



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TITULACIÓN DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

Cuantificación de la producción de metabolitos secundarios de *Streptomyces* sp., bajo estrés inducido por peróxido de hidrógeno, mediante HPLC-DAD.

TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

AUTOR: Romero Luzuriaga, Daniela Cecibel

DIRECTOR: Cartuche Flores, Luis Emilio, M. Sc.

LOJA-ECUADOR

2014

APROBACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO DE FIN DE TITULACIÓN

Magíster.

Luis Emilio Cartuche Flores.

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de fin de titulación “**Cuantificación de la producción de metabolitos secundarios de *Streptomyces sp.*, bajo estrés inducido por peróxido de hidrógeno, mediante HPLC-DAD**” realizado por Romero Luzuriaga, Daniela Cecibel; ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, septiembre de 2014

f)

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Daniela Cecibel Romero Luzuriaga declaro ser autora del presente trabajo de fin de titulación: **Cuantificación de la producción de metabolitos secundarios de *Streptomyces sp.*, bajo estrés inducido por peróxido de hidrógeno, mediante HPLC-DAD**, siendo Luis Emilio Cartuche Flores director del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del art. 67 del estatuto orgánico de la universidad técnica particular de loja que en su parte pertinente textualmente dice: “forman parte del patrimonio de la universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la universidad”

f.

Romero Luzuriaga, Daniela Cecibel

Cédula 110468980-5

DEDICATORIA

A Dios, indudable fuente de amor y sabiduría.

A mi padre, que ha sido un apoyo incondicional durante toda mi vida y me ha llenado de coraje y valor para superar cualquier obstáculo.

A mi madre, cuyo vivir me ha mostrado que el camino hacia la meta se lo traza derribando mis propios miedos.

A mis hermanos, quienes nunca bajaron los brazos para que yo tampoco lo haga, aún cuando todo se complicaba.

Al M. Sc. Luis Cartuche, por la dirección de este trabajo de tesis, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible cumplir este gran sueño.

A mis amigos incondicionales que han sabido acompañarme en los logros alcanzados y los momentos difíciles.

A mis familiares, viejos amigos y a las personas que se han sumado a mi vida, los cuales han marcado un recuerdo importante contribuyendo de alguna forma a forjar mis anhelos de superación.

AGRADECIMIENTOS

Al creador de todas las cosas, que me ha brindado fortaleza para continuar cuando más lo he necesitado; dedico primeramente mi trabajo a Dios por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.

Por la confianza y el apoyo brindado por mis Padres, quienes con dedicación y esfuerzo han sabido apoyarme y guiarme durante todo mi trayecto estudiantil, ideando este arduo camino para convertirme en una profesional, mil palabras no bastarían para agradecerles su sustento, comprensión y sus consejos en los momentos difíciles.

Mi más profundo y sincero agradecimiento al M. Sc. Luis Cartuche, director de la presente investigación, por la orientación, el seguimiento y la supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por la motivación y el apoyo incondicional que he recibido durante este tiempo.

Un agradecimiento muy especial merece la comprensión, paciencia y el ánimo recibidos de mi familia y amigos.

A todos ustedes, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	5
1.1. Actinomicetos.....	6
1.1.1. Conceptos generales.....	6
1.1.2. Características.....	6
1.1.3. Condiciones de crecimiento	7
1.1.4. El género <i>Streptomyces</i>	8
1.2. Metabolitos secundarios producidos por actinomicetos.....	9
1.2.1. Antibióticos	9
1.2.2. Agentes antitumorales.....	13
1.2.3. Agentes Inmunosupresores.....	14
1.3. Métodos 1.3. Métodos de separación y análisis cromatográficos.....	15
1.3.1. Cromatografía de filtración en gel (exclusión por tamaño).....	15
1.3.1.1. Principio	16
1.3.1.2. Factores que influyen en la separación	17
1.3.2. Cromatografía en capa fina (TLC).....	17
1.3.2.1. Principio	17
1.3.2.2. Factor de retención	18
1.3.2.3. Factores que influyen en una separación por cromatografía de capa fina.....	18

1.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	19
1.3.3.1. Principio	19
1.3.3.2. Columnas cromatográficas	20
1.3.3.3. Inyector	20
1.3.3.4. Bombas.....	21
1.3.3.5. Detector	21
1.3.3.6. Disolventes empleados.....	22
1.3.3.7. Condiciones de elución.....	22
1.3.3.8. Parámetros que influyen en la separación de los compuestos mediante HPLC ..	23
1.3.3.9. Configuración de la columna	23
1.4. Condiciones de fermentación de microorganismos marinos para producción metabólica	24
1.4.1. Medio acuoso	24
1.4.2. Temperatura de crecimiento.....	24
1.4.3. Acidez.....	24
1.4.4. Presión parcial de oxígeno	25
1.4.5. Estrés oxidativo	25
1.4.5.1. Peróxido de hidrógeno.....	26
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.1. Cepa de interés.....	28
2.2. Monitoreo de la actividad biológica	28
2.3. Cultivo y obtención del extracto.....	28
2.3.1. Reactivación de la cepa	28
2.3.2. Escalado del cultivo en medio A1 y obtención del extracto crudo.....	29
2.4. Aislamiento de metabolitos secundarios.....	29
2.4.1. Tratamiento del extracto crudo.....	29
2.4.2. Fraccionamiento en columna en gel de filtración	29
2.5. Inducción de estrés oxidativo mediante adición de H ₂ O ₂ en el medio de fermentación ...	30
2.5.1. Cuantificación de biomasa mediante peso seco	30
2.5.2. Cuantificación de la producción de metabolitos secundarios.....	31
2.5.3. Toxicidad con peróxido de hidrógeno.....	32
2.5.4. Cuantificación de biomasa durante la inducción de estrés oxidativo por H ₂ O ₂	32

2.5.5. Cuantificación de la producción de metabolitos mediante inducción de estrés oxidativo por H ₂ O ₂	32
2.6. Evaluación de la actividad antibacteriana	33
2.6.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	33
2.7. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	33
2.8. Análisis de resultados	34
2.8.1. Matemática del crecimiento exponencial.....	34
2.8.2. Velocidad volumétrica de producción de metabolitos secundarios y biomasa por peso seco	35
2.8.3. Velocidad específica de biomasa por el método de peso seco.....	35
2.8.4. Prueba T Student para muestras relacionadas	36
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
3.1. Obtención del extracto y fraccionamiento	38
3.1.1. Características de <i>Streptomyces</i>	38
3.1.2. Extracto en acetato de etilo	38
3.2. Fraccionamiento del extracto crudo	39
3.3. Inducción de estrés oxidativo mediante adición de H ₂ O ₂ en el medio de fermentación ...	42
3.3.1. Cuantificación de biomasa mediante peso seco y producción metabólica	42
3.3.2. Velocidad de producción de biomasa y metabolitos secundarios en el <i>Streptomyces</i> sp.....	44
3.3.2.1. Velocidad volumétrica de la producción de biomasa por peso seco	44
3.3.2.2. Velocidad volumétrica de la producción de metabolitos secundarios.....	45
3.3.2.3. Velocidad específica de producción de biomasa	46
3.3.3. Tiempo de generación	47
3.3.4. Prueba de Toxicidad con Peróxido de Hidrógeno	48
3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	50
3.5. Cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución	52
CONCLUSIONES.....	60
RECOMENDACIONES	62
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	68

ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO PARA ACTINOMICETOS SUPLEMENTADOS CON AGUA DE MAR ARTIFICIAL.....	69
ANEXO 2. VOLÚMENES APROXIMADOS PARA HIDRATAR SEPHADEX LH-20 EMPACADO CON DIFERENTES DISOLVENTES.....	71
ANEXO 3. FORMULACIÓN DE TRES MÉTODOS DIFERENTES A DISTINTOS PARÁMETROS DE ELUCIÓN PARA CUANTIFICAR LA PRESENCIA DE METABOLITOS PRESENTES EN <i>Streptomyces</i>	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de las columnas cromatográficas usadas en HPLC	20
Tabla 2. Comparación de los detectores usados en HPLC	21
Tabla 3. Longitudes de onda de corte en el UV de disolventes usados en HPLC	22
Tabla 4. Características físico químicas del extracto crudo MJG-3.....	38
Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del extracto diluido y el peso total obtenido	40
Tabla 6. Fraccionamiento cromatográfico a partir de la fracción F2 (segundo fraccionamiento)	41
Tabla 7. Datos correspondientes a la cuantificación de la producción de metabolitos secundarios (g/L de cultivo bacteriano) y a la variación de pH durante 6 días	43
Tabla 8. Biomasa mediante peso seco de los datos correspondientes al periodo exponencial	47
Tabla 9. Actividad inhibitoria del extracto total y sus fracciones frente a <i>Enterococcus faecalis</i>	50
Tabla 10. Actividad inhibitoria de las fracciones resultantes del fraccionamiento de F2 frente a <i>Enterococcus faecalis</i>	51
Tabla 11. Extractos empleados para la separación y cuantificación de metabolitos (1mg de extracto en 1mL de metanol grado HPLC)	52
Tabla 12. Condiciones de separación empleadas en el método denominado “Genérico_ <i>Streptomyces</i> ” utilizado para análisis por HPLC.....	53
Tabla 13. Características de los picos cromatográficos obtenidos del extracto total	55
Tabla 14. Características de los picos cromatográficos obtenidos de la fracción activa F.56	
Tabla 15. Características de los picos cromatográficos obtenidos de la subfracción E	57
Tabla 16. Características de los picos cromatográficos obtenidos de la subfracción F	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones evolutivas del orden <i>Actinonmyceta</i> l	7
Figura 2. Micelio aéreo de <i>Streptomyces</i> sp. visto en microscopio de contraste de fases (1000x).....	8
Figura 3. Columna de cromatografía de filtración en gel.....	16
Figura 4. Desplazamiento y separación de los componentes de una mezcla a través de la placa	18
Figura 5. Partes fundamentales de las que se compone un HPLC	19
Figura 6. Proceso de gravimetría a través de centrifugación	31
Figura 7. Proceso de extracción de metabolitos secundarios	32
Figura 8. Morfología de <i>Streptomyces</i> sp. en medio ácido Gauze (izquierda), donde se observa un aspecto algodonoso debido a la formación de micelio aéreo. A la derecha, cultivo de <i>Streptomyces</i> sp. en medio A1, donde se observa la producción de metabolitos excretado	38
Figura 9. CCF en CHCl ₃ :MeOH 9:1 (v/v), de la corrida cromatográfica en Sephadex del extracto AcOEt. Se muestran únicamente las placas reveladas con Óleum. A) fracciones 1-8. B) fracciones 9-17. C) fracciones 18-26.	39
Figura 10. CCF en CHCl ₃ :MeOH 9:1 (v/v), de la corrida cromatográfica en Sephadex de la Fracción F2. Se muestra el conjunto de fracciones reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica. A) CCF revelada con Óleum. B) UV 254 nm. C) UV 365 nm.	41
Figura 11. Producción de biomasa y metabolitos secundarios por <i>Streptomyces</i> sp., medida durante un lapso de 6 días.	43
Figura 12. Velocidad volumétrica g/Lh del contenido de biomasa de <i>Streptomyces</i>	45
Figura 13. Velocidad volumétrica g/Lh del contenido de metabolitos secundarios de <i>Streptomyces</i> sp.	46
Figura 14. Velocidad específica de producción de biomasa (h ⁻¹) para un cultivo de 7 días de <i>Streptomyces</i> sp.	47
Figura 15. Datos de biomasa por peso seco (g/L) proporcionados a partir del tratamiento con H ₂ O ₂ (100 mM, 50 mM y 10 mM) y cultivos en condiciones normales (BM).....	49

Figura 16. Comparación de las medidas de biomasa mediante peso seco, obtenidos a partir del ensayo de toxicidad.....	50
Figura 17. Perfil cromatográfico del extracto total del cultivo <i>Streptomyces</i> sp.....	54
Figura 18. Espectros UV del pico 1 encontrados a diferentes longitudes de onda	55
Figura 19. Perfil cromatográfico de la fracción F2 obtenida a partir del extracto total del cultivo <i>Streptomyces</i>	56
Figura 20. Perfil cromatográfico de la subfracción E obtenida a partir de la fracción F2 (extracto total).....	57
Figura 21. Perfil cromatográfico de la subfracción F obtenida a partir de la fracción F2 (extracto total).....	58
Figura 22. Espectro UV del pico de interés de la fracción F.....	59

RESUMEN

Del cultivo de *Streptomyces*, mediante maceración en AcOEt y extracción con Amberlite® XAD-7HP se obtuvo un extracto con rendimiento del 0,05%, el cual se fraccionó por cromatografía en Sephadex LH-20 empleando dos mezclas de disolventes diferentes. Se evaluaron parámetros cinéticos: velocidad volumétrica y específica de crecimiento (μ_{max}) alcanzan su máximo valor a las 48 horas, mientras que a las 96 horas consigue la máxima producción metabólica con un tiempo de generación lento de 51 horas. En la prueba de toxicidad con H₂O₂ no se revelaron diferencias significativas en la producción de biomasa del cultivo, pero si una reducción drástica en la producción de metabolitos secundarios. El extracto total presentó una fuerte actividad frente a *E. faecalis* (CMI 0,78 μ g/mL), así como la fracción F2 (CMI 0,19 μ g/mL). Se estableció un método fácil para detectar cuantitativamente los metabolitos presentes en el extracto total y las fracciones de interés de *Streptomyces* mediante HPLC-DAD, la eficiencia del método permitió obtener picos definidos a diferentes tiempos de retención.

PALABRAS CLAVES: Actinomicetos marinos, *Streptomyces*, metabolitos secundarios, cinética de crecimiento, estrés oxidativo.

ABSTRACT

The cultivation of *Streptomyces* through maceration in AcOEt and Amberlite® XAD-7HP obtained with a performance of 0.05%, which was fractionated by chromatography on Sephadex LH-20 using two different mixtures of solvents. Kinetic parameters were evaluated: volumetric speed and specific growth (μ_{max}) reaches its maximum value at 48 hours, while 96 hours get maximum metabolic production with a slow generation time of 51 hours. In the toxicity test with H₂O₂ wasn't revealed significant differences in biomass production of the culture, but there was a drastic decrease in the production of secondary metabolites. The total extract showed important activity against *E. faecalis* (CMI 0,78 μ g/mL), as well the F2 fraction (CMI 0,19 μ g/mL). It established an easy method to quantitatively detect metabolites present in the extracts and fractions of interest of *Streptomyces* by HPLC-DAD, the efficiency of this method allowed to obtain defined peaks at different retention times.

KEYWORDS: Marine Actinomycetes, *Streptomyces*, secondary metabolites, growth kinetics, oxidative stress.

INTRODUCCIÓN

Muchos de los procesos biológicos necesarios para la vida misma son realizados por los microorganismos siendo útiles en el desarrollo de productos alimenticios y, de manera importante, en la producción de metabolitos con aplicación biológica (Maier, 2000).

Se han realizado extensas investigaciones para preseleccionar microorganismos capaces de producir sustancias con actividad biológica, especialmente con hongos y actinomicetos, con la finalidad de detectar candidatos productores de nuevos fármacos que ayuden a controlar las enfermedades emergentes y reemergentes de este nuevo siglo (Dreyfus, & Chapela, 1994).

La mayoría de los antibióticos en uso hoy en día son derivados de productos naturales de actinomicetos y hongos (Newman, 2007). Los antibióticos producidos por actinomicetos y otros microorganismos han ido evolucionando hace millones de años y su actividad ha sido probada contra los microorganismos sobre la base de su capacidad para inhibir enzimas diana y macromoléculas. Los actinomicetos pueden aislarse de ambientes terrestres y marinos, siendo los actinomicetos de origen terrestre en las últimas cinco décadas, los que han servido a la industria farmacéutica para el descubrimiento de compuestos biológicamente activos; pero el radio de descubrimiento de nuevas entidades químicas ha disminuido considerablemente, haciendo de la exploración en suelos ineficiente (Baltz, 2005). Los actinomicetos conocidos como bacterias filamentosas con su característico olor a tierra corresponden al grupo más estudiado en el ámbito de los productos con actividad antimicrobiana; tradicionalmente fueron aisladas de fuentes terrestres y sólo en las dos últimas décadas llegó a ser evidente el potencial de microorganismos marinos como productores de antibióticos con estructuras únicas y características muy propias del ambiente marino (Maldonado, et al., 2005); dentro de los cuales se encuentran los antibióticos, anticancerígenos, anticoagulantes, agentes inmunomoduladores, agentes antifúngicos, etc. (Mincer, et al., 2002). En el caso de los actinomicetos, es ampliamente reconocida la capacidad que tienen de producir una gama muy variada de metabolitos secundarios (Baltz & Hosted, 1996).

En la presente investigación se evaluaron diferentes condiciones cromatográficas mediante la técnica de HPLC-DAD, para la puesta a punto de un método genérico, reproducible, para una separación eficiente de los metabolitos presentes en extractos obtenidos a partir de cultivos de *Streptomyces* sp., y que sirva de base para la evaluación de nuevos extractos obtenidos de cultivos o de fracciones que por su actividad biológica resulten de interés, dicho método permitió

realizar un estudio de carácter cuantitativo separando mezclas complejas de los compuestos presentes, permite además medir la cantidad de analitos presentes a través de la normalidad del área, sin embargo no permitió realizar un estudio cualitativo en cuanto a la identidad de los analitos, debido a la presencia de más de un compuesto en los picos resultantes (espectro UV). El extracto seco se obtuvo mediante maceración con acetato de etilo y resina estéril Amberlite® XAD- 7HP por medio del proceso de fermentación a partir de la cepa bacteriana *Streptomyces* sp. (MJG-3). El fraccionamiento del extracto se realizó en columna de filtración y separación por tamaño molecular en gel Sephadex® LH-20 utilizando como fase móvil los solventes Cloroformo:Metanol y diferencias de polaridad al incluir Hexano en la mezcla de elución. Se determinaron tres parámetros cinéticos a partir del cultivo líquido de *Streptomyces* para determinar el comportamiento de la población bacteriana y de células individuales: velocidad volumétrica (g/Lh) y velocidad específica máxima (h^{-1}) de producción de biomasa, velocidad volumétrica (g/Lh) de la producción metabólica a diferentes horas de cultivo; y, tiempo de generación de la población celular durante su periodo exponencial. El ensayo de toxicidad se realizó adicionando las dosis propuestas de peróxido de hidrógeno (100 mM, 50 mM y 10 mM) a los cultivos de 48 horas, midiendo el contenido de biomasa y producción metabólica (g/L) a las 72, 96, 120 y 144 horas de cultivo. La determinación de la actividad antibacteriana del extracto y de las fracciones de interés se realizó por el método de Microdilución en Caldo utilizando la cepa bacteriana *E. faecalis* (Ef) ATCC®, como microorganismo de prueba.

CAPÍTULO I
MARCO TEÓRICO

1.1. Actinomicetos

1.1.1. Conceptos Generales.

Los actinomicetos son bacterias aeróbicas, Gram positivas, filamentosas y parcialmente ácido resistentes; son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simple, complejo y compuestos moleculares orgánicos como: ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. Utilizan como fuente de nitrógeno: amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas. Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en la mayoría de suelos secos y cálidos donde alcanzan grandes cantidades poblacionales (Uzcátegui et al., 2011). En un principio los actinomicetos se incluyeron entre los hongos porque su morfología y desarrollo presentaban gran similitud, dotados de un micelio verdadero; debido a esto se les denominó “hongos radiados”. Sin embargo, hoy en día, y dado su carácter procariótico, se sustenta muy bien su clasificación como bacterias (Franco, 2009).

1.1.2. Características.

Dentro de sus características específicas, presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina. Adicionalmente, presentan una actividad metabólica alta, produciendo terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares hidrolíticas y ligninolíticas con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal por lo cual son miembros importantes del sistema de descomposición del suelo (Lacaz, Porto, & Martins, 1991), producen compuestos bioactivos, con actividad antagonista contra microorganismos patógenos, siendo los principales productores de antibióticos (Salazar & Ordoñez, 2013).

En la actualidad, los actinomicetos se encuentran incluidos en el dominio bacteria (Figura 1) debido a varias razones: la pared celular está compuesta por peptidoglicano, el diámetro de sus hifas es inferior al de los hongos (0,5 a 2,0 μm), son sensibles a los antimicrobianos pero presentan resistencia a los antifúngicos y la disposición de su material genético es típicamente procariótica (Sylvia, 2005).

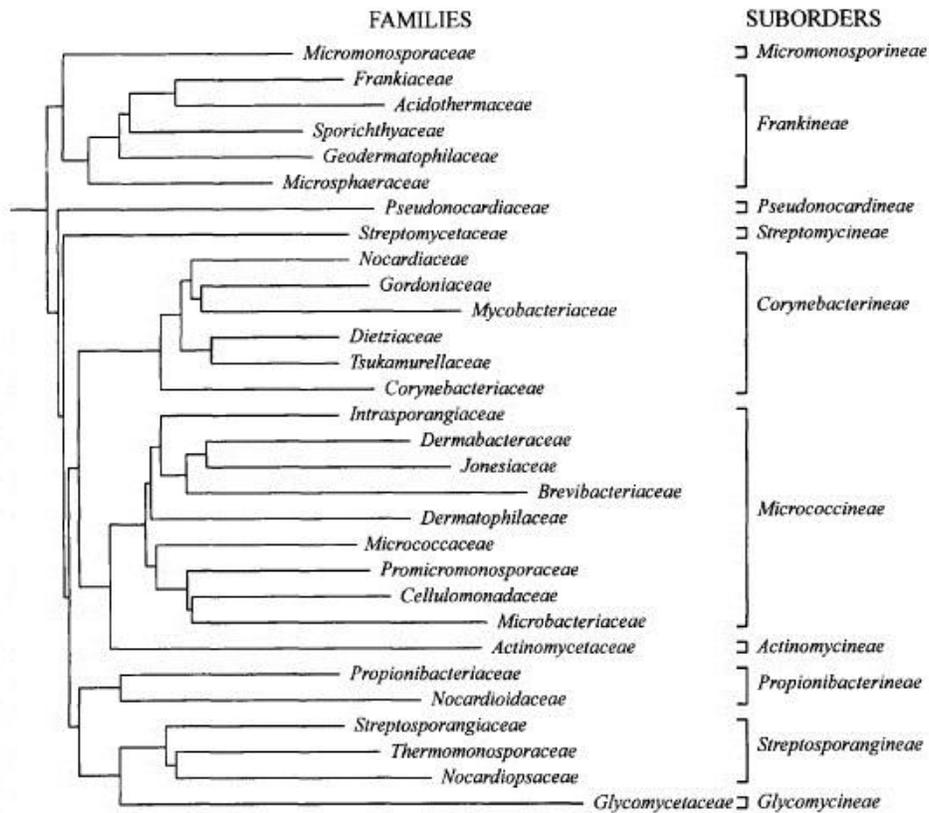


Figura 1. Relaciones evolutivas del orden *Actinomycetales*.
Fuente: (Stackenbrandt et al, 1997).

1.1.3. Condiciones de crecimiento.

La mayoría de los actinomicetos crecen en medios como agar nutritivo, agar tripticasa soja, agar sangre o agar infusión cerebro corazón. Las colonias de algunas especies de *Streptomyces* que crecen en agar nutritivo se observan como colonias duras, brillantes y pálidas, si su crecimiento se da en medio de sales inorgánicas con almidón pueden presentarse como colonias amarillas brillantes con micelio aéreo pulverulento blanco (Bergey, Hendricks, & Holt, 2000).

El crecimiento de las colonias de actinomicetos en medio sólido se puede ver a los 3 ó 4 días de incubación pero el desarrollo de micelio aéreo maduro con esporas puede tardar entre 7 y 14 días en desarrollarse y, en algunas cepas de crecimiento lento hasta más de un mes de incubación. El crecimiento en medios líquidos estacionarios se restringe a la formación de una película en la superficie o quizás un sedimento algodonoso dejando el medio líquido transparente. Para el crecimiento en medios líquidos se recomienda una agitación a

velocidades de 200 ó 250 rpm para suministrar la mejor aireación posible. A diferencia de las bacterias no filamentosas, los actinomicetos pueden crecer formando “pellets” o agrupaciones de filamentos en medios líquidos (Prescott, 2002).

1.1.4. El género *Streptomyces*.

Es uno de los géneros más característicos y conocidos de la división Actinobacteria. Se caracterizan por poseer una morfología particular en donde se diferencian dos formas de crecimiento, una primaria o asimilatoria y una secundaria o reproductiva. Las esporas reproductivas asexuales de especies de *Streptomyces* (Figura 2) se forman en los extremos de los filamentos aéreos. Si cada espora se deposita en un sustrato adecuado puede germinar y formar una colonia nueva. Estos microorganismos son aerobios estrictos. A menudo producen enzimas extracelulares que les permiten utilizar las proteínas, polisacáridos como almidón, la celulosa y diversas materias orgánicas halladas en el suelo. El género es de gran importancia biotecnológica debido a que produce metabolitos secundarios como los antibióticos que son de amplio uso en medicina humana y veterinaria, así como compuestos represores de tumores, enzimas y vitaminas (Yuan & Crawford, 1995).

Algunos actinomicetos han sido descritos como agentes de biocontrol por la capacidad de producir enzimas biodegradativas como quitinasas, glucanasas, peroxidases y otras, (Zhi-Qi, Li-Xiang, Hong-Ming, & Shi-Ning, 2006). Entre este grupo se encuentran los *Streptomyces* por ser capaces de ejercer biocontrol sobre hongos fitopatógenos como *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* (Montesinos, 2007).

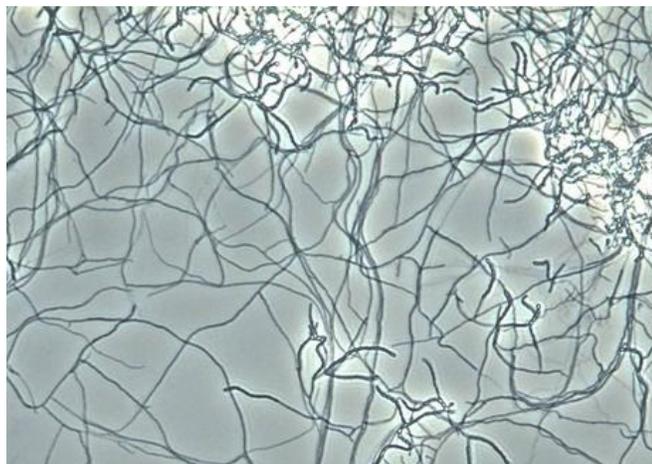


Figura 2. Micelio aéreo de *Streptomyces* sp. Visto en microscopio de contraste de fases (1000x).
Fuente: (Degen, 2006).

1.2. Metabolitos secundarios producidos por actinomicetos

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias son moléculas relativamente pequeñas producidas por un número limitado de cepas, que al parecer no tienen una función determinada en el crecimiento celular. De hecho, las cepas productoras de éstos, que por alguna mutación han perdido su capacidad de producirla, presentan crecimiento y características normales. Estos metabolitos incluyen diferentes tipos de compuestos de importancia económica, dentro de los cuales se encuentran los antibióticos, pigmentos, toxinas, feromonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, antagonistas y agonistas de receptores, pesticidas, agentes antitumorales y promotores del crecimiento en animales y plantas. Esta gran variedad de compuestos producidos en la naturaleza se ve reflejada en cerca de los más de 23.000 metabolitos microbianos conocidos, de los cuales el 42 % son producidos por hongos, 32 % actinomicetos y el resto por otros grupos de bacterias (Lazzarini, Cavaletti, Toppo, & Marinelli, 2000).

Es ampliamente reconocida la capacidad que tienen de producir una gama muy variada de metabolitos secundarios que son relevantes por su uso como fármacos (Baltz & Hosted, 1996), algunos de los cuales son descritos en el siguiente apartado.

1.2.1. Antibióticos.

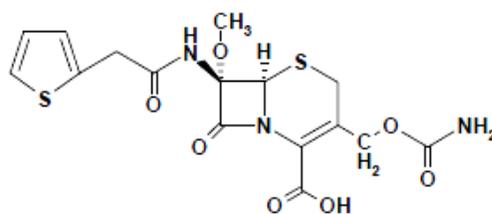
Los metabolitos microbianos más importantes son los antibióticos, sustancias que a bajas concentraciones inhiben el crecimiento de diferentes especies de microorganismos contribuyendo de esta forma al bienestar y salud de las personas. Un aspecto importante es el gran número de antibióticos existentes, de los aproximadamente 8.000 reportados hasta 1999, 45,6% eran producidos por cepas de *Streptomyces*, 16 % por otros actinomicetos, 16,9 % por otras bacterias y 21,5 % por hongos (Lazzarini et al., 2000). Otro aspecto importante de los antibióticos se refiere a la variedad de estructuras químicas que presentan, en donde todas las clases de moléculas de la química orgánica están representadas: cadenas alifáticas, anillos aromáticos aislados o condensados, anillos heterocíclicos, oligopéptidos y oligosacáridos.

La propiedad que hace que los antibióticos sean considerados como “fármacos maravillosos”, es la selectividad de su mecanismo de acción, que los distingue de germicidas y desinfectantes sintéticos. Su toxicidad selectiva contra algunas clases de organismos, con pocas excepciones,

los ha convertido en los compuestos más utilizados para la terapia contra microorganismos patógenos. Esto ha significado que las ventas de algunos de estos compuestos superen los 23 billones de dólares, ventas relacionadas a no más de 300 productos naturales, semisintéticos o sintéticos, que incluyen cefalosporinas, penicilinas, quinolonas, tetraciclinas y macrólidos (Strohl, Bartel, Li, NC., & Woodman, 1991). Los antibióticos se agrupan en familias caracterizadas porque agrupan compuestos que tienen una estructura química similar y comparten el mismo mecanismo de acción antimicrobiano (Lancini, Parenti, & Gallo, 1995). A continuación se describen algunos de los antibióticos producidos por actinomicetos:

a. **β -Lactámicos.**

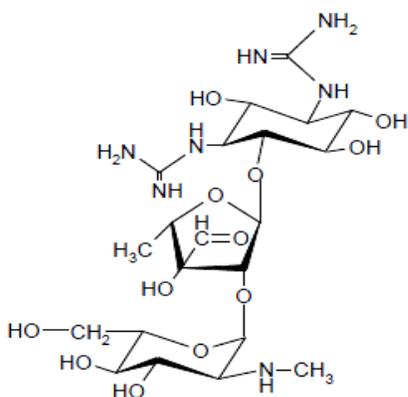
Los β -Lactámicos ejercen su efecto inhibiendo la síntesis de la pared celular. El antibiótico de interés clínico perteneciente a esta clasificación es la Tienamicina (**1**), Se aisló de *Streptomyces catleya*, antibiótico potente contra bacterias aerobias y anaerobias, Gram-positivas y Gram-negativas incluyendo *Pseudomonas*.



1

b. **Aminoglucósidos.**

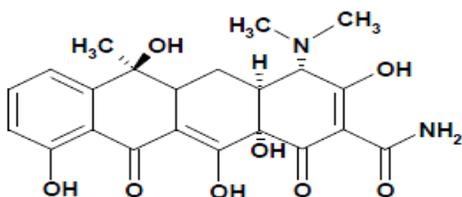
Dentro de los antibiótico de interés clínico perteneciente al grupo de los aminoglucósidos se encuentran la Estreptomina (**2**) aislada de *Streptomyces griseus*, y la Gentamicina producida por *Micromonospora purpurea*. Inhiben la síntesis de proteínas mediante su unión en la subunidad ribosomal 30S actuando sobre bacterias Gram positivas.



2

c. **Tetraciclinas.**

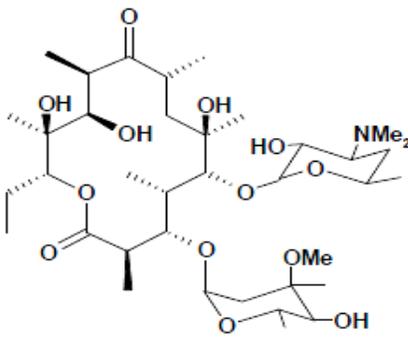
Inhiben la síntesis de proteínas a través de su unión en la subunidad ribosomal 30S. Los antibióticos de interés clínico pertenecientes a las tetraciclinas son: la Oxitetraciclina (**3**), aislada a partir de *Streptomyces rimosus*, tetraciclina y clortetraciclina producidas por *Streptomyces aureofaciens*.



3

d. **Macrólidos.**

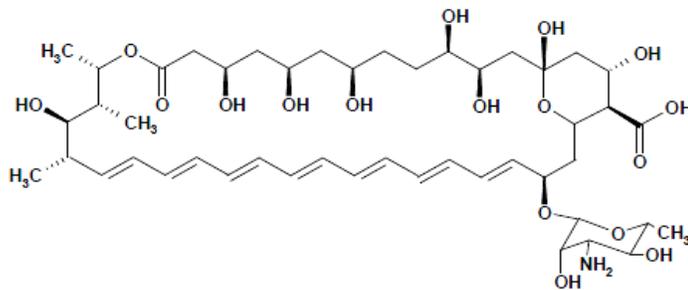
Inhiben la síntesis de proteínas a través de su unión en la subunidad ribosomal 30S. El antibiótico de interés clínico perteneciente a los macrólidos es la Eritromicina (**4**), compuesto que se aisló de *Saccharopolyspora Erythraea*.



4

e. **Polienos.**

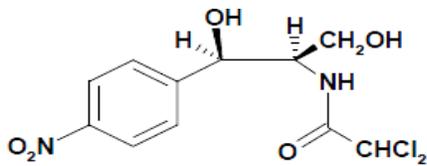
Si sitio de acción lo cumplen en la membrana plasmática alterando su permeabilidad. El antibiótico de interés clínico perteneciente a los polienos es la Amfotericina B (5), producida por *Streptomyces nodosus*, presenta actividad antifúngica.



5

f. **Fenicoles.**

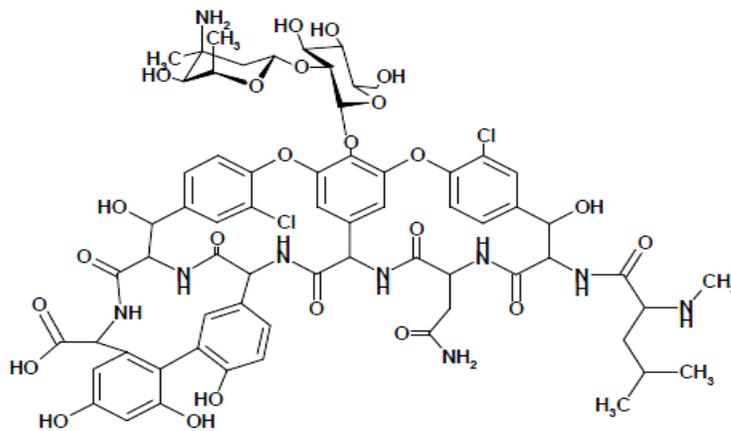
El antibiótico de interés clínico perteneciente al grupo de los fenicoles es la Cloranfenicol (6), aislado a partir de *Streptomyces venezuelae*, aunque actualmente se produce por síntesis química. Dicho antibiótico se encuentra en desuso debido a su alto grado de toxicidad en el humano y los animales.



6

g. *Glicopéptidos.*

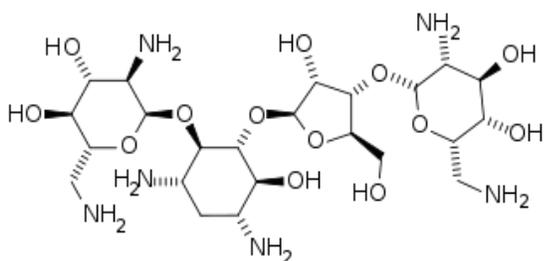
Los antibióticos de interés clínico pertenecientes a los glicopéptidos son: Vancomicina (7), aislada de *Amycolatopsis orientalis*; y, teicoplanina aislada a partir de *Actinoplanes teichomyceticus*.



7

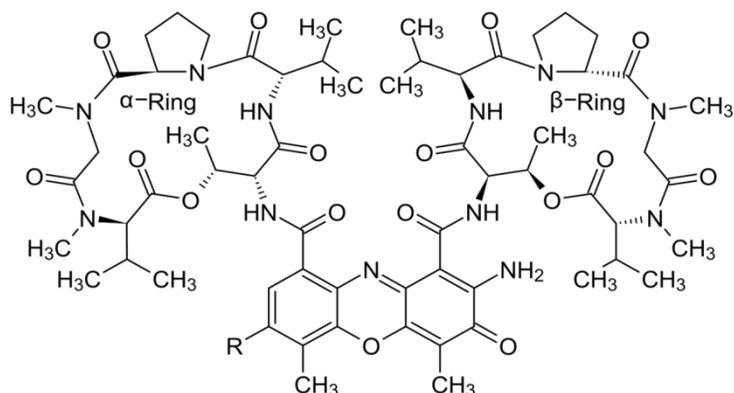
1.2.2. Agentes antitumorales.

La mayoría de los compuestos usados para quimioterapia de tumores son antibióticos producidos por actinomicetos (Tomasz, 1995), dentro de los que se encuentran actinomicina D, mitomicina, bleomicina, neomicina y las antraciclinas, daunorubicina y doxorubicina (Demain, 1999). En humanos la neomicina (8) inhibe angiogénesis inducida por angiogenina en células endoteliales (Hu, 1998), mecanismo que al parecer actúa extendiendo la capacidad de la neomicina para inhibir la fosfolipasa C.



8

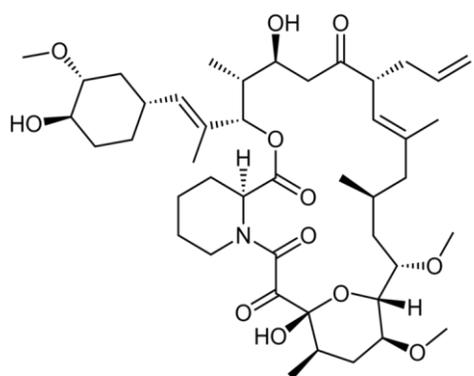
Por su parte la actinomicina D (**9**), es un antibiótico polipeptídico aislado de *Streptomyces*, al que se le reconoció actividad anticancerígena, debido a que presenta elevada toxicidad. Sin embargo, es ampliamente utilizado en investigación de biología celular para inhibir la transcripción al unirse al DNA en el complejo de inicio de la transcripción, evitando la elongación del RNA por la RNA polimerasa (Sobell, 1985).



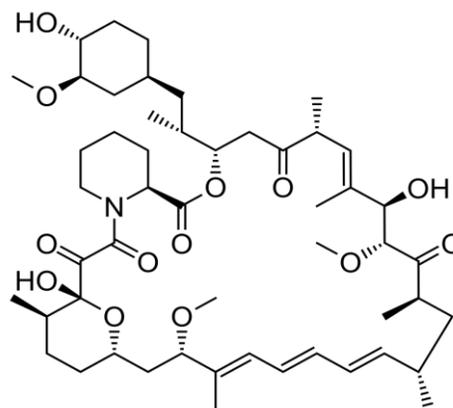
9

1.2.3. Agentes Inmunosupresores.

Dos productos producidos por actinomicetos han dado buenos resultados como inmunosupresores. Tal es el caso de los policétidos FK-506 (**10**) (tacrolimus) (Kino et al., 1987), aislado de *Streptomyces tsukubaensis* y de la rapamicina (**11**) (Sirolimus) (Vezina et al, 1975) aislado de *Streptomyces hygroscopicus*. El uso de FK-506, tracolimus o Prograf su nombre comercial, fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en 1994 para usarse en un principio en pacientes sometidos a trasplante de riñón y posteriormente para trasplantes de hígado, corazón, páncreas, tráquea, piel y córnea.



10



11

1.3. Métodos de separación y análisis cromatográficos

Todos los métodos cromatográficos tienen en común el uso de una fase estacionaria y una fase móvil. La muestra se desplaza con la fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida (Willard, Dean, & Settle Jr., 1991).

Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se moverán con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente (Hammond, 1999).

1.3.1. Cromatografía de filtración en gel (exclusión por tamaño).

Con la cromatografía de filtración en gel se separan moléculas en virtud de sus diferencias de tamaño (peso molecular). La capacidad separadora reside en el gel cuya matriz consta de un gran número de esferas porosas microscópicas. Estas esferas están constituidas por largas

cadena de polímeros unidas entre sí por enlaces químicos para formar una red tridimensional. El gel, una vez hidratado, se deposita adecuadamente en una columna hueca de vidrio (Figura 3) quedando listo para su uso (Alexander & Griffiths, 1993).

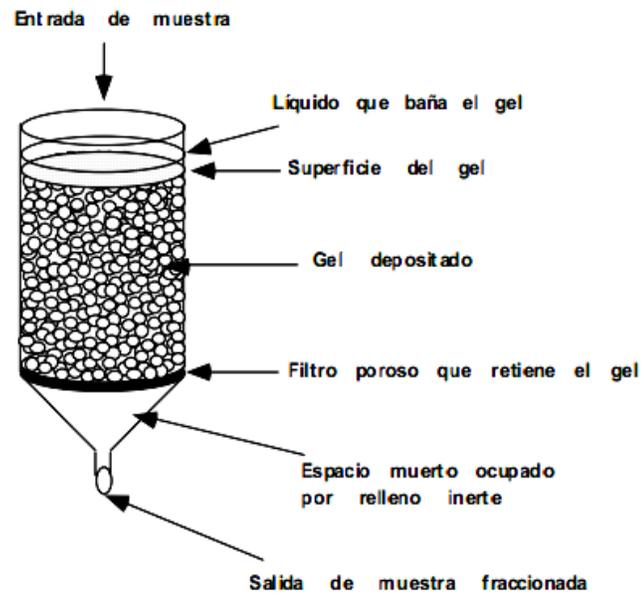


Figura 3. Columna de cromatografía de filtración en gel.
Fuente: (Valcárcel, 1988).

1.3.1.1. Principio.

Las moléculas de muy pequeño tamaño penetran en el interior de las esferas que componen el gel y, por consiguiente, no son extraídas de la columna hasta que no ha pasado a través de ella un volumen de líquido igual a su volumen total (V_t). Sin embargo, aquellas moléculas cuyo tamaño es mayor que el de los poros de las esferas del gel, no pueden penetrar en su interior y atraviesan la columna recorriendo únicamente el volumen vacío (V_o), siendo las primeras en salir de la columna. Las moléculas de tamaño intermedio, presentan una mayor o menor facilidad para difundir al interior de las esferas en función de su tamaño (Fischer, 1990).

1.3.1.2. Factores que influyen en la separación.

Además de la diferencia intrínseca de tamaño existente entre las moléculas que van a ser analizadas mediante cromatografía, hay diferentes factores que influyen en una correcta separación de las mismas:

- Longitud de la columna: la capacidad de separación de sustancias de diferente tamaño aumenta con la longitud de la columna.
- Flujo: la resolución de la separación disminuye al aumentar el flujo del líquido con que son arrastradas las moléculas a lo largo de la columna. Normalmente el flujo oscila entre 2 y 10 cm/h.
- Volumen de la muestra: las mejores separaciones se obtienen aplicando volúmenes de muestra iguales o menores al 5% del volumen total.
- Empaquetado del gel en la columna: las propiedades separadoras del gel se alteran profundamente, e incluso desaparecen, cuando un gel no está empaquetado homogéneamente en la columna o se encuentra excesivamente comprimido (Alexander & Griffiths, 1993).

1.3.2. Cromatografía en capa fina (TLC).

La cromatografía en capa fina se define como la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra una fase móvil. Este tipo de cromatografía se basa en la preparación de una capa, uniforme de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. En la cromatografía en fase normal, la fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares (Abbott & Andrews, 1970).

1.3.2.1. Principio.

La mezcla a analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil, que asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que

provoca su separación (Figura 4). Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa ésta se saca y se visualiza (Hammond, 1999).

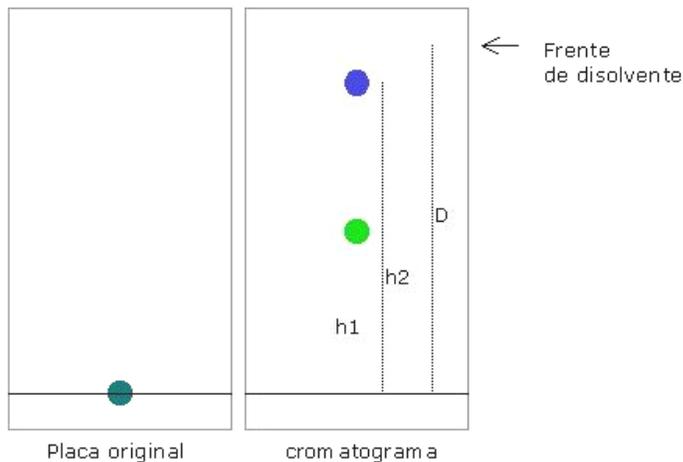


Figura 4. Desplazamiento y separación de los componentes de una mezcla a través de la placa.
Fuente: (Valcárcel, 1988).

1.3.2.2. Factor de retención.

La relación entre la distancia recorrida por un compuesto y por el disolvente desde el origen se conoce como R_f (rate factor). El valor de R_f depende de las condiciones en las cuales se corre la muestra (tipo de adsorbente, eluyente, así como las condiciones de la placa, temperatura, vapor de saturación) (Bates & Schaefer, 1977).

Tiene una reproducibilidad de $\pm 20\%$, por lo que es mejor correr duplicados de la misma placa.

1.3.2.3. Factores que influyen en una separación por cromatografía de capa fina.

- Temperatura: a menor temperatura las sustancias se adsorben más en la fase estacionaria.
- La cromatografía debe llevarse a cabo en un área sin corrientes de aire.
- Limpieza de las placas. Muchas placas están contaminadas con grasa o agentes plastificantes o adhesivos. Para el trabajo a pequeña escala, éstas deben limpiarse corriendo primero una mezcla de cloroformo y metanol y después dejar secar completamente antes de aplicar la muestra.
- Pureza de los disolventes (Pasto, Johnson, & Miller, 1992).

1.3.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La cromatografía comprende un conjunto de técnicas de análisis basadas en la separación de componentes de una mezcla y su posterior detección. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido, o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra con un flujo constante de presión proporcionado por una bomba, hasta llegar al punto donde es introducida la muestra. Siguiendo el flujo de presión la lleva a una columna donde se encuentra la fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido (Castro & Martins, 2004).

1.3.3.1. Principio.

Los componentes de la mezcla interactúan de distinta forma con la fase estacionaria y con la fase móvil a distintas velocidades y se van separando según su polaridad. Después de haber pasado los componentes por la fase estacionaria y haberse separado, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo del compuesto. En la Figura 5 se indican los componentes de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (Willard et al., 1991). El papel de las bombas es impulsar a la fase móvil con presión y flujo constante, el proceso de inyección de la muestra es automática, las columnas que se utilizan son de acero inoxidable y la función de los detectores es indicar el momento de aparición de los diferentes componentes que constituyen la muestra y realizar el análisis tanto cuantitativamente como cualitativamente (Castro & Martins, 2004).

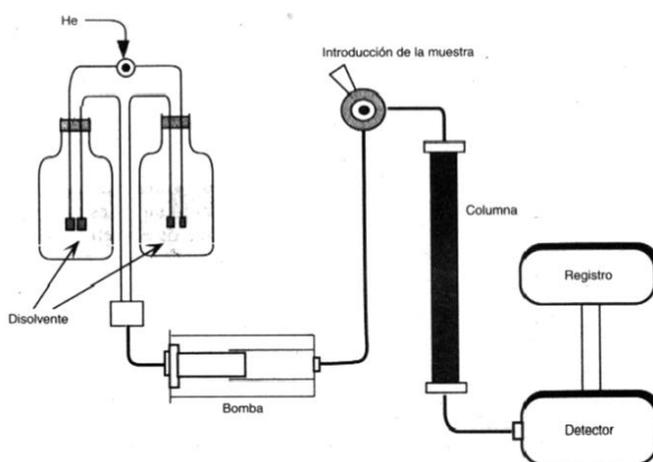


Figura 5. Partes fundamentales de las que se compone un HPLC.
Fuente: (Skoog, 2000).

1.3.3.2. Columnas cromatográficas.

a. Precolumnas.

Diseñadas para filtrar y retirar partículas que obstruyan la columna de separación; compuestos e iones que aumentan el ruido de fondo, disminuyendo la resolución y sensibilidad, y creando falsos picos; compuestos que podrían causar precipitación en contacto con la fase estacionaria o la fase móvil y compuestos que podrían co-eluir y causar picos extraños e interferir con la detección y cuantificación. En la Tabla 1 se indican los distintos tipos de columnas y los parámetros característicos de cada una.

Tabla 1. Características de las columnas cromatográficas usadas en HPLC.

Tipo	Diámetro (mm)	Relación de flujo ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Capacidad de muestra (μg)	Máxima carga de muestra (mg)
Capilar	0,075	0,25	0,05	-
	0,15	1,0	0,2	-
	0,30	5,0	1,0	-
	0,50	10	2,0	-
Microcalibre	1,0	25-50	0,05-10	-
Calibre estrecho	2,1	100-300	0,2-50	-
Analítica	4,6	500 - 1.500	1-200	10
Semi-preparativa	10	2.500 - 7.500	1.000	50
Preparativa	22	10.000 - 30.000	5.000	200

Modificado de: (Ullman,1999).

b. Columnas para derivatizar (pre o postcolumna separativa).

Columnas que modifican químicamente el compuesto a una molécula con el que se van a obtener datos potencialmente tangibles que pueden complementar a otros resultados analizados anteriormente.

1.3.3.3. Inyector.

El inyector para HPLC consiste normalmente en una válvula de inyección y un bucle. Un pequeño volumen de muestra (previamente disuelta) se carga en una jeringa y es inyectada en el bucle por la válvula de inyección. El volumen del bucle determina la cantidad inyectada y puede ir desde 5 μL hasta 500 μL .

1.3.3.4. Bombas.

a. Bombas de pistón recíproco.

Constan de un pistón conducido por una leva unida a un pequeño motor que se mueve rápidamente atrás y adelante en una cámara hidráulica variando su volumen entre 35 - 400 μL .

b. Bombas tipo jeringa.

Son más adecuadas para pequeñas columnas porque expulsan sólo un volumen finito de fase móvil antes de rellenarse. Estas bombas tienen un volumen de 250 a 500 μL .

c. Bombas de presión constante.

La fase móvil es conducida a través de la columna mediante la presión de un cilindro de gas. La disposición de las válvulas permite rellenar rápidamente la cámara del solvente cuya capacidad está sobre los 70 mL proporcionando relaciones de flujo de fase móvil continuas (Ullman, Larry, Bowers, & Burtis, 1999).

1.3.3.5. Detector.

Los detectores utilizados para HPLC (tabla 2) trabajan bajo condiciones de flujo continuo, la muestra disuelta en la fase móvil atraviesa una celda de flujo en la que es detectada. Normalmente, las muestras llegan en cantidades de nanogramo (ng) al detector, pero en análisis de trazas, esta cantidad puede llegar a ser de femtogramo (fg) e incluso de muy pocas moléculas. Es por ello que no existe un detector universal, sino que cada sustancia en principio, debe analizarse con el detector más adecuado dependiendo de su naturaleza físico-química, del tipo de análisis que se lleve a cabo y del tipo de instrumentación de la que se disponga.

Tabla 2. Comparación de los detectores usados en HPLC.

Detector	Limite de detección (ng)	Permite gradiente
UV/VIS	0,1 - 1	Sí
Índice de refracción	100 - 1.000	No
Arreglo de diodos	0,1 - 1	Sí
Dispersión de luz	0,1 - 1	Sí
Fluorescencia	0,001 – 0,01	Sí
Conductividad	0,5 - 1	No
Espectrometría de masas	0,1 - 1	Sí

Modificado de: (Fernández, 2004).

1.3.3.6. *Disolventes empleados.*

Se deben emplear disolventes de pureza cromatográfica, compatibles con el detector utilizado y presentar transparencia óptica (cuando se usan detectores UV). Es importante ajustar la fase móvil para conseguir la retención y resolución deseadas. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético, que ayudan a la separación de los compuestos (Sarkanen, 1990). En la tabla 3 se presentan los disolventes empleados en HPLC y su longitud de onda (UV).

Tabla 3. Longitudes de onda de corte en el UV de disolventes usados en HPLC.

Disolvente	Longitud de onda (nm)
Acetona	330
Acetonitrilo	190
Agua	190
Cloroformo	245
Éter Dietílico	215
N-Hexano	195
Metanol	205
Tetrahidrofurano	212
Tolueno	284

Modificado de: (Fernández, 2004).

1.3.3.7. Condiciones de elución.

En función de la composición de la fase móvil inyectada a la columna, la elución de moléculas puede ser de dos tipos: isocrática y en gradiente.

a. Elución isocrática.

Los compuestos eluyen usando una fase móvil de composición constante durante toda la cromatografía. Todos los compuestos acaban migrando a través de la columna hasta el final. Sin embargo, cada uno migra con una velocidad diferente, resultando en una relación de elución más rápida o más lenta. Este tipo de elución es bastante simple y barato, pero la resolución de algunos compuestos es cuestionable y el eluido puede no ser obtenido en un plazo de tiempo adecuado.

b. Elución en gradiente.

Los diferentes compuestos son eluidos modificando gradualmente la composición de la fase móvil durante el transcurso de la cromatografía (aumentando la fuerza iónica, modificando la polaridad, etc.). El resultado sobre la elución es un acortamiento de los tiempos de retención, el factor de retención disminuye conforme aumenta la variación de flujo del gradiente y el compuesto eluye. Este gradiente puede llevarse a cabo de forma lineal o escalonada o linealmente escalonada (Synder, Stadalius, & Quarry, 1983).

1.3.3.8. Parámetros que influyen en la separación de los compuestos mediante HPLC.

- Diámetro interno: determina la cantidad de muestra que se puede cargar a la columna y también influye en su sensibilidad.
- Medida de las partículas: estas partículas pueden tener diferentes medidas, siendo las de 5µm de diámetro las más utilizadas.
- Tamaño de poro: Los poros pequeños proporcionan una mayor superficie mientras que los poros de mayor medida proporcionan una cinética mejor, especialmente para los compuestos de tamaño más grande.
- Dimensión de la columna: una columna corta con tamaños de partícula más pequeños reduce el tiempo de desarrollo de un método.

- Presión del sistema: La presión de las bombas es variable según el modelo y fabricante, pero su rendimiento se mide en su habilidad para generar un flujo constante y reproducible (Skoog & Leary, 1996).

1.3.3.9. Configuración de la columna.

Los tamaños de columna más habitualmente recomendados para el desarrollo de métodos analíticos son 4,6 x 150 mm y 4,6 x 75 mm. Si se necesita de mayor resolución, se debe utilizar una columna de mayor longitud, 4,6 x 250 mm, o una columna de la misma longitud con partículas de menor tamaño.

Durante el desarrollo del método, es importante seleccionar el diámetro interno de columna (por ejemplo, 2,1 o 3,0 mm) que mejor responda a objetivos de aplicación adicionales (por ejemplo, sensibilidad o consumo de disolvente) o a la compatibilidad requerida con ciertos tipos de instrumento (capilares, nano o preparativos) (Synder et al., 1983).

La columna o fase estacionaria se encuentra en el horno que está a una temperatura de 20 °C, puede variar hasta 40 °C.

1.4. Condiciones de fermentación de microorganismos marinos para producción metabólica

Para su crecimiento, los microorganismos utilizados en los procesos tecnológicos, requieren estrictas condiciones del medio ambiente (Chibata & Tosa, 1977), tales como:

1.4.1. Medio acuoso.

Todas las reacciones biológicas se realizan en presencia de agua. Este es el principal componente del medio de cultivo. Incluso aquellos microorganismos que crecen en medio sólido necesitan que los sustratos estén humedecidos para ser colonizados.

1.4.2. Temperatura de crecimiento.

Las temperaturas entre las cuales se puede desarrollar una célula microbiana varían entre 10 y 60 °C. Según el rango de temperatura en el cual el crecimiento es posible podemos distinguir microorganismos psicrófilos (4 - 25 °C), mesófilos (30 - 40 °C) y termófilos (40 - 65 °C y más).

1.4.3. Acidez.

El pH de crecimiento de los microorganismos marinos varía entre 3,0 y 8,0. En forma general, las bacterias crecen a pH cercanos a la neutralidad (pH 7,0). Por el contrario, la mayoría de los hongos filamentosos y levaduras prefieren pH ácidos, alrededor de 5,0. Durante la fermentación, hay producción o consumo de ácido en el medio según el microorganismo, lo cual produce una variación del pH.

1.4.4. Presión parcial de oxígeno.

Se distinguen dos tipos de microorganismos en función de su requerimiento en oxígeno: Los microorganismos aerobios, para los cuales la disponibilidad del oxígeno es indispensable; y los microorganismos anaerobios, para los cuales el oxígeno es tóxico. Existen, por último, algunos microorganismos capaces de adaptar su metabolismo a las condiciones de oxigenación imperantes en el medio y que son por lo tanto aerobios facultativos (éste es el caso de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros).

La fermentación aerobia es hasta hoy la más utilizada ya que el crecimiento es mucho más rápido. Es necesario mencionar dos limitantes que presentan las fermentaciones aerobias:

a) Muy baja solubilidad del oxígeno en el agua, lo que hace necesario airear y agitar fuertemente el medio de cultivo.

b) Producción elevada de calor que debe ser constantemente removida a fin de mantener estable la temperatura.

1.4.5. Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo se define como el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de especies reactivas (ER) y radicales libres (RL) que provocan daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes (Harman, 1992), siendo los radicales libres especies químicas que poseen en el último orbital un electrón no apareado, por lo que son capaces de extraer un electrón de las moléculas vecinas para completar su orbital, convirtiéndose en componentes altamente reactivos y oxidantes (Halliwell, Gutteridge, & Cross, 1992).

Se genera por la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores prooxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno (Forsberg, de Faire, & Morgenstern, 2001). Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos (Matés & Pérez-Gómez, 1999).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) pertenece a la categoría de especies reactivas de oxígeno (EROs) por ser un compuesto intermediario e importante en la bioquímica de los radicales libres, el mismo que genera daño oxidativo en las células (Halliwell et al., 1992).

1.4.5.1. *Peróxido de Hidrógeno.*

El peróxido de hidrógeno es un compuesto químico con características de un líquido altamente polar, es inestable y se descompone rápidamente a oxígeno y agua con liberación de calor, tratándose de un proceso exotérmico. Soluble en lípidos y por ende capaz de difundirse por membranas.

Aunque no es inflamable, es un agente oxidante potente que puede causar combustión espontánea cuando entra en contacto con materia orgánica o algunos metales, tales como:

cobre, plata o bronce. Dependiendo de las condiciones, el peróxido de hidrógeno puede ser un agente reductor o, más comúnmente, un agente oxidante.

Es un líquido denso y transparente, incoloro e inodoro, de sabor metálico, con un punto de ebullición de 150,2 °C y una densidad de 1,47 g/cm³ a 0 °C. El peróxido de hidrógeno tiene un punto de fusión de -0,43 °C. Es completamente miscible con el agua y forma el hidrato cristalino de H₂O₂ • 2 H₂O (Fogler, 1992).

CAPÍTULO II
MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepa de interés

La cepa de interés para el estudio de producción metabólica se encuentra depositada en el cepario (crioreserva -80°C) del Departamento de Química. Fue aislada mediante técnicas microbiológicas a partir de sedimento marino colectado en el Manglar de Jambelí en el año 2010. Del análisis de la región 16 ADNr se determinó que la cepa en estudio pertenece al género *Streptomyces* y las dos secuencias obtenidas se encuentran depositadas en el GENBANK con códigos de acceso JX463753 y JX463754.

2.2. Monitoreo de la actividad biológica

De estudios previos realizados en el Departamento de Química se determinó que la cepa identificada como *Streptomyces* sp. presentaba actividad inhibitoria relevante frente a *Enterococcus faecalis* (E_f) ATCC 29212®, por lo que la actividad biológica del extracto y las fracciones resultantes de procedimientos cromatográficos fueron ensayadas frente a este microorganismo patógeno

2.3. Cultivo y obtención del extracto

2.3.1. Reactivación de la cepa.

Streptomyces sp. fue reactivada en 50 mL de medio A1 (Almidón + Extracto de levadura + peptona + carbonato de calcio) al 75% de agua de mar artificial, e incubada durante 7 días a 30°C y 200 r.p.m. La composición porcentual de los medios y del agua de mar se encuentra detallada en el ANEXO 1.

A partir del cultivo en medio A1 se prepararon cultivos en medio sólido (medio A1 + 1,5% agar) para su conservación y uso posterior.

2.3.2. Escalado del cultivo en medio A1 y obtención del extracto crudo.

El proceso de fermentación se llevó a cabo en frascos Fernbach de 2,8 L conteniendo en cada uno un volumen de 1 L de medio A1 y empleando las mismas condiciones usadas para la

reactivación del cultivo. Luego de 7 días de cultivo se añadió a cada fermentador resina estéril Amberlite® XAD- 7HP (SIGMA) en una proporción de 20 g/L para adsorber los productos orgánicos presentes en el cultivo. Llevamos a agitación a 200 r.p.m. durante dos horas, posteriormente, se separó la resina del residuo acuoso mediante filtración con gasa estéril y lavado con agua destilada y el producto final se extrajo con 1 L de AcOEt. Finalmente, la fracción soluble en AcOEt fue concentrada a presión reducida y 30 °C en rotaevaporador para obtener el extracto seco. Previo a su uso, la resina se lavó repetidamente con metanol (20 minutos en reposo x 2 veces) y agua destilada.

2.4. Aislamiento de metabolitos secundarios

2.4.1. Tratamiento del extracto crudo

Para el fraccionamiento inicial del extracto crudo en cromatografía de filtración en gel, se lo disolvió a este en una mezcla de Cloroformo y Metanol en proporción 1:1. La fracción insoluble se separó mediante centrifugación durante 15 minutos y 3.000 r.p.m. extrayendo el sobrenadante como producto final para introducir en la columna cromatográfica. La elección de la fase móvil cloroformo-metanol se realizó de acuerdo a la polaridad de los compuestos presentes observada en cromatografía de capa fina.

2.4.2. Fraccionamiento en columna en gel de filtración.

Previo al montaje de la columna pesamos 100 g de Sephadex® (gel para filtración y separación cromatográfica) y lo humectamos con un excedente de metanol, de acuerdo a las condiciones dadas por el fabricante (ANEXO 2).

El fraccionamiento se realizó mediante cromatografía de filtración en gel o exclusión por tamaño, en una columna con frita porosa NS 29/32 de tamaño 40 mm x 60 cm, y 100 g de Sephadex® hidratada y compactada de manera uniforme Sembramos el sobrenadante y como fase móvil una mezcla de CHCl₃:MeOH en proporción 1:1, recolectando fracciones de 10 a 15 mL. Un segundo fraccionamiento aseguró una mejor separación utilizando la misma técnica cromatográfica en columna NS 24/40, 20mm x 20cm con frita porosa, y sembrando 1 mL de la fracción de interés y como fase móvil empleamos una mezcla de Hex:CHCl₃:MeOH en relación 2:1:1, recolectando fracciones de 5 mL.

Como procedimiento de monitoreo de las fracciones se utilizó cromatofolios de aluminio de sílicagel G60 F254 empleando como fase móvil CHCl_3 :MeOH en proporción 9:1, visualizadas ante luz UV (254-365nm) y reveladas con Óleum¹ (ref.).

2.5. Inducción de estrés oxidativo mediante adición de H_2O_2 en el medio de fermentación

2.5.1. Cuantificación de biomasa mediante peso seco.

En cultivos líquidos aireados y agitados no produce una turbidez uniforme como en el caso de otras bacterias, sino que forman aglomeramientos y su crecimiento no sigue el modelo exponencial de las bacterias, sino el cúbico de los hongos (Stuart, 1999), por tal razón no se puede emplear el método de conteo en cámara de Neubauer, Número Más Probable u otro similar, que nos arroje datos sobre el crecimiento de *Streptomyces* sp.; por ende, para la cuantificación de la biomasa se empleó el método descrito a continuación:

Para la cuantificación de la biomasa se prepararon 5 cultivos en matraces con 50 mL de medio A1 empleando las mismas condiciones que se describen en el apartado 2.3.2. Se tomó un cultivo a las 48, 72, 96, 120 y 144 horas de incubación. De cada cultivo se tomaron 3 muestras de 5 mL, se colocaron en tubos de centrifuga previamente pesados y etiquetados, centrifugados a 3.000 r.p.m. por 15 minutos; eliminamos el sobrenadante y los llevamos a la estufa a una temperatura de 105 °C durante 3 horas, se llevan los tubos al desecador durante 10 minutos y anotamos los pesos correspondientes. Se repitió el procedimiento de secado hasta estabilización del peso. En la figura 6 se resume el proceso gravimétrico empleado.

El resultado obtenido se expresó como gramos de muestras seca por cada litro de medio de cultivo, de acuerdo a la fórmula descrita a continuación (Aranaiz et al., 2000).

Eq. 1

$$\text{Peso Seco} \left(g \frac{mS}{mL} \right) = \frac{P_s - P_v}{V_m}$$

¹ Composición del Óleum: AcOH: 80%, H₂O: 16%, H₂SO₄: 4%

Donde,

Ps= peso seco (muestra seca mS + tubo).

Pv= peso del tubo vacío.

Vm= volumen de la muestra.

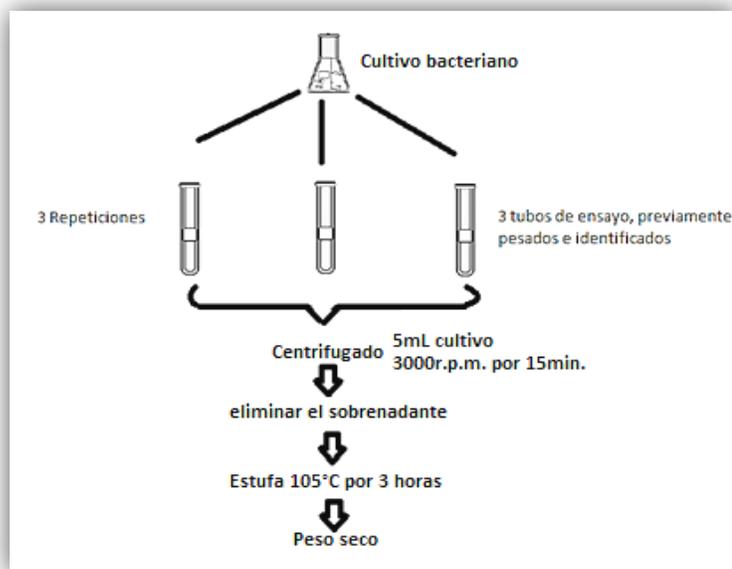


Figura 6. Proceso de gravimetría a través de centrifugación.
Fuente: Modificado de: (Aranaiz et al., 2000).

2.5.2. Cuantificación de la producción de metabolitos secundarios.

Para la cuantificación de la producción de metabolitos secundarios se prepararon 10 cultivos en matraces con 50 mL de medio A1, empleando las mismas condiciones que se describen en el apartado 2.3.2. Se tomaron dos cultivos a las 48, 72, 96, 120 y 144 horas de incubación, cada cultivo se maceró con AcOEt en proporción 1:1 con agitación durante una hora. Se decantó durante 20 minutos y se separó la fase orgánica de la acuosa. Recogemos la fase orgánica (figura 7), filtramos y llevamos al rotaevaporador para obtener el extracto seco y su peso correspondiente. De cada cultivo se realiza un control de la variación del pH al final del período de incubación.

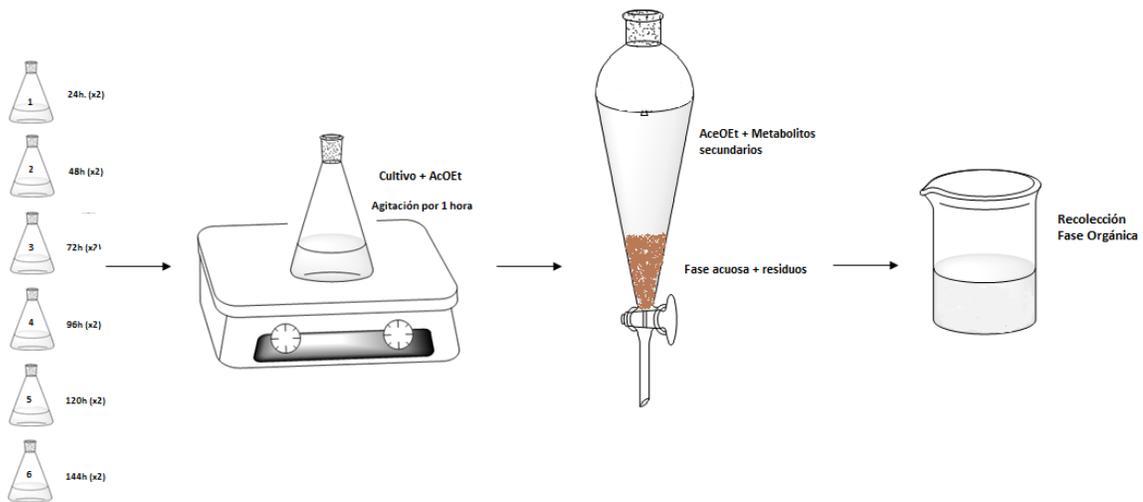


Figura 7. Proceso de extracción de metabolitos secundarios.
Fuente. La autora.

2.5.3. Toxicidad con Peróxido de Hidrógeno.

Se prepararon 6 matraces con 50 mL de medio A1 del cultivo bacteriano de acuerdo a las condiciones indicadas en el apartado 2.3.2. Se adicionó peróxido de hidrógeno (SIGMA, 30%) para obtener una concentración final de 100 mM, 50 mM y 10 mM. Se cuantificó la biomasa a las 24, 48, 72 y 96 horas posterior a la adición, de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 2.5.1.

2.5.4. Cuantificación de Biomasa durante la inducción de estrés oxidativo por H₂O₂.

Una vez determinada que concentraciones de H₂O₂ resultaron tóxicas, se establecen concentraciones subtóxicas, las mismas que se adicionan a cultivos frescos de la cepa bacteriana en fase exponencial y se cuantifica la biomasa como se describe en el apartado 2.5.1. Como monitoreo del crecimiento normal del microorganismo, los resultados obtenidos se comparan con los resultados de la curva de crecimiento sin adición de peróxido de hidrógeno.

2.5.5. Cuantificación de la producción de metabolitos mediante inducción de estrés oxidativo por H₂O₂.

Se cuantifica la producción metabólica de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 2.5.2., utilizando las mismas concentraciones que se emplean durante el ensayo de inducción

de estrés oxidativo. Los experimentos donde se mide la biomasa y se cuantifica la producción metabólica se realizaron simultáneamente para eliminar cualquier error que pueda ocurrir posterior al ensayo. En base a los resultados obtenidos se establece una curva de producción de metabolitos secundarios de acuerdo a los días de incubación empleados, para determinar si dichas concentraciones de H₂O₂ modifican o alteran la producción de metabolitos secundarios en el cultivo bacteriano.

2.6. Evaluación de la actividad antibacteriana

2.6.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).

Los valores de CMI se determinaron por el método de microdilución en caldo usando una concentración final de 5×10^5 ufc/mL para *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). La CMI se define como la concentración más baja del agente antimicrobiano que, bajo determinadas condiciones *in vitro*, previene la aparición de crecimiento visible de un microorganismo, dentro de un período definido de tiempo (Palombo, 2009). Se preparó una disolución de extracto en DMSO a una concentración de 20 mg/mL. El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos y se siguió el procedimiento de dilución doble seriada para obtener concentraciones desde 1000 µg/mL a 0,024 µg/mL. La incubación se realizó a 37°C para bacterias por 24 horas (CLSI. M7-A7; CLSI. M100-S21).

Se usó ampicilina como control positivo *E. faecalis* con un valor de CMI de 3,12 µg/mL. Como control negativo se usó DMSO.

2.7. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para realizar el análisis y valoración tanto cualitativa como cuantitativa del perfil de metabolitos presentes en el extracto crudo de acetato de etilo de *Streptomyces* sp., sus fracciones activas colectadas mediante cromatografía en gel de Sephadex® LH-20 y los extractos obtenidos en el ensayo de inducción de estrés oxidativo se utilizó el equipo HPLC Waters modelo 2596, con un sistema de bombas cuaternario.

Los extractos se disolvieron en metanol grado HPLC a una concentración de 1mg/mL y se pasaron por filtro Milipore (Millex-GV Hidrophillic PVDF) de 0,22 µm previo a la inyección en el

equipo. Se utilizó el detector de arreglo de diodos (DAD) Waters modelo 996 con un barrido de longitud de onda desde 200 a 400 nm. La corrida cromatográfica se realizó en una columna empacada C18 (longitud 150 mm x 4,6 mm y porosidad 5 µm), de la casa comercial Supelco (USA).

Se estableció un método general que cumpla con los requerimientos para la separación y cuantificación adecuada de metabolitos presentes en *Streptomyces* sp., trabajando en modo gradiente acetonitrilo:agua (v/v) grado HPLC, y manteniendo constante las siguientes condiciones: Volumen de inyección de 10 µL, tiempo de corrida de 30 minutos y un flujo de 0,5 mL/min.

Se utilizó el software Masslynx versión 4.1. para integrar el área bajo los picos cromatográficos, lo que permite la comparación simultánea de los datos de los perfiles de metabolitos.

2.8. Análisis de resultados

2.8.1. Matemática del crecimiento exponencial.

Cuando se inocula una bacteria en un medio y ha transcurrido el tiempo de generación, en cada generación sucesiva se duplica la población. La relación que existe entre el número de células y las generaciones de un cultivo creciendo en forma exponencial, puede deducirse matemáticamente de la manera siguiente:

Para calcular n = (número de generaciones), empleamos la ecuación 2.

$$\text{Eq. 2} \quad \log y = \log x + n \log 2$$

$$n = \frac{\log y - \log x}{\log 2}$$

Si se sustituye en la ecuación anterior $\log 2$ por su valor 0,3010 se tiene que $1/0,3010 = 3,3$

$$\text{Eq. 3} \quad n = 3,3 \log y/x$$

Por consiguiente, aplicando la ecuación 3, puede calcularse el número de generaciones que han tenido lugar, siempre que se conozca la población inicial “x”, y la población “y” después del tiempo “t”.

El tiempo de generación G es igual a t (tiempo transcurrido en fase exponencial para llegar de x a y) dividido por el número de generaciones n, o sea:

Eq. 4
$$G = t/n$$

2.8.2. Velocidad volumétrica de producción metabólica y de biomasa por peso seco.

La velocidad volumétrica implica la medición del crecimiento y mantenimiento celular, y, la formación de productos a partir de un cultivo cerrado. Para determinar la velocidad volumétrica empleamos la ecuación 5.

Eq. 5
$$\mu = \frac{\ln x_2 - \ln x_1}{t_2 - t_1} \times \frac{d \ln x}{dt}$$

Donde:

μ = velocidad volumétrica (g/Lh)

x_2 = gramos de biomasa en tiempo final

x_1 = gramos de biomasa en tiempo inicial

t_1 = tiempo inicial

t_2 = tiempo final

$\frac{dx}{dt}$ = velocidad volumétrica de biomasa

2.8.3. Velocidad específica de biomasa por el método de peso seco.

Eq. 6
$$\mu = \frac{1}{x} \times \frac{d \ln x}{dt}$$

Donde:

μ = velocidad específica

x = gramos de biomasa/Litros de muestra analizada

$\frac{dx}{dt}$ = velocidad volumétrica de biomasa

2.8.4. Prueba T Student para muestras relacionadas.

Se empleó la prueba T para comparar entre pares de variables numéricas. Dosis tratamiento 1, vs Dosis Tratamiento 2, para determinar que hipótesis eran correctas:

H₀1: Las concentraciones de peróxido de hidrógeno empleadas no alteran la producción de biomasa en *Streptomyces* sp.

H_a1: Las concentraciones de peróxido de hidrógeno empleadas alteran la producción de biomasa en *Streptomyces* sp.

H₀2: Las concentraciones de peróxido de hidrógeno empleadas no alteran la producción metabólica en *Streptomyces* sp.

H_a2: Las concentraciones de peróxido de hidrógeno empleadas alteran la producción metabólica en *Streptomyces* sp.

CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Obtención del extracto y fraccionamiento

3.1.1. Características de *Streptomyces* sp (MJG3).

La cepa bacteriana etiquetada como MJG-3 (M: Manglar, J: Jambelí, G: Medio ácido Gauze) aislada inicialmente en medio ácido Gauze (figura 8, izquierda) fue recultivada en medio marino A1 y seleccionada para un estudio químico y de actividad biológica, debido a los cambios de pigmentación por presencia de metabolitos solubles en el medio (figura 8, derecha), y fundamentalmente a la actividad biológica relevante mostrada frente a *Enterococcus faecalis*. De acuerdo a Singleton, 2004., las colonias a menudo presentan pigmentos de color debido a la biosíntesis de metabolitos secundarios que se excretan en el medio de cultivo.

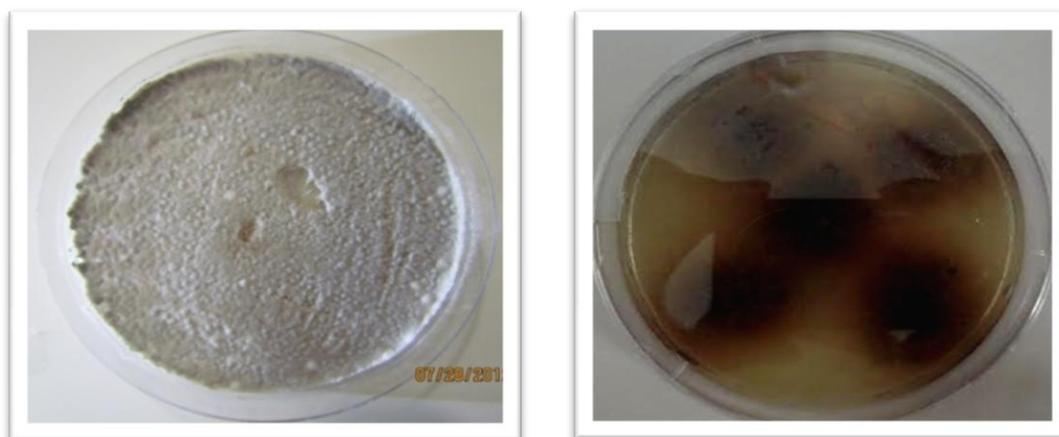


Figura 8. Morfología de *Streptomyces* sp. en medio ácido Gauze (izquierda), donde se observa un aspecto algodonoso debido a la formación de micelio aéreo. A la derecha, cultivo de *Streptomyces* sp. en medio A1, donde se observa la producción de metabolitos excretados.
Fuente: Autora.

3.1.2. Extracto en Acetato de Etilo.

Se cultivaron 10 L de la cepa de *Streptomyces* sp. (MJG-3), del cual mediante extracción con AcOEt y resina de absorción Amberlite® XAD- 7HP (SIGMA) se obtuvo un total de 4,712 g. Sus características físico químicas se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Características físico químicas del extracto crudo MJG-3.

Extracto crudo MJG-3	
Cantidad	4,712 g
Consistencia	Viscosa
Color	Café oscuro
Solubilidad	AcOEt, Acetona, MeOH.
Cantidad	4,712 g/10 L
Rendimiento	0.047 %



Fuente: Autora

Se considera que el rendimiento de los extractos puede variar dependiendo de la naturaleza química de los metabolitos y la polaridad del solvente utilizado, siendo el acetato de etilo el más recomendado en la literatura (Vimal, Rajan, & Kannabiran, 2009).

3.2. Fraccionamiento del extracto crudo

Se disolvió el extracto (4,712 g) en una mezcla de CHCl_3 :MeOH 1:1. Se centrifugó para separar residuos insolubles (desalinización) y el sobrenadante se separó mediante filtración en gel Sephadex® LH-20. La columna se eluyó con la misma mezcla de disolventes y se recolectaron 26 fracciones de entre 10 a 15 mL. La separación y visualización de los productos obtenidos se inspeccionó mediante CCF, usando como fase móvil una mezcla de CHCl_3 :MeOH en proporción 9:1 y visualizadas ante luz UV (254 y 365nm) y revelado con Óleum (figura 9).

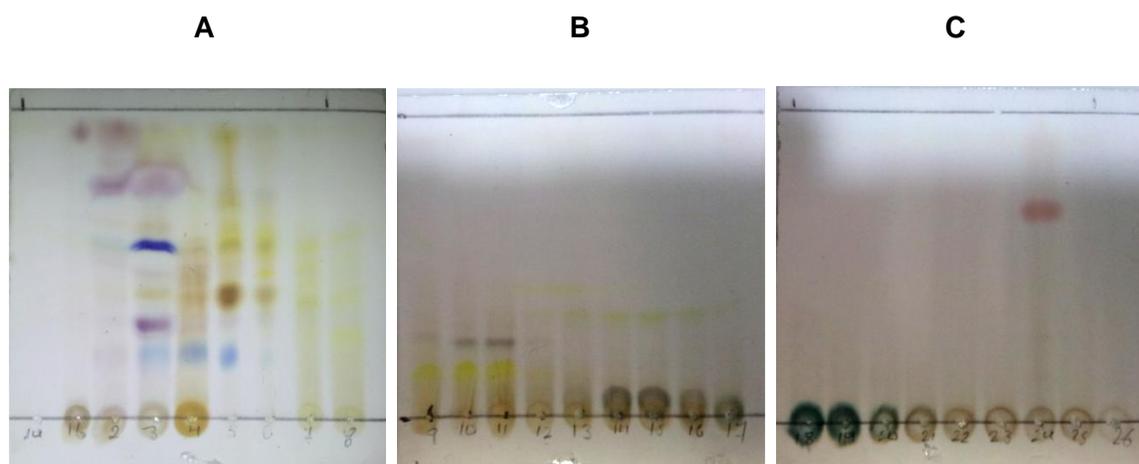


Figura 9. CCF en CHCl_3 :MeOH 9:1 (v/v), de la corrida cromatográfica en Sephadex del extracto AcOEt. Se muestran únicamente las placas reveladas con Óleum. A) fracciones 1-8. B) fracciones 9-17. C) fracciones 18-26.

Fuente: Autora.

Se reunieron las fracciones de acuerdo al comportamiento cromatográfico de los solutos obteniéndose cuatro subfracciones. La columna se lavó con metanol al 100% y la fracción resultante se etiquetó como una quinta subfracción. En la tabla 5 se describen los pesos de las fracciones obtenidas y eluciones empleadas.

Tabla 5. Fraccionamiento cromatográfico del extracto diluido y el peso total obtenido.

Nombre	Fracciones colectadas	Fase móvil	Proporción	Peso (g)
F1	1-4	CHCl ₃ -MeOH 1:1	1:1	0,068
F2	5-8	CHCl ₃ -MeOH 1:1	1:1	0,412
F3	9-13	CHCl ₃ -MeOH 1:1	1:1	0,234
F4	14-25	CHCl ₃ -MeOH 1:1	1:1	0,247
F5	26	Metanol	100%	0,196
TOTAL				1,157

Fuente: Autora.

Se obtuvo un total de 1,157 g en las fracciones recolectadas a partir de 4,712 g de extracto crudo debido al gran contenido de sales del extracto.

Debido a la complejidad presentada en cada una de las fracciones y de acuerdo al resultado de actividad biológica (tabla 9), se seleccionó la **fracción F2** para un segundo fraccionamiento empleando una mezcla de Hex:CHCl₃:MeOH 2:1:1, permitiendo de esta manera una mayor compactación del gel de Sephadex® LH-20 y diferencias de polaridad al incluir hexano en la mezcla de elución. Se recogieron 25 fracciones de aproximadamente 5 mL. La columna se lavó con metanol al 100% obteniéndose la fracción 26. Las fracciones se monitorearon mediante CCF en CHCl₃:MeOH proporción 9:1, visualizadas ante luz UV (254 y 365 nm) y reveladas con Óleum (figura 10).

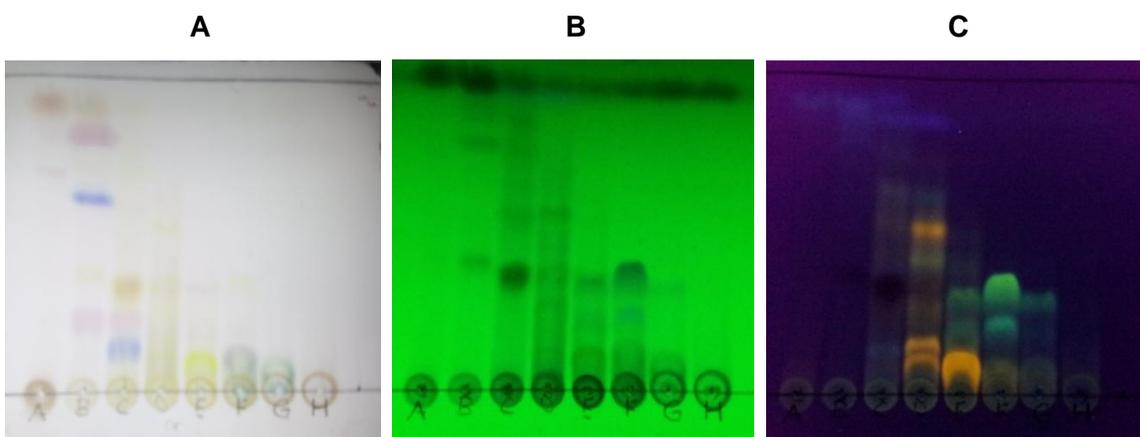


Figura 10. CCF en $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ 9:1 (v/v), de la corrida cromatográfica en Sephadex de la **Fracción F2**. Se muestra el conjunto de fracciones reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica. A) CCF revelada con Óleum. B) UV 254 nm. C) UV 365 nm.

Fuente: Autora.

Se reunieron las fracciones de acuerdo a su comportamiento cromatográfico, obteniendo finalmente ocho sub-fracciones. En la tabla 6 se describen los pesos de las fracciones obtenidas y eluciones empleadas.

Tabla 6. Fraccionamiento cromatográfico a partir de la fracción F2 (segundo fraccionamiento).

Nombre	Fracciones colectadas	Fase móvil	Proporción	Peso (g)
A	1-2	Hex- CHCl_3 -MeOH	2:1:1	0,033
B	3-4	Hex- CHCl_3 -MeOH	2:1:1	0,065
C	5-6	Hex- CHCl_3 -MeOH	2:1:1	0,036
D	7-10	Hex- CHCl_3 -MeOH	2:1:1	0,030
E	11-13	Hex- CHCl_3 -MeOH	2:1:1	0,006
F	14-18	Hex- CHCl_3 -MeOH	2:1:1	0,005
G	19-25	Hex- CHCl_3 -MeOH	2:1:1	0,002
H	26	Metanol	100%	0,006
			TOTAL	0,183

Fuente: Autora.

3.3. Inducción de estrés oxidativo mediante adición de H₂O₂ en el medio de fermentación

3.3.1. Cuantificación de biomasa mediante peso seco y producción metabólica.

Los resultados obtenidos al cuantificar la producción de metabolitos secundarios y de biomasa de los cultivos a las 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas, proporcionaron información referencial acerca de las fases del crecimiento celular, y el periodo en el cual hay una mayor o menor producción metabólica.

Para establecer la concentración del inóculo empleado para la cuantificación de biomasa y metabolitos, inicialmente se partió de reserva criogénica mantenida a -80 °C, la cual fue reactivada en 50 mL de medio A1. A partir de este cultivo, se estableció una curva de crecimiento preliminar (datos no mostrados), donde se determinó que el período donde existía una mayor velocidad de crecimiento se encontraba a las 48 horas de cultivo (datos observados en la Gráfica 3. Apartado 3.3.2.1). A través de estos resultados se estableció que el inóculo inicial presenta una concentración de 0,3 mg de peso seco/mL a las 48 horas de cultivo.

La concentración de la biomasa expresada como peso seco en g/L de cultivo cambió progresivamente en el tiempo. La mayor tasa de crecimiento se encuentra en el período comprendido entre las 48 y 72 horas, coincidente con un crecimiento exponencial indicado por el aumento ordenado de los componentes celulares, lo cual conduce a un aumento en el número de individuos en la población (Brock, 1993). Se establece un corto periodo estacionario de 96 a 120 horas en donde la tasa de crecimiento disminuye como consecuencia del agotamiento de nutrientes y acumulación de productos tóxicos y finalmente un período de declive observado hasta las 144 horas, tiempo en el que finalizó el experimento (Little & Gordon, 1997).

No se representa la fase de adaptación ya que se partió de un inóculo (0,3 mg/mL) originado de un cultivo de 48 horas. De acuerdo a Madigan, et al. (2004), si un cultivo que está creciendo en fase exponencial es inoculado al mismo medio de cultivo bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa fase de latencia y el crecimiento exponencial sigue a la misma velocidad.

Los metabolitos primarios son producto del metabolismo cuya producción tiene lugar en la fase de crecimiento y que contribuyen a la producción de biomasa celular. Por otro lado, los metabolitos secundarios son biosintetizados a partir del metabolismo primario, los cuáles no

representan factores esenciales para el crecimiento en el cultivo de producción, pero sirven en diversas funciones para la supervivencia (Piñol & Palazón, 1993).

Como se puede observar en la figura 11, durante el proceso fermentativo la producción metabólica se incrementa en un radio 13:1 desde las 72 a las 96 horas y la velocidad de producción disminuye a partir de este período (gráfica 2). Los metabolitos secundarios poseen una gran variedad de estructuras químicas y de actividades biológicas siendo sintetizados generalmente tras la entrada en la fase estacionaria de crecimiento o de diferenciación morfológica a partir de metabolitos primarios o de intermediarios de los mismos (Challis & Hopwood, 2003; Vining, 1992).

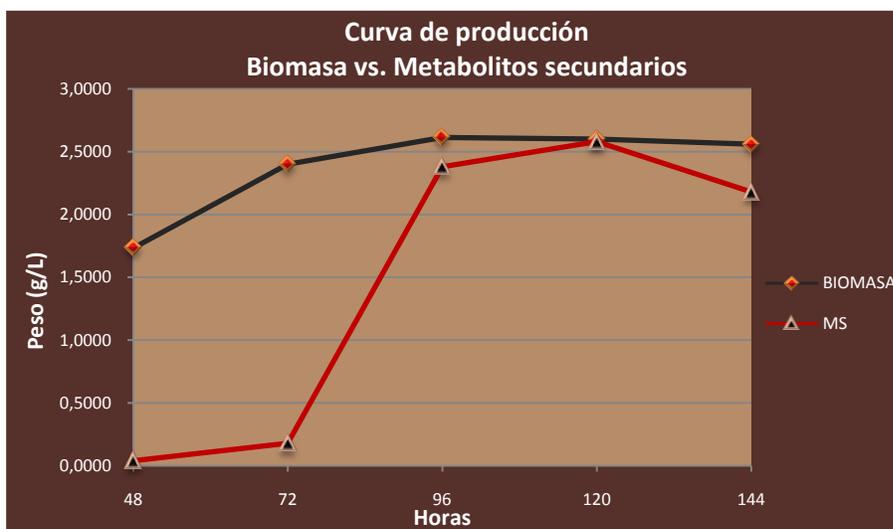


Figura 11. Producción de biomasa y metabolitos secundarios por *Streptomyces* sp., medida durante un lapso de 6 días.
Fuente: Autora.

Durante el crecimiento celular se presentó un aumento progresivo de pH del medio de cultivo (tabla 7) a partir de un pH inicial de 7,02. Según Derisi et al. (1997), el pH de crecimiento óptimo de cultivos para especies de *Streptomyces* sp. se encuentra en el rango de 6,5 a 8,0. Dicho aumento sugiere que las bacterias se encuentran consumiendo los nutrientes del medio y en óptimo metabolismo celular.

Tabla 7. Relación entre el incremento de biomasa y el aumento de pH durante los 7 días de cultivo

Tiempo (horas)	pH de cultivos	Peso neto (g/L)
0	7,02	0,0015*
48	7,1	0,002
72	7,2	0,009
96	7,7	0,119
120	7,8	0,129
144	8,0	0,109

* inóculo

Fuente: Autora.

A partir de las 48 horas junto al aumento del pH, se observó un cambio de tonalidad del color original del medio a una coloración café oscura indicativo de producción metabólica, el cual se intensificó a las 96 horas, periodo representado por el inicio del crecimiento estacionario (figura 11) en donde, el microorganismo disminuye su tasa de crecimiento, pero sigue metabólicamente activo. Una vez que se inicia su síntesis, la producción metabólica es una función lineal con respecto al tiempo, la duración de esta etapa varía en función de la naturaleza del metabolito secundario, del organismo y del medio (Pezacka & Wood, 1986). El cambio de color del medio del cultivo indica una alta producción de metabolitos secundarios, similar a lo generalmente reportado para otros pigmentos bacterianos (Toro, Patiño, & Ríos, 2001; Torres & Bonilla, 1999).

3.3.2. Velocidad de producción de biomasa y metabolitos secundarios en el cultivo *Streptomyces* sp.

3.3.2.1. Velocidad volumétrica de la producción de biomasa por peso seco.

La tasa de producción de biomasa por unidad de volumen expresado como g/Lh (obtenido a partir del cálculo del logaritmo natural de cada valor de biomasa obtenida a diferentes horas de cultivo), alcanza su máximo a las 48 horas con un valor de 0,037 g/Lh y disminuye de manera lineal ($r^2=0,97$) hasta las 144 horas (0,015 g/Lh) como se observa en la figura 12. Cuando se inocula un medio de nutrientes con una pequeña cantidad de microorganismos, estos crecerán y se reproducirán, pudiendo distinguirse entonces una sucesión de fases caracterizadas por variaciones de la velocidad de crecimiento con respecto al tiempo.

Durante la fase exponencial, la velocidad de crecimiento es constante, obteniéndose un período estable donde las concentraciones relativas de los metabolitos y enzimas permanecen constantes (Pappano, Puig de Centorbi, & Ferreti, 1990).

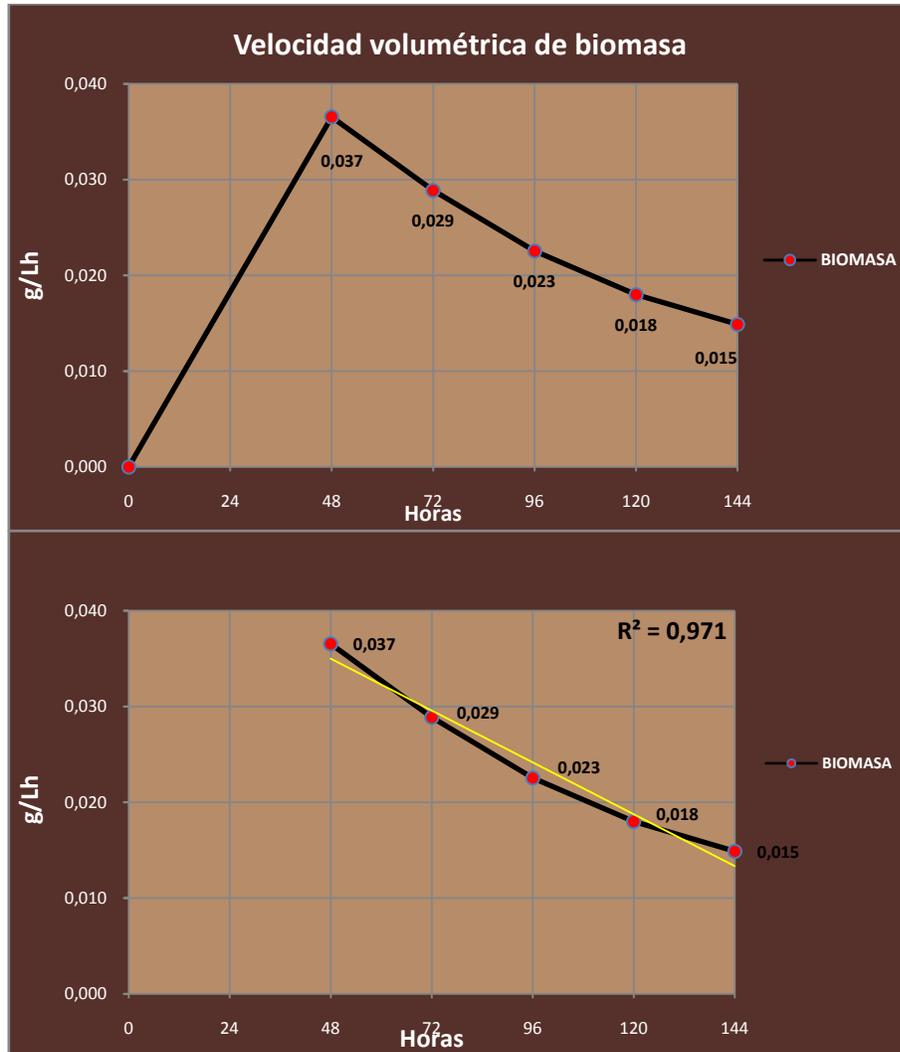


Figura 12. Velocidad volumétrica g/Lh del contenido de biomasa de *Streptomyces*.
Fuente: Autora.

3.3.2.2. Velocidad volumétrica de la producción de metabolitos secundarios.

La figura 13 indica la tasa de producción metabólica expresada en g/Lh por unidad de volumen, obtenida a partir del logaritmo natural de cada valor de la medida de los metabolitos a diferentes horas de cultivo; la misma que alcanza su máxima velocidad a las 96 horas el cultivo (periodo de crecimiento estacionario) con un valor de 0,050 g/Lh y disminuye de manera lineal ($r^2=0,99$)

hasta las 144 horas (0,033 g/Lh), en donde la población celular se encuentra en periodo de senescencia.

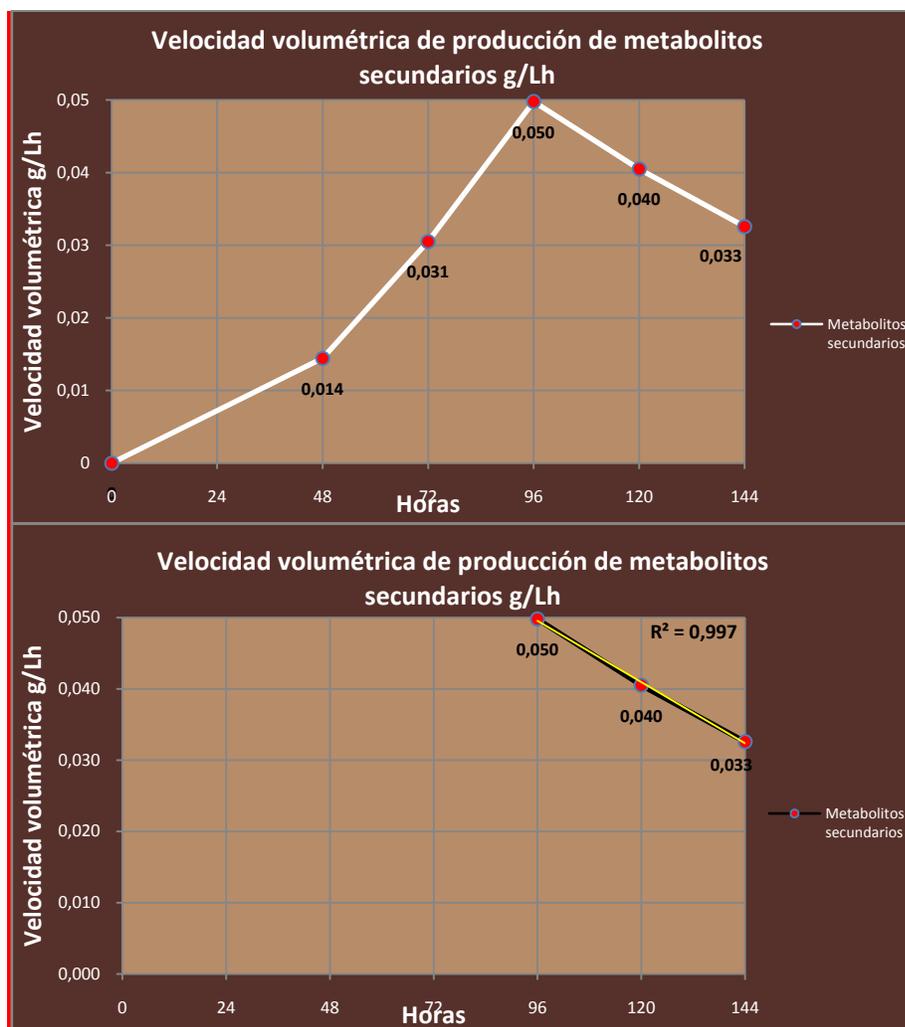


Figura 13. Velocidad volumétrica (g/Lh) del contenido de metabolitos secundarios de *Streptomyces*.
Fuente: Autora.

3.3.2.3. Velocidad específica de producción de biomasa.

En la figura 14 se observa el comportamiento cinético de generación de células en cultivo de *Streptomyces* para cada tiempo, expresado como velocidad específica en h^{-1} , alcanzando el máximo valor de la velocidad específica a las 48 horas ($0,021 h^{-1}$), inicio del periodo exponencial, a las 72 horas se muestra una declinación en la velocidad específica, disminuyendo de manera lineal hasta las 144 horas.

La velocidad específica de crecimiento, para un tipo de microorganismo dado depende principalmente de la composición y concentración del medio de cultivo, presencia de inhibidores, temperatura y pH. En ocasiones algún componente del medio de cultivo puede ser inhibidor del crecimiento y de los productos resultantes, sobre todo cuando se encuentra en altas concentraciones (Navarro & Rocha, 1998).

En un cultivo bacteriano la velocidad volumétrica de crecimiento es medida como el aumento absoluto en la concentración celular por unidad de tiempo, mientras que la velocidad de crecimiento específica es el incremento en la concentración celular por unidad de tiempo por célula (Willett, 1997).

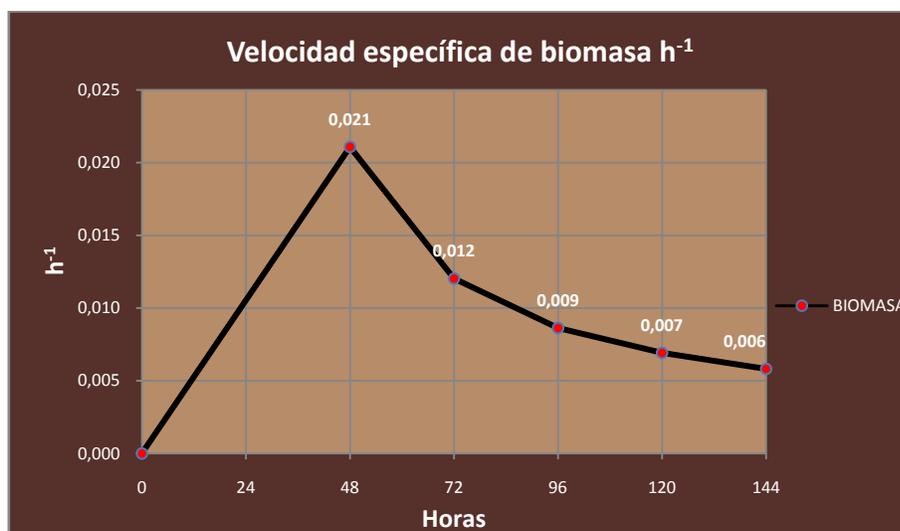


Figura 14. Velocidad específica de producción de biomasa (h^{-1}) para un cultivo de 7 días de *Streptomyces* sp.
Fuente: Autora.

3.3.3. Tiempo de generación.

La velocidad de crecimiento exponencial se expresa como tiempo de generación (**G**) y éste se define como el tiempo que tarda una población en duplicarse. Los tiempos de generación varían ampliamente entre los microorganismos, algunos crecen rápidamente y presentan tiempos de generación de unos 30 minutos y otros tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días. Utilizando los datos de biomasa obtenidos desde las 48 a las 72 horas de cultivo en fase exponencial (tabla 8) se obtuvo el número de generaciones resultantes, ya que es el período en el que la velocidad de crecimiento es elevada.

Tabla 8. Biomasa mediante peso seco de los datos correspondientes al periodo exponencial.

Variables	x	y
Tiempo	48	72
Peso seco g/L	1,733	2,400

Fuente: Autora.

a. Número de generaciones:

$$n = 3,3 \log \frac{x}{y}$$

n= 0,47 generaciones.

b. Tiempo de generación:

$$G = \frac{T}{n}$$

G= 51 horas.

El cultivo perteneciente a la cepa *Streptomyces*, presentó un tiempo de generación de 51 horas, período en el cuál se duplica el número de células o la masa celular; este dato indica que la población celular está creciendo lentamente. Al estudiar el crecimiento de los microorganismos filamentosos (hongos y actinomicetos), se comprobó que las características de crecimiento se diferencian mucho de la descrita para los microorganismos con crecimiento de forma dispersa (Marshall & Alexander, 1960).

3.3.4. Prueba de Toxicidad con Peróxido de Hidrógeno.

Los ensayos preliminares de cuantificación de la actividad metabólica y del crecimiento celular de *Streptomyces*, establecieron que a las 48 horas inicia la fase exponencial, por tal razón, las concentraciones de H₂O₂ propuestas (100 mM, 50 mM y 10 mM) se adicionaron al medio de cultivo en este período de tiempo.

En la figura 15 se puede observar la comparación entre las medidas de crecimiento celular expresadas en g/L bajo diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno durante los 4 días posteriores al tratamiento, así como el control de crecimiento en condiciones normales. A una concentración de 10 mM, la producción de biomasa con respecto al tiempo es ligeramente

mayor proporcionando una mejor respuesta celular, en comparación con la biomasa obtenida luego del tratamiento con 100 mM y 50 mM de peróxido de hidrógeno.

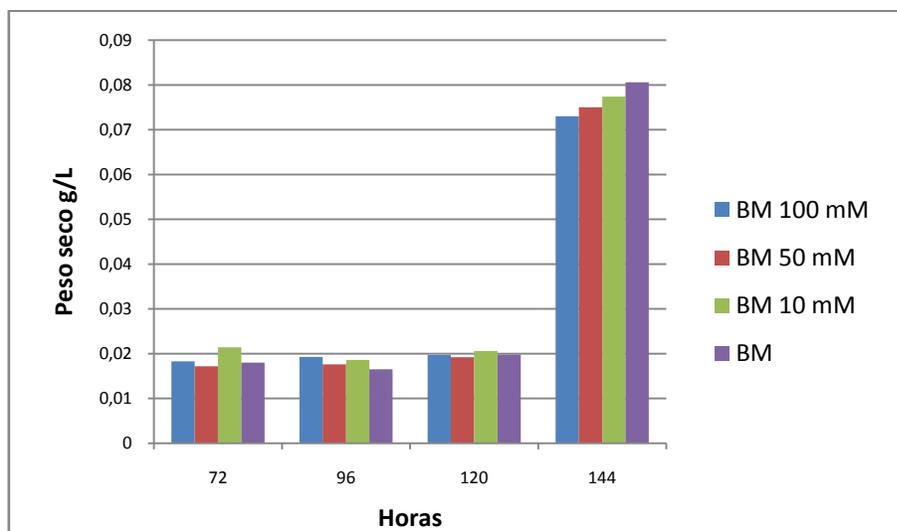


Figura 15. Datos de biomasa por peso seco (g/L) proporcionados a partir del tratamiento con H_2O_2 (100 mM, 50 mM y 10 mM) y cultivos en condiciones normales (BM).

BM: biomasa.

Fuente: Autora.

Se observa un aumento del contenido de biomasa en los cultivos obtenidos a las 144 horas, de acuerdo a la cinética de crecimiento las células se encuentran en un periodo de senescencia, envejeciendo y aumentando la tasa de muerte. El estrés oxidativo induce al aumento de los radicales libres en la célula, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales pueden oxidar y dañar las membranas celulares dando como resultado el envejecimiento y muerte celular (Delatre & Bonnefont, 1998).

Una vez realizado el análisis estadístico mediante la prueba T Student, se comprobó que no existe diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las medidas de los pesos de biomasa en los cultivos de *Streptomyces*, sometidos a estrés oxidativo mediante la adición de las concentraciones de peróxido de hidrógeno (100 mM, 50 mM y 10 mM) y los cultivos sin tratamiento, durante los diferentes días de ensayo, en la gráfica 6 se aprecia la comparación de las medidas de biomasa en los cultivos a las 72, 96, 120 y 144 horas, en donde podemos ver su similitud en cuanto a producción de biomasa tanto en los cultivos con tratamiento, como en los cultivos en condiciones normales.

En la figura 16 se observan las diferentes medidas de la producción de biomasa con relación a los días posteriores a la inducción de estrés oxidativo mediante H_2O_2 .



Figura 16. Comparación de las medidas de biomasa mediante peso seco, obtenidos a partir del ensayo de toxicidad.

BM: biomasa.

Fuente: Autora.

El peróxido de hidrógeno puede causar estrés oxidativo debido a que utiliza los canales de agua para atravesar rápidamente las membranas celulares, llegando hasta el núcleo y causando daño en el DNA por la generación de radicales libres hidroxilo (OH^\cdot) (Ribeiro, Marques, & Salvadori, 2006). Miller et al. (1993) se refieren al estrés oxidativo como el resultante de una deficiencia de sustancias protectoras naturales o de la exposición a agentes generadores de radicales libres.

Debido a las características del peróxido de hidrógeno (altamente reactivo, vida media corta y potente oxidoreductor de componentes celulares), se presentan pocos registros con estudios donde se experimenta su aplicación.

3.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La actividad del extracto crudo se analizó por el método de microdilución en caldo contra la bacteria gram positiva *E. faecalis*, empleando una solución de partida de 20 mg/mL, resultando una actividad inhibitoria en la totalidad de diluciones empleadas, por lo que se usó una escala diferente a la mencionada en el apartado 2.6.1. Usando una concentración de 1 mg/mL se obtuvieron diluciones desde 50 $\mu\text{g/mL}$ hasta 0,024 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados obtenidos de medir la sensibilidad frente a *E. faecalis*, del extracto crudo y de sus fracciones se describen en la tabla 9.

Tabla 9. Actividad inhibitoria del extracto total y sus fracciones frente a *E. faecalis*

Fracciones	Actividad biológica
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
Extracto total	0,78
F1	NA
F2	0,19
F3	NA
F4	6,25
F5	25

NA. No activo

Control +: ampicilina

Fuente: Autora.

Se considera que los extractos que muestran CMI menor de 75,0 $\mu\text{g/mL}$ tienen una fuerte actividad antimicrobiana; de 75,0 a 150,0 $\mu\text{g/mL}$ la actividad antimicrobiana es moderada; 150,0 a 250,0 $\mu\text{g/mL}$ la actividad antimicrobiana es débil; y, más de 250,0 $\mu\text{g/mL}$, el extracto se considera inactivo (Mendes, M. 2007).

De los resultados obtenidos se observa que la actividad del extracto total y las fracciones F2, F4 y F5, resultaron ser las más activas, siendo F2 la fracción con la mayor actividad antibacteriana, por lo que de su fraccionamiento posterior en Sephadex® LH-20, empleando Hex:CHCl₃:MeOH (2:1:1) se evaluó también la actividad biológica. De acuerdo a los valores de CMI obtenidos de la fracción F2, para el siguiente ensayo se partió de una concentración de 25 ppm (25 $\mu\text{g/mL}$) de extracto en cada fracción analizada, cuyos resultados se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Actividad inhibitoria de las fracciones resultantes del fraccionamiento de F2 frente a *E. faecalis*.

Fracciones	Actividad biológica
	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
A	NA
B	NA
C	NA
D	6,25
E	0,39
F	0,19
G	1,56
H	6,25

NA: No activo

Fuente: Autora.

La fracción que presenta mayor actividad contra *E. faecalis* es la fracción F encontrándose su valor de CMI en 0,19 µg/mL considerándose actividad inhibitoria fuerte, seguida de la fracción F (CMI 0,39 µg/mL). (Pandey, Ghimire, & Agrawal, 2004) Señalan que la CMI no es una constante para un agente determinado ya que está influenciada por varios factores que incluyen: la naturaleza del organismo en prueba, el tamaño del inóculo, la composición del medio de cultivo, tiempo de incubación y entre otros.

3.5. Cuantificación por Cromatografía líquida de alta resolución

El objetivo de este análisis se fundamenta en la obtención de un método sensible para valorar el éxito cromatográfico derivado de la separación por exclusión por tamaño con Sephadex® LH-20 y la producción de metabolitos secundarios presentes en *Streptomyces* sp., así como de sus fracciones activas (tabla 11).

Tabla 11. Extractos empleados para la separación y cuantificación de metabolitos (1mg de extracto en 1mL de metanol grado HPLC).

Extracto	Etiqueta
Extracto total	MJG3_1(2)
Fracción F2	MJG3_F2(2)
Fracción F2: E	MJG3_F2_E(2)
Fracción F2: F	MJG3_F2_F(2)

Fuente: Autora.

Los ensayos se desarrollaron en HPLC (Waters serie 2695), equipado con un detector de arreglo de diodos DAD (Waters 996) ajustado a una longitud de onda para realizar un barrido de 200 a 400 nm. Una **columna** analítica C18 (ver apartado 2.7.), la fase móvil en modo gradiente consistió en una mezcla acetonitrilo:agua (v/v), velocidad de flujo constante de 0,5 mL/min y un tiempo de corrida de 30 minutos.

Se evaluaron cuatro métodos para el extracto y cada fracción de interés, y las condiciones empleadas se describen en el Anexo 3. Los mejores resultados de acuerdo a la eficacia del método se obtuvieron empleando el método #4 denominado “Genérico_ *Streptomyces*” detallado en la Tabla 12. Las condiciones y resultados obtenidos de los restantes 3 métodos empleados no se muestran en este apartado debido a su deficiente eficacia en la separación de metabolitos y presencia de picos asimétricos.

Tabla 12. Condiciones de separación empleadas en el método denominado “**Genérico_Streptomyces**” utilizado para análisis por HPLC.

Tiempo (min)	Solventes		Curva
	ACN [§] (%)	H ₂ O [§] (%)	
0.00	5	95	1
5.00	5	95	1
7.00	30	70	6
7.01	50	50	1
9.00	50	50	1
15.00	100	0	6
30.00	100	0	1

[§] ACN: Acetonitrilo + 0,1% Ác. Fórmico; H₂O: agua +0,1% Ác. Fórmico
Fuente: Autora.

La adaptación de dos gradientes, intercalados por una elución isocrática, permite la separación temprana de compuestos polares en los primeros 7 minutos y una separación más eficiente de compuestos de mediana y baja polaridad en los siguientes 14 minutos.

Los cromatogramas resultantes del extracto total y de sus fracciones activas empleando el método 4, se muestran en las figuras 17, 19, 20 y 21. Los cromatogramas fueron obtenidos y editados con el paquete informático ACD/Spectrus Processor (ACDLabs 2012, build66513, Release 15.10.13).

La eficacia del método se puede valorar de acuerdo a las bandas cromatográficas. Las anchuras de las bandas cromatográficas dependen de la columna (tamaño de partícula, homogeneidad) y de la velocidad de la fase móvil. Por tanto una separación cromatográfica óptima es aquella en donde se da lugar a la formación de picos agudos, evitando en lo posible el ensanchamiento de las bandas debido a la dispersión (Ford, 1996). Con la adición del acetonitrilo como modificador orgánico a la fase móvil, se logró una mayor selectividad y por lo tanto, una mejor separación entre las señales emitidas por la muestra.

En la figura 17 se observan los seis picos cromatográficos obtenidos mediante HPLC-DAD a partir del extracto total de *Streptomyces*.

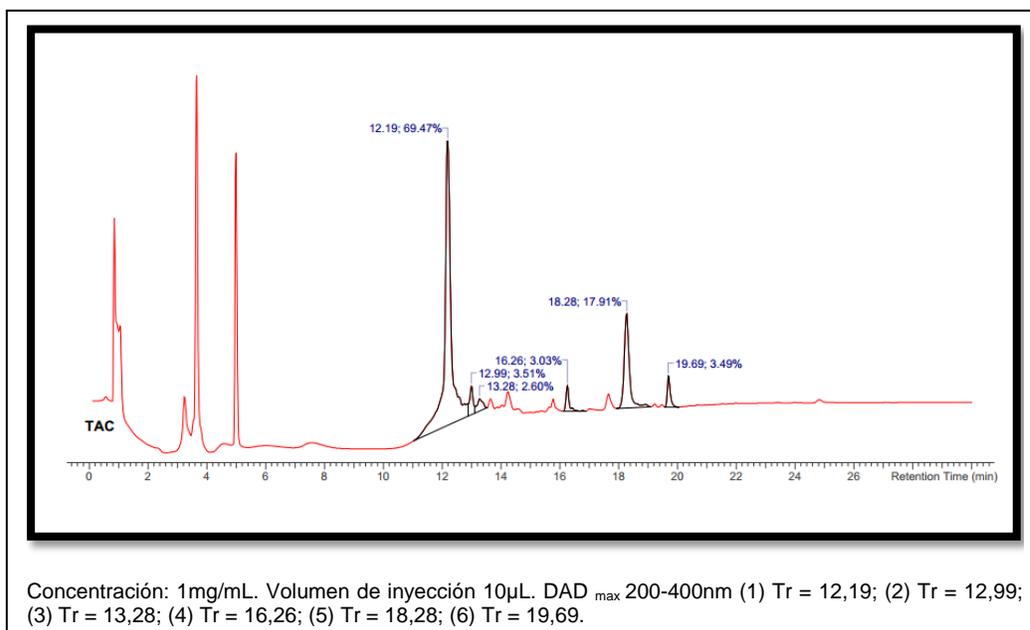


Figura 17. Perfil cromatográfico del extracto total del cultivo *Streptomyces* sp.
Fuente: Autora.

La normalización del área es un medio para establecer el porcentaje de cada componente en la muestra (Rubinson & Rubinson, 2001), el mismo que ha sido integrado electrónicamente mediante el uso del paquete informático Spectrus Processor, indicándose en la tabla 13 al igual que el contenido de analitos (µg) en cada pico cromatográfico obtenido. El contenido más alto de metabolitos se representó en el pico 1 del extracto total de *Streptomyces* (mg/mL), con una cantidad de 690 µg.

Tabla 13. Características de los picos cromatográficos obtenidos del extracto total.

Pico	Normalización del área (%)	Cantidad del analito (µg)
1	69,47	694
2	3,51	35
3	2,60	26
4	2,60	30
5	17,91	180
6	3,49	35

Fuente: Autora.

Para comprobar la pureza del pico 1 se realiza la comparación de espectros a distintos tiempos de retención registrados durante la elución del pico cromatográfico (figura 17) determinando

que teóricamente posee una impureza espectral; dicha impureza puede deberse a la presencia de uno o más compuestos o de picos no separados en la línea base. Cuando el pico es puro, no deberían encontrarse diferencias en los perfiles espectrales o cromatográficos del mismo (Garrido Frenich y col. 1999).

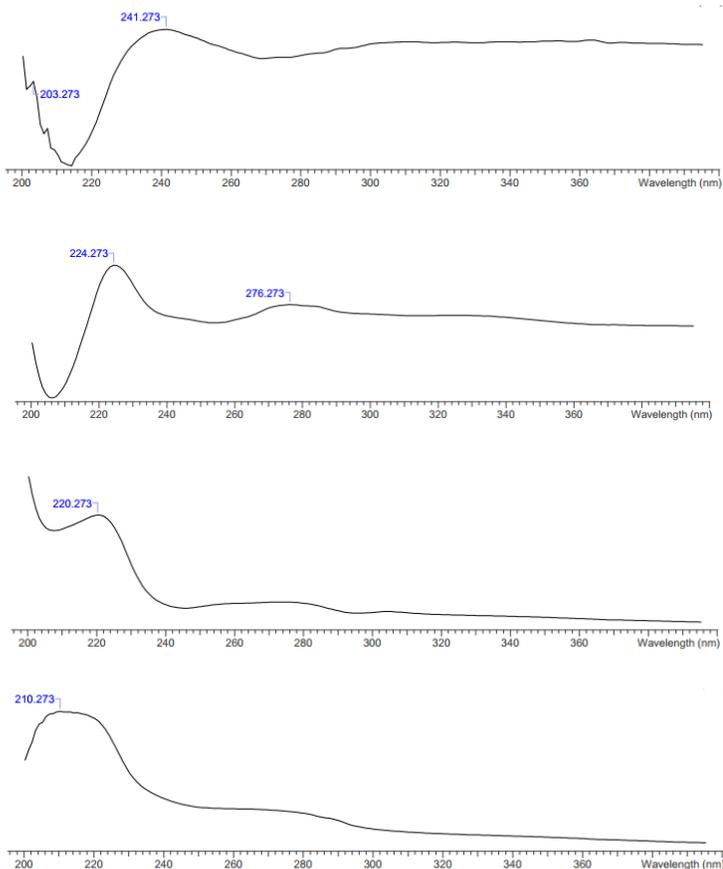


Figura 18. Espectro UV del pico 1 ($t_r=12,19$) del cromatograma de la figura 17, donde se evidencia la presencia de varios picos de absorción indicativos de la presencia de compuestos diferentes.

Fuente: Autora.

La identidad entre analitos y patrones solamente puede ser establecida mediante la comparación con una base de datos obtenidos bajo las mismas condiciones, lo que hace muy dificultosa la identificación de una sustancia o compuesto mediante este método (Ludwing, 1998). Es por ello que esta técnica de análisis cromatográfico ofrece escasas posibilidades para la realización de análisis cualitativos, debido a que nunca permiten asegurar la presencia de un sólo compuesto, por lo que no se puede excluir la posibilidad de que dos o más compuestos diferentes presenten los mismos parámetros de retención sobre un sistema dado.

En la figura 19 se muestra el cromatograma perteneciente a la fracción activa F2, en donde se observa las señales emitidas por los compuestos presentes generando siete picos a diferentes tiempos de retención; se observa una buena separación cromatográfica y picos agudos resultantes de la eficiencia del método.

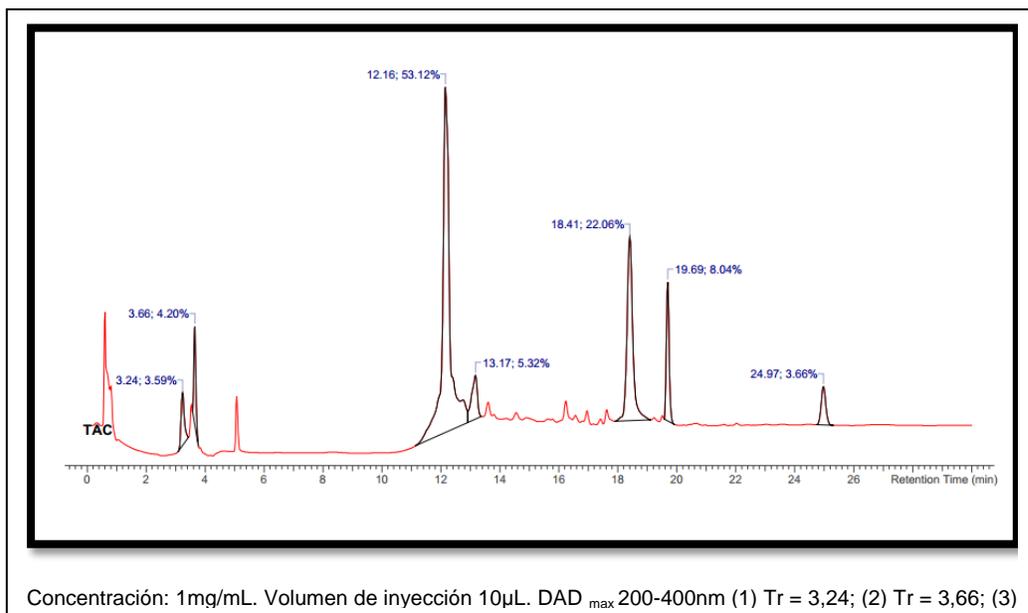


Figura 19. Perfil cromatográfico de la fracción F2 obtenida a partir del extracto total del cultivo *Streptomyces*.

Fuente: Autora.

En la tabla 14 se detallan los datos de la normalidad del área y el contenido de analitos (µg/mL) de la fracción activa F2 presentes en cada pico cromatográfico de la figura 19.

Tabla 14. Características de los picos cromatográficos obtenidos de la fracción activa F2.

Pico	Normalización del área (%)	Cantidad del analito (µg)
1	3,59	36
2	4,20	42
3	53,12	531
4	5,32	53
5	22,06	221
6	8,04	80
7	3,66	37

Fuente: Autora.

El cromatograma perteneciente a la subfracción **E** se muestra en la figura 20, en donde podemos observar la señal emitida por los componentes de la muestra generando seis picos cromatográficos a diferentes tiempos de retención. El pico 2 es el más representativo del grupo, presentando un contenido de analitos de 214 μg . La fracción estudiada presentó una actividad inhibitoria de 0,39 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frente a *E. faecalis*.

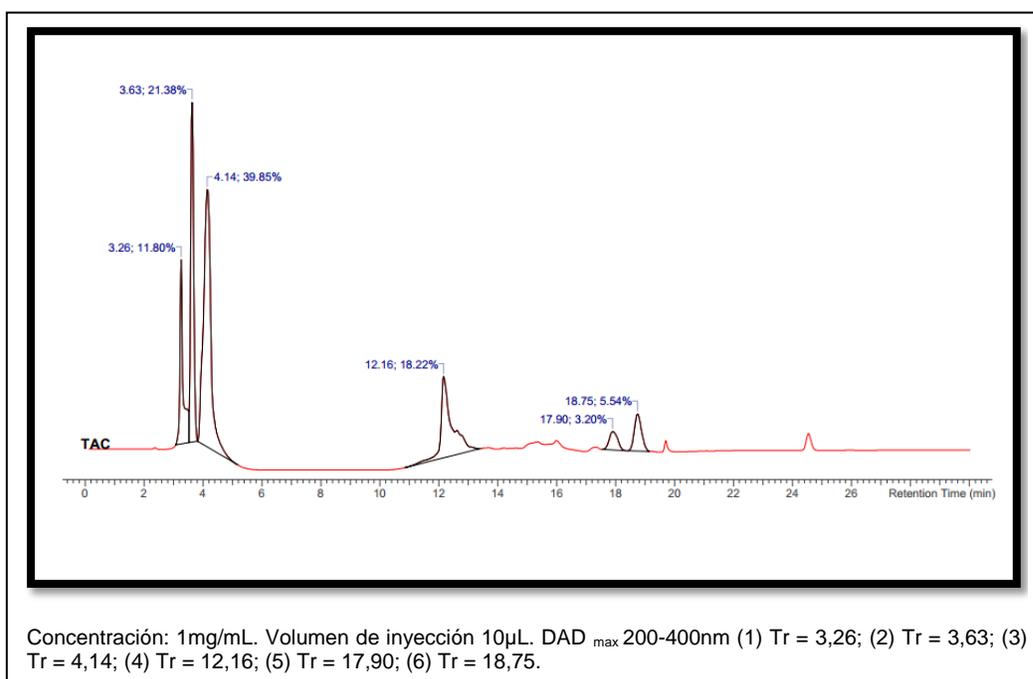


Figura 20. Perfil cromatográfico de la subfracción E obtenida a partir de la fracción F2 (extracto total).
Fuente: Autora.

En la tabla 15 se muestran los datos de normalidad del área y el contenido de analitos ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de los picos del cromatograma de la figura 20.

Tabla 15. Características de los picos cromatográficos obtenidos de la subfracción E.

Pico	Normalización del área (%)	Cantidad del analito (μg)
1	11,80	118
2	21,38	214
3	39,85	399
4	18,22	182
5	3,20	32
6	5,54	55

Fuente: Autora.

El cromatograma perteneciente a la subfracción de interés **F** se muestra en figura 21, en donde se observa siete picos cromatográficos definidos de acuerdo la señal emitida por los componentes de la muestra.

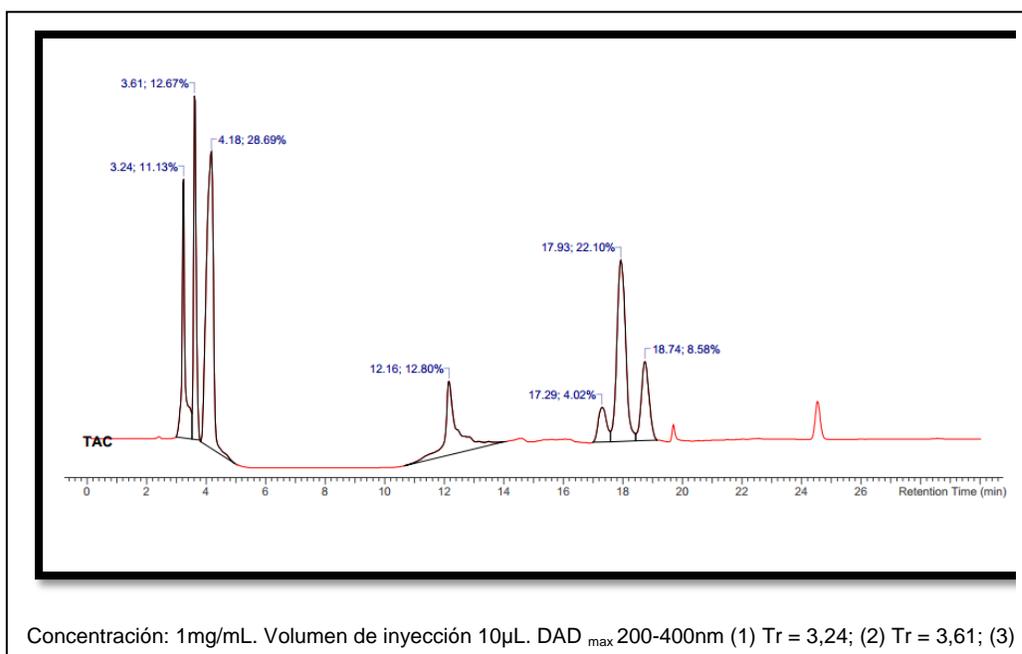


Figura 21. Perfil cromatográfico de la subfracción F obtenida a partir de la fracción F2 (extracto total).
Fuente: Autora.

En la tabla 16 se muestran los datos de normalidad del área y el contenido de analitos (µg/mL) de los picos del cromatograma de la figura 21 Como se puede observar los picos 3 y 6 contienen la mayor cantidad de analitos presentes en la subfracción de interés.

Tabla 16. Características de los picos cromatográficos obtenidos de la subfracción F.

Pico	Normalización del área (%)	Cantidad del analito (µg)
1	11,13	111
2	12,67	127
3	28,69	287
4	12,80	128
5	4,02	40
6	22,10	221
7	8,58	86

Fuente: Autora.

Comparando los cromatogramas de las subfracciones E y F obtenidas a partir de la fracción activa F2 por cromatografía en gel Sephadex® LH-20, podemos considerar que la presencia de un séptimo pico en la fracción F; con tiempo de retención 17,29 y espectro UV con un máximo de absorción 217 nm (figura 22) aporta considerablemente a la actividad biológica registrada frente a *E. faecalis* (0,19 µg/mL).

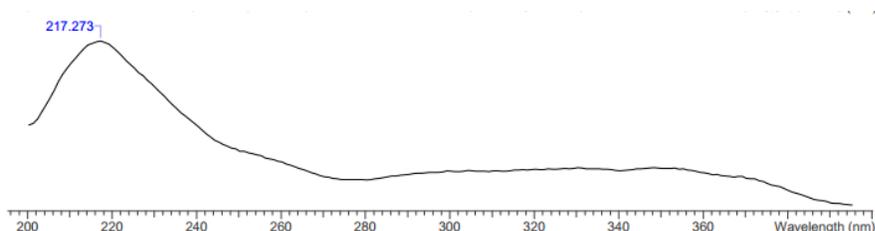


Figura 22. Espectro UV del pico de interés de la fracción F.
Fuente: Autora.

Mediante el presente estudio se consiguió realizar un estudio cuantitativo adecuado, separando mezclas complejas de los compuestos presentes en el extracto y las fracciones de interés, además el detector utilizado ofreció una respuesta adecuada al relacionar la medida del área del pico cromatográfico con la cantidad de analito contenida en la disolución inyectada, obteniendo mayor sensibilidad, la cual es casi imposible alcanzar por medio de cualquier otra técnica cromatográfica (Gascon & Fora, 1989).

CONCLUSIONES

- Mediante la técnica de cromatografía de filtración en gel Sephadex® LH-20, se logró separar los compuestos presentes en el extracto total de *Streptomyces* de acuerdo al tamaño de su molécula y a su comportamiento cromatográfico. El extracto total y la fracción F2 que presentaron actividad biológica importante son de mediano tamaño y de mediana polaridad de acuerdo a lo observado en cromatografía de capa fina.
- El extracto total presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI 0,78 µg/mL) frente a *E. faecalis* representando una fuerte actividad antibacteriana, de tal forma que podrían efectuarse ensayos posteriores utilizando esta cepa; su fracción F2 exhibió la actividad antibacteriana más importante (CMI 0,19 µg/mL).
- El cultivo de *Streptomyces* sp. alcanzó su máxima velocidad volumétrica y específica de producción de biomasa a las 48 horas de cultivo, inicio del periodo exponencial; el periodo estacionario se establece a partir de las 96 horas en donde alcanza su máxima velocidad volumétrica de producción metabólica. Luego de llegar a su velocidad máxima de producción metabólica y de biomasa, las velocidades disminuyen de manera lineal en el tiempo hasta llegar al periodo de senescencia.
- Los cultivos presentaron un tiempo de duplicación de 51 horas indicando un crecimiento lento de la población celular.
- El incremento del pH del cultivo junto con el cambio de tonalidad intensificado a partir de las 96 horas, es un indicativo de mayor producción metabólica generado por las bacterias durante su periodo estacionario de crecimiento.
- El tratamiento a los cultivos bacterianos mediante la adición de las dosis de peróxido de hidrógeno (100 mM, 50 mM y 10 mM) demostró no tener efectos significativos sobre el crecimiento poblacional en el cultivo *Streptomyces* en función del tiempo, información obtenida al aplicar el análisis estadístico T Student de los datos de peso seco (g/L) del cultivo.
- El tratamiento a los cultivos bacterianos mediante la adición de las dosis de peróxido de hidrógeno (100 mM, 50 mM y 10 mM) demostró tener efectos significativos sobre la producción metabólica del cultivo de *Streptomyces*, información conseguida al aplicar el análisis estadístico T Student de los datos obtenidos por peso seco (g/L).
- Se realizó un estudio cuantitativo mediante el uso de un método rápido y preciso por HPLC-DAD, el mismo que presentó mayor sensibilidad al utilizar el detector de arreglo de diodos para relacionar el área del pico con la cantidad de analitos presentes en la muestra. Además se observó la presencia de picos agudos y separación de los perfiles cromatográficos, factores indicativos de la eficacia del método.

RECOMENDACIONES

- Optimizar el proceso de fermentación del cultivo de *Streptomyces*, para obtener un mayor contenido de biomasa y aumento del rendimiento, además establecer un medio óptimo de producción de metabolitos secundarios de interés.
- Ampliar el estudio de las fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto total que presentaron actividad biológica significativa frente a *E. faecalis* y que no han sido estudiadas en el presente trabajo.
- A través de los procedimientos asociados al análisis y cuantificación de metabolitos secundarios mediante HPLC, desarrollar a futuro pruebas como espectrofotometría de masas y resonancia magnética nuclear, que permitan establecer si los diferentes extractos analizados presentan compuestos nuevos, o si se trata de un compuesto conocido, ya reportado para *Streptomyces* sp.
- El método denominado “Genérico_*Streptomyces*” sirve como base para posteriores análisis y cuantificación de metabolitos secundarios de diferentes cepas de actinomicetos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, D.Y., & Andrews, R.S. (1970). Introducción a la cromatografía. *a ed.*
- Alexander, R.R., & Griffiths, J.M. (1993). Basic biochemical methods. *Wiley-Lyss (Nueva York).*
- Baltz, R. (2005). Antibiotic discovery from actinomycetes: will a renaissance follow the decline and fall? *SIM News* 55: 186-96.9.
- Baltz, R., & Hosted, T. (1996). Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in actinomycetes. *TibTech.*, 14, 245-250.
- Bates, R., & Schaefer, J.P. (1977). Técnicas de Investigación en química orgánica. *Prentice-Hall Internacional.*
- Bergey, J., Hendricks, D., & Holt, J. (2000). Bergey's manual of determinative bacteriology. *Editorial Lippincott, novena edición.*
- Brock, T.M., M. (1993). Microbiología 6ta edición. *Prentice Hall Hispanoamérica S. A. México.* .
- Castro, R.M., & Martins, R.V. (2004). High capacity and low cost detection of prion protein gene variant alleles by denaturing hplc. *Jornal of Neuroscience Methods*, 139, 263-269.
- Challis, G., & Hopwood, D. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by streptomyces species. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2, 14555-14561.
- Chibata, I., & Tosa, T. (1977). Transformations of organic compounds by immobilized microbial cells. *Adv. in Applied Microbiol.* , 22, 1-27.
- Delatre, J., & Bonnefont, D. (1998). Oxidative stress, free radicals and aging. *Biotech Lab Int*, 3, 21-23.
- Demain, A. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 455-463.
- Dreyfus, M.; Chapela, I. H. (1994). "Potencial of Fungi in the Discovery of Novel, Low-Molecular Weight Pharmaceuticals", en Gullo, V. P. (ed.). *The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential.* Butterworth-Heinemann, Stoneham M. A. Boston, USA. Pp. 49-80.
- Fernández, J. (2004). Cromatografía líquida de alta resolución. *Investigation Group QUIMYTEC-UPCT.*
- Fischer, L. (1990). "Gel filtration chromatography". *Elsevier (Amsterdam).*
- Fogler, H. (1992). Elements of chemical reaction engineering. *Prentice-Hall International Editions.*
- Ford, J. (1996). The currents status of solid dispersions. *Pharm. Acta Helv*, 61, 69-88.
- Forsberg, L., de Faire, U., & Morgenstern, R. (2001). Oxidative stress, human genetic variation, and disease. *Arch Biochem Biophys*, 389, 84-93.
- Franco, M. (2009). Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización. *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 239-242.
- Gascon, F., & Fora, M. (1989). Validación de métodos analíticos. 2.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., & Cross, C.E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med*, 119, 598-620.
- Hammond, C. (1999). Experimental organic techniques. *Freeman, USA.*
- Harman, D. (1992). Free radical theory of aging. *Mutat Res.*, 275, 257-266.
- Holetz, F., Pessini, G., Sanches, N., Cortez, D., Nakamura, C., & Filho, B. (2002). Biological activity of species used in the Brazilian folk medicine. *MemInst Oswaldo Cruz*, 97. 1027-31.
- Hu, G. (1998). Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 9791-9795.
- Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., . . . Imanaka, H. (1987). Fk-506, a novel immunosuppressant isolated from streptomyces. 1: Fermentation, isolation and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot.*, 40, 1249-1255.
- Lacaz, C., Porto, E., & Martins, J. (1991). Micología médica: Fungos, actinomicetos e algas de interesse médico. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 33(4), 332-332.
- Lancini, G., Parenti, F., & Gallo, G. (1995). Multidisciplinary approach. *Plenum Press New York.*

- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G., & Marinelli, F. (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of a new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *78*, 399-405.
- Little, G., & Gordon, M. (1997). Survival fungus cultures maintained under mineral oil for twelve years. *59*: 733-736.
- Ludwing, H. (1998). Validation of analytical methods: Review and strategy. *LG International*, 96-105.
- Maier, R. (2000). "Biogeochemical Cycling", en Maier, R. M.; J. L. Pepper y C. P. Gerba (eds.). *Environmental Microbiology*. Academic Press, San Diego, USA. Pp. 319-346.
- Maldonado, L.; Stach, J.; Pathom-aree, W.; Ward A.; Bull, A. (2005). Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*. *87*: 11-18.
- Marshall, K., & Alexander, M. (1960). Growth characteristics of fungi and actinomycetes. (*Bacteriology*), 412-416
- Matés, J.M., & Pérez-Gómez, C. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, *32*, 595-603.
- Mincer, T.; Jensen, P.; Kauffman C.; Fenical, W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl. Environ. Microbiology*. *68*: 5005-5011.
- Montesinos, E. (2007). Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiology Letters*, *270*(1), 1-11.
- Navarro, G., & Rocha, F. (1998). Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas en cultivo sumergido. *Iberoam Micol*.
- Newman, D.; Cragg, G. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal Nat Prod*. *70*:461-77.
- Pandey, B., Ghimire, P., & Agrawal, V. (2004). Studies on the antibacterial activity of actinomycetes isolated from the khumbu region. 12-15.
- Pappano, N., Puig de Centorbi, O., & Ferreti, F. (1990). Determinación de la concentración inhibitoria mínima a partir de parámetros cinéticos de crecimiento. *21*(183-188).
- Pasto, D.J., Johnson, C.R., & Miller, M.J. (1992). Experiments and techniques in organic chemistry. *Prentice Hall*.
- Pezacka, E., & Wood, H. (1986). The acetyl-coa pathway: A newly discovered pathway of autotrophic growth. *Trends Biochem*(11), 14-17.
- Piñol, M., & Palazón, J. (1993). Metabolismo secundario. En: Fisiología y bioquímica vegetal. *Editorial Interamericana McGraw Hill*.
- Prescott, L.M. (2002). Microbiology. *Editorial McGraw-Hill, 5th ed.*, 524-528.
- Ribeiro, D., Marques, M., & Salvadori, D. (2006). Study of DNA damage induced by bleaching agents in vitro. *20*, 47-51.
- Salazar, A., & Ordoñez, C. (2013). Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la universidad tecnológica de pereira.
- Sarkanen, K. (1990). Chemistry of solvent pulping. *TAPPI Journal* *73*, 215:219.
- Skoog, D.A., & Leary, J.J. (1996). Análisis instrumental. *McGraw-Hill, Madrid*
- Sobell, H. (1985). Actinomycin and DNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, *82*, 5328-5331.
- Strohl, W., Bartel, P., Li, Y., NC., C., & Woodman, R. (1991). Expression of polyketide biosynthesis and regulatory genes in heterologous streptomycetes. *J. Ind. Microbiol.*, *7*, 163-174.
- Sylvia, D. (2005). Principles and applications of soil microbiology. *Pearson /Prentice Hall, Segunda Edición*, 259-306.
- Synder, L., Stadalius, M., & Quarry, M. (1983). Gradient elution in reversed-phase hplc separation of macromolecules. *Anal Chem*. *55*:1412-1430.
- Tomasz, M. (1995). Mitomycin c: Small, fast and deadly (but very selective). *Curr. Biol.*, *2*, 575-579.

- Toro, C., Patiño, P., & Ríos, R. (2001). Formulación de un medio de cultivo para la producción de pigmento. (23), 71-80.
- Torres, A., & Bonilla, G. (1999). Estudio de la relación carbono/nitrógeno y su influencia en la síntesis de prodigiosín. 68.
- Ullman, D., Larry, D., Bowers, L., & Burtis, C. (1999). Chromatography/mass spectrometry. En: Tietz textbook of clinical chemistry. *W.B Saunders Company, 3er edition*. .
- Uzcátegui, M., Serrano, J., Boiron, P., Rodríguez, V., Couble, A., Monié, D., . . . Panizo, M. (2011). Clasificación e identificación de especies de actinomicetos: Un estudio fenotípico comparativo. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 29(2)*, 91-97.
- Valcárcel, M. (1988). Técnicas analíticas de separación. *Reverté (Barcelona)*.
- Vimal, V., Rajan, B., & Kannabiran, K. (2009). Activity of marine actinomycete. *Asian J Med Sci., 1(2)*, 57-63.
- Vining, L. (1992). Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity. *Gene 115: 135-140*.
- Willard, H.H., Dean, J.A., & Settle Jr., F.A. (1991). Métodos instrumentales de análisis. *Grupo Editorial Iberoamericana S.A. de C.V., México*.
- Willett, H. (1997). Fisiología del crecimiento bacteriano. *Médica Panamericana S.A, 78*.
- Yuan, W., & Crawford, D. (1995). Characterization of streptomyces lydicus wyec108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. .
- Zhi-Qi, Q., Li-Xiang, C., Hong-Ming, T., & Shi-Ning, Z. (2006). Isolation and characterization of endophytic streptomyces sp. S5 with herbicidal activity from tomato roots. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 3(1)*, 7-12.

ANEXOS

**ANEXO 1. MEDIOS DE CULTIVO PARA ACTINOMICETOS
SUPLEMENTADOS CON AGUA DE MAR ARTIFICIAL.**

A. Fórmula para el agua de mar artificial: 10 Litros	
Solución 1 (disolver en 8 L)	
NaCl	211,90 g
Na ₂ SO ₄	35,5 g
KCl	5,99 g
NaHCO ₃	1,74 g
KBr	0,863 g
Ácido Bórico	0,230 g
NaF	0,028 g
Solución 2 (disolver en 1,93 L)	
MgCl ₂ .6H ₂ O	95,92 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	13,44 g
SrCl ₂ .H ₂ O	0,218 g
Nutriente 1 (añadir 10 mL de la solución stock)	
NaNO ₃	46,70 g en 1L H ₂ O
Nutriente 2 (añadir 10 mL de la solución stock)	
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	3,09 g en 1L H ₂ O
Solución Metales Stock 1-Hierro (añadir 10 mL de la solución stock)	
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,77 g en 1L H ₂ O
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	3,09 g
Solución Metales Stock 2- Metales Trazas (añadir 10 mL de la solución stock)	
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,073 g en 1L H ₂ O
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,016 g
MnSO ₄ .2H ₂ O	0,054 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,48 mg
Na ₂ SeO ₃	0,0173 mg
NiCl ₂ . 6H ₂ O	1,49 mg
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	2,44 g
Stock de Vitaminas (añadir 10 mL de la solución stock)	
Tiamina.clorhidrato	0,1 g en 1L

	H ₂ O _d
Biotina	2 mg
Vitamina B12	1 mg

B. Medio mínimo A1 (1L disolución)	
Almidón	10 g
Ext. Levadura	4 g
Peptona	2 g
Carbonato de calcio	1 g
Agua de mar artificial	%
Agua destilada	%
Suplementado	
Fe₂(SO₄)₃	5 mL/L u 8 g/L
KBr	5 mL/L u 8 g/L

Fuente: Departamento de Química – Sección Bioensayos.

ANEXO 2. VOLÚMENES APROXIMADOS PARA HIDRATAR SEPHADEX LH-20 EMPACADO CON DIFERENTES DISOLVENTES.

Table 2. Approximate packed medium volumes of Sephadex LH-20 as swollen in different solvents

Solvent	Approx. medium volume (ml/g dry powder)
Dimethyl sulfoxide	4.4–4.6
Pyridine	4.2–4.4
Water	4.0–4.4
Dimethylformamide	4.0–4.4
Methanol	3.9–4.1
Saline	3.8–4.2
Ethylene dichloride	3.8–4.1
Chloroform ¹	3.8–4.1
Propanol	3.7–4.0
Ethanol ²	3.6–3.9
Isobutanol	3.6–3.9
Formamide	3.6–3.9
Methylene dichloride	3.6–3.9
Butanol	3.5–3.8
Isopropanol	3.3–3.6
Tetrahydrofuran	3.3–3.6
Dioxane	3.2–3.5
Acetone	2.4–2.6
Acetonitrile ³	2.2–2.4
Carbon tetrachloride ³	1.8–2.2
Benzene ³	1.6–2.0
Ethyl acetate ³	1.6–1.8
Toluene ³	1.5–1.6

¹ Containing 1% ethanol.

² Containing 1% benzene.

³ Solvents giving a medium volume of less than about 2.5 ml/g dry powder are generally not useful.

Fuente: GE Healthcare Life Sciences.

ANEXO 3. FORMULACIÓN DE TRES MÉTODOS DIFERENTES A DISTINTOS PARÁMETROS DE ELUCIÓN PARA CUANTIFICAR LA PRESENCIA DE METABOLITOS PRESENTES EN *STREPTOMYCES*.

Método 1: Gradiente_St.

Eluciones empleadas:

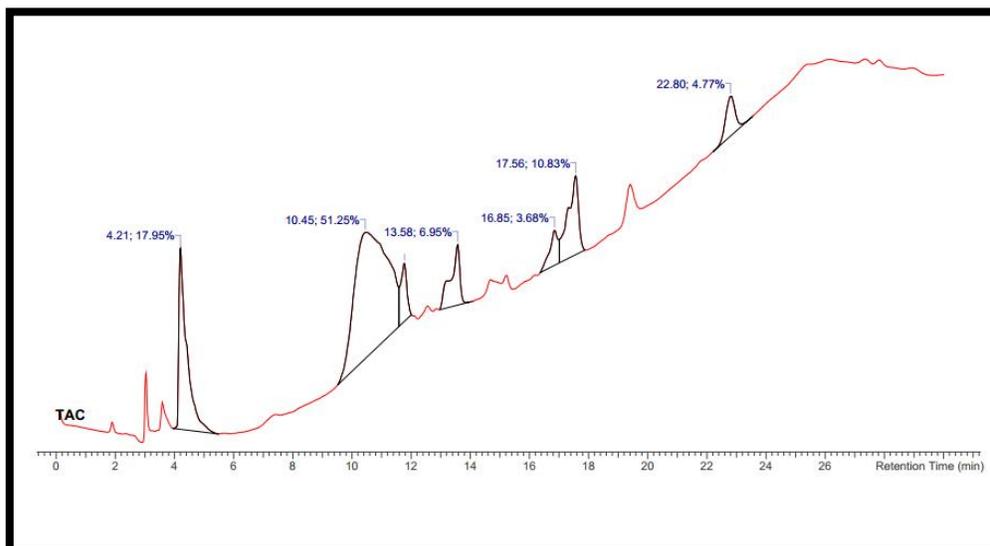
Tiempo (min)	Solventes		Curva
	A (%)	B (%)	
0.00	10	90	1
20.00	100	0	6
30.00	100	0	1

Etiquetado:

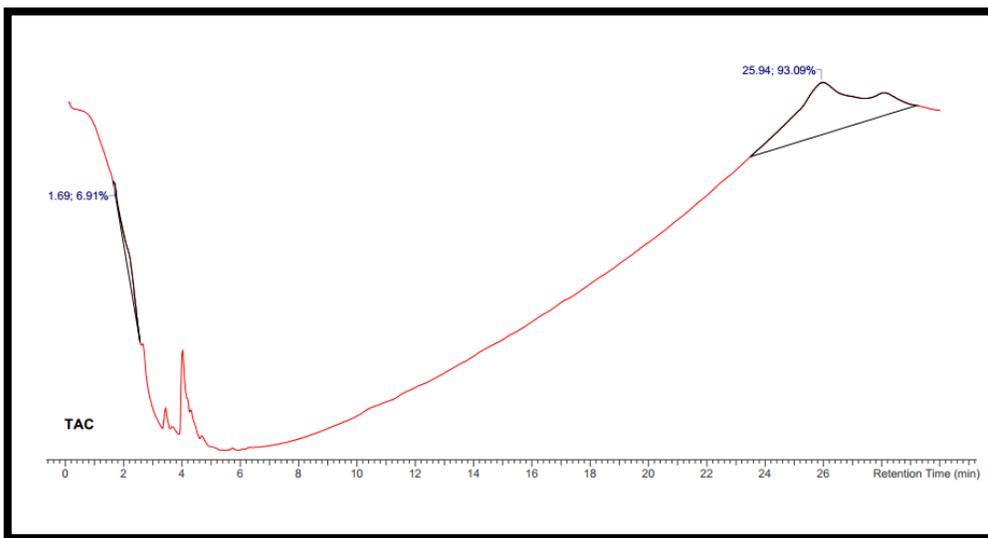
Extracto	Etiqueta
Extracto total	MJG3_1
Fracción F2	MJG3_2
Fracción F2: E	MJG3_5_E
Fracción F2: F	MJG3_6_F

Cromatogramas obtenidos del extracto total y las fracciones de interés mediante el método.

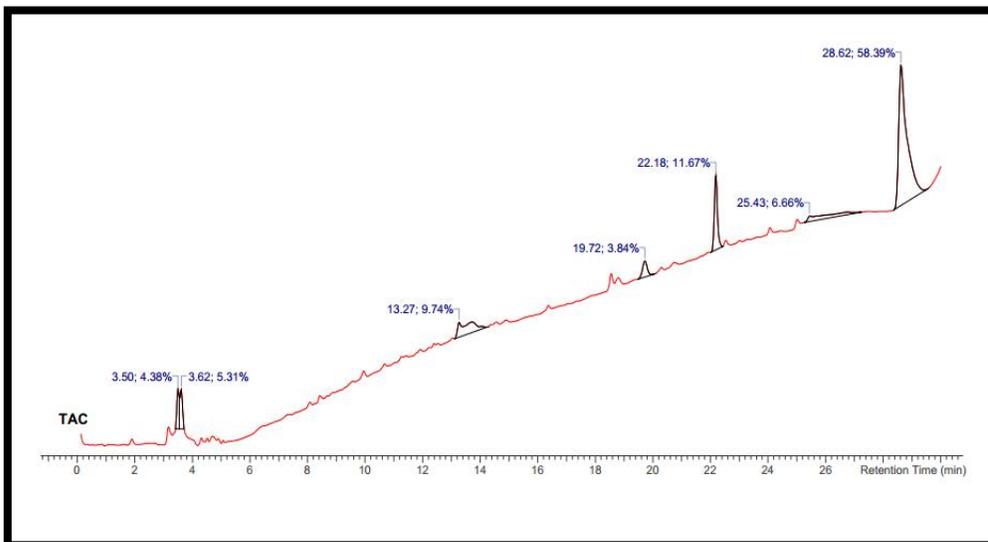
MJG3_1



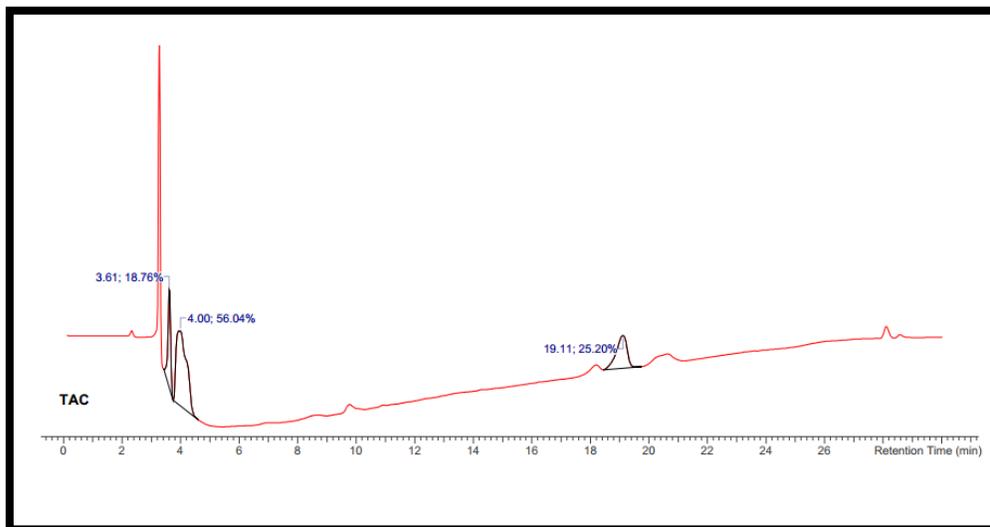
MJG3_2



MJG5_5_E



MJG_6_F



Método 2: Actino_St.

Eluciones empleadas:

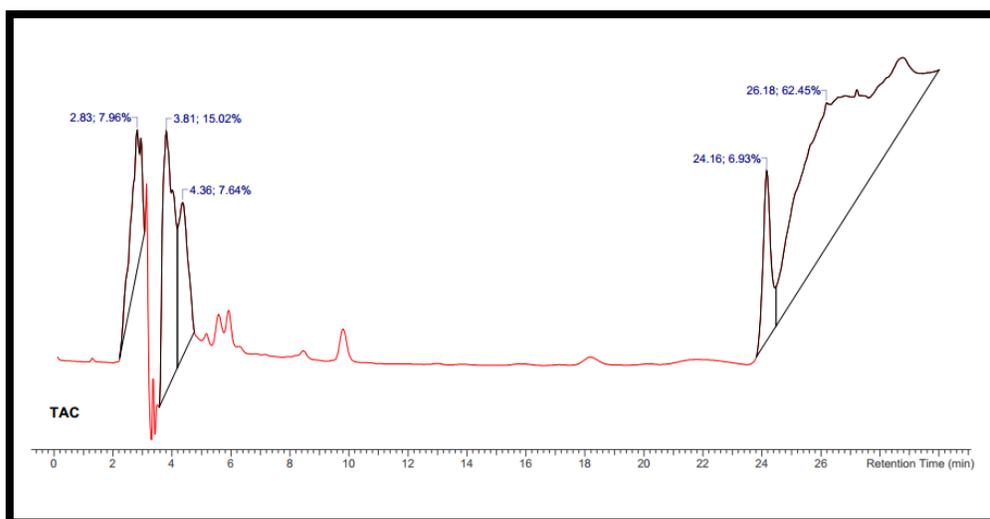
Tiempo (min)	Solventes		Curva
	A (%)	B (%)	
0.00	50	50	1
20.00	50	50	1
30.00	100	0	1

Etiquetado:

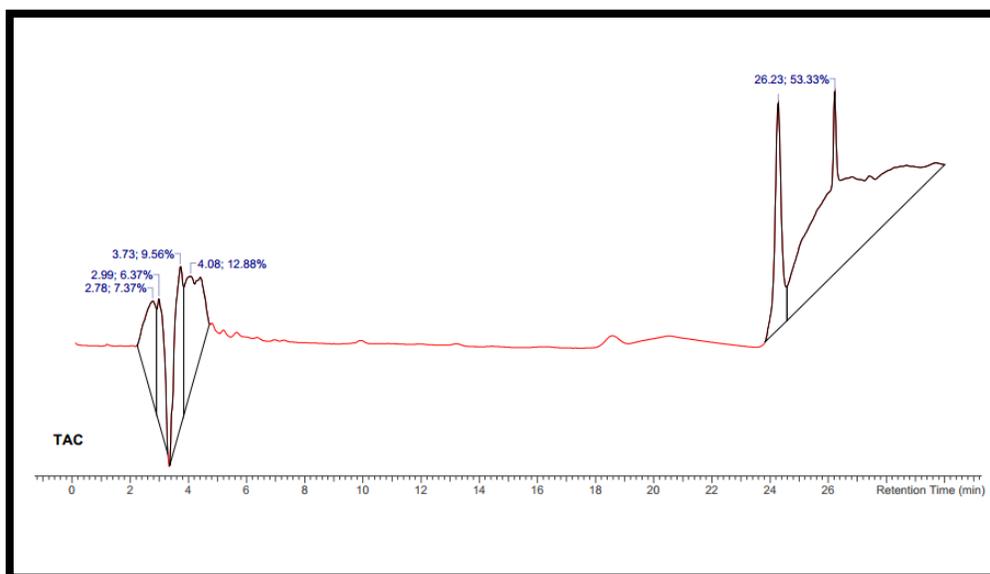
Extracto	Etiqueta
Extracto total	MJG3_3
Fracción F2	MJG3_4
Fracción F2: E	MJG3_7_E
Fracción F2: F	MJG3_8_F

Cromatogramas obtenidos del extracto total y las fracciones de interés mediante el método.

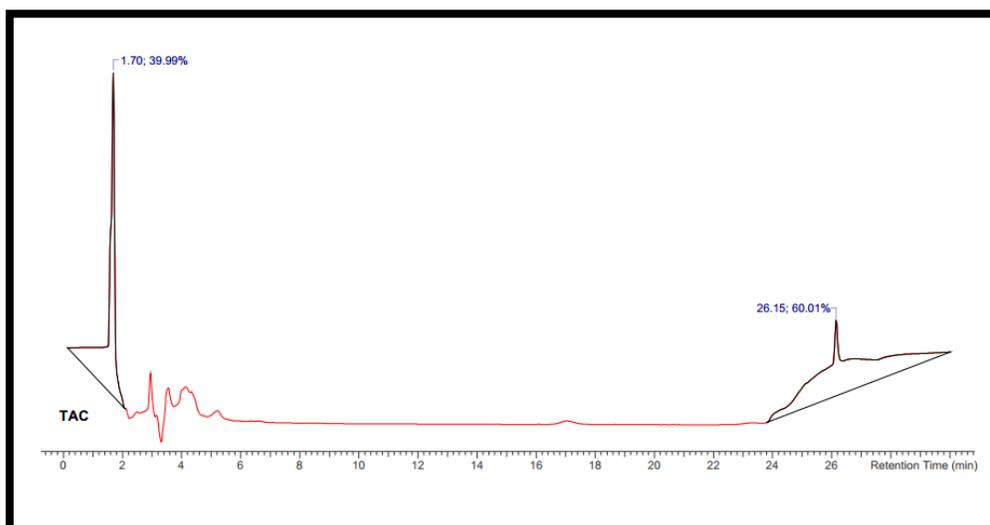
MJG3_3



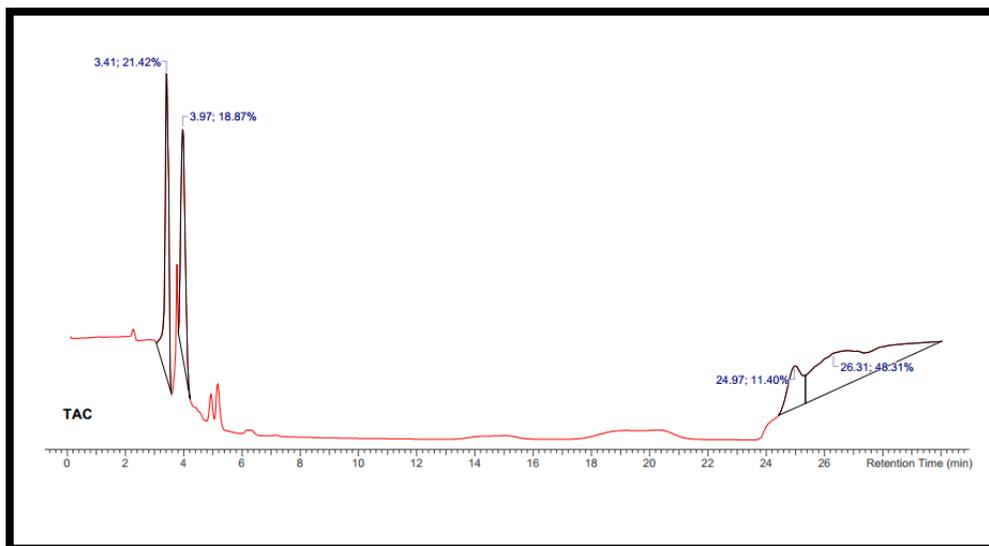
MJG3_4



MJG3_7_E



MJG3_8_F



Método 3: Genérico (1St).

Eluciones empleadas:

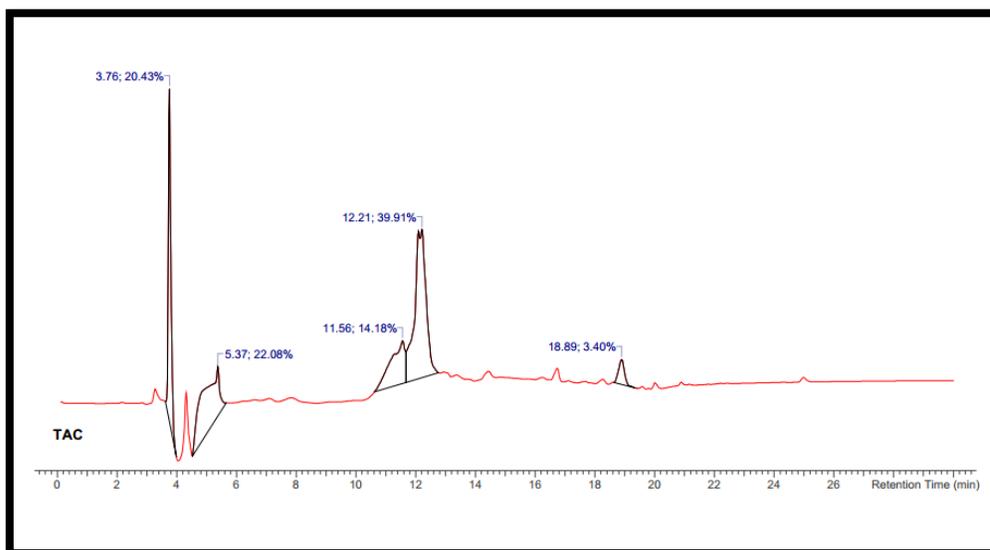
Tiempo (min)	Solventes		Curva
	A (%)	B (%)	
0.00	5	95	1
5.00	5	95	1
7.00	50	50	6
9.00	50	50	1
15.00	100	0	6
30.00	100	0	1

Etiquetado:

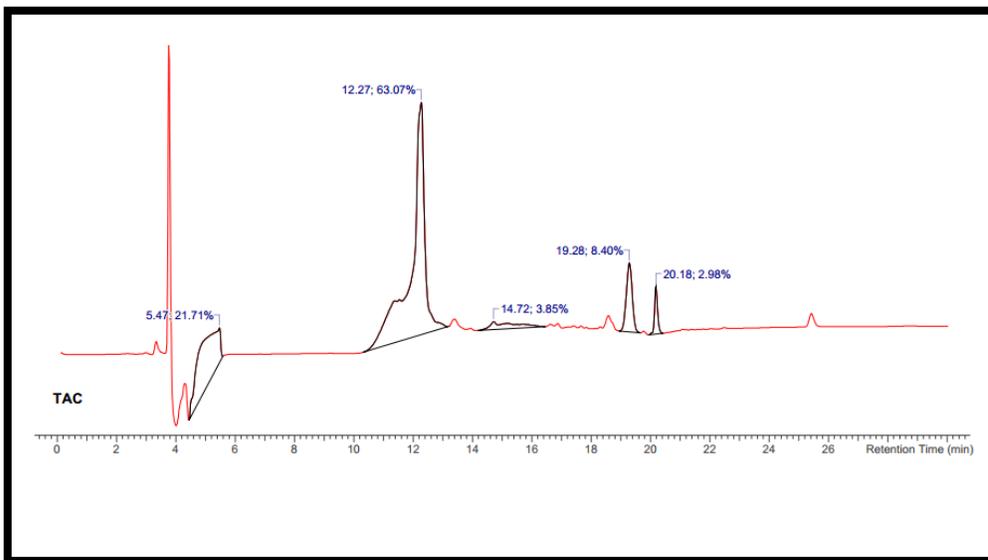
Extracto	Etiqueta
Extracto total	MJG3_1T
Fracción F2	MJG3_F2
Fracción F2: E	MJG3_F2_E
Fracción F2: F	MJG3_F2_F

Cromatogramas obtenidos del extracto total y las fracciones de interés mediante el método.

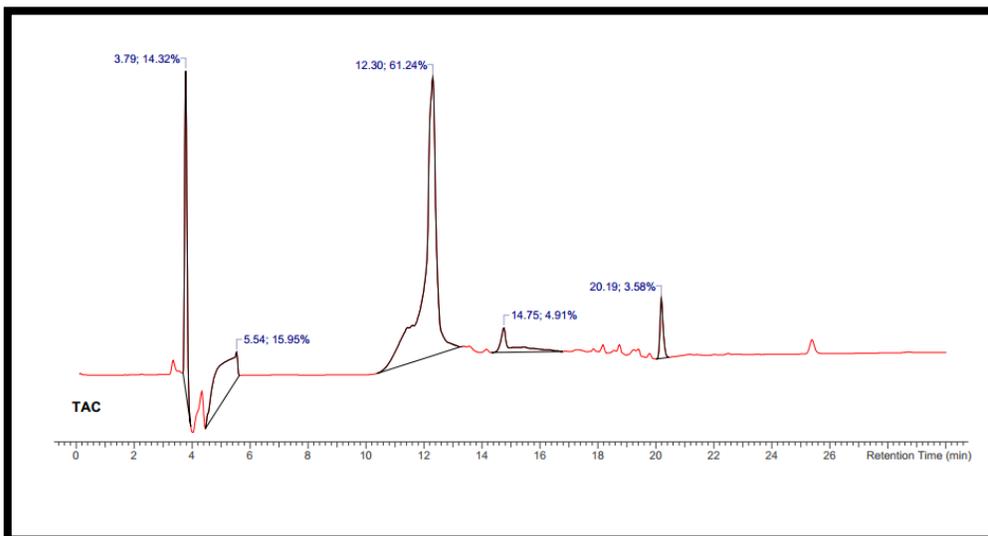
MJG3_1T



MJG3_F2



MJG3_F2_E



MJG3_F2_F

