



Universidad de Concepción

Facultad de Ciencias Químicas

Programa de Magíster en Ciencias con Mención en Química

«Obtención y caracterización parcial de moléculas bioactivas, de *Bacillus amyloliquefaciens* presente en sedimento marino obtenidos desde el litoral de la VIII región, Chile»

Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias con Mención en Química

Liliana Lara Campos

Profesor guía: Dr. Mario Silva O.

Departamento de Fitoquímica.

Concepción, Marzo 2016

RESUMEN

Los productos naturales han contribuido desde la antigüedad a la salud humana, centrados particularmente en el estudio de metabolitos secundarios de plantas para la obtención de diversos compuestos bioactivos. En los últimos años han surgido limitaciones producto del aumento de la resistencia de varios microorganismos causantes de numerosas patologías. Sobre la base de esta información, se consideró necesaria la investigación de nuevos recursos, que puedan brindar nuevas y potentes moléculas bioactivas. Desde 1940 con la aparición de medicamentos obtenidos, tal como penicilina, es que desde 1990 se inició la búsqueda intensa de nuevas moléculas en los océanos, que presentan una potente e inexplorada fuente de nuevos compuestos con elevado potencial farmacológico.

La bahía de Concepción se encuentra inmersa en uno de los ecosistemas marinos más heterogéneos e interesantes del mundo, la corriente de Humboldt. Es por ello que la búsqueda de compuestos provenientes desde microorganismos que habitan este ecosistema es sin duda una gran oportunidad para descubrir nuevas potencialidades.

Con este objetivo es que se aisló *Bacillus amyloliquefaciens* desde sedimento marino, cercano a desembocaduras de río Biobío e Itata. Esta bacteria fue fermentada en medio YPM con agua de mar filtrada, luego de 20 días se hizo la extracción con Acetato de Etilo 100% y fraccionó mediante cromatografía de columna Flash y HPLC, una vez purificada la fracción de interés y obtenido el compuesto puro mediante LS-MS, GC-MS, ELSD y RMN. Se estudió la estructura del compuesto activo. Estudio que indicó la presencia de grupo metil éster en su estructura, por lo que podría corresponder a un policétido del tipo macrólido (Macrolactina) aislado desde este microorganismo en otros estudios.

La investigación presenta diversas proyecciones considerando el elevado potencial bioactivo del compuesto aislado, por lo que continuaran los estudios de la molécula aislada para determinar mayores características estructurales.

ABSTRACT

Since ancient times, natural products have contributed to human health, particularly the secondary metabolites studies of plants to obtain different bioactive components. In the last few years, some limitations come up due to the increasing resistance of several disease-carrying microorganisms. According to the above, the investigation of new resources was necessary in order to obtain new and powerful bioactive molecules. Since the appearance of drugs obtained from the penicillin in 1940, a search for new molecules in the oceans was initiated during de 90s. This search presents a powerful and unexplored source of new compounds with high pharmacological power.

The bay of Concepción is immersed in the Humboldt Current, which is one of the most heterogeneous and interesting marine ecosystems in the world. It is for this reason that the search of compounds deriving from microorganisms that live in this ecosystem is an important opportunity to discover new potentialities.

For this purpose *Bacillus amyloliquefaciens* was isolated from marine sediment near the Biobío and Itata river mouths. This bacteria was fermented in YPM medium (yeast, peptone, mannitol) with filtered seawater. After 20 days the extraction was made with 100% ethyl acetate and it was fractionated using Flash column chromatography and high pressure liquid chromatography (HPLC). Once the fraction of interest was purified and the pure compound is obtained through LS- MS, GLC- MS, NMR and ELSD, the structure of the active compound was studied.

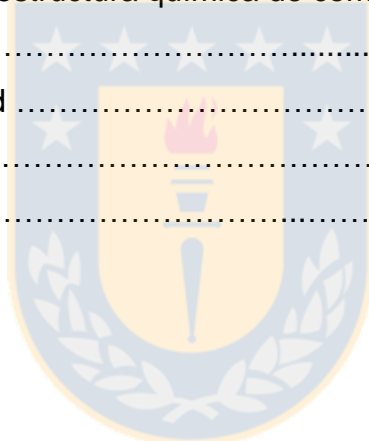
This study indicated the presence of methyl ester group in its structure, which could correspond to a polyketide macrolide type (Macrolactina) isolated from the same organism in other studies.

The research presents various projections considering the high potential of the isolated bioactive compound, continuing studies to determine higher characteristics of the isolated molecule.

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 Hipótesis.....	17
1.2 Objetivo general.....	17
1.3 Objetivos específicos.....	17
2. METODOLOGÍA.....	18
2.1 Toma de muestras y preparación de cultivos.....	18
2.2 Obtención y almacenamiento de cultivo bacteriano.	19
2.2.1 Prueba preliminar de actividad antifúngica.....	20
2.2.2 Prueba preliminar de actividad antibacteriana.....	20
2.3 Caracterización genética bacteria.	20
2.4 Cultivo de cepa bacteriana	21
2.5 Extracción compuestos	21
2.5.1 Mediante decantación líquido-líquido.	21
2.5.2 Mediante resina (Amberlite® XAD® 2).....	22
2.6 Evaluación cromatográfica de extractos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	23
2.7 Separación y evaluación bioactiva de extractos obtenidos.....	23
2.7.1 Separación mediante cromatografía de capa fina (TLC).....	23
2.7.2 Mediante columna cromatográfica rápida con otro programa.....	27
2.8 Separación y obtención de compuestos puros mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y detector evaporativo de dispersión de la luz(ELSD).....	30
2.9 Dilucidación de estructura química de compuesto bioactivo mediante LC/MS, GC/MS, RMN.....	31
2.10 Prueba de citotoxicidad	32
2.10.1 Preparación medio de cultivo y sembrado de placa 96 wells.....	32
2.10.2 Exposición de medio de cultivo a extractos.....	33
2.10.3 Lectura efecto citotóxico de extracto	34

3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	36
3.1 Caracterización genética bacteriana.....	36
3.2 Cultivo de cepa bacteriana.....	37
3.3 Extracción fase orgánica y separación compuestos bioactivos.....	37
3.3.1 Extracción mediante decantación líquido-líquido – separación compuestos bioactivos mediante cromatografía placa fina (TLC).....	37
3.3.2 Extracción mediante decantación líquido-líquido – separación compuestos bioactivos mediante columna cromatográfica rápida.....	40
3.3.3 Extracción mediante resina (Amberlite® XAD® 2) – separación compuestos bioactivos mediante columna cromatográfica flash.....	44
3.4 Separación y obtención de compuestos puros mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y detector evaporativo de dispersión de la luz (ELSD).....	51
3.5 Dilucidación parcial de estructura química de compuesto bioactivo mediante LC/MS, GC/MS, RMN.....	53
3.6 Pruebas de citotoxicidad	57
4.CONCLUSIÓN.....	60
5. REFERENCIAS.....	61



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Macrolactin V obtenida desde <i>Bacillus amilolyquefaciens</i>	15
Figura 2. Punto de muestreo cercano a desembocaduras ríos Biobío e Itata localizado 20 Km desde la línea de la costa (36°31'59,08''S, 73°17'39,26''W.....	18
Figura 3. A) Cultivo microbiano obtenido de sedimento marino B) Cultivo puro de cepa bacteriana aislada desde cultivo de Sedimento marino.....	19
Figura 4. Esquema sembrado placa 96 Wells para ensayo citotoxicidad.....	34
Figura 5. Esquema sembrado placa 96 Wells de extracto citotóxico para fracciones con porcentaje de viabilidad menor a 50% a diferentes concentraciones.....	35
Figura 6. Visualización placas TLC con extracto total. A) Lámpara UV λ 254 nm. B) Lámpara UV λ 365 nm. C) Revelada con ácido sulfúrico 30%.....	37
Figura 7. Halos de inhibición bioensayo extracto total <i>B. amyloliquefaciens</i> contra <i>S. Aureus</i> . 1) 14 mm diámetro. 2) 13 mm diámetro.....	38
Figura 8. Cromatogramas fracción 1 de extracto bioactivo de <i>B. amyloliquefaciens</i> obtenido por TLC. A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm.....	39
Figura 9. Cromatogramas fracción 2 de extracto bioactivo de <i>B. amyloliquefaciens</i> obtenido por TLC. A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm.....	39

Figura 10. Cromatogramas fase orgánica cultivo de <i>B. amyloliquefaciens</i>	
A) 210nm B) 254nm C) 310nm.....	40
Figura 11. Visualización placas TLC fracciones obtenidas mediante columna rápida	
A) Lámpara UV λ 254 nm B) Lámpara UV λ 365 nm C) Revelada con ácido sulfúrico 30%	41
Figura 12. Halos de inhibición, bioensayo extracto total <i>B. amyloliquefaciens</i> contra <i>S. Aureus</i> . A) 17 mm diámetro. B) 15 mm diámetro	42
Figura 13. Cromatogramas fracción 5 de extracto bioactivo de <i>B. amyloliquefaciens</i>	
A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm	42
Figura 14. Cromatogramas fracción 8 de extracto bioactivo de <i>B. amyloliquefaciens</i>	
A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm.....	43
Figura 15. Cromatogramas extracto total obtenido en elución con acetona	
A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm.....	44
Figura 16. Cromatogramas extracto total obtenido con metanol.	
A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm	45
Figura 17. Visualización placas TLC, 14 fracciones obtenidas mediante columna flash.	
A) Lámpara UV λ 254 nm B) Lámpara UV λ 365 nm	
C) Revelada con ácido sulfúrico 30%	46
Figura 18. Halo de inhibición bioensayo fracción 14 obtenida mediante columna cromatográfica Flash contra <i>S. Aureus</i> , 12 mm diámetro.....	46

Figura 19. A) Extracto total extracción líquido – líquido fraccionado por columna flash visto bajo lámpara UV (λ 210 nm). B) Extracto total extracción líquido – líquido fraccionado por columna flash visto bajo lámpara UV (λ 310 nm). C) Extracto total extracción líquido – líquido fraccionado por columna flash revelado con ácido sulfúrico0.....	47
Figura 20. Ensayos bioactividad contra <i>S. aureus</i> extracto total extracción líquido – líquido fraccionado por columna flash de las 5 fracciones que mostraron actividad positiva.....	48
Figura 21. Cromatogramas fracción 6 A) 210 nm. B) 254 nm C) 310 nm	49
Figura 22. Cromatogramas fracción 7 A) 210 nm. B) 254 nm C) 310 nm	49
Figura 23. Cromatogramas fracción 8 A) 210 nm. B) 254 nm C) 310 nm	50
Figura 24. Cromatogramas fracción 9 A) 210 nm. B) 254 nm C) 310 nm	50
Figura 25. Cromatogramas fracción 8 mediante ELSD. A) Diagrama total de análisis B) Diagrama tiempo 15 – 20 Min	52
Figura 26. Cromatogramas compuesto puro con bioactividad contra <i>S. aureus</i> A) 210 nm. B) 254 nm C) 310 nm.....	53
Figura 27. Cromatogramas compuesto puro obtenidos en LC/MS	54
Figura 28. Espectro de masas para compuesto puro mediante GC/MS	55
Figura 29. Espectrometro RMN-H, compuesto puro disuelto en CDCl_3 (7.2 ppm).56	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Método, gradiente acetonitrilo – agua, utilizado en HPLC...30

Tabla 2. Condiciones análisis de espectrometría de masa31

Tabla 3. Programa de calentamiento cromatógrafo de gases.....32



ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Citotoxicidad del extracto total evaluado a una concentración de 50 µg/mL por 24 horas sobre las células neuro-2a.....57
- Gráfico 2.** Actividad citotóxica de fracciones evaluadas sobre células Neuro-2a y MCF 7 por 24 horas a una concentración de 50 µg/mL.....58
- Gráfico 3.** Citotoxicidad de fracción 6 sobre células Neuro 2a por 24 horas a diferentes concentraciones 59



1. INTRODUCCIÓN

Durante siglos la fuente de obtención de medicamentos han sido los productos naturales obtenidos desde organismos como animales y plantas (Garateix, A. *et al.*, 2005).

El descubrimiento de antibióticos es considerado uno de los hechos más significantes en los tiempos modernos. Desde el descubrimiento de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming, se marcó el comienzo de una nueva era, caracterizada por la utilización de productos naturales desde microorganismos, como fuentes de obtención de compuestos con variadas propiedades antibióticas y citotóxicas (Acuña, G. *et al.*, 2003).

La búsqueda sistemática de nuevos antibióticos a partir de microorganismos, desde el medio terrestre, condujeron al descubrimiento de compuesto con elevado potencial, como estreptomina y otros. El prolongado estudio del medio terrestre se ve vinculado a un agotamiento de los recursos naturales, principalmente para el caso de estudios en plantas, en donde se hace necesario el trabajo en elevadas toneladas de materia prima para obtención de una cantidad apropiada de metabolitos secundarios de interés.

De manera particular, los organismos marinos han mostrado ser un potente recurso de compuestos farmacológica y estructuralmente únicos (Butler. M.S. *et al.*, 2008).

Con el transcurso de los años, muchas investigaciones se han enfocado en el estudio del potencial que se esconde en los océanos, los cuales cubren el setenta por ciento de la superficie terrestre y albergan la mayor parte de la biodiversidad del

planeta (Fenical W. and Jensen P. R. *et al.*, 2006). Plantas, animales y microorganismos que forman el ecosistema marino, han tenido que adaptarse a variadas y extremas condiciones, tanto de presión, temperatura, luz, pH y salinidad. Siendo reconocidos por producir compuestos estructural y bioactivamente diferentes de los reportados desde el medio terrestre, generando así, compuestos con un elevado potencial farmacológico (Blunt *et al.*, 2012).

En los últimos años, la implementación de nuevas técnicas y nuevos recursos biotecnológicos han facilitado la investigación en este potente hábitat, entregando nuevos e importantes descubrimientos (Bhadury, P. *et al.*, 2006). Investigaciones tanto biológicas como químicas han contribuido a un mayor acercamiento con las maravillas y complejidades que poseen los microorganismos que habitan en él, ofreciendo una elevada variedad de metabolitos secundarios con beneficios biológicos (Prudhomme J. *et al.*, 2008).

Los antibióticos han contribuido en la evolución de la medicina en muchos aspectos, marcando un punto importante en la historia de la humanidad.

Lamentablemente, el exitoso uso de algunos agentes terapéuticos está limitado por el potente desarrollo de cepas, resistentes a los antibióticos usados en el tratamiento contra bacterias, hongos, infecciones virales y parásitos. (Piddock L. *et al.*, 2012).

La Organización Mundial de la salud, señaló en el primer informe de carácter mundial sobre resistencia antibiótica: “estamos viviendo una era post antibióticos, en la que infecciones comunes que pueden matar, es un hecho real en el siglo XXI”. La grave amenaza que genera el aumento de cepas resistentes, ha dejado de ser una previsión para el futuro y es ya, en todos los países del mundo, una realidad, que puede afectar a cualquier persona, de cualquier edad, en cualquier país (Thomas, G. 2014).

De este modo en los últimos años se han aislado metabolitos de hongos y actinomicetes poseedores de variadas moléculas con estructura y propiedades únicas (Gordon M. *et al.*, 2013).

Muchas de las bacterias patógenas asociadas con epidemias de enfermedades humanas han evolucionado hasta ser resistentes a múltiples fármacos, tal es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, patógeno encontrado en países en desarrollo e industrializados. Convirtiéndose en un viejo patógeno en el siglo XXI. Otras infecciones nosocomiales, son causadas por múltiples bacterias, entre las que se encuentra *Staphylococcus aureus*. Esta bacteria ha sido denominada una “superbacteria”, debido a que posee una estrecha relación con la humanidad, al estar presente en un treinta por ciento de la población y vinculada a infecciones comunes de la piel, tales como forúnculos. (Davies J. and Davies D. *et al.*, 2010).

Si bien *S. aureus* no tiene la historia que *M. tuberculosis*, será en los próximos años la resistencia a esta “superbacteria” la mayor infección intrahospitalaria.

Estimaciones señalan que tanto en Europa y Estados Unidos, la resistencia antimicrobiana causa cincuenta mil muertes cada año y se espera que esta cifra se eleve a más de diez veces para el año 2050. Teniendo un mayor impacto aún, la resistencia de *Escherichia. coli*, la malaria y la tuberculosis (Fergus, W. *et al.*, 2014).

La industria farmacéutica en 1995 señaló que, de doce mil antibióticos reportados, el veintidós por ciento era producido por hongos filamentosos, mientras que actinobacterias han otorgado siete mil de los compuestos reportados, sumado a los más de novecientos compuestos obtenidos desde la biota marina reportados hacia 2005 (Newman, D. *et al.*, 2007; Jensen P. R. *et al.*, 2005). Por ello las investigaciones de han dirigido al estudio de microorganismos marinos, los cuales han otorgado diversos compuestos provenientes principalmente desde procesos metabólicos de

microorganismos asociados a macroorganismos (esponjas y tunicados) (Piel. *et al.*, 2009).

Entre los años 1997 y 2008 fueron reportados 659 compuestos bioactivos, demostrando la elevada productividad de los diversos microorganismos, en donde destacan las actinobacterias (Williams. *et al.*, 2009). Hasta la fecha se han descrito más de quince mil compuestos marinos; aunque la mayoría tienen su aplicación en el área del cáncer, es de destacar la reciente aprobación por parte de la FDA del Prialt (ziconotida), péptido neurolizante con aplicación en anestesia y que debe ser empleado a dosis mucho más bajas que la morfina (Calle, F. D. L. *et al.*, 2009).

Así, diversas investigaciones se han enfocado en el cultivo de bacterias marinas con el fin de estudiar a cabalidad su producción metabólica (Williams. *et al.*, 2009). Demostrando que metabolitos secundarios producidos por bacterias son más activos que aquellos derivados de hongos (Subramani & Aulbersbery. *et al.*, 2012).

Actualmente, cerca de ochenta clases de bacterias han sido definidas, de las cuáles solo un treinta por ciento han sido cultivadas en laboratorios.

Las actinobacterias destacan por la producción de diversos productos naturales, ejemplo de esto, es que aquellas pertenecientes al orden actinomycetal, han generado cerca de diez mil de estos productos.

El género *Streptomyces* de manera particular produce entre el setenta a ochenta por ciento de potentes productos naturales definidos (Watve. M. G. *et al.*, 2001). Otros géneros sin embargo presentan de igual forma una amplia variedad de metabolitos secundarios bioactivos, tal es el caso, de aquellas pertenecientes al género *Bacillus*, en donde diversas investigaciones han mostrado que estas bacterias,

poseen metabolitos secundarios con un potencial biológico importante con aplicaciones en diversas áreas, tal es el caso de “*Bacillus amyloliquefaciens*”, cuyas recientes investigaciones han identificado dos nuevas Macrolactinas (He S. *et al*, 2013), que muestran actividad contra *Bacillus subtilis* y *S. aureus*, aisladas desde una cepa *Bacillus* proveniente de un alga *Schizymeria dubyi*. Mientras que desde cepas de *Bacillus Amilolyquefaciens* aislada desde sedimento marino se obtuvo Macrolactina V (figura 1), un anillo lactónico de 24 miembros que presenta destacable actividad antimicrobiana y antiviral frente a Herpes Simplex (Lu. *et al.*, 2008).

Diferentes especies pertenecientes a este género son muy abundantes en la naturaleza, siendo aisladas desde diversos medioambientes (agua dulce, agua salada, suelo, plantas y animales), caracterizándose por crecer en condiciones aeróbicas formando esporas latentes. Gracias a su gran diversidad metabólica, han sido ampliamente aprovechadas en biotecnología para la producción de moléculas con elevado potencial bioactivo, sumándose a las anteriormente ya mencionadas, riboflavina, estreptavidina y β - lactamasas. (Maughan & van der Auwera. *et al.*, 2011).

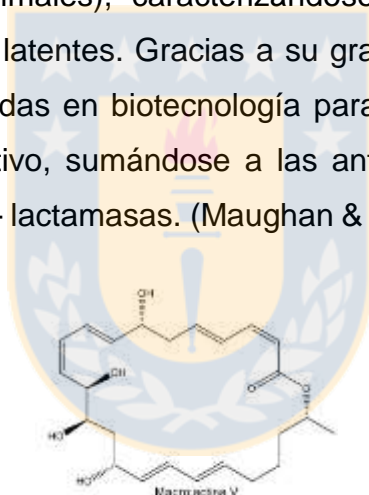


Figura1. Macrolactin V obtenida desde *Bacillus amilolyquefaciens*.

Investigaciones de microorganismos marinos en Chile son deficientes considerando que posee más de 5400 Km de costa, en donde tienen lugar diversos fenómenos de surgencia costera, particularmente en la zona centro-sur, en donde múltiples ecosistemas marinos se encuentran conjugando diversos factores meteorológicos y oceanográficos (Sobarzo M. *et al.*, 2007). De manera particular, las aguas de la plataforma continental adyacente a la bahía de Concepción, son afectadas por múltiples condiciones, entre las que destaca el efecto que tiene la proximidad de desembocaduras de ríos, variando condiciones de salinidad,

temperatura, presión y oxígeno durante el año (Neira K. *et al.*, 2007).

Estudios señalan que la estructura hidrográfica frente a Concepción se caracteriza por una fuerte influencia de vientos influyendo altamente en un variado ecosistema marino. Caracterizándose también por una diversa variabilidad estacional debido al Sistema de la Corriente de Humbolt (HCS), caracterizado por ser uno de los ecosistemas marinos más productivos del planeta, su oceanografía se distingue por un flujo hacia el Norte de aguas superficiales de origen antártico y por la fuerte corriente ascendente de aguas subsuperficiales ricas en nutrientes de origen ecuatorial. Ambos factores generan una surgencia localizada en el centro-sur de Chile, intercalada con fenómenos climáticos de gran escala, traduciéndose en una elevada heterogeneidad de condiciones espacio-temporal (Sobarzo M. *et al.*, 2010).

Todos estos factores contribuyen a que el área de Concepción sea uno de los ecosistemas más interesante del mundo (Montero P. *et al.*, 2007).

Los variados factores ambientales y antropogénicos, intervienen en las rutas metabólicas de los microorganismos presentes en la zona. Así lo señalan extractos de hongos marinos. Los cuales han evidenciado una alta probabilidad de sintetizar metabolitos secundarios con actividad antibacteriana como mecanismo de defensa (Robirosa. *et al.*, 2006, Cueto. *et al.*, 2001, Krohn. *et al.*, 2005).

Las únicas condiciones en las que se encuentra la gran biodiversidad de microorganismos marinos los señalan como potente fuente de nuevos compuestos con diversas propiedades biológicas, por ello, es que debemos sacar partido de este enorme recurso y continuar aumentando la investigación en él.

1.1 Hipótesis

Sin duda el océano es una enorme y potente fuente de recursos inexplorados. De manera particular, la biodiversidad de microorganismos es impensada y con ello sus propiedades.

Tenemos a nuestro alcance el acceso a diferentes tecnologías que nos permiten el avance en la investigación de ecosistemas con condiciones diversas, en donde se desarrollan microorganismos con una gran biodiversidad biológica, la que se traduce en una gran variedad de rutas biosintéticas generadoras de una gran diversidad de moléculas con aplicaciones en diversas áreas.

“Bacterias pertenecientes al género *Bacillus amilolyquefaciens*, aisladas a partir de sedimento marino desde litoral de la VIII región, Chile. Presentan compuestos bioactivos”.

1.2 Objetivo General

Aislar y analizar las características químicas de metabolitos secundarios bioactivos presentes en Bacterias de sedimentos marinos del litoral de la VIII región, Chile.

1.3 Objetivos Específicos

- Aislar bacterias provenientes de sedimentos marinos desde el litoral de la VIII región, Chile.
- Obtener cultivos líquidos de bacterias marinas para la extracción de metabolitos secundarios.
- Determinar parámetros de bioactividad de los extractos obtenidos de bacterias marinas.
- Analizar las características químicas de los compuestos bioactivos puros, mediante distintas técnicas espectroscópicas.

2. METODOLOGÍA

2.1 Toma de Muestras y Preparación de Cultivos.

Se extrajo sedimento marino desde punto de muestreo localizado en coordenadas $36^{\circ}31'59,08''\text{S}$ y $73^{\circ}17'39,26''\text{W}$ a una distancia de 20 km desde la línea de la costa (Figura 2). Se utilizó una draga Petit-Ponar de 1 kg de capacidad, en una embarcación artesanal en el mes de Julio de 2013. Se colectaron 3 muestras de 300 g de sedimento marino homogenizado, desde distintas profundidades, las que fueron transportadas en bolsas plásticas estériles de 1 l y almacenadas a 4°C .

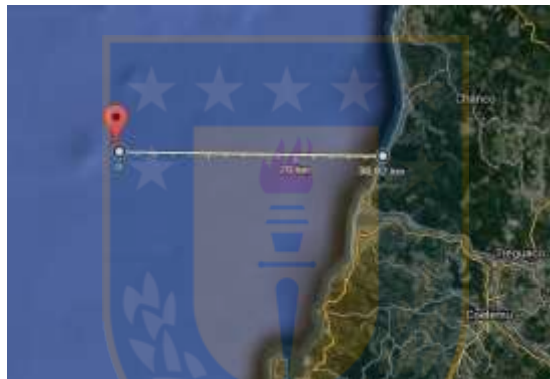


Figura 2. Punto de muestreo cercano a desembocaduras ríos Biobío e Itata localizado 20 km desde la línea de la costa ($36^{\circ}31'59,08''\text{S}$, $73^{\circ}17'39,26''\text{W}$).

De cada una de las 3 muestras se tomó 5 g, los que fueron transferidos a placas de Petri de vidrio y se secaron durante 12 horas bajo cámara de flujo laminar vertical a temperatura ambiente, para posteriormente ser homogenizadas con un mortero y colocadas a baño maría a 55°C durante 6 minutos.

En seguida fueron sembradas en una placa de petri con agar YPM (levadura-peptona-manitol) con agua de mar filtrada y 200 mg/l de sulfato de estreptomicina. En paralelo se repitió el ensayo en ausencia de antibiótico, bajo cámara de flujo laminar vertical. Para cada ensayo se utilizó una esponja estéril de 18 mm de diámetro, para presionar el sustrato y luego la superficie de la placa de petri con medio de cultivo,

generando así, una dilución seriada método timbrado (Jensen, P. R. *et al.*, 2005). A continuación se llevó a cabo la homogenización del agar bajo cámara de flujo laminar vertical.

Ambas capsulas de petri con los respectivos ensayos, fueron selladas bajo cámara e incubadas a 27°C durante 3 días.

2.2 Obtención y almacenamiento de cultivo bacteriano.

A partir de las placas sembradas, que contienen gran cantidad de microorganismos (levaduras, hongos, bacterias, actinomyces) (Figura 3. A), se identificó bajo lupa estereoscópica bacterias. Comenzando así el aislamiento selectivo de cepas de interés basado en su morfología y pigmentación.

Una vez identificadas las bacterias, éstas fueron transferidas a una placa de petri con agar YPM para la obtención de sepas puras (Figura 3. B), las que fueron incubadas a 27°C en estufa de cultivo, para ser revisadas luego de 7 días evaluando su crecimiento o posible contaminación.

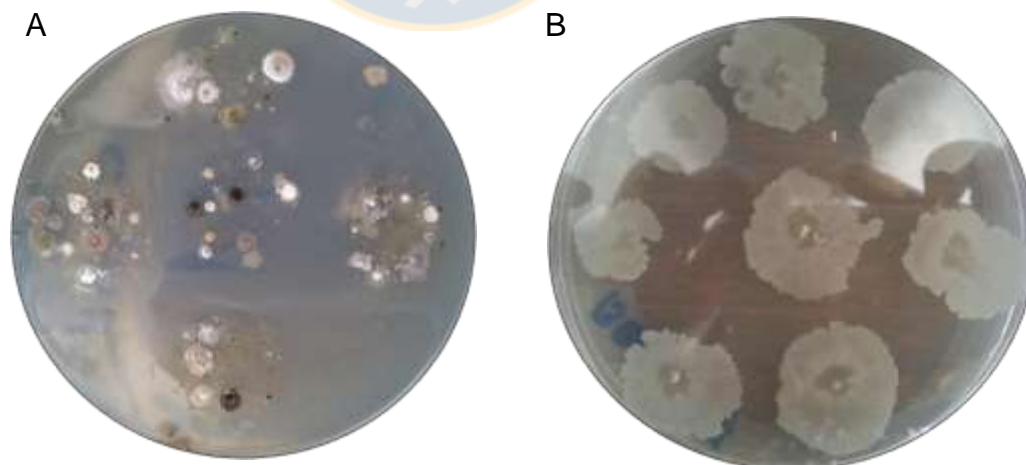


Figura 3. A) Cultivo microbiano obtenido de sedimento marino. B) Cultivo puro de cepa bacteriana aislada desde cultivo de sedimento marino.

Una vez obtenidas cepas puras, se realizó la preparación de medio YPM líquido en un matraz Erlenmeyer 500 mL (2 g manitol, 1 g peptona y 2 g levadura). Con una concentración de glicerol 20%. Luego se traspasó este medio a tubos falcón para realizar el auto clavado.

2.2.1 Prueba preliminar de actividad antifúngica.

Para esta prueba se prepararon cultivos con BENLATE en agar con medio YPM, en los que se realizó el sembrado de sedimento marino en forma de dilución.

Las placas de petri fueron incubadas a 27°C por 48 horas, a continuación se observó ausencia o presencia de crecimiento bacteriano.

2.2.2 Prueba preliminar de actividad antibacteriana.

Se probó la actividad antibacteriana de una de las cepas bacterianas obtenidas desde sedimento marino ante *Escherichia coli* (25922) y *Staphylococcus aureus* (2538-P). Para ello, se pasó una asa por el cultivo de la cepa bacteriana, para luego ser pasada por las placas de petri con medio agar tripticasa de soya (TSA) inoculadas con *E. coli* y *S. Aureus* en concentración de 10^6 UFC/mL. Las placas fueron incubadas a 27°C por 24 horas en estufa de cultivo, observando luego ausencia o presencia de crecimiento bacteriano.

2.3 Caracterización genética bacteria.

La cepa bacteriana se identificó mediante amplificación por PCR y secuenciación de ADN. La extracción de ADN se realizó a partir de micelios de la muestra pura de la bacteria, obtenida siguiendo la metodología descrita por Doyle *et al*, (1990)³⁰. Se procedió luego a la amplificación de ADN proveniente de la muestra proporcionada, utilizando partidores universales para Bacterias:

Primer forward_8F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; Primer reverse_1497R: CGGCTACCTTGTTACGACTT

Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por MacroGen Co. (Corea). Identificando la cepa evaluada por la alineación de secuencias, utilizando algorithm22 BLAST y la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.4 Cultivo de cepa bacteriana

La cepa bacteriana activa frente a pruebas de actividad fúngica y/o bacteriana, fue seleccionada y transferida a matraces Erlenmeyer de 5 l con medio líquido YPM y agua de mar filtrada, los que fueron mantenidos en agitación por 20 días a 160 rpm en agitador orbital a temperatura ambiente “Fermentación en medio líquido”.

2.5 Extracción compuestos

2.5.1 Mediante decantación líquido-líquido.

En embudos de decantación de 2.5 L se depositaron 1500 mL de cultivo bacteriano, agregando luego 200 mL de acetato de etilo 100% para realizar extracción de compuestos solubles en acetato de etilo. Se realizaron 4 lavados con este solvente. La solución de acetato de etilo con los compuestos solubles en él, fue colectada en embudo de decantación de 500 mL para realizar una nueva decantación, finalmente la solución fue filtrada para ser transferida a un balón de 500 mL. Posteriormente se realizó la concentración a sequedad en rotavapor Herdolph uv 2011 a 37°C a 100 rpm durante 20 minutos aproximadamente a presión reducida.

El extracto obtenido fue diluido con una mínima cantidad de metanol, para ser almacenado a 4°C en un vial de 10 mL.

2.5.2 Mediante Resina (Amberlite® XAD® 2).

En dos columnas cromatográficas de 2.5 L se depositaron 1.5 K de resina (750 g en cada columna), a continuación se realizó el lavado de resina con 2.5 L de metanol, para luego realizar el acondicionamiento de resina con 3 L de agua destilada.

Una vez realizado el acondicionamiento se realizó el traspaso de resina a un recipiente, para agregar cantidades iguales a los matraces Erlenmeyer que contienen los cultivos en fermentación.

Se agregó 250 g de resina a cada matraz, los que continuaron en agitación durante 3 horas.

Luego de ese tiempo el cultivo fue vaciado a columnas cromatográficas, se realizó la extracción de la fase líquida, para luego agregar 3 L de agua destilada para lavar sales provenientes de medio de cultivo.

A continuación se realizó la elución de resina, con 2.5 L de acetona, siendo colectada en matraces Erlenmeyer de 1L.

La fase orgánica obtenida en la elución fue filtrada para eliminar presencia de resina, para luego ser transferida a un balón de 1 L y ser concentrada a sequedad en un rotavapor Herdolph uv 2011 a 37°C a 100rpm durante 20 minutos a presión reducida.

El concentrado obtenido fue diluido con mínima cantidad de solvente 50% metanol 50% diclorometano y almacenado en un vial de 10 mL.

A continuación se agregaron 2.5 L de Metanol, siendo colectado en matraces Erlenmeyer de 1L, para luego ser transferido a un balón de 1 L y ser concentrado a sequedad en un rotavapor Herdolph uv 2011 a 37°C a 100rpm durante 20 minutos a presión reducida.

El concentrado obtenido fue diluido con mínima cantidad de solvente 50% metanol 50% diclorometano y almacenado en un vial de 10 mL.

2.6 Evaluación cromatográfica de extractos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Los tres extractos obtenidos (decantación líquido-líquido, primera elución con acetona y segunda elución con metanol) fueron evaluados mediante cromatografía líquida de alta eficacia con un gradiente de agua - acetonitrilo utilizando una columna semi-preparativa C18 a tres longitudes de onda: 210nm, 254nm y 310nm.

2.7 Separación y evaluación bioactiva de extractos obtenidos

2.7.1 Separación mediante cromatografía de capa fina (TLC)

El extracto obtenido mediante decantación líquido-líquido, fue analizado por cromatografía de capa fina (TLC) utilizando placas de sílica gel 60 F₂₅₄.

Se realizó el sembrado de parte del extracto contenido en un vial de 10 mL en 11 placas de sílica gel 60 F₂₅₄ de 2 cm de ancho por 7 cm de alto, las que fueron eluidas dos veces con acetato de etilo 100% y observada bajo lámpara UV. Una fue revelada con ácido Sulfúrico 30% para evaluar la presencia de compuestos y las diez restantes fueron puestas en 10 capsulas de Petri con cultivo de bacterias gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus*, *Staphylococcus aureus*), bacterias gram negativas (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli atcc 25922*, *Escherichia coli SI.*), *Pseudomonas syringae* y hongos pertenecientes a género *Candida*. Bajo cámara de flujo laminar vertical, para luego ser incubadas por 24 horas a 27°C en estufa de cultivo. Evaluando luego la presencia de halo de inhibición en sectores de la placa expuesta al cultivo bacteriano.

El resto de extracto, fue sembrado en 6 placas de sílica gel 60 F₂₅₄ de 20 cm de

ancho por 7 cm de alto, las que fueron eluidas dos veces con acetato de etilo 100%, secadas y observadas en lámpara UV, a una de estas placas “Placa Guía” se realizó corte a 0,5 cm del borde de placas para ensayo de bioactividad, (cantidad dependiente a cantidad de cepas a las cuales mostraron bioactividad en la etapa anterior) de 1 cm de ancho.

Una vez obtenidas las placas para ensayo bioactivo, cada una fue expuesta en capsula de petri con el cultivo bacterial de aquellas cepas contra las que el extracto mostro bioactividad (presencia de halo de inhibición), bajo cámara de flujo laminar vertical.

Una vez realizado el ensayo bioactivo, las capsulas fueron incubadas a 27°C en estufa de cultivo, transcurridas 24 horas, fueron retiradas, evaluando bioactividad.

A continuación se realizó la ubicación de la franja de la placa de ensayo en donde se encuentra el halo de inhibición, ubicando la “Placa Guía” sobre la cápsula petri, identificando así, bajo lámpara UV las zonas de inhibición.

Una vez marcadas las bandas en donde se encuentra el o los compuestos bioactivos se realizó la identificación de la zona de interés en la “Placa Guía” seleccionando las bandas de interés en todas las otras placas sembradas y enumerando cada banda para cada una de las 6 placas de sílica gel 60 F₂₅₄.

Luego enumeradas las bandas de interés, se realizó el corte de cada una, ubicando las bandas que corresponden a la misma zona en todas las placas gel 60 F₂₅₄ sembradas, repitiendo mismo procedimiento para cada zona de inhibición.

Finalizado el corte, se rotularon matraces Erlenmeyer de 50 mL con los números de cada banda, en los cuales se agregaron cada una de bandas correspondientes en pequeños trozos, con una pipeta Pasteur con bulbo se agregó metanol hasta cubrir los trozos de sílica gel 60 F₂₅₄.

Transcurridas 24 horas, cada uno de los matraces fue sonificado durante 5 minutos y filtrado mediante filtros de cápsula desechables con una jeringa de 5 mL, cada una de las fracciones obtenidas fue depositada en un balón de 50 mL, siendo concentradas a sequedad en un rotavapor Herdolph uv 2011 a 37°C a 100rpm durante 15 minutos aproximadamente a presión reducida.

El extracto obtenido fue disuelto con mínima cantidad de metanol (aproximadamente 1 mL), para luego ser depositado en viales de 1,5 mL.

El extracto de cada fracción obtenida fue sembrado nuevamente en 2 placas de sílica gel 60 F₂₅₄ de 20 cm de ancho por 7 cm de alto y fueron eluidas con distintos solventes según la ubicación que mostraron:

- La fracción ubicada en el origen fue corrida dos veces con una solución 90% acetato de etilo 10% metanol.
- La fracción ubicada en el centro fue corrida con acetato de etilo 100%.

Una vez corridas las placa gel 60 F₂₅₄ para cada fracción, fueron nuevamente cortadas y se llevaron a cabo los respectivos bioensayos paralelamente hasta obtener una zona visiblemente homogénea.

Una vez obtenidos los compuestos limpios, estos fueron disueltos en acetato de etilo 100% para realizar concentrado a sequedad en un rotavapor Herdolph uv 2011 a 37°C a 100 rpm durante 15 minutos aproximadamente a presión reducida.

El extracto obtenido fue disuelto con mínima cantidad de metanol (1mL aproximadamente) agregado mediante una pipeta Pasteur con bulbo, para luego ser depositado en viales de 1,5 mL para posteriormente ser analizados mediante cromatografía líquida de alta eficacia, con un gradiente de agua y acetonitrilo utilizando una columna semi-preparativa C18 a tres longitudes de onda distintas: 210nm, 254nm y 31 Mediante columna cromatográfica rápida

En principio se realizó la impregnación de 2 g de sílica gel 60 para columna cromatográfica, con el extracto total, obtenido mediante decantación líquido-líquido. Para ello, se utilizó un mortero de porcelana y bajo campana se procedió a realizar el impregnado, depositando el extracto total sobre sílica gel 60.

En una columna cromatográfica de 40 mL, se agregaron 15 g de sílica gel 60, los que fueron lavados con 20 mL de hexano y presionada. Una vez lista para la separación, se agregaron los 2 g de sílica gel 60, impregnados con el extracto total

A continuación se realizó la preparación de solventes a utilizar para la extracción de las 8 fracciones (20 mL):

Fracción 1: 100 % hexano.

Fracción 2: 80 % hexano - 20% acetato de etilo.

Fracción 3: 60% hexano - 40% acetato de etilo

Fracción 4: 40 % hexano - 60 % acetato de etilo.

Fracción 5: 20% hexano - 80% acetato de etilo.

Fracción 6: 100 % acetato de etilo.

Fracción 7: 80 % acetato de etilo - 20% metanol.

Fracción 8: 100% metanol.

Una vez realizados los solventes para cada fracción se comienza la separación, depositando por las paredes interiores de la columna los solventes, cada fracción fue colectada en un matraz Erlenmeyer de 50 mL.

Una vez colectadas las 8 fracciones en los correspondientes matraz Erlenmeyer de 50 mL, cada una de ellas fue filtrada mediante filtros de cápsula desechables con una jeringa de 5 mL y puesta sobre un balón de 50 mL para ser concentrado a sequedad en un rotavapor Herdolph uv 2011 a 37°C a 100rpm a presión reducida durante 15 min aproximadamente. El extracto obtenido fue diluido con una mínima

cantidad de metanol y traspasado a viales de 2,5 mL rotulados para cada fracción.

Se sembraron 11 placas de sílica gel 60 F₂₅₄ de 2 cm de ancho por 7 cm de alto por cada una de las 8 fracciones obtenidas, las que fueron corridas dos veces con acetato de etilo 100%, una placa de cada fracción fue revelada con ácido sulfúrico 30% para evaluar presencia de compuestos, mientras que la otras diez placas fueron puestas en capsula de petri con cultivos bioactivos de cepas mencionadas en punto 2.7.1, bajo cámara de flujo laminar vertical, e incubadas a 27°C por 24 horas en estufa de cultivo, se observó luego la presencia de halo de inhibición, identificando así las fracciones que presentan compuestos bioactivos.

Luego de identificadas las fracciones que presentan compuestos bioactivos se realizó la evaluación por Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de cada una de ellas, con un gradiente de agua y acetonitrilo utilizando una columna semi-preparativa ZORDAX Eclipse XDB-C18 a tres longitudes de onda distintas: 210nm, 254nm y 310nm.

2.7.2 Mediante columna cromatográfica rápida con otro programa (columna flash)

Primeramente se realizó la impregnación de 6 g de sílica gel 60 para columna con el extracto total obtenido en la obtención de fase orgánica mediante resina, para ello se utilizó un mortero de porcelana y bajo campana se procedió a realizar el impregnado, depositando el extracto total sobre la sílica.

Luego, se depositaron 54 g de sílica gel 60 PF_{254 + 366} para cromatografía preparativa en embudo con placa porosa de vidrio, para realizar el lavado de la sílica gel 60 PF_{254 + 366}, añadiendo 2500 mL de hexano, 250 mL de acetato de etilo y finalmente 250 mL de hexano. Una vez lavada la sílica se procedió a colocar al interior del embudo con placa porosa de vidrio la sílica Gel 60 impregnada con el extracto total homogéneamente sobre el total de la superficie.

Luego de montado el sistema, se prepararon 150 mL de solvente para cada una de las 14 fracciones a extraer:

Fracción 1: 100% hexano

Fracción 2: 90% hexano – 10% acetato de etilo

Fracción 3: 80% hexano – 20% acetato de etilo

Fracción 4: 70% hexano - 30% acetato de etilo

Fracción 5: 60% hexano – 40% acetato de etilo

Fracción 6: 50% hexano – 50% acetato de etilo

Fracción 7: 40% hexano – 60% acetato de etilo

Fracción 8: 30% hexano – 70% acetato de etilo

Fracción 9: 20% hexano – 80% acetato de etilo

Fracción 10: 10% hexano – 90% acetato de etilo

Fracción 11: 100% acetato de etilo

Fracción 12: 90% acetato de etilo – 10% metanol

Fracción 13: 50% acetato de etilo – 50% metanol

Fracción 14: 100% metanol

Finalmente se comenzó la separación depositando la primera fracción en el embudo con placa porosa de vidrio, las que son recibidas cada una en un matraz Erlenmeyer de 250 mL.

Una vez obtenidas las 14 fracciones, cada una de ellas fue puesta en un balón de 500 mL para ser concentradas a sequedad en un rotavapor Herdolph uv 2011 a 37°C a 100 rpm y presión reducida durante 15 minutos aproximadamente. Finalmente cada concentrado obtenido fue diluido con 4 mL de solvente, preparado según las características de los compuestos presentes en él, siendo las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 diluidas con 50% hexano – 50% acetato de etilo. Las fracciones 6, 7 y 8 diluidas con 50% acetato de etilo – 50% metanol y las fracciones 9, 10, 11, 12, 13 y 14 diluidas con 100% metanol. Siendo cada una de ellas traspasadas a viales rotulados de 5 mL.

Se sembraron 11 placas de sílica gel 60 F₂₅₄ de 2 cm de ancho por 7 cm de alto para cada una de las 14 fracciones obtenidas, las que fueron corridas dos veces con

acetato de etilo 100%, una de las cuales fue revelada con ácido sulfúrico 30% para evaluar presencia de compuestos en cada una de ellas.

Las diez placas restantes fueron puestas en capsulas de petri con cultivo bacteriano de las diferentes cepas mencionadas en punto 2.7.1, bajo cámara de flujo laminar vertical, incubadas a 27°C por 24 horas en estufa de cultivo, se observó luego la presencia de halo de inhibición, identificando así las fracciones que presentan compuestos bioactivos.

Se realizó un segundo cultivo de cepa bacteriana en 4 matraces Erlenmeyer de 5 L con medio líquido YPM y agua de mar filtrada, los que fueron mantenidos en agitación por 18 días a 160 rpm en agitador orbital a temperatura ambiente “Fermentación en medio líquido”.

El cultivo fue extraído mediante separación líquido-líquido para obtención de compuestos, repitiéndose mismo procedimiento descrito con anterioridad, el extracto obtenido fue separado mediante columna flash (columna rápida con otro programa). Una vez obtenido el extracto, éste fue impregnado en 6 g de sílica gel 60 para columna cromatográfica, repitiéndose a continuación el procedimiento anteriormente mencionado.

Obtenidas las 14 fracciones, se realizó el sembrado de; una placa de 20 cm de largo por 10 cm de alto con las 14 fracciones, la que fue corrida dos veces con acetato de etilo 100%, observada bajo lámpara UV y revelada con ácido sulfúrico 30%, una placa de 2 cm de ancho por 7 cm de alto para cada una de las 14 fracciones, para las que sellevó a cabo ensayo de bioactividad con *Staphilococcus aureus*. Transcurridas 24 horas se realizó la evaluación de cada una de las 14 placas de ensayo bioactivo identificando aquellas fracciones que presentan actividad positiva.

Se tomó con capilar una pequeña cantidad de cada uno de los extractos obtenidos en cada una de las 14 fracciones, las que fueron puestas en viales de 2.5 mL previamente pesados y rotulados, para evaluación citotóxica.

Cada una de las fracciones que mostraron bioactividad fueron evaluadas por cromatografía líquida de alta eficacia, con un gradiente de agua y acetonitrilo utilizando una columna semi-preparativa ZORDAX Eclipse XDB-C18 a tres longitudes de onda distintas: 210nm, 254nm y 310nm.

2.8 Separación y obtención de compuestos puros mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y detector evaporativo de dispersión de la luz (ELSD).

Aquellas fracciones que mostraron bioactividad fueron evaluadas por cromatografía líquida de alta eficacia en un equipo Agilent technologies 1260infinity, con un gradiente de agua - acetonitrilo (tabla 1), utilizando una columna semi-preparativa ZORDAX Eclipse XDB-C18, a tres longitudes de onda: 210nm, 254nm y 310nm. Comenzando así la separación de los compuestos bioactivos, obteniéndose nuevas fracciones que contienen a los compuestos bioactivos, estas fracciones fueron nuevamente evaluadas bajo las mismas condiciones, hasta obtener una sola señal simétrica correspondiente al compuesto de interés, cuya obtención se desarrolló con bioensayos paralelos de forma permanente.

Tiempo (Min)	agua (%A)	acetonitrilo (%B)
0.0	90.0	10.0
25.0	0.0	100.0
28.0	0.0	100.0
35.0	90	10.0

Tabla 1. Método, gradiente acetonitrilo – agua, utilizado en HPLC

Aquellas fracciones que poseen un cromatograma con señales poco nítidas en las zonas de inhibición fueron analizadas mediante un detector evaporativo de dispersión de la luz (ELSD) en un equipo SEDEX Model 85, utilizando columna semi-

preparativa ZORDAX Eclipse XDB-C18, fase móvil un gradiente agua – acetonitrilo (Tabla 1).

2.9 Dilucidación de estructura química de compuesto bioactivo mediante LC/MS, GC/MS, RMN.

El compuesto puro fue analizado mediante espectrómetro de masa (LC/MS-8030) para determinar peso molecular de la molécula, utilizando como fase móvil gradiente agua - acetonitrilo (Tabla 1) flujo de 0.5 mL/min. Utilizando una columna analítica Kromasil 100-2.5 C18, volumen de inyección de 20 µL y condiciones mostradas en tabla 2.

Flujo gas nebulizador	3.0 L/min
Flujo gas de secado	15.0 L/min
Interface	Ionización por electronebulización (ESI)
Voltaje Interface	4.5 kV
Corriente Interface	0.3 µA
Temperatura DL	250 °C
Temperatura bloque de calor	400 °C
Voltaje dinodo	6.0 kV
Detector Voltaje	1.70 kV
Vacío IG	1.8 e – 003 Pa
Vacío PG	9.6 e + 001 Pa
Gas CID	230 KPa

Tabla 2. Condiciones análisis de espectrometría de masa.

Posteriormente se llevó a cabo el análisis por Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas, mediante instrumento Agilent Technologies, proveído de un Horno Agilent 7890 A GC System, detector 5975 C VL MSD. Inyector 7683 B series, Columna HP-5 MS 30m x 0,25 x 0,25 µm. Intensidad de corriente de Fuente de iones 70 A, Post Run 70°C, tiempo equilibrio 0.25 min, flujo de He 1,47 mL/min,

con Splitless, volumen de inyección de 1 μ L y programa de calentamiento descrito en tabla 3.

Proporción($^{\circ}$ C/min)	Valor	Tiempo espera (min)	Tiempo de ejecución (min)
-	100	3	3
10	280	19	40

Tabla 3; Programa de calentamiento Cromatógrafo de Gases

Finalmente se realizaron experimentos de resonancia magnética nuclear 1 H-NMR, 13 C-NMR, DEPT 135 y HSQC.

2.10 Prueba de citotoxicidad

Para determinar citotoxicidad de las 14 fracciones obtenidas en columna cromatográfica flash obtenidas de extracto desde separación mediante decantación líquido-líquido, se realizaron ensayos utilizando la línea celular de neuroblastoma de ratón (N2a).

2.10.1 Preparación medio de cultivo y sembrado de placa 96 wells

Bajo cámara de flujo laminar vertical se realizó el medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con L-glutamina 2mM, penicilina 50 U/m, estreptomycin 50 μ g/ml, fungizona 2.5 μ g/ml, piruvato de sodio 1 mM y 5% de Suero Bovino Fetal (SBF).

Una vez preparado el medio, éste fue mezclado con sales de tetrazolio (MTT) en relación 1:6. En una placa multipocillo (96 Wells) se depositaron 60 μ L de MTT con medio RPMI-1640 con micro pipeta multicanal. La placa 96 Wells fue incubada a 27 $^{\circ}$ C

durante 25 minutos, posterior a este tiempo y observando el cambio de color de las sales a azul, se realizó el revelado de la placa con dimetil sulfoxido (DMSO) y la lectura mediante lector multipocillo a 570 nm.

La placa 96 Wells fue lavada con buffer PBS para disminuir el pH ácido presente en medio celular, se agregó luego, 4 mL de tripsina y medio de cultivo al 5%, logrando así la homogenización de la placa 96 Wells, realizado esto, se efectuó el conteo de células vivas bajo microscopio invertido mediante cámara de Neubauer, para el cual se agregó dilución azul de tripán al cultivo en relación 1:2 colocando un cubre objetos sobre la muestra para finalmente realizar el conteo de células presentes en la cámara de Neubauer.

Una vez contadas las células vivas presentes en la placa (96 Wells), se realizó el sembrado de placa 96 Wells, con una micro pipeta multicanal electrónica, se sembró 200 μ L de cultivo celular en cada uno de los 96 pocillos de la placa, homogeneizada luego durante 3 minutos sobre un homogeneizador shaker a 70 rpm.

Una vez sembrada la placa 96 Wells, fue incubada por 24 horas a 37°C en estufa de cultivo.

2.10.2 Exposición de medio de cultivo a extractos

El extracto de cada una de las 14 fracciones fue disuelto con distintas cantidades de metanol para lograr igual concentración μ g/mL para cada una.

Una vez disueltas y sonicadas durante 15 minutos, se agregó a un reservorio auto clavado, cantidad determinada de cada extracto en disolución para disponer de 800 μ L con concentración 50 μ g/mL, luego se agregó cantidad necesaria de Medio RPMI 5% para obtener 800 μ L de disolución extracto-Medio RPMI 5%.

La placa 96 Wells sembrada con anterioridad fue observada bajo microscopio invertido, para luego, bajo cámara de flujo vertical llevar a cabo el cambio de medio,

el medio a utilizar fue la mezcla obtenida con anterioridad extracto-medio RPMI 5%. La placa 96 Wells fue sembrada como se muestra en esquema de figura 4, agregando 200 μ L de disolución extracto-Medio RPMI 5%.



Figura 4. Esquema sembrado placa 96 Wells para ensayo citotoxicidad

Una vez sembrada la placa 96 Wells fue incubada durante 24 horas a 37°C en estufa de cultivo.

2.10.3 Lectura efecto citotóxico de extracto

La placa 96 Wells fue observada bajo microscopio invertido observando variación en número de células presentes en etapa 4.1.

En un reservorio auto clavado se diluyó 1 mL de MTT con 5 mL de Medio RPMI 5%, luego de transcurridos 10 minutos se pusieron 60 μ L en cada pocillo de placa 96 Wells, la que luego fue incubada durante 20 minutos a 37°C en estufa de cultivo. Transcurrido ese tiempo, se eliminó el medio y se agregó 100 μ L de DMSO, finalmente ambas placas 96 Wells fueron leídas en un Espectrofotómetro para microplaca, midiendo su absorbancia a 570 nm, obteniéndose porcentajes de viabilidad para cada una de las fracciones evaluadas.

Aquellas fracciones que presentaron un porcentaje de viabilidad relevante fueron expuestas nuevamente a células N2a realizándose comparaciones de

viabilidad a diferentes concentraciones. Para ello se duplicó el volumen requerido extracto-Medio RPMI 5% para exposición anterior y así poder obtener 800 μ L para 7 concentraciones diferentes de extracto citotóxico.

Una placa 96 Wells con células de N2a en medio RPMI obtenida según etapa 4.1 y mantenida en incubadora fue observada en microscopio invertido y bajo cámara de flujo laminar vertical fue retirado el medio de cultivo, para ser reemplazado por las disoluciones extracto-Medio RPMI 5% a 7 concentraciones diferentes de aquellas fracciones que mostraron porcentaje de viabilidad celular menor a 50%, según esquema mostrado en figura 5.

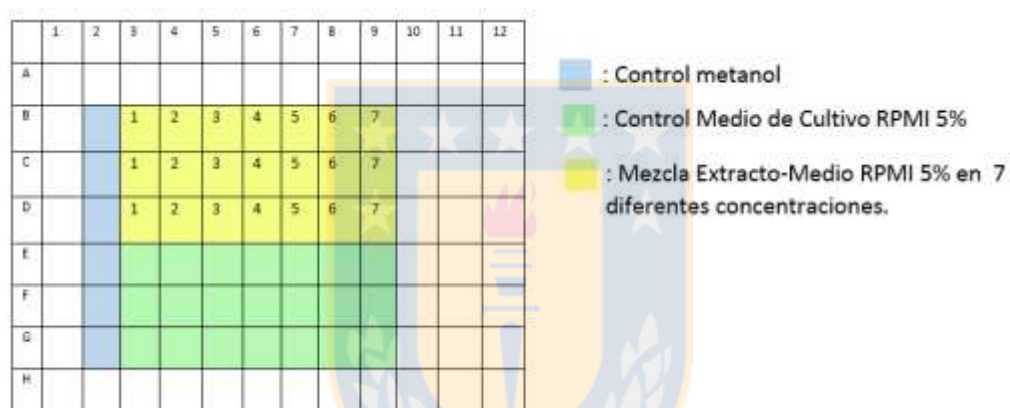


Figura 5, esquema sembrado placa 96 Wells de extracto citotóxico para fracciones con porcentaje de viabilidad menos a 50% a diferentes concentraciones.

Para comparar la citotoxicidad de las fracciones con respecto al extracto total sin fraccionar, se realizó un ensayo evaluando el extracto total a una concentración de 50 μ g/mL.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización genética Bacteriana

Se obtuvo un fragmento de amplificación, el cual fue clonado y secuenciado en ambos sentidos con partidores SP_6 y T7.

Ambas secuencias obtenidas presentaban perfiles electroforéticos óptimos, fueron limpiadas y alineadas, mediante programa MEGA 6.0, obteniendo una secuencia consenso que fue comparada con la base de Datos GenBank, mediante programa BLAST de NCBI obteniéndose el correspondiente porcentaje de identidad genética:

Organismo: *Bacillus amyloliquefaciens subsp. Plantarum*

Puntuación máxima: 2013

Puntuación total: 23383

Cubierta de consulta: 100%

Valor E: 0.0

Identidad: 99%

Adhesión: CP007244.1



Según los análisis moleculares y bioinformáticos obtenidos, el organismo caracterizado corresponde con un 99% (1505/1515) de identidad, a una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens sub sp plantarum*.

3.2 Cultivo de cepa bacteriana.

Se realizaron un total de 135 L de cultivo, en diferentes períodos dentro del desarrollo de la investigación. En primera instancia se realizó el cultivo de 25 L de cepa bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens*, para una visualización previa de bioactividad contra *S. aureus*.

3.3 Extracción fase orgánica y separación compuestos bioactivos.

3.3.1 Extracción mediante decantación líquido-líquido – separación compuestos bioactivos mediante cromatografía placa fina (TLC).

Luego de la extracción del cultivo con acetato de etilo 100%, de los 25 l de cultivo bacteriano de *Bacillus amyloliquefaciens*, se obtuvo 212.87 mg de extracto total, los que fueron disueltos con una mínima cantidad de metanol. Se sembraron 11 placas TLC de 2 x 7 cm. Corridas con acetato de etilo 100% y observadas bajo lámpara UV (Figura 6.A y 6.B). Una de las placas fue quemada con ácido sulfúrico 30%, observándose presencia de varios compuestos en el extracto total obtenido.

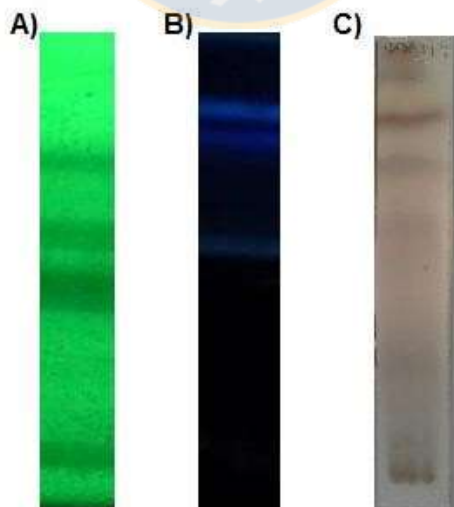


Figura 6: Visualización placas TLC con extracto total A) Lámpara UV λ 254 nm. B) Lámpara UV λ 365 nm. C) Revelada con ácido sulfúrico 30%.

Las 10 placas restantes fueron puestas sobre cápsula de petri inoculadas con diversos tipos de bacterias y hongos. Transcurridas 24 horas se observaron los bioensayos, visualizándose solo bioactividad del extracto total sobre *S. Aureus*, en donde se distinguen dos halos de inhibición (Figura 7). Ambos halos indican la presencia de 2 o más compuestos con bioactividad contra esta bacteria.

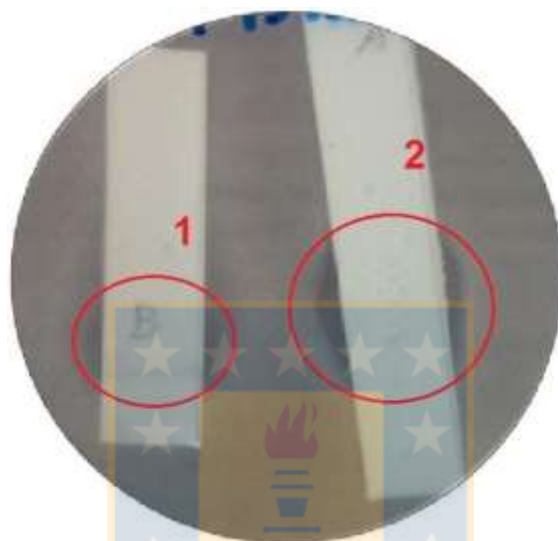


Figura 7. Halos de inhibición bioensayo extracto total *B. amyloliquefaciens* contra *S. Aureus*.
1) 14 mm diámetro. 2) 13 mm diámetro.

Los compuestos presentes en la zona de inhibición fueron separados mediante cromatografía de capa fina (TLC). Para ello se realizó el sembrado en placas de sílica de 20 x 7 cm. Obteniéndose finalmente en ensayos de bioactividad solo los halos correspondientes a cada una de las fracciones, las que fueron evaluadas mediante HPLC (Figura 8, Figura 9).

Cada una de las fracciones bioactivas, se traspasaron a un vial de 2 mL y pesados, obteniéndose así para el primer compuesto 1.56 mg y para el segundo compuesto 0.20 mg.

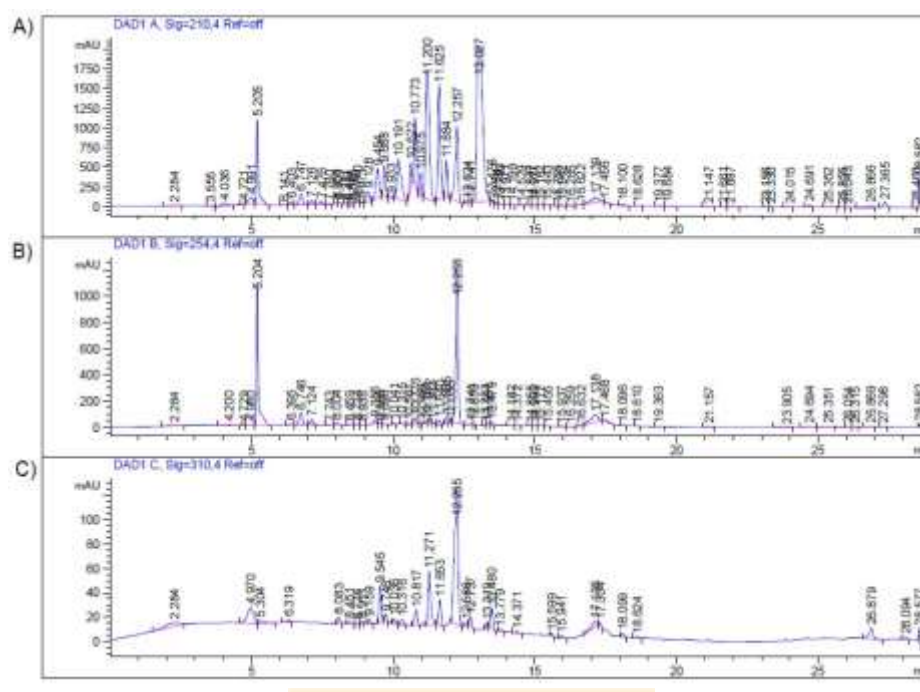


Figura 8. Cromatogramas fracción 1 de extracto bioactivo de *B. amyloliquefaciens* obtenido por TLC. A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm.

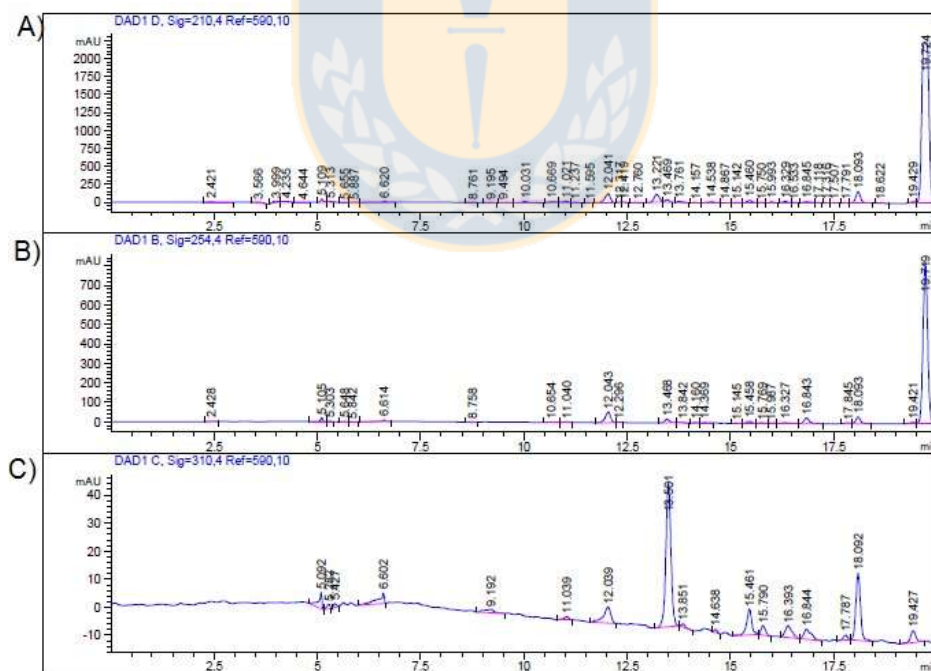


Figura 9. Cromatogramas fracción 2 de extracto bioactivo de *B. amyloliquefaciens* obtenido por TLC. A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm.

3.3.2 Extracción mediante decantación líquido-líquido – separación compuestos bioactivos mediante columna cromatográfica rápida.

Para esta segunda etapa de obtención de compuestos bioactivos, se realizó el cultivo de 30 L de cultivo de *B. amyloliquefaciens*, los que luego del período de fermentación, fueron extraídos con acetato de etilo 100%. Se obtuvo 240.6 mg de extracto total.

El extracto total fue evaluado mediante cromatografía líquida de alta presión, visualizándose los cromatogramas mostrados en Figura 10.

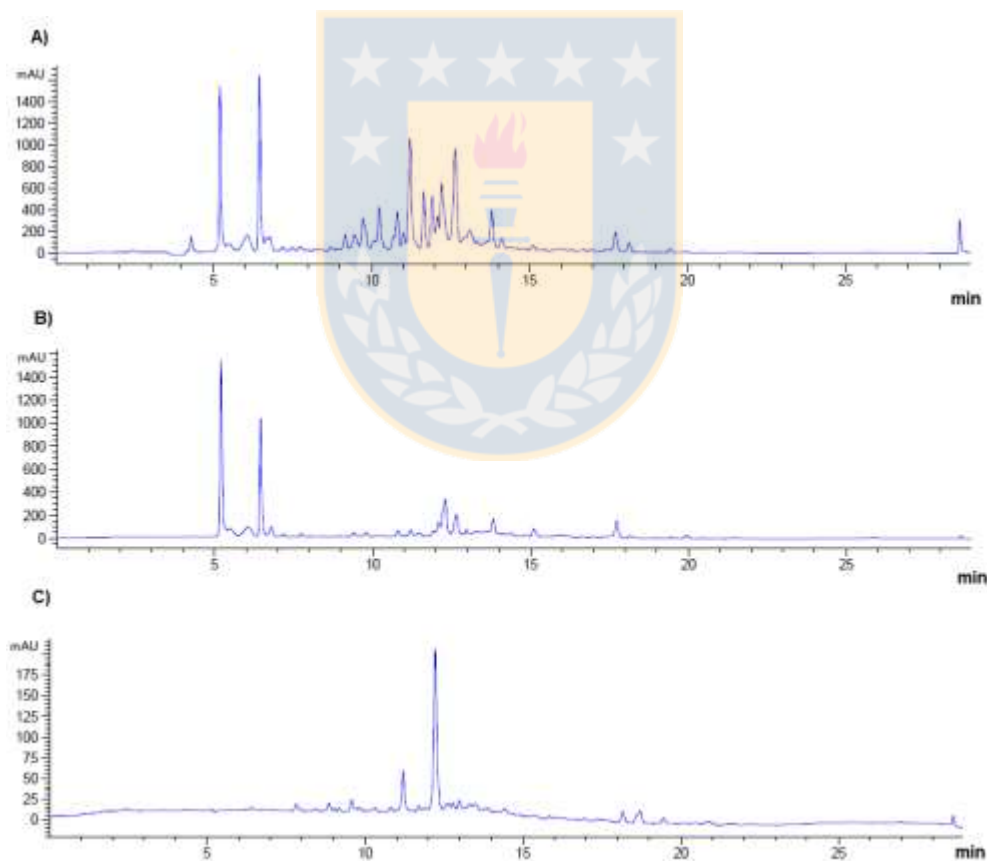


Figura 10. Cromatogramas fase orgánica cultivo de *B. amyloliquefaciens*

A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm.

Una vez obtenidas las 8 fracciones mediante columna cromatográfica rápida, se realizó la evaluación bajo lámpara UV y revelado con ácido sulfúrico 30% evaluando presencia de compuestos (Figura 11).

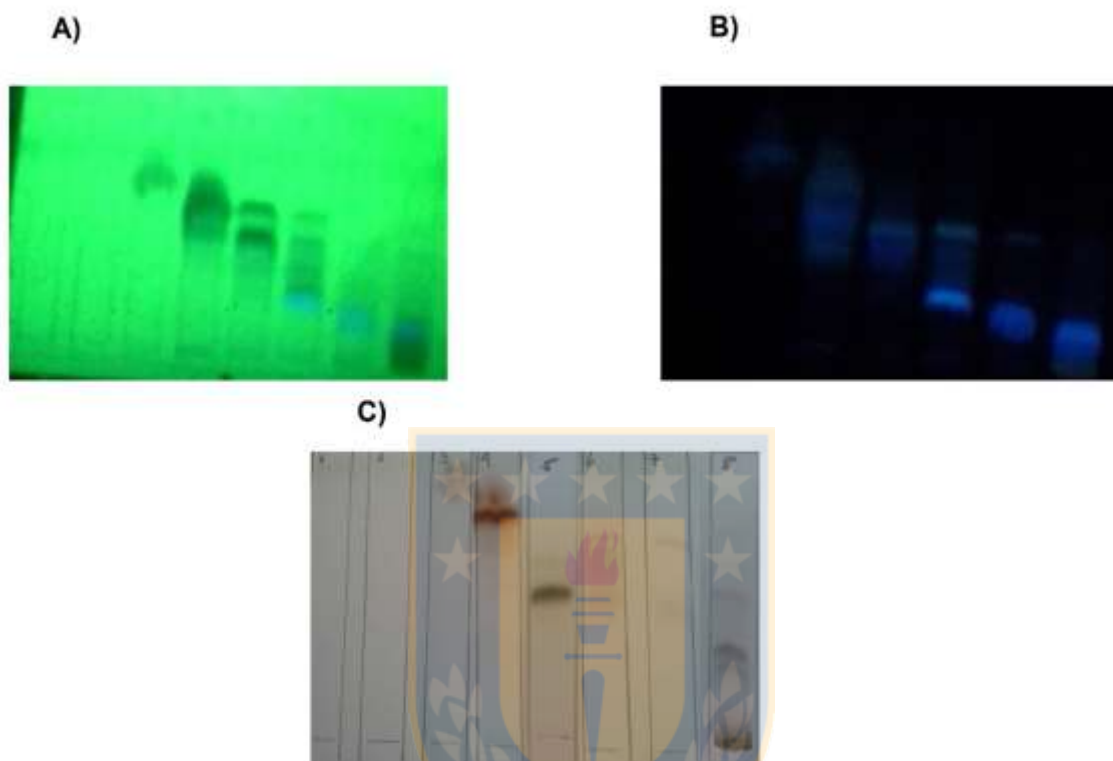


Figura 11: Visualización placas TLC fracciones obtenidas mediante columna rápida

A) Lámpara UV λ 254 nm B) Lámpara UV λ 365 nm C) Revelada con ácido sulfúrico 30%.

La finalidad de obtener un fraccionamiento del extracto total de la fase orgánica cultivo de *B. amyloliquefaciens*, es identificar en cuáles fracciones están los compuestos bioactivos, para así poder realizar una separación más eficaz.

Desarrollados los respectivos ensayos bioactivos para las 8 fracciones, se observó halo de inhibición contra *S. Aureus* en fracción 5 y fracción 8 (Figura 12).

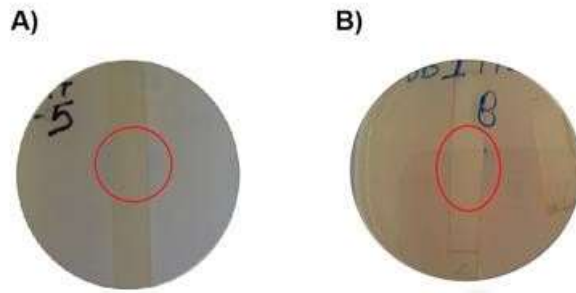


Figura 12: Halos de inhibición, bioensayo extracto total *B. amyloliquefaciens* contra *S. Aureus*. A) 17 mm diámetro. B) 15 mm diámetro.

Ambas fracciones que mostraron contener a los compuestos bioactivos fueron evaluadas mediante cromatografía líquida de alta presión, obteniendo para cada una los respectivos cromatogramas (Figura 13, Figura 14).

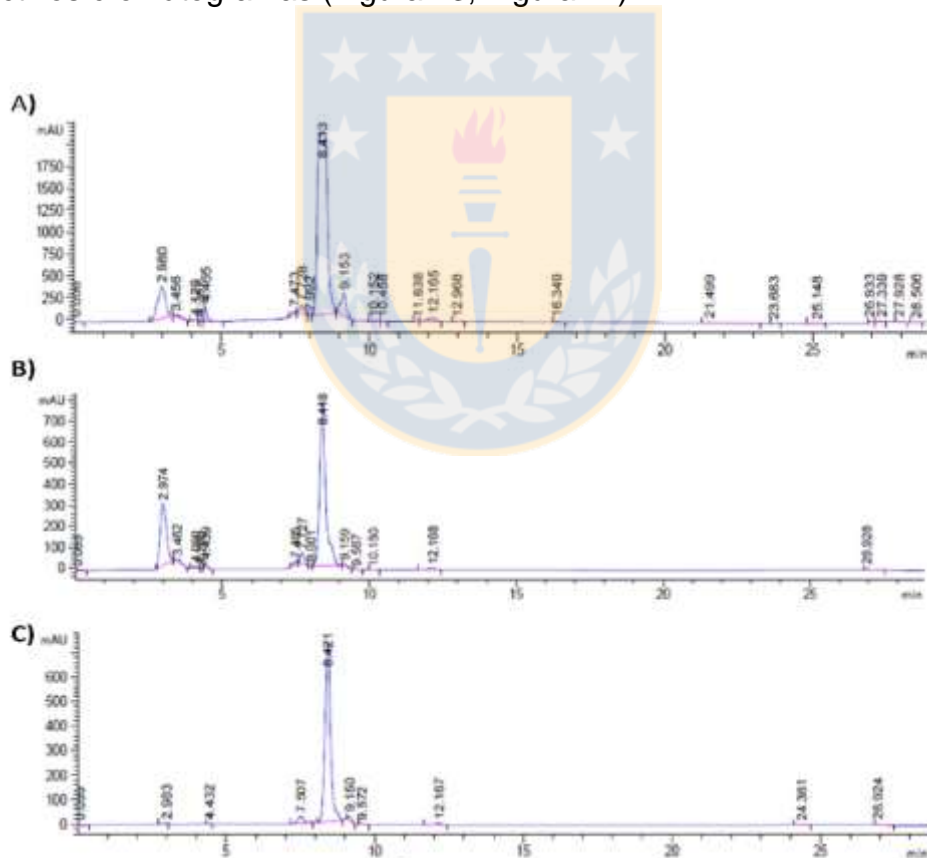


Figura 13. Cromatogramas fracción 5 de extracto bioactivo de *B. amyloliquefaciens*
 A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm.

La fracción 5 muestra una señal clara en 8.5 minutos, visible a las tres longitudes de onda, por ello se fraccionó nuevamente esta fracción mediante Cromatografía Líquida de alta eficacia (HPLC) obteniendo 1.3 mg de compuesto puro.

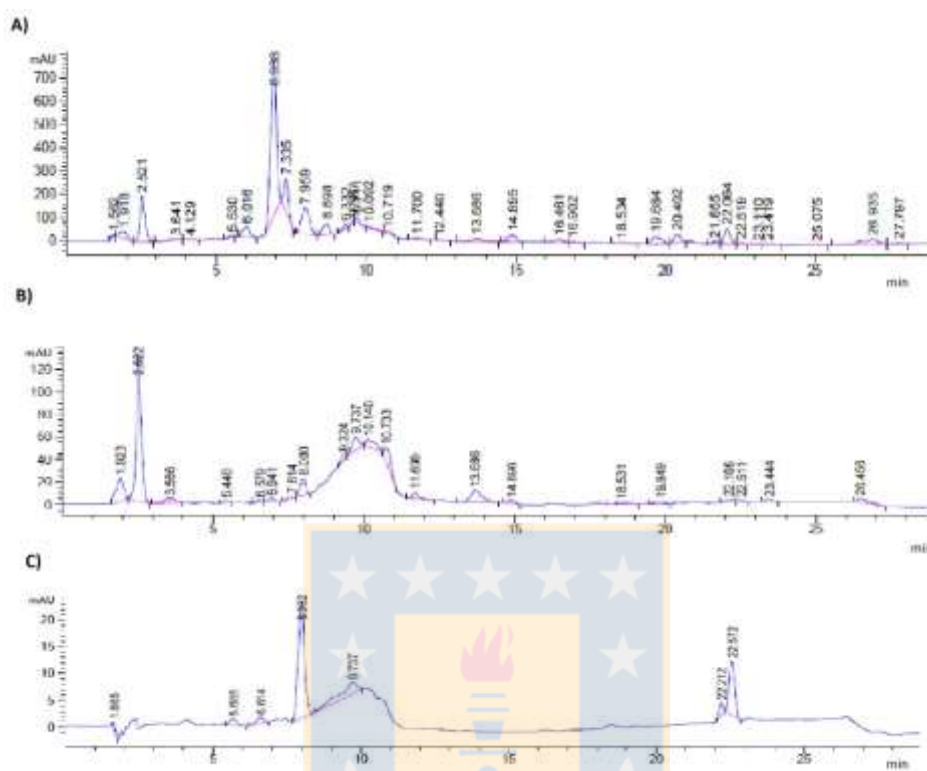


Figura 14. Cromatogramas fracción 8 de extracto bioactivo de *B. amyloliquefaciens* A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm.

Puesto que en los cromatogramas de fracción 8 no se identifican señales claras para separación de compuestos, se realizó la purificación mediante cromatografía en placa (TLC) y bioensayos conjuntos. Obteniendo de compuesto (s) activo (s) correspondiente a fracción 8, 6.7 mg de compuesto impuro (s).

3.3.3 Extracción mediante resina (Amberlite® XAD® 2) – separación compuestos bioactivos mediante columna cromatográfica flash.

En esta tercera etapa de obtención de compuestos bioactivos, se realizó el cultivo de 30 L de cultivo de *B. amyloliquefaciens*, los que luego del período de fermentación, fueron extraídos con resina.

En esta extracción se obtuvo en principio dos extractos, correspondientes al extracto obtenido en elución con acetona y el extracto obtenido con metanol. Ambos extractos, fueron evaluados mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para compararlos y evaluar combinarlos (Figura 15, Figura 16).

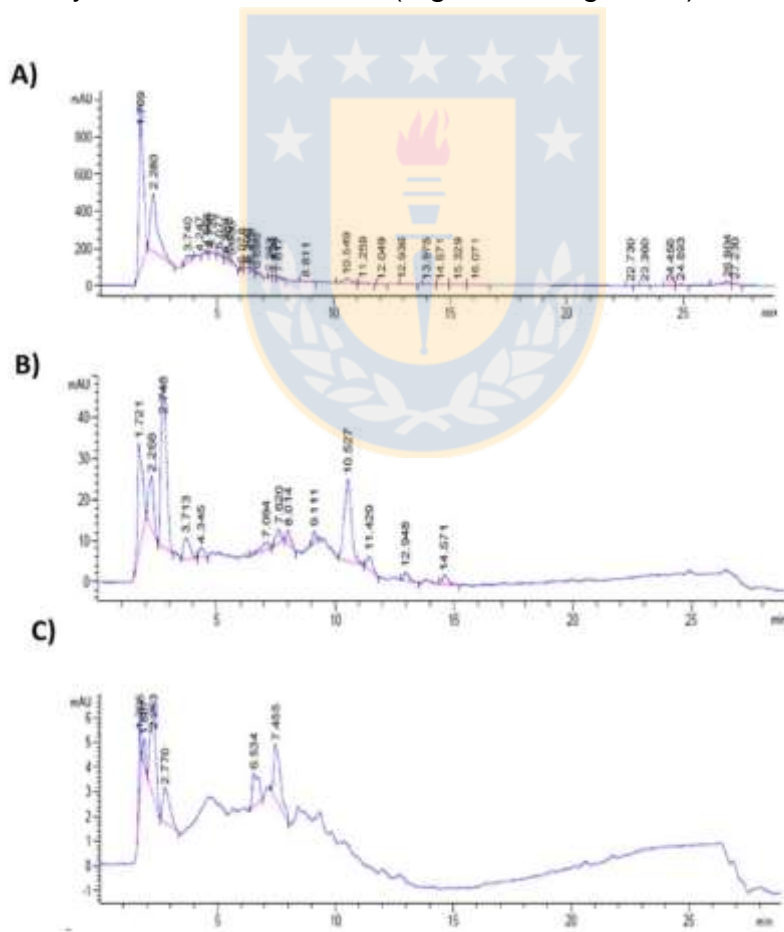


Figura 15. Cromatogramas extracto total obtenido en elución con acetona

A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm.

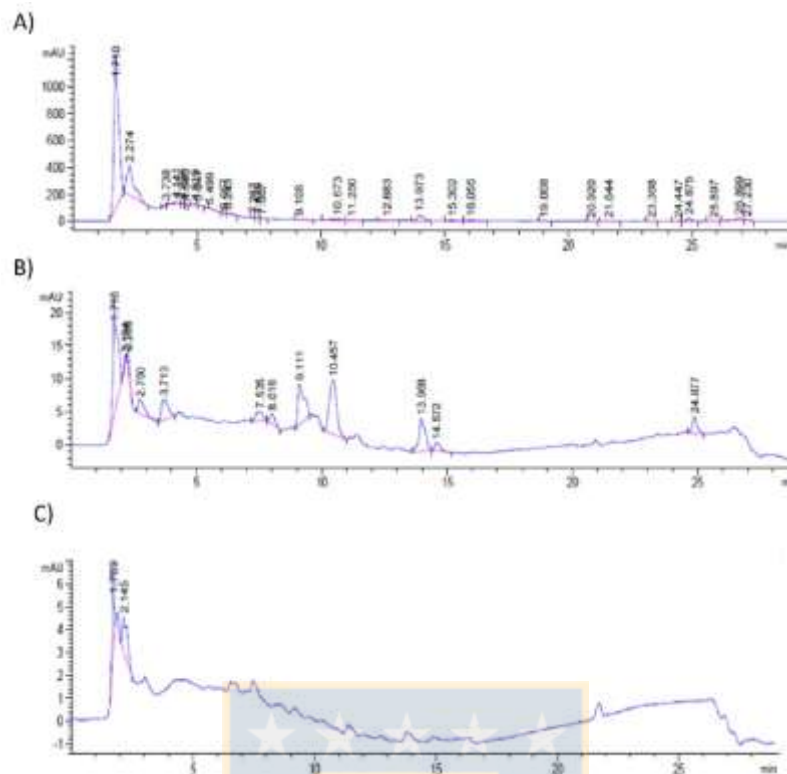


Figura 16. Cromatogramas extracto total obtenido con metanol

A) 210 nm B) 254 nm C) 310 nm.

Como ambos extractos obtenidos muestran cromatogramas iguales se combinaron, obteniendo 6,02 g, los que fueron fraccionados mediante columna cromatográfica Flash.

Una vez obtenidas las 14 fracciones mediante columna cromatográfica Flash, se realizó la evaluación bajo lámpara UV y revelado con ácido sulfúrico 30% evaluando presencia de compuestos (Figura 17).

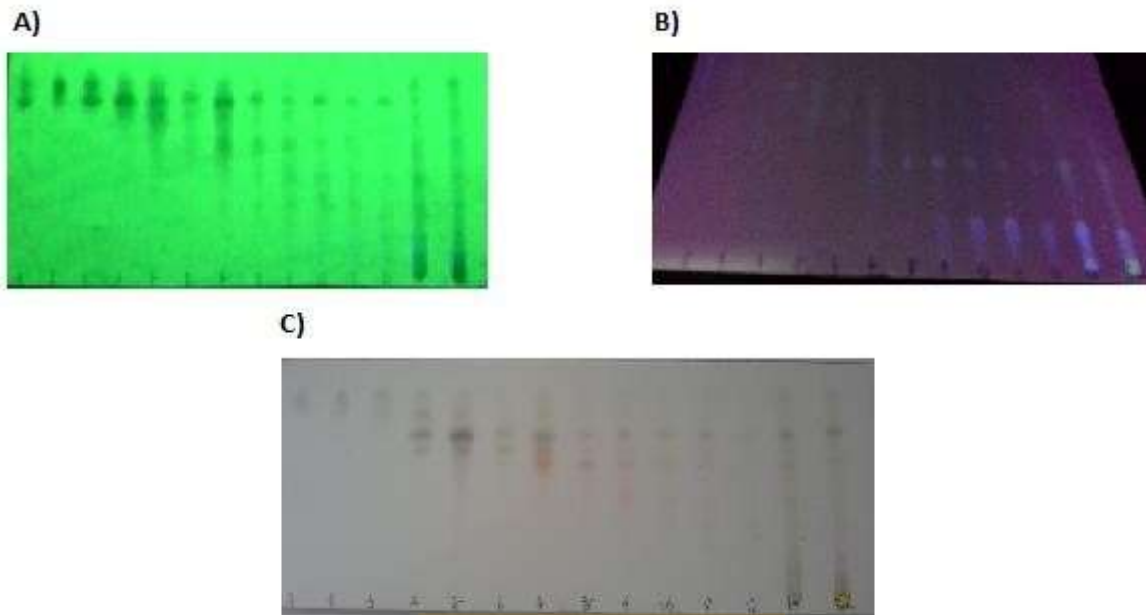


Figura 17. Visualización placas TLC, 14 fracciones obtenidas mediante columnaflash. A) Lámpara UV λ 254 nm B) Lámpara UV λ 365 nm C) Revelada con ácido sulfúrico 30%.

Desarrollados los respectivos ensayos bioactivos para las 14 fracciones, se observó halo de inhibición contra *S. Aureus* en fracción 14 (Figura 18).

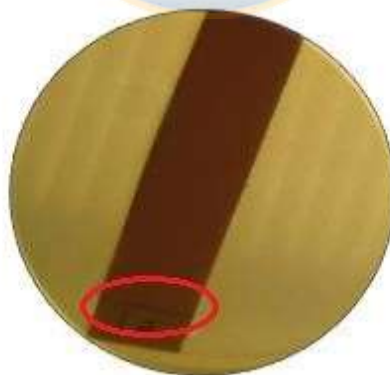


Figura 18. Halo de inhibición bioensayo fracción 14 obtenida mediante columna cromatográfica Flash contra *S. Aureus*, 12 mm diámetro.

Solo se observó una fracción bioactiva. Esto indica que la resina interacciona con el otro compuesto de interés. Por esto se descarta en las siguientes extracciones esta metodología.

Para realizar un análisis comparativo de ambas metodologías, se realizó nuevamente el cultivo de 30 L de la cepa en estudio para una segunda etapa de obtención de compuestos bioactivos mediante columna cromatográfica flash.

En esta etapa se obtuvo 985,5 mg de extracto total, el que fue fraccionado en 14 fracciones (Figura 19) de las cuales las fracciones 6, 7, 8 y 9 mostraron actividad contra *S. aureus* (Figura 20).

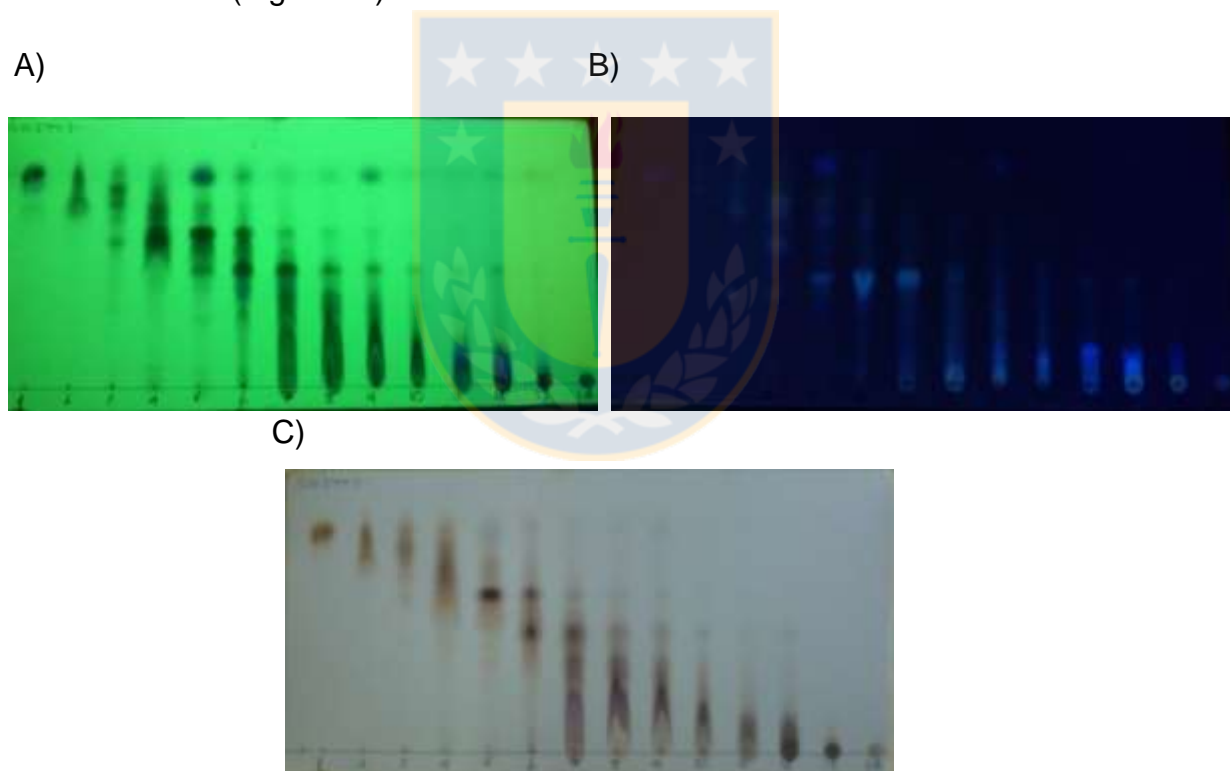


Figura 19. A) Extracto Total Extracción Líquido – Líquido Fraccionado por columna flash visto bajo lámpara UV (λ 210 nm). B) Extracto total extracción líquido – líquido fraccionado por columna flash visto bajo lámpara UV (λ 310 nm). C) Extracto total extracción líquido – líquido fraccionado por columna flash revelado con ácido sulfúrico.

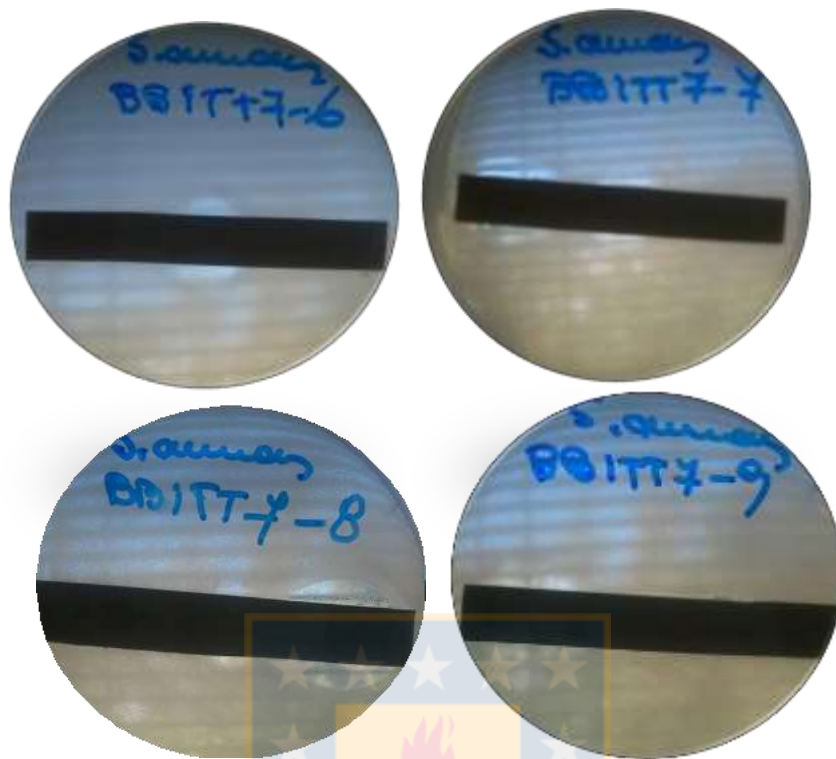


Figura 20. Ensayos bioactividad contra *S. aureus* extracto total extracción líquido – líquido fraccionado por columna flash de las 5 fracciones que mostraron actividad positiva.

Cada una de las fracciones bioactivas obtenidas fueron evaluadas en HPLC con el mismo método descrito para fracciones anteriores, una vez evaluados los distintos cromatogramas (Figuras 21, 22, 23, 24) se realizó la comparación de las distintas señales para proceder a la separación y obtención de los compuestos puros de interés.

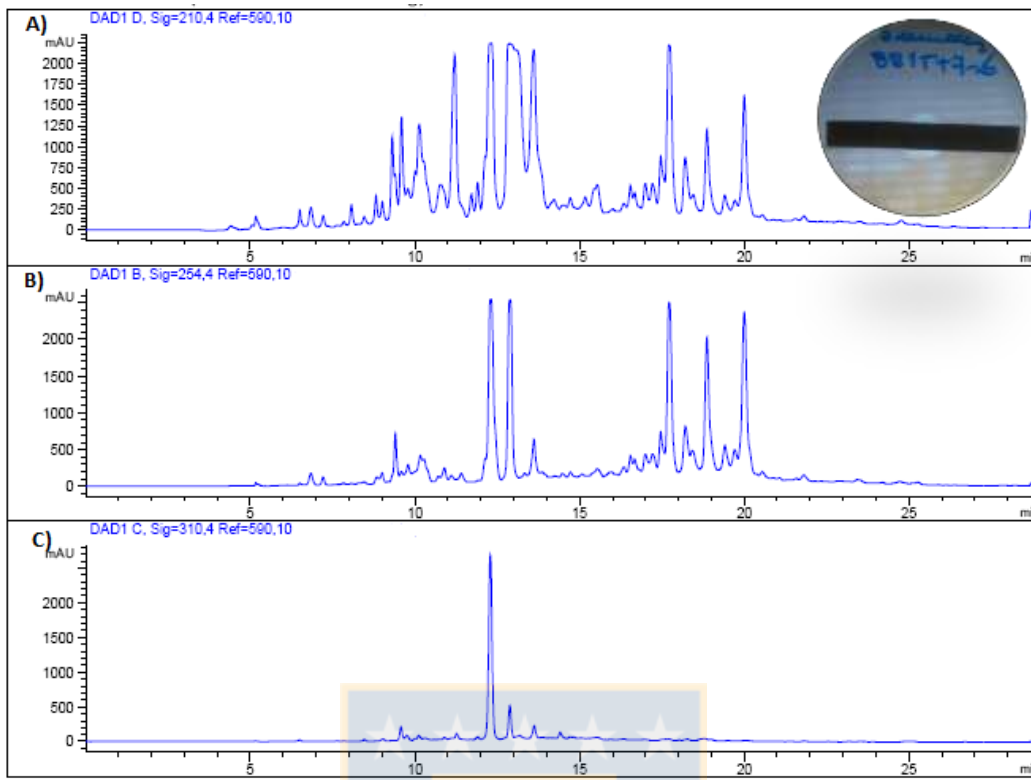


Figura 21. Cromatogramas fracción 6 A) 210 nm. B) 254 nm
C) 310nm.

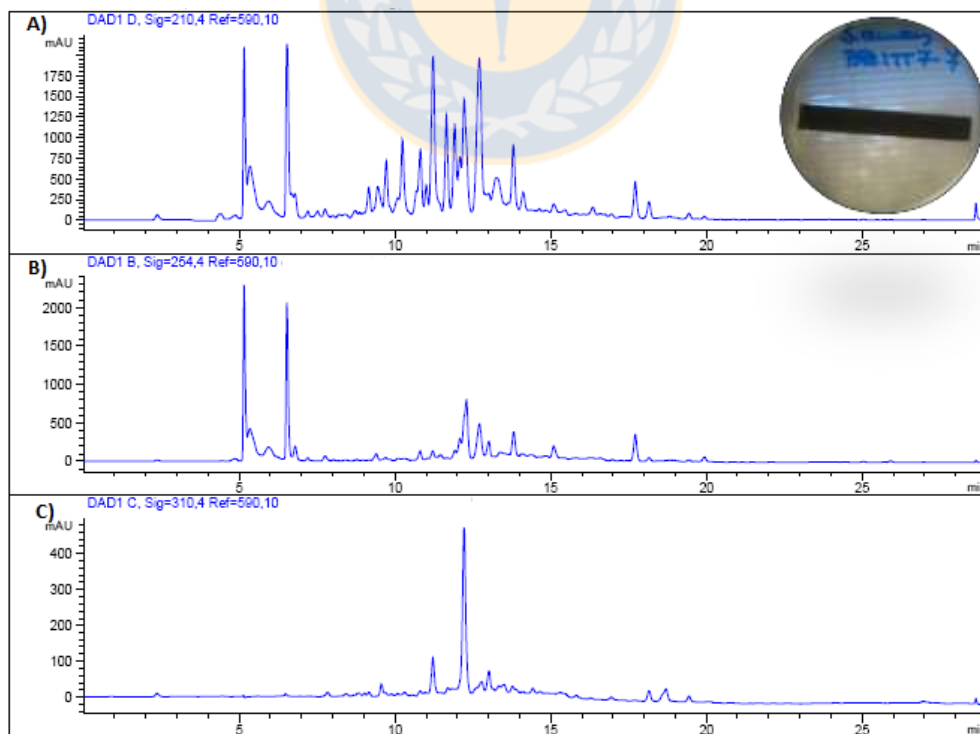


Figura 22. Cromatogramas fracción 7 A) 210 nm. B) 254 nm C) 310 nm.

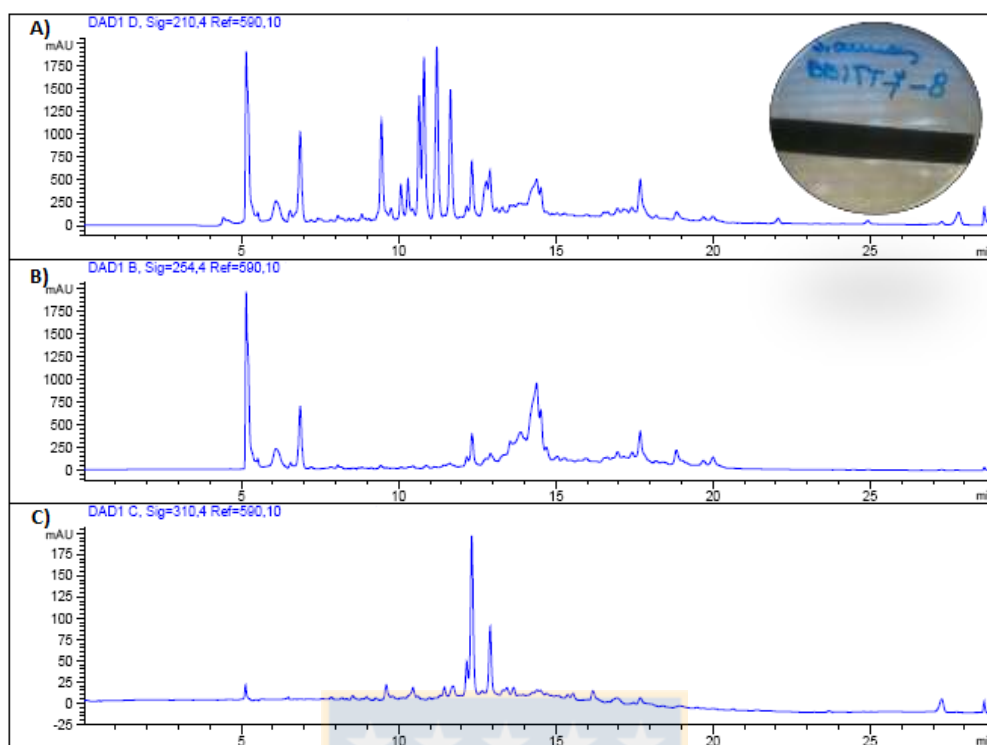


Figura 23. Cromatogramas fracción 8 A) 210 nm. B) 254 nm C)310 nm.

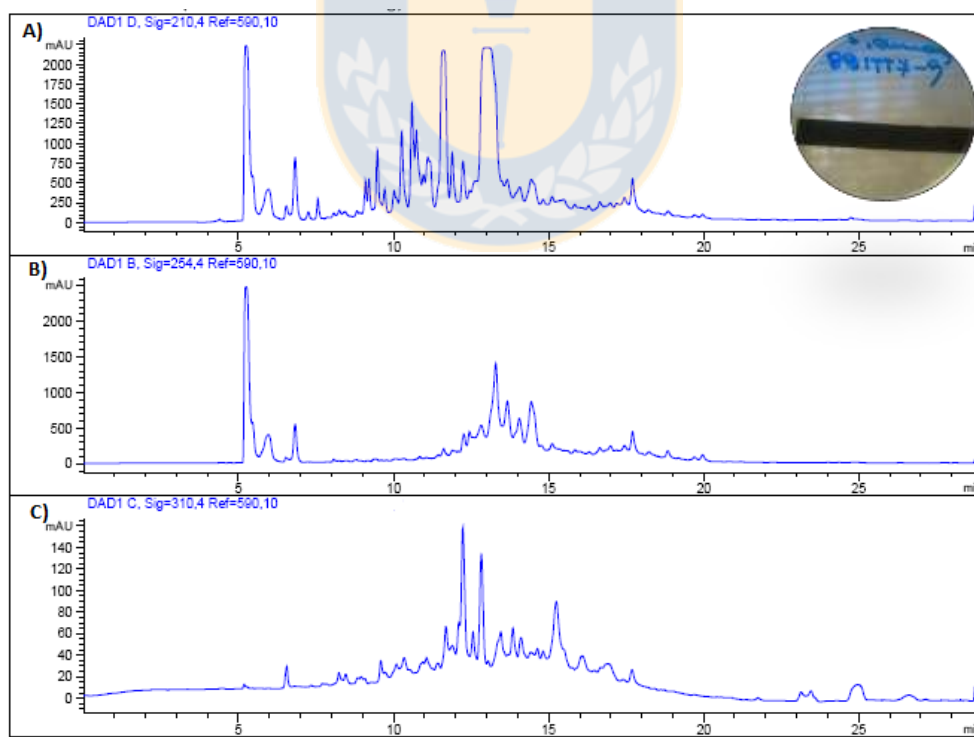


Figura 24. Cromatogramas fracción 9 A) 210 nm. B) 254 nm C)310 nm.

3.4 Separación y obtención de compuestos puros mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y detector evaporativo de dispersión de la luz (ELSD).

Observando los distintos cromatogramas, se puede observar que las fracciones 6 y 9 presentan solo uno de los compuestos de interés en ambos casos, mientras que las dos restantes (fracciones 7 y 8) presentan ambos compuestos. Por lo que para optimizar el tiempo de colección y conocimiento de las señales que corresponden a los compuestos bioactivos, se procedió a separar en primera instancia la fracción 7, debido a que en ella se observa en ensayo de bioactividad las dos zonas de inhibición.

Así, se separó esta fracción en nueve nuevas fracciones, las que corresponden a las señales en tiempos de retención de 10.816 min, 11.009 min, 12.222 min, 14.638 min, 17.718 min, 18.817 min y 19.438 min. Una vez obtenidos los compuestos semi puros de esta fracción y considerando el bajo rendimiento obtenido para los diversos compuestos presentes en la fracción 7, se llevó a cabo la separación de las mismas señales en las fracciones restantes, para posteriormente con la ayuda de bioensayos paralelos identificar las señales pertenecientes a los compuestos bioactivos. Ensayos que otorgaron actividad positiva para la señal en 12.222 min, 14.638 min, 17.718 min, 18.817 min y 19.438 min.

Los ensayos de bioactividad señalan que los compuestos con mayor bioactividad en proporción de su concentración se reúnen en las fracciones 8 y 9. Sin embargo se evaluó un problema de resolución de las señales para estas fracciones optando a realizar el análisis de fracción mediante detector evaporativo de dispersión de la luz (ELSD). Observando mediante este análisis la escasa presencia de señales en la zona de interés (Figura 25). Esto señala que las concentraciones de los compuestos situados en los tiempos de retención en el rango de los 14 a 20 min son mínimas.

Teniendo en cuenta que la concentración para este tipo de análisis es fundamental, ya que se requiere obtener cantidad suficiente de cada compuesto con actividad biológica para su identificación espectroscópica mediante RMN y diversas pruebas de actividad biológica. Se hace necesario el estudio mediante nuevas técnicas de separación y análisis bajo diferentes longitudes de onda o diferente método de separación para los compuestos presentes en ese rango de tiempo de retención y aumentar de este modo el rendimiento de los compuestos en estudio.

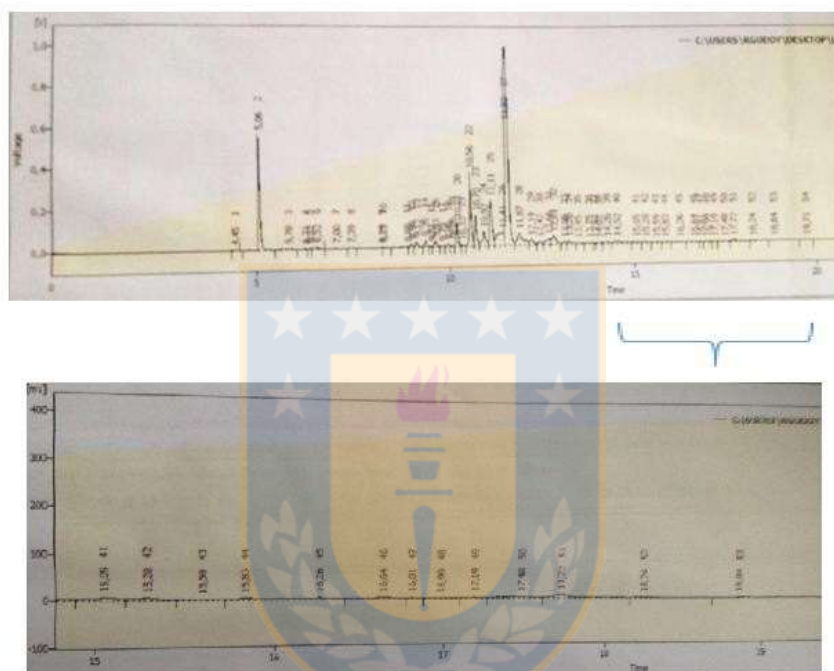


Figura 25. Cromatogramas fracción 8 mediante ELSD.

B) Diagrama total de análisis B) Diagrama tiempo 15 – 20 Min.

Es por lo anteriormente expuesto que se centró la purificación y obtención de mayor cantidad de compuesto puro presente en 12.222 min. Obteniendo así un total de 5 mg de compuesto puro (Figura 26).

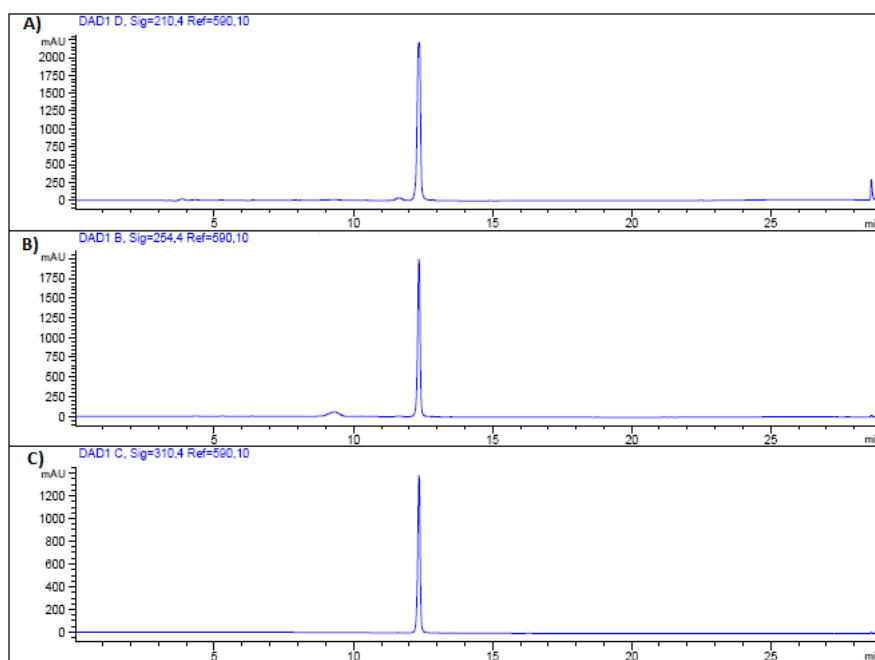


Figura 26. Cromatogramas compuesto puro con bioactividad contra *S. aureus*

A) 210 nm. B) 254 nm C) 310 nm

3.5 Dilucidación parcial de estructura química de compuesto bioactivo mediante LC/MS, GC/MS, RMN.

Para el análisis mediante LC/MS se observan diversas señales, las que pueden corresponder a fragmentos del compuesto presente, debido a su alta inestabilidad. La señal en 9.717 min por ser la más intensa es la que se ha utilizado para realizar el análisis mediante LC/MS (Figura 27). Este espectro muestra una señal mayoritaria con m/z 243, correspondiente a $[M+H]^+$, siendo así la masa del compuesto o de uno de sus fragmentos estables 242.

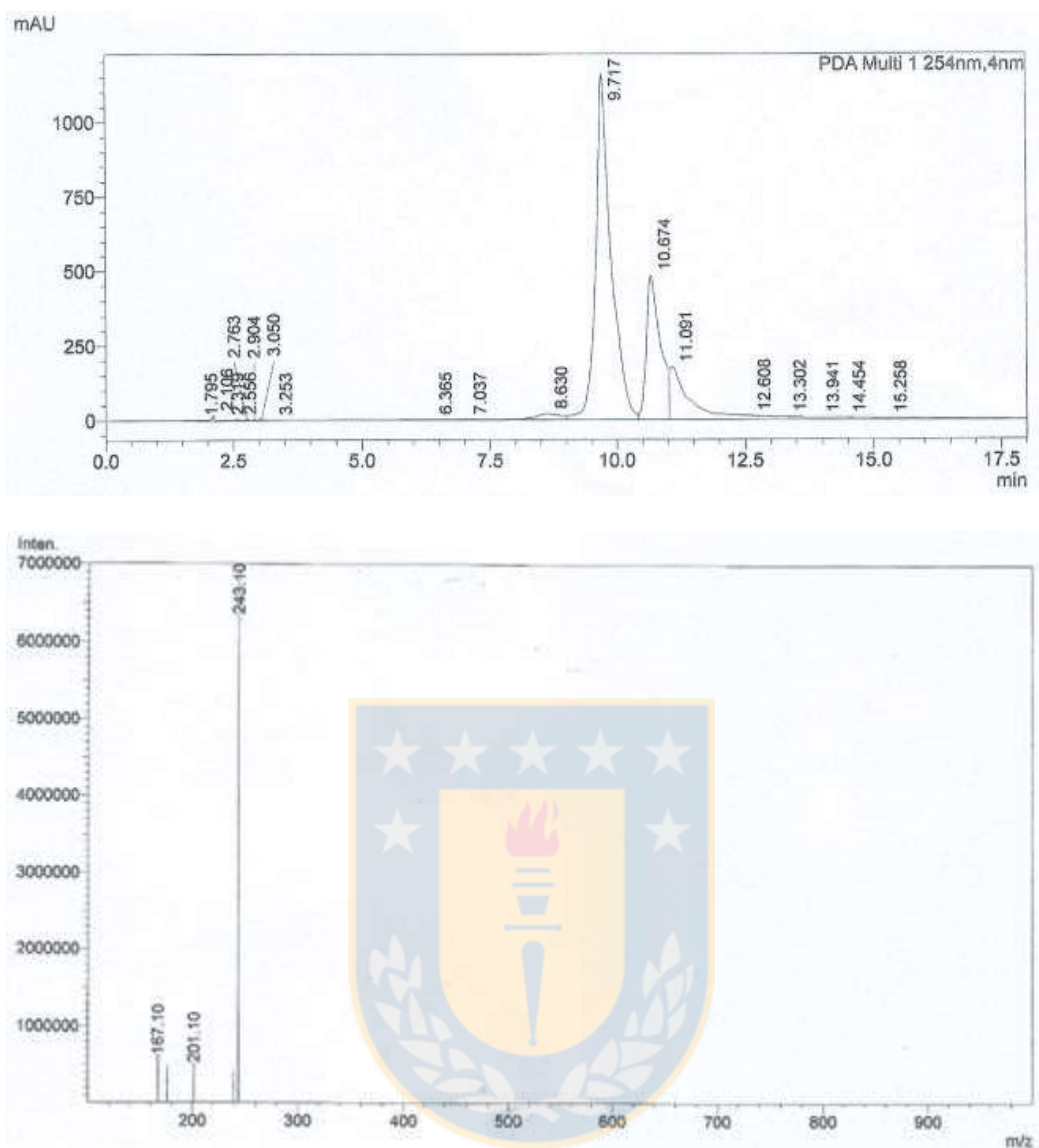


Figura 27. Cromatogramas compuesto puro obtenidos en LC/MS.

En el espectro otorgado por el cromatógrafo de gases (Figura 28), se observa para el compuesto varias fragmentaciones, de las cuáles la señal base corresponde a un m/z 74, característico de metil ésteres, originado por reordenamiento de McLafferty para un éster que posea un hidrógeno en un carbono gamma. Por otra parte, los valores en masa 87, 129 y 143 corresponderían a señales de carbocationes en los cuales está presente el grupo metil éster. De este modo el compuesto bioactivo presenta en su estructura un grupo éster ligado a una cadena carbonada en donde están presentes dobles enlaces, característicos de compuestos con bioactividad, también puede corresponder a un policétido de tipo macrólido, si se trata de un

compuesto macrocíclico con un anillo de lactona.

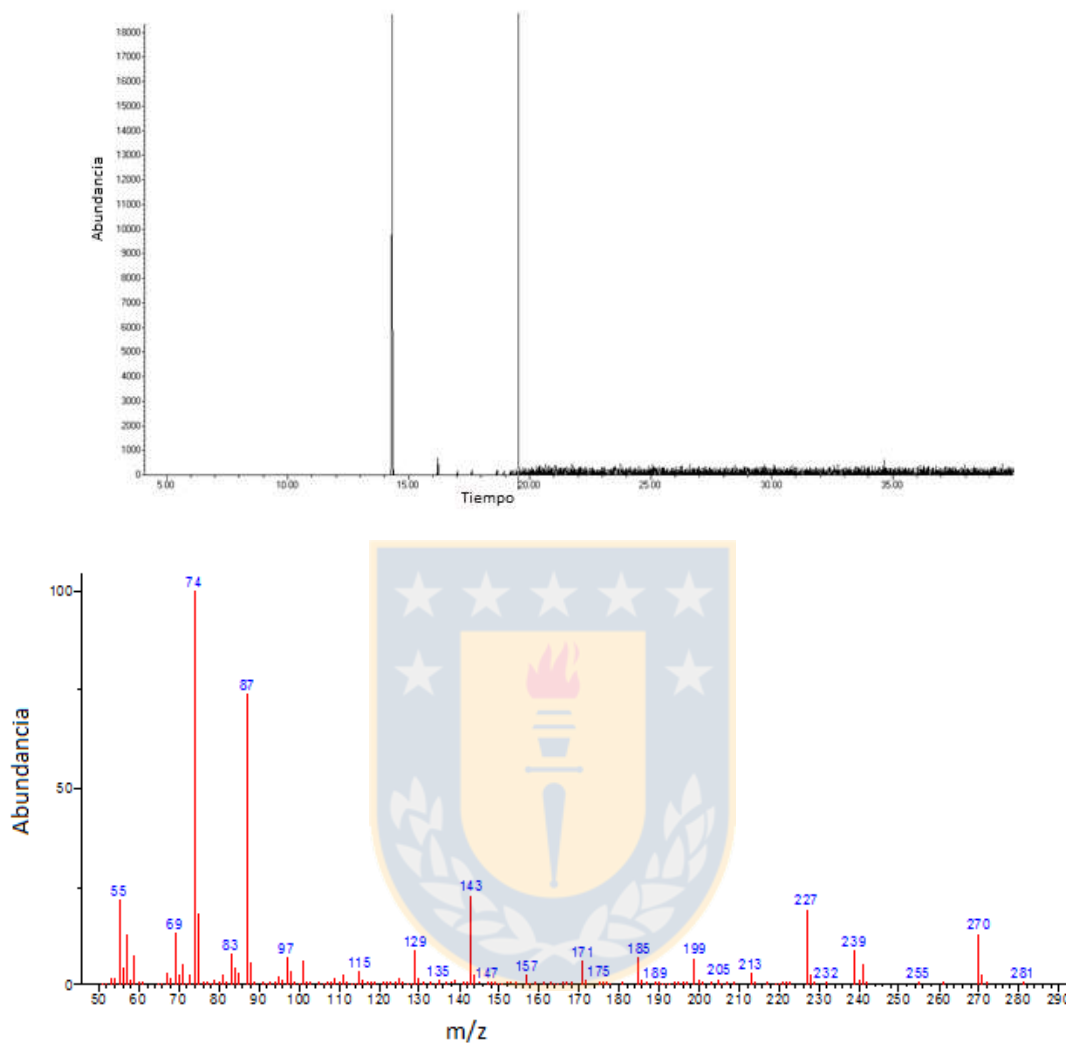


Figura 28. Espectro de masas para compuesto puro mediante GC/MS.

Para determinar con mayor relevancia la estructura del compuesto, se realizaron análisis en RMN, de los cuales solo fue posible obtener con mayor nitidez NMR-H (Figura 29), en donde se observan señales las que por cantidad de compuesto puro no presentan una buena resolución. Sin embargo son visibles algunas señales características de compuestos con característica estructural previamente dilucidadas por espectrometría de masas, correspondientes a la señal

en 3.486 ppm correspondiente al grupo metoxi presente en el metil éster, las señales presentes entre 3.9 – 6.5 ppm corresponden a los protones sobre carbonos insaturados, mientras que las señales entre 1.2 - 2.4 ppm correspondientes a protones sobre carbonos saturados.

Debemos obtener mayor cantidad de compuesto para obtención de mejor información y así poder definir al máximo posible sobre esta molécula, ya sea evaluando distintos medios, condiciones de cultivo o diferentes métodos analíticos para la separación y purificación del compuesto de interés.

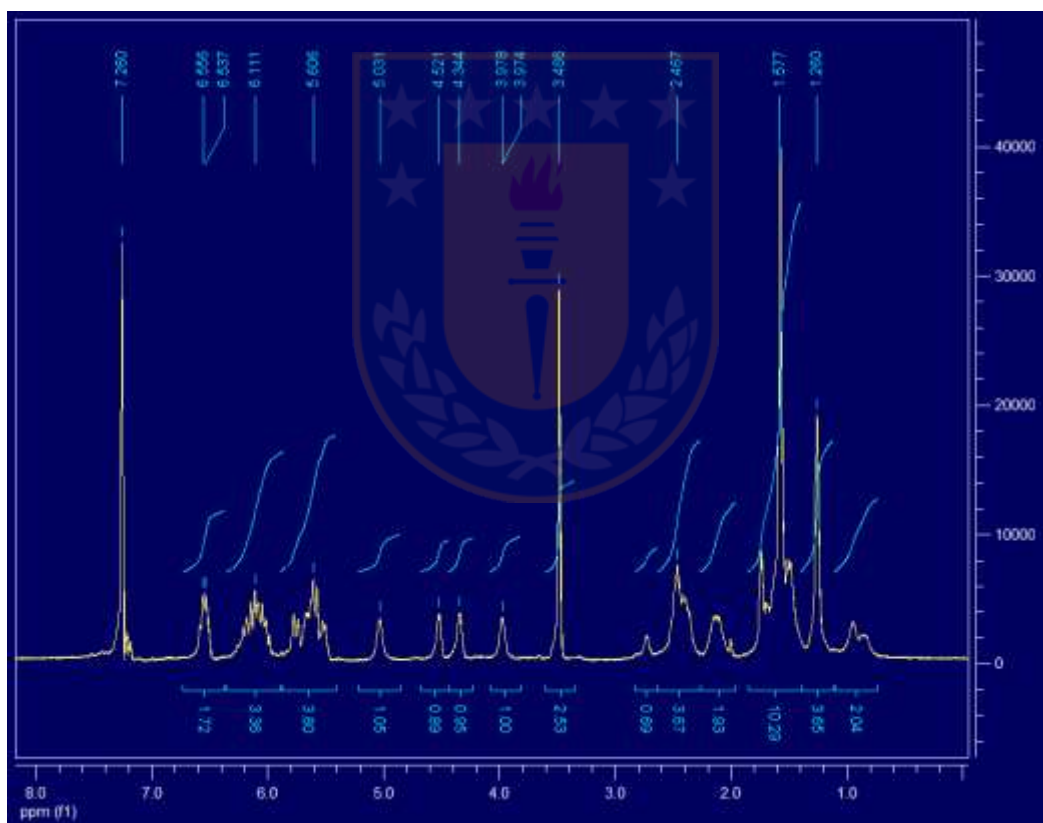


Figura 29. Espectrometro RMN-H, compuesto puro disuelto en CDCl_3 (7.2 ppm)

3.6 Pruebas de citotoxicidad

El extracto total mostró actividad citotóxica cercana al 70% en células neuro-2a, cuando es evaluada por 24 horas a una concentración de 50 µg/mL. (Gráfico 1).

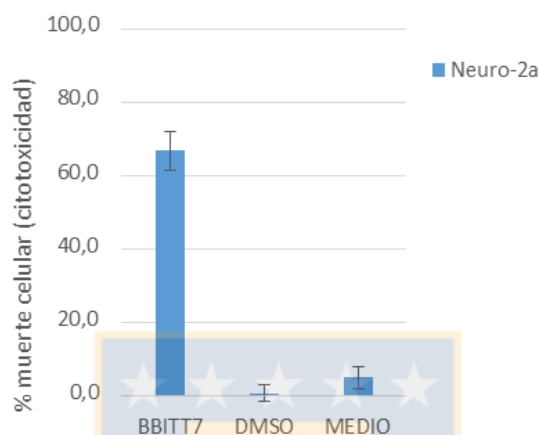


Gráfico 1. Citotoxicidad del extracto total evaluado a una concentración de 50 µg/mL por 24 horas sobre las células neuro-2a.

De las 14 fracciones evaluadas, sobre las células neuro-2^a y células MCF7 (células de cáncer de mama), solo las fracciones 3, 4, 5, 6, 8 y 9 presentan una actividad citotóxica cercana al 30 %, mientras que las fracciones restantes no presentaron actividad (Gráfico 2).

En las células de cáncer de mama MCF7 a la concentración evaluada (50 µg/mL), la fracción 9 presento una citotoxicidad de un 25%, mientras que las otras fracciones no alcanzaron una citotoxicidad mayor al 15% (Gráfico 2).

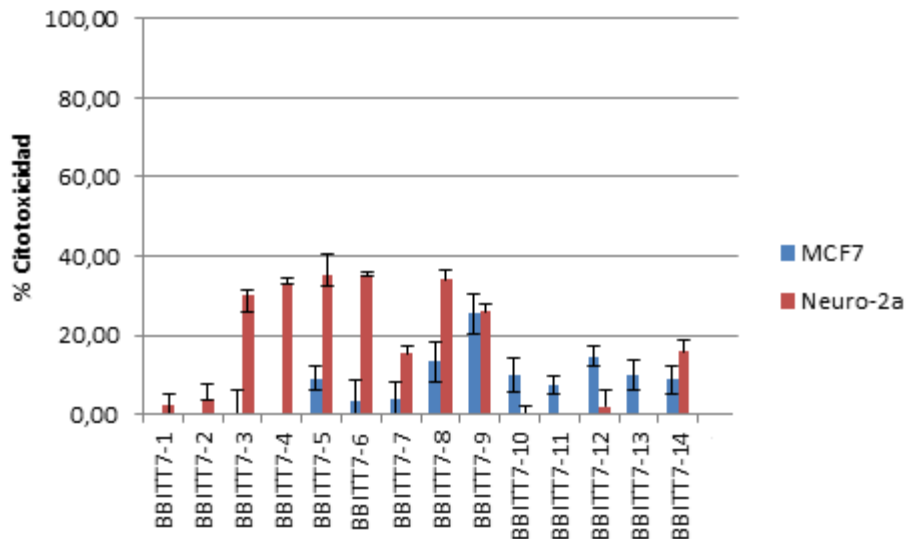


Gráfico 2. Actividad citotóxica de fracciones evaluadas sobre células Neuro-2a y MCF7 por 24 horas a una concentración de 50 µg/mL.

Considerando que la fracción 6 presenta citotoxicidad relevante, se realizaron ensayos con 7 concentraciones diferentes, indicando una concentración inhibitoria de 50% cercana a 70 µg/mL (Gráfico 3). Considerando que este valor no es favorable, conjunto a que la cantidad de extracto es mínima es necesario desarrollar nuevos parámetros de separación del extracto total exclusivos para pruebas citotóxicas.

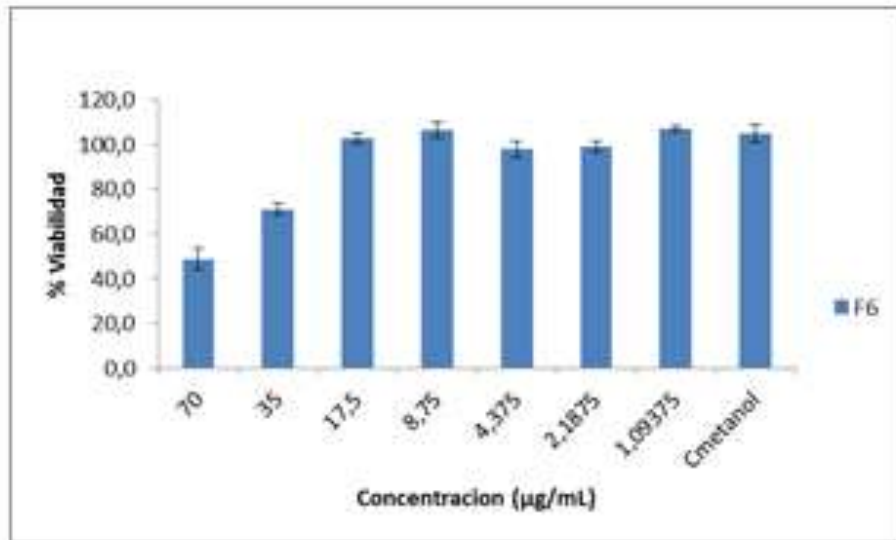


Gráfico 3. Citotoxicidad de fracción 6 sobre células Neuro 2a por 24 horas a diferentes concentraciones.

La concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida o bacteriostática se encuentran en estudio, debido al tiempo de obtención de cantidad suficiente de muestra para llevarlos a cabo.

4. CONCLUSIÓN

Los metabolitos microbianos poseen una amplia gama de actividades biológicas. Particularmente, aquellos extraídos desde bacterias aisladas desde sedimento marino, las cuáles muestran un elevado rango de bioactividad, principalmente contra *S. Aureus*, para el caso del compuesto aislado en esta investigación.

El estudio de compuestos orgánicos desde microorganismos tiene asociada una limitante importante para llevar a cabo la aislación y caracterización de los compuestos activos. El tiempo y las cantidades de metabolitos generados por estos microorganismos. Cantidades indispensables para el desarrollo de los diversos análisis.

Éstos y otros factores no son impedimento para llevar a cabo el estudio de los innumerables compuestos originados por estos microorganismos. Puesto que poseen una gran proyección en el campo biológico.

Para la extracción de los compuestos orgánicos la separación líquido-líquido es la mejor opción, debido a que permite la obtención de un extracto total más limpio y con mayor cantidad de compuestos con posibles actividades biológicas. Sin embargo, es necesario aumentar los parámetros y estudiar nuevos métodos químicos que favorezcan a una mejor separación y con ello una obtención de compuestos puros en mayores concentraciones según las características químicas de los compuestos a aislar. Logrando así, análisis con mayor resolución y poder dilucidar las estructuras de estas moléculas continuando con el apoyo en conjunto de todas las técnicas utilizadas.

5. REFERENCIAS

Acuña, G. (2003). Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. *Revista chilena de infectología*, 20, 7-10.

Bhadury, P., Mohammad, B. T., & Wright, P. C. (2006). The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(5), 325-337.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H., & Prinsep, M. R. (2012). *Marine natural products. Natural product reports*, 29(2), 144.

Butler, M. S. (2008). Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural product reports*, 25(3), 475-516.

Calle, F. D. L. (2009). Fármacos de origen marino. *Treballs de la Societat Catalana de Biologia*, 141-155.

Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.

Cueto, M., Jensen, P. R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E., & Clardy, J. (2001). Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *Journal of Natural Products*, 64(11), 1444- 1446.

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.

Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.

Fenical, W., & Jensen, P. R. (2006). Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nature chemical biology*, 2(12), 666- 673.

Fergus, W. (2014). Superbugs to kill more than cancer by 2050. <http://www.bbc.com/news/health-30416844>. Accessed 23/12/15

Garateix, A. (2005). El mar: fuente de nuevos fármacos. *Elementos, ciencia y cultura*, 12(58), 39-47.

He, S., Wang, H., Yan, X., Zhu, P., Chen, J., & Yang, R. (2013). Preparative isolation and purification of macrolactin antibiotics from marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* using high-speed counter-current chromatography in stepwise elution mode. *Journal of Chromatography A*, 1272, 15-19.

Jensen, P. R., Gontang, E., Mafnas, C., Mincer, T. J., & Fenical, W. (2005). Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments. *Environmental microbiology*, 7(7), 1039-1048.

Jensen, P. R., Mincer, T. J., Williams, P. G., & Fenical, W. (2005). Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87(1), 43-48.

Krohn, K., Dai, J., Flörke, U., Aust, H. J., Dräger, S., & Schulz, B. (2005). Botryane metabolites from the fungus *Geniculosporium* sp. isolated from the marine red alga *Polysiphonia*. *Journal of natural products*, 68(3), 400-405.

Lu, X. L., Xu, Q. Z., Liu, X. Y., Cao, X., Ni, K. Y., & Jiao, B. H. (2008). Marine drugs—macrolactins. *Chemistry & biodiversity*, 5(9), 1669-1674.

Maughan, H., & Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(5), 789-797.

Montero, P., Daneri, G., Cuevas, L. A., González, H. E., Jacob, B., Lizárraga, L., & Menschel, E. (2007). Productivity cycles in the coastal

upwelling area off Concepción: the importance of diatoms and bacterioplankton in the organic carbon flux. *Progress in Oceanography*, 75(3), 518-530.

Neira, K., & Palma, M. (2007). Estructura de la macrofauna en ambientes óxicos de bahía Coliumo, región del Bío-Bío, Chile central. *Gayana (Concepción)*, 71(2), 156-169.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of natural products*, 70(3), 461-477.

Prudhomme, J., McDaniel, E., Ponts, N., Bertani, S., Fenical, W., Jensen, P., & Le Roch, K. (2008). Marine actinomycetes: a new source of compounds against the human malaria parasite. *PLoS One*, 3(6), e2335.

Piel, J. (2009). Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural product reports*, 26(3), 338-362.

Piddock, L. J. (2012). The crisis of no new antibiotics—what is the way forward?. *The Lancet infectious diseases*, 12(3), 249-253.

Rovirosa, J., Diaz-Marrero, A. N. A., Darías, J., Painemal, K., & San Martín, A. (2006). Secondary metabolites from marine *Penicillium brevicompactum*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 51(1), 775-778.

Sobarzo, M., Bravo, L., Donoso, D., Garcés-Vargas, J., & Schneider, W. (2007). Coastal upwelling and seasonal cycles that influence the water column over the continental shelf off central Chile. *Progress in Oceanography*, 75(3), 363-382.

Subramani, R., & Aalbersberg, W. (2012). Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological research*, 167(10), 571- 580.

Thomas, G. 2014. "WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health". <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>.

Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. *Archives of microbiology*, 176(5), 386-390.

Williams, P. G. (2009). Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends in biotechnology*, 27(1), 45-52.

