobado en Estados Unidos y un número escaso de compuestos como potenciales candidatos se encuentran en ensayos clínicos (Engelhardt, 2010).

## 2.2. Productos Naturales: Una fuente prometedora para el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos

Aquellos compuestos químicos que provienen del metabolismo secundario de plantas, animales y microorganismos, son definidos como productos naturales. Los productos naturales han sido aprovechados por sus propiedades terapéuticas desde la antigüedad, tal es el caso del uso de los alcaloides del opio por los antiguos egipcios. En la actualidad, las fuentes naturales proveen la mayor fuente de diversidad química y material de partida para el descubrimiento y desarrollo de medicamentos. Muchas moléculas naturales con potencial farmacéutico, así como sus derivados sintéticamente modificados han sido exitosamente desarrollados para el uso clínico con el fin de tratar enfermedades humanas en casi todas las áreas terapéuticas (Baker et al., 2007).

Los estudios de la química de productos naturales ha contribuido en el desarrollo de la medicina moderna con descubrimientos tales como la penicilina (antibiótico derivado del hongo *Penicillium notatum*) por Alexander Fleming en 1928 (figura 2.4 a) y el agente anticancerígeno Taxol (figura 2.4.b), extraído de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), en 1967 por Monroe Wall (Simmons, 2008)



Figura 2.4. Estructura química de la (a) penicilina y (b) taxol

El descubrimiento moderno de fármacos está basado en tres principales recursos: productos naturales, derivados semisintéticos de productos naturales y compuestos sintéticos derivados de librerías de química combinatoria. Sin embargo, la gran mayoría de los medicamentos clínicamente relevantes en uso hoy día provienen de productos naturales o compuestos derivados de los mismos. Durante los últimos 20 años, el 60% de las 877 drogas que han alcanzado el mercado provienen de fuentes naturales (Lefevre et al., 2008 y Engelhardt, 2010).

### **2.2.1. Hongos endófitos**

Los organismos endófitos son definidos como aquellos microorganismos que pasan la totalidad o parte de su ciclo de vida colonizando inter y/o intracelularmente tejidos saludables de la planta hospedera (especialmente hojas, tallos y raíces), típicamente sin causar síntomas de daño inmediatos ni aparentes señales de enfermedad (Huang et al., 2008; Rodríguez et al., 2009; Zhao et al., 2010; Jalgaonwala et al., 2011)

Casi todas las clases de plantas vasculares examinadas hasta la fecha albergan organismos endófitos. Diferentes grupos de microorganismos tales como los hongos y bacterias han sido reportados como endófitos. Durante el largo periodo de co-evolución, una relación mutua se ha formado entre cada microorganismo endófito y su planta hospedera. La planta hospedera, por un lado suministra abundante alimento y espacio para la sobrevivencia de su endófito asociado, mientras tanto, estos últimos producen una variedad de metabolitos secundarios que ayudan a la planta hospedera a resistir al estrés biótico (bacterias, hongos, nemátodos e insectos) y abiótico (temperatura, pH, presión osmótica); y de esta manera favorecer el crecimiento de la planta a cambio (Zhao et al., 2010, Rosa et al., 2011).

Muchos estudios han revelado la ubicuidad de estos microorganismos, con un estimado de al menos un millón de especies de hongos endófitos asociados a plantas. A la fecha, solamente alrededor 100,000 especies de estos microorganismos han sido descritas, de los cuales la mayoría han sido encontrados en ecosistemas tropicales (Huang et al., 2008).

Los bosques tropicales son considerados los ecosistemas terrestres más diversos con el mayor número y diversidad de hongos endófitos. En este tipo de ecosistemas en donde la carrera evolutiva por la sobrevivencia juega un rol constante y activo, podría resultar en la producción de una inmensa variedad de moléculas interesantes. Los bosques tropicales representan un medio ambiente en donde la competencia, recursos limitados y la selección del más apto están en su apogeo. Por consiguiente, existe una gran probabilidad de que los hongos asociados a plantas tropicales pueda ser una fuente importante de compuestos con actividad contra enfermedades parasitarias, microbianas y cáncer (Shan et al., 2012).

Varios productos naturales derivados de hongos endófitos poseen estructuras y bioactividades únicas y, representan un gran reservorio que ofrece un potencial enorme para la exploración medicinal (Huang et al., 2008; Shan et al., 2012). Estos microorganismos han recibido considerable atención en las últimas dos décadas, ya que muchos compuestos con actividad antimicrobiana, insecticida, citotóxica y anticancerígena han sido exitosamente descubiertas de hongos endófitos (Jalgaonwala et al., 2011).

Algunos ejemplos de los compuestos bioactivos aislado de hongos endófitos se detallan en el cuadro 2.1 (Shan et al., 2012):

**Cuadro 2.1.** Compuestos bioactivos aislados de hongos endófitos

Planta hospedera	Hongo Endófito	Compuesto	Utilidad
<i>Taxus brevifolia</i>	<i>Taxomyces andreanae</i>	Taxol <sup>1</sup>	Anticancerígeno
<i>Podophyllum peltatum</i>	<i>Phialocephala fortinii</i>	Podofilotoxina <sup>2</sup>	Anticancerígeno
<i>Nothapodytes foetida</i>	<i>Entrophospora infrequens</i>	Camptotecina <sup>3</sup>	Anticancerígenos
<i>D. zingiberensis</i>	<i>Fusarium redolens</i>	Beauvericina <sup>4</sup>	Antibiótico e insecticida

<sup>1</sup> Stierle et al., 1993; <sup>2</sup> Eyberger et al., 2006; <sup>3</sup> Puri et al., 2005; <sup>4</sup> Xu et al., 2010

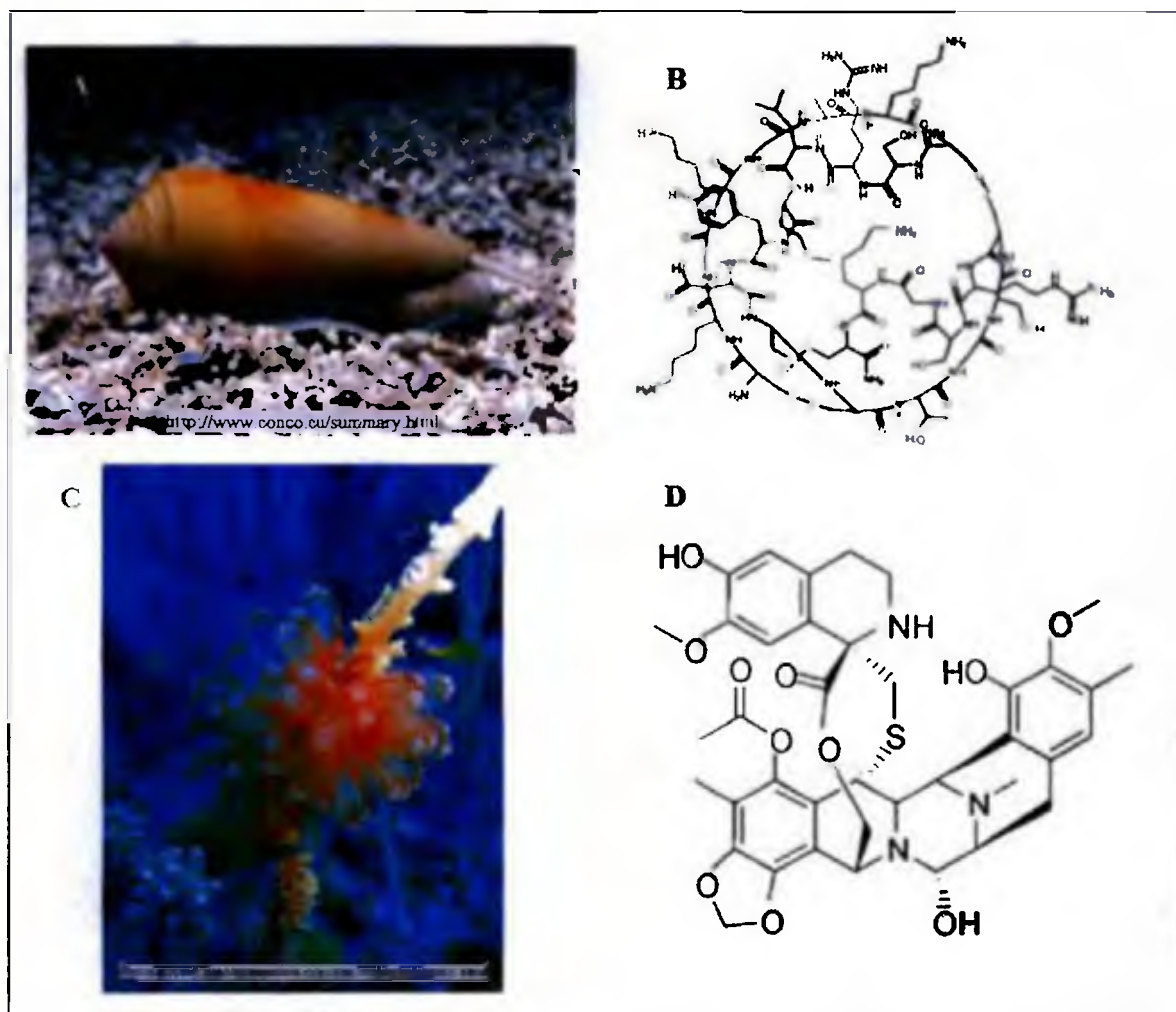
### 2.2.2. Bacterias asociadas a invertebrados marinos

Un mayor interés ha sido generado por aquellas fuentes naturales de medio ambientes más exóticos y extremos tales como los océanos y las regiones polares, así también como microorganismos con características taxonómicas nunca antes vistas (Baker et al., 2007).

Los océanos y mares del mundo representan el 70% de nuestro planeta y es una fuente natural que está siendo cada vez más explorada como recurso de compuestos con potencial terapéutico. Desde la década de 70's, más de 50,000 productos naturales de estructura diversa con diferentes actividades biológicas han sido descubiertas provenientes de macro y microorganismos marinos. Una gran variedad de investigaciones sobre moluscos, briozoos, esponjas y bacterias de origen marino han producido numerosos compuestos farmacológicamente interesantes durante los últimos años, especialmente compuestos químicos con actividad anticancerígena (Engelhardt, 2010).

Los primeros fármacos de origen marino incluyen el ziconotide, un péptido aislado de un

caracol cónico marino (*Conus magus*), el cual fue lanzado al mercado en el 2004 bajo el nombre comercial de “Prialt” para el tratamiento del dolor crónico (ver figura 2.5 A y B), y el compuesto antitumoral trabectedin, originalmente derivado del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata* (ver figura 2.5 C y D), aprobado en Estados Unidos en el 2007 (Engelhardt, 2010).



**Figura 2.5.** Organismos marinos y fármacos derivados (A) *Conus magus* (B) Ziconotide (C) *Ecteinascidia turbinata* (D) Trabectedin.

Los macroorganismos marinos representan claramente una fuente rica de moléculas bioactivas, sin embargo, el desarrollo de nuevos fármacos depende de fuentes sostenibles con suficientes cantidades de los compuestos químicos con potencial farmacológico. La

poca abundancia de estos organismos y/o baja concentraciones de la molécula de interés (como es usualmente el caso para invertebrados marinos) representan por consiguiente una gran limitante. Las bacterias, por otro lado, son una fuente mucho más favorable para el descubrimiento y producción biotecnológica de compuestos activos interesantes (Engelhardt, 2010). Además, se ha demostrado que muchos compuestos que han sido originalmente derivados de invertebrados marinos son producidos en realidad por sus bacterias asociadas (Engelhardt, 2010). Varios estudios han demostrado que los invertebrados marinos (como corales, esponjas y moluscos) albergan altos niveles de diversidad microbiana los cuales representan una fuente importante de biodiversidad marina (Baker et al , 2007)

Las bacterias en ambientes marinos suelen encontrarse bajo condiciones extremas, tales como presión, temperatura, salinidad, y reducción de micronutrientes, en donde la supervivencia y proliferación usualmente depende en la habilidad para producir compuestos biológicamente activos (Carvalho y Fernandes, 2010)

### **2.2.3. Cocultivo de microorganismos: Una estrategia útil para la producción de metabolitos secundarios no expresados en condiciones estándar de laboratorio**

Los microorganismos como las bacterias marinas y hongos endófitos producen numerosos compuestos de bajo peso molecular dotados con múltiples actividades biológicas que juegan un rol inminente en el descubrimiento de fármacos. Es concebible que muchos de estos compuestos son producidos como señales químicas o mecanismos

de defensa; sin embargo, su verdadera función en el contexto biológico es grandemente incomprendido (Scherlach y Hertweck, 2009).

A pesar de la gran cantidad de compuestos bioactivos producidos por estos microorganismos, su potencial biosintético es subestimado. De hecho, el análisis de secuencias de genomas completos indica que estos microbios (en especial los hongos) codifican la información genética necesaria para la biosíntesis de una gran variedad de compuestos que no son observados cuando son cultivados en condiciones estándares de laboratorio. Parece que en particular, en la mayoría de los casos desconocidos, los desencadenadores son requeridos para activar rutas biosintéticas silenciadas (Schroeckh et al., 2009; Scherlach y Hertweck, 2009).

La competencia que resulta del cocultivo de dos microorganismos puede inducir una ruta no expresada para la biosíntesis de nuevos metabolitos secundarios. Este tipo de investigaciones en el campo de la química de productos naturales han intentado incrementar en los resultados de los metabolitos previamente descritos, principalmente antibióticos. Sin embargo, el estudio de cocultivos de microorganismos que tienen como objetivo producir nuevas estructuras químicas e inducir la expresión de genes se encuentran en sus primeras etapas. Hasta la fecha, aproximadamente 11 nuevos compuestos bioactivos producidos en cocultivos de microorganismos han sido reportados (Park et al., 2011).

Los métodos tradicionales para descubrir productos naturales de origen microbiano usualmente involucran la recolección y cultivo de cepas, extracción, aislamiento biodirigido y elucidación estructural. Desafortunadamente, este enfoque resulta con frecuencia frustrante, debido a una alta frecuencia de redescubrimiento. El creciente

entendimiento de la genómica microbiana, ha proporcionado información valiosa sobre los principios de la biosíntesis de productos naturales y por lo tanto ofrece una alternativa prometedora para el descubrimiento de nuevas entidades químicas. La observación de que genes de rutas biosintéticas que codifican rutas de metabolitos secundarios están agrupadas en los genomas microbianos facilita su estudio y manipulación. Además, hoy día se conoce grandemente las rutas involucradas en las líneas de ensamblaje policétido sintasa (PKS) y sintasa de péptido no ribosomal (NRPS), las cuales son responsables de la biosíntesis de una gran variedad de productos naturales (Schroeckh et al , 2009).

# **OBJETIVOS**

## OBJETIVO GENERAL

- Analizar el potencial farmacológico contra cáncer, enfermedades tropicales (Malaria, Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis) y antimicrobiano del cocultivo de la bacteria marina *Pseudoalteromona sp* versus los hongos endófitos *Aspergillus fumigatus* y *Emericella unguis*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar y comparar la actividad biológica de los extractos de los cultivos individuales y cocultivos de *Pseudoalteromonas sp* vs los hongos *Aspergillus fumigatus* y *Emericella unguis*, mediante bioensayos contra cáncer, parásitos tropicales y bacterias patógenas.
- Aislar los metabolitos biológicamente activos obtenidos del cocultivo de estos microorganismos empleando diversas técnicas cromatográficas.
- Elucidar las estructuras químicas de los compuestos bioactivos aislados, a través de técnicas espectroscópicas y espectrométricas

## **4. MATERIALES**

#### 4.1. Cristalería

Tubos de ensayo con tapa, 16 x 150 mm	Pyrex
Matraces Erlenmeyer de 250, 500, 1000 y 2000 mL	Pyrex
Embudos de separación de 2000 mL	Pyrex
Balones de destilación de 100, 250 y 1000 mL	Pyrex
Vasos químicos de 50, 100 y 250 mL	Pyrex
Tubos para espectroscopia de RMN	Norell
Tubos para espectroscopia de RMN	Shiguemi
Viales de vidrio con tapa con rosca de 4, 8 y 16 mL	
Pipetas Pasteur	

#### 4.2. Materiales de laboratorio

Platos Petri, 96x16 mm y 145 x 20 mm	Greiner Bio-one
Cartuchos de extracción en fase sólida (EFS), 1 y 10 g	Supelclean LC-18
Platos de Microdilución de 96 pocillos	BD Falcon
Tubos de plástico estériles de 15 y 50 mL	Celltreat
Tubos Eppendorf de 0.2 y 1.5 mL	Eppendorf
Papel filtro cualitativo, circular de 110 mm de diámetro, 1	Whatman

### 4.3. Reactivos

#### Solventes orgánicos, grado HPLC

Acetato de etilo	Tedia
Hexano	HPLC

#### Solventes orgánicos, grado reactivo

Acetato de etilo	Tedia
Alcohol Isopropílico anhidro	Biopack
Cloroformo	J.T. Baker
Metanol	Tedia

#### Otros reactivos químicos

Agar, para microbiología	Sigma-Aldrich
Almidón de patata	Sigma-Aldrich
Agua destilada	INDICASAT
Agua marina	STRI
Cicloheximida, de origen microbiano $\geq 94\%$	Fluka (Sigma-Aldrich)
Cloranfenicol $\geq 98\%$	Sigma Chemical Co.
Cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) 99.8%	Cambridge Isotope Lab.
Cloruro de sodio	AppliChem
D(+)-Glucosa anhidra	BioChemica, AppliChem

Dimetilsulfóxido (DMSO), Plant Cell Culture Tested	Sigma-Aldrich
Extracto de levadura en polvo	Sigma Life Science
Extracto de Malta Broth	Becton Dickinson (Difco)
Glicerol $\geq 99\%$	Sigma-Aldrich
Luria Bertani (LB) Broth	Becton Dickinson (Difco)
Marine Broth	Becton Dickinson (Difco)
Müeller-Hinton (MH) Broth	Becton Dickinson (Difco)
Peptona, para microbiología	Sigma-Aldrich

#### **4.4. Aparatos y Equipos**

##### Aparatos

Agitador orbital	
Agitador de vórtice	Vortex Genie II
Autoclave (Esterilizador a vapor)	ALP, CLG series
Balanza analítica	Ohaus - Analytical Plus
Balanza granataria	Ohaus
Baño de ultrasonido	Branson, PC 620
Baño maría, Reciprocal Shaking Bath	Precision Scientific
Bombas de alto vacío	Precision
Bombas de vacío	Labconco
Cámara de extracción de gases	Hemco
Cámara de extracción de gases	Labconco

Cámara de flujo laminar	FC 120
Congelador de ultra baja temperatura (-86°C)	Thermo Scientific
Evaporador rotatorio	Labconco
Frigorífico de Laboratorio (4°C)	Sanyo (Lab cool)
Incubadora de laboratorio	CEDCO, serie 1500
Incubadora de laboratorio	Sanyo, serie MIR 263
Lector Multi-Modal de Microplacas	Synergy HT - Biotek
Liofilizador	Labconco, FZ-12 Plus
Micropipetas	Corning Lambda
Micropipetas multicanales	Corning Lambda
Plato caliente	Barnstead Thermoline
Rotavapor o Evaporador rotatorio	Buchi R210
Recicladores refrigerantes	Cole-Parmer polysat
Trampa de condensación refrigerada	Savant

### Equipos

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiencia (HPLC), equipado con un inyector manual, bomba cuaternaria, desgasificador, detector de arreglo de diodos y una columna de fase normal de Sílica, 5 $\mu$ , 250 x 1000 mm SphereClone (Phenomenex)	Agilent, Series 1100
--	----------------------

Espectrofotómetro Ultravioleta

Shimadzu, UV-2401 PC

Espectrómetro de Masas, equipado con una fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI), un analizador y detector de iones.

Jeol, JMS-LCMate

Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear, el equipo cuenta con una frecuencia de observación de 400 MHz para los núcleos de hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) y 100 MHz para los núcleos de carbono ( $^{13}\text{C}$ ).

Jeol Eclipse 400 MHz  
High Resolution FT

## **5. METODOLOGÍA**

## 5.1. Preparación de soluciones, medios de cultivos e inóculos bacterianos y fúngicos

### 5.1.1. Soluciones

Durante este proyecto de investigación se prepararon las siguientes soluciones.

<b>Solución salina (NaCl 0.85%)</b>	
Cristales de cloruro de sodio (NaCl)	8.5 g
Agua destilada	1 L
<b>Solución 0.5 McFarland</b>	
Cloruro de bario (BaCl <sub>2</sub> ) 1%	0.05 L
Ácido sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 1%	9.95 L

### 5.1.2. Medios de Cultivo

Durante este estudio fueron utilizados diferentes medios de cultivos para el crecimiento de bacterias y hongos. A menos que se especifique algo distinto, estos medios fueron preparados en matraces Erlenmeyer de 2 L, calentados y agitados en un plato caliente con ayuda de un agitador magnético hasta ebullición, luego fueron autoclavados por 15 minutos a 121°C/15lbs/plg<sup>2</sup>.

En el caso de los medios de cultivo sólidos, se les agregó agar antes de ser autoclavados. Se dejaron atemperar en un baño María a 45-55°C durante 20-30 minutos, y por último se sirvieron en platos Petri (96 x 16 mm) con un tamaño aproximado de 4 mm de profundidad dentro de la cámara de flujo laminar y se dejaron secar con la tapa cerrada por 4 horas.

- **Medios de cultivos para bacterias**

Los siguientes medios fueron empleados para el cultivo de bacterias.

<b>M1</b>	
Almidón	10 g
Extracto de levadura	4 g
Peptona	2 g
Agar	18 g
Agua marina	1 L
<b>Luria Bertani (LB)</b>	
Luria Bertani	20 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L
<b>Müeller-Hinton Broth (MHB)</b>	
Müeller-Hinton	2.1 g
Agua destilada	100 mL

Se calienta suavemente empleando un plato caliente y posteriormente se ajusta el pH a  $7.3 \pm 0.1$  (con NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N).

---

**Agar Marino (AM)**


---

Marine Broth	37.4 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 L

- **Medios para el cultivo de hongos**

Se emplearon los siguientes medios de cultivos para el crecimiento de hongos.

---

**Agar Extracto de Malta (EM)**


---

Extracto de Malta	15 g
Agar	18 g
Agua destilada	2 g

---

**Agar Müller-Hinton suplementado con glucosa al 2% (MHG)**


---

Müller-Hinton Broth	21 g
Agar	18 g
Agua destilada	1 L
Glucosa	20 g

<b>Agar Peptone Yeast Glucose (PYG)</b>	
Peptona	1 25 g
Extracto de levadura	1.25 g
Glucosa	3 0 g
Agar	18 g
Agua Marina	1 L

### **5.1.3. Inóculos bacteriano y fúngico**

#### **a. Suspensión bacteriana $1 \times 10^8$ UFC/mL**

- Las bacterias se cultivaron en platos de agar con medios de cultivo adecuados (M1 para bacterias marinas y LB para bacterias patógenas blanco) y se incubaron a 37°C durante 18-24 horas
- Con la ayuda de hisopos estériles, se tomaron suficientes colonias de platos del paso anterior y se agregaron en tubos de ensayos conteniendo 10 mL de solución salina 0.85% para preparar una suspensión bacteriana, con una turbiedad equivalente al estándar 0.5 McFarland.

#### **b. Suspensión de esporas $1-5 \times 10^6$ UFC/mL**

- De acuerdo con la tasa de crecimiento de la especie de hongo, se preparó el cultivo de 5 a 7 días a una temperatura de 30 °C en platos de agar de EM. Este crecimiento previo induce la formación de conidias o esporangiosporas.

- Con la ayuda de un asa de cultivo descartable empapado de glicerol al 99%, se tomaron las conidias para posteriormente resuspenderlas en tubos de plástico de 15 mL conteniendo 6 mL de solución salina al 0.85%.
- Se dejó sedimentar las partículas durante 3-5 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo de igual capacidad y se agitó vigorosamente durante 15 segundos.
- En el espectrofotómetro se midió la densidad óptica (DO) de la suspensión a 530 nm. Esta suspensión debe encontrarse a una DO entre 0.09-0.11 (Cantón et al., 2007).

## **5.2. Colecta, aislamiento e identificación de microorganismos**

En el marco del proyecto ICBG para la búsqueda y conservación de la biodiversidad de hongos endófitos y bacterias provenientes de fuentes terrestres y marinas con potencial actividad biológica, se han realizado diferentes expediciones en áreas seleccionadas del territorio panameño. Estos trabajos fueron ejecutados en conjunto por expertos profesionales del Laboratorio de Microbiología del Centro de Biodiversidad y Descubrimiento de Drogas de INDICASAT-AIP y del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales.

A continuación se describe brevemente el proceso de recolección, aislamiento e identificación de los microorganismos objeto de este estudio de investigación.

### **5.2.1. Bacterias asociadas a invertebrados marinos**

- **Colecta**

Se realizaron giras de campo en el Pacífico y Caribe de Panamá para la recolección de especies de invertebrados marinos y sus microorganismos asociados. Las recolecciones se efectuaron mediante buceo con aire comprimido (SCUBA) o mediante snorkeling, según fue necesario. Una parte del invertebrado fue utilizado para el aislamiento bacteriano y otra parte se conservó como referencia para la identificación taxonómica.

- **Aislamiento bacteriano**

Para el aislamiento bacteriano, los invertebrados marinos recolectados fueron lavados con agua marina estéril, para remover las bacterias pobremente adheridas. Luego, asépticamente, se separó una porción del mucus y otra de tejido (el cual fue macerado con agua marina estéril). Ambas porciones se extendieron sobre placas de agar con diferentes nutrientes (LB, M1, M2 y M3). Estas placas fueron incubadas y monitoreadas a temperatura ambiente por 3 meses.

Las colonias bacterianas que crecieron fueron sembradas en nuevas placas de agar para su purificación. Este proceso se repitió varias veces hasta que se adquirieron colonias puras.

Cada colonia fue criopreservada (-80°C) en caldo de cultivo con glicerol al 10%.

- **Identificación**

Las bacterias aisladas fueron identificadas empleando análisis morfológicos y caracterización molecular mediante secuenciación del gen ARNr 16S.

### **5.2.2. Hongos endófitos**

- **Colecta**

Diferentes expediciones fueron efectuadas en distintos bosques húmedos tropicales de la República de Panamá para la recolección de plantas y hongos endófitos asociados. Para tal propósito, se recolectaron muestras de tejido vegetal de plantas que incluyeron hojas sanas y pequeños trozos de ramas jóvenes.

- **Aislamiento**

Los aislamientos de hongos endófitos se realizaron a partir de segmentos de los órganos vegetales colectados. Estos segmentos de órganos se sometieron al proceso de esterilización para eliminar colonizadores superficiales. Posteriormente, se incubaron en platos con diferentes medios nutritivos (EM, agar Papa-dextrosa), a temperatura ambiente y con fuente de luz natural. Para la purificación y mantenimiento de todos los aislamientos, los hongos fueron transferidos a otros platos cada 3 semanas. En el laboratorio de hongos, las muestras se desinfectaron y se pusieron a crecer en una placa Petri mediante un protocolo de cultivo establecido. Se llevó a cabo una descripción morfológica de los aislamientos obtenidos.

- **Identificación**

Los hongos aislados fueron analizados mediante taxonomía molecular. El primer paso consistió en la extracción del ADN mediante un protocolo estándar. Posteriormente, el ADN se amplificó mediante PCR, los productos se clonaron y se identificaron mediante la técnica de análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

(RFPL) de las regiones ITS (espaciador transcrito interno) 5.8 S. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante la comparación con bases de datos taxonómicas especializadas

### 5.3. Fermentación de microorganismos en gran escala

Con el objetivo de evaluar la actividad biológica potencial de la interacción de estos microorganismos, se preparó tanto el cultivo individual y cocultivo de la bacteria marina (GA0204) y los hongos endófitos (F0075 y F2803) en medio líquido y sólido utilizando como sustrato caldo y agar de M1, respectivamente. Los cultivos individuales fueron utilizados como controles.

#### 5.3.1. Cocultivos en medio líquido

Se prepararon 24 matraces Erlenmeyer de 500 mL con 250 mL medio de cultivo líquido M1. Posteriormente fueron autoclavados por 15 minutos a 121°C/15lbs/plg<sup>2</sup>.

A continuación, los matraces fueron inoculados con 100 µL de suspensión bacteriana 0.5 McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC, ver sección 5.1.3.) y con la mitad del contenido de un plato Petri con agar de EM conteniendo las esporangiosporas cultivadas con 5-7 días de anterioridad (ver sección 5.1.3.), conforme al siguiente cuadro:

**Cuadro 5.1.** Esquema de inoculación de cultivos individuales y cocultivos en medio líquido.

Erlenmeyer	No. de Erlenmeyers	Suspensión bacteriana (100 µL)	Espora de hongo (½ plato de EM)
Cocultivo	20	J	J
Control Bacteriano	2	J	-
Control fúngico	2	-	J

Posteriormente, los matraces fueron incubados en un agitador orbital a 200 rpm durante 10 días a temperatura ambiente. Una vez culminado este periodo, se inspeccionó el color de los medios de cultivos.

### 5.3.2. Cocultivos en medio sólido

La bacteria marina (*Pseudoalteromonas sp.*) y *Aspergillus fumigatus* fueron inoculados en 120 platos Petri de 145 x 20 mm con agar M1 empleando 4 diferentes técnicas de rayado conforme a la figura 5.1.

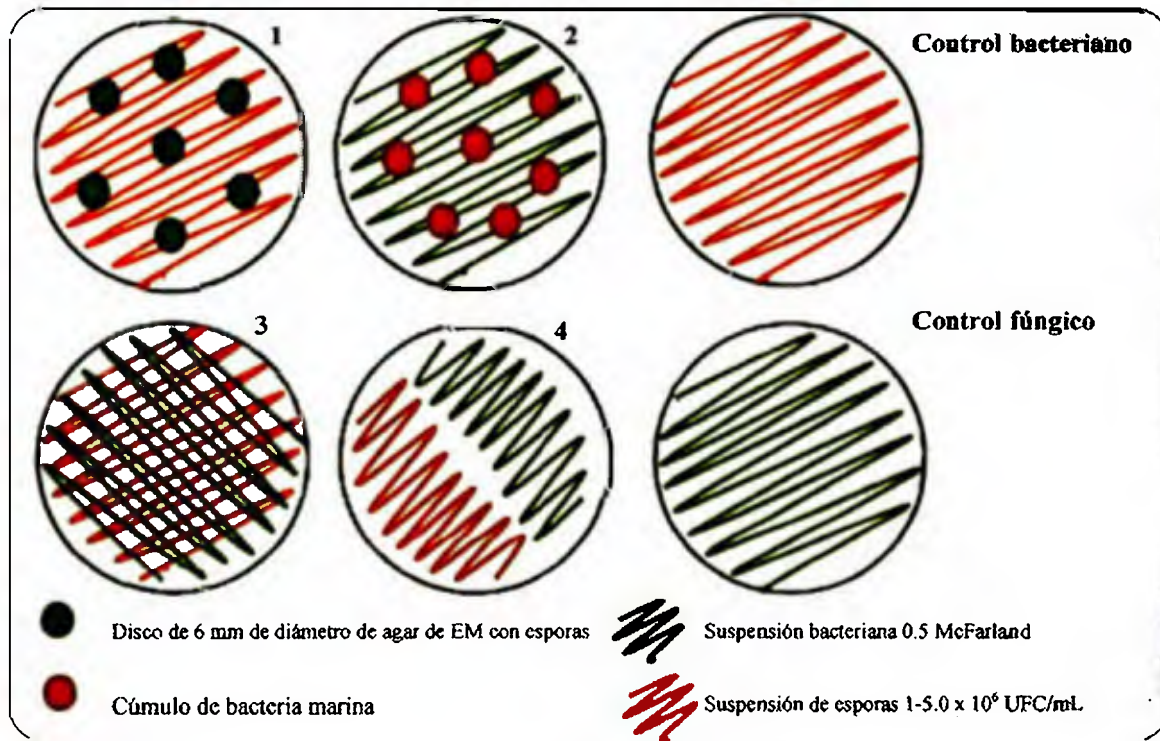


Figura 5.1. Esquema de inoculación de cultivos en medio sólido.

Se inocularon 25 platos por cada técnica de rayado y 10 platos por cada cultivo individual.

Los platos Petri fueron incubados a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 15 días. Durante este periodo se inspeccionó la apariencia de los cultivos.

#### **5.4. Extracción de los cocultivos**

Para extraer los compuestos activos se utilizó acetato de etilo (EtOAc) como disolvente orgánico.

##### **5.4.1. Cocultivos en medio líquido**

- Se utilizó la técnica de extracción líquido-líquido. Para ello el contenido de cada uno de los matraces se extrajo tres veces con igual volumen de EtOAc en un embudo de separación de 2 L.
- Los extractos orgánicos fueron lavados con agua destilada en una proporción 1:1 para eliminar restos del medio de cultivo.
- El extracto resultante se concentró al vacío (bajo presión reducida) utilizando un evaporador rotatorio hasta obtener un extracto crudo seco.

##### **5.4.2. Cocultivos en medio sólido**

Se empleó el proceso de extracción sólido-líquido o maceración.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, el medio de cultivo se procedió a cortar en cuadros de aproximadamente 1 cm de longitud y, posteriormente, se deshidrataron en el liofilizador durante 3 días.

Una vez obtenido el agar seco, se colocó el equivalente a 25 platos en un vaso químico de 1 L y se le agregó suficiente EtOAc para cubrir toda la muestra.

Por un periodo de siete días, se reemplazó el EtOAc cada 24 horas.

Se conservó la fase orgánica y se concentró al vacío mediante un evaporador rotatorio hasta obtener un extracto seco.

### 5.5. Fraccionamiento por extracción en fase sólida (EFS)

Los extractos crudos secos se fraccionaron empleando cartuchos de extracción en fase sólida (EFS) de fase reversa (C18). Para ello, la muestra fue eluída utilizando un gradiente escalonado de Metanol:Agua para obtener las fracciones A-F (Cuadro 5.2). Los componentes del extracto crudo fueron separados por su polaridad para obtener fracciones menos complejas.

**Cuadro 5.2.** Fraccionamiento por extracción en fase sólida (EFS).

Polaridad	Fracción	Porcentaje de Metanol (%)	Volumen de fase móvil (mL)	
			Cartuchos de 1 g (25-100 mg de extracto crudo)	Cartuchos de 10 g (500 a 1000 mg de extracto crudo)
	Activación	100		
	Acondicionamiento	20	10	100
Incremento de la Polaridad ↑	A	20	6	100
	B	40		
	C	60		
	D	80		
	E	100		
	F	100		

## 5.6. Evaluación de la actividad biológica

### 5.6.1. Bioensayos anticancerígenos y contra enfermedades causadas por parásitos tropicales

La evaluación de los extractos, fracciones y compuestos puros, en cuanto a sus propiedades anticancerígenas y contra los parásitos protozoarios responsables de la enfermedad de Chagas, malaria y leishmaniasis, fue realizada mediante los protocolos establecidos por ICBG Panamá, Programa Asociado 2 (AP2) en los laboratorios del Centro de Biología Celular y Molecular de Enfermedades de INDICASAT-AIP. En el cuadro 5.3 se detallan los parámetros de los bioensayos.

**Cuadro 5.3.** Parámetros de los ensayos anticancerígeno y antiparasitarios

Parámetros	Bioensayo			
	Cáncer	Enfermedad de Chagas	Malaria	Leishmaniasis
Línea celular/parásito	MCF-7	<i>T. cruzi</i>	<i>P. falciparum</i>	<i>L. donovani</i>
Control positivo	Adriamicina	Nifurtimox	Cloroquina	Anfotericina B
Punto de Corte	C < 25%	IC > 50%	IC > 70%	IC > 70%
Tipo de ensayo	Colorimétrico	Colorimétrico	Fluorométrico	Fluorométrico

C: Crecimiento, IC: Inhibición de crecimiento.

Los cuatro bioensayos antes descritos constan de dos modalidades:

- **Screening:** Se utiliza una concentración de 10 µg/mL del extracto, fracciones y compuestos puros
- **IC<sub>50</sub>:** Se emplean 4 concentraciones (10, 2, 0.4, 0.08 µg/mL) de los compuestos puros que demostraron actividad biológica en el screening. Se consideran activas aquellas muestras que posean un IC<sub>50</sub> <10 µg/mL

Se realizó un ensayo adicional para determinar la citotoxicidad de los compuestos puros utilizando la línea celular Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano del género *Chlorocebus*)

#### **5.6.2. Bioensayos antimicrobianos**

##### **a. Evaluación de la actividad antibacteriana**

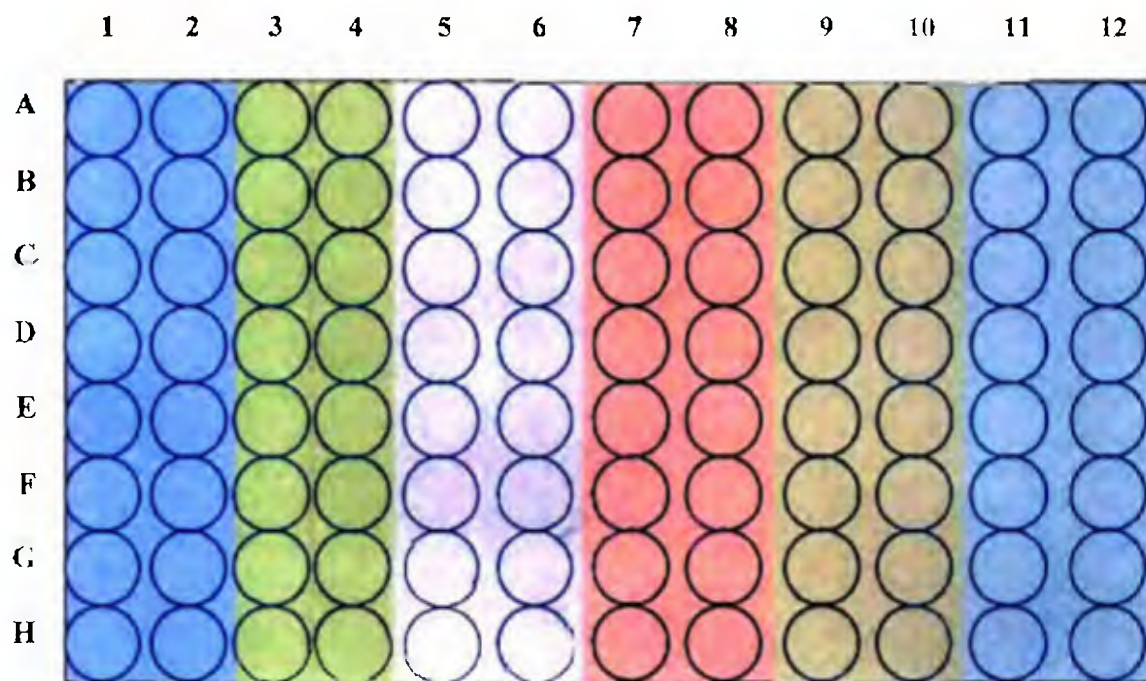
Para el descubrimiento de compuestos antibacterianos, fue utilizado el ensayo basado en el Método de Microdilución para el Screening de Productos Naturales contra bacterias (Zgoda y Porter, 2001). Se evaluó el efecto antimicrobiano contra las bacterias ATCC *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Cándida albicans* y las bacterias blanco *Staphylococcus sp*, *Bacillus sp*, *Enterobacter sp* (2) y *Vibrio sp*, las cuales fueron aisladas e identificadas mediante secuenciación del gen ARNr 16 S

Los extractos, fracciones y compuestos puros fueron ensayados a una concentración estándar de 100 mg/mL. En términos generales, el plato de 96 pocillos fue preparado dispensando en cada uno 95 µL de agua estéril, 80 µL de medio de cultivo Mueller-Hinton Broth (ver sección 5.1.2), 20 µL del inóculo bacteriano con una turbiedad equivalente al estándar 0.5 McFarland (ver sección 5.1.1) y 5 µL de extracto disuelto en

DMSO, a una concentración de 4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , para obtener un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  por pocillo.

En este ensayo se incluyeron los siguientes controles: control de color (agua, medio de cultivo y muestra disuelta en DMSO), control positivo (agua, medio, inóculo, cloranfenicol disuelto en DMSO), control negativo (agua, medio de cultivo, inóculo y DMSO) y control de esterilidad (agua, medio de cultivo y DMSO).

En el cuadro 5.4 y figura 5.2 se detallan la preparación y distribución de muestras y controles en el plato de 96 pocillos.



**Figura 5.2.** Configuración del plato de 96 pocillos para el ensayo antibacteriano de microdilución. Distribución de muestras y controles: ■ Muestra #1 ■ Muestras #2 ■ Control de color ■ Control positivo ■ Control negativo ■ Control de esterilidad.

**Cuadro 5.4.** Preparación del plato de 96 pocillos para el ensayo antibacteriano

Reactivos	Ensayo antibacteriano y controles				
	Bioensayo	C de color	C positivo	C negativo	C de esterilidad
1. Agua	95	100	95	95	100
2 Medio de cultivo	80	95	80	80	95
3 Inóculo bacteriano	20	-	20	20	-
4 Solución muestra	5	5	-	-	-
5. Solución antibiótica	-	-	5	-	-
6 DMSO	-	-	-	5	5

El contenido de cada pocillo fue mezclado con la ayuda de una micropipeta multicanal y el plato de microdilución fue incubado durante 18 horas a 37°C

El crecimiento de los microorganismos fue determinado por la absorbancia a 750 nm en un lector de microplacas. Antes de realizar las lecturas, el contenido de todos los pocillos fue mezclado con una micropipeta multicanal para resuspender las células agrupadas en el fondo de los pocillos.

El porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\%IC = \frac{DO \text{ Control Negativo Corregida} - DO \text{ Muestra Corregida}}{DO \text{ Control Negativo Corregida}} \times 100$$

$$DO \text{ Control Negativo Corregida} = DO \text{ Control Negativo} - DO \text{ Control de esterilidad}$$

$$DO \text{ Muestra Corregida} = DO \text{ muestra} - DO \text{ Control de color}$$

### b. Evaluación de la actividad antifúngica

La evaluación de la actividad antifúngica se determinó mediante el método de difusión de disco (Tarman et al., 2011; Saikot et al., 2012, Fakruddin et al., 2012; Peman et al., 2007). Para lo lograr este objetivo, se utilizaron los hongos endófitos *Aspergillus fumigatus* y *Emericella unguis*.

A continuación se detalla el procedimiento utilizado (ver figura 5.3):

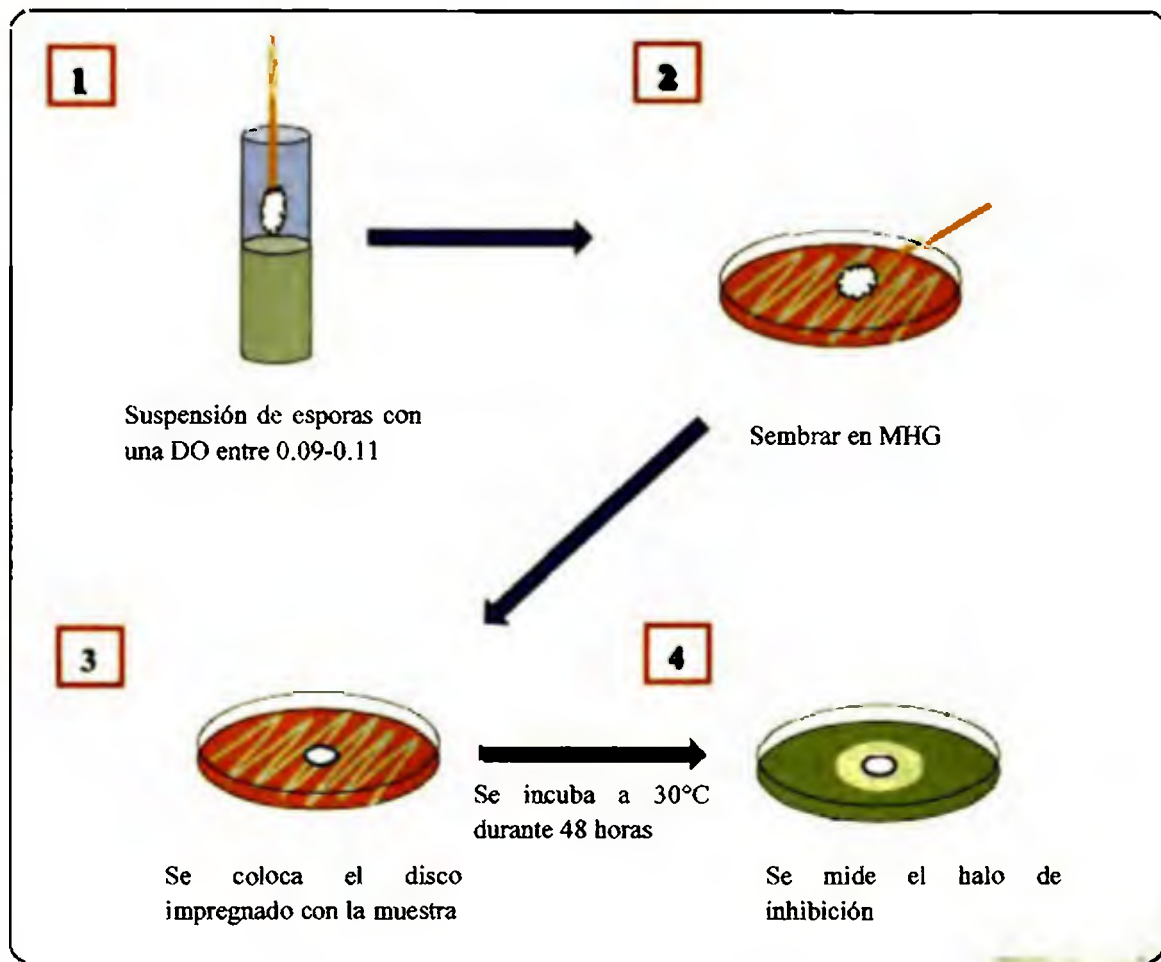
- Se sumergió un hisopo estéril en una suspensión de las esporas del hongo con un DO entre 0.09-0.11 ( $1-5.0 \times 10^6$  UFC/mL) y se retiró el exceso de líquido rozando la punta del hisopo con las paredes del tubo que contiene esta suspensión.
- Se sembraron las esporas rayando los platos de agar Müeller-Hinton suplementado con glucosa al 2% (MHG) uniformemente y se dejó secar por espacio de 3-5 minutos.
- Los extractos fueron inoculados en discos de papel filtro Whatman #1 de 6 mm de diámetro, utilizando la concentración final de las muestras según el siguiente cuadro:

**Cuadro 5.5.** Preparación de discos para el ensayo antifúngico.

Tipo de muestra	Rango según referencias bibliográficas ( $\mu\text{g}/\text{disco}$ )	Concentración para screening ( $\mu\text{g}/\text{disco}$ )
Extractos y fracciones	100-2000	400
Producto purificado	30-50	50
Cicloheximida (Control Positivo)	30-50	50

- Se aplicaron los discos en el centro de los platos y se dejaron reposar por 10 minutos.
- Los platos se incubaron a 30 °C durante 48 horas.

- Se revisó el crecimiento diariamente. Si no hubo suficiente crecimiento en los platos a las 48 horas, se re-incubaron y leyeron a las 72 horas.
- Se midió el halo de inhibición donde se produjo una reducción importante del crecimiento. La presencia de micro colonias en el borde del halo de inhibición o de colonias grandes en el interior del halo fueron ignoradas.



**Figura 5.3.** Flujograma de trabajo para la preparación del ensayo antifúngico de difusión por disco.

### 5.7. Purificación de fracciones por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)

La purificación de los metabolitos secundarios fue dirigida por la actividad biológica obtenida, de modo que aquellas fracciones activas contra cáncer, enfermedades tropicales, bacterias y hongos blancos fueron sometidas a purificación por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para ello se utilizó un cromatógrafo líquido con una columna de fase normal semipreparativa de sílica gel y una fase móvil compuesta por hexano y acetato de etilo. Se utilizaron condiciones cromatográficas estándar para la purificación de las fracciones activas conforme al cuadro 5.6.

**Cuadro 5.6.** Condiciones cromatográficas estándar para la purificación de fracciones activas

Parámetro	Condición Cromatográfica		
Columna Cromatográfica	SphereClone 5 $\mu$ Sílica (Phenomenex), 250 x 1000 mm		
Cromatógrafo	Agilent 1100 Series, equipado con detector de arreglo de diodos		
Flujo	1.0 mL/min		
Volumen de inyección	50 $\mu$ L (3 mg/ $\mu$ L)		
Longitud de onda	254 y 280 nm		
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente		
Fase móvil	Hexano:Acetato de etilo (A:B)		
Gradiente de elución	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	100	0
	75	0	100
	120	0	100
	125	100	0

Los picos cromatográficos fueron recolectados, llevados a sequedad, rotulados y almacenados a 4°C.

### **5.8. Elucidación estructural de compuestos**

La estructura química de los compuestos purificados fue determinada mediante los datos de Espectrometría de Masas (MS) y Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

- **Espectrometría de Masas**

Los espectros de masas (alta y baja resolución) fueron obtenidos por análisis directo en un espectrómetro de masas modelo JMS-LCMate, Jeol. Este equipo cuenta con una fuente de ionización química a presión atmosférica (APCI) y se utilizó en modo de ionización positiva (+). Además, se usó nitrógeno (N<sub>2</sub>) como gas de nebulización y polietilenglicol como estándar de calibración.

- **Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)**

Los espectros de RMN fueron adquiridos en el equipo JEOL Eclipse 400 MHz, usando tetrametilsilano (TMS) como referencia de desplazamiento químico. Los espectros fueron registrados en Cloroformo deuterado (CDCl<sub>3</sub>), usando como referencia las señales de solvente a 726 para protón y 77 0 para carbono.

Se realizaron los siguientes experimentos:

**Cuadro 5.7.** Experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Experimento	Tipo de Experimento	Utilidad
Protón ( $^1\text{H}$ )	1D	Tipos de protones
Carbono ( $^{13}\text{C}$ )	1D	Tipos de carbonos
$^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY (Correlation spectroscopy)	2D	Determina acoplamientos protón-protón
$^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence)	2D	Provee la correlación entre un carbono y sus protones enlazados directamente
$^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)	2D	Determina la correlación entre protones y carbonos separados uno de otro por dos o tres enlaces químicos.

Los datos de adquisición fueron procesados en un ordenador utilizando los programas Delta (Jeol, USA) y ACD LABS 12.0/ NMR Processor (Advanced Chemistry Development).

- **Determinación estructural de los compuestos bioactivos**

Empleando los datos de espectrometría de masas, espectroscopia de resonancia magnética nuclear y con la ayuda de las bases de datos de productos naturales MarinLit y AntiMarin (disponibles en INDICASAT-AIP), se determinó las estructuras químicas de los compuestos activos con un elevado grado de pureza.

## **6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 6.1. Colecta, aislamiento e identificación de microorganismos

### 6.1.1. *Pseudoalteromonas sp. (GA204)*

En la expedición del 6 de octubre de 2009 en Punta Galeta, provincia de Colón (Atlántico Panameño), se recolectó una serie de invertebrados marinos que fueron sometidos a trabajos taxonómicos para su caracterización. Entre los ejemplares identificados se encontró el coral *Muriceopsis bayeriana* (Figura 6.1). Este espécimen pertenece a la familia de los *Plexauridae* y se caracteriza por ser de color amarillo, poco tupido, con ramas secundarias alrededor de las ramas principales, con pólipos dispersos al azar en todas partes y con una abundante capa de mucopolisacáridos.

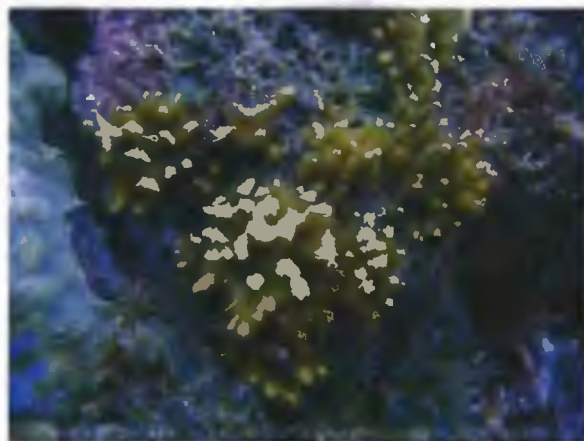


Figura 6.1. *Muriceopsis bayeriana*.

Diferentes bacterias marinas asociadas al coral *Muriceopsis bayeriana* fueron purificadas. La bacteria GA204 fue aislada de la capa mucopolisacárida de este coral y, posteriormente, identificada como *Pseudoalteromonas sp.* (Figura 6.2).

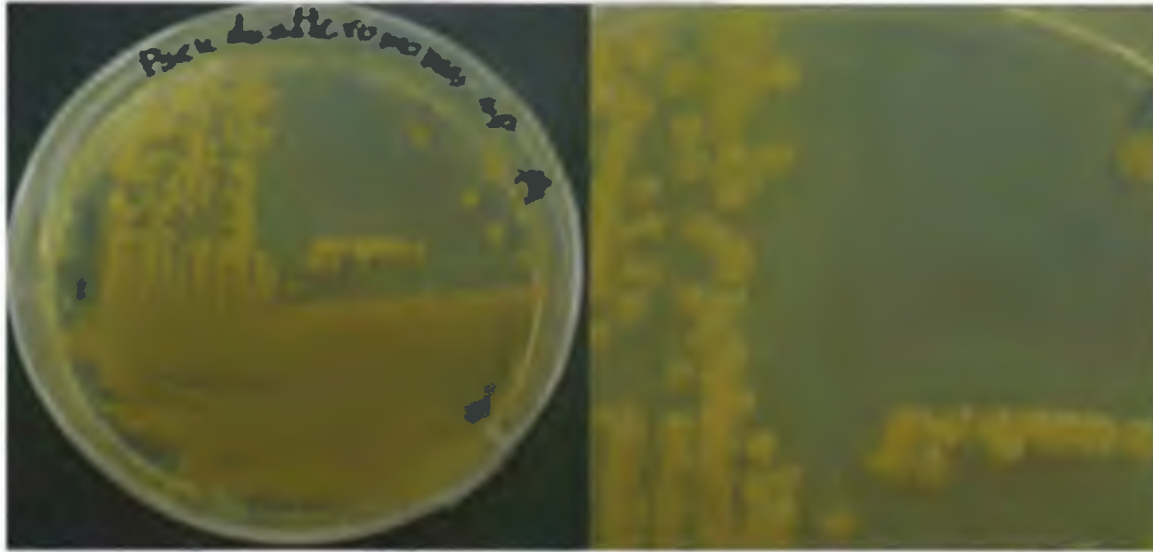


Figura 6.2. *Pseudoalteromonas* sp. (GA204).

#### 6.1.2. *Aspergillus fumigatus* (F0075) y *Emericella unguis* (F2803)

Los hongos endófitos utilizados en este trabajo de investigación fueron aislados de plantas de bosques tropicales panameños e identificados por expertos profesionales del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI). *Aspergillus fumigatus* (F0075) se obtuvo de hojas maduras de *Guarea* sp. (Meliaceae) colectadas en el Monumento Natural Barro Colorado, provincia de Panamá en enero de 1998. *Emericella unguis* (F2803) fue obtenido de hojas maduras de *Homolepis aturensis* (Pouceae) colectado en la provincia de Colón en marzo de 2008 (ver figura 6.3). Estos microorganismos fueron donados por la Dra. Sarah Higginbotham del ICBG.



Figura 6.3. Hongos endófitos y plantas hospederas (A) *Guarea sp.* (B) *Aspergillus fumigatus* (C) *Homolepis aturensis* (D) *Emericella unguis*.

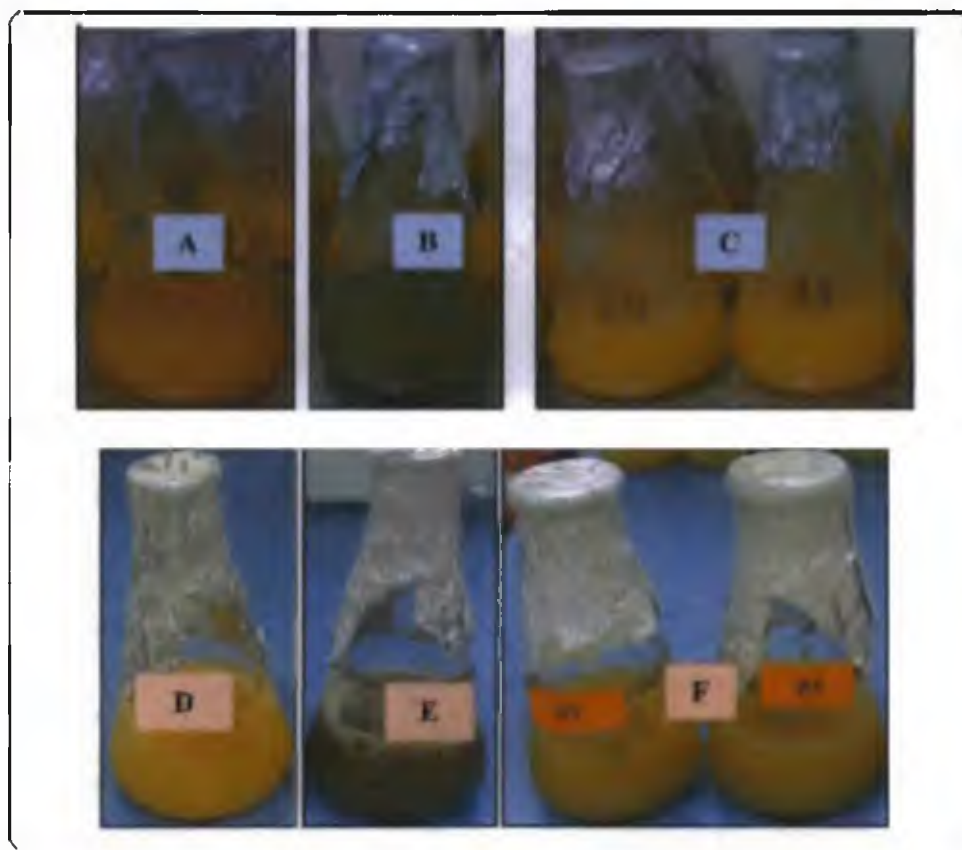
## 6.2. Fermentación, extracción y fraccionamiento de los cultivos en medio líquido y sólido

### 6.2.1. Fermentación

#### a. Cultivos en medio líquido

Una vez transcurrido el periodo de incubación, el contenido de los matraces de los controles (cultivos individuales) y cocultivos fue inspeccionado. Los controles de *Pseudoalteromonas sp.* se caracterizaron por presentar un color amarillo intenso, mientras que los controles de *A. fumigatus* y *E. unguis* eran de color verde olivo oscuro y

chocolate, respectivamente. Los cocultivos eran de color amarillo muy similares al cultivo individual de la bacteria marina. A simple vista se hizo evidente la inhibición de crecimiento de los hongos endófitos en presencia de *Pseudoalteromonas sp.* En la figura 6.4 se presentan las imágenes de la fermentación de los microorganismos en los medios de cultivos líquidos antes mencionados.



**Figura 6.4.** Fermentación de microorganismos en medio de cultivo líquido. (A) *Pseudoalteromonas sp.* (B) *Aspergillus fumigatus* (C) *Pseudoalteromonas sp.* vs. *Aspergillus fumigatus* (D) *Pseudoalteromonas sp.* (E) *Emericella unguis* (F) *Pseudoalteromonas sp.* vs. *Emericella unguis*.

b. *Cultivos en medio sólido*

En la figura 6.5 se presenta una recopilación cronológica del comportamiento del cocultivo de *Pseudoalteromonas sp.* y *A. fumigatus* en medio sólido. Durante los tres primeros días de incubación fueron evidentes grandes halos de inhibición del crecimiento del hongo alrededor de las colonias de la bacteria marina. No obstante, a partir del cuarto día, el *A. fumigatus* creció sin limitaciones, incluso sobre las colonias bacterianas.

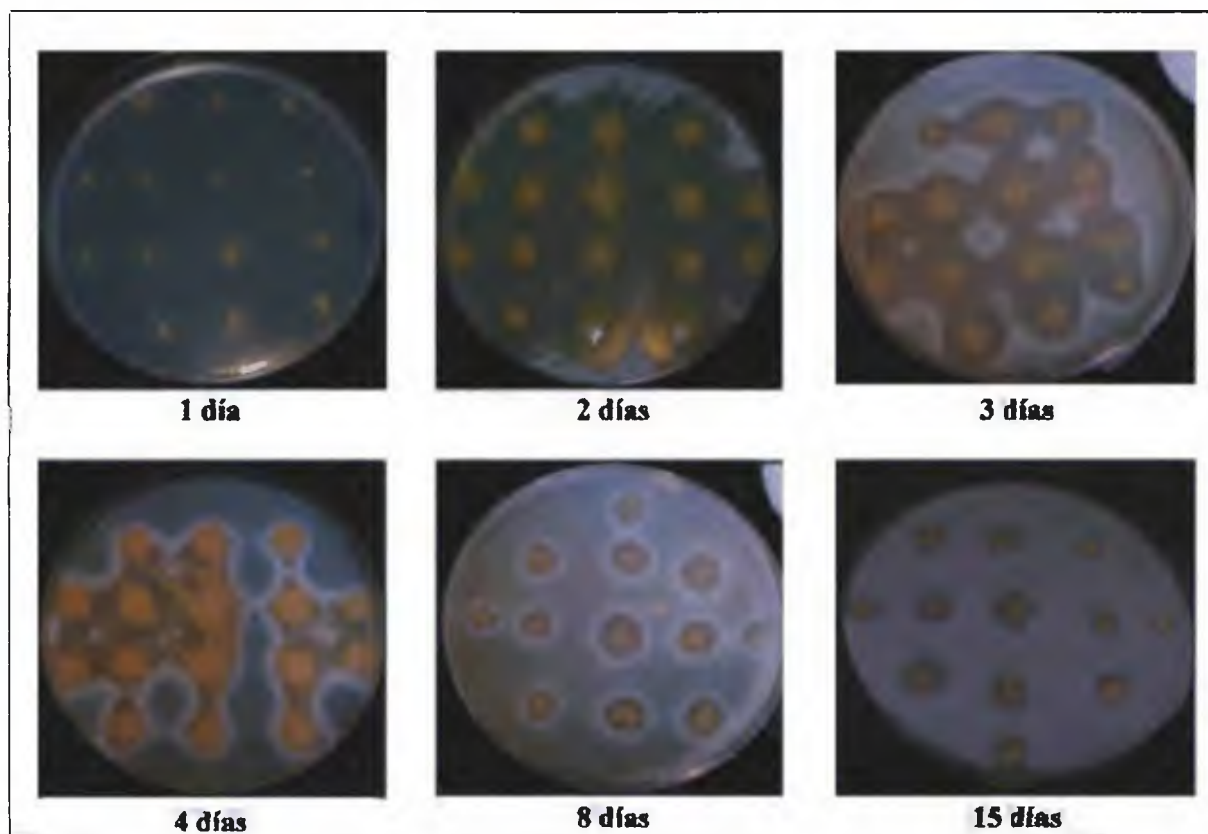


Figura 6.5. Descripción cronológica del cocultivo de *Pseudoalteromonas sp.* y *Aspergillus fumigatus* en medio sólido.

### 6.2.2. Extracción y fraccionamiento

Los metabolitos secundarios producidos durante la fermentación de los microorganismos fueron extraídos con acetato de etilo mediante una extracción líquido-líquido para los

cultivos en medio líquido y maceración para los cultivos en medio sólido. Posteriormente, se concentraron los extractos con ayuda de un evaporador rotatorio bajo presión reducida hasta obtener un extracto crudo y seco. Por último, el extracto crudo fue sometido a una extracción en fase sólida (EFS) con un cartucho de C18 para obtener fracciones menos complejas (ver figura 6.6).



**Figura 6.6.** Extracción y fraccionamiento de los cultivos en medio líquido y sólido **(A)** Extracción líquido-líquido del medio de cultivo líquido **(B)** Liofilización del medio de cultivo sólido **(C)** Extracción sólido-líquido (maceración) del medio de cultivo sólido **(D)** Fraccionamiento mediante extracción en fase sólida (EFS) **(E)** Concentración del Extracto **(F)** Extracto crudo y seco.

La asignación de los códigos de identificación, así como el rendimiento de los extractos y fracciones de los cultivos en medio líquido y sólido se presentan a en los cuadros 6.1 y

6 2, respectivamente En general, se obtuvieron seis fracciones (A-F) de los cocultivos y cinco fracciones (A-E) de los cultivos individuales.

**Cuadro 6.1.** Fraccionamiento de cultivos en medio líquido

Fracciones	Masa obtenida por cultivo (mg)						
	500 mL de medio de cultivo			5000 mL de medio de cultivo			
	GL0211	GL0271	GL0272	GL0278	GL0278-2	GL0279	GL0279-2
Crudo	28,7	112,1	85,1	297,3	390,8	240,6	296,7
(A)	1,0	4,2	4,9	55,9	53,5	33,6	47,9
(B)	3,6	2,7	4,3	56,5	138,3	34,7	59,3
(C)	1,3	22,8	1,6	25,6	35,6	28,7	75,4
(D)	1,1	31,9	10,5	85,2	72,0	73,4	27,6
(E)	17,2	22,9	4,8	56,9	37,6	24,9	80,3
(F)	-	-	-	3,1	40,0	2,9	6,2

GL0211 *Pseudoalteromonas sp.*, GL0271 *A. fumigatus*, GL0272 *Emericella unguis*, GL0278 *Pseudoalteromonas sp vs A. fumigatus*, GL0279 *Pseudoalteromonas sp vs E. unguis*

**Cuadro 6.2.** Fraccionamiento de cultivos en medio sólido

Fracciones	Masa obtenida por cultivo (mg)					
	10 platos		25 platos			
	GL0211 MS	GL0271 MS	GL0278 MS (1)	GL0278 MS (2)	GL0278 MS (3)	GL0278 MS (4)
Crudo	86,5	311,8	665,7	557,3	749,7	1016,6
(A)	34,4	66,7	348,3	128,2	219,6	259,9
(B)	14,4	45,8	102,9	183,4	127,1	59,4
(C)	1,4	49,6	87,3	42,3	36,3	43,9
(D)	3,2	28,5	30,6	28,1	30,1	34,2
(E)	19,5	178,2	86,7	71,2	147,6	118,2
(F)	3,4	6,4	9,4	3,5	20,1	4,8

GL0211 MS *Pseudoalteromonas sp.*, GL0271 MS *A. fumigatus*, GL0278 MS (1-4) *Pseudoalteromonas sp vs A. fumigatus*

### 6.3. Purificación y actividad biológica de los extractos

La purificación de los metabolitos secundarios se llevó a cabo mediante fraccionamiento biodirigido. El esquema de purificación de las fracciones activas y los resultados en los bioensayos anticancerígenos y contra parásitos de enfermedades tropicales se detallan en las figuras 6.7 a 6.14. También se incluye la purificación de compuestos, que a pesar de ser inactivos frente a los bioensayos disponibles en el laboratorio, presentaban espectros de protones que indicaban la presencia de estructuras químicas interesantes.

Las fracciones activas se sometieron a purificación por HPLC en columna semipreparativa en fase normal, utilizando un gradiente lineal de una fase móvil compuesta por hexano y acetato de etilo por 120 minutos, a un flujo constante de 1.0 mL/min, empleando una longitud de onda de 280 nm.

La fracción B del cocultivo GL0278 (figuras 6.7 y 6.8) resultó muy activa contra cáncer (22.7% C). De esta fracción se purificaron cuatro compuestos: GL0278 B P6 fue el responsable de la actividad anticancerígena (0.2% C); GL0278 B P5, que inhibió el crecimiento *Staphylococcus sp*, *Enterobacter sp* y *Vibrio sp*; y por último GL0278 B P7 y GL0278 B P10 que fueron inactivos frente a los bioensayos realizados.

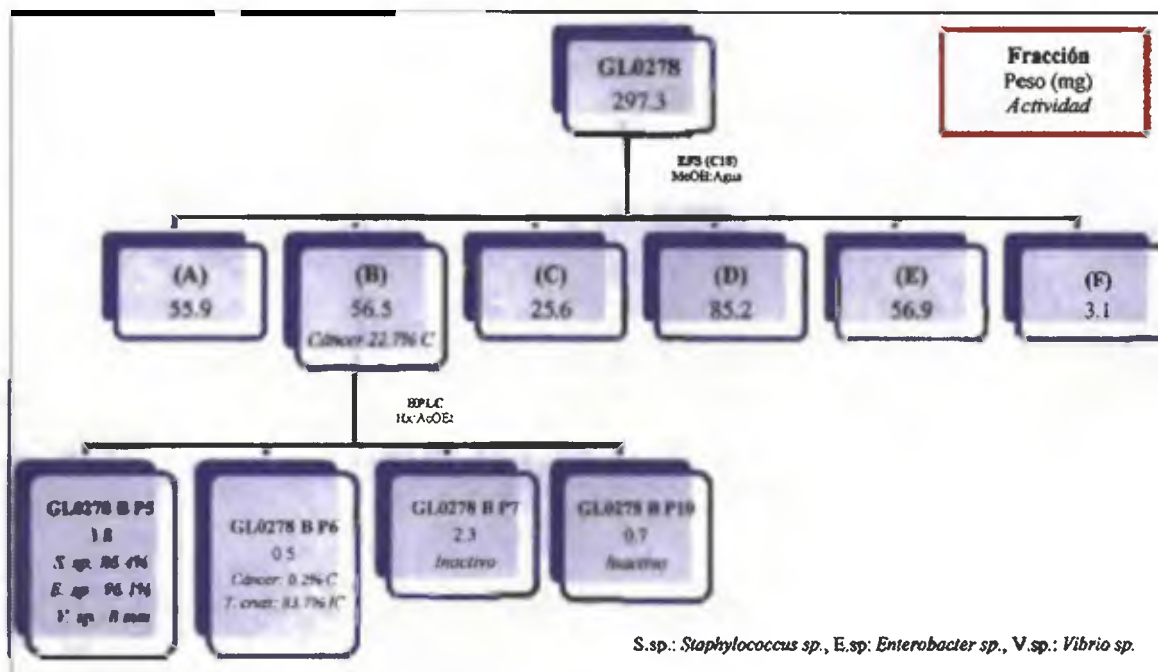


Figura 6.7. Esquema de purificación del extracto crudo del cocultivo de *Pseudoalteromonas sp.* vs. *Aspergillus fumigatus* (GL0278) fermentado en medio líquido M1.

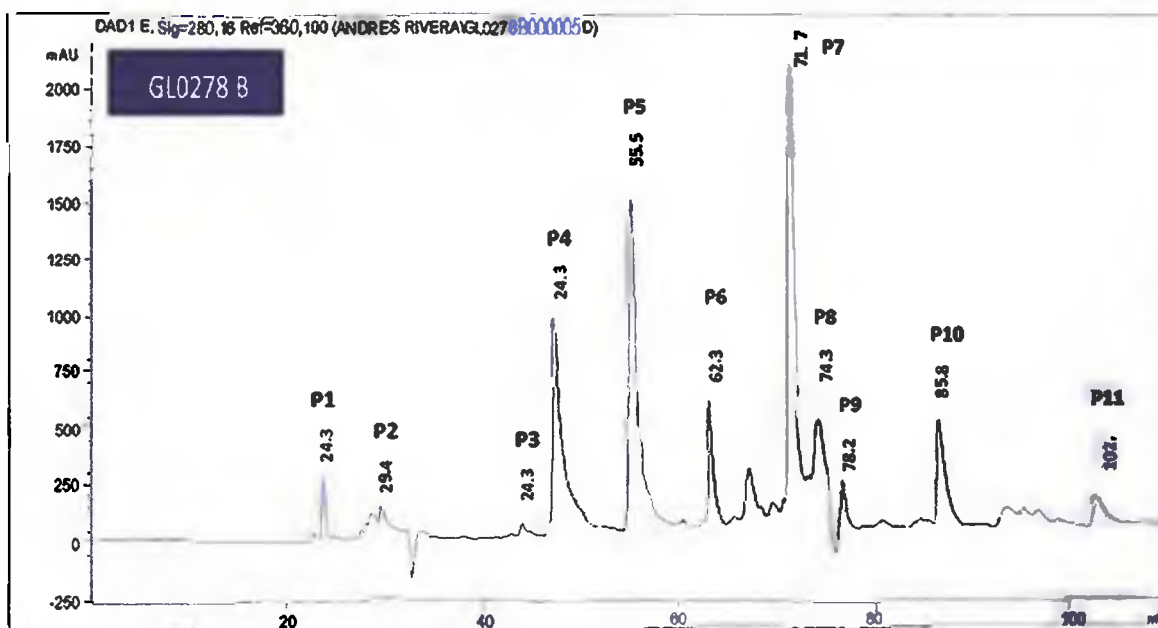


Figura 6.8. Cromatograma de HPLC para la purificación de la fracción GL0278 B.

Por otro lado, la fracción C del cocultivo GL0279 (figuras 6.9 y 6.10) mostró actividad contra cáncer (2.1% C), Chagas (79.5 % IC) y leishmaniasis (78.3% IC). Se purificó el compuesto GL0279 C P3 (responsable de la actividad biológica de la fracción C) y los compuestos inactivos GL0279 C P2, GL0279 C P4 y GL0279 C P5.

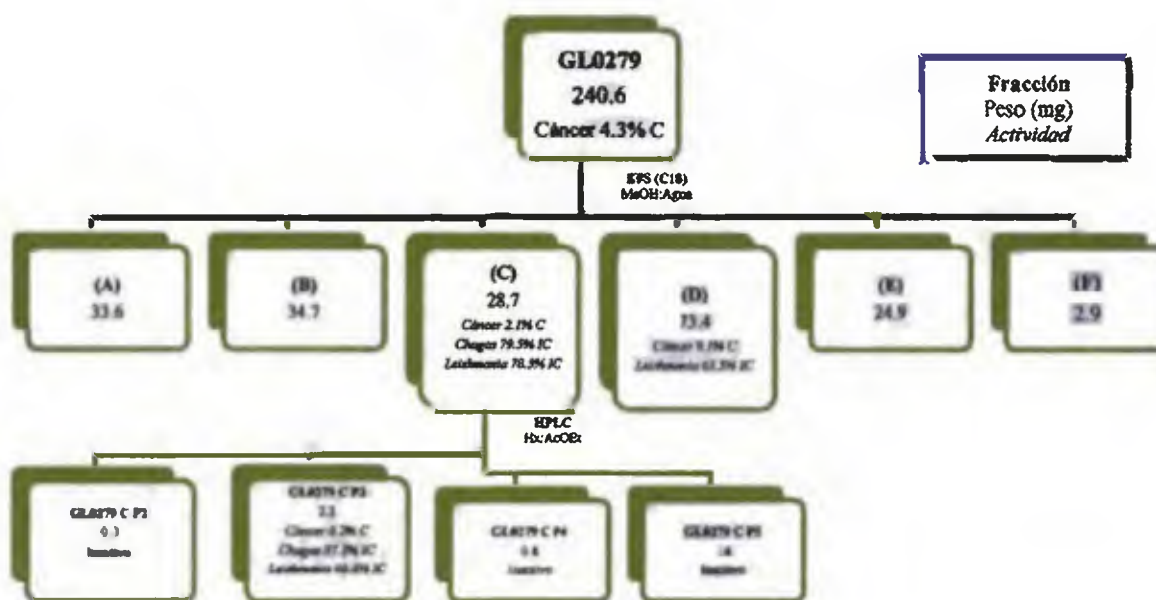


Figura 6.9. Esquema de purificación del extracto crudo del cocultivo de *Pseudoalteromonas sp.* vs. *Emericella unguis* (GL0279) fermentado en medio líquido M1.

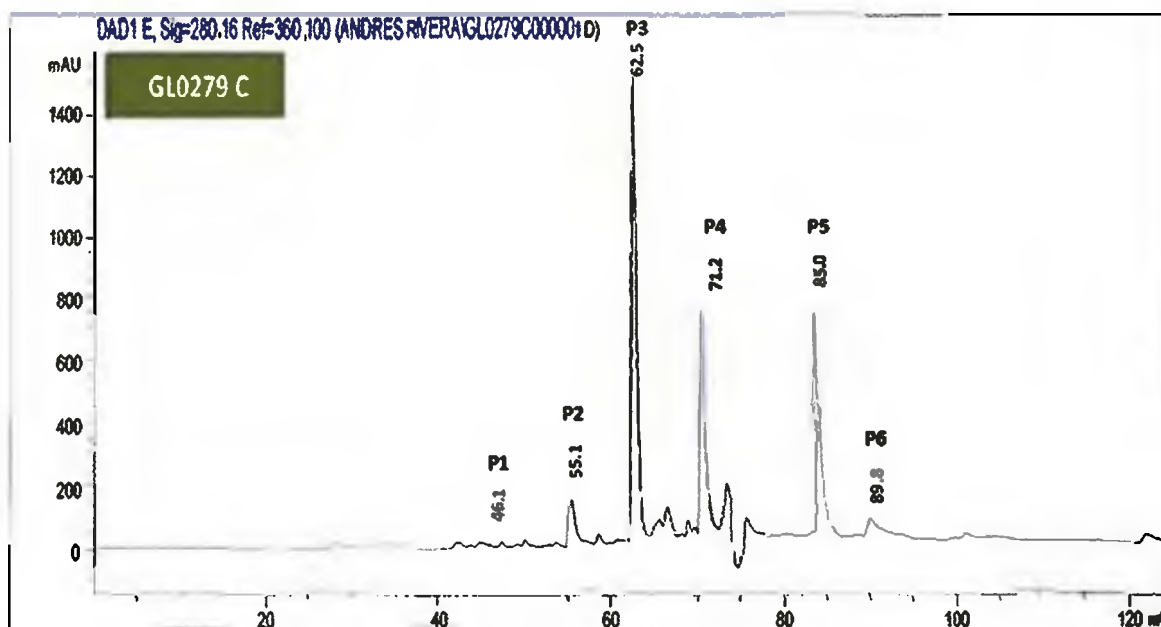


Figura 6.10. Cromatograma de HPLC para la purificación de la fracción GL0279 C.

La fracción C del cocultivo GL0279-2 (figuras 6.11 y 6.12) fue moderadamente activa contra cáncer (38.4% C). De esta fracción se purificaron tres compuestos: el compuesto GL0279-2 C P5, activo contra cáncer (0.2% C), Chagas (82.2% IC), leishmaniasis (63.1% IC) y malaria (88.4% IC) y los compuestos inactivos GL0279-2 C P3 y GL0279-2 C P6. Además, se aislaron los compuestos GL0279-2 C P2 (0.2 mg) y GL0279-2 C P4 (0.2 mg) activos contra malaria (76.2% IC) y leishmaniasis (69.7% IC), respectivamente.

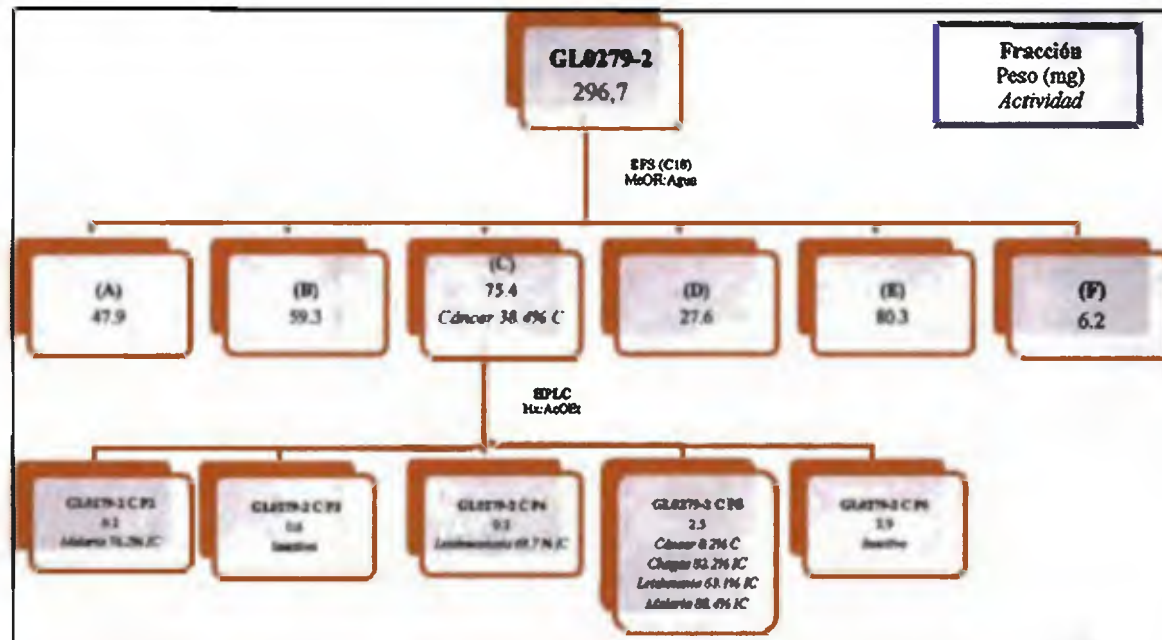


Figura 6.11. Esquema de purificación del extracto crudo del cocultivo de *Pseudoalteromonas* sp. vs. *Emericella unguis* (GL0279-2) fermentado en medio líquido M1.

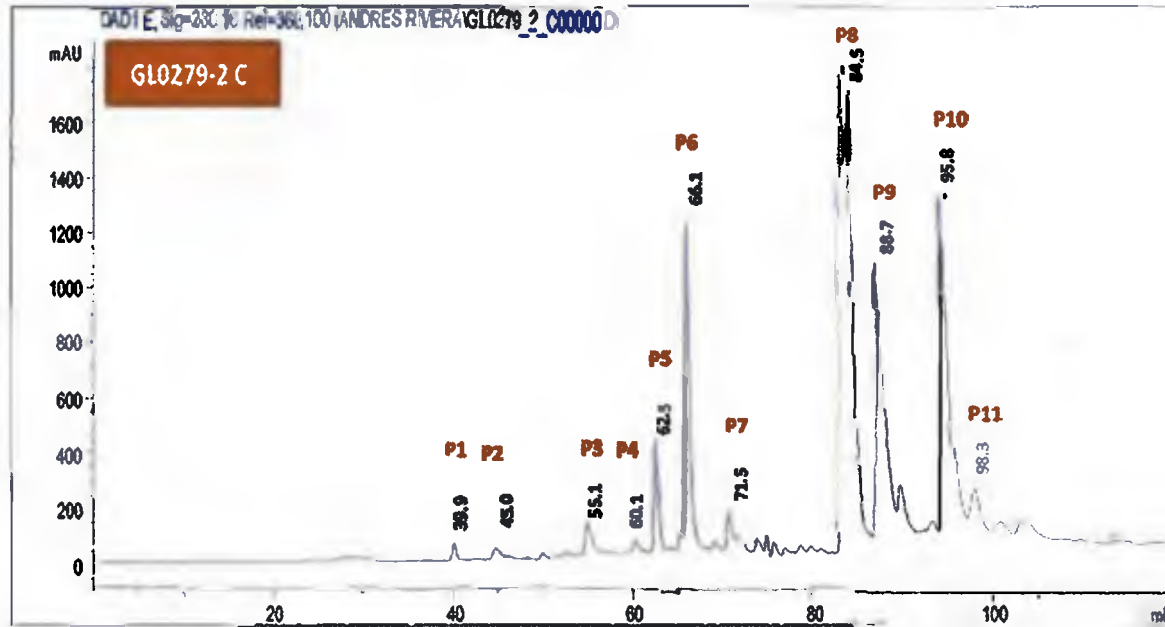


Figura 6.12. Cromatograma de HPLC para la purificación de la fracción GL0279-2 C.

Por otro lado, no se obtuvieron fracciones activas de los cocultivos en medio sólido. Sin embargo fueron aislados los compuestos inactivos GL0278 MS 1 C P 5 y GL0278 MS 1 C P 6.

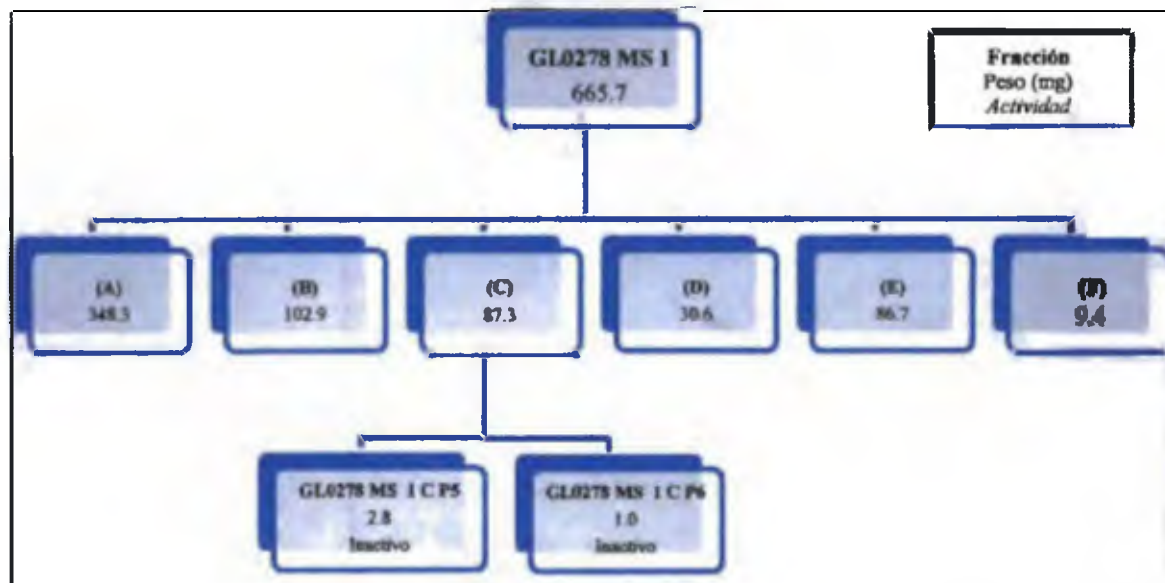


Figura 6.13. Esquema de purificación del extracto crudo del cocultivo de *Pseudoalteromonas sp.* vs. *Aspergillus fumigatus* (GL0278 MS 1) fermentado en medio sólido M1.

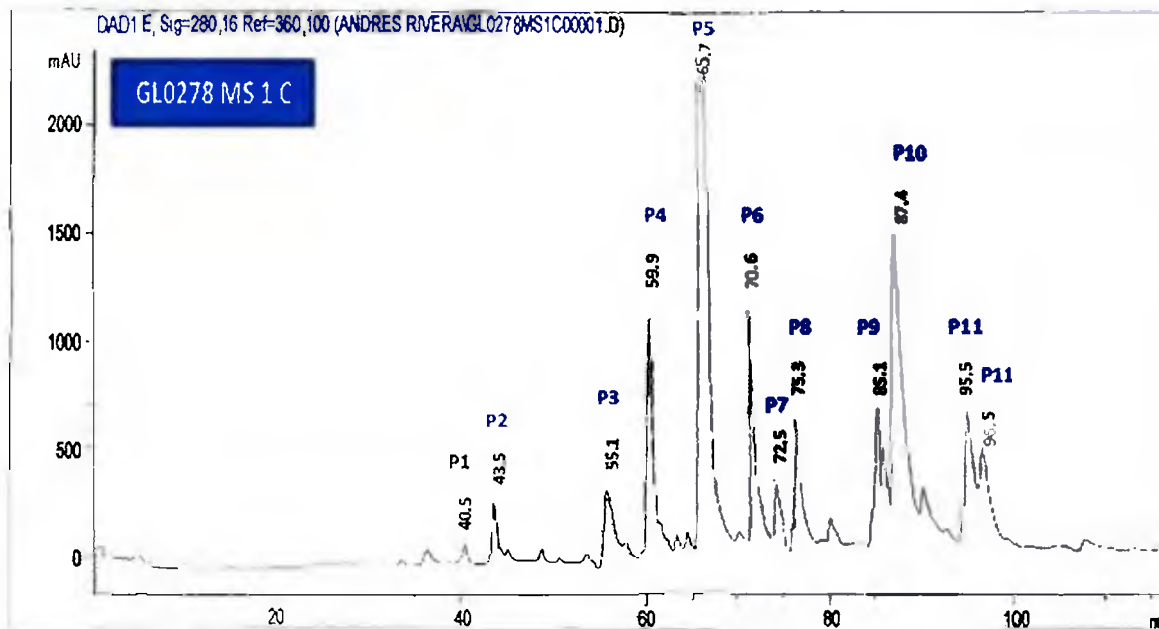


Figura 6.14. Cromatograma de HPLC para la purificación de la fracción GL0278 MS 1 C.

Es muy importante destacar que solo se obtuvieron fracciones activas procedentes de los cocultivos y no así de los cultivos individuales. Esto es una clara evidencia de que los microorganismos sujetos de este estudio no expresaron una o varias rutas metabólicas para la biosíntesis de metabolitos secundarios activos cuando se cultivaron individualmente bajo condiciones estándares de laboratorio. Por lo tanto, la fermentación mixta de estos microorganismos sugiere una interacción que estimula mecanismos de defensa que resultan en producción de compuestos bioactivos.

La evaluación de los tiempos de retención en los cromatogramas de HPLC, espectros de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y de masas de alta resolución demostró que varios de los compuestos purificados procedentes de los diversos co-cultivos se trataban de la misma entidad

química (ver apéndice 10.2). El cuadro 6.3 detalla que se purificaron 5 compuestos en total. El compuesto 1 responsable de la actividad biológica contra cáncer, leishmaniasis, Chagas y malaria, fue aislado del cocultivo de *Pseudoalteromonas sp.* con ambos hongos endófitos (*A. fumigatus* y *E. unguis*) en medio líquido. Los compuestos 2 y 3 solamente se obtuvieron de los cocultivos en medio líquido, en tanto que los compuestos 4 y 5 se aislaron de ambos cocultivos en medio líquido y sólido.

**Cuadro 6.3.** Metabolitos secundarios aislados de cocultivos en medio líquido y sólido.

Compuesto Químico	Código de Cultivo	Masa (mg)	Cocultivo de origen			
			A	B	ML	MS
Compuesto 1	GL0278 B P6	0.5	✓	-	✓	-
	GL0279 C P3	2.2	-	✓	✓	-
	GL0279-2 P5	2.5	-	✓	✓	-
Compuesto 2	GL0278 B P10	0.7	✓	-	✓	-
	GL0279 C P5	1.4	-	✓	✓	-
Compuesto 3	GL0278 B P5	3.8	✓	-	✓	-
	GL0279 C P1	0.3	-	✓	✓	-
	GL0279-2 C P3	0.6	-	✓	✓	-
Compuesto 4	GL0279-2 C P6	2.9	-	✓	-	-
	GL0278 MS 1 C P5	2.8	✓	-	-	✓
Compuesto 5	GL0278 B P7	2.3	✓	-	✓	-
	GL0279 C P4	0.8	-	✓	✓	-
	GL0278 MS 1 C P6	1.0	✓	-	-	✓

A: *Pseudoalteromonas sp.* vs. *A. fumigatus*, B: *Pseudoalteromonas sp.* vs. *E. unguis*, ML: Medio líquido, MS: Medio sólido.

## 6.4. Elucidación estructural de los compuestos

### 6.4.1. Compuesto 1

El compuesto **1** fue aislado como un polvo de color ligeramente amarillo. En la figura 6.15 se presenta su espectro de masas de alta resolución (HRMS APCI<sup>+</sup>), en el cual se distingue una señal correspondiente a la fórmula molecular C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub> ([M+H]<sup>+</sup>) observado 327.0343 m/z; calculado para 327.0473 m/z). También se aprecia una señal a 263.0799 m/z, que representa el pico base. Este patrón de fragmentación indica la pérdida de 64 unidades de m/z, lo cual corresponde a un puente de disulfuro (S-S) (Hee Jung Lee, 2001; Moreno C. et al., 2002).

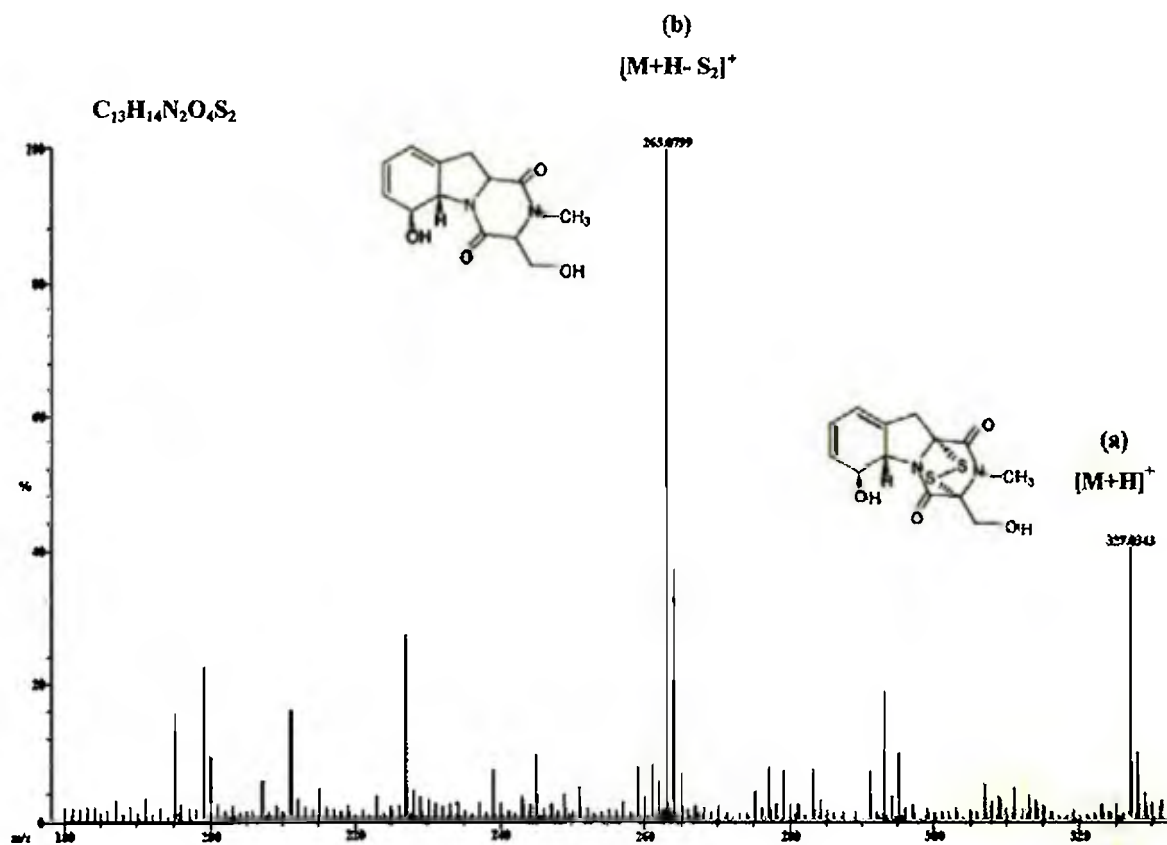


Figura 6.15. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 1. (a) Ión molecular (b) Pico base

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 1 (ver figura 6.16) se observan desplazamientos correspondientes a un N-metilo ( $\delta_{\text{H}}$  3.20, 3H, s,  $\text{H}_3\text{-2}'$ ), dos protones diastereotópicos de un grupo  $\text{CH}_2\text{O}$  ( $\delta_{\text{H}}$  4.41, 1H, d,  $\text{H}_1\text{-3}'$ ; 4.26, 1H, d,  $\text{H}_1\text{-3}'$ ), dos grupos CH ( $\delta_{\text{H}}$  4.81, 1H, s,  $\text{H}_1\text{-5}'$ ; 4.81, 1H, s,  $\text{H}_1\text{-6}$ ), tres protones olefinicos ( $\delta_{\text{H}}$  5.99, 1H, m,  $\text{H}_1\text{-7}$ ; 5.93, 1H, m,  $\text{H}_1\text{-8}$ ; 5.78, 1H, d,  $\text{H}_1\text{-9}$ ) y dos protones diastereotópicos de un metileno ( $\delta_{\text{H}}$  3.74, 1H, d,  $\text{H}_1\text{-10}$ ; 2.95, 1H, d,  $\text{H}_1\text{-10}$ ).

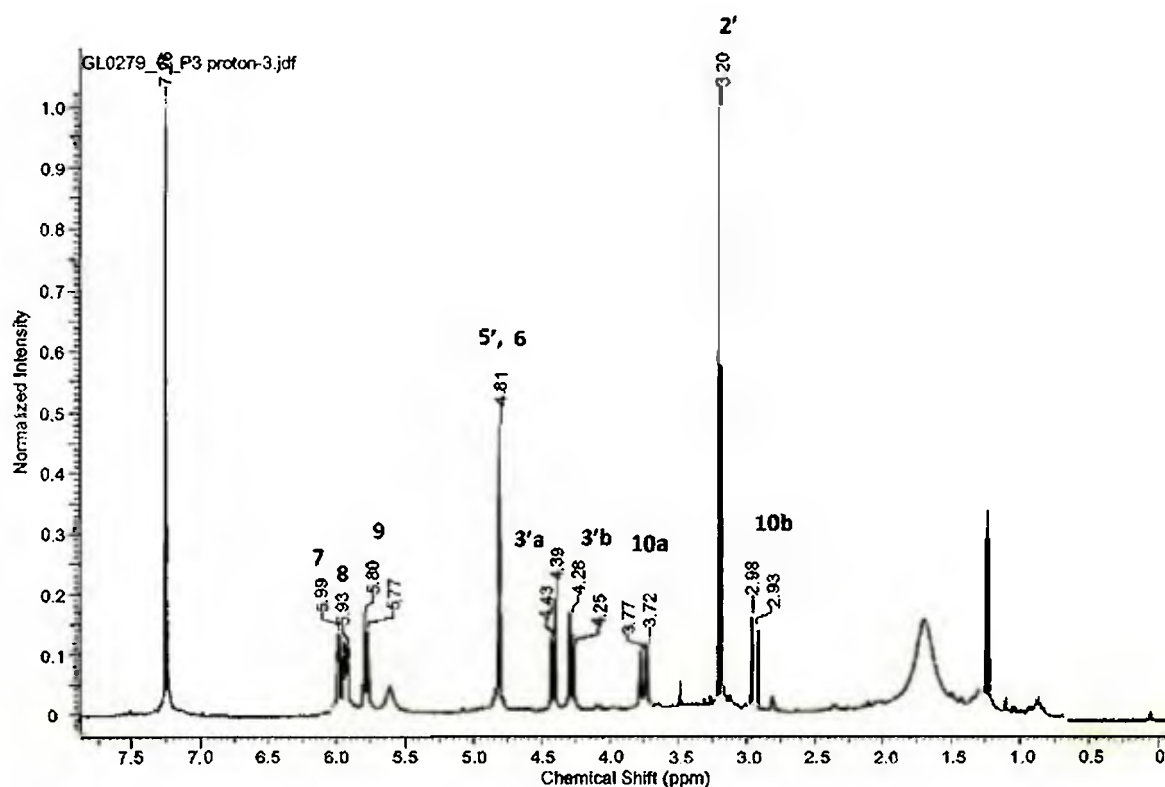


Figura 6.16. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto 1 en  $\text{CDCl}_3$ .

Los desplazamientos químicos del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (figura 6.17) reveló la presencia de dos carbonilos ( $\delta_{\text{C}}$  166.01, 166.37), tres carbonos cuaternarios ( $\delta_{\text{C}}$  75.55, 130.69,

77.21), un N-metilo ( $\delta_C$  27.46), un grupo O-CH<sub>2</sub> ( $\delta_C$  60.74), un metileno ( $\delta_C$ , 36.58), dos metinos ( $\delta_C$  69.83, 73.15) y tres carbonos olefinicos ( $\delta_C$  130.05, 123.27, 120.24).

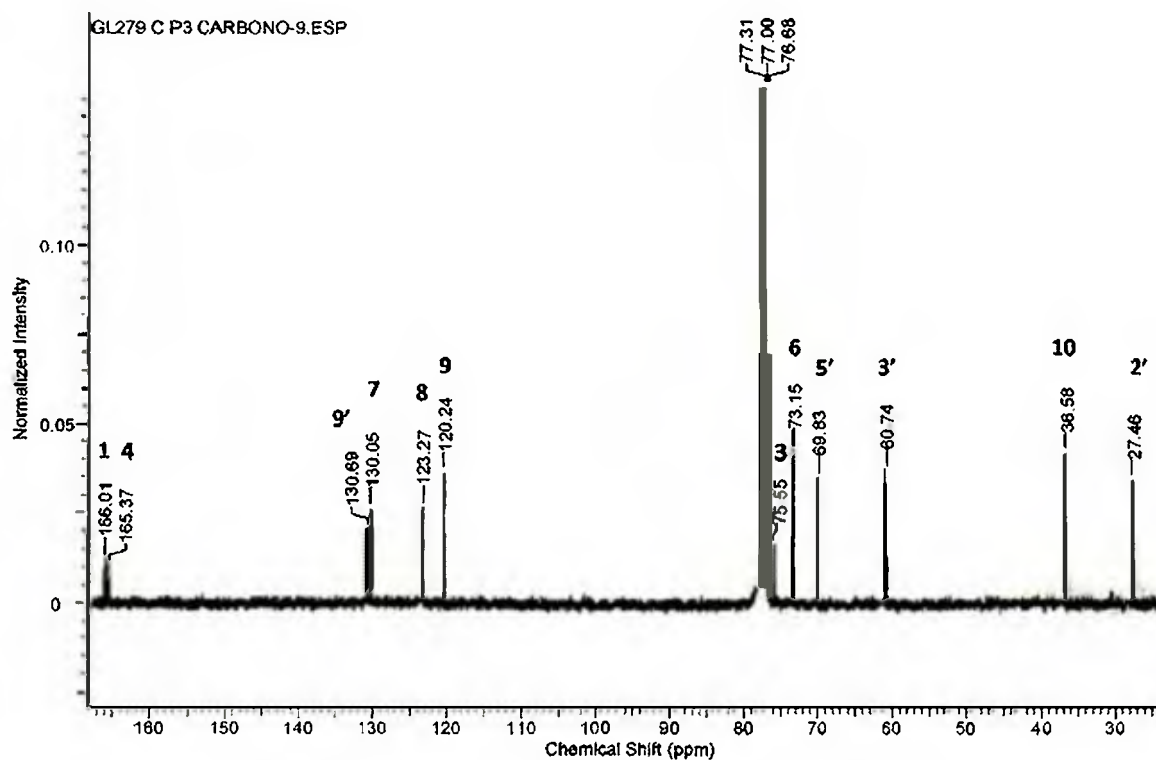


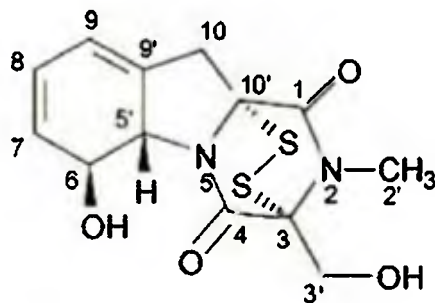
Figura 6.17. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN del compuesto 1 en CDCl<sub>3</sub>.

La estructura química de 1, detallada en la figura 6.18, se determinó mediante la comparación de la fórmula molecular más la información provista por los espectros de protón y carbono con los datos reportados en la literatura (Cole y Cox, 1981; Steiman. et al., 1990). Los desplazamientos de 1D RMN coinciden con los datos reportados para la Gliotoxina (ver cuadro 6.4), a excepción de las señales de protón correspondientes a hidroxilos a 3.55 y 8.81 que no fueron detectadas en el compuesto 1. Además, se analizaron los espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC (ver apéndice).

**Cuadro 6.4.** Comparación de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN de Gliotoxina y del compuesto 1.

No.	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)		$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)			Tipo
	GTX <sup>a</sup>	Comp. 1	GTX <sup>a</sup>	Comp. 1	Mult.	
1	166.0	166.01	-	-	-	C, carbonilo
2	-	-	-	-	-	N
2'	27.5	27.46	3.21	3.20	s	N-CH <sub>3</sub>
3	75.6	75.55	-	-	-	C, cuaternario
3'	60.7	60.74	(a) 4.43 (b) 4.26	(a) 4.41 (b) 4.26	(a) d (b) d	O-CH <sub>2</sub> , $^1\text{H}$ diastereotópicos
4	165.3	165.37	-	-	-	C, carbonilo
5	-	-	-	-	-	N
5'	69.7	69.83	4.82	4.81	s	CH
6	73.1	73.15	4.82	4.81	s	CH
7	130.1	130.05	5.99	5.99	m	CH
8	123.3	123.27	5.95	5.93	m	CH
9	120.2	120.24	5.79	5.78	d	CH
9'	130.8	130.69	-	-	-	C, cuaternario
10	36.6	36.58	(a) 3.76 (b) 2.96	(a) 3.74 (b) 2.95	(a) d (b) d	CH <sub>2</sub> , $^1\text{H}$ diastereotópicos
10'	Debajo del pico de CDCl <sub>3</sub>	Debajo del pico de CDCl <sub>3</sub>	-	-	-	C, cuaternario

GTX: Gliotoxina ; Comp. 1: Compuesto 1. Datos tomados de \*Steiman et al., 1990.



**Figura 6.18.** Estructura química de Gliotoxina.

La Gliotoxina es el prototipo de las epiditiodioxopiperazinas, la cual es producida por hongos de varios géneros tales como *Aspergillus*, *Gliocadium*, *Penicilium* y *Candida* (Scharf et al. 2012). La principal característica de este grupo de compuestos es el puente de disulfuro interno en el anillo de piperazinadiona de seis miembros al cual se le atribuye su actividad biológica (Qing y Harday, 2007). Es el producto mayoritario del clúster *gli* péptido sintetasa no ribosomal (NRPS, por sus siglas en inglés), el cual está fuertemente asociado con la virulencia del patógeno oportunista *Aspergillus fumigatus* (Forseth et al, 2011) En mamíferos, la gliotoxina induce apoptosis, previene la activación de NF-kB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) por inhibición del proteosoma e inhibe la angiogénesis en las células hospederas Esta actividad se debe principalmente al puente de disulfuro dentro de la molécula (Scharf et al 2012). La actividad anticancerígena (Qing y Harday, 2007), antimalárica (Hatabu et al, 2006) y antitripanosomal contra *Trypanosoma brucei* (Watts et al, 2010) de la gliotoxina ha sido reportada en la literatura No obstante, hasta el momento no hay registros de su actividad contra *Leishmania donovani*

### 6.4.2. Compuesto 2

El compuesto 2 fue obtenido como un polvo de color blanco, con una fórmula molecular de  $C_{15}H_{20}N_2O_4S_2$  determinada por HRMS APCI<sup>+</sup> ( $[M+H]^+$  obs. 357.0904 m/z, calc. para 357.0943 m/z). Además, en el espectro de masas está presente una señal de fragmentación a 309.0827 m/z, la cual indica la pérdida de 47 unidades de m/z correspondiente a un grupo  $CH_3-S$  (Figura 6.19).

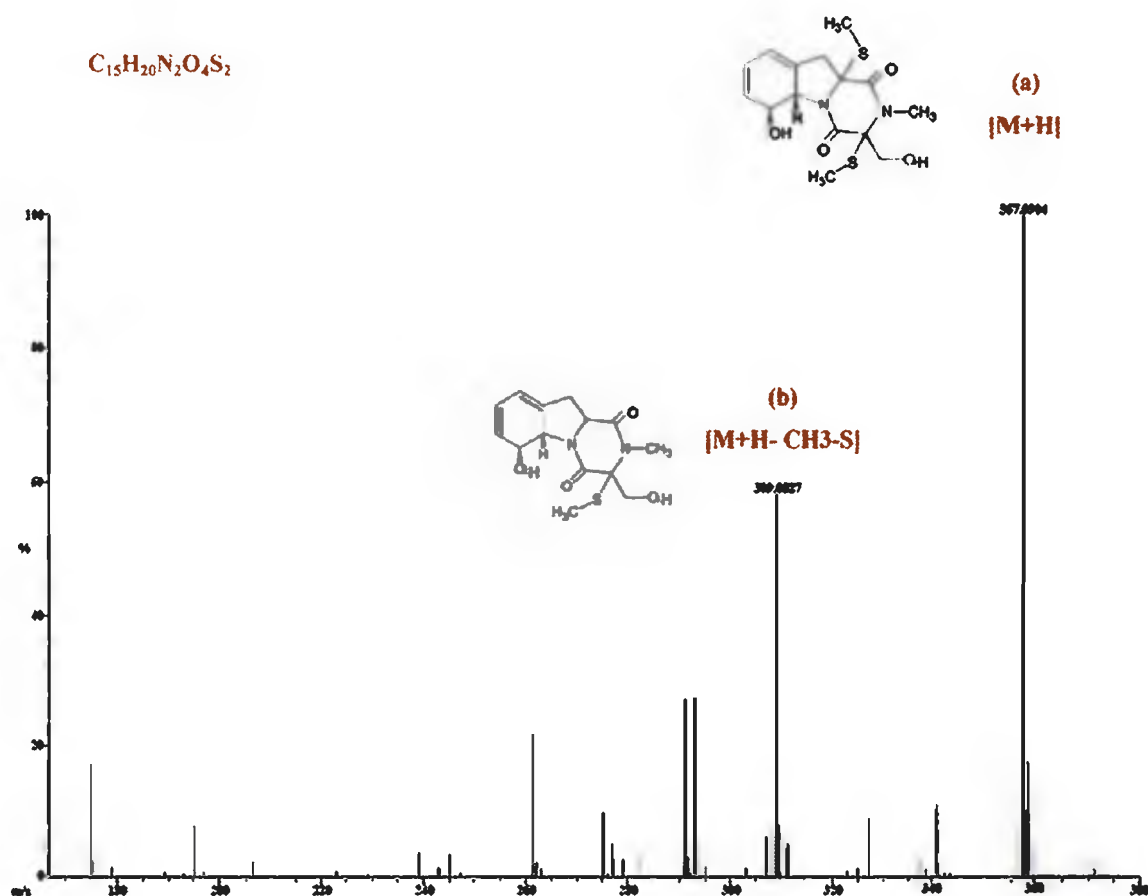


Figura 6.19. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 2. (a) Ión molecular (b) Fragmentación

El espectro de  $^1H$ -RMN (Figura 6.20) reveló la presencia de un grupo  $N-CH_3$  ( $\delta_H$  3.15, 3H, s,  $H_3-2'$ ), dos protones diastereotópicos de un grupo  $OCH_2$  ( $\delta_H$  4.40, 1H, d,  $H_1-3'$ ;

3.93, 1H, d, H<sub>1</sub>-3'), dos grupos CH ( $\delta_{\text{H}}$  4.93, 1H, s, H<sub>1</sub>-5'; 4.93, 1H, s, H<sub>1</sub>-6), tres protones olefinicos ( $\delta_{\text{H}}$  5.95, 1H, m, H<sub>1</sub>-7; 5.89, 1H, m, H<sub>1</sub>-8; 5.76, 1H, d, H<sub>1</sub>-9), dos protones diastereotópicos de un grupo CH<sub>2</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  3.09, 1H, d, H<sub>1</sub>-10; 2.93, 1H, d, H<sub>1</sub>-10) y dos SCH<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  2.27, 3H, s, H<sub>3</sub>-11; 2.25, 3H, s, H<sub>3</sub>-12).

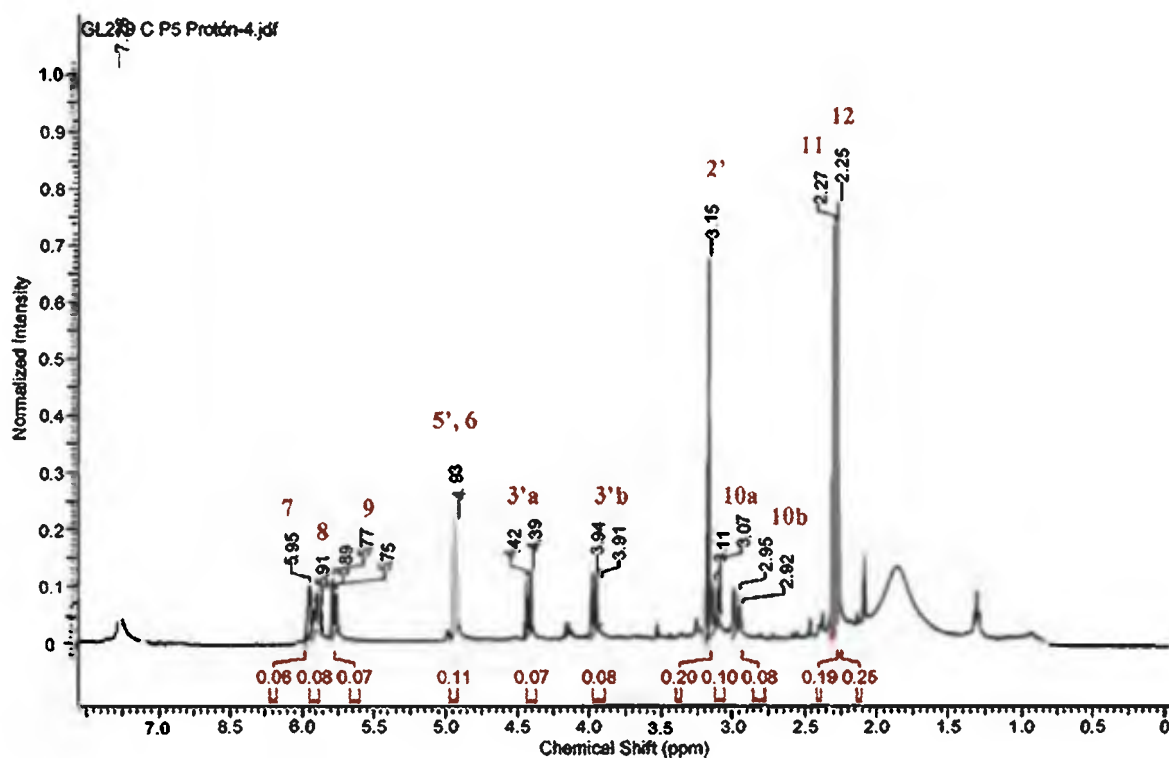


Figura 6.20. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 2 en CDCl<sub>3</sub>.

El espectro de <sup>13</sup>C-RMN (Figura 6.21) ayudó a identificar dos grupos carbonilos ( $\delta_{\text{C}}$  166.71, 165.86), tres carbonos cuaternarios ( $\delta_{\text{C}}$  71.52, 131.48, 71.74), un N-metilo ( $\delta_{\text{C}}$  28.64), un grupo O-CH<sub>2</sub> ( $\delta_{\text{C}}$  63.63), un metileno ( $\delta_{\text{C}}$ , 39.02), dos metinos ( $\delta_{\text{C}}$  69.59, 74.42), tres carbonos olefinicos ( $\delta_{\text{C}}$  130.33, 123.05, 120.18) y dos metilos enlazados a átomos de S ( $\delta_{\text{C}}$  15.09, 13.75).

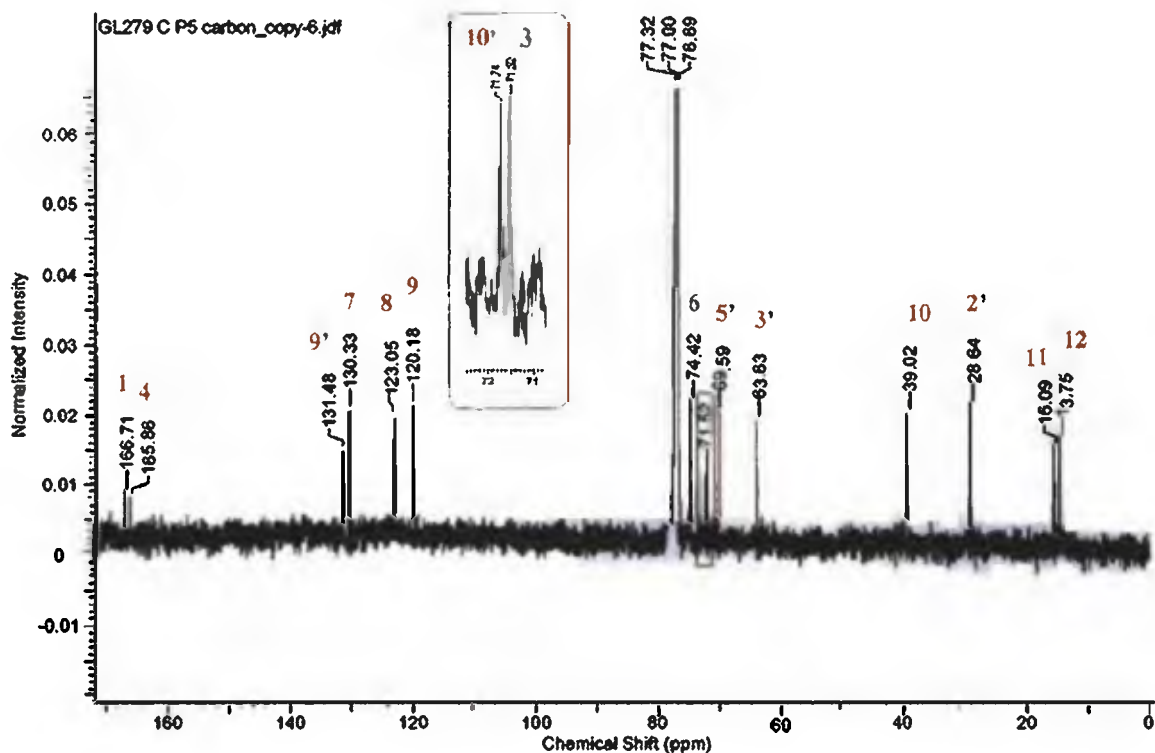


Figura 6.21. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 2 en  $\text{CDCl}_3$ .

La estructura química del compuesto 2 se determinó comparando los datos espectroscópicos experimentales, con la referencia disponible para la Bis(metil)gliotoxina (Kirby, 1980; Okamoto et al, 1986 y Afiyatulloev et al, 2005). Los desplazamientos químicos de 1D RMN del compuesto 2 coinciden con los datos reportados para la Bis(metil)gliotoxina, a excepción de la señal de protón correspondientes a un grupo  $\text{CH}_2$  a 2.99 (br s), que en su lugar aparecen dos dobletes a 3.09 y 2.93 ( $^1\text{H}$  diastereotópicos), probablemente debido a la resolución de los experimentos. Además, se analizaron los espectros dimensionales COSY, HSQC y HMBC (ver apéndice). En el Cuadro 6.5 se

detalla la comparación de los datos experimentales con los datos reportados en la literatura. En la Figura 6.22 se presenta la estructura química del compuesto 2.

**Cuadro 6.5.** Comparación de desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN de Bis(metil)gliotoxina y del compuesto 2.

No.	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)		$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)			Tipo
	BMGTX <sup>a</sup>	Comp. 2	BMGTX <sup>b</sup>	Comp. 2	Mult.	
1	166.8	166.71	-	-	-	C, carbonilo
2	-	-	-	-	-	N
2'	28.7	28.64	3.11	3.15	s	N-CH <sub>3</sub>
3	71.9	71.52	-	-	-	C, cuaternario
3'	63.6	63.63	(a) 4.38 (b) 3.88	(a) 4.40 (b) 3.93	(a) d (b) d	O-CH <sub>2</sub> , $^1\text{H}$ diastereotópicos
4	165.9	165.86	-	-	-	C, carbonilo
5	-	-	-	-	-	N
5'	69.6	69.59	4.90	4.93	s	CH
6	74.4	74.42	4.90	4.93	s	CH
7	130.1	130.33	5.6-6.0	5.95	m	CH
8	123.1	123.05		5.89	m	CH
9	120.0	120.18		5.76	d	CH
9'	131.6	131.48	-	-	-	C, cuaternario
10	38.9	39.02	2.99	(a) 3.09 (b) 2.93	(a) d (b) d	CH <sub>2</sub> , diastereotópicos
10'	71.5	71.74	-	-	-	C, cuaternario
11	14.6	15.09	2.23	2.27	s	CH <sub>3</sub>
12	13.7	13.75	2.20	2.25	s	CH <sub>3</sub>

BMGTX: Bis(metil)gliotoxina; Comp. 2: Compuesto 2. Datos tomados de <sup>a</sup>Afiyatulloev et al., 2005 y <sup>b</sup>Kirby et al., 1980.

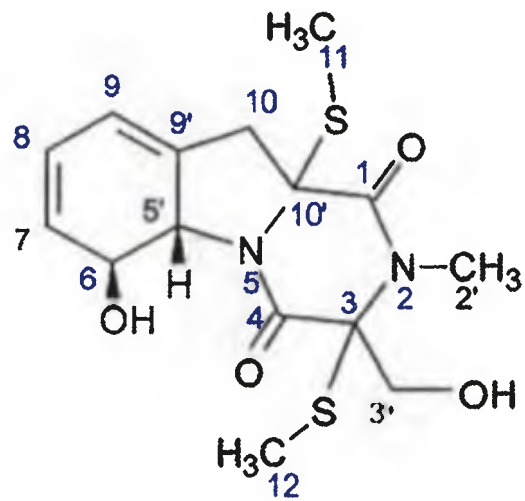


Figura 6.22. Estructura química de Bis(metil)gliotoxina

### 6.4.3. Compuesto 3

El compuesto 3 se aisló como un sólido de color anaranjado. Tiene la fórmula molecular  $C_8H_5NO_2$ , determinada por su espectro de masas de alta resolución HRMS APCI<sup>+</sup> ( $[M+H]^+$  obs. 148.0454 m/z, calc. para 148.0399 m/z). El espectro de masas también registra una señal a 180.0600 m/z correspondiente al ión molecular más metanol  $[M+H+CH_3OH]^+$  (ver figura 6.23).

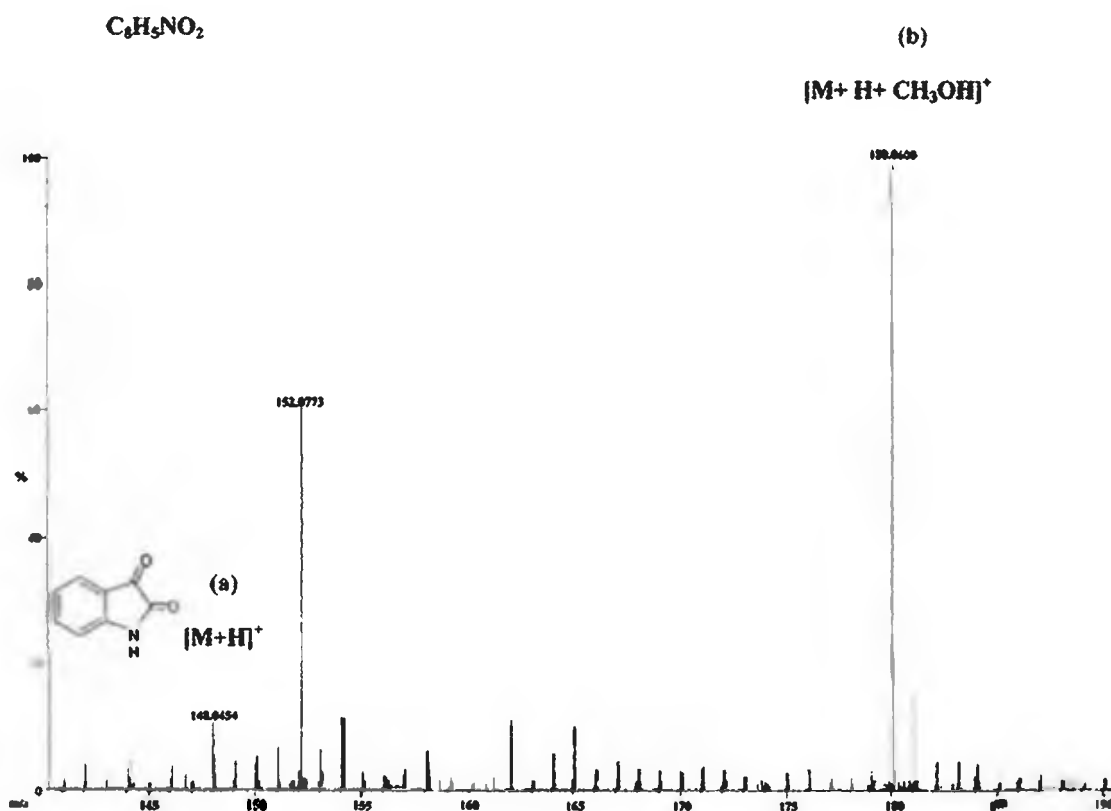


Figura 6.23. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 3.

La inspección del espectro de  $^1H$ -RMN del compuesto 3 (Figura 6.24.) mostró resonancias de cuatro protones de un grupo arilo ( $\delta_H$  7.63, 1H, d,  $H_{1-4}$ ; 7.13, 1H, t,  $H_{1-5}$ ; 7.55, 1H, t,  $H_{1-6}$ ; 6.92, 1H, d,  $H_{1-7}$ ) y un protón enlazado a un N ( $\delta_H$  8.09, 1H, bs,  $H_{1-9}$ ).

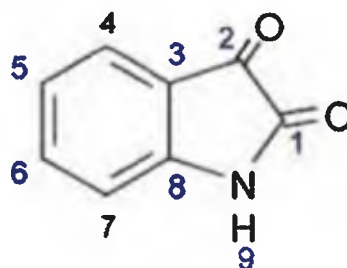


La estructura química de **3**, detallada en la Figura 6.22, se determinó a través de la comparación de la información provista por los espectros de protón y carbono con los datos reportados en la literatura (da Silva et al., 2001; Aboul-Fadl et al., 2012 y Premanathan et al., 2012). Los desplazamientos de 1D RMN del compuesto **3** coinciden con los datos reportados para el isatín (ver Cuadro 6.4). Además, se analizaron los espectros bidimensionales COSY, HSQC y HMBC (ver apéndice).

**Cuadro 6.6.** Comparación de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN de isatín y del compuesto **3**.

No.	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)		$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)			Tipo
	Isatín <sup>a</sup>	Comp. <b>3</b>	Isatín <sup>b</sup>	Comp. <b>3</b>	Mult.	
1	159.6	159.01	-	-	-	C, carbonilo
2	182.6	182.75	-	-	-	C, carbonilo
3	118.0	118.18	-	-	-	C, arilo
4	125.8	125.86	7.65	7.63	d	CH, arilo
5	124.0	124.05	7.14	7.13	t	CH, arilo
6	138.6	138.64	7.53	7.55	t	CH, arilo
7	112.4	112.21	6.77	6.92	d	CH, arilo
8	149.3	148.98	-	-	-	C, arilo
9	-	-	-	8.09	br s	NH

Comp. **3**: Compuesto **3**. Datos tomados de <sup>a</sup>da Silva et al., 2001 y <sup>b</sup>Aboul-Fadl et al., 2012.



**Figura 6.26.** Estructura química de Isatín.

El Isatín fue aislado por primera vez en 1989 de la bacteria marina *Alteromonas sp.* asociadas a huevos de crustáceos, demostrando actividad antifúngica protectora contra el hongo patógeno *Lagenidium callinectes* (Gil-Turnes et al., 1989). Además, varios de sus derivados han demostrado actividad antiproliferativa in vitro variable y promisorio contra la línea celular MCF-7 (Radwan et al., 2013).

#### 6.4.4. Compuesto 4

El compuesto 4 fue aislado como un polvo de color amarillo. Tiene la fórmula molecular  $C_{24}H_{21}N_5O_4$ , deducido por su espectro de masas de alta resolución ( $[M+H]^+$  obs. 444.1569 m/z, calc. para 444.1672 m/z), ver figura 6.27.

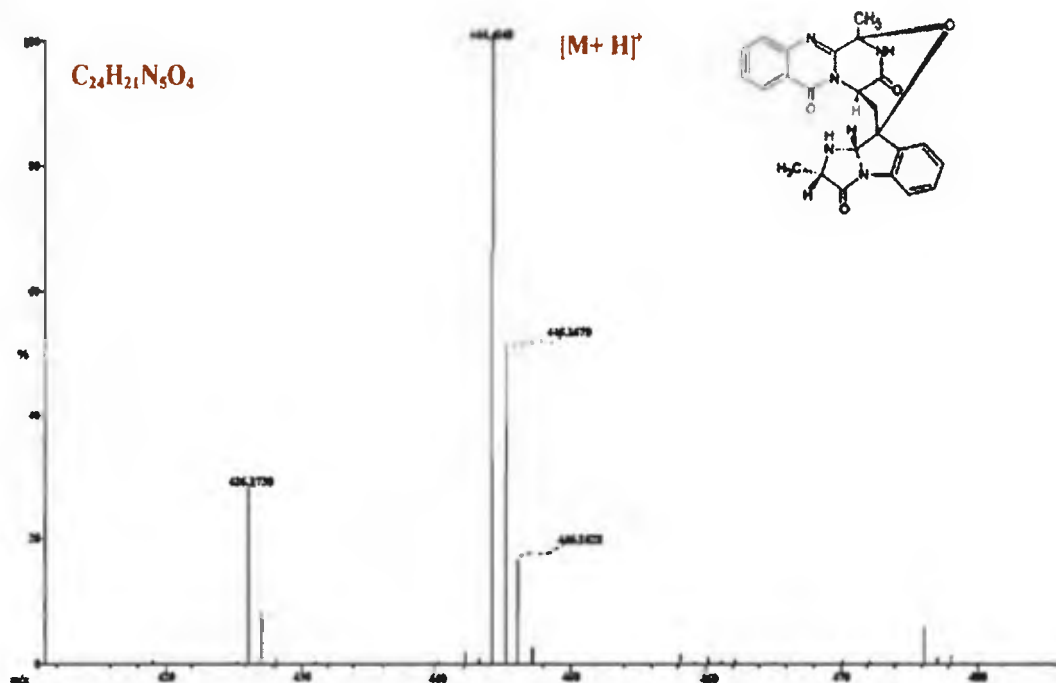


Figura 6.27. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 4.

En el espectro de  $^1H$ -RMN del compuesto 4 (figura 6.28) se observan la presencia de ocho protones de grupos fenilos ( $\delta_H$  7.80, 1H, d, H<sub>1</sub>-7; 7.86, 1H, dd, H<sub>1</sub>-8; 7.62, 1H, td, H<sub>1</sub>-9; 8.36, 1H, dd, H<sub>1</sub>-10; 7.45, 1H, d, H<sub>1</sub>-24; 7.31, 1H, t, H<sub>1</sub>-25; 7.20, 1H, td, H<sub>1</sub>-26; 7.36, 1H, d, H<sub>1</sub>-27), tres metinos ( $\delta_H$  5.73, 1H, d, H<sub>1</sub>-14; 5.34, 1H, s, H<sub>1</sub>-18; 3.71, 1H, qd, H<sub>1</sub>-20), dos protones diastereotópicos de un metileno ( $\delta_H$  2.13, 1H, d, H<sub>1</sub>-15; 2.98, 1H, dd, H<sub>1</sub>-15) y dos metilos ( $\delta_H$  2.06, 3H, s, H<sub>3</sub>-16; 1.07, 3H, d, H<sub>3</sub>-29).

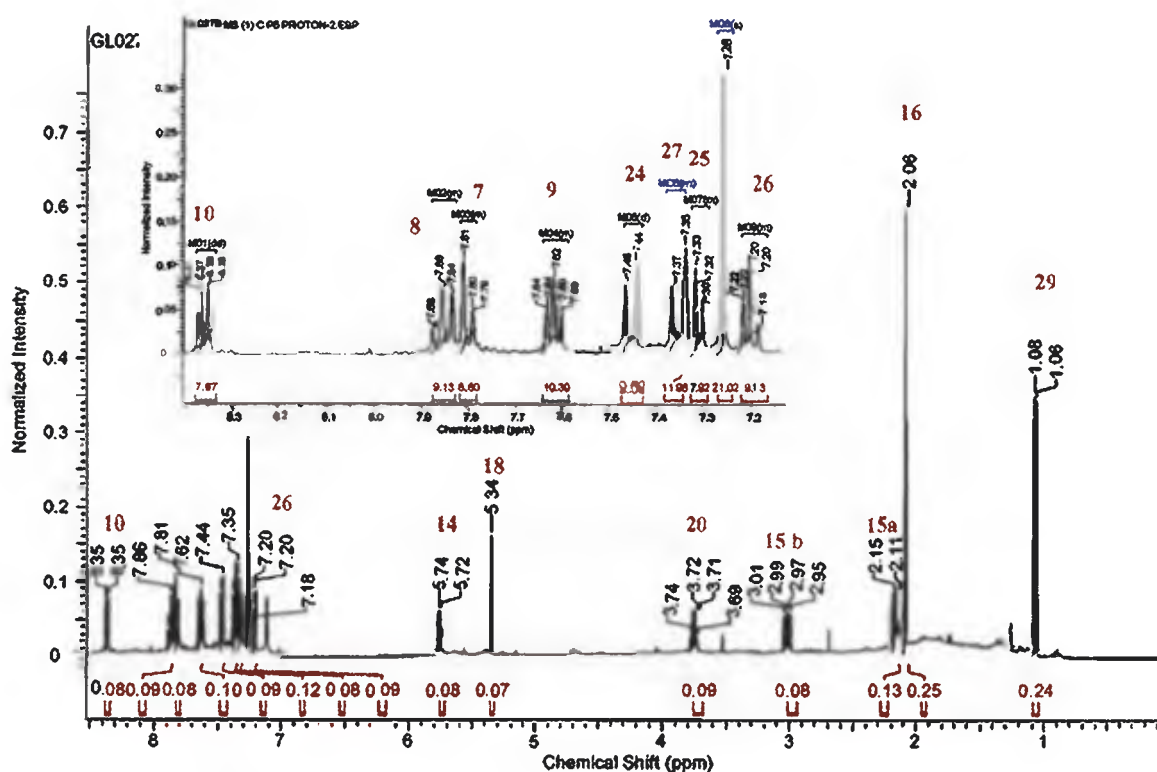


Figura 6.28. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 4 en CDCl<sub>3</sub>.

El espectro de <sup>13</sup>C-RMN (Figura 6.29) registró resonancia para 24 carbonos. Tres grupos carbonilos de tres cetonas ( $\delta_C$  170.85, 159.48, 170.28), siete carbonos cuaternarios ( $\delta_C$  84.16, 150.29, 146.27, 121.39, 87.02, 135.74, 138.29), ocho carbonos de grupos fenilos ( $\delta_C$  128.44, 134.93, 128.62, 127.02, 115.46, 130.26, 126.18, 124.85), tres metinos ( $\delta_C$  51.41, 87.16, 58.59), un metileno ( $\delta_C$  31.40) y dos metilos ( $\delta_C$  24.63, 18.71).

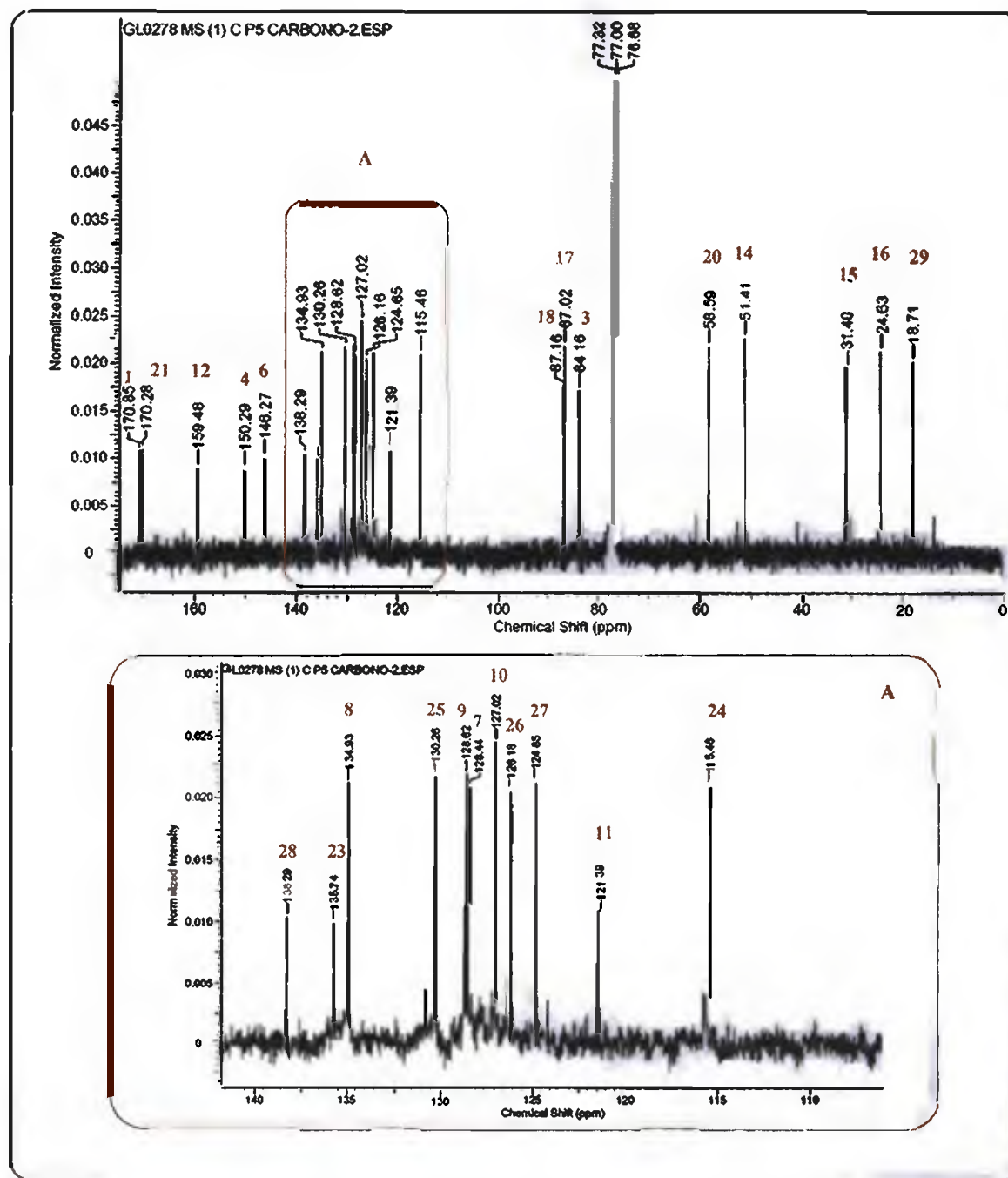


Figura 6.29. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 4 en  $\text{CDCl}_3$ .

La estructura química del compuesto 4 (Figura 6.30) se determinó mediante la comparación de los datos espectroscópicos experimentales, con los datos reportados en la literatura para la fumiquinazolina C (Numata et al., 1992; Takahashi et al., 1995;

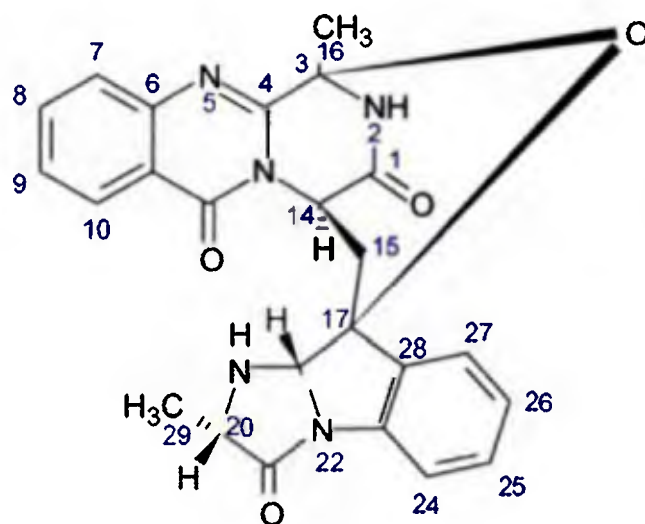
Afiyatulloev et al., 2005; Han et al. 2007). Esta información se encuentra detallada en el

Cuadro 6.7.

**Cuadro 6.7.** Comparación de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN de Fumiquinazolina C y del compuesto 4.

No.	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)		$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)			Tipo
	FQC <sup>a</sup>	Comp. 4	FQC <sup>a</sup>	Comp. 4	Mult.	
1	171.02	170.85	-	-	-	C, C=O
2	-	-	8.04	n/v	-	NH
3	84.16	84.16	-	-	-	C
4	150.39	150.29	-	-	-	C
5	-	-	-	-	-	-
6	146.32	146.27	-	-	-	C
7	128.45	128.44	7.78	7.80	d	CH
8	134.91	134.93	7.81	7.86	dd	CH
9	128.56	128.62	7.60	7.62	td	CH
10	126.98	127.02	8.35	8.36	dd	CH
11	121.34	121.39	-	-	-	C
12	159.53	159.48	-	-	-	C, C=O
13	-	-	-	-	-	-
14	51.39	51.41	5.72	5.73	d	CH
15	31.36	31.40	(a) 2.14 (b) 2.98	(a) 2.13 (b) 2.98	d (a) dd (b)	CH <sub>2</sub>
16	24.43	24.63	2.06	2.06	s	CH <sub>3</sub>
17	87.07	87.02	-	-	-	C
18	87.07	87.16	5.34	5.34	s	CH
19	-	-	-	-	-	NH
20	58.61	58.59	3.71	3.71	qd	CH
21	170.90	170.28	-	-	-	C, C=O
22	-	-	-	-	-	-
23	135.73	135.74	-	-	-	C
24	115.46	115.46	7.45	7.45	d	CH
25	130.23	130.26	7.32	7.31	t	CH
26	126.17	126.18	7.19	7.20	td	CH
27	124.88	124.85	7.37	7.36	dd	CH
28	138.41	138.29	-	-	-	C
29	18.71	18.71	1.06	1.07	d	CH <sub>3</sub>

FQC: Fumiquinazolina C; Comp. 4: Compuesto 4; n/v: No visible. Datos tomados de <sup>a</sup>Takahashi et al., 1995.



**Figura 6.30.** Estructura química de Fumiquinolone C.

La Fumiquinolone C fue reportada por primera vez en 1992 por Numata et al., producido por *Aspergillus fumigatus* aislado del tracto gastrointestinal de del pez de agua salada *Pseudolabrus japonicus*, el cual exhibió una actividad citotóxica moderada contra la línea celular P-388 de leucemia linfocítica.

### 6.4.5. Compuesto 5

El compuesto 5 fue aislado como un polvo de color amarillo. Tiene la fórmula molecular  $C_{22}H_{25}NO_8$ , deducido por su espectro de masas de alta resolución ( $[M+H]^+$  obs. 432.1184 m/z, calc. para 431.43580m/z). Además, en el espectro de masas está presente una señal de fragmentación a 348.0803 m/z, la cual indica la pérdida de 85 unidades de m/z y corresponde a un grupo  $CH_3-CH_2-CH=CH-CH-OH$  (Figura 6.31).

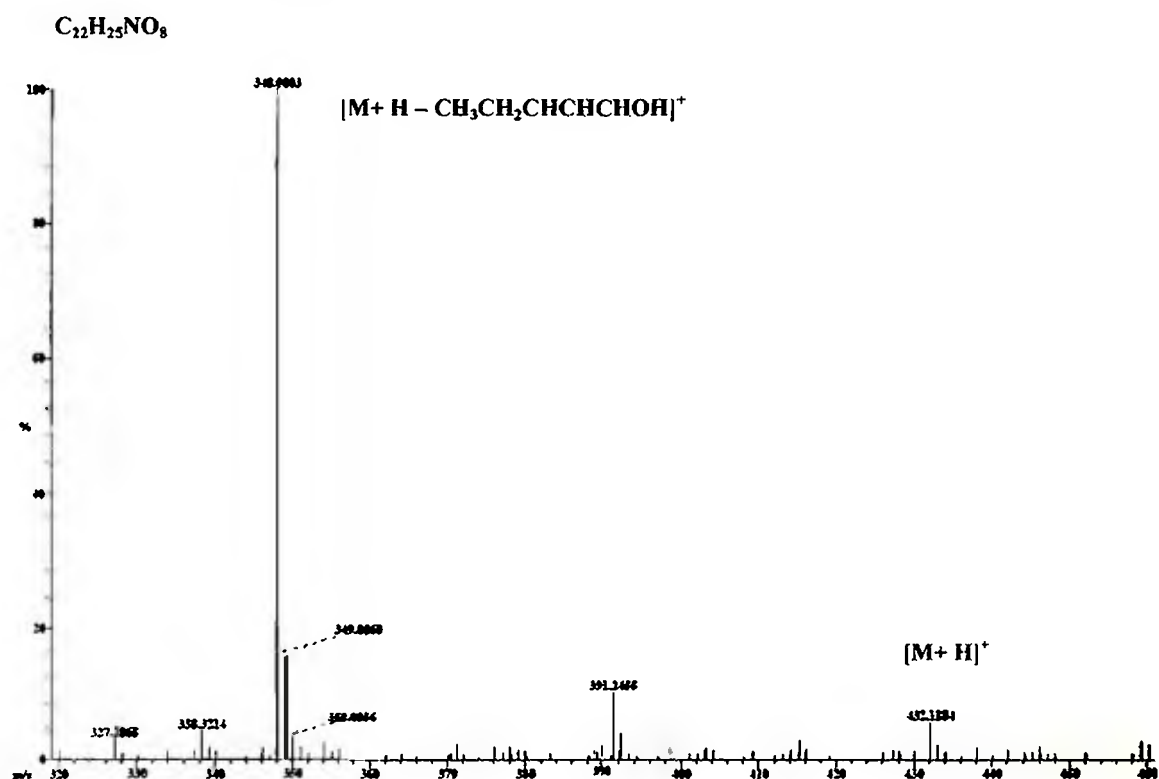


Figura 6.31. Espectro de masas de alta resolución del compuesto 5.

El espectro de  $^1H$ -RMN (Figura 6.32) indica la presencia de tres grupos metinos ( $\delta_H$  4.70, 1H, s,  $H_1$ -9; 4.59, 1H, d,  $H_1$ -10; 4.75, 1H, m,  $H_1$ -11), dos protones olefinicos ( $\delta_H$  5.31, 1H, dd,  $H_1$ -12; 5.63, 1H, m,  $H_1$ -13), cinco protones de un grupo fenilo ( $\delta_H$  8.32, 1H, dd,  $H_1$ -19; 7.50, 1H, t,  $H_1$ -20; 7.66, 1H, m,  $H_1$ -21; 7.50, 1H, t,  $H_1$ -22; 8.32, 1H, dd,  $H_1$ -23), un

metileno ( $\delta_H$  2.15, 2H, m, H<sub>2</sub>-14), dos metilos ( $\delta_H$  1.00, 3H, t, H<sub>3</sub>-15; 1.69, 3H, s, H<sub>3</sub>-16), un metoxi ( $\delta_H$  3.42, 3H, s, H<sub>3</sub>-OMe) y un NH ( $\delta_H$  7.87, 1H, bs, H<sub>1</sub>-7).

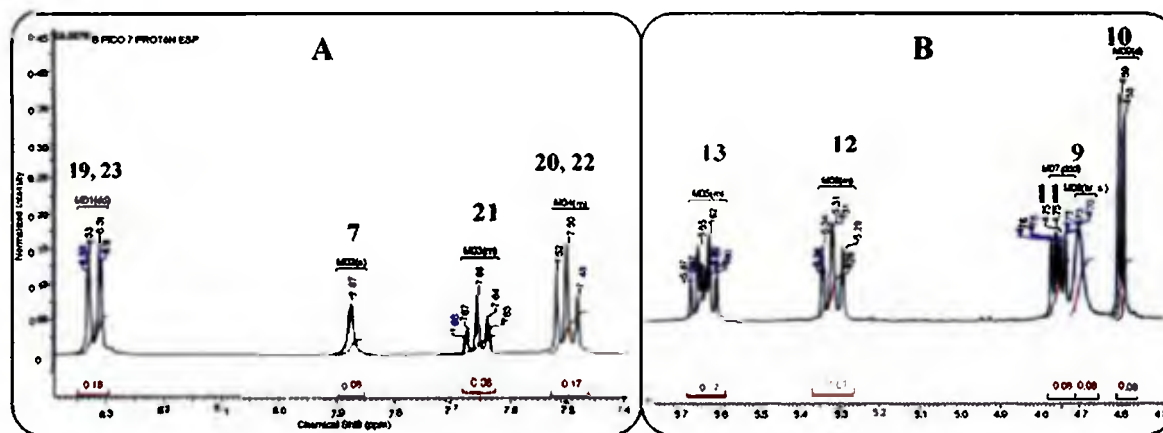
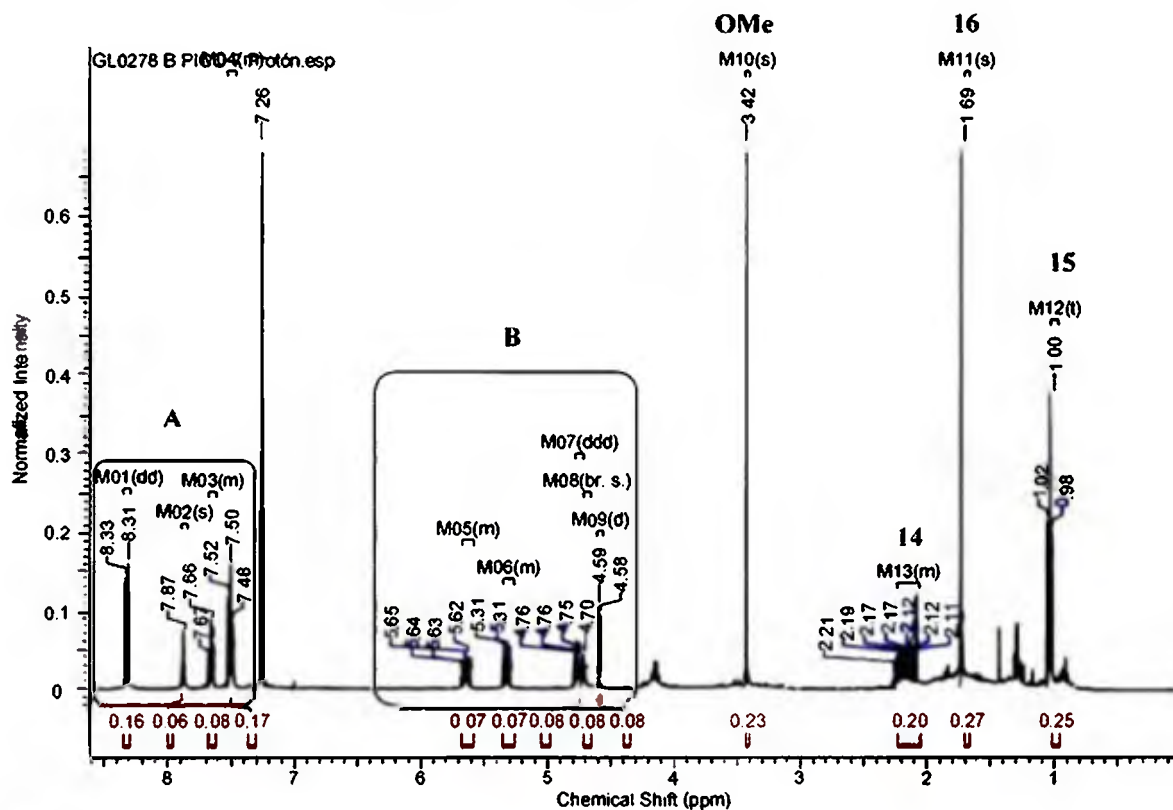


Figura 6.32. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del compuesto 5 en CDCl<sub>3</sub>.

El espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (figura 6.33) reveló la presencia de tres carbonilos ( $\delta_{\text{C}}$  196.40, 185.62, 194.82), cinco carbonos cuaternarios ( $\delta_{\text{C}}$  166.42, 113.59, 92.66, 90.13, 132.24), tres metinos ( $\delta_{\text{C}}$  73.13, 70.53, 70.66), dos carbonos olefinicos ( $\delta_{\text{C}}$  126.41, 137.08), cinco carbonos de un grupo fenilo ( $\delta_{\text{C}}$  130.68, 128.75, 134.80, 128.75, 130.68), un metileno ( $\delta_{\text{C}}$  21.44), dos metilos ( $\delta_{\text{C}}$  14.12, 6.01) y un O-CH<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{C}}$  51.74)

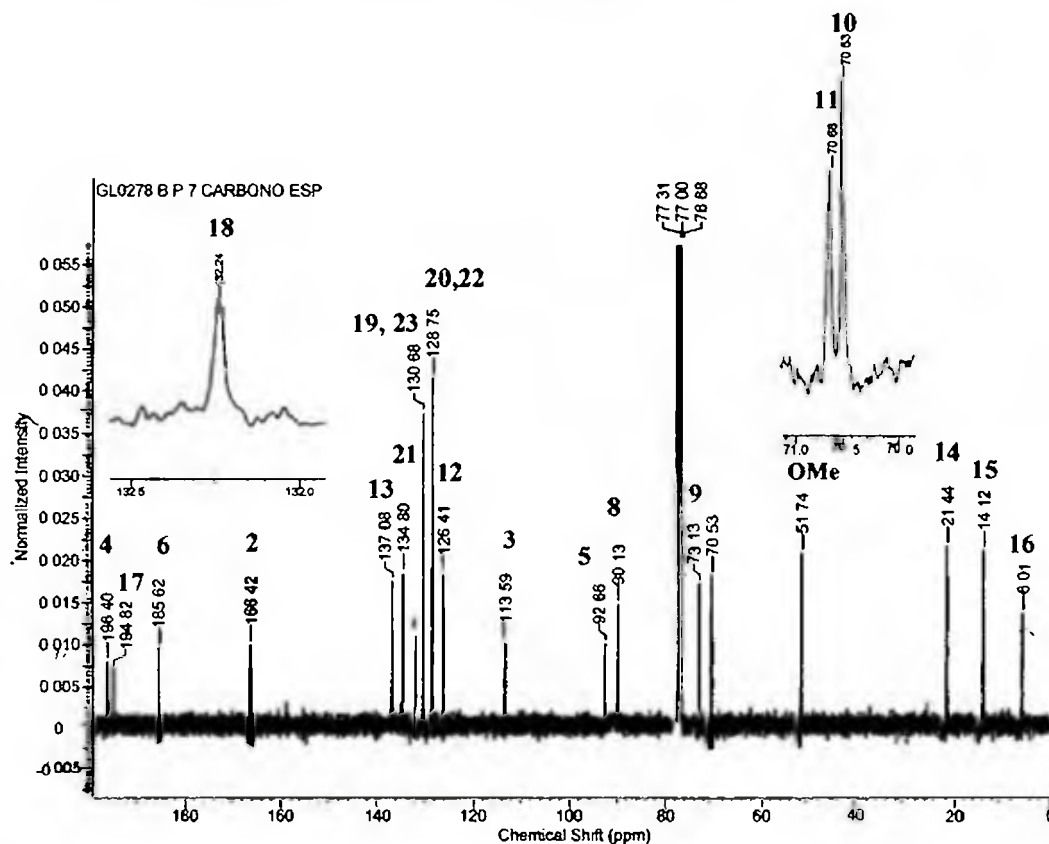


Figura 6.33. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 5 en  $\text{CDCl}_3$

En el Cuadro 6.8 se encuentra la comparación de los datos espectroscópicos experimentales del compuesto 5 con los datos reportados en la literatura para Pseurotina A (Schmeda-Hirschmann et al., 2008 y Pinheiro et al., 2012). La estructura química de Pseurotina A se detalla en la Figura 6.34.

Cuadro 6.8. Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto 5.

No.	$^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)		$^1\text{H}$ $\delta$ (ppm)			Tipo
	Pseurotia A <sup>a</sup>	Comp. 5	Pseurotia A <sup>a</sup>	Comp. 5	Mult.	
1	-	-	-	-	-	-
2	166.7	166.42	-	-	-	C
3	113.5	113.59	-	-	-	C
4	196.5	196.40	-	-	-	C=O
5	92.6	92.66	-	-	-	C
6	185.8	185.62	-	-	-	C=O
7	-	-	8.19	7.87	bs	NH
8	90.4	90.13	-	-	-	C
9	73.1	73.13	4.70	4.70	s	CH
10	70.6	70.53	4.59	4.59	d	CH
11	70.6	70.66	4.75	4.75	m	CH
12	126.5	126.41	5.31	5.31	dd	CH
13	136.9	137.08	5.61	5.63	m	CH
14	21.4	21.44	2.05-2.25	2.15	m	CH <sub>2</sub>
15	14.0	14.12	0.99	1.00	t	CH <sub>3</sub>
16	6.0	6.01	1.68	1.69	s	CH <sub>3</sub>
17	195.0	194.82	-	-	-	C=O
18		132.24	-	-	-	C
19	128.7 a 134.8	130.68	8.31	8.32	dd	CH, arilo
20		128.75	7.49	7.50	t	CH, arilo
21		134.80	7.65	7.66	m	CH, arilo
22		128.75	7.49	7.50	t	CH, arilo
23		130.68	8.31	8.32	dd	CH, arilo
OMe	51.8	51.74	3.41	3.42	s	CH <sub>3</sub>

Comp. 5: Compuesto 5. Datos tomados de <sup>a</sup> Pinheiro et al., 2012.

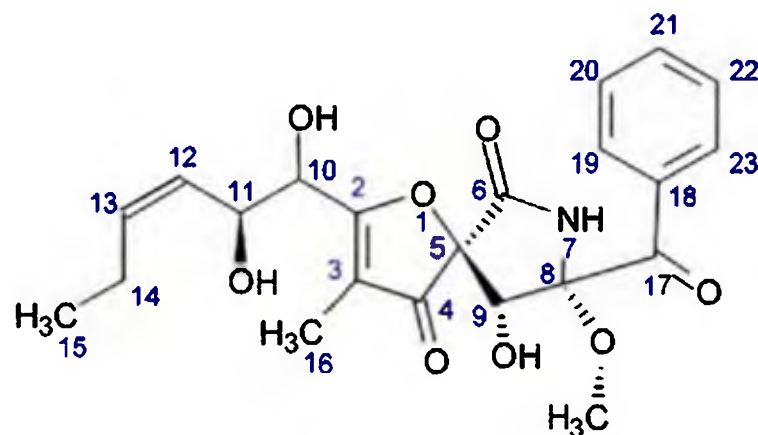


Figura 6.34. Estructura química de Pseurotin A.

Pseurotin A fue aislado en primera instancia del cultivo de *Pseudeurotium ovalis* (Ascomycetos) y se ha reportado su efecto moderado contra las bacterias *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae* y una baja toxicidad sobre fibroblastos humanos de pulmón (Schmeda-Hirschmanna et al., 2008). Además, tiene una buena actividad antileishmania (Martínez-Luis et al., 2012) e inhibe la producción de inmunoglobulinas E (IgE) in vitro (Ishikawa et al., 2009).

### 6.5. Actividad biológica de los compuestos

La actividad anticancerígena y antiparasitaria contra enfermedades tropicales así como la actividad antibacteriana y antifúngica de los cinco compuestos aislados, fue evaluada frente a la línea celular MCF-7, *Plasmodium falciparum*, *Tripanosoma cruzi*, *Leishmania donovani*, bacterias patógenas (*S. aureus*, *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Staphylococcus sp*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.1*, *Enterobacter sp.2* y *Vibrio sp.*) y hongos blanco (*A. fumigatus*, *E. unguis*, *10 A*, *10 B* y *P. citrinum*).

La hipótesis de este estudio sugería que los compuestos con actividad anticancerígena, antiparasitaria y antibacteriana aislados de los cocultivos eran producidos por la bacteria marina *Pseudoalteromonas sp*, pues este microorganismo inhibía el crecimiento de los hongos endófitos tanto en los cocultivos en medio líquido como en medio sólido (ver Figuras 6.4 y 6.5). No obstante, contrario a lo que se pensaba en un principio, la mayoría de los compuestos purificados (Compuestos 1, 2, 4 y 5) provenían de los hongos endófitos y tan solo un compuesto (Compuesto 3) fue de origen bacteriano. En el Cuadro 6.9 se detallan los resultados de los bioensayos de los cinco metabolitos secundarios aislados

El compuesto 1 (gliotoxina) fue el responsable de la actividad contra *P. falciparum* (88.4% IC), *T. cruzi* (83.7% IC), *L. donovani* (66.8% IC) y MCF-7 (0.2% C). Presentó una concentración media inhibitoria (IC<sub>50</sub>) de 0.74 µM contra cáncer. También exhibió actividad inhibitoria contra las bacterias *S. aureus* (85.7% IC), *E. coli* (99.2% IC), *A. baumannii* (97.1% IC), *Staphylococcus sp* (91.3% IC), *Bacillus sp* (97.6% IC), *Enterobacter sp 1* (71.7% IC) y *Vibrio sp* (17 mm). Por otro lado, fue inactivo contra los hongos blancos

Los compuestos 2 (bis-metil-gliotoxina), 4 (fumiquinazolina C) y 5 (Pseurotin A) fueron inactivos frente a todos los bioensayos disponibles en el laboratorio

Por su parte, el compuesto 3 (Isatin), demostró actividad sobre *Staphylococcus sp* (86.4% IC), *Enterobacter sp 1* (96.1% IC) y *Vibrio sp* (8 mm). Fue inactivo contra los hongos endófitos en estudio.

Cuadro 6.9. Actividad biológica de los compuestos aislados.

Bioensayos	Compuestos				
	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	Compuesto 5
<b>Cáncer y enfermedades tropicales</b>					
<i>P. falciparum</i>	A (88.4)	I	I	I	I
<i>T. cruzi</i>	A (83.7)	I	I	I	I
<i>L. donovani</i>	M (66.8)	I	I	I	I
MCF-7	A (0.2)	I	I	I	I
<b>Cepas ATCC</b>					
<i>S. aureus</i>	A (85.7)	I	I	I	I
<i>E. coli</i>	A (99.2)	I	I	I	I
<i>A. baumannii</i>	A 97.1	I	I	I	I
<i>P. aeruginosa</i>	I	I	I	I	I
<i>C. albicans</i>	I	I	I	I	I
<b>Bacterias patógenas</b>					
<i>Staphylococcus sp.</i>	A (91.3)	I	A (86.4)	I	I
<i>Bacillus sp.</i>	A (97.6)	I	I	I	I
<i>Enterobacter sp. 1</i>	M (71.7)	I	A (96.1)	I	I
<i>Enterobacter sp. 2</i>	I	I	I	I	I
<i>Vibrio sp.</i>	A (17)	I	M (8)	I	I
<b>Hongos blanco</b>					
<i>A. fumigatus</i>	I	I	I	I	I
<i>E. unguis</i>	I	I	I	I	I
10 A	I	I	I	I	I
10 B	I	I	I	I	I
<i>P. citrinum</i>	I	I	I	I	I

Compuesto 1: Gliotoxina; Compuesto 2: Bis(metil)gliotoxina; Compuesto 3: Isatín; Compuesto 4: Fumiquinazolina C; Compuesto 5: Pseurotín A.

A: Activo, M: Moderadamente activo, I: Inactivo. Datos expresados en % de inhibición de crecimiento (Malaria, Chagas, Leishmania, cepas ATCC, bacterias y hongos blanco), en % de crecimiento (Cáncer) y diámetro de halo de inhibición en mm (*Vibrio sp.*).

A pesar de que la inhibición de crecimiento de los hongos endófitos por acción de *Pseudoalteromonas sp* fue evidente, especialmente en los medio de cultivo sólido, no fue posible aislar el o los compuestos antifúngicos bajo el protocolo de fermentación y extracción estándar del laboratorio. Es posible que los compuestos son oxidables o fotolábiles y se degradan al dejarlos expuestos durante el periodo de incubación (medios de cultivo líquido), liofilización (medios de cultivo sólido), extracción, fraccionamiento y concentración de los extractos

Estudios previos con cepas de *Pseudoalteromonas* aisladas en Panamá, que fueron trabajados en la Universidad de San Diego (California), revelaron que estas bacterias producen compuestos denominados alterochromides, los cuales son metabolitos secundarios antifúngicos que se producen solo en condiciones de oscuridad. Por lo tanto, es posible que las bacterias de este estudio produzcan los mismos tipos compuestos y eso explicaría que no se haya encontrado actividad antifúngica en los extractos y fracciones que fueron procesados bajo la luz.

## 7. CONCLUSIONES

Los compuestos aislados con actividad biológica en este trabajo de investigación fueron identificados únicamente cuando las bacterias marinas *Pseudoalteromonas sp* y los hongos endófitos (*A fumigatus* y *E unguis*) fueron fermentados en medios de cultivos líquidos mixtos, mientras que permanecieron indetectables cuando se cultivaron individualmente y en medios de cultivo sólido

Se infiere que la interacción bacteria-hongo resultó en la activación de distintos clusters de genes de sintetasa de péptidos no ribosomales (NRPS) y policétidos sintetasa (PKS) de los hongos endófitos *A fumigatus* y *E unguis*, los cuales codifican para complejos multienzimáticos responsables de la producción de gliotoxina, bis(metil)gliotoxina, fumiquinalozina C y pseurotina A.

La gliotoxina, fue el compuesto responsable de la actividad biológica encontrada frente a los ensayos anticancerígenos (MCF-7), antiparasitarios (*P falciparum*, *T cruzi* y *L donovani*) y antibacterianos (*S aureus*, *E coli*, *A baumannii*, *Staphylococcus sp*, *Bacillus sp*, *Enterobacter sp 1* y *Vibrio sp*). Por otro, lado el isatín presentó actividad antibacteriana contra *Staphylococcus sp*, *Enterobacter sp 1* y *Vibrio sp*. La bis(metil)gliotoxina, forma reducida y metilada de la gliotoxina, así como la fumiquinazolina C y pseurotina A fueron inactivos frente a los bioensayos disponibles en el laboratorio.

Los compuestos antifúngicos producidos por *Pseudoalteromonas sp* no fueron identificados en este trabajo, pues se sospecha que son metabolitos fotosensibles que se degradaron

durante el procesamiento de los extractos bajo los protocolos de trabajo estándares de laboratorio. El empleo de nuevas tecnologías basadas en las imágenes producidas por espectrometría de masas (MALDI-TOF imaging) podría ayudar a acelerar el proceso del descubrimiento de estos compuestos con actividad antifúngica.

El descubrimiento moderno de nuevos anticancerígenos, antiparasitarios y antimicrobianos todavía depende en gran medida de los productos naturales. El presente trabajo de investigación es tan solo una pequeña demostración de que los bosques tropicales y recursos marinos representan fuentes adecuadas y prometedoras para la bioprospección de hongos endófitos y bacterias marinas. Debido a la gran biodiversidad panameña, existe la posibilidad de aislar miembros de géneros que no han sido previamente recolectados, incluyendo especies potencialmente nuevas y con bioactividades nunca antes descritas.

Considerando los altos niveles de heterogeneidad de las poblaciones microbianas y de sus medios ambientes, la tarea de entender qué tan compleja es la interacción de los microorganismos es un trabajo de gran envergadura. No obstante, la asociación de microorganismos en cocultivos simula un escenario más real de lo que ocurre en la naturaleza en comparación a los métodos de fermentación convencionales y plantea argumentos importantes con respecto a la base molecular de tales interacciones microbianas con probable importancia ecológica. Con las incontables posibilidades de combinación de microorganismos y el incremento de sofisticados métodos de aislamiento químico y de determinación estructural, el potencial de la fermentación mixta de microorganismos en el descubrimiento de drogas de productos naturales parece marcar un futuro promisorio.

## 8. RECOMENDACIONES

Futuros estudios sobre la interacción de estos y otros microorganismos no solo podrían proporcionar conocimientos fundamentales en la comunicación y antagonismo microbiano, sino también pueden conducir potencialmente al descubrimiento de compuestos bioactivos que de otro modo pasarían desapercibidos.

También se sugiere la utilización de nuevas herramientas basadas en imágenes producidas por espectrometría de masas (MALDI-TOF imaging) y redes moleculares formadas por espectrometría de masas-masas ( $MS^2$  molecular networking) para estudiar las interacciones microbianas y acelerar el proceso de descubrimiento de compuestos con actividad antifúngica que no pudieron ser aislados empleando protocolos estándares de laboratorio.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABOUL-FADL, T.; RADWAN, A.; ATTIA, M.; AL-DHFYAN, A. y ABDEL-AZIZI H. (2012). Schiff bases of indoline-2,3-dione (isatin) with potential antiproliferative activity. *Chem. Cent. J.* **6** (49):1-11.
- ABOUL-FADL, T., RADWAN, A.A., ABDELAZIZ, H.A., BASEERUDDIN, M., ATTIA, M.I. y KADI, A. (2012). Novel Schiff Bases of Indoline-2,3-dione and nalidixic acid hydrazide: synthesis, in vitro antimycobacterial and in silico *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) DNA gyrase inhibitory activity. *Dig. J. Nanomater. Bios.* **7** (1): 329 – 338.
- AFIYATULLOV, S.S.; KALINOVSKII, A.I.; PIVKIN, M.V.; DMITRENOK, P.S. y KUZNETSOVA, T.A. (2005). Alkaloids from the marine isolate of the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Chem. Nat. Compd.* **41** (2): 236-238.
- AL-ZEREINI, W. (2006). Natural Products from Marine Bacteria. Tesis. Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, Alemania. 189 págs.
- BAKER, D.; CHIU, M.; OZA, U. y RAJGARHIA, V. (2007). The value of natural products to future pharmaceutical discovery. *Nat. Prod. Rep.* **24** (6): 1225–1244.
- BERDY, J. 2005. Bioactive Microbial Metabolites. *J. Antibiot.* **58** (1):1-26.
- CARVALHO, C. y FERNANDES, P. (2010). Production of Metabolites as Bacterial Responses to the Marine Environment. *Mar. Drugs* **2010** **8** (3): 705-727.
- CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. y SNADER, K.M. (1997). Natural Products in Drug Discovery and Development. *J. Nat. Prod.* **60** (1): 52-60.
- CROFT, S. y COOMBS, G. (2003). Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **19** (11): 502-508.
- ENGELHARDT, K. (2010). Assessment of the antibiotic production potential of marinederived actinomycetes via bioactivity screening and targeted genetic analysis. Tesis. Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway. 58 págs.
- EYBERGER, A.L.; DONDAPATI, R. y PORTER, J.R. (2006). Endophyte fungal isolates from *Podophyllum peltatum* produce podophyllotoxin. *J. Nat. Prod.* **69** (8): 1121-1124.

- FAKRUDDIN M, MANNAN K.S, MAZUMDAR R.M. y AFROZ, H (2012) Antibacterial, antifungal and antioxidant activities of the ethanol extract of the stem bark of *Clausena heptaphylla*. *BMC Complement Altern Med* **12** 232.
- FORSETH, R.R., FOX, E.M; CHUNG, D W, HOWLETT, B J., KELLER, N. P. y SCHROEDER, F. C. (2011). Identification of Cryptic Products of the Gliotoxin Gene Cluster using NMR-based Comparative Metabolomics and a Model for Gliotoxin Biosynthesis *J Am Chem Soc* **133** (25) 9678–9681.
- GIL-TURNES, A.S, HAY, M.E. y FENICAL, W (1989) Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science* **246** (4926): 116-118
- HAN, X -x, XU, X -y.; CUI, C -b y GU, Q.-q (2007) Alkaloidal compounds produced by a marine-derived fungus, *Aspergillus fumigatus* H1-04, and their antitumor activities. *Chin J Med Chem.* **7** (4). 232-237
- HATABU, T, HAGIWARA, M, TAGUCHI, N; KIYOZAWA, M.; SUZUKI, M, KANO, S. y SATO, K (2006) *Plasmodium falciparum* The fungal metabolite gliotoxin inhibits proteasome proteolytic activity and exerts a plasmodicidal effect on *P falciparum* *Exp Parasitol* **112** (3): 179–183.
- LEE, H.J, LEE, J H, HWANG, B Y.; KIM, H S y LEE, J.J (2001). Anti-Angiogenic Activities of Gliotoxin and Its Methylthio-Derivative, Fungal Metabolites. *Arch Pharm Res* **24** (5): 397-401
- HOPWOOD, D.A (2007). *Streptomyces* in Nature and Medicine The Antibiotic Makers Oxford University Press, Oxford, Nueva York (Estados Unidos). 272 págs
- HOTEZ, P; BOTTAZZI, M.; FRANCO-PAREDES, C., AULT, S. y PERIAGO, M (2008) The Neglected Tropical Diseases of Latin America and the Caribbean A Review of Disease Burden and Distribution and a Roadmap for Control and Elimination. *PLoS Negl. Trop Dis* **2** (9): e300.
- HUANG, W.Y.; CAI, Y Z, HYDE, K D.; CORKE, H y SUN, M (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity* **33**:61-75
- IGOSHEVA, N, LORZ, C.; O'CONNER, E., GLOVER, V. Y MEHMET, H (2005) Isatin, an endogenous monoamine oxidase inhibitor, triggers a dose- and time-dependent switch from apoptosis to necrosis in human neuroblastoma cells *Neurochem Int* **47** (3): 216–224.
- ISHIKAWA, M, NINOMIYA, T.; AKABANE, H; KUSHIDA, N, TSUJUCHI, G; OHYAMA, M; GOMI, S, SHITO, K y MURATA, T (2009) Pseurotin A and its analogues as inhibitors of immunoglobulin E production *Bioorg Med Chem Lett* **19** (5). 1457–1460.

- JALGAONWALA, R E.; MOHITE, B.V. y MAHAJAN, R T (2011). A review. Natural products from plant associated endophytic fungi. *J Microbiol Biotech Res* 1 (2): 21-32.
- JEVONS, M.P, COE, A.W. y PARKER, M.T. (1963). Methicillin resistance in staphylococci. *The Lancet* 1(7287) 904-907
- DA SILVA, J.F.; GARDEN, S J. y PINTO, A C (2001) The Chemistry of Isatins: a Review from 1975 to 1999 *J Braz Chem Soc* 12 (3): 273-324
- KIRBY, G W., ROBINS, D.J, SEFTON, M A y TALEKAR, R R (1980) Biosynthesis of Bisdethiobis(methylthio)gliotoxin, a New Metabolite of *Gliocladium deliquescens* *J Chem Soc ,Perkin Trans* 1.119-121.
- KRINGS, M.; TAYLOR, T.N.; HASS, H.; KERP, H., DOTZLER, N. y HERMSEN, E J (2007) Fungal endophytes in a 400-million-yr-old land plant infection pathways, spatial distribution, and host responses *New Phytol* 174 (3): 648-657.
- LEFEVRE, F., ROBE, P ; JARRIN, C ; GINOLHAC, A., ZAGO, C.; AURIOL, D.; VOGEL, T M., SIMONET, P. y NALIN, R (2008). Drugs from hidden bugs: their discovery via untapped resources. *Res Microbio.* 159 (3) 153-161
- LI, X y QIN, L (2005). Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity *Trends Biotechnol.* 23 (11).539–543
- MANIVASAGAN, P , VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K y KIM, S K (2013). Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol Res* , S0944-5013(13)00125-0
- MARTÍNEZ-LUIS, S , CHÉRIGO, L., ARNOLD, E., SPADAFORA, C ; GERWICK, W H Y CUBILLA-RÍOS, L (2012). Antiparasitic and anticancer constituents of the endophytic fungus *Aspergillus sp.* strain F1544 *Nat Prod Commun* 7 (2):165-168.
- MORENO C.; VALDÉS S E. y CERVANTES R. A (2002) Evaluación de la producción de gliotoxina en 10 cepas de *Aspergillus fumigatus* obtenidas de aislamientos clínicos *Tec Pecu Mex.* 40 (2) 139-148
- NATURE NEWS FEATURE A call to arms. 2007. *Nat Rev. Drug. Discov.* 6:8-12
- NEEDHAM, J., KELLY, M.T.; ISHIGE, M y ANDERSEN, R.J. (1994). Andrimid and moiramides A-C, metabolites produced in culture by a marine isolate of the bacterium *Pseudomonas fluorescens*: structure elucidation and biosynthesis *J Org Chem* 59 (8) 2058-2063.
- NUMATA, A.; TAKAHASHI, C.; MATSUSHITA, T.; MIYAMOTO, T, KAWAI, K.; USAMI, Y., MATSUMURA, E ; INOUE, M., OHISHI, H. Y SHINGU, T (1992)

- Fumiquinazolines, novel metabolites of a fungus isolated from a saltfish. *Tetrahedron Lett.* **33** (12): 1621-1624.
- OKAMOTO M.; YOSHIDA K.; UCHIDA I.; NISHIKAWA M.; KOHSAKA M. y AOKI H. (1986). Studies of Platelet Activating Factor (PAF) antagonists from microbial Products. I. Bisdethiobis(methylthio)gliotoxin and its derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **34**(1): 340-344.
- O'SHEA, R., y MOSER, H.E. (2008). Physicochemical properties of antibacterial compounds: implications for drug discovery. *J. Med. Chem.* **51**(10):2871-2878.
- PARK, H.B.; KIM, Y.J.; PARK, J.S.; YANG, H.O.; LEE, K.R. y Kwon, H.C. (2011). Glionitrin B, a Cancer Invasion Inhibitory Diketopiperazine Produced by Microbial Coculture. *J. Nat. Prod.*, **74** (10): 2309–2312.
- PEMAN, J.; MARTÍN-MAZUELOS, E. y RUBIO-CALVO, M.C. (2007). Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Revista Iberoamericana de Micología, segunda edición [citado el 30 de enero de 2012]. Disponible en: <http://www.guia.reviberoammicol.com>
- PINHEIRO, E.A.; CARVALHO, J.M.; DOS SANTOS, D.C.; FEITOSA, A.D.; MARINHO, P.S.; GUILHON, G.M.; DE SOUZA, A.D., DA SILVA, F.M. y MARINHO, A.M. (2012): Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus sp.* EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. *Nat. Prod. Res.* **1**:1–6.
- PREMANATHAN, M.; RADHAKRISHNAN, S.; KULANGLAPPAR, K.; SINGARAVELU, G.; THIRUMALALARASU, V.; SIVAKUMAR, T. y KATHIRESAN, K. (2012). Antioxidant and anticancer activities of isatin (1H-indole-2,3-dione), isolated from the flowers of *Couroupita guianensis* Aubl. *Indian J. Med. Res.* **136** (5): 822-826.
- Program of action for Cancer Therapy (PACT). 2011. Fighting Cancer in the Developing World, International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna, Austria, 30 pág.
- QING PAN, X. y HARDAY, J. (2007). Electromicroscopic Observations on Gliotoxin-induced Apoptosis of Cancer Cells in Culture and Human Cancer Xenografts in Transplanted SCID Mice. *In vivo*, **21** (2): 259-265.
- COLE, R.J. y COX, R.H. (1981). Handbook of Toxic Fungal Metabolites. *Academic Press*, London, Inglaterra, pág. 571-574.
- RADWAN, A.A.; ALANAZI, F.K. y AL-DHFYAN, A. (2013). Synthesis, and Docking Studies of Some Fused-quinazolines and Quinazolines carrying biological active Isatin moiety as cell-cycle inhibitors of Breast Cancer Cell Lines. *Drug Res. (Stuttg)*, **63** (3): 129-136.

- RODRIGUEZ, R.J.; WHITE, J.F.; ARNOLD, A.E. y REDMAN, R.S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytol.*, **182** (2): 314-330.
- ROSA, L.H.; VIEIRA, M.; COTA, B.C.; JOHANN, S.; ALVES, T.; ZANI, C.L. y ROSA, C.A. (2011). Endophytic Fungi of Tropical Forests: A Promising Source of Bioactive Prototype Molecules for the Treatment of Neglected Diseases, Drug development- A case study based insight into modern strategies, Dr. Chris Rundfeldt (Ed.), InTech, pág. 469-486. Disponible en: <http://www.intechopen.com/books/drug-development-a-case-study-based-insight-into-modernstrategies/endophytic-fungi-of-tropical-forests-a-promising-source-of-bioactive-prototype-molecules-for-the-tre>
- SAIKOT, F.K.; KHAN, A. y HASAN, M.F. (2012). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Abroma augusta* Linn. leaves extract. *Asian Pacific. J. Trop. Biomed.*: S1418-S1422.
- SÁNCHEZ, J.F.; SOMOZA, A.D.; KELLER, N.P. y WANG, C. (2012). Advances in *Aspergillus* secondary metabolite research in the post-genomic era. *Nat. Prod. Rep.*, **29** (3), 351-371.
- SANDERS, I.R. (2004). Plant and arbuscular mycorrhizal fungal diversity - are we looking at the relevant levels of diversity and are we using the right techniques? *New Phytol.*, **164** (3): 415-418.
- SCHARF, D.; HEINEKAMP, T.; REMME, N.; HORTSCHANSKY, P.; BRAKHAGE, A. y HERTWECK, C. (2012). Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93** (2):467-472.
- SCHERLACH, K. y HERTWECK, C. (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org. Biomol. Chem.*, **7** (9): 1753-1760.
- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; HORMAZABAL, E.; RODRÍGUEZ, J. y THEODULOZ, C. (2008). Cycloaspeptide A and Pseurotin A from the Endophytic Fungus *Penicillium janczewskii*. *Z. Naturforsch C.*; **63**(5-6):383-388.
- SCHROECKH, V.; SCHERLACH, K.; NÜTZMANN, H.W.; SHELEST, E.; SCHMIDT-HECK, W.; SCHUEMANN, J.; MARTIN, K.; HERTWECK, C. y BRAKHAGE, A.A. (2009). Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106** (34):14558-14563.
- SHAN, T.; LOU, J.; GAO, S.; ZHOU, Y.; SUN, W.; CHAO LUO, C. y ZHOU, L. (2012). Antibacterial activity of the endophytic fungi from a traditional Chinese herb *Paris polyphylla* var. *chinensis*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, **6** (14), 3440-3446.
- SHER, D.; THOMPSON, J.W.; KASHTAN, N.; CROAL, L. y CHISHOLM, S.W. (2011). Response of *Prochlorococcus* ecotypes to co-culture with diverse marine bacteria. *ISME J.*, **5** (6): 1125-1132.

- SIMMONS, T. L. (2008). Characterization of New Marine Secondary Metabolites for the Treatment of Cancer and Neglected Tropical Diseases. Tesis. University of California, San Diego, Estados Unidos. 161 págs.
- SONG, J.; HOU, L.; JU, C.; ZHANG, J.; GE Y. y YUE W. (2013). Isatin inhibits proliferation and induces apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharmacol.*; **702** (1-3): 235-241.
- SPECTRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS (SDBS). [Citado el 12 de febrero de 2012]. Disponible en: [http://sdfs.riodb.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://sdfs.riodb.aist.go.jp/sdfs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)
- SPINK, W.W. y FERRIS, V. (1945). Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin-resistant strains of *staphylococci*. *Science*, **102** (2644):221-223.
- STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F.; KRIVOBOK, S. y SAGE, L. (1990). Gliotoxin: Uncommon <sup>1</sup>H couplings and revised <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR assignments. *J. Nat. Prod.*, **53** (3): 717-719.
- STIERLE, A.; STROBEL, G. y STIERLE, D. (1993). Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*. *Science*, **260** (5105): 214-216.
- SUN, Y.; TAKADA, K.; TAKEMOTO, Y.; YOSHIDA, M.; NOGI, Y.; SHIGERU OKADA, S. y MATSUNAGA, S. (2012). Gliotoxin analogues from a marine-derived fungus, *Penicillium sp.*, and their cytotoxic and histone methyltransferase inhibitory activities. *J. Nat. Prod.*, **75** (1): 111–114.
- TAKAHASHI, C., MATSUSHITA, T., DOI, M., MINOURA, K., SHINGU, T., KUMEDA, Y., y NUMATA, A. (1995). Fumiquinazolines A-G, novel metabolites of a fungus separated from a Pseudolabrus marine fish. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 2345-2353.
- TARMAN, K., LINDEQUIST, U., WENDE, K., PORZEL, A., ARNOLD, N. y WESSJOHANN, L.A. (2011). Isolation of a new natural product and cytotoxic and antimicrobial activities of extracts from fungi of Indonesian marine habitats. *Mar Drugs.*, **9**(3):294-306.
- WARD, C., CHILVERS, E., LAWSON, M., PRYDE, J., FUJIHARA, S., FARROW, S., HASLETT, C. y ROSSI, A. (1999). NF- $\kappa$ B Activation Is a Critical Regulator of Human Granulocyte Apoptosis in Vitro. *J. Biol. Chem.*, **274** (7): 4309–4318.
- WATTS, K., RATNAM, J., ANG, K.-H., TENNEY, K., COMPTON, J., MCKERROW, J. Y CREWS, P. (2010). Assessing the trypanocidal potential of natural and semisynthetic diketopiperazines from two deep water marine-derived fungi. *Bioorg Med Chem.*, **18**(7): 2566–2574.

- WHO EXPERT COMMITTEE (2002). Control of Chagas disease. Library Catalogung-in-Publication, Geneva, Switzerland, series No 905, 109 pag.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010) Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases WHO Library Catalogung-in-Publication, Geneva, Switzerland, series No. 949, 186 pag.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2010) World Malaria Report 2010. Geneva WHO, 204 p
- WRIGHT, G. D (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Micro*, 5:175-186
- XIONG, Z., WANG, J., HAO, Y y WANG, Y. (2013) Recent Advances in the Discovery and Development of Marine Microbial Natural Products *Mar Drugs*, 11 700-717.
- ZGODA, J.R y PORTER, J.R. (2001) A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi *Pharmaceutical Biology*, 39(3). 221–225.
- ZHAO, J., ZHOU, L., WANG, J., SHAN, T., ZHONG, L , LIU, X. y GAO, X (2010). Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, A Méndez-Vilas (Ed)*, Microbiology 2, (1) 567-576.

## **10. APÉNDICE**

### 10.1. Comparación de fracciones de los extractos de cultivos individuales y cocultivos de los microorganismos

Comparación de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN y cromatogramas de las fracciones B, C y D de los cultivos individuales y cocultivos en medio líquido y sólido.

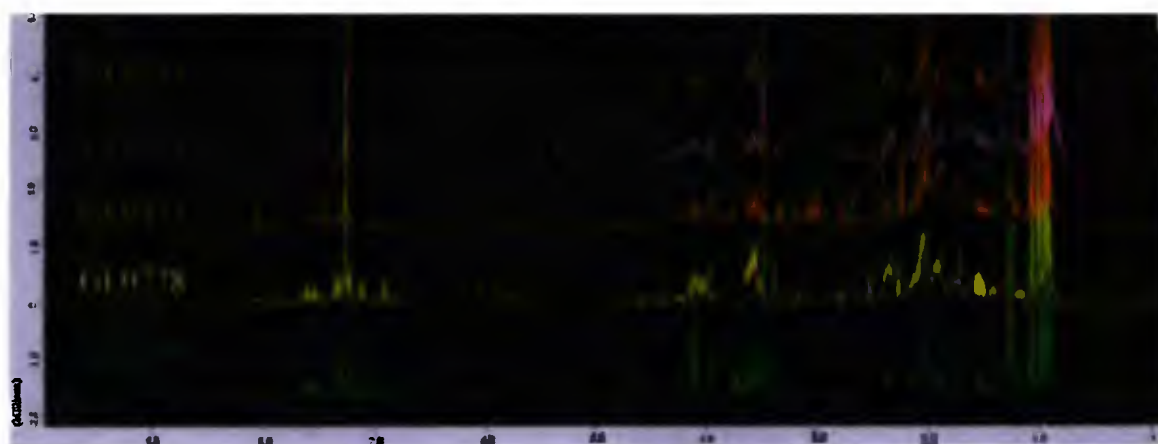


Figura 10.1. Comparación de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN de las fracciones B de los extractos de cultivos en medio líquido.

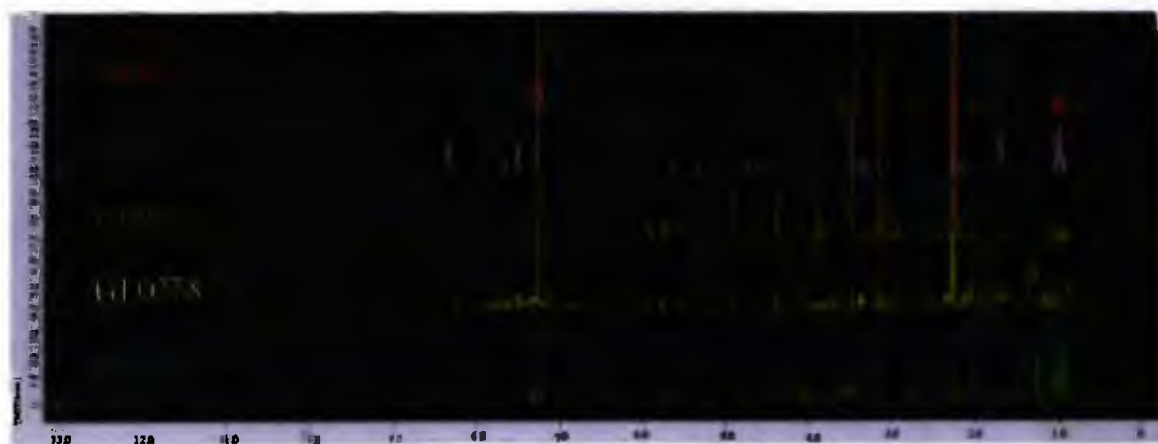
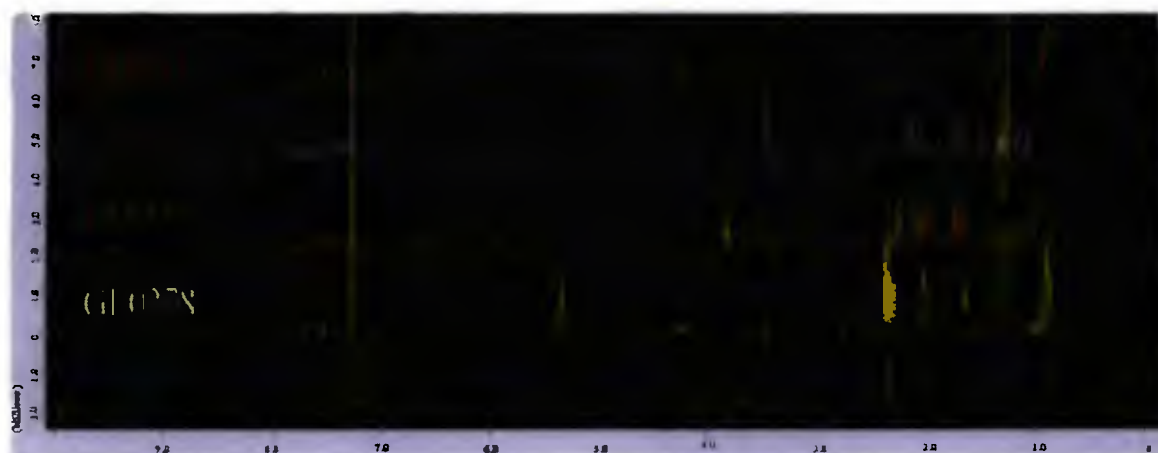
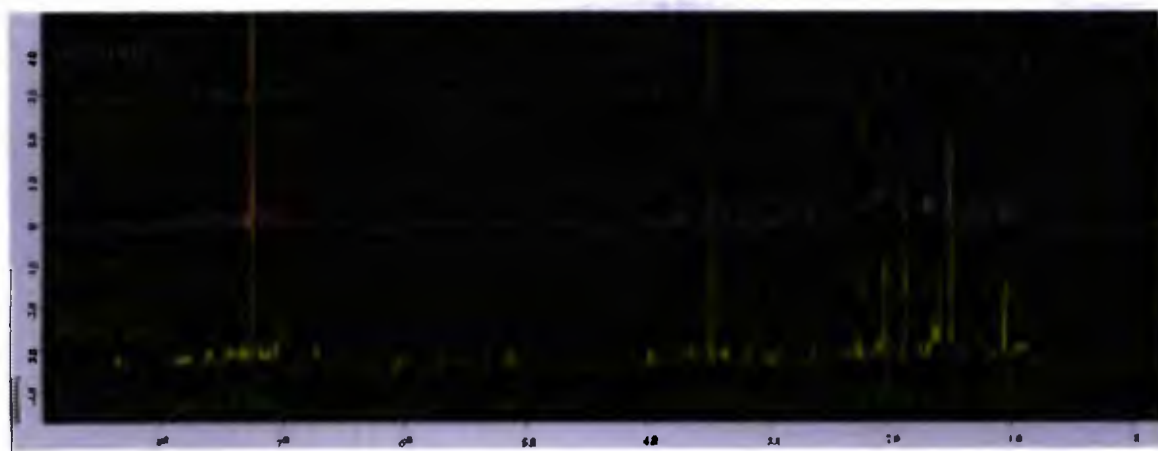


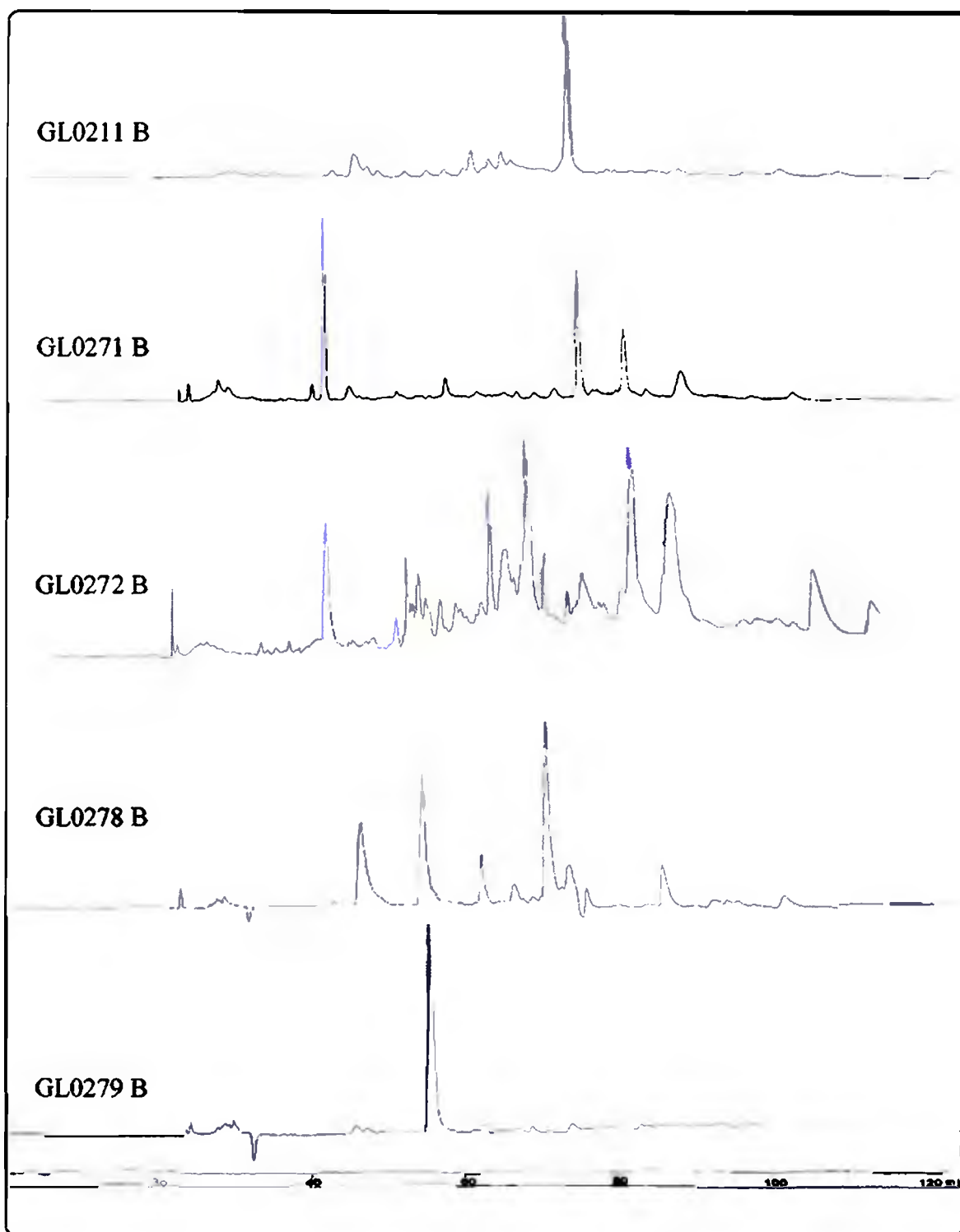
Figura 10.2. Comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de las fracciones C de los extractos de cultivos en medio líquido.



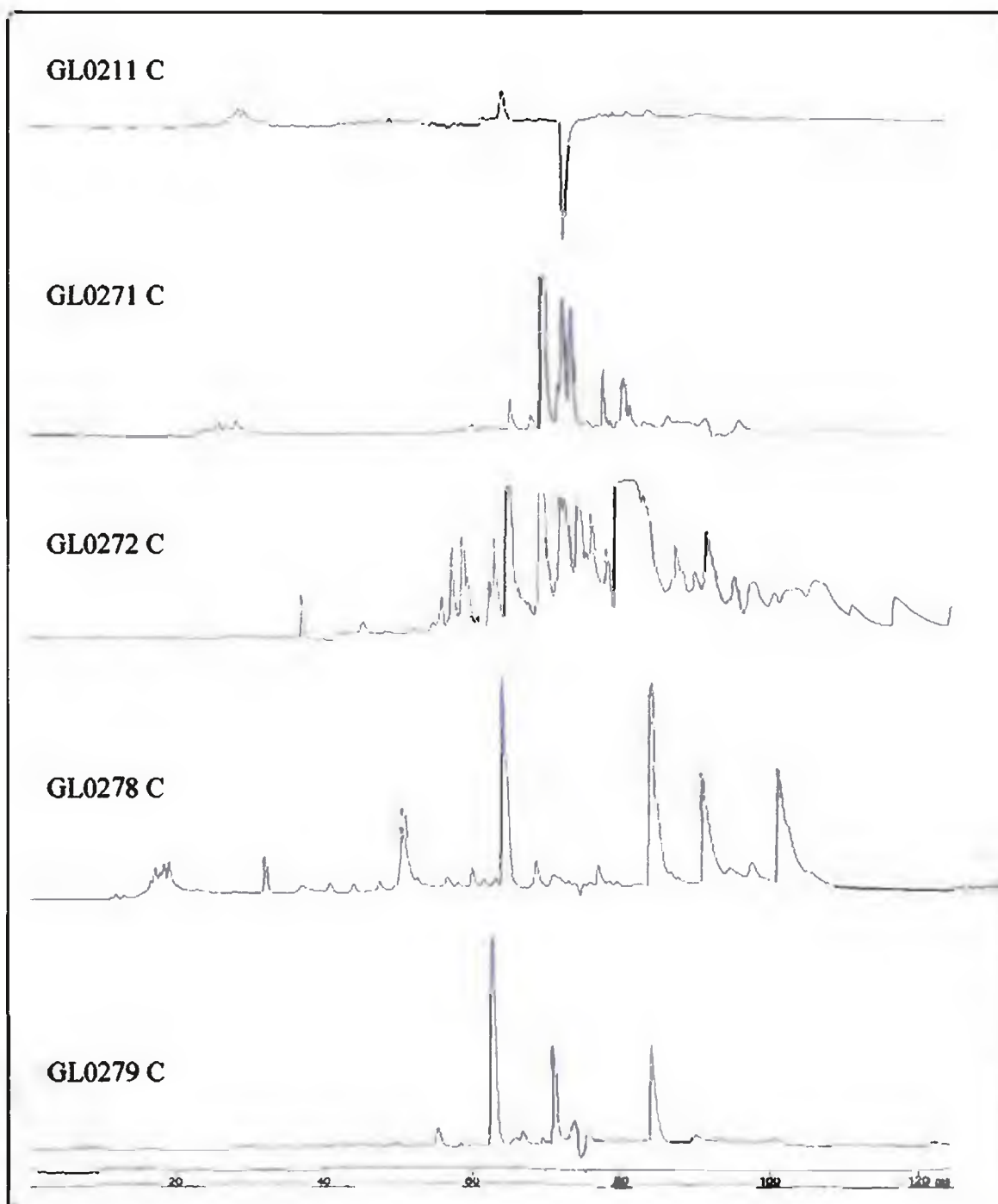
**Figura 10.3.** Comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de las fracciones D de los extractos de cultivos en medio líquido.



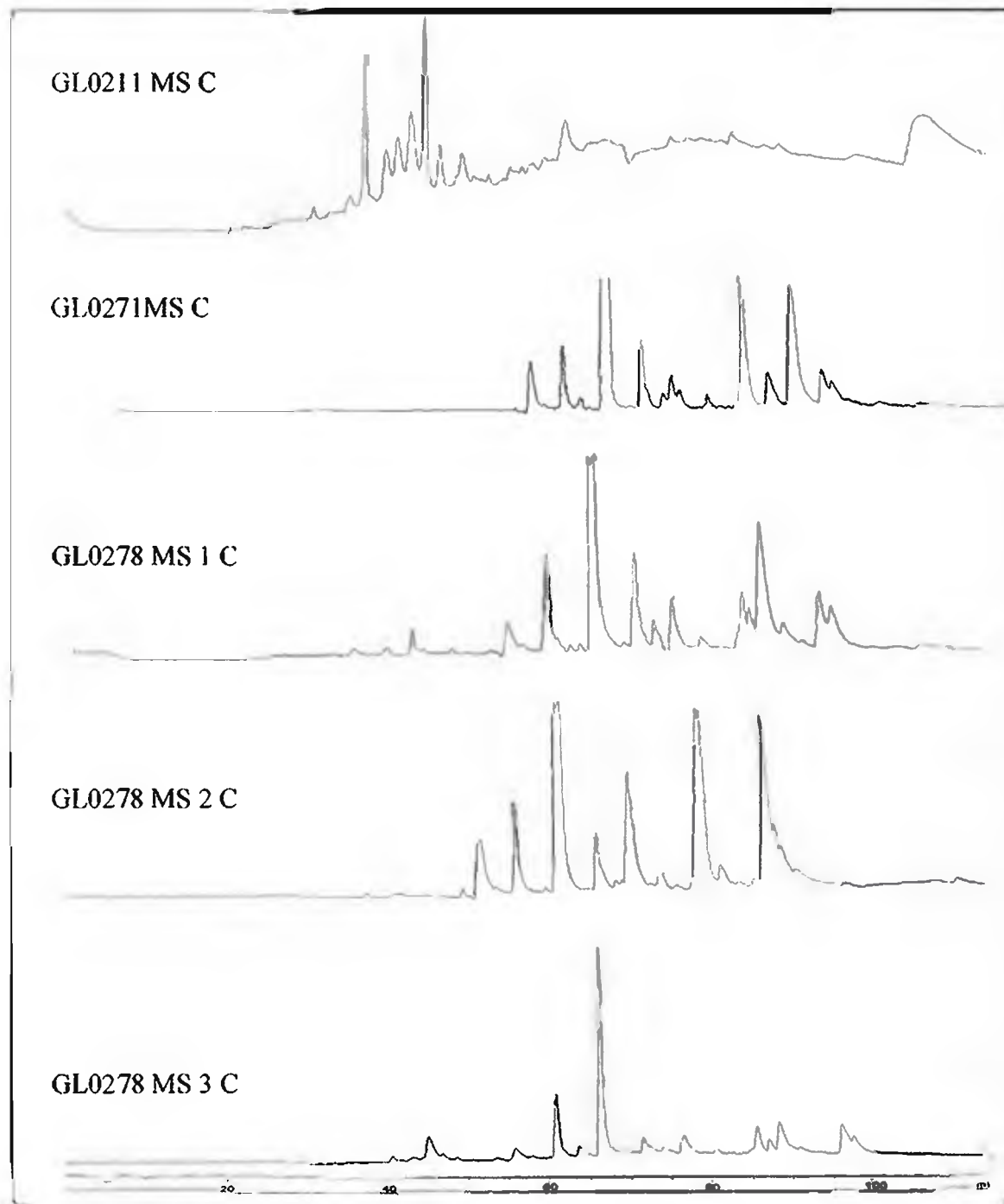
**Figura 10.4.** Comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de las fracciones C de los extractos de cultivos en medio sólido.



**Figura 10.5.** Comparación de cromatogramas de HPLC fracciones B de los extractos de cultivos en medio líquido.



**Figura 10.6.** Comparación de cromatogramas de HPLC fracciones C de los extractos de cultivos en medio líquido.



**Figura 10.7.** Comparación de cromatogramas de HPLC fracciones C de los extractos de cultivos en medio sólido.

## 10.2. Análisis de comparación de compuestos químicos aislados

### Compuesto 1

#### - Gliotoxina -

La evaluación de los cromatogramas de las fracciones activas sirvió para comprobar que los compuestos GL0278 B P6, GL0279 C P3 y GL0279-2 C P5 tienen el mismo tiempo de retención de 62.5 minutos.

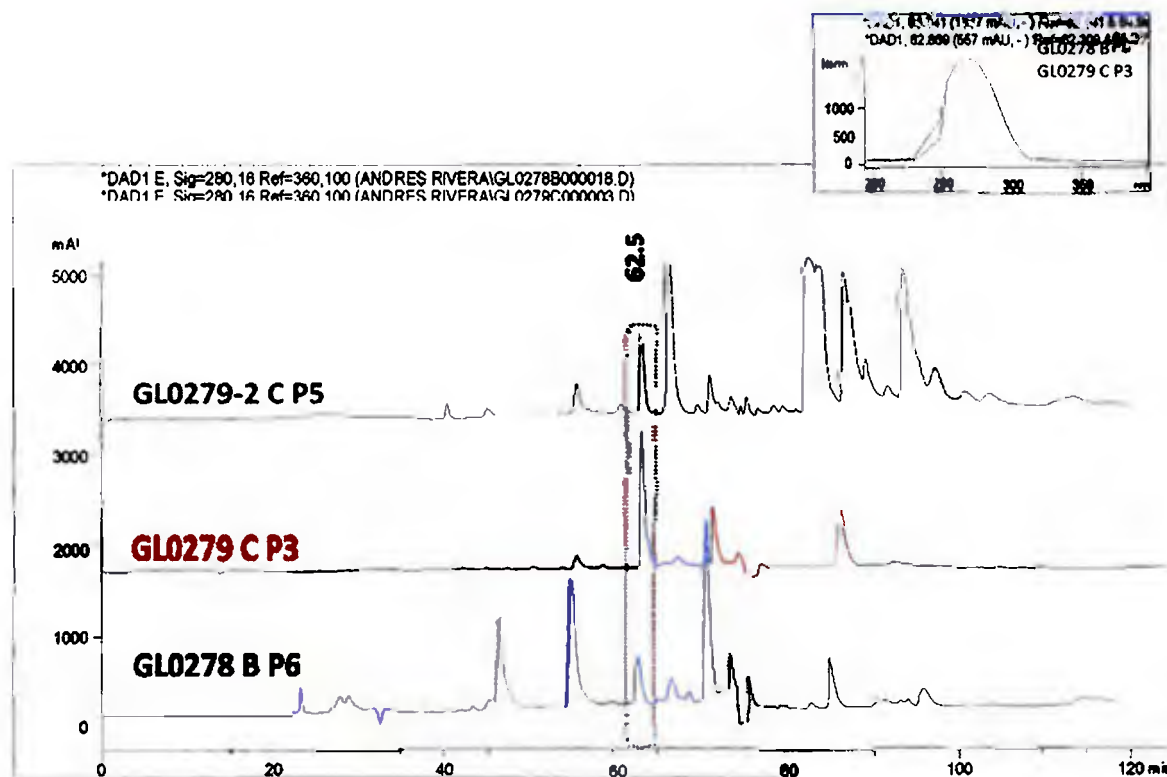
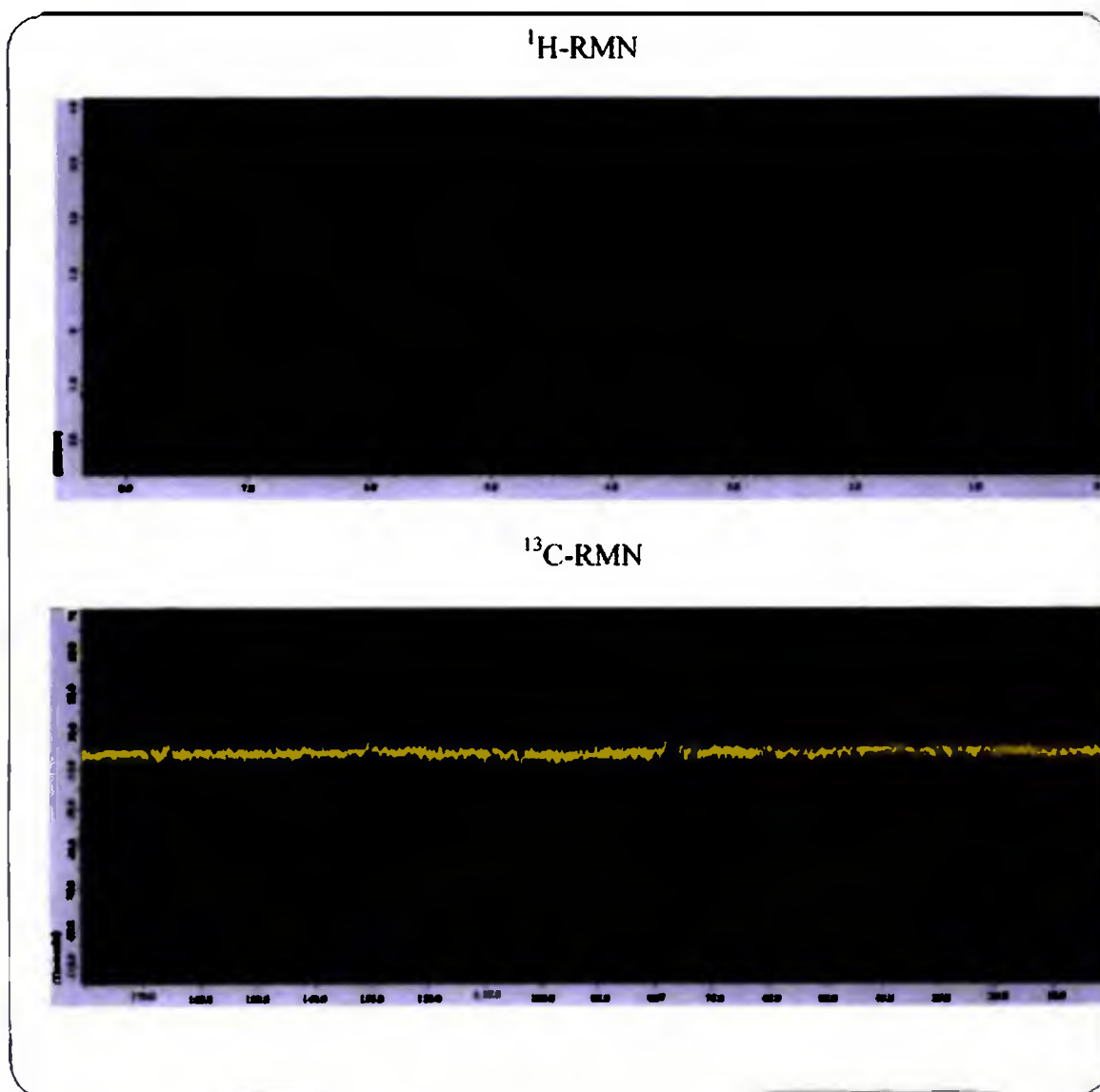


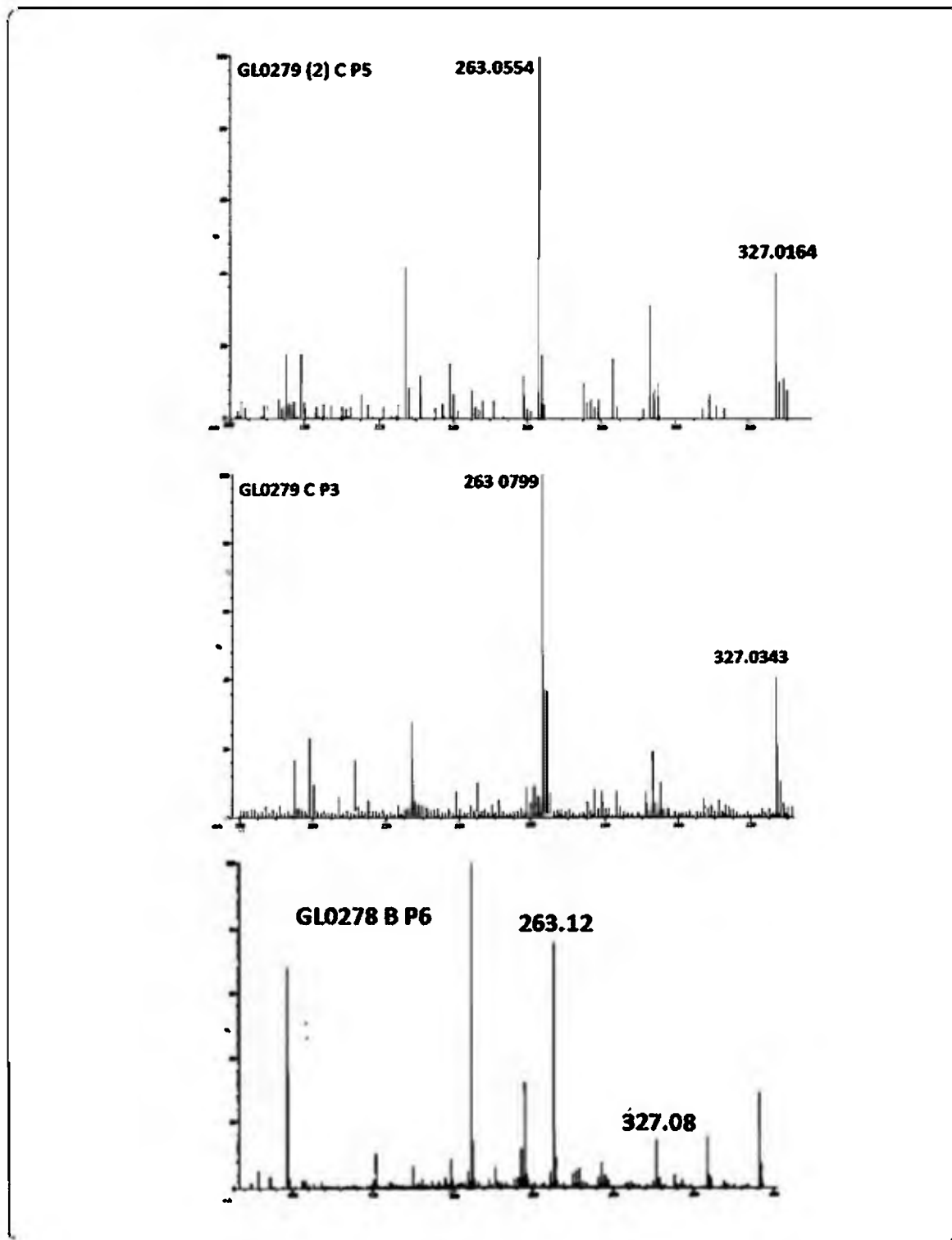
Figura 10.8. Comparación de los cromatogramas y espectro UV de las fracciones activas GL0278 B, GL0279 C y GL0279-2 C.

Este compuesto fue aislado de los cocultivos en medio líquido mas no de los cocultivos en medio sólido.

El análisis de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN, así como los espectros de masas de alta resolución sirvieron para confirmar que en efecto se trataba de la misma entidad química, ya que tienen los mismos desplazamientos químicos y peso molecular.



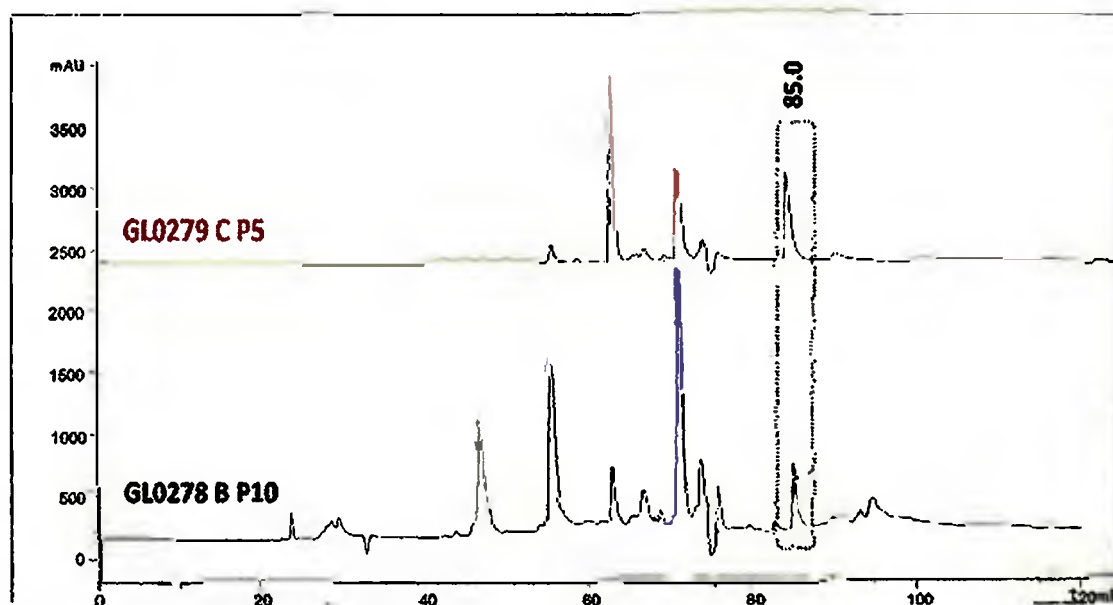
**Figura 10.9.** Comparación de espectros de protones y carbono de GL0278 B P6, GL0279 C P3 y GL0279-2 C P5.



**Figura 10.10.** Comparación de espectro de masas de GL0278 B P6, GL0279 C P3 y GL0279-2 C P5

**Compuesto 2**  
**- Bis(metil)gliotoxina -**

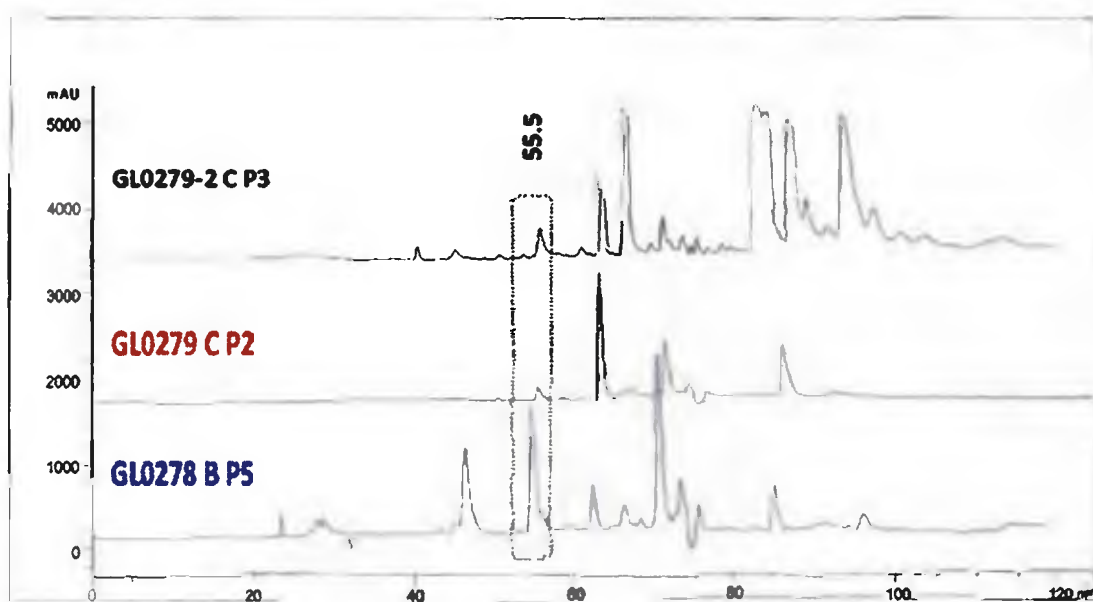
La Bis(metil)gliotoxina fue aislada de los cocultivos en medio líquido GL0278 y GL0279. El compuesto tuvo un tiempo de retención de 85.0 minutos.



**Figura10.11.** Comparación de los cromatogramas de las fracciones GL0278 B y GL0279 C.

**Compuesto 3****- Isatín -**

La evaluación de los cromatogramas correspondientes a las fracciones GL0278 B, GL0279 C y GL029-2 C demostró la presencia de isatín, el cual tuvo un tiempo de retención de 55.5 minutos.

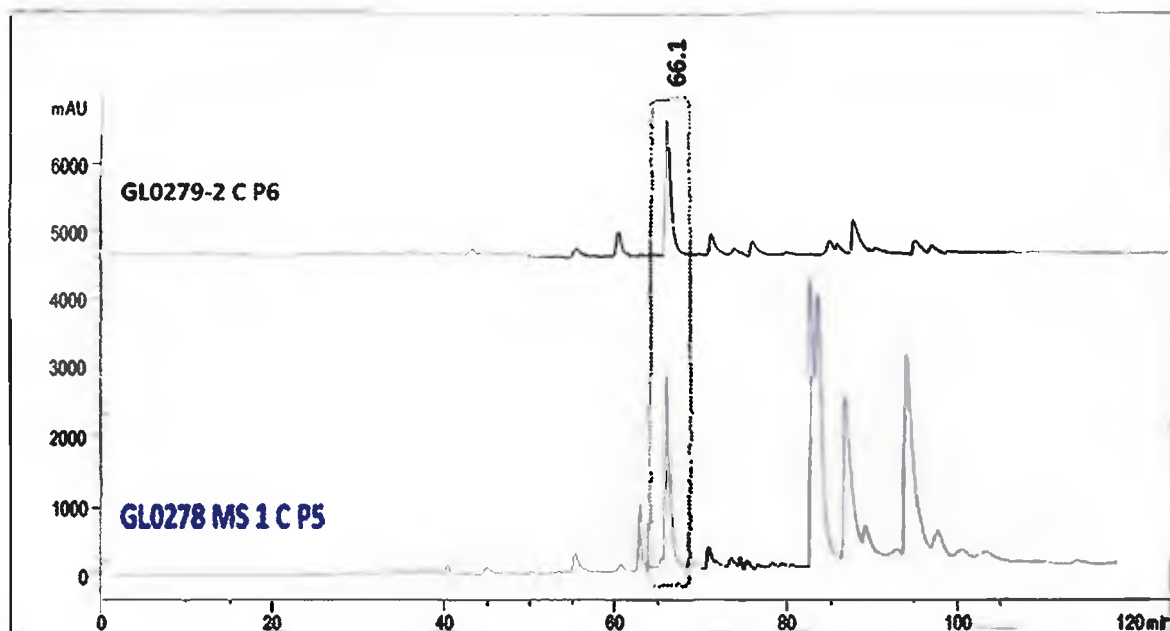


**Figura 10.12.** Comparación de los cromatogramas de las fracciones GL0278 B, GL0279 C y GL0279-2 C.

Este compuesto fue aislado de los cocultivos en medio líquido mas no de los cocultivos en medio sólido.

**Compuesto 4****- Fumiquinolona C -**

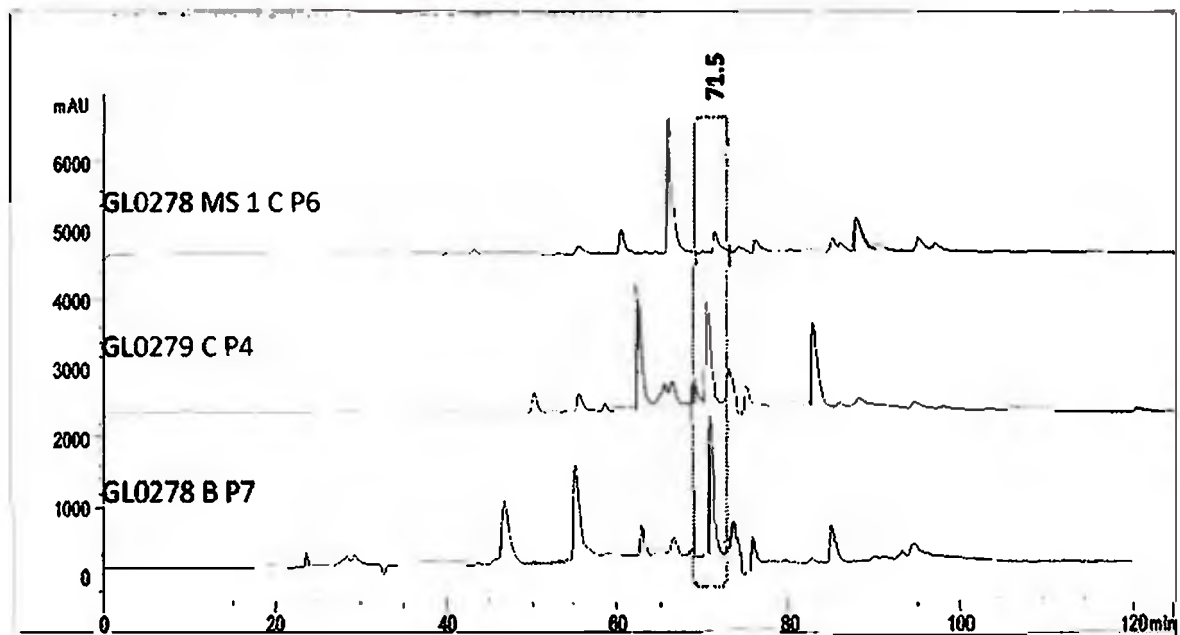
La fumiquinolona C fue purificada de los cocultivos en medio líquido GL0279-2 y del medio sólido GL0278 MS 1. Presentó un tiempo de retención de 66.1 minutos.



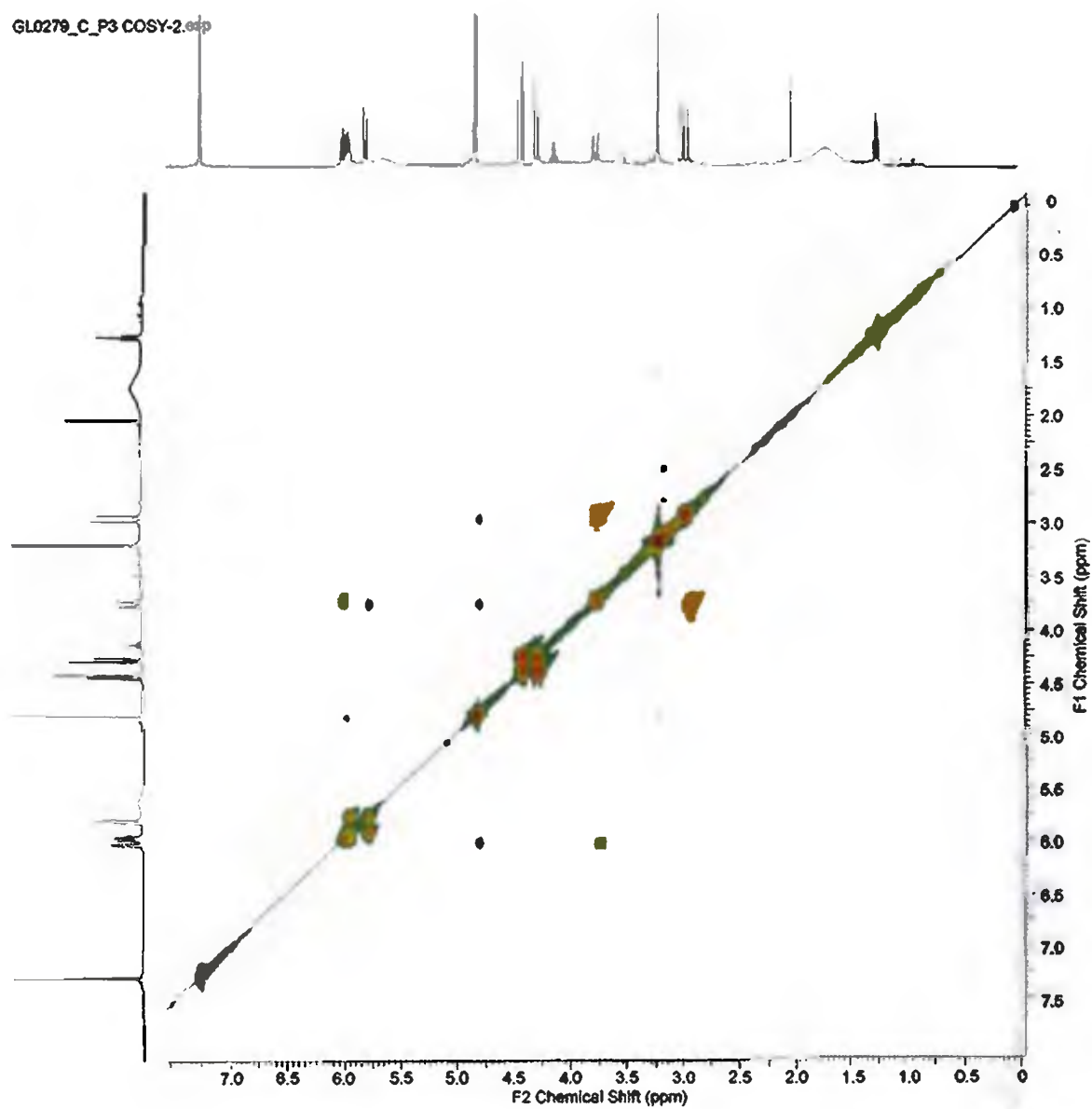
**Figura 10.13.** Comparación de los cromatogramas de las fracciones GL0279-2 C y GL0278 MS 1 C.

**Compuesto 5**  
**- Pseurotin A-**

Pseurotin A fue obtenido de los cocultivos en medio líquido GL0278, GL0279 y en medio sólido GL0278 MS 1. Presentó un tiempo de retención de 71.5 minutos.



**Figura10.14.** Comparación de los cromatogramas de las fracciones GL0278 B, GL0279 C y GL0278 MS1.

**10.3. Análisis bi-dimensional de resonancia magnética nuclear (RMN)****Compuesto 1***(Gliotoxina)***Figura 10.15. COSY del Compuesto 1 en  $\text{CDCl}_3$ .**

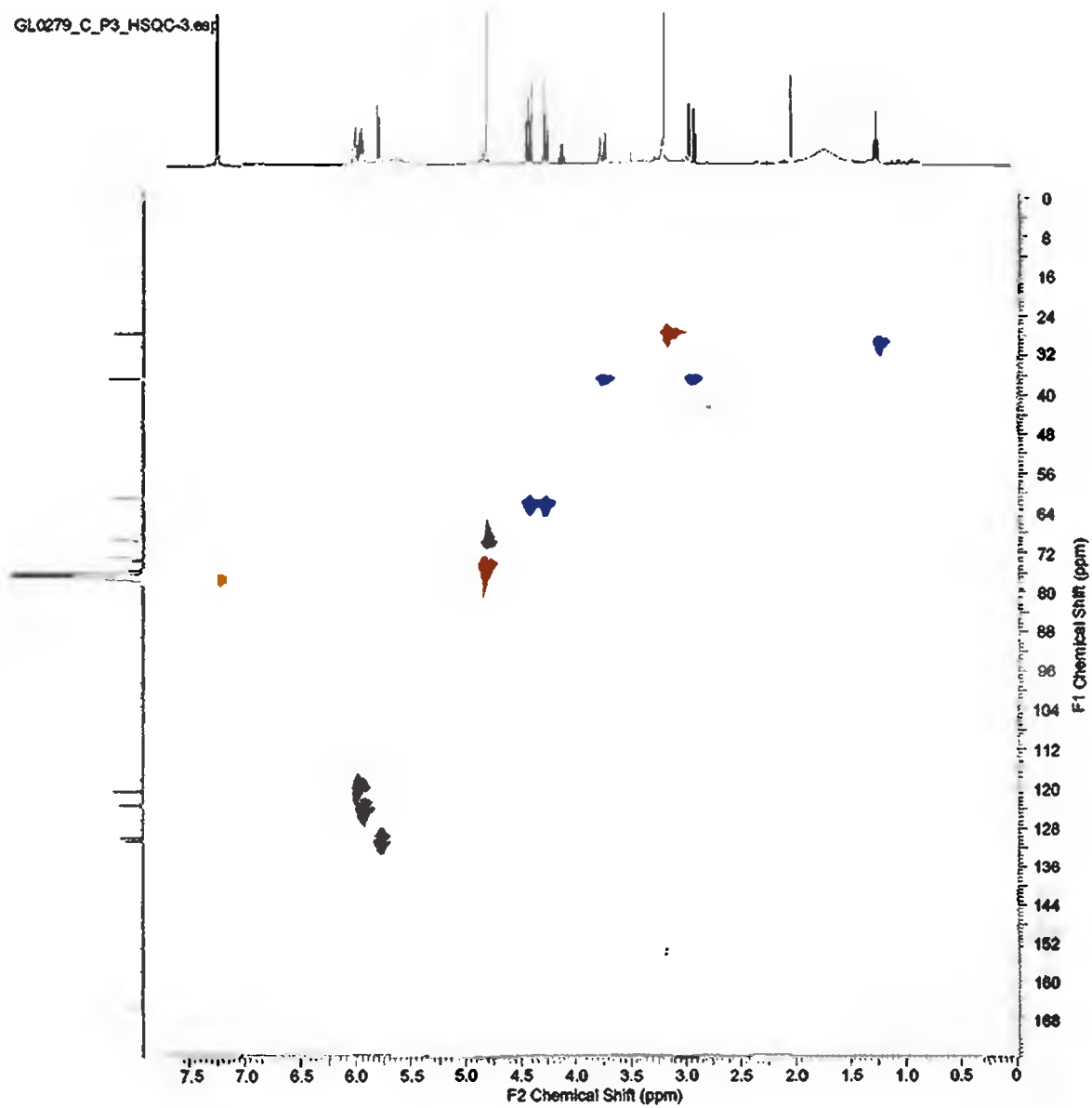


Figura 10.16. HSQC del compuesto 1 en  $\text{CDCl}_3$ .

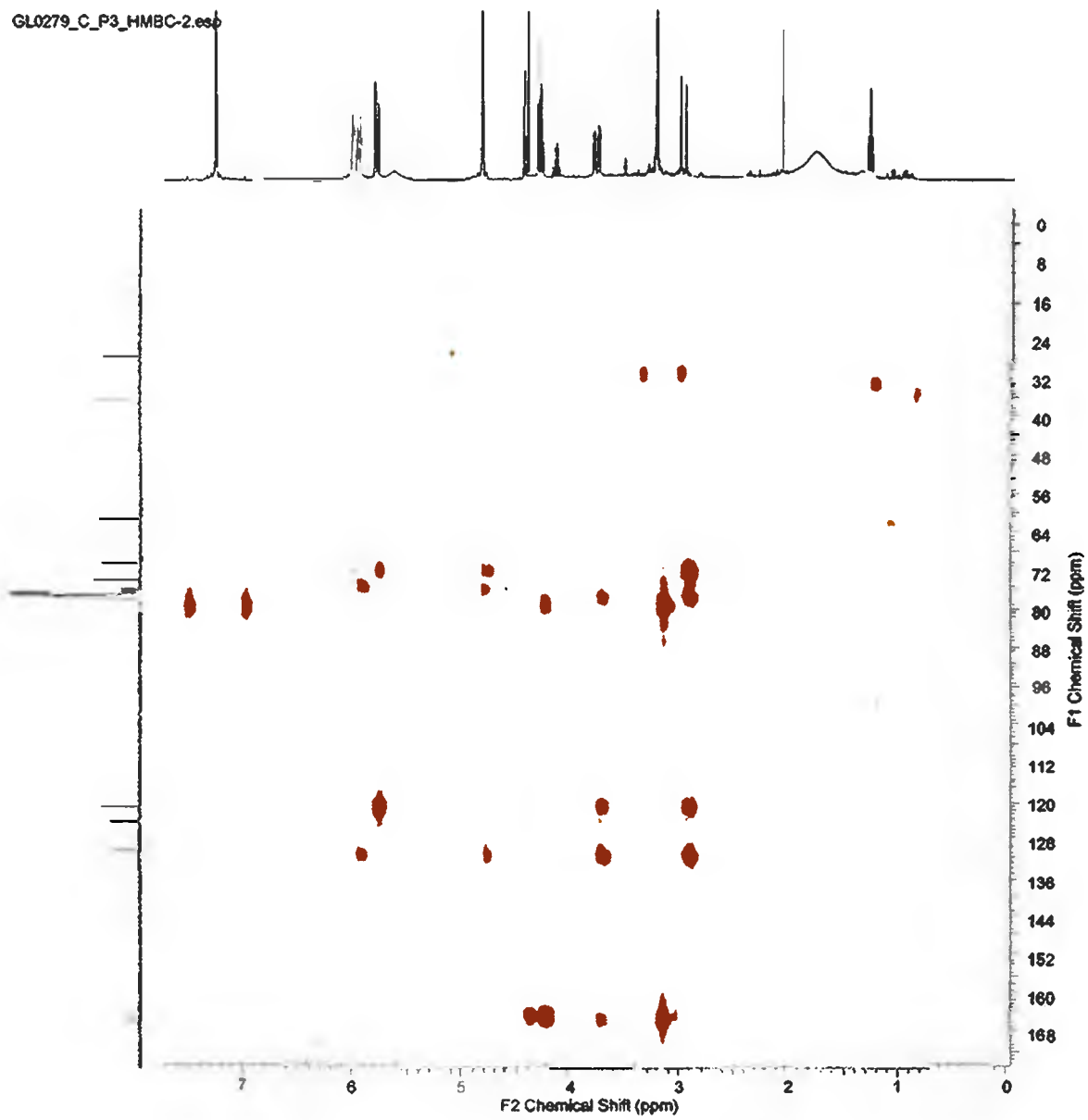
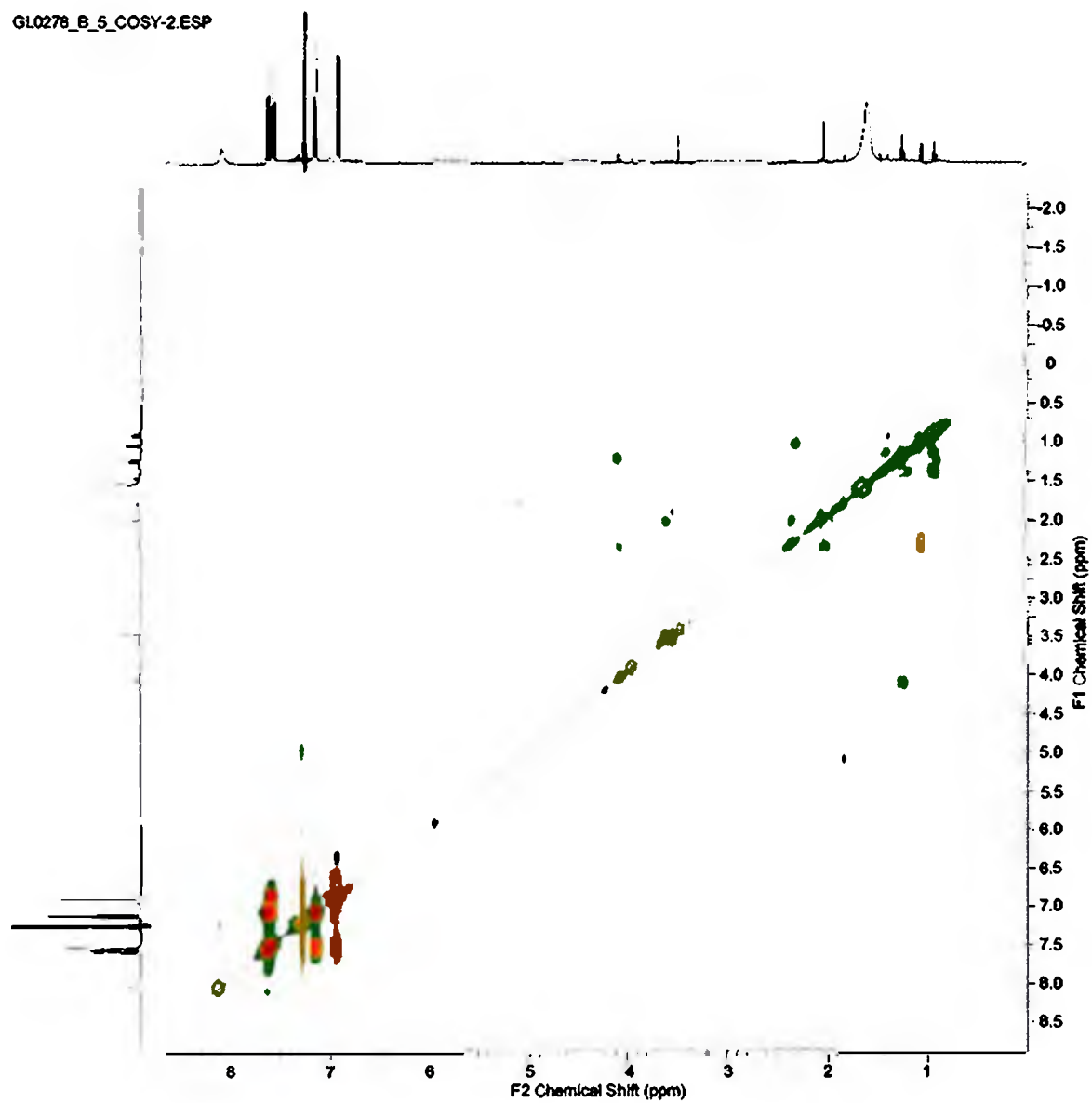


Figura 10.17. HMBC del compuesto 1 en  $\text{CDCl}_3$ .

**Cuadro 10.1.** Asignaciones espectroscópicas del Compuesto 1 en CDCl<sub>3</sub>

No.	HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)		Tipo	COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
	<sup>13</sup> C δ (ppm)	<sup>1</sup> H δ (ppm), Mult.			
1	166.01	-	C, carbonilo	-	10, 3
2	-	-	N	-	-
2'	27.46	3.20, s	CH <sub>3</sub> , N metilo	-	1, 3
3	75.55	-	C, cuaternario	-	3
3'	60.74	(a) 4.41, d (b) 4.26, d	CH <sub>2</sub> , <sup>1</sup> H's diastereotópicos	-	4
4	165.37	-	C, carbonilo	-	3', 5', 10'
5	-	-	N	-	-
5'	69.83	4.81, s	CH	6	6, 7, 9
6	73.15	4.81, s	CH	5', 7	8, 9'
7	130.05	5.99, m	CH	6, 8	5', 9
8	123.27	5.93, m	CH	7, 9	6, 9'
9	120.24	5.78, d	CH	8	5', 7, 10
9'	130.69	-	C, cuaternario	-	6, 8, 10'
10	36.58	(a) 3.74, td (b) 2.95, d	CH <sub>2</sub> , <sup>1</sup> H diastereotópicos	-	1, 5', 9
10'	Debajo del pico de CDCl <sub>3</sub>	-	C, cuaternario	-	4, 5', 9'

**Compuesto 3***(Isatín)***Figura 10.18.** COSY del compuesto 3 en  $\text{CDCl}_3$ .

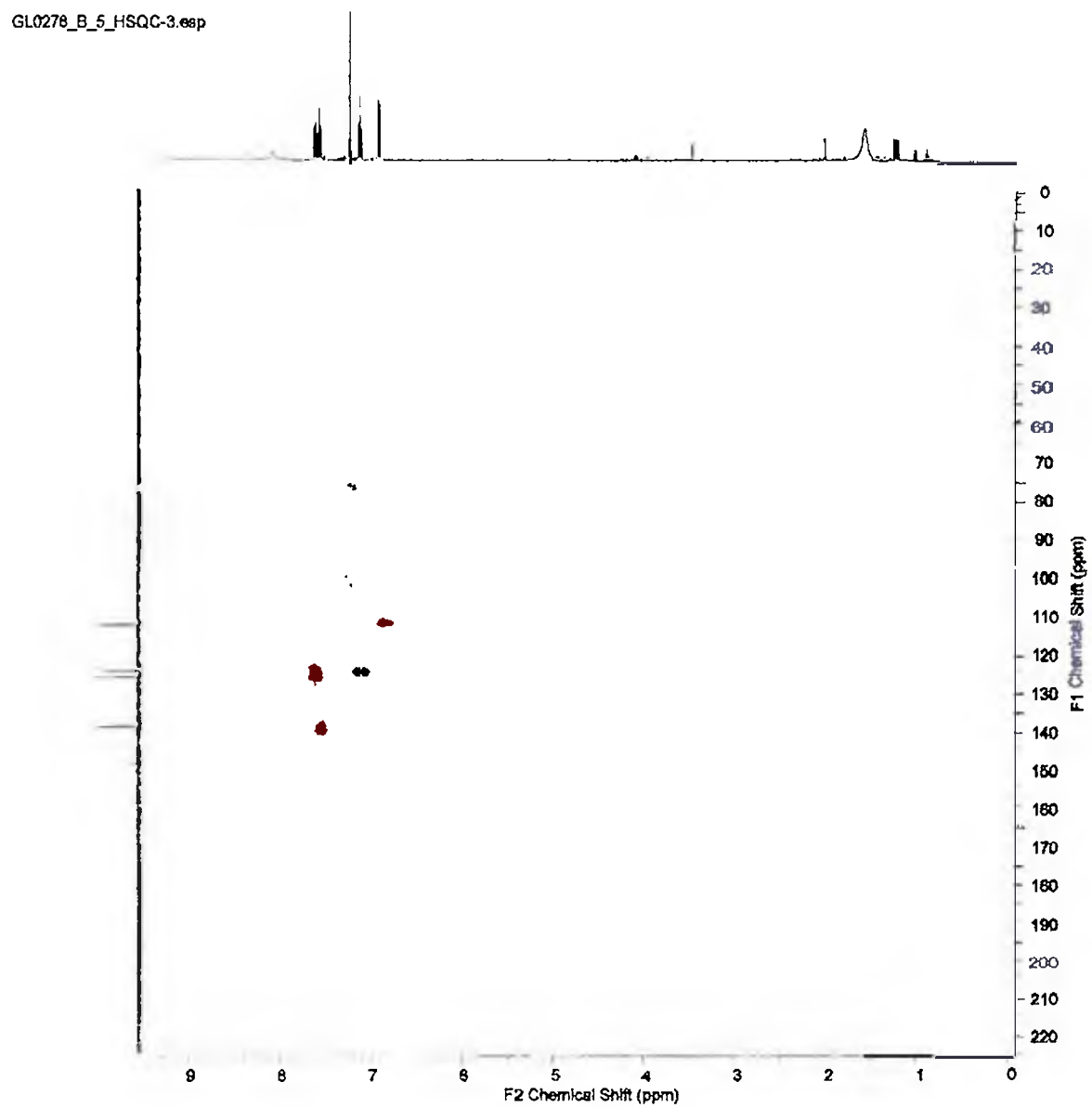
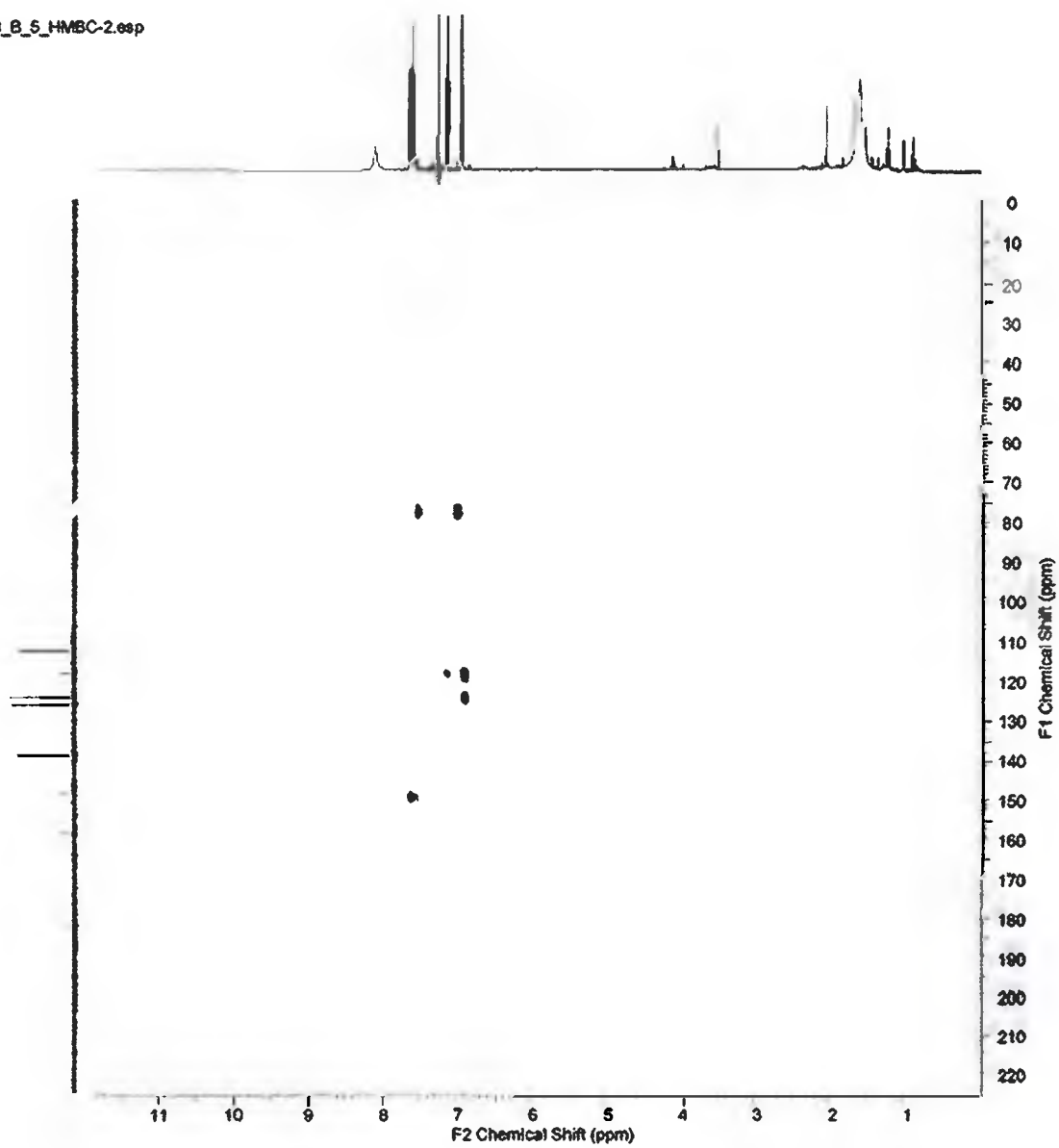


Figura 10.19. HSQC del compuesto 3 en  $\text{CDCl}_3$ .

GL0278\_B\_5\_HMBC-2.eep

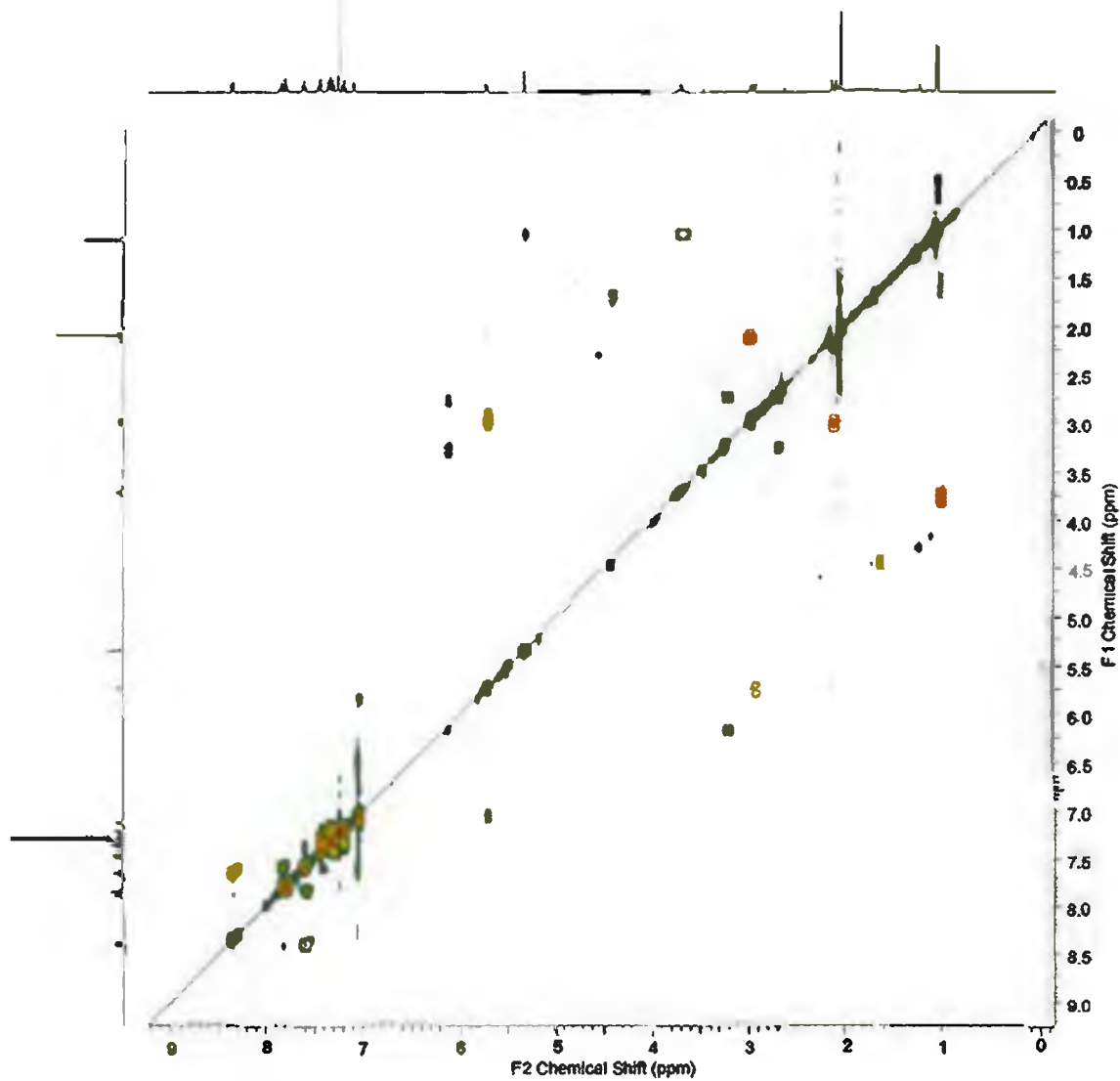
**Figura 10.20.** HMBC del compuesto 3 en CDCl<sub>3</sub>.

**Cuadro 10.2.** Asignaciones espectroscópicas de RMN del compuesto **3** en CDCl<sub>3</sub>

No.	HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)		Tipo	COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
	<sup>13</sup> C δ (ppm)	<sup>1</sup> H δ (ppm), Mult.			
1	159.01	-	C, carbonilo	-	-
2	182.75	-	C, carbonilo	-	4
3	118.18	-	C, aril	-	5, 7
4	125.86	7.63, d	CH, aril	5	2, 6, 8
5	124.05	7.13, t	CH, aril	4, 6	3, 7
6	138.64	7.55, t	CH, aril	5, 7	4, 8
7	112.21	6.92, d	CH, aril	6	5, 3
8	148.98	-	C, aril	-	4, 6
9	-	8.09	NH	-	-

**Compuesto 4**  
*(Fumiquinolona C)*

GL0278 MS (1) C P5gCOSY-2.jdt



**Figura 10.21.** COSY del compuesto 4 en  $\text{CDCl}_3$ .

GL0278 MS (1) C P5 GHSQC-4.ESP

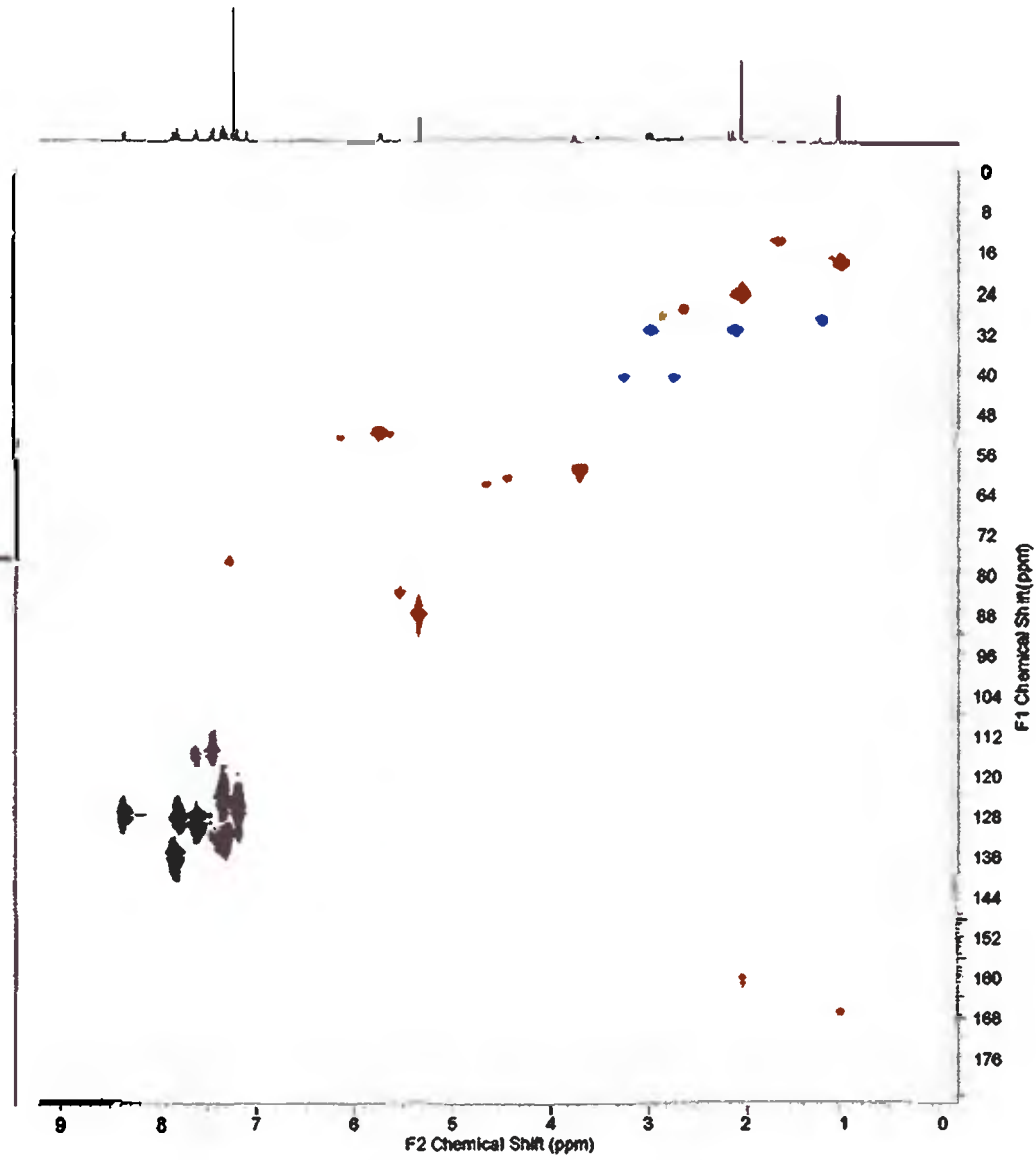


Figura 10.22. HSQC del compuesto 4 en  $\text{CDCl}_3$ .

GL0278 MS (1) C PS gHMBC-2.eep

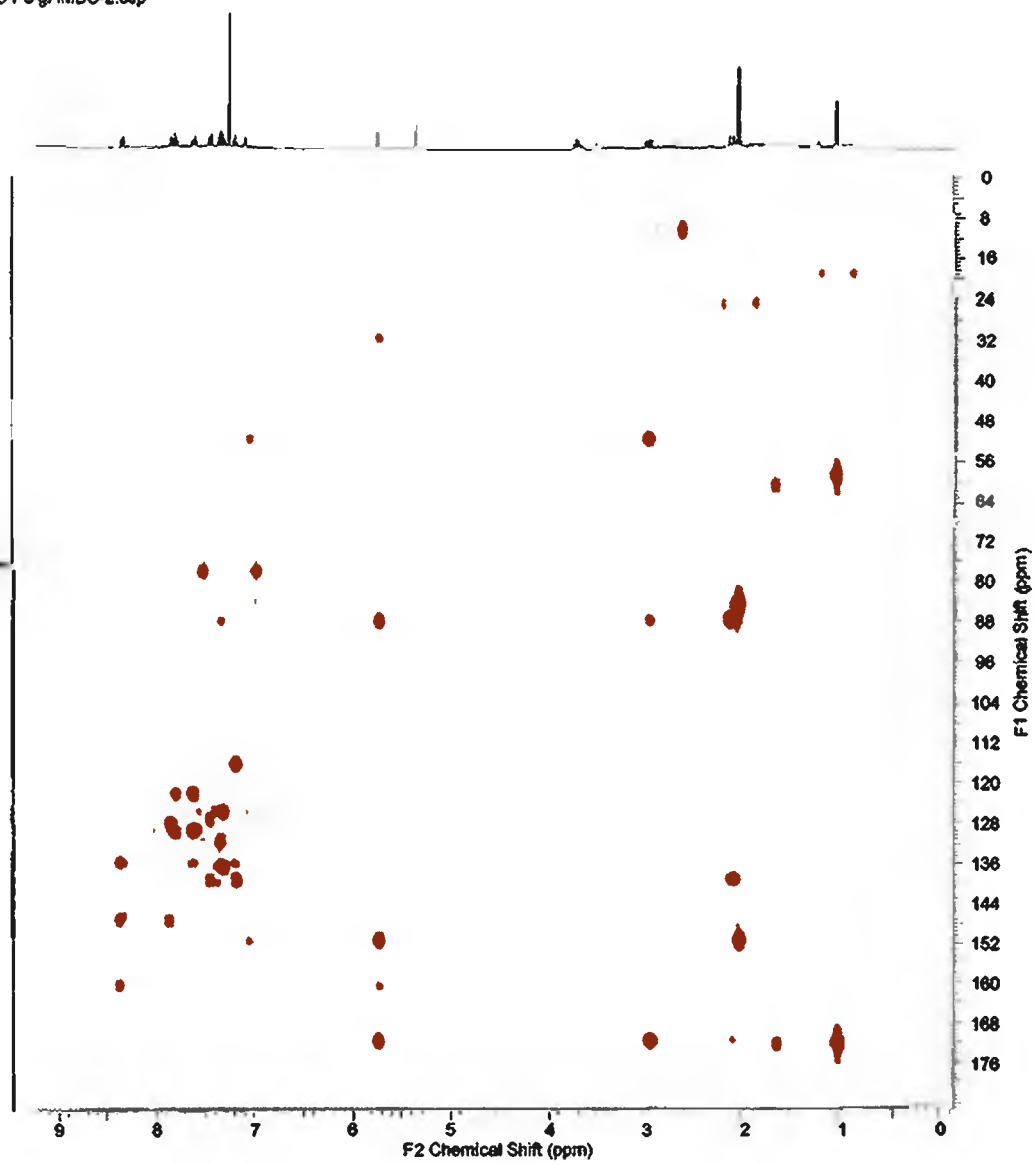


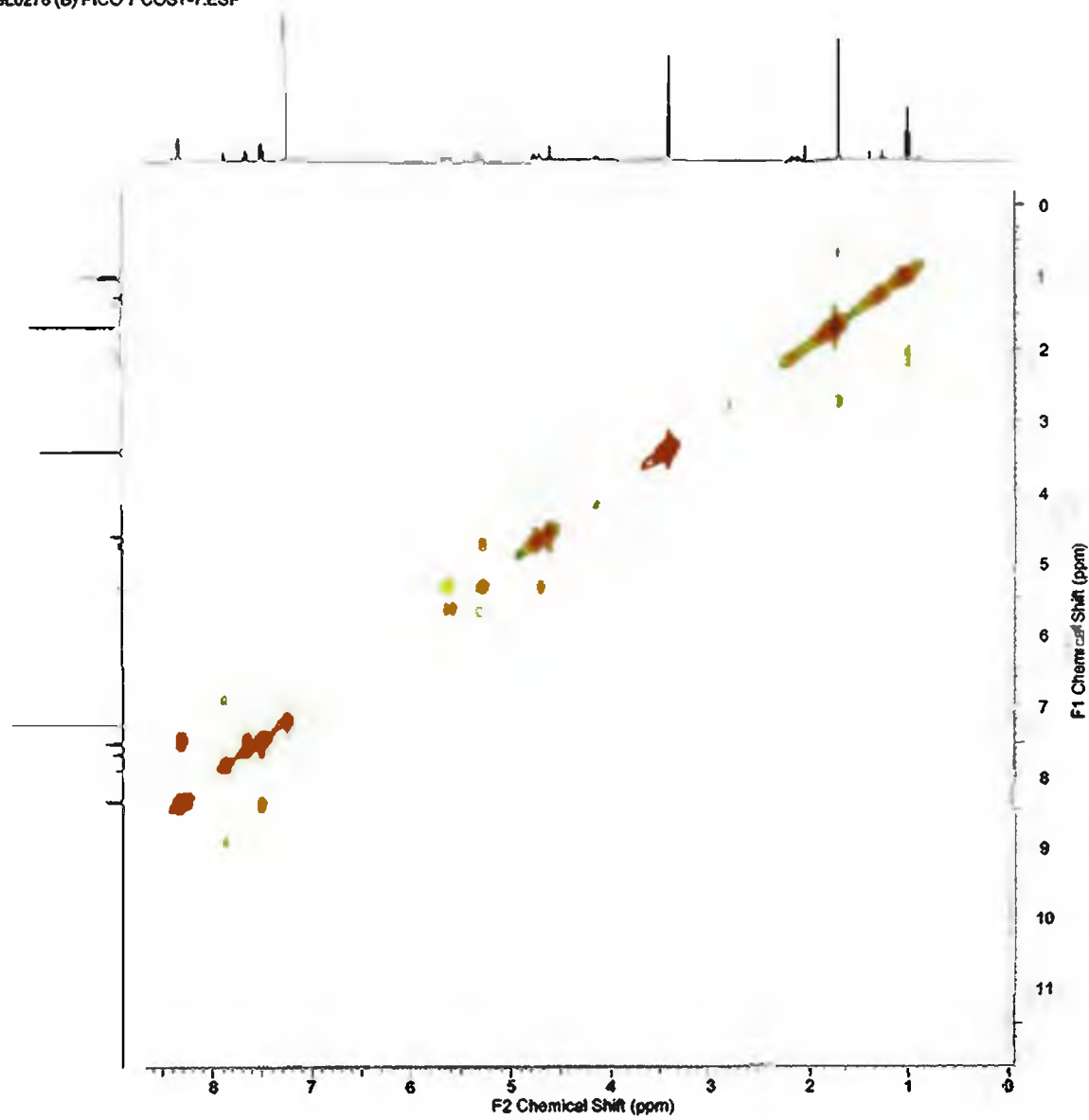
Figura 10.23. HMBC del compuesto 4 en  $\text{CDCl}_3$ .

**Cuadro 10.3.** Asignaciones espectroscópicas de RMN del compuesto 4 en CDCl<sub>3</sub>.

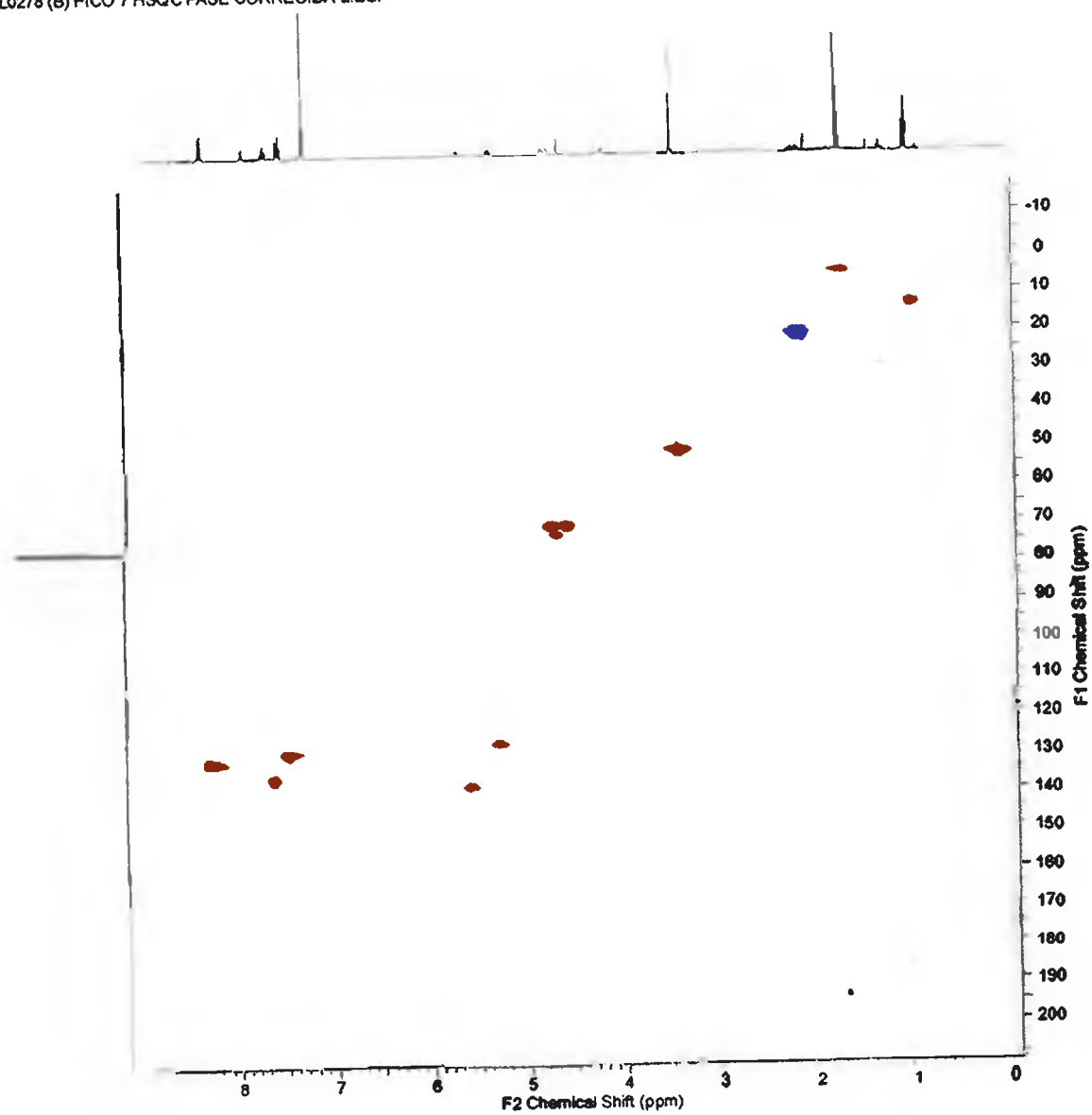
No.	HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)		Tipo	COSY ( <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H)	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)
	<sup>13</sup> C δ (ppm)	<sup>1</sup> H δ (ppm), Mult.			
1	170.85	-	C, carbonilo	-	15H
2	-	8.04	NH	-	-
3	84.16	-	C	-	-
4	150.29	-	C	-	14H, 16H
5	-	-	-	-	-
6	146.27	-	C	-	8H, 10H
7	128.44	7.78, d	CH	8	9, 11
8	134.93	7.81, dd	CH	7, 9	6C, 10
9	128.62	7.60, td	CH	10	7, 11C
10	127.02	8.35, dd	CH	9	6C, 8, 12C
11	121.39	-	C	-	7H, 9H,
12	159.48	-	C, carbonilo	-	10H, 14H
13	-	-	-	-	-
14	51.41	5.72, d	CH	15	4C, 12C, 17C
15	31.40	(a) 2.14, d (b) 2.98, dd	CH <sub>2</sub>	14	1C, 18, 28C
16	24.63	2.06	CH <sub>3</sub>	-	4C
17	87.02	-	C	-	14H, 27H
18	87.16	5.34	CH	-	15, 20, 21C, 23C, 28C
19	-	-	NH	-	-
20	58.59	3.71	CH	29	18
21	170.28	-	C, carbonilo	-	18H, 29H
22	-	-	-	-	-
23	135.74	-	C	-	18H, 25H, 27H
24	115.46	7.45	CH	25	26, 28C
25	130.26	7.32	CH	24, 26	23C, 27
26	126.18	7.19	CH	26, 27	24, 28C
27	124.85	7.37	CH	26	17C, 23C, 25
28	138.29	-	C	-	18H, 24H, 26H
29	18.71	1.06	CH <sub>3</sub>	20	21C

**Compuesto 5***(Pseurotin A)*

GL0278 (B) PICO 7 COSY-7.ESP

**Figura 10.24.** COSY del compuesto 5 en  $\text{CDCl}_3$ .

GL0278 (B) PICO 7 HSQC FASE CORREGIDA-2.ESP

Figura 10.25. HSQC del compuesto 5 en CDCl<sub>3</sub>.

GL0278 (B) PICO 7 HMBC UNIFICADO-2.ESP

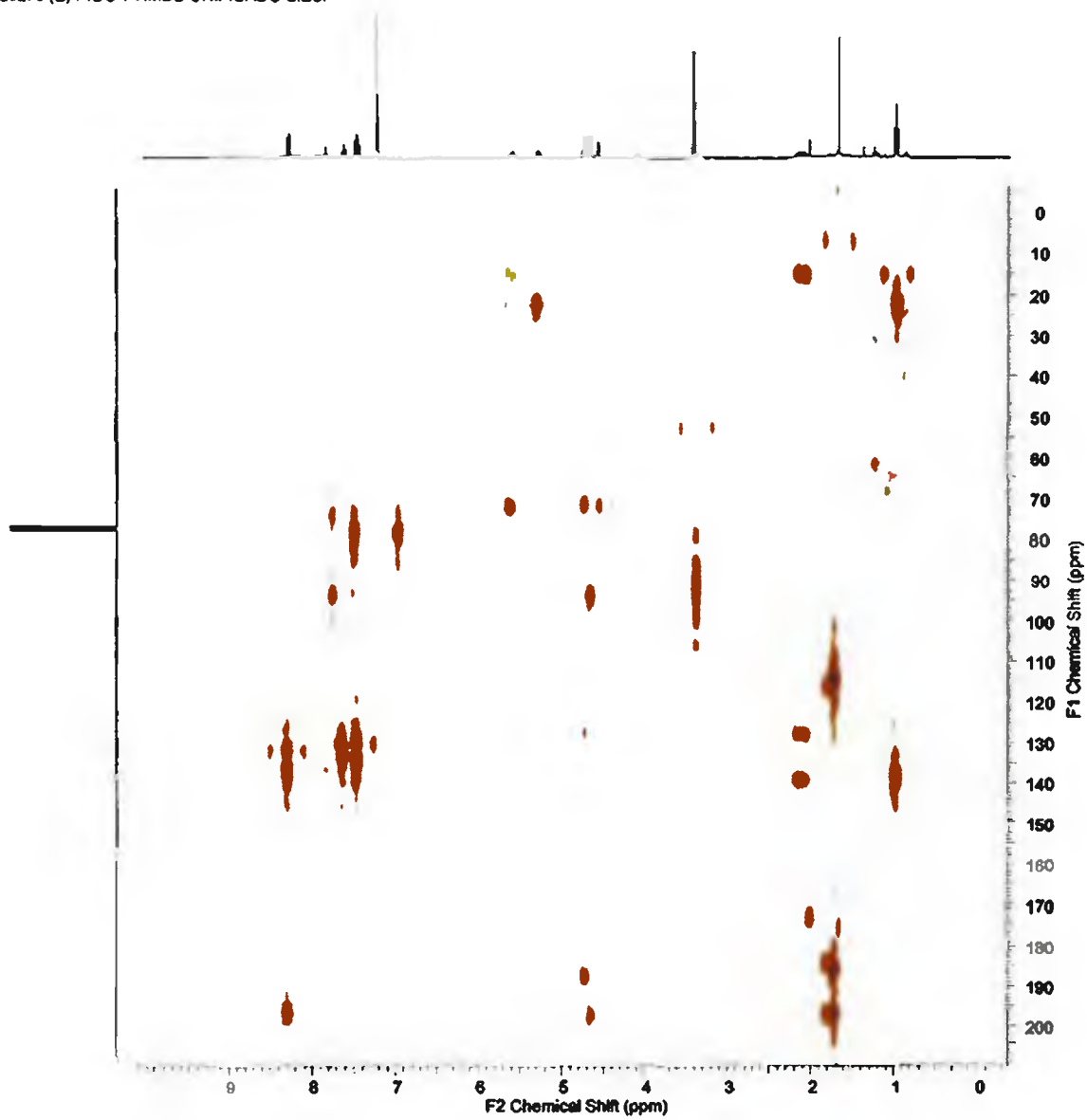


Figura 10.26. HMBC del compuesto 5 en  $\text{CDCl}_3$ .

#### 10.4. Resultados de los bioensayos anticancerígenos y contra enfermedades causadas por parásitos tropicales

**Cuadro 10.4.** Resultados de los bioensayos de los cultivos en medio líquido.

Fracciones	Cultivos Individuales											
	GL0211				GL0271				GL0272			
	M	T	L	C	M	T	L	C	M	T	L	C
<b>Crudo</b>	22.0	0.0	13.4	100	18.8	4.4	0.0	54.2	10.3	0.0	12.5	43.9
<b>(A)</b>	10.4	0.0	11.5	100	15.5	9.9	1.5	100.0	7.5	0.0	2.9	45.5
<b>(B)</b>	6.2	0.0	32.2	100	13.9	11.1	4.1	95.6	9.4	0.0	3.4	64.8
<b>(C)</b>	12.9	0.0	20.3	100	16.4	16.5	47.1	50.3	18.2	0.0	25.0	25.7
<b>(D)</b>	20.0	0.0	21.9	98.5	14.8	13.3	46.5	43.9	16.6	0.0	45.6	38.9
<b>(E)</b>	46.2	0.0	10.8	100	7.3	12.2	6.1	66.7	11.4	0.0	33.7	40.3

GL0211: *Pseudoalteromonas* sp.; GL0271: *A. fumigatus*; GL0272: *E. unguis*

M: Malaria, T: Enfermedad de Chagas, L: Leishmaniasis, C: Cáncer. Expresados en % inhibición de crecimiento para M, T y L; y % de crecimiento para C.

 Activo  Moderadamente activo  Inactivo

Cuadro 10.5. Resultados de los bioensayos de los cocultivos en medio líquido.

Fracciones	Cocultivos															
	GL0278				GL0278-2				GL0279				GL0279-2			
	M	T	L	C	M	T	L	C	M	T	L	C	M	T	L	C
<b>Crudo</b>	NE	33.7	NE	43.8	NE	0.0	NE	50.5	24.6	30.8	46.4	4.3	32.5	0.0	58.7	50.1
<b>(A)</b>	NE	19.7	NE	95.3	NE	8.6	NE	95.0	2.5	0.0	0.0	100	4.4	0.0	0.0	100.0
<b>(B)</b>	NE	22.2	NE	22.7	NE	18.6	NE	74.0	20.1	0.0	22.3	100	9.9	3.0	7.1	100.0
<b>(C)</b>	NE	30.3	NE	23.2	NE	18.4	NE	42.7	36.7	79.5	78.3	2.1	20.8	7.8	63.2	38.4
<b>(D)</b>	NE	0.0	NE	45.1	NE	16.7	NE	49.0	58.4	7.7	63.5	9.1	36.6	4.4	41.7	59.7
<b>(E)</b>	NE	0.0	NE	92.7	NE	7.7	NE	90.8	20.7	6.7	22.3	100	4.4	0.0	4.9	96.1
<b>(F)</b>	NE	0.0	NE	98.4	NE	1.6	NE	90.6	23.7	2.0	8.4	90.5	5.6	3.0	0.0	86.3

GL0278: *Pseudoalteromonas* sp. vs *A. fumigatus*; GL0279: *Pseudoalteromonas* sp. vs *E. unguis*.

M: Malaria, T: Enfermedad de Chagas, L: Leishmaniasis, C: Cáncer. Expresados en % inhibición de crecimiento para M, T y L; y % de crecimiento para C.

Activo
  Moderadamente activo
  Inactivo




NE: No ensayado

**Cuadro 10.6.** Resultados de los bioensayos de los cultivos en medio sólido.

Fracciones	Cultivos Individuales							
	GL0211 MS				GL0271 MS			
	M	T	L	C	M	T	L	C
<b>Crudo</b>	22.6	0.0	0.0	98.3	22.0	0.0	13.4	100
<b>(A)</b>	12.1	0.3	1.9	98.0	10.4	0.0	11.5	100
<b>(B)</b>	11.0	0.0	0.0	100.0	6.2	0.0	32.2	100
<b>(C)</b>	19.5	0.6	5.2	95.6	12.9	0.0	20.3	100
<b>(D)</b>	14.8	0.0	18.7	95.2	20.0	0.0	21.9	98.5
<b>(E)</b>	11.4	0.0	7.9	100.0	46.2	0.0	10.8	100
<b>(F)</b>	4.5	7.5	8.4	99.8	32.0	0.0	24.0	100

GL0211 MS: *Pseudoalteromonas* sp.; GL0271 MS: *A. fumigatus*.

M: Malaria, T: Enfermedad de Chagas, L: Leishmaniasis, C: Cáncer. Expresados en % inhibición de crecimiento para M, T y L; y % de crecimiento para C.

 Activo
  Moderadamente activo
  Inactivo

Cuadro 10.7. Resultados de los bioensayos de los cocultivos en medio sólido.

Fracciones	Cocultivos															
	GL0278 MS 1				GL0278 MS 2				GL0278 MS 3				GL0278 MS 4			
	M	T	L	C	M	T	L	C	M	T	L	C	M	T	L	C
Crudo	34.5	0.0	5.3	61.6	11.0	10.8	0.0	58.3	32.8	0.0	6.8	47.7	13.7	10.8	0.0	47.8
(A)	19.8	0.0	0.4	106.9	5.7	6.0	0.0	94.6	17.8	0.0	10.6	92.4	15.4	0.0	0.0	100.0
(B)	12.3	0.0	1.2	69.6	4.6	1.5	0.0	100.0	10.0	0.1	5.6	93.4	11.8	1.5	0.0	99.5
(C)	36.4	2.16	19.5	35.5	13.2	11.9	9.9	53.0	35.9	1.3	38.4	24.5	39.9	3.7	56.7	40.6
(D)	44.5	6.86	55.0	6.0	23.8	13.9	43.9	57.0	37.5	0.0	12.5	61.5	25	4.1	45.5	59.4
(E)	8.0	3.82	9.5	72.0	4.9	0.0	1.7	99.0	7.3	0.6	2.5	64.9	19	7.6	2.3	100.0
(F)	21.9	0.3	3.6	85.1	1.2	1.4	0.0	98.5	8.3	2.1	2.0	90.4	1.7	0.2	0.0	96.1

GL0278 MS 1-4: *Pseudoalteromonas* sp. vs. *A. fumigatus*

M: Malaria, T: Enfermedad de Chagas, L: Leishmaniasis, C: Cáncer. Expresados en % inhibición de crecimiento para M, T y L; y % de crecimiento para C.

 Activo  Moderadamente activo  Inactivo