



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

METABOLITOS ANTIBACTERIANOS DEL HONGO

***Beltraniella portoricensis* MR42**

Tesis que presenta

KARLA ALICIA PERAZA JIMÉNEZ

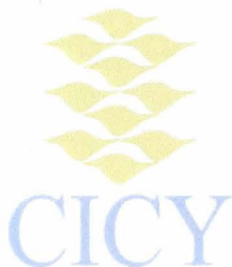
En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán, Marzo 2014





RECONOCIMIENTO



Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado Metabolitos antibacterianos del hongo *Beltraniella portoricensis* MR42 fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Ma. Marcela Gamboa Angulo, dentro de la Opción en Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe A. Vázquez Flota

Coordinador de docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.

Fecha: Marzo del 2014.

Mérida, Yucatán, México, Marzo del 2014

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos Experimentales y de Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Nombre: Karla Alicia Peraza Jiménez

Firma: 

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora la Dra. Marcela Gamboa Angulo por sus valiosas enseñanzas y consejos en la realización de este presente trabajo. Gracias por su paciencia y confianza que depositó en mí.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY) por las instalaciones brindadas en la realización de este trabajo.

Al Comité revisor de tesis, integrado por la Dra. Marcela Gamboa Angulo, Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, Dra. Yaneth Hernández Romero, Dra Blondy Canto Canché y Dr. Jairo Cristóbal Alejo.

A la I.Q. Leticia Medina Baizabal por su amistad y apoyo técnico en la realización del trabajo de laboratorio. A Narcedalia Gamboa y Sergio Pérez por su apoyo técnico en las revisiones bibliográficas y por artículos facilitados.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Arely, Anita, Marina, Dany, Magda y Angelito gracias por su amistad.

Al CONACYT por el financiamiento para el proyecto "Adiciones al estudio de hongos microscópicos tropicales con potencial biotecnológico en farmacia y agricultura (Proyecto No. 2009/CB131256)" y por la beca otorgada a K.A.P.J. (No. 427431).

DEDICATORIAS

A Dios por estar siempre a mi lado y permitirme estar finalizando otra etapa de mi vida.

Al regalo más preciado mis hijas: Alicia y Hannah por todo su amor y porque son mi motivación constante ante cualquier obstáculo o meta por alcanzar.

A mi madre por tu apoyo en todo momento, enseñanzas, consejos por ser mi amiga y confidente. Gracias por todo tu amor y confianza que siempre me has tenido., así como demostrarme que no existen imposibles.

A mi esposo José Javier por todo tu amor y ayuda incondicional. Gracias por creer en mí y darme ese empujón que tanto necesitaba para continuar hacia adelante.

A toda mi familia por depositar su confianza en mí.

CONTENIDO

CONTENIDO	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
Referencias	6
CAPITULO I	7
1.0 ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	7
1.1 Antibacterianos y modos de acción.....	7
1.1.1. Inhibiendo la síntesis de la pared celular.....	9
1.1.2. Inhibiendo la síntesis proteica	9
1.1.3. Alteración de la membrana citoplásmica	9
1.1.4. Bloqueo de la síntesis por ácidos nucleicos	9
1.2 Propiedades biológicas y químicas de hongos microscópicos de zonas tropicales de México	13
1.3 Ensayos biológicos	16
1.4 Bacterias blanco usadas en los ensayos biológicos.....	16
1.4.1. <i>Bacillus subtilis</i>	16
1.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	17
1.5 Descripción del hongo en estudio	18
1.6. <i>Beltraniella portoricensis</i>	20
1.6.1. Clasificación taxonómica.....	20

1.6.2. Sinonimias	20
1.6.4. Propiedades biológicas y químicas	21
1.7 Objetivo general.....	23
1.8 Objetivos específicos	23
1.9 Hipótesis.....	23
1.10 Estrategia experimental	25
1.11 Referencias.....	26
CAPITULO II	31
2.0 MATERIALES Y MÉTODOS	31
2.1 Trabajo microbiológico.....	31
2.2 Cultivo en arroz fermentado.....	31
2.3 Extracción del micelio cultivado	31
2.4 Partición del extracto crudo de KAP1- CYG	32
2.5 Métodos cromatográficos.....	32
2.5.1 Cromatografía en capa delgada (CCD).....	32
2.5.2 Cromatografía líquida al vacío (CLV)	32
2.5.3 Cromatografía en columna.....	32
2.6 Purificación de la fracción KAP-5C	33
2.7 Purificación de la fracción KAP-5D	33
2.8 Purificación de la fracción KAP-5F	33
2.9 Derivatización química	33
2.9.1. Acetilación de los compuestos KAP-6F y KAP-7D	33
2.10 Métodos Espectroscópicos	35
2.10.1 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).....	35
2.10.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN H ¹)	35

2.10.3 Espectroscopía de infrarrojo (IR).....	35
2.11 Datos de Beltranielona (KAP-6F)	35
2.12 Datos de Beltraniol (KAP-7D).....	35
2.13 Ensayos utilizados en este trabajo	36
2.13.1 Evaluación antibacteriana por el método de la Bioautografía	36
2.13.2 Ensayo antibacteriano por el Método de Microdilución.....	36
2.14 Referencias.....	38
CAPITULO III	39
3.0 RESULTADOS Y DISCUSION	39
3.1 Metabolitos aislados de <i>Beltraniella portoricensis</i>	39
3.1.1 Fracción KAP-5B	41
3.1.2 KAP-5C y KAP-5F	42
3.1.3 Beltranielona (KAP-6F)	43
3.1.4 Beltraniolol (KAP-7D)	53
3.2 Referencias.....	58
CAPITULO IV	61
4.1 CONCLUSIONES GENERALES	61
4.2 PERSPECTIVAS	63
ANEXOS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Ejemplos de fármacos obtenidos a partir de micromicetos con actividad antibacteriana	7
Figura 1.2. Ejemplos de fármacos disponibles en el mercado de origen fúngico.....	8
Figura 1.3. Blanco de los productos antibacterianos usados en el tratamiento de infecciones estafilocócicas.....	10
Figura 1.4 Ejemplos de metabolitos farmacológicamente activos de origen fúngico de áreas tropicales.	13
Figura1.5. Características de morfológicas de crecimiento de <i>B. portoricensis</i>	20
Figura 1.6. Diagrama de la estrategia experimental en la purificación de <i>Beltraniella portoricensis</i>	25
Figura 2.1. Diagrama de purificación de los metabolitos KAP-6F y KAP-7D.	34
Figura 3.1. Bioautografía de las fracciones KAP-2A (2A) y KAP-2B (2B)	39
Figura 3.2. Fracciones finales de la VLC (KAP-5A-H) R) fracción original.	40
Figura 3.3. Experimento de bioautografía	41
Figura 3.4. Cromatograma de gases de la fracción KAP-5B.	41
Figura 3.5. Bioautografía de las fracciones KAP-6F y KAP-7D	43
Figura 3.6. Bioensayo antibacteriano (<i>Staphylococcus aureus</i>) con la técnica de microdilución.....	43
Figura 3.7. Espectro infrarrojo (IR) del metabolito KAP-6F.....	44
Figura 3.8 Espectro de RMN ^1H de beltranielona (400 MHz, CD_3OD).	45
Figura 3.9. Espectro de RMN ^{13}C de beltranielona (100 MHz, CD_3OD).	45
Figura 3.10 Espectro DEPT 135 de beltranielona (100 MHz, CD_3OD)	46
Figura 3.11 Espectro HSQC protón-carbono de beltranielona (400 MHz en CD_3OD).	46
Figura 3.12. Acoplamiento protón-protón detectados en el espectro bidimensional COSY $1\text{H}-1\text{H}$ de beltranielona (400 MHz en CD_3OD).	47
Figura 3.13 Espectro de HMBC protón-carbono (^1J) y (^2J) de Beltranielona (400 MHz en CD_3OD).	48

Figura 3.14. Estructuras químicas de (A) ofiobolina y (B) brassiciceno.	49
Figura 3.15. Estructura química del 3-desoxi-3-hidroximetil-mio-inositol.	50
Figura 3.16. Estructura propuesta para beltranielona.	51
Figura 3.17. Datos del espectro de masas de impacto negativo de beltranielona	51
Figura 3.18. Espectro de infrarrojo (IR) de beltranielol (KAP-7D).	53
Figura 3.19. Espectro de RMN ^{13}C de beltranielol (400 MHz en CD_3OD).	54
Figura 3.20. Espectro de RMN ^1H de beltranielol (400 MHz en CD_3OD).	54
Figura 3.21.- Espectro de masas de impacto positivo de beltranielol.	55
Figura 3.22. Estructura propuesta para beltranielol.	55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Clasificación química de los antimicrobianos, algunos ejemplos, modo y espectro de acción simplificados (Errecade <i>et al.</i> , 2004).	11
Cuadro 1.2. Especies de hongos microscópicos con actividad antimicrobiana evaluados a 500 µg/disco y nematóxica (300 µg/mL).	15
Cuadro 1.3. Especies descritas del género <i>Beltraniella</i> , substrato y país de origen (www.indexfungorum.org : 19/02/2014).	19
Cuadro 3.1. Datos espectroscópicos de beltranielona en CD ₃ OD (¹ H 400 MHz, ¹³ C 100 MHz).	52
Cuadro 3.2. Datos espectroscópicos de beltranielol en CD ₃ OD (¹ H 400, ¹³ C 100 MHz). .	56

ABREVIATURAS

IR	Infrarrojo
CE-GM	Cromatografía de espectros gases masas
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
Ppm	Partes por millón
CC	Cromatografía de capa delgada
UV	Ultravioleta visible
CLV	Cromatografía líquida al vacío
An	Acetona
Hx	Hexano
AcOEt	Acetato de etilo
R_f	Relación frontal
V_{max}	Frecuencia máxima
MHz	Megahertz
s	Singulete
d	Doblete
dd	Doble de dobles
m	Multiplete
J	Constante de acoplamiento
δ	Desplazamiento químico
HSQC	Correlación cuántica heteronuclear múltiple
COSY	Correlación espectroscópica de protón
HMBC	Correlación de enlace heteronuclear múltiple

RESUMEN

Los hongos microscópicos (HM) son reconocidos como una rica fuente de metabolitos secundarios, los cuales han presentado variadas propiedades biológicas de aplicación en medicina y agricultura. Con la finalidad de contribuir a esta búsqueda en la Unidad de Biotecnología del CICY se han desarrollado estudios con HM de la zona sureste de México. Esta investigación llevó a detectar a la cepa *Beltraniella portoricensis* MR42 con actividad antimicrobiana. Esta cepa no ha sido estudiada en cuanto a sus metabolitos secundarios, por lo cual en el presente trabajo se planteó como objetivo aislar e identificar los compuestos antibacterianos que produce.

El trabajo de aislamiento y purificación se guió con los bioensayos de bioautografía y microdilución, empleando cromatofolios de gel de sílice y microplacas de 96 pozos respectivamente en donde se inocularon las fracciones junto con las bacterias blanco y se dejaron incubar por 24 h a 37°C. Los resultados se observaron por la formación de halos de inhibición así como la mínima concentración inhibitoria a la que actúan. La cepa se cultivó en forma masiva en arroz fermentado y se obtuvo el extracto de acetato de etilo, el cual mantiene la actividad antibacteriana.

El trabajo de purificación biodirigida del extracto de *B. portoricensis* llevó al aislamiento de subfracciones activas (KAP-5B-D), de las cuales se obtuvieron dos compuestos. Ambos metabolitos se identificaron como novedosos con base en el estudio integral de sus análisis espectroscópicos y espectrométricos, nombrándose beltranielona (KAP-6F) y beltranielol (KAP-7D). Únicamente el primero mostró actividad bactericida contra las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* con una MIC de 200 µg/mL para ambos patógenos.

La beltranielona y el beltranielol corresponden a nuevas aportaciones a los productos naturales y a la química de los hongos microscópicos tropicales de México.

ABSTRACT

Microscopic fungi (MF) are recognized as a rich source of secondary metabolites, presenting various biological properties for application in medicine and agriculture. With the aim of contributing to this investigation, studies have been conducted in the Biotechnology Unit of the CICY to look for HM in the southeast of Mexico. This research led to the detection of the *Beltraniella portoricensis* strain MR42 with antimicrobial activity which has not been studied in relation to its secondary metabolites. Thus, the objective of the present study was to isolate and identify antibacterial metabolites produced by this strain.

In the bioautography and microdilution bioassays, silica gel chromatofolios and 96-well microplate were used, respectively. In these experiments, the fractions were inoculated with the target bacteria and incubated at 37°C for 24 hours. The results were observed by the formation of zones of inhibition and the minimum inhibitory concentration at which they act. The strain was cultured on fermented rice and extracted with ethyl acetate extract, which showed antibacterial effect.

In this work, biodirected fractionation of *B. portoricensis* allowed the isolation of active subfractions (KAP-5B, 5D) from which two novel compounds were obtained. Both were identified by comprehensive study of spectroscopic and spectrometric analysis. They were named beltranielona (KAP- 6F) and beltranielol (KAP- 7D). Only the first showed inhibitory activity against Gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*, with a MIC of 200 µg/ ml for both pathogens.

Beltranielona and beltranielol correspond to new contributions to natural products and to the chemistry of microscopic fungi of tropical Mexico.

INTRODUCCIÓN

En la búsqueda de productos naturales (PN) que faciliten la resolución de algunos de los problemas que plantea la vida actual, el hombre ha mirado, explorado y utilizado a los microorganismos fúngicos como fuente de nuevas sustancias con propiedades biológicas innovadoras (Strohl, 2000).

Los hongos microscópicos (HM) reúnen cualidades que los convierten en un recurso con un alto potencial biotecnológico. Su tamaño, forma de reproducción y metabolismo los hace idóneos para su uso en la industria alimentaria, farmacéutica, textil, agrícola, etc (Gams, 1978). Sin duda alguna el descubrimiento de la penicilina en 1928 a partir de *Penicillium chrysogenum* dio la pauta para la producción industrial de antibióticos mediante procesos fermentativos de estos microorganismos. El impacto de estos productos fue tan alto que en 1983 ya se habían reportado más de 5,000 antibióticos, de los cuales el 23% son a partir de HM (Harvey, 2000). Aunque son un grupo altamente diverso y abundante en la naturaleza, a la fecha la mayor parte de estos estudios se han realizado con HM de regiones templadas, siendo prácticamente inexploradas las regiones tropicales (Heredia, et al 2002). Lo anterior remarca la importancia de colaborar al conocimiento del potencial biotecnológico en estas regiones de México.

Con base en lo anteriormente expuesto y con la finalidad de contribuir a la investigación de HM con aplicaciones en agricultura y farmacia, en el grupo de bioplaguicidas de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) se realizaron monitoreos de los HM de hojarasca del sureste mexicano con el fin de conocer la actividad y el tipo de metabolitos que éstos presentan (Gamboa-Angulo *et al.*, 2013; Reyes-Estebanez *et al.*, 2008). Entre éstos, la cepa de *Beltraniella portoricensis* MR42 mostró propiedades antifúngicas contra *Alternaria tagetica*, *Colletotrichum gloeosporioides*, y antibacteriana contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Cabe mencionar que en la literatura no se encontró reportes previos de estudios funguquímicos de esta especie. Lo anterior justifica continuar con su estudio, por lo que en el presente trabajo se planteó como objetivo el aislamiento, purificación biodirigida e identificación de los metabolitos antibacterianos producidos por la cepa *Beltraniella portoricensis* MR42, contra las bacterias patógenas *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

Referencias

- Gamboa- Angulo, M., Molina Salinas, G.M., Chan Bacab, M., Peraza Sánchez, S.R., Heredia G., de la Rosa García S.C. y Reyes Estebanez M. (2013). Antimycobacterial y antileishmanial effects of microfungi isolated from regions tropicals in México, *Parasitology Research*, 112, 559-566.
- Gams, W. (1992). The analysis of communities of saprophytic microfungi with special reference to soil fungi, in fungi in vegetation science. Wintterhoff, W. (ed). Kluwer Academic publishers, Dordrecht, 7, 183-223.
- Harvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, 5,294-300.
- Heredia, G. Arias, M. y Castañeda-Ruíz, R. (2002). New anamorph fungi with rhombic conidia from Mexican tropical forest. *Fungal Diversity*, 11, 99-107.
- Reyes Estebanez M., Heredia Abarca G. M. y Gamboa Angulo M.M. (2008). Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México. *Revista. Mexicana de Micología*, 28, 49-56.
- Strohl, W.R. (2000). The role of natural products in a modern drug discovery program *Drug Discovery Today*, 4,539–542.

CAPITULO I

1.0 ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1.1 Antibacterianos y modos de acción

Una de las aportaciones más importantes de los hongos para el hombre es indudablemente su capacidad de producir metabolitos con actividad antibacteriana, conocidos como antibióticos. Estos son productos del metabolismo microbiano (hongos, bacterias) comúnmente utilizados para matar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos patógenos. La penicilina producida por *Penicillium notatum*, reconocida como el antibiótico pionero, constituyó la primera aplicación de la biotecnología a la industria farmacéutica (Figura 1.1A). Así, mientras algunas especies de *Penicillium* producen penicilina, otras fabrican antibióticos tan importantes como las cefalosporinas (Figura 1.1B). Desde entonces, se han descrito un sin fin de agentes antimicrobianos detonando el gran avance de la medicina y la biotecnología en las últimas décadas (Borraz, 2006; Bull *et al.*, 2000).

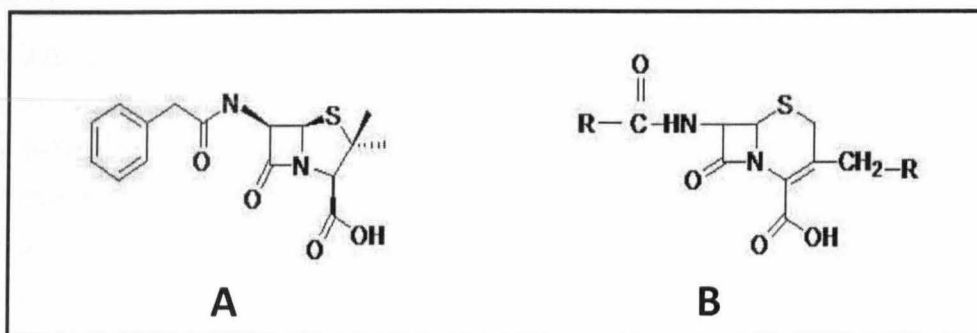


Figura 1.1. Ejemplos de fármacos obtenidos a partir de micromicetos con actividad antibacteriana, (A) Penicilina y (B) Cefalosporina.

Entre los fármacos de origen microbiano recientemente aprobados por la FDA se encuentra el acetato de caspofungina (Figura 1.2A) (Cancidas, Merck, 2001) un lipopéptido semi-sintético derivado de neumocandin y producto de la fermentación de *Glarea lozoyensis*. Este fármaco actúa inhibiendo la síntesis del homopolímero de glucosa- β -(1,3) D-glucano que es un componente esencial de la pared celular de los hongos, y ausente en mamíferos. También podemos mencionar al cefditoren pivoxilo

(Figura 1.2B), aislado de varias cepas del género *Cephalosporium*, el cual tiene un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivas y Gram negativas; y es capaz de hidrolizarse frente a una gran cantidad de β -lactamasas.

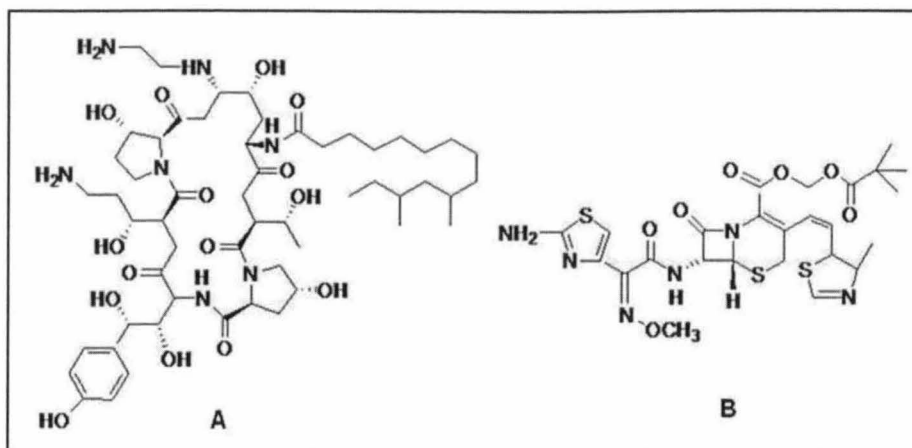


Figura 1.2. Ejemplos de fármacos disponibles en el mercado de origen fúngico. (A) Acetato de caspofungina y (B) Cefditoren pivoxilo.

De acuerdo a su origen, los compuestos antibacterianos pueden clasificarse como naturales, sintéticos y semisintéticos. Con base en su estructura se clasifican en aminoglucósidos, β -lactámicos, polipéptidos, rinfamicinas, tetraciclinas, anfenicoles, macrólidos y misceláneos. Los agentes antibacterianos idóneos son aquellos compuestos que selectivamente inhiben las enzimas de las células patogénicas y la toxicidad hacia las células huéspedes sea muy baja (Mc Dermott *et al.*, 2003).

En la forma en que actúan los antibióticos pueden ser clasificados como: bacteriostáticos (inhibiendo temporalmente el crecimiento de la bacteria) o bactericida (destruyendo la viabilidad celular). Algunos de los puntos de acción de los productos antibacterianos reportados son los siguientes:

1.1.1. Inhibiendo la síntesis de la pared celular

Estos fármacos actúan inhibiendo la síntesis péptidoglucanos necesarios para la formación de la pared celular bacteriana, la cual se debilita y rompe por acción de la presión osmótica (Gram positivas 5 atm y Gram negativas 10 atm) del medio del huésped. En este proceso están implicados los β -lactámicos y glucopéptidos.

1.1.2. Inhibiendo la síntesis proteica

En el mecanismo antimicrobiano que inhibe la síntesis proteica, el fármaco se une específicamente y de forma irreversible, con un receptor proteico de los ribosomas 30S. Esta unión causa el bloqueo de la actividad normal del complejo de iniciación, con lo que se detiene la síntesis proteica. Por otro lado, distorsiona el lugar de los codones provocando la incorporación de aminoácidos distintos al codificado, induciendo la formación de proteínas anómalas. Esto ocurre con los aminoglicósidos, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, estreptograminas, cetólidos, cloranfenicol, etc.

1.1.3. Alteración de la membrana citoplásmica

La membrana citoplasmática es una estructura vital para todas las células, ya que actúa como una barrera de permeabilidad selectiva, controlando de esta forma la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad y permiten la salida de iones K y macromoléculas como los ácidos nucleicos, lo que causa un efecto lítico. Entre los fármacos que actúan por este mecanismo se encuentran las polimixinas y los polienos.

1.1.4. Bloqueo de la síntesis por ácidos nucleicos

La biosíntesis de moléculas de ARN y ADN consiste en una larga serie de reacciones catalizadas por enzimas, que al igual que cualquier otro proceso complejo es susceptible de interrumpirse en diferentes puntos. Los antibióticos que interfieren en la síntesis de ácidos nucleicos esencialmente actúan bloqueando la síntesis de sus componentes, inhibiendo la replicación o la transcripción. Los compuestos que actúan por este mecanismo son principalmente las sulfamidas.

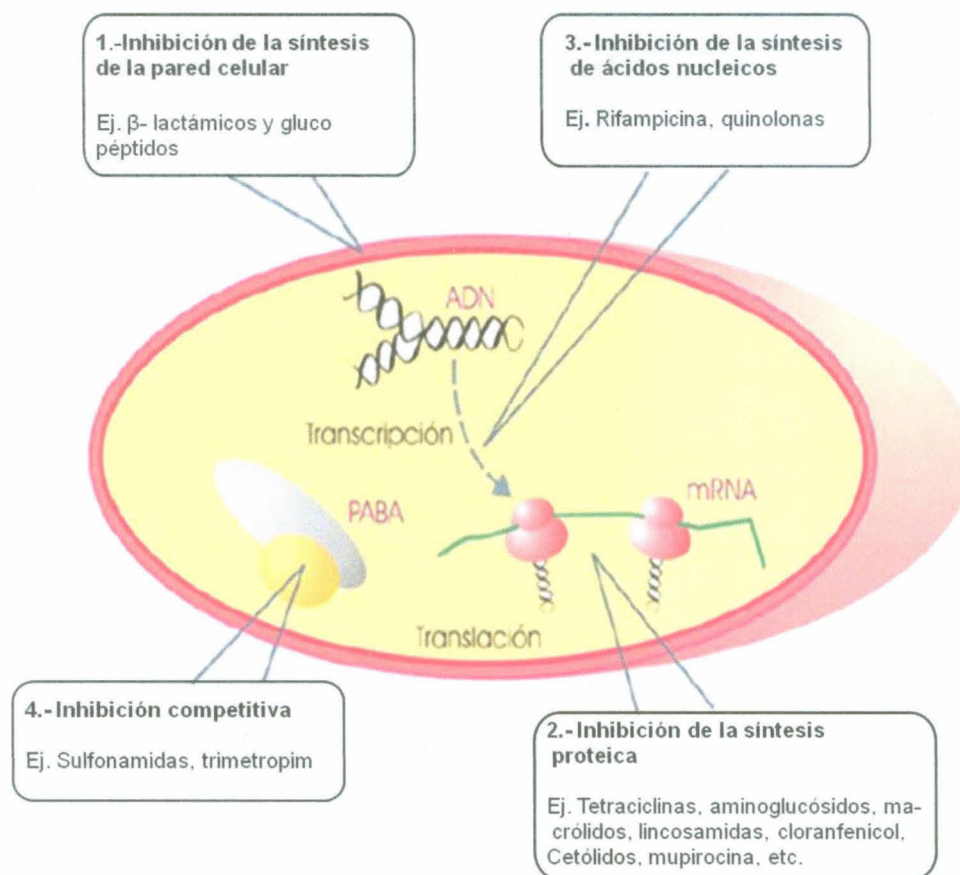


Figura 1.3. Blanco de los productos antibacterianos usados en el tratamiento de infecciones estafilocócicas (Borraz *et al.*, 2006).

Cuadro 1.1. Clasificación química de los antimicrobianos, algunos ejemplos, modo y espectro de acción simplificados (Errecade *et al.*, 2004).

Grupo	Miembros	Modo de acción	Espectro
Beta lactámicos: Penicilinas	Penicilina G	inhiben síntesis de pared	Bacterias G+
	Penicilina V	"	"
	Cloxacilina	"	Estafilococos productores de penicilinasa
	Ampicilina	"	Bacterias G+ y G-
Beta lactámicos: Cefalosporinas	Carbenicilina	"	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Cefaloridina	Inhiben síntesis de pared	Bacterias G+ y G-
	Cefalexina	"	Estafilococos productores de penicilinasa
	Cefuroxima	"	Bacterias G+ y G-
	Moxalactama	"	Bacterias G+ Enterobacterias
	Ceftiofur	"	"
	Cefoperazona	"	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Cefepima	"	Estafilococos y enterobacterias
Beta lactámicos: Inhibidores de la Beta lactamasa	Ácido clavulánico	Se enlazan e inhiben la lactamasa	Gérmenes productores de beta lactamasa
	Sulbactam	"	"
Beta lactámicos: Carbapenems	Tazobactam	"	"
	Imipenem-cilastatina	Inhiben síntesis de pared	Bacterias G+ y G- aerobios y anaerobios
Beta lactámicos: Monobactams	Aztreonam	"	G-y aerobios
	Estreptomicina	Inhiben síntesis proteica porción 30 S ribosomal	Bacterias G-
Aminoglucósidos	Kanamicina	"	"
	Neomicina	"	"
	Gentamicina	"	"
Aminociclitoles			
	Espectinomina	"	Bacterias G- y micoplasmas
Azúcares complejos o Lincosamidas	Lincomicina	Inhiben síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias G+, anaerobios y micoplasmas
	Clindamicina	"	"
Rifamicinas	Pirlimicina	"	"
	Rifampicina	Inhibe ARN polimerasa	Bacterias G+micobacterias
Péptidos	Polimixina B	Desorganizan	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

		membrana	
Glucopéptidos	Colistín	"	"
	Vancomicina	Inhibe síntesis de pared	Bacterias G+ y G-
Estreptograminas	Teicoplanina	"	"
	Avoparcina	"	"
	Virginamicina	Inhibe peptidiltransferasa	Bacterias G+ aerobias y anaerobias
Macrólidos	Eritromicina	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias G+ y G-
	Oleandomicina	"	"
	Tilosina	"	"
	Espiramicina	"	"
	Tilmicosina	"	"
Fenicoles	Cloranfenicol	Inhibe síntesis proteica porción 50S ribosomal	Bacterias G+ y G- rickettsias y chlamydias
	Tianfenicol	"	"
Tetraciclinas	Florfenicol	"	"
	Oxitetraciclina	Inhibe síntesis proteica porción 30S ribosomal	Bacterias G+ y G-, Rickettsias, chlamydias y algunos protozoos
	Doxiciclina	"	"
Sulfonamidas	Minociclina	"	"
	Sulfanilamida	Interfieren síntesis de ácido fólico	Bacterias G+, G- y coccidios
	Sulfadiazina	"	"
Diaminopirimidinas	Sulfatiazol	"	"
	Ftalilsulfatiazol	"	"
	Trimetoprima	Interfieren síntesis de ácido tetrahidrofólico	Bacterias G+, G- aerobias
Fluoroquinolonas	Baquiloprima	"	"
	Enrofloxacina	Inhiben ADN girasa	Bacterias Gram positivas y Gram negativas
	Danofloxacina	"	"
	Marbofloxacina	"	"
	Sarafloxacina	"	"
Ionóforos	Monensina	Alteran flujo de membrana	Coccidiosis, promoción del crecimiento
	Salinomicina	"	"
Nitrofuranos	Nitrofurazona	Evitan la traducción del ARN mensajero	Bacterias Gram positivas y Gram negativas
	Furazolidona	"	"
Nitroimidazoles	Metronidazol	Disrupción del ADN	Anaerobios
	Dimetridazol	"	"

1.2 Propiedades biológicas y químicas de hongos microscópicos de zonas tropicales de México

Las zonas tropicales son consideradas como una rica fuente de germoplasma microbiano; la amplia vegetación y las condiciones climatológicas favorecen una gran cantidad de nichos en los que proliferan los HM. El potencial biotecnológico de hongos tropicales es evidente con algunos notables ejemplos, tales como la apicidina (Figura 1.4A), un metabolito antiprotozoario aislado del extracto de *Fusarium pallidoroseum* colectado en Costa Rica (Meink *et al.*, 2000), y flutimida (Figura 1.4B) de *Delitschia confertospora* aislado de estiércol en Namibia, el cual es capaz de inhibir el virus de la transcripción de la influenza A (Tomassini *et al.*, 1996).

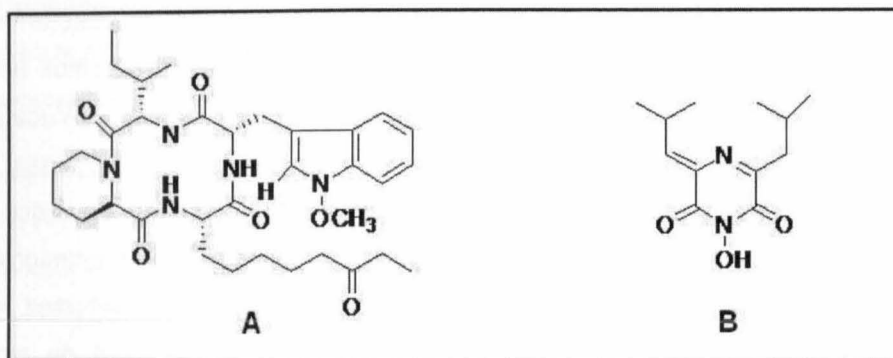


Figura 1.4 Ejemplos de metabolitos farmacológicamente activos de origen fúngico de áreas tropicales. (A) Apicidina (B) Flutimida.

A pesar de esta riqueza microbiana en los trópicos, en México el estudio de las propiedades biológicas y químicas de los HM es aún incipiente, y aún más escaso en cuanto a sus metabolitos secundarios.

Entre los trabajos de este tipo se encuentran los de Macias-Ruvalcaba (2008) que reporta a los hongos endófitos *Edenia gomezpompae* y *Muscodor yucatanensis* aislados de hojas de *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae) colectadas en Quintana Roo, México, ambos con actividad aleloquímica. Otras aportaciones corresponden al de Trigos y colaboradores (2005), donde 14 extractos de HM aislados de suelo y restos vegetales en Veracruz, México se evaluaron contra tres cepas bacterianas de importancia médica (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*) y tres fitopatógenos (*Erwinia*

carotovora, *E. carotovora* pv. *atroséptica* y *Agrobacterium tumefaciens*). Los resultados demostraron que dos de los extractos evaluados presentaron actividad antibacteriana. Por otro lado, Espinoza y col. (2008) evaluaron contra diversos fitopatógenos el filtrado del cultivo de cinco cepas de HM pertenecientes a los géneros *Ceratocystis*, *Curvularia*, *Idriella*, *Phytophthora* y *Rhizopus*, mostrando actividad fungicida sobre dos de ellos. En el sureste de México se aislaron 100 HM, específicamente de cenotes del estado de Yucatán, los cuales se han evaluado contra diferentes blancos. Entre los blancos se incluyen bacterias (*Bacillus subtilis*, *E. carotovora*, *S. aureus*, *Xanthomonas campestris*), levaduras (*Candida albicans*), hongos (*Alternaria tagetica*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*), además de un nemátodo (*Meloidogyne incognita*) y un insecto (*Myzus persicae*) (Gamboa-Angulo *et al.*, 2012; Herrera Parra, 2007; Ruiz Jiménez., 2009). En este estudio detectaron que un 59% de los extractos evaluados poseían efecto antimicrobiano, destacando 27 cepas como potenciales productoras de metabolitos activos. Adicionalmente, a partir de hojarasca de los estados de Veracruz, Tabasco y Yucatán se reportaron 48 cepas, las cuales se evaluaron contra nueve cepas patógenas y un nemátodo (*Meloidogyne incognita*) utilizando el bioensayo de difusión en disco y el ensayo nematocida (Tabla 1.2). Los resultados llevaron a detectar actividad antimicrobiana en 19 extractos y nematocida en tres extractos únicamente (Reyes-Estebanez *et al.*, 2011). En general, estos trabajos de investigación reportan la actividad de algunas especies y géneros que no habían sido evaluados previamente.

Cuadro 1.2. Especies de hongos microscópicos con actividad antimicrobiana evaluados a 500 µg/disco y nematóxica (300 µg/mL).

Hongo	B.s	E.c	S.a	X.c	C.a	A.t	C.g	F.o	P.a	Mi (%) 48h*
<i>Beltraniella japonica</i> GH18	7	10	8	16	—	—	—	—	—	16 c
<i>Beltraniella portoricensis</i> MR42	13	—	7	—	—	11	18	—	—	Ne
<i>Beltraniopsis</i> sp. GH19	11	11	11	22	—	—	—	—	—	10 c
<i>Corynespora cassicola</i> MR01	9	8	11	8	—	—	—	—	—	13 c
<i>Curviciadiella</i> sp. GH29	—	—	8	—	—	—	—	—	—	9 c
<i>Cylindrium elongatum</i> MR45	11	13	12	15	12	18	22	—	22	Ne
<i>Helicosporium talbotti</i> MR48	—	—	9	—	—	—	—	—	—	Ne
<i>Hemibeltrania malaysiana</i> GH24	—	—	7	—	—	—	—	—	—	20 c
<i>Memnoniella</i> sp. MR33	—	—	—	—	17	—	—	—	—	18 c
<i>Perelegamyces parviechinulatus</i> GH25	—	—	7	—	—	—	—	—	—	12 c
<i>Phaeobotrys</i> sp. MR14	7	13	8	7	9	—	—	—	—	21 c
<i>Phialophora verrucosa</i> MR54	8	—	—	—	—	—	—	—	—	15 c
<i>Ramichloridium apiculatum</i> MR39	—	—	8	—	—	—	—	—	—	Ne
<i>Selenosporella</i> sp. GH26	—	—	—	—	—	—	—	—	—	82 b
<i>Thozetella havanensis</i> MR43	—	—	8	—	—	—	—	—	—	8.5 c
<i>Vermicularopsiella</i> sp. MR06	7	—	—	—	—	—	—	—	—	14 c
No identificado	—	—	—	11	—	—	—	—	—	22 c
No identificado	—	—	14	8	—	—	—	—	—	9 c
Control positivo	25	25	25	25	25	24	24	24	24	100 a
Blanco (extracto de arroz fermentado)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0 d
Control negativo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0 d

Bs= *Bacillus subtilis*, Ec= *Erwinia carotovora*, Sa= *Staphylococcus aureus*, Xc= *Xanthomonas campestris*, Ca= *Candida albicans*, At= *Alternaria tagetica*, Cg= *Colletotrichum gloeosporioides*, Fo= *Fusarium oxisporum*, Pa= *Pythium aphanidermatum*, Mi= *Meloidogyne incognita*, Control positivo= Amikacina (5µg) por bacteria, Neomicol (1µg) para levadura, Ricoil (25µg) para hongos, Alliete (25µg) para *P. aphanidermatum*, Vydate (oxamil 10%) para *Meloidogyne incognita*, Control negativo= acetona (12µl) para bacterias y hongos; agua como indicador de viabilidad para nematodos; Ne = No evaluado.

1.3 Ensayos biológicos

Para dirigir la purificación de los principios activos en los procedimientos de fraccionamiento químico primero se emplean ensayos generales que guíen al aislamiento de los metabolitos responsables de la actividad detectada. Estos metabolitos promisorios deben de ser posteriormente sometidos a evaluaciones más específicas para verificar su actividad biológica y su modo de acción. En los últimos años se ha recomendado hacer pruebas biológicas en organismos blancos de diferentes niveles tróficos, para una evaluación refinada de los riesgos ambientales ocasionados por productos sintéticos, semisintéticos y de otros productos para el control de plagas, llamados no convencionales, como son los extractos botánicos. Entre estos están las pruebas de fitotoxicidad, como bioensayos con alfalfa, cebolla, lechuga, pepino y tomate, etc. (Anaya *et al.*, 2005; Shao *et al.*, 2005).

1.4 Bacterias blanco usadas en los ensayos biológicos

1.4.1. *Bacillus subtilis*

Bacteria cosmopolita, Gram positiva, aerobia, comúnmente encontrada en el suelo. Tiene la habilidad para formar una resistente endospora protectora, permitiendo al organismo tolerar condiciones ambientalmente extremas. Sin embargo, aunque este bacilo no es patógeno sí puede contaminar los alimentos produciendo una intoxicación en el cuerpo humano. *B. subtilis* está emparentado filogenéticamente con patógenos de importancia, tales como las esporas del anthrax (*B. anthracis*), así como aquellas que generan la toxina del botox (*Clostridium botulinum*), por lo cual es interesante utilizar esta bacteria como modelo de investigación. Algunas variedades de *B. subtilis* tienen aplicaciones comerciales, entre estos podemos mencionar a *B. subtilis* QST 713 (comercializado como QST 713 o Serenade) que tiene una actividad fungicida natural, y es empleado como un agente de control biológico. *B. subtilis* se ha mostrado muy manejable para la manipulación genética, y, por lo tanto, se ha adoptado extensamente como un organismo modelo para estudios de laboratorio, sobre todo de esporulación, que es un ejemplo simplificado de la diferenciación celular (Anderson *et al.*, 2001).

1.4.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus son cocos Gram positivos con diámetros que varían entre 0.5 y 1.0 μm , son inmóviles y su respiración puede ser aerobia o anaerobia facultativa. Su característica de crecer formando racimos de color amarillo dorado es debida a la producción de carotenoides durante su crecimiento, de ahí su nombre que deriva con la palabra latina con que se designa el oro y de la morfología que adoptan las células en las tinciones que realizan en medio de cultivo de agar. Su temperatura de crecimiento óptimo es de 37°C (Borraz, 2006).

S. aureus es un patógeno oportunista que forma parte de la microflora humana. Las estimaciones indican que entre el 30 y 50% de la población puede estar colonizada por esta bacteria, siendo la localización más frecuente la nasal. En el medio hospitalario en pacientes sometidos a hemodiálisis, diabéticos, con lesiones cutáneas, etc. La mayor parte de las cepas de estafilococos patógenos para el hombre elaboran una enzima llamada coagulasa que provoca la coagulación del plasma, además que son el tipo de gérmenes más resistentes, soportan temperaturas de 60°C. También puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *S. aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria. Actualmente *S. aureus* resistente a metilicina (SARM) es reconocido como uno de los patógenos más importantes causantes de infecciones nosocomiales en todo el mundo. Se habla de colonización por SARM cuando este microorganismo es aislado en una muestra clínica en ausencia de signos de infección, lo cual facilita su persistencia en el organismo causando una morbi-mortalidad comparada con los pacientes infectados por cepas sensibles de *S. aureus* a metilicina (Borraz, 2006).

1.5 Descripción del hongo en estudio

El género *Beltraniella* está integrado por 22 especies (Tabla 1.3) y está constituido por un grupo de hongos anamorfos comúnmente encontrados en sustratos en estado de descomposición como son troncos, hojas, ramas, suelo, etc. de climas tropicales (Heredia *et al.*, 2002). Su característica primordial es que forma colonias dispersas, anfigenas, aterciopeladas, gris negruzcas. Micelio en parte superficial del medio sólido, en parte inmerso; hifas ramificadas, lisas, septadas, subhialinas. Conidióforos setiformes, macronematosos, solitarios o en grupos pequeños, erectos, ramificados, lisos, septados, café oliváceos pálidos, ligeramente más oscuros de la base, $81.2-148 \times 4-5 \mu\text{m}$; nacen en la base de células radialmente lobuladas. Células conidiógenas poliblasticas, integradas, terminales, elipsoidales a obovoides, denticuladas, 1-3 dentículos, lisas, subhialinas. Células separadoras terminales, integradas, elipsoidales, subhialinas, 1 dentículo en cada extremo. $10-12 \times 4 \mu\text{m}$. Conidios solitarios, secos, acrógenos, turbinados, extremo proximal rostrado, extremo distal truncado, lisos o finamente verrugosos, sin septos, subhialinos, $17-20 \times 5-7 \mu\text{m}$; con unos poros circulares cerca de la parte más ancha. El peritecio se forma a partir de la producción de esporas distintivamente formando manchas necróticas alrededor de este de 15 mm de diámetro. La característica de crecimiento de este hongo físicamente se observa como un aterciopelado floco de color café grisáceo y marrón grisáceo. La parte superficial del micelio está compuesta de hifas septadas, ramificadas y hialinas de color café pálido a negruzcas de 1.2 a $5.6 \mu\text{m}$ (Figura 1.5) (Subramanian, 1983).

Cuadro 1.3. Especies descritas del género *Beltraniella*, substrato y país de origen (www.indexfungorum.org : 19/02/2014).

Espece	Substrato	País
<i>Beltraniella aethiopica</i> (Bhat & B.Sutton, 1985)	Hojarasca	Etiopía
<i>Beltraniella amoena</i> (R.F.Castañeda, Cano & Guarro, 1976)	Hojas del suelo	Cuba
<i>Beltraniella artocarpí</i> (Subram. 1996)	Hojas del suelo	Singapur
<i>Beltraniella botryospora</i> (Shirouzu & Tokum, 2010)	Hojas del suelo	Honshu
<i>Beltraniella buloloensis</i> (Matsush. 1971)	Hojas podridas	Papua Nueva Guinea
<i>Beltraniella clara</i> (Onofri. 1983)	Hojarasca	Costa Ivory
<i>Beltraniella clavatophora</i> (R.F.Castañeda, Cano & Guarro, 1976)	Hojas del suelo	Cuba
<i>Beltraniella fertilis</i> (Heredia, Arias, Reyes & Castañeda, 2002)	Hojas del suelo	México
<i>Beltraniella havanensis</i> (Hoi– Jech, Matsush, 1997)	Hojas del suelo	Cuba
<i>Beltraniella humicola</i> (P. Rama Rao, 1962)	Suelo	Hyderabad, India
<i>Beltraniella japónica</i> (Matsush. 1975)	Hojarasca	Japón
<i>Beltraniella lyrata</i> (Rambelli & C. Ciccar, 1987)	Hojarasca	Costa Ivory
<i>Beltraniella nilgirica</i> (Piroz & S. D. Patil, 1970)	Hojarasca	Madras, India
<i>Beltraniella odinae</i> (Subram. 1952)	Hojarasca	India
<i>Beltraniella patilii</i> (K. G. Karand & Patw, 1992)	Hojas podridas	Goa, india
<i>Beltraniella peruamazonica</i> (Matsush. 1993)	Hojas podridas	Perú
<i>Beltraniella pini</i> (M. B. Ellis, 1972)	Hojas del árbol	Península de Malasia
<i>Beltraniella pirozynskii</i> (P. M. Kirk, 1972)	Hojarasca	Reino Unido
<i>Beltraniella porosa</i> (Piroz & S. D. Patil, 1970)	Hojas podridas	Mahaharashtra, India
<i>Beltraniella portoricensis</i> (F. Stevens) Piroz & S. D. Patil, 1970)	Hojarasca	Puerto Rico
<i>Beltraniella spiralis</i> (Piroz & S. D. Patil, 1966)	Hojarasca	India
<i>Beltraniella vateria</i> (K. Swapna, Nagaveni & Manohar, 2011)	Semillas	Kurnataka, India

1.6. *Beltraniella portoricensis*

1.6.1. Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Orden: Xylariales

Familia: Amphispinariaceae

Género: *Beltraniella*

Especie: *Beltraniella portoricensis* (F. Stevens) Piroz & S.D. Patil, 1970

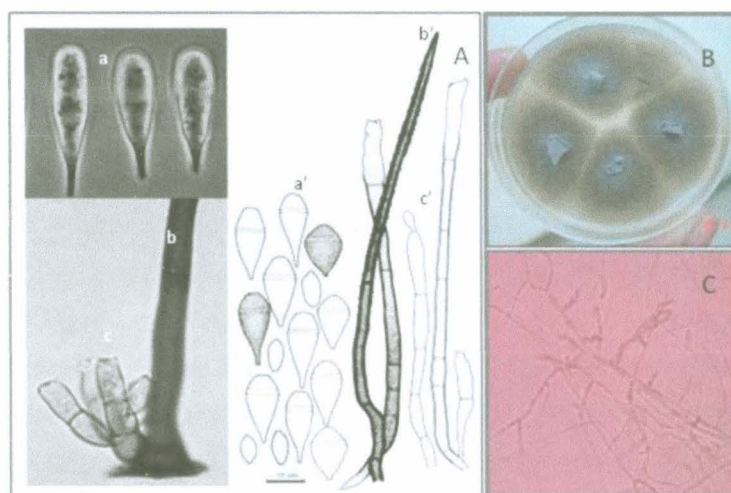


Figura 1.5. Características de morfológicas de crecimiento de *B. portoricensis*. (A) Morfología de *B. portoricensis*. (a) Ascas, (b) Conidio y (c) Hifas septadas; (a', b' c') representación esquemática de ascas, conidios e hifas septadas respectivamente. (B) crecimiento del micelio en agar (C) crecimiento del micelio vista desde el microscopio.

1.6.2. Sinonimias

Ellisiella portoricensis F.Stevens, Trans. III. St. Acad. Sci. 10: 203 (1917)

Ellisiellina portoricensis (F.Stevens) Bat. Soc. Biol. Pernambuco 14(1/2): 19 (1956)

Ellisiopsis galleisiae Bat. & Nascim., Soc. Biol. Pernambuco 14(1/2): 21 (1956)

Ellisiopsis portoricensis (F. Stevens) Piroz., Mycol. Pap. 90: 22 (1963)

1.6.3 Distribución geográfica

La especie *B. portoricensis* es un hongo común y ampliamente distribuido en la flora de los hongos de hojarasca en regiones tropicales y subtropicales de temperatura templada.

1.6.4. Propiedades biológicas y químicas

Para la especie *B. portoricensis* se reporta a la enzima (endo-1,4- β -D-glucanasa) que se emplea en la industria del detergente como surfactante (Baba *et al.*, 2005), también se ha reportado que el extracto orgánico de *B. portoricensis* posee efecto biológico de amplio espectro al inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas *B. subtilis* y *S. aureus*, los hongos patógenos *Alternaria tagetica* y *Colletotrichum gloeosporioides* y tuvo efecto repelente contra los insectos *Myzus persicae* y *Rophalosiphum padi*. Esta cepa se evaluó, pero no tuvo actividad contra *Erwinia carotovora*, *Xanthomonas campestris*, *Candida albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum* y *Mycobacterium tuberculosis*, *Leishmania mexicana*, *Spodoptera littoralis* (Gamboa Angulo *et al.*; 2013; Reyes-Estebanez *et al.*, 2009; Ruiz Jiménez, 2011).

1.7 Objetivo general

Purificar e identificar los compuestos antibacterianos de *Beltraniella portoricensis* MR42.

1.8 Objetivos específicos

- Obtener los extractos de baja, mediana y alta polaridad de los extractos orgánicos de *Beltraniella portoricensis* con disolventes de polaridad ascendente.
- Utilizar el ensayo de bioautografía para dirigir el proceso de purificación de los compuestos activos de las fracciones y subfracciones de *Beltraniella portoricensis* MR42.
- Aislar y purificar los compuestos de *Beltraniella portoricensis* utilizando diversas técnicas cromatográficas y de derivatización química.
- Identificar las estructuras moleculares de los metabolitos puros de *Beltraniella portoricensis* por el análisis integral de sus diversos estudios espectroscópicos y espectrométricos.
- Determinar la concentración mínima Inhibitoria de los compuestos puros activos de *Beltraniella portoricensis* contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

1.9 Hipótesis

El hongo microscópico *Beltraniella portoricensis* MR42 obtenido de restos vegetales del trópico mexicano biosintetiza metabolitos con actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

1.10 Estrategia experimental

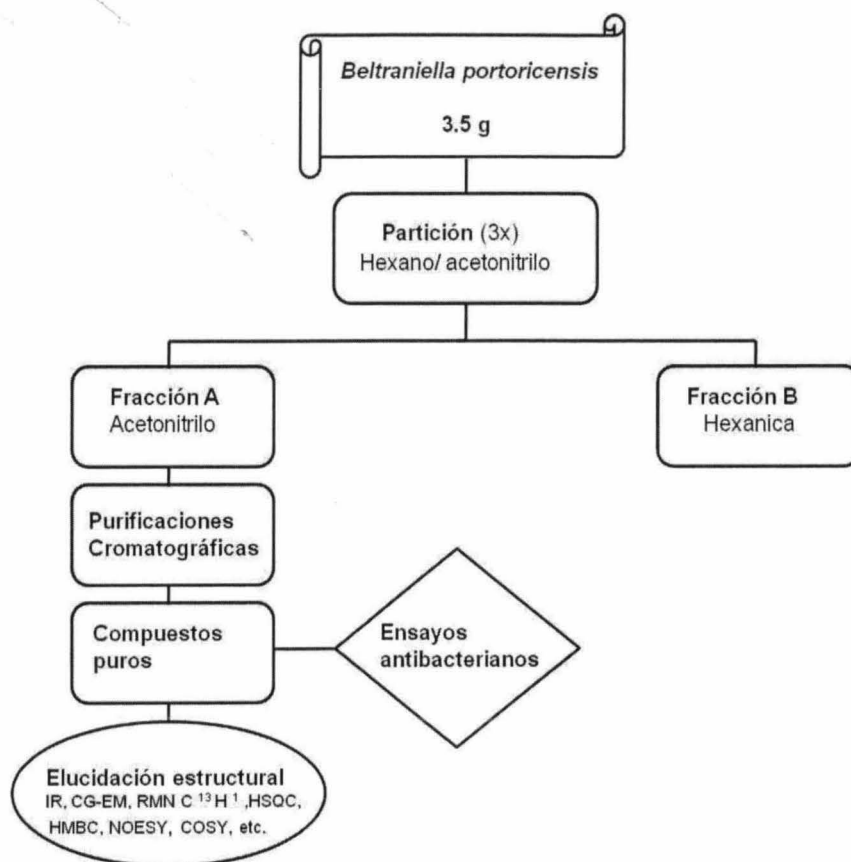


Figura 1.6. Diagrama de la estrategia experimental en la purificación de *Beltraniella portoricensis*.

1.11 Referencias

- Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, 48, 5-16.
- Baba, Y., Shimonaka, A., Koga, J., Murashima, K., Kubota, H. y Kono, T. (2005). Purification and characterization of a new endo-1,4- β -D-glucanase from *Beltraniella portoricensis*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69(6), 1198-1201.
- Bauer, A.W., Kirby, W., Sherris, M.M. y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Diagnostic Microbial Epidemiology*, 36, 41-44.
- Bigelis, R., H. He, Y. Yang Hui, L-P. Chang y Greenstein M. (2006). Production of fungal antibiotics using polymeric solid supports in solid-state and liquid fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 815-826.
- Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U. y Stähelin, H. (1976) Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agent Actions*, 6, 468-475.
- Borris, R.P. (1996). Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*, 51, 29-38.
- Borraz Ordás, C. (2006). Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Tesis doctoral. Universidad de Barcelona, España, 45-47 p.
- Bull, A., Ward, T.A.C., Goodfellow, M. y Slater, J.H. (1992). Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annual Review of Microbiology*, 42, 219-257.
- Burgueño-Tapia, E., Castillo, L., González-Coloma, A. y Joseph-Nathan, P. (2008). Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene *p*-benzoquinone perezone and some of its derivatives. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 717- 766.

- Cassell, G.H. y Mekalanos, J. (2001). Development of microbial agent in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance, 2, 601–605.
- Chin, Y-W., Balunas, M.J., Chai, H.B. y Kinghorn, D. (2006). Drug discovery from natural sources. The American Association of pharmaceutical Scientists Journal, 8, 239-253.
- Chiou, C.C., Groll, A.H. y Walsh, T.J. (2000). New Drugs and novel targets for treatment of invasive fungal infections in patients with cancer. Oncologist, 5, 120–135.
- Claeson, P. y Bohlin, L. (1997). Some aspects of bioassay method in natural product, 10, 345-346.
- Dix, N. J. y Webster (1995). Fungal Ecology. Chapman & Hall, London, 3,549-550.
- Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, Sosio, L.M. y Puglia, A.M. (2002). Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. Journal Biotechnology, 99, 187-198.
- Errecade, J. (2004). Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencia en la salud pública. FAO. México, D.F, 78p.
- Gamboa- Angulo, M., Molina Salinas, G.M., Chan Bacab, M., Peraza Sánchez, S.R., Heredia G., de la Rosa García S.C. y Reyes Estebanez M. (2013). Antimycobacterial y antileishmanial effects of microfungi isolated from regions tropicales in México, Parasitology Research, 112, 559-566.
- Gams, W. (1992). The analysis of communities of saprophytic microfungi with special reference to soil fungi, in fungi in vegetation science. Winterhoff, W. (ed). Kluwer Academic publishers, Dordrecht, 7, 183-223.

- Heredia Abarca, G.P. (1999). Diversidad y sucesión de los Hyphomycetes de la superficie de las hojas en descomposición de tres especies arbóreas dominantes en un bosque mesófilo de la montaña en el centro de Veracruz. Tesis doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F, 76p.
- Herrera, T y Ulloa, M. (1999). El Reino de los Hongos. En Micología básica y aplicada. Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica. México, D. F, 550p.
- Höller, U., A.D. Wright, G.F. Mattheé, G.M. König, S. Draeger, H-J. Aust y B. Schulz (2000). Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*, 104, 1354-1365.
- Lorenzo-Velásquez, B. (1976) Farmacología y su proyección a la Clínica. 13ª Edición. Editorial Oteo. Madrid, 341 p.
- Macías-Rubalcava, M., Hernández-Bautista, Jiménez-Estrada, B., González, M., Glenn, A. Hanlin, R., Hernández-Ortega, R., Saucedo-García A, Muria-González, J. y Anaya, A. (2008). Naftoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry*, 69, 1185-1196.
- Monaghan, R.L y Tkacz, J.S. (1990) Bioactive Microbial product: focus upon mechanism of action. *Annual Review of Microbiology*, 44, 271-301.
- Petrikkou, E. Rodríguez-Tudela J.L., Cuenca- Estrella M., Gómez A., Molleja A. y Mellado E. (2001). Inoculum standardization for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi pathogenic for humans. *Journal Clinical Microbiology*, 39, 1345-1347.
- Reyes-Estebanez, M. (2009). Estudio exploratorio de la bioactividad de hongos microscópicos asociados a restos vegetales, en zonas tropicales de México. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México, 171p.

- Reyes Estebanez M., Heredia Abarca G. M. y Gamboa Angulo M.M. (2008). Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México. *Revista Mexicana de Micología*, 28, 49-56.
- Ruíz Jiménez A. L. (2011) Evaluación de extractos fúngicos en modelos insecticidas y antifúngicos. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México, 86p.
- Rojas, G.M. y Gámez G.H. (2002). Herbicidas de origen natural. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL 42-47.
- Strohl, W.R. (2000). The role of natural products in a modern drug discovery program *Drug Discovery Today*, 4,539–542.
- Subramanian, C.V. (1983). Hyphomycetes. *Taxonomy and Biology*. Academic Press, 6, 317-318.
- Trigos, A., Mendoza G., Luna M., Heredia G. y Arias R. (2005). Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. *Revista Mexicana de Micología*, 20,89-92.

CAPITULO II

2.0 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Trabajo microbiológico

El trabajo microbiológico se realizó en condiciones asépticas, utilizando una campana de flujo laminar vertical. Todos los medios de cultivo utilizados, así como el material de trabajo, se esterilizaron durante 30 minutos en la autoclave a 121°C y 12 lb de presión.

Para los procesos de extracción y purificación se emplearon disolventes grado industrial destilados en el laboratorio y grado analítico de varias marcas (J.T. Baker, Fermont, Analítica, Merck y Aldrich). La eliminación de los disolventes se realizó a presión reducida a 40°C en un evaporador rotatorio Buchi 461 tipo R-111. Para evaporar trazas de disolventes en los extractos, fracciones y compuestos puros se empleó un flujo de nitrógeno, seguido de una bomba de alto vacío.

2.2 Cultivo en arroz fermentado

En frascos de cultivo de vidrio se depositaron 20 g de arroz y 20 mL de agua destilada, permaneciendo en fermentación por una noche. Posteriormente la mezcla fermentada se esterilizó y se dejó 24 horas para evaluar su esterilidad, se inoculó con 5 mL de la suspensión de esporas de los hongos en estudio, y permanecieron en incubación por 40 días a 25°C y fotoperiodo 12/12 horas (luz/oscuridad). Como blanco se utilizó arroz fermentado sin inocular, adicionándole agua destilada estéril.

2.3 Extracción del micelio cultivado

Al finalizar los 40 días del periodo de incubación el micelio se fragmentó con una espátula y se sometió a maceración a temperatura ambiente, con acetato de etilo por 24 horas; se repitió este proceso tres veces (2:1) y en la cuarta ocasión por media hora con metanol a aproximadamente a 50°C. El disolvente se eliminó a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio equipado con un baño de agua a 40°C.

2.4 Partición del extracto crudo de KAP1- CYG

El extracto crudo de KAP-1C y 1G (3.5 g) se fraccionó por partición entre los disolventes acetonitrilo y hexano, obteniendo dos fracciones: una de mediana polaridad denominada KAP-2A (1.17 g) y la de baja polaridad KAP-2B (1.17 g), respectivamente. Además de un residuo no soluble KAP-2C (98.9 mg).

2.5 Métodos cromatográficos

2.5.1 Cromatografía en capa delgada (CCD)

Para el análisis y monitoreo por cromatografía en capa fina (CCD) se utilizaron cromatofolios (E. M. Merck DC Alufolien) con soporte de aluminio impregnados con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.20 mm de espesor. Todas las placas cromatográficas se observaron bajo luz UV de onda corta (254 nm) y larga (365 nm). Para visualizar de forma permanente los cromatogramas, se revelaron sumergiéndolos en el revelador (ácido fosfomolibdico y/o sulfato cérico), se secaron y posteriormente se calentaron hasta la aparición de las manchas.

2.5.2 Cromatografía líquida al vacío (CLV)

Para este tipo de cromatografía, las columnas de vidrio se empacaron con gel de sílice de capa fina 60F₂₅₄ marca MerckTM con medida de poro de 60Å (2-25 µm) y volumen de poro de 0.75 cm/g.

El extracto KAP-2A (1 g) se fraccionó en una columna de 4.5 de diámetro y 6 cm de altura, eluída con un sistema de disolventes en gradiente de polaridad ascendente, con AcOEt/hexano/MeOH. Como resultado se obtuvieron 12 fracciones de 15 mL cada una, las cuales posteriormente se reunieron en ocho fracciones finales de acuerdo a su perfil cromatográfico, marcadas con las claves KAP-5A – KAP-5H (Figura 2.1).

2.5.3 Cromatografía en columna

Las columnas cromatográficas de permeación en gel se empacaron con Sephadex LH-20 marca AldrichTM como fase estacionaria, para separar moléculas dependiendo de su tamaño; para las columnas cromatográficas por gravedad (CCG) se empacaron con gel de sílice 60F₂₅₄ con medida de poro de 60Å, con mallas de 230-400 y 70-230.

2.6 Purificación de la fracción KAP-5C

La fracción KAP-5C (350 mg) se purificó usando una columna de vidrio de 30 cm × 2 cm de ancho empacada con Sephadex LH-20 (12 g), usando un sistema de disolventes de polaridad ascendente con mezclas de hexano/acetona. Como resultado se obtuvieron ocho fracciones (KAP-6A – KAP-6H) (Figura 2.1).

2.7 Purificación de la fracción KAP-5D

La fracción KAP-5D (100 mg) se purificó usando una columna de vidrio de 1 cm de diámetro × 75 cm de altura. Como fase estacionaria se empleó gel de sílice (18 g) con tamaño de malla de 230-400. Como fase móvil se empleó un sistema de disolventes de polaridad ascendente usando mezclas de hexano/acetona. Como resultado se obtuvieron siete fracciones (KAP-8A – KAP-8G) (Figura 2.1).

2.8 Purificación de la fracción KAP-5F

La fracción KAP-5F (180 mg) se purificó usando una columna de vidrio de 1 cm de diámetro × 40 cm de altura. Como fase estacionaria se empleó Sephadex LH-20 (11 g). Como fase móvil se empleó un sistema de disolventes de polaridad ascendente usando mezclas de acetona/metanol. Como resultado se obtuvieron seis fracciones (KAP-7A – KAP-7F) (Figura 2.1).

2.9 Derivatización química

Como parte del apoyo para la elucidación estructural de las moléculas obtenidas se realizaron métodos de derivatización química, con el propósito de confirmar la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos aislados.

2.9.1. Acetilación de los compuestos KAP-6F y KAP-7D

Por cada 10 mg de muestra, aproximadamente, se adicionaron 0.3 mL de piridina (Aldrich®) y 0.3 mL de anhídrido acético (Baker®). La mezcla de la reacción se mantuvo en agitación constante, a temperatura ambiente durante 12 horas, después de verificar por CCD que la reacción se había completado. Posteriormente, se adicionó a la mezcla 30 mL de agua y se extrajo con acetato de etilo tres veces. La fracción orgánica resultante se lavó sucesivamente, primero con una disolución de HCl al 5% (1:1, v/v), después con una disolución de NaHCO₃ al 2.5% y finalmente con una disolución saturada de NaCl.

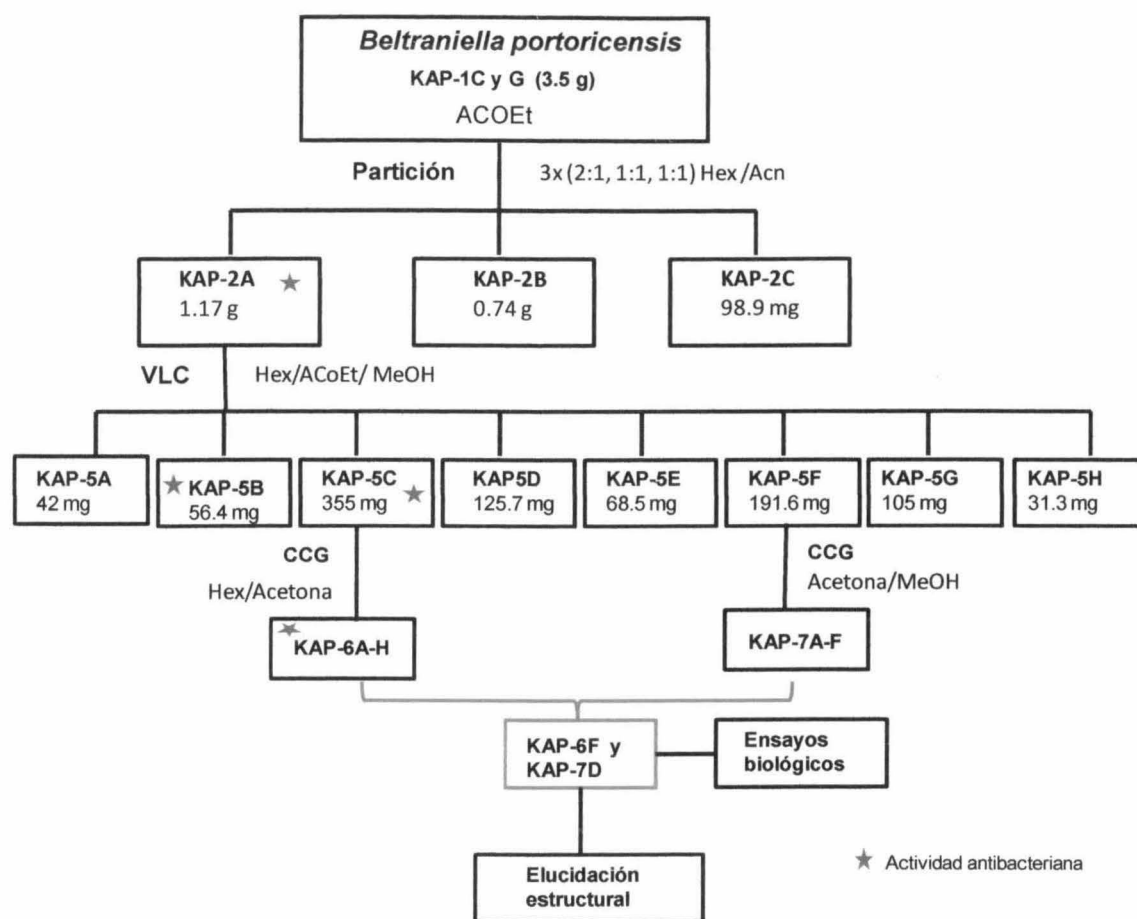


Figura 2.1. Diagrama de purificación de los metabolitos KAP-6F y KAP-7D.

2.10 Métodos Espectroscópicos

2.10.1 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

Los análisis por CG-EM se realizaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies modelo 6890N Network GC System, acoplado a un detector másico Agilent Technologies modelo 5975B inter MSD controlado por una computadora HP. Se utilizó una columna Ultra 1 (fase estacionaria no polar, 100% dimetilpolisiloxano; 25 m × 0.32 mm diámetro interno) y como gas acarreador helio de alta pureza; con un flujo de 1 mL/min y rampa de 10°C/min con un rango de temperaturas de $T_1 = 150^\circ\text{C}$ y $T_2 = 280^\circ\text{C}$.

2.10.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H)

Los espectros de RMN ^1H (400 y 600 MHz) y RMN ^{13}C (100 y 150 MHz) se corrieron en un Bruker AMX-400 y un Varian, utilizando como disolventes MeOD y CDCl_3 para los alcoholes y compuestos acetilados, respectivamente. Los experimentos bidimensionales (COSY ^1H - ^1H , DEPT, HSQC y HMBC) se obtuvieron en el mismo equipo.

2.10.3 Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Los espectros de IR se realizaron en un espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier (Nicolet modelo Protège 460 Magna IR Technology). Los datos se reportan en cm^{-1} .

2.11 Datos de Beltranielona (KAP-6F)

Este metabolito se presenta como un polvo blanco que por CCD muestra un compuesto puro a un $R_f = 0.54$ en AcOEt/hexano/MeOH (6.5:3.5:0.5). IR (película) $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$: 3392, 2919, 1699, 1460, 1132, 1037. CG-EM (m/z) = 428; RMN ^1H (400 MHz, MeOD) y RMN ^{13}C (100 MHz, MeOD) ver tabla de datos (Tabla 3.1).

2.11.1 Datos del acetato de Beltranielona

2.12 Datos de Beltraniol (KAP-7D)

Es un polvo blanco que por CCD muestra la presencia de un metabolito puro a un $R_f = 0.22$ en AcOEt/hexano/MeOH (6.5:3.5:0.5). IR (película) $\nu_{\text{máx}} \text{ cm}^{-1}$: 3367, 2919, 2869, 1635, 1261, 1024, 753 ver tabla de datos (Tabla 3.2).

2.13 Ensayos utilizados en este trabajo

2.13.1 Evaluación antibacteriana por el método de la Bioautografía

Para este bioensayo se emplearon placas cromatográficas de capa fina (E. M. Merck DC Alufolien) con soporte de plástico impregnados de gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.20 mm de espesor (7.5 × 8 cm) en donde se aplicaron por duplicado las fracciones (100, 50 µg), después se procedió a correrlas en un sistema de disolventes acetato de etilo-hexano-metanol (45:50:05) en una sola cuba, usando como control positivo la amikacina y como controles negativos la fracción de arroz y acetona (utilizado para disolver las fracciones). Las placas se observaron bajo luz ultravioleta de onda corta (UV₂₅₄) y larga (UV₃₆₈), marcando las bandas visibles para cada caso. Una de las placas se reveló con ácido fosfomolibdico. Para la bioautografía se utilizó agar bacteriológico (100 mL) Bioxon® como base para las cajas petri y agar Müeller-Hinton (100 mL) Bioxon® como sobre capa mezclada con las bacterias *B. subtilis* (ATCC 6633) y *S. aureus* (ATCC 6536). El cultivo de las bacterias blanco (medio líquido Müeller-Hinton) se ajustó a una concentración de 1×10^8 ufc/mL por comparación visual con el Nefelometro de McFarland. Un mL de la suspensión bacteriana se mezcló con el agar Müeller-Hinton, y se vació en las cajas Petri hasta formar una capa fina y cubrir las placas cromatográficas. Estas se incubaron a 37°C durante 18 horas. Para el revelado de la bioautografía se utilizó una disolución de bromuro de tiazolil azul tetrazolium (TTB, según sus siglas en inglés, 15 mL, Sigma-Aldrich al 1%). El área de las bacterias vivas se observó por la coloración azul intenso, los halos de inhibición se compararon con las bandas de las fracciones observadas en el cromatograma revelado con ácido fosfomolibdico y se determinaron los R_f (factor de retención) de los metabolitos con actividad (Moulari *et al.*, 2006, Sartoratto *et al.*, 2004, Souza *et al.*, 2007).

2.13.2 Ensayo antibacteriano por el Método de Microdilución

Las bacterias a evaluar (*B. subtilis* y *S. aureus*) se inocularon por separado en caldo Müeller-Hinton recién preparado y se incubaron a 37°C por 18 a 24 horas. Los cultivos se ajustaron en caldo Müeller-Hinton por comparación visual con el tubo 0.5 del nefelómetro de Mc Farland, a una concentración final aproximada de 1×10^8 ufc/mL. Las muestras se disolvieron en DMSO (sulfóxido de dimetilo) a una concentración de 8 µg/µL. Al primer

pozo de la microplaca de 96 pozos, se le adicionaron 190 μ L de medio caldo Mueller-Hinton estéril y 10 μ L de la muestra (80 μ g). Posteriormente, 100 μ L de esta mezcla homogénea se transfirieron al siguiente pozo y así sucesivamente hasta el número de diluciones a evaluar. Finalmente, todos los pozos se inocularon con 100 μ L de la suspensión de la bacteria blanco. La concentración final de las fracciones fue de 200, 100, 50 y 25 μ g/mL. Los ensayos se realizaron por triplicado y se utilizó amikacina como control positivo, agua estéril y caldo con las bacterias como controles negativos. Las microplacas se incubaron por 18 horas a 37°C (Andrews, 2001, Taylor *et al.*, 1983). A las 24 horas de incubación, se observó visualmente la presencia de bacterias. Para determinar la mínima concentración inhibitoria (CMI) y confirmar la viabilidad de las bacterias, se adicionaron 50 μ L de 2,3, 5,-cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) al 1%; después de 30 min, se observó la presencia de bacterias vivas por una coloración roja, que es el resultado de la reacción del compuesto y donde no hubo coloración indica muerte ya que el TTC es blanco y al no reaccionar con las bacterias (reducción a formazan) no producen la coloración roja. (De la rosa, 2007).

Después de las 24 horas de incubación se procede a determinar la mínima concentración bactericida (CMB), tomando una alícuota de cada pozo que no presento crecimiento y/o no presentó en la coloración después de aplicar el TTC, se transfirió y se estrió en cajas con TSA, incubándose a 37°C. A las 24 horas, se verificó la presencia o ausencia del crecimiento.

2.14 Referencias

- Andrews, J.M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. *Antimicrobial Agent Chemotherapy*, 48, 5-16.
- De la Rosa-García. (2007). Evaluación del potencial antimicrobiano de microorganismos aislados de cenotes de la península de Yucatán. Tesis de doctorado en ciencias biológicas y biotecnología de plantas. Centro de Investigación científica de Yucatán. Mérida, Yucatán, 148-149 p.
- Moulari, B. Pellequer, Y., Lboutounne A. y Girar, C. (2006). Isolation and in vitro antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanona from the leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. Ex poir. (Hypericaceae). *Journal of Enthnopharmacology*, 106, 272-278.
- Taylor, P.C., Schoenknecht, F.D., Sherris, J.C. y Linner, E.C. (1983). Determination of minimum bactericidal concentrations of oxacilin for *Staphylococcus aureus*: influecie and significance of technical factors. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 23, 142-150.
- Sartoratto, A., Machado, A. Delarmelina, C. Figueira, G., Duarte M., Rehder V. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Journal of Microbiology*, 35, 275-80.
- Souza, T.M., Severi, J.A., Silva, V., Santos, E. y Pietro, R.C. (2007). Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 7, 221-226.

CAPITULO III

3.0 RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Metabolitos aislados de *Beltraniella portoricensis*

La cepa identificada como *B. portoricensis* (MR42) (F. Stevens, Piroz & S.D. Patil, 1970) se aisló de hojarasca colectada en el Rancho Guadalupe en el estado de Xalapa, Veracruz. La cepa se cultivó en arroz fermentado y después de 40 días de incubación el hongo se fragmentó y se extrajo con acetato de etilo, obteniendo el extracto orgánico crudo (3.5 g). Este extracto se disolvió en acetonitrilo y la disolución resultante se particionó con hexano. De esta manera se obtuvieron dos fracciones, la hexánica de baja polaridad (KAP-2B) y la fracción de acetonitrilo de polaridad media (KAP-2A). La fracción hexánica correspondió a un 42% del extracto crudo total y la fracción de acetonitrilo a un 35% y también se obtuvo un material residual (23%) no soluble en los disolventes utilizados. El perfil cromatográfico que se observa por cromatografía de capa delgada de las fracciones obtenidas, en onda corta (254 nm) y larga a (365 nm) de la fracción KAP-2A de acetonitrilo muestran dos componentes principales activos a diferentes R_f . (Factor de retención). El primero con un $R_f = 0.34$ de polaridad intermedia y el otro de mayor polaridad, a un $R_f = 0.11$, muy separados entre sí; las señales observadas son diferentes a las encontradas en los controles de arroz y ergosterol. En la prueba antibacteriana realizada con la técnica de bioautografía se puede observar la actividad de KAP-2A, por lo que se decidió seguir con la separación de estos dos compuestos (Figura 3.1).

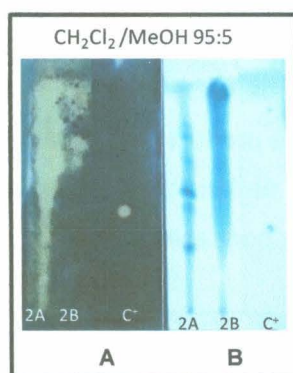


Figura 3.1. Bioautografía de las fracciones KAP-2A (2A) y KAP-2B (2B) A) Bioautografía B) Cromatografía en capa delgada revelada con ácido fosfomolibdico, (C⁺) control positivo Amikacina

En cuanto a la fracción hexánica (KAP-2B) se puede notar por el perfil cromatográfico la presencia de ácidos grasos, los que también se observan en el arroz y el ergosterol. Además, en el bioensayo de bioautografía se observa que KAP-2B no presenta actividad antimicrobiana interesante (Figura 3.1).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se decidió continuar con la purificación de KAP-2A por medio de una cromatografía líquida al vacío, usando el sistema de disolventes AcOEt/hexano/MeOH de polaridad ascendente. Como resultado se obtuvieron ocho fracciones (KAP-5A-5H) que por análisis con CCF muestra la presencia de cuatro metabolitos principales (KAP-5B, C, D y F) visibles en UV de onda corta y revelados con ácido fosfomolíbdico (Figura 3.2).

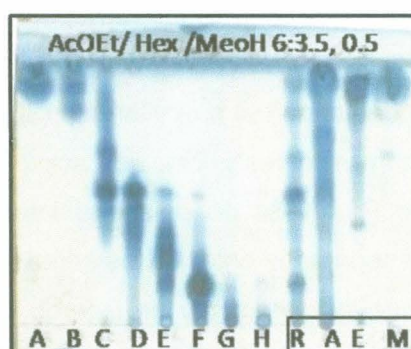


Figura 3.2. Fracciones finales de la VLC (KAP-5A-H) R) fracción original. A) fracción de arroz, E) ergosterol y M) fracción metanólica.

Estas fracciones (KAP-5B, C, D y F) se evaluaron por medio del bioensayo de bioautografía en donde se observaron halos de inhibición en KAP-5A, KAP-5B y KAP-5C. La comparación de los halos con los producidos por el control positivo (amikacina) permite concluir que la actividad inhibitoria de las fracciones son interesantes para continuar con la purificación de los metabolitos responsables de dichas actividades (Figura 3.3).

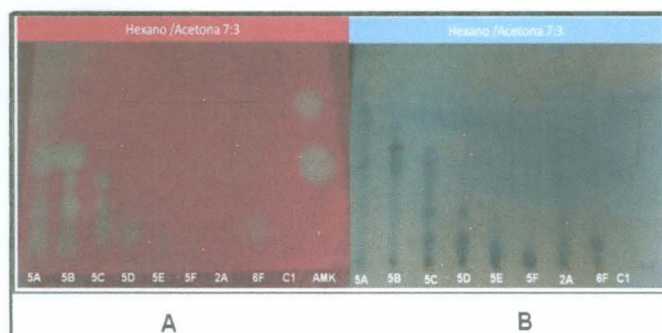


Figura 3.3. Experimento de bioautografía (A) y cromatografía de capa fina (KAP-5A-5F) revelada con ácido fosfomolibdico (B) realizados a las fracciones resultantes de la VLC, junto con la fracción activa KAP-6F y el 3-etoxibenzaldehído (C1) y la amikacina.

3.1.1 Fracción KAP-5B

Por análisis en CCF de la fracción KAP-5B se observan dos metabolitos con $R_{f1} = 0.76$ y $R_{f2} = 0.64$ en el sistema acetato de etilo/hexano/metanol (6:3.5:0.5), ambos visibles tanto en UV de onda corta y en ácido fosfomolibdico (Figura 3.2). Por otro parte, el análisis del cromatograma de gases mostró la presencia de un componente principal y mayoritario con un tiempo de retención a 7.164 min (Figura 3.4).

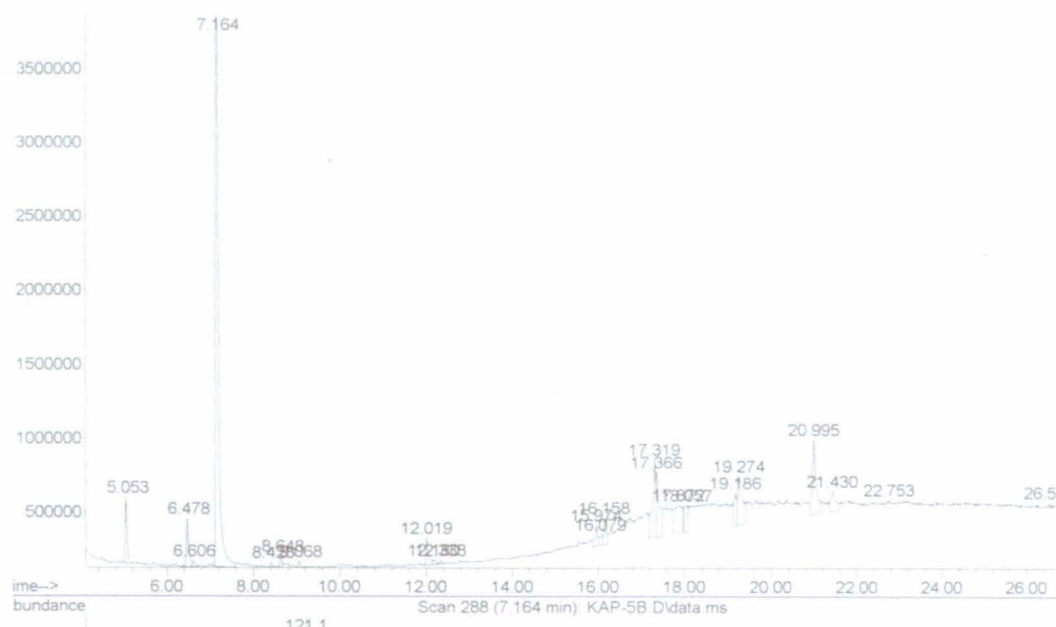


Figura 3.4. Cromatograma de gases de la fracción KAP-5B.

El patrón de fragmentación observado en el espectro másico de KAP-5B indica una estructura de tipo benzaldehído con un ión molecular a m/z 150, cuya comparación con la base de datos sugiere que se trata del 3-etoxibenzaldehído, con 69% de abundancia. El mismo espectro indica un pico base a m/z 121.0 debido a la pérdida del grupo etilo (Figura 3.4). El análisis de KAP-5B muestra que es la fracción con mayor actividad, de acuerdo con los datos obtenidos en los bioensayos de bioautografía y en microdilución, con una concentración inhibitoria (MIC) de 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 3.6). Sin embargo, para confirmar que se trata del mismo compuesto, el estándar de 3-etoxibenzaldehído se analizó bajo las mismas condiciones, observando que no se trata de este compuesto. El 3-etoxibenzaldehído tiene un tiempo de retención diferente al de KAP-5B, el cual es inactivo en el bioensayo antibacteriano. Por lo anterior, se concluye que podría tratarse de un efecto sinergista de los componentes en esta fracción que esté causando la actividad. De acuerdo con la literatura, los compuestos del tipo benzaldehído presentan actividad antibacteriana al ser evaluadas con bacterias patógenas de peces y son comúnmente utilizados en la industria de los perfumes, esencias, saborizantes artificiales y como antibacteriano en jabones líquidos (Cho Ji *et al.*, 2012). Aunado a esto, debido al que el porcentaje de rendimiento de esta fracción es minoritaria (20%) y su perfil por CCF es complejo, no se continuó con la purificación de este compuesto.

3.1.2 KAP-5C y KAP-5F

De acuerdo con los resultados obtenidos en estas fracciones y tomando en cuenta el porcentaje de rendimiento, la actividad que presentan y simplicidad para separar por CCF se decidió continuar con el estudio de las fracciones KAP-5C y KAP-5F. Estas se sometieron a purificaciones por columnas sucesivas obteniéndose los metabolitos puros KAP-6F y KAP-7D. Estos dos compuestos se sometieron al ensayo antimicrobiano con la técnica de la bioautografía y la de microdilución en caldo contra dos bacterias patogénicas para el ser humano: *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados demostraron que únicamente KAP-6F es capaz de producir un halo de inhibición en bioautografía, mientras que en microdilución presentó un efecto bactericida a una CMI de 200 $\mu\text{g/mL}$ (Figuras 3.5 y 3.6).

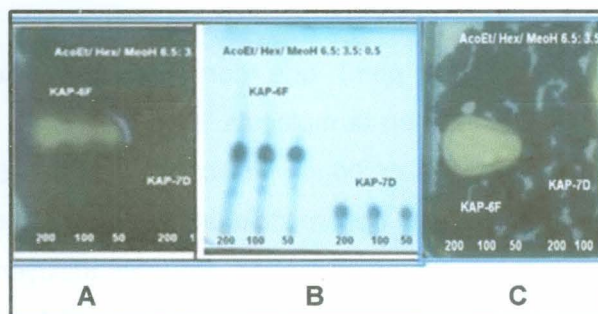


Figura 3.5. Bioautografía de las fracciones KAP-6F y KAP-7D (200, 100, 50 µg) revelada con ácido fosfomolibdico (B). Evaluado contra *Staphylococcus aureus* (A) y *Bacillus subtilis* (C).

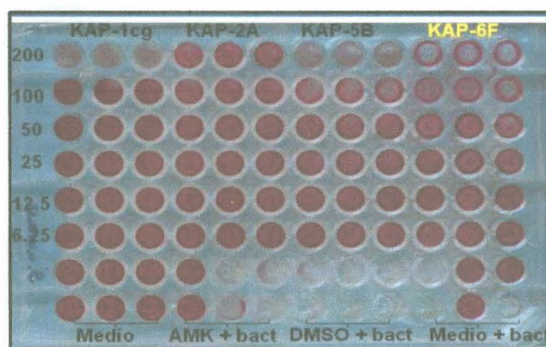


Figura 3.6. Bioensayo antibacteriano (*Staphylococcus aureus*) con la técnica de microdilución evaluando a seis concentraciones (200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL) y en la parte de abajo con sus respectivos controles positivos y negativos.

3.1.3 Beltranielona (KAP-6F)

El compuesto puro KAP- 6F se obtuvo en forma de polvo blanco; el cual se sometió a diversas pruebas espectroscópicas y espectrométricas.

En el espectro de infrarrojo (IR) de KAP-6F se observa la presencia de una banda ancha a 3392 cm^{-1} atribuida a alcoholes y otra banda de vibración de tensión a 1699 cm^{-1} de carbonilo; así como otra banda de flexión a 1037 cm^{-1} de enlaces C-O en su estructura (Figura 3.7). La presencia de grupos alcohol en la molécula se confirma por las señales múltiples base de alcohol que aparecen a campo alto (3.03 – 3.9 ppm) en el espectro de RMN ^1H de esta molécula (Figura 3.8).

Por otra parte, en el espectro de RMN ^{13}C de KAP-6F (Figura 3.9) aparece claramente una señal a campo alto (201.5 ppm) que corrobora la presencia de carbonilo correspondiente a un grupo cetona en la molécula. Adicionalmente, a campo alto en el mismo espectro se observaron dos carbonos vinílicos a 133 y 125 ppm. La molécula presenta en total 22 carbonos, los tres mencionados anteriormente, siete carbonos oxigenados, otros 10 carbonos hidrocarbonados sp^3 que incluyen dos metilos, seis metilenos, dos metinos, así como dos carbonos cuaternarios. Estos se corroboran en el experimento DEPT 135 en donde se observan claramente en fase positiva la presencia de cinco señales que corresponden a metinos y dos señales de metilo y por lo contrario en fase negativa se observa la presencia de ocho señales que corresponden a grupos metileno (Figura 3.10). La asignación de enlaces directos carbono a protón se realizó mediante el experimento bidimensional HSQC (Figura 3.11).

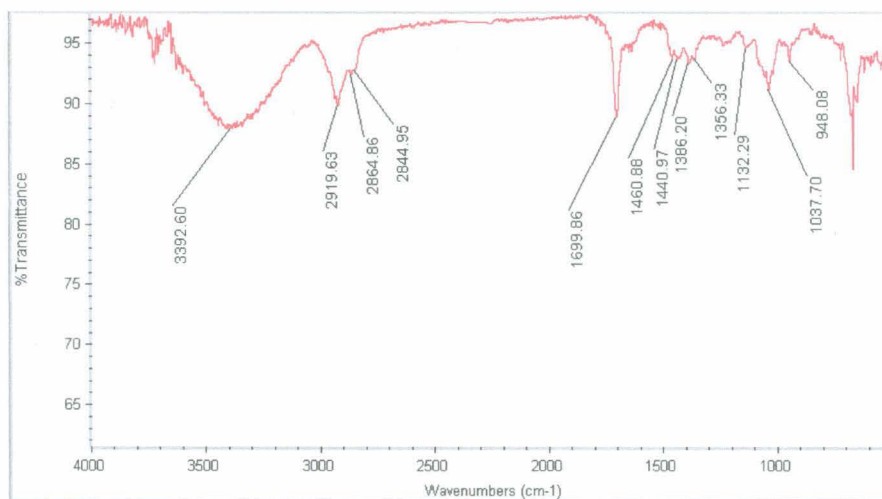


Figura 3.7. Espectro infrarrojo (IR) del metabolito KAP-6F.

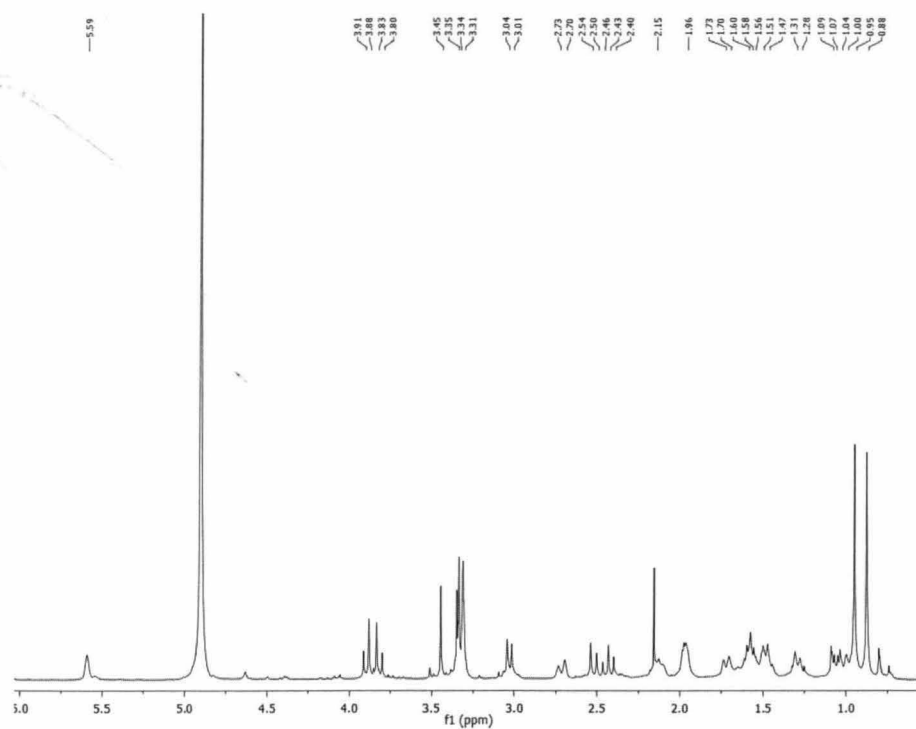


Figura 3.8 Espectro de RMN ^1H de beltranielona (400 MHz, CD_3OD).

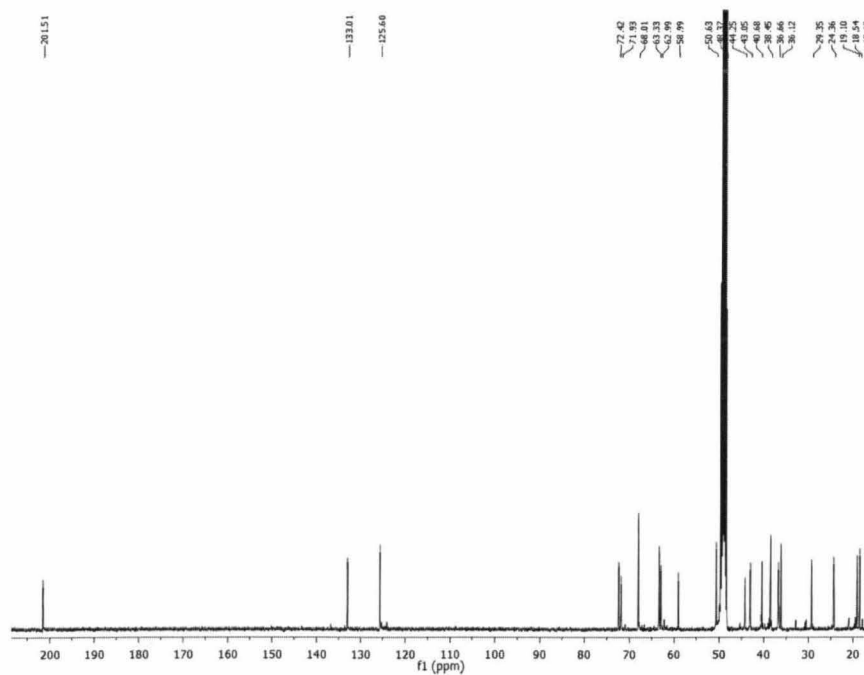


Figura 3.9. Espectro de RMN ^{13}C de beltranielona (100 MHz, CD_3OD).



Figura 3.10 Espectro DEPT 135 de beltranielona (100 MHz, CD₃OD)

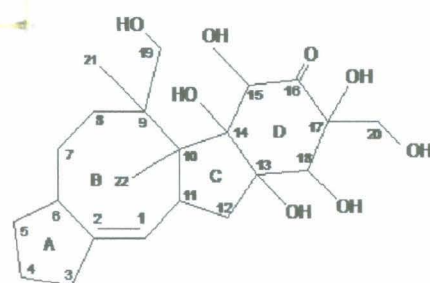


Figura 3.11 Espectro HSQC protón-carbono de beltranielona (400 MHz en CD₃OD).

Uno de los carbonos vinílicos se encuentra protonado (5.59 ppm) y muestra en el experimento bidimensional COSY (Figura 3.12) un acoplamiento alílico (4J) con los protones ubicados a 2.52 y 2.71 ppm de un metileno (H-3a y H-3b, respectivamente), y con los metinos desplazados a 2.13 ppm (H-6) y 1.58 ppm (H-11). Por otra parte, en este mismo espectro se detecta una serie de acoplamientos vecinales (1J) entre los protones H-3, H-4, H-5, H-6, H-7 y H-8 (Figura 3.13) que sugieren la presencia de dos anillos de 5-8 miembros (A, B) en la estructura de este metabolito. Esto se confirma con los acoplamientos a larga distancia (2J y 3J) que aparecen en el espectro heteronuclear HMBC de KAP-6F (Figura 3.13), principalmente de los protones H-3a y H-3b con los carbonos vinílicos C-1 y C-2, y con el carbono ubicado a 50.8 ppm (C-6) de uno de los metinos que enlaza a los anillos A y B.

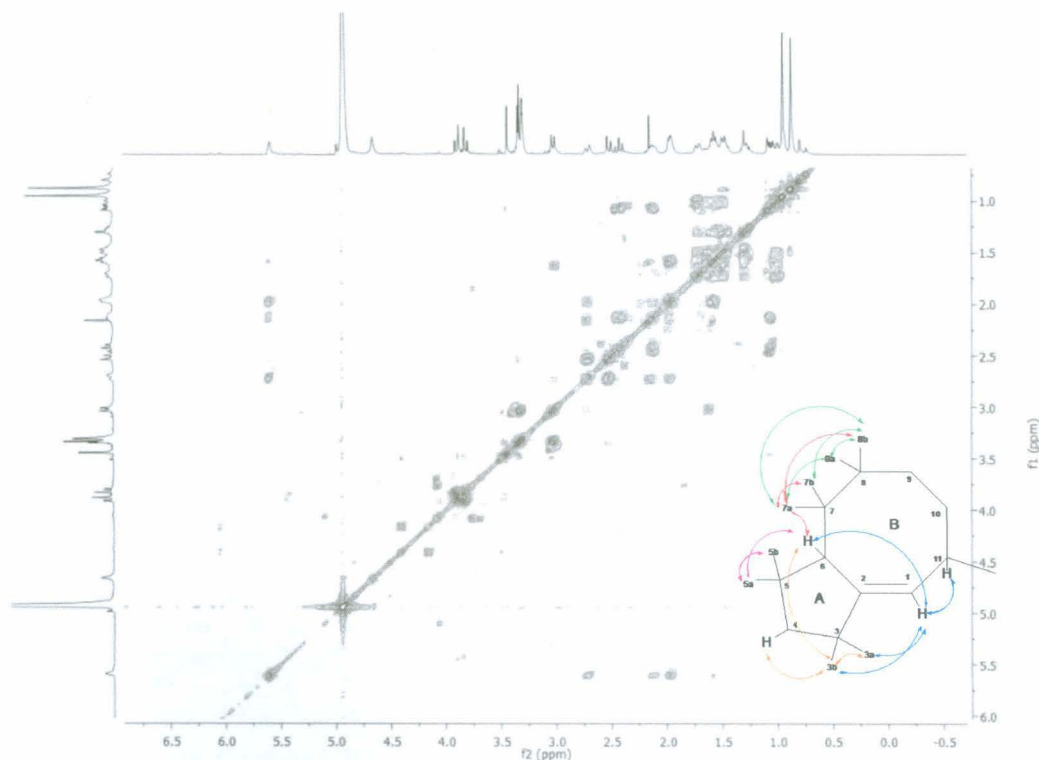


Figura 3.12. Acoplamientos protón-protón detectados en el espectro bidimensional COSY ^1H - ^1H de beltranielona (400 MHz en CD_3OD).

En el mismo espectro se localizan los acoplamientos 2J de los protones del metileno C-8 con el carbono C-9. Este último carbono se encuentra acoplado (3J) a los protones del metino a 1.58 ppm (H-11) y el metilo a 0.87 ppm (C-22), finalmente, los protones del segundo metilo ubicados a 0.95 ppm se acoplan a dos enlaces del C-10 (36.7 ppm), y tres del C-11 (44.2 ppm) con los cuales se sustenta el biciclo AB para KAP-6F. Las correlaciones 2J del protón del metino a 1.58 ppm (H-11) con los carbonos cuaternarios C-9 y C-13 (38.4 y 72.4 ppm, respectivamente), indican un tercer anillo (C) en esta subestructura, la cual se propone de cinco carbonos (Figura 3.13). Esta sección del esqueleto se relaciona con las que se reportan para las ofiobolinas aislados del hongo *Bipolaris oryzae* que son de la familia de los sesterterpenos y en los brassicicenos que son diterpenos aislados del hongo *Alternaria brassicicola*, que también muestran actividad antimicrobiana (Figura 3.14) (Wang *et al.*, 2013; Mackinon *et al.*, 1999).

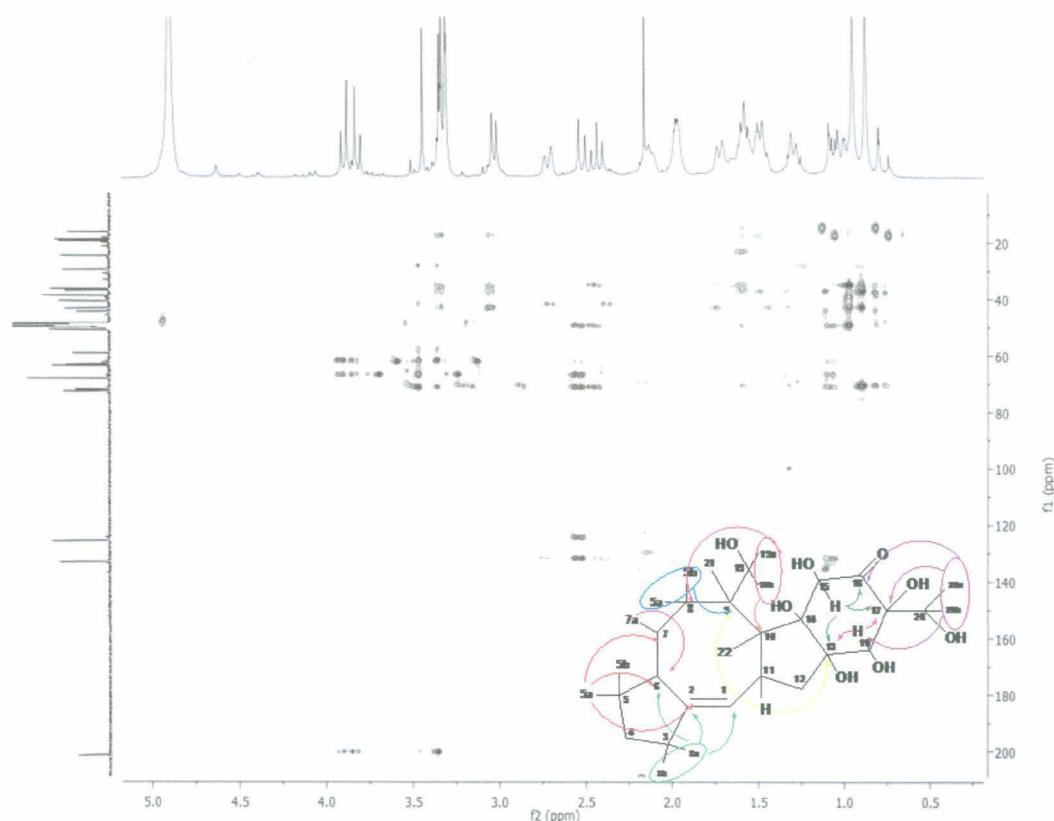


Figura 3.13 Espectro de HMBC protón-carbono (1J) y (2J) de Beltranielona (400 MHz en CD_3OD).

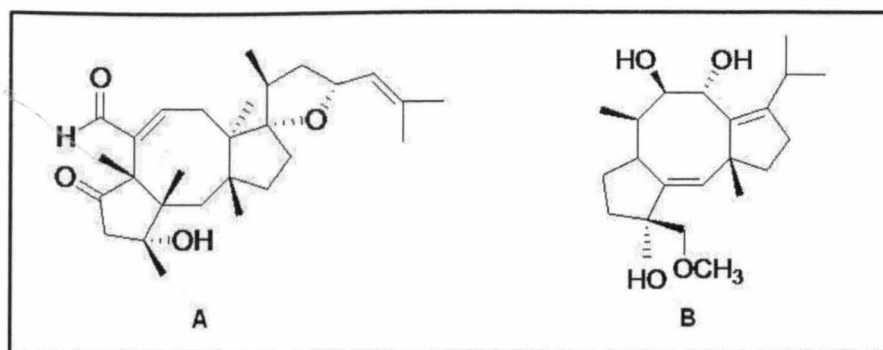


Figura 3.14. Estructuras químicas de (A) ofiobolina y (B) brassiciceno.

Al analizar en conjunto los espectros de RMN mono y bidimensionales de KAP-6F se determina que la molécula posee un total de siete carbonos oxigenados, dos de tipo primario (59.0 y 71.9 ppm), dos secundarios (68.0 y 63.3 ppm) y tres terciarios (59.0, 63.0 y 72.4 ppm). En el espectro de protón se observan dos cuartetos AB, el primero de ellos ubicado a 3.90 y 3.82 ppm y el segundo a 3.33 y 3.03 ppm de dos metilenos base de alcohol primario en posición C-19 y C-20, respectivamente. Las correlaciones a larga distancia (2J y 3J) de los protones de H-19 con los carbonos C-8, C-10 y C-22 en el espectro de HMBC para este compuesto permiten proponer que uno de estos alcoholes primarios se encuentra ubicado en el anillo B de la molécula. El segundo se acopla con los carbonos C-16, C-17 y C-18, todos oxigenados. Por otra parte, las correlaciones de los otros protones base de alcohol secundario, y los carbonos base de alcohol terciario en conjunto con el carbono cetónico sugieren fuertemente que se encuentran formando un cuarto anillo (D) altamente oxigenado en KAP-6F (Figura 3.15). Entre estos, las correlaciones 2J y 3J del protón H-15 con los C-13, C-16 y C-17, así como los protones H-20 con los carbonos C-16, C-17 y C-18 corroboran esta propuesta.

En una revisión de la literatura se encontró que este anillo (D) guarda mucha similitud con el azúcar 3-desoxi-3-hidroximetil-mio-inositol, donde las principales diferencias se centran en la cetona, y los alcoholes terciarios (Figura 3.15). Este azúcar se ha reportado como producto de síntesis y por primera vez como un producto natural de *Itoa orientalis*, una planta de la familia Flacourtiaceae (Tang *et al.*, 2012).

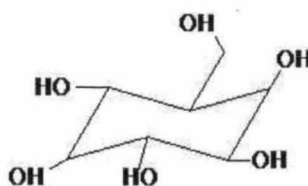


Figura 3.15. Estructura química del 3-desoxi-3-hidroximetil-mio-inositol.

Para corroborar los grupos alcohol de esta molécula, una muestra se sometió a una reacción de acetilación a temperatura ambiente con anhídrido acético y piridina. El producto de la reacción se analizó por las mismas técnicas espectroscópicas que el alcohol y, como se esperaba, los dos alcoholes primarios se encontraron acetilados (ver en anexo la tabla 2). Sin embargo, sólo uno de los secundarios se derivatizó, el cual se determinó que se encuentra unido a C-15. El grupo alcohol en C-18 no se acetiló, probablemente debido a impedimento estérico. Los datos confirman la sub-estructura propuesta para el anillo D de KAP-6F.

Los datos en conjunto indican que la estructura de KAP-6F está constituida de cuatro anillos, con fórmula condensada de $C_{22}H_{34}O_8$ y peso molecular de 426 uma y seis sitios de insaturación (Figura 3.16). Este dato calculado se confirmó con el ión molecular en el espectro de masas de impacto negativo ($[M^+ - 1] = 425$ uma) de KAP-6F (Figura 3.17). Este metabolito no ha sido reportado previamente en la literatura, el cual se nombró beltranielona (Figura 3.16), con ligera actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

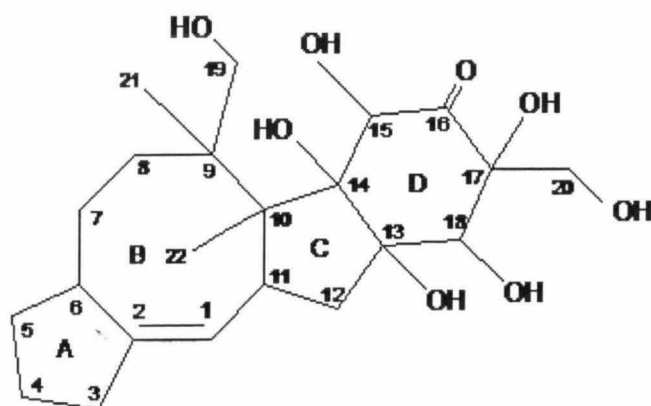


Figura 3.16. Estructura propuesta para beltranielona.

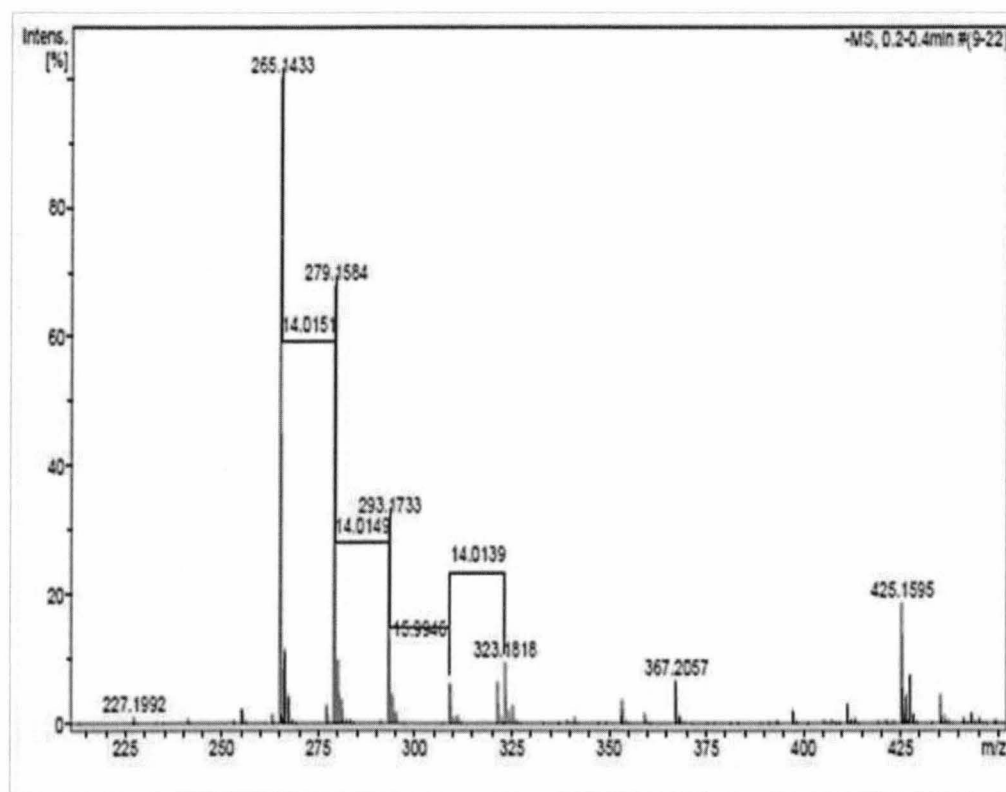


Figura 3.17. Datos del espectro de masas de impacto negativo de beltranielona.

Cuadro 3.1. Datos espectroscópicos de beltranielona en CD_3OD (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz).

Posición	$\delta^{13}\text{C}$, tipo	$\delta^1\text{H}$, mult.(J en Hz)	COSY	HMBC
1	125.6, CH	5.59, sa	3a, 3b, 6, 11	
2	133, C			
3a	43, CH_2	2.52, d (14.8)	1, 3b	1, 2, 6
3b		2.71, da (14.8)	1, 3a, 4, 6	1, 2, 6
4	24.4, CH_2	1.98, m	1, 3a,	
5a	29.3, CH_2	1.06, dd (12.8,)	5b, 6	2, 6, 7
5b		2.43, dd (12.8)	5a	6
6	50.8, CH	2.13, m	1, 5b, 7a	
7a	40.4, CH_2	1.0 da, (14)	6, 7b, 8b	6
7b		1.72 da, (12.8)	7a,	
8a	36.1, CH_2	1.29, da, (12.8)	7a, 8b	9
8b		1.49, da, (11.2)	7a, 7b, 8a, 12	9
9	38.4, C			
10	36.7, C			
11	44.2, CH	1.58, m	1	9, 13
12a	19.1, CH_2	1.59, da (8)		
12b		1.48, da (8)		
13	72.4, C			
14	59, C			
15	63.3, CH	3.36, s		13, 16, 17
16	201.5, C			
17	63, C			
18	68, CH	3.4, s		13, 17
19a	71.9, CH_2	a. 3.03, d(10.4)		8, 10, 21
19b		b- 3.33, d (10.8)		8, 10, 21
20a	59, CH_2	3.82, d (13.2)		16, 17, 18
20b		3.9, d (12.8)		16, 17, 18
21	15.9, CH_3	0.95, s		10, 11
22	18.5, CH_3	0.87, s		8, 9

3.1.4 Beltranielol (KAP-7D)

El compuesto KAP-7D se obtuvo en forma pura como un polvo blanco. Los espectros de IR, RMN ^1H , ^{13}C y los experimentos bidimensionales DEPT, HSQC, HMBC y COSY ^1H - ^1H de este compuesto presentan una enorme similitud con los correspondientes a beltranienona (Figura 3.16 y Tabla 3.1).

En el IR se observa principalmente la prominente banda de tensión a 3367 cm^{-1} característica de grupos alcohol, y la ausencia de la banda de cetona (Figura 3.18). Esto se confirma en el espectro de carbono, en conjunto con la aparición de una señal a 64.9 ppm debida a un alcohol secundario (Figura 3.19). El protón base de alcohol aparece en el espectro de protón a campos altos (4.40 ppm) como un doblete debido a su acoplamiento vecinal ($J = 2.8\text{ Hz}$) con el protón a 3.22 ppm (H-15) (Figura 3.20). Estos datos, permiten proponer que el anillo D en la estructura de KAP-7D equivale al 3-desoxi-3-hidroximetil-mio-inositol (Figura 3.15).

El espectro de masas de impacto positivo muestra un ión a $m/z\ 415\ [M^+ + 2] + \text{CH}_3$, que corresponde a la fórmula condensada esperada $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_8$ (Figura 3.21). Este segundo metabolito con estructura novedosa de *B. portoricensis* se denominó beltranielol (Figura 3.22).

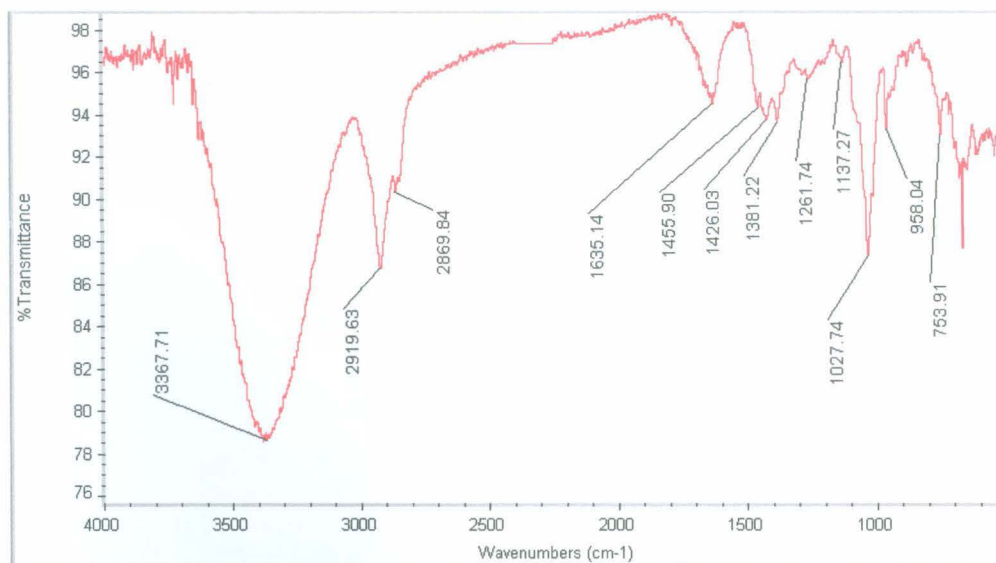


Figura 3.18. Espectro de infrarrojo (IR) de beltranielol (KAP-7D).

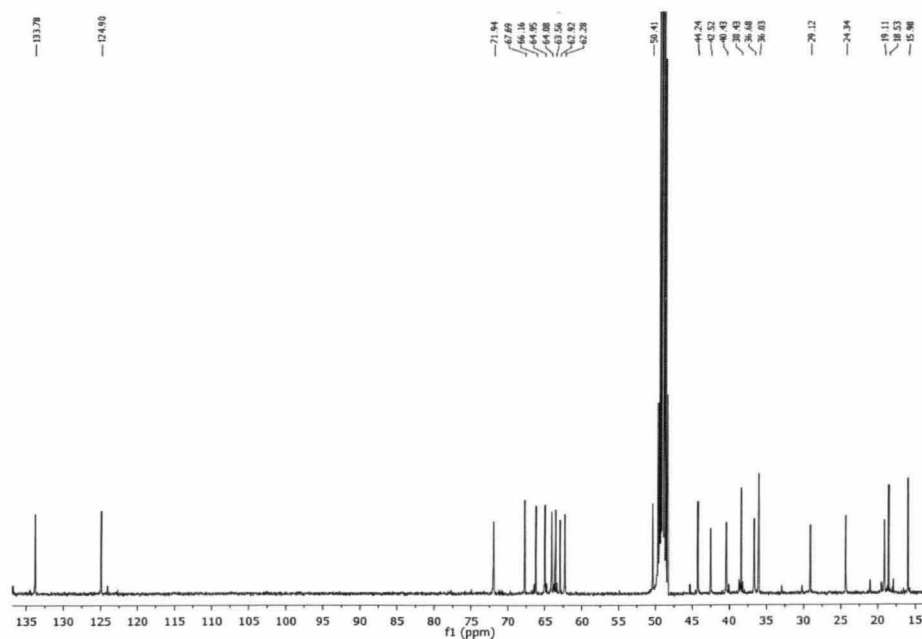


Figura 3.19. Espectro de RMN ^{13}C de beltranielol (400 MHz en CD_3OD).

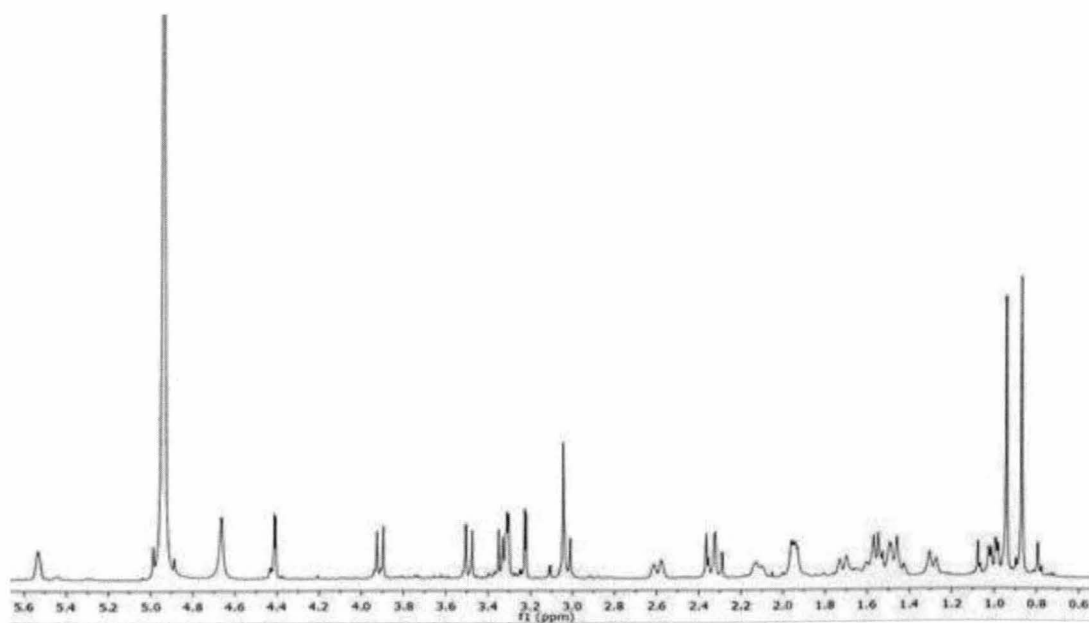


Figura 3.20. Espectro de RMN ^1H de beltranielol (400 MHz en CD_3OD)

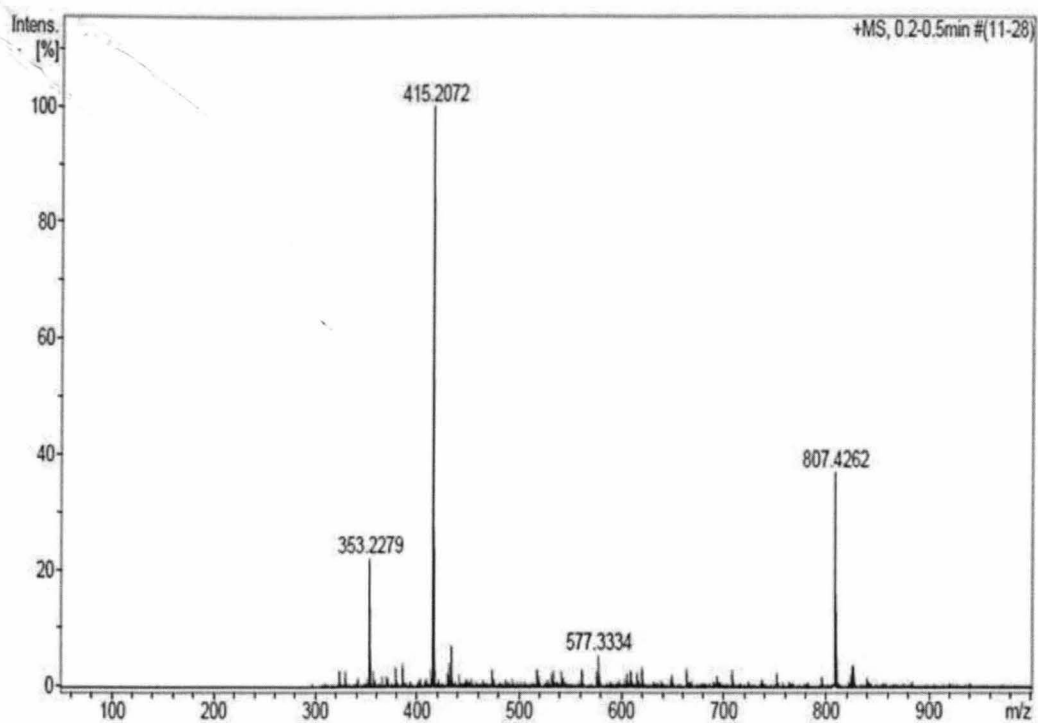


Figura 3.21.- Espectro de masas de impacto positivo de beltraniol.

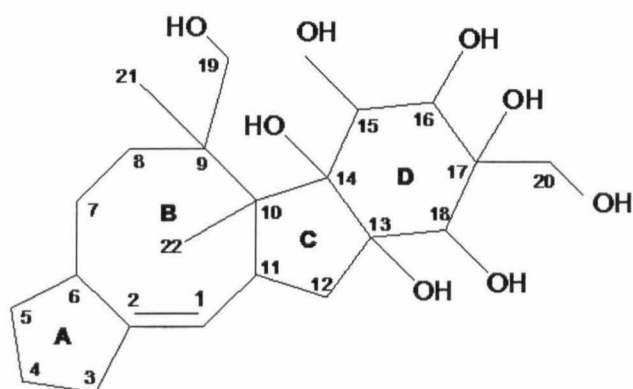


Figura 3.22. Estructura propuesta para beltraniol.

Cuadro 3.2. Datos espectroscópicos de beltranielol en CD₃OD (¹H 400, ¹³C 100 MHz).

Posición	$\delta^{13}\text{C}$, tipo	$\delta^1\text{H}$, mult. (J en Hz)	COSY	HMBC
1	124.9, CH	5.52, sa	3a, 3b, 6, 4, 12	
2	133.8, C			
3a	42.5, CH ₂	2.32, dd (15.4, 13.2)	3b, 4, 6	5
3b		2.6, da (14.8)	3a, 5a, 6	1,2, 6
4	24.3, CH ₂	1.94 , m (7.4)	12b	
5a	29.1 CH ₂	0.982, dd (12.8, 5.2)		
5b		2.43, dd (12.8, 12.8)	5b, 6	2, 6, 7
6	49.6, CH	2.11, da (11.6)	5a	5a,3b
7a	40.4, CH ₂	0.99, m	12ab, 8a, 5a	6
7b		1.71, da, (12.4)		
8a	36.7, CH ₂	1.28,d (12)		21
8b		1.48, d (12)		
9	38.4, C			21
10	36.0, C			19a, 19b
11	44.2, CH	1.56, m		9, 13
12a	19.1, CH ₂	1.47, m	5a, 8a	
12b		1.6 , m		
13	67.7, C			
14	62.9, C			15
15	63.6, CH	3.22, d (2.8)		16
16	64.9, CH	4.40, d (2.8)		15
17	66.2, C			
18	64.1, CH	3.04, s		13, 17
19a	71.9, CH ₂	a.3.33, d (12.4)	19b	19a,19b, 20a 21
19b		b- 3.02, d (12)	19a	
20a	62.3, CH ₂	3.5 ,d (12)	20b	
20b		3.90 , d (12)	20a	
21	16.0, CH ₃	0.94 , s		21
22	18.5, CH ₃	0.87, s		19a, 19b

Las revisiones en las bases de datos estructurales (Reaxys, Scifinder) no arrojaron estructuras químicas cercanas a los dos metabolitos de *B. portoricensis*. Por otra parte, la actividad de beltranielona y la inactividad de beltranielol a las bacterias *B. subtilis* y *S. aureus* fuertemente indican que el grupo carbonilo de la cetona en el primer compuesto le confiere la actividad antibacteriana a la molécula.

Finalmente, es importante cultivar y obtener más extracto de *B. portoricensis* para trabajar la parte menos polar de la fracción de acetonitrilo, con el objetivo de aislar e identificar el componente activo detectado en la fracción KAP-5B, que demostró más actividad antibacteriana que beltranielona.

3.2 Referencias

- Baba, Y., Shimonaka, A., Koga, J., Murashima, K., Kubota, H., y Kono, T. (2005). Purification and characterization of a new endo-1,4- β -D-glucanase from *Beltraniella portoricensis*. Japan. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 69, 1198-1201.
- Heredia G, Arias R.M., Reyes M. y Castañeda-Ruiz R. (2002). New anamorphic fungi with rhombic conidia from Mexican tropical forest. Fungal diversity, 11, 99-107.
- Jin-Liang, C. y Shean-Shong T. (2007). Some Hyphomycetes (Deuteromycotina) *Beltraniella* and its allies in Taiwan. Fungal Science, 24, 1–14.
- Mackinnon, S. L., Keifer, P. y Ayer, W. (1999). Components from the Phytotoxic extract of *Alternaria brassicicola*, a black spot pathogen of canola. Phytochemistry, 51, 215-221.
- Moulari, B., Pellequer, Y., Lboutounne, H., Girard, C., Chaumont, J.P., Millet, J., Muiyard, F. (2006). Isolation and *in vitro* antibacterial activity of astilbin, the bioactive flavanone from the leaves of *Harungana madagascariensis* Lam. Ex Poir(Hypericaceae). Journal Ethnopharmacology, 106:272-278.
- Pirozynski, K.A. (1963) *Beltrania* and Related Genera. Mycology Paper, 90:1-37.
- Pirozynski, K.A. y Patil, S.D. (1970). Some setose Hyphomycetes of leaf litter in South India. Journal Botanical, 48, 567–581.
- Reyes-Estebanez, M. (2009). Estudio exploratorio de la bioactividad de hongos microscópicos asociados a restos vegetales, en zonas tropicales de México. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México, 171p.

Sartoratto, A, Machado, A., Delarmelina, C., Figueira G.M., Duarte M.C.T. y Rehder V. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Journal of Microbiology*, 35:275-80.

Souza, T.M.; Severi, J.A.;Silva,Santos, E.; Pietro, R.C.L.R. (2007). Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 4, 221-226.

Tang, W., Xu H., Zeng D. y Yu L. (2012). The antifungal constituents from the seeds of *Itoa orientalis*. *Phytotherapy*, 83, 513-517.

Wang, Q.,Yang J., Qi Q., Li, B., Yang X., Liu, M., Huan, P., Zhang L., Chen J., Cai L. y Liu, H. (2013). 3- Anhydro-6-hydroxy-ophiobolin A, a new sesterterpene inhibiting the growth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and inducing the cell death by apoptosis on K562, from the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*. *Bioorganic & Medicinal chemistry Letters*, 23, 3547-3550.

CAPITULO IV

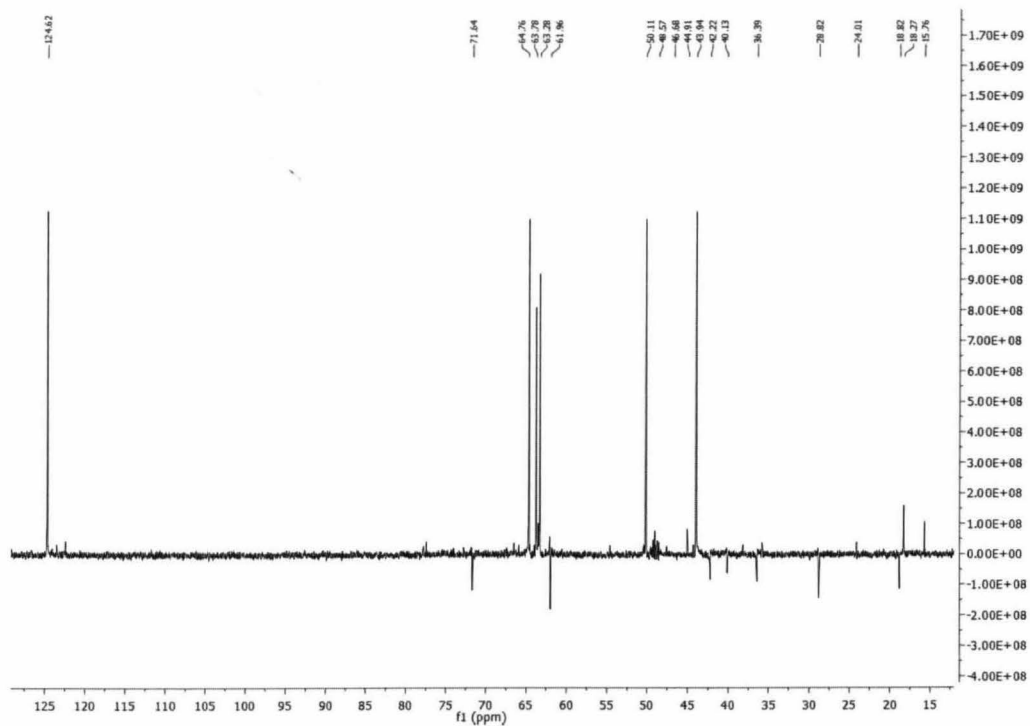
4.1 Conclusiones generales

- En este trabajo se estudia, por primera vez, desde un enfoque químico al hongo microscópico *Beltraniella portoricensis* MR42 aislado de restos vegetales del trópico mexicano.
- El cultivo masivo de *Beltraniella portoricensis* demostró que la cepa continúa produciendo metabolitos antibacterianos.
- La mayor actividad de *Beltraniella portoricensis* se localizó en la subfracción KAP-5B (MIC = 100 µg/mL) que es una mezcla compleja y de bajo rendimiento que contiene un metabolito de tipo benzaldehído.
- A partir de la fracción de polaridad media del hongo *Beltraniella portoricensis* se aislaron dos metabolitos, nombrados beltranielona y beltranielol.
- Beltranielona y beltranielol son metabolitos secundarios pertenecientes a la familia de los sesterterpenos los cuales poseen esqueletos estructurales inusuales y novedosos.
- El metabolito beltranielona es capaz de inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas *B. subtilis* y *S. aureus*, con efecto bactericida y una MIC de 200 µg/mL.
- La actividad presentada por beltranielona es baja, comparada con los controles comerciales.
- El presente trabajo representa una contribución al conocimiento micoquímico de los hongos microscópicos de México.

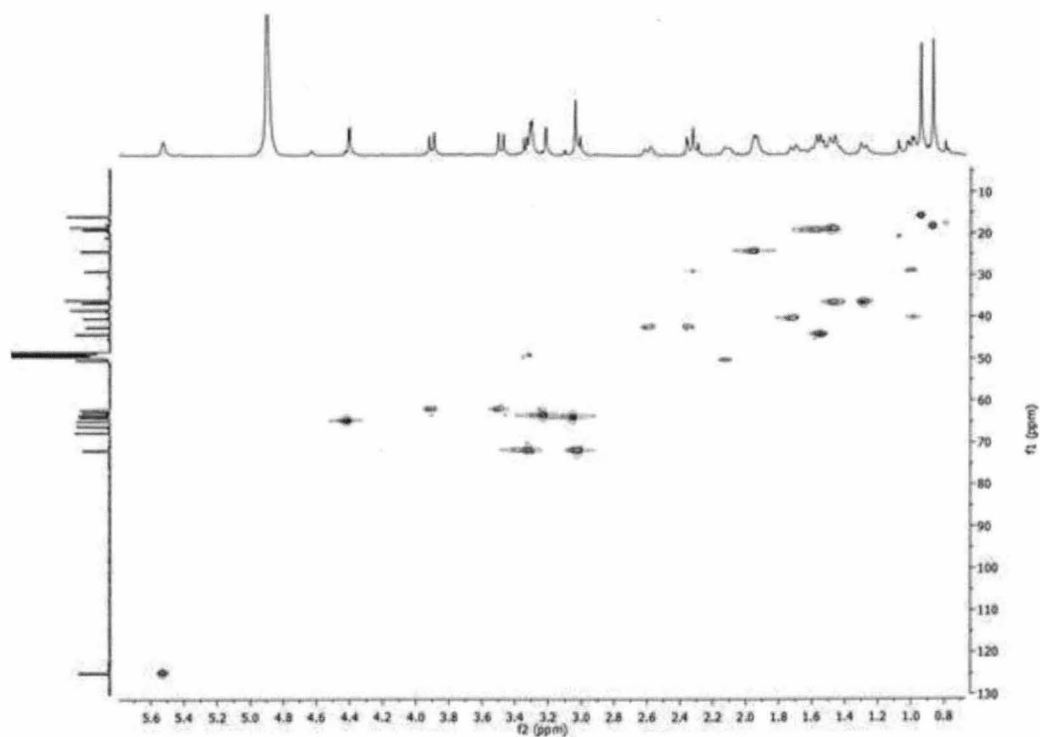
4.2 PERSPECTIVAS

- Con base en los resultados obtenidos, se sugiere obtener más extracto de *Beltraniella portoricensis*, con la finalidad de aislar los otros metabolitos activos de la subfracción KAP-5B.
- Obtener cantidades adicionales de beltranielona y beltranielol para confirmar la estructura y configuración de sus estructuras mediante estudios de cristalografía de rayos X.
- Realizar ensayos para evaluar a beltranielona y beltranielol con otros modelos patogénicos de interés como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria tagetica*, el nemátodo *Meloydogine incognita* y el insecto *Myzus persicae*.
- Realizar diversos derivados químicos para corroborar que el grupo carbonilo de la cetona le confiere la actividad presentada por beltranielona.

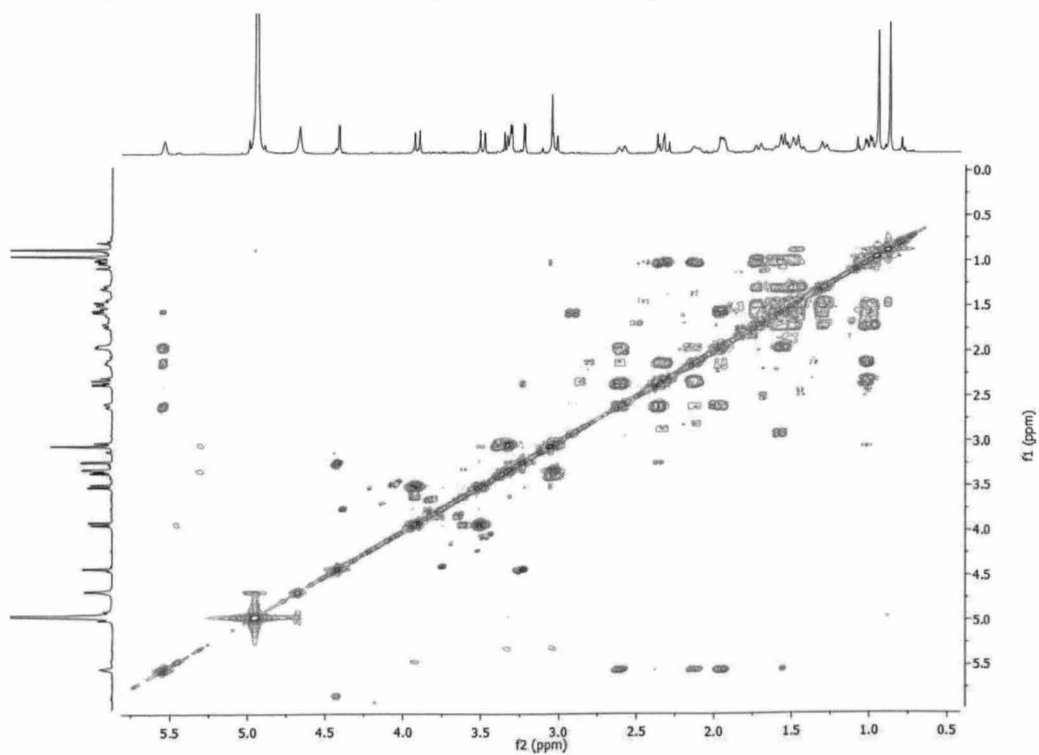
ANEXOS



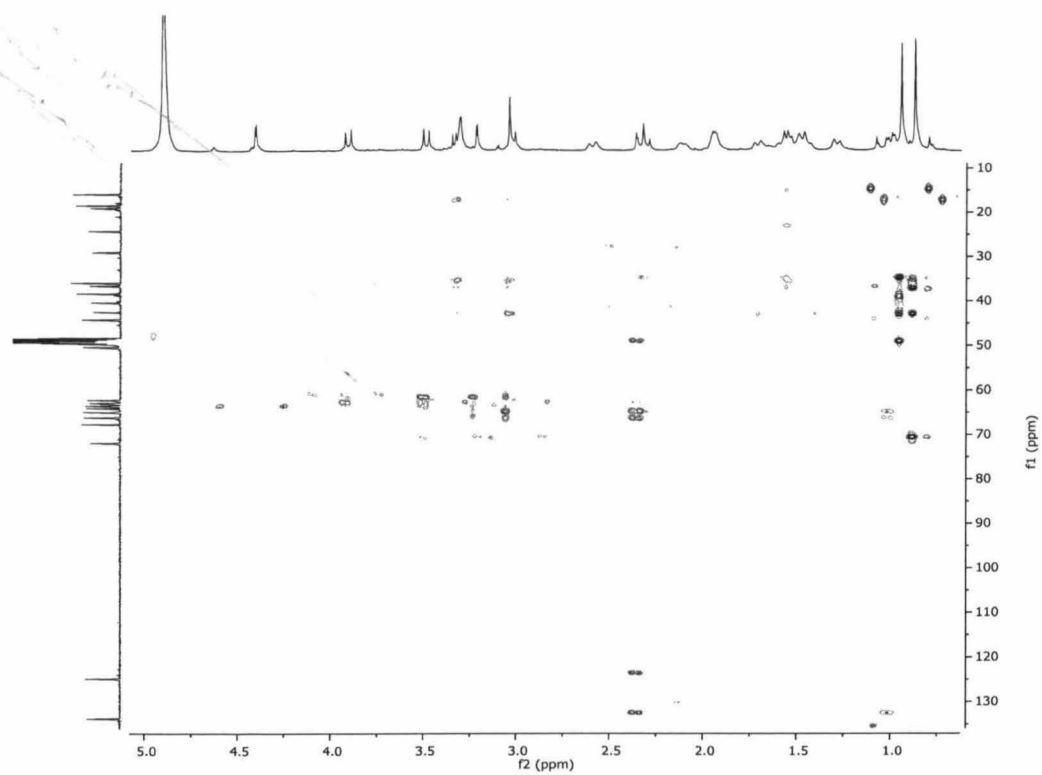
Anexo1. Espectro DEPT 135 de beltranielol (400 MHz en MeOD)



Anexo 2. Espectro HSQC de beltranielol (400 MHz en MeOD)



Anexo 3. Espectro COSY de beltranielol (400 MHz en MeOD)



Anexo 4.- Espectro de HMBC de Beltraniol (400 MHz en MeOD)

Anexo 5. Datos espectroscópicos de beltranielona acetilada en CD₃Cl (¹H 600 MHz, ¹³C 125 MHz).

Posición	$\delta^{13}\text{C}$, tipo	$\delta^1\text{H}$, mult. (J en Hz)	COSY	HMBC
1	124.4, C=CH	5.52, sa	3a, 3b, 4a,10	3
2	130.8, C=C			3,5
3a	40.3, CH ₂	2.8, d (15)	3b,4a	
3b		2.53, d (15)	3a	
4a	23.6,CH ₂	1.9, m		
4b				
5a	27.5 CH2	1.78, t (12.9)	5b	
5b		1.09, dd (6, 6)	5a	
6	44.0, CH	1.49, s		19
7a	38.6, CH ₂	1.58, d (12)	7b	
7b		0.98, m	7a	
8a	35.8, CH ₂	1.4,d, (12.6)		19
8b		1.3, dd (5.4, 4.8)		19
9	36.2, C			
10	48.40, CH	2.2, s		3, 5, 12
11	35, C			
12a	17.7, CH ₂	1.46, m		19
12b				
13	75.1, C			18
14	62.6, C			
15	60.3, CH	3.43, s	16	18,20
16	64.2, CH	5.82, s	15	
17	57.9, C			15, 18, 20
18	61.5, CH	3.2, s		15, 18
19a	72.7, CH ₂	3.80, d (5.4)	19b	12
19b		3.67, s	19a	
20a	62.7, CH ₂	4.12 ,d (12)	20b	15, 18, 20
20b		4.02, d (12)	20a	
21	17.8, CH ₃	0.934, s		12, 19
22	15.3, CH ₃	0.870, s		12
	171.3, AcO			
	170.6, AcO			
	170.5, AcO			
	21.2, <u>C</u> H ₃ -CO	2.20,s		
	21.03, <u>C</u> H ₃ -CO	2.05,s		
	20.8, <u>C</u> H ₃ -CO	2.02,s		

Anexo 6. Datos espectroscópicos de beltranielol acetilado en CD₃Cl (¹H 600 MHz, ¹³C 125 MHz).

Posición	$\delta^{13}\text{C}$, tipo	$\delta^1\text{H}$, mult.(J en Hz)	COSY	HMBC
1	124.4, C=CH	5.52, sa	3a, 3b, 4a,10	3
2	130.8, C=C			3,5
3a	40.3, CH ₂	2.8, d (15)	3b,4a	
3b		2.53, d (15)	3a	
4a	23.6,CH ₂	1.9, m		
4b				
5a	27.5 CH2	1.78, t (12.9)	5b	
5b		1.09, dd (6, 6)	5a	
6	44.0, CH	1.49, s		19
7a	38.6, CH ₂	1.58, d (12)	7b	
7b		0.98, m	7a	
8a	35.8, CH ₂	1.4,d, (12.6)		19
8b		1.3, dd (5.4, 4.8)		19
9	36.2, C			
10	48.40, CH	2.2, s		3, 5, 12
11	35, C			
12a	17.7, CH ₂	1.46, m		19
12b				
13	75.1, C			18
14	62.6, C			
15	60.3, CH	3.43, s	16	18,20
16	64.2, CH	5.82, s	15	
17	57.9, C			15, 18, 20
18	61.5, CH	3.2, s		15, 18
19a	72.7, CH ₂	3.80, d (5.4)	19b	12
19b		3.67, s	19a	
20a	62.7, CH ₂	4.12 ,d (12)	20b	15, 18, 20
20b		4.02, d (12)	20a	
21	17.8, CH ₃	0.934, s		12, 19
22	15.3, CH ₃	0.870, s		12
	171.3, AcO			
	170.6, AcO			
	170.5, AcO			
	21.2, <u>C</u> H ₃ -CO	2.20,s		
	21.03, <u>C</u> H ₃ -CO	2.05,s		
	20.8, <u>C</u> H ₃ -CO	2.02,s		