

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio de bioprospección de compuestos inhibidores de la comunicación celular (QS) como estrategia de control de agentes fitopatógenos

Sandra Judith Naranjo Gaybor

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2017

Estudio de bioprospección de compuestos inhibidores de la comunicación celular (QS) como estrategia de control de agentes fitopatógenos

Sandra Judith Naranjo Gaybor

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias-Química

Director:

Ph.D. Leonardo Castellanos Hernández

Codirectora:

Ph.D. Zulma Suárez

Línea de Investigación:

Bioprospección

Grupo de Investigación:

Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2017

Estudio de bioprospección de compuestos inhibidores de la comunicación celular (QS)
como estrategia de control de agentes fitopatógenos

Sandra Judith Naranjo Gaybor

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Doctor en Ciencias-Química

Director:

Ph.D. Leonardo Castellanos Hernández

Codirectora:

Ph.D. Zulma Suárez

Línea de Investigación:

Química de microorganismos

Grupo de Investigación:

Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2017

A Michelle, Denisse y Alexis para quienes va este trabajo, por su dulzura, comprensión y apoyo.

A mis padres Ricardo y Laurita por su ejemplo que ha marcado mi vida.

Todos tenemos sueños. Pero para convertir los sueños en realidad, se necesita una gran cantidad de determinación, dedicación, autodisciplina y esfuerzo.

Jesse Owens

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional de Colombia y al departamento de Química, por haberme abierto las puertas de su institución para llegar a completar mi perfeccionamiento académico.

Agradezco a la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) Ecuador por el financiamiento de la beca (2012-2) para el desarrollo y manutención mis estudios doctorales. A la Universidad de las Fuerzas Armadas Ecuador por concederme la comisión de servicios para realizar mis estudios doctorales.

Agradecemos a COLCIENCIAS por el financiamiento con el proyecto “Cultivo de cianobacterias y actinobacterias marinas: una nueva aproximación para el control de insectos y fitopatógenos” (Cod. 1101-659-44402. CT.537/14) Proyectos de 40 millones, (Código: 375469). Evaluación de la actividad biológica de compuestos volátiles liberados por bacterias aisladas de ambientes marinos. Profesora Diana C Sinuco. Código: 23604 Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica. Fase I. prof Leonardo. Código: 24658 Cultivo de cianobacterias y actinobacterias marinas: una nueva aproximación para el control de insectos y fitopatógenos. IFS (Grant F/5023-2), y la Universidad Nacional de Colombia DIB (grant/Hermes 23604). Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, Francisco José de Caldas, contrato No. 0459 –2013, Red Nacional para la Bioprospección de Frutas Tropicales-RIFRUTBIO.

Al ANLA y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible que concedieron el permiso de colecta de muestras y desarrollo de esta investigación (Permiso N° 4 del 10/02/ 2010, Anexo 2, Contrato de Acceso a Recurso Genético No 108; y Contrato de Acceso a Recurso Genético No 105), IFS (Grant F/5023-2), y la Universidad Nacional de Colombia DIB (grant/Hermes 23604).

Al instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por proveernos amablemente de las cepas de *Burkholderia* spp. A la Profesora Catalina Arévalo Ferro, Departamento de Biología, de la Universidad Nacional de Colombia por gentilmente suministrarnos la cepa de *Chromobacterium violaceum* ATCC31532. Al profesor Jinwoo Kim de Division of Applied Life Science and Institute of Agriculture and Life Sciences, Gyeongsang National University, Republic of Korea, por facilitarnos la cepa mutante de *Burkholderia glumae* COK 71 para realizar los ensayos de actividad biológica.

Al profesor Olivier Thomas, por su ayuda incondicional durante mi estancia en la ciudad de Niza, Francia a (la gente y el proyecto). Quiero agradecer muy especialmente al profesor Juan Francisco León por su asesoramiento y apoyo durante mi estancia en la Universidad de Mississippi, y también a Martha, Nohora y Yelkaira por hacer más placentera mi estancia en EEUU.

Al Profe Leonardo, por su invaluable guía en el desarrollo de esta tesis, por su apoyo en todo momento y por su paciencia.

A la profesora Zulma Suárez, por toda su paciencia y toda su vasta experiencia que me sirvieron de guía en el trabajo investigativo y sobre todo porque fue una gran amiga que me ayudó aún en los momentos en los que me sentía perdida.

Al Profe Freddy por la paciencia y buenas energías.

A la Ing. Nubia Moreno por su cordialidad infinita y apoyo al prestarme las instalaciones del IBUN, en todo momento. A todos los integrantes del grupo de Fermentaciones del IBUN, Diani Vergara, Elsi, a Carolina Cuellar.

Un agradecimiento especial a la profesora Diana Sinuco por toda su colaboración y buena disposición para el desarrollo de una parte del trabajo de investigación.

Un reconocimiento especial a todos los miembros del grupo Productos Naturales Marinos y Frutos de Colombia porque más que mis compañeros fueron mi familia en este país. En especial a Fabián, Adrianita, Charlie, Norman, Diana Martínez, Mateo, Juan David.

A mis amigos Dianita y Laura Juliana por su predisposición a colaborar con el trabajo del desarrollo de la tesis y su apoyo incondicional. Y muy especialmente a Luz Adriana con quien compartí toda esta dura experiencia y que fue mi apoyo, al igual que a toda su familia.

A mis padres Laurita y Ricardo (a pesar de que ya no estás en este mundo sé que aún velas por mi) que siempre estuvieron pendientes de mi bienestar, por su apoyo incondicional tanto con sus visitas, como con sus oraciones y por haber sabido comprender mis locas decisiones.

A mi esposo Fernando por su apoyo para que siga mejorando mi perfil profesional y muy especialmente a mis hijos Michelle, Denisse y Alexis, sin cuyo apoyo y comprensión no hubiese tenido el valor de culminar.

Resumen

El *quorum sensing* (QS) es un proceso de comunicación celular bacteriana que controla varios sistemas que influyen en la patogenicidad de la bacteria. La inhibición de este proceso de comunicación puede llevar a que las bacterias no desarrollen los fenotipos de virulencia. Así, el objetivo de este estudio fue contribuir al control de fitopatógenos bacterianos mediante la exploración de diferentes tipos de productos naturales como inhibidores de los sistemas de *quorum sensing* de los fitopatógenos. Lo anterior debido a que la exploración de los *quorum quenchers* (QQ), como controladores de bacterias fitopatógenas, ha sido poco explorada y no se han identificado aún los arreglos moleculares a buscar. Así, la búsqueda de los compuestos con actividad inhibitoria del QS se hizo en fuentes naturales tan diversas como bacterias, esponjas y plantas, y con el objetivo de mantener un espacio químico amplio se buscaron compuestos de alta y baja polaridad, así como fijos y volátiles.

La revisión en la literatura de los compuestos con actividad QQ sobre fitopatógenos muestra que son mayoritariamente enzimas como reductasas, oxidasas, lactonasas, amidasa o acilasas; y solo algunos ejemplos de compuestos orgánicos como furanonas halogenadas¹. No obstante, algunos extractos se han identificados con la actividad sin aislar los compuestos responsables. En la literatura médica si hay algunos ejemplos de compuestos IQS pero no han sido probado en fitopatógenos.

En esta tesis el aislamiento de los productos naturales se hizo de manera bioguiada usando el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Los compuestos puros identificados también se evaluaron como inhibidores del QS frente a *Burkholderia glumae* CIAT 4026. Esta es una cepa fitopatógena aislada de cultivos de arroz en Colombia que causa el añublo bacterial de la panícula de arroz, ocasionando graves pérdidas económicas a productores de la gramínea. Algunos fenotipos de virulencia en *Burkholderia glumae* son controlados por QS, incluyendo la producción de toxoflavina y motilidad *swimming*.

Con el objetivo de estudiar el potencial metabólico de cepas de bacterias marinas procedentes del Mar Caribe colombiano, se recolectaron muestras de invertebrados, algas, peces y sedimentos marinos. Las bacterias presentes en estas muestras fueron aisladas por diluciones sucesivas hasta recuperar 203 aislamientos. Entre ellos 162 se describieron como bacterias, y 41 como hongos de acuerdo a sus características morfológicas, observación microscópica y tinción de Gram.

Para un primer acercamiento al estudio de actividad inhibitoria de QS y antibacteriana, se seleccionaron dentro del grupo de bacterias aisladas, las pertenecientes al Phylum Actinobacteria. Este es reconocido como una fuente prolífica de compuestos con actividad biológica por lo que se esperaba que produjeran una gran cantidad de compuestos. De esta forma se identificaron 24 aislamientos como Actinobacterias, en el ensayo *in vivo*, frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, 8 resultaron activas como inhibidoras del QS. Todas las cepas fueron cultivadas en TSB, y extraídas con acetato de etilo, para ensayar la actividad de sus extractos. Los extractos orgánicos fueron analizados por HPLC-MS, buscando valorar la diversidad metabólica de los 24 aislamientos. Con la información de masas se llevó a cabo un estudio metabolómico que permitió relacionar las variables que describen al sistema con los valores de actividad biológica. Estos resultados permitieron identificar de manera preliminar algunos compuestos activos como la streptomycin D. De otro lado, las 24 actinobacterias se sometieron a análisis filogenético, por ampliación de su gen 16S, para obtener así su caracterización taxonómica lo que permitió identificar bacterias de los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Gordonia*. Las cepas que resultaron activas, tanto en los ensayos *in vivo* como en sus extractos, pertenecen a los géneros *Streptomyces* y *Micromonospora*. Finalmente se plantea una discusión sobre qué información usar (actividad biológica, perfil por LC-MS, información taxonómica) para la priorización de las cepas a estudiar, planteando un enfoque integrador y los posibles resultados de esta estrategia.

Entre las cepas anteriores se eligieron dos para realizar estudios químicos preliminares: *Micromonospora* sp. PNM 102N, y *Streptomyces* sp. PNM89.3 por ser las que presentaban buena actividad biológica. La cepa PNM102N del género *Micromonospora* se cultivó en medio TSB (20 litros), se fraccionó con acetato de etilo y por ensayo de actividad se determinó que el extracto activo era el orgánico, a éste se le sometió a fraccionamiento por CC y por análisis de RMN se logró determinar que los compuestos responsables de la actividad corresponden a compuestos lipídicos, que se recuperan en bajísima cantidad. El

segundo aislamiento PNM89.3 *Streptomyces* sp se cultivó en TSB, se fraccionó con un cartucho C18, y el fraccionamiento bioguiado permitió aislar un lipopéptido. No se continuó con el estudio químico de este compuesto porque se recupera en muy baja cantidad y su actividad no es muy fuerte.

Los 138 aislamientos que no pertenecen al Phylum Actinobacteria se ensayaron *in vivo* frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. De estos se identificaron 8 como activas en la actividad inhibitoria de QS, 37 como inactivas, 40 como bactericidas y 53 como de rápido crecimiento. Las bacterias activas fueron identificadas mediante técnicas moleculares y caracterizadas bioquímicamente correspondiendo a miembros de los siguientes géneros: *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* y *Proteus*. Dentro de ellas una no pudo ser caracterizada molecularmente pues no se logró el amplímero de su gen 16S rRNA. Las bacterias activas se cultivaron en medio TSB, encontrando que 7 extractos orgánicos fueron activos y uno presentaba la actividad en la fase acuosa. Entre las bacterias activas se descartaron 4 por ser potencialmente patógenas, quedando los aislamientos PNM115 *Paenibacillus* sp., PNM123 *Paenibacillus* sp. PNM10 *Lysinibacillus* sp. y PNM 216 como potencialmente usables como biocontroladores.

Entre estas 4 bacterias se seleccionó para estudio químico la que presentaba mejor actividad biológica frente al biosensor, que corresponde a PNM115 (*Paenibacillus* sp). Es importante mencionar que las cepas de este género se caracterizan por su buen potencial como biocontroladores, lo que también se tomó en consideración para su selección. Para el estudio químico PNM115. se cultivó en 15 litros de medio TSB, el fraccionamiento líquido-líquido y los ensayos de actividad biológica contra *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 permitieron determinar que la fase activa es la butanólica. A ésta se le fraccionó usando un cartucho C18 y se obtuvo un péptido en bajas concentraciones. Posteriormente se ensayaron otros medios de cultivo (LB, nutritivo, ISP2, medio marino), lográndose establecer que el medio LB también rinde extractos activos. El cultivo de la bacteria en este medio de cultivo, su extracción con resina HP-20, y posterior fraccionamiento sobre RP-18 permitió obtener de nuevo el péptido con un alto rendimiento (500 mg). El análisis espectroscópico por RMN permitió establecer que presenta un equilibrio conformacional complejo que hace difícil la interpretación de los datos. Un estudio detallado de los espectros mono y bi dimensionales llevaron a caracterizarlo como un péptido análogo de las polipeptinas con unidades Val-Ser, Asn-Phe, ácido léucico, leucina, isoleucina, dos unidades de cisteína y una de ácido 3-hidroxi-4-metilhexanoico, y

una masa de 1119.7135 (3.1). En los ensayos de IQS frente a *C. violaceum* se determinó que éste era activo a una concentración de 22.32 μM (25 $\mu\text{g/mL}$). Mientras que en el ensayo de *swimming* frente a *B. glumae* CIAT 4026 fue activo cuando se añadió 0.11 nmoles (0.125 μg) del compuesto.

Con el interés de ampliar el espacio químico de los compuestos recuperados de microorganismos, se buscó determinar si los compuestos volátiles (COVs) producidos por ellos presentaban actividad inhibitoria del *quorum sensing*. Para esto las 16 cepas (8 Actinobacterias, 6 Firmicutes, 1 Proteobacteria y 1 no identificada) que mostraron actividad en ensayos *in vivo* fueron ensayadas en cuanto a sus volátiles. Para esto se desarrolló un bioensayo en el que se utilizó el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 capaz de producir violaceína (pigmento violáceo) por *quorum sensing*. Para asegurar que solamente los compuestos volátiles sean los responsables de la inhibición se desarrolló un ensayo en cajas pretri divididas en tres compartimentos. En uno de ellos se crece la bacteria promisoría y en el otro el biosensor, manteniendo contacto entre sí únicamente a través de su espacio de cabeza o *HeadSpace* (HS). El ensayo se considera positivo si se observa disminución en la producción de violaceína. Se encontró que sólo una de las cepas probadas mostraba dicha actividad, la cepa PNM216 que aún no ha sido posible identificarla molecularmente pese a haber ensayado diferentes condiciones de amplificación, lo que implica que su arquitectura genómica ha sufrido variaciones lo que dificulta (y en ocasiones impiden) la amplificación de genes como el 16S por técnicas moleculares convencionales. Esta bacteria se cultivó en 5 medios diferentes y se pudo establecer que tan solo en LB y TSB se producían COVs activos. El estudio del espacio de cabeza de esta cepa, cultivada en LB, y hecho por SPME y CG-EM permitió la identificación de 29 compuestos (4.1 a 4.29) diferentes a los producidos por el medio de cultivo. De éstos, 13 de los compuestos identificados se ensayaron puros tanto en fase de vapor como en líquido. Así se logró establecer que cuatro compuestos: *p*-cimeno (4.1) actúa a una concentración de 2.7 μM , el cumeno (4.2) a 3.03 μM , 5-metil-2-hexanona (4.3) a una concentración de 4,51 μM , 2-nonanona (4.4) a 1.22 μM inhiben la producción de la violaceína en el biosensor, cuando se realizaron en fase de vapor. Se realizaron además ensayos de curva de crecimiento en el que se encontró que tres parecían actuar como bacteriostáticos y corresponden a *p*-cimeno (4.1), cumeno (4.2), 2-nonanona (4.4) mientras que uno no inhibe el crecimiento, y corresponden al compuesto 5-metil-2-hexanona (4.3), por lo tanto es QQ. Adicionalmente, se evaluaron como QQ otros compuestos volátiles,

relacionados químicamente con los volátiles identificados en el espacio de cabeza de la bacteria, (doce compuestos) entre estos fueron activos inhibiendo la producción de violaceína el acetato de isoamilo (4.30) a una concentración de 2.84 μM y el alcohol isoamílico (4.31) a 0.97 μM . Al realizar las curvas de crecimiento solo el acetato de isoamilo (4.30) y 5-metil-2-hexanona (4.3) crecieron sin afectar al biosensor.

Queriendo ampliar el espacio químico de los compuestos activos, pero esta vez mediante la exploración de otras fuentes de compuestos, se evaluó la actividad QQ de los extractos de cinco esponjas del orden Haplosclerida, recolectadas en el Caribe colombiano. Se seleccionó este orden por ser reconocido como uno de que tiene más reportes con actividad biológica. Se recolectaron las esponjas *Haliclona (Halichoclona) magnifica*, *Haliclona implexiformis*, *Haliclona vermeuleni*, y *Amphimedon viridis*, y sus extractos orgánicos se ensayaron frente a *C. violaceum*. Entre ellas la única que resultó activa frente a *C. violaceum* fue *Amphimedon viridis*, el extracto orgánico (DCM/MeOH) fue sometido a partición líquido/líquido con $\text{H}_2\text{O}/\text{DCM}$ (1:1), para obtener las fracciones de diclorometano (FD) y acuosa (FA). La fracción acuosa se extrajo con BuOH obteniéndose una fracción butanólica (WB) y una fracción acuosa residual (WW). De la fracción butanólica, que resultó ser activa, se aisló el complejo halitoxina (5.1). Este compuesto se caracterizó por RMN y EM. De la fracción WW, también activa, se aisló la taurina (5.2) caracterizada por RMN. Los dos compuestos 5.1 y 5.2 se ensayaron contra *C. violaceum* resultando activos a 0.49 mM (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 3.99 mM (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectivamente. En el ensayo de *swimming* frente a *B. glumae*, la halitoxina (5.1) fue activa cuando se le trata con 3.67 nmoles (0.75 μg) del compuesto mientras la taurina (5.2) es activa cuando se le añade 39,9 nmoles (5 μg) del compuesto.

Finalmente, basados en antecedentes de literatura que sugieren que plantas del género *Passiflora* podrían producir compuestos activos como QQ, se estudiaron 7 especies del subgénero *Tacosnia* y una del subgénero *Passiflora*. Se realizó el perfilado metabolómico, por RMN ^1H , de siete especies de curubas, lográndose detectar 53 (6.1-6.53) compuestos de diferente naturaleza química como amino ácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, y flavonoides C-glicosidados. Entre estos últimos se cuentan dos flavonoides que no han sido descritos anteriormente: Apigenina-4-O- β -glucopiranosil-8-C- β -neohesperidosido (6.1) y Apigenina-4'-O- β -glucopiranosil-8-C- β -(6''acetil)-glucopiranosido (6.2), junto con 26

flavonoides tanto O- como C- glicosidados (6.3 – 6.28). Las estructuras se propusieron mediante análisis por RMN y EM.

Los *score plots* del PCA obtenidos para los datos de RMN ^1H permitieron confirmar que *P. lehmannii* (subgénero *Passiflora*) que es un *outlayer* del grupo, e identificar a *P. cumbalensis* y *P. uribei* como las especies con las mayores diferencias de perfil químico de las muestras estudiadas de *Tacsonia*. Los ensayos de actividad QQ frente a *C. violaceum* muestran que los extractos de las especies *P. lehmannii*, *P. uribei* y *P. cumbalensis* son los más activos, mientras los de las especies *P. tripartita* var *mollissima* y *P. tarminiana* son menos activos. Adicionalmente, los datos de RMN- ^1H para los extractos fueron correlacionados con su actividad QQ mediante un análisis supervisado OPLS-DA, identificando que los compuestos responsables de la actividad observada son los flavonoides (6.1) y (6.2). Estos dos compuestos (6.1 y 6.2), junto con la Crisina 8-C-glucopiranósido (6.27) y Crisina 6-C-glucopiranósido (6.33) fueron purificados por CC y ensayados frente al biosensor. En los ensayos frente a *C. violaceum* se determinó que estos eran activos a una concentración de 0.135 mM (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para el compuesto (6.1) y de 0.472 mM (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para el compuesto 6.2, pero no fueron activos los compuestos (6.33) y (6.27). En el ensayo de movilidad *swimming* frente a *B. glumae*, sólo el compuesto (6.1) demostró actividad cuando se añadieron 2.02 nmoles (1.5 μg) del compuesto, los otros no controlaron este fenotipo. Adicionalmente se realizó otro ensayo para determinar si los compuestos eran capaces de inhibir la toxoflavina, en este se tomó como control positivo el compuesto 2-n-propil-9-hidroxi-4H-pirid[1,2-a]-pirimidin-4-ona, que fue sintetizado en el laboratorio, según la patente N°US 8,507,674 B2 Aug. 13, 2013⁸³. Es interesante destacar que este es activo a una concentración de 80 μM (16.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lo que nos ayuda a comparar la eficacia de los compuestos aislados, debido a que éstos actúan en menor cantidad que el compuesto patentado, 6,76 ($5\mu\text{g}/\text{mL}$) μM para el compuesto 6.1 y 7,87 μM ($5\mu\text{g}/\text{mL}$) para el compuesto 6.2

Para evaluar la efectividad *in vivo* de los compuestos, se usó un modelo con catafilos de cebolla infectados con el fitopatógeno del arroz a *Burkholderia glumae* CIAT 4026. Este modelo permite además predecir los resultados a obtener con semillas de arroz. En este ensayo se determinó que el compuesto 3.1, aislado de *Paenibacillus*, fue activo cuando se añadió 2.68 nmoles (3 μg) del compuesto, la halitoxina (5.1) es activa cuando se añadieron 14.7 nmoles (3 μg) y la taurina (5.2) no demostró tener actividad en este ensayo. A la máxima concentración probada que fue de 23,9 nmoles (3 μg). Los compuestos aislados

de las especies de *Passiflora* son activos cuando se añaden 1.21 nmol (0.9 µg) del compuesto 6.1 y 1.41 nmoles (0.9 µg) del compuesto 6.2.

En conclusión, del *screening* realizado a diferentes muestras obtenidas de fuentes naturales, se identificaron 5 compuestos como posibles inhibidores de QS frente a dos biosensores. Los compuestos que han demostrado ser los que muestran mejores características como QQ son el péptido 3.1 aislado de *Paenibacillus* sp, especialmente en los ensayos frente a *C. violaceum*, y los flavonoides 6.1 y 6.2 aislados de *Passiflora*, que parecen ser los más activos como QQ por los resultados obtenidos frente a *B. glumae*. Se recomienda realizar ensayos adicionales con la finalidad de buscar una posible aplicación en el campo agrícola, porque el compuesto 1 se recupera en cantidad grandes al igual que con pasiflora que son de fácil acceso.

Palabras clave: Productos naturales, *quorum quenchers*, *Passiflora*, Haliclona, actinobacterias, *Burkholderia*

Abstract

Quorum sensing (QS) is a bacterial cell-cell communication process, which allow s the regulation of gene expression in response to fluctuations in cell-population density. It is recognized that the quorum sensing inhibition can lead to prevent bacteria expression of virulence factors, essential for pathogen colonization or disease development along their interaction with the host. Therefore, the aim of this study was to contribute to control bacterial phytopathogens through the exploration of natural products as quorum sensing inhibitors. The role of quorum quenchers (QQ) to control bacterial phytopathogens has been poorly, it has become necessary to search for compounds with quorum quenching activity. In this study, screening of QS inhibitors were performed over several natural sources such as bacteria, sponges and plants. This guaranteed a wide exploration of the chemical space, including compounds of low and high polarity, volatiles and non-volatiles

Most reports for of compounds with QQ activity on phytopathogens show that they are mainly enzymes, such as reductases, oxidases, lactonases, amidases or acylases. There are only a few examples concerning to organic compounds such as halogenated furanones¹. Nevertheless, some bioactive extracts have been identified without posterior identification of single bioactive compounds. On the other hand, medical literature has contributed with QSI compounds but those have not been tested against phytopathogens.

In this thesis, the isolation of natural products was conducted by using bioassay guided fractionation, with the bacterial strain *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, which regulates violacein production by AHL-QS. Pure compounds identified as QQ with this sensor were also tested as QSI against *Burkholderia glumae* CIAT 4026. This latter strain is a well known rice-phytopathogen, isolated from rice crops in Colombia able to cause bacterial panicle blight, which generates considerable economical losses every year. Remarkably, some virulence phenotypes in *B. glumae* are controlled by QS, including the toxoflavine and lipase production and swimming-type motility.

In order to explore the metabolic potential of marine bacteria from the Colombian Caribbean Sea, samples were collected from invertebrates, algae, fishes and marine sediments. Bacteria associated to these samples were isolated by successive dilutions and 203

isolates were obtained. Further identification of morphologic features, microscopic observation and Gram staining allowed to register 162 bacterial isolates 41 as fungal isolates.

A first approach to study the QSI and antibacterial activity was based on the selection of bacteria belonging to the Phylum *Actinobacteria*. This Phylum constitutes a promising field of study because is recognized as a prolific source of bioactive compounds. In this way, 8 out of the 24 strains identified as Actinobacteria showed QSI activity, according to in vivo tests using *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. All strains were grown in TSB and further extracted with ethyl acetate to obtain organic extracts. Then, all 24 extracts were analyzed employing HPLC-MS to assess their metabolic diversity. With these data, a metabolomic study was conducted to correlate variables from the system with those data from the biological activity assays. From these experiments, compounds, such as Streptomycin D were preliminary identified. On the other side, all 24 actinobacterial isolates were submitted to a phylogenetic analysis by 16S rRNA gene amplification to obtain the taxonomic characterization. As a result, bacteria from *Streptomyces*, *Micromonospora* and *Gordonia* genera were identified. Active strains were identified to belong to the *Streptomyces* and *Micromonospora* genera. Finally, several criteria were assessed to select isolates for further studies (bioactivity, LCMS profile, taxonomic information).

Among all isolated strains, *Micromonospora* sp.PNM 102N, y *Streptomyces* sp. PNM89.3 exhibited bioactivity and they were selected to continue further chemical studies. Strain 102N was grown in TSB culture medium (20 L) and partitioned with Ethyl acetate. The evaluation of biological activity indicated that the organic extract was bioactive and then, it was submitted to repetitive fractionation employing CC. An NMR analysis showed that the bioactive compounds from this strain correspond to lipids, at very low quantities. The second strain, PNM89.3 was grown in TSB culture media and its extract was fractionated through a C18 cartridge. A lipopeptide was identified through the bioguided fractionation but the low quantity obtained with a mild bioactivity discouraged us to continue its study.

Those remaining 138 strains belonging to other phyla other than *Actinobacteria*, were tested in vivo against *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. From these, 8 exhibited bioactivity, 37 were not active, 40 exhibited bactericide effect and 53 showed fast growing. Bacterial isolates exhibiting QSI were identified by using molecular techniques

and biochemical tests. Based on those experiments, most isolates were classified as *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus* y *Proteus*. One of them could not be characterized because the amplification of its 16S rRNA gene was not achieved. The bioactive bacteria were grown in TSB culture media and the biological activity evaluation resulted in seven organic and one aqueous bioactive extracts. Between the bioactive bacteria, four were not considered to study because they are potentially pathogenic. Finally, strains PNM115 *Paenibacillus* sp., PNM123 *Paenibacillus* sp. PNM10 *Lysinibacillus* sp. and PNM 216 were identified as promising biocontrol agents.

The strain PNM115 (*Paenibacillus* sp.) was selected to chemical study because it exhibited the best result against the biosensor. In addition, this strain also was considered after observing that strains from this genus are recognized by their potential as biocontrollers. PNM115 was grown in TSB culture media (15 Liters), its extract was partitioned and the obtained fractions were tested against *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. The butanolic phase showed bioactivity and then it was fractionated through a C18 cartridge to obtain a peptide at low quantities. Afterwards, several culture media were employed (LB, ISP2, marine medium, nutritive) to establish that the LB culture media yields active extracts. The bacteria were grown with this culture media to obtain an extract with HP-20 resin and further RP-18 fractionation. This procedure allowed obtaining a new peptide with remarkable yield (500 mg). The NMR spectroscopic analysis indicated that the peptide exhibits a conformational equilibrium and its analysis is challenging. However, an exhaustive 1D and 2D NMR analysis allowed proposing the structure of the compound as a polipeptide type peptide. Residues of Val-Ser, Asn-Phe, leucic acid, leucine, isoleucine, two cysteins and one 3-hydroxy-4-methylhexanoic acid were identified. IQS evaluation against *C. violaceum* of this compound showed it was active at a 22.32 μM (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) concentration whereas the swimming assay against *B. glumae* CIAT 4026 indicated bioactivity when 0.11 nmol (0.125 μg) were added.

The QSI activity of the volatile compounds (VOCs) produced by microorganisms was tested with the aim to expand the chemical space of the studied compounds. The VOCs from 16 strains (8 Actinobacteria, 6 firmicutes, 1 proteobacteria and 1 non-identified) identified as bioactive in the in vitro assays were tested. For this purpose, a bioassay with *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 was developed. To guarantee that the observed inhibition was related with volatile compounds, the assay was developed on Petri dishes divided in three parts. In one of these parts, both the promising bacteria and the biosensor

are grown while they are in contact only through the Headspace (HS). The bioassay is considered positive if a decrease in the violacein production is observed. It was found that only one strain was active, PNM216, whose molecular identification has not been achieved. It is proposed that the genomic architecture of the strain has suffered variations and they affect the amplification of genes such as 16S by conventional molecular techniques. The bacteria were grown in 5 different culture media and the production of VOCs was observed only when LB and TSB cultures were employed. When the bacteria were grown in LB culture, a total of 29 compounds (4.1 to 4.29) were identified at the headspace. The identification was achieved by SPME followed by GCMS, and all the compounds were different to those produced by the culture media. Twelve of those compounds were tested in both liquid and vapor phases to conclude that four of them, *p*-cymene (4.1), cumene (4.2), 5-methyl-2-hexanone (4.3) and 2-nonanone (4.4), inhibit the production of violacein in vapor phase. Bacterial growth curves were constructed to evidence that compounds 4.1, 4.2 and 4.4 act as bacteriostatic whereas compound 4.3 behaves as a QQ. Furthermore, twelve structurally related VOCs to those identified in the headspace of PNM216 were tested. As a result, isoamyl acetate (4.30) isoamyl alcohol (4.31) showed activity. The bacterial growth curves it was found that 4.31 inhibits the growth whereas 4.30 acts as QQ. The remaining compounds affected the biosensor in different ways and they will be tested at lower concentrations to determine their activity.

With the aim to study different sources of compounds with bioactivity, the QQ activity of extracts from 5 sponges (Order Haplosclerida), collected at the Colombian Caribbean Sea, was tested. The selection was based on numerous reports of biological activity of isolated compounds from organisms of this order. The sponges *Haliclona (Halichocona) magnifica*, *Haliclona implexiformis*, *Haliclona vermeuleni*, and *Amphimedon viridis* were collected and their organic extracts were tested against *C. violaceum*. The organic extract (DCM/MeOH) obtained from *Amphimedon viridis* was the only active between the evaluated group and it was partitioned with H₂O/DCM (1:1). The aqueous fraction was extracted with n-BuOH to obtain a butanolic (WB) and an aqueous fraction (WW). The activity was found in the butanolic fraction and the compound Halitoxin (5.1) could be isolated. The aqueous fraction also resulted active and yielded taurine (5.2) as the active compound. The structure of compounds 5.1 and 5.2 was determined by NMR and MS. Both compounds were tested against *C. violaceum*, exhibiting activity at 0.49 mM (100 µg/mL) 3.99 mM (500 µg/mL), respectively. Swimming assay against *B. glumae* afforded a positive result when the

bacteria is treated with 3.67 nmol (0.75 μg) of compound 5.1 whereas compound 5.2 is active when 39.9 nmol (5 μg) are added.

Some reports suggest that plants from *Passiflora* genus produce active QQ compounds and this encouraged us to study seven species of *Tacsonia* and one of *Passiflora* subgenus. First, the metabolic profiling by ^1H NMR of seven species of banana passion fruit was conducted. This analysis allowed us detecting 53 compounds (6.1- 6.53) such as aminoacids, organic acids, carbohydrates, and C-glycosidated flavonoids. Apigenine-4-O- β -glucopiranosyl-8-C- β -neohesperidosyde (6.1) and Apigenine-4'-O- β -glucopiranosyl-8-C- β -(6''acetil)-glucopiranosyde (6.2) are reproted for the first time together with 26 O- and C-glicosidated flavonoids (6.3 – 6.28). All the structutres were proposed based on NMR and MS experiments. PCA score plots obtained to the ^1H NMR data allowed confirming that *P. lehmanii* (*Passiflora* subgenus) is an outlayer of the group. On the other side, *P. cumbalensis* and *P. uribei* showed the major differences in chemical profile between the samples from *Tacsonia*. QQ Bioactivity assays against *C. violaceum* showed that the extracts from especies *P. lehmannii*, *P. uribei* y *P. cumbalensis* were the most active whereas *P. tripartita* var *mollisima* and *P. tarminiana* afforded the less active ones. Furthermore, the ^1H NMR data were correlated with their QQ activity through a OPLS-DA supervised analysis Compounds 6.1 and 6.2 were identified as the responsible for the observed bioactivity and together with cirisine 8-C-glucopiranoside (6.27) and crisine 6-C glucopiranoside (6.33), all were purified by CC and posteriorly assayed against the biosensor. Compound 6.1 and 6.2 showed activity at 0.135 mM (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 0.472 mM (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), respectively. Compounds 6.33 and 6.27 did not show activity. Swimming motiltiy assay against *B. glumae* showed that only compound 6.1 was active when 2.02 nmol (1.5 μg) were added. In addition, another assay was performed to determine if the compounds could inhibit the production of toxofalvine. As positive control, the 2-n-propil-9-hydroxy-4H-pirid[1,2-a]-pirimidin-4-one was synthesized according to the patent N°US 8,507,674 B2 Aug. 13, 2013. Interestingly, this compound active at a concentration of 80 μM (16.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and the result can be employed to compare the efficacy of the isolated compounds. In general, less quantities are needed compare with the patented compound, with values of 6.76 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) μM for compound 6.1 and 7.87 μM (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for compound 6.2.

To evaluate the in vivo effect of the isolated compounds, we developed a method for virulence tests of *B. glumae* by using onion bulb scales instead of rice panizcles. For this

we used *Burkholderia glumae* CIAT 4026. This model allows predicting the results to obtain with rice seeds. Compound 3.1, isolated from *Paenibacillus*, was active when 2.68 nmol (3 µg) of the compound were added, halitoxine (5.1) was active when 4.7 nmol (3 µg) were added, and taurine (5.2) did not show activity.

To sum, the screening performed to different samples obtained from diverse natural sources allowed us identifying 5 compounds as QS inhibitors against two biosensors. The most promising compounds as QQ are the peptide 3.1 isolated from *Paenibacillus* sp, especially active against *C. violaceum* and the flavonoids 6.1 and 6.2 isolated from *Passiflora*, which are the most active as QQ based on the results obtained against *B. glumae*. It is recommended to perform further assays with the aim to establish a potential application in the agricultural field

Keywords: natural products, quorum quencher, *Passiflora*, Haliclona, actynobacteria, *Burkholderia*

Contenido

Pág.

Tabla de contenido

1. Capítulo 1: Marco Teórico	3
1.1 Quorum Sensing	3
1.1.1 Moléculas autoinducidas Als	5
1.1.2 Biosensores.....	9
1.1.3 Sistemas de QS relevantes en bacterias fitopatógenas	11
1.1.4 <i>Burkholderia glumae</i> , el añublo bacterial de la panícula del arroz.....	14
1.2 Inhibidores de quorum sensing.....	17
1.2.1 Mecanismos de acción de inhibidores de quorum sensing	17
1.2.2 Relevancia del estudio de quorum sensing y sus antagonistas.....	24
1.2.3 Fuentes de compuestos quorum quenchers	29
1.3 Uso de quorum quenchers frente a microorganismos fitopatógenos	39
1.4 Conclusiones.....	41
1.5 Bibliografía	42
2. Capítulo 2: Actinobacterias marinas como fuente de compuestos para el control de fitopatógenos: un enfoque integrador basado en el perfil metabólico / bioactividad y taxonomía	53
Resumen	54
2.1 Introducción.....	54
2.2 Resultados y Discusión	56
2.2.1 Aislamiento y caracterización de las bacterias marinas	56
2.2.2 Ensayos de actividad biológica	65
2.2.3 Análisis de perfil metabólico.....	68
2.2.4 Priorización de los aislamientos para estudios químicos adicionales usando una aproximación integrativa.....	76
2.2.5 Estudios químicos preliminares de las cepas de actinobacterias preseleccionadas.	79
2.3 Conclusiones y recomendaciones	81
2.4 Materiales y Métodos	83
2.4.1 Aislamiento de cepas bacterianas	83
2.4.2 Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas.....	85
2.4.3 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)	86
2.4.4 Identificación taxonómica y números de acceso	86
2.4.5 Bioensayos <i>in vivo</i>	87
a) Ensayo de inhibición del quorum sensing de cepas de actinobacteria.....	87
b) Ensayos antibacterianos <i>in vivo</i> frente a cepas patógenas de <i>Burkholderia</i> (Estos ensayos fueron llevados a cabo por Luz Adriana Betancur)	87

2.4.6	Bioensayo con extractos orgánicos.....	88
a)	Actividad de inhibición <i>quorum</i> de los extractos.....	88
b)	Actividad antibacteriana contra <i>Burkholderia</i> de los extractos (Estos ensayos fueron llevados a cabo por Luz Adriana Betancur)	89
2.4.7	Análisis de perfiles metabólicos de las cepas de actinobacteria	89
a)	Preparación de la muestra y análisis HPLC-MS.....	89
b)	Análisis de los datos	90
2.4.8	Estudio químico de la cepa <i>Micromonospora</i> sp.....	91
2.5	Bibliografía	91
3.	Capítulo 3: Estudio químico de la cepa <i>Paenibacillus</i> sp. (PNM115) de procedencia marina.....	99
3.1	Introducción.....	100
3.2	Resultados y Discusión	102
3.2.1	Aislamiento y caracterización de los aislamientos de origen marino	102
3.2.2	Selección de la cepa para el estudio químico	109
3.2.3	Estudio químico de la cepa <i>Paenibacillus</i> sp. (PNM115).	110
3.2.4	Ensayos de inhibición del <i>quorum sensing</i> con el compuesto 3.1.....	127
3.3	Conclusiones y Recomendaciones.....	130
3.4	Materiales y Métodos	132
3.4.1	Generalidades	132
3.4.2	Aislamiento de cepas bacterianas	133
3.4.3	Caracterización Bioquímica e identificación taxonómica de las cepas bacterianas de origen marino	133
3.4.4	Cultivos, obtención de extractos de bacterias marinas y selección de aislamiento.....	134
3.4.5	Estudio químico del aislamiento <i>Paenibacillus</i> sp PNM115	135
3.4.6	Ensayo de inhibición del <i>quorum sensing</i>	137
3.5	Bibliografía	139
4.	Capítulo 4: Compuestos volátiles de microorganismos marinos como inhibidores de Quorum sensing.....	145
4.1	Introducción.....	147
4.2	Resultados y Discusión	149
4.2.1	Selección de bacterias y medios de cultivo.....	149
4.2.2	Estudio del espacio de cabeza de PNM216.....	153
4.2.3	Ensayos con compuestos puros en fase de vapor	157
4.2.4	Ensayos de actividad biológica en solución	160
4.2.1	Estudio del Espacio de cabeza por SPME	162
4.2.2	Ensayos frente al fitopatógeno <i>Burkholderia glumae</i> CIAT 4026	162
4.3	Conclusiones.....	165
4.4	Materiales y métodos	166
4.4.1	Medios de cultivo	167
4.3.2	<i>Screening</i> preliminar	168
4.4.2	Análisis Cromatográfico	169
4.4.3	Ensayos de inhibición del quorum sensing de los compuestos volátiles	170
4.5	Bibliografía	172
5.	Capítulo 5: Compuestos inhibidores del <i>quorum sensing</i> de la esponja del Caribe <i>Amphimedon viridis</i>.....	175
5.1	Introducción.....	177

5.2	Resultados y discusión.....	178
5.2.1	<i>Screening</i> de esponjas del orden Haplosclerida	178
5.2.2	Estudio químico de <i>Amphimedon viridis</i>	180
5.2.3	Ensayos de actividad inhibitoria de QS.....	185
5.3	Conclusiones.....	190
5.4	Materiales y métodos	192
5.4.1	Procedimientos Experimentales Generales	192
5.4.2	Material animal	193
5.4.3	<i>Screening</i> de actividad inhibitoria de <i>quorum sensing</i> de las cinco esponjas seleccionadas	193
5.4.4	Estudio químico de <i>Amphimedon viridis</i>	194
5.5.5	Ensayos biológicos	195
5.5	Agradecimientos	198
5.6	Bibliografía	198
6.	Capítulo 6: Estudio metabolómico (<i>fingerprinting</i>) de hojas de curubas (<i>Passiflora</i>, subgénero <i>Tacsonia</i>) y su correlación con la actividad inhibitoria de <i>quorum sensing</i>	201
6.1	Introducción.....	203
6.2	Resultados y discusión.....	206
6.2.1	<i>Fingerprint</i> de especies de <i>Tacsonia</i>	207
6.2.2	Análisis multivariado subgénero <i>Tacsonia</i>	231
6.2.3	Bioprospección de especies de <i>Tacsonia</i> como fuente de <i>quorum quenchers</i>	232
6.2.4	Ensayos de actividad inhibitoria de QS	236
6.3	Conclusión	243
6.4	Materiales y Métodos	245
6.4.1	Material vegetal	245
6.4.2	Reactivos químicos.....	245
6.4.3	Análisis de RMN	246
6.4.4	Análisis de HPLC-MS	247
6.4.5	Aislamiento de flavonoides	248
6.4.6	Ensayos de actividad biológica	249
6.5	Bibliografía	251
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	257
8.	PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	263
8.1	Publicaciones	263
8.2	Congresos.....	263
8.2.1	Presentaciones orales	263
8.2.2	Presentaciones en poster o coautoría.....	263
9.	ANEXOS.....	265
9.1	Anexos capítulo 2:.....	268
9.2	Anexos del capítulo 3:	276
9.3	Anexos del capítulo 4	277
9.4	Anexos del capítulo 5	278
9.5	Anexos del capítulo 6:	279

Lista de figuras

Pág.

Figura 1.1 Esquema del Sistema de <i>quorum sensing</i> LuxI/LuxR en <i>V. fischeri</i> Moléculas autoinductoras <i>N</i> -3-oxohexanoil homoserin lactona (OHHL) Tomado de Galloway et al ¹³⁵	
Figura 1.2 Estructura de los principales tipos de moléculas autoinductoras de <i>quorum sensing</i> . Tomado de Zhu 2013 ¹⁵	6
Figura 1.3 Mecanismos propuestos para la inhibición del <i>quorum sensing</i> . Tomado de Hirakawa ⁸⁰	18
Figura 1.4 Sustancias homólogas a SAM e inhibidoras del QS. Tomado de Rasmussen 2006 ⁸⁵	19
Figura 1.5 Sustancias homólogas a SAM e inhibidoras del QS. Tomado de: Rasmussen, et al. 2005 ⁸⁴	20
Figura 1.6 Moléculas inhibidoras del QS aisladas del rábano picante y el ajo. Fuente: Jakobsen TH, et al; 2012 ^{84,89}	21
Figura 1.7 Documentos relacionados con la inhibición del <i>quorum sensing</i> por año. Fuente: SCOPUS ELSEVIER 2017	25
Figura 1.8 Documentos por año relacionados con la inhibición del <i>quorum sensing</i> . FUENTE: SCOPUS ELSEVIER 2017	26
Figura 1.9 Moléculas con probable actividad inhibitoria de QS aisladas a partir de plantas. Tomado de Keshavan ¹³¹ ; Khan ¹³⁴ ; Choo ¹³²	33
Figura 1.10 Compuestos con actividad QQ obtenidos a partir de organismos marinos. Tomado de: Vanegas, J.F. 2011; Skindersoe, M.E., 2008; Liu, H.B., 2008 ^{86,140,141}	35
Figura 1.11 Compuestos con actividad QQ obtenidos a partir de microorganismo marinos. Tomado de: Clark, 2009; Martínez-Matamoros, 2016; Dobrestov, 2010 ^{152,153,155}	38
Figura 2.1 Comparación de la reconstrucción filogenética basada en el análisis de 16S rRNA de los aislamientos de actinobacteriales con perfiles de agrupación de MALDI-TOF. Árbol filogenético en base de genes 16S rRNA de los aislados de actinobacterias y sus vecinos más cercanos (cultivables y no cultivables) (lado izquierdo). El cálculo de <i>Bootstrap</i> se realizó (1000 repeticiones) y se muestra para las ramas principales en el árbol. Se calculó un dendrograma basado en los perfiles MALDI-TOF de cada aislamiento (lado derecho) para comparar los resultados obtenidos por estas dos metodologías de clasificación.	61
Figura 2.2 Pruebas de actividad antimicrobiana y de inhibición de <i>quorum</i> para las 24 cepas de Actinobacteria. (A1) Foto de los fitopatógenos <i>Burkholderia</i> spp. sin confrontación (Bg: <i>Burkholderia glumae</i> , Bgl: <i>Burkholderia gladioli</i> , Bpl: <i>Burkholderia plantarii</i>). (A2) Imagen de la confrontación de los fitopatógenos de <i>Burkholderia</i> spp. contra la cepa número 9. (B1) Imagen de <i>Chromobacterium violaceum</i> . (B2) Imagen de la prueba de inhibición del <i>quorum</i> contra la cepa número 46b. (C) Mapa de bioactividad de las 24 cepas y sus extractos orgánicos. Los resultados para las actividades antibacterianas e inhibitoria de QS se resumen en la Fig. 2C. El eje horizontal muestra los códigos de las 24 Actinobacterias y el eje vertical muestra cada uno de los patógenos probados tanto en la confrontación directa como en la prueba con el extracto. El color	

indica el control total o parcial de cada fitopatógeno, que se asume como un resultado positivo.....	67
Figura 2.3 Análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) basado en perfiles metabólicos de HPLC-MS de los extractos orgánicos de 24 cepas de actinobacterianas. TSB representa el medio de cultivo. Los números arábigos representan códigos de las cepas. Los números romanos representan grupos según su similitud de perfil metabólico. En violeta están resaltadas las cepas activas.	69
Figura 2.4 <i>Barcoding versus</i> árbol filogenético. <i>Barcoding</i> basado en variables (tiempo de retención y <i>m/z</i>) que muestran perfiles metabólicos distintos entre las 24 Actinobacterias. En el eje horizontal se muestran las variables expresadas como valores <i>m/z</i> > 200 de los 24 extractos. Cada variable representa un solo compuesto y su presencia está representada por cuadrados negros. El eje vertical muestra cada una de las cepas de Actinobacteria según el árbol filogenético.....	72
Figura 2.5 <i>Score Scatter Plot</i> del OPLS-DA usando Y como IQS para los siete extractos orgánicos de las cepas PNM9, PNM46b, PNM87, PNM89.4, PNM102N, PNM184, PNM194. En color negro los extractos activos y en color gris los no activos	73
Figura 2.6 OPLS-DA actividad de inhibición de <i>quorum</i> . Resumen de ajuste ($R^2Y = 1$, $Q^2 = 0,998$). Loading Scatter Plot (VIPs, color gris). Las cepas PNM9, PNM46b, PNM87, PNM89.4, PNM102N, PNM184, y PNM194. En este caso, la escalado de datos se realizó por escalado de varianza unitaria (UV-).....	73
Figura 3.1 Fotografía del enfrentamiento <i>in vivo</i> de <i>Chromobacterium violaceum</i> contra A) cepa PNM123, se observa inhibición del QS. B) cepa PNM142 no se observa inhibición del QS. C) cepa PNM24, se observa inhibición del crecimiento del biosensor. D) Se observa que la cepa PNM106 crece mucho más rápido que el biosensor e invade la caja. E) Control de crecimiento de <i>Chromobacterium violaceum</i> si presencia de otra bacteria.	104
Figura 3.2 Árbol filogenético elaborado a partir de la secuenciación 16S rRN A de los ocho aislamientos bacterianos de origen marino que inhibieron <i>in vivo</i> el QS de <i>C. violaceum</i>	107
Figura 3.3 Ensayos de inhibición de QS con el sobrenadante del aislamiento PNM115 <i>Paenibacillus</i> sp. frente al biosensor <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC31532 en diferentes medios, con tres repeticiones de cada uno, y que se ensayan en la misma caja por triplicado (nueve perforaciones). A) Medio marino, no se observa actividad; B) medio TSA, se observa actividad; C) medio nutritivo, la actividad es mínima; D) medio LB es activo; y E) medio ISP2, se observa una menor actividad.	111
Figura 3.4 Espectro de RMN 1H 400 MHz (MeOD- d_4) de la fracción TSB-FBII.8 (11mg) obtenida de <i>Paenibacillus</i> sp cultivado en TSB.	112
Figura 3.5. Espectro de RMN 1H (400 MHz en Metanol d_4) del compuesto activo 3.1. aislado de <i>Paenibacillus</i> sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB. Se observan señales para un compuesto tipo péptido, pero éstas son anchas y poco definidas.	115
Figura 3.6 Espectro de RMN 1H (600 MHz) en metanol d_4 , del compuesto activo 3.1. aislado de <i>Paenibacillus</i> sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB. Se observan señales anchas y poco definidas.	116

- Figura 3.7** Espectro de masas registrado en modo (+) ESIMS del compuesto 3.1 aislado de *Paenibacillus* sp. (PNM115) 117
- Figura 3.8** Espectro de RMN ¹³C (100 MHz en Metanol *d*₄) del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB. 119
- Figura 3.9** Espectro de COSY (400 MHz en Metanol *d*₄) del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB 121
- Figura 3.10** Espectro de *J*-resolved (400 MHz en Metanol *d*₄) del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB. 122
- Figura 3.11** Espectro de HSQC (400 MHz en Metanol *d*₄) del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB. 122
- Figura 3.12** Espectro de HMBC (400 MHz en Metanol *d*₄) del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB. A) con *J* 7.7 Hz con *J* 5.0 Hz 123
- Figura 3.13** Correlaciones claves para identificación de fenilalanina, serina, valina, ácido léucico, isoleucina y leucina (COSY: Línea gruesa; HMBC: Flechas). La presencia de cisteína y aspargina se sugiere por las correlaciones en COSY y los desplazamientos químicos, y la del ácido 3-hidroxi-4-metilhexanoico se sugiere por COSY y HMBC pero las señales están sobre puestas. 125
- Figura 4.1 Foto del ensayo de valoración de la actividad inhibitoria de QS mediada por volátiles. A. Resultado con COVs de la bacteria PNM194. B. Resultado de inhibición con los COVs de PNM216. C. Resultado con COVs de la bacteria PNM100. D. Resultado con COVs de la bacteria PNM92..... 150
- Figura 4.2** Fotos del ensayo de actividad IQS de la bacteria PNM216 sembrada en diferentes medios. A: Medio Kalinovskaya, no hay inhibición del QS, B: Medio Nutritivo, inhibición de QS. C: Medio LB fuerte inhibición de la producción de QS. 153
- Figura 4.3** A) Montaje para la toma de la muestra del espacio de cabeza del inóculo del aislamiento PNM216 usando una fibra DVB/CAR/PDMS de Supelco®. B) Comparación de cromatogramas del espacio de cabeza del cultivo de PNM216 en medio LB y el blanco de medio a los 10 días C) Comparación de cromatogramas del espacio de cabeza del cultivo de PNM216 en medio TSB a los 10 días (en color anaranjado el control de medio sin inocular)..... 155
- Figura 4.4** Ensayo de Inhibición del QS de *C. violaceum* ATCC 31532 con compuestos puros en fase de vapor. A: Esquema de ensayo realizado usando cajas Petri y papeles cargados con el compuesto a ensayar. B: Foto del control negativo, ausencia de compuesto. C: Foto del resultado usando 5-metil-2-hexanona (15 microlitros, 0.004nM). D: Foto del resultado usando 2-nonanona (10 microlitros) 159
- Figura 4.5** Ensayos de inhibición de QS de compuestos volátiles estudiados con 5, 3 y 2 µL de los compuestos puros. A) Curvas de crecimiento de la bacteria con 5-metil-2-hexanona (4.3) y Acetato de isoamilo (4.30). Se observa determinar que el acetato de isoamilo crece sin afectar el crecimiento de la bacteria, los otros ensayos no son muy claros porque se usó concentraciones del compuesto muy elevadas. 161
- Figura 4.6** A) Ensayo de inhibición del *swimming* en *Burkholderia glumae*, la bacteria se puso en contacto con diferentes cantidades de los compuestos identificados y se catalogó como: A) inhibición total IT, 5-metil-2-hexanona (4.3) (21.84 µmoles); B)

inhibición parcial IP cumeno (4.2) (6.24 μ moles), C) no inhibición NI, p-cimeno (4.1) (5.58 μ moles); D) control de bacteria, se observa que existe diferencia entre el desplazamiento de la bacteria con y sin compuesto.....	163
Figura 4.7 Ensayos en catafilos de cebolla de los compuestos con mejor actividad frente a <i>B. glumae</i> , aislados del espacio de cabeza del aislamiento PNM216: A) 5-metil-2-hexanona (4.3) cuando se pone en contacto con 3.94 μ mol B) 2 nonanona (4.20) cuando se pone en contacto con 5.27 μ mol del compuesto puro C) Control con inóculo de bacteria <i>Burkholderia glumae</i> CIAT 4026.	164
Figura 5.1 Ensayos de inhibición de <i>quorum sensing</i> frente al biosensor <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 31532 con fracciones y extractos de A). Fracción FD de <i>Haliclona magnifica</i> , se observa que es una fracción no activa. B) Fracción acuosa de <i>Amphimedon viridis</i> (FA) observándose actividad inhibitoria del QS.	179
Figura 5.2. Espectro de RMN- ¹ H de 5.1. complejo Halitoxina (Metanol <i>d</i> ₄ , 400 MHz). Con ampliación de la región 7.9 a 9.3 ppm	181
Figura 5.3. Espectro de RMN ¹³ C de 5.1. complejo Halitoxina (Metanol <i>d</i> ₄ , 400 MHz) ..	182
Figura 5.4. Estructura del complejo halitoxina (tomado de Schmitz ²⁷).....	182
FIGURA 5.5 A) Cromatograma HPLC-MS en fase reversa de la fracción WB. B). Espectro de masas (+)-ESIMS de la fracción butanólica extraída de <i>Amphimedon viridis</i> . Complejo Halitoxina	183
Figura 5.6 Compuesto 5.2 identificado como taurina en la fase acuosa de <i>Amphimedon viridis</i>	185
Figura 5.7. Ensayo de inhibición del QS con halitoxina (5.1) A). Foto del ensayo de inhibición de <i>quorum sensing</i> frente a <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 31532 en placas de 96 pozos. Los números corresponden a la concentración molar usada. Nótese que la concentración a la que se inhibe el QS corresponde a 0.49 mM (100 μ g/mL) B). Curva de crecimiento de las tres concentraciones comparadas con el control, no se observa diferencias significativas en el crecimiento.....	186
Figura 5.8 Ensayo de inhibición con taurina (compuesto 5.2) aislado de <i>Amphimedon viridis</i> A) contra <i>Chromobacterium violaceum</i> a concentraciones de 7.98 mM y 0.19mM, la concentración mínima a la que se observa actividad inhibitoria del QS es de 3.99 mM (500 μ g/mL). B) Curva de crecimiento de <i>Chromobacterium violaceum</i> en presencia de 5.2, a concentraciones de 7.98 mM (1000 μ g/mL) y 3.99 mM (500 μ g/mL). Se observa que no afecta el crecimiento de la bacteria en ninguna de las dos concentraciones.	187
Figura 5.9 (A) Foto de la motilidad presentada por <i>B. glumae</i> CIAT 4026 en presencia del compuesto 5.1 Halitoxina cuando se aplican 3.67 nmoles (0.75 μ g) del compuesto. Se puede observar que existe una disminución en el movimiento de la bacteria. (B) Foto del control que corresponde a la bacteria sin añadir ningún compuesto. (C) Motilidad que presenta <i>B. glumae</i> usando el compuesto 5.2 taurina 39.9 nmoles (5 μ g) aislado de <i>Amphimedon viridis</i> y (D) control de crecimiento de bacteria sin añadir otro compuesto.	189
Figura 5.10 Ensayo con catafilos de cebolla para probar la actividad de los compuestos identificados del aislamiento de <i>Amphimedon viridis</i> . A) Prueba de la inocuidad del compuesto 5.1 no se observa ninguna alteración en el tejido del catafilo B) Control de bacteria en ausencia de cualquier compuesto C) Control con bacteria y metanol (solvente	

usado para solubilizar el compuesto) D) ensayo de actividad con halitoxina compuesto 5.1 añadiendo 3 µg (14.79 nmoles). E) Ensayo de actividad con taurina 5.2 no presenta actividad positiva al añadir 3 µg (24 nmoles).	190
Figura 5.11 Evaluación de las fracciones de la esponja <i>Amphiedon viridis</i> frente a <i>C. violaceum</i> ATCC31532 a 300, 200 y 100 µg/disco para los números 3,2,1 respectivamente A) la fracción WB resultó activa en todas cantidades probadas y (B) WW resultó levemente activa en todas cantidades probadas. Como control positivo se usó <i>p</i> -hidroxibenzaldehído (200 µg / disco) y como control negativo metanol, que corresponde al solvente usado para disolver las fracciones.	194
Figura 6.1 A) Compilado de los extractos de hoja de las especies del subgénero <i>Tacsonia</i> , se presenta la ampliación de la región de protones aromáticos. B). Espectro RMN ¹ H del extracto de <i>P. taminiiana</i> y principales tipos de compuestos identificados.	208
Figura 6.2 <i>Barcoding</i> de metabolitos primarios encontrados en las especies del subgénero <i>Tacsonia</i>	209
Figura 6.3 <i>Barcoding</i> de compuestos fenólicos encontrados en especies del subgénero <i>Tacsonia</i>	211
Figura 6.4 Cromatogramas (TICs) de los extractos butanólicos de las especies de <i>Passiflora</i> acá estudiados. Los números en negrilla corresponden a los compuestos identificados, (por espacio a los números presentados se les debe añadir un 6 anterior) y los números en <i>itálica</i> corresponden al <i>m/z</i> de compuestos desconocidos.	220
Figura 6.5 Espectro de RMN ¹³ C 150 MHz (MeOD-d ₄) del compuesto 6.1 aislado de <i>Passiflora lehmannii</i>	222
Figura 6.6 Espectro de RMN ¹ H 600 MHz (MeOD-d ₄) del compuesto 6.1 aislado de <i>Passiflora lehmannii</i>	222
Figura 6.7 . Confórmero mayoritario para el compuesto 6.1, se observa que los protones de la unidad de ramnosa quedan enfrentados al anillo A y sufren desplazamiento a campo alto.	223
Figura 6.8 Espectro TOCSY del compuesto 6.1 obtenido de <i>Passiflora lehmannii</i> en metanol-d ₄	224
Figura 6.9 Espectro HSQC del compuesto 6.1 obtenido de <i>Passiflora lehmannii</i> en metanol-d ₄	224
Figura 6.10 Espectro Espectro <i>J-resolved</i> del extracto del compuesto 6.1 obtenido de <i>Passiflora lehmannii</i> en metanol-d ₄	225
Figura 6.11 Espectro HMBC del compuesto 6.1 obtenido de <i>Passiflora lehmannii</i> en metanol-d ₄	225
Figura 6.12 Espectro de RMN ¹ H 600 MHz (MeOD-d ₄) del compuesto 6.2 aislado de <i>Passiflora uribei</i>	227
Figura 6.13 Espectro HSQC del compuesto 6.2 obtenido de <i>Passiflora uribei</i> en metanol-d ₄	227
Figura 6.14 Espectro HMBC del compuesto 6.1 obtenido de <i>Passiflora uribei</i> en metanol-d ₄	228
Figura 6.15 Nuevos flavonoides identificados como los componentes mayoritarios de <i>P. lehmannii</i> (figura A) y <i>Passiflora uribei</i> (figura B). Las flechas representan las correlaciones claves en HMBC.	229

- Figura 6.16.** PCA PLOT Comparación de hojas de curuba usando análisis de componente principal (PCA), se obtuvo una separación en cuatro grupos principales por *score plot*. El primero corresponde a las especies de *P. cumbalensis* en color verde, el segundo *P. lehmannii* lo que es razonable debido a que esta especie no se encuentra dentro del subgénero *Tacsonia*, el tercer grupo formado por *P. uribei* y el cuarto grupo constituido por las otras especies, todo lo que queda fuera de los círculos232
- Figura 6.17** Ensayo de inhibición del *quorum sensing* contra *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. La actividad *quorum quenching* es detectada por la falta de producción de violaceína alrededor de los pozos. En las figuras A y B se muestran los resultados del extracto de *P. tarminiana* a 500 µg/mL. Se observa que las dos repeticiones presentan halos similares. En las figuras C y D están los resultados para *P. uribei*; a la misma concentración, pero en esta es posible diferenciar el diámetro de los halos en las dos repeticiones. El *p*-hidroxibenzaldehído fue usado como control positivo (orificio en el centro de la caja con un halo blanco) y 10 µL de metanol al 10% como control negativo (orificio alrededor del cual no existe la presencia de un halo).....233
- Figura 6.18** Análisis multivariado supervisado con los datos de RMN. A. OPLS *score plot* usando los Inhibidores de QS como variable Y, mostrado separación de muestras activas y no activas a lo largo de OPLS1. B. El correspondiente *S-plot*, presentando los valores de IQS significativos. C. *S-plot* sin *P. cumbalensis*.....234
- Figura 6.19** A) Resultado del test de permutación del modelo OPLS-DA. (B) Curva ROC que afirma la validez de predicción del modelo, respecto a un grupo activo Vs. Grupo inactivo. El área bajo la curva fue 0.85 (un modelo ideal tendría un AUC de 1) claramente establece que la predicción del modelo fue robusta235
- Figura 6.20** Curva de crecimiento de los tratamientos aplicados a *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 con los compuestos **6.1** y **6.2**.....238
- Figura 6.21** Bioensayo en cross streak con *Burkholderia glumae* ATCC 33617 y el biosensor *Burkholderia glumae* COK71. (A) control negativo (color azul); (B) control positivo propuesto en la patente N° US 8,507,674 B2 (sin color) y (C) ensayo con extractos de *Passiflora uribei* (0.05 mg/ml).....240
- Figura 6.22** Ensayos de inhibición del *swimming* en *B. glumae*. A. compuesto 6.1 aislado de *P. lehmannii* cuando actúa con 2.02 nmoles (1.5 µg) del compuesto presenta disminución en el diámetro del movimiento. C. compuesto 6.2 aislado de *P. uribei* con 2.36 nmoles (1.5 µg) no presenta una marcada inhibición del QS. B y C corresponde a los controles de MeOH y el blanco que es la bacteria sin compuesto respectivamente. 241
- Figura 6.23.** Ensayo en modelo en catafilos de cebolla usando *Burkholderia glumae* CIAT 4026. A Compuesto 6.1, aislado de *Passiflora lehmannii*, ensayo de inocuidad (lado izquierdo) a una concentración de 50, 75 y 100 µg/mL En el lado derecho control con MeOH recuadro superior izquierdo y control de bacteria recuadro superior derecho, en el inferior el ensayo con 1.21 nmoles (0.9 µg) del compuesto. B Compuesto 6.2, aislado de *Passiflora uribei*, ensayo de inocuidad cuadro izquierda, la actividad del compuesto. En el recuadro superior se encuentran los controles y en el inferior el compuesto a una concentración de 1.41 nmoles (0.9 µg).....242

Lista de tablas

Pág.

Tabla 2.1 Filiación de cepas de <i>Actinobacteria</i> aisladas de muestras marinas.....	59
Tabla 2.2 Derreplicación de los 12 VIPs para la actividad inhibitoria de <i>quorum sensing</i> usando la base de datos Antimarin.....	74
Tabla 2.3 Cepas con la mayor actividad biológica HCA - OTU.....	78
Tabla 3.1 Caracterización fenotípica de cepas seleccionadas, por su actividad inhibitoria de <i>quorum sensing</i> frente al biosensor <i>Chromobacterium violaceum</i> , en diferentes medios de cultivo.....	105
Tabla 3.2 Identificación taxonómica de los aislamientos activos contra <i>C. violaceum</i> . Se presentan los vecinos más cercanos y su porcentaje de similitud.	108
Tabla 3.3 Resultados del ensayo de inhibición del <i>quorum sensing</i> de <i>C. violaceum</i> de los extractos de las bacterias activas (500 microgramos por pozo) cultivadas en medio LB.....	110
Tabla 3.5 Fórmulas moleculares para 3.1 si 560.3604 corresponde a $[M+2H^{++}]$, y si 560.3604 corresponde a $[M+Na]^{++}$	117
Tabla 3.5 Asignación en RMN de las señales identificadas para el péptido activo 3.1. .	119
Tabla 4.1 Resultados de los ensayos con volátiles para las 16 cepas seleccionadas ...	151
Tabla 4.2 Comparación de la actividad de los COVs producidos por PNM216 cultivada en diferentes medios frente al biosensor <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC31532	153
Tabla 4.3 Compuestos identificados en el espacio de cabeza de PNM216 crecido en medio LB.	156
Tabla 4.4 Resumen de los resultados del ensayo de inhibición de <i>quorum sensing</i> con compuestos puros frente al biosensor <i>Chromobacterium violaceum</i> en fase de vapor. Para los compuestos activos se da el diámetro del halo de inhibición observado.....	158
Tabla 4.5 Concentraciones de los compuestos en ensayo frente a <i>C. violaceum</i> . Las concentraciones empleadas son muy altas y afectan el crecimiento,	161
Tabla 4.6 Resultados ensayos de <i>swimming</i> con <i>B. glumae</i> usando diferentes cantidad de los compuestos volátiles identificados	163
Tabla 4.7 Ensayo de actividad en modelo de catafilos de cebolla con los compuestos identificados como IQS en el espacio de cabeza de PNM216. La mejor actividad corresponde a la cantidad de compuestos en la que se observa menor maceración del material vegetal.....	165
Tabla 6.1 Datos de colección de especies del subgénero <i>Tacsonia</i> “curuba”	207

Tabla 6.2 Compuestos fenólicos identificados en las especies de Tacsonia usando los datos obtenidos en los análisis de RMN y HPLC-MS/EM.	214
Tabla 6.3 Datos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C para Apigenin-4-O-β-glucopiranosil-8-C-[α-rhamnopyranosil-(1→2)]-β-glucopiranosido (6.1) y Apigenin-4-O-glucopiranosil, 8-C-(6'' acetil)- β-glucopyranósido (Metanol-d ₄ , δ en ppm, <i>J</i> en Hz).....	229

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
ABP	Añublo bacterial de la panícula de arroz
ACA	Agar de almidón y caseína
AcOEt	Acetato de etilo
ACP	Proteína portadora de grupos acilo
Als	Moléculas autoinductoras
AI-2	Moléculas autoinductoras - 2
AIP	Péptidos autoinductores
AHLs	<i>N</i> -Acilhomoserinlactonas
ADNr	Acido desoxiribonucleico ribosomal
AP	alquilpiridinio
ARNr	Acido ribonucleico ribosomal
BDSF	ácido cis-2-dodecenoico
br d	Doblete ancho
br s	Singlete ancho
CAI-1	(3S)-3-hidroxi-tridecan-4-ona
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CDSF	ácido cis-cis-11-metildodeca-2,5-dienoico
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CL-EM	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
COVs	Compuestos orgánicos volátiles
d	Doblete
dd	Doble doblete

Símbolo	Término
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfoxido
DSF	Factor de señal difusible
DO	Densidad óptica
ELSD	<i>Evaporating Light Scattering Detector</i>
Eca	<i>Erwinia carotovora</i>
EI	<i>Electron Impact Ionization</i>
EPS	Exopolisacáridos
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
eV	<i>Electron volt</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography coupled Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
HCA	Análisis de agrupamiento jerárquico
HHQ	2-Heptil-4-(1H)-hidroxi-quinolina
HMBC	<i>Heteronuclear correlation through multiple bond coherence</i>
HMDD	<i>Human Metabolome Database</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HRESIMS	<i>High Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz	<i>Herz</i>
IQS	Inhibición de <i>quorum sensing</i>
IR	Índice de Retención
<i>J</i>	Constante de acoplamiento (Hz)
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa carga
MeOH	Metanol
MeOD- <i>d</i> ₄	Metanol deuterado
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MIC _{QS}	Concentración mínima inhibitoria de <i>quorum sensing</i>
MVDA	Análisis multivariado

Símbolo	Término
ABC	<i>ATP-Binding Cassette</i>
MSP	Mean spectra projection (main spectra dendrogram)
OPLS-DA	<i>Orthogonal Partial Least Square-Discriminant Analysis</i>
OTU	Unidades taxonómicas operacionales
PCA	Análisis de componente principal
Pcc	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
PCR-TR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
ppm	Partes por millón
PQS	Señal de quinolona de <i>Pseudomonas</i>
QQ	<i>Quorum quencher</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
q	Cuadruplete
RA	Reactivo analítico
RMN	Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear
RPM	Revoluciones por minuto
s	Singlete
SAM	S-adenosilmetionina
SEM	Scanning Electron Microscopy
SPME	Microextracción en fase sólida
t	Triplete
TSP	Fostato de sodio tribásico
UHPLC-MS	Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas
UV	Ultravioleta
WB	Fracción butanólica
δ	Desplazamiento (ppm)
λ	Longitud de onda

Introducción

Durante las últimas décadas se ha entendido que la producción de varios fenotipos, asociados con la patogenicidad de las bacterias, se regula mediante sistemas de *quorum sensing* (QS). En estos sistemas las bacterias segregan moléculas autoinducidas para comunicarse con las bacterias vecinas y coordinar su expresión fenotípica. El uso de compuestos que interfieren con la comunicación celular es una alternativa novedosa que surge como una alternativa interesante para el control de enfermedades provocadas por microorganismos.

Los compuestos capaces de inhibir el QS son producidos por una amplia gama de organismos, como bacterias, hongos, plantas o animales de ecosistemas terrestres, marinos o de agua dulce¹⁻³. Sin embargo, aunque muchos organismos o extractos de tejidos exhiben actividades inhibitorias del QS, los compuestos responsables por esta actividad tan sólo se han caracterizado en un número limitado de casos. La naturaleza química de los compuestos *quorum quenchers* (QQ), es decir de los inhibidores de la comunicación celular, es muy diversa⁴⁻⁶, incluyendo desde metabolitos secundarios hasta enzimas. Así mismo, si bien el uso de QQ podría ser usado en el control de fitopatógenos esta posibilidad ha sido poco explorada. En este marco la presente tesis de doctorado busca contribuir al control de fitopatógenos bacterianos mediante el uso de productos naturales (o derivados) como inhibidores de sus sistemas de *quorum sensing*. Para alcanzar este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos: Identificar extractos de organismos con actividad inhibitoria del *quorum sensing*, haciendo énfasis en extractos de microorganismos marinos: de los cuales se mantendrán bancos de cepas para su posterior estudio. Aislar por métodos cromatográficos, e identificar por métodos espectroscópicos, los compuestos responsables de la actividad inhibitoria de *quorum sensing* en los extractos activos del objetivo anterior. Establecer si los compuestos QQ aislados previamente inhiben la expresión de factores de virulencia en fitopatógenos (Por ejemplo *Cromobacterium violaceum*; *Burkholderia glumae*; *Pseudomonas*

fuscovaginae, *Xanthomonas oryzae* o *Pantoea aglomerans*) y finalmente determinar el efecto de algunas de las moléculas QQ en el desarrollo de los síntomas en catafilos de cebolla.

El presente documento está organizado por capítulos auto contenidos, cada uno de los cuales fue redactado con un formato tipo artículo. El primer capítulo corresponde al estado del arte, describiendo tanto los sistemas de QS de fitopatógenos como los inhibidores de estos sistemas. El segundo y tercero se refiere al estudio de bioprospección de inhibidores de QS realizado con bacterias aisladas de ambientes marinos, haciendo énfasis en metabolitos fijos. En el cuarto capítulo se exploran los compuestos volátiles producidos por bacterias como compuestos QQ. En el quinto capítulo se describe el estudio bioprospectivo de esponjas marinas del orden Haplosclerida en búsqueda de inhibidores de QS. En el sexto capítulo se estudian las hojas de diferentes plantas del género *Passiflora* en búsqueda de estos inhibidores. Finalmente, los compuestos activos identificados en los capítulos anteriores fueron ensayados frente a modelos de cebolla como aproximación a su uso en el control de fitopatógenos. Los espectros y datos están en anexos electrónicos.

1. Capítulo 1: Marco Teórico

Este capítulo se presentará en tres partes: primero se abordará el fenómeno del *quorum sensing*, discutiendo tanto las moléculas autoinductoras como su papel en la virulencia de patógenos. Así mismo, se describirá el uso de biosensores en la búsqueda de compuestos capaces de inhibir el QS. En la segunda parte se presentarán y discutirán las moléculas capaces de inhibir el *quorum sensing*, sus fuentes y mecanismos de acción. Finalmente, se presentará el uso de estos inhibidores en el control de fitopatógenos, que es el tema central de esta tesis.

El rendimiento de los cultivos agrícolas se ve afectado por múltiples factores que incluyen tanto el estrés abiótico, como la sequía, la salinidad, la temperatura, y la deficiencia de nutrientes¹; como los factores bióticos, por eje. las enfermedades causadas por hongos, virus y bacterias. El surgimiento de fitopatógenos resistentes a los antibióticos, hace patente la necesidad de descubrir nuevos compuestos bioactivos que permitan el control de estos fitopatógenos sin causar su muerte, pues así se evita la presión que acarrea la aparición de cepas resistentes. Así, el enfoque en la búsqueda de sustancias para el control de bacterias patógenas ha cambiado, evitando buscar los compuestos con actividad bactericida, y centrándose más en la búsqueda de moléculas capaces de interferir con el *quorum sensing* (QS) de las bacterias. Lo anterior tomando ventaja de que éste regula la virulencia de los fitopatógenos, y por lo tanto el efecto dañino de la bacteria sobre la planta se atenúa en presencia de un inhibidor de QS, sin activar los mecanismos de defensa bacterianos y por lo tanto sin generar resistencia al compuesto ².

1.1 *Quorum Sensing*

El comportamiento social no es exclusivo de los macro-organismos, pues se ha podido establecer que algunos organismos unicelulares también han desarrollado la capacidad de trabajar de manera coordinada por un bien común. Esta comunicación se establece a

través de una sofisticada comunicación célula a célula que involucra una serie de compuestos orgánicos. Esta comunicación se da tanto *intra* como *inter*-específica, y permite que los microorganismos involucrados coordinen sus actividades, con el objetivo de proporcionar un beneficio de la población microbiana en su conjunto³.

El fenómeno descrito como *quorum sensing* (QS) consiste en la regulación de la expresión genética en función de la densidad de la población bacteriana, la cual se censa a través del reconocimiento de moléculas señal (producidas por las mismas bacterias)⁴⁻⁶. El "lenguaje" utilizado para esta comunicación intercelular se basa en moléculas orgánicas pequeñas, que son producidas por las mismas bacterias, y que son llamadas autoinductores (AIs). La detección del *quorum* se da solamente cuando la población de bacterias es lo suficientemente alta, pues si bien una bacteria aislada también libera AIs en el ambiente, su concentración es demasiado baja para ser detectada. En cuanto la población de las bacterias llega a una masa celular crítica, la concentración de autoinductores alcanza un nivel umbral que en respuesta les permite a las bacterias activar o reprimir genes diana, además de producir una mayor cantidad de AIs⁷⁻⁹. Las bacterias utilizan el QS para regular diversos comportamientos en una condición social específica, incluyendo la bioluminiscencia, la transferencia horizontal de ADN, la formación de biopelículas, la esporulación, la producción de factores de virulencia, la captación de glucosa, la producción de antibióticos, la biosíntesis de nucleótidos *de novo*, la producción de metabolitos secundarios, entre otros^{3,10}

La mayoría de las bacterias hasta ahora identificadas, que utilizan sistemas de *quorum sensing*, ecológicamente están asociadas de alguna manera con plantas o animales. La naturaleza de estas relaciones puede ser beneficiosa, como con las bacterias simbióticas, o perjudicial, como se ve con bacterias patógenas⁸. Es importante notar que tanto la difusión, como la detección, de las moléculas autoinductoras depende del tipo de bacteria, siendo diferente los sistemas en bacterias gram-positivas y gram-negativas^{1,9}.

En las bacterias gram negativas uno de los sistemas de QS mas estudiado se basa en la producción de acilhomoserina-lactonas (AHLs) como moléculas señal, las cuales inician el circuito de detección de *quorum*. Estas moléculas son sintetizadas por proteínas tipo LuxI. La concentración del auto-inductor sintetizado se acumula hasta un nivel adecuado donde otras proteínas (LuxR), las reconocen y se unen a las AHL para activar o reprimir la transcripción de los genes diana regulados por el sistema¹¹ (Figura 1.1). Las acil

homoserinlactonas, son las lactonas de la homoserina unidas a una cadena acilo por un enlace amida, ellas difieren en la longitud de la cadena de carbono del grupo acilo (variando de 4 a 18) y en el grado de oxidación del carbono de la posición C-3. Una proteína portadora de grupos acilo (acilo-ACP) produce la homoserinlactona, mientras que la cadena lateral acilo proviene de una S-adenosilmetionina. Existen otras familias de proteínas productoras de AHLs, incluyendo la familia de LuxM que difiere significativamente en la secuencia de aminoácidos con las de la familia LuxI, aunque ambas emplean el mismo sustrato para iniciar la formación de las AHLs. La interacción entre los sensores de proteína de histidina quinasa y AHLs resulta en la activación de los genes dependientes de detección de *quorum* pertenecientes al sistema LuxM¹².

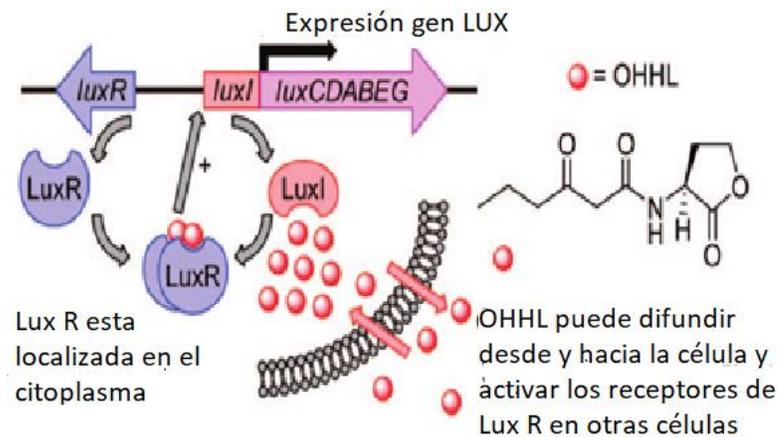
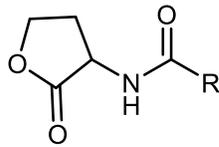


Figura 1.1 Esquema del Sistema de *quorum sensing* LuxI/LuxR en *V. fischeri* Moléculas autoinductoras *N*-3-oxohexanoil homoserin lactona (OHHL) Tomado de Galloway et al ¹³

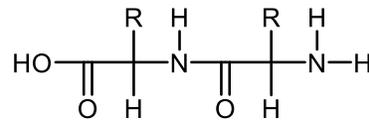
1.1.1 Moléculas autoinductoras Als

Se han identificado un gran número de moléculas autoinductoras, con características estructurales diversas. De hecho, en muchas especies bacterianas se ha identificado la producción de más de un tipo de compuestos autoinductores, que junto con la proteína sintasa y el aparato asociado de transducción de señales, forman una red interdependiente de unidades reguladoras que gobiernan la respuesta de la población bacteriana a los cambios en el medio ambiente mediante la regulación de un conjunto diverso de genes¹⁴. Las moléculas autoinductoras de sistemas de *quorum sensing* se pueden categorizar en cuatro grupos principales que a continuación se describen (Figura 1.2)^{12,15}.

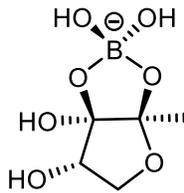
A) L-AHL



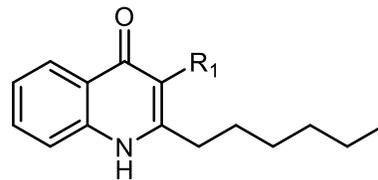
B) Oligopéptidos AIP



C) AI-2



D) PQS R₁ = OH / HHQ R₁ =



E) Moléculas disufisibles DSF

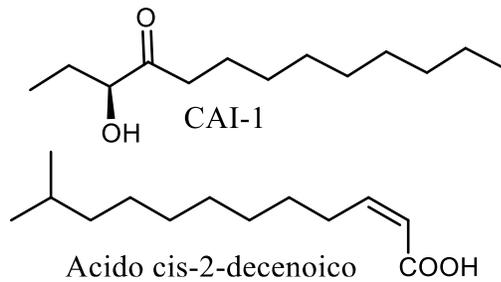


Figura 1.2 Estructura de los principales tipos de moléculas autoinducidas de *quorum sensing*. Tomado de Zhu 2013¹⁵

A. Homoserinlactonas

Los sistemas de *quorum sensing* regulados por las Acil-homoserinlactonas (AHLs) (Figura 1.2), o autoinductor 1 (AI-1), son empleados por una gran cantidad de bacterias gram-negativas, incluyendo aquellas de los géneros *Rhizobium*, *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* entre otras. Las proteínas tipo LuxI / LuxR son las que controlan este sistema¹². La biosíntesis de AHL depende principalmente de los miembros de la familia LuxI AHL sintasas^{14,16}, mientras las proteínas luxR las reconocen y activa todos los genes diana conectados.

Las AHL naturales reportadas hasta la fecha contienen un anillo de homoserinlactona no sustituido en las posiciones β y γ , que está *N*-acilado con un derivado de ácido graso¹³

(Figura 1.2A). Estos ácidos grasos pueden ser saturados o insaturados, contener un grupo hidroxilo u carbonilo en el tercer carbono, y varían en su longitud de cadena carbonada entre 4-18 carbonos, aunque se han reportado algunas más grandes. En general se considera que las moléculas de AHL se difunden libremente a través de la membrana celular hacia el exterior de la célula; sin embargo, hoy en día se reconoce que algunas AHL necesitan de un sistema de bombeo que las transfiera al exterior de la célula. Lo anterior, depende de las características estructurales de la AHL, en especial de la longitud de la cadena y/o grado de insaturación³.

B. Oligopéptidos

Las moléculas señal más ampliamente difundidas entre las bacterias gram-positivas son los péptidos autoinductores (AIP), formados por 5 a 20 residuos de amino ácidos (Figura 1.2B). El péptido precursor, se sintetiza en el ribosoma celular después de lo cual se modifica para alcanzar una forma madura¹⁷. Para la detección de esta señal se utiliza un sistema de transducción de señal de dos componentes, compuesto por un regulador de respuesta intracelular y una proteína receptora histidina quinasa

localizada en la membrana¹⁵. A cierta concentración de AIP la transducción de señales reguladoras de dos componentes recibirá la señal y transmitirá el mensaje sensorial a la célula a través de fosforilación. Esto, por lo tanto, da como resultado la activación y expresión de genes dependientes del QS¹⁸.

El objetivo principal de la AIP es asegurar la comunicación entre las bacterias, pero también se ha encontrado que algunas moléculas AIP pueden estar involucrados en otras funciones microbianas¹⁹, como por ejemplo en funciones de defensa como los antibióticos Subtilina y lantnisina¹⁵, que son dos AIP que muestran una actividad antimicrobiana contra un gran número de bacterias gram-positivas¹².

C. Las moléculas Autoinductoras-2 (AI-2) para la comunicación interespecies

Las moléculas autoinductoras del tipo 2 (AI-2) son derivados de un 2-metil-tetrahidrofurano polihidroxilado, específicamente de la 4,5-dihidroxi- 2,3-pentanodiona (DPD) en su forma hemiacetálica y de éster borato (Figura 1.2 C). Este AI-2 es producido por la proteína LuxS¹⁵, y se cree que es utilizado para la comunicación *inter* especies, debido a que la producción de AI-2, y los homólogos luxS sintasa, está muy extendida entre diferentes tipos de bacterias tanto gram-negativas como gram-positivas^{3,12}. Sin embargo, es de notar

que muchas bacterias sólo producen AI-2, pero carecen de receptores para ellas, por lo que no serían capaces de censar su presencia. Las dos clases de receptores de AI-2: LuxPQ y Lsr están restringidos a los representantes del género *Vibrio* y *Salmonella typhimurium*^{20,21}

D. AI-3 y quinolonas (PQS)

Al menos tres diferentes auto-inductores son responsables de las señales de detección de *quorum* de *Pseudomonas aeruginosa*. Estos incluyen la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, que se determinó a finales de los años 90 y se denominó señal de quinolona de *Pseudomonas* (PQS)²², y dos señales de tipo acilhomoserinlactona: C4-HSL (*N*-butirilhomoserina lactona) y 3-oxo-C12-HSL (3-oxododecanoilhomoserina lactona)¹². La PQS y su precursor 2-heptil-4(1H)-hidroxiquinolona (HHQ) (Figura 1.2 D). son los productos biosintéticos del operón *pqsABCDE*, que media la condensación de antranilato y un ácido graso α -ceto. Tanto PQS y HHQ actúan como autoinductores QS a través de su interacción con el regulador transcripcional PqsR, lo que resulta en la modulación de la expresión del gen diana. Aunque sólo *P. aeruginosa* produce PQS, otras especies de *Pseudomonas*, así como de *Burkholderia* spp. utilizan HHQ como una señal de detección de *quorum*¹¹.

E. Señales difusibles

Los factores de señal difusibles (DSF) son otro tipo de señal QS bien estudiada en bacterias gram-negativas. En general, las señales de la familia DSF son ácidos grasos insaturados con geometría *cis* en la posición 2 y diferentes tamaños de cadena²³. Dentro de las DSF también hay otro grupo de moléculas denominadas CAI-1³ (Figura 1.2 E).

Estas señales DSF regulan diversas funciones biológicas, incluida la expresión del gen de virulencia y la dispersión de biopelículas²⁴. Dentro de estos compuestos se han identificado el ácido *cis*-2-dodecenoico (BDSF), el ácido *cis-cis*-11-metildodeca-2,5-dienoico (CDSF)²⁵ y el ácido *cis*-10-metil-2-dodecenoico (IDSF / DSF-II). Otro ejemplo de esta familia es el autoinductor-1 (CAI-1) de *Vibrio cholerae* que se identificó como (3*S*)-3-hidroxi-tridecan-4-ona. La biosíntesis de CAI-1 requiere de la enzima CqsA que se encuentra principalmente en las especies de *Vibrio*²⁶, mientras que la familia DSF existe comúnmente en algunos patógenos de las plantas, tales como *Xanthomonas* spp. y *Burkholderia* spp.²⁷.

1.1.2 Biosensores

Dada la relevancia que ha adquirido el fenómeno de QS en la expresión de la virulencia de patógenos para el ser humano y las plantas, se han desarrollado biosensores que son capaces de dar información sobre la naturaleza y el tipo de moléculas AI, involucradas en el sistema del microorganismo que se está estudiando¹¹. Durante la última década, se han desarrollado varios biosensores para detectar y cuantificar las moléculas de AI, principalmente AI-1 o AI-2. Estos biosensores no solo son eficientes en la detección de la presencia de AI sino también en la búsqueda de inhibidores de QS^{28,29}.

Un biosensor es una bacteria genéticamente modificada, que alberga el circuito genético QS de interés acoplado con un circuito genético reportero fácilmente detectable y cuantificable, que suele incluir fluorescencia, producción de pigmentos y luminiscencia. Entre los biosensores más difundidos se tiene: *Vibrio harveyi* BB170, *Pseudomonas aeruginosa* PA14-R3, *Chromobacterium violaceum* CV026 y *Pseudomonas aeruginosa* M71LZ^{11,30}. Las moléculas AI también pueden ser analizadas usando varios métodos analíticos, incluyendo HPLC y espectrometría de masas³¹.

a. Biosensores basados en *Chromobacterium violaceum*

C. violaceum es una bacteria gram-negativa, anaerobia facultativa, que se considera no patógena para los humanos y algunas plantas y se encuentra en áreas tropicales y subtropicales de varios continentes; sin embargo, en algunos casos puede actuar como un patógeno oportunista para animales y humanos y causar septicemia mortal³². Posee un circuito QS de tipo Cvil / CviR basado en AHLs. Este circuito de QS regula la producción de violaceína, un pigmento púrpura insoluble en agua, para el que se han reportado actividades tripanocida y antivirales^{11,32-34}, además de antibacteriana^{35,36} y quitinolítica³⁷. McClean *et al.* (1997) desarrollaron la cepa CV026 de *C. violaceum*, que es incapaz de sintetizar AHLs, pero que es capaz de detectarlas. Este biosensor ha sido ampliamente utilizado para la detección de bacterias productoras de AHL, puesto que *C. violaceum* CV026 detecta AHL que van desde C4- hasta C8-AHL³⁵.

El *C. violaceum* ATCC 31532 corresponde a una cepa *wild type*, que se utiliza en ensayos estándar de difusión en disco para establecer la actividad inhibitoria de *quorum sensing*. En este ensayo se evidencia la inhibición de QS mediante la inhibición de la producción del pigmento violeta sin causar muerte al biosensor, lo que dará cuenta de que los sistemas de QS son interrumpidos en *C. violaceum* sin interferir en el crecimiento bacteriano. De

este modo, la actividad inhibitoria de QS de los compuestos se establece por la aparición de un halo incoloro pero viable²⁸

b. Biosensor de *Burkholderia glumae* COK71

Burkholderia glumae es una bacteria gram-negativa patógena para una serie de cultivos de importancia industrial, incluyendo el arroz. Produce toxoflavina bajo el control de un regulador transcripcional tipo LysR ToxR y su ligando ToxJ, es decir la toxoflavina actúa en un *feed back* positivo. El biosensor *Burkholderia glumae* COK71 fue desarrollado por el grupo de Kim en *Gyeongsang National University, Republic of Korea* en el año 2013. Utilizando el conocimiento sobre la regulación de la toxoflavina en *B. glumae* BGR1 se construyó un biosensor de la presencia de toxoflavina que se puede visualizar fácilmente. El gen *toxA* se controla en respuesta a la presencia de toxoflavina por el activador transcripcional ToxR. Se utilizó este sistema de activación para inducir la expresión de *toxA*, lo que permite la expresión controlada por toxoflavina. El fragmento interno del gen *toxA* se clonó en pVIK112 para medir la actividad β -galactosidasa en respuesta a diferentes concentraciones de toxoflavina. Los plásmidos se transfirieron luego de S17-1/ λ pir a la cepa BGR1 de *B. glumae* mediante conjugación, seleccionando para la fusión transcripcional *toxA-lacZ* resistente a la kanamicina. La mutación nula ToxA abolió la producción de toxoflavina³⁸, pero permite ver su presencia mediante la actividad β -galactosidasa.

El biosensor COK71 requiere que los sustratos sean suplementados con X-gal y ONPG, de modo tal que en presencia de toxoflavina, que activa la β -galactosidasa y se produce un color azul en el medio para evidenciar la detección de la toxoflavina en muestras naturales.³⁸ Se pueden analizar muestras que contienen 50-500 nM de toxoflavina. Por lo tanto, se puede cuantificar indirectamente la toxoflavina a través de la hidrólisis de X-gal por acción de la β -galactosidasa, lo que se detecta por el color azul. No se observa la presencia del color en ausencia de toxoflavina³⁸.

Así, si la cepa de *B. glumae* que se está valorando ha sido tratada con un compuesto QQ no producirá toxoflavina y por lo tanto no se producirá el color azul al revelar su presencia con COK71.

c. Biosensores de *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria gram-negativa que no contiene un gen de AHL sintasa, por lo que no produce AHL, lo que lo convierte en un huésped adecuado para la detección de AHL si se le incluyen los circuitos genéticos de detección de AHL. En 1998 Winson et al, diseñaron cepas de *E. coli* que portaban plásmidos (pSB401, pSB403 y pSB1075) para detectar y cuantificar las AHL presentes en los sobrenadantes de *Burkholderia* sp. cepa A9^{29,39}. Estos biosensores detectan una amplia gama de AHL y produce bioluminiscencia que se mide usando un luminómetro. Los plásmidos pSB401, pSB403 y pSB1075 fueron contruidos fusionando los genes *luxCDABE* de bioluminiscencia de *Photobacterium luminescens* con las regiones promotoras de los genes *luxI*, *Vibrio fischeri*, *ahyI* *Aeromonas hydrophila*, y el gen *lasI* de *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. En cada caso, el plásmido también porta el gen *luxR* respectivo, para asegurar la expresión de la proteína LuxR que permita el reconocimiento de las AHLs, con diferentes niveles de sensibilidad.³⁹

d. Biosensor de *Pseudomonas* sp.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno humano oportunista. La expresión de su virulencia (formación de biopelícula)¹³ se regula mediante a QS, se ha establecido que esta bacteria contiene dos sistemas QS de LuxI / LuxR: (a) LasI / LasR y (b) RhII / RhIR. En el sistema LasI / LasR, LasI sintetiza *N*-3-oxo-dodecanoilhomoserinalactona (OdDHL), que se une al activador transcripcional LasR, lo que lleva a la regulación positiva de los promotores blanco. En el sistema RhII / RhIR, RhII se sintetiza *N*-butanoilhomoserinlactona (BHL), que luego se une a RhIR, lo que lleva a la expresión de los promotores regulados⁸. Los biosensores de *Pseudomonas* se construyeron mutando el gen autoinductor de sintasa (*lasI* o *rhII*) y expresando el reportero como *lacZ* del promotor sensible a QS. La cepa *P. aeruginosa* PAO1 M71LZ se ha usado para detectar AHL de cadena larga como 3-oxo-C10- y 3-oxo-C12-AHL⁸. La presencia de AHL se cuantifica midiendo el nivel de *lacZ* y realizando el ensayo de β galactosidasa¹¹.

1.1.3 Sistemas de QS relevantes en bacterias fitopatógenas

Se estima que las plantas terrestres evolucionaron hace más de 700 millones de años, y junto a ellas coevolucionaron los microorganismos, lo que les permitió establecer diferentes interacciones entre ellos⁴⁰. Durante el transcurso de estas interacciones, las plantas lograron desarrollar sistemas capaces de monitorear los cambios en algunas actividades específicas de las bacterias, mientras que las bacterias responden a las variaciones en la

fisiología de la planta; así, ambos organismos hacen continuamente ajustes a su comportamiento de acuerdo a la actividad de su contraparte⁴¹. En los últimos años, ha quedado claro que muchos comportamientos importantes en las bacterias se regulan de manera dependiente de la densidad de población bacteriana, incluidos comportamientos como la motilidad y la síntesis de exoenzimas, exopolisacáridos, surfactantes y antibióticos que son cruciales para atacar, o colonizar plantas, animales⁴². La comprensión de esta señalización es fundamental para la elaboración de nuevas formas para mejorar la resistencia de la planta a enfermedades bacterianas⁴¹.

Esta comunicación entre organismos de diferentes reinos se da a través de señales químicas, por lo que se han estudiado diferentes modelos entre ellos la simbiosis leguminosa-*Rizobium*; y entre los patógenos *Agrobacterium* y sus huéspedes⁴³. Estudios recientes han demostrado que: (a) los compuestos fenólicos de las plantas pueden regular la expresión génica de los genes asociados con la virulencia en bacterias patógenas, (b) los autoinductores bacterianos contribuyen a la expresión de genes de las plantas, y (c) los compuestos de bajo peso molecular (productos naturales) producidos por las plantas pueden actuar como interferentes del QS bacteriano⁴¹. Este último punto es uno de los aspectos que se pretende lograr con la búsqueda de moléculas capaces de inhibir el QS y su aplicación en la agricultura, y es la hipótesis de la presente tesis. Como ejemplos de relaciones fitopatógeno- huésped se pueden citar:

Xanthomonas oryzae pv. *oryzae* (Xoo) es una γ -proteobacteria patógena para plantas vasculares, responsable de producir la enfermedad del tizón de la hoja en plantas de arroz (*Oryza sativa*). Xoo no produce AHL⁴⁴ pero posee la proteína OryR, que es una subfamilia de proteínas relacionadas con LuxR-QS, que se solubiliza en algún compuesto producido por las plantas de arroz (*rice signal molecule* (RSM)). Además, OryR regula el gen *pip* que codifica para la enzima prolina iminopeptidasa, en respuesta a las señales de plantas⁴⁴. La activación de la transcripción del gen *pip* aumenta si se añade un macerado de arroz infectado por Xoo, lo que indica que los compuestos (RSM) de la planta están presentes en el xilema que es la zona que generalmente se encuentra infectada⁴⁵. Estudios de expresión genética en todo el genoma han demostrado que OryR es un regulador global, y regula la expresión de aproximadamente 20% de los genes implicados en la regulación de la motilidad o la quimiotaxis⁴⁵. Se ha inferido que OryR regula la expresión de FlhF que es un regulador flagelar en respuesta a las señales de la planta mediante el reconocimiento

de una secuencia palindrómica conocida como *lux*-box en la región promotora; que juega un papel en las fases tempranas de la infección, lo que no permite a la planta detectar la llegada de Xoo, que se traduce en la hiper motilidad que permite colonizar el sistema vascular^{41,45}. Se demostró también que el RSM es una molécula pequeña y no interfiere con los sistemas AHL QS. Esto sugiere que este miembro de la familia LuxR, independientemente de la relación con los miembros de AHL QS, no se vincula a AHL, pero se une a un compuesto aún no identificado en RSM y está involucrado en la señalización inter reinos⁴⁵.

Agrobacterium tumefaciens y *Agrobacterium rhizogenes* son α -proteobacterias (familia Rhizobiaceae)⁶ patógenas para las dicotiledóneas, y producen enfermedades como tumores de corona o agalla, y enfermedades en raíces⁴⁷. El desarrollo de ambas enfermedades en plantas requiere de plásmidos de virulencia grandes, el plásmido inductor de tumores de agalla es *Ti* y el plásmido *Ri* es el inductor de las raíces en cabellera. Estos plásmidos codifican muchas de las funciones de virulencia necesarios para la enfermedad. El mecanismo por el cual *Agrobacterium* causa la enfermedad se basa en la transferencia horizontal de genes entre reinos. Los genes necesarios para conducir este proceso están agrupados en un plásmido y se conocen como genes *vir* (virulencia). Durante la patogénesis, un segmento específico o múltiples segmentos del plásmido *Ti* o *Ri* se copian de la llamada región T (región transferido) del plásmido a través de un mecanismo de conjugación para generar un ADN monocatenario intermedio llamado el ADN-T. Las proteínas de ADN-T y Vir asociadas se transfieren a través de un sistema de secreción de tipo IV a partir de las bacterias en células de plantas en el sitio de la infección⁴⁸ y se pasan al núcleo de la planta, en el que el ADN-T se integra de forma estable en el ADN cromosómico de la planta⁴⁹. Productos de genes específicos ADN-T provocan la manifestación visible de la enfermedad, es decir la generación de tumores, otros genes de ADN-T provocan la síntesis y liberación de metabolitos inusuales que se conocen colectivamente como opinas, los cuales son consumidos por las agro bacterias en y alrededor del sitio de la infección como fuentes de carbono, nitrógeno, y, en algunos casos, de fósforo⁶. La producción de opinas en los tejidos infectados proporciona un beneficio selectivo a la bacteria que alberga el plásmido de virulencia y mejora su ventaja competitiva^{41,50}. Curiosamente, muchos aislamientos ambientales de *Agrobacterium* no albergan el plásmido *Ti* y, por lo tanto, son avirulentos. Por lo tanto, la transferencia conjugativa del plásmido *Ti* de las cepas patógenas a las cepas libres de plásmidos podría desempeñar

un papel clave en el mantenimiento y la expansión de la población de *A. tumefaciens* infecciosa⁵¹. En *A. tumefaciens*, los genes responsables del sistema de QS se encuentran presentes en el plásmido Ti, que incluye Tral y TraR. Tral sintetiza la señal 3OC8AHS (*N*-3-oxooctanoyl-L-homoserina lactona), que se une y activa a TraR⁵², la cual a su vez se une a una región del promotor “caja *tra*” y, por lo tanto, activa la transcripción de varios operones que codifican proteínas necesarias para la replicación y conjugación del plásmido Ti^{4,53}. En este contexto, el sistema QS de *A. tumefaciens* es similar al prototipo del sistema LuxI-LuxR QS de las especies de *Vibrio*⁵⁴.

Xanthomonas campestris pv. *campestris* (Pammel) Dowson (Xcc en lo sucesivo) es una bacteria gram negativa y es el agente causal de la pudrición negra de las crucíferas, que es posiblemente la enfermedad más importante de las crucíferas en todo el mundo²⁴. Similar a muchos otros patógenos bacterianos, Xcc también ha desarrollado sistemas QS para regular su expresión genética. Estos sistemas usan señales difusibles DSF⁵⁵, entre las que se ha caracterizado el ácido *cis*-11-metil-2-dodecenoico⁵⁶.

Por otra parte, las cepas de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* son el agente causal de la enfermedad de mancha marrón del fréjol y favorece las lesiones por heladas en plantas⁵⁷. El sistema de detección de QS en *P. syringae* tiene muchas similitudes a la de otras bacterias gram negativas. La producción de 3-oxo-C6-HSL (3-oxo-hexanoilhomoserinalactona) se da de forma dependiente de la densidad celular y requiere la expresión del gen de la sintasa AHL, *ahII*, y el gen regulador de AHL, *ahIR*^{58,59}. El sistema de *quorum sensing* *AhII-AhIR* como el *AefR* son reguladores positivos de la producción de EPS, tolerancia al estrés oxidativo y maceración de tejidos de plantas, así como también son reguladores negativos de *swimming* y *swarming*⁵⁹.

1.1.4 *Burkholderia glumae*, el añublo bacterial de la panícula del arroz

La enfermedad conocida como añublo bacterial de la panícula de arroz (ABP) fue reportada por primera vez en Japón en la década de 1950⁶⁰, desde entonces se ha convertido en una de las enfermedades más graves para los productores de arroz en el mundo. El término añublo bacterial se usa para describir la pudrición de la vaina de plántulas, y la decoloración del grano de arroz, una enfermedad que se ve favorecida por la alta temperatura y la humedad durante la noche. El ABP es causada principalmente por

Burkholderia glumae, pero probablemente hay un par de otras especies relacionadas^{61,62}. La reducción de la producción de arroz debida al añublo bacterial de la panícula puede alcanzar hasta un 75% en cultivos severamente infestados, lo cual se suma a la complejidad de que es una bacteria residente en semillas de arroz⁶³. Dentro de las especies patógenas de *Burkholderia*, *B. glumae* ha sido la más estudiada por ser la más agresiva y por tanto la mayor responsable de la baja en la producción del arroz a nivel mundial, particularmente en países de Asia, América del Norte y Latinoamérica, incluyendo a Colombia y Ecuador^{63,64}.

B. glumae fue reportada por primera vez en Colombia a finales de los años 80's. Los resultados de las investigaciones realizadas sobre esta bacteria en las diferentes variedades de arroz cultivadas en Colombia, señalan que la mayoría de las cepas son altamente agresivas, y que además los aislamientos de *B. glumae* poseen una gran variabilidad genética. Esta enfermedad es considerada como la de mayor importancia, no solo por las pérdidas económicas ocasionadas en el cultivo, sino también, por su difícil control y manejo en campo⁶⁵.

B. glumae es una bacteria gram-negativa, aeróbica, capsulada, mótil, que presenta de dos a cuatro flagelos lofótricos, de forma bacilar, y tiene actividad pectolítica y lipolítica⁶⁶. Muchos autores consideran que *B. glumae* se transmite a través de la semilla, así el grupo de Hikichi et al (1993) detectó a *B. glumae* en varias partes de semillas infectadas de forma natural, incluyendo la epidermis y el parénquima. Además, las células de *B. glumae* presentes en vainas de las hojas son esenciales para la infección primaria, las cuales, a su vez, proporcionan una importante fuente de inóculo para panículas emergentes⁶⁶. Weinberg et al (2007) informaron que *B. glumae* causa enfermedad granulomatosa crónica infectante humana, que rara vez es inducida por patógenos bacterianos vegetales⁶⁷.

Para el caso de *B. glumae* se han descrito como factores de patogenicidad controlados por QS la producción de toxoflavina y lipasa; que están regulados por los sistemas *TofI/TofR* y *LipA*, homólogos a *LuxI* y *LuxR*, respectivamente^{63,68}. Así mismo, la biosíntesis de flagelo, y la actividad de la catalasa, regulados por sistemas *IcIR* y *QsmR*, también son factores de patogenicidad controlados por QS^{69,70}. Se han descrito además otros factores de virulencia potencialmente controlados por QS, como el sistema de secreción de tipo III (TTSS), la producción de poligalacturonasas y polisacáridos extracelulares (EPSs), que están ampliamente distribuidos entre los fitopatógenos⁶⁶. Todos estos factores de virulencia

podrán ser potencialmente controlados mediante el uso de compuestos inhibidores de sistemas QS, también conocidos como Quorum Quenchers (QQ).

En *Burkholderia* es muy importante la motilidad para causar la infección, es decir que esta contribuye con su patogenicidad. Se ha identificado al menos dos tipos de movimientos, uno a través de un líquido mediante flagelos llamado *swimming*⁷¹, y otro sobre una superficie llamado *swarming*⁷². Los flagelos son orgánulos importantes para las bacterias, ya que les permite reubicarse en los sitios más apropiados para su desarrollo causando infección en diferentes partes del huésped. La toxoflavina sola no es suficiente para que se produzca la podredumbre del grano, la motilidad dependiente de los flagelos y la quimiotaxia son necesarias para que las bacterias infecten el tejido vegetal eficientemente⁷³. En algunas cepas de *B. glumae* tanto el *swimming* como el *swarming* están controlados por QS⁷⁰, por lo que el efecto de los compuestos QQ se puede ver en la movilidad de la bacteria.

El ABP es una enfermedad grave, no sólo debido a la diversidad de cepas del patógeno que la producen, sino también por la falta de métodos eficaces para controlarla. El incremento de variedades de plantas resistentes a la enfermedad pueden ser la mejor opción, pero sólo existen variedades parcialmente resistentes que carecen de las características comerciales deseadas^{74,75}. El ácido oxolínico puede usarse en el tratamiento de semillas o en aplicación foliar, y a la fecha es el único compuesto químico indicado para el control de ABP y autorizado para la venta en Colombia. Sin embargo, no está disponible comercialmente en algunos países. Además, la aparición de cepas de *B. glumae* resistentes al ácido oxolínico limita el uso de este producto químico en un futuro cercano⁷⁶. Cui et al⁷⁷ informaron la presencia de cepas de *B. glumae* resistentes a múltiples fármacos como la ampicilina y kanamicina, y descubrió que compuestos de cobre Cu²⁺ tienen actividad antibacteriana contra la *B. glumae* aislada de pacientes y plantas de arroz, sin embargo, su empleo se ha visto obstruido por las implicaciones ambientales del uso de estas sustancias. Sin embargo, todavía es muy difícil explorar un bactericida eficiente y poco tóxico para controlar esta enfermedad⁶³.

Si bien los antibióticos clásicos, sean estos bactericidas o bacteriostáticos, seguirán siendo los fármacos de elección para tratar infecciones bacterianas agudas en el futuro, parece inequívoco que el aumento de la prevalencia de patógenos resistentes a fármacos requiera la exploración y el desarrollo oportuno de nuevos enfoques antimicrobianos alternativos,

incluyendo estrategias anti virulencia. Numerosos informes que describen la interferencia exitosa con la señalización de QS usando moléculas pequeñas, así como los avances en el conocimiento biológico del QS han sentado la base científica del potencial uso de los QQ para reducir la virulencia de cepas bacterianas patógenas¹. En el marco anterior ya se concedió una patente, otorgada a Suga, et al.⁷⁸, de agentes químicos de control eficaz de enfermedades bacterianas de importancia agrícola y hortícola. Estos compuestos con núcleo de pirimidinona⁷⁸ actúan como un inhibidor del *quorum sensing* y pueden ser usados para el control del fitopatógeno *Burkholderia glumae*.

1.2 Inhibidores de *quorum sensing*

Los antibióticos son reconocidos como agentes antimicrobianos eficaces para tratar enfermedades causadas por bacterias patogénicas. Los antibióticos tradicionales son bactericidas, o bacteriostáticos, que actúan en los procesos esenciales del ciclo de vida bacteriano, incluyendo la síntesis de la pared celular, la replicación del ADN, la transcripción de ARN o la síntesis de proteínas. Sin embargo, debido a la presión selectiva que imponen los antibioticos se ha venido observando la proliferación de cepas bacterianas resistentes⁷⁹. De otro lado, se han descubierto en muchos organismos sistemas de *quorum sensing*, incluyendo bacterias, hongos, células cancerígenas. Estos sistemas se pueden relacionar con la virulencia y tolerancia a diversos fármacos. Por lo tanto, la detección e inhibición del *quorum* se considera ahora como un *target* potencial para el desarrollo de agentes controladores de bacterias patógenas⁸⁰.

1.2.1 Mecanismos de acción de inhibidores de *quorum sensing*

El circuito de QS tiene varios puntos donde podría ser interrumpido para evitar así la comunicación bacteriana, y por ende la expresión del fenotipo regulado por el sistema, que puede estar involucrado en la patogenicidad de la cepa (Figura 1.3). Así, hasta el momento se han descrito cinco estrategias para el control de *quorum sensing*: 1) Inhibición de la producción de la señal; 2) Antagonismo de la molécula señal en su unión al receptor de la familia LuxR; 3) Degradación de las señales; 4) Captura de las señales y 5) Supresión de las actividades, estabilidad o producción de la sintasa y los receptores⁸⁰.

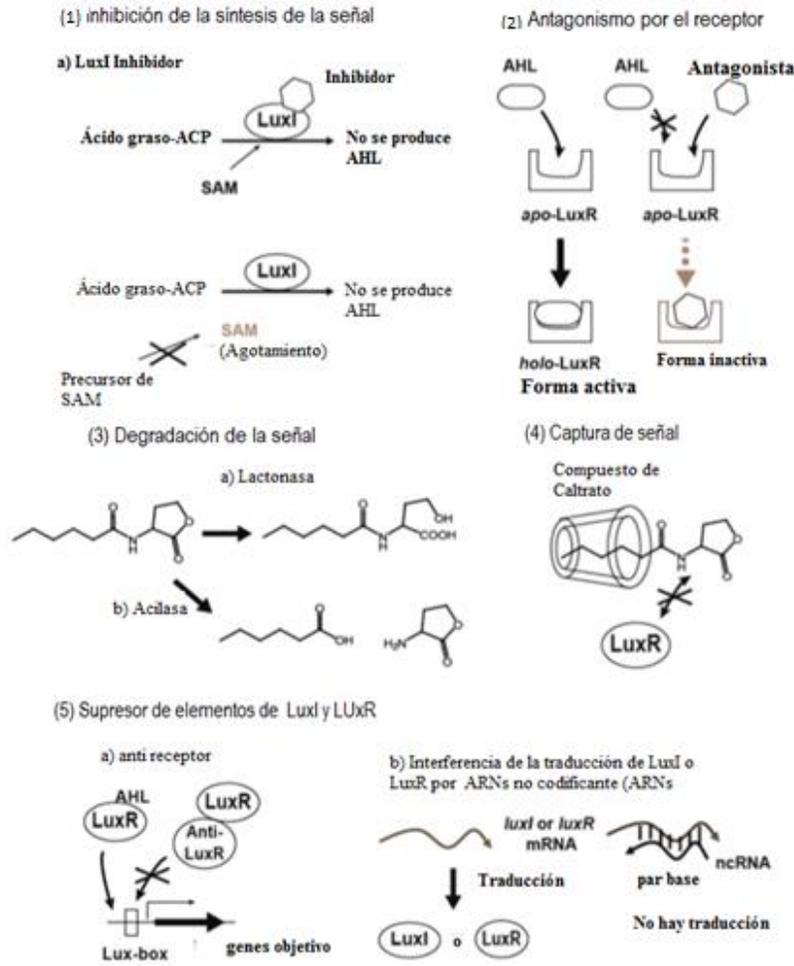


Figura 1.3 Mecanismos propuestos para la inhibición del *quorum sensing*. Tomado de Hirakawa⁸⁰.

A. Inhibición de la biosíntesis de las moléculas señalizadoras

Las AHLs son sintetizadas por proteínas tipo LuxI, a partir de derivados de ácidos grasos conjugados con la proteína transportadora de grupo acilo (acil-ACP) y un anillo de homoserinalactona, que proviene de la S-adenosilmetionina (SAM). Las diferentes proteínas tipo LuxI reconocen por igual al precursor común, SAM, y específicamente a la proteína acil-ACP, que contiene grupos acilo de diferente longitud de cadena y de diferente estado de oxidación en la posición C-3⁸¹. La síntesis comienza con un ataque nucleofílico sobre el carbono carboxílico C-1 de la molécula acil-ACP por parte del grupo amino de SAM, seguido por la lactonización de SAM que resulta en la formación del anillo y la liberación de la AHL⁸².

Del conocimiento anterior se pudo inferir que sustancias homologas a SAM (Figura 1.4), pueden ser recibidas por las proteínas tipo LuxI, reduciendo la síntesis efectiva de las AHLs naturales. Entre este tipo de compuestos se han identificado: L/D-S-adenosilhomocisteina, sinefungina y butiril-SAM (Figura 1.4), que han demostrado ser capaces de inactivar la sintasa RhII de *P. aeruginosa*, y por lo tanto actúan como inhibidores del QS^{83,84}.

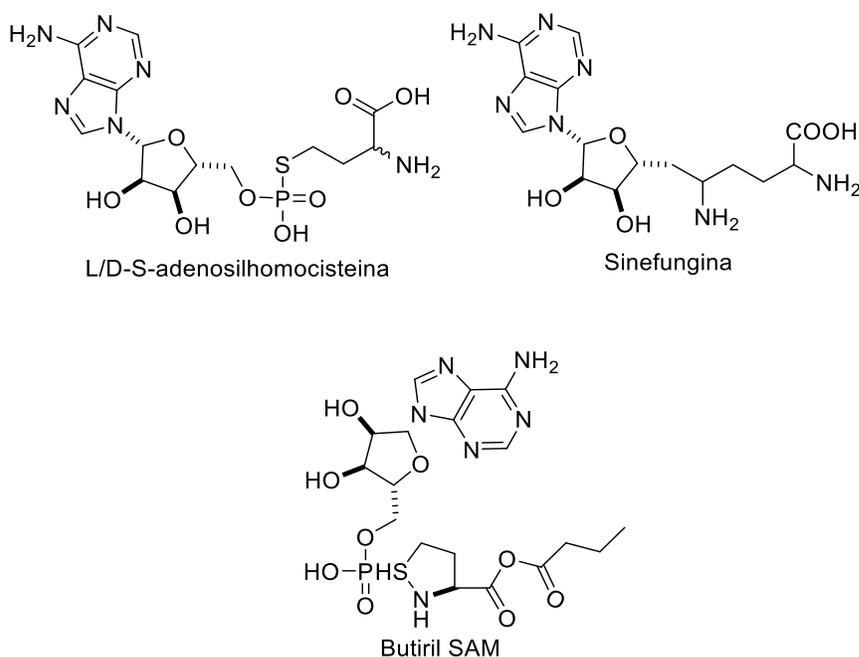


Figura 1.4 Sustancias homólogas a SAM e inhibitoras del QS. Tomado de Rasmussen 2006⁸⁵

B. Interferencia antagonista de las AHLs en su acción con luxR

Las AHLs actúan uniéndose directamente a los miembros de la familia de proteínas que son reguladores transcripcionales LuxR, de tal manera que el complejo LuxR /AHL activa o reprime múltiples genes diana incluyendo los que codifican para la AHL sintasa (por lo general un miembro de la familia de proteínas LuxI), dando lugar a un circuito de autoinducción positiva⁸². Así, un paso crucial en el circuito de *quorum sensing* es la formación del complejo AHL-proteína receptora LuxR, de modo tal que los antagonistas que interfieran con esa unión AHL-receptor serían inhibidores potenciales del QS (Figura 1.3). Varios compuestos naturales, y sintéticos, han mostrado esta actividad antagonista. En términos generales, se sabe que estos antagonistas son moléculas similares a las AHL, resultando en antagonistas potenciales de la señal nativa de AHL⁸⁰.

Muchos estudios han mostrado que el anillo láctónico de las AHLs juega un papel importante en la formación del complejo LuxR/AHL, y por esta razón se buscan moléculas

con estructura similar a la lactona, que puedan antagonizar la función de las AHLs. En el marco anterior, se encontró que furanonas halogenadas del alga roja *Delisea pulchra* son capaces de inhibir el *quorum sensing*, y se encontró que jugaban un papel muy importante como *antifoulants*, manteniendo limpia la superficie del alga⁸⁶. Estas bromo-furanonas naturales inspiraron la búsqueda de compuestos análogos con actividad QQ incrementada, buscando controlar la bacteria oportunista *Pseudomonas aeruginosa*. De este estudio se lograron identificar los derivados denominados C30 y C56 (Figura 1.5) como los más potentes⁸⁴. Otras lactonas han sido reportados como QQ, entre ellas la patulina y el ácido penicílico (Figura 1.5) producido por hongos⁸⁴. La patulina también ha sido probada como IQS contra *Salmonella typhi* que es un patógeno gramnegativo que causa enfermedades que van desde la gastroenteritis y la diarrea hasta el síndrome sistémico que pone en peligro la vida, con muy buenos resultados⁸⁷.

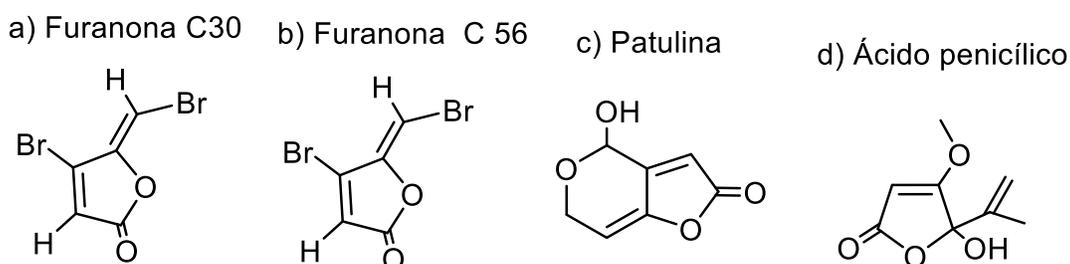


Figura 1.5 Sustancias homólogas a SAM e inhibitoras del QS. Tomado de: Rasmussen, et al. 2005⁸⁴

Otros compuestos naturales muy reconocidos por su actividad inhibitoria de QS son algunos azufrados, como por ejemplo la iberina, aislada del rábano picante⁸⁸, y el ajoeno, aislado del ajo (Figura 1.6)⁸⁹. Estos productos naturales inhiben el sistema de QS de *Pseudomonas aeruginosa* en uno o en los dos sistemas *las* y *rhl*, y pueden competir con las AHLs de *P. aeruginosa* por la unión a LasR o RhIR⁸⁴. Compuestos con esta capacidad de unirse a análogos de LasR son pocos, de hecho, solo se identificaron tres inhibidores de la proteína⁸⁰. Existen estudios recientes sobre algunos de estos compuestos que demuestran que actúan como IQS. Así, estudios *in vivo* mostraron una reducción significativa de la infección pulmonar en ratones tratados con ajoeno en comparación con los no tratados⁸⁹. Además, existe evidencia experimental que muestra que el ajoeno media su efecto inhibitorio de QS a través de la modulación de la expresión de ARNm de *rsmY* y

rsmZ en *P. aeruginosa*; y contra *S. aureus* mostrando la modulación de la expresión de rnaIII y otros genes importantes regulados por QS⁹⁰.

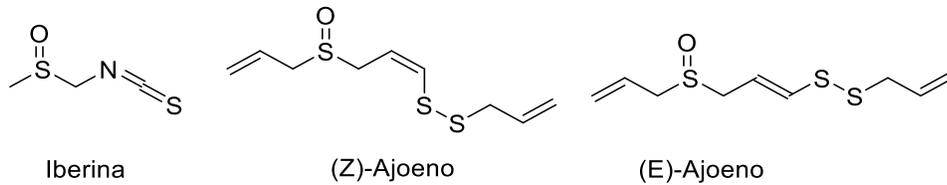


Figura 1.6 Moléculas inhibidoras del QS aisladas del rábano picante y el ajo. Fuente: Jakobsen TH, et al; 2012^{84,89}

La información de la estructura en 3D de los receptores de la familia de LuxR ha permitido el descubrimiento de una gran variedad de antagonistas. Sin embargo, esta información no es suficiente para la selección de moléculas candidatas, siendo necesario saber cómo se produce el cambio - conformacional en el receptor para distinguir entre un "verdadero ligando" (agonista) y "ligando falso" (antagonista). El análisis de la conformación estructural de la señal libre es actualmente una tarea difícil debido a que las proteínas de la familia LuxR se consideran inestables en ausencia de la señal, y son finalmente sometidas a proteólisis⁸⁰.

C. Degradación de señales

La tercera forma de inhibir el QS es por degradación de las moléculas señal, una vez que éstas han sido producidas Figura 1.3. Se ha observado que algunas plantas y bacterias son capaces de producir enzimas que las degradan²⁶. Se han identificado cuatro clases de enzimas catalíticas: las lactonasas, que abren el anillo de homoserinalactona^{91,92}, las amidasas (también denominadas amidohidrolasas o acilasas) que escinden AHLs en el enlace amida y liberan la unidad de ácido graso⁹³, las reductasas que reducen la cetona del carbono 3, en aquellas AHLs que las tienen, en un hidroxilo^{94,95} y las citocromo oxidasas que catalizan la oxidación de la cadena acilo⁹⁶. Otra estrategia para degradar las AHLs aprovecha el hecho de que los pH básicos provocan la lisis de las lactonas en ellas; así, se puede citar como ejemplo algunas plantas, que cuando son infectadas por bacterias patógenas que usan sistemas de *quorum sensing* incrementan el pH en la zona de infección para controlar la expresión de factores de virulencia, reduciendo de esta forma el ataque^{6,83,85}.

También se evidencia la degradación de otras moléculas señal¹⁹ como estrategia biológica para minimizar la infección, tal es el caso de la degradación del 3-OH-PAME (Acido-3-Hydroxipalmítico metil ester) involucrado en la regulación de la virulencia en *Ralstonia*⁹⁷. Al igual que la molécula DSF producida por *Xanthomonas*⁹⁸, y el PQS de *Pseudomonas*⁹⁹. Las dicetopiperazinas también pueden degradarse por actividades microbianas de una manera no específica, es decir independientemente de su función de señal QS¹⁰⁰.

D. Captura de señales

Este cuarto mecanismo de inhibición, se ha identificado como una alternativa para atenuar la detección del *quorum* bacteriano en sistemas que usan como moléculas autoinducidas las AHL, y se basa en que el QS no se produce cuando se mantiene la concentración de AHL por debajo de un nivel de umbral, por tanto, una molécula interceptora de AHL actuaría como un inhibidor de la detección del *quorum* (Figura 1.3). Como agentes interceptores de las moléculas señalizadoras se han empleado las ciclodextrinas, que son reconocidas por formar complejos con compuestos orgánicos. En un estudio inicial se ensayó con la bacteria *P. aeruginosa*, que tiene un sistema de QS dependiente de C4-HSL, se hicieron ensayos con el cultivo en presencia de ciclodextrinas, y se ocluyó la AHL nativa, lo que resultó en la supresión génica de la *rhIA*, demostrando la utilidad de la técnica¹⁰¹. Ensayos con C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL, y 3-oxo-C6-HSL de *Serratia marcescens* demostraron que estas homoserin lactonas pueden ser atrapadas por las ciclodextrinas, lo que se traduce en la disminución de la producción del pigmento rojo conocido como prodigiosina y que es inducido por QS⁰⁰. El uso de ciclodextrinas como método de inhibición de QS está en estudio¹⁰³, y debe superar problemas técnicos como la baja solubilidad de las ciclodextrinas, y la pobre estabilidad del complejo de inclusión de ciclodextrina-AHL, para que su uso pueda tener éxito en el futuro^{80,104}.

E. Supresores de *Quorum sensing*

Se conoce que algunas bacterias que tienen sistemas de *quorum sensing* presentan elementos reguladores que impiden la percepción de la densidad de su población. Las implicaciones fisiológicas de un mecanismo de modulación intrínseca del *quorum sensing* podría ser un método inhibitorio de QS, dado que sería posible manipular artificialmente su función regulatoria⁸⁰.

Existen activadores Anti-LuxR que inhiben la activación del *quorum sensing* en *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas aeruginosa*. TrIR de *Agrobacterium*

tumefaciens es un homólogo de TraR, una proteína receptora de AHL pero que carece de un dominio de unión a ADN¹⁰⁵. La proteína forma un heterodímero inactivo con TraR.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ que interactúa con TraR para evitar su unión al ADN; que confiere una acumulación constitutiva de señal de AHL incluso en ausencia de octopina, que es un iniciador de *quorum sensing*, y también confieren eficacia de conjugación del megaplásmido con activación excesiva del *quorum sensing*. Como anti-TraR en *Agrobacterium tumefaciens*, QslA es una proteína anti-LasR en *Pseudomonas aeruginosa*¹⁰⁹. Se ha reportado de mutantes en el gen *qslA* son capaces de responder a niveles más bajos de la señal de *quorum sensing* que la cepa parental, lo cual resulta en una mayor actividad de *quorum sensing*, como la producción elevada de exo-proteasa y elastasa. QscR, ha sido catalogado como una proteína de la familia Lux R-solo en *Pseudomonas aeruginosa*, inhibe una serie de genes activados por LasR-RhLR mediante la interacción proteína-proteína con LasR y RhLR, respectivamente, y suprime la virulencia en un modelo de infección con *Drosophila*^{110,111}. La pequeña proteína única QteE controla la estabilidad de la proteína LasR en *Pseudomonas aeruginosa*, pero no afecta su transcripción ni traducción¹¹². El mutante *rsaL* da como resultado una producción ilimitada de 3-oxo-C12-HSL, sin embargo, la sobreproducción de la proteína produce un nivel más bajo de proteínas de virulencia, por lo que *RsaL* maneja la homeostasis del *quorum sensing*⁸⁰.

F. Estrategias para la detección e identificación de compuestos con actividad inhibitoria de QS y falsos positivos

Para la identificación de compuestos capaces de inhibir el QS, un enfoque muy utilizado consiste en el *screening* de diferentes organismos, entre los que se incluyen plantas medicinales, cultivos celulares, tejidos y bibliotecas químicas utilizando varios biosensores de señal QS bacteriana⁶. Este tipo de muestras se analizan buscando observar la supresión del fenotipo gobernado por QS, por eje. el color, luminiscencia etc, sin afectar el crecimiento del biosensor.

Sin embargo, estas pruebas no se consideran concluyentes para la determinación de la actividad inhibitoria del QS de un compuesto determinado. Para optimizar el *screening* es necesario realizar otro tipo de pruebas como el sistema selector de inhibidores de QS¹¹³.

Desouky et al. (2013) desarrollaron un sistema para identificar compuestos QQ que se regulan por QS mediada por péptidos cíclicos en bacterias gram-positivas. Se basa en el uso de los sistemas *agr* y *fsr* de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*,

respectivamente. Combina una cepa reportera *S. aureus agr* que porta los genes de luciferasa y de proteína verde fluorescente bajo el control del promotor *agr*. y con un ensayo de inducción de gelatinasa para examinar el sistema QS de *E. faecalis fsr* y buscar compuestos inhibidores de QS¹¹⁴.

Para determinar la concentración máxima a la cual el biosensor no se ve afectado en el crecimiento pero se logra una inhibición del fenotipo regulado por QS, se debe incubar una serie de diluciones de cada extracto y determinar si el compuestos a probar no afecta el crecimiento del biosensor, pero genera reducciones o incrementos de la expresión del fenotipo controlado por QS¹¹³.

1.2.2 Relevancia del estudio de *quorum sensing* y sus antagonistas

El descubrimiento de que el *quorum sensing* regula diversas funciones, como la formación de *biopelículas*, factores de virulencia bacteriana, producción de antibióticos, transferencia de plásmidos conjugados, pigmentación, producción de exopolisacáridos (EPS), ha atraído la atención de muchos grupos de investigación. Así, la caracterización de sistemas de *quorum sensing* se ha convertido en un tema muy relevante, ya que muchos agentes patógenos de plantas y humanos regulan la expresión de sus factores de virulencia por medio de sistemas de QS¹³. Entre los cientos de genes regulados por QS, los genes más ampliamente estudiados han sido los relacionados con la virulencia. Estos genes son de particular interés porque la disrupción QS está siendo investigada como una estrategia para controlar patógenos virulentos, en particular aquellos multiresistentes a antibióticos de última generación¹¹⁵. Así, los estudios sobre la inhibición del *quorum sensing* se han incrementado en las últimas dos décadas, llegando a más de 150 artículos por año (Figura. 1.7).

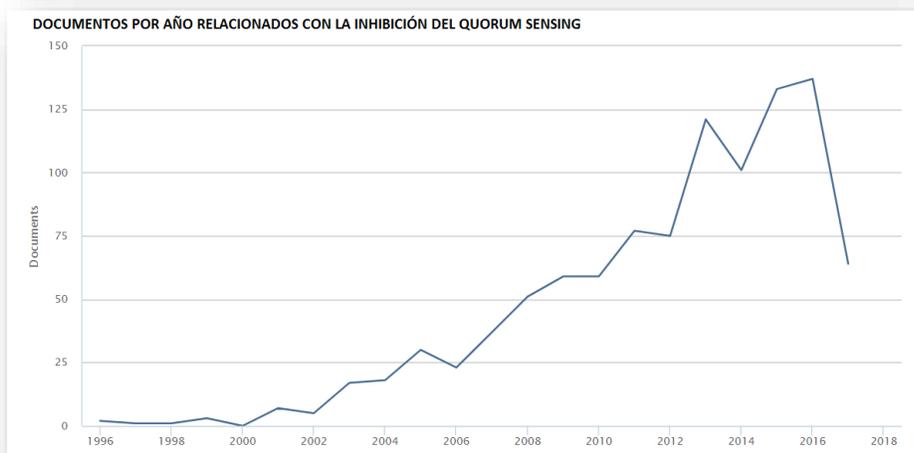


Figura 1.7 Documentos relacionados con la inhibición del *quorum sensing* por año.
Fuente: SCOPUS ELSEVIER 2017

Durante el desarrollo de estas investigaciones en QS han venido apareciendo conceptos y términos novedosos tales como el *quorum quencher*, antivirulencia, detección de difusión, transferencia de masa (con más señales que implican tasas de transferencia de masa más bajas) y sociomicrobiología^{4,6}. El término *quorum quenching* se refiere a todos los procesos involucrados en la perturbación de QS^{6,79,116}, inicialmente se usaba el término inhibición de QS, pero en los últimos cinco años se ha incrementado el uso del término QQ⁶. Los actores moleculares involucrados en el QQ son diversos en su estructura (enzimas, moléculas pequeñas), el modo de acción (clivaje de señal QS, inhibición competitiva, etc.) y la diana de acción sobre la que actúan. Lo anterior gracias a que varios puntos del proceso de percepción de la señal y la regulación de la transcripción. Normalmente, las enzimas que inactivan las señales QS se denominan enzimas QQ, mientras que los compuestos orgánicos que alteran las vías QS se denominan inhibidores de QS (IQS). Los parámetros físicos, como la temperatura y el pH, también pueden afectar la vida media de las señales QS⁶. En esta tesis se usará el término QQ para referirnos a compuestos capaces de inhibir el QS.

El *quorum quenching* se considera como un mecanismo natural desarrollado por a) los mismos organismos emisores de las señales involucradas en el QS para reciclar o limpiar sus propias señales; o b) por otros organismos que en una relación competitiva con los primeros organismos emiten señales para interrumpir los sistemas QS de los primeros. Las

investigaciones sobre *quorum quenching* se han incrementado para desarrollar estrategias dirigidas a controlar patógenos y poblaciones invasoras, tanto en el campo de la medicina, como la agronomía e incluso en la ingeniería de aguas. El desarrollo de tratamientos basados en la interferencia QS es en gran medida impulsado por la necesidad de enfoques alternativos o complementarios a los antibióticos⁶. En el gráfico siguientes se muestran los resultados de la búsqueda del término *quorum quenching* en SCOPUS (desde 1997 hasta septiembre de 2017) clasificados por áreas de conocimiento, en él se puede observar que áreas como la bioquímica-genética, inmunología-microbiología, medicina y farmacología, son las más importantes (Figura 1.8).

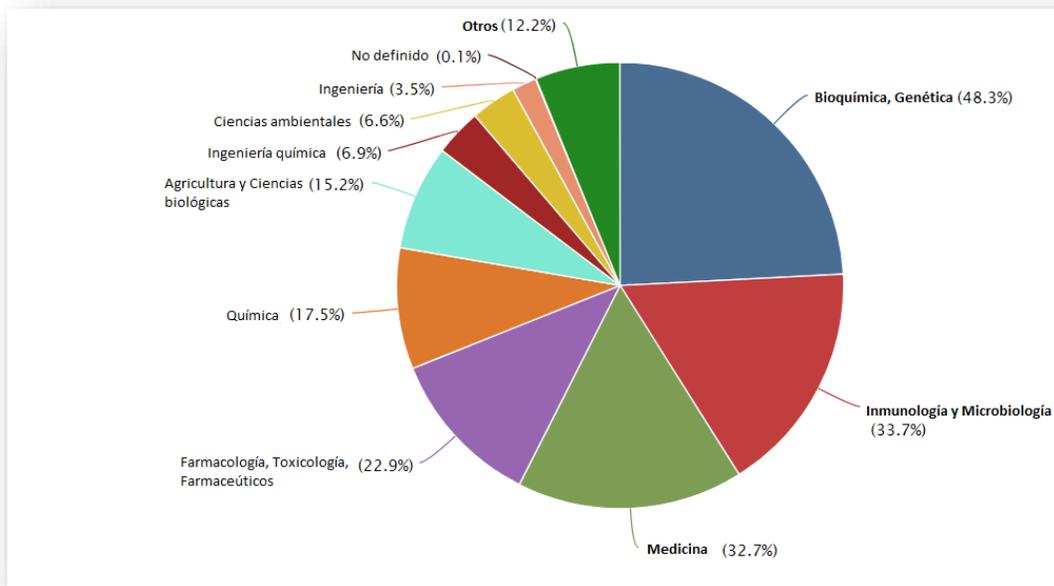


Figura 1.8 Documentos por año relacionados con la inhibición del *quorum sensing*.

FUENTE: SCOPUS ELSEVIER 2017

A continuación, se presenta una visión general de la situación actual en los tres tópicos de mayor relevancia en el estudio de inhibidores de QS

A. Salud humana

Los antibióticos siguen siendo la principal opción de tratamiento contra infecciones bacterianas. No obstante, su uso inadecuado ha llevado al aumento en la resistencia de las bacterias patógenas a múltiples fármacos. Esta realidad ha orientado la investigación hacia la búsqueda de medidas para el tratamiento terapéutico, lo que se conoce como la

era post-antibiótica¹¹⁷. Los sistemas de *quorum sensing* permiten un ataque coordinado de la comunidad bacteriana sobre el huésped que se da solo cuando la comunidad bacteriana ha alcanzado cierto nivel de organización y de densidad poblacional¹⁹.

Hasta la fecha, sólo se han llevado a cabo algunos ensayos clínicos piloto, con resultados prometedores, que comprenden el uso de azitromicina como inhibidor de QS en el tratamiento de la neumonía asociada a los ventiladores en los hospitales ¹¹⁸. Las biopelículas son estructuras microbianas complejas que limitan la eficacia de las moléculas de antibióticos y de las células inmunitarias para alcanzar sus objetivos microbianos. Como consecuencia, la alteración de estas biopelículas hace que las células bacterianas sean más susceptibles a los tratamientos. Sin embargo, algunas dificultades en este ensayo arrojaron resultados positivos solo en un subgrupo de pacientes, por lo que los resultados sobre la efectividad del uso de esta molécula no son concluyentes.

En otro estudio se pudo establecer que la combinación de antibióticos (tobramicina) y compuestos QQ (furanona o ajoeno) permiten una mayor eliminación de *Pseudomonas aeruginosa* en ratones¹¹⁹. Otro ejemplo del uso de compuestos QQ en medicina es el de Givskovand *et al.*, quienes, en un ensayo clínico con 26 pacientes con fibrosis quística, con diagnóstico de *Pseudomonas aeruginosa* en los pulmones. A estos pacientes durante un período de 8 semanas se les suministró aceite de ajo, en una concentración de 656 mg/día. Una cantidad muy por debajo de la toxicidad del aceite para la bacteria patógena. Aunque los pacientes mostraron mejoras en el ensayo, la evaluación general no fue concluyente y se necesita aún validar esta teoría con ensayos clínicos a mucho mayor escala¹²⁰.

En términos generales, se entiende que la aplicación de la inhibición del *quorum sensing* dirigida a la salud humana requiere más investigación antes de poder integrarse plenamente como una práctica médica convencional¹². Como regla general, sin embargo, el uso terapéutico de inhibidores de QS en humanos como un único tratamiento parece menos concebible que la utilización en estrategias terapéuticas integradas con antibiótico¹²¹.

B. Tratamiento de aguas

En los últimos años, el tratamiento de aguas residuales ha involucrado el uso de biorreactores de membrana (MBR) antes de ser descargados al medio ambiente para su reutilización. Sin embargo, un reto importante para la implementación de los MBR es la

formación de biopelículas, causada por comunidades de bacterias, sobre la superficie de la membrana lo que disminuye su eficiencia¹²². En estos lodos activados se encontraron una gran cantidad de bacterias capaces de producir AHLs¹²³. Varios estudios en la literatura han tratado de aliviar la formación de biopelículas en sistemas de membrana mediante la inhibición de señales de *quorum sensing*¹².

Una alternativa para disminuir las biopelículas es el uso de bacterias que sean capaces de producir enzimas que degraden las AHLs¹²⁴. Así, Oh et al. usó esta estrategia para el control del *biofouling* en un biorreactor de membrana (MBR) que se usa para el tratamiento de aguas residuales; para esto usó una *E. coli* recombinante capaz de producir AHL-lactonasas¹²⁵ y una cepa de *Rhodococcus* sp. propia de las MBR que se encapsularon en una membrana de fibra hueca y se colocó en el biorreactor obteniéndose, muy buenos resultados en el control de la formación de biopelículas¹²⁵.

C. Agricultura

Un sector agrícola bien desarrollado protege la seguridad alimentaria de una nación, y la calidad de los alimentos producidos tiene un impacto significativo en los ingresos y la salud de los consumidores, lo que ha estimulado a los investigadores a mejorar la productividad de los cultivos¹². Bloquear la comunicación de los microorganismos sirve como una táctica eficaz para interrumpir las acciones de cooperación entre las bacterias para invadir a sus huéspedes vegetales. De hecho, ahora se conoce que la interferencia de la comunicación existe naturalmente entre microorganismos y plantas¹⁹. La inhibición de las moléculas autoinductoras de *quorum sensing* para controlar las enfermedades en plantas, y la estimulación de moléculas señal puede ser usada para regular fenotipos beneficiosos para el huésped. Estudios recientes han demostrado que las plantas pueden producir y secretar varios compuestos que imitan las señales de QS de las bacterias y, por lo tanto, tienen el potencial de inhibir activamente el QS en las bacterias; Sin embargo, no se conocen las estructuras químicas de estos compuestos, por lo que la identificación y síntesis química son fundamentales para analizar el mecanismo de acción de estos compuestos imitadores, así como determinar sus efectos sobre las bacterias benéficas, e identificar las vías enzimáticas de la síntesis de estos compuestos. Todo lo anterior para explorar su uso para mejorar la salud de plantas y animales².

Erwinia carotovora (*Pectobacterium carotovorum*) es un fitopatógeno que causa la pudrición blanda en una variedad de plantas. La patogenicidad de esta bacteria depende

de la producción de una variedad de enzimas capaces de degradar tejidos vegetales, que incluyen pectatoliasas, poligalacturonasas, celulasas, y proteasas. Estas enzimas están implicadas en la maceración de tejido vegetal, que es un proceso necesario para la colonización bacteriana. La producción de estas enzimas está regulada por homólogos de LuxRI: ExpR y Expl. El papel exacto de ExpR en la regulación de la exoenzima aún no está claramente definido. De otro lado, *E. carotovora* ha desarrollado una sofisticada estrategia para contrarrestar la competencia, y es la producción de carbapenema, un antibiótico de amplio espectro, cuya producción está regulada mediante el uso de un segundo sistema de *quorum* regulado por CarR y Carl; este último es responsable de la síntesis de 3-oxo-C6-AHL⁸. En otro ejemplo, AiiA una enzima producida por *Bacillus* sp. 240B1 que tiene el potencial de reducir la patogenicidad de *E. carotovora*¹¹⁶ hidrolizando el enlace lactona de las AHL producidas por el fitopatógeno. Experimentos posteriores, mostraron que las plantas que eran capaces de producir AHL-lactonasas, mostraban una resistencia significativamente mayor ante la infección¹¹⁶

Otro mecanismo de defensa usado es la inserción de genes artificiales en el ácido desoxirribonucleico (ADN) de una planta con la capacidad de producir enzimas capaces de actuar como *quorum quenchers*. La ingeniería de la enzima QQ "lactonasa" en plantas de papa y tabaco, la cual ha reducido el potencial de patógenos para causar enfermedades¹¹⁶. Además de las modificaciones artificiales, se ha reportado que la bacteria *Microbacterium testaceum* tiene un efecto natural de degradación de AHL sobre las hojas de papa. Estas bacterias se multiplican en la superficie de las hojas a una densidad lo suficientemente alta como para suprimir las moléculas de señalización, evitando así la aparición de enfermedades como la podredumbre blanda¹²⁶, causada por *Erwinia carotovora*.

1.2.3 Fuentes de compuestos *quorum quenchers*

La búsqueda de compuestos capaces de inhibir el *quorum sensing*, o *quorum quenchers* (QQ), es una alternativa prometedora para el control de la virulencia, debido a que no ejerce presión selectiva sobre las cepas, lo que podría generar resistencia como es el caso de los antibióticos¹⁵.

Los compuestos QQ han sido identificados en varias fuentes, se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con su peso molecular: a) compuesto de bajo peso molecular y b)

compuestos macromoleculares. Los primeros también se conocen como inhibidores de QS, y comprenden también los productos naturales; mientras los segundos, corresponden principalmente a enzimas y en general reciben el nombre de *quorum quenchers*. Inicialmente, se usó el término *quorum quenching* para describir la degradación enzimática de señales AHL, e inhibidores de QS (IQS) para las moléculas pequeñas (eje. productos naturales) antagonistas moleculares de las moléculas señalizadoras. Recientemente, el término *quorum quencher* se está usando de una forma más amplia, con una connotación para describir cualquier forma de interferencia¹²⁷.

A. Compuestos QQ obtenidos a partir de plantas

Las plantas han evolucionado con bacterias asociadas y han establecido una cuidadosa relación con ellas. Por lo tanto no debe sorprender que las plantas sean capaces de percibir y responder a señales bacterianas¹²⁸. Investigaciones en búsqueda de QQ han permitido establecer que muchos extractos de plantas actúan como QQ, y que en algunos casos presentan compuestos estructuralmente similares a las moléculas señal (AHLs). También se ha observado que algunos compuestos producidos por plantas son capaces de degradar los receptores y las señales (Lux R, LasR)¹²⁹. Algunos ejemplos se describen a continuación, siendo importante aclarar que hay muchos ejemplos en la literatura donde tan solo se identifican extractos activos sin llegar a identificar los compuestos responsables de dicha actividad:

En el estudio realizado por Husain et al. (2017) se investigó la actividad QQ de los extractos foliares de *Mangifera indica* L. (mango) encontrando que los extractos metanólicos son activos contra *Chromobacterium violaceum*, interfiriendo en la producción de la violaceína. La actividad QQ también se manifiesta en la reducción de la elastasa (76%), la proteasa total (56%), la piocianina (89%), la quitinasa (55%), la producción de exopolisacáridos (58%) y la motilidad en hinchazón (74%) en *Pseudomonas aeruginosa* PAO 1. El análisis fitoquímico de los extractos activos reveló un contenido muy alto de compuestos fenólicos en extracto metanólico, y un total de 14 compuestos fueron detectados por GC-MS y CLAE¹³⁰.

La invasión de nódulos de raíces de plantas por parte de *Sinorhizobium meliloti* requiere la presencia de al menos uno de los dos exopolisacáridos (succinoglucosa y exopolisacárido II [EPS II]). La producción de estos dos tipos de EPS está regulada por sistemas de QS. Ésta se ve interrumpida en presencia del QQ: amino ácido *L*-canavenina

(Figura 1.9a), que es un análogo de arginina y es producido por semillas de la leguminosa *Medicago sativa*. Se cree que el mecanismo de inhibición está relacionado con la interferencia en los cambios conformacionales de la proteína reguladora de ExpR en esta bacteria, necesaria para la transcripción de los genes *eps*¹³¹.

El extracto de *Vainilla planifolia*, comúnmente conocida como vainillina, es utilizado como una especia y saborizante. Además, ha demostrado que reduce significativamente la producción de violaceína en *C. violaceum* CV026. El extracto de vainilla contiene principalmente vainillina (85.0%), *p*-hidroxibenzaldehído (8.5%), 4-hidroxibenzil-metil-éter (1.0%) y algunos ácidos, ésteres, fenoles e hidrocarburos¹³². No obstante, no se ha establecido cuál, o cuáles, compuestos son los responsables de la actividad observada para el extracto, esta situación es desafortunadamente común en el estudio de extractos de plantas, y particularmente cierto para el caso de los aceites esenciales¹³³.

Los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), *Cinnamomum spp.* (canela), *Lavandula angustifolia* (lavanda) y *Mentha spicata* (menta) poseen actividad inhibitoria de QS. El análisis por CG-EM del aceite de clavos mostró que el eugenol es el constituyente mayoritario, además se reporta la presencia de otros constituyentes minoritarios como el β -cariofileno; isocariofileno; óxido de cariofileno; 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metil etil) naftaleno y el acetato de linalilo (Fig. 1-9 b). Sin embargo, el ensayo del eugenol puro no mostró inhibición de QS por lo que el compuesto responsable de la actividad del aceite no ha sido determinado¹³⁴, y probablemente se deba a otros ingredientes, como α -cariofileno y/o β -cariofileno, pudiendo actuar en forma individual o en combinación con otros ingredientes.

Los estudios en plantas también han estado dirigidos a compuestos fijos. Se determinó el galato D(-)-epigallocatequina, el ácido elágico y ácido tánico (Fig. 1-9 c) causan inhibición de biopelícula, la motilidad, *swarming*, la bioluminiscencia, y la fluorescencia, en bacterias como *E. coli*, *B. cepacia*, *P. putida*. El galato D(-)-epigallocatequina resultó ser el compuesto más activo, seguido del ácido elágico. Sin embargo, el ácido tánico no presentó actividad en los ensayos de inhibición de biopelícula, ni en los de motilidad *swarming*¹²⁸.

El extracto etanólico de *Cassia alata* L., una hierba medicinal ampliamente utilizada en el tratamiento de infecciones microbianas, mostró tener actividad inhibitoria de QS contra el biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026 y *C. violaceum wild type*. La fracción rica

en flavonoides mostró una inhibición del 50% de la producción de violaceína en *C. violaceum*. En el caso de *P. aeruginosa* PAO esta fracción inhibió significativamente los siguientes factores de virulencia: producción de piocianina, actividades elastolíticas y proteolíticas, *swarming* así como la formación de *biopelículas*. Los flavonoides encontrados fueron: quercetina, quercetrina y kaempferol, y cuando se probaron de manera individual también tuvieron actividad inhibitoria del QS¹³⁵.

En un estudio realizado por Castillo Juárez¹³⁶ se evaluó el potencial de inhibición de *quorum sensing* de una mezcla de ácidos anacárdicos (AAM) aislada de *Amphipterygium adstringens*, una planta medicinal conocida como "cuachalalate". La actividad de AAM fue investigada por la restricción de la producción de ramnolípidos y piocianinas, así como la disminución de la actividad de la elastasa, siendo factores de virulencia controlados por QQ en *Pseudomonas aeruginosa* y *Chromobacterium violaceum*. Como era de esperarse, la inhibición en la producción de violaceína no afectó la viabilidad de la bacteria, pero se demostró que AAM inhibió la producción de piocianina (86% a 200 mg/ml) y ramnolípido (91% a 500 mg/mL); y disminuyó la actividad de elastasa (75% a 500 mg / mL) en *P. aeruginosa* sin afectar su desarrollo¹³⁶.

En un estudio dentro de nuestro grupo de investigación, se ensayaron múltiples extractos de plantas, esponjas y corales. El extracto más activo del conjunto fue de *Cecropia pachystachya*, una planta del Brasil. El estudio bioguiado del extracto polar permitió identificar a los flavonoides C-glicosidados y a la rutina como los compuestos responsables de la actividad IQS contra *C. violaceum*⁸³.

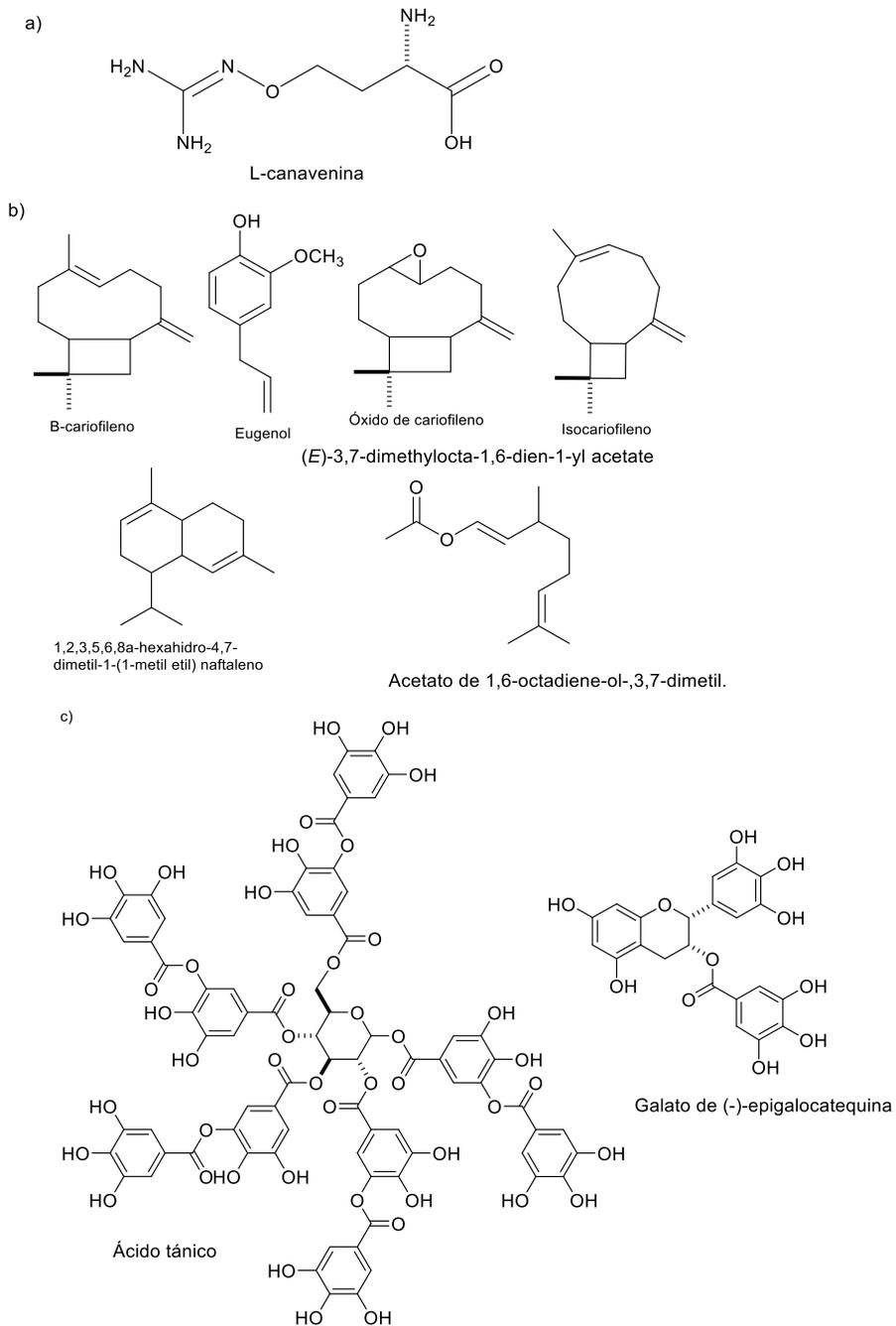


Figura 1.9 Moléculas con probable actividad inhibitoria de QS aisladas a partir de plantas. Tomado de Keshavan¹³¹; Khan¹³⁴; Choo¹³²

B. Compuestos aislados de organismos marinos con actividad QQ

Los océanos contienen el volumen más grande de seres vivos en el planeta "azul", habitado por aproximadamente 235-250.000 especies descritas, incluyendo casi todos los

grupos taxonómicos. La diversidad de especies, y sus roles ecológicos y evolutivos, han hecho de los organismos marinos una fuente atractiva de moléculas con potencial farmacológico¹³⁷. Existen pocos ejemplos de búsquedas sistemáticas de QQ en organismos marinos, a pesar del probado éxito que éstos han tenido en otras ramas de la medicina, particularmente en la búsqueda de anticancerígenos¹³⁸.

Skindersoe y colaboradores llevaron a cabo una evaluación de la actividad inhibitoria de *quorum sensing* de 284 extractos de diferentes especies marinas, entre las que están algas, ascidias, esponjas y corales (duros y blandos), provenientes de la Gran Barrera de Arrecife de Australia. Dichos estudios permitieron determinar que el 23% de los extractos fueron activos sobre un sistema de *quorum sensing* regulado mediante un mecanismo tipo LuxR. De ellos el 56% fueron activos como QQ frente a *P. aeruginosa*. Esta evaluación permitió la identificación de manoalida, el monoacetato de manoalida y la secomanoalida (Figura 1.10 a), de la esponja *Luffariella variabilis*, como compuestos capaces de inhibir el *quorum sensing*⁸⁶.

La macroalga marina *Ahnfeltiopsis flabelliformis* produce floridósido, betonicina y ácido isetionico (Figura 1.10 b), los cuales en mezcla interfieren con el QS dependiente de AHLs. Ni el ácido isetionico, ni floridosido mostraron actividad cuando fueron ensayados de manera individual contra *Agrobacterium tumefaciens* NTL4; sin embargo, cuando se combinaban lograban inhibir el QS de manera dependiente de la dosis. Los mecanismos de acción de estos compuestos son desconocidos^{139,140}.

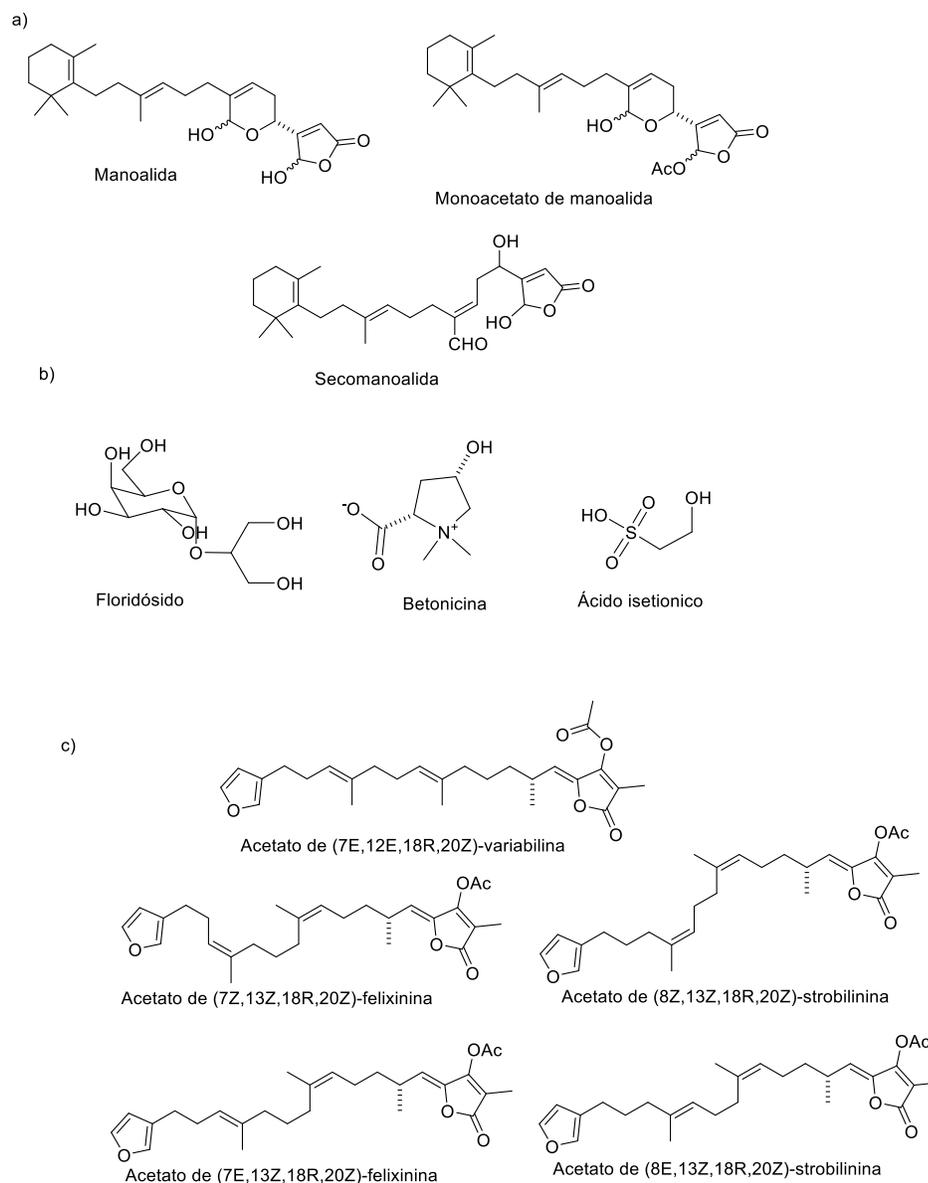


Figura 1.10 Compuestos con actividad QQ obtenidos a partir de organismos marinos. Tomado de: Vanegas, J.F. 2011; Skindersoe, M.E., 2008; Liu, H.B., 2008^{86,140,141}

De las esponjas *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix*, colectadas en el Caribe colombiano, se lograron aislar sustancias inhibitoras de QS. En ambas esponjas se encontraron como sustancias activas ácidos grasos con cadena entre 14 y 26 átomos de carbonos. Adicionalmente, de la esponja *Ircinia felix* se aisló una fracción rica en furanosesterterpenos que presentó actividad QQ moderada, sin afectar el crecimiento del biosensor. Estructuralmente estos furanosesterterpenos están relacionados con las AHLs y otros QQ; lo anterior puede explicar la actividad QQ contra *C. violaceum* ATCC 31532¹⁴¹.

Tello *et al.*, aislaron ocho cembranoides a partir del extracto orgánico del octocoral *Pseudoplexaura flagellosa* del Caribe colombiano. Se evaluaron sus propiedades *antifouling* mediante ensayos de inhibición del QS y bioensayos de inhibición del biopelículas; tres de los compuestos evaluados ((8S)-Dihidroplexaurolone; (8R)-Dehidroxiplexaurolone y (8S)-Dehidroxiplexaurolone) mostraron buena actividad como compuestos QQ contra *Chromobacterium violaceum*, y cuatro ((8S)-Dihidroplexaurolone; (8S)-Dehidroxiplexaurolone, (8R)-Dehidroxiplexaurolone y (8R)-Dehidroxiplexaurolone) exhibieron inhibición en la maduración del biopelículas sin interferir en el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio harveyi* y *Staphylococcus aureus*¹⁴²⁻¹⁴⁴. En otro estudio se aislaron tres nuevos cembranoides diterpenoides, knightol, acetato de knightol y knightal, junto con el conocido como asperdiol y acetato de asperdiol, como compuestos principales del octocoral *Eunicea knighti* recolectada en el caribe colombiano. Además, se obtuvieron cinco compuestos semisintéticos mediante transformaciones químicas de los compuestos naturales. Todos los compuestos se analizaron en cuanto a la actividad de inhibición de bioluminiscencia controlado por QS contra *Escherichia coli* ps40 y *Pseudomonas putida* IsoF. Tres de los compuestos resultaron activos^{143,145}

C. Compuestos aislados de microorganismos con actividad inhibitoria de QS

Los microorganismos marinos son particularmente atractivos en términos de su potencial aplicación biotecnológica, debido a que: (a) no se han explorado ampliamente, como sus contrapartes terrestres; y (b) poseen potentes compuestos bioactivos que son eficaces aún en bajas concentraciones considerando que deben actuar a bajas concentraciones, pues es claro que el volumen de agua en ambientes marinos es enorme¹⁴⁶. Hasta hace poco, la incapacidad para cultivar microorganismos marinos en el laboratorio había limitado severamente el estudio de los ecosistemas microbianos naturales, y se ha estimado que se ha cultivado mucho menos del 1% de microorganismos observados microscópicamente¹⁴⁷.

La exploración de metabolitos secundarios provenientes de microorganismos marinos ha conducido al descubrimiento de numerosos compuestos biológicamente activos que poseen actividad antibiótica, antitumoral y otras actividades farmacológicas. De hecho, actualmente se están usando para el tratamiento de varias enfermedades en los seres humanos, animales y plantas¹⁴⁸, entre ellos se pueden destacar la resistencia a antibióticos producida por bacterias patógenas como *P. aeruginosa*. O la presencia de tumores.

Entre las actividades biológicas exploradas está la inhibición de la comunicación celular, o QQ. Las bacterias marinas que exhiben actividad inhibitoria del QS pertenecen no sólo a las clases de Alfa y Gamma proteobacterias, sino también a Actinobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes. Estas bacterias capaces de producir compuestos QQ se han aislado a partir tanto de biopelículas microbianas como de ambientes pelágicos^{149,150}. Es más, algunos estudios han mostrado que entre el 14% y el 18% de las bacterias cultivables tienen actividad lactonasa o acilasa, capaz de inhibir el QS^{149,151}.

En un estudio realizado por Romero *et al.*¹⁴⁹ sobre la prevalencia de bacterias marinas capaces de interferir con QS, se examinaron ciento sesenta y seis cepas aisladas de diferentes comunidades microbianas marinas. Se valoró su capacidad para interferir con la actividad de la AHL. Veinticuatro cepas (14,4%) fueron capaces de eliminar o reducir significativamente la actividad de *N*-hexanoil-L-homoserina lactona detectada por el biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026, un porcentaje mucho mayor que el reportado para aislados del suelo. Esto podría indicar que los fenómenos de interferencia del QS son frecuentes en el medio marino. Los aislamientos activos pertenecían a nueve géneros diferentes de origen predominantemente o exclusivamente marino, incluidos miembros de las bacterias *Alfa* y *Gamma proteobacteria* (8), Actinobacteria (2), Firmicutes (4) y Bacteroidetes (1), todos los aislamientos fueron confirmados por inactivar enzimáticamente las señales AHL por HPLC-MS.¹⁴⁹ No obstante lo anterior, no se identificaron los compuestos/enzimas responsables de la actividad.

Dentro de las bacterias más estudiadas están las cianobacterias de las que se han aislado moléculas como la 8-epi-malingamida C (Figura. 1.11 a), y el ácido língbico [(4*E*, 7*S*)-7-metoxitradec-4-enoico], obtenidas a partir de *Lyngbya majuscula* recolectada en Dry Tortugas, Florida¹⁴⁸. Estos compuestos tienen la capacidad de inhibir los genes de expresión de QS de *Chromobacterium violaceum* [80]. Adicionalmente, se encontró que los dos compuestos eran citotóxicos para las células HT29 de cáncer de colon y tienen la capacidad de inhibir la percepción de *quorum* bacteriano en un ensayo de gen informador con el plásmido pSB107535 transformado en *Escherichia coli* JM109 [81]. Los ácidos tumónoicos E-H, aislados de la cianobacteria *Blennothrix cantharidosmum*, mostraron actividad inhibitoria de QS moderada frente al sistema LuxI/LuxR de *Vibrio fischeri* (cepa nativa) (Figura 1.11b). De ellos, el ácido tumónoico F mostró ser el más activo con un IC₅₀ de 62 µM¹⁵².

De las bacterias marinas *Jeotgalicoccus halophilus* y *Oceanobacillus profundus*, aisladas del octocoral *Antillologorgia elisabethae* (sin. *Pseudopterogorgia elisabethae*), se obtuvieron las fracciones metanólicas que demostraron ser activas como inhibidores del QS¹⁵³. Un estudio químico del extracto orgánico de *Oceanobacillus profundus* permitió identificar a el tirosol y acetato de tirosol como los responsables de la actividad IQS¹⁵³. De *Jeotgalicoccus halophilus* se aislaron siete compuestos (4-(metiltio)fenol, *p*-hidroxibenzaldehído, 3-indolaldehído, (1*H*-indol-3-il) oxoacetamida, 2-metilpropanoamida y cyclo-[Prolil-Valil-Prolil-Fenilalil]) los cuales resultaron activos en el ensayo de inhibición de QS frente a *C. violaceum* a concentraciones inferiores a las usadas para el control positivo (ácido Kojico)¹⁵⁴

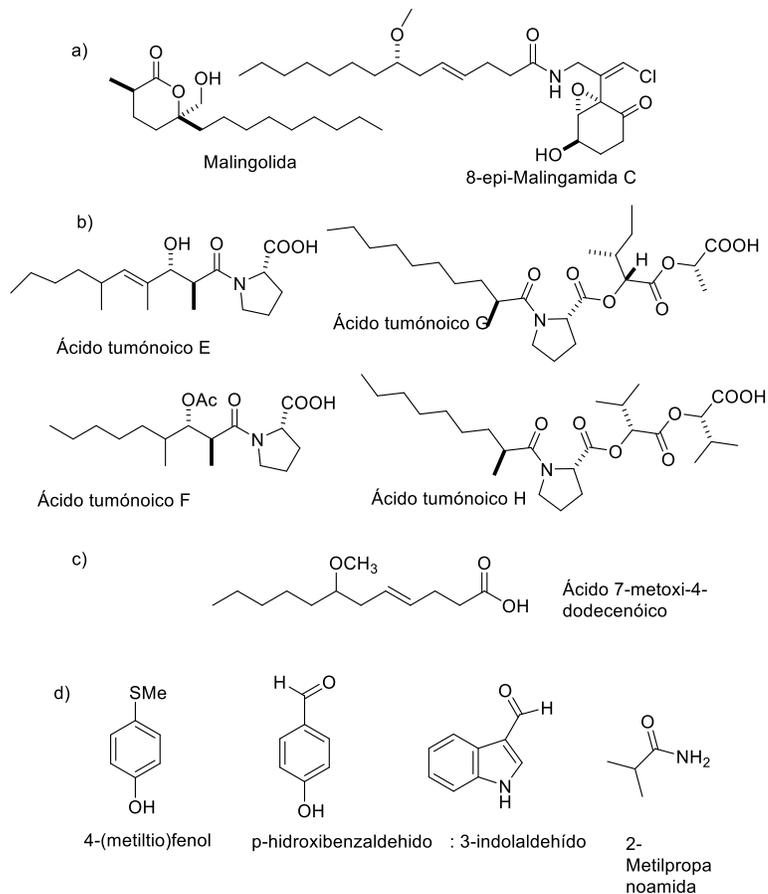


Figura 1.11 Compuestos con actividad QQ obtenidos a partir de microorganismo marinos. Tomado de: Clark, 2009; Martínez-Matamoros, 2016; Dobrestov, 2010^{152,153,155}

1.3 Uso de *quorum quenchers* frente a microorganismos fitopatógenos

Muchas bacterias fitopatógenas gram-negativas emplean sistemas de QS para regular sus rasgos de virulencia. Anteriormente se describieron varios de estos sistemas de *quorum sensing* en bacterias fitopatógenas (numeral 1.1.3). Hoy en día se ha establecido que una estrategia de control para las cepas fitopatógenas es el uso de bacterias biocontroladoras capaces de producir compuestos *quorum quenchers*, y así proteger a las plantas de estos fitopatógenos, o al menos atenuar su efecto dañino. A continuación, se expondrán ejemplos que han sido evaluados a escala de laboratorio.

En el estudio realizado por Zamani *et al.*; se aislaron a partir de la rizósfera de tomate bacterias capaces de degradar las AHLs. Para esto, se usaron dos cepas biosensores y diferentes AHL sintéticas. Las bacterias activas se identificaron mediante 16S rDNA como pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Microbacterium* y *Arthrobacter*. Cinco de los aislamientos fueron capaces de inactivar AHLs 3-oxo-sustituidas tanto cortas como largas. La cepa *Bacillus cereus* U92 resultó ser la más eficiente, siendo capaz de inactivar todas las AHL sintéticas hasta en un 80%. En los co-cultivos de laboratorio, *B. cereus* U92 disminuyó eficientemente los fenotipos regulados por QS de *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas chlororaphis* y *Chromobacterium violaceum*. La cepa redujo con éxito la frecuencia de transferencia del plásmido-TI conjugado en *A. tumefaciens* en aproximadamente un 99% en los cultivos binarios. Mientras tanto, en un ambiente más natural, esta cepa actuó como un agente de control biológico contra *A. tumefaciens*, demostrando ser capaz de disminuir la incidencia de la hendidura de la corona en las raíces de tomate (hasta el 90%), fenotipo patogénico regulada por QS, y atenuar la pudrición suave en los tubérculos de patata (hasta 60%)¹⁵⁶.

La *N*-acilhomoserinlactona acilasa (AHL acilasa) es una enzima conocida como responsable de interrumpir la comunicación célula-célula en bacterias. Kusada *et. al.* aislaron y caracterizaron una AHL acilasa nueva (denominada MacQ) de una bacteria multirresistente, *Acidovorax* sp. Cepa MR-S7. La proteína MacQ fue purificada expresada heterológamente en *Escherichia coli*, y se verificó la capacidad de esta enzima para degradar una amplia variedad de AHLs, que van desde cadenas laterales C₆ a C₁₄ con o sin sustituciones 3-oxo. También se observó que la virulencia del patógeno *Pectobacterium carotovorum*, se atenuó notablemente en co-cultivo con *Escherichia coli* que sobre expresa

MacQ. Además, se descubrió que esta enzima es capaz de degradar un amplio espectro de antibióticos β -lactámicos (penicilina G, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, cefalexina y cefadroxilo) por desacilación, indicando claramente que MacQ es una enzima bifuncional que confiere tanto actividad *quorum quenching* como resistencia a antibióticos en la cepa MR-S7. MacQ tiene una identidad de secuencia de aminoácidos relativamente baja con cualquiera de las acilasas conocidas (<39%)¹⁵⁷

Otro caso interesante fue reportado para una cepa del género *Lysinibacillus*. Se caracterizó la actividad inhibitoria de QS de un aislamiento de suelo *Lysinibacillus* sp. Gs50, y se exploró su potencial para controlar la podredumbre blanda de plantas de cultivo como papa, zanahoria y pepino. *Lysinibacillus* sp. Gs50 inactivó las AHL, que podría ser restauradas después por acidificación, lo cual sugirió que la inactivación se debió a la hidrólisis de la lactona de las AHL. Se encontró que *Lysinibacillus* sp. Gs50 puede degradar las AHLs producidas por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), que es la causante de la pudrición blanda. Este agente productor de compuestos QQ genera una disminución en la producción de enzimas degradadoras de la pared celular de la planta de Pcc y atenúa los síntomas de pudrición blanda en la infección experimental de papa, zanahoria y pepino¹⁵⁸.

La eficacia de un inhibidor de QS depende de los patógenos probados. Como consecuencia, los compuestos QQ deben estudiarse y caracterizarse para cada patógeno específico^{159,160}. Las bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Rhodococcus*, que son habitantes comunes de la rizósfera de suelo y papa, se han estudiado especialmente ya que son bacterias capaces de degradar AHL. Estas bacterias no inhiben el crecimiento de los patógenos *Pectobacterium*, pero inactivan sus señales de QS, por lo tanto, eliminan los síntomas inducidos por *Pectobacterium*, como por eje podredumbre de la papa, manchas foliares y de fruto^{92,161,162}.

Todos los ejemplos anteriormente mencionados evidencian las amplias posibilidades que ofrece el estudio de compuestos con actividad inhibitoria del *quorum sensing* y las alternativas terapéuticas que podrían generarse como consecuencia de la caracterización de estas moléculas, aisladas de diversas fuentes.

1.4 Conclusiones

El *quorum sensing* (QS) es una forma de comunicación intercelular que se usa para coordinar procesos fisiológicos y actividades cooperativas de bacterias a nivel poblacional, y depende de la producción, secreción y detección de moléculas autoinducidas, como acil-homoserinlactonas (AHLs), oligopéptidos (AIP) y autoinductores 2¹⁶³. La alta densidad celular, permite a las bacterias activar un arsenal de factores de virulencia (formación de biopelículas, producción de toxinas, *swimming* y *swarming*, etc)¹¹ que son responsables en algunos casos de enfermedades animales y plantas. Los inhibidores de QS, conocidos como QQ, son una alternativa para el tratamiento de estas enfermedades infecciosas. Los primeros estudios se dieron para patógenos de interés médico, pero hoy también se hacen esfuerzos en el control de enfermedades de plantas e incluso peces¹¹.

Existen varios mecanismos descritos para la inhibición del QS, entre ellos las enzimas que degradan AHL han sido las más estudiadas. En el contexto de las interacciones multiespecíficas, se está volviendo evidente que el ajuste fino y el apagado de la señal son tan importantes como la transmisión de la señal, razón por la cual este campo de estudio es de gran interés. De otro lado, no existen muchos estudios dirigidos a otro tipo de compuestos que puedan inhibir el QS, por lo que el desarrollo de esta tesis es un aporte al conocimiento actual sobre la inhibición de QS por parte de moléculas pequeñas o productos naturales.

Los productos naturales con actividad IQS son producidos por una amplia gama de organismos, como bacterias, hongos, plantas o animales de ecosistemas terrestres, marinos o de agua dulce⁶. Sin embargo, aunque muchos organismos o extractos de tejidos exhiben actividades de IQS, los compuestos activos que se han caracterizado completamente solo en un número limitado de casos. La naturaleza química de las QQ purificados es muy diversa^{13,19}, y no es clara la correlación entre la estructura molecular y la inhibición del QS en la mayoría de ellos, con excepción de los análogos estructurales a las moléculas de señal, de los cuales sí se saben que actúan como inhibidores competitivos.

En el marco anterior, esta tesis de doctorado propone como hipótesis que los productos naturales con actividad IQS pueden ser útiles en el control de enfermedades de plantas causadas por bacterias fitopatógenas, pues se ha demostrado que estas bacterias usan sistemas de QS para controlar su patogenicidad. El impacto de este abordaje podría ser

grande ya que varias especies de patógenos de plantas causan grandes pérdidas en la producción de alimentos en Colombia y en el mundo.

1.5 Bibliografía

- (1) Palaniyandi, S. A.; Yang, S. H.; Zhang, L.; Suh, J. W. Effects of Actinobacteria on Plant Disease Suppression and Growth Promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, *97* (22), 9621–9636.
- (2) Hentzer, M.; Givskov, M. Pharmacological Inhibition of Quorum Sensing for the Treatment of Chronic Bacterial Infections. *J. Clin. Invest.* 2003, *112* (9), 1300–1307.
- (3) Zhao, X.; Liu, X.; Xu, X.; Fu, Y. V. Microbe Social Skill: The Cell-to-Cell Communication between Microorganisms. *Sci. Bull.* 2017, No. February.
- (4) Fuqua, W. C.; Winans, S. C. A LuxR-LuxI Type Regulatory System Activates Agrobacterium Ti Plasmid Conjugal Transfer in the Presence of a Plant Tumor Metabolite. *J. Bacteriol.* 1994, *176* (10), 2796–2806.
- (5) Zhou, L.; Slamti, L.; Nielsen-LeRoux, C.; Lereclus, D.; Raymond, B. The Social Biology of Quorum Sensing in a Naturalistic Host Pathogen System. *Curr. Biol.* 2014, *24* (20), 2417–2422.
- (6) Grandclément, C.; Tannières, M.; Moréra, S.; Dessaux, Y.; Faure, D. Quorum Quenching: Role in Nature and Applied Developments. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015, *40* (1), 86–116.
- (7) Ng, W.-L.; Bassler, B. L. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu. Rev. Genet.* 2009, *43*, 197–222.
- (8) de Kievit, T. R.; Iglewski, B. H.; Kievit, T. R. De; Teresa, R. MINIREVIEW Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infect. Immun.* 2000, *68* (9), 4839–4849.
- (9) Pereira, C. S.; Thompson, J. A.; Xavier, K. B. AI-2-Mediated Signalling in Bacteria. 2012.
- (10) An, J. H.; Goo, E.; Kim, H.; Seo, Y.-S. Y.-S.; Hwang, I. Bacterial Quorum Sensing and Metabolic Slowing in a Cooperative Population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014, *111* (41), 14912–14917.
- (11) Kalia, V. C. *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*; Kalia, V. C., Ed.; Springer New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London: New Delhi, 2015.
- (12) Bakaraki Turan, N.; Chormey, D. S.; Büyükpınar, Ç.; Engin, G. O.; Bakirdere, S. Quorum Sensing: Little Talks for an Effective Bacterial Coordination. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2017, *91*, 1–11.
- (13) Galloway, W. R. J. D.; Hodgkinson, J. T.; Bowden, S. D.; Welch, M.; Spring, D. R. Quorum Sensing in Gram-Negative Bacteria: Small-Molecule Modulation of AHL and AI-2 Quorum Sensing Pathways. *Chem. Rev.* 2011, *111* (1), 28–67.
- (14) Atkinson, S.; Williams, P. Quorum Sensing and Social Networking in the Microbial World. *J. R. Soc. Interface* 2009, *6* (40), 959–978.
- (15) Zhu, J.; Kaufmann, G. F. Quo Vadis Quorum Quenching? *Curr. Opin. Pharmacol.* 2013, *13* (5), 688–698.
- (16) Passos da Silva, D.; Schofield, M.; Parsek, M.; Tseng, B. An Update on the Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram-Negative Biofilm Development. *Pathogens* 2017, *6* (4), 51.
- (17) Dobretsov, S.; Teplitski, M.; Bayer, M.; Gunasekera, S.; Proksch, P.; Paul, V. J. Inhibition of Marine Biofouling by Bacterial Quorum Sensing Inhibitors. *Biofouling* 2011, *27* (8), 893–905.
- (18) Waters, C. M.; Bassler, B. L. Quorum Sensing: Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev.*

- Biol.* 2005, 21 (1), 319–346.
- (19) LaSarre, B.; Federle, M. J. Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013, 77 (1), 73–111.
- (20) Venturi, V. Regulation of Quorum Sensing in *Pseudomonas*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2006, 30 (2), 274–291.
- (21) Pereira, C. S.; De Regt, A. K.; Brito, P. H.; Miller, S. T.; Xavier, K. B. Identification of Functional LsrB-like Autoinducer-2 Receptors. *J. Bacteriol.* 2009, 191 (22), 6975–6987.
- (22) Pesci, E. C.; Milbank, J. B.; Pearson, J. P.; McKnight, S.; Kende, A. S.; Greenberg, E. P.; Iglewski, B. H. Quinolone Signaling in the Cell-to-Cell Communication System of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999, 96 (20), 11229–11234.
- (23) Dong, Y.; Zhang, L. Quorum Sensing and Quorum-Quenching Enzymes. 2005, 43 (February), 101–109.
- (24) He, Y.-W.; Zhang, L.-H.; JL, H.; SD, M.; R, G.-L.; MR, M.; AP, C.; MA, D.; K, B.; AA, V. Quorum Sensing and Virulence Regulation in *Xanthomonas Campestris*. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32 (5), 842–857.
- (25) He, Y.-W.; Wu, J.; Cha, J.-S.; Zhang, L.-H. Rice Bacterial Blight Pathogen *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Produces Multiple DSF-Family Signals in Regulation of Virulence Factor Production. *BMC Microbiol.* 2010, 10, 187.
- (26) Dobretsov, S.; Teplitski, M.; Paul, V. Mini-Review: Quorum Sensing in the Marine Environment and Its Relationship to Biofouling. *Biofouling* 2009, 25 (5), 413–427.
- (27) Whitehead, N. A.; Barnard, A. M. L.; Slater, H.; Simpson, N. J. L.; Salmond, G. P. C. Quorum-Sensing in Gram-Negative Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 2001, 25 (4), 365–404.
- (28) Tello, E.; Castellanos, L.; Duque, C. Synthesis of Cembranoid Analogues and Evaluation of Their Potential as Quorum Sensing Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* 2013, 21 (1), 242–256.
- (29) Anbazhagan, D.; Mansor, M.; Yan, G. O. S.; Md Yusof, M. Y.; Hassan, H.; Sekaran, S. D. Detection of Quorum Sensing Signal Molecules and Identification of an Autoinducer Synthase Gene among Biofilm Forming Clinical Isolates of *Acinetobacter* Spp. *PLoS One* 2012, 7 (7), e36696.
- (30) Steindler, L.; Venturi, V. Detection of Quorum-Sensing *N*-Acyl Homoserine Lactone Signal Molecules by Bacterial Biosensors. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007, 266 (1), 1–9.
- (31) Rutherford, S. T.; Bassler, B. L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012, 2 (11), 1–25.
- (32) Durán, M.; Faljoni-Alario, A.; Durán, N. *Chromobacterium Violaceum* and Its Important Metabolites--Review. *Folia Microbiol. (Praha)*. 2010, 55 (6), 535–547.
- (33) Stauff, D. L.; Bassler, B. L. Quorum Sensing in *Chromobacterium Violaceum*: DNA Recognition and Gene Regulation by the CviR Receptor. *J. Bacteriol.* 2011, 193 (15), 3871–3878.
- (34) Rettori, D.; Durán, N. Production, Extraction and Purification of Violacein: An Antibiotic Pigment Produced by *Chromobacterium Violaceum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1998, 14 (5), 685–688.
- (35) Mcclean, K. H.; Winson, M. K.; Fish, L.; Taylor, A.; Chhabra, S. R.; Camara, M.; Daykin, M.; John, H.; Swift, S.; Bycroft, B. W.; et al. Quorum Sensing and *Chromobacterium Violaceum*: Exploitation of Violacein Production and Inhibition for the Detection of *N*-Acyl Homoserine Lactones. *Microbiology* 1997, 143 (1 997), 3703–3711.

- (36) Wells, J. S.; Trejo, W. H.; Principe, P. A.; Bush, K.; Georgopapadakou, N.; Bonner, D. P.; Sykes, R. B. SQ 26,180, A Novel Monobactam. I Taxonomy, Fermentation and Biological Properties. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 1982, XXXV (2), 184–188.
- (37) Chernin, L. S.; Winson, M. K.; Thompson, J. M.; Haran, S.; Bycroft, B. W.; Chet, I.; Williams, P.; Stewart, G. S. Chitinolytic Activity in *Chromobacterium Violaceum*: Substrate Analysis and Regulation by Quorum Sensing. *J. Bacteriol.* 1998, 180 (17), 4435–4441.
- (38) Choi, O.; Lee, Y.; Han, I.; Kim, H.; Goo, E.; Kim, J.; Hwang, I. A Simple and Sensitive Biosensor Strain for Detecting Toxoflavin Using Beta-Galactosidase Activity. *Biosens. Bioelectron.* 2013, 50, 256–261.
- (39) Winson, M. K.; Swift, S.; Fish, L.; Throup, J. P.; Jørgensen, F.; Chhabra, S. R.; Bycroft, B. W.; Williams, P.; Stewart, G. S. Construction and Analysis of luxCDABE-Based Plasmid Sensors for Investigating N-Acyl Homoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing. *FEMS Microbiol. Lett.* 1998, 163 (2), 185–192.
- (40) Heckman, D. S. Molecular Evidence for the Early Colonization of Land by Fungi and Plants. *Science (80-.)*. 2001, 293 (5532), 1129–1133.
- (41) Venturi, V.; Fuqua, C. Chemical Signaling Between Plants and Plant-Pathogenic Bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2013, 51 (1), 17–37.
- (42) Teplitski, M.; Robinson, J. B.; Bauer, W. D. Plants Secrete Substances That Mimic Bacterial N -Acyl Homoserine Lactone Signal Activities and Affect Population Density-Dependent Behaviors in Associated Bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2000, 13 (6), 637–648.
- (43) Brencic, A.; Winans, S. C.; Colonization, P. Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria. 2005, 69 (1), 155–194.
- (44) Ferluga, S.; Bigirimana, J.; Höfte, M.; Venturi, V. A LuxR Homologue of *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* Is Required for Optimal Rice Virulence. *Mol. Plant Pathol.* 2009, 191 (3), 890–897.
- (45) Ferluga, S.; Venturi, V. OryR Is a LuxR-Family Protein Involved in Interkingdom Signaling between Pathogenic *Xanthomonas Oryzae* Pv. *Oryzae* and Rice. *J. Bacteriol.* 2009, 191 (3), 890–897.
- (46) Fraccaroli, M.; Nicoletti, S.; Maltese, F.; Choi, Y. H.; Guzzo, F.; Levi, M.; Verpoorte, R. Pre-Analytical Method for Metabolic Profiling of Plant Cell Cultures of *Passiflora Garckeii*. *Biotechnol. Lett.* 2008, 30 (11), 2031–2036.
- (47) Aloni, R.; Ullrich, C. I. Biology of Crown Gall Tumors. In *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*; Springer New York: New York, NY, 2008; pp 565–591.
- (48) Christie, P. J.; Atmakuri, K.; Krishnamoorthy, V.; Jakubowski, S.; Cascales, E. Biogenesis, Architecture, and Function of Bacterial Type IV Secretion Systems. *Annu. Rev. Microbiology* 2005, 59 (29).
- (49) Tzfira, T.; Li, J.; Lacroix, B.; Citovsky, V. *Agrobacterium* T-DNA Integration: Molecules and Models. *Trends Genet.* 2004, 20 (8), 375–383.
- (50) Platt, T. G.; Bever, J. D.; Fuqua, C. A Cooperative Virulence Plasmid Imposes a High Fitness Cost under Conditions That Induce Pathogenesis. *Proc. Biol. Sci.* 2012, 279 (1734), 1691–1699.
- (51) Tsai, C.-S.; Winans, S. C. LuxR-Type Quorum-Sensing Regulators That Are Detached from Common Scents. *Mol. Microbiol.* 2010, 77 (5), 1072–1082.
- (52) Qin, Y.; Luo, Z.-Q.; Smyth, A. J.; Gao, P.; Beck Von Bodman, S.; Farrand, S. K. Quorum-Sensing

- Signal Binding Results in Dimerization of TraR and Its Release from Membranes into the Cytoplasm. *EMBO* 19 (19), 5212–5221.
- (53) Pappas, K. M.; Winans, S. C. A LuxR-Type Regulator from *Agrobacterium Tumefaciens* Elevates Ti Plasmid Copy Number by Activating Transcription of Plasmid Replication Genes. *Mol. Microbiol.* 2003, 48 (4), 1059–1073.
- (54) Wang, C.; Yan, C.; Fuqua, C.; Zhang, L. H. Identification and Characterization of a Second Quorum-Sensing System in *Agrobacterium Tumefaciens* A6. *J. Bacteriol.* 2014, 196 (7), 1403–1411.
- (55) Barber, C. E.; Tang, J. L.; Feng, J. X.; Pan, M. Q.; Wilson, T. J. G.; Slater, H.; Dow, J. M.; Williams, P.; Daniels, M. J. A Novel Regulatory System Required for Pathogenicity of *Xanthomonas Campestris* Is Mediated by a Small Diffusible Signal Molecule. *Mol. Microbiol.* 1997, 24 (3), 555–566.
- (56) Wang, L.-H.; He, Y.; Gao, Y.; Wu, J. E.; Dong, Y.-H.; He, C.; Wang, S. X.; Weng, L.-X.; Xu, J.-L.; Tay, L.; et al. A Bacterial Cell-Cell Communication Signal with Cross-Kingdom Structural Analogues. *Mol. Microbiol.* 2003, 51 (3), 903–912.
- (57) Hirano, S. S.; Upper, C. D. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas Syringae*-a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000, 64 (3), 624–653.
- (58) Dumenyo, C. K.; Mukherjee, A.; Chun, W.; Chatterjee, A. K. Genetic and Physiological Evidence for the Production of N-Acyl Homoserine Lactones by *Pseudomonas Syringae* Pv. *Syringae* and Other Fluorescent Plant Pathogenic *Pseudomonas* Species. *Eur. J. Plant Pathol.* 1998, 104 (6), 569–582.
- (59) Quiñones, B.; Dulla, G.; Lindow, S. E. Quorum Sensing Regulates Exopolysaccharide Production, Motility, and Virulence in *Pseudomonas Syringae*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 2005, 682 (7), 682–693.
- (60) Kim, J.; Kim, J. G.; Kang, Y.; Jang, J. Y.; Jog, G. J.; Lim, J. Y.; Kim, S.; Suga, H.; Nagamatsu, T.; Hwang, I. Quorum Sensing and the LysR-Type Transcriptional Activator ToxR Regulate Toxoflavin Biosynthesis and Transport in *Burkholderia Glumae*. *Mol. Microbiol.* 2004, 54 (4), 921–934.
- (61) Wamische, Y.; Kelsey, C.; Belmar, S.; Gebremariam, T.; McCarty, D. Bacterial Panicle Blight of Rice in Arkansas <http://www.uaex.edu> (accessed Jul 30, 2017).
- (62) Nandakumar, R.; Shahjahan, A. K. M.; Yuan, X. L.; Dickstein, E. R.; Groth, D. E. *Burkholderia Glumae* and *B. Gladioli* Cause Bacterial Panicle Blight in Rice in the Southern United States. *896 Plant Dis.* 93 (9).
- (63) Zhou-qi, C.; Bo, Z.; Guan-lin, X.; Bin, L.; Shi-wen, H. Research Status and Prospect of *Burkholderia Glumae*, the Pathogen Causing Bacterial Panicle Blight. *Rice Sci.* 2016, 23 (3), 111–118.
- (64) Riera-Ruiz, C.; Vargas, J.; Cedeño, C.; Quirola, P.; Escobar, M.; Cevallos-Cevallos, J. M.; Ratti, M.; Peralta, E. L. First Report of *Burkholderia Glumae* Causing Bacterial Panicle Blight on Rice in Ecuador. *Plant Dis.* 2014, 98 (7), 988–988.
- (65) Pérez, C., & Saavedra, E. Avances En El Manejo Integrado de La Bacteria *Burkholderia Glumae* En El Cultivo de Arroz En El Caribe Colombiano. *Rev. Colomb. Cienc. Anim.* 2011, 3 (1), 111–124.
- (66) Ham, J. H.; Melanson, R. A.; Rush, M. C. *Burkholderia Glumae*: Next Major Pathogen of Rice? *Mol. Plant Pathol.* 2011, 12 (4), 329–339.
- (67) Weinberg, J. B.; Alexander, B. D.; Majure, J. M.; Williams, L. W.; Kim, J. Y.; Vandamme, P.; LiPuma, J. J. *Burkholderia Glumae* Infection in an Infant with Chronic Granulomatous Disease. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45 (2), 662–665.

- (68) Jeong, Y.; Kim, J.; Kim, S.; Kang, Y.; Nagamatsu, T.; Hwang, I. Toxoflavin Produced by *Burkholderia Glumae* Causing Rice Grain Rot Is Responsible for Inducing Bacterial Wilt in Many Field Crops. *Plant Dis.* 2003, 87 (8), 890–895.
- (69) Chun, J.; Lee, J.-H.; Jung, Y.; Kim, M.; Kim, S.; Kim, B. K.; Lim, Y.-W. EzTaxon: A Web-Based Tool for the Identification of Prokaryotes Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007, 57 (Pt 10), 2259–2261.
- (70) Nickzad, A.; Lépine, F.; Déziel, E. Quorum Sensing Controls Swarming Motility of *Burkholderia Glumae* through Regulation of Rhamnolipids. *PLoS One* 2015, 10 (6), e0128509.
- (71) Moens, S.; Vanderleyden, J. Functions of Bacterial Flagella. *Crit. Rev. Microbiol.* 1996, 22 (2), 67–100.
- (72) Harshey, R. M. Bees Aren't the Only Ones: Swarming in Gram-Negative Bacteria. *Mol. Microbiol.* 1994, 13 (3), 389–394.
- (73) Kim, J.; Kang, Y.; Choi, O.; Jeong, Y.; Jeong, J. E.; Lim, J. Y.; Kim, M.; Moon, J. S.; Suga, H.; Hwang, I. Regulation of Polar Flagellum Genes Is Mediated by Quorum Sensing and FlhDC in *Burkholderia Glumae*. *Mol. Microbiol.* 2007, 64 (1), 165–179.
- (74) Sayler, R. J.; Cartwright, R. D. Genetic Characterization and Real-Time PCR Detection of *Burkholderia Glumae*, a Newly Emerging Bacterial Pathogen of Rice in the United States. *Plant Dis.* 2006, 90 (5), 603–610.
- (75) Chen, R.; Barphagha, I. K.; Karki, H. S.; Ham, J. H. Dissection of Quorum-Sensing Genes in *Burkholderia Glumae* Reveals Non-Canonical Regulation and the New Regulatory Gene *tofM* for Toxoflavin Production. *PLoS One* 2012, 7 (12).
- (76) Maeda, Y.; Kiba, A.; Ohnishi, K.; Hikichi, Y. New Method to Detect Oxolinic Acid-Resistant *Burkholderia Glumae* Infesting Rice Seeds Using a Mismatch Amplification Mutation Assay Polymerase Chain Reaction. *J Gen Plant Pathol* 2004, 70, 215–217.
- (77) Cui, Z.; Ibrahim, M.; Yang, C.; Fang, Y.; Annam, H.; Li, B.; Wang, Y.; Xie, G.-L.; Sun, G. Susceptibility of Opportunistic *Burkholderia Glumae* to Copper Surfaces Following Wet or Dry Surface Contact. *Molecules* 2014, 19 (7), 9975–9985.
- (78) Suga, H.; Igarashi. Quorum Sensing Inhibitor. *Us 20100256369 a1*. 2010.
- (79) Tang, K.; Zhang, X. H. Quorum Quenching Agents: Resources for Antivirulence Therapy. *Mar. Drugs* 2014, 12 (6), 3245–3282.
- (80) Hirakawa, H.; Tomita, H. Interference of Bacterial Cell-to-Cell Communication: A New Concept of Antimicrobial Chemotherapy Breaks Antibiotic Resistance. *Front. Microbiol.* 2013, 4 (MAY), 1–14.
- (81) Fuqua, C.; Greenberg, E. P. Listening in on Bacteria: Acyl-Homoserine Lactone Signalling. *Nat. Rev. Mol. cell Biol.* 2002, 3 (September), 685–695.
- (82) Williams, P. Quorum Sensing, Communication and Cross-Kingdom Signalling in the Bacterial World. *Microbiology* 2007, 153 (12), 3923–3938.
- (83) Brango-Vanegas, J.; Costa, G. M.; Ortmann, C. F.; Schenkel, E. P.; Reginatto, F. H.; Ramos, F. A.; Arévalo-Ferro, C.; Castellanos, L. Glycosylflavonoids from *Cecropia Pachystachya* Trécul Are Quorum Sensing Inhibitors. *Phytomedicine* 2014, 21 (5), 670–675.
- (84) Rasmussen, T. B.; Skindersoe, M. E.; Bjarnsholt, T.; Phipps, R. K.; Christensen, K. B.; Jensen, P. O.; Andersen, J. B.; Koch, B.; Larsen, T. O.; Hentzer, M.; et al. Identity and Effects of Quorum-Sensing

- Inhibitors Produced by *Penicillium* Species. *Microbiology* 2005, 151 (5), 1325–1340.
- (85) Rasmussen, T. B.; Givskov, M. Quorum-Sensing Inhibitors as Anti-Pathogenic Drugs. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006, 296 (2–3), 149–161.
- (86) Skindersoe, M. E.; Ettinger-Epstein, P.; Rasmussen, T. B.; Bjarnsholt, T.; de Nys, R.; Givskov, M. Quorum Sensing Antagonism from Marine Organisms. *Mar. Biotechnol.* 2008, 10 (1), 56–63.
- (87) Vijayababu, P.; Samykannu, G.; Thomas, J.; Antonyraj, C. B.; Narayanan, S. B.; Piramanayagam, S.; Narayanan, S. Patulin Interference with ATP Binding Cassette Transferring Auto Inducer -2 in *Salmonella Typhi* and Biofilm Inhibition via Quorum Sensing. *Informatics Med. Unlocked* 2018, 7 (9857), 1–12.
- (88) Jakobsen, T. H.; Bragason, S. K.; Phipps, R. K.; Christensen, L. D.; van Gennip, M.; Alhede, M.; Skindersoe, M.; Larsen, T. O.; Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; et al. Food as a Source for Quorum Sensing Inhibitors: Iberin from Horseradish Revealed as a Quorum Sensing Inhibitor of *Pseudomonas Aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78 (7), 2410–2421.
- (89) Jakobsen, T. H.; Van Gennip, M.; Phipps, R. K.; Shanmugham, M. S.; Christensen, L. D.; Alhede, M.; Skindersoe, M. E.; Rasmussen, T. B.; Friedrich, K.; Uthe, F.; et al. Ajoene, a Sulfur-Rich Molecule from Garlic, Inhibits Genes Controlled by Quorum Sensing. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56 (5), 2314–2325.
- (90) Jakobsen, T. H.; Warming, A. N.; Vejborg, R. M.; Moscoso, J. A.; Stegger, M.; Lorenzen, F.; Rybtke, M.; Andersen, J. B.; Petersen, R.; Andersen, P. S.; et al. A Broad Range Quorum Sensing Inhibitor Working through sRNA Inhibition. *Sci. Rep.* 2017, 7 (1), 9857.
- (91) Zhang, H.-B.; Wang, L.-H.; Zhang, L.-H. Genetic Control of Quorum-Sensing Signal Turnover in *Agrobacterium Tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002, 99 (7), 4638–4643.
- (92) Uroz, S.; Oger, P. M.; Chapelle, E.; Adeline, M.-T.; Faure, D.; Dessaux, Y. A *Rhodococcus qsdA*-Encoded Enzyme Defines a Novel Class of Large-Spectrum Quorum-Quenching Lactonases. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, 74 (5), 1357–1366.
- (93) Lin, Y.-H.; Xu, J.-L.; Hu, J.; Wang, L.-H.; Ong, S. L.; Leadbetter, J. R.; Zhang, L.-H. Acyl-Homoserine Lactone Acylase from *Ralstonia* Strain XJ12B Represents a Novel and Potent Class of Quorum-Quenching Enzymes. *Mol. Microbiol.* 2003, 47 (3), 849–860.
- (94) Bijtenhoorn, P.; Schipper, C.; Hornung, C.; Quitschau, M.; Grond, S.; Weiland, N.; Streit, W. R. BpiB05, a Novel Metagenome-Derived Hydrolase Acting on *N*-Acylhomoserine Lactones. *J. Biotechnol.* 2011, 155 (1), 86–94.
- (95) Bijtenhoorn, P.; Mayerhofer, H.; Müller-Dieckmann, J.; Utpatel, C.; Schipper, C.; Hornung, C.; Szesny, M.; Grond, S.; Thürmer, A.; Brzuszkiewicz, E.; et al. A Novel Metagenomic Short-Chain Dehydrogenase/Reductase Attenuates *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation and Virulence on *Caenorhabditis Elegans*. *PLoS One* 2011, 6 (10), e26278.
- (96) Chowdhary, P. K.; Keshavan, N.; Nguyen, H. Q.; Peterson, J. A.; González, J. E.; Haines, D. C. *Bacillus Megaterium* CYP102A1 Oxidation of Acyl Homoserine Lactones and Acyl Homoserines. *Biochemistry* 2007, 46 (50), 14429–14437.
- (97) Shinohara, M.; Nakajima, N.; Uehara, Y. Purification and Characterization of a Novel Esterase (?-Hydroxypalmitate Methyl Ester Hydrolase) and Prevention of the Expression of Virulence by *Ralstonia Solanacearum*. *J. Appl. Microbiol.* 2007, 103 (1), 152–162.

- (98) Newman, K. L.; Chatterjee, S.; Ho, K. A.; Lindow, S. E. Virulence of Plant Pathogenic Bacteria Attenuated by Degradation of Fatty Acid Cell-to-Cell Signaling Factors. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 2008, *3261094* (3), 326–334.
- (99) Pustelny, C.; Albers, A.; Büldt-Karentzopoulos, K.; Parschat, K.; Ram Chhabra, S.; Cámara, M.; Williams, P.; Fetzner, S. Dioxygenase-Mediated Quenching of Quinolone-Dependent Quorum Sensing in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Chem. Biol.* 2009, *16*, 1259–1267.
- (100) Kanzaki, H.; Imura, D.; Nitoda, T.; Kawazu, K. Enzymatic Conversion of Cyclic Dipeptides to Dehydro Derivatives That Inhibit Cell Division. *J. Biosci. Bioeng.* 2000, *90* (1), 86–89.
- (101) Ikeda, T.; Inoue, Y.; Suehiro, A.; Ikeshoji, H.; Ishida, T.; Takiguchi, N.; Kuroda, A.; Kato, J.; Ohtake, H. The Effects of Cyclodextrins on Autoinducer Activities of Quorum Sensing in *Pseudomonas Aeruginosa*. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2002, *44* (1/4), 381–382.
- (102) Kato, N.; Morohoshi, T.; Nozawa, T.; Matsumoto, H.; Ikeda, T. Control of Gram-Negative Bacterial Quorum Sensing with Cyclodextrin Immobilized Cellulose Ether Gel. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2006, *56* (1–2), 55–59.
- (103) Vance, J. E.; Peake, K. B. Function of the Niemann-Pick Type C Proteins and Their Bypass by Cyclodextrin. *Curr. Opin. Lipidol.* 2011, *22* (3), 204–209.
- (104) Devescovi, G.; Bigirimana, J.; Degrassi, G.; Cabrio, L.; LiPuma, J. J.; Kim, J.; Hwang, I.; Venturi, V. Involvement of a Quorum-Sensing-Regulated Lipase Secreted by a Clinical Isolate of *Burkholderia Glumae* in Severe Disease Symptoms in Rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, *73* (15), 4950–4958.
- (105) Chai, Y.; Zhu, J.; Winans, S. C. TrIR, a Defective TraR-like Protein of *Agrobacterium Tumefaciens*, Blocks TraR Function in Vitro by Forming Inactive TrIR:TraR Dimers. *Mol. Microbiol.* 2001, *40* (2), 414–421.
- (106) Fuqua, C.; Burbea, M.; Winans, S. C. Activity of the *Agrobacterium* Ti Plasmid Conjugal Transfer Regulator TraR Is Inhibited by the Product of the traM Gene. *J. Bacteriol.* 1995, *177* (5), 1367–1373.
- (107) Swiderska, A.; Berndtson, A. K.; Cha, M. R.; Li, L.; Beaudoin, G. M. J.; Zhu, J.; Fuqua, C. Inhibition of the *Agrobacterium Tumefaciens* TraR Quorum-Sensing Regulator: Interactions with the TraM Anti-Activator. *J. Biol. Chem.* 2001, *276* (52), 49449–49458.
- (108) Wang, C.; Zhang, H.-B.; Chen, G.; Chen, L.; Zhang, L.-H. Dual Control of Quorum Sensing by Two TraM-Type Antiactivators in *Agrobacterium Tumefaciens* Octopine Strain A6. *J. Bacteriol.* 2006, *188* (7), 2435–2445.
- (109) Seet, Q.; Zhang, L.-H. Anti-Activator QslA Defines the Quorum Sensing Threshold and Response in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 2011, *80* (4), 951–965.
- (110) Chugani, S. A.; Whiteley, M.; Lee, K. M.; D'Argenio, D.; Manoil, C.; Greenberg, E. P. QscR, a Modulator of Quorum-Sensing Signal Synthesis and Virulence in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001, *98* (5), 2752–2757.
- (111) Ledgham, F.; Ventre, I.; Soscia, C.; Foglino, M.; Sturgis, J. N.; Lazdunski, A. Interactions of the Quorum Sensing Regulator QscR: Interaction with Itself and the Other Regulators of *Pseudomonas Aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol. Microbiol.* 2003, *48* (1), 199–210.
- (112) Siehnel, R.; Traxler, B.; An, D. D.; Parsek, M. R.; Schaefer, A. L.; Singh, P. K. A Unique Regulator Controls the Activation Threshold of Quorum-Regulated Genes in *Pseudomonas Aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010, *107* (17), 7916–7921.

- (113) Rasmussen, T. B.; Bjarnsholt, T.; Skindersoe, M. E.; Hentzer, M.; Kristoffersen, P.; Kote, M.; Nielsen, J.; Eberl, L.; Givskov, M. Screening for Quorum-Sensing Inhibitors (QSI) by Use of a Novel Genetic System, the QSI Selector. *J. Bacteriol.* 2005, 1799–1814.
- (114) Desouky, S. E.; Nishiguchi, K.; Zendo, T.; Igarashi, Y.; Williams, P.; Sonomoto, K.; Nakayama, J. High-Throughput Screening of Inhibitors Targeting Agr / Fsr Quorum Sensing in *Staphylococcus Aureus* and *Enterococcus Faecalis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013, 77 (5), 923–927.
- (115) Chung, J.; Goo, E.; Yu, S.; Choi, O.; Lee, J.; Kim, J.; Kim, H.; Igarashi, J.; Suga, H.; Sun Moon, J.; et al. Small-Molecule Inhibitor Binding to an N-Acyl-Homoserine Lactone Synthase. *PNAS* 2011, 10 (29), 12089–12094.
- (116) Dong, Y.-H.; Wang, L.-H.; Xu, J.-L.; Zhang, H.-B.; Zhang, X.-F.; Zhang, L.-H. Quenching Quorum-Sensing-Dependent Bacterial Infection by an N-Acyl Homoserine Lactonase. *Nature* 2001, 411 (6839), 813–817.
- (117) Alanis, A. J. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Arch. Med. Res.* 2005, 36, 697–705.
- (118) van Delden, C.; Köhler, T.; Brunner-Ferber, F.; François, B.; Carlet, J.; Pechère, J.-C. Azithromycin to Prevent *Pseudomonas Aeruginosa* Ventilator-Associated Pneumonia by Inhibition of Quorum Sensing: A Randomized Controlled Trial. *Intensive Care Med.* 2012, 38 (7), 1118–1125.
- (119) Christensen, L. D.; van Gennip, M.; Jakobsen, T. H.; Alhede, M.; Hougen, H. P.; Hoiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M. Synergistic Antibacterial Efficacy of Early Combination Treatment with Tobramycin and Quorum-Sensing Inhibitors against *Pseudomonas Aeruginosa* in an Intraperitoneal Foreign-Body Infection Mouse Model. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012, 67 (5), 1198–1206.
- (120) Smyth, A. R.; Cifelli, P. M.; Otori, C. A.; Righetti, K.; Lewis, S.; Erskine, P.; Holland, E. D.; Givskov, M.; Williams, P.; Cámara, M.; et al. Garlic as an Inhibitor of *Pseudomonas Aeruginosa* Quorum Sensing in Cystic Fibrosis--a Pilot Randomized Controlled Trial. *Pediatr. Pulmonol.* 2010, 45 (4), 356–362.
- (121) Kutty, S. K.; Barraud, N.; Pham, A.; Iskander, G.; Rice, S. A.; Black, D. S.; Kumar, N. Design, Synthesis, and Evaluation of Fimbrilide–Nitric Oxide Donor Hybrids as Antimicrobial Agents. *J. Med. Chem.* 2013, 56 (23), 9517–9529.
- (122) Lee, J.-W.; Jutidamrongphan, W.; Park, K.-Y.; Moon, S.-H.; Park, C. Advanced Treatment of Wastewater from Food Waste Disposer in Modified Ludzack-Ettinger Type Membrane Bioreactor. *Environ. Eng. Res.* 2012, 17 (2), 59–63.
- (123) Chong, G.; Kimyon, O.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S.; Manefield, M. The Presence and Role of Bacterial Quorum Sensing in Activated Sludge. *Microb. Biotechnol.* 2012, 5 (5), 621–633.
- (124) Lade, H.; Paul, D.; Kweon, J. H. Quorum Quenching Mediated Approaches for Control of Membrane Biofouling. *Int. J. Biol. Sci.* 2014, 10 (5), 550–565.
- (125) Oh, H.-S.; Yeon, K.-M.; Yang, C.-S.; Kim, S.-R.; Lee, C.-H.; Park, S. Y.; Han, J. Y.; Lee, J.-K. Control of Membrane Biofouling in MBR for Wastewater Treatment by Quorum Quenching Bacteria Encapsulated in Microporous Membrane. *Environ. Sci. Technol.* 2012, 46 (9), 4877–4884.
- (126) Wang, W. Z.; Morohoshi, T.; Ikenoya, M.; Someya, N.; Ikeda, T. AiiM, a Novel Class Ot N-Acylhomoserine Lactonase from the Leaf-Associated Bacterium *Microbacterium Testaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010, 76 (8), 2524–2530.

- (127) Tang, K.; Zhang, X.-H. Quorum Quenching Agents: Resources for Antivirulence Therapy. *Mar. Drugs* 2014, 12 (6), 3245–3282.
- (128) Huber, B.; Eberl, L.; Feucht, W.; Polster, J. Influence of Polyphenols on Bacterial Biofilm Formation and Quorum-Sensing. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 2003, 58 (11–12), 879–884.
- (129) Kalia, V. C. Quorum Sensing Inhibitors: An Overview. *Biotechnol. Adv.* 2013, 31 (2), 224–245.
- (130) Husain, F. M.; Ahmad, I.; Al-Thubiani, A. S.; Abulreesh, H. H.; AlHazza, I. M.; Aqil, F. Leaf Extracts of *Mangifera Indica* L. Inhibit Quorum Sensing - Regulated Production of Virulence Factors and Biofilm in Test Bacteria. *Front. Microbiol.* 2017, 8, 727.
- (131) Keshavan, N. D.; Chowdhary, P. K.; Donovan, C.; González, J. E. L-Canavanine Made by *Medicago Sativa* Interferes with Quorum Sensing in *Sinorhizobium Meliloti*. *J. Bacteriol.* 2005, 187 (24), 8427–8436.
- (132) Choo, J. H.; Rukayadi, Y.; Hwang, J. K. Inhibition of Bacterial Quorum Sensing by Vanilla Extract. *Lett. Appl. Microbiol.* 2006, 42 (6), 637–641.
- (133) Osorno, O.; Castellanos, L.; Ramos, F. a; Arévalo-Ferro, C. Gas Chromatography as a Tool in Quorum Sensing Studies. *Gas Chromatogr. - Biochem. Narcotics Essent. Oils* 2011.
- (134) Khan, M. S. A.; Zahin, M.; Hasan, S.; Husain, F. M.; Ahmad, I. Inhibition of Quorum Sensing Regulated Bacterial Functions by Plant Essential Oils with Special Reference to Clove Oil. *Lett. Appl. Microbiol.* 2009, 49 (3), 354–360.
- (135) Vasavi, H. S.; Arun, A. B.; Rekha, P. D. Anti-Quorum Sensing Activity of Flavonoid-Rich Fraction from *Centella Asiatica* L. against *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2016, 49 (1), 8–15.
- (136) Castillo-Juárez, I.; García-Contreras, R.; Velázquez-Guadarrama, N.; Soto-Hernández, M.; Martínez-Vázquez, M. Amphipterygium Adstringens Anacardic Acid Mixture Inhibits Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors of *Chromobacterium Violaceum* and *Pseudomonas Aeruginosa*. *Arch. Med. Res.* 2013, 44 (7), 488–494.
- (137) Boeuf, G. Marine Biodiversity Characteristics. *Comptes Rendus - Biol.* 2011, 334 (5–6), 435–440.
- (138) Cragg, G. M.; Grothaus, P. G.; Newman, D. J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents †. *Chemal Rev.* 2009, 109, 3012–3043.
- (139) Kim, J. S.; Kim, Y. H.; Seo, Y. W.; Park, S. Quorum Sensing Inhibitors from the Red Alga, *Ahnfeltiopsis Flabelliformis*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2007, 12 (3), 308–311.
- (140) Liu, H. B.; Koh, K. P.; Kim, J. S.; Seo, Y.; Park, S. The Effects of Betonicine, Floridoside, and Isethionic Acid from the Red Alga *Ahnfeltiopsis Flabelliformis* on Quorum-Sensing Activity. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2008, 13 (4), 458–463.
- (141) Quintana, J.; Brango-Vanegas, J.; M. Costa, G.; Castellanos, L.; Arévalo, C.; Duque, C.; Quintana, J.; Brango-Vanegas, J.; Costa, G. M.; Castellanos, L.; et al. Marine Organisms as Source of Extracts to Disrupt Bacterial Communication: Bioguided Isolation and Identification of Quorum Sensing Inhibitors from *Ircinia Felix*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2015, 25 (3), 199–207.
- (142) Tello, E.; Castellanos, L.; Arevalo-Ferro, C.; Rodríguez, J.; Jiménez, C.; Duque, C. Absolute Stereochemistry of Antifouling Cembranoid Epimers at C-8 from the Caribbean Octocoral *Pseudoplexaura Flagellosa*. Revised Structures of Plexaurolones. *Tetrahedron* 2011, 67 (47), 9112–9121.

- (143) Tello, E.; Castellanos, L.; Arevalo-Ferro, C.; Duque, C. Cembranoid Diterpenes from the Caribbean Sea Whip *Eunicea Knighti*. *J. Nat. Prod.* 2009, 72 (9), 1595–1602.
- (144) Mora-Cristancho, J. A.; Arévalo-Ferro, C.; Ramos, F. A.; Tello, E.; Duque, C.; Lhullier, C.; Falkenberg, M.; Schenkelc, E. P. Antifouling Activities against Colonizer Marine Bacteria of Extracts from Marine Invertebrates Collected in the Colombian Caribbean Sea and on the Brazilian Coast (Santa Catarina). *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 2011, 66 C (9–10), 515–526.
- (145) Tello, E.; Castellanos, L.; Arévalo-Ferro, C.; Duque, C. Disruption in Quorum-Sensing Systems and Bacterial Biofilm Inhibition by Cembranoid Diterpenes Isolated from the Octocoral *Eunicea Knighti*. *J. Nat. Prod.* 2012, 75 (9), 1637–1642.
- (146) Lu, Y.; Dong, X.; Liu, S.; Bie, X. Characterization and Identification of a Novel Marine *Streptomyces* Sp. Produced Antibacterial Substance. *Mar. Biotechnol.* 2009, 11 (6), 717–724.
- (147) Cragg, G. M.; Newman, D. J. Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2013, 1830 (6), 3670–3695.
- (148) Saurav, K.; Costantino, V.; Venturi, V.; Steindler, L. Quorum Sensing Inhibitors from the Sea Discovered Using Bacterial N-Acyl-Homoserine Lactone-Based Biosensors. *Mar. Drugs* 2017, 15 (3), 53.
- (149) Romero, M.; Martin-Cuadrado, A. B.; Roca-Rivada, A.; Cabello, A. M.; Otero, A. Quorum Quenching in Cultivable Bacteria from Dense Marine Coastal Microbial Communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011, 75 (2), 205–217.
- (150) Hmelo, L. R. Quorum Sensing in Marine Microbial Environments. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 2017, 9, 257–281.
- (151) Romero, M.; Martin-Cuadrado, A.-B.; Otero, A. Determination of Whether Quorum Quenching Is a Common Activity in Marine Bacteria by Analysis of Cultivable Bacteria and Metagenomic Sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78 (17), 6345–6348.
- (152) Clark, B. R.; Engene, N.; Teasdale, M. E.; Rowley, D. C.; Valeriote, F. A.; Gerwick, W. H. NIH Public Access. *NIH Public Access* 2009, 71 (9), 1530–1537.
- (153) Martínez-Matamoros, D.; Laiton Fonseca, M.; Duque, C.; Ramos, F. A.; Castellanos, L. Búsqueda de Bacterias Marinas Como Fuente de Inhibidores de Quorum Sensing (IQS): Primer Estudio Químico de *Oceanobacillus Profundus* (RKHC-62B). *Rev. Vitae* 2016, 23 (1), 30–47.
- (154) Martínez-Matamoros, Diana; Duque, Carmenza; Ramos, Freddy; Castellanos, L. Quorum Sensing Inhibitors from the Marine Bacteria *Jeotgalicoccus Halophilus* (RKHC-28) Associated to the Caribbean Sea Whip *Antillogorgia Elisabethae*. *Mar. Biotechnol.* 2009.
- (155) Dobretsov, S.; Teplitski, M.; Alagely, A.; Gunasekera, S. P.; Paul, V. J. Malyngolide from the Cyanobacterium *Lyngbya Majuscula* Interferes with Quorum Sensing Circuitry. *Environ. Microbiol. Rep.* 2010, 2 (6), 739–744.
- (156) Zamani, M.; Behboudi, K.; Ahmadzadeh, M. Quorum Quenching by *Bacillus Cereus* U92: A Double-Edged Sword in Biological Control of Plant Diseases. *Bioctrl. Sci. Tech.* 2013, 23 (5), 555–573.
- (157) Kusada, H.; Tamaki, H.; Kamagata, Y.; Hanada, S.; Kimura, N. A Novel Quorum-Quenching N-Acylhomoserine Lactone Acylase from *Acidovorax* Sp. Strain MR-S7 Mediates Antibiotic Resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017, 83 (13), e00080-17.
- (158) Garge, S. S.; Nerurkar, A. S. Attenuation of Quorum Sensing Regulated Virulence of *Pectobacterium*

- Carotovorum* Subsp. *Carotovorum* through an AHL Lactonase Produced by *Lysinibacillus* Sp. Gs50. *PLoS One* 2016, 1–23.
- (159) Rasch, M.; Rasmussen, T. B.; Andersen, J. B.; Persson, T.; Nielsen, J.; Givskov, M.; Gram, L. Well-Known Quorum Sensing Inhibitors Do Not Affect Bacterial Quorum Sensing-Regulated Bean Sprout Spoilage. *J. Appl. Microbiol.* 2007, 102 (3), 826–837.
- (160) des Essarts, Y.; Sabbah, M.; Comte, A.; Soulère, L.; Queneau, Y.; Dessaux, Y.; Hélias, V.; Faure, D. *N,N'*-Alkylated Imidazolium-Derivatives Act as Quorum-Sensing Inhibitors Targeting the *Pectobacterium Atrosepticum*-Induced Symptoms on Potato Tubers. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14 (10), 19976–19986.
- (161) Uroz, S.; D'Angelo-Picard, C.; Carlier, A.; Elasri, M.; Sicot, C.; Petit, A.; Oger, P.; Faure, D.; Dessaux, Y. Novel Bacteria Degrading N-Acylhomoserine Lactones and Their Use as Quenchers of Quorum-Sensing-Regulated Functions of Plant-Pathogenic Bacteria. *Microbiology* 2003, 149 (8), 1981–1989.
- (162) Dong, Y.-H.; Zhang, X.-F.; Xu, J.-L.; Zhang, L.-H. Insecticidal *Bacillus Thuringiensis* Silences *Erwinia Carotovora* Virulence by a New Form of Microbial Antagonism, Signal Interference. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 954–960.
- (163) Zhang, W.; Li, C. Exploiting Quorum Sensing Interfering Strategies in Gram-Negative Bacteria for the Enhancement of Environmental Applications. *Front. Microbiol.* 2016, 6 (JAN), 1–15.

2. Capítulo 2: Actinobacterias marinas como fuente de compuestos para el control de fitopatógenos: un enfoque integrador basado en el perfil metabólico / bioactividad y taxonomía

El trabajo desarrollado en este capítulo es la base del artículo publicado:

Luz A. Betancur, Sandra J. Naranjo-Gaybor, Diana M. Vinchira-Villarraga, Nubia C. Moreno-Sarmiento, Luis A. Maldonado, Zulma R. Suarez-Moreno, Alejandro Acosta-González, Guillermo F. Padilla-Gonzalez, Mónica Puyana, Leonardo Castellanos, Freddy A. Ramos "Marine *Actinobacteria* as a Source of Compounds for Phytopathogen Control: An integrative Metabolic-Profiling / Bioactivity and Taxonomical Approach"
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0170148>

Nota aclaratoria: El trabajo experimental de este capítulo fue realizado tanto por la autora de esta tesis, Sandra Judith Naranjo-Gaybor, como por la estudiante de doctorado: Luz Adriana Betancur Jaramillo, ambas estudiantes del programa de Doctorado de la Universidad Nacional de Colombia. Los resultados acá mostrados corresponden a los obtenidos por Sandra Judith, y/o obtenidos por las dos estudiantes. Cuando se haga uso de los resultados obtenidos exclusivamente por Luz Adriana Betancur se hará la aclaración respectiva.

Resumen

Las bacterias marinas se consideran como una de las fuentes más prometedoras para el descubrimiento de compuestos biológicamente activos, su mayor potencial está en que es una fuente renovable. En este estudio, se recolectaron muestras de sedimentos, invertebrados y algas del arrecife de coral de Providencia y Santa Catalina (Mar Caribe colombiano) con el objetivo de aislar cepas tipo Actinobacterias capaces de producir compuestos inhibidores de *quorum sensing* con el potencial de controlar fitopatógenos. Se obtuvieron 203 cepas de microorganismos de los cuales, de acuerdo con la secuenciación su gen 16S rRNA, 24 cepas son Actinobacterias de los géneros: *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Gordonia*. Para evaluar su *metabolic profiling*, las cepas se cultivaron en medio líquido, y sus extractos orgánicos fueron analizados por LC-MS. Los datos de LC-MS y actividad biológica fueron relacionados por técnicas metabolómicas, análisis OPLS-DA, identificando valores de TR y *m/z* que se correlacionan con la actividad. El ejercicio de dereplicación permitió sugerir la presencia de algunos compuestos con potencial actividad IQS como la streptomina D. Con base en la clasificación taxonómica de las cepas, la información de actividad biológica, y perfil metabólico, se seleccionaron las cepas más activas de los 24 aislamientos.

2.1 Introducción

Muchas bacterias fitopatógenas dependen de sistemas de QS para provocar la enfermedad en su huésped vegetal^{1,2}. Como ejemplo de lo anterior se tiene la producción de toxoflavina por parte de algunas especies de *Burkholderia* (particularmente en *B. glumae*), que está controlada por el sistema QS C8-AHL, TofI/TofR. La producción de esta fitotoxina es un factor clave en el desarrollo de la patogenicidad relacionada con la pudrición y marchitez del arroz³. Los compuestos inhibidores de *quorum sensing* pueden ser usados como agentes terapéuticos, capaces de disminuir la patogenicidad de ciertas enfermedades bacterianas⁴, teniendo así un uso potencial contra fitopatógenos⁵. No obstante, este campo ha sido poco explorado en la literatura científica, y en esta tesis se pretende dar aportes en este campo poco desarrollado de la investigación.

Los microorganismos marinos han sido reconocidos como una fuente importante de metabolitos secundarios^{6,7}, no obstante, son pocos los ejemplos en los que se use este potencial para controlar fitopatógenos^{6,8}. Un ejemplo que vale la pena resaltar son los compuestos piericidina A y glucopiericidina A, obtenidos del cultivo de *Streptomyces xanthocidicus* KPP01532, que mostraron ser eficaces para el control de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca). Esta Eca es un patógeno de plantas que causa enfermedades como la “pierna negra”, y la pudrición blanda en tallos y tubérculos de papa. La expresión de los factores de virulencia por parte de Eca está controlado mediante QS, involucrando los genes *pelC*, *pehA*, *ceIV* y *nip*. Los niveles de transcripción de los cuatro genes fueron significativamente más bajos cuando Eca se expuso a la piericidina A o glucopiericidina A, lo que sugiere que ellos podrían tener un uso potencial como agentes de control de la enfermedad de pudrición blanda en tubérculos de papa⁹.

A pesar de los esfuerzos por aislar compuestos nuevos a partir de microorganismos de ambientes marinos, los enfoques tradicionales de bioprospección, incluyendo el fraccionamiento bioguiado, a menudo conducen al aislamiento de compuestos ya conocidos¹⁰. Esto, en parte, se debe al uso de enfoques clásicos para seleccionar las cepas microbianas a estudiar basadas únicamente en información taxonómica o antimicrobiana¹¹. De otro lado, los estudios basados exclusivamente en la diversidad química de los compuestos producidos por las cepas a estudiar carecen de datos sobre su actividad biológica, lo que limita su impacto para otras aplicaciones. Por estas razones, la bioprospección de cepas microbianas, para aislar nuevos compuestos bioactivos, se ha dirigido hacia estrategias integradas, que combinan datos filogenéticos y pruebas de actividad biológica con enfoques de derreplicación. Lo anterior como una alternativa rápida para identificar metabolitos conocidos y bioactivos en una mezcla de muestras, muchas veces muy numerosa para usar técnicas clásicas de PN. Estas estrategias, complementadas con análisis multivariados (PCA, HCA, OPLS y otros), han demostrado ser eficaces en la identificación de nuevos compuestos bioactivos, mejorando los programas de descubrimiento de fármacos a partir de microorganismos¹².

En este capítulo se presenta una estrategia para estudiar el potencial metabólico de cepas de bacterias marinas procedentes del Mar Caribe colombiano, a partir de la integración de información taxonómica; los datos de inhibición de *quorum sensing* (*Chromobacterium*

violaceum ATCC 31532), junto con su perfil metabólico por HPLC-MS. Todos los datos obtenidos aquí se integraron para priorizar la selección de aislamientos para continuar con la identificación de los compuestos activos.

El desarrollo de este capítulo contiene secciones que fueron desarrolladas en forma conjunta con la estudiante de Doctorado Luz Adriana Betancur, cuyo proyecto de tesis se titula “Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos”.

2.2 Resultados y Discusión

Se conoce que los miembros del *phylum* Actinobacteria tienen potencial como biocontroladores¹³ y exhiben capacidad para la producción de nuevos fármacos^{14,15}. Los actinomicetos marinos se destacan como fuentes de nuevos fármacos antimicrobianos¹⁶, y de compuestos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer^{15,17}. Así mismo exhiben actividad inhibitoria de QS¹⁸, razón por la cual se seleccionan para iniciar la búsqueda de compuestos QQ en la presente tesis de doctorado. Las cepas de actinobacteria se han aislado tanto a partir de biopelículas microbianas como de ambientes pelágicos^{19,20}, lo que da cuenta de su enorme arsenal químico para adaptarse al ambiente, asunto del que se espera tomar ventaja en la presente tesis.

Esta sección se presentará en cinco partes, en primer lugar, se describe el aislamiento e identificación de las cepas, para continuar con el resultado de ensayos de actividad biológica y de análisis metabólico. Finalmente, se usarán todos estos criterios para seleccionar una muestra a estudiar químicamente desde una perspectiva integrativa. El último punto describirá el estudio químico de una bacteria seleccionada.

2.2.1 Aislamiento y caracterización de las bacterias marinas

Muestras de invertebrados (esponjas, octocorales), algas, peces y sedimentos, recolectadas en Providencia (Colombia), se procesaron utilizando protocolos clásicos de enriquecimiento para el aislamiento de Actinobacterias cultivables, tales como el uso de medios de cultivo de agar ISP-2 y agar de avena²¹. Una semana más tarde, una vez detectado el crecimiento bacteriano, los medios se fragmentaron en trozos y se

transfirieron a una solución salina suplementada con CaCO_3 , con el fin de mejorar el crecimiento de cepas de Actinobacteria, dado que el uso de esta base facilita su crecimiento²². La purificación de aislamientos bacterianos se realizó por subcultivo sucesivo de colonias individuales en medio ACA, recuperando 203 aislamientos: 162 se describieron como bacterias y 41 como hongos. Lo anterior se hizo mediante observación directa de las características morfológicas de los aislamientos, y observación microscópica por tinción de Gram; las bacterias que mostraban características propias de actinobacterias, tales como presencia de micelio aéreo y/o esporulación, fueron seleccionadas para continuar con su estudio (Anexo tabla S2.1). Estos procedimientos nos permitieron recuperar 24 aislamientos de Actinobacteria (c.a. 15%) de los 162 aislamientos bacterianos.

Las 24 cepas preseleccionadas como actinobacterias se cultivaron en medios ISP-2, ISP-3, ISP-4, y agar nutritivo con el fin de caracterizarlas morfológicamente (Anexo Figura S2.1). Cada cepa fue fotografiada en cada medio de cultivo, registrando características morfológicas (color, esporulación etc). Dentro de las actinobacterias el género *Streptomyces* es el más representativo, y se caracteriza por la presencia del ácido *L,L*-diaminopimélico (*L,L*-A2pm)²³, siendo un marcador quimiotaxonómico para las bacterias de éste género. Por esta razón se llevó a cabo la determinación de la presencia de este ácido en cada uno de los 24 aislamientos²⁴ (Figura S2.2), para lo cual se usó por CCD. Y patrones del *L,L*-A2pm. La presencia de *L,L*-A2pm en 22 de los aislamientos indica que éstos son del género *Streptomyces*. Estas 22 cepas se caracterizan por formar micelios extensamente ramificados que transportan abundantes hifas aéreas capaces de diferenciarse en cadenas de esporas. Este conjunto de 22 aislamientos fue de particular interés porque se sabe que los “streptomicetos” son una de las fuentes más prolíficas de metabolitos secundarios^{25,26}. Los otros dos aislamientos (PNM25 y PNM102N) mostraron que contienen ácido meso-A2pm (Anexo Figura S2.2), lo que indica que si bien son actinobacterias no pertenecen al género *Streptomyces*²⁴.

Posteriormente, se realizaron pruebas bioquímicas para determinar si los aislamientos cuentan con la maquinaria enzimática para fermentar y oxidar glucosa, así como para otras actividades enzimáticas (Anexo Tabla S2.2). Los resultados de los perfiles bioquímicos, obtenidos mediante el ensayo API 20E, se resumen en el Anexo Tabla S2.2, haciéndose

evidente que las 24 cepas mostraron diferencias, lo que podría indicar que los aislamientos no son redundantes. Así, por ejemplo, se encontró que los aislamientos PNM89.3 y PNM89.4 son similares en su perfil bioquímico, y sólo difieren en su reacción de oxidasa, por lo que no se trata de la misma cepa, aunque sí de dos muy relacionadas. En cuanto al test de catalasa, todas las cepas fueron positivas a la catalasa a excepción del aislamiento PNM161b, es decir que ellas poseen la enzima catalasa, la cual es capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua: esta es característica de bacterias aerobias²⁷. También se evidenciaron casos de cepas con el mismo comportamiento bioquímico pero que son diferentes por aspectos morfológicos. Por ejemplo, las cepas 9 y 5 mostraron el mismo perfil en las pruebas bioquímicas, pero la cepa 9 se consideró diferente de la cepa 5, ya que su morfología en los cuatro medios de cultivo es diferente (ISP-2, ISP-3, ISP-4, agar nutritivo).

Finalmente, y buscando caracterizar molecularmente las 24 cepas bacterianas seleccionadas, se llevó a cabo el análisis del gen 16S rRNA para cada una de ellas, tal y como se presenta en la Tabla 2.1 y Figura 2.1 (cada una de las secuencias contenía 1400 pb de longitud). Las secuencias obtenidas fueron limpiadas, alineadas y comparadas con la base de datos EZ-Taxon. Estos resultados sugieren que los 24 aislamientos en efecto pertenecen al *phylum* Actinobacteria, encontrándose representantes de tres géneros diferentes, a saber: *Streptomyces* (22 cepas), *Gordonia* (una cepa, número PNM25) y *Micromonospora* (una cepa, número PNM102N) (tabla 2.1). Estos resultados están de acuerdo con los perfiles bioquímicos obtenidos de API 20-E, lo que sugiere que su fenotipo es compatible con su genotipo identificado por 16S rRNA. Lo mismo se puede afirmar para las cepas de *Streptomyces* propuestas por la presencia del ácido *L,L*-A2pm. Es importante mencionar que para poder determinar la especie en cada caso se requieren análisis más profundos que se irán realizando según la necesidad.

Los vecinos más cercanos y el porcentaje de similitud para cada cepa se presentan en la Tabla 2.1. El árbol filogenético de las 24 cepas, basado en el locus 16S rRNA, se muestra en la Fig. 2.1, identificándose siete unidades taxonómicas operacionales (OTU1-7). En general, no se encontró correlación entre las fuentes de aislamiento y las especies bacterianas aquí recuperadas, lo que indica que todas las fuentes albergan diferentes

especies de Actinobacterias, sin agrupamiento aparente de una OTU particular por ninguna fuente específica.

Tabla 2.1 Filiación de cepas de *Actinobacteria* aisladas de muestras marinas

Cluster (OTU)	Vecinos cercanos	%Sim	Código del aislamiento	Strain/ GenBank número de acceso	Fuente
1	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	99.86	PNM3	KX641378	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
			PNM6	KX641383	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	<i>Streptomyces violascens</i>	99.86	PNM13	KX641381	Sedimento
			PNM87	KX641385	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	<i>Streptomyces resistomycificus</i>	99.86	PNM89.3	KX641386	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
			PNM89.4	KX641387	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	99.86	PNM161a	KX641396	<i>Bryopsis sp.</i> (Chlorophyta)
	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	99.86	PNM161b	KX641397	<i>Bryopsis sp.</i> (Chlorophyta)
			PNM184	KX641399	<i>Eunicea fusca</i> (Gorgonacea)
				PNM194	KX641400
			PNM208	KX641401	<i>Eunicea fusca</i> (Gorgonacea)
2	<i>Streptomyces sp. MBRL172</i>	99.03	PNM182	KX641398	<i>Amphiroa sp.</i> (Rhodophyta)
3	<i>Streptomyces sanyensis</i>	99.72	PNM5	KX641379	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
			PNM143	KX641389	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
			PNM144	KX641390	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
			PNM144a	KX641391	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
			PNM145	KX641392	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
			PNM148	KX641393	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
			PNM149	KX641394	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)
PNM149a	KX641395	<i>Niphates digitalis</i> (Porifera)			
4	<i>Streptomyces microflavus</i>	99.86	PNM46b	KX641384	<i>Codium sp.</i> (Chlorophyta)
	<i>Streptomyces fulvorobeus</i>	99.86			
5	<i>Streptomyces pratensis</i>	100	PNM9	KX641380	<i>Dictyota sp.</i> (Phaeophyta)
6	<i>Micromonospora chalcea</i>	99.79	PNM102N	KX641388	<i>Dictyota sp.</i> (Phaeophyta)
	<i>Micromonospora maritima</i>	99.38			
	<i>Micromonospora sediminicola</i>	99.15			
	<i>Micromonospora marina</i>	99.44			
7	<i>Gordonia bronchialis</i>	98.41	PNM25	KX641382	<i>Xestospongia sp.</i> (Porifera)

Un total de once *Streptomyces* forman el primer clado (OTU 1), estas cepas fueron recuperadas de cinco fuentes diferentes (Tabla 2.1), lo que sugiere la ubicuidad de los

miembros del grupo. En cuanto a los vecinos cercanos a estas 11 cepas del OTU1 se puede decir que han sido en general recuperados de suelo (*S. griseochromogenes*, *S. violascens*, *S. resistomycificus* y *S. exfoliatus*); siendo solamente *S. albidoflavus* recuperada del mar, aunque también se ha recuperado del suelo, y para la que se han reportado actividades antifúngicas y antibacterianas^{28,29}. En el caso de *S. violacens* y *S. resistomycifus* se ha reportado actividad antibacteriana, en el primer caso se han identificado antibióticos como la actinomicina³⁰. Los otros vecinos *S. griseochromogenes* y *S. hydrogenans* han demostrado actividad antifúngica^{31,32}. Con lo anterior es interesante notar que si bien a este OTU pertenecen cepas con reconocida actividad antibiótica no se han reportado compuestos con actividad inhibitoria del QS.

El OTU3 también agrupó varias cepas, a saber: PNM5, PNM143, PNM144, PNM144a, PNM145, PNM148, PNM149 y PNM149A. Todas estas cepas fueron recuperadas de la misma esponja *Niphates digitalis*; sin embargo, se observaron diferencias entre sus perfiles bioquímicos y sus morfologías en los medios ISP usados, indicando que son aislamientos diferentes. Es importante resaltar que el vecino más cercano de todas ellas es *Streptomyces sanyensis*, indicando que son muy similares entre sí. Esta especie ha sido recuperada de sedimentos de manglar, y hay reportes de actividad antimicrobiana^{33,34}, pero no de actividad QQ.

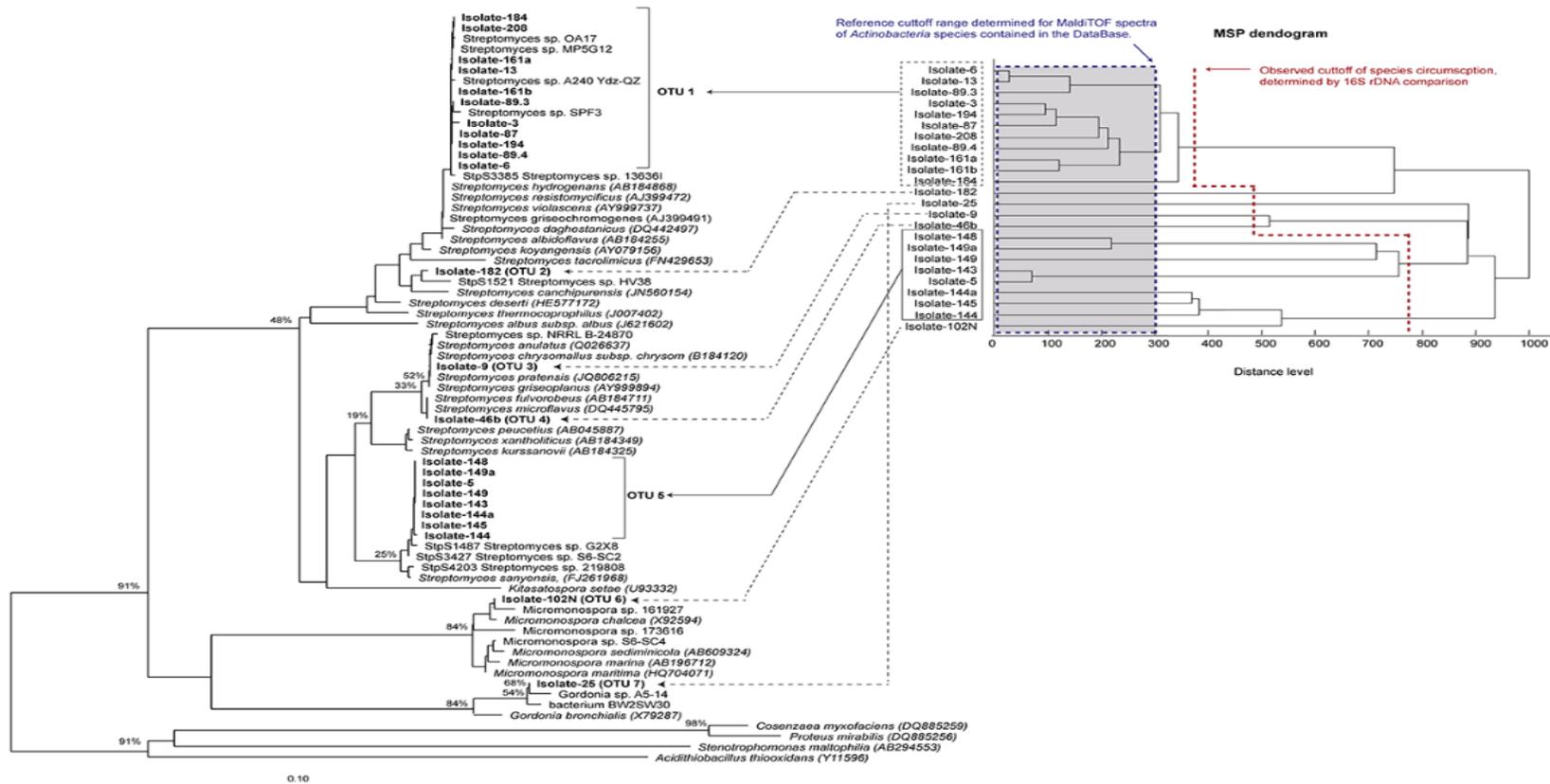


Figura 2.1 Comparación de la reconstrucción filogenética basada en el análisis de 16S rRNA de los aislamientos de actinobacteriales con perfiles de agrupación de MALDI-TOF. Árbol filogenético en base de genes 16S rRNA de los aislados de actinobacterias y sus vecinos más cercanos (cultivables y no cultivables) (lado izquierdo). El cálculo de *Bootstrap* se realizó (1000 repeticiones) y se muestra para las ramas principales en el árbol. Se calculó un dendrograma basado en los perfiles MALDI-TOF de cada aislamiento (lado derecho) para comparar los resultados obtenidos por estas dos metodologías de clasificación.

Otros cinco aislamientos se agruparon en cinco OTUs individuales: (i) Cepas PNM182 *Streptomyces* sp. (OTU 2), que está estrechamente relacionado con *Streptomyces canchipurensis*³⁵, (ii) La cepa PNM9 (OTU 5), que se agrupa junto con *Streptomyces pratensis*, que a su vez ha sido recuperado de los ambientes terrestres y no hay informes sobre su actividad biológica³⁶; (iii) la cepa PNM46b (OTU 4), que está estrechamente relacionada con *Streptomyces microflavus* y *Streptomyces fulvorobeus*. La primera ha sido reportada tanto en ambientes marinos como terrestres, mientras que *S. fulvorubeus* se ha reportado sólo en ambientes marinos³⁷. Ninguna de estas dos cepas tiene informes de actividad inhibitoria de QS. Interesantemente, los dos OTUs restantes no se relacionan con *Streptomyces* como los anteriores, siendo (iv) La cepa PNM102N (OTU 6) filiada a *Micromonospora* sp. como el vecino más cercano. De este género se ha reportado un gran número de antibióticos, siendo el segundo más prolífico después de *Streptomyces*, se han reportado hasta 500 moléculas diferentes con diversas estructuras y propiedades. Las especies de *Micromonospora* también pueden producir enzimas hidrolíticas, lo que les permite desempeñar un papel activo en la degradación de la materia orgánica en sus hábitats naturales³⁸. Finalmente, el último OTU corresponde a la cepa PNM25 (OTU 7), que se relacionó con *Gordonia* sp. como el vecino más cercano. Se destaca que este vecino tiene un porcentaje de similitud del gen 16S rDNA inferior al 98,7%. Lo anterior podría significar que el aislamiento PNM25 podría ser una nueva especie, ya que de acuerdo con el límite actual de circunscripción de una especie procarionta basada en la secuencia 16S rDNA el porcentaje de similaridad debe ser superior al 99%³⁹. Los miembros del género *Gordonia* fueron aislados originalmente como patógenos oportunistas en seres humanos; sin embargo, en los últimos años, la mayoría de los nuevos miembros del género han sido aislados de fuentes terrestres y marinas⁴⁰. Varios miembros de este taxón juegan un papel importante en la biodegradación y biorremediación, por lo que podría ser de interés para este trabajo. La producción de compuestos tensoactivos por *Gordonia* sp. se ha asociado con su capacidad para degradar los compuestos hidrófobos⁴¹.

Como una técnica complementaria a la información filogenética anterior, se hicieron análisis de masas de los péptidos de las cepas. Recientemente, la espectrometría de masas MALDI-TOF MS se ha utilizado para la derreplicación bacteriana, y la identificación preliminar de aislamientos ambientales. Esta técnica se basa en el análisis de proteínas de la cepa completa. El grado de similitud de la masa molecular observada para las proteínas hace que la semejanza espectral sea un marcador adecuado de relación filogenética⁴². Así, las 24 cepas de Actinobacteria se analizaron por MALDI-TOF, los

resultados se convirtieron en dendogramas MSP, usando como control positivo y de calibración *Escherichia coli* (DH5 α). Los espectros de todas las especies de actinobacterias disponibles en la base de datos MALDI-TOF (BDAL) se utilizaron para calcular una referencia *cut-off* de la distancia de similitud que define una especie de actinobacteria. El corte calculado mostró que las especies similares pueden ser definidas por el 70% de similitud (Anexo Figura S2.3). En la Fig. 2.1 se muestra la agrupación de los aislamientos basados en sus perfiles proteicos (lado derecho) y los basados en análisis de 16S de DNAr (lado izquierdo). Los OTUs observados mediante 16S rDNA están acorde con los cluster observados en MALDI-TOF, con la excepción de los grupos más abundantes (OTU 1 y 3) que no coinciden bien entre los dos análisis.

Cuando se comparan ambos enfoques, los resultados de MALDI-TOF sugieren que la riqueza de especies dentro de OTU 1 y OTU 3 podría ser superior a la observada por la secuenciación de 16S rDNA, denotada por la línea de color rojo. El dendrograma MSP muestra una riqueza de miembros dentro de la OTU 1, y confirmó la posible heterogeneidad observada entre estos aislamientos y descrita anteriormente, ésta es probablemente causada por el distinto origen del que proceden. Por otro lado, la OTU número 3 contiene siete cepas de *Streptomyces* aisladas de *Niphates digitalis* como se muestra por el análisis 16S de rRNA, y aunque la fuente de aislamiento es la misma, se puede observar que la riqueza de especies en comparación con OTU 1 es mayor, si se considera que éstas proceden de diferentes fuentes de aislamiento.

En resumen, de las 25 muestras ambientales estudiadas, se pudieron recuperar 24 cepas de Actinobacteria, incluyendo 22 *Streptomyces*, 1 *Gordonia* y 1 *Micromonospora* indicando que es necesario mejorar los procedimientos de recuperación de este tipo de cepas, probablemente esperar mayores tiempos en el crecimiento inicial pueda mejorar la recuperación de actinos. De la esponja *Niphates digitalis* se recuperó el mayor número de cepas de Actinobacteria (13), mientras que de las esponjas *Xetospongia* sp. (1), *Amphimedon compressa* (0), *Plakortis halichondroides* (0) y *Aplysina archeri* (0) se recuperaron pocas o ninguna cepa de Actinobacteria. Esto está en contravía con el hecho de que de Porifera se ha reportado la mayor diversidad de comunidades bacterianas⁴⁰. Todas las otras fuentes ambientales también mostraron baja diversidad: algas *Dictyota* sp. y *Bryopsis* sp.; el octocoral *Eunicea fusca*, de donde se recuperaron dos cepas de Actinobacteria, mientras que de las algas *Codium* sp. y *Amphiroa* sp. sólo se pudo aislar

una cepa de Actinobacteria. En el caso de los diez sedimentos estudiados, sólo se pudieron recuperar 2 cepas.

2.2.2 Ensayos de actividad biológica

Los ensayos de actividad biológica se llevaron a cabo siguiendo dos aproximaciones, primero se evaluaron los aislamientos en enfrentamiento *in vivo* contra el biosensor de QS, y luego los aislamientos que resultaron activos se cultivaron y extrajeron con acetato de etilo para obtener los extractos orgánicos que se volvieron a ensayar contra *Chromobacterium violaceum*. Lo anterior con el fin de establecer si la actividad observada *in vivo* se debía a compuestos orgánicos y se mantenía cuando se realizaba la extracción. Estos mismos ensayos se hicieron con cepas patógenas de *Burkholderia*. A continuación, se describen y discuten los resultados de estos ensayos.

Todos los aislamientos de bacterias (162) fueron ensayados *in vivo* frente al biosensor *Chromobacterium violaceum*, buscando establecer una posible actividad inhibitoria del QS, la cual se evidenciaría como un crecimiento del biosensor sin producción de violaceína (Fig. 2.2A). Se observó que algunas bacterias inhibían el QS (16 cepas), otras actuaban como bactericidas (27), un tercer grupo no inhibían el QS ni afectaban el crecimiento del biosensor (44 cepas), otras actuaban como bacteriostáticos (19 cepas), mientras un quinto grupo crecía rápidamente (56) y colonizaba toda la caja sin que se pudiera juzgar el efecto de inhibición, éstas se clasificaron como de “crecimiento rápido” (Anexo tabla S2.1). En este capítulo nos centramos únicamente en las 24 Actinomicetes identificadas, de las cuales 8 inhiben el QS, 4 no son activas (Figura 2.2A1), 9 son bactericidas, y los tres restantes son bacteriostáticas. En los capítulos siguientes se retomarán los resultados con los aislamientos no actino.

Adicionalmente para las 24 actinobacterias se realizaron pruebas de antagonismo (confrontación directa) contra los fitopatógenos *Burkholderia glumae* ATCC 33617 (causa el añublo bacterial de la panícula de arroz), *B. gladioli* 3704- 1 (causa la podredumbre del grano bacteriano y el dorado de la vaina foliar) y, *B. plantarii* ATCC 43733 (causa la enfermedad en plántulas en el arroz). Se observó que unas cepas inhibían el crecimiento del fitopatógeno, mientras otras no lo hacían. Se observó que *B. gladioli* era más fácilmente afectada por los actinos, a diferencia de *B. glumae* que no fue tan afectada. En las Figuras 2.2 se presentan los resultados de la actividad antibacteriana (Figura 2A), y de inhibición del QS (Figura 2B).

Como se observa en la figura 2C, ocho cepas fueron activas frente al biosensor *C. violaceum*, por lo que se seleccionaron para continuar con el estudio. Así, éstas se cultivaron en 100 mL de medio TSB por 15 días, el cultivo se centrifugó a 5000 rpm y el sobrenadante se extrajo con acetato de etilo, obteniéndose dos fracciones: la orgánica (acetato de etilo) y la acuosa. Se usó el medio *Tryptic Soy Broth* (TSB) debido a que es un medio nutritivo que favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, en especial las bacterias anaerobias facultativas y aerobias comunes, característica que favorecerían nuestro trabajo ya que conocíamos los requerimientos nutricionales de las bacterias aisladas⁴³ Cada una de las fracciones fue evaluada frente al biosensor, y los resultados se resumen en la Figura 2.2C, se pudo observar que en un caso la actividad IQS se perdió (PNM184), mientras en los otros se centró en la fase orgánica (los siete restantes). En este último caso se espera que los compuestos QQ correspondan a productos naturales. El aislamiento PNM184, que pertenece al género *Streptomyces*, no mantuvo su actividad ni en el extracto orgánico, ni en la fase acuosa, por lo que se podría pensar que se trataba de una actividad enzimática. Es de resaltar que ningún extracto acuoso mostró actividad IQS.

Algunos actinomicetos marinos han demostrado tener actividad inhibitoria del QS, como ejemplos tenemos: a los actinomicetos marinos estudiados por You et al.⁴⁴ que inhibieron la formación de biopelículas de diferentes especies de *Vibrio*⁴⁴. A *Streptomyces* sp. Y33-1 productora del péptido Siomicina I, que inhibe la gelatinasa y la biosíntesis de gelatinasa, cuya expresión es regulada por QS y que ocasiona la alteración de la biopelícula que forma *Enterococcus faecalis* como factor de virulencia⁴⁵. A una cepa de *Streptomyces* sp, estudiada por Kinoshita et al., 1997, que produce butirolactonas (2 (3H) -furanonas) que actúan como análogos de AHL, y han resultado ser efectivos inhibiendo el QS de *C. violaceum* CV026⁴⁶.

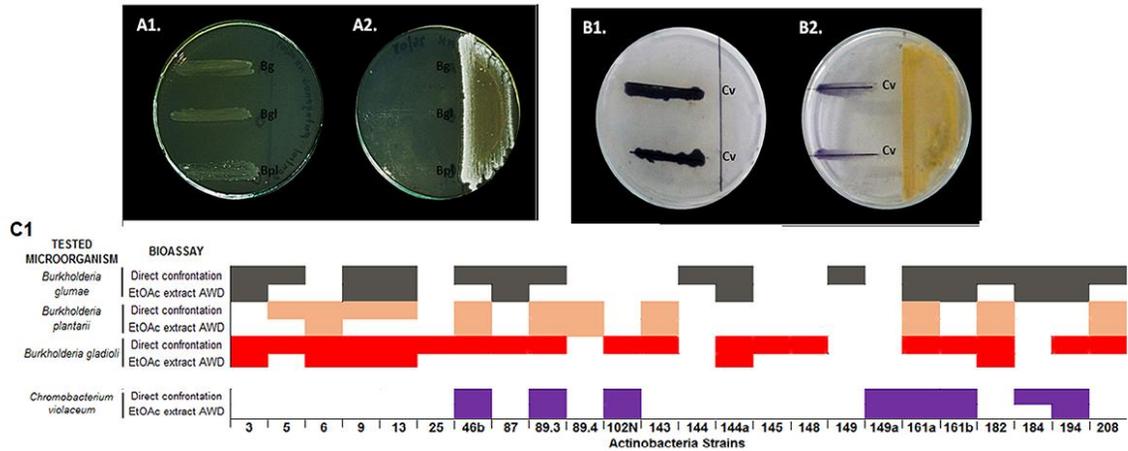


Figura 2.2 Pruebas de actividad antimicrobiana y de inhibición de *quorum* para las 24 cepas de Actinobacteria. (A1) Foto de los fitopatógenos *Burkholderia* spp. sin confrontación (Bg: *Burkholderia glumae*, Bgl: *Burkholderia gladioli*, Bpl: *Burkholderia plantarii*). (A2) Imagen de la confrontación de los fitopatógenos de *Burkholderia* spp. contra la cepa número 9. (B1) Imagen de *Chromobacterium violaceum*. (B2) Imagen de la prueba de inhibición del *quorum* contra la cepa número 46b. (C) Mapa de bioactividad de las 24 cepas y sus extractos orgánicos. Los resultados para las actividades antibacterianas e inhibitoria de QS se resumen en la Fig. 2C. El eje horizontal muestra los códigos de las 24 Actinobacterias y el eje vertical muestra cada uno de los patógenos probados tanto en la confrontación directa como en la prueba con el extracto. El color indica el control total o parcial de cada fitopatógeno, que se asume como un resultado positivo

Adicionalmente, las 24 actinobacterias se ensayaron contra tres bacterias fitopatógenas del género *Burkholderia*, esto se hizo tanto *in vivo* como con las fases orgánicas y acuosas obtenidas de manera similar a las descritas anteriormente. Los aislamientos que causaron mayor inhibición *in vivo* frente a los fitopatógenos fueron: las cepas PNM5, PNM9, PNM13, PNM46b, PNM89.3, PNM161a, PNM161b, PNM182 y PNM208, que son activos frente a las tres especies de *Burkholderia*. Todos ellos pierden actividad al menos frente a un patógeno cuando se ensayan sus extractos orgánicos. Adicionalmente, los extractos orgánicos más activos no corresponden necesariamente a las mismas cepas activas *in vivo*, siendo los aislamientos PNM3, PNM6, PNM13, PNM144a, PNM161a, y PNM182 activas al menos contra dos de los fitopatógenos probados. La cepa menos activa en ambos bioensayos es PNM25, una especie *Gordonia* que sólo controla *B. gladioli*. Las cepas de *Streptomyces* spp.: PNM144 y PNM149 solo actuaban como bactericidas en los ensayos *in vivo* mientras sus extractos no son activos sugiriendo un posible mecanismo de acción con intermediación de enzimas. Finalmente, los extractos de tres cepas (PNM25, PNM144 y PNM149) no mostraron ninguna actividad, siendo las dos últimas activas en ensayos *in vivo*.

De las cepas que resultaron activas como inhibidoras de QS, los aislamientos PNM46b, PNM89.3, y PNM161a (*Streptomyces* spp de la OTU 1), también demostraron actividad *in vivo* contra los tres fitopatógenos de *Burkholderia*. Este importante mencionar que los extractos orgánicos de estos tres aislamientos no son activos contra los fitopatógenos pero si son QQ. El aislamiento 161a (*Streptomyces* sp de la OTU 1) activo como QQ en su extracto orgánico es activo frente a dos de los fitopatógenos tanto *in vivo* como en sus extractos. La cepa PNM102N (*Micromonospora* de la OTU 6), además de ser activa contra *C. violaceum in vivo e in vitro*, demostró ser solamente activa frente *B. gladioli*. Finalmente, PNM149a (*Streptomyces* sp de la OTU 3), activa contra *C. violaceum*, no es activa contra ningún fitopatógeno. En conclusión, no parece haber relación entre la actividad IQS y la actividad bactericida contra las especies de *Burkholderia* ensayadas.

2.2.3 Análisis de perfil metabólico

Uno de los principales objetivos de este capítulo fue seleccionar cepas con diferentes perfiles químicos, buscando evitar el aislamiento de compuestos redundantes. Así, y con el fin de evaluar la producción de metabolitos por parte de cada una de las 24 cepas, se hizo el análisis por CL-EM de cada uno de los extractos orgánicos. Para esto cada una de ellas se cultivó en TSB durante 15 días a temperatura ambiente y con agitación, posteriormente los cultivos fueron centrifugados y el sobrenadante fue extraído con acetato de etilo, para recuperar la fase orgánica. Esta fase fue analizada por CL-EM, usando una columna de RP-18 y con ionización ESI en modo positivo y negativo. Los datos CL-EM se exportaron en una matriz Excel (.CSV), y luego se procesaron con el software libre MZmine 2.10. Con ayuda de éste se alinearon los picos, se suprimieron los aductos y se eliminó el ruido presente en los cromatogramas.

Los datos fueron sometidos a análisis multivariado (MDVA) con el fin de determinar la similitud entre los diferentes extractos, que reflejará la similitud metabólica entre las cepas estudiadas. El MDVA permite evaluar simultáneamente un gran número de datos (en este caso iones m/z y tiempos de retención, que representan metabolitos) y determinar sus correlaciones con ciertas propiedades biológicas, la actividad IQS por ejemplo. Para el análisis multivariado se utilizó el paquete estadístico SIMCA-P 14⁴⁷. Así, para los 24 extractos orgánicos se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) usando Pareto como método de escalado. Como control se incluyó el extracto de los medios de cultivo (TSB), los resultados se presentan en la Fig. 2.3.

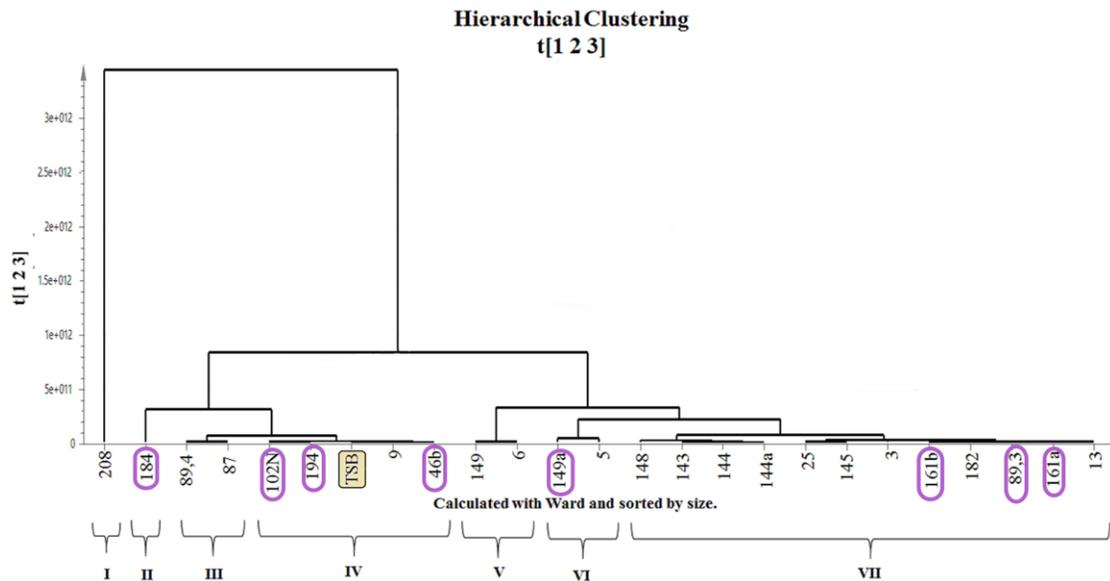


Figura 2.3 Análisis de agrupamiento jerárquico (HCA) basado en perfiles metabólicos de HPLC-MS de los extractos orgánicos de 24 cepas de actinobacterianas. TSB representa el medio de cultivo. Los números arábigos representan códigos de las cepas. Los números romanos representan grupos según su similitud de perfil metabólico. En violeta están resaltadas las cepas activas.

El dendrograma HCA de la Fig. 2.3 muestra que los extractos de las cepas se agruparon en siete grupos (I a VII) de acuerdo con su perfil químico por HPLC-MS. Es importante notar que estos no se correlacionan con las OTU obtenidas de los datos genéticos. En un análisis por HCA, la distancia medida entre dos objetos corresponde al grado de similitud entre ellos. Por lo tanto, en este caso, una pequeña distancia de agrupamiento indica una alta similitud en el perfil químico de las cepas, mientras si esta distancia es grande la divergencia química entre las cepas será mayor. El hecho de que el HCA no coincida con la reconstrucción filogenética, ni con el dendrograma obtenido por el análisis de MALDI-TOF, no es sorprendente ya que estas técnicas se enfocan en diferentes conjuntos de información dentro de las cepas bacterianas, haciéndolas complementarias. Mientras que el árbol filogenético se basa en la similitud de secuencias de 16S rRNA, MALDI-TOF se emplea comúnmente para compuestos de peso molecular medio a alto incluyendo péptidos y proteínas, y que están presentes en la célula bacteriana. Por otra parte, los análisis por HPLC-MS se concentran en metabolitos de bajo peso molecular, y además que están en el sobrenadante del cultivo. En este sentido una proximidad de dos cepas en el árbol filogenético da razón de una similitud en términos genéticos, mientras una proximidad en el HCA construido con datos de HPLC-MS diría que las dos cepas producen compuestos similares o iguales.

Estudios biotecnológicos como el presente buscan, mediante el cultivo de bacterias, recuperar compuestos con alguna actividad biológica. En este sentido serán interesantes aquellas cepas que transformen el medio de cultivo en metabolitos aislables. El extracto del blanco de TSB está en el grupo IV, que también incluye los extractos de los aislamientos PNM9, PNM46b, PNM102N y PNM194, lo que sugiere que la producción metabólica de estos aislados no difirió sustancialmente del perfil obtenido del medio de cultivo. Es decir que estas cepas, si bien podrán producir compuestos activos su concentración sería muy baja, y por tanto su recuperación difícil. En conclusión, los aislamientos del grupo IV no sería de interés en un estudio químico que busque recuperar los compuestos activos.

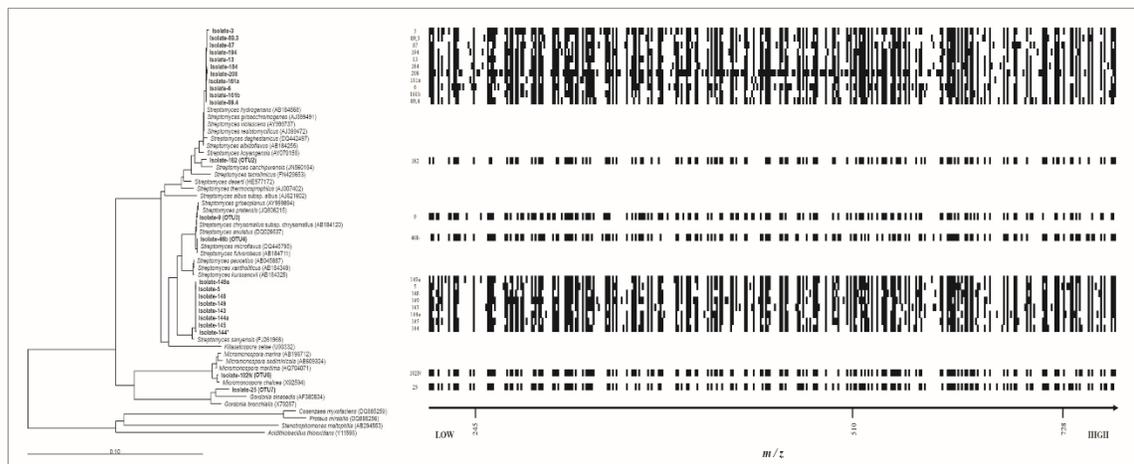
La gran distancia del grupo I, constituido únicamente por el *Streptomyces* PNM208, con respecto a los otros grupos (grupo II-VII), sugiere diferencias importantes en términos de perfiles metabólicos para este aislamiento cuando se le compara con las demás muestras. Teniendo en cuenta que el aislamiento PNM208 no muestra diferencias significativas con respecto a los otros aislamientos en términos de actividad biológica, el perfil bioquímico, fuente de la que se recuperó, ni en la secuenciación del gen 16S rRNA, dichas diferencias deben explicarse únicamente por la presencia de metabolitos distintos. Estos metabolitos probablemente se sintetizan como resultado de la presencia de grupos de genes biosintéticos que son exclusivos del aislamiento, que dan como fruto de una expresión génica diferencial. De hecho, estudios previos han demostrado que diferentes cepas perteneciente a la misma especie *Streptomyces* (*S. albus*) contienen diferentes grupos de genes que codifican la producción de metabolitos secundarios específicos de cada cepa⁴⁸. Esta cepa PNM208 podría ser interesante para su estudio químico, pues es muy diferente de las demás, pero al no ser activa como QQ no es de interés para esta tesis. No obstante, su estudio químico se recomienda, pues parece ser una productora de compuestos diferentes a las demás del cepario.

En la misma medida, el grupo II comprendía una única cepa (PNM184), el grupo III contiene las cepas PNM87 y PNM89.4; el grupo V incluye las cepas PNM6 y PNM149; las cepas PNM5 y PNM149a pertenecen al grupo VI. Mientras, el grupo VII contiene un gran grupo de cepas PNM3, PNM13, PNM25, PNM89.3, PNM143, PNM144, PNM144a, PNM145, PNM148, PNM161a, PNM161b y PNM182. Lo más importante de lo anterior es que las cepas con actividad inhibitoria de QS se encuentran distribuidas en todos los grupos, pero el IV contiene una gran cantidad de extractos activos. Este resultado es interesante porque

en este mismo grupo está el medio de cultivo TSB, lo que indica que los compuestos responsables de la actividad QQ deben ser minoritarios en sus extractos.

Con el fin de visualizar la diversidad metabólica de los 24 extractos de las cepas, se construyó un *barcoding* químico (Figura 2.4). Para ello, el archivo con extensión CSV se exportó a Microsoft Excel y se restaron los datos del medio para cada una de los aislamientos (solo se consideran valores $m/z > 200$). Luego, utilizando la función IF de Excel (= IF (célula > 0,1,0)) se creó un conjunto de datos binarios (código de barras) para cada extracto bacteriano, mostrando la diversidad química global. Los valores de presencia "1" se muestran en color negro, mientras que los valores de ausencia "0" son blancos. Cada variable corresponde a un identificador de dos dimensiones para cada compuesto basado en su tiempo de retención (cromatografía CLAE) y valor m/z . Utilizando este código de barras, es posible identificar algunas cepas con una gran riqueza metabólica (gran número de variables, es decir cuadros negros), a saber: PNM208 (236 variables); y algunas cepas con baja diversidad metabólica como las cepas PNM89.3 y PNM182 (137 y 129 variables, respectivamente). Este análisis identificó a la cepa PNM208 como el productor de un gran número de metabolitos exclusivos (35 cuadros negros únicos), confirmando así los resultados de HCA ya que esta cepa mostró diferencias importantes en términos de perfil metabólico con respecto a las otras muestras, siendo importante recordar que esta cepa no resultó activa. Otras cepas (como PNM149a) no producen metabolitos exclusivos, ya que comparten todas las variables (tiempo de retención y m/z) con otras cepas. Mientras que la cepa PNM102N produce sólo un metabolito diferente (variable) comparándolo con otros compuestos identificados en los otros extractos aquí presentados. En cuanto a las ocho cepas con actividad IQS cabe resaltar que las cepas PNM149a y PNM102N no presentan metabolitos exclusivos, mientras las PNM89.3 es poco diversa. Las otras cepas activas no presentan características que las diferencien de las no activas.

En este punto existen diversos puntos de vista para la selección, pues podría ser interesante una bacteria que produzca muchos compuestos exclusivos pues daría acceso a moléculas nuevas y ampliar el espacio químico. No obstante, una cepa productora de múltiples compuestos podría dar lugar a compuestos diferentes, pero en bajas concentraciones que haría difícil recuperarlos. Lo anterior pone de manifiesto que puede haber un camino diferente que es buscar cepas con poca diversidad química, que produzcan pocos compuestos, pero en gran cantidad.



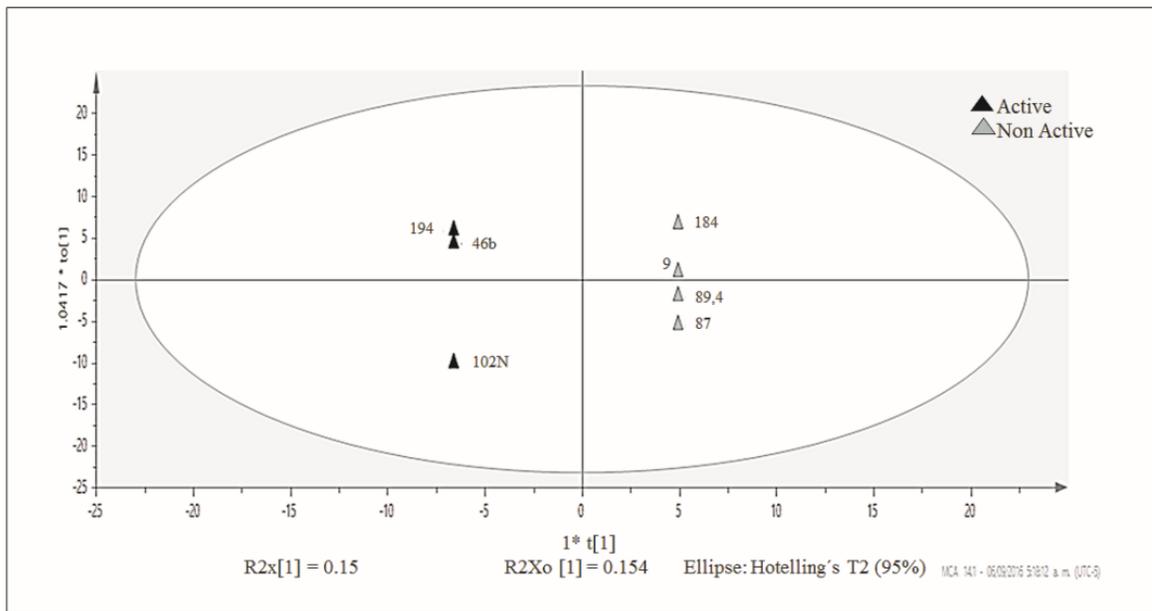


Figura 2.5 Score Scatter Plot del OPLS-DA usando Y como IQS para los siete extractos orgánicos de las cepas PNM9, PNM46b, PNM87, PNM89.4, PNM102N, PNM184, PNM194. En color negro los extractos activos y en color gris los no activos

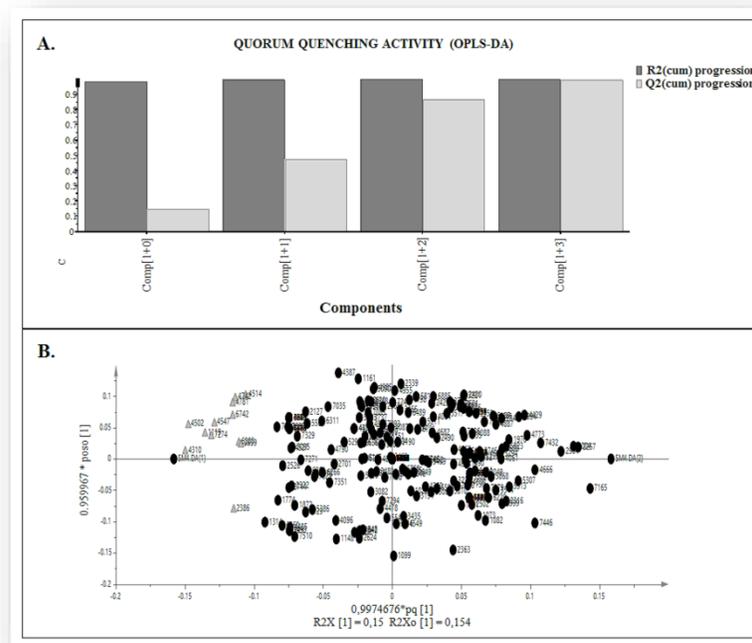
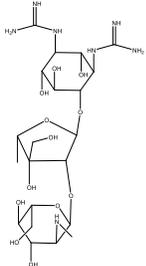
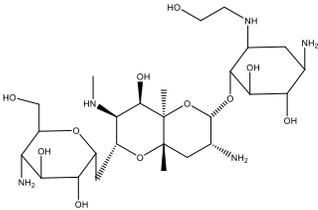
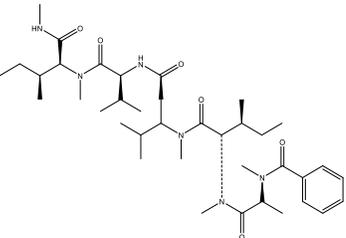
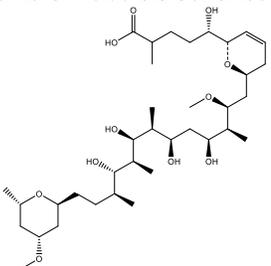


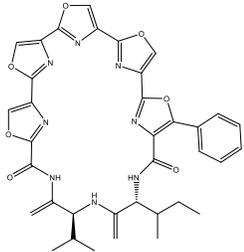
Figura 2.6 OPLS-DA actividad de inhibición de *quorum*. Resumen de ajuste ($R^2Y = 1$, $Q^2 = 0,998$). Loading Scatter Plot (VIPs, color gris). Las cepas PNM9, PNM46b, PNM87, PNM89.4, PNM102N, PNM184, y PNM194. En este caso, la escalado de datos se realizó por escalado de varianza unitaria (UV-).

Del *Score Scatter Plot* obtenido del OPLS-DA se pudieron identificar 12 VIPs (compuestos) como los asociados a la actividad de inhibición del QS. Ellos representan los compuestos QQ para los 3 extractos activos del Grupo A (grupo II-IV), Figura 2.6. En la tabla 2.2 se presenta los códigos de las variables VIPs tal como se observan en la Figura 2.6, así como sus correspondientes valores de *m/z* y tiempo de retención. La dereplicación se hizo haciendo uso de la base de datos Antimarin y tomando como criterio la *m/z* y el origen del compuesto. En la tabla 2.2 se consigna esta información que mostró coincidencias para sólo 3 de los 12 VIPs identificados. Así, los compuestos determinados por comparación tentativamente serían para *m/z* 687.9 Inostamycina-B o Pterulamida III; para *m/z* 709.7 Mechercharmycina B (de Actinobacterias desconocidas)⁵¹; y para *m/z* 584.6 Streptomycina D (de *Streptomyces* spp)⁵² o Youlenmycina (de *Streptomyces* sp.)⁵³. En la tabla 2.2 se muestran las estructuras de los compuestos derreplicados. Es importante notar que la Streptomycina D se ha reportado como compuesto QQ en *Acinetobacter baumannii*⁵⁴ por lo que su identificación en los VIPs está de acuerdo con nuestra apuesta metodológica. Esta coincidencia muestra la fortaleza de este enfoque para guiar los esfuerzos de aislamiento en compuestos desconocidos y la capacidad de identificar nuevas fuentes de compuestos activos conocidos.

Tabla 2.2 Derreplicación de los 12 VIPs para la actividad inhibitoria de *quorum sensing* usando la base de datos Antimarin.

Código de Aislamiento donde se identifica la presencia del compuesto	VIPs		Fórmula Molecular	Número de Hits en Antimarin-database	Actividad Reportada
	<i>m/z</i>	RT (min)			
PNM194,PNM46b,PNM102N	225.1	39.0		No hits	
PNM194,PNM46b, PNM9,PNM102N	249.1	9.6		No hits	
PNM194,PNM46b,PNM102N	251.1	36.9		No hits	
PNM194,PNM184, PNM46b,PNM102N	267.1	35.7		No hits	
PNM194,PNM46b,PNM102N	295.1	37.7		No hits	
PNM194,PNM46b,PNM102N, PNM89.4	355.1	34.3		No hits	
PNM194,PNM46b,PNM102N, PNM89.4, PNM184	547.1	10.1		No hits	
PNM87, PNM194,PNM46b,PNM102N	556.3	9.5		No hits	
PNM194,PNM46b,PNM102N	584.6	9.9	C ₂₁ H ₄₁ N ₇ O ₁₂	Nombre: Dihidrostreptomycina; Abiocina; Vibriomicina DST; M43-05026; 23572; Streptomycina-D Fuente: <i>Streptomyces humidus</i> , S.sp.	Streptomycina a concentraciones subinhibitorias

Código de Aislamiento donde se identifica la presencia del compuesto	VIPs		Fórmula Molecular	Número de Hits en Antimarin-database	Actividad Reportada
	m/z	RT (min)			
					inhibe el quorum sensing en <i>Acinetobacter baumannii</i> (83)
			<chem>C23H45N5O12</chem>		Nombre: Youlenmicina Fuente: <i>Streptomyces</i> sp. (82)
					
PNM194,PNM46b,PNM102N	687.9	9.1	<chem>C37H66O11</chem>		Name: Inostamycin-B Antibiotic (84)
					
			<chem>C37H62N6O6</chem>		Nombre: Pterulamida III Citotoxico contra línea celular P388
					
PNM194,PNM46b,PNM102N	709.7		<chem>C37H66O11</chem>		Nombre: Acido bistonellico B
					
PNM194,PNM46b,PNM102N	709.7	7.4	<chem>C35H32N8O7S</chem>		Nombre: mechercharmicina A Fuente: <i>Actinobacteria</i> Citotoxico Humano, Leucemia Pulmón humano (80)

Código de Aislamiento donde se identifica la presencia del compuesto	VIPs		Fórmula Molecular	Número de Hits en Antimarin- database	Actividad Reportada
	<i>m/z</i>	RT (min)			
PNM194,PNM46b,PNM102N	751.3	9.0		No hits	

Este mismo ejercicio se hizo para el cluster B del HCA de la figura 2.3 pero no se encontró correlación entre la actividad IQS y las variables (R_t y m/z), lo que podría explicarse por una heterogeneidad enorme en la producción metabólica.

2.2.4 Priorización de los aislamientos para estudios químicos adicionales usando una aproximación integrativa

Tradicionalmente, la selección de cepas para estudios químicos se basa únicamente en el estudio de la actividad biológica. Sin embargo, los datos de bioactividad por sí solos no proporcionan información sobre los compuestos químicos responsables de la misma, y pueden llevar a la selección de cepas productoras de compuestos ya conocidos, o de organismos ya reconocidos por su actividad biológica. De otro lado, la selección basada únicamente en filogenia (secuencias de 16S rRNA) es útil como guía para seleccionar cepas de un género específico o especies de interés particular, o incluso para descartar aislamientos redundantes o aquellas cepas patógenas de una colección. Sin embargo, estos datos taxonómicos por sí solos no proporcionan información metabólica o de bioactividad. También hay ejemplos de cepas relacionadas filogenéticamente que no producen los mismos metabolitos secundarios y cepas pertenecientes a clados diferentes con producción de metabolitos similares^{14,55}. Finalmente, el uso exclusivo de perfiles metabólicos solo da información sobre diversidad química, que combinado con ejercicios de dereplicación puede dar información sobre su novedad, pero no indica si estos compuestos son activos, ni su valor taxonómico.

De otro lado, es de esperarse que cepas capaces de producir varios compuestos activos (antimicrobianos, por ejemplo) puedan tener un efecto más duradero y más potente sobre el patógeno que las cepas que producen un único compuesto bioactivo, pues es más probable que el patógeno desarrolle resistencia hacia él. Lo anterior será cierto si es que estos compuestos tienen mecanismos de acción diferentes. Sin embargo, debe observarse que las bacterias que producen varios compuestos (bacterias ricas en metabolitos), producirían cantidades bajas de compuestos, dificultando su aislamiento e identificación. Además, de las diferencias observadas en el perfil metabólico podrían surgir extractos con baja diversidad de compuestos activos, lo que sugiere que las cepas podrían haber desarrollado la capacidad de producir moléculas altamente potentes con una pequeña diversidad. De lo anterior queda claro que no hay un único criterio de selección de cepas bacterianas basado en el perfil metabólico. Además, el uso exclusivo del perfil metabólico (HPLC-MS) por sí solo no se correlaciona con la actividad biológica deseada.

En términos generales, se puede decir que cada conjunto de datos por sí solo no es suficiente para tomar una decisión sobre qué cepas son adecuadas para estudiar. Para superar este problema, recientemente, se ha descrito el análisis de perfiles metabólicos basado en datos de HPLC-MS y/o RMN, junto con un análisis multivariado supervisado como OPLS-DA que integra información de bioactividad, como una herramienta útil para obtener información sobre la composición química de los extractos seleccionados por su actividad antes del aislamiento del compuesto⁵⁶⁻⁵⁸.

En este trabajo proponemos el uso de datos de actividad biológica como criterio principal, seguido de la riqueza metabólica y la información filogenética. Los datos de actividad biológica se pueden obtener usando dos aproximaciones el ensayo *in vivo* y el ensayo de los extractos, el primero será útil en la selección de cepas en estudios de biocontrol, mientras los extractos orgánicos proporcionan información valiosa para guiar estudios químicos adicionales. Los datos taxonómicos reflejan la diversidad genética mientras el uso de HCA (construido con datos de HPLC-MS) y *barcoding* refleja la riqueza metabólica.

Utilizando este enfoque, se seleccionaron seis cepas para estudios químicos adicionales como resultado de bioactividad integrada, perfilación metabólica e información taxonómica (Tabla 2.3). De las 24 actinobacterias estudiadas en este capítulo, se seleccionaron 8 cepas por presentar actividad inhibitoria de *quorum sensing* en ensayos *in vivo* (PNM46b, PNM89.3, PNM102N, PNM149a, PNM161a, PNM161b, PNM184 y PNM194). Los extractos orgánicos y acuosos de éstas 8 bacterias también fueron ensayados,

encontrando que 7 de ellos activos en su fase orgánica, mientras el aislamiento PNM184 no es activo en ninguno de los dos extractos. Por lo que se descarta para un estudio químico, aunque podría tener valor como biocontrolador. De los siete aislamientos restantes la mayoría de ellas son *Streptomyces* spp, mientras PNM102N pertenece al género *Micromonospora*, lo que es interesante debido a que este género ha sido descrito como biocontrolador y promotor de crecimiento en plantas⁵⁹. De estos siete PNM161a, PNM161b, PNM89.3, y PNM194 pertenecen al OTU 1; lo que nos permite pensar que son cepas que se encuentran relacionadas filogenéticamente, pudiendo producir compuestos relacionados, por lo que sólo una de ellas debería seleccionarse. De otro lado la cepa PNM149a, pertenece al OTU3, PNM46b pertenece al OTU 4, y PNM102N pertenece al OTU 6, por lo que se considera que estas tres son interesantes para realizar el estudio químico por no tener relaciones filogenéticas.

En cuanto a la diversidad química, que se juzga a través del HCA y el *barcoding*, se buscan bacterias que produzcan compuestos poco relacionados con el medio, en este sentido las bacterias del IV, que incluye al medio TSB, no serían de interés; que es el caso de PNM194, PNM102N y PNM46b. En este punto es importante descartar que desde el punto de vista filogenético y de actividad biológica (su extracto es el más activo) la cepa de *Micromonospora* PNM102N es la más interesante, pero desde el punto de vista químico no, debido a que sería difícil recuperar los compuestos bioactivos. En el grupo VII, que sería el más lejano al grupo que contiene al medio TSB (grupo IV), se encuentran las cepas PNM89.3, PNM161a y PNM161b siendo interesantes para su estudio químico. Estas tres cepas pertenecen al OTU 1, significando que están muy relacionadas filogenéticamente, por lo que se debería elegir a una sola de ellas para su estudio químico y además son también activas como antimicrobianas contra los fitopatógenos de *Burkholderia*, lo que sugiere que es interesante su estudio desde el punto de vista como antibiótico. La cepa 149a, pertenece al grupo VI que está más alejado del grupo IV (TSB), además pertenece al OTU 3 que comprende un grupo grande de *Streptomyces*, siendo la única que presenta actividad IQS, lo que haría muy interesante para su estudio químico, pero en cuanto a su actividad biológica no es tan potente, adicionalmente en el análisis MVDA no hubo correlación de su composición química con la actividad biológica por lo que no se prioriza.

Tabla 2.3 Cepas con la mayor actividad biológica HCA - OTU

Código Cepa	Nombre científico	Ensayo <i>in vivo</i>	Halo de inhibición extracto	OTU (núm. de miembros)	Cluster (HCA)	Actividad frente a especies de <i>Burkholderia</i>
-------------	-------------------	-----------------------	-----------------------------	------------------------	---------------	----------------------------------------------------

			orgánico (mm)		(núm. de miembros)	<i>In vivo</i>	Extracto
PNM161a	<i>Streptomyces</i> sp	+	2.5	1 (11)	VII (8)	3	2
PNM161b	<i>Streptomyces</i> sp	+	1.5	1 (11)	VII (8)	2	1
PNM89.3	<i>Streptomyces</i> sp	+	2	1 (11)	VII (8)	3	1
PNM184	<i>Streptomyces</i> sp	+	-	1 (11)	II (1)	2	1
PNM194	<i>Streptomyces</i> sp	+	1.5	1 (11)	IV (4)	2	1
PNM46b	<i>Streptomyces</i> sp	+	1.4	4 (1)	IV (4)	3	1
PNM149a	<i>Streptomyces</i> sp	+	1.25	5 (8)	VI (2)	0	0
PNM102N	<i>Micromonospora</i> sp.	+	2.5	6 (1)	IV (4)	1	0

Con estos criterios las cepas más promisorias son PNM102N, PNM149a y PNM89.3. La primera porque es la más activa y pertenece a un género interesante como biocontrolador pero cuya diversidad química no parece respaldarla. En tanto que, PNM149a pertenece al OTU3, al igual que otras cinco cepas muy similares filogenéticamente, químicamente es interesante por encontrarse en el grupo VI del HCA que se encuentra alejado del medio TSB; no obstante, este aislamiento es levemente activo contra *C. violaceum*, y no activo contra las cepas de *Burkholderia*. El aislamiento PNM89.3 es medianamente activo, pertenece al OTU 1, con otros 11 aislamientos muy similares, y se encuentra en el grupo VII del HCA, que es el más lejano con respecto al medio (TSB), por lo que podría considerarse para su estudio químico, pero al realizar los estudios preliminares de esta cepa las fracciones obtenidas perdieron actividad, razón por la que se suspendió su estudio, y se decidió continuarlo con PNM102N (*Micromonospora* sp.), pese a que se esperaba que fuera difícil por su similitud con el medio.

2.2.5 Estudios químicos preliminares de las cepas de actinobacterias preseleccionadas.

De estas tres cepas PNM89.3, PNM102N y PNM149A, se decide realizar el estudio a las dos primeras por ser las más activas. La primera cepa preseleccionada corresponde a la PNM89.3, una cepa de *Streptomyces* en general se cree que las cepas de este género aisladas de ambientes marinos son productoras de antibióticos más diversos que sus análogos terrestres⁶⁰. De cepas de *Streptomyces*, se han aislado algunos compuestos QQ, no obstante hay pocos ejemplos en la literatura⁶¹. PNM89.3 se cultivó en 500 mL de medio TSB, el sobrenadante se centrifugó y extrajo con acetato de etilo. La fracción orgánica resultó activa frente al biosensor *Chromobacterium violaceum*, por lo que se fraccionó sobre una columna RP-18, identificándose que la actividad se repartió entre las diferentes fracciones, sin embargo, ninguna era tan activa como el original. Esto se podría explicar

por fenómenos de sinergia o porque el compuesto se quedó irreversiblemente retenido en la columna. La fracción más abundante corresponde a un lipopéptido a juzgar por los desplazamientos característicos de los metilos y los protones alfa de los amino ácidos. (figura del anexo S2.5). No obstante, la actividad no fue lo suficientemente buena para seguir trabajando con él. Las otras fracciones tenían rendimientos bajos, lo que coincide con el hecho de que esta cepa PNM89.3 haya sido identificada como productora de pocos compuestos según el *Barcoding* de metabolitos (figura 2.3). Se recomienda cultivar esta bacteria en otros medios, como se hizo en el capítulo 3, para optimizar la recuperación de los compuestos activos.

La cepa PNM102N pertenece al género *Micromonospora*, cuyos miembros están ampliamente distribuidas en la naturaleza, viviendo en ambientes diferentes, y son fuente de metabolitos secundarios biológicamente activos, y recientemente se demostró que pueden influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas⁵⁹. Por esta razón esta cepa puede ser de interés para este trabajo. La capacidad de producción de compuestos por parte de ellas puede variar enormemente⁵⁷ por lo que hacer generalizaciones es arriesgado. En la literatura científica, se ha descrito que el género *Micromonospora* produce compuestos citotóxicos como neihumician, y antibióticos como la fortimicina A y la gentamicina⁶², macrolactamas como la micromonolactama⁶³, e incluso una nueva clase nueva de compuestos, como la diazepinomicina, que se caracteriza por tener núcleo de dibenzodiazepina unido a una cadena lateral de farnesilo⁶⁴.

Por lo anteriormente expuesto, y dado los resultados obtenidos en el análisis previo (Tabla 2.3) se realizó el estudio químico de 102N (*Micromonospora* sp), que es fuertemente activa, pertenece a un género prometedor, aunque está muy relacionada con el medio TSB en los análisis por HPLC-MS que indican que los compuestos activos pueden estar en cantidades muy pequeñas. La cepa se cultivó en 20 litros de TSB, éste se centrifugó para obtener el sobrenadante que fue sometido a extracción líquido-líquido con acetato de etilo, obteniéndose dos fracciones: un extracto orgánico, el cual mostro actividad frente al biosensor, y un extracto acuoso que resultó no ser activo. Lo anterior indica que los compuestos activos no son de alta polaridad. El fraccionamiento bioguiado de la fase orgánica por sephadex y CCF preparativa (Ver numeral 2.4.8) permitió identificar la fracción activa, luego de múltiples fraccionamientos lo que terminó con un rendimiento muy bajo (1.18 mg). El control de las fracciones se hizo por CCF, RMN ¹H y CL-EM. Para la fracción activa (F3.2.2), se encontró que el espectro de RMN ¹H muestra la presencia de

un compuesto tipo ácido graso, a juzgar por las señales en δ_H 1.29 ppm correspondientes a $(CH_2)_2$ y δ_H 0.89 ppm, correspondiente al metilo terminal. Además, se observa la presencia de dos singletes anchos en 7.6 y 7.7 ppm (Anexo Figura S2.5). Estos resultados son coherentes con amidas alquílicas o nitrilos alquílicos. Los análisis por CG-EM, con columna DB-5, no arrojaron resultados contundentes pudiendo indicar que se trata de compuestos de alta polaridad o cadena larga. Lo anterior es coherente con la identificación de alquilnitrilos saturados en especies de *Micromonospora* sabiendo que sus amidas son precursoras de ellas⁶⁵. Este resultado sugiere la necesidad de estudiar los volátiles de las bacterias para buscar compuestos QQ como se hizo en el capítulo 4. La presencia de cianuro hidratadas en micromonosporas ha sido relatada, y se sabe que son capaces de degradar cianuro, por eje. *Micromonospora braunna*⁶⁶. La Cianuro hidratasa es una enzima intracelular detectada en pocos hongos y bacterias. Cataliza la reacción de hidratación del cianuro, una toxina potente, para formar formamida, una amida no venenosa intermedia de la degradación del cianuro^{66,67}.

En vista de la poca cantidad de muestra que se logró aislar, a pesar de haber iniciado con 20L de cultivo, llevó a concluir que si bien el compuesto puede ser muy activo se encuentra en muy pequeñas cantidades. Esta situación era la predicha por HCA, en el que se puede observar que el extracto de esta cepa 102N se encuentra muy cercano al medio de cultivo (TSB), lo que significa que es muy similar lo que hace difícil su estudio químico.

2.3 Conclusiones y recomendaciones

Se recolectaron muestras de invertebrados, algas, peces y sedimentos marinos para a partir de ellos obtener cepas de microorganismos. Algunas de las bacterias cultivables en estas muestras fueron aisladas por diluciones sucesivas hasta recuperar 203 aislamientos. Entre ellos 162 se describieron como bacterias y 41 como hongos, de acuerdo a sus características morfológicas, observación microscópica y tinción de Gram. Así, este estudio contribuyó a investigar la biodiversidad en el suroeste del Mar Caribe como una fuente de diversidad microbiana no explotada, que tiene un enorme potencial para proporcionar compuestos químicos que permitan desarrollar nuevos productos biotecnológicos con posibles aplicaciones en el campo de la agricultura.

Las 162 cepas descritas como bacterias se ensayaron mediante enfrentamiento *in vivo* contra el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Este *screening* preliminar

permitió identificar la presencia de 16 aislamientos activos. Dado que las actinobacterias han mostrado ser una fuente prolífica de compuestos activos, en este capítulo se decidió trabajar con ellas. Dentro de los procesos de aislamiento se lograron recuperar 24 cepas de actinobacterias, identificadas por su morfología (presencia de micelio) y presencia de ácido diaminopimélico en su pared celular, en el caso de los *Streptomyces*. El número de actinobacterias recuperadas en este estudio no cumplió con las expectativas, pues de acuerdo a la literatura el número debería ser mayor, particularmente en fuentes como esponjas y algas. Por lo anterior es importante abordar nuevas metodologías que permitan una recuperación de este tipo de bacterias, que incluyan tanto otros medios de cultivo como la variación en los tiempos de cultivo de los mismos.

El análisis del gen 16S rRNA permitió identificar tres géneros dentro de los 24 aislamientos recuperados (*Streptomyces*, *Micromonospora* y *Gordonia*). Estos géneros son los comúnmente identificados en cepas provenientes del mar. El análisis de los extractos orgánicos por CL-EM permitió caracterizar la riqueza metabólica de las 24 cepas de Actinobacterias. Estos datos fueron sometidos a análisis multivariado (MVDA) buscando correlacionar los datos que describen el sistema (R_t y m/z) con su actividad biológica, lo que identificó algunas VIPS que por ejercicios de dereplicación permitieron sugerir la presencia de compuestos QQ como la Streptomycina D.

Para la selección de cepas promisorias se aplicó una estrategia integrativa utilizando información taxonómica, bioactividad y herramientas de perfilado metabólico. Así, se seleccionaron las siguientes ocho cepas de Actinobacterias: PNM46b, PNM89.3, PNM102N, PNM149a, PNM161a, PNM161b, PNM184 y PNM194, como fuente de nuevos y activos compuestos IQS contra los fitopatógenos. Para un estudio químico preliminar dentro de estas ocho cepas se eligieron las cepas PNM89.3, y PNM102N. La primera pertenece al género *Streptomyces*, su extracto orgánico es activo frente al biosensor pero durante su fraccionamiento sobre RP-18 la actividad se reduce. El compuesto mayoritario es un lipopéptido poco activo frente al biosensor. Se continuó el estudio con el aislamiento PNM102N, molecularmente identificada como del género *Micromonospora*, la selección de esta cepa se hizo por su fuerte actividad, pero su perfilado metabólico por LC-MS pronosticaba que los compuestos activos eran poco abundantes. El estudio químico de 20L del cultivo en TSB permitió el aislamiento de un compuesto lipídico en muy baja cantidad, por lo que se sugiere su estudio en otros medios de cultivo que permitan

recuperar más cantidad del compuesto activo. Los otros aislamientos prometedores, antes citados, deben ser estudiados químicamente haciendo cultivos en diferentes medios.

2.4 Materiales y Métodos

Generalidades

Los análisis por RMN se hicieron en MeOD-d₄ (Merck), grado de deuteración 99.8%, D₂O grado de deuteración 99.9% (Merck), en un espectrómetro Bruker avance 400MHz Ultrashield RMN. Las extracciones se hicieron con acetato de etilo Honeywell Burdick & Jackson. La cromatografía en columna se realizó empleando SilicaFlash® P60 40-63 µm (230-400 mesh) 60^a, y solventes calidad RA (grado analítico). La cromatografía por exclusión de tamaño se hizo en una columna abierta empacada con Sephadex LH-20, usando como fase móvil Diclorometano Emparta® de Merck/metanol Lichrosolv® de Merck (1:1).

Los análisis de CLAE/EM se llevaron a cabo en un equipo Agilent Technologies 1260, acoplado a un espectrómetro de masas marca Agilent Technologies 6520 Hybrid MS Q-TOF, usando ionización por electrospray (ESI) en modo positivo. Se usó una columna C-18 Zorbax Extend (2.1 mm x 50 mm; 1.8 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a 30°C. La fase móvil fue metanol, con un flujo de 0.2 mL/min.

Los análisis de densidad óptica se hicieron en un equipo de Elisa marca Accu Reader⁺ M965mate. Para la preparación de los inóculos de los biosensores y la fermentación de las cepas seleccionadas se usó un Orbital Shaker HD-3000 DIMAR termostato a (130 rpm). Para la conservación de las cepas se usó un ultracongelador Panasonic MDF-U56UVC-PA; se usó una centrífuga HERMLE Z206A; una estufa Mermet; para la preparación de las muestras se usó una cabina de flujo laminar ESCO, un vórtex BOECO V1Plus.

2.4.1 Aislamiento de cepas bacterianas

Para llevar a cabo esta investigación, la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) y el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible otorgaron el permiso de recolecta y estudio de muestras de bacterias recuperadas (Permiso N° 4 del 10/02/2010, Anexo 2, Contrato de Acceso a Recurso Genético No 108). Para el aislamiento de las cepas bacterianas, se recolectaron pequeñas piezas (2 cm²) de invertebrados marinos, algas y sedimentos mediante buceo en arrecifes en la isla de Providencia (Mar Caribe

colombiano) en marzo del 2013. Las coordenadas geográficas del área de muestreo fueron 13° 23'0,00 "N a 13° 25'0.00" N 81° 22'0.00 "O a 81° 24'0,00". Muestras de los mismos sustratos se recogieron en cinco sitios diferentes en marzo de 2013. Los fragmentos de los gorgónidos y algas se obtuvieron con tijeras, mientras los fragmentos de esponja se cortaron con un cuchillo de buceo. En el caso de las muestras de sedimento (5 cm³) se colectaron utilizando cucharas de plástico. En todos los casos las muestras individuales se colocaron en una bolsa ziplock y se llevaron a la superficie.

En tierra cada una de las muestras se enjuagó suavemente con agua estéril y luego se colocó sobre la superficie del medio de cultivo sólido y estéril contenido en cajas de Petri. La recuperación de cepas actinobacterianas se realizó utilizando dos de los medios sugeridos para tal fin^{68,69}: agar ISP-2 (extracto de levadura 4 g/l, extracto de malta 10 g/l, dextrosa 4 g/l, agar 20 g/l) y agar de avena suplementado con sales (avena 30 g/l, NaCl 20,8 g/l, KCl 0,56 g/l, MgSO₄ 4,8 g/l, sal de Rila 1,5 g/l, glicerol 1,5 g/l, agar 18 g/l). Las placas se incubaron durante dos semanas a 30° C.

Una vez que se detectó el crecimiento bacteriano, el agar se fragmentó en trozos con una aguja estéril. Los fragmentos obtenidos se transfirieron a 2,0 mL de solución salina estéril (0,85%) y luego se homogenizaron en un vórtex y se suplementaron con 50 mg de CaCO₃ con el fin de mejorar el crecimiento de cepas bacterianas⁷⁰. Tales suspensiones se incubaron a 26° C durante una semana y después se diluyeron en serie con Tween-80® (0,1%). Las diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁵ se cultivaron en agar de almidón y caseína (ACA) (caseína 1 g/l, almidón 10 g/l, K₂HPO₄ 0,5 g/l; agar 15 g/l) y se incubaron a 26° C por un período de 4 a 6 semanas. La purificación de aislamientos bacterianos se realizó por subcultivo sucesivo de colonias individuales en medio ACA. Se recuperó un total de 203 aislamientos, incluyendo 162 bacterias y 41 hongos. (anexo tabla S2.1)

Los aislados bacterianos se conservaron de la siguiente manera: i) Para las bacterias formadoras de micelio (características de organismos tipo Actinobacteria), se cultivaron colonias individuales en placas ACA a 4°C (preservación a corto plazo) y las suspensiones de micelios se conservaron en glicerol al 50% y -80°C (Conservación a largo plazo)⁷¹. ii) Para aquellas bacterias sin formación de micelio, se cultivó una única colonia en agar de trípticasa soya Bacto™: (Digerido pancreático de Caseína de 17 g/L, digerido papaico de Soja 3 g/L, Cloruro Sódico 5g / L, Dextrosa 2.5g/L, Fosfato di potasico 2.5 g/L Agar 15g / L) y se suspendió un asa llena de biomasa en caldo de trípticasa soya suplementado con glicerol al 50%, que se almacenaron a -80°C.

La identificación taxonómica, la caracterización bioquímica y los estudios de perfil metabólico se realizaron a 33 cepas (24 de ellas del *phyum* Actinobacteria) con base en sus características micro y macroscópicas (*vide infra*) y a la actividad biológica que presentaban, en este caso si eran activas como bactericidas o como inhibidoras de *quorum sensing*. Todas las cepas se registraron en la colección de microorganismos del IBUN (Instituto de Biotecnología - Sede Bogotá), como se resume en el Anexo tabla S2.1.

2.4.2 Caracterización bioquímica de las cepas bacterianas

Las colonias individuales de las cepas de tipo Actinobacteria se caracterizaron por su morfología de colonias en agar nutritivo, ISP-2, ISP-3 e ISP-4. Se tuvieron en cuenta características morfológicas como: color y forma de las colonias en diferentes medios, formación de exudados, esporulación⁶⁹, además de características bioquímicas se evaluó la actividad de la catalasa y la oxidasa (Bactident® Oxidasa MERKC), que ha sido reportada para caracterizar bacterias⁷²⁻⁷⁴. Otras características bioquímicas como fermentación u oxidación de azúcares (glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amígdalina y arabinosa); actividad enzimática (β -galactosidasa, arginina-dihidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, ureasa, triptófano-desaminasa, gelatinasa); utilización de citrato; producción de sulfuro, indol y acetoina; y reducción de nitratos. Todo lo anterior se hizo haciendo uso del kit API 20E (bioMérieux Inc., Durham, NC) (Anexo Tabla S 2.2)⁷².

Para la caracterización quimiotaxonómica de las cepas de Actinobacteria, se determinó la presencia de ácido L,L-diaminopimélico (LL-A2pm) o ácido mesodiaminopimélico en la pared celular de los aislados. La metodología empleada fue la propuesta por Staneck y Roberts⁷⁵ con algunas modificaciones⁷⁶. Brevemente, se suspendieron dos o tres colonias de biomasa fresca (crecimiento de 7-14 días) en 500 μ L de HCl 6N. Esta suspensión se homogenizó en un vórtex durante 10 min, y después se colocó en una estufa a 100° C durante 8 h. Luego de la centrifugación, los sobrenadantes se transfirieron a un tubo Eppendorf nuevo y se secaron a 100°C. Se añadieron 500 μ L de agua destilada estéril y las muestras se centrifugaron y se secaron una vez más hasta que los sobrenadantes se secaron por completo. Este material se suspendió en 75 μ L de agua destilada, y se analizó por TLC (3 μ L de cada muestra) usando 1 μ L de mezcla de ácidos diaminopimélicos de referencia (CHEM-IMPEX INT'L INC, 1% en agua destilada). Las placas de TLC fueron de 20x20 cm en vidrio y con soporte de celulosa (Merck KGaA 64271), se desarrollaron en

cámaras de vidrio saturadas con una mezcla de metanol-agua-HCl 6N-piridina (80: 26: 4: 10, v/v). Las placas se secaron al aire, y luego se asperjaron con una solución de ninhidrina recién preparada (0,2%, p/v disuelta en acetona). Finalmente, se calentaron a 100° C durante 5 min. La presencia de ácido L,L-diaminopimélico se detectó en aquellas regiones que mostraban un color verde oliva característico ($R_f = 0,6$). (Anexo Figura S2.2). Los otros diastereoisómeros del ácido diaminopimélico tienen un comportamiento cromatográfico diferente.

2.4.3 Análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las cepas para el análisis de micrografía electrónica de barrido se crecieron durante 8 días en medio de agar ISP-2 usando papel de filtro. Los cultivos de cepas se fijaron utilizando tampón fosfato Milloning (0,1 M; pH 7,2) Glutaraldehído (1%). Las células se enjuagaron con agua destilada posteriormente deshidratada con etanol. Primero se secó el papel de filtro, luego se fijó en trozos y se recubrió con grafito. El análisis de microscopía de barrido se realizó utilizando SEM-Tescan Vega 3 SB⁷⁷.

2.4.4 Identificación taxonómica y números de acceso

En este punto la clasificación taxonómica se llevó a cabo únicamente para las cepas que se clasificaron morfológicamente como actinobacterias (en el capítulo siguiente se discuten otras cepas). Así, se realizó la amplificación por PCR y la secuenciación del locus 16S rRNA completo, utilizando *primers* universales 27F y 1492R⁷⁸. Las secuencias se depuraron y ensamblaron con el software DNA Baser 2.9 y se obtuvo una alineación precisa usando la herramienta SINA en línea⁷⁹. Los árboles filogenéticos y sus vecinos más cercanos se generaron utilizando el software ARB⁸⁰ y los LTPs123 disponibles en la base de datos SILVA⁸¹. Todas las secuencias de nucleótidos de DNAr 16S rRNA para las 24 cepas se depositaron en GenBank / EMBL / DDBJ, bajo los números de acceso KX641378 a KX641401, como se presenta en la Tabla 2.1.

Adicionalmente, las cepas se analizaron por espectrometría de masas con MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight*) Biotyper BRUKER. Para este propósito, las cepas fueron crecidas en medio LB y se incubaron durante ocho días a la misma temperatura. La identificación se realizó mediante un método de frotis directo, en el que se recogió una sola colonia y se colocó en una placa blanco de MALDI como una capa delgada y se dejó secar a temperatura ambiente. La placa MALDI se cubrió posteriormente

con 1 μ L de ácido fórmico al 70% y luego se cubrió con la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico-HCCA) y se secó al aire. Posteriormente cada cepa se analizó por MALDI-TOF. Los perfiles se visualizaron con el software FlexControl (versión 3.0) y el MTC Blotyper RTC. Los dendogramas se obtuvieron utilizando el software BioTyper 3.0. Para la calibración y como control positivo, se utilizó un perfil proteico de *Escherichia coli* (DH5 α) Bacterial Test Standard (BTS) (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania).

2.4.5 Bioensayos *in vivo*

Con el fin de establecer la actividad inhibitoria del QS de cada una de las cepas de actinobacteria, éstas fueron ensayadas frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC31532. Adicionalmente, las cepas fueron ensayadas como antibacterianos usando cepas patógenas para el arroz del género *Burkholderia*.

a) Ensayo de inhibición del *quorum sensing* de cepas de actinobacteria

Con el fin de probar la capacidad de las cepas de Actinobacteria para interrumpir los sistemas de *quorum sensing*, se utilizó a *Chromobacterium violaceum* ATCC31532 como biosensor por medio de un ensayo antagónico de *cross streak* (36,39). Brevemente, en placas de agar LB se sembraron cada una de las cepas en una línea horizontal, cerca de uno de los extremos de la placa de agar. A continuación, el biosensor se sembró perpendicularmente a esta línea. Las cajas se incubaron por 48 horas. Se consideró que el resultado era positivo para la inhibición de *quorum sensing* cuando el biosensor crecía, pero no producía violaceína (colonias blancas); mientras se consideró negativo cuando el biosensor no crecía (bactericida) o se ponía morado.

b) Ensayos antibacterianos *in vivo* frente a cepas patógenas de *Burkholderia*

(Estos ensayos fueron llevados a cabo por Luz Adriana Betancur)

La actividad antibacteriana de los 24 aislamientos de tipo Actinobacteria se llevó a cabo contra 3 patógenos bacterianos del arroz, usando un ensayo de confrontación directa. Las cepas patógenas empleadas fueron: *Burkholderia plantarii* ATCC 43733, *Burkholderia glumae* ATCC 33617 y *Burkholderia gladioli* CIAT 3704-1. Todas ellas fueron proveídas por FEDEARROZ. La última corresponde a una cepa recuperada de plantas de arroz sintomáticas de la enfermedad conocida como añublo bacterial de la panícula de arroz.

Estas cepas bacterianas se recuperaron y crecieron como se ha descrito previamente ⁸²⁻⁸⁵.

El ensayo de confrontación se realizó de la siguiente manera: las colonias individuales de cada aislamiento de Actinobacteria se inocularon en forma masiva en cajas Petri con medio Mueller-Hinton cubriendo la mitad de la superficie de la caja. Las cajas se incubaron a 28°C durante 10 días. Al cabo de este tiempo, las cepas patógenas de *Burkholderia* fueron estriadas en una línea horizontal, perpendicular a la zona de crecimiento de la actinobacteria ensayada. Las placas se incubaron a 37 °C y el crecimiento de cepas de *Burkholderia* se monitoreó diariamente durante tres días. Las cepas ensayadas capaces de inhibir total o parcialmente el crecimiento de los patógenos, después de 48 horas, se consideraron activos (positivos) para la actividad antibacteriana.

2.4.6 Bioensayo con extractos orgánicos

Las cepas se cultivaron por triplicado en 100 mL de caldo de tripticasa soya (TSB Bacto™ BD), usando erlenmeyers de 500 mL, agitando a 130 rpm, a 25° C durante 2 semanas. Los cultivos fueron entonces centrifugados y filtrados por membranas de 0,22 µm, y los sobrenadantes se extrajeron por tres veces con acetato de etilo (AcOEt). Los extractos orgánicos se concentraron a presión reducida, y se mantuvieron congelados hasta realizar los ensayos de bioactividad (actividad antibacteriana, y de inhibición del *quorum sensing*) y para el análisis de LC-EM. El extracto de AcOEt del medio de cultivo TSB se utilizó como blanco para bioensayos y análisis químicos.

a) Actividad de inhibición *quorum* de los extractos

Se ensayaron los extractos orgánicos de las cepas marinas para determinar la presencia de compuestos *quorum quencher*, utilizando un ensayo de difusión de disco ⁸⁶. Se utilizó la cepa productora de AHL *Chromobacterium violaceum* ATCC31532 como biosensor y se cargaron discos de 5 mm de diámetro con 300 µg de cada fracción de AcOEt. Luego se colocaron los discos sobre la superficie de platos de agar previamente inoculadas con una suspensión bacteriana de *C. violaceum* ATCC 31532 (OD 600 nm 0,5). Las placas se incubaron durante 24 horas a 30° C. Como controles negativo y positivo, se utilizaron 300 µL de DMSO (5% v/v) y 200 µg de 4-hidroxibenzaldehído (PHB) por disco. La presencia de compuestos *quorum quencher* se identificó por la falta de producción de violaceína alrededor de los discos, pero que mantenían células viables ⁸⁷. En contraste, cuando se

observaron zonas de inhibición del crecimiento, este resultado se informó como extracto antibacteriano.

b) Actividad antibacteriana contra *Burkholderia* de los extractos (Estos ensayos fueron llevados a cabo por Luz Adriana Betancur)

La actividad antibacteriana de los extractos contra las cepas patógenas de *Burkholderia* se evaluó mediante una prueba de difusión en placas de microtitulación de 96 pozos. Brevemente, cada una de las cepas de *Burkholderia* spp. se cultivaron en medio líquido King (Peptona 20g/L, Fosfato dipotásico 1.5g/L, Sulfato de magnesio 1.5 g/L, 10 mL de glicerol) a 30 °C durante una noche hasta alcanzar una densidad óptica D_{600nm} 0.25. Después se adicionaron 30 μ L de cada cultivo bacteriano sobre 200 μ L de medio KB agar PRONADISA (Peptona 20g/L, Fosfato dipotásico 1.5g/L, Sulfato de magnesio 1.5 g/L, Agar bacteriológico 14 g/L, 10 mL de glicerol) en cada uno de los pozos de las placas de 96 pozos. A continuación, se agregó 500 μ g de cada uno de los extractos de AcOEt suspendidos en 30 μ L de DMSO al 5% en cada pozo. Las placas se incubaron de forma estática durante 24 h a 37° C, y el crecimiento de cada cultivo *Burkholderia* se controló después de 24 h mediante inspección visual; aquellos pozos que muestran inhibición del crecimiento de *Burkholderia* se consideraron positivos para la presencia de compuestos antibacterianos. Se utilizó gentamicina 0,2 μ g / mL como control positivo para la inhibición bacteriana, y DMSO al 5% y TSB como controles negativos.

2.4.7 Análisis de perfiles metabólicos de las cepas de actinobacteria

a) Preparación de la muestra y análisis HPLC-MS

Se prepararon los extractos orgánicos para cada aislamiento y el blanco del medio a una concentración de 1 mg/mL en MeOH (grado CLAE). Los experimentos de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se llevaron a cabo en un equipo CLAE LaChrom (VWR HITACHI-ELITE) con un detector de masas ESI-IT Amazon X (Bruker-Daltonics). El análisis cromatográfico se realizó utilizando una columna XTerra C-18 (4,6 x 150 mm, 5 μ m) y un flujo de 1,0 mL/min. La fase móvil consistió en una solución acuosa al 0,075% de ácido fórmico (A) y acetonitrilo con 0,075% de ácido fórmico (B). El programa se inició con 10% de B durante 3 min y un incremento lineal hasta 40% de B en 17 min, seguido de un aumento lineal hasta 100% de B en 15 min, seguido luego de 10 min a 100%

de B. El tiempo de análisis total para cada muestra fue de 50 min. La muestra (20 μ L) fue inyectada por un inyector automático. La detección por espectrometría de masas se llevó a cabo tanto en modo de ionización positiva como negativa con un voltaje de spray a 4 kV y temperatura capilar a 250° C. El intervalo de masa se estableció a partir de m/z 70-3000. Los archivos de datos crudos generados por HPLC-MS se convirtieron primero en archivos netCDF.

b) Análisis de los datos

Los archivos netCDF fueron importados al software MZmine 2.10⁸⁸ para el pre-procesamiento de datos. La detección de picos en MZmine se realizó tras la eliminación del ruido, la construcción del cromatograma y los pasos de deconvolución de pico⁸⁹. En el módulo de detección de masas (*Mass detection*), se generan unas listas de masas (iones) por cada "scan" en los archivos de los datos crudos. Para este estudio se usó el algoritmo *Centroid mass detector*, el cual asume que cada señal por encima de un nivel dado de ruido es un ion detectado. El nivel de ruido por tanto se define como la mínima intensidad de un dato puntual para ser considerado parte del cromatograma y todos los datos por debajo de ese nivel de intensidad serán descartados. Ese nivel se determina de acuerdo a la calidad de los datos. En este estudio se usó un nivel de ruido de 1×10^5 . A continuación, se realizó la construcción de cromatogramas (*Chromatogram building*), el cual toma las listas de masas generadas para cada "EM scan" y construye un cromatograma para cada valor de masa que pueda ser detectada continuamente a lo largo de los "scans" produciendo una lista depurada de picos. Este módulo usa parámetros de tolerancia de m/z (*m/z tolerance o ppm*), duración mínima en tiempo (*Min time span*) y altura mínima (*Min height*); para el estudio se utilizaron 1 "m/z" o 100 ppm, 1 min, 1.1×10^5 respectivamente."

La lista de picos alineados se exportó entonces como un archivo de valores separados por comas (.CSV). Los datos fueron importados a SIMCA-P 14 (Umetrics, Suecia) para el análisis de datos multivariado⁴⁷. Se generó el barcoding en Microsoft Excel utilizando la función IF (= IF (cell> 0,1,0)). Esta presencia-ausencia creó un conjunto de datos binarios para cada extracto bacteriano que muestra la diversidad química general. Los valores de "1" se muestran rellenando la celda de negro, mientras que los valores de "0" se rellenan de blanco¹². Además, se utilizó una herramienta de Excel para ordenar y se eliminaron aquellos datos observados también para el blanco de medio (sólo se consideran valores

m/z > 200), buscando que las únicas variables que queden, correspondan a los compuestos totales detectados en cada uno de los extractos.

El proceso de derreplicación se realizó utilizando la base de datos de productos naturales de AntiMarin, y se confirmó la abundancia isotópica en datos crudos de HPLC-MS⁴⁷.

2.4.8 Estudio químico de la cepa *Micromonospora* sp

La cepa identificada por métodos moleculares como *Micromonospora* sp (102N), fue cultivada en 20 litros de medio TSB por 15 días. Luego de este tiempo el cultivo se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante se extrajo con acetato de etilo obteniendo un extracto orgánico y un acuoso. Después de realizar los ensayos de actividad con *C. violaceum* se determinó que el extracto orgánico era activo. Por tanto 1.005 g de este extracto fueron fraccionados por cromatografía en columna Flash empleando un sistema de solventes DCM/AcOEt/MeOH, obteniendo nueve fracciones. Se volvió a valorar la actividad biológica con el biosensor y se determina que la fracción F3 (81mg) muestra la actividad, por lo tanto, fue elegida para ser separada por exclusión de tamaño empleando Sephadex y eluida con DCM/MeOH (1:1), obteniendo seis fracciones, en la que la fracción activa era F3.2 (60.3 mg).

Esta fracción fue separada nuevamente por sephadex obteniendo cinco fracciones, siendo las fracciones F3.2.4 (23.7 mg) y F3.2.5 (3.1 mg) las más activas. Las fracciones no activas F3.2.2 (10.6 mg), F3.2.3 (17.8 mg) y la fracción activa F3.2.4, fueron analizadas por RMN y GC/EM. La fracción F3.2.5 fue separada por sephadex obteniendo cuatro fracciones donde la fracción F3.2.5.2 (0.98 mg) y la fracción F3.2.5.3 (1.1 mg) son seleccionadas para estudio espectroscópico por control por CCF. Resumiendo lo anterior, se determina que las 5 fracciones (F3.2.2, F3.2.3, F3.2.4, F3.2.5.2 y F3.2.4.5.3) se analizaron por RMN ¹H y por GC/EM

2.5 Bibliografía

- (1) Andersen, A. S.; Joergensen, B.; Bjarnsholt, T.; Johansen, H.; Karlsmark, T.; Givskov, M.; Krogfelt, K. A. Quorum-Sensing-Regulated Virulence Factors in *Pseudomonas Aeruginosa* Are Toxic to *Lucilia Sericata* Maggots. *Microbiology* 2010, 156 (Pt 2), 400–407.
- (2) Barnard, A. M. L.; Bowden, S. D.; Burr, T.; Coulthurst, S. J.; Monson, R. E.; Salmond, G. P. C. Quorum Sensing, Virulence and Secondary Metabolite Production in Plant Soft-Rotting Bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2007, 362 (1483), 1165–1183.
- (3) Kim, J.; Kang, Y.; Kim, J.; Choi, O.; Hwang, I. Occurrence of *Burkholderia Glumae* on Rice and Field Crops in Korea. *Plant Pathol. J.* 2010, 26 (3), 271–272.

- (4) Teasdale, M. E.; Donovan, K. A.; Forschner-Dancause, S. R.; Rowley, D. C. Gram-Positive Marine Bacteria as a Potential Resource for the Discovery of Quorum Sensing Inhibitors. *Mar. Biotechnol.* 2011, 13 (4), 722–732.
- (5) Lopes, R. B. M.; De Oliveira Costa, L. E.; Vanetti, M. C. D.; De Araújo, E. F.; De Queiroz, M. V. Endophytic Bacteria Isolated from Common Bean (*Phaseolus Vulgaris*) Exhibiting High Variability Showed Antimicrobial Activity and Quorum Sensing Inhibition. *Curr. Microbiol.* 2015, 71 (4), 509–516.
- (6) Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* 2016, 33 (3), 382–431.
- (7) Martín-Rodríguez, A. J.; Reyes, F.; Martín, J.; Pérez-Yépez, J.; León-Barrios, M.; Couttolenc, A.; Espinoza, C.; Trigos, Á.; Martín, V. S.; Norte, M.; et al. Inhibition of Bacterial Quorum Sensing by Extracts from Aquatic Fungi: First Report from Marine Endophytes. *Mar. Drugs* 2014, 12 (11), 5503–5526.
- (8) Tang, K.; Zhang, X. H. Quorum Quenching Agents: Resources for Antivirulence Therapy. *Mar. Drugs* 2014, 12 (6), 3245–3282.
- (9) Kang, J. E.; Han, J. W.; Jeon, B. J.; Kim, B. S. Efficacies of Quorum Sensing Inhibitors, Piericidin A and Glucopiericidin A, Produced by *Streptomyces Xanthocidicus* KPP01532 for the Control of Potato Soft Rot Caused by *Erwinia Carotovora* Subsp. *Atroseptica*. *Microbiol. Res.* 2016, 184, 32–41.
- (10) Abdelmohsen, U. R.; Yang, C.; Horn, H.; Hajjar, D.; Ravasi, T.; Hentschel, U. Actinomycetes from Red Sea Sponges: Sources for Chemical and Phylogenetic Diversity. *Mar. Drugs* 2014, 12 (5), 2771–2789.
- (11) Handelsman, J.; Rondon, M. R.; Brady, S. F.; Clardy, J.; Goodman, R. M.; Handelsman, J. Crosstalk R245 Molecular Biological Access to the Chemistry of Unknown 05SP 09 Soil Microbes: A New Frontier for Natural Products E4 + Qfs. *Chem. Biol.* 1998, 815, 245–249.
- (12) Forner, D.; Berru, F.; Correa, H.; Duncan, K.; Kerr, R. G. Chemical Dereplication of Marine Actinomycetes by Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry Profiling and Statistical Analysis. *Anal. Chim. Acta* 2013, 805, 70–79.
- (13) Barka, E. A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-Vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H.-P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; van Wezel, G. P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of *Actinobacteria*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016, 80 (1), 1–43.
- (14) Jensen, P. R.; Williams, P. G.; Oh, D.-C.; Zeigler, L.; Fenical, W. Species-Specific Secondary Metabolite Production in Marine Actinomycetes of the Genus *Salinispora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73 (4), 1146–1152.
- (15) Imhoff, J. F.; Labes, A.; Wiese, J. Bio-Mining the Microbial Treasures of the Ocean: New Natural Products. *Biotechnol. Adv.* 2011, 29 (5), 468–482.
- (16) Emmert, E. A.; Handelsman, J. Biocontrol of Plant Disease: A (Gram-) Positive Perspective. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 171 (1), 1–9.
- (17) Olano, C.; Méndez, C.; Salas, J. A. Antitumor Compounds from Marine Actinomycetes. *Mar. Drugs* 2009, 7 (2), 210–248.
- (18) Ooka, K.; Fukumoto, A.; Yamanaka, T.; Shimada, K. Piericidins, Novel Quorum-Sensing Inhibitors against *Chromobacterium Violaceum* CV026, from *Streptomyces* Sp. TOHO-Y209 and TOHO-O348. *Open J. Med. Chem.* 2013, 3 (December), 93–99.
- (19) Romero, M.; Martín-Cuadrado, A. B.; Roca-Rivada, A.; Cabello, A. M.; Otero, A. Quorum Quenching in Cultivable Bacteria from Dense Marine Coastal Microbial Communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 2011, 75 (2), 205–217.
- (20) Hmelo, L. R. Quorum Sensing in Marine Microbial Environments. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 2017, 9, 257–281.

- (21) Gulve, R. M.; Deshmukh, A. M. Antimicrobial Activity of the Marine Actinomycetes. *Int. Multidiscip. Res. J.* 2012, 2 (3), 16–22.
- (22) Qin, S.; Li, J.; Chen, H.-H.; Zhao, G.-Z.; Zhu, W.-Y.; Jiang, C.-L.; Xu, L.-H.; Li, W.-J. Isolation, Diversity, and Antimicrobial Activity of Rare Actinobacteria from Medicinal Plants of Tropical Rain Forests in Xishuangbanna, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009, 75 (19), 6176–6186.
- (23) Desak Gede, S. A.; Agustine S.; Yetti, M. I.; Puspa, D. L.; Hakiki, M. Identification of LL and Meso-Diaminopimelic Acid (DAP) of Actinomycete Strains and Its Secondary Metabolite Production. *Procedia Chem.* 2015, 16, 451–456.
- (24) Maldonado, L. A.; Fragoso-Yáñez, D.; Pérez-García, A.; Rosellón-Druker, J.; Quintana, E. T. Actinobacterial Diversity from Marine Sediments Collected in Mexico. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2009, 95 (2), 111–120.
- (25) Rateb, M. E.; Houssen, W. E.; Harrison, W. T. A.; Deng, H.; Okoro, C. K.; Asenjo, J. A.; Andrews, B. A.; Bull, A. T.; Goodfellow, M.; Ebel, R.; et al. Diverse Metabolic Profiles of a *Streptomyces* Strain Isolated from a Hyper-Arid Environment. *J. Nat. Prod.* 2011, 74 (9), 1965–1971.
- (26) Sousa, C. da S.; Soares, A. C. F.; Garrido, M. da S. Characterization of Streptomyces with Potential to Promote Plant Growth and Biocontrol. *Sci. Agric.* 2008, 65 (1), 50–55.
- (27) Shangari, N.; O'Brien, P. J.; Shangari, N.; O'Brien, P. J. Catalase Activity Assays. In *Current Protocols in Toxicology*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2006; p 7.7.1-7.7.16.
- (28) Cheng, K.; Rong, X.; Pinto-Tomás, A. A.; Fernández-Villalobos, M.; Murillo-Cruz, C.; Huang, Y. Population Genetic Analysis of *Streptomyces Albidoflavus* Reveals Habitat Barriers to Homologous Recombination in the Diversification of Streptomyces. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, 81 (3), 966–975.
- (29) Augustine, S. K.; Bhavsar, S. P.; Kapadnis, B. P. A Non-Polyene Antifungal Antibiotic from *Streptomyces Albidoflavus* PU 23. *J. Biosci.* 2005, 30 (2), 201–211.
- (30) Viegelmann, C.; Margassery, L. M.; Kennedy, J.; Zhang, T.; O'Brien, C.; O'Gara, F.; Morrissey, J. P.; Dobson, A. D. W.; Edrada-Ebel, R. Metabolomic Profiling and Genomic Study of a Marine Sponge-Associated *Streptomyces* Sp. *Mar. Drugs* 2014, 12 (6), 3323–3351.
- (31) Solanki, R., Khanna, M. et al. Bioactive Compounds from Marine Actinomycetes. *Indian J. Microbiol.* 2008, 48 (December), 410–431.
- (32) Kaur, T.; Manhas, R. K. Antifungal, Insecticidal, and Plant Growth Promoting Potential of *Streptomyces Hydrogenans* DH16. *J. Basic Microbiol.* 2014, 54 (11), 1175–1185.
- (33) Sui, J.-L.; Xu, X.-X.; Qu, Z.; Wang, H.-L.; Lin, H.-P.; Xie, Q.-Y.; Ruan, J.-S.; Hong, K. *Streptomyces Sanyensis* Sp. Nov., Isolated from Mangrove Sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2011, 61 (7), 1632–1637.
- (34) Li, T.; Du, Y.; Cui, Q.; Zhang, J.; Zhu, W.; Hong, K.; Li, W. Cloning, Characterization and Heterologous Expression of the Indolocarbazole Biosynthetic Gene Cluster from Marine-Derived *Streptomyces Sanyensis* FMA. *Mar. Drugs* 2013, 11 (2), 466–488.
- (35) Li, W.-J.; Nimaichand, S.; Jiang, Z.; Liu, M.-J.; Khieu, T.-N.; Kim, C.-J.; Hozzein, W. N.; Park, D.-J.; Wadaan, M. A. M.; Ningthoujam, D. S. *Streptomyces Canchipurensis* Sp. Nov., Isolated from a Limestone Habitat. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2014, 106 (6), 1119–1126.
- (36) Rong, X.; Doroghazi, J. R.; Cheng, K.; Zhang, L.; Buckley, D. H.; Huang, Y. Classification of *Streptomyces* Phylogroup Pratensis (Doroghazi and Buckley, 2010) Based on Genetic and Phenotypic Evidence, and Proposal of *Streptomyces Pratensis* Sp. Nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 2013, 36 (6), 401–407.
- (37) Schneemann, I.; Wiese, J.; Kunz, A. L.; Imhoff, J. F. Genetic Approach for the Fast Discovery of Phenazine Producing Bacteria. *Mar. Drugs* 2011, 9 (12), 772–789.

- (38) Barka, E. A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Gaveau-vaillant, N.; Jacquard, C.; Klenk, H.-P.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; van Wezel, G. P. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016, 80 (1), 1–43.
- (39) Yarza1, P.; Yilmaz, P.; Pruesse, E.; Göckner, F. O.; Ludwig, W.; Schleifer, K.-H.; Whitman, W. B.; Euzéby, J.; Amann, R.; Rosselló-Móra, R. Uniting the Classification of Cultured and Uncultured Bacteria and Archaea Using 16S rRNA Gene Sequences. *Analysis* 2014, 12 (9), 635–645.
- (40) Cha, J.-H.; Cha, C.-J. *Gordonia Alkaliphila* Sp. Nov., an Actinomycete Isolated from Tidal Flat Sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2013, 63 (Pt 1), 327–331.
- (41) Jackisch-Matsuura, A. B.; Santos, L. S.; Eberlin, M. N.; Faria, A. F. de; Matsuura, T.; Grossman, M. J.; Durrant, L. R. Production and Characterization of Surface-Active Compounds from *Gordonia Amicalis*. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 2014, 57 (1), 138–144.
- (42) Christner, M.; Trusch, M.; Rohde, H.; Kwiatkowski, M.; Schlüter, H.; Wolters, M.; Aepfelbacher, M.; Hentschke, M. Rapid MALDI-TOF Mass Spectrometry Strain Typing during a Large Outbreak of Shiga-Toxicogenic *Escherichia Coli*. *PLoS One* 2014, 9 (7), e101924.
- (43) Dickinson, B. *INSTRUCCIONES DE USO – MEDIOS EN FRASCOS LISTOS PARA USAR BD Tryptic Soy Broth (TSB)*; 2014.
- (44) You, J.; Xue, X.; Cao, L.; Lu, X.; Wang, J.; Zhang, L.; Zhou, S. Inhibition of *Vibrio* Biofilm Formation by a Marine Actinomycete Strain A66. 2007.
- (45) Nakayama, J.; Tanaka, E.; Kariyama, R.; Nagata, K.; Nishiguchi, K.; Mitsuhashi, R.; Uemura, Y.; Tanokura, M.; Kumon, H.; Sonomoto, K. Siamycin Attenuates Fsr Quorum Sensing Mediated by a Gelatinase Biosynthesis-Activating Pheromone in *Enterococcus Faecalis*. *J. Bacteriol.* 2007, 189 (4), 1358–1365.
- (46) Martinelli, E.; Suffredini, M.; Galli, G.; Glisenti, A.; Pettitt, M. E.; Callow, M. E.; Callow, J. A.; Williams, D.; Lyall, G. Amphiphilic Block Copolymer/poly(dimethylsiloxane) (PDMS) Blends and Nanocomposites for Improved Fouling-Release.
- (47) Macintyre, L.; Zhang, T.; Viegemann, C.; Martinez, I.; Cheng, C.; Dowdells, C.; Abdelmohsen, U.; Gernert, C.; Hentschel, U.; Edrada-Ebel, R. Metabolomic Tools for Secondary Metabolite Discovery from Marine Microbial Symbionts. *Mar. Drugs* 2014, 12 (6), 3416–3448.
- (48) Seipke, R. F.; Mau, B.; Perna, N.; Myers, E.; Lipman, D. Strain-Level Diversity of Secondary Metabolism in *Streptomyces Albus*. *PLoS One* 2015, 10 (1), e0116457.
- (49) Chagas-Paula, D.; Zhang, T.; Da Costa, F.; Edrada-Ebel, R. A Metabolomic Approach to Target Compounds from the Asteraceae Family for Dual COX and LOX Inhibition. *Metabolites* 2015, 5 (3), 404–430.
- (50) van den Berg, R. a; Hoefsloot, H. C. J.; Westerhuis, J. a; Smilde, A. K.; van der Werf, M. J. Centering, Scaling, and Transformations: Improving the Biological Information Content of Metabolomics Data. *BMC Genomics* 2006, 7, 142.
- (51) Kanoh, K.; Matsuo, Y.; Adachi, K.; Imagawa, H.; Nishizawa, M.; Shizuri, Y. Mechercharmocins A and B, Cytotoxic Substances from Marine-Derived *Thermoactinomyces* Sp. YM3-251. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2005, 58 (4), 289–292.
- (52) Waksman, S. A. *Streptomycin: Background, Isolation, Properties, and Utilization*; 1952.
- (53) Ye, X. W.; Qiang, Y. J. The Fermentation, Isolation and Physico-Chemical Properties of Youlemycin. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 1987, 27 (2), 156–164.
- (54) Saroj, S. D.; Rather, P. N. Streptomycin Inhibits Quorum Sensing in *Acinetobacter Baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013, 57 (4), 1926–1929.
- (55) Ritacco, F. V.; Haltli, B.; Janso, J. E.; Greenstein, M.; Bernan, V. S. Dereplication of *Streptomyces*

- Soil Isolates and Detection of Specific Biosynthetic Genes Using an Automated Ribotyping Instrument. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2003, 30 (8), 472–479.
- (56) Abdelmohsen, U. R.; Cheng, C.; Viegelmann, C.; Zhang, T.; Grkovic, T.; Ahmed, S.; Quinn, R. J.; Hentschel, U.; Edrada-Ebel, R. Dereplication Strategies for Targeted Isolation of New Antitrypanosomal Actinosporins A and B from a Marine Sponge Associated-Actinokineospora Sp. EG49. *Mar. Drugs* 2014, 12 (3), 1220–1244.
- (57) Tawfike, A. F.; Viegelmann, C.; Edrada-Ebel, R. Metabolomics and Dereplication Strategies in Natural Products. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*; 2013; Vol. 1055, pp 227–244.
- (58) Ito, T.; Masubuchi, M. Dereplication of Microbial Extracts and Related Analytical Technologies. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2014, 67 (5), 353–360.
- (59) Palaniyandi, S. A.; Yang, S. H.; Zhang, L.; Suh, J. W. Effects of Actinobacteria on Plant Disease Suppression and Growth Promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 97 (22), 9621–9636.
- (60) Fiedler, H. P.; Bruntner, C.; Bull, A. T.; Ward, A. C.; Goodfellow, M.; Potterat, O.; Puder, C.; Mihm, G. Marine Actinomycetes as a Source of Novel Secondary Metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 2005, 87 (1), 37–42.
- (61) Kalia, V. C. *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*; Kalia, V. C., Ed.; Springer New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London: New Delhi, 2015.
- (62) Solanki, R.; Khanna, M.; Lal, R.; Solanki, R., Khanna, M. et al. Bioactive Compounds from Marine Actinomycetes. *Indian J. Microbiol.* 2008, 48 (December), 410–431.
- (63) Skellam, E. J.; Stewart, A. K.; Strangman, W. K.; Wright, J. L. C. Identification of Micromonolactam, a New Polyene Macrocyclic Lactam from Two Marine Micromonospora Strains Using Chemical and Molecular Methods: Clarification of the Biosynthetic Pathway from a Glutamate Starter Unit. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2013, 66 (7), 431–441.
- (64) Charan, R. D.; Schlingmann, G.; Janso, J.; Bernan, V.; Feng, X.; Carter, G. T. Diazepinomicin, a New Antimicrobial Alkaloid from a Marine Micromonospora Sp. *J. Nat. Prod.* 2004, 67 (8), 1431–1433.
- (65) Montes Vidal, D.; von Rymon-Lipinski, A. L.; Ravella, S.; Groenhagen, U.; Herrmann, J.; Zaburannyi, N.; Zarbin, P. H. G.; Varadarajan, A. R.; Ahrens, C. H.; Weisskopf, L.; et al. Long-Chain Alkyl Cyanides: Unprecedented Volatile Compounds Released by Pseudomonas and Micromonospora Bacteria. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2017, 56 (15), 4342–4346.
- (66) Shete, H. G.; Kapdnis, B. P. Production and Characterization of Cyanide Hydratase from *Micromonospora Braunna*. *Univers. J. Environ. Res. Technol.* 2012, 2 (6), 609–615.
- (67) Akcil, A.; Karahan, A. G.; Ciftci, H.; Sagdic, O. Biological Treatment of Cyanide by Natural Isolated Bacteria (*Pseudomonas* Sp.). *Miner. Eng.* 2003, 16 (7), 643–649.
- (68) Shirling, E. B.; Gottlieb, D. Methods for Characterization of Streptomyces Species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1966, 16 (3), 313–340.
- (69) Labeda, D. P.; Goodfellow, M.; Brown, R.; Ward, A. C.; Lanoot, B.; Vanncanneyt, M.; Swings, J.; Kim, S. B.; Liu, Z.; Chun, J.; et al. Phylogenetic Study of the Species within the Family Streptomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 2012, 101 (1), 73–104.
- (70) Kieser, T.; Bibb, M. J.; Buttner, M. J.; Chater, K. F.; Hopwood, D. A.; John Innes Foundation. *Practical Streptomyces Genetics*; John Innes Foundation, 2000.
- (71) Shepherd, M. Laboratory Maintenance of Streptomyces Species. *Curr. Protoc. ...* 2010, 1–10.
- (72) Espinoza, L. E.; Baines, A. L. D.; Lowe, K. L. Biochemical, Nutrient and Inhibitory Characteristics of *Streptomyces* Cultured from Hypersaline Estuary, the Laguna Madre (Texas). *OnLine J. Biol. Sci. Publ. Online* 2013, 13 (131), 18–27.

- (73) Shirling, E. B.; Gottlieb, D. Cooperative Description of Type Cultures of *Streptomyces* III. Additional Species Descriptions from First and Second Studies. 1968, 18 (4), 279–392.
- (74) Goodfellow, M.; Goodfellow, Michael. *Actinobacteria Phyl. Nov.* In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2015; pp 1–2.
- (75) Staneck, J. L.; Roberts, G. D. Simplified Approach to Identification of Aerobic Actinomycetes by Thin-Layer Chromatography. *Appl. Microbiol.* 1974, 28 (2), 226–231.
- (76) Quintana, E. T.; Badillo, R. F.; Maldonado, L. A. Characterisation of the First Actinobacterial Group Isolated from a Mexican Extremophile Environment. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2013, 104 (1), 63–70.
- (77) Prakash, D.; Nawani, N. N. A Rapid and Improved Technique for Scanning Electron Microscopy of Actinomycetes. *J. Microbiol. Methods* 2014, 99, 54–57.
- (78) Eden, P. A.; Schmidt, T. M.; Blakemore, R. P.; Pace, N. R. Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum Magnetotacticum* Using Polymerase Chain Reaction-Amplified 16s rRNA-Specific DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991, 41 (2), 324–325.
- (79) Pruesse, E.; Peplies, J.; Glöckner, F. O. SINA: Accurate High-Throughput Multiple Sequence Alignment of Ribosomal RNA Genes. 2012, 28 (14), 1823–1829.
- (80) Westram, R.; Bader, K.; Prüsse, E.; Kumar, Y.; Meier, H.; Glöckner, F. O.; Ludwig, W. ARB: A Software Environment for Sequence Data. In *Handbook of Molecular Microbial Ecology I*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2011; pp 399–406.
- (81) Munoz, R.; Yarza, P.; Ludwig, W.; Euzéby, J.; Amann, R.; Schleifer, K.-H.; Glöckner, F. O.; Rosselló-Móra, R. Release LTPs104 of the All-Species Living Tree. *Syst. Appl. Microbiology* 2011, 34, 169–170.
- (82) Devescovi, G.; Bigirimana, J.; Degrassi, G.; Cabrio, L.; LiPuma, J. J.; Kim, J.; Hwang, I.; Venturi, V. Involvement of a Quorum-Sensing-Regulated Lipase Secreted by a Clinical Isolate of *Burkholderia Glumae* in Severe Disease Symptoms in Rice. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73 (15), 4950–4958.
- (83) Azegami, K.; Nishiyama, K.; Watanabe, Y.; Kadota, I.; Ohuchi, A.; Fukazawa, C. *Pseudomonas Plantarii* Sp. Nov., the Causal Agent of Rice Seedling Blight. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1987, 37 (2), 144–152.
- (84) CaLS, I. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement: CLSI Document M100-S21. *Wayne Clin. Lab. Stand. Institutue* 2011.
- (85) Solis, R.; Bertani, I.; Degrassi, G.; Devescovi, G.; Venturi, V.; L, E.; S, K.; H, S.; T, N.; I, H. Involvement of Quorum Sensing and RpoS in Rice Seedling Blight Caused by *Burkholderia Plantarii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2006, 259 (1), 106–112.
- (86) McLean, R. J. C.; Pierson, L. S.; Fuqua, C. A Simple Screening Protocol for the Identification of Quorum Signal Antagonists. *J. Microbiol. Methods* 2004, 58 (3), 351–360.
- (87) Tello, E.; Castellanos, L.; Arévalo-Ferro, C.; Duque, C. Disruption in Quorum-Sensing Systems and Bacterial Biofilm Inhibition by Cembranoid Diterpenes Isolated from the Octocoral *Eunicea Knighti*. *J. Nat. Prod.* 2012, 75 (9), 1637–1642.
- (88) Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular Framework for Processing, Visualizing, and Analyzing Mass Spectrometry- Based Molecular Profile Data.
- (89) Cheng, C.; Macintyre, L.; Abdelmohsen, U. R.; Horn, H.; Polymenakou, P. N.; Edrada-Ebel, R.; Hentschel, U. Biodiversity, Anti-Trypanosomal Activity Screening, and Metabolomic Profiling of Actinomycetes Isolated from Mediterranean Sponges.

3. Capítulo 3: Estudio químico de la cepa *Paenibacillus* sp. (PNM115) de procedencia marina

Resumen

Los productos naturales aislados de microorganismos marinos han demostrado tener un amplio rango de actividades biológicas, incluyendo la inhibición del *quorum sensing*. En este capítulo se describe el estudio de las bacterias de los phylum Firmicutes y Proteobacteria del cepario construido en el capítulo 2. Las bacterias seleccionadas para este capítulo no pertenecen al phylum Actinobacteria, pues éstas ya se estudiaron en el capítulo anterior.

Se evaluaron *in vivo* 138 aislamientos que no pertenecen al Phylum Actinobacteria de los cuales 8 bacterias son activas como inhibidores de *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Las bacterias activas se cultivaron en medio TSB, encontrando que 7 extractos orgánicos fueron activos y uno mantenía la actividad en la fase acuosa. Las bacterias activas fueron identificadas mediante técnicas moleculares y caracterizadas bioquímicamente como PNM115 *Paenibacillus* sp., PNM123 *Paenibacillus* sp. PNM10 *Lysinibacillus* sp., *Bacillus anthracis* (PNM82 y PNM217), *Bacillus cereus* (PNM100), *Proteus mirabilis* (PNM92) y PNM 216 sin identificar. Se descartaron las bacterias potencialmente patógenas: *Bacillus cereus* (PNM100), *Bacillus anthracis* (PNM82 y PNM217), y *Proteus mirabilis* (PNM92), quedando las bacterias *Paenibacillus* sp. (PNM115), *Paenibacillus* sp. (PNM123), *Lysinibacillus* sp. (PNM10) y una no identificada

PNM216 como potencialmente promisorias. De estas bacterias se seleccionó la cepa PNM115 (*Paenibacillus* sp) por ser la que presentaba mejor actividad biológica frente al biosensor, y pertenece a un género descrito como potencialmente aplicable como biosensor.

La bacteria *Paenibacillus* sp. CODIGO IBUN 2110 se cultivó en varios medios de cultivo y se seleccionó a los medios TSB y LB como los mejores para realizar el estudio. Cada cultivo se filtró, y el sobrenadante libre de células se extrajo con acetato de etilo para obtener la fracción orgánica (FO), el residuo acuoso se extrajo con butanol para obtener las fracciones butanólica (WB) y acuosa residual (WW). La fracción activa corresponde a la fracción WB, y ésta se fraccionó mediante cartuchos RP-18. Cada fracción fue evaluada mediante bioensayo y analizada por CLAE. El estudio espectroscópico de la fracción activa mostró que se trata de un péptido (compuesto 3.1) que es un péptido con unidades Val-Ser, Asn-Phe, ácido léucico, leucina, isoleucina, dos unidades de cisteína y una de ácido 3-hidroxi-4-metilhexanoico, y una masa de 1119.7135, sugiriendo la presencia de un análogo de las polipeptinas. El compuesto 3.1 se evaluó frente a *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, obteniéndose que la concentración mínima inhibitoria del QS es 22.3 μM (25 $\mu\text{g/mL}$). En cuanto a los ensayos realizado frente al fitopatógeno del arroz *Burkholderia glumae* CIAT 4026, que presenta varios fenotipos controlados por QS, entre éstos el *swimming* que fue controlado por el compuesto 3.1 cuando se le añade 0.11 nmol (0.125 μg), y en el ensayo de virulencia frente a este patógeno se encuentra que es activo cuando se añaden 2.68 nmoles (3 μg) del compuesto.

Palabras clave: *Paenibacillus*, microorganismos marinos, *quorum sensing*, compuestos quorum quenchers

3.1 Introducción

Las bacterias marinas han demostrado ser una fuente prolífica de metabolitos secundarios bioactivos, muchos de los cuales son estructuralmente únicos¹. Esto es debido a la gran competitividad por recursos, nutrientes y espacio a la que se ven sometidas; es más algunos de estos metabolitos pueden mediar las interacciones microorganismo-microorganismo², entre las cuales están incluidas fenómenos de QS. Las bacterias del género *Paenibacillus* comprende especies bacterianas que han sido reportadas como simbioses de plantas como el maíz, la calabaza y el arroz, y se ha identificado que son capaces de promover el crecimiento de ellas^{3,4}. Están ampliamente distribuidas en el globo

terráqueo, de hecho han sido aisladas de suelos, raíces de plantas, de regiones polares, de ambientes marinos, e incluso de desiertos³. Este género de bacterias se ha caracterizado como productoras de enzimas como amilasas, celulasas, hemicelulasas, lipasas, pectinasas, oxigenasas, deshidrogenasas, enzimas modificadoras de lignina y mutanasas, que pueden tener aplicaciones para detergentes, alimentos, textiles, entre otras³. Así mismo se han aislado de ellas compuestos antimicrobianos.

Adicionalmente se ha encontrado que cepas de este género tienen aplicaciones como biofertilizantes y biopesticidas⁴⁻⁶, por ejemplo, la cepa *Paenibacillus polymyxa* SCHC33 fue patentada para su uso como biofungicida⁷, no tóxico para humanos, ni vegetales; y su gran capacidad para esporular ha permitido realizar formulaciones comerciales de alta estabilidad y durabilidad, con capacidad de competir con los fungicidas comerciales⁷. Otro ejemplo interesante, es la cepa *Paenibacillus* sp. 300, que sintetiza la β -1,3-glucanasa que lisa las paredes de células fúngicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*^{8,9}, por lo que se puede usar como fungicida. Una cepa de *Paenibacillus paduli*, aislada de uvas, demostró tener actividad como inhibidora de DSF en *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 8004^{10,11}.

El género *Paenibacillus* produce una gran cantidad de metabolitos secundarios, siendo interesante resaltar la familia de antibióticos conocidos como polimixinas (A, B, D, E y M), que son péptidos de diez aminoácidos con un anillo heptapéptido catiónico y una modificación ácido graso *N*-terminal¹². Varios tipos de polimixinas han sido identificados con pesos entre 1129 a 1218 Da que difieren básicamente en la porción lipídica y en los aminoácidos 3, 6 y 7. También se caracterizan por tener un aminoácido inusual llamado ácido 2,4 diaminobutírico (DAB)¹². Estos compuestos además de tener actividad contra un gran número de patógenos clínicos resistentes^{4,13} también presentan actividad contra fitopatógenos como los hongos *Colletotrichum gloeosporoides* y *Fusarium oxysporum*¹⁴. La paenibacillina, un antibiótico, aislado de *Paenibacillus polymyxa* OSY-DF mostró tener actividad antibiótica contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, resistente a la meticilina, y otras bacterias Gram-positivas^{15,16}.

Un ejemplo interesante es el de *Paenibacillus* 139SI, que mostró capacidad como controlador de factores de virulencia controlados por QS. El extracto de su cultivo se utilizó para probar sus efectos anti-QS en la LasA proteasa, LasB elastasa, producción de pioverdina, y formación de biopelículas por parte de *P. aeruginosa*, así como evaluar sus efectos terapéuticos sobre las enfermedades pulmonares causadas por bacterias, perfil

hematológico y respuestas de anticuerpos séricos de animales de experimentación en un modelo de rata con infección pulmonar crónica. Los resultados mostraron disminución de las actividades controladas por QS en *P. aeruginosa*⁶. Por otra parte, el extracto prolonga significativamente los tiempos de supervivencia de las ratas y facilita el aclaramiento de la biopelícula de pulmones infectados^{6,17}. Este análisis demuestra que este género de bacterias posee alto potencial en la producción de compuestos con actividad QQ con aplicaciones biomédicas.

En este capítulo se buscó explorar el potencial de las bacterias marinas recuperadas en este *screening*, que no pertenecen al *phylum* Actinobacteria, como fuente de compuestos con actividad inhibitoria del QS. Así, este capítulo 3 complementa al capítulo dos donde se exploraron las actinobacterias.

3.2 Resultados y Discusión

Dentro de las bacterias, el *phylum* Firmicutes se destaca como fuente de compuestos activos, incluyendo los inhibidores de QS. Así, en este capítulo se buscó explorar la posibilidad de que estas bacterias tengan aplicaciones agrícolas. Es más, en la literatura se describen algunas bacterias de este *phylum* con esta actividad. Por ejemplo, *Bacillus cereus* U92, aislada de rizosfera de un cultivo de tomate, es capaz de degradar AHL de bacterias patógenas como *C. violaceum*, *A. tumefaciens*, *P. aeruginosa* y *Pseudomonas chlororaphis*. Adicionalmente se ensayó la capacidad de degradación de AHL como un control biológico de la pudrición blanda producida por *P. carotovorum* y corona de agalla producida por *Agrobacterium* en un sistema notobiótico de raíces de tomate¹⁸.

3.2.1 Aislamiento y caracterización de los aislamientos de origen marino

En el capítulo 2 se exploró el potencial de las actinobacterias como fuente de compuestos con actividad IQS, en este capítulo se buscó determinar la capacidad de producción de compuestos QQ por parte de bacterias diferentes a las actinobacterias. Como se ilustró en el capítulo anterior se logró el aislamiento de 162 cepas de bacterias, de las cuales 24 son actinobacterias. El paso siguiente en este capítulo fue evaluar el potencial de las 138 bacterias restantes (no actinos) para interrumpir el QS del biosensor *Chromobacterium violaceum*. Para esto se llevó a cabo un enfrentamiento *in vivo* entre las bacterias a ensayar y el biosensor usando cajas de Petri haciendo uso del medio LB (Figura 3.1). Se

observa que en las bacterias que eran activas existía crecimiento del biosensor, pero no presentaba la coloración violeta que corresponde a la violaceína (Figura 3.1a), mientras en las bacterias no activas se observaba la presencia de la coloración violeta en el biosensor (Figura 3.1B). Otro grupo de bacterias mostró inhibición del crecimiento del biosensor y por tanto se clasificaron como bactericidas (figura 3.1C). Finalmente, se observó que existían algunas bacterias que crecían más rápido que el biosensor cubriendo la caja Petri sin permitir el juzgamiento de la actividad IQS (Figura 3.1D).

Los resultados de este ensayo se resumen en el Anexo Tabla S2.1, y se pudo determinar que 8 aislamientos eran capaces de inhibir el QS, 40 aislamientos se clasificaron como bactericidas o bacteriostáticos, 37 aislamientos como inactivos y 53 bacterias se clasificaron como de rápido crecimiento. Así, de este ensayo se identificaron ocho cepas activas que corresponden a PNM10, PNM82, PNM92, PNM100, PNM115, PNM123, PNM216, y PNM217 (Tabla 3.1). A continuación, se realizó la caracterización morfológica de estas bacterias en los siguiente tres medios: Agar caseína almidón (ACA), Agar Mueller Hinton (MH) y agar Luria Bertani (LB), que fueron seleccionados por ser los medios que se usan para describir bacterias tipo bacilo (Tabla 3.1). De los ocho aislamientos, cuatro corresponden a bacilos gram positivos; tres son gram variables y uno es gram negativo. La mayoría no presenta pigmentación en el anverso de la caja a excepción del aislamiento PNM92 que presenta un pigmento amarillo, ninguna hidroliza la caseína que está presente en el medio ACA. A diferencia de los actinos éstas no producen gotas sobre la superficie de la colonia, y tampoco esporulan.

La caracterización de los perfiles bioquímicos de los 8 aislamientos activos se hizo mediante API 20E, los resultados obtenidos son congruentes con lo esperado para bacterias Firmicutes, y se presentan en el Anexo Tabla S3.1.

El siguiente paso fue la identificación taxonómica de los aislamientos no pertenecientes al *phylum* Actinobacteria. Para esto se amplificó el gen 16S rRNA, utilizando *primers* universales 27F y 1492R¹⁹, y se secuenciaron los amplímeros, todos ellos con un tamaño superior a 1400 pares de bases.. El procesamiento del árbol filogenético se desarrolló usando el método *Neighbor-Joining*¹⁹ con el software *MEGA7*²²

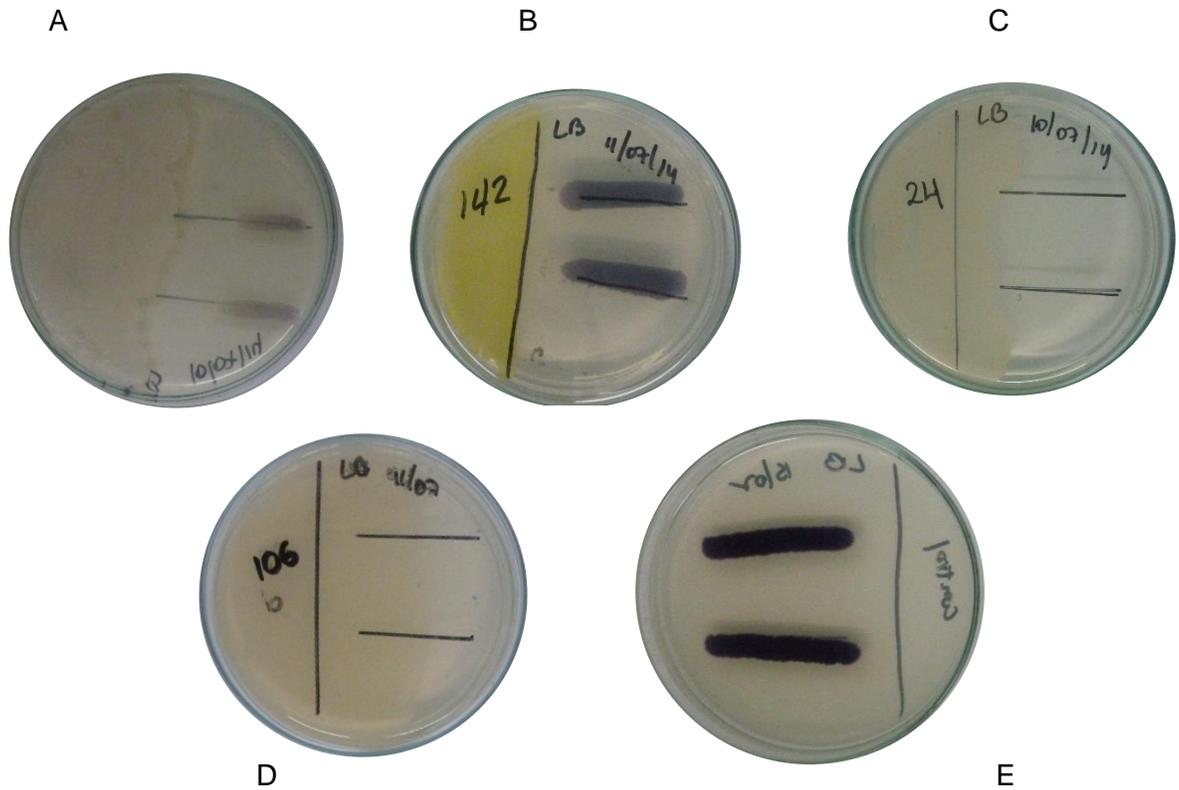


Figura 3.1 Fotografía del enfrentamiento *in vivo* de *Chromobacterium violaceum* contra A) cepa PNM123, se observa inhibición del QS. B) cepa PNM142 no se observa inhibición del QS. C) cepa PNM24, se observa inhibición del crecimiento del biosensor. D) Se observa que la cepa PNM106 crece mucho más rápido que el biosensor e invade la caja. E) Control de crecimiento de *Chromobacterium violaceum* si presencia de otra bacteria.

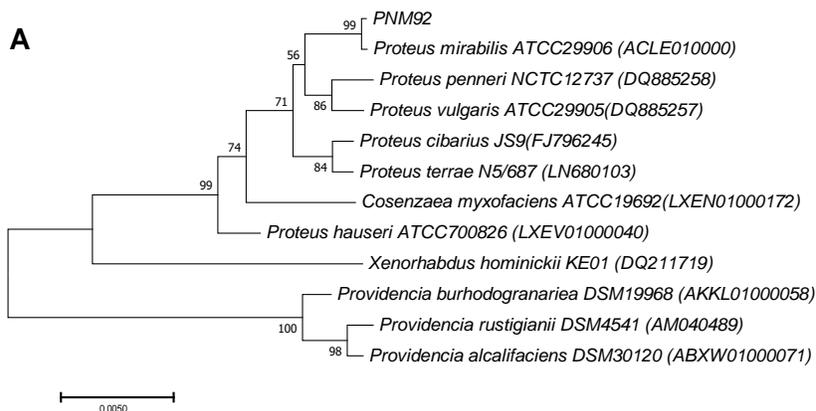
Como se indica en la tabla 3.2, 7 de los 8 aislamientos se encuentran distribuidos en dos *phylum* Firmicutes (Figura 3.2A) y Proteobacteria (Figura 3.2B), los cuales son distantes taxonómicamente y por ello se presentan dos árboles diferentes. Dentro del *phylum* Firmicutes se encuentran la mayoría de los aislamientos perteneciendo a tres familias diferentes *Bacillaceae*, *Paenibacillaceae* y *Planococcaceae* que corresponden a tres géneros *Bacillus* (PNM82, PNM100, PNM217), *Paenibacillus* (PNM115 y PNM123) y *Lysinibacillus* (PNM10), respectivamente. El aislamiento PNM216 no pudo ser identificado por análisis molecular, a pesar de que se realizaron varias pruebas de identificación con diferentes *primers* y condiciones de temperatura, lo cual sugiere que los *primers* universales empleados no han permitido la amplificación de los genes ribosomales y por ello está siendo sometida a análisis específicos que buscan identificar su filiación taxonómica específica.

Tabla 3.1 Caracterización fenotípica de cepas seleccionadas, por su actividad inhibitoria de *quorum sensing* frente al biosensor *Chromobacterium violaceum*, en diferentes medios de cultivo

Cepa	ACA	MH	LB	Gram
PNM10	Colonias pequeñas blancas opacas con bordes definidos. No produce pigmento	Colonias redondas sin bordes definidos, opacas de color crema pulverulentas	Colonias redondas sin bordes definidos opacas de color amarillo planas	Bacilo positivo
PNM82	Colonias redondas con bordes irregulares. Colonia plana. No presenta pigmentación No hidroliza caseína No esporula.	Colonias irregulares plana opaca sin bordes definidos No produce pigmentación, No esporula	Colonias redondas sin bordes definidos de color crema opaco. No produce pigmentación. No esporula	Bacilo positivo
PNM92	Colonias redondas sin bordes definidos. Brillantes convexas Color blanco. 2. Pigmentación Anverso: No Reverso No tiene. No hidroliza caseína No esporula.	Colonias redondas sin bordes definidos brillante crema plana 2. Pigmentación Anverso: No Reverso Amarillo No esporula	Colonias redondas con bordes planas brillantes cremas. No produce pigmentación. Reverso Amarillo No esporula	Bacilo negativo
PNM100	Colonias redondas con bordes irregulares. Colonia plana. No presenta. Pigmentación. No hidroliza caseína No esporula.	Colonias irregulares plana opaca sin bordes definidos No produce pigmentación, No esporula	Colonias redondas sin bordes definidos de color crema opaco. No produce pigmentación. No esporula	Bacilo positivo
PNM115	Colonias irregulares sin bordes definidos. Blancas convexas No presenta pigmentación No hidroliza caseína No esporula.	Colonias irregulares sin bordes definidos brillante crema mucoso No presenta pigmentación No esporula	Colonias redondas sin bordes definidos brillantes convexa cremas, filamentosa mucosa No produce pigmentación. No esporula	Bacilo gram variable
PNM123	Colonias pequeñas redondas con bordes definidos. Brillante Blancas con mucosa planas No presenta pigmentación. No hidroliza caseína No esporula.	Colonias sin bordes definidos semiredondas brillantes mucoso blanca No presenta pigmentación No esporula	Colonias pequeñas redondas brillantes de bordes definidos color blanco plana No presenta. pigmentación No esporula	Bacilo gram variable
PNM216	Coloniasredondas con bordes definidos. Opacas Blancas No presenta pigmentación No hidroliza caseína No esporula.	Colonias pequeñas redondas brillante cremas de bordes definidos No presenta pigmentación No esporula	Colonias redondas de bordes definidos color crema convexas No presenta pigmentación No esporula	Bacilo gram variable
PNM217	Colonias redondas con bordes irregulares. No presenta pigmentación. No hidroliza caseína No esporula.	Colonias irregulares plana opaca sin bordes definidos No produce pigmentación No esporula	Colonias reedondas sin bordes definidos de color crema opaco. No produce pigmentación. No esporula	Bacilo positivo

En la tabla 3.2 se presentan la identificación taxonómica de los aislamientos más activos, con sus vecinos más cercanos y su porcentaje de similitud. Como en todos los casos éste es superior al 99% la identidad a nivel de género de los aislamientos se confirma en cada caso, pero la especie sigue siendo indeterminada. La determinación de la cepa se irá haciendo en la medida de la necesidad. Cada una de las cepas fue depositada en la colección biológica Banco de Cepas y Genes del IBUN, los códigos de colección se detallan en la tabla 3.2.

A partir de cepas del género *Lysinibacillus* se han reportado cepas capaces de producir lactonasas que puede inhibir el QS^{24,25}, éstas han sido aisladas de plantas y se usan como controladores biológicos de cacao²⁶. Adicionalmente, se reportó que *Lysinibacillus* sp. Gs50 puede degradar las AHL producidas por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Pcc), que produce la pudrición blanda de la papa. Del género *Paenibacillus* se han reportado cepas que son capaces de inactivar las DSF producidas por el fitopatógeno *Xanthomonas campestris*²⁷, así mismo, bacterias de este género se han reportado como endófitos capaces de mejorar el metabolismo de las plantas²⁸. Existen ejemplos de bacterias del género *Bacillus* capaces de degradar la proteína AiiA que cataliza la lactonólisis de las AHL²⁹. Finalmente, entre de las cepas de *Proteus* se han reconocido patógenos, lo que indica que no es una buena candidata para continuar con este estudio.



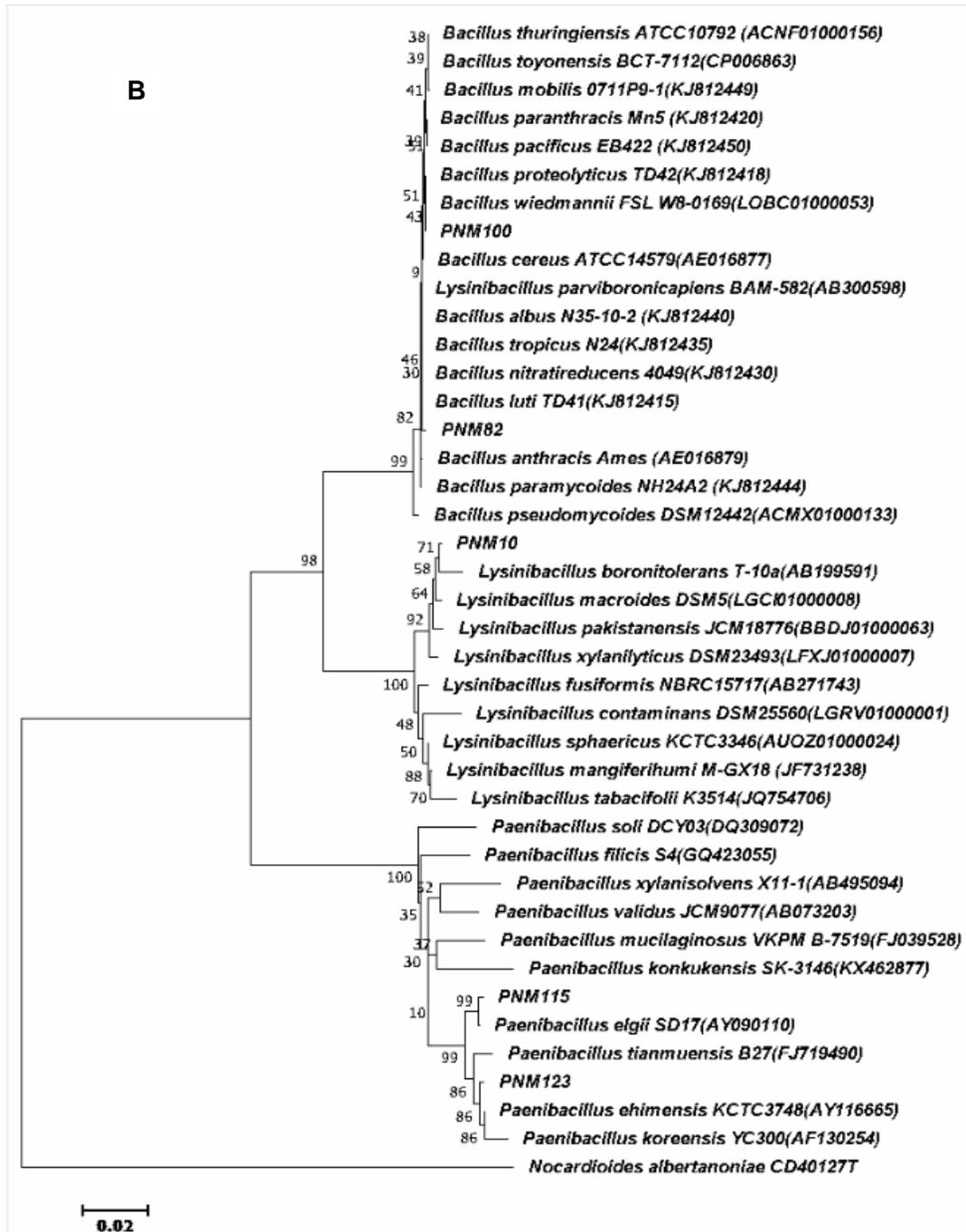


Figura 3.2 Árbol filogenético elaborado a partir de la secuenciación 16S rRN A de los ocho aislamientos bacterianos de origen marino que inhibieron *in vivo* el QS de *C. violaceum*.

Tabla 3.2 Identificación taxonómica de los aislamientos activos contra *C. violaceum*. Se presentan los vecinos más cercanos y su porcentaje de similitud.

CEPA	CODIGO IBUN	FUENTE	VECINOS CERCANOS	% SIMILARIDAD	FILO
PNM10	2034	<i>Dictyota</i> sp. (alga)	<i>Lysinibacillus macroides</i>	99.46	FIRMICUTES
			<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	99.26	
			<i>Lysinibacillus boronitolerans</i>	99.04	
PNM82	2084	Arena a 60 pies profundidad	<i>Bacillus anthracis</i>	99.85	FIRMICUTES
			<i>Bacillus paramycooides</i>	99.80	
			<i>Bacillus cereus</i>	99.80	
PNM92	2092	<i>Amphiroa</i> sp. (alga roja)	<i>Proteus mirabilis</i>	99.73	PROTEOBACTERIA
			<i>Proteus penneri</i>	98.92	
			<i>Proteus vulgaris</i>	98.91	
PNM100	2098	<i>Eunicea fusca</i> (octocoral)	<i>Bacillus cereus</i>	99.93	FIRMICUTES
			<i>Bacillus wiedmannii</i>	99.85	
			<i>Bacillus anthracis</i>	99.80	
PNM115	2110	Sedimento de arrecife	<i>Paenibacillus elgii</i>	99.73	FIRMICUTES
			<i>Paenibacillus ehimensis</i>	98.96	
			<i>Paenibacillus tianmuensis</i>	98.43	
PNM123	2116	<i>Codium</i> sp. (alga)	<i>Paenibacillus ehimensis</i>	99.71	FIRMICUTES
			<i>Paenibacillus elgii</i>	98.80	
			<i>Paenibacillus koreensis</i>	98.79	
PNM 217	2178	<i>Dictyota</i> sp. (alga)	<i>Bacillus anthracis</i>	100.00	FIRMICUTES
			<i>Bacillus anthracis</i>	99.93	
			<i>Bacillus cereus</i>	99.93	

En cuanto a las fuentes de donde se obtuvieron las cepas es interesante notar que cinco de las cepas activas provienen de algas, dos de sedimentos y una de esponja. Según la literatura era de esperarse una mayor diversidad en las esponjas³⁰, como se mencionó también para las actinobacterias. La mayoría provienen de algas de los géneros *Dictyota*, *Amphiroa* y *Codium*, una muestra proviene de un octocoral, estas fuentes son congruentes con la literatura en la que se reporta actividad inhibitoria de QS relacionada con algas y octocorales²⁹, y que podría dar a pensar que la actividad podría relacionarse con la presencia de bacterias que habitan estos organismos; dos de los aislamientos provienen de sedimentos o arena.

3.2.2 Selección de la cepa para el estudio químico

El paso siguiente fue evaluar si los cultivos de los aislamientos activos en el medio tenían la actividad QQ. Para esto las ocho cepas seleccionadas se cultivaron en TSB (caldo tripticasa soya), se centrifugaron y el sobrenadante se extrajo con acetato de etilo para obtener los extractos orgánico y acuoso. El medio TSB se seleccionó porque ha demostrado ser un medio nutritivo que favorece el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos³¹ y en la literatura es muy usado para el *screening* de bacterias³² Para los ensayos de actividad se usó el medio LB, Los resultados mostraron que todos los aislamientos, con excepción de la cepa PNM115, presentan actividad en la fase orgánica, indicando que los compuestos activos para estos aislamientos son de polaridad baja a media. Dado que el extracto orgánico de PNM115 no es activo, el residuo acuoso fraccionó con butanol, las fracciones obtenidas (WW y WB) se ensayaron y se determinó que la butanólica es la activa. Lo anterior indica que los compuestos responsables de la actividad inhibitoria del QS no son enzimas y corresponden a productos naturales de alta polaridad.

Los resultados obtenidos en los ensayos de actividad biológica para las ocho cepas activas se resumen en la tabla 3.3, en estos ensayos se usaron 0.5 mg de extracto por pozo. En general las fracciones más activas corresponden a la fracción de acetato de etilo de la cepa PNM92 (*Proteus* sp.) y la butanólica de PNM115 (*Paenibacillus* sp.). La primera fue obtenida de un alga del género *Amphiroa* y la segunda de sedimento marino. Las menos activas corresponden a las fracciones orgánicas de las cepas PNM216 (no identificada) y PNM217 (*Bacillus anthracis*).

Como se ilustró en el segundo capítulo no sólo es importante considerar la actividad que presentan las cepas, sino además su identidad taxonómica, entonces como segundo criterio de selección se usó su identidad taxonómica como sigue: no se tuvieron en cuenta las bacterias para las cuales se haya reportado cepas asociadas a enfermedades humanas y/o de plantas (Tabla 3.3). Si bien es claro que no todas las cepas de una especie son patógenas, no se continuó con su estudio porque en una posible aplicación agrícola posterior no serían idóneas para su uso por asuntos de bioseguridad, o requerirían estudios profundos para mostrar su inocuidad^{33,34}, lo que las haría imprácticas. En este sentido no se tuvieron en cuenta los aislamientos PNM100 (*Bacillus cereus*), PNM82 y PNM217 (*Bacillus anthracis*) relacionadas con enfermedades gastrointestinales³⁵. Esta decisión se tomó también para el aislamiento PNM92 (*Proteus mirabilis*), especies que se

relaciona con enfermedades humanas del tracto urinario^{36,37}. Así, quedan como candidatas a estudiar: PNM10 (*Lysinibacillus* sp), PNM115 (*Paenibacillus* sp), PNM123 (*Paenibacillus* sp) y PNM216 (no determinada).

Tabla 3.3 Resultados del ensayo de inhibición del *quorum sensing* de *C. violaceum* de los extractos de las bacterias activas (500 microgramos por pozo) cultivadas en medio LB

Aislamiento	Vecinos Cercanos	Ext. Orgánico	Ext. Acuoso	Halo de inhibición (mm)	Observación
PNM10	<i>Lysinibacillus</i> sp	√	NA	2.5	Pendiente para estudio Patógeno
PNM100	<i>Bacillus cereus</i>	√	NA	2	Estudiada en capítulo 3
PNM115	<i>Paenibacillus</i> sp	NA	√ Fase butanólica	4	
PNM123	<i>Paenibacillus</i> sp	√	NA	2	Pendiente para estudio Patógeno
PNM82	<i>Bacillus anthracis</i>	√	NA	1	Patógeno
PNM217	<i>Bacillus anthracis</i>	√	NA	0.5	Patógeno
PNM92	<i>Proteus mirabilis</i>	√	NA	4	Patógeno
PNM216	No determinada	√	NA	0.5	Estudiada en el capítulo 4

√: inhibición del QS -: No se observas inhibición del QS

Para las cuatro cepas restantes (PNM10, PNM115, PNM123 y PNM216) como criterio de selección se usó la actividad IQS, siendo PNM115 la más activa por lo que seleccionó para continuar con el estudio. Este aislamiento pertenece al género *Paenibacillus*, del cual se han reportado algunos biocontroladores^{8,28}, por lo que este aislamiento es promisorio. Los aislamientos PNM10 (*Lysinibacillus* sp.) y PNM123 (*Paenibacillus* sp) tienen también una buena actividad y serán buenos candidatos para estudios posteriores por también pertenecer a géneros promisorios como biocontroladores^{25,38}. El aislamiento PNM216 (aún no identificado) es poco activo y no se conoce su clasificación taxonómica, pero por ser de un grupo taxonómico seguramente diferente a los usuales se escogió para su estudio en el capítulo IV de la presente tesis.

3.2.3 Estudio químico de la cepa *Paenibacillus* sp. (PNM115).

Con la finalidad de identificar el medio más adecuado para la producción de metabolitos activos como QQ del aislamiento PNM115, ésta se cultivó en varios medios: medio marino,

TSA, LB, nutritivo e ISP2 (Figura 3.3.). Los cultivos fueron centrifugados y el sobrenadante libre de células ensayado en cuanto a su actividad QQ. Los resultados obtenidos mostraron que el sobrenadante más activo (mayor halo de inhibición) se obtuvo cuando se usaron los medios TSA y LB, los siguientes en actividad fueron medio nutritivo e ISP2.

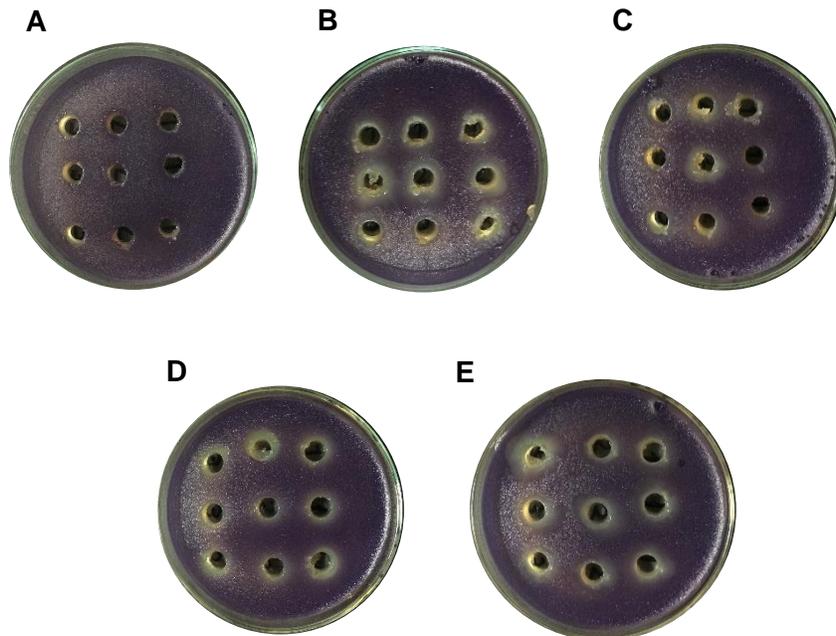


Figura 3.3 Ensayos de inhibición de QS con el sobrenadante del aislamiento PNM115 *Paenibacillus* sp. frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC31532 en diferentes medios, con tres repeticiones de cada uno, y que se ensayan en la misma caja por triplicado (nueve perforaciones). A) Medio marino, no se observa actividad; B) medio TSA, se observa actividad; C) medio nutritivo, la actividad es mínima; D) medio LB es activo; y E) medio ISP2, se observa una menor actividad.

El paso siguiente fue cultivar a PNM115 masivamente en medio TSB, por rendir el sobrenadante más activo, para esto se usaron fiolas de 5 litros, cultivando 1L cada vez, esto se hizo 15 veces hasta obtener 15 L de cultivo. Éste fue sometido a centrifugación y el sobrenadante se extrajo con acetato de etilo (TSB-FO). La fracción acuosa se extrajo con butanol (TSB-FB) y se obtuvo el residuo acuoso (TSB-WW). Cada una de las tres fracciones fue sometida al bioensayo con el *Chromobacterium violaceum* ATCC31532; confirmándose que la fracción activa correspondía a la fracción butanólica (TSB-FB). La fracción butanólica (4.5g) fue fraccionada sobre un cartucho C18 obteniéndose 8 fracciones (TSB-FBI a TSB-FBVIII), que se evaluaron frente al biosensor y se determinó que la fracción TSB-FBII (564 mg) era la fracción más activa. Acto seguido, esta fracción fue separada sobre RP-18 obteniendo 9 fracciones (TSB-FBII-1 a TSB-FBII-9), de las

cuales TSB-FBII-8 (11 mg) es la más activa. Un fraccionamiento análogo fue hecho para el medio de cultivo sin inocular y así tener el blanco respectivo.

El espectro de RMN ^1H (Fig 3.4) de esta fracción muestra señales anchas en las regiones de los protones H- α de aminoácido y de metilos, observándose una gran cantidad de señales doblete colapsadas. En cualquier caso, el espectro de RMN ^1H (figura 3.4), registrado en metanol sugiere la presencia de un compuesto tipo péptido, con algún grado de similitud con los reportados para péptidos obtenidos del género *Paenibacillus*¹⁴. Es interesante destacar la presencia de señales anchas a campo alto, entre δ_{H} 0.7 y 0.9, que no se observan en los blancos del cultivo. La complejidad y falta de definición de las señales de la fracción activa puede indicar que el compuesto activo no se logró purificar con facilidad, lo que ya se ha observado en nuestro grupo de investigación cuando se trabaja en un medio complejo como el TSB. Este medio se usó debido a que es un medio muy usado en el aislamiento de bacterias^{39,40}, sin embargo químicamente es muy complejo y no permite aislar los compuestos biosintetizados por la bacteria.

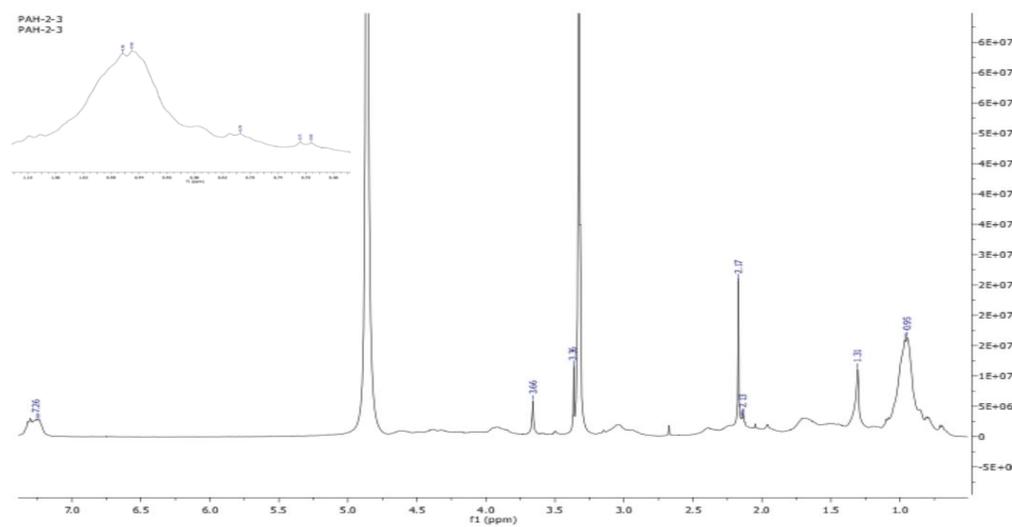


Figura 3.4 Espectro de RMN ^1H 400 MHz ($\text{MeOD-}d_4$) de la fracción TSB-FBII.8 (11mg) obtenida de *Paenibacillus* sp cultivado en TSB.

Ante la situación anterior se decidió hacer el cultivo en medio LB, que en nuestro laboratorio ha mostrado rendir extractos menos complejos que el TSB (Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con la estudiante de pregrado Viviana Carreño, coautora de este capítulo). Adicionalmente, como se observa en la figura 3.3., el sobrenadante obtenido en este medio TSB también rinde extractos activos. El siguiente paso fue

determinar el método de extracción para recuperar los compuestos activos, para esto 1L del cultivo de PNM-115 en LB fue centrifugado y el cultivo libre de células fue extraído con AcOEt para obtener la fracción orgánica (LB-FO) y a partir del residuo acuoso se obtuvieron las fracciones butanólica (LB-WB) y acuosa residual (LB-WW) por partición L-L. De otro lado, la fracción acuosa de 1L de cultivo fue tratada con resina HP-20 obteniéndose una fracción de compuestos de alta polaridad no retenida (LB-NR) y una fracción retenida LB-FR, que se eluyó con metanol.

Se llevaron a cabo los ensayos biológicos y se determinó que las fracciones butanólica (LB-WB) y retenida en la resina HP-20 (LB-FR) resultaron activas como QQ, mientras los blancos respectivos no lo son. Lo anterior sugiere que los compuestos responsables por la actividad QQ son de carácter polar pero no iónico. Los espectros de RMN de las dos fracciones activas resultaron muy parecidos, indicando que se recuperan los mismos compuestos. No obstante, los espectros de las fracciones activas también son similares a los de los blancos respectivos, indicando una gran interferencia del medio de cultivo. La mayor diferencia de los extractos activos con respecto a los blancos, es la presencia de señales anchas a campo alto, entre δ_H 0.6 y 0.9, que no se observan en los blancos del cultivo. Adicionalmente, estas mismas señales habían sido observadas en la fracción activa identificada en el cultivo de TSB (fig 3.4), lo que sugiere la presencia del mismo compuesto activo.

Con base en lo anterior, se seleccionó la extracción con resina HP-20 puesto que trabaja con solventes menos tóxicos, menos costosos y que el proceso se hace más rápido; a pesar de que el rendimiento era un poco inferior. Así se procesaron los 15L de cultivo obtenidos y una porción del extracto LB-FR (3.0 g) obtenido fue fraccionado sobre fase reversa (sobre RP-18) en dos tandas de 1.5 g, recuperando 15 fracciones (FR-I a FR-XV). Cada una de ellas fue sometida al bioensayo y se estableció que solamente las eluidas con metanol resultaron ser activas (FR-XIII a FR-XV). El extracto del medio LB sin inocular fue tratado de la misma manera con fines de comparación, al registrar los espectros de RMN 1H de los dos extractos (activo y blanco) se pudieron observar diferencias en la zona aromática y de campo alto (ver anexo Figura S3.1). Lo anterior sugiere que los compuestos responsables de estas señales son producidos por la bacteria en estudio. De otro lado, fue interesante notar que cuando el fraccionamiento se hizo sobre sílica (fase normal) se perdía la actividad, sugiriendo que los compuestos activos se quedan retenidos sobre la

resina, tal vez porque podría formar enlaces con la sílica, de carácter polar, por lo que no se puede recuperar a partir de ella.

El análisis de la fracción activa por UPLC mostró la presencia de picos en tiempos de retención diferentes a los mostrados por fracción correspondiente del blanco de cultivo. No obstante, se observa que el único pico de la fracción activa es ancho y poco definido y no pudo ser resuelto a pesar de las diferentes columnas (C8 Kromasil 10x250 mm y Symmetry 4,6 x 150 mm), solventes (MeOH, ACN, H₂O) con y sin acidificación (ac. Fórmico 0,1%) y modos de detección (DAD y ELSD) empleados. Se decidió hacer una columna preparativa (4,6 x 100 mm, Kinetex 2.6 μ), colectando porciones del pico ancho en diferentes recipientes. Tanto la reinyección de estas fracciones en HPLC, como sus espectros de RMN, mostraron que se trataba de un único compuesto, que se denominó 3.1.

Estudios de bacterias del género *Paenibacillus* han permitido identificarlas como productoras de lipopéptidos, que pueden estar formadas por una fracción de ácido 3-hidroxi-4-metil-hexanoico y varios aminoácidos como cuerpo peptídico en forma cíclica. Los espectros RMN ¹H reportados tiene una alta similitud con el espectro de 3.1¹⁴, no obstante se observa la ausencia de señal intensa en 1.2 ppm en 3.1, lo que sugiere que no contiene el residuo de ácido graso, siendo un compuesto tipo péptidico. En estos péptidos es común la presencia de fenilalanina, leucina, valina entre otros, también se encuentran aminoácidos inusuales como es el caso del ácido diaminobutírico (DAB). En general, lo que se reporta son compuestos cíclicos con algunas modificaciones incluyendo porciones de aminoácidos no usuales y un número de residuos de aminoácidos entre 7 y 13 aproximadamente; por ejemplo se reportan heptapéptidos con grupos guanidino³⁹ y pentapéptidos con al menos 4 residuos DAB y residuos de ornitina^{39,41}.

Los espectros de RMN ¹H (400 MHz), en CDCl₃, de 3.1 mostraron señales anchas sugiriendo que la muestra no esté bien disuelta o que es una mezcla de confórmeros compleja. Por lo anterior, se registraron los espectros en solventes de diferente polaridad, Metanol *d*₄, Cloroformo CDCl₃, dimetilsulfóxido *d*₆ y piridina *d*₅. Infortunadamente todos los espectros de RMN ¹H registrados muestran señales anchas y poco definidas, siendo el de mejor calidad el registrado en metanol (figura 3.5), sin presentarse problemas de solubilidad que pudieran justificar la falta de definición. Los espectros también se registraron a 600 MHz sin que mejoraran significativamente la definición del espectro (figura 3.6). La presencia de agregaciones moleculares también puede explicar la presencia de señales anchas, estas agregaciones se pueden evitar cambiando el pH de la

solución por adición de un ácido, como se ha descrito para los péptido mattacina o polimyxina M⁴²; no obstante, la adición de HCOOH al metanol *d*₄ tampoco mejoró la resolución del espectro. La presencia de anillos macrocíclicos podría explicar la mezcla de conformeros, por lo que se buscó romper un posible enlace éster, en el caso de que se tratase de un depsipéptido, para lo cual se trató el compuesto 3.1 con bases sin observarse transformación en el compuesto. Otra posibilidad que explica la gran cantidad de señales sobrepuestas es que se trate de un péptido de gran tamaño con repetición de unidades de amino ácido.

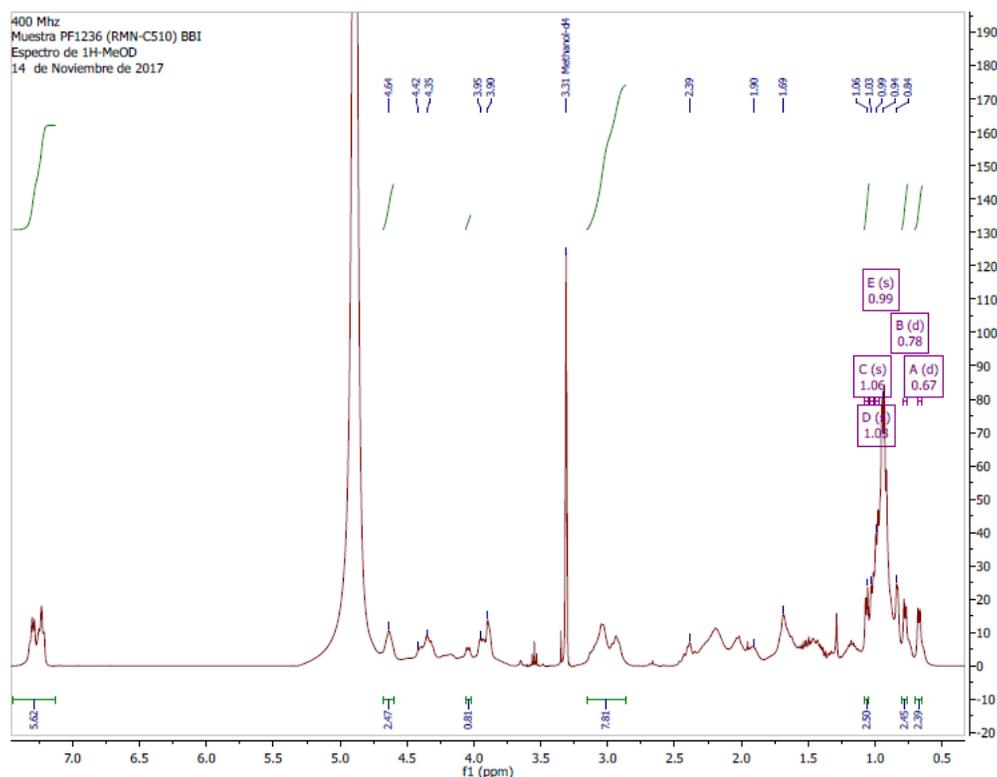


Figura 3.5. Espectro de RMN ¹H (400 MHz en Metanol *d*₄) del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB. Se observan señales para un compuesto tipo péptido, pero éstas son anchas y poco definidas.

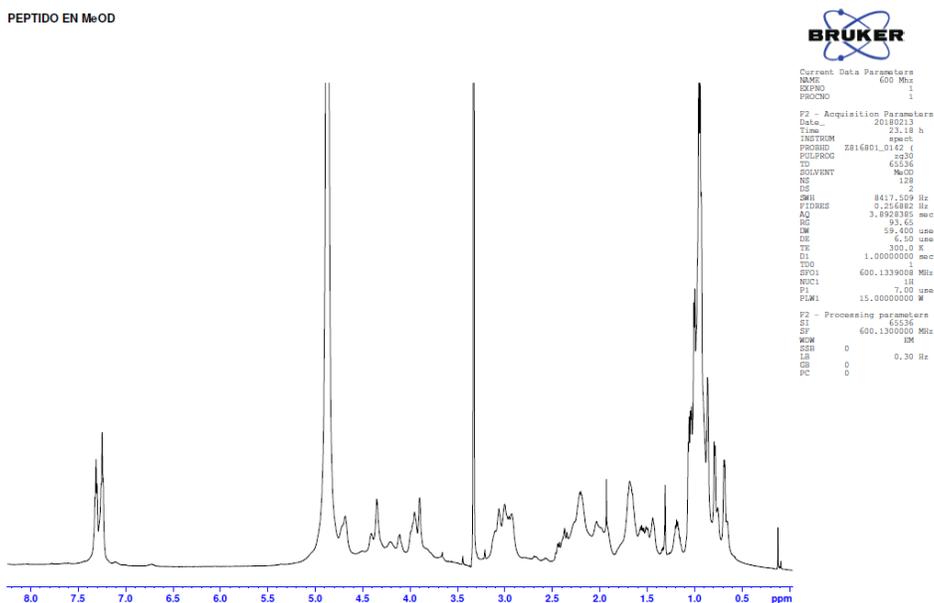


Figura 3.6 Espectro de RMN ^1H (600 MHz) en metanol d_4 , del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB. Se observan señales anchas y poco definidas.

El análisis del compuesto 3.1. por CL-(+) ESIMS, permitió identificar la presencia de un ion a m/z de 560.3604 (figura 3.7), que de acuerdo a la distribución isotópica sugiere que está dos veces cargado. De esta manera $[\text{M}+\text{H}]^+$, si el ion identificado es $[\text{M}+\text{H}]^{2+}$, corresponde a 1119.7135. En el caso de que ion 560.3604 sea $[\text{M}+\text{Na}]^{++}$, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ correspondería a 1097.7316, las fórmulas moleculares propuestas para ambos casos serían las consignadas en la tabla 3.4^{43,44}. El gran número de fórmulas moleculares con bajo error no permite identificar con certeza la fórmula molecular de 3.1; aunque confirma la presencia de un péptido debido al alto número de O y N en las fórmulas moleculares propuestas, estos compuestos son comunes en *Paenibacillus*^{12,39}. El ejercicio de dereplicación en AntiBase, base especializada en microorganismos, no arrojó coincidencias para la masa 1120 sugiriendo que el compuesto podría ser nuevo y se debe trabajar en su elucidación estructural.

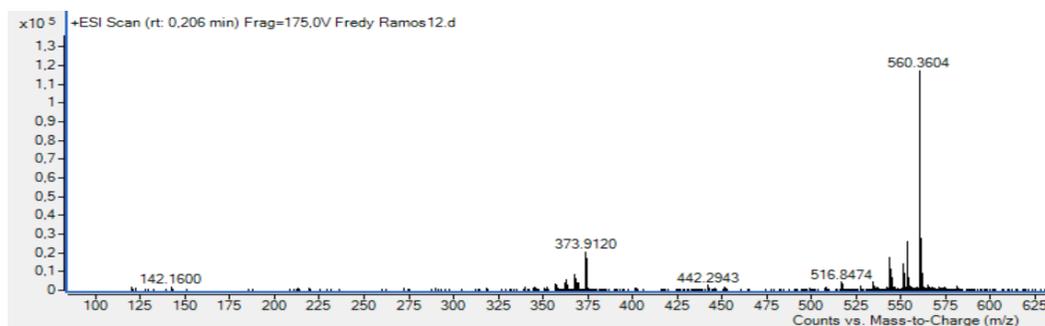


Figura 3.7 Espectro del masas registrado en modo (+) ESIMS del compuesto 3.1 aislado de *Paenibacillus* sp. (PNM115)

Tabla 3.4 Fórmulas moleculares para 3.1 si 560.3604 corresponde a $[M+2H]^{++}$, y si 560.3604 corresponde a $[M+Na]^{++}$

	Fórmula molecular	Masa monoisotópica	ppm	mDa	Insaturación
$[M+2H]^{++}$					
1	$C_{54}H_{95}N_{12}O_{13}(+1)$	1.119,71	0,096	0,108	13,5
2	$C_{61}H_{101}N_9O_4S_3(+1)$	1.119,71	0,164	-0,184	16
3	$C_{61}H_{93}N_{13}O_5S(+1)$	1.119,71	0,255	0,285	22
4	$C_{62}H_{99}N_6O_{10}S(+1)$	1.119,71	0,259	0,291	16,5
5	$C_{47}H_{103}N_{14}O_{10}S_3(+1)$	1.119,71	0,289	0,324	3,5
6	$C_{54}H_{103}N_8O_{12}S_2(+1)$	1.119,71	0,323	-0,361	7,5
7	$C_{53}H_{97}N_{15}O_7S_2(+1)$	1.119,71	0,327	-0,367	13
8	$C_{68}H_{93}N_7O_7(+1)$	1.119,71	0,357	-0,4	26
9	$C_{46}H_{99}N_{14}O_{15}S(+1)$	1.119,71	0,486	-0,544	4,5
10	$C_{70}H_{95}N_4O_8(+1)$	1.119,71	0,842	0,942	25,5
11	$C_{55}H_{99}N_{12}O_8S_2(+1)$	1.119,71	0,872	0,976	12,5
12	$C_{56}H_{105}N_5O_{13}S_2(+1)$	1.119,71	0,876	0,981	
$[M+2Na]^{++}$					
1	$C_{49}H_{104}N_9NaO_{14}S(+1)$	1.097,73	0,031	-0,034	2
2	$C_{56}H_{102}N_{10}NaO_6S_2(+1)$	1.097,73	0,131	0,144	10,5
3	$C_{48}H_{106}N_{12}NaO_8S_3(+1)$	1.097,73	0,463	-0,508	1,5
4	$C_{63}H_{102}N_4NaO_8S(+1)$	1.097,73	0,494	-0,542	14,5
5	$C_{56}H_{94}N_{14}NaO_7(+1)$	1.097,73	0,558	0,613	16,5
6	$C_{57}H_{100}N_7NaO_{12}(+1)$	1.097,73	0,563	0,618	11
7	$C_{55}H_{98}N_{10}NaO_{11}(+1)$	1.097,73	0,66	-0,725	11,5
8	$C_{64}H_{98}N_8NaO_4S(+1)$	1.097,73	0,725	0,795	19,5
9	$C_{50}H_{108}N_9NaO_9S_3(+1)$	1.097,73	0,76	0,834	1

El espectro RMN ^{13}C presenta al menos 47 señales, varias de éstas duplicadas (figura 3.8). En el espectro se pueden identificar señales para carbonos sp^2 oxigenados, carbonos sp^2 , carbonos sp^3 unidos a heteroátomos y no unidos a ellos. Así, las señales a campo bajo en δ_{C} 177.1; 176.7; 175.4; 174.7, 174.6; 174.5; 173.7; 173.4; 173.3 y 173.0, algunas de ellas dobleteadas, sugieren la presencia de al menos 10 carbonilos (C=O) de ésteres o amidas. Cuatro señales en la región aromática en δ_{C} 137.3; 130.4; 129.8 y 128.2 indican la presencia de un grupo fenilo monosustituido. Las señales para metino asociadas a C- α de α -hidroxiácidos y C- α de α -aminoácidos aparecen en δ_{C} 51.7; 53.3; 54.2; 57.8; 57.9; 60.7; 62.7; 72.9 y 73.0, algunas dobleteadas. La señal de metileno en δ_{C} 64.0 es congruente con el carbono metilénico oxigenado de la serina. Adicionalmente, en la zona entre 42 y 26 ppm se pueden observar al menos diez señales para metilenos, muchas de ellas dobleteadas. Finalmente, en campo alto se observan al menos 12 señales para metilo en δ_{C} 11.5; 12.2; 14.4; 16.2; 20.0; 20.2; 21.5; 21.5; 23.6; 23.6; 23.8 y 24.9. En el espectro RMN ^1H (figura 3.6) se observan tres señales complejas en δ_{H} 7.31 (bt, $J= 7.1$ Hz/ δ_{C} 129.8); 7.25 (bt, $J= 7.0$ Hz/ δ_{C} 128.2) y 7.23 (bd, $J= 7.0$ Hz/ δ_{C} 130.4) que fueron asociadas a un grupo fenilo monosustituido. Las señales para protón en la zona entre 5 y 3.7 ppm muestra la presencia de al menos 10 protones H- α de aminoácido e hidroxiácido. La zona entre 3.5 y 1.2 es compleja y se puede asociar a protones β entre otros. En la región de metilos entre δ_{H} 1.2 y 0.6 se observa una gran cantidad de señales doblete colapsadas, destacándose las señales en δ_{H} 0.68 (d, 6.4) y 0.79 (d, 6.4), que son características de las fracciones activas como se describió en el aislamiento bioguiado. El resumen de la asignación en RMN de las señales identificadas para el péptido activo 3.1 se presentan en la tabla 3.5.

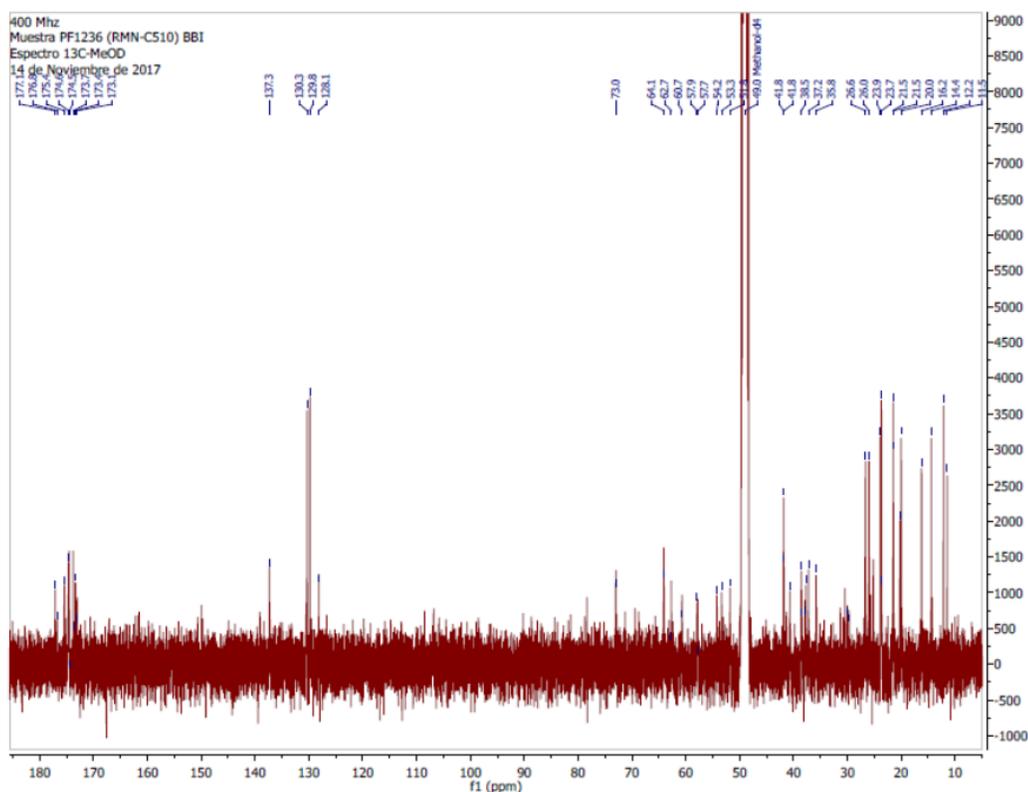


Figura 3.8 Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz en Metanol d_4) del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB.

Tabla 3.5 Asignación en RMN de las señales identificadas para el péptido activo 3.1.

Posición	δ_{H} en ppm (multiplicidad, J en Hz)	δ_{C} en ppm (multiplicidad)
Fenilalanina		
1		174.5 qC
2	4.42 (dd, J 11.2, 5.2)	57.9 CH
3	3.03 - 3.12	38.5 CH_2
4		137.3 qC
5/9	7.23 (bd, J = 7.0 Hz)	130.4 CH
6/8	7.31 (bt, J = 7.1 Hz)	129.8 CH
7	7.25 (bt, J =7.0 Hz)	128.2 CH
Serina		
1		174.6 qC
2	4.35 (bt, 4.2)	57.8 CH_2
3	3.9 (m)	64.0 CH_2
Valina		
1		176.7 qC
2	3.90 (d, J = 10.0 Hz)	62.7 CH
3	2.22 (m)	30.0 CH
4	1.06 (d, J = 7.1)	20.2 CH_3
5	1.00 (d, J = 6.9)	20.0 CH_3

Posición	δ_H en ppm (multiplicidad, J en Hz)	δ_C en ppm (multiplicidad)
Ácido leucico		
1		ND
2	3.95 (bdd, 6.5, 3.3)	73.0 CH
3	1.43-1.52 (2H, m)	40.6 CH ₂
4	0.96 (m)	24.9 CH
5	0.68 (bd, 6.4)	21.5 CH ₃
6	0.79 (bd, 6.4)	23.8 CH ₃
Leucina		
1		ND
2	4.68 (br s)	51.7 CH
3	1.67-1.70(m) 2.40 (m)	41.7 CH ₂
4	1.70 (m)	25.9 CH
5	0.86 (bs)	21.5 CH ₃
6	0.94 (d, 7.3)	23.6 CH ₃
Isoleucina		
1	-	177.1 qC
2	4.11 (bd, 9.7)	60.7 CH
3	1.91 (m)	37.1
4	1.60 (m) 1.19 (m)	26.6
5	0.95 (bt, 7.3)	23.6 CH ₃
6	1.03 (d, 6.9)	16.2 CH ₃
Cisteina-1		
1	-	ND
2	4.33 (m)	53.3 CH
3	2.10-2.30 (m)	29.6 CH ₂
Cisteina 2		
1	-	ND
2	4.63 (m)	54.2 CH
3	2.10-2.30	29.9 CH ₂
Asparagina		
1		ND
2	4.37 (m)	58.0
3	2.9-3.1 (m)	37.5 CH ₂
ácido 3-hidroxi-4-metil hexanoico		
1		175.4
2	2.4 (2H, m)	41.8 CH ₂
3	3.94 (m)	73.4 CH
4	1.43 (m)	41.8 CH
5	1.16-1.28 (m) 1.55 (m)	26.7 CH ₂
6	0.92 (bs)	14.4 CH ₃
7	0.94 (bs)	12.2 ó 11.5 CH ₃

ND: no determinado

Se registraron los espectros bidimensionales COSY (figura 3.9), J-resolved (figura 3.10), HSQC (figura 3.11) y HMBC (figura 3.12) con diferentes valores de J (5 y 7 Hz) en metanol, tanto a 400 como 600 MHz con el fin de caracterizar el compuesto activo 3.1. (Estos espectros pueden consultarse en el anexo electrónico de la presente tesis) El estudio de ellos permitió identificar la presencia de algunos aminoácidos como se describe a continuación. Es importante decir que las constantes de acoplamiento ^1H - ^1H fueron medidas en el espectro *J* resolved debido a que en el espectro RMN ^1H la señales salen anchas.

Muestra PF1236 (RMN-C510) BBI
Espectro COSY-MeOD
15 de Noviembre de 2017

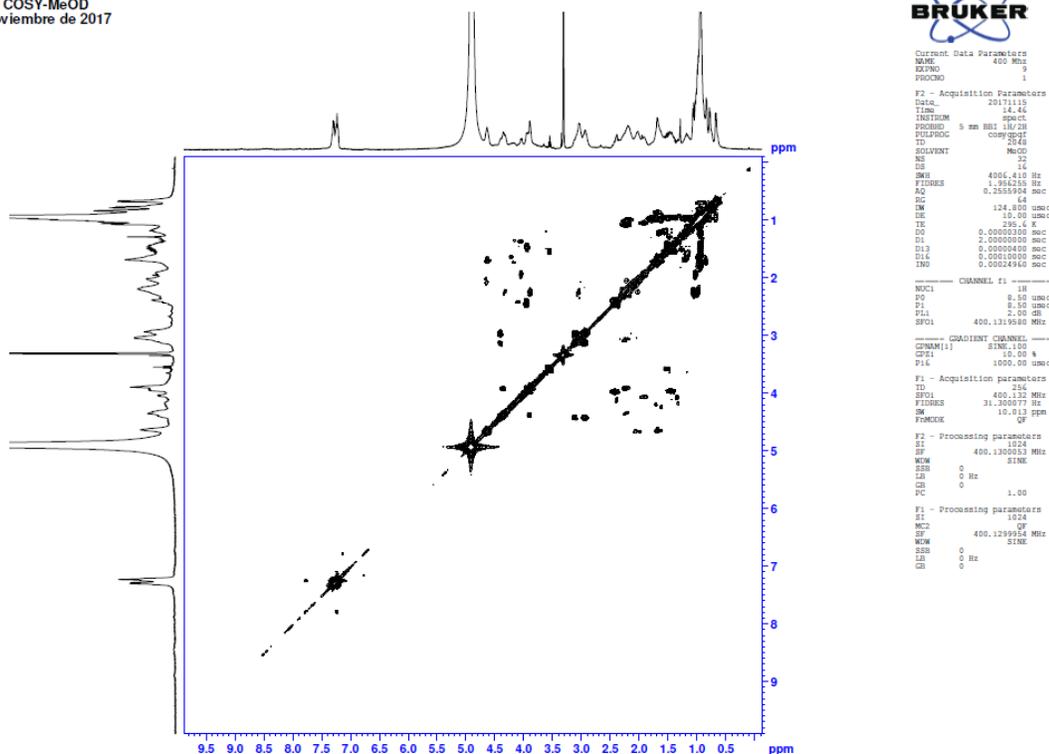


Figura 3.9 Espectro de COSY (400 MHz en Metanol d_4) del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB

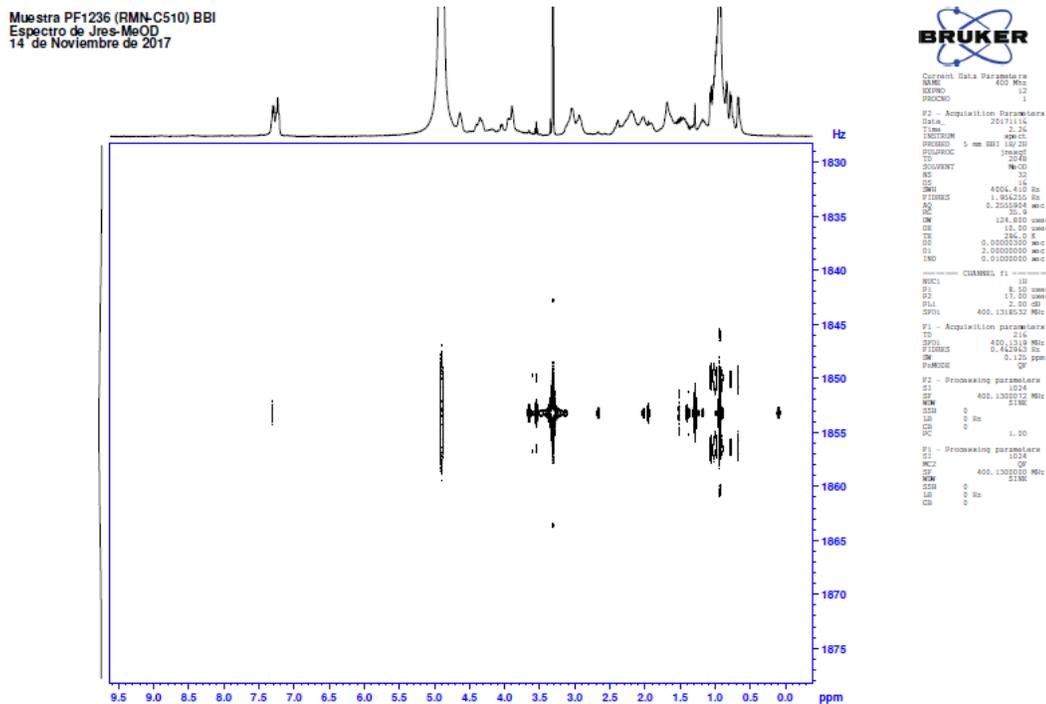


Figura 3.10 Espectro de J-resolved (400 MHz en Metanol d_4) del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB.

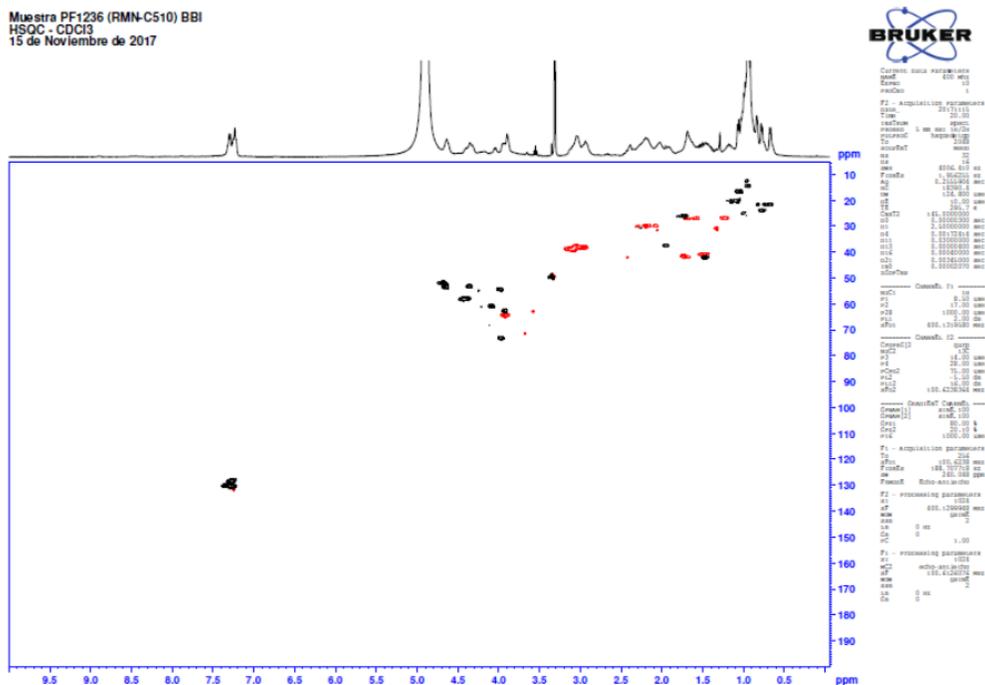


Figura 3.11 Espectro de HSQC (400 MHz en Metanol d_4) del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB.

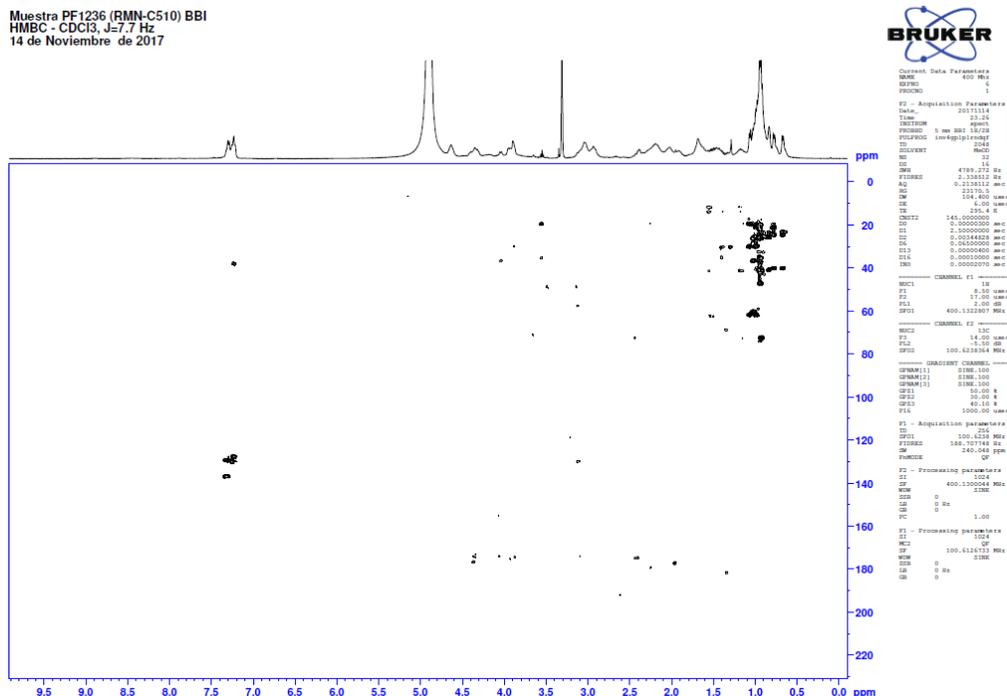


Figura 3.12 Espectro de HMBC (400 MHz en Metanol *d*₄) del compuesto activo 3.1. aislado de *Paenibacillus* sp PNM115 a partir de cultivo en medio LB. A) con *J* 7.7 Hz con *J* 5.0 Hz

Las señales para los protones de metileno oxigenado en δ_{H} 3.9 (m/ δ_{C} 64.0) correlacionan en COSY con la señal de metino nitrogenado en δ_{H} 4.35 (bt, 4.2 Hz/ δ_{C} 57.8). Estos protones carbinólicos correlacionan en HMBC con un carboxilo en δ_{C} 174.6, confirmando la presencia de una unidad de serina (figura 3.13).

Los protones de metilo en δ_{H} 1.06 (d, *J* = 7.1 / δ_{C} 20.2) y 1.00 (d, *J*=6.9/ δ_{C} 20.2) correlacionan en HMBC con las señales de carbono de alfa amino ácido en δ_{C} 62.7 (δ_{H} 3.90, d, *J* = 10.0 Hz), y de metino δ_{C} 30.0 (δ_{H} 2.22, m), además de entre sus respectivos carbonos. Lo anterior muestra la presencia de un grupo isobutilo típico de valina. En HMBC el protón β en δ_{H} 2.22 y el α δ_{H} 3.90 muestran un *crosspeak* con un carbonilo en δ_{C} 176.7. Todo lo anterior es congruente con la presencia de una valina (figura 3.13)

Los protones de metilo a campo bajo en δ_{H} 0.68 (bd, *J* = 6.4 / δ_{C} 21.5) y 0.79 (bd, *J*=6.4 / δ_{C} 23.8) correlacionan en HMBC con las señales del metileno δ_{C} 40.6 (δ_{H} 1.43-1.52, m), y de metino δ_{C} 24.9 (δ_{H} 0.96, m), además de entre sus respectivos carbonos. Lo anterior muestra la presencia de un grupo isobutilo. En COSY los protones β en δ_{H} 1.43-1.52 (m) correlacionan entre sí y con el protón α de un hidroxiaácido en δ_{H} 3.95 (bdd, *J* = 6.5, 3.3 Hz / δ_{C} 73.0), este protón fue juzgado como carbinólico por el desplazamiento de su carbono

en δ_C 73.0, que es típico del ácido leucico.⁴⁵ La correlación en HMBC entre δ_H 0.96 (H-4) y el carbono oxigenado (δ_C 73.0, C-2) confirman lo anterior. Desafortunadamente no se observó correlación entre los protones β en δ_H 1.43-1.52 (m) con algún carboxilo, por lo que no se pudo establecer el desplazamiento de éste. Todo lo anterior sugiere la presencia del ácido leucico, o ácido 2-hidroxiisocapróico (figura 3.13).

Los protones de metilo en δ_H 1.03 (bd, $J=6.9$ / δ_C 16.2) correlacionan en HMBC con las señales de metileno δ_C 26.6 (δ_H 1.60, m/ 1.19, m), de metino δ_C 37.1 (δ_H 1.91, m), y de metino en alfa de amino ácido en δ_C 60.7 (δ_H 4.11, bd, 9.7). Adicionalmente, las señales de metileno en δ_H 1.60 (m) y 1.19 (m) correlacionan en COSY con la señal ancha en δ_H 0.95 (bt, 7.3/ δ_C 23.6). La correlación en HMBC entre δ_H 1.91 (H-3) y el carboxilo en δ_C 177.1 completan el aminoácido. Todo lo anterior permitió establecer la presencia de isoleucina (figura 3.13).

Los protones en δ_H 0.86 (bs / δ_C 21.5) y 0.94 (bd, $J=7.3$ / δ_C 16.2) correlacionan en HMBC con las señales del metileno en δ_C 41.7 (δ_H 1.67-1.70, m), y de metino δ_C 25.9 (δ_H 1.70, m), además de entre sus respectivos carbonos. Lo anterior muestra la presencia de un grupo isobutilo. En COSY los protones β en δ_H 1.67-1.70 (m) correlacionan entre sí y con el protón α de un hidroxiaácido en δ_H 4.68 (m / δ_C 53.3). Desafortunadamente no se observó correlación entre los protones β en δ_H 1.67-1.70 (m) con algún carboxilo, por lo que no se pudo establecer el desplazamiento de éste. Todo lo anterior sugiere la presencia del amino ácido leucina (figura 3.13).

La presencia de dos unidades de cisteína, se pueden sugerir por la presencia de metilenos en δ_C 29.6 y 29.7, que correlacionan en HSQC con multipletes entre δ_H 2.10-2.30, que a su vez correlacionan en COSY con protones en δ_H 4.33 y 4.63, que a su vez correlacionan en HSQC con carbonos en δ_C 53.3 y 54.2. Todo lo anterior es característico de unidades de cisteína, y la presencia de azufre había sido sugerida por EM (ver tabla 3.4). De la misma manera se puede sugerir la presencia de asparagina, por la presencia de un metileno en δ_C 37.5, cuyos protones (δ_H 2.9-3.1) únicamente acoplan entre sí y con el protón en δ_H 4.37 en el experimento COSY. Estos valores de desplazamiento son típicos del ácido aspártico y/o la asparagina.⁴⁶

En el experimento COSY se observó un sistema de spin que incluye el metilo en δ_H 0.94 (δ_C 11.5 ó 12.2) y un metileno diasterotópico en δ_H 1.16-1.28 y 1.55 (δ_C 26.7), este metileno a su vez, correlaciona con un metino en δ_H 1.46 (δ_C 41.8) y este metino con un metilo en

δ_H 0.92 (δ_C 14.4). Esta estructura fue confirmada por las correlaciones en HMBC entre el metileno y los carbonos del metino y metilo. En este mismo sistema, el metino mencionado δ_H 1.46 (δ_C 41.8) correlaciona con un metino oxigenado en δ_H 3.94 (δ_C 73.4) el cual correlaciona con un metileno ancho en δ_H 2.4 (δ_C 41.8). Lo anterior se confirma por la señal en HMBC entre el metilo δ_H 0.92 (δ_C 14.4) y el carbono del metino oxigenado en δ_C 73.4. En HMBC, el protón carbinólico δ_H 3.94 muestra un crosspeak con un carbonilo en δ_C 175.4. Todo lo anterior es congruente con la presencia de un residuo que proviene del ácido 3-hidroxi-4-metilhexanoico, estos residuos han sido descritos para bacterias del género *Paenibacillus*⁴⁷. La presencia de este último residuo sugiere que el compuesto 3.1 es un metabolito híbrido entre la ruta biosintética de los policétidos y los péptidos no ribosomales.

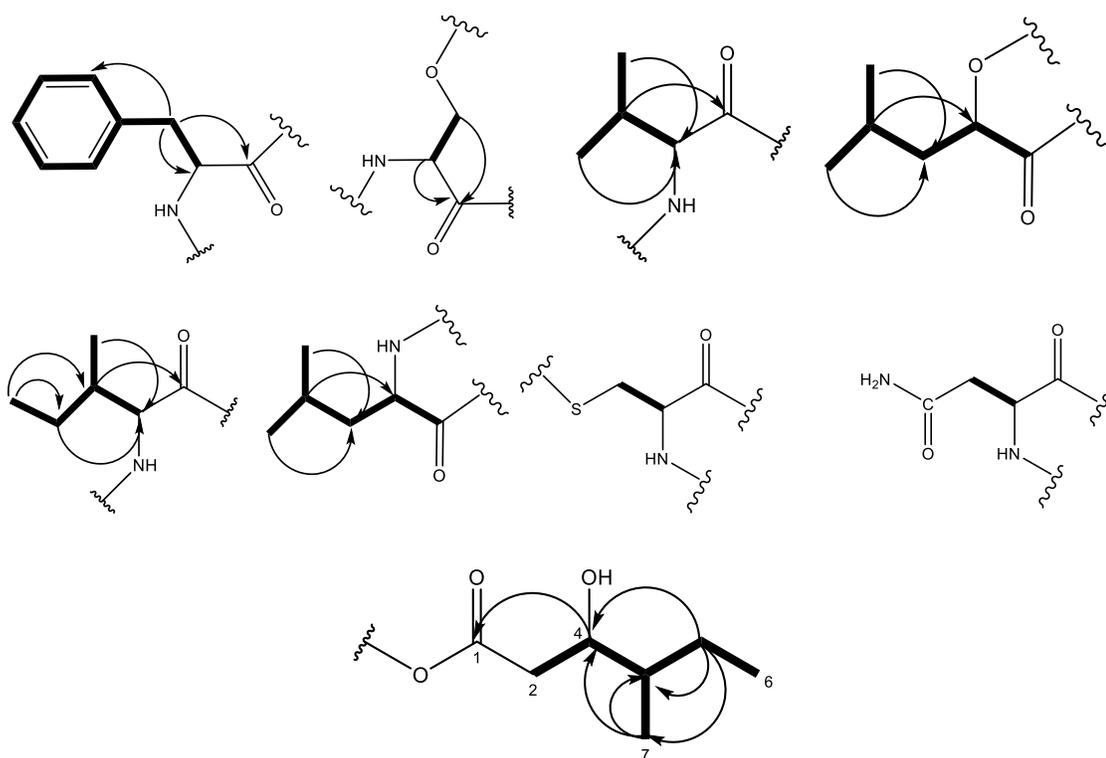


Figura 3.13 Correlaciones claves para identificación de fenilalanina, serina, valina, ácido léucico, isoleucina y leucina (COSY: Línea gruesa; HMBC: Flechas). La presencia de cisteína y aspargina se sugiere por las correlaciones en COSY y los desplazamientos químicos, y la del ácido 3-hidroxi-4-metilhexanoico se sugiere por COSY y HMBC pero las señales están sobre puestas.

Para la unión de los amino ácidos en los péptidos se suelen emplear las correlaciones de los protones alfa con los carboxilos de los aminoácidos vecinos. Así se pudo identificar que la unidad de serina se encuentra unida al carboxilo de la valina, por la correlación en HMBC

entre el protón en δ_H 4.35 de la serina con el carboxilo en δ_C 176.7 de la valina, además del carboxilo en δ_C 174.6 propio de la misma unidad de serina. Así mismo, el nitrógeno de la asparagina está unido al carboxilo de la fenilalanina, por la correlación en HMBC entre el protón alfa en δ_H 4.35 con el carboxilo en 174.5 en el experimento HMBC. (figura 3.14). Infortunadamente no se observan más correlaciones en HMBC (ni con J de 7.7 Hz ni 5.0 Hz) que permitan más conexiones.

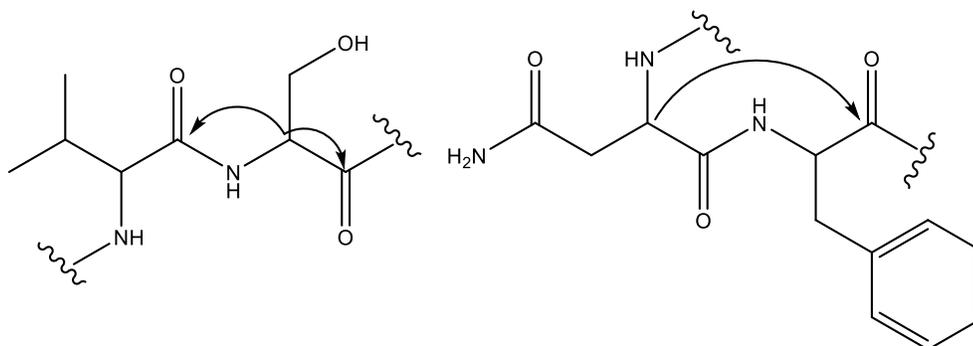


Figura 3.14 Correlaciones claves para identificación de las unidades de valina-serina, y asparagina-fenilalanina. Correlaciones en HMBC marcadas en flechas.

Con todo lo anterior se identificó la presencia de unidades Val-Ser, Asn-Phe, ácido léucico, leucina, isoleucina, dos unidades de cisteína y una de ácido 3-hidroxi-4-metilhexanoico. La presencia de residuos de tipo policétido ha sido ampliamente predicho por estudios genómicos para cepas de *Paenibacillus*, aunque son pocos los ejemplos de aislamiento^{48,49}. El ejercicio de dereplicación usando la base de datos *Scifinder*, permitió identificar que compuestos con esta masa molecular corresponden a péptidos, pero ninguno de ellos contiene todos los aminoácidos acá identificados lo que confirma de que se trata de un compuesto nuevo. La masa sugiere que el péptido es cíclico y que seguramente tiene un puente disulfuro, pues explica muy bien el valor observado de $[M+H]^{2+}$. Este compuesto sería similar a los lipopeptidos que han sido reportados para cepas de *Bacillus* y *Paenibacillus*; cuya lista incluye las polimixinas, octapeptinas, polipeptinas, iturinas, surfactinas, fengicinas, fusaricidinas, tridecaptinas y kurstakinas.^{50,51} Estos lipopéptidos tienen una amplia variedad de actividades, que van desde antibacterianos y antifúngicos, hasta anticancerígenos y antivirales. Dentro de estas actividades, la más destacada y promisoría sería la antimicrobiana⁵¹ donde se prevé que estos compuestos entren en fase clínica próximamente⁵¹. También se ha visto su potencial como controladores de patógenos comunes en cultivos¹⁴. El compuesto 3.1 comparte

características con las polimixinas al ser ésta una familia de lipopeptidos cíclicos con residuos de policetidos 3-hidroxilados y terminación anteiso^{14,51}.

Para la identificación total de este compuesto se sugiere obtener espectros de MS/MS^{14,52,53} que permitan identificar la secuencia de los aminoácidos, e hidrólisis ácida seguida de tratamiento con Marfey para determinar la estereoquímica de los aminoácidos.^{54,55}

3.2.4. Ensayos de inhibición del *quorum sensing* con el compuesto 3.1.

El compuesto 3.1 fue evaluado frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC_{QS}) del *quorum sensing*, para lo cual se usó la metodología de dilución en agar empleando 8 concentraciones diferentes para el compuesto (25 µg/mL – 400 µg/mL). Estos ensayos se hicieron en placas de 96 pozos (Figura 3.15), observándose que a 25 µg/mL (22.3 µM) hay inhibición en la producción de violaceína. Con el fin de probar que no haya inhibición de crecimiento o retraso en el mismo, se hizo la curva de crecimiento de la bacteria con el compuesto a diferentes concentraciones (figura 3.16), y se pudo apreciar que el crecimiento de la bacteria no se ve afectado al añadir el compuesto en esta concentración 25 µg/mL (Figura 3.15).

Al comparar la concentración MIC_{QS} del compuesto 3.1.(25 µg/mL) con la reportada como bactericida, para compuestos similares, se puede observar que la MIC_{QS} se encuentra muy por debajo del rango reportado para péptidos similares como por eje en *Ralstonia solanacearum* (124 µg/mL) y *Erwinia cartotovora* (124 µg/mL)¹⁴. Es importante mencionar que se ha reportado que los bactericidas se comportan como inhibidores de QS a concentraciones subinhibitorias^{27,56–58}

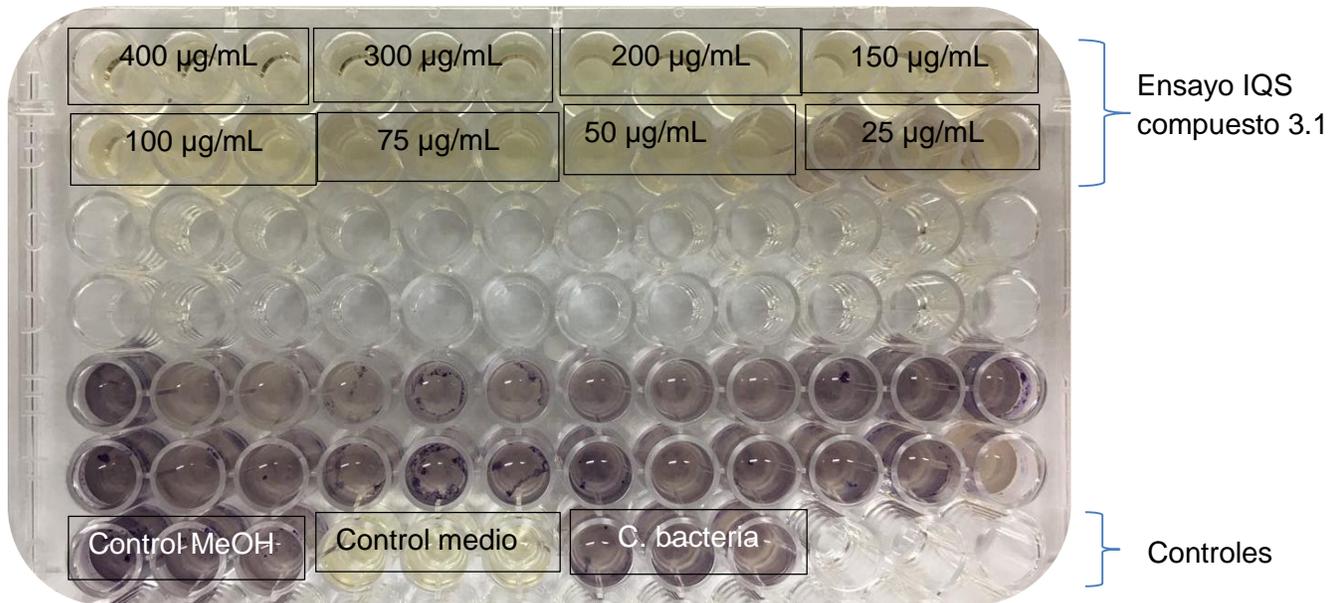


Figura 3.15 Ensayo de inhibición de QS del compuesto 3.1 aislado de *Paenibacillus* sp. frente a *Chromobacterium violaceum*, para determinar el MIC_{QS} del compuesto. En las dos filas superiores se observa la actividad del compuesto a diferentes concentraciones. Como se observa la concentración a la cual se inhibe el QS es 25 µg/mL. En las filas inferiores se encuentran los controles de medio con metanol y bacteria, la segunda solo el medio y las tres últimas el control de bacteria.

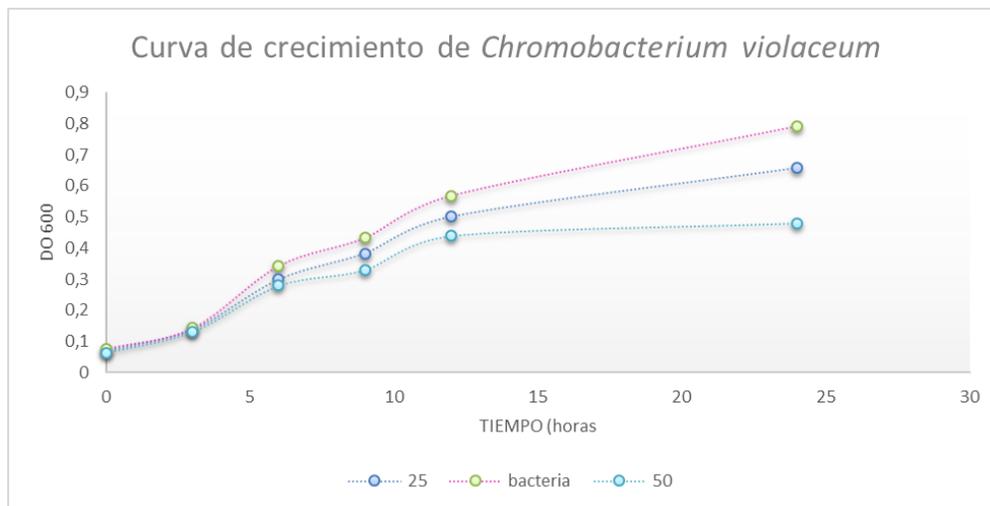


Figura 3.16 Curva de crecimiento de *Chromobacterium violaceum* tratada con 25 µg/mL del compuesto 3.1 aislado de *Paenibacillus* sp. PNM115. Se puede apreciar que no existe una diferencia significativa entre el tratamiento evaluado y el blanco que es la bacteria sin adición de otro compuesto (color verde)

La motilidad de las bacterias se considera un fenotipo que actúa favoreciendo la patogenicidad, y que en el caso del *swimming* en *B. glumae* es controlada por QS⁵⁹. Por esta razón determinar si un compuesto es capaz de inhibir este fenotipo es importante en

este estudio. En el bioensayo se puso una cantidad conocida del compuesto 3.1 (0.5; 0.25 y 0.125 μg) sobre la superficie del agar en presencia de la cepa *Burkholderia glumae* CIAT 4026, seleccionada por ser patógena y móvil. Como resultado de este ensayo se puede apreciar que existe una disminución en la movilidad *swimming* por parte de *B. glumae* al ensayarlo con 0.11 nmol (0.125 μg) del compuesto 3.1 (Figura 3.17). Como control negativo se usó MeOH al 10% para determinar que no sea este compuesto el responsable de la actividad (Figura 3.17b), y también la bacteria crecida en ausencia de cualquier compuesto (Figura 3.17).

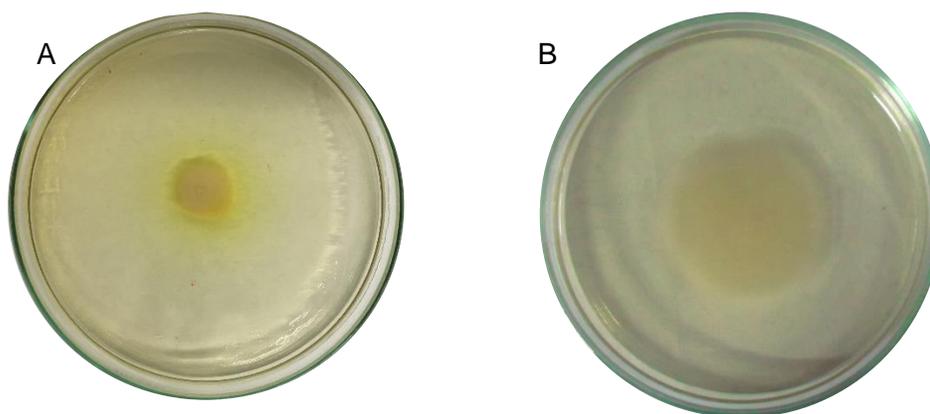


Figura 3.17 A) Ensayo de inhibición del *swimming* en *Burkholderia glumae*, la bacteria se puso en contacto con diferentes cantidades del compuesto (0.125 μg , 0.25 μg y 0.5 μg). En el gráfico la inhibición se produce a 0.11 nmoles (0.125 μg) del compuesto 3.1. B) control de bacteria. Se observa que existen diferencias entre el desplazamiento de la bacteria con y sin compuesto.

Para determinar si el compuesto es capaz de inhibir a la bacteria *B. glumae* en granos de arroz, se ensayó una forma alternativa y preliminar con catáfilos de cebolla, que permite predecir los resultados de este ensayo, siguiendo la metodología propuesta por Karki 2010⁶⁰. En primer lugar, se determinó la toxicidad de 3.1 en un sistema vivo, disponiendo el compuesto sobre los catafilos de cebolla en diferentes cantidades. Se determinó que es inocuo al no afectar el tejido de la cebolla (figura 3.18 A). Luego se procedió a infectar el catafilo con *Burkholderia glumae* CIAT 4026, cepa patógena, en presencia y ausencia de 3.1. Como resultado de este ensayo se puede observar que el compuesto 3.1 es capaz de inhibir el efecto nocivo de la bacteria cuando se le añade 2.68 nmoles (3 μg) del compuesto, juzgado por la ausencia de maceración en la cebolla en presencia del compuesto (fig 3.18). Cuando no se puso el compuesto la bacteria maceró el tejido de la cebolla, como se observa en los controles con MeOH y con solo la bacteria (Figura 3.18 B y C)

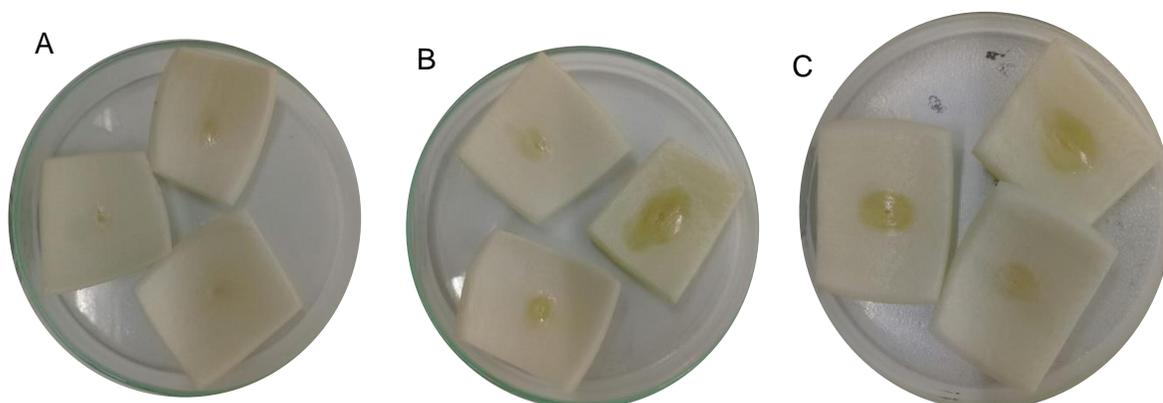


Figura 3.18 Ensayos en catafilos de cebolla del compuesto 3.1 aislado de la cepa *Paenibacillus* sp. A) Compuesto 3.1 a cantidad de 2.68 nmoles (3 µg) B) Control con inóculo de bacteria *Burkholderia glumae* CIAT 4026 C) Control de solvente MeOH inoculado con la bacteria a una concentración de 10%.

Resumiendo, el compuesto 3.1 actúa como inhibidor del QS frente a *C. violaceum* a una concentración de 22.3 µM (25 µg/mL) y que ésta no afecta el crecimiento de la bacteria. Los ensayos realizados con *B. glumae* CIAT 4026 para determinar si es activo controlando el *swimming* se observa que el compuesto lo inhibe cuando se le pone en contacto con 0.11 nmol (0.125 µg) y finalmente en el ensayo usando catafilos de cebolla se observa que el compuesto es activo cuando se pone en contacto con 2.68 nmoles (3µg) del compuesto, lo que indica que este compuesto es QQ con potencial para controlar fitopatógenos. Compuestos similares a **3.1** actúan como bactericidas o antifúngicos a concentraciones mayores a las acá reportadas como controladores del QS¹⁴.

3.3 Conclusiones y Recomendaciones

De un total de 138 aislamientos microbianos (no actinobacterias), obtenidos a partir de organismos y sedimentos marinos, y por medio de bioensayos de inhibición del QS se seleccionaron 8 cepas que presentaron actividad inhibitoria de QS. Se realizó la identificación molecular a estos aislamientos permitiéndolas caracterizar como *Lysinibacillus* sp (PNM10); *Bacillus cereus* (PNM100); *Paenibacillus* sp (PNM115); *Paenibacillus* sp (PNM123), *Bacillus anthracis* (PNM82 y PNM217), *Proteus mirabilis* (PNM92) y PNM216, no identificada

Dentro de las cepas activas como IQS había algunas cepas pertenecientes a bacterias relacionadas con enfermedades humanas o de plantas, razón por la cual se descartaron para continuar con el estudio. Pues el desarrollo de un biocontralador a partir de ellas

requeriría profundizar en su seguridad lo que haría inviable o muy difícil su desarrollo. Así, y teniendo tanto los resultados de actividad biológica como su clasificación taxonómica los aislamientos PNM115 (*Paenibacillus* sp), PNM10 (*Lysinibacillus* sp.) y PNM123 (*Paenibacillus* sp) son los más promisorios para el desarrollo de biocontroladores.

La cepa PNM115 (*Paenibacillus* sp) se seleccionó para su estudio químico por ser la más activa y pertenecer a un género que ha mostrado ser útil en el desarrollo de biocontroladores. El estudio detallado de los espectros de RMN 1D y 2D (COSY; HMBC; HSQC; J-resolved) del compuesto activo 3.1 permitió identificar que es un péptido análogo de las polipeptinas con unidades Val-Ser, Asn-Phe, ácido léucico, leucina, isoleucina, dos unidades de cisteína y una de ácido 3-hidroxi-4-metilhexanoico, y una masa de 1119.7135. El compuesto presenta un complejo equilibrio conformacional que conlleva a que las señales sean anchas y poco definidas, por lo que no se pudo completar las conexiones de estos aminoácidos. Para terminar su identificación total se sugiere obtener espectros de MS/MS, que permitan identificar la secuencia de los aminoácidos. Y llevar a cabo una hidrólisis ácida seguida de tratamiento con el reactivo de Marfey para determinar la estereoquímica de los aminoácidos del péptido 3.1.

El compuesto 3.1 mostró actividad QQ frente a *Chromobacterium violaceum* ATCC31532 a una concentración de 22.3 μM (25 $\mu\text{g/mL}$), se determinó además que éste no afectaba el crecimiento bacteriano, mediante el desarrollo de curvas de crecimiento, por lo que puede ser considerado como un compuesto QQ. Adicionalmente, 3.1 afecta el fenotipo de *swimming*, controlado por QS, de *Burkholderia glumae* cuando se añaden 0.11 nmoles (0.125 μg) del compuesto. Finalmente, 3.1 impide la pudrición de los catafilos de cebolla por parte de *Burkholderia glumae* CIAT 4026 cuando se trata con 2.68 nmol (3 μg) del compuesto. Es importante mencionar que *Burkholderia glumae* CIAT 4026 es un fitopatógeno altamente virulento y con movilidad, por lo que resultan muy interesantes los resultados con 3.1.

Esta cepa PNM115 (*Paenibacillus* sp) debe ser considerado para el desarrollo de un biocontrolador, basado en su actividad IQS, con aplicación en el campo agrícola. Estos estudios se harán con el IBUN.

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1 Generalidades

Los análisis por RMN se hicieron en MeOD- d_4 (grado de deuteración 99.8%, Merck) cloroformo $CDCl_3$ (grado de deuteración 99.5 %, Merck) y dimetilsulfóxido DMSO- d_6 (grado de deuteración 99.8%, Merck) y piridina- D_5 (grado de deuteración 99.8 %, Merck). Los espectros de RMN 1H , ^{13}C y 2D fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker AscendTM600 (600 MHz para 1H y 100 MHz para ^{13}C), y Bruker Avance 400. Las señales residuales de los solventes fueron usadas como estándar interno de calibración.

Las extracciones se hicieron con acetato de etilo (Honeywell Burdick & Jackson), y butanol (Emsure® de Merck), el fraccionamiento se realizó con un cartucho Starta C18 (500 mg) y un gradiente MeOH- H_2O (grado analítico).

Los análisis por UPLC se hicieron en un equipo Ultimate 3000 acoplado a un detector ELSD (SEDEX 85) y a un detector DAD. Para ello se empleó una columna C8 (4.6 x 100 mm, Kinetex 2.6 μm) utilizando como fase móvil ACN/ H_2O (flujo: 0.5 ml min^{-1}) en gradiente: Se inició con 5% de ACN hasta alcanzar el 50 % durante 15 min; al min 20 se llega al 100 % de ACN que se mantiene durante 5 min, en el min 25 desciende el porcentaje hasta 5 % de ACN durante 5 min y se mantiene en 5% de ACN durante 2 min más. Así, el tiempo total de corrida fue de 32 min. Para la preparación de las muestras se disolvieron 2 mg de ellas en 1 mL de MeOH, la solución se filtró a través de una membrana de 0.22 micras. Se inyectaron 20 μL de la solución.

Los análisis de CLAE/EM se llevaron a cabo en un equipo Agilent Technologies 1260, acoplado a un espectrómetro de masas marca Agilent Technologies 6520 Hybrid MS Q-TOF, usando ionización por electrospray (ESI) en modo positivo. Se usó una columna C-18 Zorbax Extend (2.1 mm x 50 mm; 1.8 μm ; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a 30°C. La fase móvil fue metanol/agua (9:1), con 10 mM de formiato de amonio, con un flujo de 0.2 mL/min.

Los análisis de densidad óptica se hicieron en un equipo de Elisa marca Accu Reader⁺ M965mate. Para la preparación de los inóculos de los biosensores y la fermentación de las cepas seleccionadas se usó un Orbital Shaker HD-3000 DIMAR termostato a (130 rpm). Para la conservación de las cepas se usó un ultracongelador Panasonic MDF-U56UVC-

PA; se usó una centrífuga HERMLE Z206A; una estufa Mermet; para la preparación de las muestras se usó una cabina de flujo laminar ESCO, un vórtex BOECO V1Plus.

3.4.2 Aislamiento de cepas bacterianas

Las bacterias usadas en este ensayo son las obtenidas en el capítulo 2. Para llevar a cabo esta investigación, se seleccionaron a las bacterias que producían la inhibición de *quorum sensing* usando el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 y que por sus características morfológicas no se encontraban dentro del *phylum* Actinobacteria, pues éstas ya habían sido estudiadas en el capítulo anterior. A los ocho aislamientos que fueron seleccionados por su actividad inhibitoria de *quorum sensing*, que proceden del cepario descrito en el capítulo 2 numeral 2.2.1 y se les caracterizó tanto bioquímica como molecularmente.

3.4.3 Caracterización Bioquímica e identificación taxonómica de las cepas bacterianas de origen marino

Las colonias individuales de las cepas se caracterizaron por su morfología de colonias en agar LB (Luria Bertani), Muller Hinton y ACA (agar caseína almidón). En la Tabla 3.1. se resume esta información. Cada una de ellas se caracterizaron bioquímicamente por su actividad de la catalasa y la oxidasa (Bactident® Oxidasa MERKC)⁶¹⁻⁶³. Otras características bioquímicas como la fermentación u oxidación de azúcares (glucosa, manitol, inositol, sorbitol, ramnosa, sacarosa, melibiosa, amígdalina y arabinosa); actividad enzimática (β -galactosidasa, arginina-dihidrolasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa, ureasa, triptófano-desaminasa, gelatinasa); utilización de citrato; producción de sulfuro, indol y acetoin; y la reducción de nitratos se obtuvieron mediante el kit API 20E (bioMérieux Inc., Durham, NC)^{61,64}, Anexo Tabla 3.1.

Para la identificación taxonómica de las cepas seleccionadas, se realizó la amplificación por PCR y la secuenciación del locus 16S ARNr completo utilizando *primers* universales 27F y 1492R, como se describió anteriormente⁶⁵. Los datos fueron alineados usando el programa BLAST. Las alineaciones de secuencia se analizaron usando máxima parsimonia y se compararon usando la base de datos EzTaxon⁶⁶. El árbol filogenético óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.26619872. El porcentaje de árboles replicados en el que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 réplicas) se muestran junto a las ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de

rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. El análisis involucró 15 secuencias de nucleótidos. Todas las secuencias de nucleótidos de DNAr 16S rRNA para las 8 cepas se depositaron en GenBank / EMBL / DDBJ, bajo los números de acceso KX641378 a KX641401. Toda la información anterior se presenta en la Tabla 3.3.

3.4.4 Cultivos, obtención de extractos de bacterias marinas y selección de aislamiento.

Las ocho cepas activas se cultivaron por triplicado en 100 mL de caldo de tripticasa soya (TSB Bacto™ BD), usando erlenmeyers de 500 mL, agitando a 130 rpm, a 25° C durante 5 días. Los cultivos fueron entonces centrifugados y filtrados por membranas de 0.22 µm, y los sobrenadantes se extrajeron por tres veces con acetato de etilo (AcOEt). Los extractos orgánicos se concentraron a presión reducida y los acuosos se separaron con BuOH obteniéndose dos fracciones la butanólica (WB) y un residuo acuoso (WW), a los que se les realizó ensayos de bioactividad (inhibición del *quorum sensing*).

El medio de cultivo LB se preparó usando agar (14 g) (Sharlau), Levadura (5 g) (Oxoid), Triptona (10 g) (Sharlau) y NaCl R.A (10 g) (Honeywell) por cada litro de agua. Para controlar la temperatura de los cultivos en agar y bioensayos se utilizó una incubadora MEMMERT a 28 °C. Para la esterilización del material y medios se usó una autoclave AllAmerican 75X de 32 L a 20 psi y 220°C durante 20 minutos. Los inóculos, y todos los procedimientos relacionados con la exposición de las cepas bacterianas al ambiente, fueron realizados en cabina de flujo laminar Labconco Tipo II y una cabina de flujo laminar ESCO AVE-402.

Los cultivos en líquido se agitaron en el Orbital Shaker HD-3000 DIMAQ a temperatura ambiente (~22°C) a 100 rpm. La biomasa se separó por centrifugación a 6000 rpm en una centrifuga T52 MLW durante 20 minutos.

Los ensayos de actividad biológica se llevaron a cabo siguiendo dos aproximaciones, primero se evaluaron los aislamientos en enfrentamiento *in vivo* contra el biosensor de QS, tal y como se describió en el capítulo anterior (literal 2.4.5A). Luego los aislamientos que resultaron activos se cultivaron y extrajeron con acetato de etilo para obtener los extractos orgánicos y acuosos que se volvieron a ensayar contra *Chromobacterium violaceum*. En caso de que la actividad IQS se encontró en la fase acuosa, esta fracción se sometió a

partición con butanol para obtener la fracción acuosa residual WW y la fracción butanólica WB. Lo anterior con el fin de establecer si la actividad observada *in vivo* se debía a compuestos orgánicos y se mantenía cuando se realizaba la extracción. El procedimiento se describe en el capítulo 2 literal 2.4.6

3.4.5 Estudio químico del aislamiento *Paenibacillus* sp PNM115

a) Cultivo en medio TSB

La cepa identificada por métodos moleculares como *Paenibacillus* sp (PNM115), fue cultivada en volúmenes de 1 litro de caldo de tripticasa soya (TSB Bacto™ BD), usando erlenmeyers de 5000 mL, agitando a 130 rpm, a 25° C por 5 días. Esto se repitió 15 veces para obtener 15 litros de cultivo. Luego de este tiempo, el cultivo se centrifugó a 5000 rpm por 20 minutos. El sobrenadante fue extraído con acetato de etilo, obteniendo un extracto orgánico (FO) y un acuoso. Al extracto acuoso se le hizo una separación líquido-líquido con butanol. A estas tres fracciones (Orgánica TSB-FO, acuosa TSB-WW y butanólica TSB-WB) se les hicieron ensayos de actividad frente a *C. violaceum* se determinó que la fracción butanólica TSB-WB (4.5 g) era la que presentaba la actividad.

La fracción TSB-WB fue separada usando un cartucho C18, con un gradiente H₂O/MeOH (desde 100% H₂O hasta 100 % metanol) obteniendo 8 fracciones (TSB-FBI a TSB-FBVIII), a las cuales se les realizó ensayos de actividad contra *C. violaceum* y se observa que la fracción TSB-FBII (564 mg), eluída con 40% de metanol, es la única activa. Esta fracción TSB-FBII fue separada nuevamente en el cartucho C18 con un gradiente H₂O/MeOH; desde 100% H₂O hasta 100% metanol, obteniéndose nueve fracciones (TSB-FBII.1 a TSB-FBII.9). Todas las fracciones fueron evaluadas como IQS, siendo la fracción TSB-FBII.9 (11mg) eluída con 70% de metanol la que mejor actividad mostró frente al biosensor. Esta fracción fue analizada por RMN y CLAE/EM.

b) Cultivo en medio LB

Se cultivó la cepa PNM115 en cajas de Petri con agar LB por la técnica de siembra masiva y se dejaron en incubación a 37 °C durante 2 días. Al cabo de este tiempo se inocularon 5 plugs en 100 mL de LB en un Erlenmeyer de 500 mL y se dejó en agitación a temperatura ambiente por dos días, entonces se pasó este cultivo (aprox. 100 mL) a un recipiente de 5 litros para completar 1 L de medio LB. Finalmente se cultivó la cepa en las mismas condiciones anteriores durante 5 días.

Luego de culminar el tiempo de cultivo, éste se centrifugó durante 20 minutos y el sobrenadante obtenido se filtró, el pelet se desechó. El sobrenadante (920 mL) se extrajo por tres veces con AcOEt, en una proporción de medio acuoso-AcOEt de 3:1. Se separaron las fases y se concentró la fase orgánica (LB-FO) a presión reducida. Por otra parte, la fase acuosa (870 mL) se dividió en dos: el primer volumen (440 mL) se pasó a través de 12 g de Diaion HP-20® recolectándose el medio acuoso no retenido (429 mL) (LB-FNR), y eluyéndose las sustancias adheridas a la resina con MeOH (120 mL), para luego concentrar esta fase metanólica obteniéndose 0.6422 g (LB-FR). El segundo volumen (430 mL) se extrajo tres veces con BuOH en una proporción medio acuoso-BuOH de 3:1. En esta extracción con butanol se obtuvieron la fase acuosa residual (LB-WW) y la fase butanólica (LB-WB) que fue concentrada a presión reducida obteniéndose 1.067 g. Todos los extractos orgánicos y fases acuosas obtenidas fueron conservadas en refrigeración para los posteriores ensayos de actividad. Después de evaluar la actividad y el rendimiento se decidió continuar con la metodología de extracción por el método de resina.

Los procedimientos de cultivo y extracción por el método de la resina HP-20 se realizaron posteriormente en una escala mayor donde se cultivó la cepa PNM115 en 15 L de medio líquido LB para obtener 3.8 g de extracto retenido y eluido con metanol (LB-FR).

Los procedimientos anteriormente descritos fueron realizados también para un blanco de medio, que corresponde al medio de cultivo LB sin inoculación. Obteniendo las mismas fracciones descritas anteriormente y que corresponden a LB-FO-B, LB-FNR-B, LB-FR-B, LB-WB-B y LN-WW-B. Para los cuales también se realizaron los ensayos de actividad con los parámetros anteriormente descritos.

Con el fin de determinar cuál es la mejor metodología de fraccionamiento del extracto activo (LB-FR) se hicieron ensayos con fases polares (sílice) y reversas (Cartuchos de RP-18):

La fracción retenida en HP-20 (LB-FR) (0,550 g) fue disuelta en 1 mL de cloroformo/metanol 95:5 y fraccionada sobre sílica gel (columna 210 mm x 25 mm), utilizando como sistemas de elución CHCl_3 /MeOH en las siguientes proporciones v/v 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 50:50, 30:70; 20:80 y 10:90. Para todas las fracciones se hizo el ensayo de inhibición del QS con *C. violaceum*

La fracción retenida por la resina diaion HP-20 (LB-FR) (200 mg) fue separada sobre un cartucho RP18 (Sigma-Aldrich Supelclean TM LC- 18 SPE) de 1 g, utilizando 12 mL de

cada una de las siguientes mezclas de H₂O/MeOH: 80:20, 50:50, 20:80 y 0:100. Las muestras obtenidas de cada sistema fueron concentradas y evaluadas mediante ensayos de actividad.

Este procedimiento se realizó, pero en una mayor escala donde se fraccionaron 1.5 g de LB-FR disueltos en 2 mL de MeOH (dos veces) en una columna abierta de RP-18 (210 mm x 25 mm) utilizando 210 mL de cada una de las siguientes fases móviles H₂O/MeOH: 80:20, 50:50, 20:80, 0:100. De esta manera se obtuvieron 15 fracciones (LB-FR-I hasta LB-FR-XV), y para cada una de ellas se realizaron los ensayos de actividad inhibitoria del QS.

Los procedimientos anteriormente descritos fueron realizados también para un blanco de medio, que corresponde al medio de cultivo TSB y LB sin inoculación de la cepa PNM115. Obteniendo las mismas fracciones descritas anteriormente, FO, WB y WW. Para los cuales también se realizaron los ensayos de actividad con los parámetros anteriormente descritos.

3.4.6 Ensayo de inhibición del *quorum sensing*

Los ensayos de inhibición de *quorum sensing* se realizaron usando extractos, fracciones y compuestos puros utilizando como biosensores las bacterias *Chromobacterium violaceum* ATCC31532 (gentilmente donado por la profesora Catalina Arévalo del departamento de Biología de la Universidad Nacional), *Burkholderia glumae* CIAT 4026 (gentilmente donado por la profesora Nubia Moreno IBUN) y *Burkholderia glumae* COK 71 (gentilmente donada por el profesor Kim J. de la University of Korea)⁶⁷, las cuales se caracterizan por presentar sistemas de *quorum sensing* que regulan la expresión de características fenotípicas como la producción de violaceina (*C. violaceum*), toxoflavina (*B. glumae*) y motilidad tipo *swimming* (*B. glumae*). Las composiciones de los medios usados se describen en los capítulos 2 y 3 de esta tesis.

A. Ensayo bioguiado para determinar fracciones activas

Para estos ensayos se utilizó como biosensor *C. violaceum* (ATCC 31532). Se realizaron ensayos de actividad para las fracciones orgánica, acuosa y butanólica obtenidos a partir de los cultivos de la bacteria. La actividad de la fracción orgánica se evaluó a 500 µg, mediante la técnica de difusión en disco usando discos de papel de 6 mm de diámetro impregnado de la sustancia a evaluar. Para las fracciones acuosa y butanólica se realizaron ensayos de difusión en pozo, probando una concentración de 500 µg/mL.

Para los bioensayos de inhibición de QS se prepara un pre inóculo con el biosensor en 5 mL de LB líquido y se lo deja crecer una noche a una temperatura de 25°C hasta alcanzar una DO_{600nm} 0.5. Se prepararon cajas de Petri con 25 mL de agar LB inoculadas con 100 μ L de una solución del biosensor *C. violaceum*, posteriormente se dispusieron los discos de papel impregnados con la sustancia o en los pozos previamente hechos. Como control positivo se usó para-hidroxibenzaldehído (200 μ g por disco y por pozo) y como control negativo metanol al 5% (100 μ L por pozo). El ensayo para cada extracto se realizó por triplicado, y se utilizó como criterio cualitativo de actividad inhibitoria de QS la presencia de un halo blanco que se catalogó como positivo para la inhibición de QS, sin que se observe muerte celular. Las lecturas de los ensayos se hicieron después de incubar durante 2 días a 28°C.

B. Ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC_{QS}) para QS

La concentración mínima inhibitoria (MIC_{QS}) corresponde a la concentración mínima en la que el compuesto identificado como QQ produce la inhibición del QS en el biosensor. Se determinó haciendo uso de cajas de 96 pozos; cada pozo fue llenado con cantidades variables de LB líquido hasta lograr el volumen de 300 μ L y mantener la concentración requerida en cada pozo e inoculados con 10 μ L de una solución de *C. violaceum* (DO_{600nm} 0.5). Adicionalmente, los pozos se suplementaron con el compuesto a ensayar a diferentes concentraciones desde 300 μ g/mL hasta 25 μ g/mL. Se usaron como blancos el medio de cultivo y el medio inoculado con la bacteria con 10 μ L y como control negativo se usó metanol 10% que fue el solvente usado para solubilizar los compuestos. De esta forma se determinó la MIC_{QS} para el compuesto **3.1**.

Con el objetivo de confirmar que no se generara un efecto negativo sobre el crecimiento del biosensor se determinó la curva de crecimiento a diferentes concentraciones del compuesto ensayado, con base al dato obtenido en el MIC_{QS} . Los resultados obtenidos fueron comparados contra un control negativo el cual fue suplementado con MeOH al 10% y como blanco se mantiene la bacteria crecida sin añadir ningún compuesto. Las diferencias significativas entre los tratamientos se determinaron mediante ANOVA usando un post test de Dunnett ($p < 0.01$).

C. Ensayo de inhibición de *swimming* en *Burkholderia glumae*

Para determinar si el compuesto es capaz de inhibir la motilidad de la bacteria se realizaron diferentes ensayos, siguiendo la metodología propuesta por Karki 2010⁶⁰ con ligeras modificaciones. A saber, se dejó crecer la bacteria durante la noche a 37 °C en un agitador (130 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica DO₆₀₀ 0.7. Se prepararon cajas Petri con agar KB solidificado con 0.3% de agar (Composición por cada litro de agua: Peptona 20 g; Cloruro de magnesio 1.5 g sulfato de potasio 1.5 g, Agar, 3 g y glicerol 10 mL) y se dejaron solidificar durante 15 minutos en la cabina de flujo laminar. Posteriormente, en el centro del agar se deja caer haciendo una pequeña incisión en el agar 5 µL del inóculo de la bacteria *Burkholderia glumae* CIAT 4026 (D.O.₆₀₀ 0.7), que habían sido suplementados con 0.125 µg, 0.25 µg y 0.5 µg del compuesto (3.1) para el ensayo, como control negativo se usó a la bacteria a la que se le adicionó 300 µL de MeOH al 10% y en otra caja se creció la bacteria en ausencia del compuesto (blanco). La actividad se determinó comparando el diámetro del movimiento que presenta en la cepa *wild type*. Si la bacteria no se movía, o lo hacía significativamente menos, el compuesto se clasificaba como inhibidor del QS, para este fenotipo.

D. Ensayo con catafilos de cebolla

Los catafilos de cebolla se cortaron con un cuchillo estéril en pedazos con un tamaño aproximado de 2 X 3 cm. En cajas Petri estériles se colocan de 2 a 3 catafilos a los que se les hace una pequeña incisión con una punta estéril de 10 µL, en el orificio que se forma se coloca 3 µL de una solución de la bacteria crecida durante la noche con una DO₆₀₀ 0.5, y adicionada con 2.6 nmol (3 µg) del compuesto que vamos a probar, en este caso. Las cajas con el inóculo se tapan y se colocan en una cámara húmeda preparada en una caja de plástico estéril y cubierta con papel toalla húmedo. Esta se cierra herméticamente usando vinipel, evitando realizar movimientos bruscos que modifiquen el ensayo. Se incubó por 36 horas a 30°C en una incubadora. El grado de virulencia se determinó midiendo el área macerada en el catafilo.

3.5 Bibliografía

- (1) Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* 2016, 33 (3), 382–431.
- (2) Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. Marine Natural Products.

- Nat. Prod. Rep.* 2017, 34 (3), 235–294.
- (3) Grady, E. N.; Macdonald, J.; Liu, L.; Richman, A.; Yuan, Z. Current Knowledge and A Review Introduction to *Paenibacillus*. *Microb. Cell Fact.* 2016, 15.
 - (4) Hao, Z.; Van Tuinen, D.; Wipf, D.; Fayolle, L.; Chataignier, O.; Li, X.; Chen, B.; Gianinazzi, S.; Gianinazzi-Pearson, V.; Adrian, M. Biocontrol of Grapevine Aerial and Root Pathogens by *Paenibacillus* Sp. Strain B2 and Paenimycin *in Vitro* and *in Planta*. *Biol. Control* 2017, 109, 42–50.
 - (5) Kalinovskaya, N. I.; Romanenko, L. A.; Kalinovskiy, A. I.; Dmitrenok, P. S.; Dyshlovoy, S. A. A New Antimicrobial and Anticancer Peptide Producing by the Marine Deep Sediment strain “*Paenibacillus Profundus*” sp. Nov. SI 79. *Nat. Prod. Commun.* 2013, 8 (3), 381–384.
 - (6) Alasil, S. M.; Omar, R.; Ismail, S.; Yusof, M. Y. Antibiofilm Activity, Compound Characterization, and Acute Toxicity of Extract from a Novel Bacterial Species of *Paenibacillus*. *Int. J. Microbiol.* 2014, 2014, 649420.
 - (7) Olmedo, R. S.; Bustamante, L. C.; Huilifir, C. C.; Castillo, N. A. Cepa Bacteriana *Paenibacillus Polymyxa* schc33, Y Su Uso Para Combatir Hongos Fitopatogenicos En Frutas, Hortalizas O Plantas. WO 2016019480 A1, 2015.
 - (8) Singh, P. P.; Shin, Y. C.; Park, C. S.; Chung, Y. R. Biological Control of *Fusarium* Wilt of Cucumber by Chitinolytic Bacteria. *Phytopathology* 1999, 89, 92–99.
 - (9) Compant, S.; Duffy, B.; Nowak, J.; Clément, C.; Barka, E. A. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, 71 (9), 4951–4959.
 - (10) Newman, K. L.; Chatterjee, S.; Ho, K. A.; Lindow, S. E. Virulence of Plant Pathogenic Bacteria Attenuated by Degradation of Fatty Acid Cell-to-Cell Signaling Factors. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 2008, 21 (3), 326–334.
 - (11) LaSarre, B.; Federle, M. J. Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2013, 77 (1), 73–111.
 - (12) Shaheen, M.; Li, J.; Ross, A. C.; Vederas, J. C.; Jensen, S. E. *Paenibacillus Polymyxa* PKB1 Produces Variants of Polymyxin B-Type Antibiotics. *Chem. Biol.* 2011, 18, 1640–1648.
 - (13) Alkotaini, B.; Anuar, N.; Amir, A.; Kadhum, H.; Asmahani, A.; Abdu, S. Detection of Secreted Antimicrobial Peptides Isolated from Cell-Free Culture Supernatant of *Paenibacillus Alvei* AN5. 2013, 40, 571–579.
 - (14) Naing, K. W.; Lee, Y. S.; Nguyen, X. H.; Jeong, M. H.; Anees, M.; Oh, B. S.; Cho, J. Y.; Moon, J. H.; Kim, K. Y. Isolation and Characterization of an Antimicrobial Lipopeptide Produced by *Paenibacillus Ehimensis* MA2012. *J. Basic Microbiol.* 2015, 55 (7), 857–868.
 - (15) He, Z.; Kisla, D.; Zhang, L.; Yuan, C.; Green-Church, K. B.; Yousef, A. E. Isolation and Identification of a *Paenibacillus Polymyxa* Strain That Coproduces a Novel Lantibiotic and Polymyxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73 (1), 168–178.
 - (16) Huang, E.; Yousef, A. E. Biosynthesis of Paenibacillin, a Lantibiotic with N-Terminal Acetylation, by *Paenibacillus Polymyxa*. *Microbiol. Res.* 2015, 181, 15–21.
 - (17) Alasil, S. M.; Omar, R.; Ismail, S.; Yusof, M. Y. Inhibition of Quorum Sensing-Controlled Virulence Factors and Biofilm Formation in *Pseudomonas Aeruginosa* by Culture Extract from Novel Bacterial Species of *Paenibacillus* Using a Rat Model of Chronic Lung Infection. *Int. J. Bacteriol.* 2015, 2015, 1–16.
 - (18) Zamani, M.; Behboudi, K.; Ahmadzadeh, M. Quorum Quenching by *Bacillus Cereus* U92: A Double-Edged Sword in Biological Control of Plant Diseases. *Bioctrl. Sci. Tech.* 2013, 23 (5), 555–573.
 - (19) LANE, J., D. 16S/23S rRNA Sequencing. *Nucleic acid Tech. Bact. Syst.* 1991.

- (20) Saitou, N.; Nei, M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987, 4 (4), 406–425.
- (21) Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016, 33 (7), 1870–1874.
- (22) Case, R. J.; Boucher, Y.; Dahllöf, I.; Holmström, C.; Doolittle, W. F.; Kjelleberg, S. Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73 (1), 278–288.
- (23) Koul, S.; Vipin, C.; Kalia. Multiplicity of Quorum Quenching Enzymes: A Potential Mechanism to Limit Quorum Sensing Bacterial Population. *Indian J. Microbiol.* 2008, 57, 100–108.
- (24) Gómez-Garzón, C.; Dussán, J. Evidence-Based Validation of Quorum Quenching from *Lysinibacillus Sphaericus* and *Geobacillus* Sp. in Bioremediation of Oil Sludge. *Can. J. Microbiol.* 2017, 63 (1), 74–82.
- (25) Ma, A.; Lv, D.; Zhuang, X.; Zhuang, G. Quorum Quenching in Culturable Phyllosphere Bacteria from Tobacco. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14 (7), 14607–14619.
- (26) Kalia, V. C. *Quorum Sensing vs Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*; Kalia, V. C., Ed.; Springer New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London: New Delhi, 2015.
- (27) Johnston-Monje, D.; Raizada, M. N. *Plant and Endophyte Relationships: Nutrient Management*, Second Edi.; Elsevier B.V., 2011; Vol. 1.
- (28) Natrah, F. M. I.; Defoirdt, T.; Sorgeloos, P.; Bossier, P. Disruption of Bacterial Cell-to-Cell Communication by Marine Organisms and Its Relevance to Aquaculture. *Mar. Biotechnol.* 2011, 13 (2), 109–126.
- (29) Abdelmohsen, U. R.; Yang, C.; Horn, H.; Hajjar, D.; Ravasi, T.; Hentschel, U. Actinomycetes from Red Sea Sponges: Sources for Chemical and Phylogenetic Diversity. *Mar. Drugs* 2014, 12 (5), 2771–2789.
- (30) Dickinson, B. *INSTRUCCIONES DE USO – MEDIOS EN FRASCOS LISTOS PARA USAR BD Tryptic Soy Broth (TSB)*; 2014.
- (31) Sully, E. K.; Malachowa, N.; Elmore, B. O.; Alexander, S. M.; Femling, J. K.; Gray, B. M.; DeLeo, F. R.; Otto, M.; Cheung, A. L.; Edwards, B. S.; et al. Selective Chemical Inhibition of *Agr* Quorum Sensing in *Staphylococcus Aureus* Promotes Host Defense with Minimal Impact on Resistance. *PLoS Pathog.* 2014, 10 (6), e1004174.
- (32) Granum, P. E. Spotlight on *Bacillus Cereus* and Its Food Poisoning Toxins. *FEMS Microbiol. Lett.* 2017, 364 (10).
- (33) Missiakas, D.; Schneewind, O. Assembly and Function of the *Bacillus Anthracis* S-Layer. *Annu. Rev. Microbiol.* 2017, 71 (1), 79–98.
- (34) Popov, S. G.; Villasmil, R.; Bernardi, J.; Grene, E.; Cardwell, J.; Wu, A.; Alibek, D.; Bailey, C.; Alibek, K. Lethal Toxin of *Bacillus Anthracis* Causes Apoptosis of Macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 293 (1), 349–355.
- (35) Jacobsen, S. M.; Stickler, D. J.; Mobley, H. L. T.; Shirliff, M. E. Complicated Catheter-Associated Urinary Tract Infections due to *Escherichia Coli* and *Proteus Mirabilis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008, 21 (1), 26–59.
- (36) Armbruster, C. E.; Smith, S. N.; Johnson, A. O.; DeOrnellas, V.; Eaton, K. A.; Yep, A.; Mody, L.; Wu, W.; Mobley, H. L. T. The Pathogenic Potential of *Proteus Mirabilis* Is Enhanced by Other Uropathogens during Polymicrobial Urinary Tract Infection. *Infect. Immun.* 2017, 85 (2), e00808-16.
- (37) Ahmad, V.; Khan, M. S.; Mohammad, Q.; Jamal, S.; Alzohairy, M. A.; Karaawi, M. A. Al; Siddiqui, U. Antimicrobial Potential of Bacteriocins: In Therapy, Agriculture and Food Preservation. *Int. J.*

- Antimicrob. Agents* 2016, 49, 1–11.
- (38) Guo, Y.; Huang, E.; Yuan, C.; Zhang, L.; Yousef, A. E. Isolation of a *Paenibacillus* Sp. Strain and Structural Elucidation of Its Broad-Spectrum Lipopeptide Antibiotic. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012, 78 (9), 3156–3165.
- (39) Christiaen, S. E. A.; Matthijs, N.; Zhang, X. H.; Nelis, H. J.; Bossier, P.; Coenye, T. Bacteria That Inhibit Quorum Sensing Decrease Biofilm Formation and Virulence in *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *Pathog. Dis.* 2014, 70 (3), 271–279.
- (40) Ohno, O.; Ikeda, Y.; Sawa, R.; Igarashi, M.; Kinoshita, N.; Suzuki, Y.; Miyake, K.; Kazuo, U. Isolation of Heptadepsin, a Novel Bacterial Cyclic Depsipeptide That Inhibits Lipopolysaccharide Activity. *Chem. Biol.* 2004, 11, 1059–1070.
- (41) Martin, N. I.; Hu, H.; Moake, M. M.; Churey, J. J.; Whittal, R.; Worobo, R. W.; Vederas, J. C. Isolation, Structural Characterization, and Properties of Mattacin (Polymyxin M), a Cyclic Peptide Antibiotic Produced by *Paenibacillus Kobensis* M. *J. Biol. Chem.* 2003, 278 (15), 13124–13132.
- (42) Patiny, L.; Borel, A. ChemCalc: A Building Block for Tomorrow's Chemical Infrastructure. *J. Chem. Inf. Model.* 2013, 53 (5), 1223–1228.
- (43) The Fiehn laboratory at UC Davis. Mass Spectrometry Adduct Calculator <http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/metabolomics/ms-adduct-calculator> (accessed Feb 25, 2018).
- (44) Zhang, S.; Qiu, Y.; Kakule, T. B.; Lu, Z.; Xu, F.; Lamb, J. G.; Reilly, C. A.; Zheng, Y.; Sham, S. W. S.; Wang, W.; et al. Identification of Cyclic Depsipeptides and Their Dedicated Synthetase from *Hapsidospora Irregularis*. *J. Nat. Prod.* 2017, 80 (2), 363–370.
- (45) Prabhu, V.; Chatson, B.; Abrams, G.; King, J. ¹³C Chemical Shifts of 20 Free Amino Acids and Their Use in Detection by NMR of Free Amino Acids in Intact Plants of *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 1996, 149 (3–4), 246–250.
- (46) Naing, K. W.; Lee, Y. S.; Nguyen, X. H.; Jeong, M. H.; Anees, M.; Oh, B. S.; Cho, J. Y.; Moon, J. H.; Kim, K. Y. Isolation and Characterization of an Antimicrobial Lipopeptide Produced by *Paenibacillus Ehimensis* MA2012. *J. Basic Microbiol.* 2015, 55 (7), 857–868.
- (47) Aleti, G.; Sessitsch, A.; Brader, G. Genome Mining: Prediction of Lipopeptides and Polyketides from *Bacillus* and Related Firmicutes. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2015, 13, 192–203.
- (48) Müller, S.; Garcia-Gonzalez, E.; Mainz, A.; Hertlein, G.; Heid, N. C.; Mösker, E.; Van Den Elst, H.; Overkleeft, H. S.; Genersch, E.; Süßmuth, R. D. Paenilamicin: Structure and Biosynthesis of a Hybrid Nonribosomal Peptide/polyketide Antibiotic from the Bee Pathogen *Paenibacillus Larvae*. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2014, 53 (40), 10821–10825.
- (49) Quinn, G. A.; Maloy, A. P.; McClean, S.; Carney, B.; Slater, J. W. Lipopeptide Biosurfactants from *Paenibacillus Polymyxa* Inhibit Single and Mixed Species Biofilms Lipopeptide Biosurfactants from *Paenibacillus Polymyxa* Inhibit Single and Mixed Species Biofilms Lipopeptide Biosurfactants from *Paenibacillus Polymyxa* Inhib. *Biofouling* 2012, 28 (10), 1151–1166.
- (50) Cochrane, S. A.; Vederas, J. C. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* Spp.: A Gold Mine of Antibiotic Candidates. *Med. Res. Rev.* 2016, 36 (1), 4–31.
- (51) Deng, Y.; Lu, Z.; Bi, H.; Lu, F.; Zhang, C.; Bie, X. Isolation and Characterization of Peptide Antibiotics LI-F04 and Polymyxin B 6 Produced by *Paenibacillus Polymyxa* Strain JSa-9. *Peptides* 2011, 32 (9), 1917–1923.
- (52) Han, J.; Ma, Z.; Gao, P.; Lu, Z.; Liu, H.; Gao, L.; Lu, W.; Ju, X.; Lv, F. The Antibacterial Activity of LI-F Type Peptide against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) in Vitro and Inhibition of Infections in Murine Scalded Epidermis. 2018.
- (53) Bhushan, R.; Brückner, H. Use of Marfey's Reagent and Analogs for Chiral Amino Acid Analysis: Assessment and Applications to Natural Products and Biological Systems. *J. Chromatogr. B Anal.*

- Technol. Biomed. Life Sci.* 2011, 879 (29), 3148–3161.
- (54) Moon, K.; Lim, C.; Kim, S.; Oh, D. C. Facile Determination of the Absolute Configurations of ??-Hydroxy Acids by Chiral Derivatization Coupled with Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis. *J. Chromatogr. A* 2013, 1272, 141–144.
- (55) Niu, C.; Afre, S.; Gilbert, E. S. Subinhibitory Concentrations of Cinnamaldehyde Interfere with Quorum Sensing. *Lett. Appl. Microbiol.* 2006, 43 (5), 489–494.
- (56) Imhoff, J. F.; Labes, A.; Wiese, J. Bio-Mining the Microbial Treasures of the Ocean: New Natural Products. *Biotechnol. Adv.* 2011, 29 (5), 468–482.
- (57) Varga, Z. G.; Armada, A.; Cerca, P.; Amaral, L.; Mior Ahmad Subki, M. A. A.; Savka, M. A.; Szegedi, E.; Kawase, M.; Motohashi, N.; Molnár, J. Inhibition of Quorum Sensing and Efflux Pump System by Trifluoromethyl Ketone Proton Pump Inhibitors. *In Vivo* 2012, 26 (2), 277–285.
- (58) Kim, J.; Kang, Y.; Choi, O.; Jeong, Y.; Jeong, J.-E.; Lim, J. Y.; Kim, M.; Moon, J. S.; Suga, H.; Hwang, I. Regulation of Polar Flagellum Genes Is Mediated by Quorum Sensing and FlhDC in *Burkholderia Glumae*. *Mol. Microbiol.* 2007, 64 (1), 165–179.
- (59) Karki, H. S. Physiological, Biochemical and Molecular Characteristics Associated with Virulence of *Burkholderia Gumae*: The Major Causative Agent of Bacterial Panicle Blight of Rice, Louisiana State University, 2010.
- (60) Espinoza, L. E.; Baines, A. L. D.; Lowe, K. L. Biochemical, Nutrient and Inhibitory Characteristics of *Streptomyces* Cultured from Hypersaline Estuary, the Laguna Madre (Texas). *Online J. Biol. Sci. Publ. Online* 2013, 13 (131), 18–27.
- (61) Shirling, E. B.; Gottlieb, D. Cooperative Description of Type Cultures of *Streptomyces* III. Additional Species Descriptions from First and Second Studies. 1968, 18 (4), 279–392.
- (62) Goodfellow, M.; Goodfellow, Michael. *Actinobacteria Phyl. Nov.* In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2015; pp 1–2.
- (63) Tassadaq, H.; Aneela, R.; Shehzad, M.; Iftikhar, A.; Jafar, K.; Veronique, E. H.; Kil, Y. K.; Muhammad, A. Biochemical Characterization and Identification of Bacterial Strains Isolated from Drinking Water Sources of Kohat, Pakistan. *African J. Microbiol. Res.* 2013, 7 (16), 1579–1590.
- (64) Eden, P. A.; Schmidt, T. M.; Blakemore, R. P.; Pace, N. R. Phylogenetic Analysis of *Aquaspirillum Magnetotacticum* Using Polymerase Chain Reaction-Amplified 16S rRNA-Specific DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991, 41 (2), 324–325.
- (65) Chun, J.; Lee, J.-H.; Jung, Y.; Kim, M.; Kim, S.; Kim, B. K.; Lim, Y.-W. EzTaxon: A Web-Based Tool for the Identification of Prokaryotes Based on 16S Ribosomal RNA Gene Sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007, 57 (Pt 10), 2259–2261.
- (66) Choi, O.; Lee, Y.; Han, I.; Kim, H.; Goo, E.; Kim, J.; Hwang, I. A Simple and Sensitive Biosensor Strain for Detecting Toxoflavin Using Beta-Galactosidase Activity. *Biosens. Bioelectron.* 2013, 50, 256–261.

4. Capítulo 4: Compuestos volátiles de microorganismos marinos como inhibidores de Quorum sensing

Sandra J. Naranjo-Gaybor^{1,2}, Arley Pino,³ Leonardo Castellanos¹, Diana C. Sinuco¹

¹ Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Departamento de Química, Carrera 30 No. 45-03, Edificio de Química of 427, Bogotá, 111321, Colombia.

² Universidad de las Fuerzas Armadas. ESPE Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA II Av. General Rumiñahui s/n Sangolquí- Ecuador

³ Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Departamento de Farmacia, Carrera 30 No. 45-03, laboratorio 401-1, Bogotá, 111321, Colombia.

*dcsinucol@unal.edu.co

Este capítulo está basado en el artículo "" sometido a Vitae

Resumen

Las bacterias han desarrollado sistemas de comunicación intercelular para adaptarse a variaciones causadas por el estrés, la competencia y contrarrestar al hospedero. Entre ellos están los compuestos orgánicos volátiles (COVs), que hacen parte de su metabolismo secundario. La diversidad de los COVs representa una fuente valiosa de compuestos con actividades biológicas potencialmente aprovechables, entre las que se tienen la inhibición de *quorum sensing*, la antibacteriana y la antifúngica. No obstante, estos COVs no han sido suficientemente aprovechados por el hombre.

En los capítulos previos de esta tesis se habían identificado 16 bacterias capaces de inhibir el QS en ensayos *in vivo*. En este capítulo, estas mismas cepas se ensayaron en cuanto a la actividad inhibitoria de QS de sus COVs, mediante un ensayo con el espacio de cabeza de su cultivo y haciendo uso del biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Entre estas 16 bacterias solamente la bacteria gram-negativa PNM216 aislada de un alga marina (*Dictyota*) y aún no identificada, mostró actividad. PNM216 se cultivó en 6 medios de cultivo diferentes encontrando que los que producen COVs más activos corresponden a los medios TSA y LB. Los COVs producidos en el medio LB se analizaron mediante microextracción en fase sólida (SPME), utilizando una fibra de (DVB / CAR / PDMS), y se identificaron mediante análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM), usando como criterios los índices de retención y los espectros de masas. La producción de volátiles se evaluó a los 5, 10 y 15 días, encontrando diferencias marcadas en la concentración y producción de los COVs.

Se determinaron 29 compuestos (4.1-4.29), incluyendo aldehídos y cetonas como compuestos más abundantes, pero también se observó una producción de alcoholes, ácidos carboxílicos, ésteres, éteres, compuestos aromáticos, compuestos azufrados y nitrógenados. Algunos de los compuestos identificados se adquirieron o sintetizaron, así un total de 13 de estos compuestos fueron evaluados en fase de vapor como QQ contra *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. De este análisis se logró identificar que los compuestos activos son: la 5-metil-2-hexanona (4.3), que actuó a una concentración de 0.004nM; el cumeno (4.2) a una concentración de 0.003 nM; el *p*-cimeno (4.1) a una concentración de 0.003 nM y la 2-nonanona (4.4) a una concentración de 0.001nM. También se ensayaron como compuestos QQ 12 compuestos (4.30 a 4.42) relacionados

con los identificados en el espacio de cabeza del cultivo de PNM216, siendo activos el acetato de isoamilo (4.30) a 0.003 nM y el alcohol isoamílico (4.31) que actuó a 0.001 nM.

Para determinar si éstos no afectaban el crecimiento del biosensor se realizó un nuevo ensayo en cajas de 96 pozos y se logró determinar que el acetato de isoamilo y 5-metil-2-hexanona no afectaban el crecimiento del biosensor; mientras que los otros compuestos requieren mayor análisis.

4.1 Introducción

Los compuestos orgánicos volátiles microbianos (COVs) son producidos por una amplia gama de microorganismos que van desde bacterias hasta hongos¹. Durante mucho tiempo se ha reconocido que las bacterias emiten aromas característicos, por ejemplo, el olor típico del indol que produce *Escherichia coli*; el ácido butírico y la acetona de *Clostridium acetobutylicum*², o el olor característico a materia orgánica en descomposición, que es el resultado de la liberación de compuestos volátiles producto del metabolismo bacteriano². Se han caracterizado muchos compuestos activos olfativamente de origen microbiano de importancia en la industria de alimentos, como por ejemplo los componentes aromáticos del queso, chucrut, yogur, vino, etc.². Por otra parte, se sabe muy poco sobre las interacciones bacterianas con otros microorganismos a través de la producción de metabolitos pequeños, que permiten a las bacterias responder y adaptarse a los cambios ambientales. Sin embargo, se sabe que los compuestos volátiles bacterianos contribuyen a las interacciones entre reinos (plantas, hongos y nematodos). Estudios recientes han demostrado la influencia de los volátiles en el comportamiento de algunas bacterias³, razón por la cual en este capítulo buscaremos si estos afectan el QS de los fitopatógenos.

El estudio de volátiles producidos por bacterias es particularmente interesante por su alto potencial como promotores del crecimiento en plantas, así como controladores de diferente tipo de organismos como hongos y bacterias patógenas². Por ejemplo los volátiles producidos por bacterias del género *Streptomyces* tienen un gran potencial en la agricultura como biofumigantes contra bacterias⁴ y contra hongos generando crecimiento anormal en hongos como *Aspergillus giganteus*, *F. oxysporum*, *Penicillium viridicatum* y *Zygorhynchus vuilleminii*. No obstante, lo anterior, una gran cantidad de COVs bacterianos aún no se ha caracterizado, ni se ha identificado su potencial aplicación en la industria agrícola.

Otros estudios han revelado que las cepas de actinomicetos, mixobacterias, y cianobacterias son las de mayor interés como fuente de COVs bioactivos, lográndose identificar por eje terpeno ciclasas⁵ y varios monoterpenos biosintetizados por ellas. Autores como Stotzky y Schenck⁶ describieron bacterias como *Pseudomonas* spp. y *Streptomyces* spp. como productoras de etileno y cianuro de hidrógeno y a *Clostridium* spp. como emisores de disulfuro de dimetilo, diversos ácidos de cadena corta, el 2,3-butanodiol, el isopentanol y la acetoina². Las funciones ecológicas de estos COVs, así como su potencial biotecnológico, no ha sido suficientemente aprovechado y es un campo que se quiere explorar en esta tesis.

Existe mucha evidencia que indica que los COVs son amigables con el medio ambiente y podrían explotarse en la práctica agrícola como agentes que mejoran el crecimiento de las plantas, la productividad y la resistencia hacia las enfermedades⁷. Así, los COVs tienen potencial como compuestos alternativos a los pesticidas, fungicidas y bactericidas dañinos para el ambiente¹. Entre las actividades biológicas descritas para estos COVs se describe la inhibición del *quorum sensing*⁸ como una alternativa para reducir la virulencia del patógeno;^{9,10} no obstante, esta alternativa ha sido poco explorada, es el objetivo de este capítulo.

Cherin *et al.*⁸ estudiaron los COVs producidos por las cepas rizosféricas *Pseudomonas fluorescens* B-4117 y *Serratia plymuthica* IC1270 que pueden actuar como inhibidores de sistemas de QS mediados por AHLs. Estos sistemas son comunes en bacterias patógenas de los géneros *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Pectobacterium* y *Pseudomonas*⁸. De hecho, se observó, mediante análisis por LC-MS/MS, que el tratamiento de las bacterias *Pseudomonas chlororaphis* 449, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, y *P. fluorescens* 2-79 con los COVs emitidos por la cepa *Serratia plymuthica* IC1270 reduce la cantidad de AHL producidas por estas bacterias⁸. Así mismo, se suprimió el crecimiento del patógeno *Agrobacterium tumefaciens* responsable de la enfermedad de la corona y la agalla en plantas de tomate¹¹.

Así en el presente capítulo, se buscó establecer el potencial de los COV producidos por las bacterias marinas aisladas en los capítulos anteriores como fuente de compuestos con actividad inhibitoria del QS. En este capítulo se describe la selección de la cepa a estudiar,

así como el estudio de los COVs de la cepa con mayor actividad llamada PNM216 (IBUN 2177), que no ha sido identificada taxonómicamente, frente al biosensor de QS *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 y el fitopatógeno *Burkholderia glumae*.

4.2 Resultados y Discusión

De los capítulos anteriores se hace evidente que las bacterias pueden ser fuente de compuestos con actividad inhibitoria de la comunicación celular. La mayoría de los compuestos que se han identificado en la literatura con esta actividad son “fijos”, y muy poco se ha explorada a cerca de los volátiles. De hecho, son pocos los ejemplos en la bibliografía científica de compuestos volátiles producidos por bacterias con actividad IQS⁸. En este capítulo exploramos la posibilidad de que los aislamientos bacterianos estudiados sean fuente de compuestos con esta actividad.

4.2.1 Selección de bacterias y medios de cultivo

En el capítulo 2 y 3 se ensayaron las bacterias vivas frente al biosensor *Chromobacterium violaceum*, encontrando 16 cepas activas. Este ensayo de enfrentamiento directo no permite determinar si la actividad está dada por compuestos fijos, volátiles o enzimas. Razón por la cual se decidió hacer una valoración de los volátiles producidos por las bacterias (COVs) como inhibidores de QS frente a *C. violaceum*. Para ello se usaron cajas de Petri divididas en tres compartimentos, cultivando en un compartimento la bacteria a evaluar y en otro el biosensor sin que se diera contacto directo entre ellas, asegurando que solo se daba a través del espacio de cabeza mediado por volátiles. El tercer compartimento se mantuvo vacío. Al cabo de 24 horas se valoró la producción de violaceína por parte del biosensor y se comparó con el control. Esto se hizo para cada uno de los 17 aislamientos objeto de estudio, que corresponden a los 16 identificados como activos en los capítulos anteriores y una cepa control que no hubiese sido activa en los ensayos previos (tabla 4.1), que sería el control negativo (PNM182).

En la figura 4.1.b se observa que los COVs de PNM216 (IBUN 2177) disminuyeron la producción de violaceína, lo que podría significar que éstos tienen un efecto IQS. Los blancos de medio no mostraron efecto inhibitor. En las figuras 4.1a, c y d se observa que no hay disminución en la producción de violaceína por parte del biosensor, cuando se expone a los volátiles de PNM194, PNM100 y PNM92, respectivamente. Este resultado se presentó en la mayoría de los casos, incluyendo la bacteria no activa seleccionada (PNM182). Es importante mencionar que el biosensor *C. violaceum* crece rápidamente, por lo que en los ensayos con actinobacterias (PNM182, PNM149, PNM102N, PNM89.3, PNM194, PNM144a, PNM89.4, PNM46b), éstas se sembraron 5 días antes por ser de crecimiento más lento y en el caso de las otras bacterias (PNM 92, PNM217, PNM216, PNM115, PNM123, PNM10, PNM100, PNM82) la siembra se hizo al mismo tiempo que el biosensor.

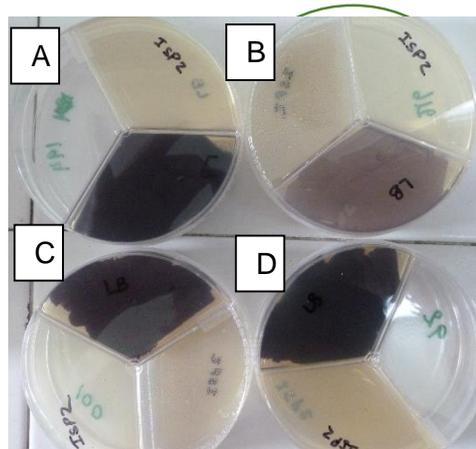


Figura 4.1 Foto del ensayo de valoración de la actividad inhibitoria de QS mediada por volátiles. A. Resultado con COVs de la bacteria PNM194. B. Resultado de inhibición con los COVs de PNM216. C. Resultado con COVs de la bacteria PNM100. D. Resultado con COVs de la bacteria PNM92.

Especies de bacterias pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos son capaces de emitir una variedad de compuestos volátiles, que comprenden derivados de ácidos grasos, terpenoides, compuestos aromáticos, nitrogenados y azufrados¹². En la literatura existen reportes de COVs del género *Streptomyces* activos

biológicamente, aunque en su mayoría tienen efecto frente a hongos². De igual forma para *Paenibacillus* existen reportes de que este género es un agente de biocontrol fúngico (farag dinamic) mediado por COVs¹³. Por esta razón se esperaba que las cepas de estos géneros acá estudiadas podrían producir COVs biológicamente activos y eventualmente con actividad IQS. No obstante, los resultados mostraron que ninguna de ellas fue activa y que la única cepa activa corresponde a una cepa no identificada (PNM216).

Tabla 4.1 Resultados de los ensayos con volátiles para las 16 cepas seleccionadas

Código de la cepa	Identificación taxonómica	Medio de cultivo	Actividad Inhibitoria del QS por volátiles
PNM10	<i>Lysinibacillus sp</i>	LB	NO
PNM100	<i>Bacillus cereus</i>	LB	NO
PNM115	<i>Paenibacillus sp</i>	LB	NO
PNM123	<i>Paenibacillus sp</i>	LB	NO
PNM217	<i>Bacillus anthracis</i>	LB	NO
PNM82	<i>Bacillus anthracis</i>	LB	NO
PNM92	<i>Proteus mirabilis</i>	LB	NO
PNM216	<i>no identificada</i>	LB	SI
PNM89.3	<i>Streptomyces sp.</i>	ISP2	NO
PNM102N	<i>Micromonospora sp.</i>	ISP2	NO
PNM184	<i>Streptomyces sp.</i>	ISP2	NO
PNM194	<i>Streptomyces sp.</i>	ISP2	NO
PNM149a	<i>Streptomyces sp.</i>	ISP2	NO
PNM46b	<i>Streptomyces sp.</i>	ISP2	NO
PNM161a	<i>Streptomyces sp.</i>	ISP2	NO
PNM161b	<i>Streptomyces sp.</i>	ISP2	NO
PNm182	<i>Streptomyces sp.</i>	ISP2	NO

La única bacteria que resultó activa en el ensayo anterior, PNM216 (IBUN 2177), fue aislada de un alga del género *Dictyota*. Esta bacteria se caracteriza por ser un bacilo gram positivo, que de acuerdo a las pruebas bioquímicas realizadas (capítulo 2), es capaz de fermentar lactosa y arabinosa (ONPG, ARA), desaminar el triptófano (TDA) y producir la enzima gelatinasa. Infortunadamente, la clasificación taxonómica de PNM 216 no se ha podido llevar a cabo por medio de técnicas moleculares, debido a la imposibilidad de amplificar y secuenciar el gen 16S ARNr. El uso de los primers 16S_A/ 16S_B, 27F/1492R y 518F/800R bajo condiciones de PCR estándar no produjo los amplímeros de aproximadamente 1600

pb esperados para este gen con el ADN obtenido de PNM 216. La evaluación de variaciones en la concentración del ADN usado en la PCR en rangos desde 20 ng hasta 100 ng y la modificación de la temperatura de anillamiento en rangos desde 50 a 62°C tampoco produjeron amplímeros. Para descartar la posibilidad de estar trabajando con un hongo o una levadura, se intentó amplificar la región ITS1 usando los primers ITS1/ITS4. Sin embargo, al igual que con los primers usados para el 16S, no se obtuvieron los amplímeros esperados (en este caso de 500 a 800 pb). En algunos microorganismos con características físicas¹⁴ que concuerdan con las bacterias, se han descrito variaciones en la arquitectura genómica que dificultan (y en ocasiones impiden) la amplificación de genes como el 16S por técnicas moleculares convencionales¹⁴. Este parece ser el caso de PNM216.

Teniendo en cuenta esta información y los resultados obtenidos a la fecha, se considera necesario realizar pruebas adicionales que permitan identificar este microorganismo tales como la amplificación y secuenciación de otros genes conservados como el gen de la subunidad β de la RNA polimerasa bacteriana (*rpoB*)¹⁵ o la secuenciación completa del genoma de PNM 216. En la actualidad se está tramitando el permiso para exportar esta cepa y secuencias el gen completo de esta cepa con el fin de caracterizarla.

Es bien conocido que la productividad metabólica de una bacteria depende en gran medida del medio de cultivo en el que ésta crezca¹⁶. Con base en lo anterior, se realizó el cultivo de esta cepa en diferentes medios con la finalidad de probar cuál era el medio más adecuado para la producción de volátiles. Así, PNM216 fue sembrada en los siguientes medios: TSA, medio nutritivo, medio marino, LBS, Kalinovskaya y LB. Para esto, se usaron las bases de dos cajas Petri de 10 mm de diámetro, en la primera se inoculó el biosensor y en la segunda se cultivó PNM216 en los medios antes referidos (figura 4.2). Estos dos cultivos se enfrentaron colocando el biosensor en la parte superior del sistema y a PNM216 en la parte inferior, evitando cualquier contacto entre ellas.

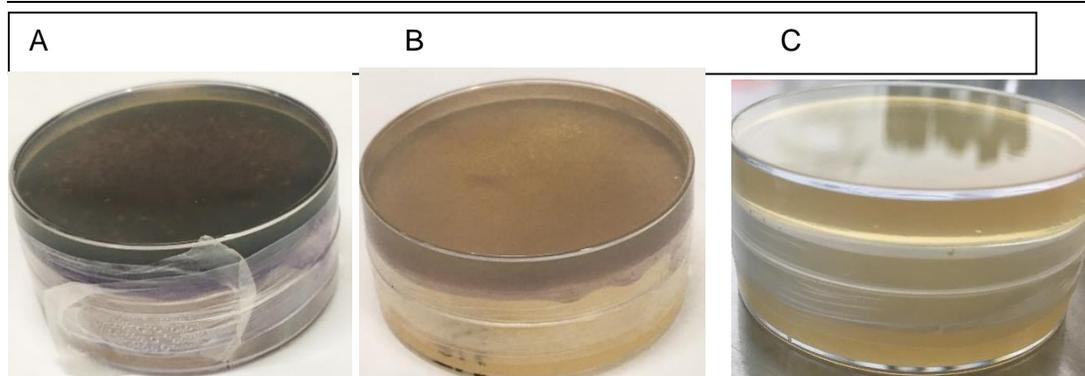
Amphimedon viridis

Figura 4.2 Fotos del ensayo de actividad IQS de la bacteria PNM216 sembrada en diferentes medios. A: Medio Kalinovskaya, no hay inhibición del QS, B: Medio Nutritivo, inhibición de QS. C: Medio LB fuerte inhibición de la producción de QS.

Los resultados de este ensayo de enfrentamiento a través de COVs se resumen en la tabla 4.2, lográndose establecer que la mejor actividad se obtuvo cuando se usaron los medios TSA y LB, y en menor medida en medio nutritivo (Figura 4.2). Con los medios Kalinovskaya, LBS y marino no se obtuvo ninguna actividad. Lo que podría deberse a que los medios con alto contenido de sales no favorecieron a esta bacteria para la producción de metabolitos secundarios como se observa lo que ocurre con los medios LBS, marino y Kalinosvskaya.

Tabla 4.2 Comparación de la actividad de los COVs producidos por PNM216 cultivada en diferentes medios frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC31532

MEDIO DE CULTIVO	Inhibición en la producción de violaceína
TSA	+++
LB	++
Nutritivo	+
Kalinovskaya	-
LBS	-
Marino	-

+ : inhibición del QS - : no hay inhibición del QS

4.2.2 Estudio del espacio de cabeza de PNM216

Con lo anterior se pudo establecer que PNM216 crecida en medios TSA y LB libera COVs con capacidad de inhibir la producción de violaceína, fenotipo controlado por QS en *C. violaceum*. Con el fin de identificar los compuestos responsables de esta actividad se buscó estudiar el espacio de cabeza de estos cultivos. Para ello, se usó una fibra de microextracción en fase sólida (SPME) de Divinilbenceno/Carboxen/ Polidimetilsiloxano

(DVB/CAR/PDMS) de Supelco®, seleccionada como la más apropiada para este tipo de estudio en un trabajo de grado realizado en el grupo de investigación¹⁷. Los compuestos retenidos se desorbieron térmicamente en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM).

Así, PNM216 se cultivó en fiolas de 500 mL, poniendo 100 mL de los dos medios seleccionados y realizando monitoreos a los 5, 10 y 15 días de cultivo en el medio LB y a las 24, 48, 72 y 96 horas en el medio TSB (equivalente a TSA pero líquido). Se decidió tomar las muestras a diferentes tiempos de inoculación, para poder conocer la diferencia de volátiles producidos por la bacteria a diferentes tiempos. Lamentablemente los datos tomados con medio TSB no se pudieron identificar por problemas con la columna. Al término de cada periodo se introdujo en la parte superior del erlemeyer la fibra durante 30 minutos (Figura 4.3a). Esto se hizo tanto para el cultivo con la bacteria como para el medio sin inocular. La comparación entre los cromatogramas obtenidos del medio LB inoculado y sin inocular a los 5 días se presentan en la figura 4.3b. Como se puede observar existen picos en común entre el espacio de cabeza del cultivo de la bacteria PNM216 y el medio usado (LB). Al igual que con el medio TSB (figura 4.13c): los compuestos presentes en el cultivo y ausentes en el medio serán los producidos por el metabolismo de la bacteria.

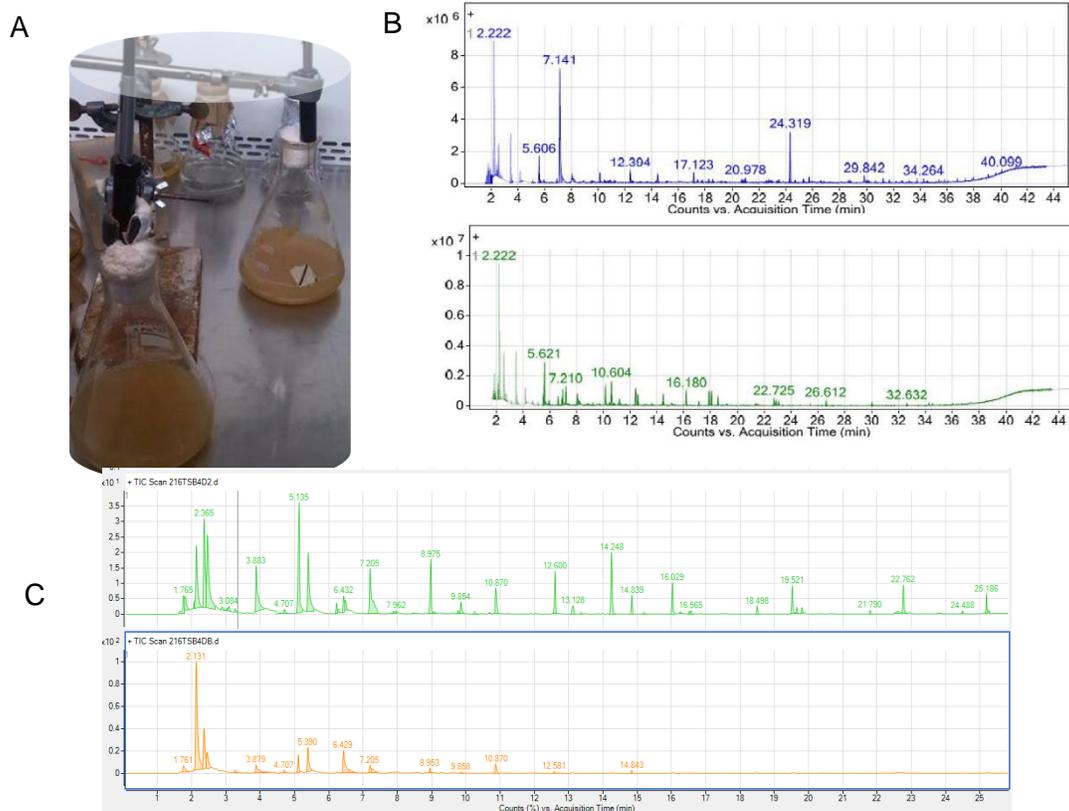


Figura 4.3 A) Montaje para la toma de la muestra del espacio de cabeza del inóculo del aislamiento PNM216 usando una fibra DVB/CAR/PDMS de Supelco®. B) Comparación de cromatogramas del espacio de cabeza del cultivo de PNM216 en medio LB y el blanco de medio a los 10 días C) Comparación de cromatogramas del espacio de cabeza del cultivo de PNM216 en medio TSB a los 10 días (en color anaranjado el control de medio sin inocular)

El paso siguiente fue la identificación de los compuestos producidos por la bacteria PNM216. Para esto, se realizó el análisis primero para descartar aquellos picos presentes tanto en el medio de cultivo sin inocular y en el inoculado, pues estos corresponden a picos presentes en el medio. Esta caracterización se pudo hacer con facilidad en el medio LB, mientras en el medio TSB se presentaron dificultades para obtener resultados confiables con la fibra, por lo que se debe explorar nuevas metodologías de muestreo que permitan la caracterización del espacio de cabeza activo que se obtiene por cultivo de PNM216 en medio TSB.

Amphimedon viridis

Para los picos producidos por PNM216 en medio LB se estudió su espectro de masas, la comparación de ellos con los reportados en las bases de datos y la comparación de los índices de Kovats calculados mediante el uso de una serie de parafinas de n-alcános C7-C16 con los reportados en la literatura¹⁸. La información de los compuestos identificados se resume en la tabla 4.3. La naturaleza química de los compuestos identificados fue variable, destacándose la presencia de compuestos carbonílicos, particularmente de metilcetonas, así como la presencia de alcoholes, compuestos azufrados, compuestos nitrogenados, terpenos, aromáticos, éteres y ácidos carboxílicos. Estos resultados son congruentes con los reportados en la literatura para microorganismos³.

Tabla 4.3 Compuestos identificados en el espacio de cabeza de PNM216 crecido en medio LB.

Pico	Compuesto	Tipo de compuesto	IK	Ik literatura	% Área relativa		
					5 días	10 días	15 días
4.1	<i>p</i> -cimeno	Terpeno	1085	-	0,7	ND	ND
4.2	Cumeno	Terpeno	997	-	ND	0,9	ND
4.3	5-metil-2-hexanona		809	804	ND	0,5	0,7
4.4	2-nonanona		1090	1091	3,6	1,5	ND
4.5	Isovalerato de metilo	Éster	757	-	0,3	ND	ND
4.6	3-metil-2-pentanona	Metilcetona	727	722	0,6	0,6	0,6
4.7	NI		821	-	ND	ND	0,2
4.8	tio-isobutanoato de metilo	Azufrado	824	-	0,5	ND	ND
4.9	2-heptanona	Metilcetona	864	869	1,7	0,9	0,8
4.10	2-butoxi-etanol		849	845	ND	ND	0,4
4.11	6-metil-2-heptanona	Metilcetona	895	-	2,1	3,9	5,1
4.12	Nonano	Alcano	874	900	0,3	ND	0,3
4.13	5-metil-2-heptanona	Metilcetona	953	-	2,4	4,6	7,2
4.14	3-metil-tio-butanoato de metilo	Azufrado	923	-	1,2	ND	ND
4.15	4-metil-2-pentanona	Metilcetona	736	733	0,3	0,8	0,5
4.16	Limoneno	Terpeno	1003	998	ND	1,9	ND
4.17	Lindano		1010	-	ND	0,4	ND
4.18	Acetato de 1-metilhexilo		1040	1034	0,3	ND	ND
4.19	NI		1044	-	ND	1,3	ND
4.20	Sulfuro de dimetilo	Azufrado	733	-	ND	0,5	1,3
4.21	2-decanona	Metilcetona	1160	1163	1,5	2,6	4,0
4.22	1-fenil-2-propanona	Metilcetona	1054	-	ND	ND	0,2
4.23	2-pentanona	Metilcetona	700	701	1,1	0,8	ND
4.24	Metilindano		1097	-	ND	0,3	ND
4.25	Undecano	Alcano	1098	1100	0,3	ND	ND
4.26	2-Undecanona	Metilcetona	1290	1291	2,1	0,5	0,4
4.27	2-Dodecanona	Metilcetona	1355	-	2,0	2,2	1,4
4.28	2-metil-undecanal	Aldehído	1362	1366	1,9	ND	ND
4.29	2-tetradecanona	Metilcetona	1435	-	ND	0,5	ND

NI No identificado ND No detectado

4.2.3 Ensayos con compuestos puros en fase de vapor

Con los procesos anteriores se lograron identificar 29 compuestos (4.1 a 4.29), de los cuales 11 fueron comprados. Adicionalmente, se decidieron evaluar 13 compuestos puros (4.30 a 4.42) relacionados las moléculas identificadas en PNM216 o previamente identificadas en los COVS de las bacterias. Los compuestos usados y los resultados se resumen en la tabla 4.4. La evaluación de la actividad inhibitoria del QS de estos compuestos se hizo en su fase de vapor, depositando los compuestos sobre papel de filtro en diferentes cantidades. Estos papeles se pusieron en el fondo de la caja de Petri, en la tapa se dispuso el cultivo del biosensor *C. violaceum*, tal y como se muestra en la figura 4.4A. El resultado positivo se evidenció como un halo de inhibición de color claro en el biosensor (figura 4.4C y 4.4D) y se comparó con el blanco, que corresponde al ensayo en ausencia de compuesto volátil Figura 4.4.C. Los resultados se resumen en la tabla 4.2, expresando en cm el diámetro promedio del halo de inhibición observado y la concentración a la que corresponde.

.

Tabla 4.4 Resumen de los resultados del ensayo de inhibición de *quorum sensing* con compuestos puros frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* en fase de vapor. Para los compuestos activos se da el diámetro del halo de inhibición observado

N°	NOMBRE	Identificado en PNM216	ACTIVO	Cantidades usadas							
				15 μl	μM	10 μl	μM	5 μl	μM	2.5 μl	μM
4.1	<i>p</i> -cimeno	Sí	Sí	NE		1.0	2.7	NA		NE	
4.2	Cumeno	Sí	Sí	NE		0.5	3,03	NA		NE	
4.3	5-metil-2-hexanona	Sí	Sí	1.2	1.2	NA					
4.4	2-Nonanona	Sí	Sí	NE		1.0	2.45	0.5	1,22	NE	
4.6	3-metil-2-pentanona	Sí	No								
4.9	2-heptanona	Sí	No								
4.10	2-butoxi-etanol	Sí	No								
4.15	4-metil-2-pentanona	Sí	No								
4.16	Limoneno	Sí	No								
4.21	2-Decanona	Sí	No								
4.26	2-Undecanona	Sí	No								
4.27	2-Dodecanona	Sí	No								
4.30	Acetato de isoamilo	No	Sí	NE		1.5	0.003	NA		NE	
4.31	Alcohol isoamilico	No	Sí	NE		NE		1.0	1.93	1.0	0.97
4.32	Etilenglicol	No	no								
4.33	Acetilacetona	No	no								
4.34	Acetato de isopropilo	No	no								
4.35	Linalool	No	no								
4.36	Hexanol	No	no								
4.37	1-Octanol	No	no								
4.38	1-Heptanol	No	no								
4.39	Propilenglicol	No	no								
4.40	2-Octanol	No	no								
4.41	Isobutil.metilcetona	No	no								
4.42	Acetato de n-butilo	No	no								

NA: no activo NE no ensayado Comp. 4.30 a 4.42 no hacen parte del metabolismo

Se pudo evidenciar que 4 compuestos de los determinados en la bacteria presentaron actividad inhibitoria del QS, siendo ellos los terpenos: *p*-cimeno y cumeno; y las metilcetonas: 5-metil-2-hexanona y 2-nonanona. Entre los otros compuestos ensayados

solamente el acetato de isoamilo y el alcohol isoamílico resultaron activo. En cuanto a los terpenos, vale la pena resaltar que el más activo fue el *p*-cimeno, que únicamente se detecta al quinto día de muestreo y no se presenta en los otros días analizados. Este terpeno ha sido identificado como parte del aceite esencial de *Eucalyptus globulus*, que es capaz de inhibir el QS en *C. violaceum*¹⁹; no obstante, no se ha identificado qué compuesto es el responsable de la actividad siendo esta la primera vez que se identifica para el *p*-cimeno. El cumeno ha sido aislado a partir de la trufa *Tuber magnatum*¹, no se ha reportado esta actividad biológica. Otros terpenos ensayados fueron el limoneno (4.16) y el linalool (4.35), que no mostraron ser activos en este ensayo, lo que sorprende porque muchos aceites esenciales que los contienen son capaces de inhibir QS²⁰. No obstante, es importante que los compuestos responsables de la actividad en estos aceites esenciales no se han individualizado.

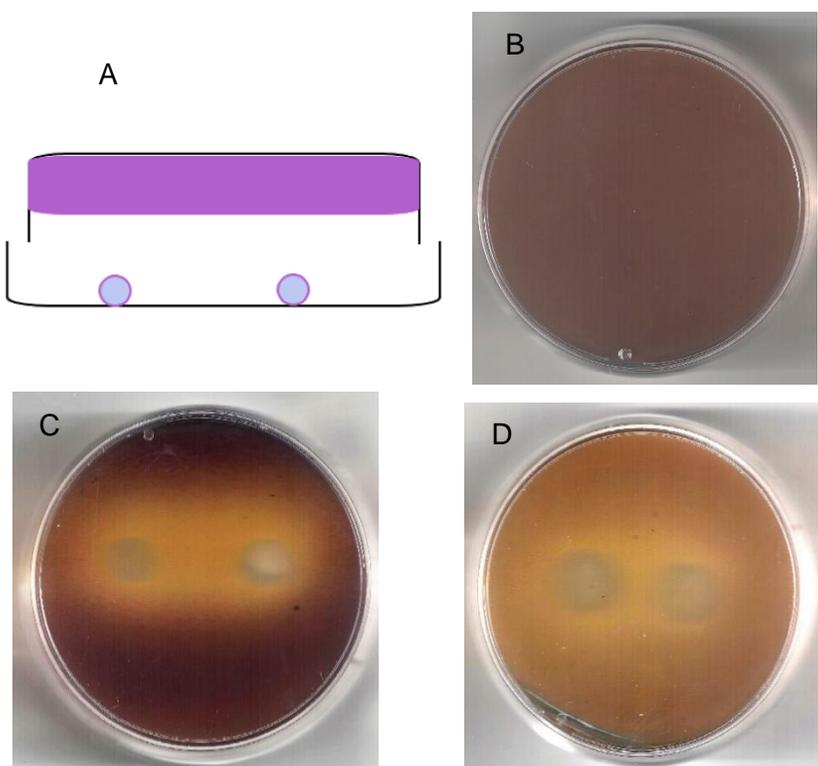


Figura 4.4 Ensayo de Inhibición del QS de *C. violaceum* ATCC 31532 con compuestos puros en fase de vapor. A: Esquema de ensayo realizado usando cajas Petri y papeles cargados con el compuesto a ensayar. B: Foto del control negativo, ausencia de compuesto. C: Foto del resultado usando 5-metil-2-hexanona (15 microlitros, 0.004nM). D: Foto del resultado usando 2-nonanona (10 microlitros)

De otro lado, dos de las metilcetonas ensayadas mostraron actividad inhibitoria del QS, mientras 8 de ellas no mostraron la actividad. No parece haber una relación entre la estructura y la actividad clara, pues hay cetonas metiladas y no metiladas activas, así como de cadena larga y corta. Las metilcetonas han sido descritas como componentes del COVs de algunas bacterias²¹ y existen estudios de su uso como IQS²². Estos compuestos se han descritos como partícipes de comunicación interespecies, así la 2-undecanona ha sido asociada a compuestos emitidos por rizobacterias y se clasifica como un promotor del crecimiento de plantas²³, dado que ésta fue identificada en PNM216 su uso como biocontrolador podría ser recomendable porque no solo controlaría al fitopatógeno sino que promovería el crecimiento de la planta. Así mismo, la 2-heptanona, 4-metil-2-pentanona y 2-octanona se han reportado promotores de relaciones inter bacterianas con rizobacterias patógenas, de igual forma compuestos azufrados como el sulfuro de dimetilo¹.

4.2.4 Ensayos de actividad biológica en solución

Los compuestos *p*-cimeno (4.1), cumeno (4.2), 5-metil-2-hexanona (4.3), 2 nonanona (4.20), alcohol isoamílico (4.31) y acetato de isoamilo (4.30) fueron identificados como capaces de inhibir el QS del biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. No obstante, para poder asegurar lo anterior debe verificarse que estos compuestos no actúen ni como bactericidas ni como bacteriostáticos. Así, lo primero fue determinar la concentración mínima inhibitoria del QS, para esto en placas de 96 pozos se añadieron diferentes volúmenes de los compuestos (5 μ L, 3 μ L y 2 μ L) y se añadió el medio de cultivo (285, 287 y 288 μ L respectivamente), con 10 microlitros de biosensor (figura 4.5) para tener un volumen total de 300 μ L. El control se hizo con el biosensor sin ningún compuesto y se compararon los resultados. Cada ensayo se hizo por triplicado. Los datos de coloración violeta se tomaron a las 24 horas y luego a las 48 y 72 horas. Se observa que todos los compuestos inhiben la producción de violaceína en las cantidades usadas. Al mismo tiempo se hicieron las lecturas de absorbancia a 600nm, con el de obtener las curvas de crecimiento. Se puede observar que compuestos como 5-metil-2-hexanona (4.3), acetato de isoamilo (4.30) no afectan el crecimiento del biosensor, pese a haberse ensayado en concentraciones mucho más elevadas que la concentración mínima inhibitoria en fase de vapor encontrada (tabla 4.4). Todos los otros compuestos actúan como bacteriostáticos, a

excepción del alcohol isoamílico a 92 mM que es bactericida, pero se ensayaron en concentraciones mucho mayores a la mínima inhibitoria en fase de vapor (tabla 4.4) por lo que se deben ensayar mucho más diluídos.

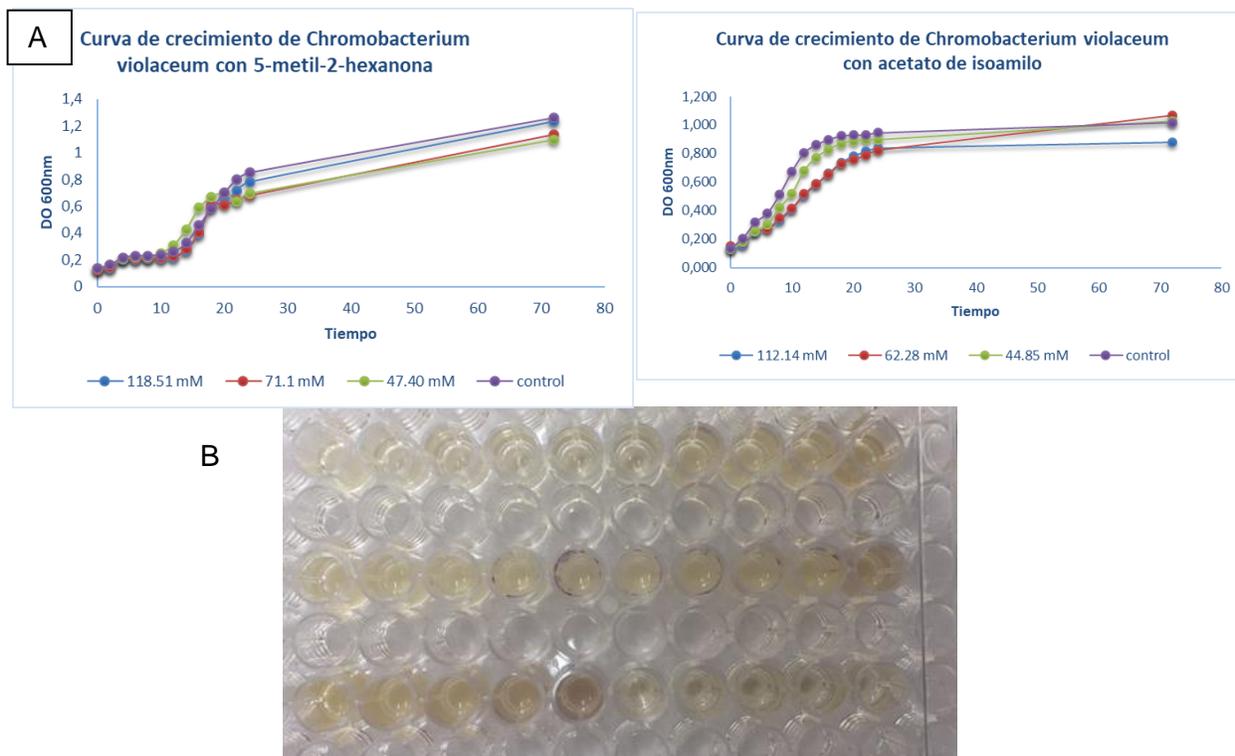


Figura 4.5 Ensayos de inhibición de QS de compuestos volátiles estudiados con 5, 3 y 2 μ L de los compuestos puros. A) Curvas de crecimiento de la bacteria con 5-metil-2-hexanona (4.3) y Acetato de isoamilo (4.30). Se observa determinar que el acetato de isoamilo crece sin afectar el crecimiento de la bacteria, los otros ensayos no son muy claros porque se usó concentraciones del compuesto muy elevadas.

Tabla 4.5 Concentraciones de los compuestos en ensayo frente a *C. violaceum*. Las concentraciones empleadas son muy altas y afectan el crecimiento,

COMPUESTO	Volumen añadido			AFECTA CRECIMIENTO BIOSENSOR
	2 μ l	3 μ l	5 μ l	
<i>p</i> -cimeno (4.1)	42.5	63.8	106	Si
cumeno (4.2)	47.8	71.7	119	Si
5-metil-2-hexanona (4.3)	47.4	71.1	118	No
2 nonanona (4.20)	38.4	57.6	96	Si
alcohol isoamílico (4.31)	61,3	92	153	Si
acetato de isoamilo (4.30)	44,8	67.2	112	No

4.2.1 Estudio del Espacio de cabeza por SPME

La bacteria PNM216 fue crecida en medio LB líquido, para esto se dispensaron 100 mL de medio LB líquido en un Erlenmeyer de 500 mL y se inoculó con el aislamiento PNM216. El sistema se tapó con tapones de algodón. Esto mismo se hizo con los medios LB y TSB. El espacio de cabeza de cada uno de los medios inoculados con la bacteria PNM216 fue evaluado a los 5, 10 y 15 días de cultivado a través del uso de la fibra de microextracción en fase sólida (SPME) Divinilbenceno/ Carboxen/ Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) Supelco®. La fibra se puso en contacto con el espacio de cabeza estático por 30 minutos por duplicado en condiciones asépticas. La evaluación del medio de cultivo sin inocular sirvió como blanco para determinar los COVs que eran producidos en el medio y no por el microorganismo. Los compuestos retenidos en la fibra se desorbieron tras una inyección manual mantenida por 5 minutos en un Cromatógrafo de Gases Agilent 7890B acoplado a un detector de espectrometría de masas Agilent 5977A con una fuente de ionización por impacto electrónico (EI) a 70 eV con un rango de adquisición m/z 40-300 uma. Los compuestos fueron separados en una columna capilar de sílica fundida (HP-5, 30 m, 0,25 mm, 250um df). El programa de calentamiento fue el siguiente: una temperatura inicial de 50 °C, 50-200 °C (6 °C/min) y calentamiento sostenido por 5 min a 200 °C.

4.2.2 Ensayos frente al fitopatógeno *Burkholderia glumae* CIAT 4026

El *swimming* un fenotipo controlado por QS y considerado como un factor que favorece la patogenicidad en *B. glumae*²⁴, se evaluó, como parte de este trabajo. En el bioensayo se puso una cantidad conocida de los compuestos identificados en este capítulo sobre la superficie del agar en presencia de la cepa *Burkholderia glumae* CIAT 4026, seleccionada por ser patógena y móvil. Los resultados de este ensayo se pueden apreciar en la tabla 4.5 en la que se evidencia que exhibe un control total de la motilidad en la mayoría de los compuestos cuando se encuentra en cantidades superiores a 17.5 µmol del compuesto, a excepción de la 2-nonanona que lo inhibe parcialmente. Con las otras cantidades ensayadas se observa una inhibición parcial o nula. De este ensayo parecería que el cumeno (4.2) y el alcohol isoamílico (4.30), son los que presentan mejores resultados Figura 4.6

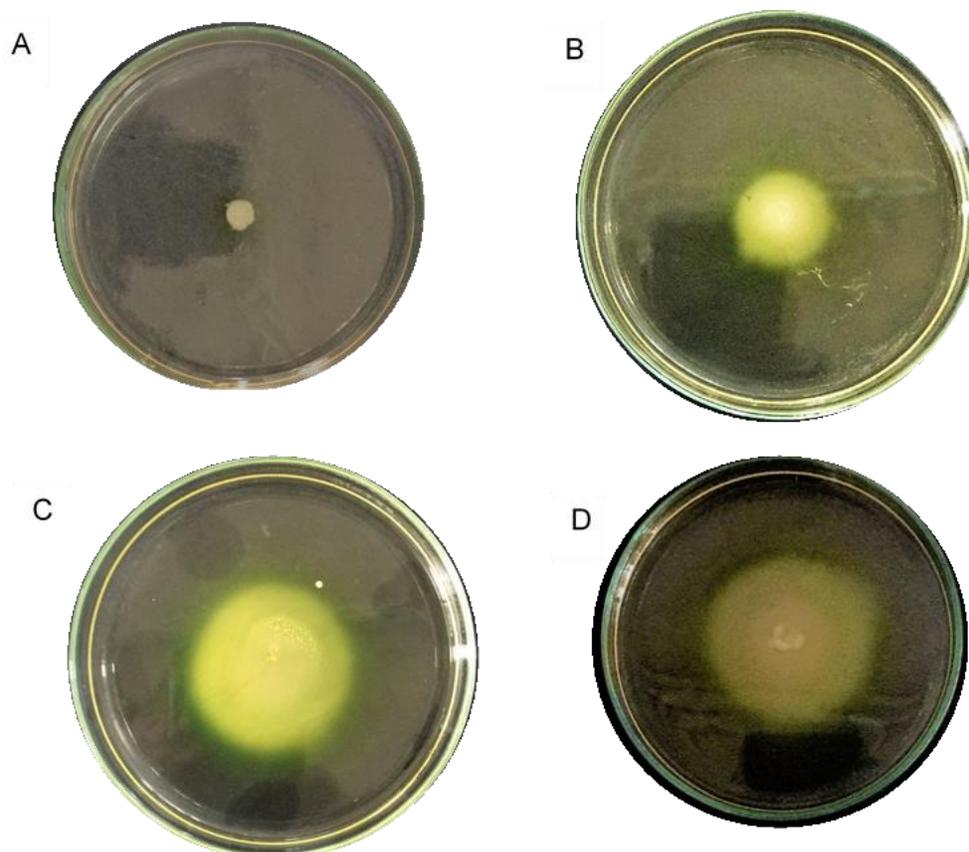


Figura 4.6 A) Ensayo de inhibición del *swimming* en *Burkholderia glumae*, la bacteria se puso en contacto con diferentes cantidades de los compuestos identificados y se catalogó como: A) inhibición total IT, 5-metil-2-hexanona (4.3) (21.84 μ moles); B) inhibición parcial IP cumeno (4.2) (6.24 μ moles), C) no inhibición NI, p-cimeno (4.1) (5.58 μ moles); D) control de bacteria, se observa que existe diferencia entre el desplazamiento de la bacteria con y sin compuesto

Tabla 4.6 Resultados ensayos de *swimming* con *B. glumae* usando diferentes cantidad de los compuestos volátiles identificados

C O M P U E S T O	CANT μmol	ACTIVI DAD	CANT μmol	ACTIVI DAD	CANT μmol	ACTIVI DAD
p-cimeno (4.1)	18.62	IT	9.31	NI	5.58	NI
cumeno (4.2)	20.8	IT	10.4	IP	6.24	IP
5-metil-2-hexanona (4.3)	21.84	IT	10.44	NI	6.56	NI

2 nonanona (4.20)	17.57	IP	8.78	NI	5.27	NI
alcohol isoamílico (4.31)	28.36	IP	14.18	IP	8.5	IP
acetato de isoamilo (4.30)	19.2	IT	9.6	IP	5.76	IP

NI No inhibe IP Inhibición parcial IT Inhibición total

Con el fin de evaluar la inocuidad y funcionalidad de los compuestos QQ, se realizaron ensayos en catafilos de cebolla, este ensayo es usado para determinar la virulencia de *B. glumae*. En primer lugar, se determinó la inocuidad de los compuestos en un sistema vivo inoculando los compuestos identificados como activos (tabla 4.4) en los catafilos de cebolla en diferentes concentraciones y se determina que es inocuo si no afecta el tejido de la cebolla. Una vez determinada la inocuidad, se procedió a realizar los ensayos usando la bacteria de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 3.4.6. Como resultado de este ensayo se puede observar que los compuestos que presentan mejor actividad son: 5-metil-2-hexanona (4.3) cuando se pone en contacto con 3.94 μmol y 2-nonanona (**4.20**) cuando se pone en contacto con 5.27 μmol del compuesto puro, esta actividad se evidencia porque no se presenta maceración en la cebolla a diferencia de lo que se observa en el ensayo frente a *Burkholderia glumae*, como control de maceración. (Figura 4.7). Los datos de la cantidad de compuesto usada y la mejor actividad en este ensayo se presentan en la tabla 4.6.

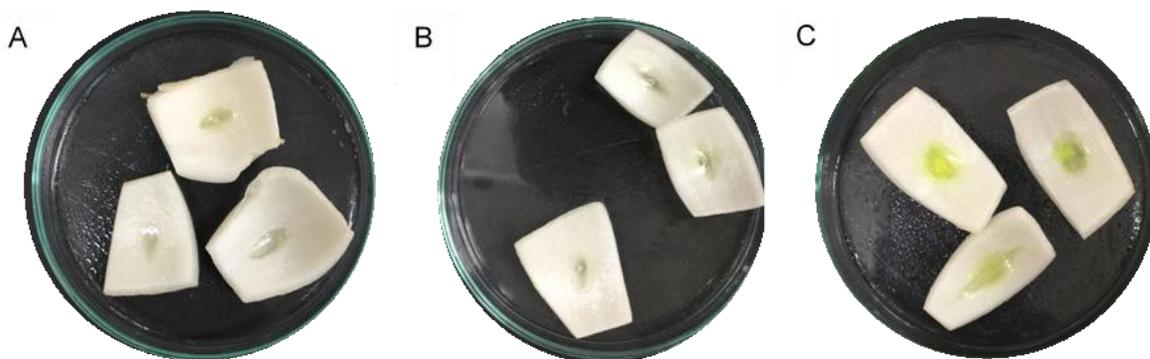


Figura 4.7 Ensayos en catafilos de cebolla de los compuestos con mejor actividad frente a *B. glumae*, aislados del espacio de cabeza del aislamiento PNM216: A) 5-metil-2-hexanona (4.3) cuando se pone en contacto con 3.94 μmol B) 2 nonanona (4.20) cuando

se pone en contacto con 5.27 μmol del compuesto puro C) Control con inóculo de bacteria *Burkholderia glumae* CIAT 4026.

Tabla 4.7 Ensayo de actividad en modelo de catafilos de cebolla con los compuestos identificados como IQS en el espacio de cabeza de PNM216. La mejor actividad corresponde a la cantidad de compuestos en la que se observa menor maceración del material vegetal.

COMPUESTO	CANT μmol	CANT μmol	CANT μmol	MEJOR ACTIVIDAD
<i>p</i>-cimeno (4.1)	11.17	5.58	3.35	5.58 μmol
cumeno (4.2)	12.48	6.24	3.74	12.48 μmol
5-metil-2-hexanona (4.3)	13.13	6.5	3.94	3.94 μmol
2 nonanona (4.20)	10.54	5.27	3.16	5.27 μmol
alcohol isoamílico (4.31)	17.01	8.5	5.1	8.5 μmol
acetato de isoamilo (4.30)	11.52	5.76	3.45	11.52 μmol

4.3 Conclusiones

Del cepario obtenido y estudiado en los capítulos anteriores se decidió realizar un *screening* de las cepas que fueron activas *in vivo* para determinar si los compuestos responsables de la actividad podrían incluir algunos volátiles. Para lo cual se hizo un ensayo en que se ponía a las bacterias en la misma caja Petri con el biosensor *C. violaceum* ATCC 31532, pero de tal forma que el contacto entre ellas no sea directo sino únicamente a través del espacio de cabeza. De este ensayo se logró identificar a la cepa PNM216 como una cepa promisoría. Esta bacteria no se ha podido caracterizar molecularmente debido a su arquitectura molecular, este análisis se lo realizará posteriormente.

Se identificó que los COVs más activos para PNM 216 se tienen cuando ésta se cultiva en los medios LB y TSB. El análisis de los espacios de cabeza de estos, utilizando técnicas

analíticas como SPME y análisis por CG-EM, permitió la identificación de 29 compuestos (4.1 a 4.29) producidos por el metabolismo de la bacteria en LB. Los compuestos son de diferentes familias químicas, principalmente compuestos relacionados con aldehídos y cetonas, aunque también se encontró una producción de alcoholes, ácidos, ésteres, éteres, compuestos aromáticos, compuestos azufrados y compuestos nitrogenados.

El ensayo en fase de vapor con algunos de los compuestos puros identificados y otros similares (4.30 -4.42), permitió identificar los siguientes como QQ de *C. violaceum*: 5-metil-2-hexanona (4.3) que actuó a una concentración de 0.004nM; cumeno (4.2) a una concentración de 0.003 nM, *p*-cimeno (4.1) a 0.003 nM; acetato de isoamilo (4.30) a 0.003nM, alcohol isoamilico (4.31) a 0.001 nM y 2-nonanona (4.4) a una concentración de 0.001nM.

De los ensayos realizados frente al fitopatógeno *B. glumae* CIAT 4026, se puede apreciar que los compuestos con mejor actividad como IQS se encuentran el 5-metil-2-hexanona (4.3) que actúa en el fenotipo de *swimming* cuando se le pone en contacto con 21.84 μ moles observándose una inhibición total del crecimiento de la bacteria y en el ensayo de virulencia actúa con 3.94 μ mol. La 2-nonanona no presenta una buena inhibición del QS, en el ensayo de *swimming* en que actúa con la menor cantidad de compuesto en comparación con los otros compuestos, pero la inhibición no es completa, pero en el ensayo de virulencia lo hace con bajas cantidades (5.27 μ mol) del compuesto, lo que lo hace un compuesto interesante para continuar el seguimiento de su actividad.

Es importante destacar la utilidad que tienen estos compuestos que actúan a muy bajas concentraciones, lo que significaría que tienen un muy bajo impacto sobre el medio ambiente y actúan como IQS.

4.4 Materiales y métodos

Los solventes usados fueron grado analítico: metanol Lichrosolv® de Merck, 2-Heptanona Alfa Aesar, 2-Nonanona ALDRICH, 2-Decanona Alfa Aesar, 2-Undecanona SIGMA-ALDRICH. 2-Dodecanona ALDRICH, 4-Metil-2-pentanona Alfa Aesar, 3-Metil-2-pentanona SIGMA-ALDRICH, 5-Metil-2-hexanone SIGMA-ALDRICH, 2-n-butoxietanol Alfa Aesar, Hexanol Merck, Heptanol Merck, Cumeno SIGMA-ALDRICH, Limoneno SIGMA-ALDRICH,

p-cimeno Alfa Aesar, Acetato de isoamilo Honeywell, Alcohol isoamilico, Etilenglicol, Acetil cetona, Acetato de isopropilo Honeywell, Linalool SIGMA-ALDRICH, Hexanol 1 SIGMA-ALDRICH, 2-Octanol SIGMA-ALDRICH, Heptanol Lichrosolv® de Merck, Propilenglicol Alfa Aesar, Isobutil.metil cetona Alfa Aesar, Acetato de *n*-butilo SIGMA-ALDRICH

Se usó una fibra de microextracción en fase sólida (SPME) de Divinilbenceno/Carboxen/ Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de Supelco®. Para la desorción de la fibra se usó un cromatógrafo de Gases Agilent 7890B acoplado a un detector de espectrometría de masas Agilent 5977A con una fuente de ionización por impacto electrónico (EI) a 70 eV con un rango de adquisición *m/z* 40-300 uma. Los compuestos fueron separados en una columna capilar de sílica fundida (HP-5, 30 m, 0,25 mm, 250um df). El programa de calentamiento fue el siguiente: una temperatura inicial de 50 °C, 50-200 °C (6 °C/min) y calentamiento sostenido por 5 min a 200 °C.

Los análisis de densidad óptica se hicieron en un equipo de Elisa marca Accu Reader+ M965mate. Para la preparación de los inóculos de los biosensores se usó un Orbital Shaker HD-3000 DIMAR termostatado a (130 rpm). Todos los instrumentos y medios fueron esterilizados con presión de vapor en una autoclave ALL American 75X de 32 L a 20 p.s.i y 220 °C por 20 minutos. Los inóculos fueron preparados en cabina de flujo laminar Labconco Tipo II.

4.4.1 Medios de cultivo

Realizar el *screening* de las bacterias con capacidad de inhibir el *quorum sensing* tomando para el ensayo las cepas de bacterias provenientes del Cepario del grupo Productos Naturales Marinos y Frutos de Colombia y que en trabajos previos de *screening* han demostrado tener actividad IQS en ensayos de difusión en agar²⁴.

Para este ensayo se utilizó el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 capaz de producir violaceina (pigmento violáceo) por *quorum sensing*, para asegurar que solamente los compuestos volátiles sean los responsables de la inhibición se creció en agar LB a la bacteria a probar y al biosensor *C. violaceum* ATCC 31532 en cajas de Petri realizando un enfrentamiento *in vivo*, manteniendo contacto entre sí únicamente a través de su espacio de cabeza o *HeadSpace* (HS). Estos ensayos se realizarán por triplicado. Se

incubó por 24 horas a 28 °C y se evaluó la inhibición por la presencia o ausencia del pigmento violáceo (violaceína) que produce el biosensor.

Una vez seleccionada la cepa productora de volátiles con actividad IQS se procedió a realizar una evaluación de los medios de cultivo sólido en los que se produce la actividad con mejores resultados. Los medios con mayor actividad se seleccionaron para ensayos en cultivos líquidos. Y se realizaron mediciones en CG-MS a las 36 horas, 5, 10 y 15 días de inoculado. Una vez realizadas estas mediciones se procedió a identificar los compuestos responsables de la actividad, comparándolos con bases de datos especializados. Para esto se hizo ensayos con el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 utilizando la metodología de sensidiscos; la evaluación se hizo midiendo el halo de inhibición y también con la bacteria

La composición de los medios que se evaluaron es la siguiente:

LB (LB) (g/L): Triptona 10g, Extracto de levadura 5g, cloruro de sodio 10g.

TSB (TSB) g/L: Digerido pancreático de caseína 17g, digerido papaínico de soja 3g, dextrosa 2,5g, cloruro sódico 5g, fosfato dipotásico 2,5g.

LB con sales (LBS) (g/L): NaCl 20.8 g, KCl 0.56 g, MgCl₂ 4.00 g, MgSO₄·7H₂O 4.80 g, Tris 0.36 g, sal marina Rila ® 1.5 g, extracto de levadura 5 g y triptona 10.0 g.

Marino Mínimo (Mm) se usó la siguiente composición (g/L): peptona 0.3, extracto de levadura 0.15, glicerol 1.5, NaCl 2.08, KCl 0.056, MgSO₄ 0.48, sal marina 0.15, MgCl₂ 0.4, Tris 0.036.

LB mínimo + sales (LBmS) se usó la siguiente composición (g/L): extracto de levadura 0.5, triptona 1, NaCl 20.8, KCl 0.56, MgCl₂ 4, MgSO₄ 4.8, sal marina 1.5.

Kalinovskaya y colaboradores (2002) (Kal) (g/L): extracto de levadura 5, K₂HPO₄ 0.07, NH₄Cl 1, FeSO₄ 0.025, MgCl₂ 0.8, NaCl 4.16, KCl 0.112, MgSO₄ 0.96, sal marina 0.3, tris 2.42

Nutritivo(Nut) (g/L): peptona 5g, extracto de levadura 3g, Cloruro de sodio 5 g.

4.3.2 *Screening* preliminar

Los 16 aislamientos que previamente habían mostrado actividad en IQS en los ensayos *in vivo*, tal y como se describió en los capítulos 2 y 3, fueron seleccionados para evaluar su potencial como fuente de COVs activos con capacidad de inhibir el QS, a saber: PNM46b, PNM89.3, PNM102N, PNM149a, PNM161a, PNM161b, PNM184, PNM194, PNM115, PNM123, PNM10, PNM217, PNM82 y PNM216.

El *screening* se realizó en cajas Petri divididas en tres compartimentos. En uno de los compartimentos se creció el biosensor *C. violaceum* ATCC 31532 en medio LB. En el segundo se creció la bacteria a ensayar utilizando como medio de cultivo ISP2 para las actinobacterias y LB para los otros aislamientos. El tercero se dejó vacío. De esta manera se aseguró que no hubiese contacto entre las bacterias y que la interacción se diera únicamente a través de volátiles.

Para el caso de las actinobacterias se realizó el inóculo ISP2, DO600nm 0.5. Las bacterias no actino se inocularon en medio LB líquido, con una DO600nm 0.5, que fue crecida durante la noche y se inocularon 100 µL en el compartimento respectivo. Del biosensor *C. violaceum* ATCC 31532 se inocularon 100 µL en medio LB, DO600nm 0.5. Todos los inóculos fueron dispersados con un asa estéril 10 µL. Las cajas se incubaron por 24 horas en una incubadora Memmert a 28 °C antes de evaluar la inhibición de QS. Estos ensayos se realizaron por triplicado. Los controles negativos fueron el biosensor en un compartimento y el medio de cultivo (LB e ISP2) sin inocular en el otro. La inhibición se evidenció como la ausencia de color violeta en el compartimento inoculado *C. violaceum* ATCC 31532.

4.4.2 Análisis Cromatográfico

La desorción de la fibra se realizó mediante inyección manual, y se mantuvo por 5 minutos en un Cromatógrafo de Gases Agilent 7890B acoplado a un detector de espectrometría de masas Agilent 5977^a, equipado con una fuente de ionización por impacto electrónico (EI) a 70 eV con un rango de adquisición m/z 40-300 uma. Los compuestos fueron separados en una columna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m, 0,25 mm, 250µm df). El programa de calentamiento fue el siguiente: una temperatura inicial de 50 °C, 50-200 °C (6 °C/min) y calentamiento sostenido por 5 min a 200 °C.

La identificación de los COVs se hizo mediante el estudio de los espectros de masas obtenidos, de la comparación de éstos con los incluidos en la base datos utilizando el software integrado Mass Hunter, así como la comparación de los índices de Kovats (IK) de cada compuesto con los reportados en la literatura. El IK fue calculado mediante el uso de una serie de parafinas de n-alcanos C7-C16. Poner la referencia) Algunos compuestos identificados fueron comprados y su identidad fue comprobada por coinyección.

4.4.3 Ensayos de inhibición del quorum sensing de los compuestos volátiles

Los ensayos de inhibición de quorum sensing se realizaron con los compuestos puros y sintetizados utilizando como biosensor la bacteria *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Los compuestos a ensayar se detallan en la tabla 4.3.

A) Ensayos de inhibición del *quorum sensing* con compuestos puros en fase de vapor contra *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532

Una vez determinados los compuestos con posible actividad inhibitoria del QS, se realizó ensayos con compuestos puros disponibles frente al biosensor *C. violaceum*. Para éste se realizó un inóculo de la cepa biosensora en LB líquido por una noche hasta tener una DO600nm 0.5, se tomaron 10 µL de éste y se inoculó en medio LB (10 mL), éstos se ponen en la base de una caja Petri y se deja solidificar, mientras que en la tapa de la caja Petri se colocaron dos papeles filtro de forma circular (diámetro de 5 mm) impregnados con diferentes cantidades de los compuestos puros (de 15 a 2.5 µL). Se incubaron por 24 horas a 28 °C y se determinó la actividad IQS por la presencia de halos blancos en el biosensor (tabla 4.4).

B) Ensayos de inhibición del *quorum sensing* por parte de los compuestos puros en solución contra *Chromobacterium violaceum* ATCC

Con el objetivo de determinar la capacidad de los compuestos puros para inhibir la producción de violaceina en el biosensor *C. violaceum* ATCC31532, se llevó a cabo un ensayo de dilución en caldo LB líquido de acuerdo a lo propuesto por Balouiri²⁵. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se determinó haciendo uso de cajas de 96 pozos. Cada pozo fue llenado con 5, 3 y 2 µL de los compuestos volátiles, se añadieron (85, 87 y 88 µL) de medio LB y se inocularon con 10 µL de una solución de *C. violaceum* (D.O600nm 0.25), para completar un volumen total en todos los pozos de 300 µL. Se usó como blanco el medio de cultivo sin compuestos, y como control negativo se usó el medio inoculado con 10 µL de la bacteria.

La MIC se estableció como la concentración mínima a la que se observaba actividad IQS, es decir la inhibición de la producción de la violaceina. Los resultados obtenidos fueron comparados contra un control negativo el cual no fue suplementado con ningún compuesto.

C) Ensayo de inhibición de *swimming* en *Burkholderia glumae*

Para determinar si el compuesto es capaz de inhibir la motilidad de la bacteria se realizaron diferentes ensayos, siguiendo la metodología propuesta por Karki 2010⁵⁵ con ligeras modificaciones. A saber, se dejó crecer la bacteria durante la noche a 37 °C en un agitador (130 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica DO₆₀₀ 0.7. Se prepararon cajas Petri con agar KB solidificado con 0.3% de agar (Composición por cada litro de agua: Peptona 20 g; Cloruro de magnesio 1,5 g sulfato de potasio 1,5 g, Agar, 3 g y glicerol 10 mL), y se dejaron solidificar durante 15 minutos en la cabina de flujo laminar. Posteriormente, en el centro del agar se deja caer haciendo una pequeña incisión en el agar 5 µL del inóculo de la bacteria *Burkholderia glumae* CIAT 4026 (D.O.₆₀₀ 0.7), que habían sido suplementados con diferentes cantidades de los compuestos identificados en este capítulo (tabla 4.5), como control negativo se usó a la bacteria a la que se le adicionó 300 µL de MeOH al 10% y en otra caja se creció la bacteria en ausencia del compuesto (blanco). La actividad se determinó comparando el diámetro del movimiento que presenta en la cepa *wild type*. Si la bacteria no se movía, o lo hacía significativamente menos, el compuesto se clasificaba como inhibidor del QS, para este fenotipo.

D) Ensayo con catafilos de cebolla

Los catafilos de cebolla se cortaron con un cuchillo estéril en pedazos con un tamaño aproximado de 2 X 3 cm. En cajas Petri estériles se colocan de 2 a 3 catafilos a los que se les hace una pequeña incisión con una punta estéril de 10 µL, en el orificio que se forma se coloca 3 µL de una solución de la bacteria crecida durante la noche con una DO₆₀₀ 0.5, y adicionada con diferentes cantidades de los compuestos identificados y que se desea probar, en este caso las cajas con el inóculo se tapan y se colocan en una cámara húmeda preparada en una caja de plástico estéril y cubierta con papel toalla húmedo. Esta se cierra herméticamente usando vinipel, evitando realizar movimientos bruscos que modifiquen el ensayo. Se incuba por 36 horas a 30°C en una incubadora. El grado de virulencia se determinó midiendo el área macerada en el catafilo

4.5 Bibliografía

- (1) Kanchiswamy, C. N.; Malnoy, M.; Maffei, M. E. Chemical Diversity of Microbial Volatiles and Their Potential for Plant Growth and Productivity. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 151.
- (2) Kai, M.; Hausteiner, M.; Molina, F.; Petri, A.; Scholz, B.; Piechulla, B. Bacterial Volatiles and Their Action Potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *81*, 1001–1012.
- (3) Audrain, B.; Farag, M. A.; Ryu, C.-M.; Ghigo, J.-M. Role of Bacterial Volatile Compounds in Bacterial Biology. *FEMS Microbiol. Rev.* **2015**, *39* (2), 222–233.
- (4) Palaniyandi, S. A.; Yang, S. H.; Zhang, L.; Suh, J. W. Effects of Actinobacteria on Plant Disease Suppression and Growth Promotion. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97* (22), 9621–9636.
- (5) Citron, C. a.; Barra, L.; Wink, J.; Dickschat, J. S. Volatiles from Nineteen Recently Genome Sequenced Actinomycetes. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (9), 2673–2683.
- (6) Stotzky, G.; Schenck, S. Volatile Organic Compounds and Microorganisms. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **1976**, No. May.
- (7) Farag, M. A.; Zhang, H.; Ryu, C.-M. Dynamic Chemical Communication between Plants and Bacteria through Airborne Signals: Induced Resistance by Bacterial Volatiles. *Journal Chem Ecol* **2013**, *39*, 1007–1018.
- (8) Chernin, Leonid. Toklikishvili, Natela. Ovadis, Mariana, Kim, Sofía, Ben-Ari, Julius, Khmel, Inessa, Vainstein, A. Quorum-Sensing Quenching by Rhizobacterial Volatiles. *Environ. Microbiol. Rep.* **2011**, *3* (6), 698–704.
- (9) LaSarre, B.; Federle, M. J. Exploiting Quorum Sensing To Confuse Bacterial Pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2013**, *77* (1), 73–111.
- (10) Kusari, P.; Kusari, S.; Lamshöft, M.; Sezgin, S.; Spiteller, M.; Kayser, O. Quorum Quenching Is an Antivirulence Strategy Employed by Endophytic Bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98* (16), 7173–7183.
- (11) Dandurishvili, N.; Toklikishvili, N.; Ovadis, M.; Eliashvili, P.; Giorgobiani, N.; Keshelava, R.; Tediashvili, M.; Vainstein, A.; Khmel, I.; Szegedi, E.; et al. Broad-Range Antagonistic Rhizobacteria *Pseudomonas Fluorescens* and *Serratia Plymuthica* Suppress *Agrobacterium* Crown Gall Tumours on Tomato Plants. *J. Appl. Microbiol.* **2011**, *110* (1), 341–352.
- (12) Wenke, K.; Kai, M.; Piechulla, B. Belowground Volatiles Facilitate Interactions between Plant Roots and Soil Organisms. *Planta* **2010**, *231* (3), 499–506.
- (13) Grady, E. N.; MacDonald, J.; Liu, L.; Richman, A.; Yuan, Z. C. Current Knowledge and Perspectives of *Paenibacillus*: A Review. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15* (1), 1–18.
- (14) Saitou, N.; Nei, M. The Neighbor-Joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.* **1987**, *4* (4), 406–425.
- (15) Case, R. J.; Boucher, Y.; Dahllöf, I.; Holmström, C.; Doolittle, W. F.; Kjelleberg, S. Use of 16S rRNA and *rpoB* Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73* (1), 278–288.
- (16) Gottschalk, G. *Bacterial Metabolism*; Springer New York: New York, NY, 1986.
- (17) Pino, A. Estudio de Compuestos Volátiles Con Actividad Biológica a Partir de Bacterias de Origen Marino, Universidad Nacional de Colombia, 2016.
- (18) El-Sayed Ashraf M. Kovats | The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals <http://www.pherobase.com/kovats/?isvalid=yes> (accessed Feb 28, 2018).

Amphimedon viridis

- (19) Bouyahya, A.; Dakka, N.; Et-Touys, A.; Abrini, J.; Bakri, Y. Medicinal Plant Products Targeting Quorum Sensing for Combating Bacterial Infections. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2017**, No. 17.
- (20) Olivero-Verbel, J.; Barreto-Maya, A.; Bertel-Sevilla, A.; Stashenko, E. E. Composition, Anti-Quorum Sensing and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Lippia Alba*. *Braz. J. Microbiol.* **2014**, *45* (3), 759–767.
- (21) Bruce, A.; Verrall, S.; Hackett, C. A.; Wheatley, R. E. Identification of Volatile Organic Compounds (VOCs) from Bacteria and Yeast Causing Growth Inhibition of Sapstain Fungi. *Holzforchung* **2004**, *58* (2), 193–198.
- (22) Varga, Z. G.; Armada, A.; Cerca, P.; Amaral, L.; Mior Ahmad Subki, M. A. A.; Savka, M. A.; Szegedi, E.; Kawase, M.; Motohashi, N.; Molnár, J. Inhibition of Quorum Sensing and Efflux Pump System by Trifluoromethyl Ketone Proton Pump Inhibitors. *In Vivo* **2012**, *26* (2), 277–285.
- (23) Weise, T.; Thürmer, A.; Brady, S.; Kai, M.; Daniel, R.; Gottschalk, G.; Piechulla, B. VOC Emission of Various *Serratia* Species and Isolates and Genome Analysis of *Serratia Plymuthica* 4Rx13. *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *352* (1), 45–53.
- (24) Kim, J.; Kang, Y.; Choi, O.; Jeong, Y.; Jeong, J.-E.; Lim, J. Y.; Kim, M.; Moon, J. S.; Suga, H.; Hwang, I. Regulation of Polar Flagellum Genes Is Mediated by Quorum Sensing and FlhDC in *Burkholderia Glumae*. *Mol. Microbiol.* **2007**, *64* (1), 165–179.
- (25) McLean, R. J. C.; Pierson, L. S.; Fuqua, C. A Simple Screening Protocol for the Identification of Quorum Signal Antagonists. *J. Microbiol. Methods* **2004**, *58* (3), 351–360.
- (26) Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S. K. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6* (2), 71–79.

5. Capítulo 5: Compuestos inhibidores del *quorum sensing* de la esponja del Caribe *Amphimedon viridis*

Sandra J. Naranjo-Gaybor^{1,2}, Zulma R. Suarez-Moreno³, Olivier Thomas⁴, Francisco León⁵, Sven Zea⁶, Freddy A. Ramos¹, Leonardo Castellanos^{1*}

¹ Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Departamento de Química, Carrera 30 No. 45-03, Edificio de Química of 427, Bogotá, 111321, Colombia.

² Universidad de las Fuerzas Armadas. ESPE Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA II Av. General Rumiñahui s/n Sangolquí- Ecuador

³ Investigación y Desarrollo. Empresa Colombiana de Productos Veterinarios VECOL S.A. Avenida El Dorado No.82-93 Bogotá D.C.

⁴ National University of Ireland Galway, Marine Biodiscovery, School of Chemistry, University Road, Galway, Ireland

⁵ Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, University of Florida, Gainesville, Florida, 32610, United States

⁶ Centro de Estudios en Ciencias del Mar - CECIMAR, Universidad Nacional de Colombia - Sede Caribe, Santa Marta, Magdalena, Colombia

[*lcastellanosh@unal.edu.co](mailto:lcastellanosh@unal.edu.co)

Este capítulo está basado en el artículo del mismo nombre sometido a la revista Vitae

Resumen

Las esponjas marinas han sido los invertebrados más estudiados desde el punto de vista químico, pues han mostrado ser fuente de compuestos con diferentes actividades biológicas incluyendo la inhibición del *quorum sensing* (IQS). En este capítulo se valoró la actividad inhibitoria de QS de los extractos de cinco especies de esponjas del orden Haplosclerida, recolectadas en el Caribe Colombiano, usando como biosensor a *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Entre ellas, solamente la esponja *Amphimedon viridis* mostró actividad inhibitoria, esta especie había sido previamente estudiada en el Brasil por ser fuente de compuestos con actividad antifúngica y antibacteriana contra ciertos géneros de bacterias. El estudio químico bioguiado del extracto permitió identificar al complejo halitoxina (5.1) y a la taurina (5.2) como los compuestos responsables de la actividad inhibitoria del QS frente al biosensor *C. violaceum* ATCC 31532, sin afectar su crecimiento, lo que se juzgó mediante una curva de crecimiento a diferentes concentraciones del compuesto. Los valores de CMI del QS son 0.49 mM (100 µg/mL) para el compuesto (5.1) y 3.99 mM (500 µg/mL) para el compuesto 5.2.

Estos compuestos también fueron ensayados frente al fitopatógeno *Burkholderia glumae* CIAT 4026, para determinar si el compuesto actuaba como IQS se valoró su efecto sobre la motilidad *swimming*, fenotipo de patogenicidad controlado por QS. Así se pudo establecer que el compuesto 5.1 resultó inhibitor del *swimming* de la bacteria cuando se le adiciona 0.75 µg (3.67 nmoles) del compuesto, por su parte el 5.2 lo hizo con 39.9 nmoles (5 µg) del compuesto, mostrando ser menos potente. Con el fin de determinar la capacidad de los compuestos para afectar la virulencia del patógeno se llevó a cabo un ensayo con catafilos de cebolla, inoculados con el fitopatógeno *Burkholderia glumae* CIAT 4026. Como resultado de este ensayo se determinó que la halitoxina controla la virulencia de la bacteria cuando se añadió 3 µg (14.70 nmoles) del compuesto. No se observa actividad con la taurina (5.2) a la máxima cantidad usada 23.97 nmoles (3µg).

5.1 Introducción

Las esponjas marinas son un importante componente estructural y funcional de los arrecifes de coral, incluyendo por supuesto a los del Caribe¹. Adicionalmente, las esponjas marinas se han identificado como fábricas de productos naturales biológicamente activos, de hecho son los organismos marinos más estudiados químicamente². Entre ellas, las esponjas del orden Haplosclerida se han identificado como una de las fuentes más prolíficas de productos naturales marinos (PNM), incluyendo alcaloides, poliacetilenos y derivados terpénicos³. Muchos de ellos han resultado activos en diferentes ensayos biológicos^{4,5}. Por ejemplo alcaloides de tipo 3-alquilpiridina, denominadas hachijodines A-G, obtenidos de esponjas marinas de los géneros *Xestospongia* y *Amphimedon*⁶; o sus derivados glicosilados denominados amfimedósidos A-E, aislados de *Amphimedon* sp. (Japón), muestran actividad citotóxica⁷. A partir de *Amphimedon* sp se aisló el derivado piridínico amphimedina,⁸ este alcaloide aromático pentacíclico mostró una potente actividad citotóxica, por lo que ha sido el objetivo de diferentes estudios de síntesis^{9,10}.

A partir del extracto de *Amphimedon chloros* se aislaron los antibióticos tipo piridinio conocidos como halitoxinas y anfitoxinas¹¹. Compuestos tipo 3-alquilpiridina están ampliamente distribuidos entre las especies del orden Haplosclerida y su ocurrencia se limita en gran medida a este grupo, por lo que se suelen describir como característicos de este grupo³. Parecería que los derivados de mono- y bis-3-alquilpiridina están restringidos a especies pertenecientes a los géneros *Amphimedon*, *Cribrochalina* y *Niphates*, todos pertenecientes a la familia Niphatidae³. Así, estos compuestos pueden ser considerados como una sinapomorfia del orden Haplosclerida⁴, aunque existen discrepancias sobre este tema. No obstante, se cree que los patrones de diversidad química pueden coincidir en buena medida con una clasificación filogenética actualizada que incorpora datos moleculares y morfológicos. Adicionalmente, debería considerarse la evaluación del posible origen bacteriano de los compuestos derivados de la esponja³.

La inhibición del QS se ha convertido en una diana atractiva para el desarrollo de nuevos agentes anti-infecciosos, pues es sabido que muchos factores de virulencia se controlan por QS¹². Así, los compuestos que inhiben los mecanismos de QS (*Quorum Quenchers*, QQ) atenúan los fenotipos determinantes de virulencia siendo poco probable que causen resistencia hacia ellos¹³, por lo que se espera que tengan una vida útil más larga. Por ejemplo, la bacteria *Burkholderia glumae* causa pudrición de granos y plántulas de arroz¹⁴.

En esta bacteria el QS está asociado con la virulencia causada por la motilidad de la bacteria y la secreción de proteínas y toxinas. El sistema de QS que controla estos fenotipos incluye a la *N*-octanoil-L-AHL (C8-AHL) con su receptor cognado TofR C8-HS¹⁵. Se han desarrollado inhibidores de QS que atenúan su patogenicidad, este es el caso de compuestos sintetizados por Suga et al. ¹⁶, que contiene un anillo de pirimidona y que han sido patentados como productos para el control de enfermedades causadas por bacterias, en horticultura y agricultura¹⁶.

Con esta perspectiva, en el presente capítulo se describe la evaluación de la actividad inhibitoria del QS de los extractos de varias especies de esponjas marinas del orden Haplosclerida recolectadas en el Caribe colombiano: *Haliclona (Halichocona) magnifica*, *Haliclona implexiformis*, *Haliclona vermeuleni* y *Amphimedon viridis*. Como biosensores se usaron *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, cuyo fenotipo producido por QS es la violaceína y el fitopatógeno *Burkholderia glumae* (fitopatógeno del arroz) causante del añublo bacterial del arroz, que afecta a cultivos de la gramínea. Así, el objetivo principal de este capítulo es encontrar compuestos con actividad IQS a partir de esponjas marinas.

5.2 Resultados y discusión

Las esponjas marinas se distribuyen desde la zona intertidal poco profunda hasta la profunda llanura abisal¹⁷. Durante su larga historia evolutiva, la mayoría de ellas han desarrollado un arsenal enorme de productos naturales, incluyendo vías metabólicas únicas que conducen a una gran diversidad química. Lo anterior es el fruto de una estrecha relación con su microbiota asociada³.

5.2.1 *Screening* de esponjas del orden Haplosclerida

En este marco, en el presente capítulo se buscaron compuestos con actividad inhibitoria del QS en cinco especies del orden Haplosclerida (Tabla 5.1), que fueron recolectadas en el mar Caribe colombiano. Los datos de recolección se resumen en la Tabla 5.3. Los organismos fueron extraídos con metanol y el extracto resultante fue secado y sometido a partición entre DCM y agua, con el fin de obtener una fracción orgánica (FD) y una acuosa (FA). Otra porción de la esponja fue liofilizadas y extraída con metanol:DCM y se obtuvo un extracto crudo que denominamos EL. Cada uno de los extractos para cada esponja fue ensayado frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, usando entre 2000

Amphimedon viridis

y 500 μg por disco, buscando determinar la posible actividad inhibitoria del *quorum sensing*. Los extractos con esta actividad inhibirían la producción del pigmento violeta, conocido como violaceína, sin afectar el crecimiento de la bacteria, tal y como se muestra en la Figura 5.1. En la tabla 5.1 se resumen los resultados del ensayo, encontrando que el único extracto que mostró actividad fue el de *Amphimedon viridis*, razón por la que se decidió trabajar con esta esponja.

Tabla 5.1 Resultados del ensayo biológico de extractos de las esponjas frente a *C. violaceum* ATCC 31532. Los extractos con actividad IQS se marcan como (+), mientras los extractos sin actividad (-)

ESPONJA	Extracto EL			Fracción FA			Fracción FD		
	500 $\mu\text{g}/\text{dis}$	1000 $\mu\text{g}/\text{dis}$	2000 $\mu\text{g}/\text{dis}$	500 $\mu\text{g}/\text{dis}$	1000 $\mu\text{g}/\text{dis}$	2000 $\mu\text{g}/\text{dis}$	500 $\mu\text{g}/\text{dis}$	1000 $\mu\text{g}/\text{dis}$	2000 $\mu\text{g}/\text{dis}$
<i>Haliclona magnifica</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Haliclona implexiformis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Haliclona vermeuleni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Amphimedon viridis</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-

EL: extracto liofilizado FA: fracción acuosa; FD: fracción diclorometánica

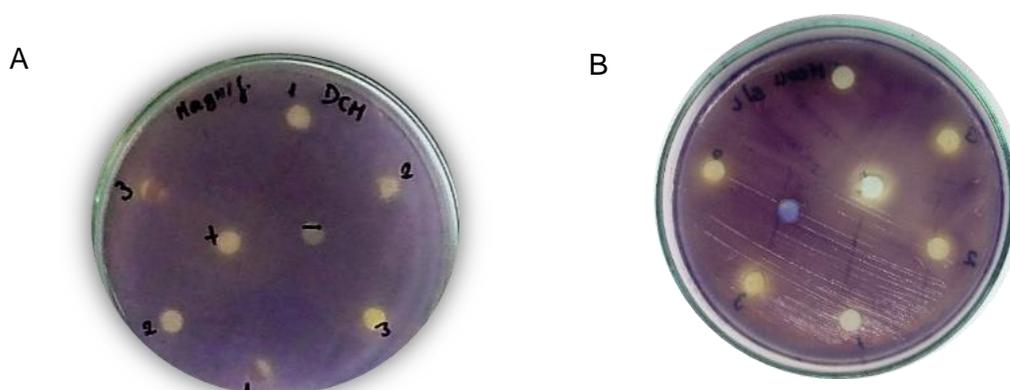


Figura 5.1 Ensayos de inhibición de *quorum sensing* frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 con fracciones y extractos de A). Fracción FD de *Haliclona magnifica*, se observa que es una fracción no activa. B) Fracción acuosa de *Amphimedon viridis* (FA) observándose actividad inhibitoria del QS.

5.2.2 Estudio químico de *Amphimedon viridis*

Amphimedon viridis (Duchassaing & Michelotti, también conocida como *Haliclona viridis*) pertenece a la familia Niphatidae, orden Haplosclerida¹⁸. De acuerdo a *World Porifera Database* se encuentra distribuida en el Caribe oriental, desde el sur de Estados Unidos hasta Brasil¹⁸, aunque también existen reportes de colecta en el Mar Rojo¹⁹. De esta especie se han aislado cerebrósidos²⁰; incluyendo varios heptaacetilcerebrósidos que han demostrado una moderada actividad antifúngica contra *Candida albicans*²¹. De otro lado, Chehade y Mitchell aislaron la 1,3-dimetilisoguanina a partir de especímenes colectados en diferentes localidades Bermudas y Brasil^{22,23}. Este compuesto fue esencialmente inactivo en bioensayos hemolíticos y antimotóricos, pero causó un aumento en las contracciones del músculo longitudinal del cobayo/plexo mientérico obtenidas por estimulación eléctrica transmural²⁴. En otro estudio, a partir del extracto de *Amphimedon viridis*, recolectada en Brasil, se aislaron 2 toxinas homólogas, identificadas como anfitoxina y halitoxina, que mostraron actividad selectiva contra un panel de bacterias de diferentes géneros (*Pseudomonas*, *Vibrio* y *Aeromonas*)¹⁹.

Dado que el extracto de *Amphimedon viridis* resultó activo como inhibidor de QS, éste se sometió a partición entre H₂O/DCM 1:1 y la fracción acuosa se extrajo a su vez con BuOH, siguiendo un esquema de kupchan^{25,26}, obteniéndose así tres fracciones en orden creciente de polaridad: FD (DCM, 696 mg), WB (BuOH, 430 mg) y WW (residual de H₂O, 150 mg). Cada una de éstas se ensayó contra *C. violaceum*, presentando actividad QQ las fracciones WB (300, 200 y 100 µg/disco) y WW (300 y 200 µg/disco), mientras que la fracción de diclorometano no resultó activa. Lo anterior indica que los compuestos responsables de la actividad son de polaridad elevada.

El análisis por HPLC-MS de la fracción WB mostró un único pico, indicando un buen grado de pureza para 5.1. Este compuesto (430 mg) fue aislado como un sólido amorfo negro con rotación óptica tuvo un valor de $[\alpha]^{23}_D - 48.65$ (c= 0.1, MeOH). En el espectro de RMN ¹H (Figura 5.2) se observan señales anchas en: δ_H 8.96 (m, 1H, H-a), 8.84 (m, 1H, H-b), 8.50 (bd, $J = 8\text{Hz}$, 1H, H-c) y 8.03 (m, 1H, H-d), que corresponden a los desplazamientos y multiplicidades esperados para protones de anillo aromático tipo piridina. Así mismo, muestra señales en δ_H 4.63 (m, 2H, H-e) que corresponden a protones de metileno sobre nitrógeno cuaternario. Adicionalmente, se observa una señal en δ_H 2.89 (m, 2H, H-f) correspondiente a protones de un metileno bencílico y que están unidos a otro metileno en

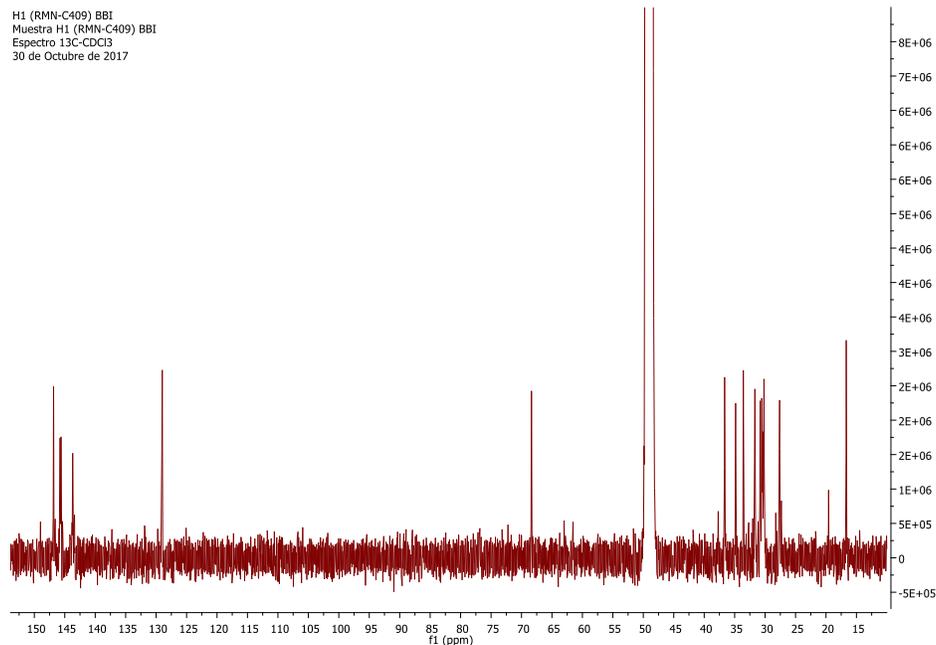
Amphimedon viridis

Figura 5.3. Espectro de RMN ^{13}C de 5.1. complejo Halitoxina (MetAN d_4 , 400 MHz)

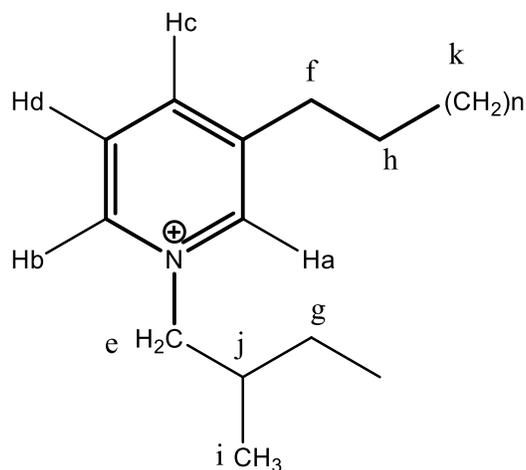


Figura 5.4. Estructura del complejo halitoxina (tomado de Schmitz ²⁷)

El complejo halitoxina suele ser aislado como una mezcla inseparable de sales de piridinio de alto peso molecular²⁴. En la figura 5.5a se observa el cromatograma de ésta en RP-18 detectando a 254nm. En el espectro de masas de 5.1 se observó la presencia de un ion a m/z 204, que corresponde al monómero de la halitoxina, consistente con la fórmula

molecular $C_{14}H_{22}N^{+28}$. Adicionalmente, se observan iones en valores de m/z entre 148 y 232, que sugieren una fórmula empírica $(C_{15}H_{24}NaCl \cdot 2H_2O)_n$ como se muestra en la tabla 5.2. Todos estos valores coinciden con los valores reportados por Scott 2000²⁸ para el complejo Halitoxina, permitiendo confirmar que 5.1 corresponde a este complejo.

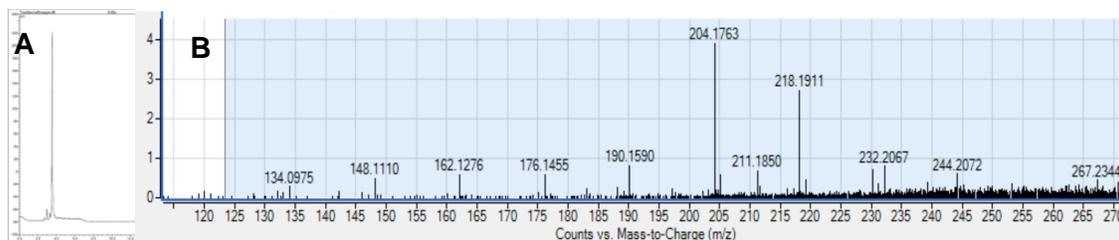


FIGURA 5.5 A) Cromatograma HPLC-MS en fase reversa de la fracción WB. B). Espectro de masas (+)-ESIMS de la fracción butanólica extraída de *Amphimedon viridis*. Complejo Halitoxina

Tabla 5.2 Iones del complejo Halitoxina (5.1) y su asignación por comparación con los datos reportados por Scott en 2000²⁸

Monómero	Masa Fragmento (m/z)	Abundancia relativa del pico (%)	Fórmula empírica sugerida
1	148	10	$C_{10}H_{14}N^+$
2	162	20	$C_{11}H_{16}N^+$
3	176	12	$C_{12}H_{18}N^+$
4	190	19	$C_{13}H_{20}N^+$
5	204	100	$C_{14}H_{22}N^+$
6	218	69	$C_{15}H_{24}N^+$
7	232	18	$C_{16}H_{26}N^+$

Se ha propuesto que los componentes básicos involucrados en la biogénesis de los alcaloides 3-alkilpiperidínicos son amoniaco, una unidad de tres carbonos tal como propenal y un dialdehído de cadena larga. Estas unidades se ensamblan primero en un monómero de 3-alkilpiperidina que puede polimerizar para dar el oligómero. No existe una contraparte terrestre para la ruta biogénica propuesta para estos alcaloides de esponjas²⁹

El complejo halitoxina ha sido aislado de un amplio número de especies del orden Haplosclerida, entre estas: *Haliclona erina*; *Haliclona rubens*; *Amphimedon viridis* (anteriormente *Haliclona viridis*)^{27,30} y *Amphimedon compressa*³¹. Este complejo ha

demostrado ser tóxico para varios organismos, incluyendo bacterias, invertebrados, peces, anfibios y ratones^{4,32}. Fracciones purificada de halitoxina poseen actividad cardiotónica, actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*¹⁹, inhibitoria de la acetilcolinesterasa *in vitro* y hemolítica⁴. En bajas concentraciones mostró efecto antimitótico contra huevos de erizo de mar y en concentraciones más altas produjo lisis celular^{28,30}. Inicialmente se pensaba que la actividad citolítica de los polímeros 3-alkilpiridinio (3-AP) era debida a sus propiedades detergentes; debido a que estas moléculas poseen un anillo de piridinio cargado positivamente ("cabeza polar") y restos alifáticos ("colas no polares") y por lo tanto forman agregados supramoleculares con estructuras similares a micelas en soluciones acuosas, al menos para poli-APS²⁴. Se ha encontrado que la hemólisis es similar en muchos aspectos a la obtenida con detergentes catiónicos, como el cloruro de cetilpiridinio o el bromuro de cetiltrimetilamonio y se esperaba que su acción fuera similar a la de estos detergentes. Sin embargo, los poli-APS, en concentraciones inferiores a su concentración micelar crítica, producen lesiones leves de la membrana, con un diámetro promedio de 5.8 nm, indicando que la lisis se debe a la formación de poros en la membrana celular y no simplemente debido al efecto disruptivo del detergente. De hecho, los resultados obtenidos con halitoxina aislada de *Callyspongia ridleyi*²⁸, muestran claramente que a bajas concentraciones, estas moléculas forman poros de membrana transitorios pero definidos, que podrían usarse para la transfección del ADN celular.

Adicionalmente, la halitoxina ha mostrado actividad antibacteriana hacia dos especies de bacterias gram-positivas: *Bacillus subtilis* y *Streptococcus pyogenes*^{4,27}. Kelman y colaboradores¹⁹ evaluaron la actividad antimicrobiana de la mezcla de halitoxina/amphitoxina, aislada de *Amphimedon viridis*, contra un panel de bacterias ecológicamente asociadas a la esponja, encontrando que no son activas. No obstante, cuando estos compuestos se ensayaron contra bacterias obtenidas de la columna de agua, se encontró una fuerte inhibición de la mayoría de las cepas marinas. Esta inhibición selectiva podría desempeñar un papel ecológico importante en la prevención del *microfouling* y en la defensa contra bacterias marinas potencialmente patógenas²⁴. Así como hacer parte de una selección activa del holobionte.

De otro lado, la fase acuosa mostró una leve actividad inhibitoria de QS y fue fraccionada SPE C18 y luego sobre sephadex, pudiéndose aislar el compuesto 5.2. El espectro de RMN-¹H de 5.2 mostró señales para dos metilenos en δ_H 3.48 (t, $J= 6.6$ Hz, 2H) y 3.32 (t, $J= 6.6$

Hz, 2H) y para protones de metilo sobre grupo amino en δ_H 2.82 (s) (Anexo Figura 5.1). El espectro de RMN- ^{13}C mostró señales para dos metilenos unidos a un heteroátomos en δ_C 35.3 y 47.4. Estos datos permitieron establecer que el compuesto 5.2 corresponde a la taurina, por su correspondencia con los datos publicados³³ (Figura 5.6). Se ha reportado la presencia de taurina y algunos derivados de ella, en algunas esponjas, por ejemplo *Agelas oroides*³⁴; así como en estrellas de mar³⁵. La taurina ha sido reportada como un componente importante de los EPS de la superficie celular bacteriana, por ejemplo en *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*³⁶, lo que permitiría pensar que este compuesto puede ser producido por un organismo simbiote asociado a la esponja.

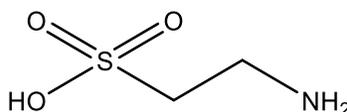


Figura 5.6 Compuesto 5.2 identificado como taurina en la fase acuosa de *Amphimedon viridis*

5.2.3 Ensayos de actividad inhibitoria de QS

Los compuestos 5.1 y 5.2 fueron identificados como los responsables de la actividad inhibitoria de QS frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, usando el aislamiento bioguiado antes descrito. El paso siguiente fue determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC_{QS}) del *quorum sensing*, para lo cual se usó la metodología de dilución en agar empleando 6 concentraciones diferentes para el compuesto 5.1. (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estos ensayos se hicieron en placas de 96 pozos. En el caso de la halitoxina compuesto (5.1) se observa que a altas concentraciones hay una marcada inhibición de la producción de la violaceina, mientras a bajas concentraciones la coloración violeta es evidente. La MIC_{QS} para el caso de la halitoxina (5.1) fue de 0.49 mM (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) frente al biosensor *C. violaceum* ATCC 31532 (Figura 5.7). En el caso de la halitoxina se tomó como masa molecular promedio 204 uma para los cálculos por corresponder al ion más abundante. Un factor que se debe tener en cuenta es que los compuestos con actividad inhibitoria del QS no pueden afectar el crecimiento de la bacteria, es decir no pueden ser ni bactericidas ni bacteriostáticos³⁷. La primera acción se descarta porque se puede ver claramente el crecimiento de las colonias de *C. violaceum* ATCC 31532 incluso a 0.99 mM. Para descartar un efecto bacteriostático se hizo una curva de crecimiento del biosensor en presencia del complejo halitoxina 5.1, usando concentraciones de 50 y 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, y en su

ausencia, como control negativo. Estos valores se seleccionaron levemente superiores a los encontrados en la MIC_{QS} para asegurar que no había inhibición de crecimiento del biosensor. Como se puede observar en la Figura 5.7B, este complejo 5.1 no afecta el crecimiento del biosensor, por lo que se puede considerar que este es un verdadero inhibidor del QS.

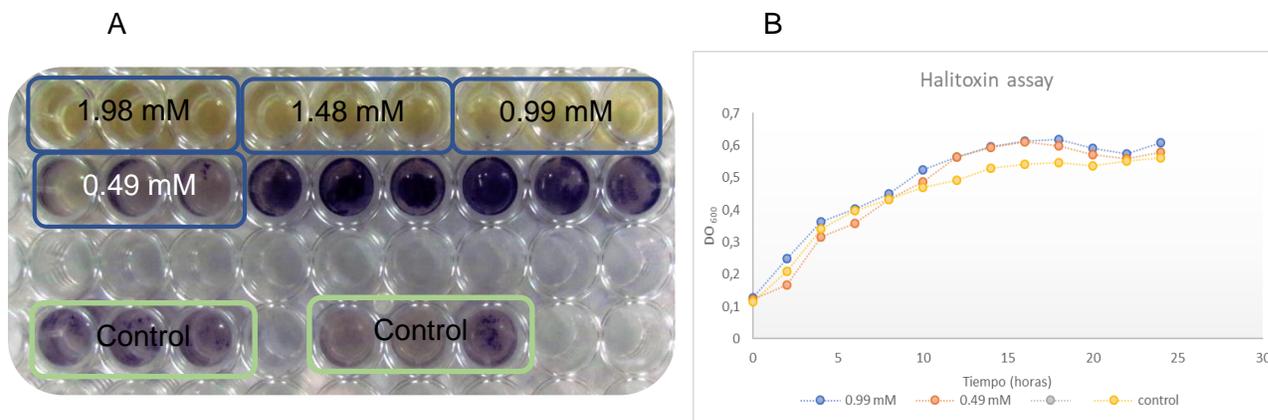


Figura 5.7. Ensayo de inhibición del QS con halitoxina (5.1) A). Foto del ensayo de inhibición de *quorum sensing* frente a *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 en placas de 96 pozos. Los números corresponden a la concentración molar usada. Nótese que la concentración a la que se inhibe el QS corresponde a 0.49 mM (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) B). Curva de crecimiento de las tres concentraciones comparadas con el control, no se observa diferencias significativas en el crecimiento.

Estos mismos ensayos se hicieron para la taurina 5.2 y se determinó que la violaceina se inhibía a una concentración de 3.99 mM (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Figura 5.8), siendo mucho menos potente que la halitoxina, pero por su pequeño tamaño y fácil consecución comercial es una alternativa interesante como QQ. Además, se realizó la curva de crecimiento y se determinó que las concentraciones de inhibición de QS tampoco afecta el crecimiento de la bacteria (Figura 5.8).

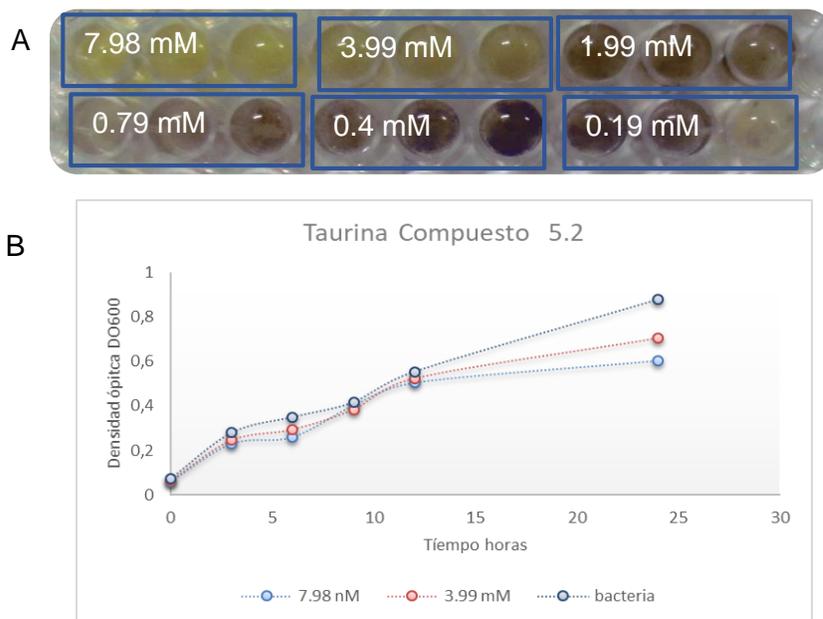


Figura 5.8 Ensayo de inhibición con taurina (compuesto 5.2) aislado de *Amphimedon viridis* A) contra *Chromobacterium violaceum* a concentraciones de 7.98 mM y 0.19mM, la concentración mínima a la que se observa actividad inhibitoria del QS es de 3.99 mM (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). B) Curva de crecimiento de *Chromobacterium violaceum* en presencia de 5.2, a concentraciones de 7.98 mM (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y 3.99 mM (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se observa que no afecta el crecimiento de la bacteria en ninguna de las dos concentraciones.

Las bacterias muestran diferentes tipos de motilidad, entre estas el *swimming* que se realiza a través de un medio líquido por medio de flagelos³⁸. La motilidad *swimming* puede estar contralada por sistemas de QS y es fundamental en la patogenicidad de las bacterias, pues permite la colonización del hospedero. Así, por ejemplo, en el caso de *B. glumae* la toxoflavina sola no es suficiente para que se produzca la pudrición del grano, se requiere una motilidad dependiente de flagelos para infectar eficientemente el tejido vegetal, por lo que este movimiento es fundamental en el proceso de infección³⁹. Así, se decidió valorar si los compuestos QQ son capaces de inhibir el *swimming* de *B. glumae*, para esto se siguió el procedimiento establecido por Karki 2010⁴⁰.

La cepa de *B. glumae* seleccionada para este ensayo fue *B. glumae* CIAT 4026 que es una cepa hiper productora de toxoflavina⁴¹. Se seleccionó esta cepa *wild type* porque era la que producía mayor cantidad de toxoflavina a diferencia de otras cepas con las que se cuenta

en el cepario de CIAT, como por ejemplo la cepa de referencia *B. glumae* ATCC 33617 que produce poca cantidad de toxoflavina. Adicionalmente, es importante mencionar que no se logró que ninguna de las bacterias del cepario desarrollara motilidad *swarming*, otro fenotipo asociado a la patogenicidad controlado por QS, probablemente porque en estas cepas los genes responsables de su activación no estén activados. 8

Para estos ensayos se creció la bacteria *Burkholderia glumae* CIAT 4026 en KB líquido a 37 °C hasta que alcanzó una densidad óptica de DO_{600} 0.7, luego se le añadió el compuesto a ensayar disuelto en metanol acuoso (10%) a diferentes concentraciones y se mezcló por agitación en vortex. Acto seguido, se pusieron 5µL del caldo, que contiene la bacteria con el compuesto a ensayar en diferentes cantidades, sobre la superficie del agar KB solidificado, se dejó en reposo durante 48 h y se evaluó diámetro de nado (*swimming*) frente a un blanco. Los ensayos con el complejo de halitoxina mostraron una fuerte inhibición del *swimming* cuando se aplicaron cantidades mayores de 0.75 µg (3.67 nmoles) (figura 5.9A), pudiéndose así establecer que 5.1 es capaz de inhibir el desplazamiento de esta cepa *wild type* de *Burkholderia glumae* (Figura 5.9B). Los resultados obtenidos con la taurina como inhibidor de motilidad se dieron cuando se usaron cantidades mayores a 5 µg (39.9 nmoles) (Figura 9C). La taurina (5.2) ha sido reportada como un compuesto que puede inhibir la formación del *biofilm* en *Acinetobacter oleivorans* DR1; por una reducción de señales del QS y la expresión del gen *sapA* que controla la permeabilidad de la membrana a las señales de QS. La *Acinetobacter oleivorans* DR1 es una bacteria capaz de degradar el diésel. Las células de DR1 pueden construir una biopelícula controlada por sistemas de QS en la superficie de las gotas de aceite durante la degradación del alcano, lo que afecta su degradación⁴².

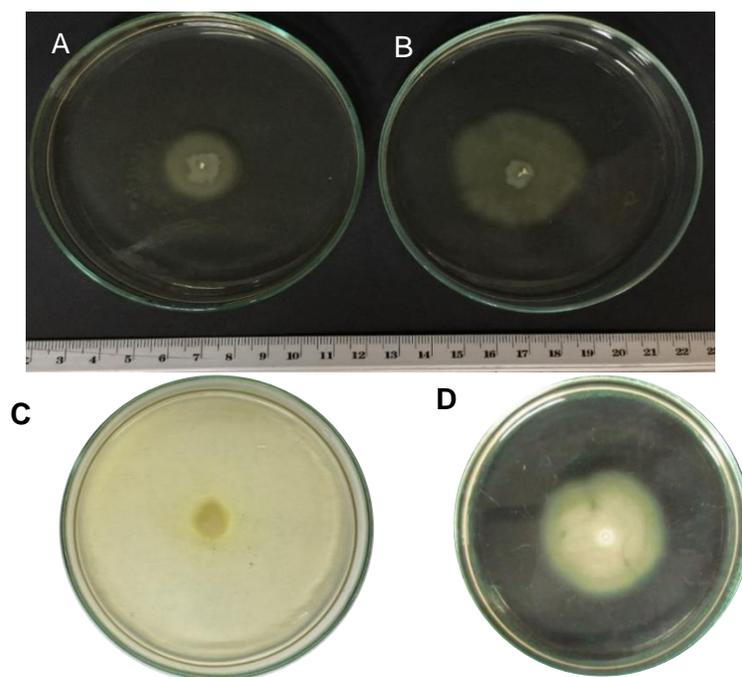


Figura 5.9 (A) Foto de la motilidad presentada por *B. glumae* CIAT 4026 en presencia del compuesto 5.1 Halitoxina cuando se aplican 3.67 nmoles (0.75 μg) del compuesto. Se puede observar que existe una disminución en el movimiento de la bacteria. (B) Foto del control que corresponde a la bacteria sin añadir ningún compuesto. (C) Motilidad que presenta *B. glumae* usando el compuesto 5.2 taurina 39.9 nmoles (5 μg) aislado de *Amphimedon viridis* y (D) control de crecimiento de bacteria sin añadir otro compuesto.

Finalmente, según Karki 2010⁴⁰ es posible predecir la virulencia de *B. glumae* sobre semillas de arroz mediante un ensayo con catafilos de cebolla. Así, en primer lugar, se determinó la toxicidad de los compuestos en un sistema *in vivo* disponiendo los compuestos 5.1 y 5.2 sobre los catafilos de cebolla en diferentes cantidades (se evaluó 125, 100 y 75 μg por pozo). Como se observa en la figura 5.11 no se afectó el catafilo de la cebolla con ninguna de las dos sustancias. Una vez determinada su no toxicidad, se procedió a realizar los ensayos usando la bacteria de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 5.5.5, en el que básicamente se dispone una alícuota del medio de cultivo con la bacteria crecida la noche anterior y con el compuesto como se ilustró para el ensayo de *swimming*. Como resultado de estos ensayos se puede observar que el compuesto 5.1 es capaz de inhibir la patogenicidad de la bacteria cuando se ponen 3 microgramos (14.70 nmoles) de él. El compuesto 5.2 no presentó actividad a la máxima cantidad usada en este ensayo 3

microgramos (23.97 nmoles), debido a que es posible ver la maceración en la cebolla al igual que en los ensayos con MeOH y la bacteria sin compuesto (Figura 5.10).

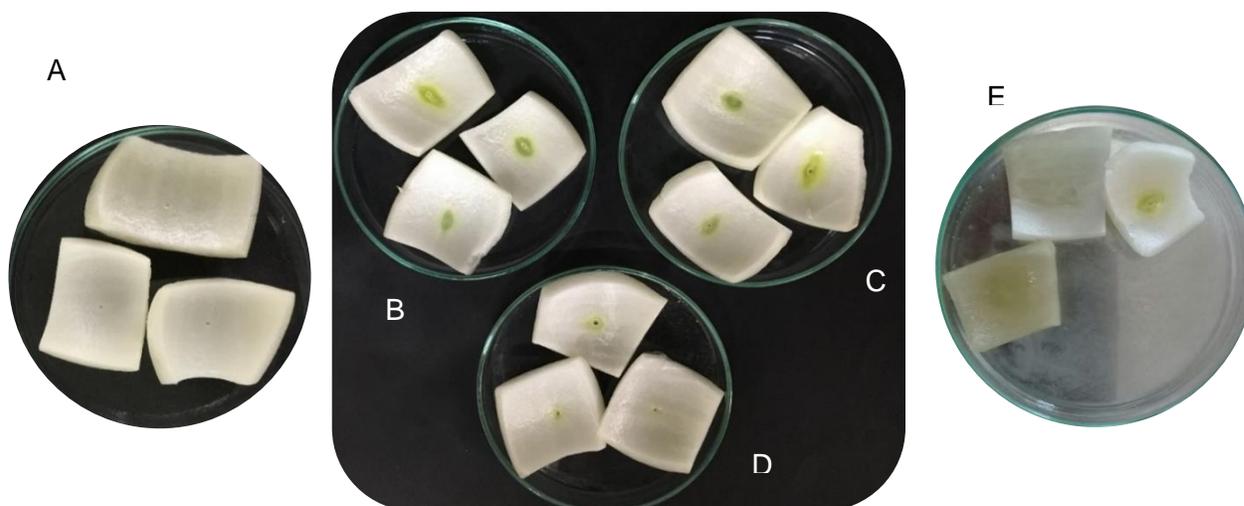


Figura 5.10 Ensayo con catafilos de cebolla para probar la actividad de los compuestos identificados del aislamiento de *Amphimedon viridis*. A) Prueba de la inocuidad del compuesto 5.1 no se observa ninguna alteración en el tejido del catafilo B) Control de bacteria en ausencia de cualquier compuesto C) Control con bacteria y metanol (solvente usado para solubilizar el compuesto) D) ensayo de actividad con halitoxina compuesto 5.1 añadiendo 3 μg (14.79 nmoles). E) Ensayo de actividad con taurina 5.2 no presenta actividad positiva al añadir 3 μg (24 nmoles).

De acuerdo a todo lo anterior halitoxina (5.1.) parece ser un buen candidato para continuar con estudios más profundos de control de fitopatógenos. El problema del suministro podría ser una barrera importante en el desarrollo de este tipo de moléculas como agentes agrícolas, no obstante, ya se han desarrollado métodos de síntesis para moléculas análogas⁴³ y su utilidad en el control del *fouling* marino ha sido probada⁴⁴, la cual se puede dar por mecanismos de QQ. Este es un punto interesante para ser abordado en estudios posteriores.

5.3 Conclusiones

El *screening* primario realizado con los extractos de varias especies de esponjas del orden Haplosclerida recolectadas en el Caribe Colombiano, permitió identificar al extracto de la esponja *Amphimedon viridis* como activo frente al biosensor *Chromobacterium violaceum*

ATCC 31532. El fraccionamiento bioguiado de su extracto permitió la obtención e identificación de la halitoxina (5.1), en la fase butanólica y la taurina (5.2), en la fase acuosa, como los compuestos responsables de la actividad.

El complejo de halitoxina (5.1) muestra una concentración mínima para la inhibición de la violaceina de 0.49 mM (100 µg/mL) frente al biosensor *Chromobacterium violaceum*. Frente al fitopatógeno *Burkholderia glumae* CIAT 4026 mostró controlar al fenotipo *swimming*, controlado por QS, cuando se usan 0.75 µg (3.67 nmoles) de compuesto y fue capaz de controlar la virulencia de *Burkholderia glumae* CIAT 4026 sobre cebolla cuando se usa una cantidad de 3 microgramos (14.70 nmoles). Para el caso de la taurina, compuesto 5.2, la inhibición de la violaceina se observó a una concentración de 3.99 mM (500 µg/mL). Frente a *B. glumae* CIAT 4026 la inhibición de la motilidad se produjo cuando se añadió 39.9 nmoles (5 µg) del compuesto. No se observa actividad con la taurina (5.2) en el ensayo de virulencia sobre cebolla cuando se trató con 23.97 nmoles (3µg) del compuesto.

Estos ensayos nos indican que se produce la inhibición de QS con los compuestos 5.1 y 5.2, aunque a concentraciones altas en comparación con las otras encontradas en este estudio. Sin embargo, se podría considerar la síntesis de estos compuestos para su aplicación en el campo agrícola. Mientras que la taurina podría ser usada en combinación con otros compuestos para potencializar su actividad, sobre todo si se considera que es compuesto que se puede conseguir en grandes cantidades por ser comercial.

5.4 Materiales y métodos

5.4.1 Procedimientos Experimentales Generales

Los análisis por RMN se hicieron en óxido de deuterio (Merck), grado de deuteración 99.9%; y MeOD-d₄ (Merck), grado de deuteración 99.8%, en un espectrómetro Bruker avance 400MHz Ultrashield RMN. Las extracciones se hicieron con diclorometano (Emparta® de Merck), metanol (Lichrosolv® de Merck) y 1-butanol (Emsure® de Merck). La cromatografía por exclusión de tamaño se hizo en una columna abierta empacada con Sephadex LH-20, usando como fase móvil de metanol (Lichrosolv® de Merck).

Los perfiles cromatográficos de las fracciones obtenidas en el estudio químico (FD, WB y WW), se obtuvieron en un equipo UHPLC-UV Dionex Ultimate 3000 Impact II Thermo Scientific, usando una columna Phenyl-Hexyl Phenomenex 00D-4500-AN KINETEX 1.7µm (dimensiones 100 x 2.1 mm) y calentando a 40°C. Se usó una elución en gradiente desde una fase móvil H₂O (0.1 % de ácido fórmico) /ACN (0,1 % de ácido fórmico) (9:1) hasta 100% de ACN en 25 minutos, manteniendo ACN 100% por 10 minutos, para un tiempo total de 35 minutos. El flujo se mantuvo a 0.5 mL/min y la presión fue de 625 bar.

Los análisis de HPLC-MS se llevaron a cabo en un equipo Agilent Technologies 1260, acoplado a un espectrómetro de masas marca Agilent Technologies 6520 Hybrid MS Q-TOF, usando ionización por electrospray (ESI) en modo positivo. Se usó una columna C-18 Zorbax Extend (2.1 mm x 50 mm; 1.8 µm; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) a 30°C. La fase móvil fue metanol/agua (9:1), con 10 mM de formiato de amonio, a un flujo de 0.2 mL/min.

Los datos de rotación específica fueron obtenidos en un polarímetro ADP440+. Los análisis de densidad óptica se hicieron en un equipo de Elisa marca Accu Reader⁺ M965mate. Para la preparación de los inóculos de los biosensores se usó un Orbital Shaker HD-3000 DIMAR termostato y agitando a 130 rpm

5.4.2 Material animal

Las especies del orden Haplosclerida listadas en la Tabla 5.3 fueron recolectadas por SCUBA e identificadas mediante caracteres morfológicos por el Dr. Sven Zea. Una vez recolectadas las muestras fueron congeladas y preservadas así hasta su análisis.

Tabla 5.3 Especies de esponjas recolectadas para el *screening* de compuestos QQ

Espece	Voucher	Lugar de colecta	Fecha
<i>Haliclona magnifica</i>	INV-POR 1349	Santa Marta	10- 04- 2014
<i>Haliclona implexiformis</i>	INV-POR 1350	Santa Marta	10- 04- 2014
<i>Haliclona vermeuleni</i>	INV-POR 1348	Santa Marta	10- 04- 2014
<i>Niphates erecta</i>	INV-POR 0144	Santa Marta	11-07-2014
<i>Amphimedon viridis</i>	INV-POR 0115	Santa Marta	10- 04- 2014
		Santa Marta	14-08-2014

5.4.3 *Screening* de actividad inhibitoria de *quorum sensing* de las cinco esponjas seleccionadas

La extracción se llevó a cabo usando dos métodos, para cada uno de ellos se emplearon 5 gramos de esponja congelada. En el primero la esponja congelada fue sometida a maceración durante 12 h con metanol, el extracto obtenido se secó y se sometió a partición liquido-liquido empleando DCM/agua, obteniendo así una fracción diclorometánica (FD) y otra acuosa (FA). En un segundo método, las esponjas congeladas se liofilizaron y luego se extrajeron con MeOH/H₂O (1:1), para ello se hizo uso de ultrasonido por 15 minutos. Este proceso se repitió tres veces. El solvente se filtró y el filtrado se concentró a presión reducida y se pesó para obtener un extracto crudo (EL). Los datos de los pesos se resumen en la tabla 5.4.

Tabla 5.4 Peso de las fracciones obtenidas para cada una de las esponjas estudiadas

ESPONJA	Peso del extracto crudo (EL) en mg	Peso de FD en mg	Peso de FA en mg
<i>Haliclona magnifica</i>	177.8	123.4	135.9
<i>Haliclona implexiformis</i>	240	140	427.4
<i>Haliclona vermeuleni</i>	199.3	126.5	481.1
<i>Niphates erecta</i>	196.1	80.9	203.2
<i>Amphimedon viridis</i>	310.4	109.2	283.7
EL. Extracto liofilizado		FD fracción de diclorometano	FA Fracción acuosa

Cada uno de los tres extractos (FA, FD y EL), para cada una de las 5 esponjas, se sometió al ensayo de inhibición de *quorum sensing* usando el biosensor *Chromobacterium*

violaceum ATCC 31532⁴⁵. La metodología del bioensayo empleada es la descrita en el numeral 5.2.5.A. Una foto de los resultados se muestra en la Figura 5.1, y los resultados se resumen en la tabla 5.1.

5.4.4 Estudio químico de *Amphimedon viridis*

La esponja *Amphiedon viridis* fue recolectada en Santa Marta, departamento Magdalena (Noreste de Colombia), en raíces de mangle a 1 m de profundidad, se seleccionó para hacer su estudio químico por ser única la esponja que mostró actividad inhibitoria de *quorum sensing* contra el biosensor *C. violaceum*.

La esponja *Amphiedon viridis* colectada (17.8 g peso húmedo) fue limpiada, liofilizada, y extraída con DCM/MeOH por tres veces con ultrasonificación durante 15 min. El extracto fue filtrado y concentrado para obtener 4.98 g de un sólido oleoso. Posteriormente, éste fue resuspendido en agua y sometido a partición con H₂O/DCM (1:1), para obtener las fracciones de diclorometano FD (0.69 g) y acuosa FA. La fracción acuosa se extrajo con BuOH obteniéndose una fracción butanólica WB (0.43 g) y una fracción acuosa residual WW (0.153 g).

La fracción butanólica WB, que es activa (Figura 5.11), fue analizada mediante HPLC-MS encontrado que se trataba de un solo pico mayoritario, cuando fue analizada por HPLC-MS se observó el mismo comportamiento. Así esta se denominó complejo 5.1.

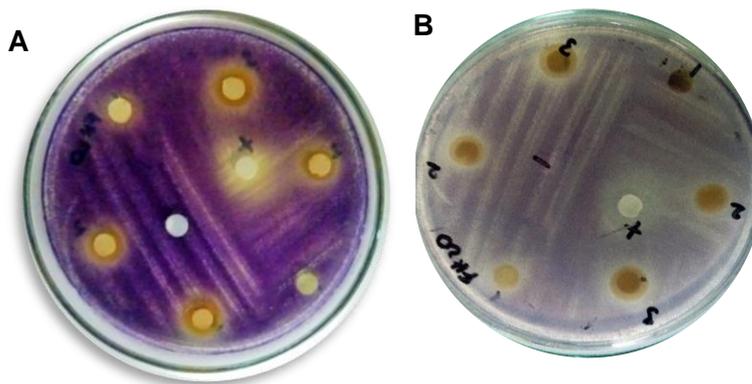


Figura 5.11 Evaluación de las fracciones de la esponja *Amphiedon viridis* frente a *C. violaceum* ATCC31532 a 300, 200 y 100 µg/disco para los números 3,2,1 respectivamente A) la fracción WB resultó activa en todas cantidades probadas y (B) WW resultó levemente activa en todas cantidades probadas. Como control positivo se usó *p*-hidroxibenzaldehído (200 µg / disco) y como control negativo metanol, que corresponde al solvente usado para disolver las fracciones.

La fracción acuosa WW (153 mg) fue separada usando un cartucho de 500 mg SPE Strata® C18-E (55 µm, 70 Å), como solvente se empleó un gradiente discontinuo ACN-H₂O, desde 1:9 hasta 1:0. Se obtuvieron 10 fracciones (WWF1-WWF10), siendo WWF1 (131.3 mg) la fracción mayoritaria. Esta fue fraccionada empleando Sephadex LH-20 (100 mm x 10 mm), con metanol a 0.5 mL/min como fase móvil, para obtener cinco fracciones (WWF1.1 a WWF1.5). Estas fracciones fueron analizadas por RMN y evaluadas en el ensayo de inhibición de *quorum sensing* con *C. violaceum* ATCC 31532. La fracción activa WWF1.4 (9.1 mg) corresponde al compuesto 5.2.

5.5.5 Ensayos biológicos

Los ensayos de inhibición de *quorum sensing* se realizaron usando extractos, fracciones y compuestos puros utilizando como biosensores las bacterias *Chromobacterium violaceum* ATCC31532 (gentilmente donado por la profesora Catalina Arévalo del departamento de Biología de la Universidad Nacional), *Burkholderia glumae* CIAT 4026 (gentilmente donado por la profesora Nubia Moreno IBUN), las cuales se caracterizan por presentar sistemas de *quorum sensing* que regulan la expresión de características fenotípicas como la producción de violaceína (*C. violaceum*), toxoflavina (*B. glumae*) y motilidad tipo *swimming* (*B. glumae*).

Las composiciones de los medios de cultivo usados se describen en los capítulos 2 y 3 de esta tesis.

A) Ensayos de inhibición de la producción violaceína en *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 con extractos y fracciones

Con el objetivo de determinar la capacidad de las muestras (extractos y fracciones) para inhibir la producción de violaceína en el biosensor *C. violaceum* ATCC31532, se llevó a cabo un ensayo de dilución en caldo modificando el propuesto por Balouiri ⁴⁵. Para ello, se usaron cajas de Petri con agar Luria Bertani (LB) sobre los cuales fueron inoculados 100 µL de una solución de *C. violaceum* (D.O_{600nm} 0.25). Inmediatamente, en cada placa se colocaron sensidiscos de papel filtro (6 mm de diámetro) en los cuales se había puesto una cantidad conocida de cada muestra a evaluar –extractos y fracciones- (300, 200 y 100 µg de muestra por disco). Estas muestras se habían transferido con metanol (90%) y luego el solvente se había dejado evaporar a temperatura ambiente, por esta razón se usó metanol

como blanco. El ensayo se realizó por triplicado para cada muestra y cantidad evaluada. Se tomó como respuesta positiva de inhibición de QS, la aparición de halos crema alrededor del disco o pozo que indiquen crecimiento bacteriano sin producción de violaceína.

B) Determinación de la concentración mínima inhibitoria del QS (MIC_{QS})

La concentración mínima inhibitoria (MIC_{QS}) para 5.1 y 5.2 se determinó haciendo uso de cajas de 96 pozos. Cada pozo fue llenado con cantidades variables de LB líquido hasta lograr el volumen de 300 μ L y mantener la concentración requerida en cada pozo. Cada pozo fue inoculado con 10 μ L de una solución de *C. violaceum* (D.O_{600nm} 0.25). Adicionalmente, los pozos se suplementaron con el compuesto a ensayar a diferentes concentraciones desde 500 μ g/mL hasta 25 μ g/mL y en el caso de la taurina de 1000 μ g/mL hasta 25 μ g/mL. Se usaron como blancos el medio de cultivo y el medio inoculado con la bacteria y 10 μ L de una solución al 10% de metanol que fue el solvente usado para solubilizar los compuestos y como control negativo se usó el medio inoculado con la bacteria. De esta forma se determinó que la MIC_{QS} para 5.1 es de 100 μ g/mL para el compuesto 5.2, mientras que para taurina la concentración fue de 500 μ g/mL.

Con el objetivo de confirmar que no se generara un efecto negativo sobre el crecimiento del biosensor se determinó la curva de crecimiento a diferentes concentraciones del compuesto ensayado. Para esto se inoculó en cajas de 96 pozos con concentraciones variables del compuesto a probar solubilizado en metanol al 5%, a este se le añadió 10 μ L de inóculo de la bacteria con una DO₆₀₀ de 0.25 y se le completó con medio LB hasta alcanzar un volumen de 300 μ L en cada pozo. A continuación, se realizaron medidas del crecimiento de la bacteria midiendo su densidad óptica cada tres horas usando un equipo de ELISA a 600 nm. Los datos se registraron y se usaron para graficar la curva de crecimiento por 24 horas. Las concentraciones a evaluar fueron seleccionadas con base al dato obtenido en el MIC_{QS}. Los resultados obtenidos fueron comparados contra un control negativo el cual no fue suplementado con ningún compuesto. Las diferencias significativas entre los tratamientos se determinaron mediante ANOVA usando un post test de Dunnett ($p < 0.01$).

C) Ensayo de inhibición de *swimming* en *Burkholderia glumae*

Para determinar si el compuesto es capaz de inhibir la motilidad de la bacteria se realizaron diferentes ensayos, siguiendo la metodología propuesta por Karki 2010⁴⁰ con ligeras modificaciones.

El inóculo de *Burkholderia glumae* CIAT 4026 se preparó en KB líquido hasta que alcanzó una densidad de $D.O_{600nm}$ 0.7, a 37 C. Luego, al cultivo de la bacteria se le añade la cantidad necesaria de una solución del compuesto a 2mg/mL para obtener concentraciones finales de 5.1 de 300, 200, 150 y 100 $\mu\text{g/mL}$ y para 5.2 de 1000, 500, 300, 200 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Como control negativo se evaluó el comportamiento de la bacteria en ausencia de los compuestos.

Se prepararon placas de agar KB solidificado con 0.3% de agar (Composición por cada litro de agua: Peptona 20 g; Cloruro de magnesio 1.5 g sulfato de potasio 1.5 g; Agar 4.5 g y glicerol 10 mL) y se dejaron solidificar durante 15 min. Posteriormente, en el centro se dejaron caer, haciendo una pequeña incisión sobre el agar, 5 μL del inóculo de la bacteria *Burkholderia glumae* CIAT 4026 ($D.O_{600nm}$ = 0.7) y el compuesto a diferentes concentraciones, que habían sido previamente preparado. La actividad se determinó comparando el diámetro del movimiento que presenta en la cepa *wild type* en presencia y ausencia del compuesto a evaluar. Si la bacteria no se movía, o lo hacía significativamente menos, el compuesto se clasifica como inhibidor del QS. Las fotografías del ensayo se muestran en la figura 5.9 y 5.10

D) Ensayo con catafilos de cebolla

El inóculo de *Burkholderia glumae* CIAT 4026 se preparó en KB líquido hasta que alcanzó una densidad de $D.O_{600nm}$ 0.5, a 37 C. Luego, al cultivo de la bacteria se le añade la cantidad necesaria de una solución metanólica al 10% del compuesto a 2mg/mL para obtener concentraciones finales de 5.1 de 1000, 500 y 300 $\mu\text{g/mL}$ y para 5.2 de 1000 y 500 $\mu\text{g/mL}$. Los catafilos de cebolla se cortaron con un cuchillo estéril en pedazos con un tamaño aproximado de 2 X 3 cm. En cajas Petri estériles se colocan de 2 a 3 catafilos a los que se les hace una pequeña incisión con una punta estéril de 10 μL , en el orificio que se forma se coloca 3 μL de una solución de la bacteria y el compuesto. Las cajas con el inóculo se tapan y se colocan en una cámara húmeda preparada en una caja de plástico estéril y cubierta con papel toalla húmedo. Esta se cierra herméticamente usando vinipel, evitando realizar movimientos bruscos que modifiquen el ensayo. Se incubó por 36 horas a 30°C en una incubadora. El grado de virulencia se determinó midiendo el área macerada en el catafilo

5.5 Agradecimientos

SJNG. Agradece a la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación (SENESCYT) Ecuador por el financiamiento de la beca (2012-2). A la Universidad de las Fuerzas Armadas Ecuador por la comisión de servicios para realizar sus estudios doctorales.

Agradecemos al proyecto Colciencias-ECOS Nord No. C15U01 por el apoyo económico y logístico brindado durante mi estancia en Niza-Francia.

5.6 Bibliografía

- (1) Diaz, M. C.; Rützler, K. Sponges: An Essential Component of Caribbean Coral Reefs. *Bull. Mar. Sci.* 2001, 69 (2), 535–546.
- (2) Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R. Marine Natural Products. *Nat. Prod. Rep.* 2017, 34 (3), 235–294.
- (3) Tribalat, M.-A.; Marra, M. V.; McCormack, G. P.; Thomas, O. P. Does the Chemical Diversity of the Order Haplosclerida (Phylum Porifera: Class Demospongia) Fit with Current Taxonomic Classification? *Planta Med.* 2016, 82 (09/10), 843–856.
- (4) Berlinck, R. G. S.; Ogawa, C. A.; Almeida, A. M. P.; Sanchez, M. A. A.; Malpezzi, E. L. A.; Costa, L. V.; Hajdu, E.; De Freitas, J. C. Chemical and Pharmacological Characterization of Halitoxin from *Amphimedon Viridis* (Porifera) from the Southeastern Brazilian Coast. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 1996, 115 (2), 155–163.
- (5) Mioso, R.; Marante, F.; Bezerra, R.; Borges, F.; Santos, B.; Laguna, I. Cytotoxic Compounds Derived from Marine Sponges. A Review (2010–2012). *Molecules* 2017, 22 (208), 1–34.
- (6) Tsukamoto, S.; Takahashi, M.; Matsunaga, S.; Fusetani, N.; van Soest, R. W. M. Hachijodines A–G: Seven New Cytotoxic 3-Alkylpyridine Alkaloids from Two Marine Sponges of the Genera *Xestospongia* and *Amphimedon* 1. *J. Nat. Prod.* 2000, 63 (5), 682–684.
- (7) Takekawa, Y.; Matsunaga, S.; Soest, R. W. M. van; Fusetani, N. Amphimedosides, 3-Alkylpyridine Glycosides from a Marine Sponge *Amphimedon* Sp. *J. Nat. Prod.* 2006, 69 (10), 1503–1505.
- (8) Schmitz, F. J.; Agarwal, S. K.; Gunasekera, S. P.; Schmidt, P. G.; Shoolery, J. N. Amphimedine, New Aromatic Alkaloid from a Pacific Sponge, *Amphimedon* Sp. Carbon Connectivity Determination from Natural Abundance Carbon-13-Carbon-13 Coupling Constants. *J. Am. Chem. Soc.* 1983, 105 (14), 4835–4836.
- (9) Prager, Rolf. Tsopelas, Chris. Heisler, T. A Simple Synthesis of Amphimedine. *J. Chem. Res.* 1992, 44, 277–285.
- (10) Nakahara, S.; Tanaka, Y.; Kubo, A. Total Synthesis of Amphimedine. *Heterocycles* 1996, 43 (10), 2113–2123.
- (11) Kelman, D.; Kashman, Y.; Hill, R. T.; Rosenberg, E.; Loya, Y. Chemical Warfare in the Sea: The Search for Antibiotics from Red Sea Corals and Sponges. *Pure Appl. Chem.* 2009, 81 (6), 1113–1121.
- (12) Asfour, H. Z. Anti-Quorum Sensing Natural Compounds. *J. Microsc. Ultrastruct.* 2017.
- (13) Adonizio, A. L.; Downum, K.; Bennett, B. C.; Mathee, K. Anti-Quorum Sensing Activity of Medicinal

Amphimedon viridis

- Plants in Southern Florida. *J. Ethnopharmacol.* 2006, 105 (3), 427–435.
- (14) Gañan Betancur, L. Manejo Integrado Del Añublo Bacterial de La Panícula de Arroz (*Oryza Sativa* L.) Causado Por *Burkholderia Glumae*. *ResearchGate* 2016, 19(2) (November 2011), 79–90.
- (15) Chung, J.; Goo, E.; Yu, S.; Choi, O.; Lee, J.; Kim, J.; Kim, H.; Igarashi, J.; Suga, H.; Sun Moon, J.; et al. Small-Molecule Inhibitor Binding to an *N*-Acyl-Homoserine Lactone Synthase. *PNAS* 2011, 10 (29), 12089–12094.
- (16) Suga, Hiroaki. Igarashi, T. United States Patent. US 8,507,674 B2, 2011.
- (17) Andersen, R. J.; Van Soest, R. W. M.; Kong, F. Chapter Three 3-Alkylpiperidine Alkaloids Isolated from Marine Sponges in the Order Haplosclerida. *Alkaloids Chem. Biol. Perspect.* 1996, 10, 301–355.
- (18) Van Soest, R.W.M; Boury-Esnault, N.; Hooper, J.N.A.; Rützler, K.; de Voogd, N.J.; Alvarez, B.; Hajdu, E.; Pisera, A.B.; Manconi, R.; Schönberg, C.; Klautau, M.; Picton, B.; Kelly, M.; Vacelet, J.; Dohrmann, M.; Díaz, M.-C.; Cárdenas, P.; Carballo, J. L., R. World Porifera Database <http://www.marinespecies.org/porifera/index.php> (accessed Aug 17, 2017).
- (19) Kelman, Dovi. Kashman, Yoel. Rosenberg Eugene. Ilan Micha. Ifrach Ilan. Loya, Y.; Kelman, D.; Kashman, Y.; Rosenberg, E.; Ilan, M.; Ifrach, I.; Loya, Y. Antimicrobial Activity of the Reef Sponge *Amphimedon Viridis* from the Red Sea: Evidence for Selective Toxicity. *Aquat. Microb. Ecol. Aquat Microb Ecol* 2001, 24 (1), 9–16.
- (20) Hirsch, S. Kashman, Y. New Glycosphingolipids from Marine Organisms. *Tetrahedron* 1989, 45 (1), 3897–3906.
- (21) Li, H.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. Antifungal Metabolites from Marine Sponges. In *Current Organic Chemistry*, Bentham Science Publishers, 1998; pp 649–682.
- (22) Chehade, C. C.; Dias, R. L. A.; Berlinck, R. G. S.; Ferreira, A. G.; Costa, L. V.; Rangel, M.; Malpezzi, E. L. A.; De Freitas, J. C.; Hajdu, E. 1,3-Dimethylisoguanine, a New Purine from the Marine Sponge *Amphimedon Viridis*. *J. Nat. Prod.* 1997, 60 (7), 729–731.
- (23) Mitchell, S. S.; Whitehill, A. B.; Trapido-Rosenthal, H. G.; Ireland, C. M. Isolation and Characterization of 1,3-Dimethylisoguanine from the Bermudian Sponge *Amphimedon Viridis*. *J. Nat. Prod.* 1997, 60 (7), 727–728.
- (24) Turk, T.; Sepčić, K.; Mancini, I.; Guella, G. 3-Akylpyridinium and 3-Alkylpyridine Compounds from Marine Sponges, Their Synthesis, Biological Activities and Potential Use. *Stud. Nat. Prod. Chem.* 2008, 35 (C), 355–397.
- (25) Kupchan, S. M.; Britton, R. W.; Ziegler, M. F.; Sigel, C. W. Bruceantin, a New Potent Antileukemic Simaroubolide from *Brucea Antidysenterica*. *J. Org. Chem.* 1973, 38 (1), 178–179.
- (26) Anta, C.; González, N.; Santafé, G.; Rodríguez, J.; Jiménez, C. New Xenia Diterpenoids from the Indonesian Soft Coral *Xenia* Sp. *J. Nat. Prod.* 2002, 65 (5), 766–768.
- (27) Schmitz, F. J.; Hollenbeak, K. H.; Campbell, D. C. Marine Natural Products: Halitoxin, Toxic Complex of Several Marine Sponges of the Genus *Haliclona*. *J. Org. Chem.* 1978, 43 (20), 3916–3922.
- (28) Scott, R. H. H.; Whyment, A. D. D.; Foster, A.; Gordon, K. H. H.; Milne, B. F. F.; Jaspars, M. Analysis of the Structure and Electrophysiological Actions of Halitoxins: 1,3 Alkyl-Pyridinium Salts from *Callyspongia Ridleyi*. *J. Membr. Biol.* 2000, 176 (2), 119–131.
- (29) Andersen, R.; Williams, D. Pharmaceuticals from the Sea. *Chem. Mar. Environment* 2000, No. 13, 55–79.
- (30) Freitas, J. C. Malpezzi, E. L. A.; Costa, L. V. Berlinck, R. G. S.; Almeida, A. M. P. Ogawa, C. A.; Sanchez, M. A. A. Hajdu, E. M. *Cytotoxic and Neurotoxic Effects Induced by Halitoxin Isolated from*

Amphimedon viridis

Amphimedon Viridis (*Porifera*); Pergamon Press, 1996; Vol. 3.

- (31) Albrizio, S.; Ciminiello, P.; Fattorusso, E.; Magno, S.; Pawlik, J. R. Amphitoxin, a New High Molecular Weight Antifeedant Pyridinium Salt from the Caribbean Sponge *Amphimedon Compressa*. *J. Nat. Prod.* 1995, 58 (5), 647–652.
- (32) Baslow, M. H.; Turlapaty, P. In Vivo Antitumor Activity and Other Pharmacological Properties of Halitoxin Obtained from the Sponge *Haliclona Viridis*. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1969, 12, 6–8.
- (33) Wishart, DS; Jewison, T; Guo, AC; Wilson, M; Knox, C. et al. The Human Metabolome Database: in 2013. *Nucleic Acids Res.* <http://www.hmdb.ca/> (accessed Aug 30, 2017).
- (34) Tasdemir, D.; Topaloglu, B.; Perozzo, R.; Brun, R.; O'Neill, R.; Carballeira, N. M.; Zhang, X.; Tonge, P. J.; Linden, A.; Rüedi, P. Marine Natural Products from the Turkish Sponge *Agelas Oroides* That Inhibit the Enoyl Reductases from *Plasmodium Falciparum*, *Mycobacterium Tuberculosis* and *Escherichia Coli*. *Bioorganic Med. Chem.* 2007, 15 (21), 6834–6845.
- (35) Wang, Weihong; Lee, Yoon Mi; Hong, Jongki; Lee, Chong-OK; Park, Jong Hee; Jug, J. H. New Taurine Derivatives from a Starfish and a Sponge. *Nat. Prod. Sci.* 2003, 9 (4), 241–244.
- (36) Smyley, D W; Wilkinson, B. J. Survey of Taurine Uptake and Metabolism in *Staphylococcus Aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 1983, 129, 2421–2428.
- (37) Grandclément, C.; Tannières, M.; Moréra, S.; Dessaux, Y.; Faure, D. Quorum Quenching: Role in Nature and Applied Developments. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015, 40 (1), 86–116.
- (38) Moens, S.; Vanderleyden, J. Functions of Bacterial Flagella. *Crit. Rev. Microbiol.* 1996, 22 (2), 67–100.
- (39) Kim, J.; Kang, Y.; Choi, O.; Jeong, Y.; Jeong, J.-E.; Lim, J. Y.; Kim, M.; Moon, J. S.; Suga, H.; Hwang, I. Regulation of Polar Flagellum Genes Is Mediated by Quorum Sensing and FlhDC in *Burkholderia Glumae*. *Mol. Microbiol.* 2007, 64 (1), 165–179.
- (40) Karki, H. S. Physiological, Biochemical and Molecular Characteristics Associated with Virulence of *Burkholderia Glumae*: The Major Causative Agent of Bacterial Panicle Blight of Rice, Louisiana State University, 2010.
- (41) Beltrán-Molina, Jorge; Cuellar-Cuestas, Carolina; Suárez-Moreno, Z. Diagnóstico Y Epidemiología: Nuevas Estrategias de Estudio de Las Enfermedades Bacterianas Del Arroz En Colombia. *Rev. Arroz* 2006, 61 (507), 4–23.
- (42) Eom, H. J.; Park, W. Inhibitory Effect of Taurine on Biofilm Formation During Alkane Degradation in *Acinetobacter Oleivorans* DR1. *Microb. Ecol.* 2017.
- (43) Timm, C.; Mordhorst, T.; Kück, M. Synthesis of 3-Alkyl Pyridinium Alkaloids from the Arctic Sponge *Haliclona Viscosa*. *Mar. Drugs* 2010, 8 (3), 483–497.
- (44) Fusetani, N. Biofouling and Antifouling. *R. Soc. Chem.* 2004, 21 (October 2003), 94–104.
- (45) Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibnsouda, S. K. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *J. Pharm. Anal.* 2016, 6 (2), 71–79.

6. Capítulo 6: Estudio metabolómico (*fingerprinting*) de hojas de curubas (*Passiflora*, subgénero *Tacsonia*) y su correlación con la actividad inhibitoria de *quorum sensing*



Leonardo Castellanos^{1,2}, Sandra Judith Naranjo-Gaybor^{1,3}, Erica Georgina Wilson², Gustavo Morales¹, Abel Mateo Forero,¹ Freddy A. Ramos¹, Young Hae Choi²

¹ *Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Cra. 30 N° 45-03, Bogotá D.C., Colombia*

² *Natural Products Laboratory, Institute of Biology, Leiden University, Sylviusweg 72, 2333 BE Leiden, The Netherlands*

³ *Universidad de las Fuerzas Armadas. ESPE Carrera de Ingeniería Agropecuaria Extensión Santo Domingo. Av. General Rumiñahui s/n Sangolquí- Ecuador*

[Este capítulo está basado en el artículo del mismo nombre sometido a la revista *Phytochemistry*](#)

Resumen

Las curubas son plantas que pertenecen al género *Passiflora* (subgénero *Tacsonia*) y son apetecidas, principalmente, por sus frutos comestibles. Son plantas que se cultivan comercialmente a pequeña-mediana escala, no obstante, muchas son silvestres no domesticadas. Algunas especies de *Passiflora* se han usado tradicionalmente en la medicina popular de varios países y sus actividades han sido aprobadas por las farmacopeas de Brasil y España como sedantes y ansiolíticos. También presentan propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas. Este subgénero comprende un gran número de especies cuyo perfil químico aún no ha sido estudiado, a pesar de su alto valor comercial.

En este estudio, se realizó el perfilado metabolómico del extracto polar de las hojas de seis especies silvestres del sub género *Tacsonia* y una adicional del subgénero *Passiflora*, mediante RMN ^1H . Los datos permitieron detectar un total de 53 compuestos en las siete especies analizadas, incluyendo dos flavonoides nuevos apigenina-4-O- β -glucopiranosil-8-C- β -neohesperidósido (6.1) y apigenina-4'-O- β -glucopiranosil-8-C- β -(6''acetil)-glucopiranosido (6.2), junto con 26 O- y C- flavonoides glicosidados (6.3 – 6.28), siete ácidos orgánicos, nueve aminoácidos, GABA, seis polifenoles, sacarosa, glucosa, mioinositol y seis compuestos misceláneos. Las estructuras propuestas de los flavonoides C y O- glicosidados fueron confirmados por su aislamiento seguido de análisis por RMN y HRMS.

Los *score plots* del PCA obtenidos para los datos de RMN ^1H permitieron confirmar que *P. lehmannii* (subgénero *Passiflora*) es un outlier del grupo e identificar a *P. cumbalensis* y *P. uribei* como las especies con las mayores diferencias de perfil químico de las muestras estudiadas de *Tacsonia*. Adicionalmente, los datos de RMN ^1H fueron correlacionados mediante un OPLS-DA con los resultados de los ensayos de actividad de *quorum quenching* (QQ), usando la cepa productora de homoserinlactonas (AHL) *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Este análisis mostró que los extractos más activos fueron aquellos de *Passiflora lehmannii* Mast. *P. uribei* L.K. Escobar y *P. cumbalensis* que la actividad IQS se correlaciona con la presencia de flavonoides. Se realizaron los ensayos de estos flavonoides frente a *C. violaceum* ATCC 31532 y se encontró que los activos corresponden

a los de las especies *P. lehmannii* (6.1) y *P. uribei* (6.2) a una concentración de 0.135 mM (100 µg/mL) para el compuesto (6.1) y de 0.472 mM (300 µg/mL) para el compuesto 6.2.

Adicionalmente, estos dos compuestos fueron evaluados por su actividad QQ frente al fitopatógeno *Burkholderia glumae* ATCC 33617 en cuanto a su producción de toxo flavina, y motilidad *swimming*. En el ensayo de movilidad *swimming* frente a *B. glumae*, sólo el compuesto (6.1) demostró actividad cuando se añadieron 2.02 nmoles (1.5 µg) del compuesto, los otros no controlaron este fenotipo.

Adicionalmente, se realizaron ensayos en catafilos de cebolla con la finalidad de probar los compuestos en un modelo que simula la virulencia del patógeno en granos de arroz. De este se logró determinar que los dos compuestos son inocuos para los cultivos y además pueden ser usados como una alternativa en el control de fitopatógenos, debido a que actúan a muy bajas cantidades, a saber, el compuesto 6.1 es activo con 1.21 nmol (0.9 µg) y el compuesto 6.2 con 1.41 nmoles (0.9 µg).

Este estudio presenta usos potenciales para los residuos de los cultivos de *Passiflora*, haciéndolos aprovechables.

Palabras claves: *Passiflora*, *Tacsonia*, frutos de curuba, metabolómica, *quorum quenching*, correlación metabolitos-actividad

6.1 Introducción

El norte de los Andes, particularmente Colombia y Ecuador, constituye el centro de la diversidad del género *Passiflora*¹. Las propiedades medicinales de las infusiones de hojas de algunas especies como *P. incarnata*, *P. alata* y *P. foetida* han sido ampliamente descritas, y pueden ser consultadas en múltiples revisiones como las de Gladioli 2016 e Ingale, 2010^{2,3}. Los estudios químicos realizados con especies de *Passiflora* han permitido identificar flavonoides-C-glicosidados, saponinas triterpenoidales como los componentes mayoritarios y otros componentes minoritarios como aminoácidos, alcaloides y glucósidos cianogénicos^{2,4}. Los flavonoides C-glicosidados han mostrado actividad antioxidante, anticancerígena y antitumoral, hepato protectora, antiinflamatoria, antidiabética, antiviral, antibacteriana y antifúngica² como también interrupción del *quorum sensing*⁵. De otro lado, se ha planteado que las saponinas son producidas por las plantas como defensas naturales, protegiéndolas contra el ataque de posibles patógenos⁶ y han mostrado ser insecticidas, antibióticos, fungicidas y poseer propiedades farmacológicas como antiinflamatoria,

hipocolesterolemia, inhibidora de xantina oxidasa, anti-fúngica, anti-protozoaria, antimicrobiana, anti nociceptivo, antitumoral, entre otras ⁷.

Las curubas pertenecen al subgénero *Tacsonia* (género *Passiflora*) y crecen únicamente en los Andes suramericanos. Esta región cuenta con más de 50 especies de este subgénero, las cuales crecen por encima de los 2000 metros de altitud y se caracterizan por ser productoras de frutas exóticas comestibles, con alta acogida en los mercados locales y extranjeros. Por lo anterior, estos cultivos son una alternativa interesante para los pequeños cultivadores en los altos Andes⁸. Las especies de *Tacsonia* con cultivos más extendidos incluyen: *P. tripartita* var. *mollissima* (Kunth) Holm-Niels. & P. Jørg. (curuba de castilla), *P. tarminiana* Coppens & V.E. Barney (curuba india), *P. cumbalensis* (Karst) Harms (nombre en inglés: *rosy passion fruit*), *P. pinnatistipula* Cav. (tintin) y *P. mixta* L. (curuba de indio o curuba de monte). *P. tarminiana* es apreciada por los agricultores porque es resistente a la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*)⁹. Las otras especies son comúnmente encontradas en ambientes silvestres y huertos caseros, pero no es muy común su cultivo a mediana o gran escala.

La curuba de castilla (*P. tripartita* var. *mollissima*) es la especie más valorada por los consumidores debido a sus propiedades organolépticas y es una de las especies aprobadas como sedante en Colombia¹⁰. Junto con estos usos fitomedicinales ya descritos, las especies del subgénero *Tacsonia* pueden tener otras aplicaciones incluyendo la presencia de compuestos *quorum quenchers*. Las bacterias usan señales de *quorum sensing* (QS) para coordinar y sincronizar varios comportamientos para dar respuesta a diferentes ambientes¹¹; además de regular muchos procesos relacionados con el metabolismo¹². La expresión de algunos fenotipos relacionados con virulencia dependen del QS y muchas bacterias patógenas de plantas contienen este tipo de sistemas, produciendo la enfermedad en la planta hospedera^{13,14}. A modo de ejemplo, es ampliamente reconocido que la producción de la toxoflavina, una fitotoxina, por parte de *Burkholderia* spp es controlada por un sistema de QS, siendo un factor de patogenicidad clave en la marchitez vascular del arroz¹⁵. La diversidad biológica del subgénero *Tacsonia* es muy amplia y su diversidad química no ha sido estudiada.

En un estudio de múltiples especies usar un enfoque basado en el aislamiento bio guiado de compuestos, resulta ser un proceso lento con la recuperación de un número bajo de compuestos. Lo anterior es un cuello de botella en el estudio de productos naturales. En este marco, surge la metabolómica, que es una técnica analítica y de análisis multivariado,

como alternativa para perfilar globalmente los metabolitos de bajo peso molecular de plantas y otros organismos, sin que sea necesario su aislamiento, haciendo de ésta una aproximación apropiada para la comparación de múltiples especies. Adicionalmente, la metabolómica es una herramienta efectiva para facilitar el descubrimiento de compuestos bioactivos, por medio de la comparación multivariada de extractos activos e inactivos¹⁶. Diferentes herramientas analíticas pueden ser usadas en metabolómica, siendo las más comunes el HPLC-MS y RMN- ¹H. La ventaja de la última es la alta reproducibilidad y la facilidad para cuantificar, donde la intensidad de la señal es directamente relacionada con la concentración molar¹⁷ y no está sesgada por la estructura química de los compuestos analizados. Adicionalmente, la preparación de la muestra es sencilla y su interpretación puede llevar a la identificación inequívoca de los compuestos del extracto, aún en mezcla.

El objetivo de este estudio fue comparar los perfiles metabólicos de especies de *Tacsonia* colectados en los Andes Colombianos para correlacionar su perfil químico con su actividad inhibitoria del *quorum sensing*, con el fin de darle un nuevo uso potencial a los residuos de hojas. Para alcanzar este propósito se realizó el estudio metabolómico de seis especies de curuba, seleccionando las especies más representativas de este subgénero y una séptima perteneciente a otro subgénero como control. La estrategia usada incluyó una aproximación no direccionada (*non-target*) usando análisis de RMN para identificar los compuestos mayoritarios¹⁸ y cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UPLC-EM) para confirmar la identidad de los flavonoides C-glicosidados¹⁹. La actividad inhibitoria de QS de los extractos crudos de las hojas de *Passiflora* fueron evaluados con el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 y con esta información fue posible relacionar la respuesta de la bioactividad con la composición del extracto *Passiflora* e identificar los compuestos responsables de la actividad. Los compuestos purificados fueron evaluados frente al fitopatógeno *Burkholderia glumae* ATCC 33617, que controla mediante sistemas de QS la expresión de algunos factores de virulencia, como la producción de toxo flavina y la motilidad *swimming*.

6.2 Resultados y discusión

Las muestras del subgénero *Tacsonia* fueron colectadas en las regiones central y sur de los Andes Colombianos. Todas las muestras son silvestres y no se usaron muestras de cultivo debido a que la mayoría de ellas corresponden a híbridos y para evitar sesgos en la comparación (Tabla 6.1). Las muestras fueron identificadas mediante sus caracteres morfológicos por el biólogo Gustavo Morales, los vouchers fueron depositados en la colección del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia como se reporta en la Tabla 6.1. En todos los casos se registraron los datos de altitud, longitud, y latitud, además de la fecha de recolección. Los *fingerprints* de cada muestra fueron obtenidos mediante RMN-¹H, realizando un análisis no dirigido buscando tener un rango amplio de metabolitos con diferentes polaridades²⁰. Las bases de datos de *Leiden Natural Products Laboratory*, the *Chenomx NMR Suite 8.2* (Chenomx Inc., Edmonton, Alberta, Canada) y *Human Metabolome Database* (HMDB) fueron usadas para la identificación de varios compuestos en mezcla. Para incrementar la sensibilidad del análisis de los flavonoides los extractos butanólicos de cada una de las especies seleccionadas se analizaron mediante HPLC-MS cuyos datos son útiles para identificación de los flavonoides propuestos por RMN. Para establecer la relación entre la composición química de las especies y la actividad QQ del extracto se realizaron diversos análisis multivariados (MVDA) incluyendo el análisis de componentes principales (PCA) y OPLS.

Tabla 6.1 Datos de colección de especies del subgénero *Tacsonia* “curuba”

Especies colectadas de <i>Passiflora</i>	Subgéneros (Sección / series)	Voucher	Número de muestras
<i>Passiflora tripartita</i> var. <i>mollissima</i> (Kunth) Holm-Niels & P. Jørg	<i>Tacsonia</i> (Bracteogama)	COL599223	7
<i>P. tripartita</i> (Juss.) Poir. var. <i>tripartita</i>	<i>Tacsonia</i> (Bracteogama)	COL599245	1
<i>Passiflora cumbalensis</i> var. <i>Goudotiana</i> (H. Karst) Harms	<i>Tacsonia</i> (Bracteogama)	COL599225	10
<i>Passiflora tarminiana</i> Coppens & V.E. Barney	<i>Tacsonia</i> (Bracteogama)	COL599247	13
<i>Passiflora mixta</i> L. f.	<i>Tacsonia</i> (<i>Tacsonia</i>)	COL599246	12
<i>Passiflora pinnatistipula</i> Cav.	<i>Tacsonia</i> (<i>Colombiana/Poggendorffia</i>)	S/catalogar	3
<i>Passiflora uribei</i> L.K. Escobar	<i>Tacsonia</i> (<i>Colombiana/Fimbriatistipula</i>)	S/catalogar	3
<i>Passiflora lehmannii</i> Mast	<i>Passiflora</i> (<i>Tiliaefolia</i>)	COL599222	2

**P. lehmannii* no es una especie *Tacsonia* (curuba) sino del subgénero *Passiflora*, más similar a las granadillas

6.2.1 Fingerprint de especies de *Tacsonia*

Las hojas de *Passiflora* secas y congeladas fueron liofilizadas y luego extraídas usando CH₃OH-*d*₄-buffer KH₂PO₄ en D₂O a pH 6 (1:1, v/v), MD6. Este extracto contiene un amplio rango de metabolitos, incluidos azúcares, aminoácidos, saponinas y flavonoides. Los cuales corresponden a los principales compuestos reportados para especies de *Passiflora*. Todos los extractos fueron directamente analizados por RMN ¹H (600 MHz) y los espectros fueron procesados con TopSpin™ y los datos exportados a SIMCA™ para su análisis por métodos multivariados. Los espectros de RMN ¹H obtenidos fueron dereplicados mediante Chenomx™, usando tanto la librería del software como la librería *in-house* del *Leiden laboratory of Natural Products*; adicionalmente, se usaron datos de literatura. Debido a la superposición de señales de protones, la identidad de los compuestos propuestos fue verificada mediante el análisis de los experimentos de 2D-RMN (*J*-resolved; ¹H-¹H-correlated spectroscopy –COSY- y *heteronuclear multiple bond correlation* HMBC). Los datos completos de RMN se presentan en los anexos tanto para los flavonoides como para los otros compuestos identificados (Tabla S6.1 y S6.2 Figura S6.1, S6.2 y S6.3).

Los espectros de RMN ^1H de los extractos de las diferentes muestras *Passifloras* son muy similares entre sí, particularmente entre 0-6 ppm. En todos los casos se observan regiones que permiten identificar la presencia de aminoácidos, carbohidratos y flavonoides como se presenta en la Figura 6.1a. La mayor diferencia entre las diferentes especies estudiadas se presenta en la región aromática, sugiriendo una composición de flavonoides y otros compuestos polifenólicos diferente para cada especie (Figura. 6.1b). En la figura S6.4 del anexo se puede observar la asignación de las señales para *P. tarminiana*. Es importante notar que los espectros de las réplicas de cada uno de los extractos son muy similares entre sí, al menos visualmente, pero para poder juzgar esto de manera fiable se debe hacer análisis multivariado, como se ilustrará en la sección [6.2.2](#).

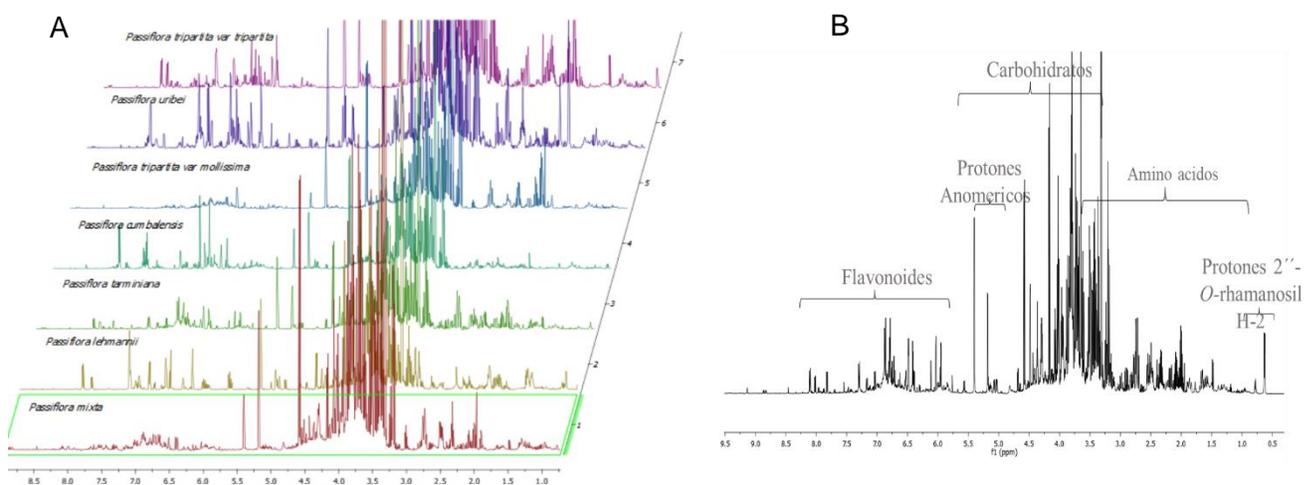


Figura 6.1 A) Compilado de los extractos de hoja de las especies del subgénero *Tacsonia*, se presenta la ampliación de la región de protones aromáticos. B). Espectro RMN ^1H de extracto de *P. tarminiana* y principales tipos de compuestos identificados

Mediante los análisis de RMN y las técnicas de de-replicación se identificaron siete ácidos orgánicos, nueve amino ácidos, GABA, sacarosa, glucosa, mioinositol y cinco compuestos misceláneos (Fig 6.2). Su identificación y distribución en las especies evaluadas se presenta en el *barcoding* de metabolitos primarios de la figura 6.2. Se puede observar que las especies que contienen los extractos más complejos son: *P. tarminiana*, *P. cumbalensis*, *P. tripartita var mollissima* y *P. tripartita var tripartita*, mientras los menos complejos fueron *P. uribei* y *P. lehmannii*, incluida en este estudio como un *out layer*. El contenido de azúcares, polihidroxi-alcoholes y misceláneos es muy similar en los siete extractos, mientras

el contenido de los ácidos orgánicos y amino ácidos no presenta ningún patrón evidente (Figura 6.3).

COMPUESTO	<i>P. tripartita</i> var. <i>tripartita</i>	<i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	<i>P. tarminiana</i>	<i>P. mixta</i>	<i>P. cumbalensis</i>	<i>P. uribei</i>	<i>P. pinnatistipula</i>	<i>P. lehmannii</i>
Ácidos orgánicos								
Ácido acético 6.a1								
Ácido ascórbico 6.a2								
Ácido cítrico 6.a3								
Ácido fórmico 6.a4								
Ácido glutámico 6.a5								
Ácido málico 6.a6								
Ácido piperónico 6.a7								
Ácido shikímico 6.a8								
Ácido succínico 6.a9								
GABA 6.a10								
Aminoácidos								
Alanina 6.a11								
Glutamina 6.a12								
Leucina 6.a13								
Prolina 6.a14								
Treonina 6.a15								
Tirosina 6.a16								
Valina 6.a17								
Azúcares								
Glucosa 6.a18								
Sacarosa 6.a19								
Mio-inositol 6.a20								
Misceláneos								
Colina 6.a21								
Etanol 6.a22								
Putrescina 6.a23								
Trigonelina 6.a24								
5-carboximetil-2,5-dihidrofuran-2-ona 6.a25								

Figura 6.2 *Barcoding* de metabolitos primarios encontrados en las especies del subgénero *Tacsonia*

En la literatura tan sólo hay dos reportes que describen el contenido de amino ácidos en especies de *Passiflora*. El primero describe 21 amino ácidos de *P. incarinata* y en el segundo se describen diecisiete amino ácidos para semillas de *Passiflora edulis*, usadas

en la formulación China “Tainung No. 1”²¹. Los amino ácidos reportados en la literatura son los mismos encontrados en este trabajo. El GABA (ácido γ -aminobutírico) fue detectado en la mayoría de las especies aquí estudiadas, incluida *P. tripartita* var *mollissima*, una de las especies aprobadas como sedante leve en Colombia¹⁰ y que parece ser la fuente más prolífica de este compuesto entre las muestras estudiadas. La única muestra donde no se identificó fue en *P. uribei*. El GABA se ha reportado en *P. incarnata* y se ha sugerido que es el responsable de las propiedades ansiolíticas y sedantes de los extractos de las hojas del maracuyá²². No obstante, la significancia farmacológica de GABA en los extractos de *Passiflora* todavía no es clara^{19,23–25}, pues no es capaz de permear la barrera hematoencefálica. Así mismo, la trigonellina fue identificada en todas las muestras como un compuesto minoritario y se ha relacionado a actividades como neuroprotectora, antimigraña, sedante, para mejorar la memoria y también como hipoglucémico²⁶. Todas estas propiedades farmacológicas se han identificado en extractos de diferentes *Passiflora* spp. según la medicina tradicional²⁷.

La presencia de la 5-carboximetil-2,5-dihidrofuran-2-ona es inesperada debido a que este compuesto había sido previamente aislado únicamente de organismos no relacionados, como la esponja marina *Xestospongia* sp. recolectada en la isla de Viti Levu (Fiji). Este compuesto muestra citotoxicidad moderada contra la línea celular P388 de leucemia murina²⁸ y se ha identificado como un intermediario clave en la ruta de ramificación del catecol de la β -cetoacil-CoA por la degradación de muchos arenos por una variedad de organismos incluyendo microorganismos²⁹. El origen microbiano de este compuesto podría explicar los cambios en concentración observados para las muestras aquí estudiadas, incluyendo las de *P. caerulea* y *P. incarnata* obtenidas en Países bajos (resultados no mostrados) y su presencia en organismos filogenéticamente no relacionados como las esponjas.

Finalmente, es notable señalar que no se detectó la presencia de saponinas por RMN ni por HPLC-MS, a pesar de que éstas se han reportado como compuestos mayoritarios en especies del género *Passiflora*, particularmente en el subgénero *Passiflora* ej. *P. edulis* var *flavicarpa* (Serie *Incarnatae*)³⁰, *P. alata* (Serie *Quadrangulares*)³¹, *P. quadrangularis* (Serie *Quadrangulares*) y *P. ligularis* (Serie *Tiliaefoliae*) (resultados no publicados).

COMPUESTO	<i>P. tripartita</i> var. <i>tripartita</i>	<i>P. tripartita</i> var. <i>mollissima</i>	<i>P. tarminiana</i>	<i>P. mixta</i>	<i>P. cumbalensis</i>	<i>P. uribei</i>	<i>P. lehmannii</i>
Apigenina-4-O-β-glucopiranosil-8-C neohesperidósido (6.1)							
Apigenina-4-O-glucopiranosil, 8-C-(6'' acetil)-glucopiranosido (6.2)							
Galocatequina (6.3)							
Galocatequina-(4α-8)-catequina (6.4)							
Desconocido (6.5)							
Procianidina dimero B1 (6.6)							
Procianidina C2 (6.7)							
Catequina (6.8)							
6-O-glucopiranosil vitexina (6.9)							
Orientina -7-O-glucosido (6.10)							
Acetil hexosido vitexina (6.11)							
7-O-glucopiranosil vitexina (6.12)							
Schaftosido (6.13)							
Isoorientina (6.14)							
Orientina-2''-O-ramnosido (6.15)							
Orientina (6.16)							
2''-O-glucosil-6-C-glucosil apigenina (6.17)							
Vitexina-2''-O-ramnosido (6.18)							
Vitexina (6.19)							
luteolina-4-O-glucopiranosil, 8-C -(6'' acetil)-glucopiranosido (6.20)							
Isovitexina (6.21)							
4'-metoxiluteolina-C- (O-hexosido) hexapiranoside (6.22)							
4'-metoxiluteolina-6-C-glucopiranosido (P.23)							
4'-metoxiluteolina-8-C-glucopiranosido (P.24)							
Crisina C- hexosido-O-deoxihexosido (6.25)							
Desconocido (6.26)							
Crisina 8-C-glucopiranosido (6.27)							
Luteolina-8-C-(6'' acetil)-glucopiranosido (6.28)							
Desconocido (6.29)							
4'-metoxiluteolina-6-C-6''acetilglucopiranosido (6.30)							
Apigenina-8-C(6'' acetil)-glucopiranosido (6.31)							
Desconocido (6.32)							
Crisina 6-C-glucopiranosido (6.33)							
4'-metoxiluteolina-8-C-6''acetilglucopiranosido (6.34)							

Figura 6.3 *Barcoding* de compuestos fenólicos encontrados en especies del subgénero

Tacsonia

Los datos de RMN de los extractos permitieron establecer la presencia de compuestos polifenólicos, pero no permitieron su identificación, debido a la alta complejidad de la región aromática y al corrimiento que sufren los desplazamientos químicos en los espectros de RMN ^1H de estos compuestos. Adicionalmente, la baja concentración de algunos de estos compuestos hace difícil su análisis. Para resolver este problema, se aislaron cromatográficamente los compuestos más abundantes de los extractos, incluidos algunos flavonoides C-glicosidados y catequinas y se registraron los espectros de RMN ^1H en metanol d_4 y DMSO d_6 , para compararlos con los reportados en la literatura y en MD6 para los análisis metabolómicos de este capítulo. Los datos de RMN en MD6 se incluyen en la Tabla 6.2 y se pueden consultar en otros solventes en la tabla S6.2 del anexo. Es interesante resaltar que cuatro de los flavonoides aislados mostraron señales de grupos metilos a δ_{H} 0.60 ppm aproximadamente, estas señales son atribuidas a los protones del metilo CH_3 -6 de la ramnosa en C- neohesperidósido. Este desplazamiento hacia campo inusualmente alto se debe al efecto protector del anillo A de la unidad del flavonoide. Esto se da cuando la neohesperiosa está enlazada al núcleo del flavonoide en la posición C-6 o C-8. La barrera rotacional alrededor del enlace C-glicosídico también generan una duplicación de las señales observadas en los espectros de RMN, como resultado de la presencia de dos conformeros mayoritarios^{32,33}. Estudios conformacionales de estos glicósidos se han llevado a cabo en los últimos años³² y han permitido concluir lo anteriormente expuesto Las señales para estos flavonoides unidos a una unidad de C- neohesperidósida fueron encontradas en la mayoría de los espectros de RMN ^1H de los extractos de *Tacsonia*, excepto para los extractos de *P. tripartita* var *mollissima* y baja concentración o ausencia fue encontrada en muestras de *P. mixta*. Siendo esta una característica metabólica de esta especie.

Para la identificación de estos compuestos polifenólicos minoritarios, los extractos se analizaron por CL-EM usando tanto (-)-ESIMS como MS/MS. Estas metodologías han mostrado ser útiles para la caracterización estructural de flavonoides O-glicosidados y C-glicosidados en nuestras muestras de *Passiflora*^{19,34,35}. Para el análisis de los compuestos fenólicos, el extracto obtenido en metanol:agua fue sometido a partición agua:butanol y esta última fase fue concentrada y analizadas por UPLC-PDA-MS (ESI-qTOF) en fase reversa y RMN. La identificación de cada pico cromatográfico se hizo por comparación de los tiempos de retención con los de los patrones y el análisis de los espectros de masas y UV. Mediante el análisis de datos de MS/MS se asignó las señales de las hexosas, pentosas y grupos

acetilo; así como la diferenciación de los derivados O-glicosidados de los C-glicosidados. Los patrones de fragmentación han sido bien establecidos en la literatura, siendo $[M-162]^{+/-}$ característico de hexosas, $[M-132]^{+/-}$ para pentosas. Los fragmentos $[M-18]^{+/-}$ y $[M-120/90]^{+/-}$ para la *cross-ring cleavages* [(O-C1 y C2-C3)] o [(O-C1 y C3-C4)] de los C-hexósidos, el fragmento $[M-90/60]^{+/-}$ para los C-pentósidos y el $[M-104/74]$ para C-deoxihexósidos. Todos estos iones fueron usados para la caracterización de flavonoides^{19,36-39} (anexo Figura S6.5). Para la determinación de flavonoides en materiales vegetales es muy empleada la espectrofotometría UV-VIS (ultravioleta-visible) debido a su simplicidad, rapidez, bajo costo de ejecución y amplia disponibilidad⁴⁰. Así se puede establecer la presencia de núcleos de apigenina, luteolina o crisina^{41,42}. La combinación de estas técnicas permitió identificar los compuestos fenólicos presentados en la tabla 6.2, así por ejemplo para la diferenciación entre el 6-C-glicósido-luteolina (isorientina, 6.14) y 8-C-glicósido-luteolina (orientina, 6.16) está basado en una mayor abundancia del ion m/z 429 $[M-18-H]^-$ en 6-C-hexosido, mientras que ese ion se presenta con una menor intensidad en la orientina¹⁹. La Tabla 6.2 presenta los 34 polifenoles identificados incluyendo los datos de RMN (solvente MD6), el tiempo de retención, λ_{max} y el valor m/z experimental y los datos obtenidos de MS/MS por HRMS-ESI(-). Se incluyen las referencias bibliográficas usadas con fines de comparación. Para los datos de RMN que fueron registrados en otros solventes (MeOD y DMSO) se puede consultar el anexo Tabla S6.2.

Tabla 6.2 Compuestos fenólicos identificados en las especies de Tacsonia usando los datos obtenidos en los análisis de RMN y HPLC-MS/EM.

No	Compuesto	Datos de RMN (MD6) (m, J Hz)	tr (min)	λ max (nm)	Datos de m/z y MS/MS experimentales	Fórmula molecular y m/z predicho para [M-H] ⁻
6.1	Apigenina-4-O- β -glucopiranosil-8-C neohesperidósido	8.01 (d, 8.8)/7.86 (d, 8.7), 7.03 (d, 8.8)/8.57 (d, 8.6), 6.71 (s)/6.80(s), 5.14 (d, 9.9), 5.13 (d, 1.7), 5.05 (d, 10.0), 2.18 (m)/2.40 (m), 0.71 (d, 6.3)/0.89(d, 6.3)	4.9	270 340	739.2134 619, 413, 341, 311, 293	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉ 739.2091
6.2	Apigenina-4'-O- β -glucopiranosil-8-C- β -(6'' acetil)-glucopiranosido	8.03 (d, 8.4), 7.26 (d, 8.4), 6.68 (bs), 6.28 (bs), 5.04 (d, 7.4), 4.99 (d, 10.2), 4.46 (dd, 2.0, 12.0), 4.26 (dd, 4.7, 12.0), 4.16 (bt, 9.4), 3.92 (dd, 2.2, 12.0), 3.73 (dd, 5.6, 12.0), 3.56 (dd, 7.9, 9.3), 3.50 (dd, 7.4, 9.6), 3.50 (t, 8.9, 3.43 (t, 9.4), 1.89 (bs)	5.3	298 341 348	635.1624 473 [M-Glc] ⁻ , 413 [M-Glc-AcO] ⁻ , 341, 311, 283	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₆ 635.1618
6.3	Galocatequina ⁴³	6.48 (brs), 6.05 (brs), 5.97 (brs), 4.7 (brs), 2.5 (dd, 15.5, 7.5)	2.0	270	305.0675 125, 167, 179, 219, 237	C ₁₅ H ₁₄ O ₇ 305.0667
6.4	Galocatequina-(4 α -8)-catequina ⁴³		2.1	280	593.1298	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃ 593.1301
6.5	Desconocido		2.6	280 224	463.0878	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ 463.0882
6.6	Procianidina dímero B1 ^{43,44}	6.92 (d, 1.5), 6.87 (d, 8.1), 6.72 (brs), 5.10 (brs)	2.7	226 280	577.1362 407, 289, 161, 125	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂ 577.1352
6.7	Procianidina C2 ⁴¹⁴³		2.8	282	865.2077 739, 713, 695, 577, 575, 451, 425, 407, 289, 287	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈ 865.1985

No	Compuesto	Datos de RMN (MD6) (m, J Hz)	tr (min)	λ max (nm)	Datos de <i>m/z</i> y MS/MS experimentales	Fórmula molecular y <i>m/z</i> predicho para [M-H] ⁻
6.8	Catequina ⁴¹	2.52 (dd, 16.1, 7.9), 2.83 (dd, 16.1, 5.3), 4.12 (m), 4.69 (d, 7.3), 5.94 (d, 2.2), 6.03 (d, 2.2), 6.79 (br d, 8.2), 6.88 (d, 2.0)	2.9	226 280	289.0731 271, 245, 205, 179, 125, 109	C ₁₅ H ₁₄ O ₆ 289.0718
6.9	6-O-glucopiranosil vitexina ^{19,45,46,47}		3.4	226 272 324	593.1530 473, 431 [M-Glc] ⁻ , 341 311 [M-162-120] ⁻ , 282	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ 593.1512
6.10	Orientina -7-O-glucósido ⁴⁸		3.4	270 336	609.1467 489, 447, 357, 327	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ 609.1461
6.11	Vitexina acetil hexósido		4.1	226 272 326	635.1610 575, 515, 473 [M-hexosa] ⁻ , 413 [M-AcO-hexosa] ⁻ , 365, 311, 282	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₆ 635.1618
6.12	7-O-glucopiranosil vitexina ^{45,48}		4.2	224 272 330	593.1533 473, 431[M-Glc] ⁻ , 311	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ 593.1512
6.13	Schaftósido ^{35,49,50,51,52}	8.02 (d, 8.8), 7.04 (d, 8.8), 6.72 (s), 4.92 (d, 9.9), 4.76 (obscured), 4.12 (s), 4.11 (bd, 11.8), 3.96 (dd, 11.8, 2.1)	4.3	226 272 336	563.1429 503, 487, 473, 443, 383, 353	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄ 563.1406
6.14	Isoorientina ^{45,53,49}	7.42 (m Hz), 6.98 (d, 8.5 Hz), 6.63 (s), 6.59 (s), 4.3 (bt, 8.9 Hz), 3.90 (dd, 12.5, 2.2), 3.80 (dd 12.5, 5.2), 3.57 (m) 3.4(m)	4.5	228 270 350	447.0946 429, 369, 357, 327, 297, 285	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ 447.0933
6.15	Orientina-2''-O-ramnósido ⁴⁸		4.5	270 350	593.1527 473, 429, 357, 327	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ 593.1512

No	Compuesto	Datos de RMN (MD6) (m, J Hz)	tr (min)	λ max (nm)	Datos de <i>m/z</i> y MS/MS experimentales	Fórmula molecular y <i>m/z</i> predicho para [M-H] ⁻
6.16	Orientina ^{53 45 49}	7.55 (m): 6.89 (d, 8.4), 6.44 (bs), 6.25 (s), 5.03 (d, 10.0)	4.6	226 270 348	309, 285 447.0943 431, 357, 327, 297	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ 447.0933
6.17	2''-O-glucosil-6-C-glucosil apigenina ^{54 48}		4.9	275 350	593.1518	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ 593.1512
6.18	Vitexina-2''-O-ramnósido ^{54,55}	8.00 (d, 8.3 Hz), 7.01(d, 8.5 Hz), 6.70 (s), 6.37 (s), 5.09 (d, 1.6), 5.05 (d, 9.9), 4.24 (brt, 8.8), 2.42(m), 2.39 (m), 0.79 (d, 6.4), 0.65 (d, 6.3)	5.0	270 338	577.1578 457, 413, 311, 293	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄ 577.1563
6.19	Vitexina ⁴¹	7.98 (bd, 8.3), 7.00 (d, 8.4), 6.68 (bs), 6.37 (bs), 5.01 (d, 10.1 Hz)	5.2	269 338	431.0991 341, 311, 283	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ 431.0984
6.20	luteolina-4-O-glucopiranosil, 8-C-(6'' acetil)-glucopiranosido ³⁵		5.2	226 272 338	651.1572 581, 489 [M-Glc] ⁻ 357, 327, 298	C ₂₉ H ₃₂ O ₁₇ 651.1567
6.21	Isovitexina ^{41 49}	7.87 (d, 8.4 Hz), 6.98 (d, 8.5 Hz), 6.63 (s), 6.59 (s), 4.29 (bt, 8.9 Hz), 3.90 (dd, 12.5, 2.2), 3.80 (dd 12.5, 5.2), 3.57 (m) 3.55(m)	5.4	228 272 338	431.0995 353, 341, 323, 311, 283	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ 431.0984
6.22	4'-metoxiluteolina-C-(O-hexósido) hexapiranosido		5.6	226 270 348	607.1670 487, 443 [M-glc] ⁻ , 341, 323	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₅ 607.1668
6.23	4'-metoxiluteolina-6-C-	7.57 (bd, 8.4), 7.45 (bs), 7.12 (br d, 8.3),	5.7	226 270 348	461.1086 425, 371, 341, 298, 191, 149	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁ 461.1089

No	Compuesto	Datos de RMN (MD6) (m, J Hz)	tr (min)	λ max (nm)	Datos de m/z y MS/MS experimentales	Fórmula molecular y m/z predicho para [M-H] ⁻
	glucopiranosido ³⁵ ₄₅	6.60 (s), 6.36 (s), 5.03 (d, 10.0), 4.41 (bd, 12.0) 3.94 (s)				
6.24	4'-metoxiluteolina-8-C-glucopiranosido ³⁵ ₄₅		5.9	226 272 348	461.1085 371, 341, 298	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁ 461.1089
6.25	Crisina C-hexósido-O-deoxihexósido ⁴⁹		5.9	270 315	561.1612	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₃ 561.1614
6.26	Desconocido		6.2	270 345	623.1612	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆ 623.1618
6.27	Crisina 8-C-glucopiranosido ⁴²	7.98 (d, 7.3 Hz), 7.64 (m), 7.60 (m), 6.79 (s), 6.35 (s), 5.06 (d, 10.1), 4.30 (t, 9.1 Hz), 3.90 (dd, 12.5, 2.2 Hz), 3.83 (dd 12.5, 5.2), 3.57 (m), 3.52 (m)	6.4	226 272 318	415.1041 325, 295, 267, 187, 149	C ₂₁ H ₂₀ O ₉ 415.1035
6.28	Luteolina-8-C-(6'' acetil)-glucopiranosido ³⁵		6.6	228 270 348	489.1040 429, 357, 327, 297	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂ 489.1039
6.29	Desconocido		6.9	270 345	593.1520	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ 593.1512
6.30	4'-metoxiluteolina-6-C-6''acetilglucopiranosido		6.9	270 345	503.1195 443, 428, 407, 383, 333, 341, 299	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₂ 503.1195
6.31	Apigenina-8-C(6'' acetil)-glucopiranosido ³⁵		7.4	226 270 338	473.1086 413, 341, 311	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₁ 473.1089

No	Compuesto	Datos de RMN (MD6) (m, J Hz)	tr (min)	λ max (nm)	Datos de <i>m/z</i> y MS/MS experimentales	Fórmula molecular y <i>m/z</i> predicho para [M-H] ⁻
6.32	Desconocido		7.5	270 345	649.1776	C ₃₀ H ₃₄ O ₁₆ 649.1774
6.33	Crisina 6-C-glucopiranosido ⁴²	7.99 (d, 7.2 Hz), 7.64 (brt, 7.4), 7.59 (brt, 7.4), 6.78 (s), 6.62 (s), 4.92 (d, 10.0), 4.30 (t, 9.1 Hz), 3.90 (dd, 12.5, 2.2 Hz), 3.80 (dd, 12.5, 5.2), 3.57 (bt. 7.7), 3.52 (m)	7.7	226 272 318	415.1049 325, 295, 267	C ₂₁ H ₂₀ O ₉ 415.1035
6.34	4'-metoxiluteolina-8-C-6''acetilglucopiranosido ³⁵	7.57 (bd, 8.4), 7.45 (bs), 7.12 (br d, 8.3), 6.63 (s), 6.36 (s), 5.04 (d, 10.0), 4.41 (bd, 12.0) 3.94 (s), 1.85 (brs)	7.7	228 272 348	503.1210 443, 371, 353, 341, 326, 298	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₂ 503.1195

Los perfiles obtenidos por CL-EM de la fracción BuOH de cada especie de *Passiflora* estudiada se muestran en la Figura 6.4. Se observan algunos extractos complejos como los de *P. tarminiana*, *P. mixta*, *P. tripartita* var *tripartita* y *P. tripartita* var *mollissima* así como algunos perfiles menos complejos como los de *P. uribei* y *P. lehmannii*. Esta información está en concordancia con los perfiles de RMN. Interesantemente, las dos variedades de *P. tripartita* (*mollissima* y *tripartita*) mostraron ser diferentes, a la vez que el perfil de *P. tripartita* var *mollissima* fue similar al de *P. tarminiana* (Figura. 6.4). Lo que permite sugerir que *P. tarminiana*, más apreciada por los cultivadores por su resistencia a las enfermedades, puede ser usada como sustituta de *P. tripartita* var *mollissima* aprobada en Colombia como fitomedicamento.

Los núcleos de los flavonoides encontrados en las muestras de este estudio (Tabla 6.2), incluyen luteolina (6.10, 6.14-6.16, 6.20, 6.22-6.24, 6.28, 6.30, 6.34), apigenina (6.1, 6.2, 6.9, 6.11-6.13, 6.17-6.19, 6.21, 6.31) y crisina (6.25, 6.27, 6.33); como también algunas catequinas (6.3-6.5, 6.8) y procianidinas (6.6, 6.7). Los derivados de luteolina son dominantes en *P. tripartita* var. *mollissima*, mientras que son menos abundantes en *P. uribei*, y *P. mixta*. Es interesante notar, que el compuesto 4'-metoxiluteolin-8-C-6''acetilglucopiranosido (6.34) había sido descrito previamente en nuestro grupo de investigación⁵⁶ y había sido propuesto como marcador químico para *P. tripartita* var *mollissima* por investigadores de Chile³⁵. Sin embargo, este compuesto 6.34 también ha sido encontrado en *P. mixta*, *P. tarminiana* y *P. uribei*, pero no en *P. tripartita* var *tripartita* por lo que su valor como quimiomarcador para esta curuba, la oficial para Colombia, debe ser reevaluado. Los flavonoides relacionados con la apigenina han sido reportados en la Farmacopea Brasileña como sustancias de referencia para *P. alata*⁵⁷. En nuestras muestras de *Tacsonia* encontramos derivados de apigenina en todas las especies, excepto en el extracto de *P. cumbalensis*, donde se encontró grandes cantidades de derivados de la crisina C-glicosidados, estos derivados de crisina fueron encontrados en extractos de *P. tripartita* var. *tripartita* y *P. mixta*, pero en pequeñas cantidades. La crisina se ha reportado como posible ansiolítico y fue previamente aislado de *P. coerulea*⁵⁸. De otro lado, se encontraron derivados de catequinas en *P. tarminiana* y en dos variedades de *P. tripartita*. Interesantemente, las catequinas han sido reportadas como estimulantes de la actividad ansiolítica⁵⁹

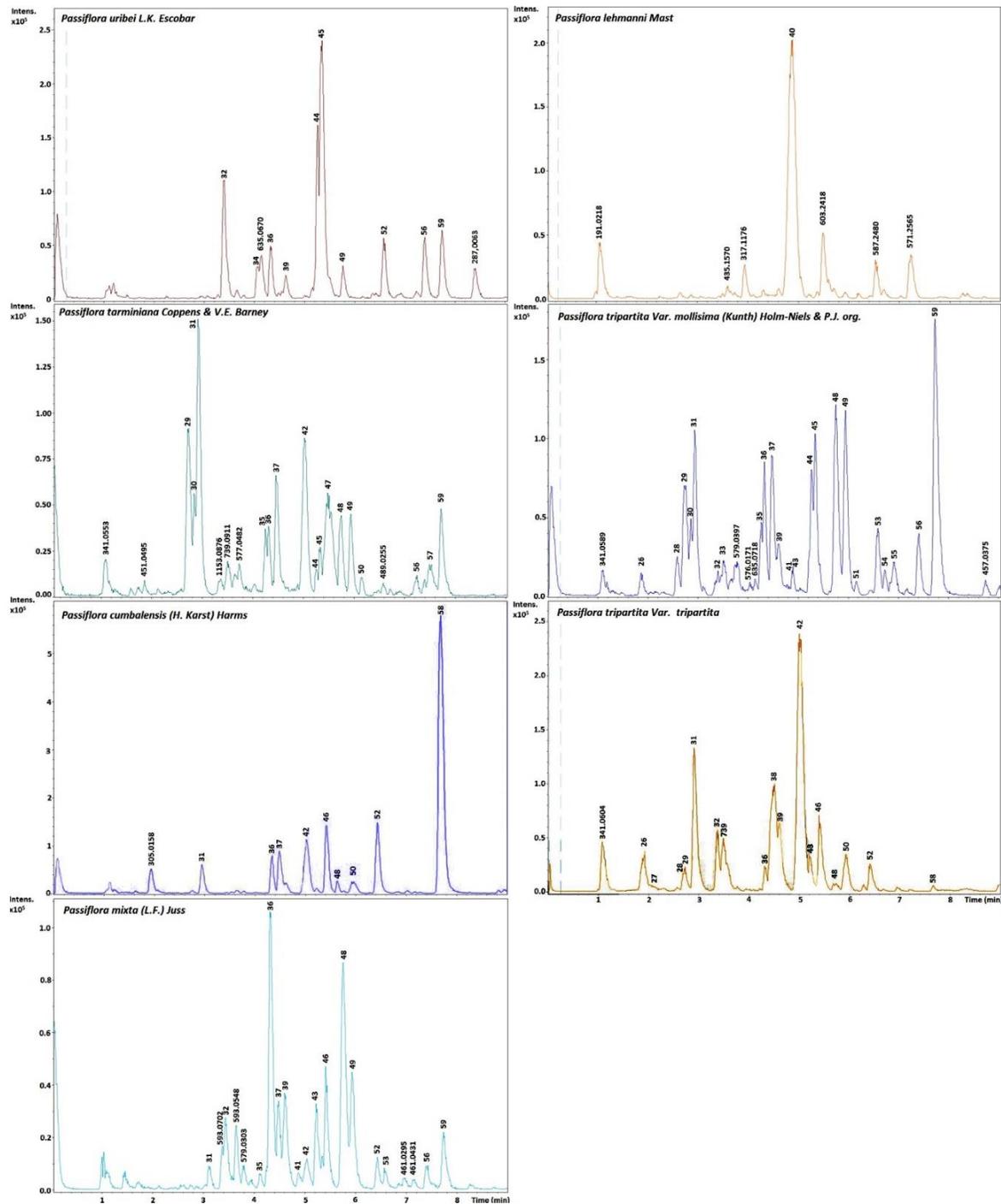


Figura 6.4 Cromatogramas (TICs) de los extractos butanólicos de las especies de *Passiflora* acá estudiadas. Los números en negrilla corresponden a los compuestos identificados, (por espacio a los números presentados se les debe añadir un 6 anterior) y los números en itálica corresponden al *m/z* de compuestos desconocidos.

En varias de las muestras analizadas se pudo establecer la presencia de flavonoides no identificados por LC-MS, potencialmente nuevos, lo cual es particularmente cierto para *P. lehmannii*. En esta especie la mayoría de los picos no se pudieron identificar por LC-MS, que muestras de nuevo que esta especie está poco relacionada con las curubas de *Tacsonia*. En este aspecto es interesante notar que los compuestos mayoritarios de *P. lehmannii* y *Passiflora uribei* no pudieron ser identificados por LC-MS. Por esta razón y porque estas especies son fuertemente activas, se decidió purificar los flavonoides mayoritarios de las dos especies por métodos cromatográficos.

De *P. lehmannii* se aisló el compuesto 6.1, que presentó un ion en el espectro (-)-HRESIMS en m/z de 739.2091 [M-H]⁻, sugiriendo una fórmula molecular de C₃₃H₄₀O₁₉, que junto con el ion en m/z 413 [M-Glu-Rha]⁻, de los datos de MS/MS, sugiere la presencia de un flavonoide triglicosidado con dos residuos de hexosa y otro de deoxihexosa (Anexo Figura S6.5). El espectro de RMN 13C (figura 6.5), muestra una gran cantidad de señales desdobladas, lo que puede indicar que se trata de una mezcla compleja de conformeros, como ya se ha identificado para flavonoides con un residuo de neohesperidósido^{32,33}. En este espectro se hace evidente la presencia de señales para carbonos sp², carbonos anoméricos (tres pares), múltiples carbonos oxigenados, más la presencia de una señal δ_C C 18.1, característica del metilo de la ramnosa en un neohesperidósido. El compuesto 6.1 presenta señales de RMN-¹H (600 MHz, Metanol-d₄) (figura 6.6.) características de un núcleo de apigenina, δ_H H 7.97 (d, 8.7)[7.81 (d, 8.5)]; 6.93 (d, 8.7)[6.94 (d, 8.5)]; 6.59 (s)[6.62]; 6.27 (s)[6.25 (s)]; tres protones anoméricos: δ_H H 5.15 (d, 1.3)[5.31 (d, 1.7)]; 5.03 (d, 9.9)[5.15 (d, 9.8)]; 4.39 (d, 7.7)[4.27(d, 7.9)] y una zona compleja de protones carbinólicos propios de varias unidades de carbohidratos. Así mismo, se destaca la presencia de señales para metilo δ_H H 0.73 (d, 6.2)[0.88 (d, 6.2)], el desplazamiento a campo alto está de acuerdo con lo esperado para un metilo de neohesperidósido (α-ramnosil-(1→2)-β-glucopiranosido), cuyo conformero más abundante adquiere una conformación plegada, estabilizada por el efecto anomérico, haciendo que el metilo de la ramnosa y su protón de la posición 5 estén en una estrecha proximidad al anillo aromático A, que es responsable de los desplazamientos químicos inusuales³². Lo anterior se ilustra en la figura 6.7 obtenida por la minimización y visualización que fue realizada usando la

versión académica del software Maestro versión 10.5 (Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016), usando la minimización de campo de fuerza universal (OPLS_2005).

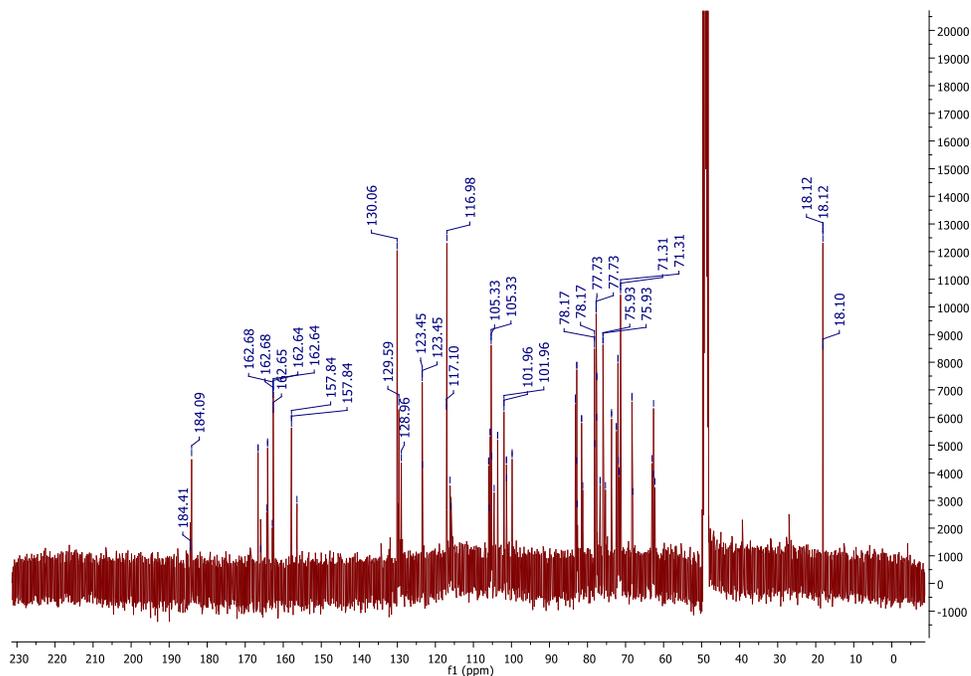


Figura 6.5 Espectro de RMN ^{13}C 150 MHz (MeOD-d₄) del compuesto 6.1 aislado de *Passiflora lehmanni*

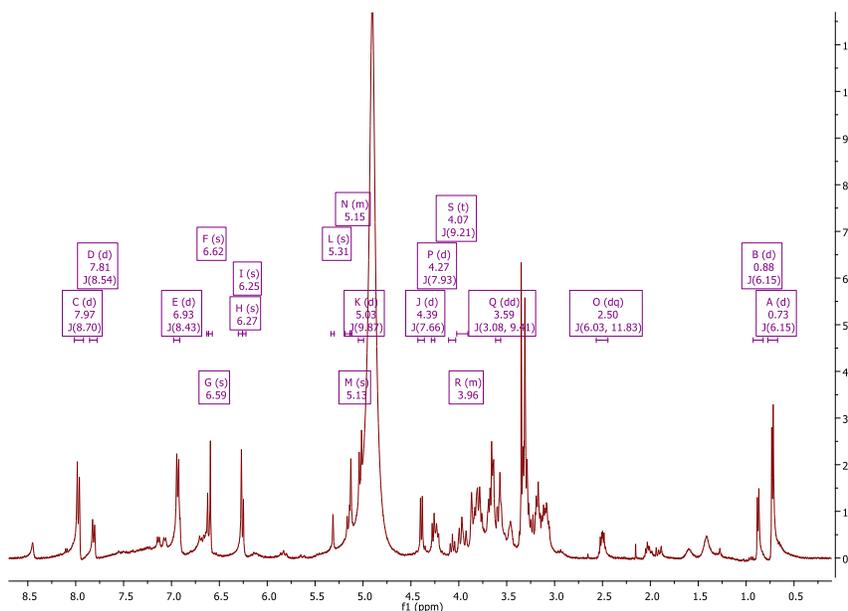


Figura 6.6 Espectro de RMN ^1H 600 MHz (MeOD-d₄) del compuesto 6.1 aislado de *Passiflora lehmanni*

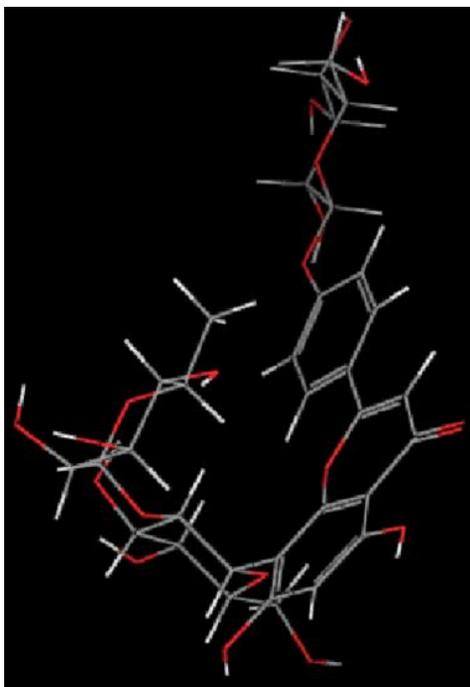


Figura 6.7 . Confórmero mayoritario para el compuesto 6.1, se observa que los protones de la unidad de ramnosa quedan enfrentados al anillo A y sufren desplazamiento a campo alto.

En el experimento TOCSY (figura 6.8) se observó el acoplamiento entre los protones orto, confirmando la presencia del núcleo de apigenina y una zona compleja de protones carbinólicos de los azúcares que acoplan entre sí que fue estudiada en detalle para lograr la asignación, que se completó con el experimento HSQC y J-resolved (Figura 6.9 y 6.10). El hidrógeno anomérico en δ_H 5.15 (d, 1.8)[5.31 (d, 1.7)]/ δ_C 102.0[101.3], muestra un valor de J pequeño que es característico de una α -ramnosa⁶⁰ y muestra una correlación en HMBC con C-2'' del glucopiranosido δ_C 77.6 [76.7]/ δ_H 4.26 (dd, 9.9; 8.6) [4.07 (t, 9,3)]; de la misma manera se observa la correlación en HMBC entre el protón δ_H 4.26[4.07] / δ_C 77.6 [76.7] con el carbono anomérico de la ramnosa en δ_C 102.0[101.3]/ δ_H 5.15 (d, 1.8)[5.31 (d, 1.7)] (Figura 6.11). Todo lo anterior permite establecer que la ramnosa está unida al C-2 de una glucosa. Este protón 2 de la glucosa en δ_H 4.26 (dd, 9.9; 8.6)[4.07 (t, 9,3)] correlaciona en TOCSY y HMBC, con el protón anomérico en 5.03 (d, 9.9)[5.15 (d, 9.8)]/ δ_C 73.7[75.3] que es característico del protón β -anomérico de un C-glucósido, a juzgar por el valor de J y del desplazamiento de carbono⁶⁰. Este protón anomérico en δ_H 5.03 (d, 9.9)[5.15 (d, 9.8)] correlaciona en HMBC con los carbonos en δ_C 105.3 (C-8); 157.8[156.4] (C-9) y 164.1[164.3] (C-7) del núcleo del flavonoide, permitiendo fijar la posición de este residuo de

C-neohesperidósido en el C-8. Finalmente, el tercer carbono anomérico δ_{H} 4.39 (d, 7.7)[4.27 (d, 7.9)]/ δ_{C} 105.6 [105.2] corresponde a un β -O-glucósido, que está unido a la posición 4' por la correlación de HMBC entre el protón anomérico con el carbono C-4' (δ_{C} 162.7) como se presenta en la Figura 6.11 y Tabla 6.3. De esta forma el compuesto 6.1 fue identificado como Apigenina-4-O- β -glucopiranosil-8-C-neohesperidosido Figura 6.10. La presencia de este compuesto había sido propuesta por Escobar *et al.* en 1983, en *P. coactilis* identificándolo por hidrólisis enzimática, co-cromatografía en TLC, análisis de RMN de 100MHz y UV de los derivados obtenidos ⁶¹. Reportamos los datos completos de RMN y EM por primera vez para este compuesto.

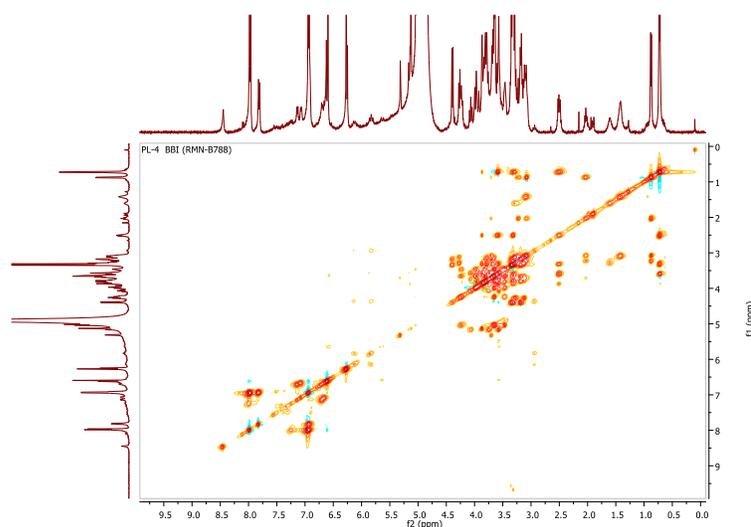


Figura 6.8 Espectro TOCSY del compuesto 6.1 obtenido de *Passiflora lehmannii* en metanol- d_4

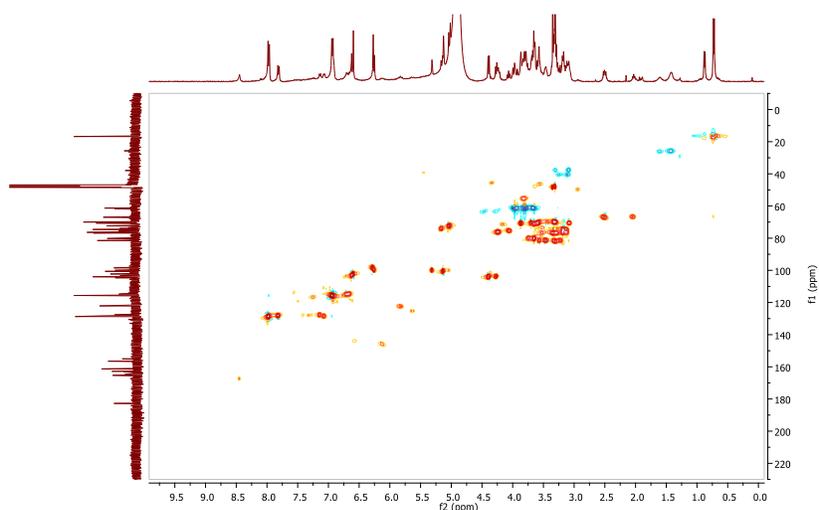


Figura 6.9 Espectro HSQC del compuesto 6.1 obtenido de *Passiflora lehmannii* en metanol- d_4

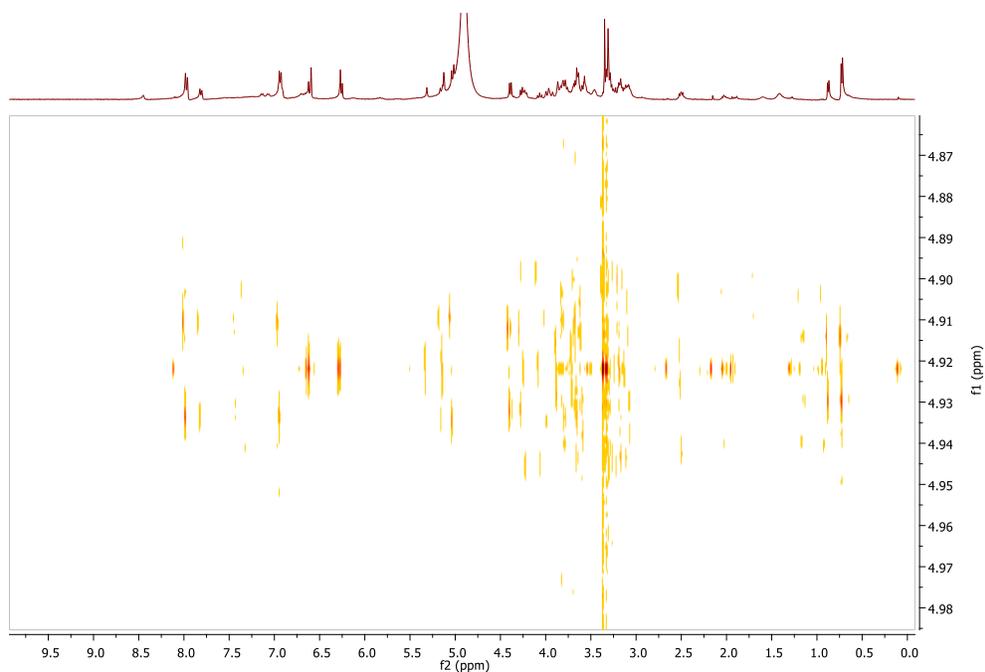


Figura 6.10 Espectro Espectro *J-resolved* del extracto del compuesto 6.1 obtenido de *Passiflora lehmanna* en metanol- d_4

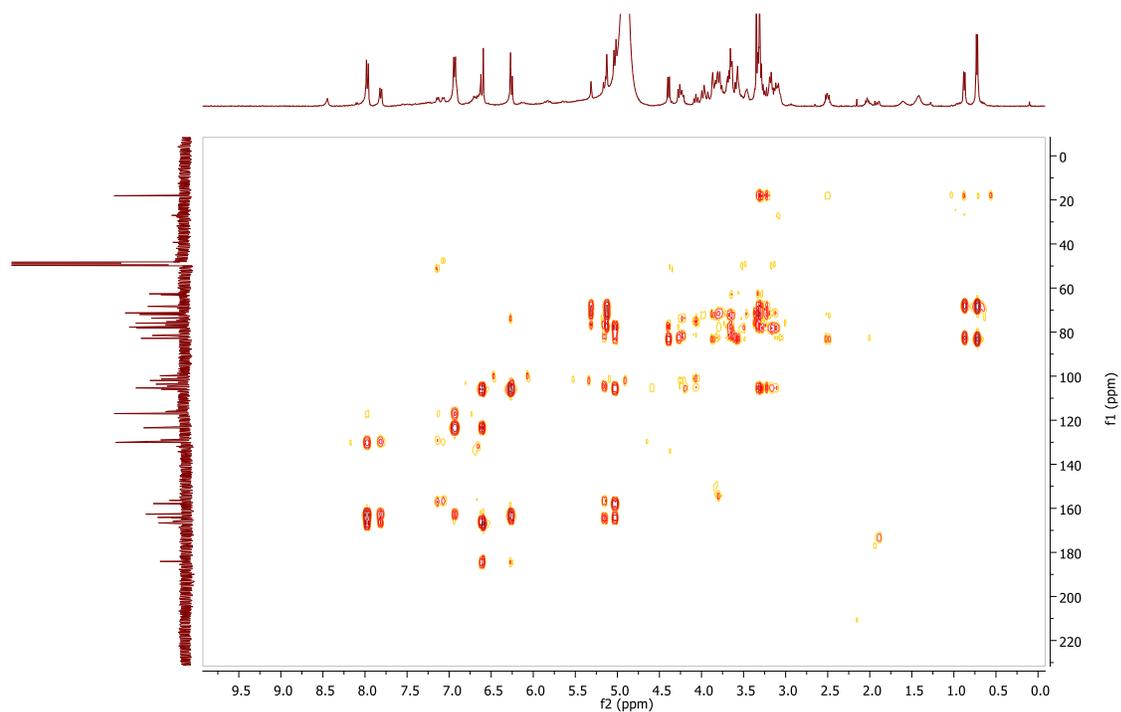


Figura 6.11 Espectro HMBC del compuesto 6.1 obtenido de *Passiflora lehmanna* en metanol- d_4

El compuesto 6.2 presentó en el espectro (-)-HRESIMS un ion a 635.1624 [M-H]⁻, sugiriendo una fórmula molecular de C₂₉H₃₂O₁₆. Los datos de MS/MS sugieren la presencia de dos hexosas y un residuo acetil por los iones a 473 [M-hexosa]⁻ y 413 [M-hexosa-AcO]⁻. Los datos RMN ¹H (600 MHz, Metanol-d₄) (Figura 6.12) del compuesto 6.2 muestran señales características de un núcleo de apigenina sustituido en el anillo A en δ_H 8.03 (2H, d, *J* = 8.4)/δ_C 129.8; 7.24 (2H, d, *J* = 8.4)/δ_C 118.1; 6.31 (1H, bs)/δ_C 101.8 y 6.68 (1H, bs)/δ_C 104.8. También se evidencia la presencia de dos protones β-anoméricos δ_H 5.04 (1H, d, *J* = 7.4)/δ_C 101.6 y 4.96 (1H, d, *J* = 9.3)/δ_C 75.7, siendo este último característico de un C-glicósido por el desplazamiento del carbono y el valor de la *J*, mientras el primero corresponde a un O-glicósido usando el mismo razonamiento³². Lo último además es coherente con la pérdida de la unidad de hexosa en el espectro de MS. En el espectro de RMN ¹H se observa una gran cantidad de protones carbinólicos, cuyos valores de constante de acoplamiento grandes, así como los desplazamientos de carbono (juzgados por el HSQC Figura 6.13), son coherentes con dos unidades de glucosa. La correlación en HMBC del protón anomérico en δ_H 4.96 (1H, d, *J* = 9.3)/δ_C 75.7, y del H-2'' de la glucosa en δ_H 4.12 (t, 9.3)/δ_C 73.0, con el carbono en δ_C 104.6 de la posición C-8 del flavonoide; así como el *crosspeak* entre este protón anomérico y el carbono de la posición C-9 δ_C 157.4, permitieron fijar una unidad de azúcar sobre el carbono 8 de la apigenina. La otra unidad de glucosa se unió al O de la posición C-4' por la correlación en HMBC entre el protón anomérico en δ_H 5.03 (d, 7.4)/δ_C 101.6, y el carbono C-4' δ_C 157.4, como se presenta en la Figura 6.14 y la Tabla 6.3. El grupo acetilo fue ubicado en la posición 6'' del C-glucopiranosido de acuerdo a la correlación en HMBC entre los protones H₂-6'' en δ_H 4.47 (dd, 12.0, 2.0) y 4.28 (dd, 12.0; 4.7)/δ_C 65.2, y el carboxilo en δ_C 173.1 y con C-4'' (δ_C 72.5/δ_H 3.70 (m)); y de estos protones diasterotópicos de metileno en COSY con el metino H-5'' en δ_H 3.56(m) / δ_C 79.8. Las correlaciones se presentan en la Figura 6.15. Así el compuesto 6.2 fue identificado como Apigenina-4'-O-β-glucopiranosil,8-C-β-(6''acetil)-glucopiranosido, que no ha sido reportado previamente.

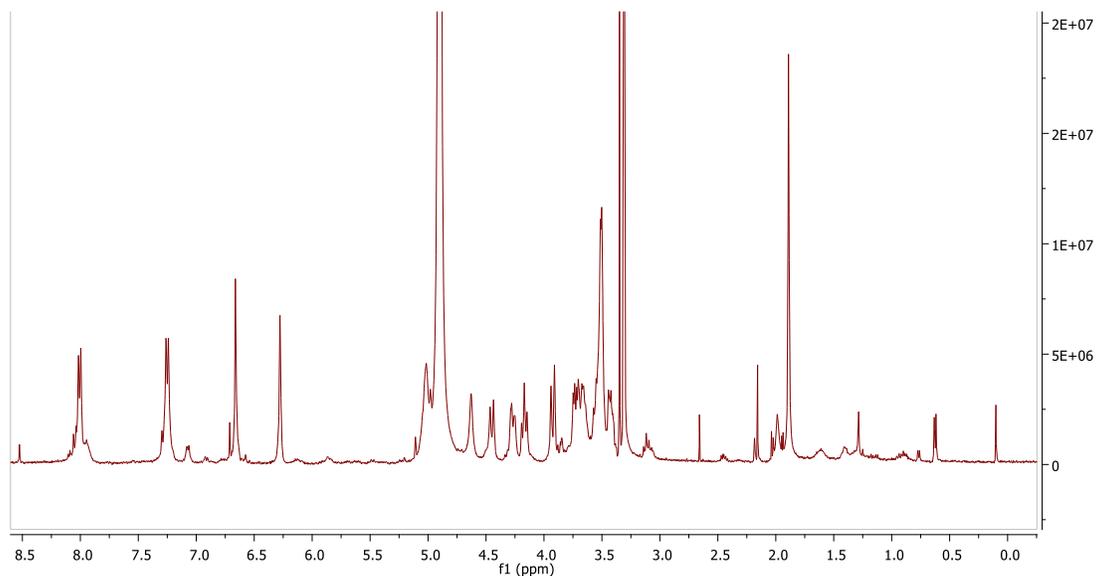


Figura 6.12 Espectro de RMN ^1H 600 MHz (MeOD- d_4) del compuesto 6.2 aislado de *Passiflora uribei*

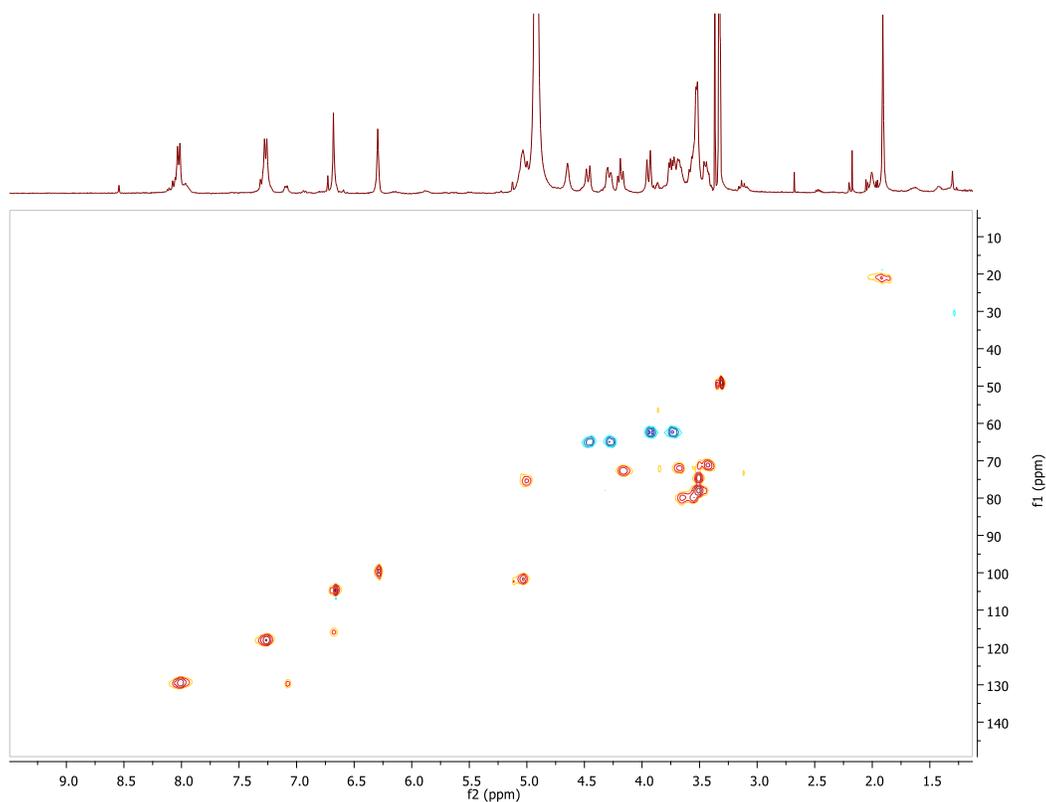


Figura 6.13 Espectro HSQC del compuesto 6.2 obtenido de *Passiflora uribei* en metanol- d_4

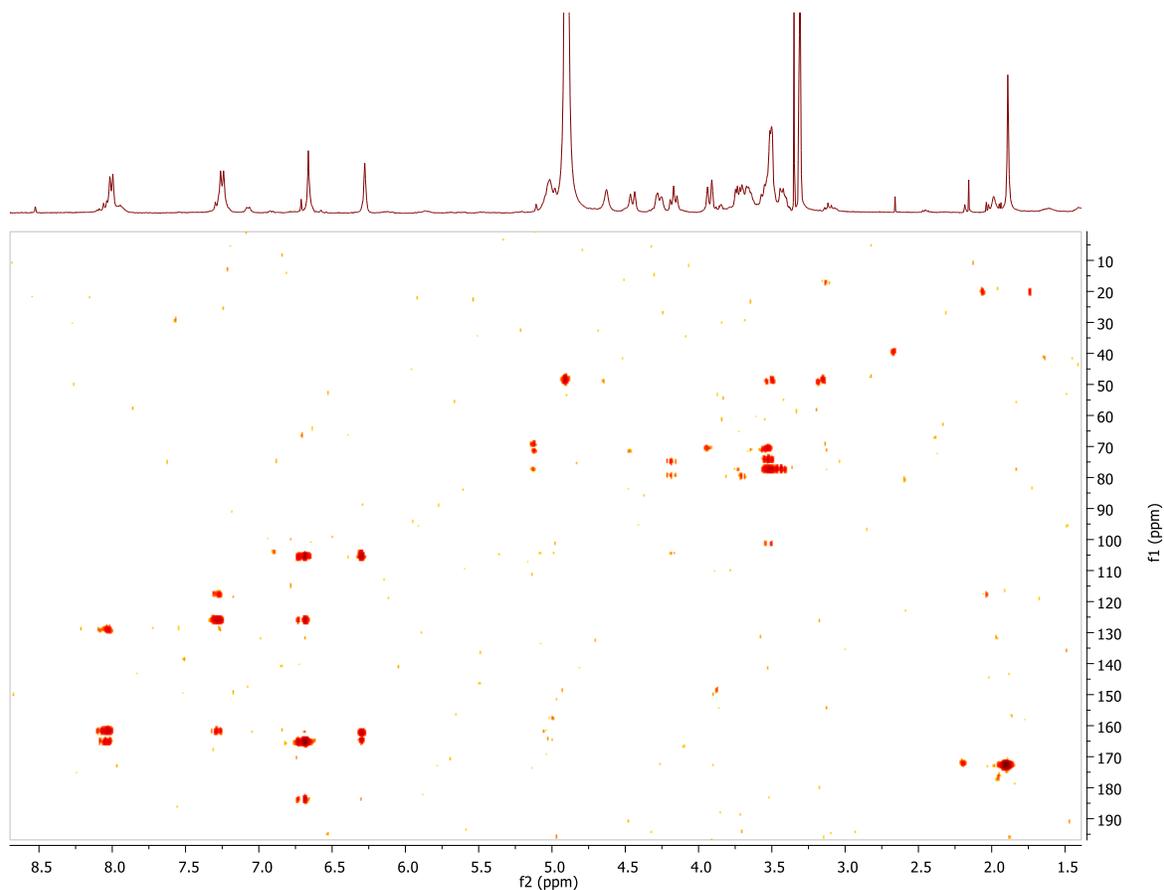
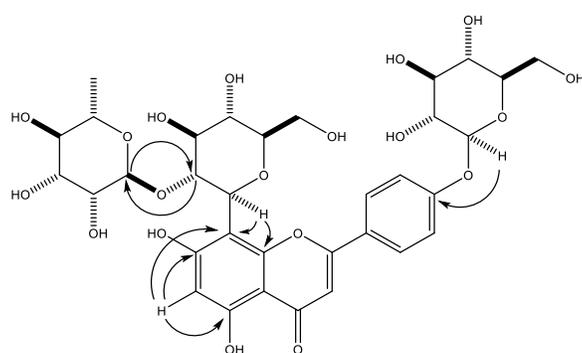
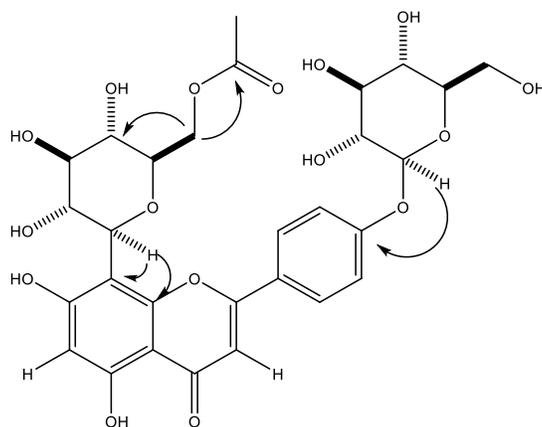


Figura 6.14 Espectro HMBC del compuesto 6.1 obtenido de *Passiflora uribei* en metanol- d_4



A. Apigenin-4-O- β -glucopiranosil-8-C- neohesperidósido (6.1). Con flechas se muestran correlaciones en HMBC determinantes.



B. Apigenin-4'-O- β glucopiranosil, 8-C- β -(6'' acetil)-glucopiranosido (6.2). Con flechas se muestran correlaciones en HMBC determinantes.

Figura 6.15 Nuevos flavonoides identificados como los componentes mayoritarios de *P. lehmannii* (figura A) y *Passiflora uribei* (figura B). Las flechas representan las correlaciones claves en HMBC.

Tabla 6.3 Datos de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C para Apigenin-4-O- β -glucopiranosil-8-C-[α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -glucopiranosido (6.1) y Apigenin-4-O-glucopiranosil, 8-C-(6'' acetil)- β -glucopyranosido (Metanol- d_4 , δ en ppm, J en Hz).

Posición	Apigenin-4-O- β -glucopiranosil-8-C-[α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -glucopiranosido (6.1) ^a		Apigenin-4-O-glucopiranosil, 8-C-(6'' acetil)- β -glucopyranosido (6.2)	
	δ_{H} (mult, J value in Hz)	δ_{C} (ppm)	δ_{H} (mult, J value in Hz)	δ_{C} (ppm)
2		166.6 [165.9]		165.5
3	6.59 (s) [6.62 (s)]	102.0 [103.6]	6.68 (bs)	104.8
4		184.1 [184.4]		184.1
5		162.7 [162.9]		161.1
6	6.27 (s) [6.25 (s)]	99.8 [101.3]	6.31 (s)	101.8
7		164.1 [164.3]		162.8
8		105.3 [105.3]		104.6
9		157.8 [156.4]		157.4
10		106.0 [105.8]		104.8
1'		123.5 [123.4]		126.4
2'-6'	7.97 (d, 8.7) [7.81 (d, 8.5)]	130.1 [129.6]	7.24 (d, 8.4)	118.1
3'-5'	6.93 (d, 8.7) [6.94 (d, 8.5)]	117.0 [117.1]	8.03 (d, 8.4)	129.8

Posición	Apigenin-4-O-β-glucopiranosil-8-C-[α-ramnopiranosil-(1→2)]-β-glucopiranosido (6.1) ^a		Apigenin-4-O-glucopiranosil, 8-C-(6'' acetil)- β-glucopyranósido (6.2)	
	δ _H (mult, <i>J</i> value in Hz)	δ _C (ppm)	δ _H (mult, <i>J</i> value in Hz)	δ _C (ppm)
4'		162.7 [162.7]		161.8
C-8 glucosa				
1''	5.03 (d, 9.9) [5.15 (d, 9.8)]	73.7 [75.3]	4.96 (d, 9.3)	75.7
2''	4.26 (dd, 9.9; 8.5) [4.07 (bt, 9.3)]	77.6 [76.7]	4.12 (t, 9.3)	73.0
3''	3.68 (dd, 8.5; 5.3) [3.73 (bt, 8.7)]	81.6 [81.2]	3.57 (dd, 9.3, 7.9)	80.2
4''	3.65 (m)	72.4 [72.4]	3.70 (m)	72.5
5''	3.48 (m) [3.71]	82.8 [82.7]	3.67 (m)	80.4
6''	3.97 (m) 3.80 (m)	62.6 [62.3]	4.47 (dd, 12.0, 2.0) 4.28 (dd, 12.0; 4.7)	65.2
CH ₃ CO				173.1
CH ₃ CO			1.89 (bs)	21.0
4-O- glucosa				
1'''	4.39 (d, 7.7) [4.27 (d, 7.9)]	105.6 [105.2]	5.03 (d, 7.4)	101.6
2'''	3.17 (m) [3.12 (m)]	75.9 [75.9]	3.48 (dd, 9.6, 7.4)	74.9
3'''	3.34 (m) [3.34 (m)]	78.2 [78.1]	3.40 (bt, 9.4)	71.3
4'''	3.32 (m)	71.3 [71.7]	3.43 (m)	71.3
5'''	3.32 (m)	82.8 [82.7]	3.56(m) overlaped	79.8
6'''	3.79 (m)/3.68 (m) [3.79 (m) /3.66 (m)]	62.6 [62.3]	3.73 (dd, 12.0, 5.6) 3.92 (dd, 12.0, 2.00)	62.5
Ramnosa				
1'''	5.13 (d, 1.8) [5.31 (d, 1.7)]	102.0 [101.3]		
2'''	3.88 (dd, 3.1, 1.8) [3.71 (dd, 3.1, 1.7)]	72.0 [72.0]		
3'''	3.59 (dd, 9.6, 3.1) [3.24 (dd, 9.4, 3.1,)]	72.0 [71.7]		
4'''	3.31 (bt, 9.6) [3.22 (bt, 9.4)]	83.2 [82.9]		
5'''	2.55 (dq, 9.6, 6.2) [2.11 (m)]	68.3 [68.1]		
6'''	0.73 (d, 6.2) [0.88 (d, 6.2)]	18.1 [18.1]		

^a En paréntesis cuadrados el conformero menos abundante. Relación 1.00: 0.45, según la integración en RMN ¹H.

6.2.2 Análisis multivariado subgénero *Tacsonia*

Estudios metabolómicos previos en especies del género *Passiflora* han permitido la identificación de C- y O- glicósidos flavonoides, glicósidos de mandelonitrilo y ácidos grasos conjugados^{19,49}. En este estudio nos centramos en las moléculas de polaridad media a alta por el tipo de extracción llevada a cabo, razón por la cual no se identificó la presencia de ácidos grasos, pero sí de flavonoides. El *barcoding* de la Figura 6.3 mostró que las principales diferencias entre las especies de *Tacsonia* se da por su contenido de flavonoides y en algunos casos de aminoácidos. Sin embargo, esta inspección visual no es suficiente para identificar tendencias y se debe hacer uso del análisis multivariado.

Así, se realizó el análisis de componentes principales de los datos de RMN, usando un *binning* de 0.04 ppm, de los extractos de *Tacsonia* usando un escalado Pareto. El *score plot* obtenido explica el 44.8% de la varianza, con un PC1 (26.7%) y PC2 (18.1%). Se puede observar la presencia de cuatro agrupaciones principales (Figura 6.16), siendo interesante destacar la que *P. lehmannii* es un *out-group* y mostró ser la especie menos relacionada entre las muestras evaluadas. Esto se explica porque *P. lehmannii* no pertenece al subgénero *Tacsonia* sino al *Passiflora*. Entre las especies de *Tacsonia* estudiadas la más diferente fue *P. uribei*, que forma un grupo diferente. Las muestras de *P. cumbalensis* están agrupadas separadamente de las otras muestras de *Tacsonia*, mostrando una relación un poco más distante con las otras especies como ha sido descrito anteriormente con base en evidencia de los fenotipos anormales en progenies híbridas y de retrocruzamiento segregado⁶². Esta especie se caracteriza por un alto contenido de derivados de crisina que no son abundantes en las otras especies. Un cuarto grupo, poco definido, se observa en el centro del *score plot* y contiene especies como *P. mixta*, *P. tripartita* var. *mollissima* y *P. tarminiana*, de las cuales se sabe que hibridizan fácilmente, aunque cada uno recupera su propia morfología y carácter genético distintivo después de muy pocas generaciones, lo que sugiere que están muy cerca en términos evolutivos⁶³. Esto está de acuerdo con los datos obtenidos en el PCA.

La *Passiflora* oficial para Colombia *P. tripartita* var. *mollissima* parece ser intermedia entre *P. tarminiana* y *P. mixta* por lo que éstas podrían ser una alternativa para la *Passiflora* oficial de Colombia⁶⁴, mientras las dos variedades de *P. tripartita* no parecen estar tan relacionadas, aunque se debe notar que *P. tripartita* var. *tripartita* tan solo se pudo recolectar

una muestra, pues está casi extinta en el territorio explorado, por lo que no se pueden sacar conclusiones definitivas al respecto. (Tabla 6.2 y Anexo Figura 6.8 y 6.9 y Figura 6.16)

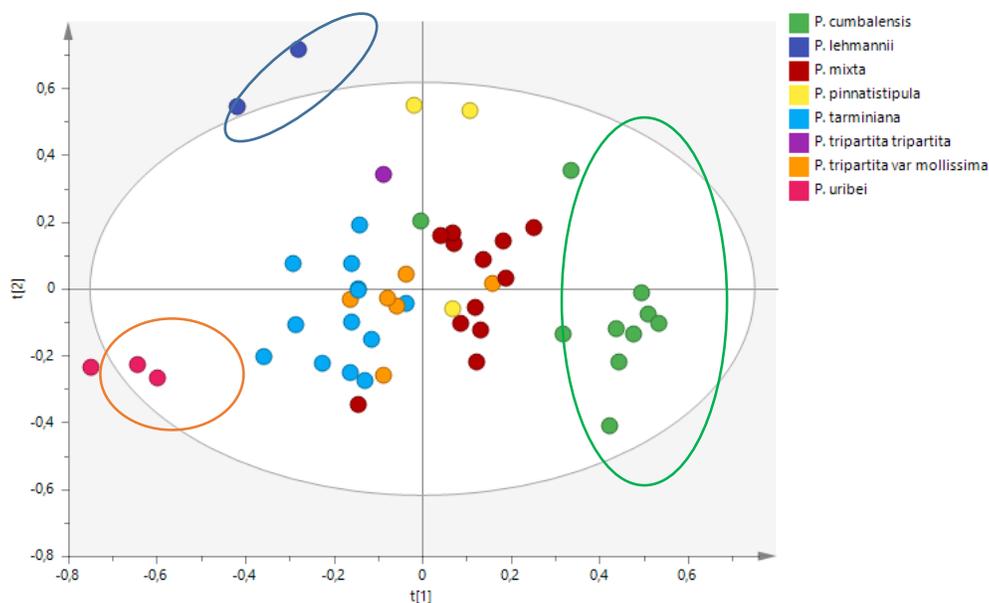


Figura 6.16. PCA PLOT Comparación de hojas de curuba usando análisis de componente principal (PCA), se obtuvo una separación en cuatro grupos principales por *score plot*. El primero corresponde a las especies de *P. cumbalensis* en color verde, el segundo *P. lehmannii* lo que es razonable debido a que esta especie no se encuentra dentro del subgénero *Tacsonia*, el tercer grupo formado por *P. uribei* y el cuarto grupo constituido por las otras especies, todo lo que queda fuera de los círculos

6.2.3 Bioprospección de especies de *Tacsonia* como fuente de *quorum quenchers*

El siguiente paso fue determinar si hay una correlación entre los metabolitos identificados en *Tacsonia* y la actividad inhibitoria *quorum sensing* (IQS) medida para los extractos. Es importante notar que algunos flavonoides C-glicosidados ya han sido reportados como inhibidores de QS⁵, por lo que se puede esperar que estos extractos puedan presentar actividad IQS y ser potencialmente usados en el control de fitopatógenos. Como un ejemplo de un compuesto QQ con aplicación agrícola se puede mencionar una enzima producida por *Bacillus* sp. 240B1, que es capaz de inhibir la producción de señales de QS producidas por *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*), reduciendo la actividad pectolítica extracelular y atenuando su patogenicidad en patata, berenjena, repollo chino, zanahoria, apio, coliflor y tabaco⁶⁵

Los extractos metanol acuosos de las especies de *Tacsonia* fueron evaluados contra el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. Los resultados de algunos extractos de las especies seleccionadas de *Tacsonia* se presentan en la Figura 6.17, donde los extractos de *P. uribei*, *P. lehmannii* y *P. cumbalensis* presentan una fuerte actividad (diámetro del halo de inhibición de 40mm). También se observan extractos de muestras de *Tacsonia* poco activas y otras no activas. Los resultados completos se muestran en el Anexo Tabla S6.3

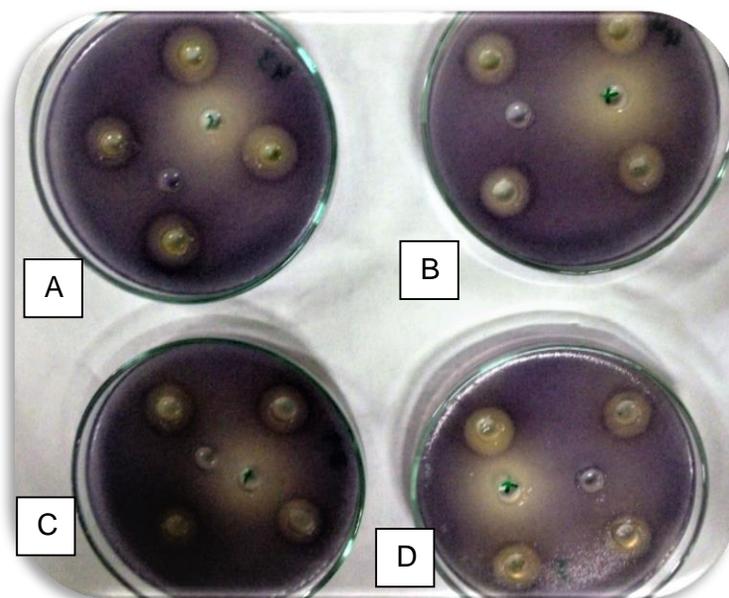


Figura 6.17 Ensayo de inhibición del *quorum sensing* contra *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. La actividad *quorum quenching* es detectada por la falta de producción de violaceína alrededor de los pozos. En las figuras A y B se muestran los resultados del extracto de *P. tarminiana* a 500 µg/mL. Se observa que las dos repeticiones presentan halos similares. En las figuras C y D están los resultados para *P. uribei*; a la misma concentración, pero en esta es posible diferenciar el diámetro de los halos en las dos repeticiones. El *p*-hidroxibenzaldehído fue usado como control positivo (orificio en el centro de la caja con un halo blanco) y 10 µL de metanol al 10% como control negativo (orificio alrededor del cual no existe la presencia de un halo).

La correlación de los metabolitos detectados en los espectros de RMN-¹H con la bioactividad, aplicando proyecciones ortogonales de estructuras latentes (OPLS), y usando los resultados de IQS como código de la variable Y (menos de 30 mm de halo de inhibición se codifican como 1 y más de 30 mm de halo de inhibición se codifican como 3). La separación de los grupos activos y no activos se observa en el *OPLS score plot* ($R^2= 0.425$ and $Q^2= 0.302$), con los grupos activos en el lado negativo a lo largo del OPLS1 (Fig. 6.18A). De esta forma, *P. cumbalensis*, *P. uribei* y *P. lehmannii* se agruparon en dos grupos activos

bien definidos, mientras que las otras especies no mostraron una tendencia clara. La calidad y robustez del modelo OPLS-DA fue validado por un test de permutación ($n=100$). El intercepto del valor de Q^2 fue -0.504 (menor a 0.05), encontrándose que el modelo original es estadísticamente efectivo (Figura 6.19A). Además, el modelo fue validado por el cálculo del área bajo la curva característica operativa del receptor (ROC). El valor del área bajo la curva (AUC) fue 0.9565 que añade confianza al modelo en cuanto a las predicciones que se pueden tomar de este frente a los dos grupos que lo conforman (Activos e inactivos) (Figura 6.19B).

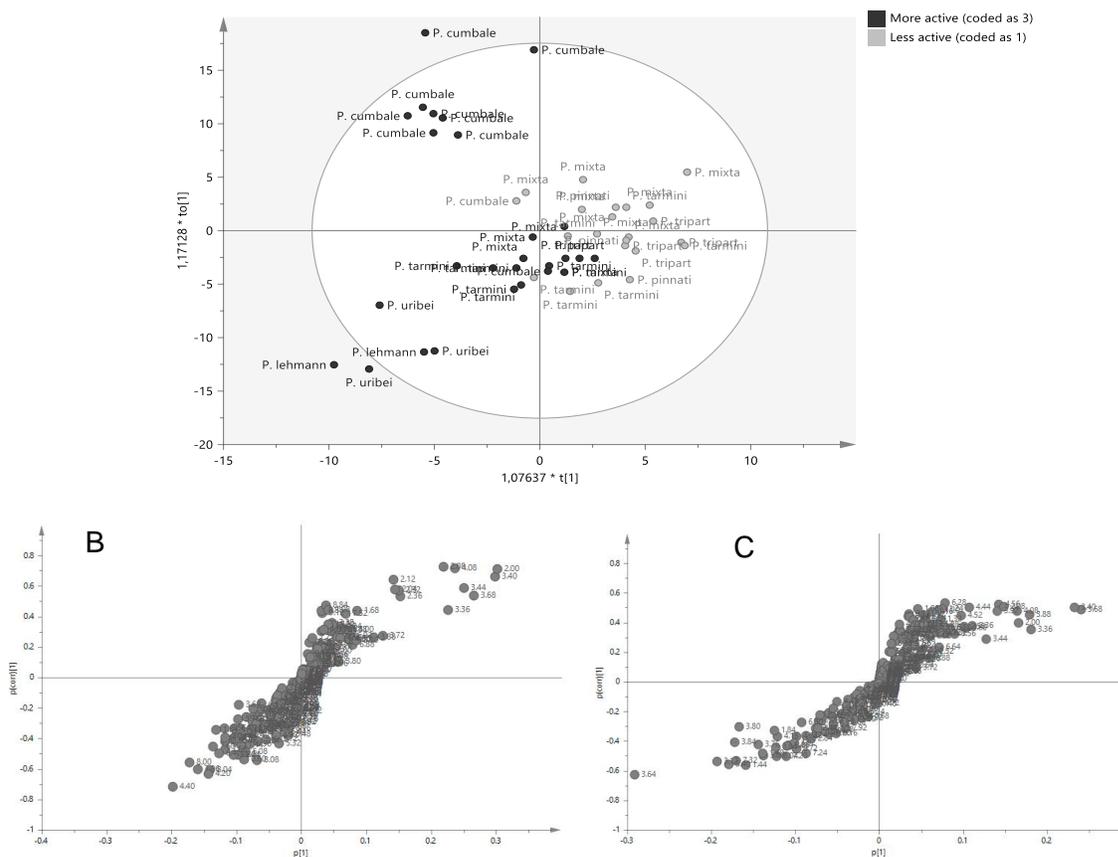


Figura 6.18 Análisis multivariado supervisado con los datos de RMN. A. OPLS score plot usando los Inhibidores de QS como variable Y, mostrando separación de muestras activas y no activas a lo largo de OPLS1. B. El correspondiente S-plot, presentando los valores de IQR significativos. C. S-plot sin *P. cumbalensis*.

A lo largo del eje OPLS2 dos grupos activos pueden ser identificados, uno en el lado negativo para *P. uribei* y *P. lehmannii* y otro en el lado positivo para *P. cumbalensis*, sugiriendo que los compuestos responsables de la actividad no son los mismos en los dos grupos. Para determinar los compuestos activos en *P. cumbalensis* se empleó una S-plot sin usar los datos de *P. lehmannii* y *P. uribei* (Figura. 6.18B). La proyección de variables importantes (VIP) de desplazamientos químicos responsables de la actividad IQS, permitió identificar los siguientes δ_H 3.64, 3.80 y 5.05, correspondientes a residuos de azúcar, y δ_H 6.94 y 7.99 que están correlacionados con el anillo A y B de los flavonoides con núcleo crisina, estos VIP detectados estaban asociados con los flavonoides 6.27 (Crisina 8-C-glucopiranosido) y 6.33 (Crisina 6-C-glucopiranosido), mayoritarios de *P. cumbalensis*. Así mismo, para el modelo que contiene todas las muestras estudiadas se identificaron las variables importantes de la proyección (VIP) responsables de la actividad IQS, permitiendo identificar los siguientes δ_H 3.84, 4.20 y 4.40, correspondiente a los residuos de azúcar, y δ_H 6.80 y 8.04 que están relacionados con los anillos aromáticos de los flavonoides.

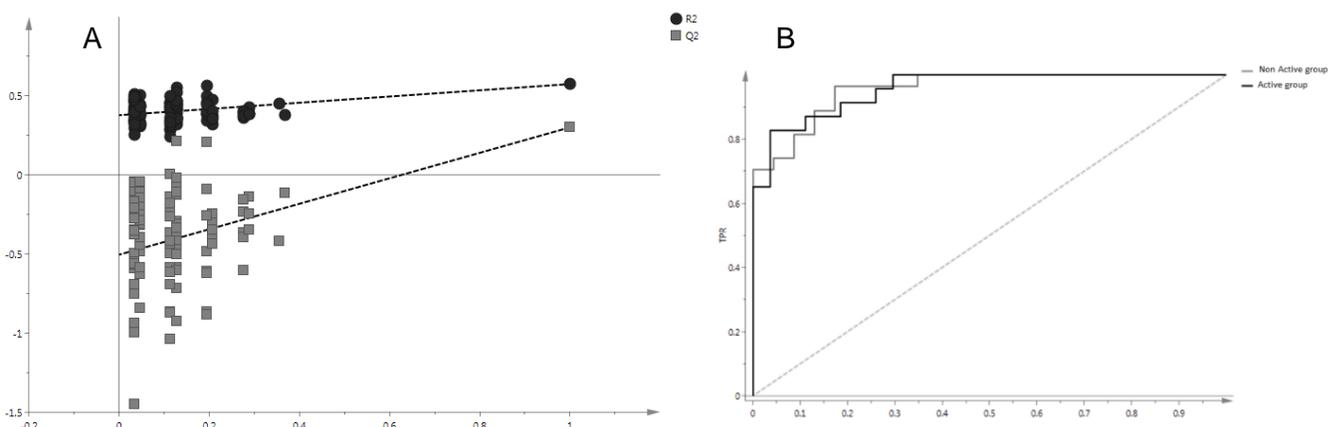


Figura 6.19 A) Resultado del test de permutación del modelo OPLS-DA. (B) Curva ROC que afirma la validez de predicción del modelo, respecto a un grupo activo Vs. Grupo inactivo. El área bajo la curva fue 0.85 (un modelo ideal tendría un AUC de 1) claramente establece que la predicción del modelo fue robusta

Los análisis de OPLS y S-plot anteriores sugieren que los flavonoides son los compuestos responsables de la actividad IQS en especies de *Passiflora*. De hecho, estudios previos han correlacionado la presencia flavonoides con la actividad inhibitoria del QS; así por ejemplo, el estudio de *Centella asiatica* reveló que la quercetina y el kaempferol mostraron actividad inhibitoria de QS contra *C. violaceum* y *P. aeruginosa* PAO1 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Los compuestos mayoritarios de *C. asiatica*, como triterpenos y ácido asiático, no mostraron actividad inhibitoria de QS⁶⁶. La actividad inhibitoria de QS de los extractos de hojas de

Psidium guajava fueron determinados usando el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, la quercetina y quercetina 3-O-arabinosido fueron identificadas como los compuestos QQ usando *C. violaceum* 12472, a 50 y 100 µg/mL, respectivamente⁶⁶. Paczkowski *et al.* estudiaron los mecanismos de inhibición de QS de los flavonoides estableciendo que son inhibidores del regulador transcripcional de QS LasR. En el mismo estudio, se demostró que los flavonoides inhibían específicamente el *quorum sensing* por vía de antagonismo con regulador transcripcional, LasR y RhIR. El análisis de la relación estructura - actividad sugiere que la presencia de dos grupos hidroxilos en el anillo A de la flavona son esenciales para potenciar la inhibición de LasR/RhIR. Los análisis bioquímicos también revelaron que los flavonoides tienen una función no competitiva para prevenir la unión con el ADN de LasR/RhIR. La exposición de *P. aeruginosa* a flavonoides mostró alteración de la transcripción de los *targets* promotores que controlan el *quorum sensing* y suprimen la producción de factores de virulencia, confirmando su potencial como anti infectivos, cuya función no es dado por mecanismos tradicionales bactericidas o bacterostáticos⁶⁷.

Burkholderia glumae es un fitopatógeno que causa el añublo bacterial de la panícula y la pudrición bacterial de la vaina descomposición del arroz en varios campos de cultivo^{68,69}. La toxoflavina (pigmento amarillo brillante) es un factor de virulencia importante para *B. glumae*, causante de los síntomas de la enfermedad^{70,71}. Por esta razón, la búsqueda de compuestos que puedan inhibir la producción de toxoflavina es un *target* importante para controlar la patogenicidad de *B. glumae*. La biosíntesis de toxoflavina está controlada por un regulador transcripcional tipo LysR. ToxR y su ligando toxoflavina actúa como un coinductor para activar la expresión de los operones *tox*⁷⁰. Otro factor de virulencia que coadyuva con la infección que produce *B. glumae* en cultivos de arroz es la motilidad mediada por la presencia de un flagelo polar, cuya producción también es controlada por un sistema de *quorum sensing* mediado por moléculas C8-AHL que utiliza el regulador de tipo IclR QsmR para activar la expresión de *flhDC*⁷².

6.2.4 Ensayos de actividad inhibitoria de QS

Del análisis multivariado se pudo inferir que los compuestos 6.1, 6.2, 6.27 y 6.33 eran los responsables de la actividad inhibitoria de QS frente al biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, en los extractos de *P. lehmannii*, *P. uribei* y *P. cumbalensis*. Estos

extractos fueron fraccionados cromatográficamente como se describe en el numeral 6.3.6., hasta obtenerlos puros. El paso siguiente fue determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC_{QS}) del *quorum sensing* contra *C. violaceum*, para lo que se usó la metodología de dilución en agar empleando 5 concentraciones diferentes para cada compuesto (50 $\mu\text{g/mL}$ – 400 $\mu\text{g/mL}$). Estos ensayos se hicieron en placas de 96 pozos (Figura 6.20). Los compuestos de *P. uribei* y *P. lehmanii* mostraron actividad, mientras los de *P. cumbalensis* no lo hicieron ni a la máxima cantidad empleada. Para el compuesto 6.1 se observa que a 400 $\mu\text{g/mL}$ hay inhibición total en la producción de violaceína, mientras que a 100 $\mu\text{g/mL}$ (0.13mM) la inhibición disminuye considerablemente, por lo que esta es considerada como la MIC_{QS} para el caso del compuesto (6.1). Como es necesario establecer que esta inhibición de la producción de violaceína no se dé por una disminución en la velocidad de crecimiento del biosensor¹¹, se construyó la curva de crecimiento obtenida al tratar la bacteria con el compuesto 6.1. y en que se puede apreciar que el crecimiento de la bacteria no se ve afectado (Figura 6.21A). En tanto que para el compuesto 6.2 la MIC_{QS} fue de 300 $\mu\text{g/mL}$ (0.47 mM) frente al biosensor *C. violaceum* (figura 6.20B), de igual forma éste no afecta al crecimiento del biosensor, de acuerdo a lo observado en la curva de crecimiento que se elaboró con los datos obtenidos de este tratamiento (figura 6.21B). Se realizó estos ensayos para el compuesto aislado de *P. cumbalensis*, probándose concentraciones de 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$ pero no se obtuvo el resultado esperado es decir no se observó actividad. Interesantemente las dos concentraciones de los compuestos evaluados no solo no afectan el crecimiento, sino que incluso el crecimiento de la bacteria es mayor, a juzgar por la mayor absorbancia que alcanza el cultivo en presencia de los compuestos.

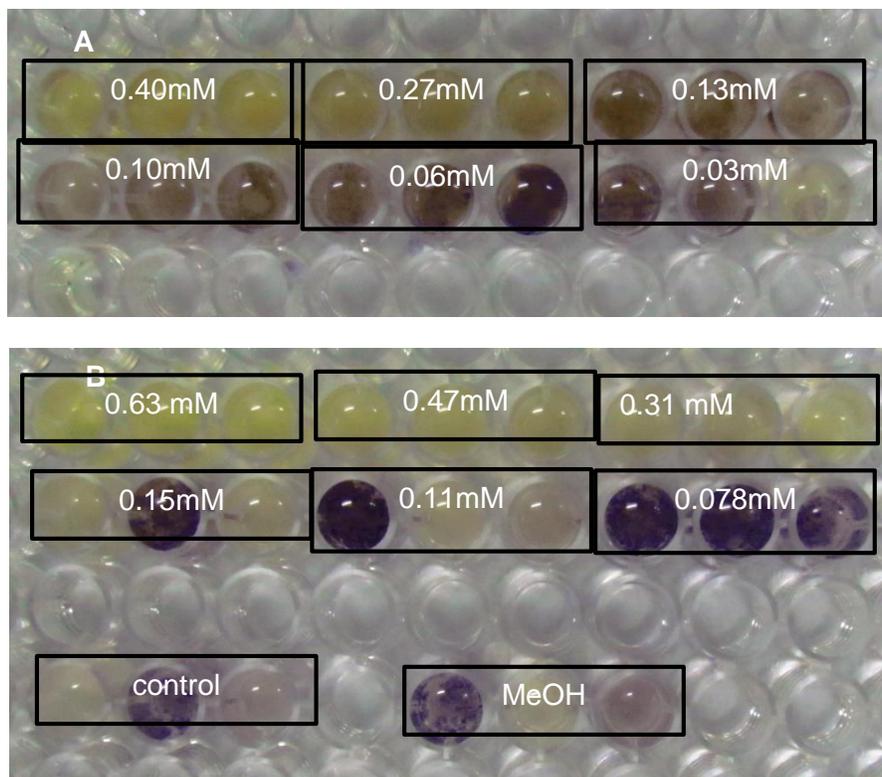


Figura 6.20 Fotografía de la inhibición de QS de los compuestos 6.1 (*Passiflora lehmanni*) (A) y 6.2 (*Passiflora uribei*) (B). Se observa que la actividad del compuesto 6.1 se presenta a una concentración de 0.13 mM (100 µg/mL), mientras que para el compuesto 6.2 es de 0.47 mM (300 µg/mL). Se observa también el blanco que corresponde al medio inoculado con la bacteria y el control negativo que es el medio con la bacteria y metanol al 10% que es el solvente usado para preparar las muestras

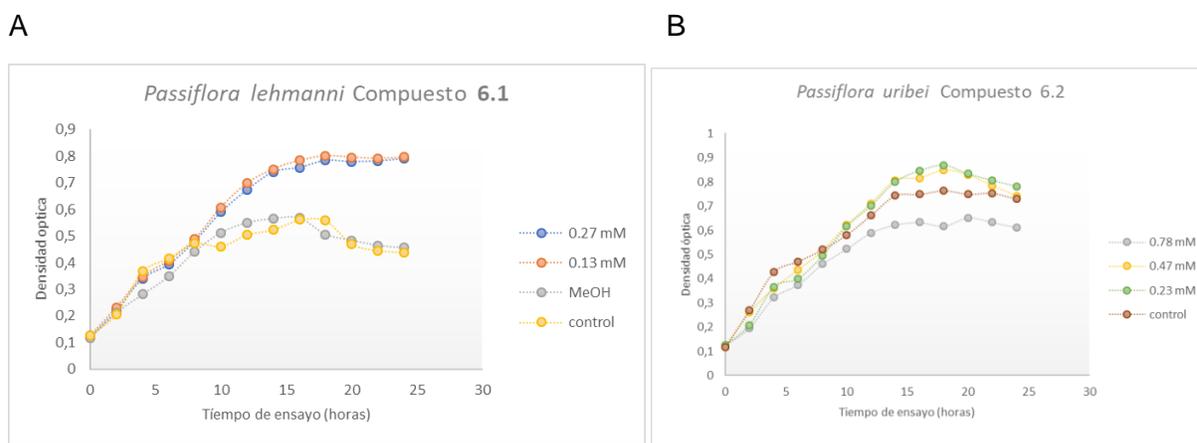


Figura 6.20 Curva de crecimiento de los tratamientos aplicados a *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 con los compuestos 6.1 y 6.2

Con todo lo anterior se pudo establecer que los compuestos 6.1 y 6.2 son capaces de inhibir el sistema de QS del biosensor *C. violaceum* sin afectar el crecimiento. El paso siguiente

fue establecer si, como lo muestra el extracto crudo, también son capaces de afectar la virulencia de *B. glumae*.

Ensayos de inhibición de toxoflavina

Para valorar la producción de toxoflavina por parte del patógeno *Burkholderia glumae* ATCC 33617 en presencia de extractos y compuestos puros aislados de especies de *Passiflora*⁷³ se usó un biosensor sensible a ella. En este caso es el biosensor seleccionado fue la cepa *B. glumae* COK71, que es capaz de detectar la producción de la toxina en concentraciones de 50–500nM⁷³. Esta cepa COK71 fue modificada genéticamente, por Kim *et al.*⁷³ quien gentilmente nos la donó, para tener una alta especificidad por la toxoflavina y está basada en la actividad de la β -galactosidasa que hidroliza un glicósido que libera un pigmento azul. Los extractos enriquecidos en flavonoides (extractos butanólicos) de *P. uribei*, *P. lehmannii* y *P. cumbalensis* disminuyeron la producción de toxoflavina en *B. glumae* ATCC 33617 (Figura 6.20), lo que se evidencia por la ausencia de coloración azul comparado con el control. Estos resultados evidencian el potencial de los flavonoides presentes en estas hojas para controlar la producción de la toxina por el fitopatógeno *B. glumae*. Como control positivo se usó el compuesto 2-n-propil-9-hidroxi-4H-pirid[1,2-a] pirimidin-4-ona (0.066 mg/mL, 80 μ M), que fue sintetizado en esta tesis atendiendo la patente N°US 8,507,674 B2. y que ha sido patentado como inhibidor del QS en *Burkholderia*. La actividad mostrada por este control positivo es similar a la de los extractos de flavonoides (ensayados a 0.05 mg/mL), lo que pone de manifiesto el gran potencial de los flavonoides de *Passiflora* como controladores de este factor de virulencia del fitopatógeno. Los compuestos puros 6.1 y 6.2 inhiben la producción de la toxoflavina en concentraciones inferiores a la pirimidinona patentada pues para el compuesto 6.1 es 6.76 μ M (5 μ g/mL), mientras para 6.2 es de 7.87 μ M (5 μ g/mL).

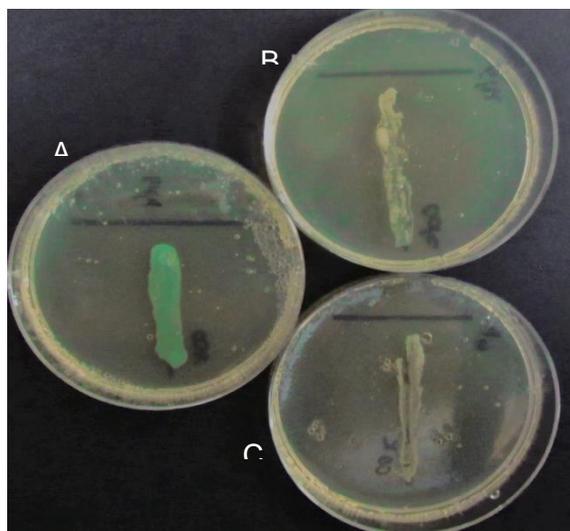


Figura 6.21 Bioensayo en cross streak con *Burkholderia glumae* ATCC 33617 y el biosensor *Burkholderia glumae* COK71. (A) control negativo (color azul); (B) control positivo propuesto en la patente N° US 8,507,674 B2 (sin color) y (C) ensayo con extractos de *Passiflora uribei* (0.05 mg/ml).

Ensayos de *swimming*.

Como se explicó anteriormente la motilidad de las bacterias se considera un fenotipo que actúa favoreciendo la patogenicidad y que además en el caso de *B. glumae* es controlada por QS. Por esta razón determinar si un compuesto es capaz de inhibir este fenotipo mediante IQS es importante en este estudio.

Este ensayo se realizó como se describe en el punto 6.4.6 de este capítulo, brevemente se prepara un medio Top, al que una vez se encuentra sólido se le realiza una pequeña incisión en la que se deposita 5 μ L de una solución que contiene la bacteria con una concentración conocida del compuesto a probar. Como resultado de este ensayo se puede apreciar que existe una disminución en el desplazamiento por *swimming* que desarrolla *Burkholderia glumae* CIAT 4026 al ensayarlo con 1.5 μ g del compuesto 6.1 (Figura 6.22A), en cambio para el compuesto 6.2 no se observa una mayor actividad razón por la que se podría deducir que este compuesto no afecta el QS de *B. glumae* relacionado con este fenotipo (Figura 6.22C). Como control negativo se usó MeOH al 10% como concentración final de la solución de bacteria para determinar que no sea este disolvente el responsable de la actividad (Figura 6.22B) y como blanco se depositaron 5 μ L de la dispersión de la bacteria (Figura 6.22D).

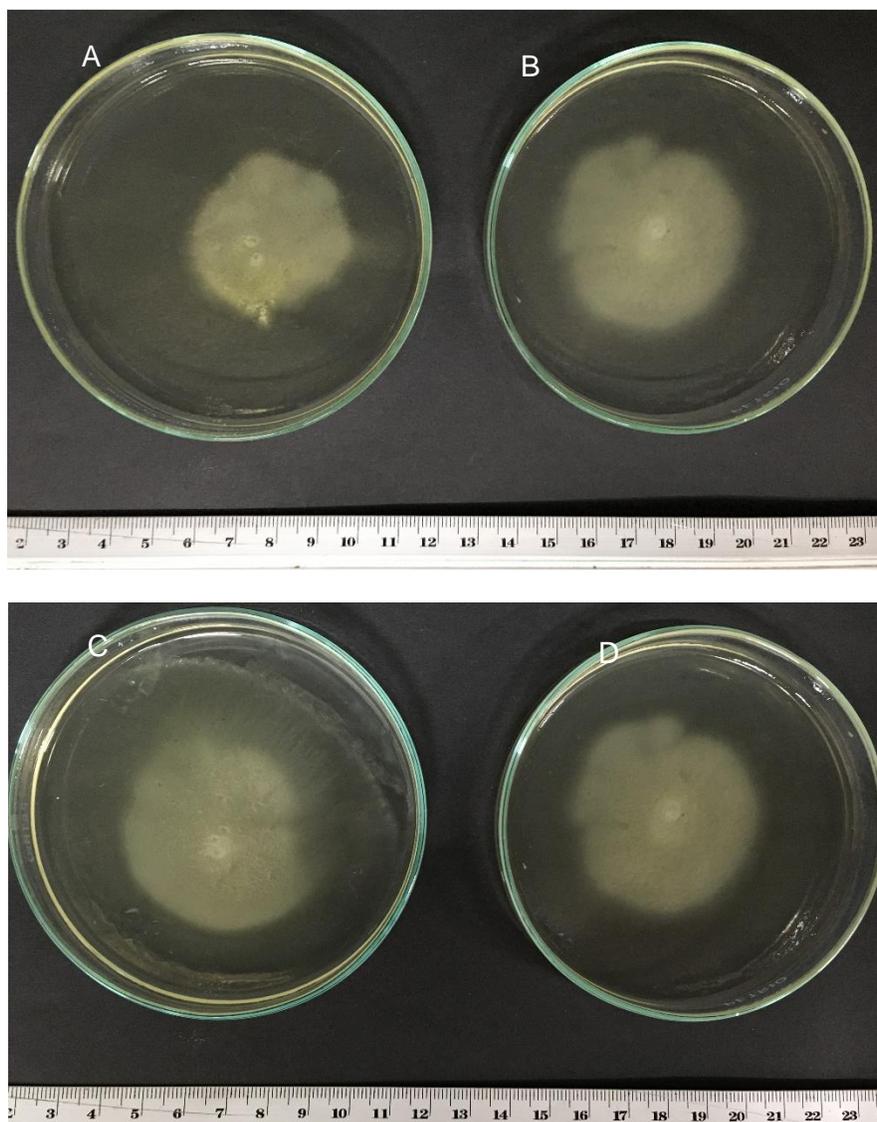


Figura 6.22 Ensayos de inhibición del *swimming* en *B. glumae*. A. compuesto 6.1 aislado de *P. lehmanni* cuando actúa con 2.02 nmoles (1.5 μg) del compuesto presenta disminución en el diámetro del movimiento. C. compuesto 6.2 aislado de *P. uribei* con 2.36 nmoles (1.5 μg) no presenta una marcada inhibición del QS. B y C corresponde a los controles de MeOH y el blanco que es la bacteria sin compuesto respectivamente.

Ensayos con catafilos de cebolla.

Para determinar si los compuestos inhibían a *B. glumae* en un modelo *in vivo* que se usa para predecir la virulencia del patógeno⁷⁴, que consiste en determinar el grado de maceración que sufre los catafilos de cebolla, siguiendo la metodología propuesta por Karki 2010⁷⁵. Este modelo permite predecir el efecto de *B. glumae* sobre las semillas de arroz. El nivel de virulencia se evalúa midiendo el área de maceración en cada catafilo de cebolla.

En primer lugar, se determinó la inocuidad de los compuestos en un sistema vivo depositando sobre los catafilos de la cebolla cantidades conocidas de los compuestos a evaluar. Se conoce que el compuesto es inocuo si después de incubarlos por 36 horas no se presenta ninguna alteración en el tejido de la cebolla. Una vez determinada la inocuidad de los compuestos 6.1 y 6.2, se procedió a realizar los ensayos usando la bacteria de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 6.3.6. Como resultado de estos ensayos se puede observar que no se presenta maceración en la cebolla a diferencia de lo que se observa en los ensayos con MeOH y la bacteria sin compuesto. (Figura 6.23) Por lo que estos compuestos inhiben al patógeno *Burkholderia glumae* CIAT 4026, que es altamente agresivo.

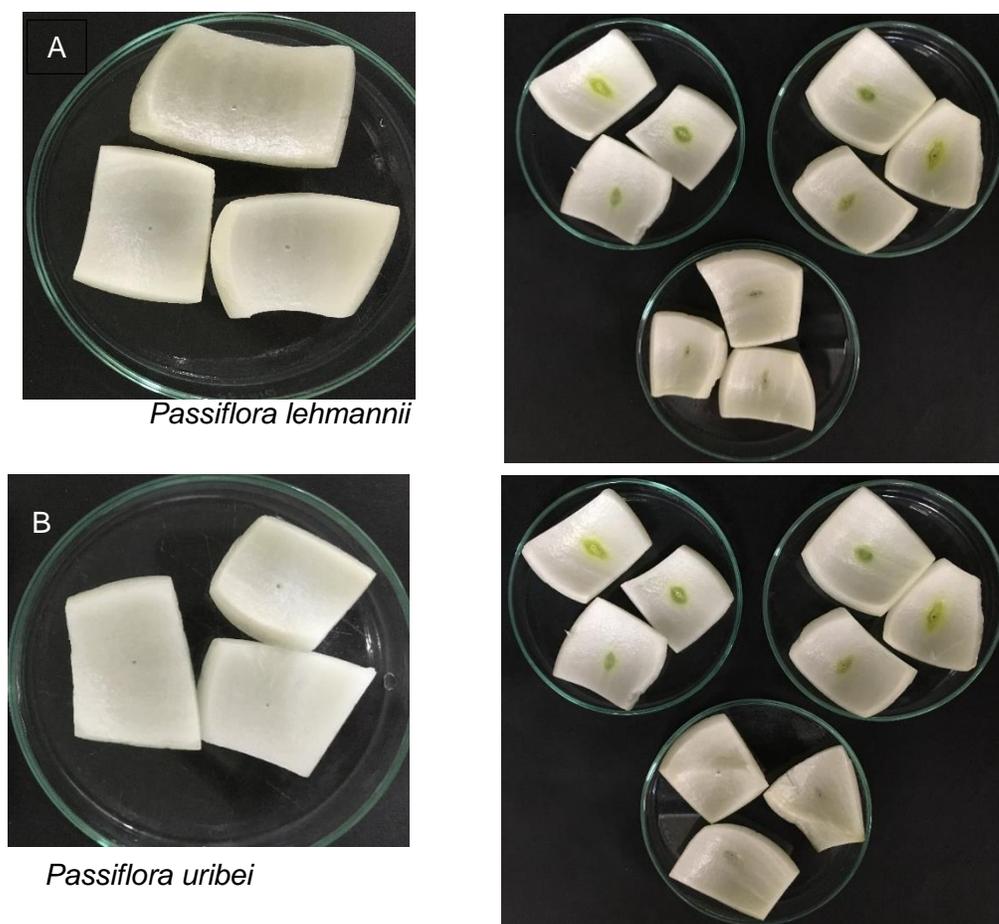


Figura 6.23. Ensayo en modelo en catafilos de cebolla usando *Burkholderia glumae* CIAT 4026. A Compuesto 6.1, aislado de *Passiflora lehmannii*, ensayo de inocuidad (lado izquierdo) a una concentración de 50, 75 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En el lado derecho control con MeOH recuadro superior izquierdo y control de bacteria recuadro superior derecho, en el inferior el ensayo con 1.21 nmoles (0.9 μg) del compuesto. B Compuesto 6.2, aislado de *Passiflora uribei*, ensayo de inocuidad cuadro izquierda, la actividad del compuesto. En el recuadro superior se encuentran los controles y en el inferior el compuesto a una concentración de 1.41 nmoles (0.9 μg).

6.3 Conclusión

El subgénero *Tacsonia Passiflora* comprende un grupo de plantas con diferentes actividades biológicas, entre ellas, la actividad ansiolítica resulta ser la más reportada. El estudio químico de especies de este subgénero permitió la identificación de 59 compuestos entre los cuales se hallaron aminoácidos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. Adicionalmente, dos nuevos flavonoides fueron identificados en *P uribei* y *P. lehmanii*. Esta investigación es una contribución a la descripción de los marcadores químicos de especies del subgénero *Tacsonia* y su correlación con la actividad biológica, demostrando el potencial uso de estas especies.

Los datos del análisis multivariado (PCA y OPLS) de las siete especies analizadas mostraron que *P. cumbalensis* y *P. uribei* son especies altamente diferenciadas de las otras especies estudiadas del subgénero *Tacsonia* (*P. tripartita* var. *mollissima*, *P. tarminiana* and *P. mixta*, *P. tripartita* var. *tripartita*). Estas diferencias se deben principalmente a la presencia de glicósidos de crisina identificadas en *P. cumbalensis* y acetil hexósidos de vitexina presentes en *P. uribei*. Adicionalmente, el contenido de flavonoides se correlacionó con la actividad inhibitoria del *quorum sensing* usando el biosensor *C. violaceum*.

En el ensayo de inhibición de la producción de toxoflavina por parte de *Burkholderia glumae* ATCC 33617, se usó como control positivo 2-n-propil-9-hidroxi-4H-pirid[1,2-a]pirimidin-4-ona, sintetizada en el laboratorio y patentada en la literatura como inhibidor de la producción de toxoflavina en *B. glumae*. El compuesto patentado inhibió la producción de la toxoflavina a 80 μM (16.32 $\mu\text{g/mL}$), mientras 6.1 y 6.2 lo hicieron a 6.76 (5 $\mu\text{g/mL}$) μM y 7.87 μM (5 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Mostrando que estos flavonoides de *Passiflora* son altamente prometedores como controladores de este fitopatógeno del arroz.

Los compuestos 6.1 y 6.2, junto con la Crisina 8-C-glucopiranosido (6.27) y Crisina 6-C-glucopiranosido (6.33) fueron ensayados frente al biosensor *C. violaceum*. En los ensayos frente a *C. violaceum* se determinó que los dos primeros eran activos a una concentración de 0.135 mM (100 $\mu\text{g/mL}$) para el compuesto 6.1 y de 0.472 mM (300 $\mu\text{g/mL}$) para el compuesto 6.2, pero no fueron activos los compuestos 6.33 y 6.27.

En el ensayo de movilidad *swimming* frente a *B. glumae*, sólo el compuesto 6.1 demostró actividad cuando se añadieron 2.02 nmoles (1.5 µg) del compuesto, los otros flavonoides no controlaron este fenotipo. Finalmente, en el ensayo de virulencia en modelo de cebolla tanto 6.1 como 6.2. fueron activos cuando se añadieron 1.21 nmol (0.9 µg) y 1.41 nmoles (0.9 µg) respectivamente.

Dado que *P. uribei* y *P. lehmannii* no han sido domesticadas y podría haber dificultades en el suministro de los flavonoides para las aplicaciones agrícolas, se requieren nuevos estudios químicos para determinar la influencia y la variabilidad metabólica de estas especies asociadas a su distribución geográfica y ambiental. Una vez establecidas estas se deben valorar resultados de control de inhibición de la *Burkholderia* en pruebas en campo con semillas de arroz.

6.4 Materiales y Métodos

Para el procesamiento de las muestras se usó Ultrasonificador (Branson 5510E-MT, Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA). Microcentrífuga (Thermo Scientific, Heraeus Pico 17, microcentrifuge). Liofilizador (Edwards Ltd., Crawley, UK). Los espectros de RMN fueron tomados en un equipo Bruker (600 MHz DMX-600 spectrometer, Bruker AXS Advanced X-ray Solutions GmbH, Karlsruhe, Germany) operado a 600.13 MHz para espectros de RMN- ^1H y equipado con una crioprobe TCI y un sistema de gradient Z. Los análisis de UHPLC-TOF-MS se realizaron en un sistema Ultimate 3000 UHPLC (Thermoscientific, Pittsburgh, PA, USA) acoplado a un micro-ToF-2Q espectrómetros de masas de Bruker Daltonics (Bremen, Germany) on interfase de electrospray⁷⁶. Silica gel (pore size 60 Å, 70–230 mesh) para columnas cromatográficas abiertas marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Sephadex LH-20 (GE Healthcare Life Sciences, Eindhoven, Países Bajos) se usó para la cromatografía por exclusión de tamaño.

6.4.1 Material vegetal

Las plantas usadas en este estudio pertenecen al subgénero *Tacsonia*, género *Passiflora*, familia Passifloraceae; como se detalla en la Tabla 6.1; además, se colectó una especie de granadilla, *Passiflora lehmannii* (subgénero *Passiflora*), con fines comparativos. Las muestras fueron colectadas en la región central que corresponde al departamento de Cundinamarca y la región sur a los departamentos de Nariño y Huila. Todas las muestras corresponden a muestras silvestres de plantas maduras con flores y frutos, se colectaron de seis a diez hojas sanas con tijeras estériles. Las hojas se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Después de retirar el exceso de nitrógeno y liofilizarlas por 48h, todas las muestras fueron extraídas (con 1:1 $\text{CD}_3\text{OD}:\text{KH}_2\text{PO}_4$ buffer en D_2O MD6) y posteriormente fueron analizadas por RMN para obtener los espectros de RMN- ^1H . Las muestras fueron identificadas según sus caracteres morfológicos siguiendo los lineamientos de Escobar, Ocampo and Primot^{8,77}.

6.4.2 Reactivos químicos

Metanol- d_4 , agua deuterada y TSP- d_4 fueron comprados a Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim, Germany). Metanol (grado RA y CLAE), acetonitrilo (grado CLAE), diclorometano (grado

RA) y butanol (grado RA), fueron comprados a Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los estándares de referencia usados fueron: isoorientina (Sigma, >98%), orientina (Sigma, >97%), trihidrato de rutina (Sigma, >95%), isovitexina (Fluka, >95%), vitexina (Fluka, >95%) y luteolina-7-O-glucosido (Fluka, >98%). La identidad de los compuestos de referencia se verificó por RMN-¹H y CLAE-MS.

6.4.3 Análisis de RMN

a. Extracción

Las muestras fueron preparadas siguiendo el procedimiento descrito por Kim *et al.* para el análisis metabolómico de plantas⁷⁸, con pequeñas modificaciones, a saber 25 mg de hojas secas de *Passiflora* fueron transferidas a un tubo Eppendorf de 2 mL, con 0.5 mL de metanol-*d*₄ y 0.5 mL de buffer KH₂PO₄ en D₂O (pH 6.0), con un contenido de 0.1% TSP. Posteriormente, se mezcló en un vortex por 1 min a temperatura ambiente y luego fue sonicada por 15 minutos. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas por 5 min a 13,000 RPM a temperatura ambiente y 300 µL del sobrenadante fue filtrado directamente en un tubo de RMN de 3 mm.

b. Medición

Los espectros de RMN-¹H fueron tomados a 25°C en un espectrómetro Bruker DMX-600 de 600MHz. Los parámetros experimentales de la espectroscopía RMN-¹H, la espectroscopía de correlación ¹H-¹H COSY y correlación heteronuclear a multiple enlace (HMBC) fueron tomados según el protocolo de Kim *et al.*⁷⁸. Cada espectro de RMN-¹H se tomó con 128 scans usando los siguientes parámetros: 0.16 Hz/punto, ancho de pulso (pulse width, PW) = 30 (11.3 µs) y tiempo de relajación (relaxation delay) de 1.5 s³⁴. Las FID fueron tratadas usando las transformaciones de Fourier con ensanchamiento de línea⁸ = 0.3 Hz. La secuencia de presaturación fue usada para suprimir la señal residual del H₂O. Los espectros obtenidos fueron analizados usando TopSpin (ver. 3.1 Bruker). La fase y la línea base fueron ajustadas manualmente y se calibraron a 0.00 ppm según el TSP. Los metabolitos primarios fueron asignados realizando comparación de la posición de los picos usando los patrones de la librería espectral Chemon Chenomx™ 600 MHz y la base de datos del laboratorio.

6.4.4 Análisis de HPLC-MS

a. Extracción

Después de moler las hojas secas de *Passiflora*, 500 mg fueron adicionados en un tubo plástico de 15 mL, se agregaron 5 mL de agua:metanol (1:1) y se sonicaron a 25°C por 15 min. Se removió el solvente al extracto filtrado a presión reducida y el residuo fue re-suspendido en 5 mL de agua extrayendo con diclorometano y posteriormente con butanol. La fracción butanólica fue secada y liofilizada. Se prepararon soluciones de 1 mg de fracción butanólica en 1 mL de agua, filtradas con filtros de 0.20 µm (Minisart® RC15 Syringe, 0.2 µm) para luego analizarlas por UHPLC-HRMS. La fracción butanólica es rica en flavonoides y saponinas según reportes previos³⁴.

b. Medición

El análisis de UHPLC-TOF-MS se realizó en un equipo Ultimate 3000 UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas Bruker Daltonics microTOF-QII equipado con una fuente de ionización por electrospray estándar. Los análisis fueron realizados con ESI en detección tanto en modo negativo como en modo positivo. El rango de masas (m/z) se fijó de 100–1300 y las condiciones de ESI se mencionan a continuación: gas nebulizador, nitrógeno (2.0 bares), gas de secado, nitrógeno (11 L/min a 200°C); voltaje capilar, 3800 V; *end plate offset*, -500 V; funnel 1 RF, 220 Vpp; funnel 2 RF, 140 Vpp; gas de colisión, nitrógeno; energía de colisión, 8 eV; collision RF 300 Vpp; tiempo de transferencia, 70 µs; *prepulse storage*, 5 µs; *spectra rate*, 2 Hz. El espectrómetro de masas se programó para adquirir datos de MS/MS de manera dependiente, adquiriendo 5 *scans* MS/MS para cada *scan* de precursor MS1. Para la ionización en modo positivo, todas las condiciones fueron las mismas y el voltaje capilar fue de 4000 V. Se realizó la calibración interna usando una solución de formiato de sodio de 10 mM de Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Las muestras fueron separadas usando una columna C18 Kinetex (150 × 2.0 mm, 1.7 µm) (Phenomenex, USA) y se usó un sistema de solventes de acetonitrilo (solvente A) y 0.5% ácido fórmico (solvente B), en una única rampa desde 17% a 35% A en 20 min. Para cada muestra se inyectaron 3 µL y se usó un flujo de 0.5 mL/min.

6.4.5 Aislamiento de flavonoides

Con el fin de obtener los flavonoides mayoritarios y asignar sus señales en RMN (en MD6), las fracciones butanólicas de *P. cumbalensis*, *P. lehmannii* y *P. uribei* fueron separadas por técnicas cromatograficas como CC y analizadas por HPLC-MS y RMN. Las señales asignadas de RMN y HPLC-MS se usaron en el análisis de los espectros de los extractos crudos. (sección 4.3).

a. Flavonoides de *P. cumbalensis*

Las hojas (2.8 g) de *P. cumbalensis* fueron molidas y extraídas dos veces con MeOH/H₂O (1:1 v/v) y se removió el solvente a presión reducida para obtener un extracto verde oscuro. El extracto fue sometido a partición líquido/líquido con CH₂Cl₂/H₂O (1:1 v/v). La fracción acuosa fue sometida nuevamente a una partición con BuOH/H₂O (1:1 v/v), obteniendo una fracción acuosa (WW, 715 mg) y fracción butanólica (WB, 163 mg). Una parte de la fracción WB (154 mg) se fraccionó usando una columna cromatográfica en fase normal con sílica gel (4 g, Buchi Silica), con un flujo constante de 10 mL/min. Se usó el solvente A (CHCl₃) y el solvente B (1% ácido fórmico en metanol) con un gradiente de elución lineal (0-10 minutos isocrático 10% de B durante 10 min, 10-60 minutos hasta 90% de B, luego 60-80 minutos isocrático a 90% de B) para obtener nueve fracciones (F1–F9).

Las fracciones F2 y F3 (45 mg) (eluídas con 15% de B) fueron separadas usando cromatografía con fase estacionaria sephadex LH-20, eluída con metanol. Se colectaron 50 tubos de 10 mL cada uno y se obtuvieron 7 subfracciones (F2.1–F2.7). La subfracción F2.3 (21 mg) contenía crisina 8-C-glucopiranosido (6.52) y crisina-6-C-glucopiranosido (6.58)^{42,79}, siendo el último purificado por recristalización con metanol. Las fracciones F4-F5 (14 mg) (eluídas con 60% de B) se separaron por cromatografía con sephadex LH-20 eluída con metanol. Nuevamente se colectaron 50 tubos de 10 mL cada uno y se juntaron en ocho subfracciones (F4.1–F4.8). La subfracción F4.3 contenía una mezcla de isovitexina-2''-O-ramnosido (6.42)⁵⁴ y crisina 6-C-glucopiranosido (6.58). La subfracción F4.5 resultó ser una mezcla de isoorientina (6.37) e isovitexina (6.46). Las fracciones F6-F7 fueron separadas en una columna de sephadex siguiendo los procedimientos antes descritos, mientras la subfracción F6.5 fue una mezcla de isovitexina (6.46) y schaftosido

(6.36)⁵². Todas las muestras fueron analizadas en RMN-¹H (solventes MD6, DMSO y metanol-d₄) y UHPLC-MS.

b. Flavonoides de *P. lehmannii*

Las hojas molidas y secas de *P. lehmannii* (250 mg) fueron extraídas con una mezcla de MeOH/H₂O (1:1 v/v) por triplicado y se removió el solvente a presión reducida. El extracto obtenido fue sometido a partición L-L con DCM, BuOH y agua como se describió previamente. La fracción WB (8 mg) corresponde principalmente a un único compuesto y una porción (3.8 mg) fue separada por CLAE usando una columna Phenomenex luna column (250 x 10 mm, 5µm), con una fase móvil de H₂O: ACN en gradiente lineal (0-20 minutos desde 20% de ACN hasta el 80% de ACN). Se aisló 1.1 mg del flavonoide mayoritario Apigenina-4-O-β-glucopiranosil-8-C-β-neohesperidosido (6.1) (tiempo de retención, 9.8 min), identificado por RMN y HRMS.

c. Flavonoides de *P. uribei*

Una pequeña porción de las hojas molidas y secas de *P. uribei* (160 mg) fue extraída con MeOH/H₂O (1:1 v/v) 5 veces. El extracto resultante fue concentrado y sometido a partición L-L usando DCM, BuOH y agua, como se describió previamente. La fracción butanólica (8mg) fue separada en las mismas condiciones de HPLC descritas previamente, aislando 3.6 mg del flavonoide mayoritario apigenina-4'-O-β-glucopiranosil-8-C-β-(6''acetil)-glucopiranosido (6.2), (tiempo de retención, 10.0 min). El compuesto fue analizado por RMN-¹H (solventes MD6, DMSO y metanol-d₄) y UHPLC-MS.

6.4.6 Ensayos de actividad biológica

Los extractos de las especies de *Passiflora* se obtuvieron de 20 mg de polvo de hojas secas. Se adicionó 1 mL de metanol-agua 1:1. La mezcla fue sonicada por 15 minutos y luego centrifugada por 20 min a 6000 rpm. Los sobrenadantes obtenidos fueron evaluados en cuanto a la presencia de compuestos QQ usando el ensayo modificado de difusión en agar⁸⁰⁻⁸². Brevemente, una suspensión de la cepa de *Chromobacterium violaceum* ATCC31532, previamente crecida en medio líquido LB, fue inoculada en 30 mL de medio LB agar con el fin de obtener una suspensión de 0.5 OD_{600nm}. El medio fue servido en cajas Petri de 9 cm y se realizaron 4 pozos (6 mm de diámetro) que se hicieron una vez el medio

se solidificó. Después, 300µL de cada extracto de metanol-agua fueron depositados en los pozos de las cajas Petri e incubadas por 24 h a 30°C. Como control negativo se usaron 300µL de MeOH-H₂O 1:1 y 200 µg 4-hidroxibenzaldehído (PHB) fue usado como control positivo, disuelto en MeOH. La presencia de compuestos QQ se determinó por la ausencia de violaceina alrededor de los pozos sin inhibición del crecimiento del biosensor (*C. violaceum*)⁸³.

a. Ensayos de IQS con *Burkholderia glumae* usando el método de *cross-streaking*

Se prepararon cajas Petri con 10 mL de medio LB agar suplementado con X-gal (40µg/mL) y el extracto (0.5 µg/mL) o compuesto puro (0.3 µg/mL) a ensayar. Como control positivo se usó el compuesto QQ 2-n-propil-9-hidroxi-4H-pirid[1,2-a] pirimidin-4-ona (80 µM). Este compuesto fue sintetizado según la patente N°US 8,507,674 B2 Aug. 13, 2013⁸⁴. Como control negativo se usó el medio con una solución de MeOH al 5% que corresponde al solvente usado para disolver los compuestos a probar. Como blanco se usó el medio sin adicionar ningún compuesto. Los extractos butanólicos de las especies de *Passiflora* (0.05 mg /mL) fueron usados para evaluar su actividad biológica.

Una vez que se solidificó el medio se realizó el rayado de *Burkholderia glumae* ATCC33617 en una línea sobre el agar y en posición T se rayó *B. glumae* COK71 con una distancia entre ellas de 5mm. Previamente, las cepas fueron crecidas en medio LB líquido y la suspensión se ajustó a OD_{600nm} 0.5. La presencia de toxoflavina induce la producción β-galactosidasa en la cepa COK71 generando una coloración azul. No se observaron cambios fenotípicos en ausencia de toxoflavina⁷³. En este sentido, es posible establecer la inhibición de la toxoflavina fenotipo regulado por QS por los extractos y compuestos ensayados.

La cepa *B. glumae* COK 71 usada como biosensor fue amablemente donada por el Profesor Jimwoo Kim de la University of Korea⁷³.

b. Ensayo de inhibición de *swimming* en *Burkholderia glumae*

Para determinar si el compuesto es capaz de inhibir la motilidad de la bacteria se realizó un ensayo, siguiendo la metodología propuesta por Karki 2010⁷⁵ con ligeras modificaciones. A saber, se dejó crecer la bacteria durante la noche a 37 °C en un agitador (130 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica DO₆₀₀ 0.7. Se prepararon cajas Petri con agar KB solidificado

con 0.3% de agar (Composición por cada litro de agua: Peptona 20 g; Cloruro de magnesio 1,5 g; sulfato de potasio 1,5 g, Agar 3 g y glicerol 10 mL) y se dejaron solidificar durante 15 minutos. Posteriormente, en el centro del agar se deja caer haciendo una pequeña incisión en el agar 5 μ L del inóculo de la bacteria *Burkholderia glumae* CIAT 4026 (D.O.600nm= 0.7), que habían sido suplementados 100 μ g del compuesto a probar, de este se toman alícuotas para alcanzar la concentración de compuesto deseada en cada caso (6.1 y 6.2 (1.5, 1 y 0.5 μ g/ 10 μ L de solución de inóculo de bacteria), como control negativo al inóculo se le adicionó con 300 μ L de MeOH y en otra caja se creció la bacteria en ausencia de los compuestos (control negativo). La actividad se determinó comparando el diámetro del movimiento que presenta en la cepa *wild type*. Si la bacteria no se movía, o lo hacía significativamente menos, el compuesto se clasificaba como inhibidor del QS.

C. Ensayo con catafilos de cebolla

Los catafilos de cebolla se quitaron con un cuchillo estéril y se cortaron en pedazos con un tamaño aproximado de 2 X 3 cm. En cajas Petri estériles se colocan de 2 a 3 catafilos a los que se les hace una pequeña incisión con una punta estéril de 10 μ L, en el orificio que se forma se coloca 3 μ L de una solución de la bacteria *Burkholderia glumae* CIAT 4026 crecida durante la noche con una DO₆₀₀ de 0.5 y adicionada con 0.9 μ g del compuesto que vamos a probar. Las cajas con el inóculo se tapan y se colocan en una cámara húmeda preparada en una caja de plástico estéril y cubierta con papel toalla húmedo. Esta se cierra herméticamente usando vinipel, evitando realizar movimientos bruscos que modifiquen el ensayo. Se incuba por 36 horas a 30°C en una incubadora. El grado de virulencia se determinó midiendo el área macerada en el catafilo

6.5 Bibliografía

- (1) Ocampo Pérez, J.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Restrepo, M.; Jarvis, A.; Salazar, M.; Caetano, C.; Ocampo Perez, J.; Coppens d'Eeckenbrugge, G.; Restrepo, M.; Jarvis, A.; et al. Diversity of Colombian Passifloraceae: Biogeography and an Updated List for Conservation. *Biota Colomb.* 2007, 8 (1), 1–45.
- (2) Ingale, A. G.; Hivrale, A. U. Pharmacological Studies of *Passiflora* Sp . and Their Bioactive Compounds. *African J. Plant Sci.* 2010, 4 (10), 417–426.
- (3) Gadioli, I. L.; da Cunha, M. de S. B.; de Carvalho, M. V. O.; Costa, A. M.; Pineli, L. de L. de O. A Systematic Review on Phenolic Compounds in *Passiflora* Plants: Exploring Biodiversity for Food, Nutrition, and Popular Medicine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2016, 00–00.

- (4) Dhawan, K.; Dhawan, S.; Sharma, A. Passiflora: A Review Update. *J. Ethnopharmacol.* 2004, *94* (1), 1–23.
- (5) Brango-Vanegas, J.; Costa, G. M.; Ortmann, C. F.; Schenkel, E. P.; Reginatto, F. H.; Ramos, F. A.; Arévalo-Ferro, C.; Castellanos, L. Glycosylflavonoids from *Cecropia Pachystachya* Trécul Are Quorum Sensing Inhibitors. *Phytomedicine* 2014, *21* (5), 670–675.
- (6) Osbourn, A. E. Saponins in Cereals. *Phytochemistry* 2003, *62* (1), 1–4.
- (7) Sparg, S. G.; Light, M. E.; van Staden, J. Biological Activities and Distribution of Plant Saponins. *J. Ethnopharmacol.* 2004, *94* (2–3), 219–243.
- (8) Primot, S.; D'Eeckenbrugge, G. C.; Rioux, V.; Pérez, J. A. O.; Garcin, F. Variación Morfológica de Tres Especies de Curubas (*Passiflora Tripartita* Var. *Mollissima*, *P. Tarminiana* Y *P. Mixta*) Y Sus Híbridos En El Valle Del Cauca (Colombia). *Rev. Bras. Frutic.* 2005, *27* (3), 467–471.
- (9) Campos, T.; Quintero, O. C. Curuba (*Passiflora Tripartita* Var. *Mollissima*). 2012, 421–442.
- (10) Ministerio de la Protección Social de Colombia. Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales. *Univ. Nac.* 2008.
- (11) Grandclément, C.; Tannières, M.; Moréra, S.; Dessaux, Y.; Faure, D. Quorum Quenching: Role in Nature and Applied Developments. *FEMS Microbiol. Rev.* 2015, *40* (1), 86–116.
- (12) Helman, Y.; Chernin, L. Silencing the Mob: Disrupting Quorum Sensing as a Means to Fight Plant Disease. *Mol. Plant Pathol.* 2015, *16* (3), 316–329.
- (13) Andersen, A. S.; Joergensen, B.; Bjarnsholt, T.; Johansen, H.; Karlsmark, T.; Givskov, M.; Krogfelt, K. A. Quorum-Sensing-Regulated Virulence Factors in *Pseudomonas Aeruginosa* Are Toxic to *Lucilia Sericata* Maggots. *Microbiology* 2010, *156* (Pt 2), 400–407.
- (14) Barnard, A. M. L.; Bowden, S. D.; Burr, T.; Coulthurst, S. J.; Monson, R. E.; Salmond, G. P. C. Quorum Sensing, Virulence and Secondary Metabolite Production in Plant Soft-Rotting Bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2007, *362* (1483), 1165–1183.
- (15) Kim, J.; Kang, Y.; Choi, O.; Jeong, Y.; Jeong, J. E.; Lim, J. Y.; Kim, M.; Moon, J. S.; Suga, H.; Hwang, I. Regulation of Polar Flagellum Genes Is Mediated by Quorum Sensing and FlhDC in *Burkholderia Glumae*. *Mol. Microbiol.* 2007, *64* (1), 165–179.
- (16) Wu, C.; Choi, Y. H.; van Wezel, G. P. Metabolic Profiling as a Tool for Prioritizing Antimicrobial Compounds. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2016, *43* (2–3), 299–312.
- (17) Pimenta, L. P. S.; Kim, H. K.; Verpoorte, R.; Choi, Y. H. NMR-Based Metabolomics: A Probe to Utilize Biodiversity; 2013; pp 117–127.
- (18) Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. NMR-Based Metabolomic Analysis of Plants. *Nat. Protoc.* 2010, *5* (3), 536–549.
- (19) Farag, M. A.; Otify, A.; Porzel, A.; Michel, C. G.; Elsayed, A.; Wessjohann, L. A. Comparative Metabolite Profiling and Fingerprinting of Genus *Passiflora* Leaves Using a Multiplex Approach of UPLC-MS and NMR Analyzed by Chemometric Tools. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016, *408* (12), 3125–3143.
- (20) Verpoorte, R.; Choi, Y. H.; Kim, H. K. NMR-Based Metabolomics at Work in Phytochemistry. *Phytochem. Rev.* 2007, *6* (1), 3–14.
- (21) Liu, S.; Yang, F.; Li, J.; Zhang, C.; Ji, H.; Hong, P. Physical and Chemical Analysis of *Passiflora* Seeds and Seed Oil from China. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2008, *59* (7–8), 706–715.

- (22) Meier, B. *Passiflorae* Herba--Pharmazeutische Qualität. 1995.
- (23) Elsas, S. M.; Rossi, D. J.; Raber, J.; White, G.; Seeley, C. A.; Gregory, W. L.; Mohr, C.; Pfankuch, T.; Soumyanath, A. *Passiflora Incarnata* L. (Passionflower) Extracts Elicit GABA Currents in Hippocampal Neurons in Vitro, and Show Anxiogenic and Anticonvulsant Effects in Vivo, Varying with Extraction Method. *Phytomedicine* 2010, 17 (12), 940–949.
- (24) Jawna-Zbońska, K.; Blecharz-Klin, K.; Joniec-Maciejak, I.; Wawer, A.; Pyrzanowska, J.; Piechal, A.; Mirowska-Guzel, D.; Widy-Tyszkiewicz, E. *Passiflora Incarnata* L. Improves Spatial Memory, Reduces Stress, and Affects Neurotransmission in Rats. *Phyther. Res.* 2016, 30 (5), 781–789.
- (25) Knudsen, G. M.; Poulsen, H. E.; Paulson, O. B. Blood-Brain Barrier Permeability in Galactosamine-Induced Hepatic Encephalopathy. *J. Hepatol.* 1988, 6 (2), 187–192.
- (26) Zhou, J.; Chan, L.; Zhou, S. Trigonelline: A Plant Alkaloid with Therapeutic Potential for Diabetes and Central Nervous System Disease. *Curr. Med. Chem.* 2012, 19 (21), 3523–3531.
- (27) Kannan, S.; Devi, B. P.; Jayakar, B. *In-Vitro* Antibacterial Activity of Various Extracts on the Leaves of *Passiflora Mollissima*. *J. Chem. Pharm. Res.* 2010, 2 (5), 225–228.
- (28) Quinoa, E.; Kho, E.; Manes, L. V.; Crews, P.; Bakus, G. J. Heterocycles from the Marine Sponge *Xestospongia* Sp. *J. Org. Chem.* 1986, 51 (22), 4260–4264.
- (29) Ribbons, D. W.; Sutherland, A. G. (+)-Muconolactone from Arene Biotransformation in *Pseudomonas Putida*: Production, Absolute Configuration and Enantiomeric Purity. *Tetrahedron* 1994, 50 (11), 3587–3594.
- (30) Yoshikawa, K.; Katsuta, S.; Mizumori, J.; Arihara, S. Four Cycloartane Triterpenoids and Six Related Saponins from *Passiflora Edulis*. *J. Nat. Prod.* 2000, 63 (9), 1229–1234.
- (31) Reginatto, F. H.; Gosmann, G.; Schripsema, J.; Schenkel, E. P. Assay of Quadranguloside, the Major Saponin of Leaves of *Passiflora Alata*, by HPLC-UV. *Phytochem. Anal.* 2004, 15 (3), 195–197.
- (32) Larionova, M.; Spengler, I.; Nogueiras, C.; Quijano, L.; Ramírez-Gualito, K.; Cortés-Guzmán, F.; Cuevas, G.; Calderón, J. S. A C-Glycosylflavone from Piper Ossanum, a Compound Conformationally Controlled by CH/TT and Other Weak Intramolecular Interactions. *J. Nat. Prod.* 2010, 73 (10), 1623–1627.
- (33) Camargo, L. M. D. M.; Férézou, J. P.; Tinoco, L. W.; Kaiser, C. R.; Costa, S. S. Flavonoids from *Mimosa Xanthocentra* (Leguminosae: Mimosoideae) and Molecular Modeling Studies for Isovitexin-2"-O- α -L-Rhamnopyranoside Rotamers. *Phytochem. Lett.* 2012, 5 (3), 427–431.
- (34) Zucolotto, S. M.; Fagundes, C.; Reginatto, F. H.; Ramos, F. A.; Castellanos, L.; Duque, C.; Schenkel, E. P. Analysis of C-Glycosyl Flavonoids from South American *Passiflora* Species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochem. Anal.* 2012, 23 (3), 232–239.
- (35) Simirgiotis, M.; Schmeda-Hirschmann, G.; Bórquez, J.; Kennelly, E. The *Passiflora Tripartita* (Banana Passion) Fruit: A Source of Bioactive Flavonoid C-Glycosides Isolated by HSCCC and Characterized by HPLC–DAD–ESI/MS/MS. *Molecules* 2013, 18 (2), 1672–1692.
- (36) Davis, B. D.; Brodbelt, J. S. Determination of the Glycosylation Site of Flavonoid Monoglucosides by Metal Complexation and Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004, 15 (9), 1287–1299.
- (37) Figueirinha, A.; Paranhos, A.; Pérez-Alonso, J. J.; Santos-Buelga, C.; Batista, M. T. *Cymbopogon Citratus* Leaves: Characterization of Flavonoids by HPLC–PDA–ESI/MS/MS and an Approach to Their

- Potential as a Source of Bioactive Polyphenols. *Food Chem.* 2008, 110 (3), 718–728.
- (38) Cuyckens, F.; Claeys, M. Mass Spectrometry in the Structural Analysis of Flavonoids. *Journal of Mass Spectrometry*. January 2004, pp 1–15.
- (39) Qimin, L.; van den Heuvel, H.; Delorenzo, O.; Corthout, J.; Pieters, L. A. C.; Vlietinck, A. J.; Claeys, M. Mass Spectral Characterization of C-Glycosidic Flavonoids Isolated from a Medicinal Plant (*Passiflora Incarnata*). *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1991, 562 (1–2), 435–446.
- (40) Marques, G. S.; Monteiro, R. P. M.; Leão, W. de F.; Lyra, M. A. M.; Peixoto, M. S.; Rolim-Neto, P. J.; Xavier, H. S.; Soares, L. A. de L. Avaliação de Procedimentos Para Quantificação Espectrofotométrica de Flavonoides Totais Em Folhas de *Bauhinia Forficata* Link. *Quim. Nova* 2012, 35 (3), 517–522.
- (41) Granica, S.; Kluge, H.; Horn, G.; Matkowski, A.; Kiss, A. K. The Phytochemical Investigation of *Agrimonia Eupatoria* L. and *Agrimonia Procera* Wallr. as Valid Sources of *Agrimoniae* herba—The Pharmacopoeial Plant Material. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2015, 114, 272–279.
- (42) Miyaichi, Y.; Tomimori, T. Studies on Constituents of *Scutellaria* Species XIX On the Phenol Glycosides of the Roots of *Scutellaria Baicalensis* Georgi. *Nat. Med.* 1994, 48 (3), 215–218.
- (43) Callemien, D.; Collin, S. Use of RP-HPLC-ESI(–)-MS/MS to Differentiate Various Proanthocyanidin Isomers in Lager Beer Extracts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2008, No. 0, 0–6.
- (44) Verdu, C. F.; Gatto, J.; Freuze, I.; Richomme, P.; Laurens, F.; Guilet, D. Comparison of Two Methods, UHPLC-UV and UHPLC-MS/MS, for the Quantification of Polyphenols in Cider Apple Juices. *Molecules* 2013, 18 (9), 10213–10227.
- (45) Zhang, C.; Ren, B.; Lin, Z.; Tong, L.; Wang, H.; Chen, S. An Analysis Method for Simultaneous Screening of Deoxyribonucleic Acid-Binding Active Compounds and Investigating Their Mechanisms by Ultra-Fast Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Coupled with Fluorescence Detection Technology. *J. Chromatogr. A* 2015, 1381, 160–172.
- (46) Salvador, M. J.; Ferreira, E. O.; Mertens-Talcott, S. U.; De Castro, W. V.; Butterweck, V.; Derendorf, H.; Dias, D. A. Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Antioxidant Flavonoids from *Alternanthera Tenella* Colla. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 2006, 61 (1–2), 19–25.
- (47) Kim, I.; Chin, Y.-W.; Lim, S. W.; Kim, Y. C.; Kim, J. Norisoprenoids and Hepatoprotective Flavone Glycosides from the Aerial Parts of *Beta Vulgaris* Var. *Cicla*. *Arch. Pharm. Res.* 2004, 27 (6), 600–603.
- (48) Sakalem, M. E.; Negri, G.; Tabach, R. Chemical Composition of Hydroethanolic Extracts from Five Species of the *Passiflora* Genus. *Brazilian J. Pharmacogn.* 2012, 22 (6), 1219–1232.
- (49) Otify, A.; George, C.; Elsayed, A.; Farag, M. A. Mechanistic Evidence of *Passiflora Edulis* (Passifloraceae) Anxiolytic Activity in Relation to Its Metabolite Fingerprint as Revealed via LC-MS and Chemometrics. *Food Funct.* 2015, 6 (12), 3807–3817.
- (50) Du, S. S.; Zhang, H. M.; Bai, C. Q.; Wang, C. F.; Liu, Q. Z.; Liu, Z. L.; Wang, Y. Y.; Deng, Z. W. Nematocidal Flavone-C-Glycosides against the Root-Knot Nematode (*Meloidogyne Incognita*) from *Arisaema Erubescens* Tubers. *Molecules* 2011, 16 (6), 5079–5086.
- (51) Vila, F. C.; Colombo, R.; De Lira, T. O.; Yariwake, J. H. HPLC Microfractionation of Flavones and Antioxidant (Radical Scavenging) Activity of *Saccharum Officinarum* L. *J. Braz. Chem. Soc.* 2008, 19 (5), 903–908.
- (52) Xie, C.; Veitch, N. C.; Houghton, P. J.; Simmonds, M. S. J. Flavone C-Glycosides from *Viola Yedoensis* MAKINO. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 2003, 51 (10), 1204–1207.

- (53) Pereira, O. R.; Silva, A. M. S.; Domingues, M. R. M.; Cardoso, S. M. Identification of Phenolic Constituents of *Cytisus Multiflorus*. *Food Chem.* 2012, 131 (2), 652–659.
- (54) Costa, G. M.; Cárdenas, P. A.; Gazola, A. C.; Aragón, D. M.; Castellanos, L.; Reginatto, F. H.; Ramos, F. A.; Schenkel, E. P. Isolation of C-Glycosylflavonoids with α -Glucosidase Inhibitory Activity from *Passiflora Bogotensis* Benth by Gradient High-Speed Counter-Current Chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2015, 990, 104–110.
- (55) Rayyan, S.; Fossen, T.; Solheim Nateland, H.; Andersen, M. Isolation and Identification of Flavonoids, Including Flavone Rotamers, from the Herbal Drug “Crateagi Folium Cum Flore” (Hawthorn). *Phytochem. Anal.* 2005, 16 (5), 334–341.
- (56) Ramos, F. A.; Castellanos, L.; López, C.; Palacios, L.; Duque, C.; Pacheco, R.; Guzmán, A. An Orientin Derivative Isolated from *Passiflora Tripartita* Var. *Mollissima*. *Lat. Am. J. Pharm.* 2010.
- (57) Farmacopéia, A. N. D. V. S. *Farmacopeia Brasileira*; 2010; Vol. 1.
- (58) Wolfman, C.; Viola, H.; Paladini, A.; Dajas, F.; Medina, J. H. Possible Anxiolytic Effects of Chrysin, a Central Benzodiazepine Receptor Ligand Isolated from *Passiflora Coerulea*. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1994, 47 (1), 1–4.
- (59) Vignes, M.; Maurice, T.; Lanté, F.; Nedjar, M.; Thethi, K.; Guiramand, J.; Récasens, M. Anxiolytic Properties of Green Tea Polyphenol (–)-Epigallocatechin Gallate (EGCG). *Brain Res.* 2006, 1110 (1), 102–115.
- (60) Andersen, O. M.; Markham, K. R. *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications.*; 2006; Vol. 45.
- (61) Escobar, L. K.; Liu, Y. L.; Mabry, T. J. C-Glycosylflavonoids from *Passiflora Coactilis*. *Phytochemistry* 1983, 22 (3), 796–797.
- (62) Ocampo Pérez, J.; Coppens d’Eeckenbrugge, G. Morphological Characterization in the Genus *Passiflora* L.: An Approach to Understanding Its Complex Variability. *Plant Syst. Evol.* 2017.
- (63) Segura, S. D.; D’Eeckenbrugge, G. C.; Ocampo, C. H.; Ollitrault, P. Isozyme Variation in *Passiflora* Subgenus *Tacsonia*: Geographic and Interspecific Differentiation among the Three Most Common Species. *Genet. Resour. Crop Evol.* 2005, 52 (4), 455–463.
- (64) D’Eeckenbrugge Geo Coppens, Barney Vctoria, Moller Jorgensen Peter, M. D. J. M. *Passiflora Tarminiana*, a New Cultivated Species of *Passiflora* Subgenus *Tacsonia* (Passifloraceae). 2001, 11 (ISSN 1055-3177), 8–15.
- (65) Dong, Y.-H.; Xu, J.-L.; Li, X.-Z.; Zhang, L.-H. AiiA, an Enzyme That Inactivates the Acylhomoserine Lactone Quorum-Sensing Signal and Attenuates the Virulence of *Erwinia Carotovora*.
- (66) Vasavi, H. S.; Arun, A. B.; Rekha, P. D. Anti-Quorum Sensing Activity of *Psidium Guajava* L. Flavonoids against *Chromobacterium Violaceum* and *Pseudomonas Aeruginosa* PAO1. *Microbiol. Immunol.* 2014, 58 (5), 286–293.
- (67) Paczkowski, J. E.; Mukherjee, S.; McCready, A. R.; Cong, J.-P.; Aquino, C. J.; Kim, H.; Henke, B. R.; Smith, C. D.; Bassler, B. L. Flavonoids Suppress *Pseudomonas Aeruginosa* Virulence through Allosteric Inhibition of Quorum-Sensing Receptors. *J. Biol. Chem.* 2017, jbc.M116.770552.
- (68) Compant, S.; Nowak, J.; Coenye, T.; Clément, C.; Ait Barka, E. Diversity and Occurrence of *Burkholderia* Spp. in the Natural Environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008, 32 (4), 607–626.
- (69) Beltrán-Molina, Jorge; Cuellar-Cuestas, Carolina; Suárez-Moreno, Z. Diagnóstico Y Epidemiología:

- Nuevas Estrategias de Estudio de Las Enfermedades Bacterianas Del Arroz En Colombia. *Rev. Arroz* 2006, 61 (507), 4–23.
- (70) Kim, J.; Kim, J. G.; Kang, Y.; Jang, J. Y.; Jog, G. J.; Lim, J. Y.; Kim, S.; Suga, H.; Nagamatsu, T.; Hwang, I. Quorum Sensing and the LysR-Type Transcriptional Activator ToxR Regulate Toxoflavin Biosynthesis and Transport in *Burkholderia Glumae*. *Mol. Microbiol.* 2004, 54 (4), 921–934.
- (71) Jeong, Y.; Kim, J.; Kim, S.; Kang, Y.; Nagamatsu, T.; Hwang, I. Toxoflavin Produced by *Burkholderia Glumae* Causing Rice Grain Rot Is Responsible for Inducing Bacterial Wilt in Many Field Crops. *Plant Dis.* 2003, 87 (8), 890–895.
- (72) Kim, J.; Kang, Y.; Choi, O.; Jeong, Y.; Jeong, J.-E.; Lim, J. Y.; Kim, M.; Moon, J. S.; Suga, H.; Hwang, I. Regulation of Polar Flagellum Genes Is Mediated by Quorum Sensing and FlhDC in *Burkholderia Glumae*. *Mol. Microbiol.* 2007, 64 (1), 165–179.
- (73) Choi, O.; Lee, Y.; Han, I.; Kim, H.; Goo, E.; Kim, J.; Hwang, I. A Simple and Sensitive Biosensor Strain for Detecting Toxoflavin Using Beta-Galactosidase Activity. *Biosens. Bioelectron.* 2013, 50, 256–261.
- (74) Chen, R.; Barphagha, I. K.; Karki, H. S.; Ham, J. H. Dissection of Quorum-Sensing Genes in *Burkholderia Glumae* Reveals Non-Canonical Regulation and the New Regulatory Gene *tofM* for Toxoflavin Production. *PLoS One* 2012, 7 (12).
- (75) Karki, H. S. Physiological, Biochemical and Molecular Characteristics Associated with Virulence of *Burkholderia Glumae*: The Major Causative Agent of Bacterial Panicle Blight of Rice, Louisiana State University, 2010.
- (76) Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: Modular Framework for Processing, Visualizing, and Analyzing Mass Spectrometry- Based Molecular Profile Data.
- (77) Escobar, L. K. Passifloraceae Linda Labert.pdf. In *Flora de Colombia*; Pinto, P., Lozano, G., Eds.; ICN- Museo de historia natural: Bogotá, Colombia, 1988.
- (78) Kim, H. K.; Choi, Y. H.; Verpoorte, R. NMR-Based Metabolomic Analysis of Plants. *Nat. Protoc.* 2010, 5 (MARCH 2010), 536–549.
- (79) Zhang, Y.-Y.; Guo, Y.-Z.; Ageta, H.; Harugay, Y.; Onda, M.; Hashimoto, K.; Ikeya, Y.; Okada, M.; Maruno, M. A New Flavone C-Glycoside from *Scutellaria Baicalensis*. *J. Chinese Pharm. Sci.* 1997, 6 (4), 182–186.
- (80) Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S. K. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *J. Pharm. Anal.* 2016, 6 (2), 71–79.
- (81) McLean, R. J. C.; Pierson, L. S.; Fuqua, C. A Simple Screening Protocol for the Identification of Quorum Signal Antagonists. *J. Microbiol. Methods* 2004, 58 (3), 351–360.
- (82) Magaldi, S.; Mata-Essayag, S.; Hartung De Capriles, C.; Perez, C.; Colella, M. T.; Olaizola, C.; Ontiveros, Y.; Ellis, M.; Ain, A. Well Diffusion for Antifungal Susceptibility Testing. *Int. J. Infect. Dis.* 2004, 8, 39–45.
- (83) Betancur, L. A.; Naranjo-Gaybor, S. J.; Vinchira-Villarraga, D. M.; Moreno-Sarmiento, N. C.; Maldonado, L. A.; Suarez-Moreno, Z. R.; Acosta-González, A.; Padilla-Gonzalez, G. F.; Nica Puyana, M.; Castellanos, L.; et al. Marine *Actinobacteria* as a Source of Compounds for Phytopathogen Control: An Integrative Metabolic-Profiling / Bioactivity and Taxonomical Approach.
- (84) Suga, H.; Igarashi. Quorum Sensing Inhibitor. *Us 20100256369 a1.* 2010.

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El *quorum sensing* (QS) se entiende como una forma de comunicación intercelular que usan las bacterias para coordinar sus procesos fisiológicos y actividades cooperativas a nivel poblacional. Éste depende de la producción, secreción y detección de moléculas autoinducidas, cuando se llega a la densidad poblacional correcta, llega al *quorum*, las bacterias pueden activar entre otros fenotipos un arsenal de factores de virulencia (formación de biopelículas, producción de toxinas, *swimming* y *swarming*, etc) que son responsables en algunos casos de enfermedades tanto de personas como de animales y plantas. La posibilidad de inhibir el *quorum sensing* podría ser útil en el control de patógenos de plantas, si éstas usan sistemas de QS para regular procesos asociados con su virulencia. Por lo tanto, la inhibición del QS a través del uso de moléculas pequeñas de diferentes orígenes puede resultar valiosa para el tratamiento de tales enfermedades, con muchas aplicaciones biotecnológicas.

Los inhibidores de QS, conocidos como QQ, son una alternativa para el control de estas enfermedades infecciosas. Existen varios mecanismos descritos para la inhibición del QS, entre ellos las enzimas que degradan AHL han sido las más estudiadas. También se han descrito la inhibición de QS por parte de moléculas pequeñas o productos naturales. Éstos PN con actividad IQS son producidos por una amplia gama de organismos, como bacterias, hongos, plantas o animales de ecosistemas terrestres, marinos o de agua dulce. Sin embargo, aunque para muchos extractos de organismos se ha demostrado que son capaces de inhibir el QS, los compuestos activos (*quorum quenchers*, QQ) que se han caracterizado completamente han sido pocos. Por lo anterior se identifica que hay un gran faltante de información en este tópico en la literatura científica especializada y aportar a la subsanación de este vacío, es uno de los objetivos de esta tesis de doctorado.

De este modo, en la presente tesis de doctorado buscamos compuestos con actividad QQ, capaces de regular los fenotipos de virulencia del fitopatógeno del arroz *Burkholderia*

glumae, a partir de diferentes fuentes de productos naturales: microorganismos, tanto fijos como volátiles; esponjas marinas y plantas, con el fin de tener una perspectiva amplia de las moléculas capaces de inhibir este fitopatógeno, es decir ampliar el espacio químico de los compuestos activos. Se seleccionó como modelo biológico *Burkholderia glumae* CIAT 4026, que es una cepa fitopatógena que causa el añublo bacterial de la panícula de arroz ocasionando graves pérdidas económicas a productores de la gramínea y cuyos fenotipos de virulencia son producidos por QS. Entre los fenotipos controlados por QS en este fitopatógeno están la producción de la toxoflavina y la motilidad *swimming*. El uso de *Burkholderia glumae* en un modelo de catafilos de cebolla está correlacionado con la respuesta esperada con el añublo bacterial de la panícula de arroz

En el primer bloque de la presente tesis se buscó valorar a los microorganismos de origen marino como fuente de compuestos con actividad QQ, lo anterior dado que está probado que ellos son, en términos generales, los responsables de la producción de muchos de los metabolitos bioactivos aislados a partir de invertebrados marinos. Así, inicialmente se valoraron múltiples fuentes de microorganismos, a saber: esponjas, algas, octocorales, lodos. A partir de ellos se obtuvieron 162 aislamientos bacterianos y 41 hongos. De ellos 16 mostraron actividad inhibitoria del QS en ensayos *in vivo* contra el biosensor *C. violaceum* ATCC31532. Las cepas activas se caracterizaron molecularmente mediante el uso del gen *16S* y se lograron identificar bacterias de los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lisynibacillus* y *Proteus*, que son ampliamente conocidos por su capacidad de producir metabolitos secundarios bioactivos.

En una primera aproximación se seleccionaron las Actinobacterias activas para su estudio, pues la revisión en la literatura sugiere una enorme diversidad química en su metabolismo. Se estudiaron 8 cepas con una aproximación integrativa para la selección de las cepas, utilizando información taxonómica, bioactividad y herramientas de perfil metabólico junto con procedimientos de derreplicación. Este ejercicio permitió priorizar seis cepas de Actinobacterias recuperadas de ambientes marinos (161a, 208, 5, 9, 182), todas pertenecientes al género *Streptomyces* con excepción de una *Gordonia* (cepa PNM25) Y una *Micromonospora* (cepa 102N), como fuente de nuevos y activos compuestos contra los fitopatógenos. El estudio metabólico, usando datos de HPLC-MS y ensayos de actividad IQS, permitió la identificación preliminar de compuestos bioactivos utilizando procedimientos de derreplicación, sugiere que estas cepas son una fuente de compuestos,

incluyendo metabolitos bioactivos bien conocidos y nuevos. Nuestros datos ponen de manifiesto que las cepas activas podrían actuar mediante antibióticos (antibacterianos y antimicóticos) de Iso que se sabe a bajas concentraciones actúan como *quorum quenchers*. Entre las cepas anteriores se eligieron dos para realizar el estudio químico: *Micromonospora* sp., perteneciente al Filo Actinobacteria, de la que se cultivó 20 litros en medio TSB, se fraccionó con acetato de etilo y por ensayo de actividad se determinó que el extracto activo era el orgánico, a éste se le sometió a fraccionamiento por CC y por análisis de RMN se logró determinar que los compuestos responsables de la actividad corresponden a compuestos lipídicos

Lo más importante de esta sección fue el poder vincular varias técnicas para de esta forma dirigir la búsqueda de compuestos IQS con mayor certeza y agilidad.

En una segunda aproximación, se estudiaron las otras bacterias activas (8) que no corresponden a actinobacterias, identificándose de los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lisynibacillus* y *Proteus*, obtenidas a partir de organismos como esponjas, algas y sedimentos marinos. Las cepas bacterianas que han sido relacionadas con patógenos, no fueron tenidas en cuenta para estudios posteriores. El ensayo de los extractos de las bacterias permitió identificar 8 cepas como promisorias. De entre ellas se seleccionó al aislamiento PNM115 CODIGO IBUN 2110, identificado como *Paenibacillus* sp, para su estudio químico. El análisis bioguiado permitió establecer que el péptido tipo polimixina 3.1., con residuos fenilalanina, serina, valina e isoleucina, sugiriendo la presencia de un análogo de las polimixinas como el responsable de la actividad IQS contra *C. violaceum*.

Finalmente y buscando la posibilidad de que la inhibición del QS observada mediante ensayos *in vivo* se dé por compuestos volátiles (COVs), se evaluaron las 16 cepas activas mediante un ensayo de espacio de cabeza. Se encontró que sólo una de ellas mostraba dicha actividad, la cepa PNM216, esta bacteria no ha podido ser secuenciada por 16S ni ITS a pesar de haberla tratado con diferentes técnicas de amplificación. La bacteria PNM216 se cultivó en 5 medios diferentes y se pudo establecer que tan solo en medios LB y TSB se producían COVs activos. El estudio del espacio de cabeza de esta cepa cultivada en LB por SPME y CG-EM permitió la identificación de 29 compuestos (4.1 a 4.29). Algunos de los compuestos identificados se compraron o sintetizaron y se ensayaron tanto en fase de vapor como en líquido. Así se logró establecer que cuatro compuestos: *p*-cimeno (4.1),

cumeno (4.2), 5-metil-2-hexanona (4.3) y 2-nonanona (4.4) inhiben la producción de la violaceína en el biosensor y no inhiben el crecimiento, por lo tanto son compuestos QQ. Adicionalmente, se evaluaron otros compuestos volátiles relacionados con los identificados en el espacio de cabeza de la bacteria acetato de isoamilo (4.30) y el alcohol isoamílico (4.31) como QQ. La naturaleza menos polar y más pequeña de estos compuestos ayuda a ampliar el espacio químico de las moléculas QQ y la facilidad de consecución de algunos de ellos sugiere que su uso a escala comercial será posible si se superan los ensayos en campo.

De lo anterior, se pudo establecer que las cepas *Micromonospora* sp., *Paenibacillus* sp. y la cepa PNM 216, podrían utilizarse para la producción biotecnológica de agentes de control biológico o para la producción de compuestos con fines agroquímicos. Así, en este estudio se contribuyó a investigar la biodiversidad microbiana colombiana aún no explorada y que tiene un enorme potencial para proporcionar compuestos químicos y desarrollar nuevos productos biotecnológicos con posibles aplicaciones en el campo de la agricultura. Para poder establecer el verdadero potencial de estos aislamientos como biocontroladores se deben hacer pruebas de invernadero y campo.

Continuando con la exploración de los productos naturales de origen marinos, se seleccionaron 5 esponjas del orden Haplosclerida. Las esponjas de este orden se caracterizan por ser productoras de compuestos con diferentes actividades biológicas. Del ensayo de los extractos de las 5 muestras contra el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 se pudo establecer que la única que resultó activa fue *Amphimedon viridis*. Mediante el fraccionamiento bioguiado de su extracto se aislaron e identificaron los compuestos halitoxina (4.1), en la fase butanólica y la taurina (4.2) en la fase acuosa. Estos productos naturales ya habían sido reportados en la literatura, pero no se les había establecido su actividad inhibitoria del QS. Alcaloides tipo alquilpiridina catiónicos han sido descritos como antifoulants y para los que se han desarrollado múltiples aproximaciones sintéticas, por lo que se podrían producir en cantidades suficientes para su aprovechamiento agrícola, lo mismo se puede decir para la taurina. Experimentos más complejos, como el uso de otros biosensores como *Agrobacterium tumefaciens*, nos permitiría tener una visión más clara de la actividad que debe hacerse para establecer su verdadero potencial como controladores del añublo bacteriano del arroz y otras enfermedades causadas por bacterias fitopatógenas.

Finalmente, con el fin de valorar los residuos obtenidos de la cosecha de plantas del subgénero *Tacsonia Passiflora*, conocidas como curubas, y para las que se han informado diferentes actividades biológicas, entre ellas, la actividad ansiolítica resulta ser la más reportada, se llevó a cabo su estudio químico de siete especies de este subgénero. El cual permitió la identificación de 59 compuestos entre aminoácidos, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. Los datos del análisis multivariado (PCA y OPLS) de las siete especies analizadas mostraron que *P. cumbalensis* y *P. uribei* son especies altamente diferenciadas de las otras especies estudiadas del subgénero *Tacsonia* (*P. tripartita* var. *mollissima*, *P. tarminiana* and *P. mixta*, *P. tripartita* var. *tripartita*). Estas diferencias se deben principalmente a la presencia de glicósidos de crisina identificadas en *P. cumbalensis* y acetil hexósidos de vitexina presentes en *P. uribei*. Adicionalmente, el contenido de flavonoides se correlacionó con la actividad inhibitoria del *quorum sensing* usando el biosensor *C. violaceum*. La información de los VIPs da cuenta de que los compuestos responsables de la actividad son los de tipos fenólico. El estudio de los extractos más activos que corresponden a *P. uribei* y *P. lehemanii* permitió la identificación de los dos nuevos flavonoides identificados como Apigenin-4-O- β -glucopiranosil-8-C-neohesperidósido (6.1). y Apigenin-4-O-glucopiranosil, 8-C-(6'' acetil)- β -glucopyranósido (6.2), que en ensayos *in vitro* mostraron actividad IQS. Esta investigación es una contribución a la descripción de los marcadores químicos de especies *Tacsonia* y su correlación con la actividad biológica, demostrando el potencial uso de estas especies. Estudios químicos posteriores son necesarios para determinar la influencia y la variabilidad metabólica de estas especies, asociadas a su distribución geográfica y ambiental.

Al complejo de halitoxina se le realizó ensayos de actividad biológica frente a *C. violaceum* determinándose que la concentración mínima para la inhibición de la violaceína era de 250 μ M. también se ensayó con la bacteria *Burkholderia glumae* ATCC 33617, para determinar si los fenotipos controlados por QS (producción de toxoflavina, *swimming*) en esta bacteria son inhibidos por los compuestos aislados.

Esta es una primera aproximación en la búsqueda de compuestos capaces de actuar como IQS, se usó el biosensor *Chromobacterium violaceum* por ser una cepa en la que se puede distinguir fácilmente el fenotipo controlado por QS, además esta nos permite extrapolar los compuestos a otras cepas fitopatógenas con similares sistemas de QS. Con la finalidad de probar un modelo más cercano a la realidad se usó un ensayo con catáfilos de cebolla que

nos permite visualizar si los compuestos son capaces de disminuir la virulencia de *B. glumae*.

8. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

8.1 Publicaciones

Betancur LA, Naranjo-Gaybor SJ, Vinchira-Villarraga DM, et al. Marine Actinobacteria as a source of compounds for phytopathogen control: An integrative metabolic-profiling / bioactivity and taxonomical approach. Virolle M-J, ed. *PLoS One*. 2017;12(2):e0170148. doi:10.1371/journal.pone.0170148. . Impact factor: 3.54

8.2 Congresos

8.2.1

8.2.2 Presentaciones orales

VII Iberoamerican NMR meeting 2016 (Exposición oral)

8.2.3 Presentaciones en poster o coautoría

Bogotá Microbiological Meeting BOOM. 18-19 de Agosto 2017 Bogotá (Póster) Segundo Lugar

Naranjo-Gaybor, S.; Suarez-Moreno, Z.; León, J.; Ramos, F.; Castellanos, L. "Marine bacteria as source of quorum quencher compounds" Presentación en el Congreso Italo-Latinoamericano De Etnomedicina XXVI SILAE Y El IX Congreso Colombiano De Cromatografía, Cartagena, Colombia, 25-29 Septiembre de 2017. Pag 188.

Sinuco, D.; Coconubo, L.; Naranjo, S.; Vinchira, D.; Castellanos, L.; Ramos, F. "Biological activity of volatile organic compounds released by marine origin bacteria cultures" Presentación en el Congreso Italo-Latinoamericano De Etnomedicina XXVI SILAE Y EI IX Congreso Colombiano De Cromatografía, Cartagena, Colombia, 25-29 Septiembre de 2017. Pag 100

Castellanos, L.; Naranjo, S.J.; Choi, Y.; Ramos, F.A. "NMR based metabolic profiling of Colombian Banana Passion Fruits" VII IBEROAMERICAN NMR MEETING. Cartagena, Colombia. Octubre 3-6, 2016. Book of abstracts, pag 40.

Betancur, L.A.; Naranjo, S.J.; Vinchira, D.M.; Vergara, D.; Moreno, N.; Maldonado, L.A.; Suarez, Z.R.; Acosta, A.; Castellanos, L.; Ramos, F.A. "Marine Bacteria From The Colombian Caribbean Sea As A Source Of Compounds For The Control Of Phytopatogens" V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales CIPNat 2016, el XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica y el VIII Congreso Colombiano de Cromatografía COCOCRO 2016. Bogotá, Abril 2016. Libro de memorias. ISBN 978-958-59491-0-2. Editor: SCCQ. Pag MB-04

Betancur, L.A.,S.J. Naranjo, D. Vergara, D. Vinchira, Z. Suarez, L.A. Maldonado, L. Castellanos, N. C. Moreno, F.A. Ramos. "Aislamiento de actinobacterias marinas del Caribe colombiano como potenciales agentes para el control de fitopatógenos" IV Seminario. La investigación en ciencias del mar de la Universidad Nacional de Colombia – Una mirada desde los Andes. Bogotá Noviembre 24-26 del 2014. pag

Romero-Otero, A. R., L. A. Betancur,S. J. Naranjo, A. L. Chacón, M. A. Santos, F. A. Ramos, L. Castellanos, N. Moreno-Sarmiento. "Evaluación de la actividad antimicrobiana de hongos aislados a partir de ambientes marinos contra fitopatógenos" IV Seminario. La investigación en ciencias del mar de la Universidad Nacional de Colombia – Una mirada desde los Andes. Bogotá Noviembre 24-26 del 2014. Pg 4.

Romero-Otero, A., Betancur, L.A.;Naranjo, S.J., Chacón, A.L.; Santos, M., Vergara, D.I., Vinchira, D.M.,Moreno-Sarmiento, N., Suarez, Z., Ramos, F.A., Castellanos, L. "Screening de la actividad antimicrobiana de hongos aislados a partir de ambientes marinos contra fitopatógenos" VIII Congreso Latinoamericano de Micología. Medellin, 4 al 7 de Noviembre de 2014. ISSN 0304-3584. Pag 415-416

9. ANEXOS

CAPÍTULO 2

Figura S2.1 Morfología de colonias en cuatro medios: agar nutritivo, ISP-2, ISP-3 e ISP-4, de las cepas: 25 (*Gordonia* sp.), 102N (*Micromonospora* sp.) y 182 (*Streptomyces* sp.)

Figura S2.2 L,L-DAP y meso-DAP (ácido diaminopimélico) es un marcador quimiotaxonómico del género *Streptomyces*. Placas de celulosa TLC Merck 20x20 cm. Fase móvil: Metanol: agua: HCl 6 N: piridina 80: 26: 4: 10 v% v. Revelador: solución ninhidrina 2%.

Figura S2.4 Espectros de todas las especies de actinobacterias disponibles en la base de datos MALDI-TOF (BDAL). se utilizaron para calcular una referencia *cut-toff* que podría ayudarnos a determinar la supuesta distancia de similitud que definen a una especie actinobacteriana. El corte calculado mostró que las especies similares pueden ser definidas por el 70% de similitud.

Figura S2.5 OPLS-DA actividad de inhibición de *quorum*. Resumen de ajuste ($R^2Y = 1$, $Q^2 = 0,998$). Loading Scatter Plot (VIPs, color gris). Las cepas 9, 46b, 87, 89.4, 102N, 184, 194. En este caso, la escalado de datos se realizó por escalado de varianza unitaria (UV-).

Tabla S2.1 Resumen de aislamientos obtenidos a partir de diferentes fuentes de origen marino y actividad observada

Tabla S2.2 Ensayo bioquímico para 24 cepas marinas. Ensayo API 20E (bioMérieux Inc., Durham, NC) - Oxidasa y Catalasa - L, L DAP (Actinobacteria). El ensayo muestra la presencia de: ONPG: \ beta - galactosidasa; ADH: arginina-dihidrolasa; LDC: lisina descarboxilasa; ODC: ornitina descarboxilasa. CIT: utilización de citrato. Producción de: H₂S, URE: Ureasa, TDA: triptófano desaminasa, IND: indol, VP: acetoin, GEL: gelatinasa. Otras características bioquímicas como la fermentación u oxidación de azúcares (GLU:

glucosa, MAN: manitol, INO: inositol, SOR: sorbitol, RHA: ramnosa, SAC: sacarosa, MEL: melibiose, AMY: amygdalin y ARA: arabinosa. reducción de nitratos a nitritos.

CAPÍTULO 3

Tabla. S3.1 Caracterización bioquímica API 20E para aislamientos no actinos con actividad inhibitoria de QS

Figura S3.1. Comparación de los espectros RMN-H de la fracción activa FR-XIII (rojo) y su correspondiente blanco (verde). Las ampliaciones corresponden a las zonas de mayor diferencia.

CAPÍTULO 4

Figura S4.1 Cromatogramas obtenidos con la fibra Divinilbenceno/ Carboxen/ Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) Supelco®. En la parte superior el medio LB sin inocular y en el inferior el medio LB inoculado con el aislamiento PNM216

CAPÍTULO 5

Figura S5.1. Espectro de ^1H RMN (METANOL D_4 , 400 MHz) de la fracción acuosa WW, correspondiente al compuesto 5.2 identificado como Taurina

CAPÍTULO 6

Tabla S6.1. Desplazamientos químicos (δ_{H} en metanol- d_4 - KH_2PO_4 en D_2O a pH 6.0) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los metabolitos identificados en especies de *Passiflora*. Se incluyen datos de los espectros bidimensionales (COSY, HMBC y J-resolved)

Figura S6.1. Espectro COSY del extracto de *Passiflora tarminiana* en metanol- d_4 - KH_2PO_4 en D_2O a pH 6.0.

Figura S6.2. Espectro HMBC del extracto de *Passiflora tarminiana* en metanol- d_4 - KH_2PO_4 en D_2O a pH 6.0

Figura S6.3. Espectro *J-resolved* del extracto de *Passiflora tarminiana* en metanol- d_4 - KH_2PO_4 en D_2O a pH 6.0

Figura S6.4. Asignación de señales de RMN ^1H (MD6) para compuestos identificados para extracto de *Passiflora tarminiana*.

Tabla S6.2. Desplazamientos químicos de ^1H (δ) en diferentes solventes MD6, MeOD y DMSO de metabolitos de *Passiflora* sp.

Figura S6.5. Fragmentación de la Apigenin-4-O-glucopiranosil, 8-C-(6'' acetil)- β -glucopiranosido (6.2) en el espectro MS-MS del ión m/z 635.0536 [M^+]

Figura S6.6. Cromatograma de masas de especies cultivadas de *Passiflora Tacsonia*

Figura S6.7. Flavonoides y compuestos relacionados detectados en *Passiflora* spp.

Compuestos fenólicos identificados por datos de RMN y HPLC-MS/MS.

Figura S6.8. PCA de comparación de curubas colombianas cultivadas usando análisis de componente principal (PCA).

Figura S6.9. PCA de comparación en la región de flavonoides (4.8-10 ppm)

Figura S6.10. PCA Comparing the Colombian cultured banana passion fruits in the flavonoid region (4.8-10 ppm) by using principal component analysis (PCA).

Tabla S6.3 Datos de inhibición de *quorum sensing* usando *Chromobacterium violaceum* ATCC31532

9.1 Anexos capítulo 2:

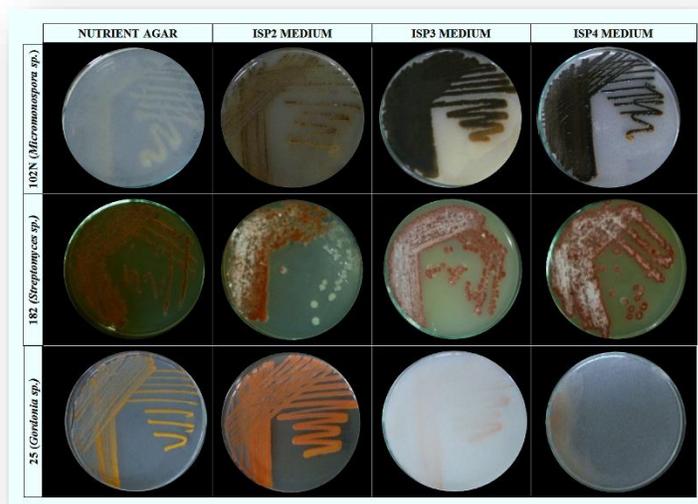


Figura S2.1. Morfología de colonias en cuatro medios: agar nutritivo, ISP-2, ISP-3 e ISP-4, de las cepas: 25 (*Gordonia* sp.), 102N (*Micromonospora* sp.) y 182 (*Streptomyces* sp.)

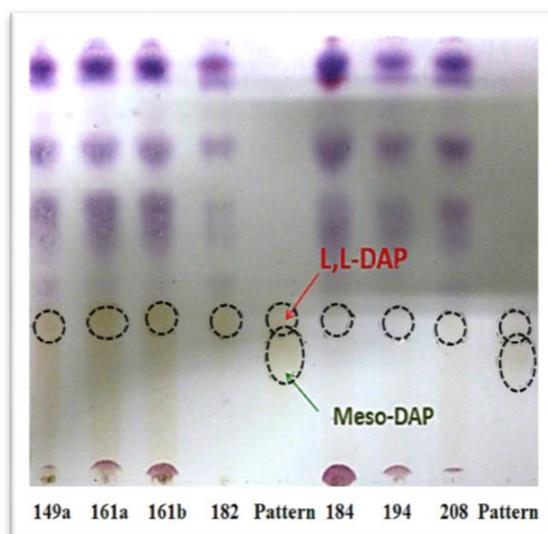


Figura S2.2. L,L-DAP y meso-DAP (ácido diaminopimérico) es un marcador quimiotaxonómico del género *Streptomyces*. Placas de celulosa TLC Merck 20x20 cm. Fase móvil: Metanol: agua: HCl 6 N: piridina 80: 26: 4: 10 v% v. Revelador: solución ninhidrina 2%.

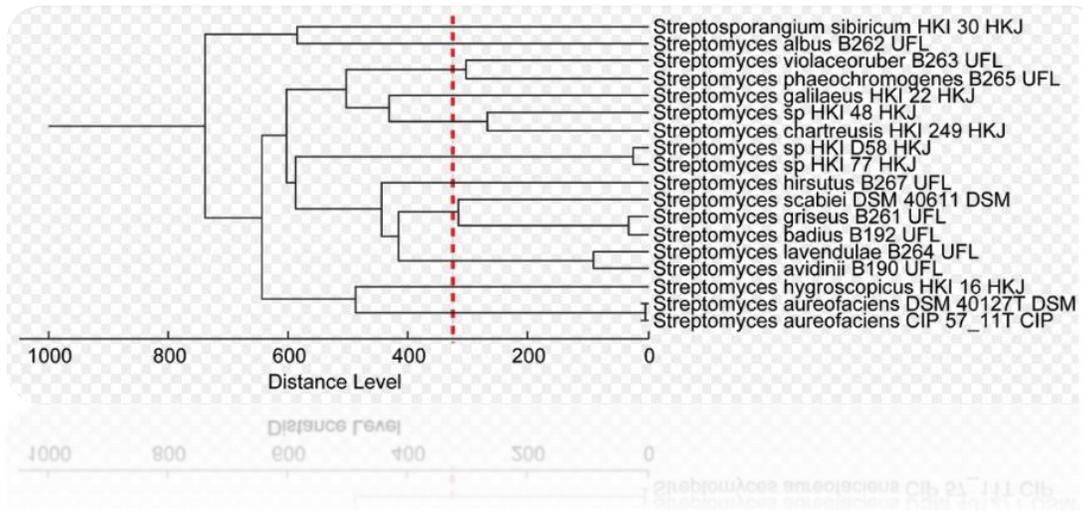


Figura S2.4. Espectros de todas las especies de actinobacterias disponibles en la base de datos MALDI-TOF (BDAL). se utilizaron para calcular una referencia *cut-toff* que podría ayudarnos a determinar la supuesta distancia de similitud que definen a una especie actinobacteriana. El corte calculado mostró que las especies similares pueden ser definidas por el 70% de similitud.

Tabla S2.1 Resumen de aislamientos obtenidos a partir de diferentes fuentes de origen marino y actividad observada

ID IBUN	N Cepa	Procedencia Muestra	Tipo	Actividad
02027	PNM3	Primer lavado Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	Esponja	Bactericida
02028	PNM4	Primer lavado Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	Esponja	No activa
02029	PNM5	Primer lavado Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	Esponja	Bactericida
02030	PNM6	Primer lavado Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	Esponja	Bactericida
02031	PNM7	Primer lavado Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	Esponja	No activa
02032	PNM8	Primer lavado Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	Esponja	Crecimiento rápido
02033	PNM9	Ultimo lavado <i>Dictyota sp.</i>	Alga	Bactericida
02034	PNM10	Ultimo lavado <i>Dictyota sp.</i>	Alga	IQS
02035	PNM11	Posiblemente <i>Amphiroa sp.</i>	Alga	Crecimiento rápido
02036	PNM13	Sedimento grueso	Sedimento	Bactericida
02037	PNM14	Sedimento grueso	Sedimento	No activa
02038	PNM15	Sedimentos en pastos	Sedimento	Crecimiento rápido
02039	PNM16 b	<i>Eunicea fusca</i>	Octocoral	Crecimiento rápido
02040	PNM17	<i>Eunicea fusca</i>	Octocoral	Bacteriostático
02041	PNM19	<i>Eunicea fusca</i>	Octocoral	No activa
02042	PNM20	<i>Eunicea fusca</i>	Octocoral	No activa

ID IBUN	N Cepa	Procedencia Muestra	Tipo	Actividad
02043	PNM22	Corteza de manglar	<i>Manglar</i>	No activa
02044	PNM24	Corteza de manglar	<i>Manglar</i>	Bactericida
02045	PNM25	<i>Xestospongia</i> sp.	<i>Esponja</i>	No activa
02046	PNM26	<i>Xestospongia</i> sp.	<i>Esponja</i>	Crecimiento rápido
02047	PNM27	<i>Xestospongia</i> sp.	<i>Esponja</i>	Crecimiento rápido
02048	PNM30	Primer lavado <i>Eunicea Fusca</i>	<i>Octocoral</i>	Bactericida
02049	PNM31	<i>Plakortis halichondrioides</i>	<i>Esponja</i>	Crecimiento rápido
02050	PNM32	Arena coralina gruesa	<i>Sedimento</i>	Bactericida
02051	PNM33	Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	Crecimiento rápido
02052	PNM35	Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	No activa
02053	PNM37	Ultimo lavado <i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	No activa
02054	PNM39	Fango manglar	<i>Sedimento</i>	No activa
02055	PNM41	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02056	PNM43	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02057	PNM44	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Bacteriostático
02058	PNM45	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Bactericida
02059	PNM46b	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	IQS
02060	PNM47	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	No activa
02061	PNM48	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Bactericida
02062	PNM49	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Bactericida
02063	PNM50	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Bacteriostático
02064	PNM52	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Bactericida
02065	PNM53	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Bactericida
02066	PNM54	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Bactericida
02067	PNM56a	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Bactericida
02068	PNM59	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02069	PNM61	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	No activa
02070	PNM62	Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	Bacteriostático
02071	PNM63b	Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	No activa
02072	PNM64 a	Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	No activa
02073	PNM65	Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	Bactericida
02074	PNM66	Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	Crecimiento rápido
02075	PNM67	Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	Crecimiento rápido
02076	PNM68	Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	Bacteriostático
02077	PNM69	Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	Bactericida
02078	PNM72	Sedimento grueso	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02079	PNM73	Sedimento grueso	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02080	PNM75	Arena a 60 ft	<i>Sedimento</i>	No activa
02081	PNM76	Arena a 60 ft	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02082	PNM77	<i>Amphimendon compressa</i>	<i>Esponja</i>	No activa
02083	PNM80	<i>Amphimendon compressa</i>	<i>Esponja</i>	Crecimiento rápido
02084	PNM82	Arena a 60 ft	<i>Sedimento</i>	IQS

ID IBUN	N Cepa	Procedencia Muestra	Tipo	Actividad
02085	PNM84	Sedimento en manglar	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02086	PNM85	Posiblemente <i>Amphiroa</i> sp.	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02087	PNM87	Prim lav Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	Bactericida
02088	PNM89	Prim lav Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	Crecimiento rápido
02089	PNM89.3	Prim lav Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	IQS
02090	PNM89.4	Prim lav Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	Bacteriostático
02091	PNM91	Posiblemente <i>Amphiroa</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02092	PNM92	Posiblemente <i>Amphiroa</i> sp.	<i>Alga</i>	IQS
02093	PNM94	<i>Erythropodium</i> sp	<i>Octocoral</i>	No activa
02094	PNM95	<i>Erythropodium</i> sp	<i>Octocoral</i>	Bacteriostático
02095	PNM96	<i>Erythropodium</i> sp	<i>Octocoral</i>	Crecimiento rápido
02096	PNM97	<i>Erythropodium</i> sp	<i>Octocoral</i>	Bacteriostático
02097	PNM98	<i>Eunicea fusca</i>	<i>Octocoral</i>	Crecimiento rápido
02098	PNM100	<i>Eunicea fusca</i>	<i>Octocoral</i>	IQS
02099	PNM102A	Ultimo lavado <i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	No activa
02100	PNM102N	Ultimo lavado <i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	IQS
02101	PNM103b	Ultimo lavado <i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	No activa
02102	PNM104 a	Ultimo lavado <i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02103	PNM104b	Ultimo lavado <i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02104	PNM105 a	Ultimo lavado <i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02105	PNM105	Ultimo lavado <i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02106	PNM106	Fango manglar	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02107	PNM109	Fango manglar	<i>Sedimento</i>	No activa
02108	PNM110	Fango manglar	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02109	PNM112	Sedimento de arrecife	<i>Sedimento</i>	Bacteriostático
02110	PNM115	Sedimento de arrecife	<i>Sedimento</i>	IQS
02111	PNM119	Barrido piel	<i>Pez loro</i>	No activa
02112	PNM119 b	Barrido piel	<i>Pez loro</i>	Crecimiento rápido
02113	PNM120 b	Barrido piel	<i>Pez loro</i>	Crecimiento rápido
02114	PNM121	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02115	PNM122	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02116	PNM123	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	IQS
02117	PNM124	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02118	PNM126 a	<i>Codium</i> sp.	<i>Alga</i>	Bactericida
02119	PNM132	Fango manglar	<i>Sedimento</i>	No activa
02120	PNM133	Fango manglar	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02121	PNM134	Fango manglar	<i>Sedimento</i>	Bactericida
02122	PNM135	Fango manglar	<i>Sedimento</i>	No activa
02123	PNM138	Fango manglar	<i>Sedimento</i>	No activa
02124	PNM142	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates</i> sp.	<i>Esponja</i>	No activa
02125	PNM143	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates</i> sp.	<i>Esponja</i>	Bacteriostático

ID IBUN	N Cepa	Procedencia Muestra	Tipo	Actividad
02126	PNM144	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates</i> sp.	<i>Esponja</i>	No activa
02127	PNM144a	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates</i> sp.	<i>Esponja</i>	No activa
02128	PNM145	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates</i> sp.	<i>Esponja</i>	Bactericida
02129	PNM148	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates</i> sp.	<i>Esponja</i>	Bactericida
02130	PNM149	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates</i> sp.	<i>Esponja</i>	Bacteriostático
02131	PNM149a	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates</i> sp.	<i>Esponja</i>	IQS
02132	PNM151	<i>Sargassum</i> sp.	<i>Alga</i>	Bactericida
02133	PNM153	<i>Sargassum</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02134	PNM154	<i>Sargassum</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02135	PNM156	<i>Erythropodium</i> sp	<i>Octocoral</i>	Crecimiento rápido
02136	PNM157	<i>Erythropodium</i> sp	<i>Octocoral</i>	No activa
02137	PNM160	Posiblemente <i>Bryopsis</i>	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02138	PNM161a	Posiblemente <i>Bryopsis</i>	<i>Alga</i>	IQS
02139	PNM161 b	Posiblemente <i>Bryopsis</i>	<i>Alga</i>	IQS
02140	PNM162	Fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	<i>Esponja</i>	Crecimiento rápido
02141	PNM163	Arena coralina en un claro	<i>Sedimento</i>	No activa
02142	PNM164	Arena coralina en un claro	<i>Sedimento</i>	No activa
02143	PNM165 a	Arena coralina en un claro	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02144	PNM166	Arena coralina en un claro	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02145	PNM167	Arena coralina bajo pináculo	<i>Sedimento</i>	Bactericida
02146	PNM168	Arena coralina bajo pináculo	<i>Sedimento</i>	Bacteriostático
02147	PNM169	Arena coralina bajo pináculo	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02148	PNM170	Arena coralina bajo pináculo	<i>Sedimento</i>	Bacteriostático
02149	PNM172	Primer lavado posible <i>Amphiroa</i> sp.	<i>Alga</i>	Bacteriostático
02150	PNM173	Primer lavado posible <i>Amphiroa</i> sp.	<i>Alga</i>	No activa
02151	PNM174	Primer lavado posible <i>Amphiroa</i> sp.	<i>Alga</i>	Bacteriostático
02152	PNM175	Primer lavado posible <i>Amphiroa</i> sp.	<i>Alga</i>	No activa
02153	PNM177	<i>Eunicea fusca</i>	<i>Octocoral</i>	Crecimiento rápido
02154	PNM182	<i>Eunicea fusca</i>	<i>Octocoral</i>	No activa
02155	PNM183 b	Primer lavado <i>Dictyota</i>	<i>Alga</i>	Bacteriostático
02156	PNM184	Primer lavado <i>Eunicea Fusca</i>	<i>Octocoral</i>	IQS
02157	PNM185	Barrido piel	<i>Pez loro</i>	Crecimiento rápido
02158	PNM186	Barrido piel	<i>Pez loro</i>	Crecimiento rápido
02159	PNM187	Barrido piel	<i>Pez loro</i>	Bacteriostático
02160	PNM189	Barrido piel	<i>Pez loro</i>	Bacteriostático
02161	PNM190	Punta de <i>Aplysina archeri</i>	<i>Esponja</i>	No activa
02162	PNM194	Cascajo coralino cueva pulpo	<i>Sedimento</i>	IQS
02163	PNM196	cascajo coralino cueva pulpo	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido

ID IBUN	N Cepa	Procedencia Muestra	Tipo	Actividad
02164	PNM197	cascajo coralino cueva pulpo	<i>Sedimento</i>	No activa
02165	PNM198	Cascajo coralino cueva pulpo	<i>Sedimento</i>	No activa
02166	PNM200	Sedimento en pastos	<i>Sedimento</i>	No activa
02167	PNM201	Sedimento en pastos	<i>Sedimento</i>	Bacteriostático
02168	PNM205	Sedimento en pastos	<i>Sedimento</i>	No activa
02169	PNM206	Sedimento en pastos	<i>Sedimento</i>	Crecimiento rápido
02170	PNM208	<i>Eunicea fusca</i>	<i>Octocoral</i>	Bactericida
02171	PNM209	<i>Eunicea fusca</i>	<i>Octocoral</i>	No activa
02172	PNM211	<i>Eunicea fusca</i>	<i>Octocoral</i>	Crecimiento rápido
02173	PNM212	<i>Eunicea fusca</i>	<i>Octocoral</i>	Crecimiento rápido
02174	PNM213	<i>Eunicea fusca</i>	<i>Octocoral</i>	Crecimiento rápido
02175	PNM214	<i>Eunicea fusca</i>	<i>Octocoral</i>	Bactericida
02176	PNM215	<i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	No activa
02177	PNM216	<i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	IQS
02178	PNM217	<i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	IQS
02179	PNM218	<i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	No activa
02180	PNM219	<i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02181	PNM220	<i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	Crecimiento rápido
02182	PNM221	<i>Dictyota</i> sp.	<i>Alga</i>	No activa

Tabla S2.2. Ensayo bioquímico para 24 cepas marinas. Ensayo API 20E (bioMérieux Inc., Durham, NC) - Oxidasa y Catalasa - L, L DAP (Actinobacteria). El ensayo muestra la presencia de: ONPG: \ beta - galactosidasa; ADH: arginina-dihidrolasa; LDC: lisina descarboxilasa; ODC: ornitina descarboxilasa. CIT: utilización de citrato. Producción de: H₂S, URE: Ureasa, TDA: triptófano desaminasa, IND: indol, VP: acetoin, GEL: gelatinasa. Otras características bioquímicas como la fermentación u oxidación de azúcares (GLU: glucosa, MAN: manitol, INO: inositol, SOR: sorbitol, RHA: ramnosa, SAC: sacarosa, MEL: melibiose, AMY: amygdalin y ARA: arabinosa. reducción de nitratos a nitritos

TEST/ Cepa	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	NO ₂	oxidasa	catalasa	L,L DAP
143	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
144	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
161A	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+
161B	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+
25	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-
184	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
208	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
102N	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-
13	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
144A	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
148	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
149	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
149A	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
87	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
89.3	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
89.4	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+
6	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
46b	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
194	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+
3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
182	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
5	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+
145	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+

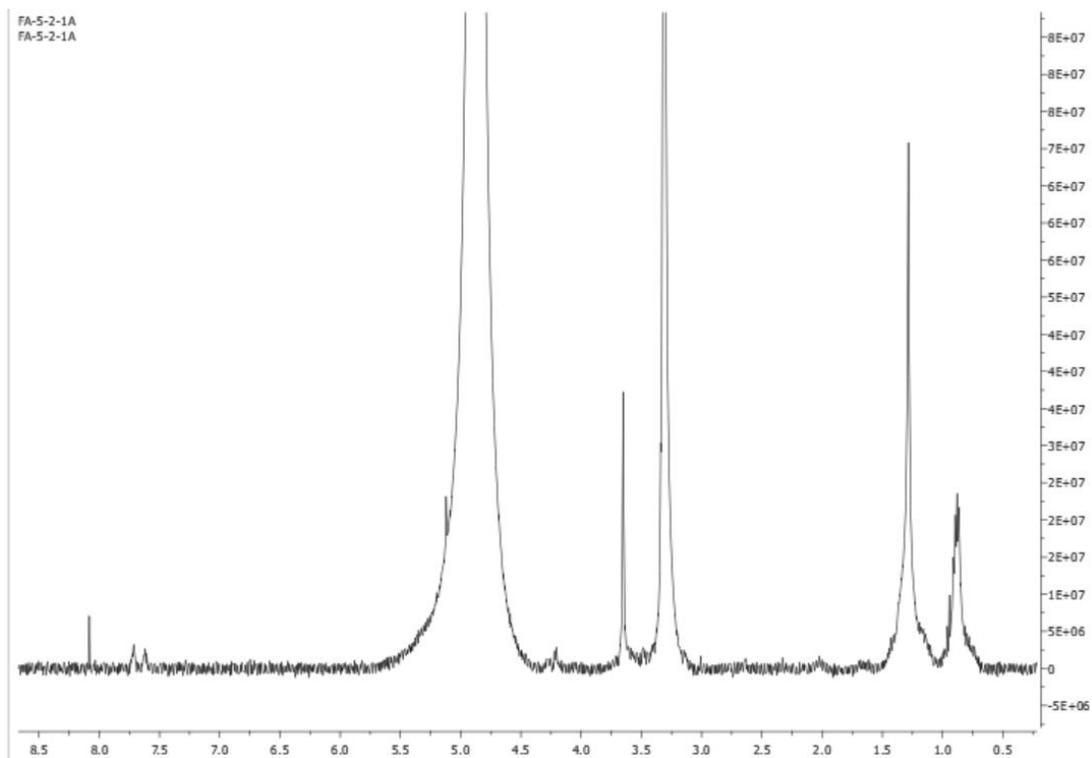


Figura S2.5 Espectro de RMN ^1H (MeOD, 400 MHz) de la fracción F3.2.4.2.1 aislada de *Micromonospora* sp

9.2 Anexos del capítulo 3:

Tabla. S3.1 Caracterización bioquímica API 20E para aislamientos no actinos con actividad inhibitoria de QS

CEPA	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO ₂
PNM 10	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PNM 92	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
PNM 100	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
PNM 115	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
PNM 123																					
PNM 216	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
PNM 217	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
PNM 82	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+

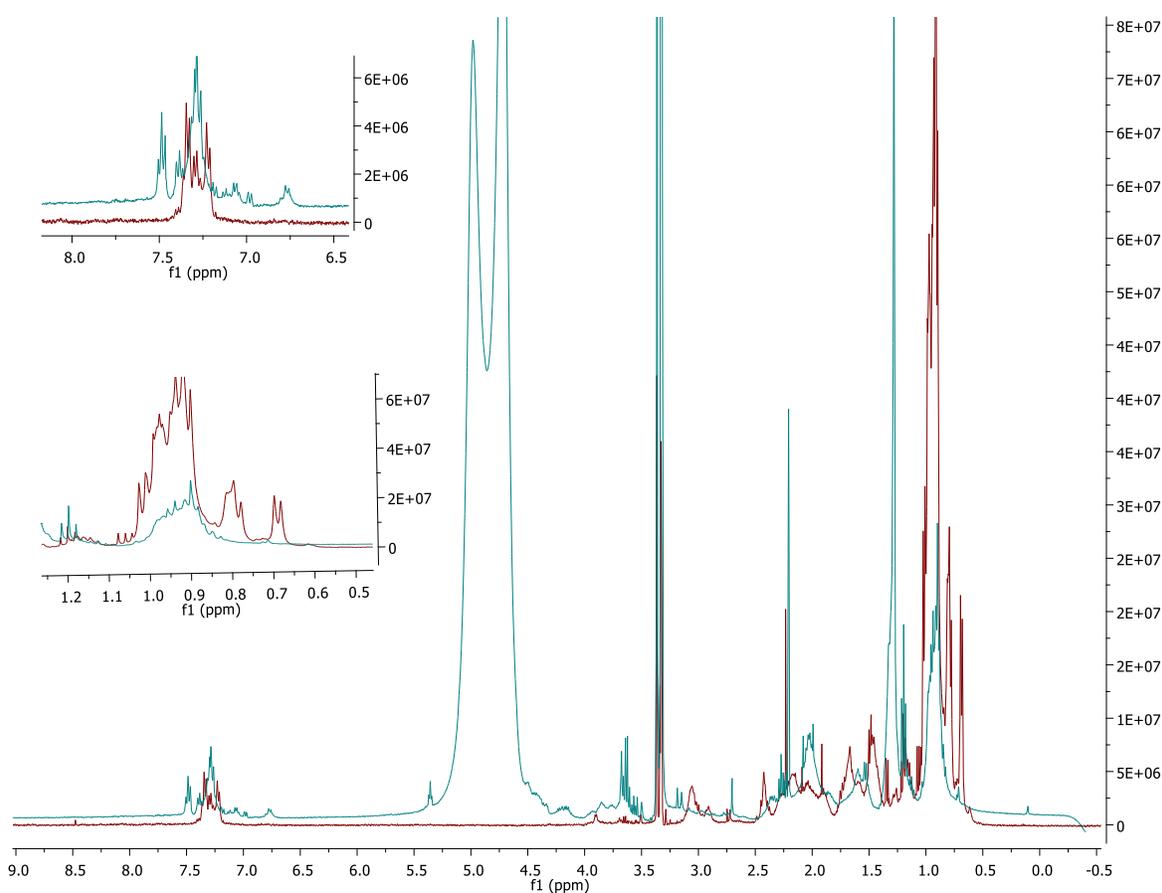


Figura S3.1. Comparación de los espectros RMN-H de la fracción activa FR-XIII (rojo) y su correspondiente blanco (verde). Las ampliaciones corresponden a las zonas de mayor diferencia

9.3 Anexos del capítulo 4

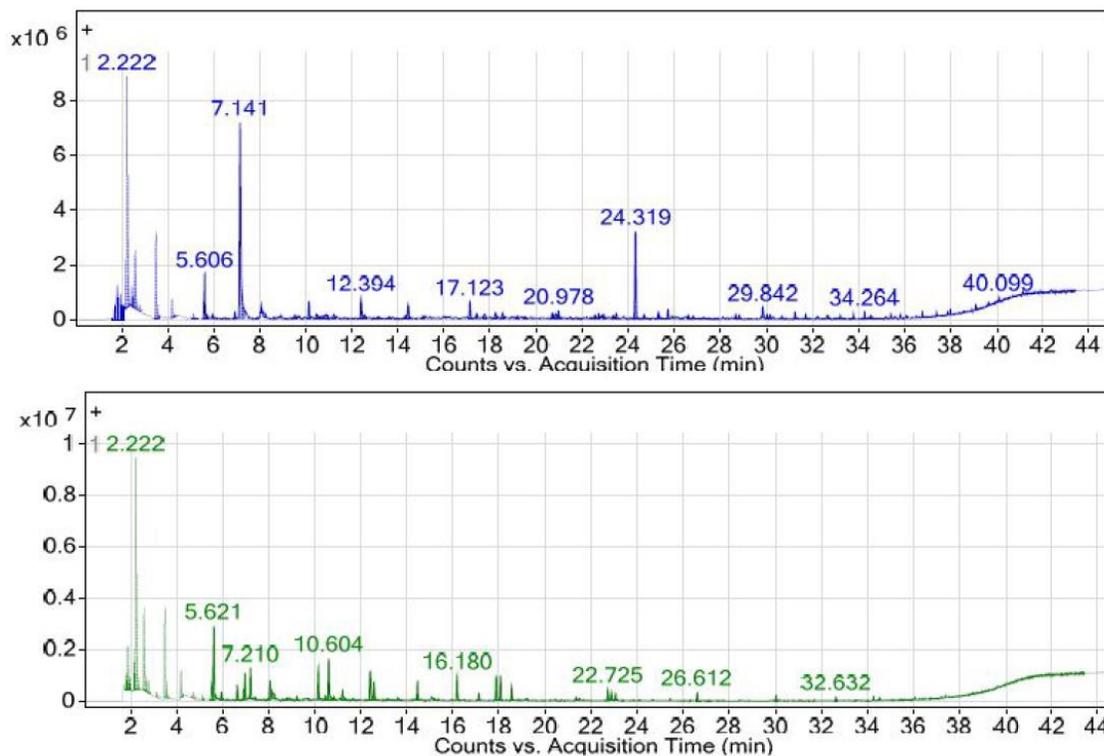


Figura S4.1. Cromatogramas obtenidos con la fibra Divinilbenceno/ Carboxen/ Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) Supelco®. En la parte superior el medio LB sin inocular y en el inferior el medio LB inoculado con el aislamiento PNM216, a los cinco días de cultivo.

9.4 Anexos del capítulo 5

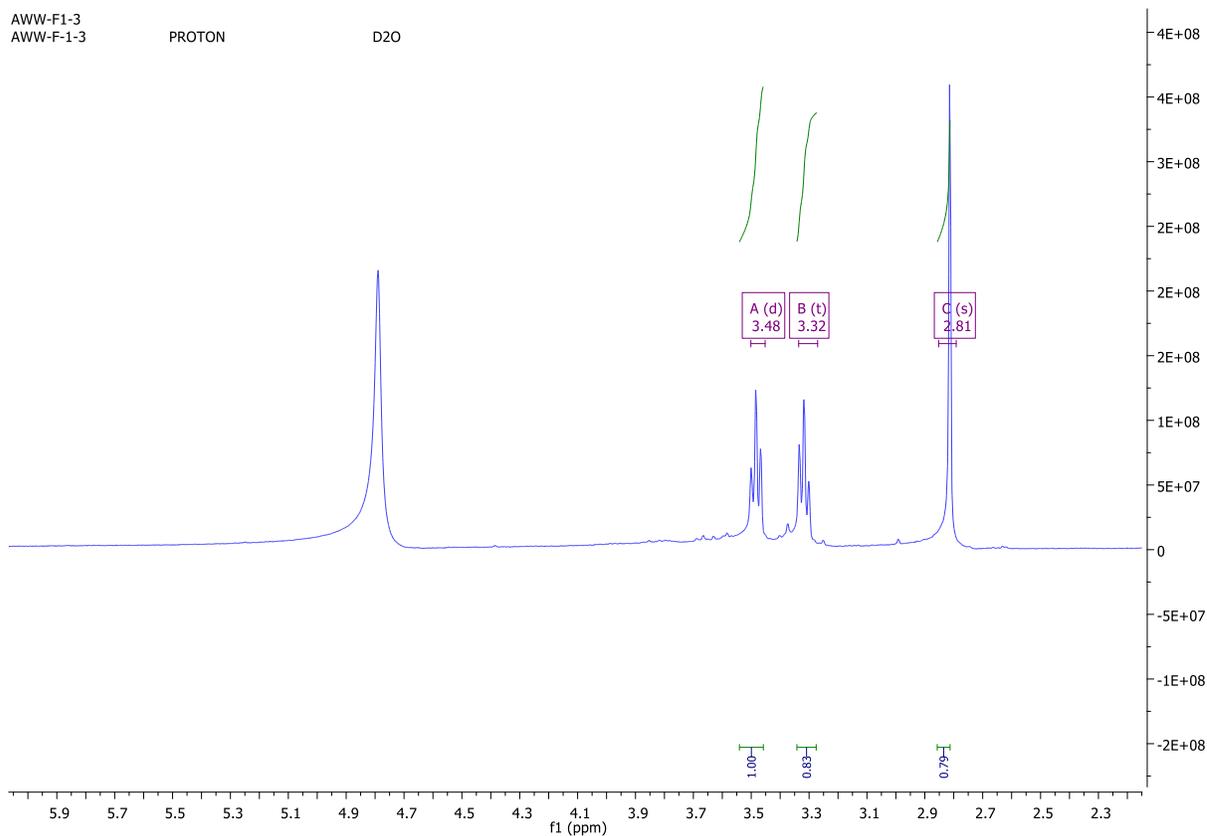


Figura S5.1. Espectro de ^1H RMN (Metanol d_4 , 400 MHz) de la fracción acuosa WW, correspondiente al compuesto 5.2 identificado como Taurina

9.5 Anexos del capítulo 6:

Tabla S6.1. Desplazamientos químicos (δ_H en metanol- d_4 - KH_2PO_4 en D_2O a pH 6.0) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de los metabolitos identificados en especies de *Passiflora*. Se incluyen datos de los espectros bidimensionales (COSY, HMBC y J-resolved).

Compuestos	Desplazamiento químico (multiplicidad, J)	Espectro 2D RMN
Ácidos y amino ácidos		
Acido acético	1.94 (s)	HMBC δ_H 1.94/ δ_C 179.2
Alanina	1.48 (H-3, d, $J = 7.2$ Hz)	HMBC δ_H 1.48/ δ_C 50.4 and 174.9 COSY δ_H 1.48 / δ_H 3.78
Ascorbato de Sodio	4.48 (H-5, d, $J = 2.3$ Hz)	COSY δ_H 4.48/ δ_H 3.96 δ_H 3.96/ δ_H 3.70 HMBC δ_H 4.48/ δ_C 174.0 δ_H 4.48/ δ_C 66.4
Ácido cítrico	2.53 (H-2a, d, $J = 16.3$); 2.71 (H-2b, d, $J = 16.3$)	COSY δ_H 2.53/ δ_H 2.71 HMBC δ_H 2.71/ δ_C 177.9 δ_H 2.71/ δ_C 180.6 δ_H 2.71/ δ_C 75.4
Ácido fórmico	8.46 (s)	
GABA	1.91 (H-3, m); 2.31 (H-2, t, $J = 7.5$); 3.01 (H-4, t like, $J = 7.5$)	COSY δ_H 2.31/ δ_H 1.91 δ_H 1.91/ δ_H 3.00
Ácido glutámico	2.13 (H-2, m), 2.40 (H-3, m); 3.70 (H-1, dd, $J = 6.8, 1.6$ Hz)	COSY δ_H 3.70/ δ_H 2.13 δ_H 2.40/ δ_H 2.04 HMBC δ_H 2.40/ δ_C 55.9 δ_H 2.40/ δ_C 180.1 δ_H 2.04/ δ_C 180.4
Glutamina	2.13 (H-3, m); 2.46 (H-4, m)	COSY δ_H 2.13/ δ_H 2.46
Leucina	0.95 (H-4, d, $J = 6.3$), 0.97 (H-5, d, $J = 6.3$)	COSY δ_H 0.95/ δ_H 1.78
Ácido málico	2.63 (dd, $J = 17.4, 9.4$), 2.81 (dd, $J = 17.4, 3.6$)	COSY δ_H 2.64 / δ_H 2.81 HMBC

Compuestos	Desplazamiento químico (multiplicidad, J)	Espectro 2D RMN
Prolina	4.08 (H-2, dd, $J = 8.7, 6.5$), 3.4 (m), 3.31 (m), 2.34 (m), 2.09 (ddd, $J=19.4, 6.3, 6.3$), 2.01 (m)	δ_H 2.64/177.4
		COSY
		δ_H 2.09/ δ_H 2.01
		δ_H 2.34/ δ_H 2.01
		δ_H 3.31/ δ_H 2.01
		δ_H 3.34/ δ_H 2.01
		δ_H 4.08/ δ_H 2.09
		δ_H 4.08/ δ_H 2.34
		HMBC
		δ_H 2.34/ δ_C 174.3
		δ_H 2.34/ δ_C 45.8
		δ_H 2.09/ δ_C 24.2
		δ_H 2.09/ δ_C 45.8
		δ_H 2.09/ δ_C 174.3
δ_H 2.01/ δ_C 29.4		
δ_H 2.01/ δ_C 45.8		
δ_H 2.01/ δ_C 61.6		
Ácido Shikímico	2.18 (H-6a, dddd, $J = 17.9, 7.6, 2.2, 1.4$); 2.76 (H-6b, dddd, $J = 17.9, 5.3, 3.2, 1.2$); 3.93 (H-5, m); 4.35 (H-3, dd, $J = 4.2, 4.2$); 6.48 (H-2, m)	COSY
		δ_H 6.48/ δ_H 2.18
		δ_H 6.48/ δ_H 2.76
		δ_H 6.48/ δ_H 4.35
		δ_H 4.35/ δ_H 3.93
		δ_H 2.76/ δ_H 2.18
		δ_H 2.18/ δ_H 3.93
		δ_H 2.76/ δ_H 3.93
		HMBC
		δ_H 6.48/ δ_C 73.8
		δ_H 6.48/ δ_C 174.1
		δ_H 2.76/ δ_C 174.1
		δ_H 2.76/ δ_C 135.5
		δ_H 2.76/ δ_C 131.5
δ_H 2.76/ δ_C 72.3		
δ_H 2.76/ δ_C 67.0		
δ_H 2.18/ δ_C 67.0		
δ_H 2.18/ δ_C 131.5		
δ_H 2.18/ δ_C 135.5		
Ácido succínico	2.55 (s)	HMBC
		δ_H 2.55/ δ_C 179.0
Treonina	1.33 (d, $J = 6.8$ Hz), 3.51 (m), 4.22 (m)	COSY
		δ_H 1.33/ δ_H 4.22
Tirosina	7.17 (d, $J = 8.6$), 6.84 (d, $J = 8.6$ Hz), 3.87 (m), 3.21 (m)	COSY
		δ_H 7.17/ δ_H 6.83
		δ_H 3.87/ δ_H 3.21
		HMBC
		δ_H 7.17/ δ_C 155.01

Compuestos	Desplazamiento químico (multiplicidad, J)	Espectro 2D RMN
Valina	1.01 (H-3, d, J = 7.0), 1.05 (H-4, d, J = 7.0)	COSY δ_{H} 1.01/ δ_{H} 2.26 δ_{H} 1.05/ δ_{H} 2.26
Compuestos Fenólicos Catequina	2.52 (H-4a, m); 2.82 (H-4b, dd, J = 16.1, 5.3 Hz); 4.12 (H-3, m), 4.69 (H-2, d, J = 7.3 Hz), 5.95 (H-6, d, J = 2.3 Hz); 6.03 (H-8, d, J = 2.1); 6.88 (H-2', d, J = 2.0), 6.84 (H-6', d, J = 8.2), 6.79 (m, ov)	COSY δ_{H} 4.12 / δ_{H} 4.69 δ_{H} 4.12 / δ_{H} 2.52 δ_{H} 4.12 / δ_{H} 2.82 δ_{H} 5.95 / δ_{H} 6.03 δ_{H} 6.79 / δ_{H} 6.88 δ_{H} 6.79 / δ_{H} 6.84 HMBC δ_{H} 6.79 / δ_{C} 144.5 δ_{H} 6.79 / δ_{C} 113.2 δ_{H} 6.88 / δ_{C} 120.3 δ_{H} 6.84 / δ_{C} 130.5 δ_{H} 6.88 / δ_{C} 144.3 δ_{H} 6.84 / δ_{C} 144.3 δ_{H} 4.69 / δ_{C} 66.73 δ_{H} 4.69 / δ_{C} 114.38 δ_{H} 4.69 / δ_{C} 119.15 δ_{H} 4.69 / δ_{C} 130.30 δ_{H} 4.69 / δ_{C} 26.25 δ_{H} 4.12 / δ_{C} 73.92 δ_{H} 2.82 / δ_{C} 155.2 δ_{H} 2.52 / δ_{C} 155.2 MORE
Azúcares Glucosa	5.18 (H-1 α , d, J = 3.8 Hz), 4.58 (H-1 β , d, J = 7.8 Hz), 3.87 (dd, J = 12.2, 2.1 Hz)	COSY δ_{H} 5.18/ δ_{H} 3.47 δ_{H} 4.58/ δ_{H} 3.20 HMBC δ_{H} 5.18/ δ_{C} 72.8 δ_{H} 3.46/ δ_{C} 73.0 δ_{H} 4.58/ δ_{C} 76.1 δ_{H} 3.20/ δ_{C} 96.1 δ_{H} 3.20/ δ_{C} 76.0
Mio-inositol	4.02 (H-2, t, J = 2.9 Hz), 3.62 (H-4/6, t, J = 9.6 Hz), 3.47 (H-1/3, dd, J = 9.9, 2.9 Hz), 3.23 (H-5, t, J = 9.4 Hz)	COSY δ_{H} 3.23/ δ_{H} 3.62 δ_{H} 3.62/ δ_{H} 3.47 δ_{H} 3.47/ δ_{H} 4.02 HMBC δ_{H} 3.23/ δ_{C} 69.8 δ_{H} 3.23/ δ_{C} 72.4 δ_{H} 3.62/ δ_{C} 74.5

Compuestos	Desplazamiento químico (multiplicidad, J)	Espectro 2D RMN
Sacarosa	5.40 (H-1, d, $J = 3.6$ Hz), 4.15 (H-5', d, $J = 8.4$ Hz); 4.02 (t, $J = 8.3$ Hz), 3.65 (brs), 3.51 (dd, $J = 9.9, 3.9$ Hz)	δ_{H} 3.62/ δ_{C} 71.4 δ_{H} 3.47/ δ_{C} 72.4 δ_{H} 4.02/ δ_{C} 72.4 COSY δ_{H} 5.40/ δ_{H} 3.50 δ_{H} 4.15/ δ_{H} 4.02 HMBC δ_{H} 5.40/ δ_{C} 72.7 δ_{H} 5.40/ δ_{C} 103.7 δ_{H} 5.40/ δ_{C} 103.7 δ_{H} 3.50/ δ_{C} 103.7 δ_{H} 4.02/ δ_{C} 103.7 δ_{H} 4.15/ δ_{C} 61.6 δ_{H} 4.15/ δ_{C} 74.1
Misceláneo Colina	3.20 (s)	COSY δ_{H} 3.5 / δ_{H} 4.06 HMBC δ_{H} 3.20/ δ_{C} 68.9
Etanol	1.19 (H-2, t, $J = 7.1$)	COSY δ_{H} 1.19/ δ_{H} 3.60
Pipecolato	3.56 (m), 2.99 (ddd, $J = 12.3, 12.3, 3.1$), 2.23 (m), 1.58 (m)	COSY δ_{H} 3.56/ δ_{H} 1.66 δ_{H} 3.56/ δ_{H} 2.23 δ_{H} 3.39/ δ_{H} 2.99 δ_{H} 2.99/ δ_{H} 1.66
Putrescina	3.03(m), 1.77 (m)	COSY δ_{H} 3.03/ δ_{H} 1.77
Trigonellina	9.17(s), 8.84(m), 8.08(m), 4.43(s)	COSY δ_{H} 8.84/ δ_{H} 8.08 HMBC δ_{H} 4.43/ δ_{C} 145.83
5-carboxi-metil-2,5-dihidrofuranona	7.82 (H-4, dd, $J = 5.7, 2.4$), 6.39 (H-3, dd, $J = 5.7, 1.3$), 5.57 (H-5, m), 2.90 (H-6, dd, $J = 18.9, 6.1$), 2.55 (H-6', dd, 18.9, 2.0)	COSY δ_{H} 7.82/ δ_{H} 6.39 δ_{H} 7.82/ δ_{H} 5.57 δ_{H} 6.39/ δ_{H} 5.57 δ_{H} 5.57/ δ_{H} 2.90 δ_{H} 2.90/ δ_{H} 2.55

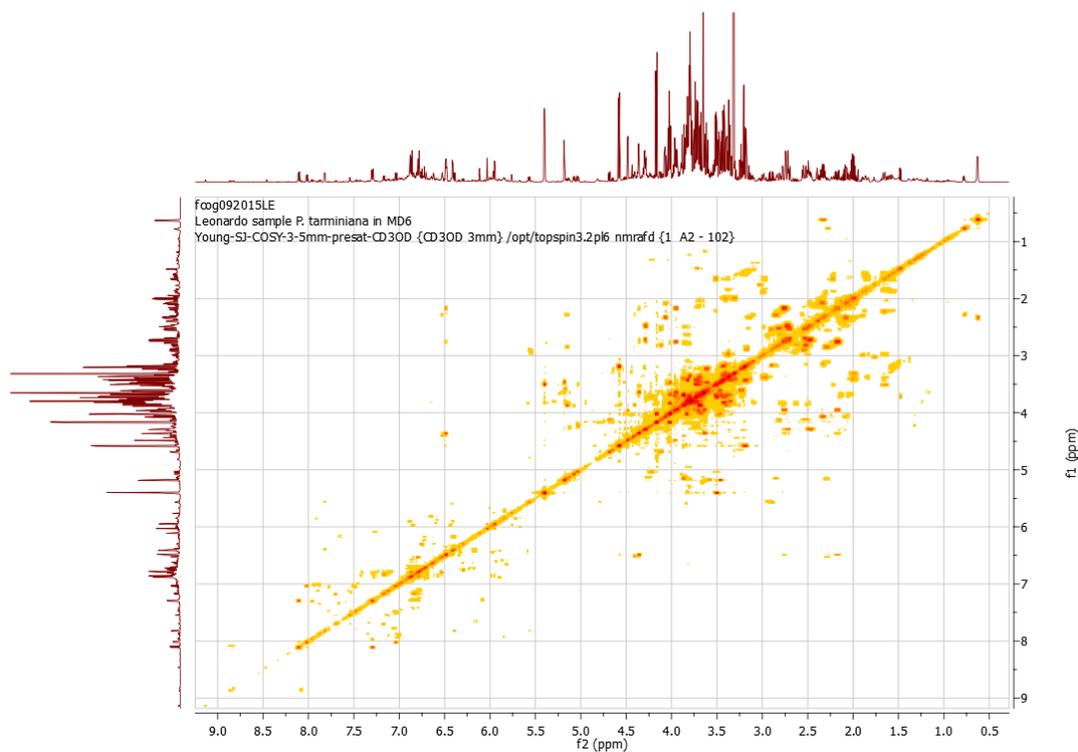


Figura S6.1 2D NMR spectra COSY correlations for *Passiflora tarminiana* in methanol-d₄-KH₂PO₄ en D₂O at pH 6.0.

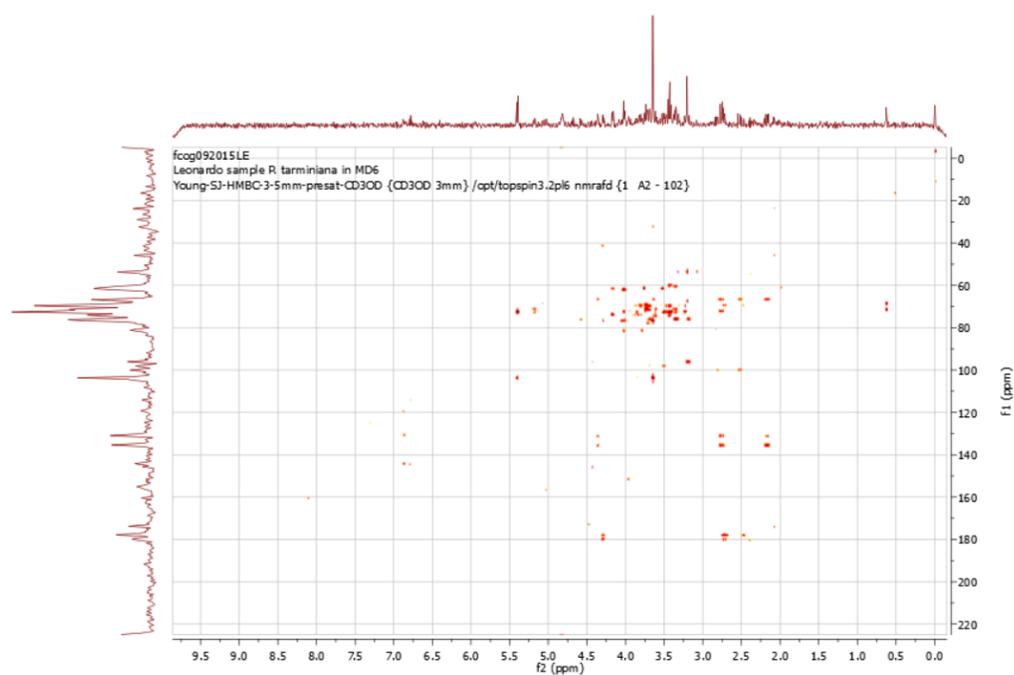


Figura S6.2. 2D NMR spectra HMBC correlations for *Passiflora tarminiana* in methanol-d₄-KH₂PO₄ en D₂O at pH 6.0.

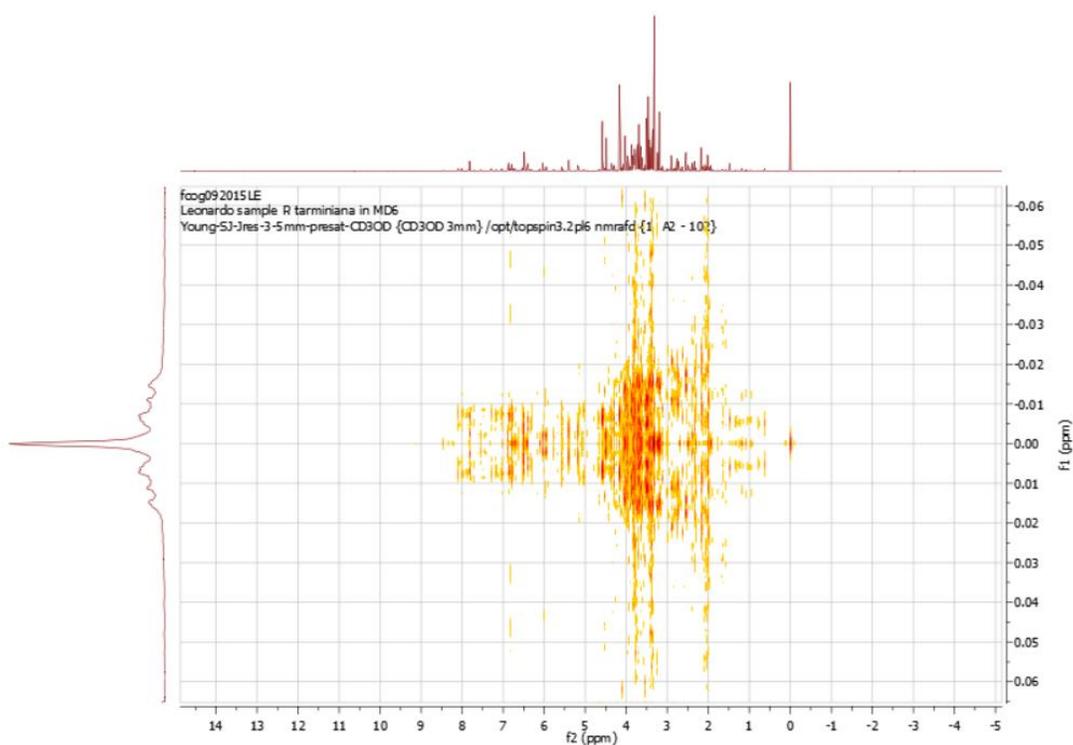


Figura S6.3. Espectro *J*-resolved del extracto de *Passiflora tarminiana* en metanol-d₄-KH₂PO₄ en D₂O a pH 6.0

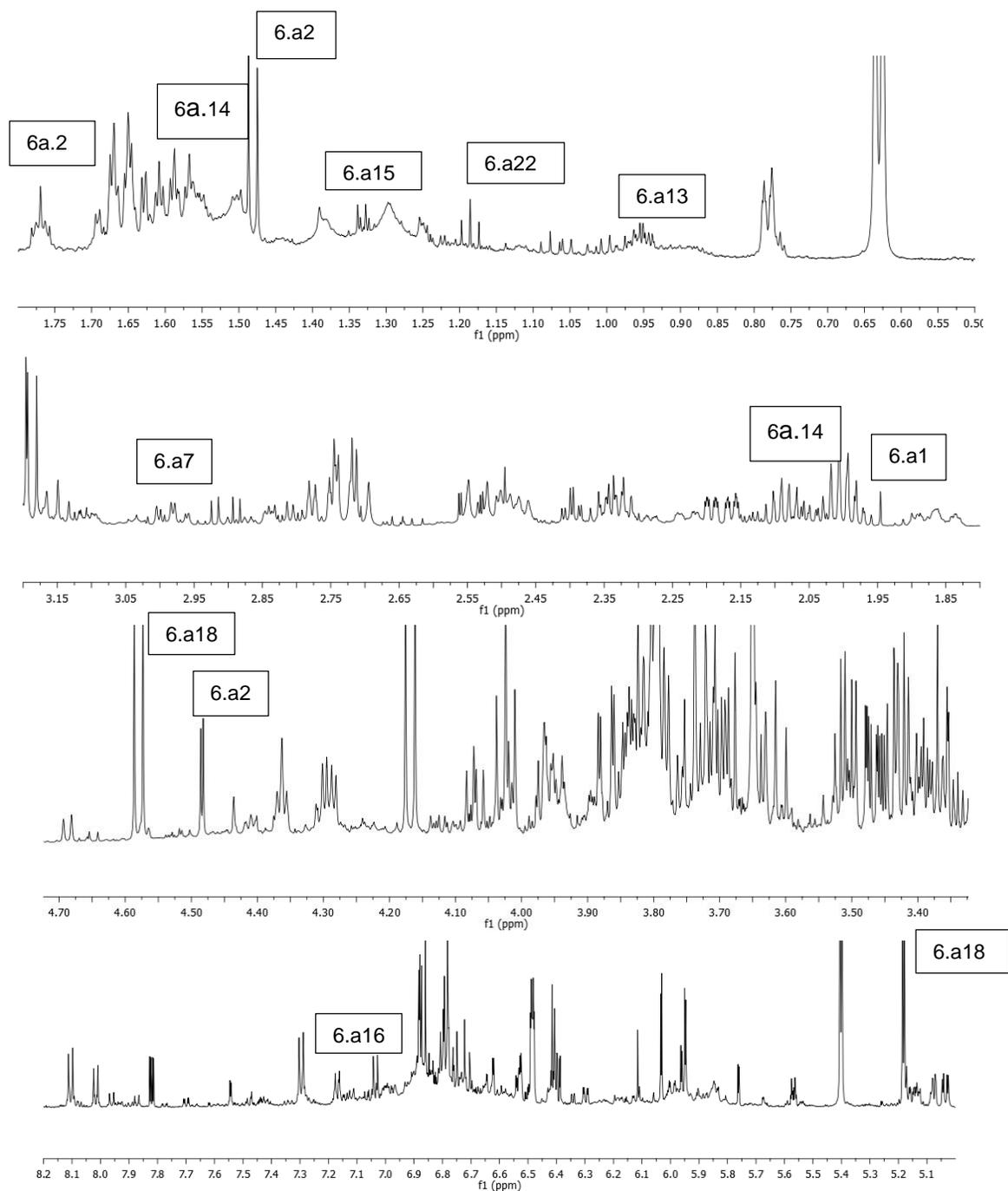


Figura S6.4. Asignación de señales de RMN ^1H (MD6) para compuestos identificados para extracto de *Passiflora tarminiana*

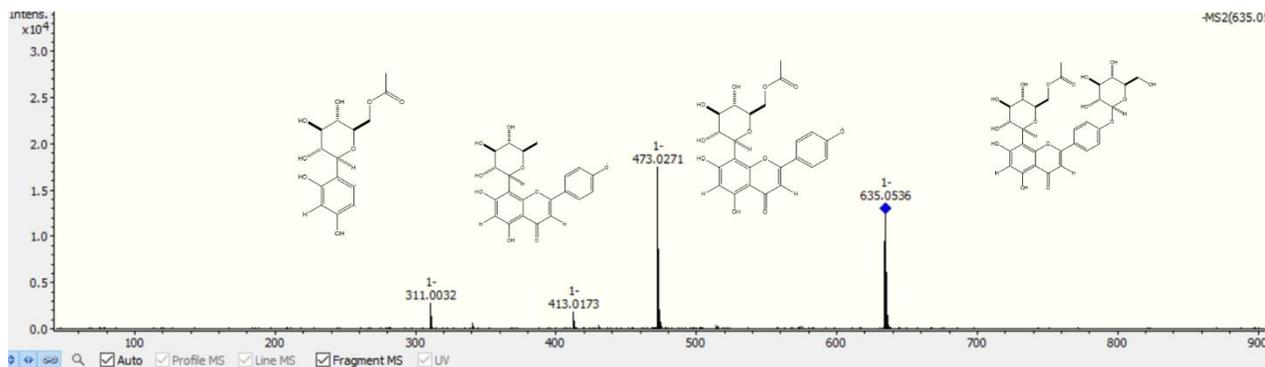


Figura S6.5. Fragmentación de la Apigenina-4-O-glucopiranosil, 8-C-(6'' acetil)- β -glucopiranosido (6.2) en el espectro MS-MS del ión m/z 635.0536 [M^+]

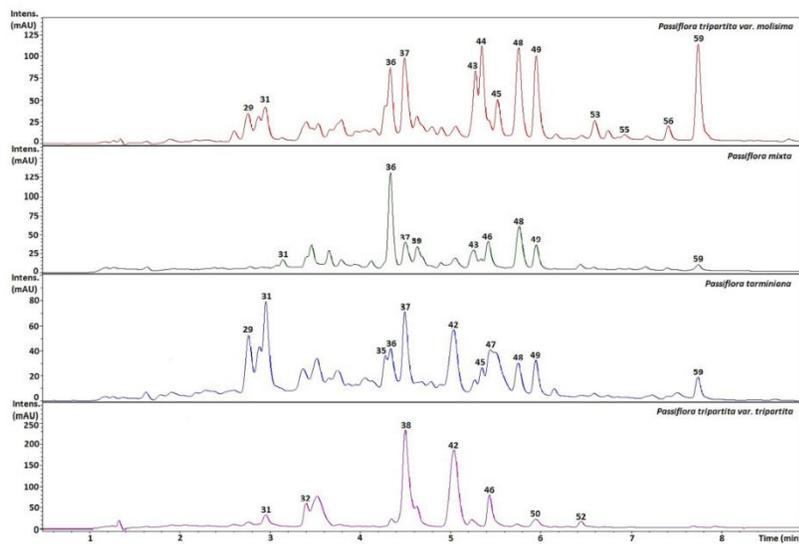
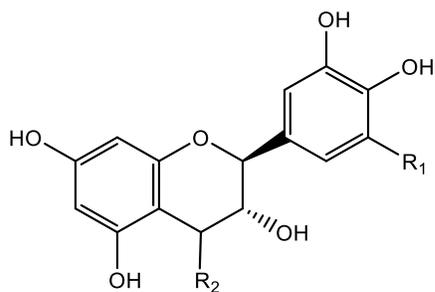
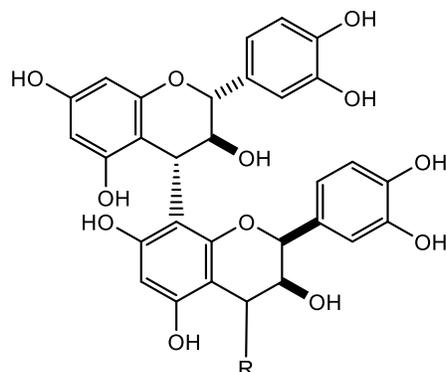
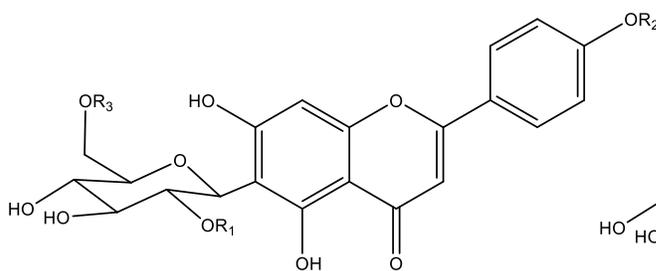
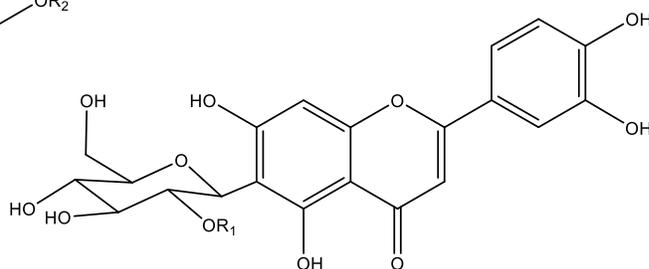
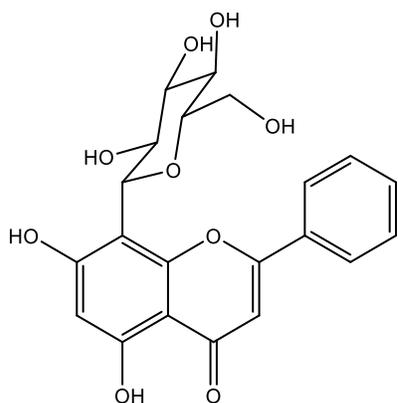
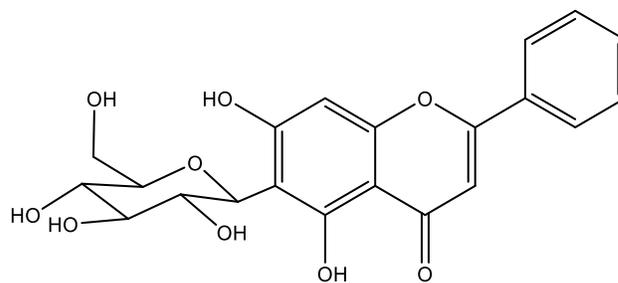


Figura S6.6. Cromatograma de masas de especies cultivadas de *Passiflora Tacsonia*

gallocatechin [26] $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$ gallocatechin-(4 α ->8)-catechin [27] $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{Catechin}$ Catechin [31] $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$ Procyanidin dimer B1 [29] $R = \text{H}$ Procyanidin trimer C2 [30] $R = (4\alpha\text{-}8)\text{-catechin}$ 2''-O-glucosyl-6-C-glucosyl apigenin [41] $R_1 = \text{glucose}$, $R_2, R_3 = \text{H}$ Isovitexin [46] $R_1, R_2, R_3 = \text{H}$ 4'-methoxyluteolin-6-C-glucopyranoside [48] $R_1, R_3 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$ 4'-methoxyluteolin-6-C-6''-acetylglucopyranoside [55] $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$, $R_3 = \text{CH}_3\text{CO}$ Isoorientin [37] $R_1 = \text{H}$ Orientin-2''-O-rhamnoside [38] $R_1 = \text{rhamnose}$ 

Chrysin 8-C-glucopyranoside [52]



Chrysin 6-C-glucopyranoside [58]

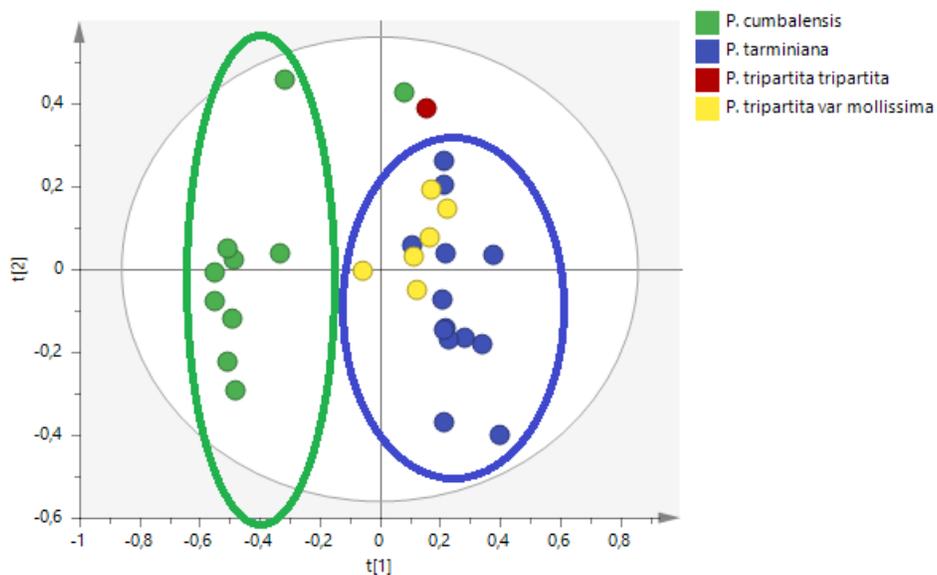
Figura S6.7. Flavonoides y compuestos relacionados detectados en *Passiflora* spp. Compuestos fenólicos identificados por datos de RMN y HPLC-MS/MS.

Anexo Tabla S6.2. Desplazamientos químicos (δ_H en metanol- d_4 - KH_2PO_4 en D_2O a pH 6.0) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de compuestos fenólicos identificados en especies de *Passiflora*. Se incluyen datos de los espectros bidimensionales (COSY, HMBC y J-resolved).

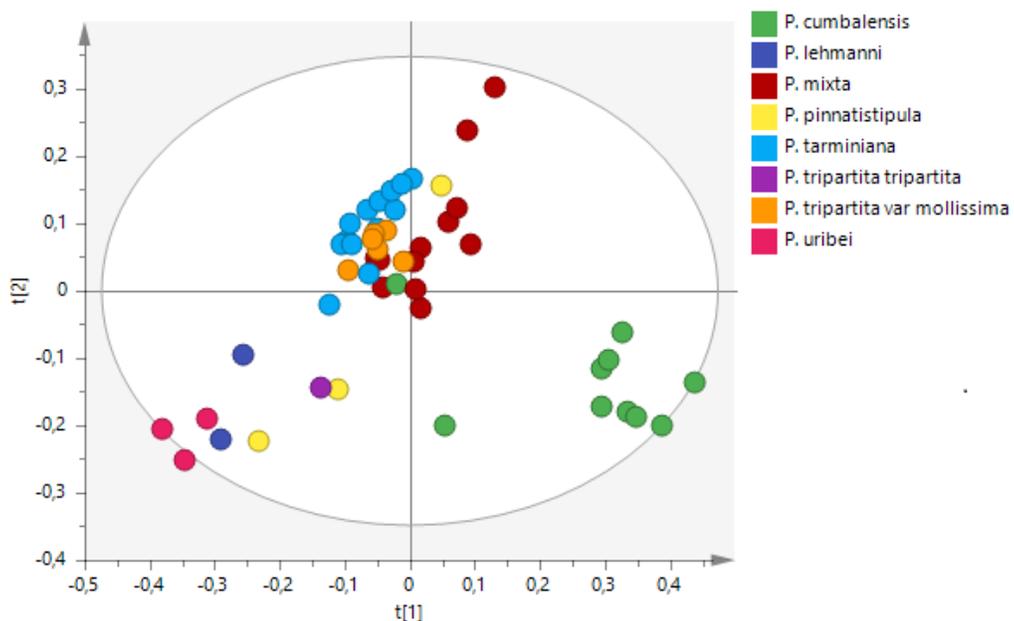
No	Compuesto	Datos RMN	Referencia
6.13	Isoschaftósido	MeOD 7.96 (d, 8.8), 6.95 (d, 8.8), 6.60 (s), 5.13 (d, 9.8), 5.10 (d, 9.9), 4.08 (dd, 12.5, 2.1) DMSO 8.04 (d, $J = 8.6$), 6.92 (d, $J = 8.8$ Hz), 6.89 (s), 4.77 (d, 10.0), 4.58 (d, 9.9), 3.76 (bd, 11.9), 3.68 (bd, 11.9), 3.57 (bs)	Molecules 2013, 18, 1672-1692 MS/MS is in agreement with isoschaftoside not with schaftoside <i>Food Funct.</i> , 2015, DOI 10.1039/C5FO00875A <i>Molecules</i> 2011, 16, 5079-5086; doi:10.3390/molecules16065079 Schafoside elutes before isochaftoside but very close, and before vitexin J. Braz. Chem. Soc., Vol. 19, No. 5, 903-908, 2008
6.14	Isoorientina	MeOD 7.32 (m Hz), 6.85 (d, 8.9 Hz), 6.43 (s), 6.34 (s), 4.9 (d, 9.9), 4.3 (bt, 9.4 Hz), 3.86 (dd, 12.1, 2.3), 3.75 (dd 12.1, 5.1), 3.52 (bt, 9.2 Hz) 3.4(m) DMSO 7.31 (dd, 8.4, 2.4 Hz), 7.26 (d, 2.4), 6.70 (d, 8.4 Hz), 6.40 (s), 4.58 (d, 9.8), 4.06 (bt, 9.4 Hz), 3.65 (bd, 11.8, 2.2), 3.52 (dd 11.8, 6.0), 3.18 (bt, 8.4 Hz) 3.13 (m)	J chrom A 1381 2015 160 172 Food Chemistry 131 (2012) 652– 659 <i>Food Funct.</i> , 2015, DOI:10.1039/C5FO00875A
6.1	Apigenina-4-O- β - glucopiranosil-8-C neohesperidósido	MeOD 7.99 (d, 8.8), 6.94 (d, 8.8), 6.58 (s), 6.24 (s), 5.13 (d, 1.8), 5.05 (d, 9.9), 5.04 (d, 7.44), 4.26 (dd, 9.9; 8.6), 4.10 (bt, 9.8, 8.6), 3.85 (dd, 3.1, 1.8), 3.64 (m), 3.73 (t, 8.7), 3.61 (dd, 3.1, 9.6), 3.31 (t, 9.6), 2.57 (dq, 9.6, 6.2), c 0.75 (d, 6.2), 0.90 (d, 6.3)	Compuesto nuevo
6.18	Isovitexina-2''-O- ramnósido	MeOD 7.98 (d, 8.8 Hz), 6.95 (d, 8.9 Hz), 6.61 (s), 6.28 (s), 5.10 (d, 1.8), 5.03 (d, 10.0), 4.33 (bt, 8.8 Hz), 4.19 (brt, 8.8), 2.46(m),	Geison J. Chromatogr. B 990 (2015) 104- 110 Hawthorn leaves extracts. Medicinal Chinese plant

No	Compuesto	Datos RMN	Referencia
		2.34 (m), 0.79 (d, 6.4), 0.65 (d, 6.1) DMSO	
6.2	Apigenina-4-O-glucopiranosil, 8-C-(6'' acetil)-glucopiranosido	8.06 (d, 8.6 Hz), 6.90 (d, 8.8 Hz), 6.89 (s), 6.23 (s), 4.98 (d, 1.6), 4.77 (brt, 10.0), 4.05 (bt, 8.8), 2.13 (m), 0.65 (d, 6.1), 0.47 (6.1) MeOD	Compuesto nuevo
6.21	Isovitexina	8.03 (d, 8.4), 7.26 (d, 8.4), 6.68 (bs), 6.28 (bs), 5.04 (d, 7.4), 4.99 (d, 10.2), 4.46 (dd, 2.0, 12.0), 4.26 (dd, 4.7, 12.0), 4.16 (bt, 9.4), 3.92 (dd, 2.2, 12.0), 3.73 (dd, 5.6, 12.0), 3.56 (dd, 7.9, 9.3), 3.50 (dd, 7.4, 9.6), 3.50 (t, 8.9, 3.43 (t, 9.4), 1.89 (bs) MeOD	Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 114 (2015) 272–279 <i>Food Funct.</i> , 2015, DOI: 10.1039/C5FO00875A
6.27	Crisina 8-C-glucopiranosido	7.79 (d, 8.8 Hz), 6.89 (d, 8.8 Hz), 6.43 (s), 6.34 (s), 4.89 (d, 9.9), 4.3 (bt, 9.4 Hz), 3.86 (dd, 12.1, 2.2), 3.74 (dd 12.1, 5.1), 3.47 (bt, 8.9 Hz) 3.4(m) DMSO	
6.27	Crisina 8-C-glucopiranosido	7.84 (d, 8.7 Hz), 6.88 (d, 8.8 Hz), 6.55 (s), 6.38 (s), 4.52 (d, 9.8), 4.06 (bt, 9.4 Hz), 3.65 (bd, 11.8, 2.2), 3.52 (dd 11.8, 6.0), 3.18 (bt, 8.4 Hz) 3.19 (m) MeOD	Natural Medicines 48 (3) , 215–218 (1994)
6.33	Crisina 6-C-glucopiranosido	7.98 (d, 7.3Hz), 7.57 (m) 6.74 (s), 6.29 (s), 4.99 (d, 10.0 Hz), 4.10 (brt, 9.3 Hz) 3.97 (bd, 11.8), 3.81 (dd, 12.1, 5.3), 3.48 (m), 3.43 (m) DMSO	
6.33	Crisina 6-C-glucopiranosido	8.08 (d, 7.6), 7.63 (m), 7.56 (m), 6.97 (s), 6.30 (s) 4.65 (d, 9.9) MeOD	Natural Medicines 48 (3) , 215–218 (1994)

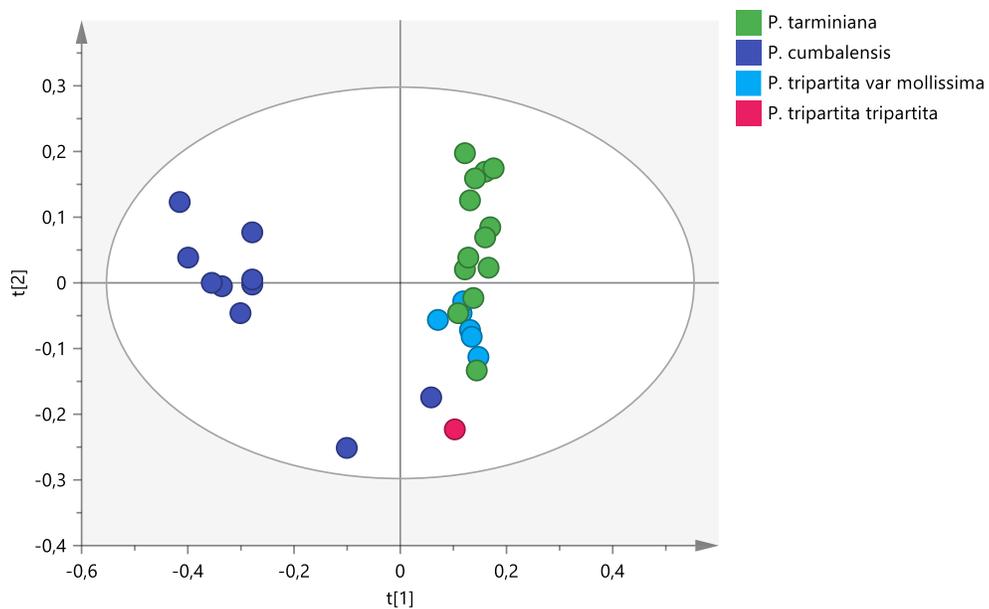
No	Compuesto	Datos RMN	Referencia
		7.98 (d, 7.1Hz), 7.56 (m), 6.76 (s), 6.54 (s), 4.91 (d, 9.9 Hz), 4.17 (brt, 9.3 Hz), 3.88 (dd, 12.1, 2.1Hz), 3.74 (dd, 12.1, 5.3), 3.48 (m), 3.43 (m)	
		DMSO 8.08 (d, 7.6): 7.60 (m), 6.97 (bs), 6.52 (s), 4.85 (brs), 4.59 (d, 9.8), 4.04 (bt, 10.2), 3.68 (bd, 12.1)	



Anexo Figura S6.8. PCA de comparación de curubas colombianas cultivadas usando análisis de componente principal (PCA).



Anexo Figura S6.9. PCA de comparación en la region de flavonoides (4.8-10 ppm)



Anexo Figura S6.10. PCA Comparing the Colombian cultured banana passion fruits in the flavonoid region (4.8-10 ppm) by using principal component analysis (PCA)

Tabla S6.3 Datos de inhibición de *quorum sensing* usando *Chromobacterium violaceum* ATCC31532

ESPECIES <i>Passiflora</i>	Código	Diámetro HALO (mm)	Categoría
<i>Passiflora cumbalensis</i>	P116	35	3
<i>Passiflora cumbalensis</i>	P129	40	3
<i>Passiflora cumbalensis</i>	P131	45	3
<i>Passiflora cumbalensis</i>	P132	45	3
<i>Passiflora cumbalensis</i>	P212	40	3
<i>Passiflora cumbalensis</i>	P31'	30	1
<i>Passiflora cumbalensis</i>	P36'	35	3
<i>Passiflora cumbalensis</i>	P45	50	3
<i>Passiflora cumbalensis</i>	P41	35	3
<i>Passiflora cumbalensis</i>	P46	35	3
<i>Passiflora mixta</i>	P119	40	3
<i>Passiflora mixta</i>	P121	30	1
<i>Passiflora mixta</i>	P123	30	1
<i>Passiflora mixta</i>	P204	30	1
<i>Passiflora mixta</i>	P205	30	1
<i>Passiflora mixta</i>	P26	20	1
<i>Passiflora mixta</i>	P26	10	1
<i>Passiflora mixta</i>	P27	20	1
<i>Passiflora mixta</i>	P40	35	3
<i>Passiflora mixta</i>	P32	25	1
<i>Passiflora mixta</i>	P33	30	1
<i>Passiflora mixta</i>	P7	35	3
<i>Passiflora mixta</i>	P42	45	3
<i>Passiflora mixta</i>	P42	40	3
<i>Passiflora pinnatistipula</i>	P24	0	1
<i>Passiflora pinnatistipula</i>	P38	0	1
<i>Passiflora pinnatistipula</i>	P37	5	1
<i>Passiflora lehmannii</i>	P216	40	3
<i>Passiflora lehmannii</i>	P217	35	3
<i>Passiflora tarminiana</i>	P110	40	3
<i>Passiflora tarminiana</i>	P112	40	3
<i>Passiflora tarminiana</i>	P114	30	1
<i>Passiflora tarminiana</i>	P122	20	1
<i>Passiflora tarminiana</i>	P122	25	1
<i>Passiflora tarminiana</i>	P208	25	1
<i>Passiflora tarminiana</i>	P208	25	1
<i>Passiflora tarminiana</i>	P21	35	3
<i>Passiflora tarminiana</i>	P213	35	3
<i>Passiflora tarminiana</i>	P23	15	1
<i>Passiflora tarminiana</i>	P23	15	1
<i>Passiflora tarminiana</i>	P43	45	3
<i>Passiflora tarminiana</i>	P39	45	3
<i>Passiflora tarminiana</i>	P39	35	3
<i>Passiflora tarminiana</i>	P44	10	1

ESPECIES <i>Passiflora</i>	Código	Diámetro HALO (mm)	Categoría
<i>Passiflora tarminiana</i>	P6	40	3
<i>Passiflora tarminiana</i>	P8	35	3
<i>Passiflora tripartita</i>	P28	30	1
<i>Passiflora tripartita var tripartita</i>	P47	25	1
<i>Passiflora tripartita var mollisssima</i>	P22	20	1
<i>Passiflora tripartita var mollisssima</i>	P22	15	1
<i>Passiflora tripartita var mollisssima</i>	P3'	15	1
<i>Passiflora tripartita var mollisssima</i>	P3'	25	1
<i>Passiflora tripartita var mollisssima</i>	P30	25	1
<i>Passiflora tripartita var mollisssima</i>	P30	35	3
<i>Passiflora tripartita var mollisssima</i>	P5	25	1
<i>Passiflora tripartita var mollisssima</i>	P9	35	3
<i>Passiflora tripartita var mollisssima</i>	P9	40	3
<i>Passiflora uribei</i>	P34	50	3
<i>Passiflora uribei</i>	P35	45	3
<i>Passiflora uribei</i>	P48	45	3