



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Estudios de bioprospección del coral
blando *Pseudopterogorgia
elisabethae* como fuente de
sustancias con actividad biológica
Fase IV**

Hebelin Correa Velandia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2012

Estudios de bioprospección del coral blando *Pseudopterogorgia elisabethae* como fuente de sustancias con actividad biológica Fase IV

Hebelin Correa Velandia

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctora en Ciencias-Química

Directora:

Dra. Carmenza Duque Beltran

Codirectora:

Dra. Catalina Arévalo-Ferro

Línea de Investigación:

Productos Naturales Marinos

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

2012

A mis padres

Ana B. Velandia y Julio C. Correa

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por la formación académica durante todos estos años.

A la University of Prince Edward Island, por abrirme las puertas para realizar mi pasantía doctoral y por el apoyo financiero que me brindaron durante mi estadía.

Al programa de Becas Sobresalientes de Posgrado de la Vicerrectoría Académica, Universidad Nacional de Colombia por el apoyo financiero entre II Semestre de 2008- I semestre de 2011.

A COLCIENCIAS (Proyecto: 110148925103, contrato: 402-2009) por el apoyo financiero para realizar este trabajo.

Al Ministerio del Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial por conceder el permiso de investigación para este proyecto (permiso marco No. 4 del 10 de Febrero de 2010) y a la Vicerectoria de Investigación por la tramitación necesaria para obtenerlo.

A la profesora Carmenza Duque por su incondicional apoyo, su inmenso conocimiento y su profunda sabiduría que siempre supo compartir conmigo

Al profesor Russell Kerr por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y hacerme parte de la gran familia Kerr Lab.

A M Sc. Brad Haltli por enseñarme y mostrarme lo maravilloso que es trabajar en microbiología y por dirigir la mayoría de la parte biológica de este trabajo.

Al Dr. Fabrice Berrué por asesorarme en la parte química de este trabajo. Gracias Fabrice por ser un excelente ser humano y un gran investigador.

A la profesora Catalina Arévalo por la asesoría en la concepción del proyecto inicial y por la asesoría y sugerencias ofrecidas en parte de la biología de este trabajo.

A la profesora Mónica Puyana de la Universidad Jorge Tadeo Lozano por la recolección de las muestras de *Pseudopteroorgia elisabethae* y el conocimiento compartido conmigo para llegar a entender mejor este octocoral.

A todos los compañeros y profesores del laboratorio de marinos de la Universidad Nacional de Colombia.

A todos mis compañeros del laboratorio de marine natural products de la University of Prince Edward Island. Gracias por mostrarme los cinco continentes reunidos en un solo laboratorio, donde el idioma no es una barrera para aprender: Fabrice (Francia), Katherine (Escocia), Ghada (Egipto), Sutaporn (Tailandia), Malcom (Australia), Rebecca (USA), Dave (Canada-Espana), Brad (Brithis Columbia), Tricia y Saskia (Nova Scotia), Veronica (Ontario), Martin y Josh (New Brunkswik), Jenn (Quebec) y Simon y Katherine(PEI).

A Stacey y Russell por abrirme su casa y recibirme como una hija más en su familia.

A Tricia por ser una gran amiga y hacer posibles muchos de mis deseos durante mi estadía en Canada.

A Elia y Chris por ser uno de los pocos ángeles que se han cruzado en mi vida

A Sutaporn y su familia por mostrarme lo maravilloso que es su país Tailandia.

A todas las personas que de alguna u otra forma me ayudaron a superar la peor de mis crisis, en especial a Chiquis por el acompañamiento y los buenos consejos que siempre me diste.

A mis amigos Katherine, Lizeth, Diana, Ed, Jairo y Johan por haberme apoyado y aguantado durante todo este proceso. A los soles infinitas gracias por siempre estar ahí, en las buenas y en las malas, en la tristeza y en las alegrías, en la salud y en la enfermedad... (como cuando te casas) y por ser MRLF.

A Chiquis creo que eres la persona con el record de más lecturas realizadas a todo este documento, mil gracias por tus invaluable aportes y correcciones, eres grande.

A Victor por su nobleza, amor y todo el apoyo y soporte que me brindo en la última parte de este tan largo proceso.

Finalmente a quiero agradecer a mi familia, no existen las palabras para expresar todo lo que ellos representan para mi. Gracias por darme todo el amor, la alegría y la comprensión, sin su apoyo jamás hubiese sido posible ser la persona que soy hoy en día. Son lo más preciado que tengo.

Resumen

Con el fin de ampliar el potencial de aplicación del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* de la Isla de Providencia (Caribe Sur Occidental), se aislaron e identificaron nueve compuestos: las pseudopterosinas PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU y 3-O-acetil-PsU y las seco-pseudopterosinas: seco-PsJ y seco-PsK, a los cuales junto con la mezcla en equilibrio de diterpenos no glicosidados (MEDNG aislada de *P. elisabethae* de la Isla de San Andrés) se les determinó un perfil citotóxico mas completo contra cinco líneas celulares humanas (HeLa (cáncer cervical), PC-3 (cáncer de próstata), HCT116 (cáncer colorectal), MCF-7 y BJ (fibroblastos normales de piel)) y se les determinó por primera vez la actividad antimicrobiana contra cuatro microorganismos patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*). Los resultados mostraron que todas las sustancias evaluadas presentaron una citotoxicidad moderada no selectiva, en donde las PsQ y PsG fueron los compuestos más activos (GI50 5.8 μ M-12.0 μ M). Con respecto a la actividad antimicrobiana todos los compuestos mostraron una buena y selectiva actividad contra las bacterias Gram-positivas, siendo las PsU, PsQ, PsS, seco-PsK y PsG los compuestos mas activos contra *S. aureus* (IC50 2.9–4.5 μ M) y las PsG, PsU y seco-PsK contra *E. faecalis* (IC50 3.1–3.8 μ M).

Paso seguido en la línea de prospección propuesta se hizo necesario buscar la producción sustentable (suministro) de estos compuestos de modo que se pudiera disponer de cantidades apreciables de ellos para seguir con los procesos de evaluación clínica y posterior aplicación industrial. Teniendo en cuenta que en los últimos años, crecientes evidencias han implicado a los microorganismos simbióticos como la fuente biosintética de diferentes metabolitos aislados de a partir de una gran variedad de invertebrados marinos, en el presente trabajo se caracterizó por primera vez para un octocoral de agua superficial a nivel mundial, la comunidad bacteriana asociada con *P. elisabethae* de la Isla de Providencia (considerando que ella pudiera ser la verdadera responsable de la producción de los compuestos tipo Ps y seco-Ps), empleando métodos dependientes (cultivo en diferentes medios de las diluciones del homogeneizado y del raspado de la superficie de muestras del octocoral) e independientes de cultivo (pirosecuenciación de los 16S rDNA y DGGE). Como resultado se lograron aislar e identificar 40 bacterias pertenecientes a las clases Bacilli (15 cepas), Actinobacteria (12 cepas), Gammaproteobacteria (9 cepas), Alphaproteobacteria (3 cepas) y Betaproteobacteria (1 cepa). Los resultados de los análisis independientes de cultivo de

la comunidad bacteriana total asociada con tres individuos de *P. elisabethae* reveló que la comunidad bacteriana se compone de 12 *phyla*, de los cuales Proteobacteria (54.06% a 86,39%) fue el *phylum* más abundante seguido de Bacteroidetes (1.98% a 2.68%), Cyanobacteria (0.27% a 4.54%), Actinobacteria (0.49% a 1,15%) y Firmicutes (0.15% a 0.20%). Gammaproteobacteria fue la clase más abundante (46.80% a 80.03%), seguido por Alphaproteobacteria (4.34% a 6.61%), Cyanobacteria (0.27% a 4.54%) y Sphingobacteria (0.92% a 2.55%). *Pseudomonas* spp. y *Sphingobacter* spp. fueron identificados como los filotipos más abundantes. Adicionalmente, considerando que la comunidad bacteriana simbiote total asociada a *P. elisabethae* está compuesta principalmente por bacterias Gram-negativas y que además las Ps y seco-Ps aisladas de este mismo octocoral presentaron una actividad selectiva contra las bacterias Gram-positivas, se planteó la hipótesis de que estos compuestos podrían tener un posible papel ecológico controlando químicamente los organismos que se asientan (*fouling*) en la superficie del octocoral. Para comprobar lo anterior se evaluó la capacidad de los compuestos aislados para inhibir el crecimiento y formación del *biofilm* bacteriano de seis cepas aisladas de superficies marinas cubiertas con *fouling*, como un indicador de su actividad *antifouling*, así como también la actividad antimicrobiana de estos compuestos contra las bacterias aisladas de la superficie del propio octocoral. Los resultados mostraron que las Ps y seco-Ps modulan el crecimiento bacteriano (inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram-positivas e induciendo la asociación a superficies de las bacterias Gram-negativas). Así, por primera vez se da soporte experimental al posible papel de estas sustancias en la selección de los organismos asociados a la superficie de *P. elisabethae* y la regulación de la composición de la comunidad bacteriana simbiótica del octocoral, lo cual puede estar relacionado con el hecho de que *P. elisabethae* mantenga una superficie limpia, libre del crecimiento de micro- y macro*fouling* excepto por sus propios microorganismos simbiotes. Por otro lado vale la pena resaltar que a partir de los resultados obtenidos por primera vez en este trabajo para la actividad antimicrobiana de las Ps y seco-Ps contra bacterias aisladas de superficies con *fouling*, se amplía el potencial de aplicación de estas sustancias como agentes *antifouling*. Adicionalmente, teniendo en cuenta que la mayoría de agentes *antifouling* conocidos no son efectivos contra algunas especies bacterianas y diatomeas, las Ps y seco-Ps como agentes capaces de controlar la formación de comunidades bacterianas se convierte en una solución para potencializar diferentes tratamientos contra el problema del *fouling*.

Finalmente, para evaluar la capacidad de las bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae* para producir compuestos químicos (entre ellos Ps y seco-Ps) bioactivos o no bioactivos se realizó un *screening* químico y un *screening* biológico de los productos de cultivo de las 40 bacterias aisladas en este trabajo, en cuatro medios diferentes. Para ello se planteó una nueva metodología que permitió la miniaturización de los cultivos por triplicado (5.0 mL) en cuatro medios diferentes, junto con la extracción en fase sólida empleando la resina diaion HP-20 y el uso de la tecnología UPLC-MS de como herramienta química para la detección rápida de compuestos producidos (*screening* químico) por las 40 bacterias, logrando determinar que ninguna de las bacterias

estudiadas es capaz de producir compuestos tipo Ps, seco-Ps y compuestos relacionados en las condiciones de cultivo empleadas. Sin embargo, mediante el análisis de los resultados de UPLC-MS empleando el software Xcalibur™ del equipo se logró obtener una librería de 46 compuestos producidos por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes, para los cuales haciendo uso de la base de datos Antibase 2007™ como herramienta de derreplicación se sugiere la estructura de 10 de ellos: amicoumacina A, amicoumacina B, cloroxantomicina, 3-acetoamido-3-deoxi-beta-D-glucopiranos, ansamitocina PDM-0, bruceantarina, bruceantina, pyloricidina D, AI-77-D y ansamitocina PDM-4. Por su parte, el screening biológico de los extractos del cultivo de las 40 bacterias en los cuatro medios, se utilizó como herramienta para determinar la producción de sustancias con actividad biológica por parte de alguna de las bacterias en un medio de cultivo determinado. Para ello los extractos fueron evaluados *contra* *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*. Los resultados mostraron que todas las bacterias son fuente de compuestos con actividad antibiótica contra al menos un microorganismo ensayado. En donde la mayoría de Actinobacterias, cuando fueron cultivadas en el medio B, producen sustancias capaces de inhibir el crecimiento de *E. faecalis* y *S. aureus*, mientras que cuando fueron cultivadas en TSB, solo presentaron actividad contra *S. aureus*. Por el contrario ninguno de los extractos de este grupo presentó una considerable actividad contra *P. aeruginosa* ni contra *C. albicans*. Por su parte el grupo de bacterias Firmicutes cuando fueron cultivadas en medios bajos en nutrientes (MMB y NB/10) produjeron sustancias con actividad contra *C. albicans*. Finalmente, las Proteobacterias fueron capaces de producir sustancias con actividad contra *S. aureus* y *C. albicans* cuando fueron cultivadas en los medios E1, MMB y NB-IO, mientras que su cultivo en el medio TAK parece favorecer la producción de sustancias con actividad contra *E. faecalis*. De este primer análisis se pudo seleccionar los extractos de las bacterias y los medios de cultivo que presentaron los mejores resultados de actividad antimicrobiana y finalmente, seleccionar dos Actinobacterias *Brevibacterium casei* y *Brachybacterium conglomeratum* para realizar su escalamiento a un litro de cultivo. Posteriormente, los extractos del cultivo de estas dos bacterias fueron sometidos a un fraccionamiento bioguiado, el cual permitió encontrar las fracciones responsables de la actividad antimicrobiana mostrada por cada uno de los extractos. Sin embargo, debido a la poca cantidad obtenida de dichas fracciones no se pudo continuar con su estudio para poder identificar los compuestos presentes en ellas.

Palabras Claves: Bioprospección, productos naturales marinos, ecología química, *screening* químico y biológico, *Pseudopterogorgia elisabethae*, comunidad bacteriana asociada con *P. elisabethae*, pseudopterinas, seco-pseudopterinas, actividad citotóxica, antimicrobiana y antifouling.

Abstract

The goal of this research was to expand the potential application of the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* of Providencia Island (southwest Caribbean Sea). In the present work, nine compounds were isolated and identified. The pseudopterins: PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU and 3-O-acetil-PsU and the *seco*-pseudopterins: *seco*-PsJ and *seco*-PsK, together with the inter-converted mixture of non-glycosylated diterpenes (IMNGD isolated from *P. elisabethae* of San Andres Island) their anti-microbial profiles were screened for the first time against four pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*). Also reported is a more complete cytotoxic profile against five human cells lines (HeLa, PC-3, HCT116, MCF-7 and BJ). For the cytotoxic profiles, all compounds evaluated showed moderate and non-selective activity against both tumor and normal cell lines, where PsQ and PsG were the most active compounds (GI50 values between 5.8 μ M to 12.0 μ M). With respect to their anti-microbial activity the compounds showed good and selective activity against the Gram-positive bacteria, while they did not show activity against the Gram-negative bacterium or yeast. PsU, PsQ, PsS, *seco*-PsK and PsG were the most active compounds (IC50 2.9–4.5 μ M) against *S. aureus* and PsG, PsU and *seco*-PsK showed good activity (IC50 3.1–3.8 μ M) against *E. faecalis*.

To continue with the bio-prospecting proposal it became necessary to seek sustainable production (supply) of these compounds so that there would be appreciable amounts to continue with the process of clinical evaluation and subsequent industrial application. Therefore, it was endeavoured to characterize the composition of the bacterial community associated with Colombian *P. elisabethae*, as a growing body of evidence has implicated symbiotic microorganisms as the biosynthetic source of metabolites isolated from a variety of marine invertebrates. Eventual identification of a bacterium capable of producing Ps and *seco*-Ps would open a biotechnological route to the production of these promising metabolites. To characterize the bacterial community associated with *P. elisabethae* from Providencia Island, both culture dependent (dilution plating of homogenized octocoral onto a variety of agar media) and culture independent (pyrosequencing of 16S rDNA amplicons and DGGE) approaches were employed. Culture dependent analysis resulted in the identification of 40 unique bacteria classified as Bacilli (15 strains), Actinobacteria (12 strains), Gammaproteobacteria (9 strains), Alphaproteobacteria (3 strains) and Betaproteobacteria (1 strain). Culture independent analysis of the bacterial communities associated with three *P. elisabethae* individuals revealed that the bacterial communities were composed of 12 phyla of which Proteobacteria (54.06% to 86.39%) was the most abundant followed by Bacteroidetes (1.98% to 2.68%), Cyanobacteria (0.27% to 4.54%), Actinobacteria (0.49% to 1.15%) and Firmicutes (0.15% to 0.20%). Gammaproteobacteria was the most abundant class (46.80% to 80.03%) followed by Alphaproteobacteria (4.34% to 6.61%), Cyanobacteria (0.27% to 4.54%) and Sphingobacteria (0.92% a 2.55%). *Pseudomonas* spp. and

Spongiobacter spp were identified as the most abundant phylotypes associated with *P. elisabethae*. To the best of our knowledge this is the first characterization of the bacterial diversity associated with *P. elisabethae* collected from Colombian waters. Additionally, these results showed that the bacterial community associated with *P. elisabethae* is composed principally by Gram-negative cells and also that Ps and *seco*-Ps showed selective activity against eukaryotic and prokaryotic cells. It was hypothesized that these compounds may have a potential ecological role by chemically controlling the organisms settling on (fouling) the surface of octocoral. Therefore, their activity against bacteria associated with heavily fouled marine surfaces was evaluated as an indicator of antifouling activity. Additionally, their activity against the normal microbiota of *P. elisabethae* was assessed to determine whether they played a role on the octocoral surface. So, with experimental support, it has shown the possible ecological role of these substances for the first time, where the Ps and *seco*-Ps seem to modulate bacterial growth (inhibiting Gram-positive bacterial growth and inducing Gram-negative bacteria association with surfaces). This might suggest a role as chemical modulators of epibiosis on the surface of *P. elisabethae*. These results suggest that Ps and *seco*-Ps might have a role in the selection of organisms associated with the octocoral surface and in the regulation of the symbiotic bacterial community composition, which might be related to the clean surface of *P. elisabethae*. On the other hand, according to the antimicrobial activity of the Ps and *seco*-Ps against bacteria isolated from fouling surfaces, it is possible to extend the potential application of these substances as antifouling agents. Also, due to the fact that most known antifouling agents are not effective against bacterial and diatom species, the Ps and *seco*-Ps can be combined with existing antifouling agents to increase their potential applications.

Finally, to assess the ability of cultivable bacteria associated with *P. elisabethae* to produce chemical compounds (including Ps and *seco*-Ps) bioactive or non-bioactive, chemical and a biological screening of the substances produced by the 40 bacteria in four different media was carried out. This gave rise to a new methodology that allowed the miniaturization of triplicate cultures (5.0 mL) in four different media. Along with solid phase extraction using Diaion resin HP-20 and the use of UPLC-MS technology as a chemical tool for rapid screening of compounds produced (chemical screening). Using this methodology it was determined that none of the 40 bacteria studied is capable of producing Ps, *seco*-Ps or either related compounds in the culture conditions used. However, through the analysis of UPLC-MS chromatograms using the equipment software (Xcalibur™) a library of 46 compounds produced by 14 bacteria of the *phylum* Firmicutes was developed. Using the database Antibase2007™ as a dereplication tool, the structure of 10 of these compounds were identified as: amicoumacin A, amicoumacin B, cloroxantomicin, 3-deoxy-3-acetoamide-beta-D-glucopyranose, ansamitocin PDM-0, bruceantarin, bruceantin, pyloricidin D, AI-77-D and ansamitocin PDM-4. Additionally, a biological screening was done to determine the production of antibiotics for the 40 bacteria in the four media. The extracts of the cultures were evaluated against *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. The results showed that all the bacteria

isolated were sources of compounds with antibiotic activity, since all the extracts showed activity against at least one microorganism tested. Most of the Actinobacteria, when they were cultured in medium B, produced substances capable of inhibiting the growth of *E. faecalis* and *S. aureus*, whereas when they were grown in TSB the extracts just showed activity against *S. aureus*. In contrast none of the extracts from this group presented a significant activity against *P. aeruginosa* or *C. albicans*. The group of Firmicutes bacteria, when they were grown in low in nutrient media (MMB and NB/10), produced substances with activity against *C. albicans*. Finally, the Proteobacteria were able to produce substances with activity against *S. aureus* and *C. albicans* when they were grown in the media E1, MMB and NB-IO, while when they were cultured in TAK seemed to favor production of substances with activity against *E. faecalis*. From this first analysis it was possible to select the extracts (bacteria and culture media) that showed the best antimicrobial activity and finally, two Actinobacteria: *Brevibacterium casei* and *Brachybacterium conglomeratum* were selected to scale up to 1 liter of culture. Both extracts underwent a bioassay guided fractionation in order to find the fractions responsible for antimicrobial activity. However, due to the small amount of material obtained from such fractions the structural identifications of the compounds present in the fractions was not performed.

Keywords: Bioprospection, marine natural products, chemical ecology, chemical screening, biological screening, *Pseudopterogorgia elisabethae*, bacterial community associated with *P. elisabethae*, pseudopterogins, *seco*-pseudopterogins, cytotoxic, antimicrobial and antifouling activities.

Contenido

	Pág.
Resumen	XI
Lista de Figuras	XXIII
Lista de Tablas	XXVII
Lista de Símbolos y Figuras	XXIX
Introducción	1
1. Estado del arte	4
1.1. Bioprospección (valoración y aprovechamiento) de recursos marinos	4
1.2. <i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> como fuente de sustancias con actividad biológica explotable	6
1.3. Estado actual de la investigación de <i>P. elisabethae</i> en Colombia	10
1.4. Problemas de suministro (<i>supply</i>) y alternativas de producción de la biomasa	12
1.5. ¿Son los microorganismos simbiotes de algunos invertebrados marinos los verdaderos productores de compuestos farmacológicamente importantes?	15
1.5.1. De bacterias simbiotes	16
1.5.2. De microalgas simbiotes	20
1.5.3. De hongos simbiotes	21
1.6. Métodos para la producción de Ps y seco-Ps	22
1.7. Nuestra propuesta	23
2. Resultados y Discusión	26
2.1. Aislamiento e identificación de los compuestos mayoritarios de la fracción polar de <i>P. elisabethae</i>	26
2.1.1. Aislamiento de los compuestos mayoritarios de la fracción polar de <i>P. elisabethae</i>	27
2.1.2. Identificación de las Ps glicosidadas con fucosa (PsG, PsP, PsQ y PsS)	30

2.1.3.	Identificación de las Ps glicosidadas con arabinosa (PsT, PsU y 3-O-acetil-PsU)	35
2.1.4.	Identificación de las seco-Ps (seco-PsJ y seco-PsK)	37
2.2.	Ampliación del potencial de aplicación de las Ps y seco-Ps	41
2.2.1.	Actividad citotóxica de las Ps, seco-Ps y MEDNG contra líneas celulares humanas	41
2.2.2.	Actividad antimicrobiana de las Ps, seco-Ps y MEDNG contra microorganismos patógenos	43
2.3.	Determinación de la composición de la comunidad bacteriana asociada con <i>P. elisabethae</i>	47
2.3.1.	Caracterización de la comunidad bacteriana cultivable asociada con <i>P. elisabethae</i> por métodos dependientes de cultivo	48
2.3.2.	Caracterización de la comunidad bacteriana total asociada con <i>P. elisabethae</i> por métodos independientes de cultivo	57
2.4.	Evaluación de las Ps y seco-Ps como agentes moduladores del microfouling marino	71
2.4.1.	Efecto de las Ps y seco-Ps en la colonización bacteriana (microfouling)	73
2.4.1.1.	Actividad antibacterial contra bacterias asociadas con superficies marinas con <i>fouling</i>	73
2.4.1.2.	Actividad inhibitoria de la formación de biofilm	74
2.4.2.	Influencia de las Ps y seco-Ps en la composición de la comunidad bacteriana asociada con la superficie de <i>P. elisabethae</i>	77
2.4.2.1.	Comparación de los datos obtenidos para la comunidad bacteriana total asociada con <i>P. elisabethae</i> establecida por pirosecuenciación (Sección 2.3.2) y por FISH (Zorro, 2011)	78
2.4.2.2.	Actividad de las Ps y seco-Ps contra las bacterias cultivables asociadas con <i>P. elisabethae</i>	82
2.5.	Evaluación de la capacidad de las bacterias cultivables asociadas con <i>P. elisabethae</i> para producir compuestos químicos (bioactivos o no bioactivos)	86
2.5.1.	Cultivo miniaturizado de las 40 bacterias cultivables asociadas con <i>P. elisabethae</i> y extracción de los productos	88
2.5.2.	Screening de los compuestos químicos productos de cultivo de las bacterias cultivables asociados con <i>P. elisabethae</i>	89
2.5.2.1.	Detección de la producción de las Ps, seco-Ps y compuestos relacionados en los extractos de cultivo de las 40 bacterias cultivables asociados con <i>P. elisabethae</i> usando UPLC-MS	90
2.5.2.2.	Análisis de los compuestos presentes en los extractos de cultivo de 14 bacterias del <i>phylum</i> Firmicutes usando UPLC-MS e identificación por derreplicación con Antibase 2007TM	95
2.5.3.	Screening biológico de los productos de cultivo de las bacterias cultivables asociadas con <i>P. elisabethae</i>	107
2.5.3.1.	Actividad antimicrobiana de los extractos del cultivo de las bacterias simbiotes de <i>P. elisabethae</i>	107

2.5.3.2.	Escalamiento del cultivo y fraccionamiento bioguiado de los extractos de las Actinobacterias <i>Brevibacterium casei</i> (RKHC-66A) y <i>Brachybacterium conglomeratus</i> (RKHC-33)	113
3.	Conclusiones y Recomendaciones	117
4.	Parte experimental	123
4.1.	Recolección y tratamiento de <i>P. elisabethae</i>	123
4.2.	Aislamiento y elucidación estructural de Ps y seco-Ps a partir de <i>P. elisabethae</i>	125
4.3.	Actividad biológica de las Ps y seco-Ps aisladas de <i>P. elisabethae</i>	127
4.3.1.	Actividad citotóxica contra líneas celulares de humanos	127
4.3.1.1.	Líneas celulares	127
4.3.1.2.	Actividad citotóxica por MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio)	127
4.3.2.	Actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos	128
4.3.2.1.	Cepas microbianas y medios de cultivo	128
4.3.2.2.	Actividad antimicrobiana por microdilución	128
4.3.3.	Análisis estadístico	129
4.4.	Determinación de la composición de la comunidad bacteriana asociada con <i>P. elisabethae</i>	130
4.4.1.	Aislamiento y caracterización de la comunidad bacteriana cultivable	130
4.4.1.1.	Aislamiento de las bacterias cultivables	130
4.4.1.2.	Identificación de las bacterias cultivables por secuenciación del gen 16S rRNA	130
4.4.2.	Caracterización de la comunidad bacteriana total	132
4.4.2.1.	Extracción y purificación del DNA genómico (gDNA) empleado en bTEFAP y DGGE	132
4.4.2.2.	Pirosecuenciación por bTEFAP (bacterial tag-encoded FLX-Titanium amplicon pyrosequencing)	133
4.4.2.3.	Análisis de la diversidad bacteriana de las librerías de 16S rDNA	133
4.4.2.4.	Identificación de las 10 especies más abundantes de cada una de las librerías de 16S rDNA	134
4.4.2.5.	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE)	135
4.4.2.6.	Hibridización <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH) (Tomado de Zorro P, 2011).	136
4.5.	Evaluación de las Ps y seco-Ps como agentes moduladores del <i>microfouling</i> marino	137
4.5.1.	Efecto de las Ps y seco-Ps en la colonización bacteriana (<i>microfouling</i>)	137
4.5.1.1.	Bacterias asociadas con superficies marinas con <i>fouling</i>	137
4.5.1.2.	Ensayo antibacterial de difusión en agar con sensidiscos contra bacterias asociadas con superficies marinas con <i>fouling</i>	137
4.5.1.3.	Ensayo de inhibición de <i>biofilm</i>	137

4.5.2. Influencia de las Ps y seco-Ps en la composición de la comunidad bacteriana asociada con la superficie de <i>P. elisabethae</i>	139
4.5.2.1. Bacterias cultivables asociadas con la superficie de <i>P. elisabethae</i>	139
4.5.2.2. Ensayo antibacterial de difusión en agar con sensidiscos contra las bacterias cultivables asociadas con <i>P. elisabethae</i>	140
4.5.3. Análisis estadístico	140
4.6. Evaluación de la capacidad de las bacterias cultivables asociadas con <i>P. elisabethae</i> para producir compuestos químicos (bioactivos o no bioactivos)	141
4.6.1. Bacterias simbioses y preinóculo	141
4.6.2. Condiciones de cultivo de las bacterias cultivables asociadas con <i>P. elisabethae</i>	141
4.6.3. Extracción de los productos de cultivo de las bacterias cultivables asociadas con <i>P. elisabethae</i>	143
4.6.4. <i>Screening</i> de los compuestos químicos como productos de cultivo de las bacterias cultivables asociados con <i>P. elisabethae</i>	143
4.6.4.1. Análisis por UPLC-MS	143
4.6.4.2. Detección de las Ps y seco-Ps y compuestos relacionados en los extractos de los cultivos	144
4.6.4.3. Detección e identificación de otros compuestos producidos por 14 bacterias del <i>phylum</i> Firmicutes y construcción de una librería utilitaria de compuestos	145
4.6.5. <i>Screening</i> biológico de los productos de cultivo de las bacterias cultivables asociadas con <i>P. elisabethae</i>	146
4.6.5.1. Actividad antimicrobiana como herramienta para la selección de cepas que producen sustancias con actividad antimicrobiana	146
4.6.5.2. Escalamiento del cultivo y extracción de los productos de cultivo de dos <i>Actinobacterias</i> <i>Brachybacterium conglomeratus</i> (RKHC-33) y <i>Brevibacterium casei</i> (RKHC-66A)	147
4.6.5.3. Fraccionamiento bioguiado del cultivo de un litro de las bacterias <i>Brachybacterium conglomeratus</i> (RKHC-33) y <i>Brevibacterium casei</i> (RKHC-66A)	148

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Estructuras de las Ps y seco-Ps aisladas a partir de especímenes de <i>P. elisabethae</i> del Caribe Norte	8
Figura 1-2: Compuestos aislados de <i>P. elisabethae</i> recolectado en la Isla de San Andrés y Providencia (Caribe Sur-Occidental)	11
Figura 1-3: Compuestos producidos por bacterias asociadas con invertebrados marinos	17
Figura 1-4: Compuestos producidos por microalgas asociadas con invertebrados marinos	20
Figura 1-5: Pestalona, compuesto químico producido por hongos simbioses de invertebrados marinos	22
Figura 2-1: Perfil cromatográfico (CLAE-EM) de la fracción polar del extracto crudo de <i>P. elisabethae</i> recolectado en la Isla de Providencia. Columna Thermo Hyper-Keystone C-18, con un sistema isocrático acetonitrilo/agua (7:3), 0.2 mL/min	28
Figura 2-2: Perfil cromatográfico (Combiflash) de la FPST obtenida del fraccionamiento inicial de <i>P. elisabethae</i> recolectado en la Isla de Providencia. Columna RediSep DIOL (150 g) con un gradiente continuo de polaridad empezando con hexano 100% (Solvente A) hasta MeOH 100% (solvente B) en 30 minutos, con un flujo de 85 mL/min	28
Figura 2-3: Espectro de masas en modo APCI de los compuestos 1-9 aislados a partir de <i>P. elisabethae</i> (Caribe Sur-Occidental)	31
Figura 2-4: Estructura química de las Ps y seco-Ps (Compuestos 1-9) aisladas de <i>P. elisabethae</i> de la Isla de Providencia (Caribe Sur-Occidental)	39
Figura 2-5: Árboles filogenéticos de las bacterias cultivables asociadas con <i>P. elisabethae</i> , basado en las secuencias de 16S rDNA. A. Actinobacteria, B. Firmicutes, C. Proteobacteria. Los dendrogramas fueron inferidos usando el método de Neighbor-Joining	54
Figura 2-6: I. Composición taxonómica a nivel de orden de la comunidad bacteriana total asociada con <i>P. elisabethae</i> , de las tres librerías de 16S rDNA estimada por pirosecuenciación. Secuencias "Unclassified" no pudieron ser clasificadas dentro de ningún phylum, orden o clase conocido. II. Perfiles por DGGE de secuencias parciales de 16S rDNA obtenidas a partir del gDNA de los tres individuos	61
Figura 2-7: Curvas de rarefacción a nivel de clase 15% y especie 3%, del	

- número de OTUs observados vs. el número de secuencias identificadas en las librerías de 16S rDNA de la comunidad bacteriana total asociada con tres individuos (A, B y C) de *P. elisabethae* estimado por pirosecuenciación 63
- Figura 2-8:** Efecto de las Ps y seco-Ps aisladas de *P. elisabethae* sobre el crecimiento y la formación de biofilm de *A. P. putida* IsoF y bacterias marinas Gram-negativas asociadas con superficies con *fouling* y B. Bacterias marinas Gram-positivas asociadas con superficies con *fouling* 76
- Figura 2-9:** Composición taxonómica de la comunidad bacteriana total asociada con *P. elisabethae* (Caribe Sur-Occidental) A. Promedio del porcentaje de la composición de las librerías bTEFAP del 16S rDNA de tres individuos de *P. elisabethae*. “Bacteria no clasificadas” secuencias que no pudieron ser clasificadas dentro de ninguno de los *phyla* conocidos y “Proteobacteria no clasificadas” secuencias que no pudieron ser clasificadas dentro de ninguna clase de Proteobacteria. B. Promedio del porcentaje del número de células bacterianas detectadas por FISH usando sondas específicas para Eubacteria (EUB338), Alphaproteobacteria (ALF443), Gammaproteobacteria (GAM42a) y Betaproteobacteria (BET42a) 79
- Figura 2-10:** Micrografías de epifluorescencia de las bacterias presentes en la superficie de los fragmentos de *P. elisabethae* (Caribe Sur-Occidental). Las células fueron visualizadas usando sondas de FISH para Eubacteria (EUB338-Verde), Alphaproteobacteria (ALF443-Azul), Gammaproteobacteria (GAM42a-Rojo) y Betaproteobacteria (BET42a-Amarillo). Panel A. Células hibridizadas con las sondas EUB338 (verde) y ALF443 (azul) Panel B. Células hibridizadas con las sondas EUB338 (verde) y GAM42a (Rojo). Panel C. Células hibridizadas con la sonda BET42a (amarillo) y Panel D. Células hibridizadas con la sonda EUB338 (verde) 81
- Figura 2-11:** Modelo del posible mecanismo de defensa antifouling de *P. elisabethae* (Caribe Sur-Occidental) a través de las Ps y seco-Ps 85
- Figura 2-12:** Propuesta de fragmentación de compuestos tipo Ps y seco-Ps y de los diterpenos no glicosidados MEDNG bajo EM de Ionización química en modo APCI 93
- Figura 2-13:** Análisis UPLC-MS de un estándar de PsT, un estándar de seco-PsJ y del extracto del cultivo de la bacteria *Jeotgalicoccus aerulatos* (RKHC-28) en medio MB, replica 1. A: TIC (Total Ion Chromatogram) del estándar de la PsT. B: RIC (Reconstructed Ion Chromatogram) del ión en m/z 301 de estándar de la PsT. C: TIC del estándar de la seco-PsJ. D: RIC del ión en m/z 303 del estándar de la seco-PsJ. E: TIC del extracto del cultivo de *J. aerulatos* (RKHC-28). F: RIC del ión en m/z 301 del cultivo de *J. aerulatos* (RKHC-28). G: RIC del ión en m/z 303 del cultivo de *J. aerulatos* (RKHC-28) 94
- Figura 2-14:** Análisis UPLC-MS de los productos de cultivo de la bacteria *Bacillus firmus* (RKHC-13) en MB. A: Perfil cromatográfico (detectores PDA, ELSD y MS) de los productos de cultivo. B. Espectro de masas en modo APCI del compuesto 16 con tiempo de retención 4.37 min con un ión [M+H]⁺ en m/z 491.2.

- C. Espectro de masas en modo APCI del compuesto con tiempo de retención 5.24 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 373.3. D. Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la cantidad de sustancia 16 con tiempo de retención 4.37 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 491.2. E. Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la cantidad de sustancia con tiempo de retención 5.24 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 373.3. Medios $n=3$, Bacterias: 14 cepas junto con el control del medio sin inocular y metanol como blanco de solvente 99
- Figura 2-15:** Estructuras propuestas para 10 de los compuestos encontrados en la librería de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbiotes del octocoral *P. elisabethae* (Caribe Sur-Occidental) 104
- Figura 2-16:** Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la producción selectiva de algunas sustancias presentes en la librería. A. Compuesto 25 con tiempo de retención 5.74 min y un ión $[M+H]^+$ en m/z 853.4 producido únicamente por la bacteria *Bacillus pumilus* (RKHC-57) en varios medios. B. Compuesto 14 con tiempo de retención 4.13 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 425.3 producido por las bacterias *Bacillus pumilus* (RKHC-57) y *Bacillus mojavenis* (RKHC-37) en varios medios. Medios $n=3$, Bacterias: 14 cepas junto con el control del medio sin inocular y metanol como blanco de solvente 105
- Figura 2-17:** Actividad antimicrobiana de los extractos de los cultivos de las 40 bacterias en cuatro medios diferentes. A. Para las Actinobacterias los medios B, MMB, TAK y TSB. B. Para las Firmicutes los medios MB, MMB, NB/10 y TAK. C. Para Proteobacteria los medios E1, MMB, NB-IO y TAK 108
- Figura 4-1:** Área de recolección de *P. elisabethae* en la Isla de Providencia, Caribe Sur-Occidental. El sitio de recolección fue El planchon ($13^{\circ}24'0''N$ y $81^{\circ}23'0''W$). Figura tomada de Puyana et al., 2004 124
- Figura 4-2:** Esquema de fraccionamiento bioguiado del extracto del cultivo de un litro de la bacteria *Brachybacterium conglomeratus* (RKHC-33) 149
- Figura 4-2:** Esquema de fraccionamiento bioguiado del extracto del cultivo de un litro de la bacteria *Brevibacterium casei* (RKHC-66A) 153

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Datos de RMN ¹ H (600 MHz) obtenidos para las PsG, PsP, PsQ y PsS y comparación con los reportados en la literatura (500 MHz) (Duque <i>et al.</i> , 2004)	34
Tabla 2-2: Datos de RMN ¹ H (600 MHz) obtenidos para las PsT, PsU y 3-O-acetil-PsU y comparación con los datos reportados en la literatura (500 MHz) (Duque <i>et al.</i> , 2004, Correa, 2007)	35
Tabla 2-3: Datos de RMN ¹ H (600 MHz) obtenidos para las <i>seco</i> -PsJ y <i>seco</i> -PsK y comparación con los reportados en la literatura (500 MHz) (Duque <i>et al.</i> , 2006; Correa, H., 2005)	38
Tabla 2-4: Actividad citotóxica de las Ps, <i>seco</i> -Ps y la MEDNG aisladas de <i>P. elisabethae</i> (Caribe Sur-Occidental) contra líneas tumorales humanas (HeLa, PC-3, HCT116, MCF-7) y células normales (BJ)	43
Tabla 2-5: Actividad antibacteriana de las Ps, <i>seco</i> -Ps y la MEDNG aisladas de <i>P. elisabethae</i> (Caribe Sur-Occidental) contra dos bacterias Gram-positivas	44
Tabla 2-6: Porcentaje de similitud y distancia Kimura 2 parámetros de las 40 bacterias cultivables asociadas con <i>P. elisabethae</i> comparada con las especies más similares encontradas en la base de datos	50
Tabla 2-7: Composición, riqueza y diversidad de las comunidades bacterianas totales asociadas con tres individuos de <i>P. elisabethae</i> (A , B y C), estimadas por las librerías de 16S rDNA de pirosecuenciación	60
Tabla 2-8: Las 10 más numerosas OTUs de la comunidad bacteriana total asociada con tres individuos de <i>P. elisabethae</i> (A , B y C) identificadas en las librerías de 16S rDNA de pirosecuenciación	66
Tabla 2-9: Actividad antibacteriana de las Ps and <i>seco</i> -Ps aisladas de <i>P. elisabethae</i> , contra seis bacterias asociadas con superficies marinas con <i>fouling</i> (<i>A. lacunosa</i> y <i>Donax</i> sp.)	74
Tabla 2-10: Actividad antibacteriana de la fracción FPST (Mezcla de Ps y <i>seco</i> -Ps) aislada de <i>P. elisabethae</i> contra las bacterias cultivables asociadas con la superficie de <i>P. elisabethae</i>	83
Tabla 2-11: Base de datos de los estándares de Ps, <i>seco</i> -Ps y compuestos relacionados con su respectivo tiempo de retención por UPLC-MS (TR), peso molecular (PM) y los iones diagnósticos observados en su espectro de masas en modo APCI	91
Tabla 2-12: Librería de compuestos (10-55) detectados como productos de cultivo en los medios MB, TAK, MMB y NB/10 de 14 bacterias cultivables del <i>phylum</i> Firmicutes asociadas con <i>P. elisabethae</i> (Caribe Sur-Occidental)	100
Tabla 2-13: Los 10 extractos (bacteria y medio de cultivo) más activos contra cada uno de los microorganismos evaluados <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>C. albicans</i> y <i>P. aeruginosa</i> en el <i>sreening</i> biológico	111

Tabla 2-14: Lista de la bacterias cuyos extractos en los diferentes medios presentaron las mejores actividades antimicrobianas	112
Tabla 4-1: Actividad antimicrobiana contra MRSA, VRE y <i>C. albicans</i> de los extractos del cultivo y de las fracciones obtenidas a partir del cultivo de un litro de la bacteria <i>B. conglomeratum</i> (RKHC-33)	150
Tabla 4-2: Actividad antimicrobiana contra MRSA, VRE y <i>C. albicans</i> de los extractos del cultivo y de las fracciones obtenidas a partir del cultivo de un litro de la bacteria <i>B. casei</i> (RKHC-66A)	154

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
5-LO	5-lipooxigenasa
Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
APCI	Ionización química a presión atmosférica
B	Caldo B
BJ	Fibroplastos normales de la piel
<i>brd</i>	Doblete ancho
<i>brs</i>	Singlete ancho
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficiencia
CLAE-EM	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas
COX	Ciclooxigenasa
<i>d</i>	Doblete
d.i.	Diámetro interno
<i>dd</i>	Doble doblete
DMEM	Medio Dulbecco modificado de Eagle
DMSO	Dimetilsulfoxido
DO	Densidad óptica
<i>dt</i>	Doble triplete
E1	Caldo E1
E.S	Error estándar
EM	Espectrometría de masas
EtOH	Etanol
FBS	Suero fetal bovino
FDA	Food and Drug Administration
GGDP	Geranil-geranil-difosfato
GI ₅₀	Inhibición del crecimiento en 50%
HBSS	Solución salina buferizada de Hanks
HCT 116	Cáncer colorectal
HeLa	Cáncer cervical
HRESIMS	<i>High resolution electrospray mass spectrometry</i>
HSV	Virus de herpes simple
HVMV	Citomegalovirus
<i>Hz</i>	Hertz
IC ₅₀	Concentración para inhibir el 50% del crecimiento

IE	Ionización por impacto electrónico
IND	Investigational New Drug
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LB	Caldo Luria-Bertani
LPS	Lipopolisacárido
<i>m</i>	multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MB	Caldo marino
MCF-7	Cáncer de mama
Me	Metilo
MEDNG	Mezcla en equilibrio de diterpenos no glicosidados
MeOH	Metanol
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MMB	Caldo minimo marino
MPO	Mieloperoxidasa
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-bromuro de tetrazolido
NB/10	Caldo nutritivo dilución a diez
NB-IO	Caldo nutritivo con <i>Instant Ocean</i> al 50%
NCI-H460	Cáncer de pulmón
PBS	Solución salina fosfatada
PC-3	Cáncer de próstata
PLA2	Fosfolipasa A2
PMNs	Polimorfonucleares neutrofilos
Ps	Pseudopterosina
RMN	Espectroscopia de resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
<i>s</i>	Singlete
SCUBA	<i>Self contained underwater breathing apparatus</i>
SD	Medio Sabouraud-Dextrosa
<i>seco</i> -Ps	<i>seco</i> -pseudopterosina
<i>sext</i>	Sextete
SF-268	Cáncer del sistema nervioso central
<i>t</i>	Triplete
TAK	Caldo Takashi
TMS	Trimetilsililo
TPA	Tetradecanoilforbol acetato
TSB	Caldo digerido de soya y caseína
TXB2	Tromboxano
UPLC-MS	Cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas
UV/Vis	Ultravioleta visible
VZV	Virus de varicela Zoster
δ	Desplazamiento (RMN)
λ	Longitud de onda

Introducción

El mar es actualmente uno de los mayores centros de atención, para muchos científicos, debido a la gran diversidad de especies presentes en él, y por ende el incentivo hacia la gran cantidad de sustancias químicas que ellos contienen, la gran mayoría hasta ahora desconocidas pero que pueden llegar a tener interesantes actividades biológicas explotables por el hombre. Desde 1975, se han diferenciado tres áreas de estudio de los productos naturales marinos (Faulkner, 2000): toxinas, ecología química y biomedicinas marinas; siendo este último el que mayor auge ha tenido, debido a la variedad de organismos marinos fuente de compuestos bioactivos, por ejemplo microorganismos, algas, medusas, anémonas de mar, tunicados, esponjas, moluscos, ascidias y corales.

Por las razones anteriormente mencionadas, nuestro grupo de investigación "Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia" ha venido trabajando en el estudio y posible aprovechamiento de invertebrados marinos colombianos. Entre los principales logros del grupo, se cuenta el haber establecido el potencial económico (con base en la composición química-actividad biológica) de cerca de 80 especies de esponjas marinas, de algunas especies de equinodermos y del gorgonáceo *Pseudopterogorgia elisabethae* de San Andrés y Providencia. Nuestros resultados relacionados con esta última especie han establecido que ella es un excelente recurso, fuente de diterpenos glicosidados tipo pseudopterosinas (Ps) y seco-pseudopterosinas (seco-Ps), descubriendo nuevas pseudopterosinas (PsP-PsV) y seco-pseudopterosinas (seco-PsK) (Correa 2005, 2007; Duque *et al*, 2006), nunca antes reportadas en este organismo pero de distintas localidades geográficas.

Estos compuestos mostraron en nuestros experimentos *in vivo* e *in vitro*, excelentes propiedades antiinflamatorias (Correa 2007 y Correa *et al*, 2009), hecho que las convierte en excelentes candidatas para su explotación económica, trabajo el cual es parte de la línea de bioprospección de nuestro grupo, en donde se busca descubrir recursos biológicos con fines comerciales. Sin embargo, los trabajos anteriormente mencionados apenas forman parte de las primeras etapas del proceso bioprospectivo, aún es necesario ampliar el potencial de aplicación de las Ps y seco-Ps como sustancias con otras actividades biológicas tales como citotóxica y antimicrobiana, razón por la cual paso seguido será necesario buscar la producción sostenible de estos compuestos para avanzar en la implementación de los procesos que hagan posible su aplicación comercial.

En varias revisiones en la literatura química, se observa que a pesar del gran potencial de algunos productos naturales marinos aislados de un sin número de macroorganismos, existe una oferta limitada de muchos de ellos, lo cual se convierte en un gran obstáculo en la transformación de estas sustancias en una entidad comercial. Por ejemplo algunos de estos compuestos fueron encontrados en cantidades tan bajas del orden de μg por kg de tejido. En otros casos el organismo productor vive en lugares de difícil acceso, implicando una limitada disponibilidad del macroorganismo y por ende resulta en niveles extremadamente bajos de suministro (*supply*), lo cual repercute negativamente en su desarrollo como producto comercial.

Aunque el problema de suministro se reconoció hace más de diez años y si bien se han logrado algunos avances desde entonces, a través de la implementación de algunas técnicas tradicionales de síntesis y semisíntesis química, fermentación, cultivo celular,

maricultura (cultivo en condiciones naturales), acuicultura (cultivo en condiciones artificiales) y la clonación de genes biosintéticos, es claro que sigue siendo necesario el desarrollo de nuevos y variados métodos de suministro, sin llegar a perjudicar a la especie ni a la supervivencia del ecosistema.

Específicamente para el caso de *P. elisabethae* varios de los anteriores métodos han sido explorados para la posible producción sustentable de las Ps y seco-Ps; por ejemplo, la síntesis de algunos de ellos realizada por el profesor E. Corey, quien fue el pionero en la obtención exitosa de Ps y seco-Ps y de sus agliconas (Corey y Carpino, 1989; Corey y Lazerwith, 1998), trabajos que además se convirtieron en la base para la revisión de la estereoquímica de la mayoría de estas sustancias. Otra técnica alternativa para la síntesis de las Ps ha sido la catálisis enzimática, con ayuda de enzimas extraídas de *P. elisabethae* (Kohl *et al.*, 2003a; 2003b). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento nadie está aplicando ninguno de los dos procedimientos anteriores como fuente sustentable de estas sustancias, debido a que el primero es un método costoso y con bajo rendimiento y el segundo debido a que hasta el momento no ha sido caracterizada la enzima responsable de la biosíntesis de estos compuestos.

En contraste, la maricultura está siendo aplicada con éxito para la obtención de extractos semipurificados de *P. elisabethae* ricos en Ps y seco-Ps en las Islas Bahamas, país que ejerce un control especial en la recolección de colonias con el fin de mantener la viabilidad del recurso. Sin embargo, este método tiene como mayor limitante el lento crecimiento del octocoral, lo que conlleva a tener niveles de oferta muy por debajo de los niveles de demanda.

Para el caso de Colombia hemos excluido como método de obtención sustentable de estos compuestos la maricultura debido a que nuestros estudios han demostrado que las densidades poblacionales de estos organismos en las localidades de San Andrés y Providencia son bajas y no resistirían explotación (Puyana *et al.*, 2004). De igual forma la síntesis tal como se mencionó anteriormente es un método difícil de llevar a cabo, debido a que estos compuestos presentan por lo menos cuatro centros quirales, lo que hace que estas reacciones sean procesos largos e e inviábiles debido a su alto costo.

Lo considerado anteriormente exige una solución en la cual se necesita implementar la producción de conocimiento científico y tecnológico que sirva de soporte para la solución del problema del suministro de *P. elisabethae*.

Recientemente en la literatura, se han encontrado reportes en los cuales se ha establecido que en algunos macroorganismos, los responsables de la producción de compuestos con actividad biológica con interés para el hombre son los organismos simbiotes. Algunos ejemplos relevantes son entre otros el caso del briozoo *Bugula neritina* productor del macrólido briostatina, potente agente anticáncer comercial, en el cual se ha establecido que es en realidad su bacteria simbiote *Candidatus Endobugula serluta* quien produce el metabolito bioactivo (Davidson *et al.*, 2001). También vale la pena mencionar el descubrimiento de la bacteria *Vibrio* sp., la cual produce la kahalalida F, agente anticáncer muy próximo a ser aprobado como droga comercial, esta kahalalida F fue aislada inicialmente del molusco *Elysia rufescens* (Hill *et al.*, 2007).

Posible solución al problema de suministro de *P. elisabethae* de la Isla de Providencia

Como una posible solución para el suministro rentable de las Ps y *seco*-Ps aisladas por nosotros, propusimos estudiar si estos compuestos son producidos por el simbiote, como parece sugerirlo la diferente composición química encontrada en animales de diferentes localidades del Caribe, y luego por vía biotecnológica cultivar controladamente los microorganismos responsables de su producción, lo cual es obviamente muchísimo más sencillo y económico de hacer.

Entonces en la primera parte del presente trabajo se propuso para ampliar el potencial de aplicación de *P. elisabethae*, recolectar el organismo en la Isla de Providencia y extraer los compuestos con solventes, purificarlos por cromatografía e identificarlos por espectroscopía y luego evaluar su citotoxicidad frente a líneas celulares tumorales con el método del MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), y determinar su actividad antimicrobiana usando el método de microdilución y difusión en agar con sensidiscos frente a bacterias patógenas.

En la segunda parte, con el fin de intentar encontrar una solución al problema de suministro de estos compuestos se propuso por primera vez en el ámbito científico, estudiar los simbioses bacterianos de este octocoral a través de la caracterización por métodos dependientes e independientes de cultivo. Para ello el DNA genómico total extraído de *P. elisabethae* recolectado en la Isla de Providencia, sirvió como base para la amplificación del gen 16S rRNA, y posteriormente la realización de la secuenciación parcial de los amplicones por pirosecuenciación y el estudio por DGGE. Adicionalmente, fragmentos de *P. elisabethae* homogeneizados en buffer fosfato (PBS) junto con un aislamiento con hisopo de las bacterias epifíticas, fueron sembrados en placas de agar, con el fin de aislar la mayor cantidad de bacterias cultivables en condiciones de laboratorio, dichas bacterias fueron caracterizadas morfológica y filogenéticamente por métodos moleculares estudiando la secuencia del gen ribosomal 16S rRNA.

Finalmente, para identificar los compuestos que producen las bacterias aisladas de *P. elisabethae*, éstas se cultivaron diferencialmente y se analizaron por CLAE-EM (APCI) (*screening* químico) para detectar la producción de Ps, *seco*-Ps, o compuestos estructuralmente relacionados, u otro tipo de sustancias. Con el fin de ampliar el potencial de aplicación de dichas bacterias simbioses se propuso realizar un *screening* biológico, el cual determina cuales de ellas producen compuestos con actividad antimicrobiana contra cuatro organismos patógenos, y posteriormente hacer el escalamiento del cultivo de dos bacterias con fin de realizar un fraccionamiento bioguiado en busca de los compuestos o el compuesto responsable de la actividad detectada.

1. Estado del Arte

1.1 Bioprospección (valoración y aprovechamiento) de recursos marinos

El mar es actualmente uno de los mayores centros de atención, para muchos científicos, debido a la gran diversidad de especies presentes en él, y por ende el incentivo hacia la gran cantidad de sustancias químicas que ellos contienen, la gran mayoría hasta ahora desconocidas pero que pueden llegar a tener interesantes actividades biológicas explotables por el hombre. Es por eso que los productos naturales marinos han venido jugando desde hace unos 40 años un papel muy importante en el descubrimiento de sustancias con estructuras químicas novedosas la mayoría de las veces sin contraparte terrestre, de las cuales algunas de ellas se han venido convirtiendo en nuevas drogas o en prototipos para el desarrollo de nuevas drogas o en sustancias importantes para otros fines industriales (Faulkner, 2002; Blunt *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta lo anterior, el estudio de los organismos marinos con el objetivo de aislar estos compuestos, elucidar su estructura, determinar su actividad biológica o uso aprovechable por el hombre, y luego iniciar los desarrollos industriales para su aprovechamiento después de haber resuelto el problema del suministro, es sin ninguna duda, un camino interesante para hacer una exploración responsable de estos recursos marinos por parte de los investigadores de productos naturales. Todo este proceso es conocido como bioprospección de recursos marinos (valoración y aprovechamiento de recursos marinos) el cual incluye también la presentación de patentes, desarrollo de estudios estructura-actividad para incrementar la actividad encontrada y finalmente la aprobación del compuesto por las instituciones nacionales e internacionales encargadas de vigilar su inclusión como drogas, insecticidas, herbicidas, alimentos nutracéuticos, perfumes, pinturas...etc. en el mercado.

Si bien las investigaciones en la química de productos naturales marinos es un campo relativamente joven (1970-a la fecha), ya hay entre los más de 18.000 compuestos marinos aislados (Faulkner, 2002; Mayer *et al.*, 2010; Blunt *et al.*, 2011), numerosos productos que están en el mercado e.g. algunas drogas antivirales como Ara A, comercializada por Glaxo Smith Kline, y AraC comercializada por Pharmacia; drogas anticáncer como AraC y Yondelis™, producida y comercializada para Europa por Pharmamar (filial del grupo Zeltia) y comercializada en Estados Unidos por Johnson y Jonnson; drogas contra el dolor como Prial™ aprobada por la FDA y por la Comisión Europea, y comercializada en Europa por Eisai; aditivos (mezcla de pseudopterosinas) en cremas cosméticas comercializadas por Estée Lauder; suplementos nutritivos (Formulaid™); reactivos en Biología Molecular, etc. (Pomponi, 1999; Proksch *et al.*, 2002; Proksch *et al.*, 2003; Newman *et al.*, 2003; Kijjoa y Sawangwong, 2004; Newman y Cragg, 2004; Newman y Cragg, 2007; Butler, 2008, Newman y Cragg, 2010; Mayer *et al.*, 2010). Vale la pena mencionar que existen también numerosas patentes particularmente en los países desarrollados, protegiendo la propiedad y el futuro de muchos compuestos marinos y que están a la espera del momento y oportunidad adecuados para su explotación.

También algunos de los compuestos de origen marino han mostrado actividades insecticidas, herbicidas y antifúngicas convirtiéndose en excelentes candidatos para ser transformados en agentes agroquímicos (Peng *et al.*, 2003). De igual forma el campo de productos naturales marinos como principios activos de recubrimientos antifouling que no sean ajenos al ambiente del cual fueron obtenidos, es una perspectiva reciente que bien vale la pena ser explorada (Omae, 2003; Yebra *et al.*, 2004; Fusetani, 2011; Qian *et al.*, 2010).

Aunque cada una de estas clases de bio-productos representa un potencial de multi-billones de dólares en el mercado mundial, en Colombia es poco lo que se ha hecho a pesar del esfuerzo que algunos pocos investigadores han venido haciendo. Así, por la importancia científica y económica del tema para nuestro país, en el presente trabajo se mostrará un modelo de estudio de bioprospección realizado en nuestro país con el

octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* del Caribe Sur-Occidental, con el fin de ampliar el potencial de aplicación de algunos de sus compuestos, así como también la búsqueda de una fuente alterna y renovable para la producción sustentable de dichas sustancias.

1.2 *Pseudopterogorgia elisabethae* como fuente de sustancias con actividad biológica explotable

Uno de los *phyla* con mayor diversidad presente en el mar es el Cnidaria, incluye cerca de 10 mil especies, distribuidas en aproximadamente 1125 géneros, siendo así uno de los más diversos del subreino Metazoa. La mayoría de estos organismos viven en el mar, sin embargo, se han encontrado algunos hidroides de agua dulce. Los cnidarios se dividen en seis clases principales (Coll, 1992), entre ellos la clase octocoralia ha hecho un aporte importante al desarrollo de nuevas drogas (Faulkner, 2002; Blunt *et al.*, 20011). Los organismos pertenecientes a esta clase están ampliamente distribuidos en la mayoría de hábitat marinos tropicales y subtropicales de la región del Caribe y del Atlántico Occidental, constituyendo cerca del 38% de toda su fauna conocida, con cerca de 195 especies documentadas. Uno de los órdenes más representativos de esta clase en las Costas e Islas colombianas, son los gorgonáceos, dentro de los cuales se encuentra el género *Pseudopterogorgia*, el cual lo componen organismos sésiles coloniales de estructura relativamente frágil, y dependiendo de la especie pueden estar constituidos por cientos o miles de individuos modulares (pólipos) (Coll, 1992).

Una de estas especies, la pluma de mar *Pseudopterogorgia elisabethae* muy común en la fauna caribeña, es un organismo marino ampliamente estudiado, actualmente existe un gran número de publicaciones sobre la sorprendente quimiodiversidad de esta especie.

Para realizar una búsqueda exhaustiva sobre el tema, se recurrió a varias fuentes de información entre ellas: SciFinder, Chemical Abstrac Service (CAS-online), la base de datos Marinlit y el Natural Product Reports (NPR), encontrando cerca de un centenar de artículos relacionados con el género *Pseudopterogorgia* y alrededor de cincuenta artículos específicamente sobre la especie *Pseudopterogorgia elisabethae*. Esta especie ha sido fuente de más de 100 diferentes compuestos, la mayoría de origen terpénico,

(aislados de especímenes de distintas localidades del Caribe), los cuales pueden clasificarse de acuerdo al esqueleto terpénico que poseen. Entre los compuestos aislados de *P. elisabethae* se destacan las pseudopterosinas (Ps) y las seco-pseudopterosinas (seco-Ps), no solo por el tipo de esqueleto que poseen sino también por su excelente actividad biológica.

La potente y selectiva actividad terapéutica de las Ps y seco-Ps hasta ahora aisladas del octocoral *P. elisabethae* y el alto grado de variedad química de los especímenes recolectados en diferentes lugares de la región del Caribe (Heckrodt y Mulzer., 2005; Marrero *et al.*, 2010), han motivado a varios autores a investigar en este campo de estudio. Hasta lo que se sabe, 30 pseudopterosinas (PsA-Y, *iso*-PsE, 2-O-acetil-PsQ, 3-O-acetil-PsQ, 2-O-acetil-PsU y 2-O-acetil-PsQ) (Look *et al.*, 1986; Roussis *et al.*, 1990; Ata *et al.*, 2003; Ata *et al.*, 2004; Duque *et al.*, 2004, 2006; Puyana *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004; Hoarau *et al.*, 2008) y 11 seco-pseudopterosinas (*seco*-PsA-K) (Look y Fenical, 1987; Ata *et al.*, 2003; Puyana *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004; Ferns y Kerr, 2005; Duque *et al.*, 2006) (Figuras 1-1 y 1-2) han sido aisladas a partir de muestras recolectadas en Las Bahamas, Bermudas, cayos de la Florida y en las islas colombianas de San Andrés y Providencia.

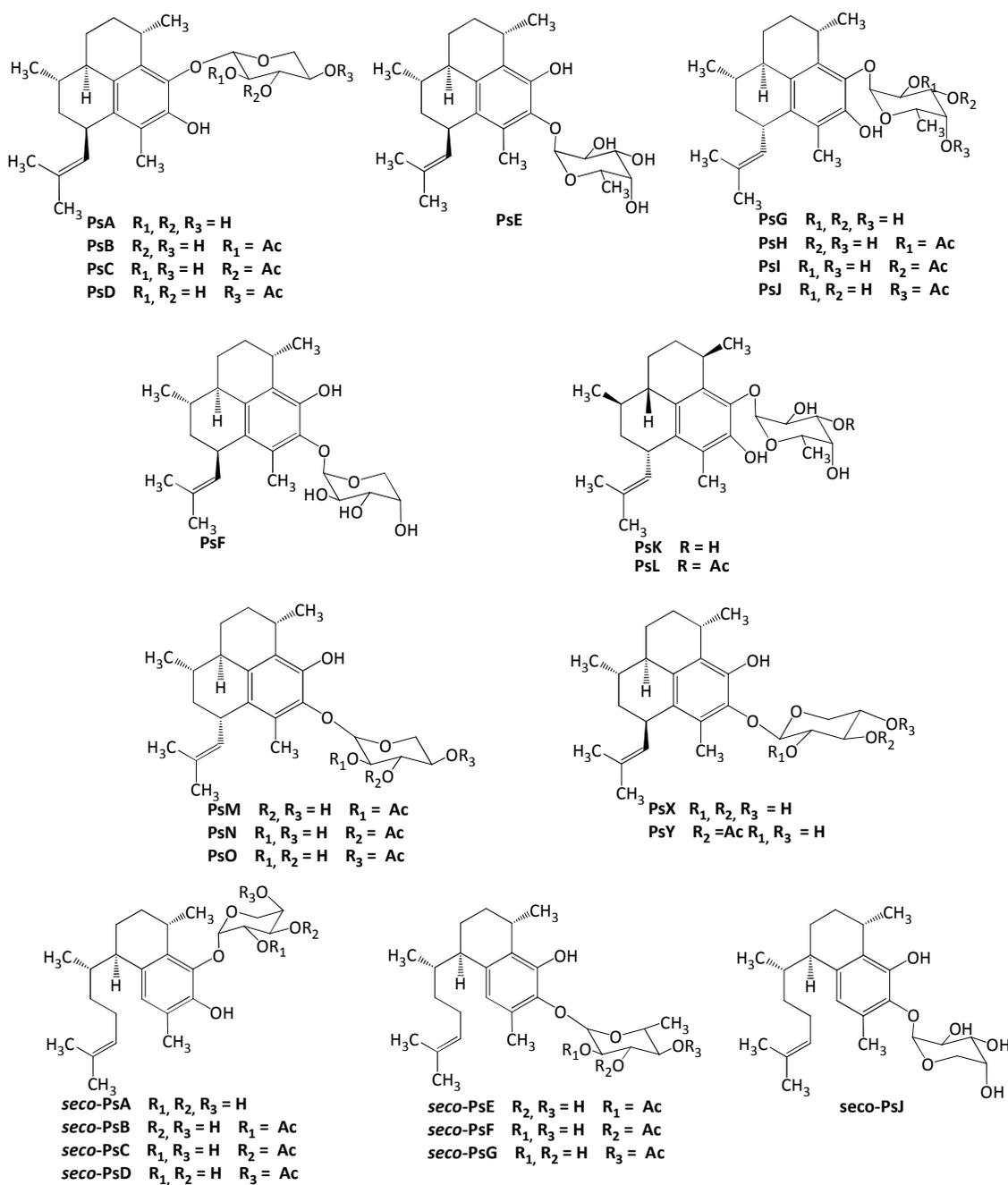


Figura 1-1. Estructuras de Ps y seco-Ps aisladas a partir de especímenes de *P. elisabethae* del Caribe Norte

Las PsA-D, PsE, *iso*-PsE, PsM-O, PsX, PsY y *seco*-PsA-G (Figura 1-1) aisladas de muestras de octocoral recolectadas en el norte del Mar Caribe (Las Bahamas, Bermudas y cayos de la Florida) han sido evaluadas como agentes anti-inflamatorios, analgésicos y antimicrobianos (Look *et al.*, 1986; Look y Fenical, 1987; Roussis *et al.*, 1990; Ata *et al.*,

2003; Ata *et al.*, 2004; Heckrodt y Mulzer., 2005; Hoarau *et al.*, 2008;). Entre ellas, las PsN, PsA, *iso*-PsE y PsE, mostraron ser las más potentes en el ensayo anti-inflamatorio de edema auricular de ratón (Look *et al.*, 1986; Roussis *et al.*, 1990; Ata *et al.*, 2003; Hoarau *et al.*, 2008). Además, ha sido demostrado que la PsA y la PsE evitan la biosíntesis de eicosanoides por inhibición de PLA2 (fosfolipasa A2), 5-LO (5-lipooxigenasa) y COX (ciclooxigenasa), la degranulación de los leucocitos y la consecuente liberación de enzimas lisosomales (Potts y Faulkner., 1992; Mayer *et al.*, 1998). Adicionalmente, las PsA-E, PsK, PsX, PsY y *seco*-PsA-D mostraron una excelente y selectiva actividad contra las bacterias Gram-positivas *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (Look y Fenical, 1987; Ata *et al.*, 2004).

Además de las actividades antes mencionadas, extractos semipurificados, ricos en estos compuestos, son usados como aditivos para prevenir la irritación causada por la exposición al sol, en cosméticos para el rostro de la firma Estée Lauder en un producto llamado Resilience[®], el cual tiene gran éxito comercial gracias a su alta eficacia (Faulkner, 2000; Haefner, 2003; Kijoa y Sawanwong, 2004). Este hecho ha generado una gran demanda del organismo, la cual se estima del orden de 30 a 45 toneladas anuales, por parte de la industria cosmética. Sin embargo, en la actualidad la oferta de material animal sólo proviene de las islas de Las Bahamas, país que ejerce un control especial en la recolección de colonias con el fin de mantener la viabilidad del recurso. Actualmente el precio de la crema a base de extracto semipurificado de coral (50 mL) oscila entre US\$ 80-100 (Precios 2011).

Adicionalmente, las PsA-D, fueron licenciadas a una pequeña firma, OsteoArthritis Sciences Inc., para uso medicinal como potencial droga anti-inflamatoria, la cual completó los ensayos preclínicos de un derivado de la PsA, llamado metopterosina (OAS1000), un potente compuesto anti-inflamatorio, inhibidor de la síntesis de leucotrieno B₄, el cual fue incluido como una IND (Investigational New Drug) por la FDA (U.S. Food and Drug Administration) y hoy día se encuentra en fase de experimentación en humanos para dermatitis irritante de contacto (Faulkner, 2000; Haefner, 2003; Kijoa y Sawanwong, 2004; Gross y König, 2006; Marrero *et al.*, 2010).

1.3 Estado actual de la investigación de *P. elisabethae* en Colombia

Con respecto a los especímenes de *P. elisabethae* recolectados en el Caribe Sur-Occidental, específicamente en las Islas de San Andrés y Providencia (Colombia), éstos son fuente de varias sustancias nuevas: las PsP-V, 2-O-acetil-PsQ, 3-O-acetil-PsQ, 2-O-acetil-PsU, 2-O-acetil-PsQ, *seco*-PsH-K, una mezcla en equilibrio de diterpenos no-glicosidados (10-acetoxi-9-hidroxi- y 9-acetoxi-10-hidroxi-amfilecta-8,10,12,14-tetraenos (MEDNG), y los diterpenos elisabetatrienol y amfilecta-8(13), 11, 14-trieno-9-10-diona, así como también son fuente de algunas sustancias conocidas: las PsG, PsK, amfilectosinas A y B y *seco*-PsJ (Duque *et al.*, 2004, 2006; Puyana *et al.*, 2004) (Figura 1-2). Sin embargo, sólo a un número limitado de estos compuestos se les ha evaluado su potencial como agentes anti-inflamatorios (Correa *et al.*, 2009), anti-tuberculosis, antivirales, anti-malaria y anticáncer (Rodríguez *et al.*, 2004).

En lo que respecta a su actividad anti-inflamatoria, nuestros experimentos mostraron que las fracciones enriquecidas con las PsG, PsK, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, *seco*-PsJ y *seco*-PsK fueron capaces de inhibir la inflamación inducida *in vivo* por el acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA) en el ensayo de edema auricular de ratón, con resultados comparables a los mostrados por la indometacina utilizada como fármaco de referencia (Correa *et al.*, 2009). Además, en experimentos *in vitro*, las PsQ, PsS, PsT, PsU y MEDNG mostraron una buena actividad en la inhibición de la liberación de mieloperoxidasa (MPO): las PsP, PsT y MEDNG inhibieron la liberación del radical óxido nítrico NO (Correa *et al.*, 2009) y la PsR inhibe el tromboxano B2 (TXB2) y el anión superóxido (O_2^-) (Rodríguez *et al.*, 2004).

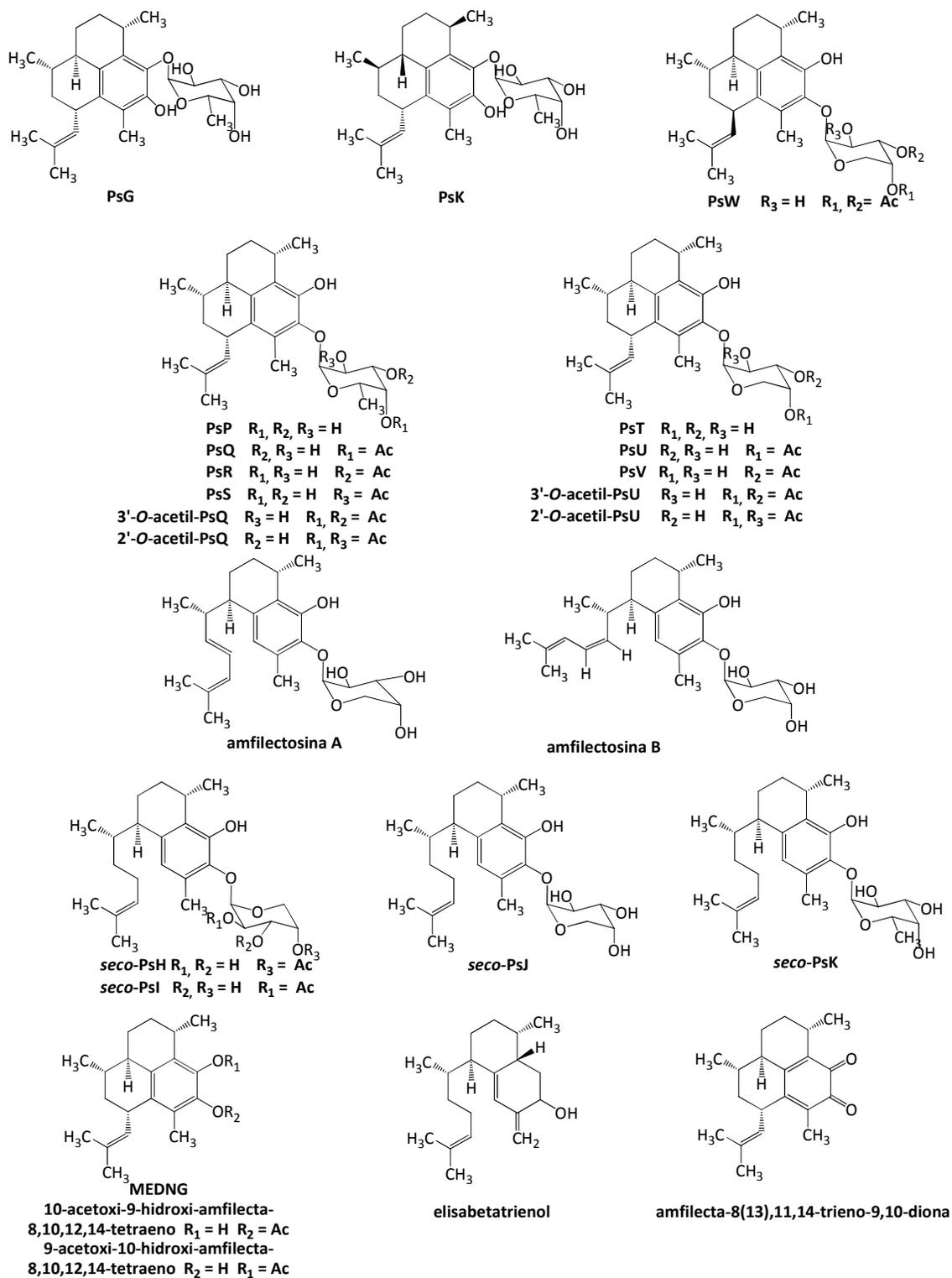


Figura 1-2. Compuestos aislados de *P. elisabethae* recolectada en las Islas de San Andrés y Providencia (Caribe Sur-Occidental)

En otros experimentos, se evaluó la actividad antiviral de la PsP contra los virus de herpes simple (HSV-1 y HSV-2), citomegalovirus (HVMV) y virus de varicela zoster (VZV), y las PsQ, PsR, PsU, PsV, *seco*-PsH y *seco*-PsI fueron evaluadas como agentes anti-maláricos (contra *Plasmodium falciparum*) y como agentes anti-tuberculosis (contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv) (Rodríguez *et al.*, 2004). Además, sólo hay un reporte acerca de la actividad citotóxica de PsQ, PsR, PsU, PsV y 3-O-acetil-PsU contra MCF-7 (cáncer de mama), NCI-H460 (cáncer de pulmón), y SF-268 (cáncer del sistema nervioso central) (Rodríguez *et al.*, 2004), estos datos sugieren que algunas de las Ps evaluadas presentaron actividad citotóxica, pero con poca potencia.

Sin embargo, aunque estas investigaciones han demostrado que el octocoral *P. elisabethae* de Colombia es un recurso altamente promisorio en cuanto a fuente de compuestos bioactivos, el cual sería deseable explotar, se hace importante terminar la fase de bioprospección correspondiente a la caracterización desde el punto de vista de la actividad biológica, completando los ensayos de actividad citotóxica y evaluando la actividad antimicrobiana y antifouling de las Ps y *seco*-Ps, con el fin de determinar de manera más amplia su posible aplicación en la industria farmacéutica, cosmética y de pinturas. No obstante, para poder continuar con las fases posteriores de la bioprospección se necesita entonces disponer de material suficiente que suministre la biomasa necesaria para seguir con éxitos las etapas posteriores del inicio de los desarrollos industriales para su aprovechamiento.

1.4 Problemas de suministro (*supply*) y alternativas de producción de biomasa

La brecha entre el potencial y la aplicación de un compuesto con actividad biológica explotable está directamente limitada por la disponibilidad del recurso marino, es por eso que a pesar del gran potencial de algunos productos naturales aislados de un sin número de macroorganismos marinos, una oferta limitada de muchos de ellos representa un importante obstáculo en su transformación a una entidad comercial (Proksch y Ebel, 2002; Newman y Hill, 2006). Por ejemplo, algunos de estos compuestos han sido encontrados en el orden de µg por kg de tejido, en otros casos el organismo productor vive en sitios bastantes inaccesibles (limitada disponibilidad del macroorganismo),

resultando en niveles extremadamente bajos de suministro (*supply*), lo cual repercute negativamente en su desarrollo como producto comercial (Carter, 2002). Aunque en algunos casos se disponga de las cantidades suficientes para realizar todas las pruebas preclínicas y clínicas de un compuesto con potencial biomédico, previo a su comercialización, es obvio que las cantidades de biomasa necesarias para la comercialización como medicamento de la sustancia con interés farmacológico obtenida de esponjas, tunicados u otro invertebrado, jamás podrá ser conseguido directamente del ambiente natural (Proksch y Ebel 2002).

Algunas opciones para la utilización sostenible de los recursos marinos han sido la síntesis química, la maricultura o acuicultura del organismo fuente del compuesto, el cultivo de células del macroorganismo o microorganismo de origen, la clonación molecular y biosíntesis en un organismo sustituto. Cada una de estas opciones tiene sus ventajas y limitaciones, no todos los métodos son aplicables en todos los casos, además la mayoría de estos métodos están todavía en desarrollo, es por eso que la comprensión de la bioquímica de las vías fundamentales por las que se sintetizan las sustancias de interés es clave para la aplicación de la mayoría de estas técnicas (Carter, 2002).

La síntesis química fue uno de los primeros métodos implementados para la obtención sustentable de sustancias, sin embargo, solamente puede ser aplicado de manera eficiente en la producción de moléculas sencillas en las cuales su síntesis no involucre reacciones arduas, como es el caso de la síntesis de moléculas con varios centros quirales, en las cuales es necesario diseñar e implementar de manera eficiente reacciones estereoselectivas. Otro método que surgió a la par fue la semisíntesis, la cual es aplicada en la obtención de la molécula de interés a partir de un precursor sintético; en la mayoría de casos este precursor sintético es obtenido de una fuente natural renovable, como es el caso de la droga comercial Yondelis® (trabectedina), denominado ET-743 durante su desarrollo, el cual es un agente antitumoral obtenido originalmente del tunicado marino *Ecteinascidia turbinata* (Pharmamar, 2008) y que en la actualidad se produce semisintéticamente a partir de la cianosafracina B obtenida por cultivo celular de una bacteria del género *Pseudomonas* (Cuevas *et al.*, 2009).

La maricultura es un método que aprovecha la oferta natural de alimento permitiendo la regeneración espontánea del invertebrado. Hasta ahora parece ser el método más

efectivo en términos de costo y eficiencia, especialmente porque en la mayoría de los organismos, la manipulación de explantes induce una mayor biosíntesis de los metabolitos de interés (Zea y De Weerd, 1999; Hadas *et al.*, 2005), aunque todavía falta mucha investigación que permita una correcta manipulación para maximizar la producción del metabolito de interés (Osinga *et al.*, 1999; Duckworth *et al.*, 1999). No obstante, la maricultura tiene como desventaja las condiciones ambientales cambiantes que pueden en ciertos momentos afectar el desarrollo del macroorganismo (Proksch y Ebel, 2002), además del lento crecimiento de algunos de ellos.

Otro método similar a la maricultura es la acuicultura, la cual se basa en el cultivo de macroorganismos en condiciones artificiales que simulen las condiciones naturales del organismo en cultivo. La acuicultura tiene como principales ventajas: la eliminación de los depredadores; la facilidad de proporcionar a los organismos la alimentación más adecuada en cuanto a cantidad y contenido de los alimentos, lo que permite incrementar el crecimiento que es el factor clave para la rentabilidad del cultivo; y el poder intensificar la fertilidad de las especies.

Otros métodos que han empezado a surgir en los últimos años, son los métodos de ingeniería genética en los cuales se hace uso de técnicas de biología molecular como herramientas no sólo para el suministro de productos naturales (por ejemplo, a través de la identificación, el aislamiento, la clonación y la expresión de los genes que participan en la producción de los compuestos químicos), sino también el descubrimiento de nuevas fuentes de diversidad molecular (por ejemplo, a través de la identificación de los genes o vías biosintéticas de microorganismos no cultivables) (Carter, 2002).

También en años recientes se ha planteado como una nueva alternativa biotecnológica para obtener compuestos químicos bioactivos, cultivar *in vitro*, en condiciones controladas, las células responsables de su producción. Adicionalmente, estos cultivos también pueden servir como base para aislar los grupos de genes responsables de la producción de dichos metabolitos, y mediante técnicas de ingeniería genética, introducirlos en microorganismos que puedan ser cultivados y producir así los compuestos de interés a escala industrial en cámaras de fermentación. En todos los casos es importante lograr identificar cuál es el organismo (células del macroorganismo o

alguno de los microorganismos asociados) responsable de la producción del compuesto de interés, de esta manera implementar el cultivo enriquecido de las células productoras, lo cual no ha sido fácil debido al poco conocimiento que se tiene en cuanto a las relaciones entre los diferentes microorganismos y macroorganismos marinos, en gran parte porque con frecuencia los microorganismos simbióticos (bacterias, microalgas u hongos) no son fácilmente cultivables en condiciones de laboratorio. Se estima que tan solo entre el 0.1%-1.0% y en algunos casos excepcionales el 15% de la población total es cultivable (Giovannoni *et al.*, 1990).

Recientemente, se ha establecido que en algunos macroorganismos, son en realidad los simbioses quienes producen los compuestos con actividad biológica de interés para el hombre (la mayoría de invertebrados marinos viven asociados a microorganismos, incluyendo bacterias, microalgas y hongos) (Kobayashi y Ishibashi, 1993; Proksh y Ebel, 2002; Piel, 2004; Newman y Hill, 2006). Estas asociaciones simbióticas en algunos casos pueden llegar a constituir hasta el 50% de la biomasa del animal (Brantley *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1999, 2001), tal como ocurre en la esponja *Aplysina aerophoba* la cual está constituida casi en un 40% por bacterias y cianobacterias de las cuales tan solo el 1% fue cultivable en el medio estándar ZoBell (Friedrich *et al.*, 2001).

Aunque el problema de suministro es reconocido desde hace más de diez años y si bien se han logrado algunos avances desde entonces, a través de la implementación de las técnicas anteriormente mencionadas, es claro que sigue siendo necesario el desarrollo de nuevos y variados métodos de suministro que conduzcan al establecimiento de vías rentables de producción, sin llegar a perjudicar ni a la especie ni a la supervivencia del ecosistema.

1.5 ¿Son los microorganismos simbioses de algunos invertebrados marinos los verdaderos productores de compuestos farmacológicamente importantes?

Algunos ejemplos donde se han establecido simbioses de invertebrados tales como bacterias, microalgas u hongos, como los verdaderos productores de los compuestos biológicamente activos se citan a continuación.

1.5.1 De bacterias simbiotes:

Dicetopiperazinas

La esponja caribeña *Tedania ignis*, también conocida como esponja de fuego, fue objeto de estudio por primera vez en 1983 por Schmitz y colaboradores debido a la interesante actividad citotóxica *in vivo* que mostró el extracto crudo frente a tumores (Schmitz *et al.*, 1983), en este mismo estudio, se logró el aislamiento bioguiado a partir del extracto crudo de *T. ignis*, de tres dicetopiperazinas: ciclo-(L-Pro-L-Leu), ciclo-(L-Pro-L-Val) y ciclo-(Pro-Ala) (Figura 1-3). Sin embargo, aunque las tres sustancias presentaron una moderada actividad citotóxica, ésta no fue comparable con la actividad mostrada por el extracto crudo (Schmitz *et al.*, 1983). Estudios posteriores, en donde a partir del cultivo en el laboratorio de la bacteria *Micrococcus* sp., aislada del tejido de *T. ignis*, se logró el aislamiento de las sustancias arriba mencionadas, demostraron que al parecer, es la bacteria la responsable de la biogénesis de estas dicetopiperazinas (Stierle *et al.*, 1988; Kobayashi y Ishibashi, 1993; Piel, 2004).

Briostatina 1

Desde 1968 las briostatinas policétidos aisladas a partir del extracto del briozoo *Bugula neritina* han sido estudiadas debido a su importante actividad celular y potencial terapéutico (Pettit *et al.*, 1982; 1991). Actualmente, la briostatina 1 (Figura 1-3) se encuentra en fase II en ensayos clínicos, como agente citotóxico de varios tipos de cáncer (Aphios, 2008) y este briozoo es la única fuente conocida de esta familia de macrólidos. Por esta razón y porque un g de briozoo produce tan solo 7-8 µg de compuesto el aspecto del suministro es muy importante. En el futuro la demanda de este posible medicamento podrá oscilar entre 50 a 100 g por año. Actualmente, la demanda está siendo solventada gracias al desarrollo de condiciones más apropiadas del cultivo del briozoo en ambiente artificiales (Rodríguez, 2003; Dahms *et al.*, 2007). Recientemente, la empresa Calbio Marine Technologies en Carlsbad ha implementado paneles de cultivo de *B. neritina* a una profundidad entre 15-40 m como método sustentable de obtención de la briostatina (Davidson *et al.*, 2001; Rodríguez, 2003).

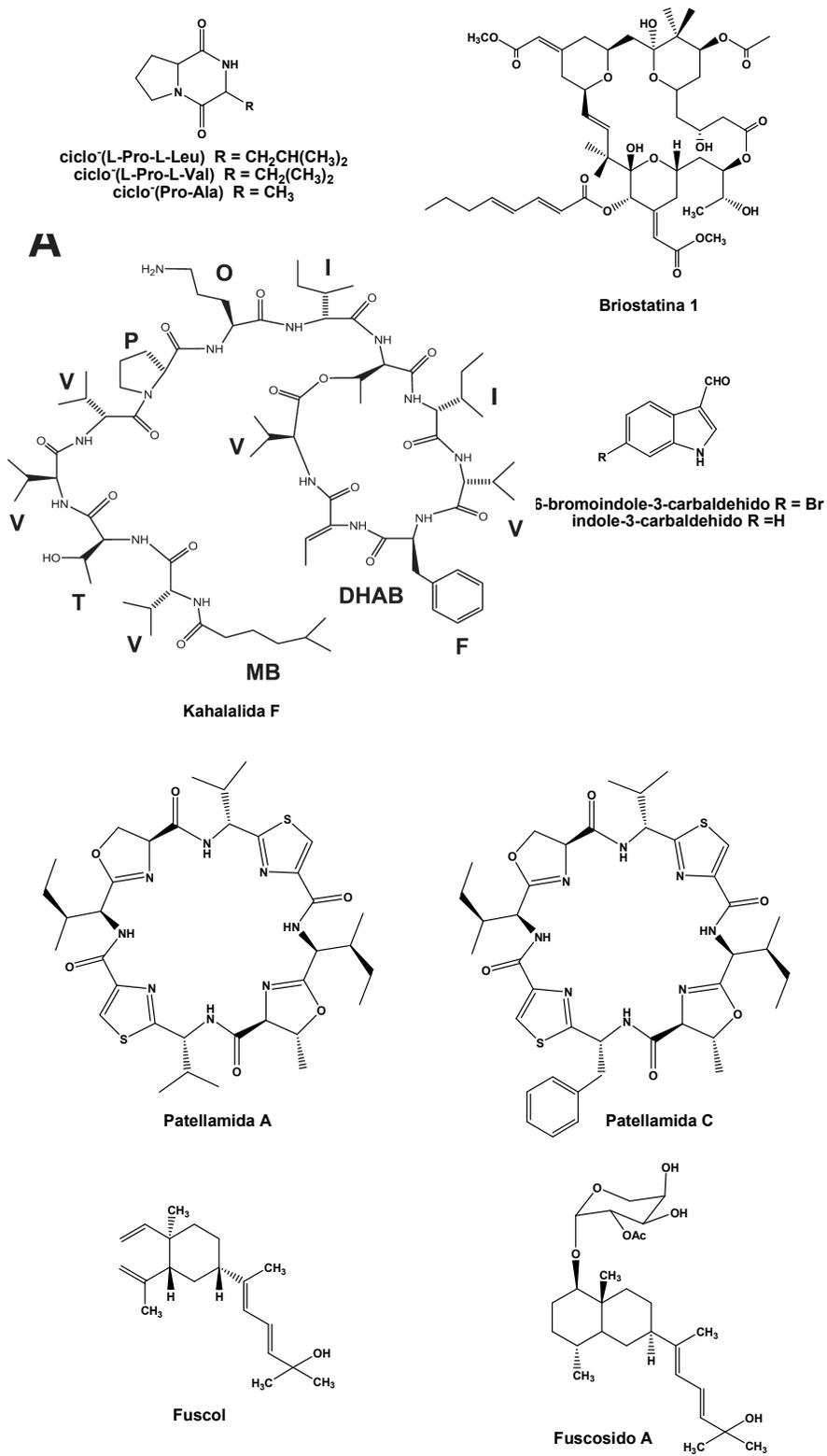


Figura 1-3. Compuestos producidos por bacterias asociadas con invertebrados marinos

En la búsqueda de métodos alternativos para la producción de la briostatina 1, Kerr y sus colaboradores demostraron que éste compuesto no era adquirido por *E. bugula* a través de la dieta (Kerr *et al.*, 1996). Estos resultados se convirtieron en el punto de partida para estudios posteriores, en donde a partir de la superficie del briozoo fue aislada la Gammaproteobacteria simbiote, *Endobugula serluta*, la cual aunque no pudo ser cultivada en el laboratorio, si se pudo atribuir la paternidad de las briostatinas por medio de un experimento sencillo en el cual cultivos de *B. neritina* fueron tratados con antibióticos, observando una disminución drástica en la producción del compuesto, indicando la participación de *E. serluta* en la producción de la briostatina (Davidson *et al.*, 2001).

Kahalalida F

Los sacoglosanos son un grupo de moluscos del orden opisthobranchia, los cuales han sido fuente de numerosos metabolitos (Blunt *et al.*, 2011; Faulkner, 2002), entre ellos el ciclodepsipeptido kahalalida F (Figura 1-3) aislado del molusco *Elysia rufescens* (Haman y Sheuer, 1993). Dicho compuesto es acumulado por el molusco para su defensa química frente a depredadores. Actualmente, la kahalalida F se encuentra en ensayos clínicos de fase II para el tratamiento de carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) y melanoma y también se está evaluando para el tratamiento de la psoriasis severa. El mecanismo de acción de dicha sustancia es que altera la función de las membranas lisosómicas e induce la muerte celular mediante oncosis, también se ha comprobado que su actividad antitumoral es independiente de la resistencia a múltiples fármacos (MDR) y del estado de la p53, además está relacionada con la expresión basal del ErbB3. (Pharmamar, 2011).

Estudios adicionales han demostrado que este metabolito es adquirido por *E. rufescens* a través de la dieta a partir de su hospedero el alga verde *Bryopsis* sp., la cual también mostró una interesante actividad antialimentaria frente a peces depredadores (Becerro *et al.*, 2001). Sin embargo, en estudios muy recientes ya se logró obtener la kahalalida F a partir de la bacteria *Vibrio* sp., aislada de *E. rufescens* demostrando que es esta bacteria la responsable de su producción (Hill *et al.*, 2007).

6-bromoindol-3-carbaldehído

La ascidia del Caribe *Stomozoa murray* se caracteriza por tener una superficie limpia de macroepibiontes, razón por la cual ha sido un organismo de partida para la búsqueda de compuestos con actividad antifouling. De esta manera Olguin-Urbe y colaboradores se dieron a la tarea de aislar los metabolitos responsables de la defensa química de *S. murray*, logrando obtener el 6-bromoindol-3-carbaldehído y su debromo derivado (Figura 1-3). Los ensayos antifouling arrojaron como resultados que el 6-bromoindol-3-carbaldehído inhibió moderadamente el asentamiento *in vivo* de larvas de cirripedios, sin embargo, no presentó actividad frente a la inhibición del crecimiento de esporas de algas ni tampoco presentó actividad antialimentaria frente a peces (Olguin-Urbe *et al.*, 1997). Adicionalmente, en este trabajo se plantearon la hipótesis de que dichos compuestos podrían ser encontrados en bacterias asociadas a *S. murray*, lo cual fue confirmado al lograr el aislamiento de ambas sustancias en la bacteria *Acinetobacter* sp., la cual fue encontrada en la superficie de la ascidia.

Patellamidas A y C

Las patellamidas A y C (Figura 1-3) han sido reconocidas por su interesante actividad citotóxica, la cual aunque moderada en comparación con otras drogas existentes usadas en el tratamiento de cáncer, les permite ser empleadas en pacientes que presentan resistencia a múltiples fármacos (MDR). Estas sustancias fueron aisladas de la ascidia *Lissoclinun patella* (Degnan *et al.*, 1989; Sings y Rinehart, 1996). Experimentos cuidadosos y exhaustivos demostraron que un *cluster* de *Prochloron didemni* (una cianobacteria simbiote de *L. patella* y de muchas otras ascidias), era el responsable de la producción de las patellamidas arriba mencionadas. En experimentos posteriores donde el *cluster* fue clonado en *Escherichia coli* se encontraron cantidades detectables de la patellamida A (Long *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2005).

Fuscol y Fuscósido A

A partir de *Eunicea fusca* (octocoral) se han aislado varios terpenos (Gopichand y Schmitz, 1978; Shin y Fenical, 1991), los cuales han mostrado interesantes actividades antiinflamatorias en el modelo *in vivo* de edema auricular de ratón y en la inhibición selectiva de la producción de leucotrienos (Jacobson y Jacobs 1992). Experimentos adicionales de inducción de terpenos marcados radiactivamente en el holobionte y en preparaciones de los microorganismos asociados a *E. fusca*, demostraron que en ambos (holobionte y microorganismos) se encontraban metabolitos tales como el fuscol y el

fuscosido A (Newberg *et al.*, 2006), (Figura 1-3) los cuales anteriormente habían sido aislados de *E. fusca*. En este mismo estudio, después del aislamiento de 600 bacterias a partir de la fracción de microorganismos simbioses de *E. fusca*, se comprobó que el organismo responsable de la producción de dichos terpenos fue una bacteria coco Gram-positiva (Newman y Hill, 2006).

1.5.2 De microalgas simbioses

Ácido okadaico

A partir de las esponjas *Halichondria okadai* y *Halichondria melanodocia* fue aislado por primera vez el ácido okadaico (Tachibana *et al.*, 1981), el cual actualmente es clasificado como toxina marina. Dicha toxina es acumulada vía cadena trófica por moluscos, los cuales luego de su ingestión por humanos son los responsables de la reconocida intoxicación diarreica. El ácido okadaico presenta una estructura macrocíclica de polieter con 38 carbonos, la cual es mantenida por puentes de hidrógeno intramoleculares (Figura 1-4), esta toxina natural es un potente inhibidor de las proteínas fosfatasa, especialmente de la fosfatasa 1 y de la fosfatasa 2A, sin embargo no inhibe la fosfatasa 2B. Su mecanismo de acción se asemeja al de un modelo llave-cerradura al unirse a la fosfatasa en una zona hidrofóbica próxima al centro activo de la enzima, interactuando además con zonas básicas en el centro activo. La toxicidad del ácido okadaico radica en ser un promotor tumoral, debido a que al inhibir la acción de las fosfatasas produce una hiperfosforilación de proteínas celulares, incluyendo las responsables de la supresión tumoral (Paul *et al.*, 2007).

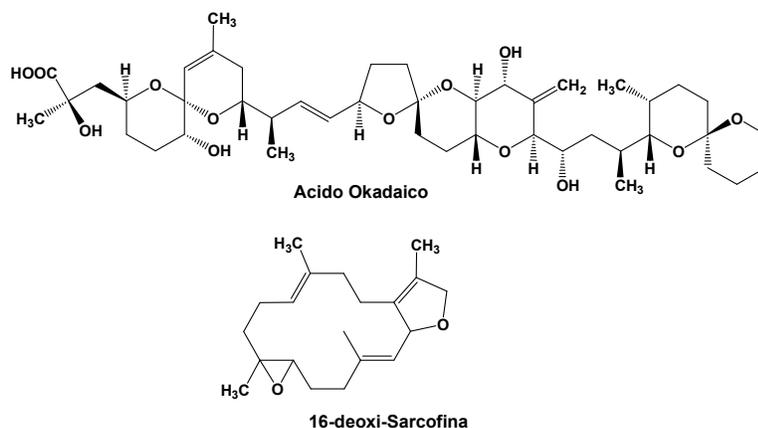


Figura 1-4. Compuestos producidos por microalgas asociadas con invertebrados marinos

Un año después se dio aislamiento a partir de las esponjas *H. okadai* y *H. melanodocia* se demostró que el ácido okadaico es realmente producido por dinoflagelados del género *Prorocentrum* (Murakami *et al.*, 1982), simbiontes dietarios de dichas esponjas.

16-deoxi-Sarcofina

Como parte de la búsqueda de compuestos bioactivos de origen marino, extractos metanólicos de varios octocorales recolectados en aguas de Okinawa (Japón), fueron evaluados frente a aislamientos de anillos de aorta de conejo. Este *screening* primario reveló que el extracto del octocoral del género *Sarcophyton*, presentó actividad como antagonista de Ca, inhibiendo rápidamente la contracción de los anillos de aorta inducida por KCl, por el contrario no presentó actividad cuando la contracción de los anillos de aorta eran inducidos por *nor*-epinefrina (NE). Por aislamiento bioguiado se logró determinar el compuesto responsable de dicha actividad: el diterpeno 16-deoxi-sarcofina (Kobayashi *et al.*, 1983), (Figura 1-4). Estudios posteriores por CLAE demostraron la presencia de dicho compuesto en el extracto crudo de microalgas del género *Symbiodinium* aislado en los pólipos de éste coral blando (Kobayashi y Ishibashi, 1993).

1.5.3 De hongos simbiontes

Pestalona

Otra fuente de sustancias con actividad biológica son los hongos asociados a macroorganismos marinos, un ejemplo de este tipo es el hongo marino del género *Pestalona* aislado de la superficie del alga parda *Rosenvingea* sp., recolectado en las Islas Bahamas. Este hongo solamente cuando es cultivado con la bacteria marina Gram negativa CNJ-328 es capaz de producir el aldehído aromático pestalona (Figura 1-5), el cual es un potente antibiótico de la bacteria resistente a la meticilina *Staphylococcus aureus* (MIC 0.037 µg/mL) y de la bacteria resistente a la vancomicina *Enterococcus faecium* (MIC 0.078 µg/mL), (Cueto *et al.*, 2001).

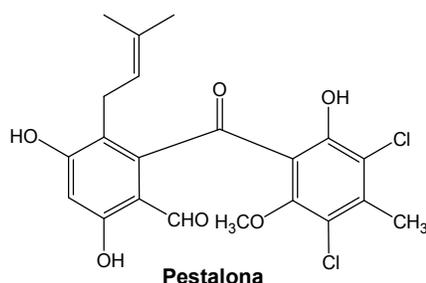


Figura 1-5. Pestalona, compuesto químico producido por hongos simbios de invertebrados marinos

1.6 Métodos para la producción de Ps y seco-Ps

Como se mencionó anteriormente la intención de buscar una fuente sustentable que provea las Ps y seco-Ps, nos impulsa hacia la búsqueda de un camino conveniente para su obtención. Por esta razón fue importante hacer una búsqueda bibliográfica que nos indicara el estado actual en esa actividad. Así para el caso de *P. elisabethae* varios métodos han sido aplicados para la posible producción sustentable de las Ps y seco-Ps; por ejemplo, la síntesis de algunas de estas sustancias fue realizada por el profesor E. Corey, el cual fue el pionero en la obtención con éxito de algunas de ellas y de sus agliconas (Corey y Carpino, 1989; Corey y Lazerwith, 1998), trabajos que se convirtieron en la base para la revisión de la estereoquímica de la mayoría de estas sustancias. Otra técnica alternativa para la síntesis de las Ps, ha sido la catálisis enzimática, con ayuda de enzimas extraídas de *P. elisabethae* (Kohl *et al.*, 2003a, 2003b). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento nadie está aplicando ninguno de los dos procedimientos anteriores como fuente sustentable de estas sustancias.

Adicionalmente, la maricultura está siendo aplicada con éxito para la obtención de extractos semipurificados de *P. elisabethae* ricos en Ps y seco-Ps en Las Bahamas, país que ejerce un control especial en la recolección de colonias con el fin de mantener la viabilidad del recurso. Sin embargo, este método tiene como mayor limitante el lento crecimiento del octocoral, lo que conlleva a tener niveles de oferta muy por debajo de los niveles de demanda.

En el 2003, el grupo del profesor Kerr (Mydlarz *et al.*, 2003) comprobó que en organismos de *P. elisabethae*, recolectados en las Islas Bahamas, al parecer la

microalga asociada *Symbiodinium* sp., es la responsable de la producción de las PsA-D y su precursor biogénico el elisabetatrieno, sin embargo, un experimento sencillo pero efectivo, en donde se añadieron antibióticos al cultivo de *Symbiodinium* sp. aislados del octocoral se observó que aunque los dinoflagelados crecieron no hubo producción de los diterpenos arriba mencionados, hecho que sugiere la posibilidad de que estos compuestos sean de origen microbiano (bacterias comensales presentes en *Symbiodinium*) o bacterias contaminantes de la fracción de *Symbiodinium* (Newman y Hill, 2006). Trabajos para confirmar o negar esta posibilidad deben llevarse a cabo.

Todo lo mostrado hasta este punto, demuestra que el octocoral *P. elisabethae* del Caribe Sur-Occidental es un recurso altamente promisorio como fuente de nuevos compuestos químicos con posible actividad biológica, hasta el momento tan solo se ha determinado la actividad anti-inflamatoria de los compuestos reportados en este animal del Caribe colombiano, por lo tanto es necesario completar su caracterización, tanto desde el punto de vista de su actividad antimicrobiana como también su actividad como agentes citotóxicos; solo de esta forma será posible determinar el potencial de aplicación de las Ps y seco-Ps aisladas de *P. elisabethae* que crece en Colombia. Sin embargo, aunque estas moléculas pueden llegar a ser posibles sustancias con aplicación biomédica o industrial, es inaplazable considerar cómo obtener cantidades suficientes de cada uno de estos compuestos, por lo cual es necesario buscar también un método conveniente para la producción sustentable de estos compuestos.

1.7 Nuestra propuesta

Como primera conclusión del marco teórico presentado podemos enunciar que las investigaciones previas realizadas han resuelto muchos interrogantes para Colombia, se tiene un recurso el octocoral *P. elisabethae*, altamente promisorio en cuanto a fuente de compuestos anti-inflamatorios. Sin embargo, aún está pendiente la caracterización del recurso desde el punto de vista de otras actividades biológicas por ejemplo completar los ensayos de actividad citotóxica contra líneas tumorales y determinar la actividad antimicrobiana y antifouling de los compuestos puros aislados, específicamente de los compuestos tipo Ps y seco-Ps. Estos estudios nos permitirán seguir en la línea de bioprospectiva, propuesta en el inicio de este marco teórico, determinando de manera

más amplia su potencial de aplicación en la industria farmacéutica, cosmética y en la industria de pinturas.

Como segunda conclusión con base en los resultados obtenidos de este marco teórico, estas moléculas pueden llegar a ser posibles sustancias con aplicación biomédica y teniendo en cuenta la baja densidad poblacional de *P. elisabethae* en el archipiélago de San Andrés y Providencia, se hace necesario considerar cómo obtener cantidades suficientes de las Ps, seco-Ps, algunos precursores biogénicos y algunos otros compuestos de estructura química novedosa o con actividad biológica para continuar con las etapas posteriores del estudio bioprospectivo.

Para el caso de Colombia hemos excluido como método de obtención sustentable la extracción directa de estos compuestos debido a que nuestros estudios han demostrado que las densidades poblacionales de estos organismos en las localidades de San Andrés y Providencia son bajas y no resistirían explotación (Puyana *et al.*, 2004). De igual forma la síntesis tal como se mencionó anteriormente es un método difícil de llevar a cabo, debido a que estos compuestos presentan por lo menos cuatro centros quirales y en algunos casos estas reacciones para obtenerlos son inviables debido a su alto costo.

Lo considerado anteriormente exige una solución, en la cual se necesita producir conocimiento científico y tecnológico que sirva de soporte a la solución del problema del suministro para *P. elisabethae*. Por esta razón y considerando lo mencionado anteriormente dentro de los métodos alternativos que se están explorando recientemente, se planteó la hipótesis (probada en algunos invertebrados marinos) de que estas sustancias bioactivas aisladas de *P. elisabethae*, podrían estar siendo producidas por sus microorganismos asociados, si esta situación se prueba, se podrían convertir los simbioses microbianos en una de las fuentes alternas para la producción de estas sustancias de interés. Es obvio, que el cultivo de microorganismos por métodos biotecnológicos es un paso muchísimo más sencillo que el cultivo en extenso de los macroorganismos, además se dejaría inalterado el ecosistema donde se hizo el descubrimiento inicial.

Así el presente trabajo pretendió además de ampliar el espectro de aplicación de las Ps y *seco*-Ps, realizar por primera vez en el ámbito científico, la búsqueda de esta clase de compuestos de interés farmacológico en los microorganismos simbiotes con especial énfasis en bacterias asociadas al octocoral *P. elisabethae*, recolectado en la Isla de Providencia. Se planteó la hipótesis inicial de que son las bacterias simbiotes las responsables de la producción de dichas sustancias, tal como ocurre al parecer con otras Ps aisladas de *P. elisabethae* recolectada en las islas de Las Bahamas (Kerr R. Comunicación personal). Para ello se aisló y caracterizó la comunidad bacteriana asociada a *P. elisabethae*, por métodos dependientes e independientes de cultivo, y se evaluó la capacidad de las bacterias simbiotes cultivables para producir compuestos químicos (Ps, *seco*-Ps, intermediarios biosintéticos u otros compuestos químicos) con actividad biológica.

En conclusión la presente investigación tuvo como objetivo completar la caracterización de las Ps y *seco*-Ps aisladas de especímenes de *P. elisabethae* que crece en Colombia, desde el punto de vista de la actividad biológica determinando su potencial citotóxico, antimicrobiano y *antifouling*, así como también, convertirse en el primer intento de caracterización del simbiote (con énfasis en bacterias) de este macroorganismo y determinar hasta donde fue posible el papel de las bacterias cultivables simbiotes como posibles productoras de Ps y *seco*-Ps o de otras sustancias químicas con potencial farmacológico.

2. Resultados y Discusión

2.1 Aislamiento y elucidación estructural de los compuestos presentes en la fracción polar de *P. elisabethae*

Como se mencionó anteriormente, en los últimos años se ha examinado el octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* recolectado en la Isla de Providencia (Caribe Sur-Occidental) como fuente de nuevos compuestos biológicamente activos (Puyana *et al.*, 2004; Duque *et al.*, 2004, 2006, 2010; Correa *et al.*, 2009, 2011a), estudios que han arrojado hasta el momento, el aislamiento de un gran número de nuevas pseudopterosinas (Ps) y *seco*-pseudopterosinas (*seco*-Ps) (PsP-W, 2'-O-acetil-PsQ, 3'-O-acetil-PsQ, 2'-O-acetil-Ps, 3'-O-acetil-PsU y *seco*-PsK) como también el aislamiento de varias Ps, *seco*-Ps y amflectosinas conocidas (PsG, PsK, *seco*-PsJ, amflectosinas A y B) (Duque *et al.*, 2004, 2006; Rodríguez *et al.*, 2004), compuestos que exhibieron una notable actividad anti-inflamatoria *in vivo* e *in vitro* (Rodríguez *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2009), una moderada actividad anticáncer (Rodríguez *et al.*, 2004) y considerables actividades antiviral, anti-malaria y anti-tuberculosis (Rodríguez *et al.*, 2004).

Sin embargo, aunque las investigaciones previas han resuelto muchos interrogantes para Colombia, dando como resultados iniciales que tenemos un recurso el octocoral *P. elisabethae*, altamente promisorio en cuanto a fuente de compuestos bioactivos, el cual sería deseable explotar, se hace importante terminar de caracterizarlo desde el punto de vista de la actividad biológica completando los ensayos de actividad citotóxica y evaluando la actividad antimicrobiana de las Ps y *seco*-Ps, con el fin de determinar de manera más amplia su posible aplicación en la industria farmacéutica y cosmética, como agentes anti-inflamatorios, anticáncer y antimicrobianos. De acuerdo a lo anterior como fase inicial del presente trabajo se realizó el aislamiento e identificación de algunas de las Ps y *seco*-Ps presentes en el octocoral *P. elisabethae* colombiano, específicamente

recolectando las muestras en la Isla de Providencia debido a que el contenido de Ps y seco-Ps es mayor en esta localidad en comparación a las muestras de la Isla de San Andres (Puyana *et al.*, 2004). Sin embargo, para la parte de la evaluación de la actividad biológica, también se evaluó la actividad citotóxica y antimicrobiana de la MEDNG, correspondiente a los compuestos mayoritarios de las muestras recolectadas en la Isla de San Andres (Duque *et al.*, 2006).

Para ello, especímenes de *P. elisabethae* fueron recolectados en aguas de la Isla de Providencia y después de secarlos al sol fueron extraídos con una mezcla de diclorometano y metanol (1:1). Parte del extracto crudo obtenido (200 mg), fue pasado a través de un cartucho RP-18 y eluido con una mezcla de acetonitrilo:agua (1:1). La fracción polar así obtenida fue analizada por CLAE-EM, para verificar la presencia de Ps y seco-Ps. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la Figura 2-1, donde puede apreciarse una composición característica de las muestras de Providencia (Puyana *et al.*, 2004), las cuales están constituidas principalmente por una mezcla compleja de aproximadamente trece compuestos tipo Ps, seco-Ps y amflectosinas (determinados según su espectro de masas).

2.1.1 Aislamiento de los compuestos mayoritarios de la fracción polar de *P. Elisabethae*

El extracto crudo de *P. elisabethae* (4.0 g) fue separado por una cromatografía flash en fase reversa eluyendo con 500 mL de cada mezcla de disolventes de polaridad decreciente (metanol-agua 1:9, fracción F1, metanol-agua 1:1, F2, metanol-agua 4:1, F3, metanol 100%, F4; etanol al 100%, F5, acetona al 100%, F6, diclorometano-metanol 1:1, F7 y diclorometano 100%, F8). De acuerdo al perfil por CCD, se verificó que las fracciones F4 y F5 contenían una mezcla de Ps y seco-Ps comparando contra dos estándares de PsP y PsQ.

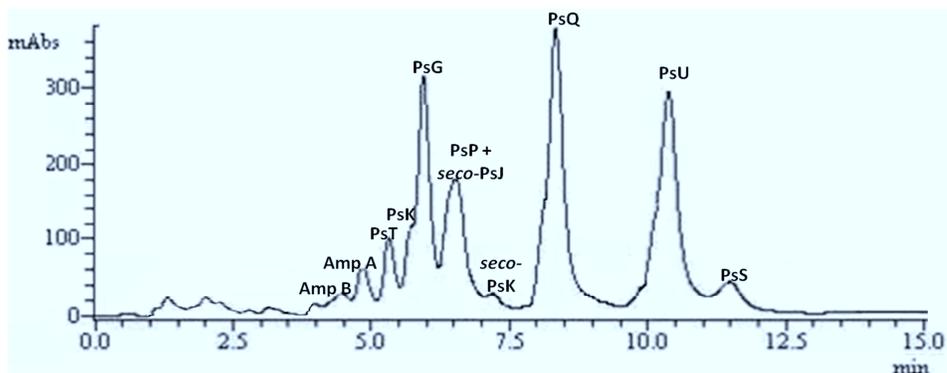


Figura 2-1. Perfil cromatográfico (CLAE-EM) de la fracción polar del extracto crudo de *P. elisabethae* recolectado en la Isla de Providencia. Columna Thermo Hyper-Keystone C-18, con un sistema isocrático acetonitrilo/agua (7:3), 0.2 mL/min

Las fracciones 4 y 5 fueron entonces reunidas en una sola nombrada como FPST, debido a su similitud en composición química establecidas según CCD y CLAE-EM. FPST (1500.0 mg) fue separada por cromatografía flash automática usando como fase estacionaria una columna RediSep DIOL (150 g) y empleando como fase móvil un gradiente continuo de polaridad empezando con hexano 100% hasta etanol 100% y monitorizada por UV a una longitud de onda de 210 nm (Figura 2-2). En total se obtuvieron diez subfracciones (FPST1- FPST10), de las cuales FPST4-FPST7 mostraron contener los compuestos de interés de acuerdo a su perfil por CLAE-EM.

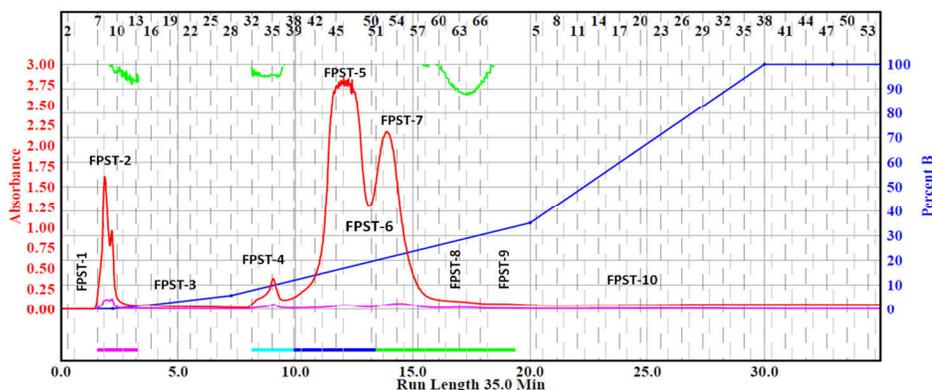


Figura 2-2. Perfil cromatográfico (Combiflash) de la FPST obtenida del fraccionamiento inicial de *P. elisabethae* recolectado en la Isla de Providencia. Columna RediSep DIOL (150 g) con un gradiente continuo de polaridad empezando con hexano 100% (Solvente A) hasta MeOH 100% (solvente B) en 30 minutos, con un flujo de 85 mL/min.

Finalmente, cada una de estas subfracciones fueron separadas por CLAE preparativa en fase reversa tal como se describe en la metodología, logrando aislar las PsG (compuesto 1), PsP (compuesto 2), PsT (compuesto 3) y *seco*-PsJ (compuesto 4) a partir de FPST 7,

la *seco*-PsK (compuesto **5**), a partir de FPST 6, las PsQ (compuesto **6**), PsS (compuesto **7**) y PsU (compuesto **8**), a partir de FPST 5, y la 3-*O*-acetil-PsU (compuesto **9**) a partir de FPST 4.

La caracterización de cada compuesto se realizó inicialmente por espectrometría de masas en modo APCI, análisis en donde las Ps y *seco*-Ps se diferencian principalmente entre ellas por el ión base. De esa manera se determinó que los compuestos **1-3** y **6-9** correspondían a Ps debido a que presentaron un ion base en m/z 301 correspondiente a la pérdida de una unidad de azúcar desde el ión molecular para originar una aglicona de fórmula $C_{20}H_{29}O_2$. Mientras que para los compuestos **4** y **5** su espectro de masas presentó un ión base en m/z 303 correspondiente a la pérdida de una unidad de azúcar desde el ión molecular para originar la aglicona de fórmula $C_{20}H_{31}O_2$ (Figura 2-3).

Con esta misma técnica, se logro determinar el tipo de azúcar ligado a cada una de las Ps y *seco*-Ps aisladas en el presente trabajo (Figura 2-3, Figura 2-4). Así, se logró establecer que los compuestos **1**, **2** y **5** están glicosidados con una deoxihexosa libre ($C_6H_{10}O_4$), debido a la pérdida de 146 u a partir del ión molecular m/z 447 [$C_{26}H_{38}O_6 + H$]⁺ para los compuestos **1** y **2** y a partir del ión molecular m/z 449 [$C_{26}H_{40}O_6 + H$]⁺ para el compuesto **5**. También se determinó que los compuestos **6** y **7** están glicosidados con una deoxihexosa monoacetilada ($C_8H_{12}O_5$), porque se observó una pérdida de 188 u a partir del ión molecular en m/z 489 [$C_{27}H_{40}O_7 + H$]⁺ presente en ambos compuestos. Para los compuestos **3** y **4** se halló que éstos están glicosidados con una pentosa libre ($C_5H_8O_4$), también debido a la presencia de un ión correspondiente a la pérdida de 132 u a partir del ión molecular en m/z 433 [$C_{25}H_{36}O_6 + H$]⁺ del compuesto **3** y del ión molecular en m/z 435 [$C_{25}H_{38}O_6 + H$]⁺ del compuesto **4**. En cuanto al compuesto **8** se pudo establecer que éste está glicosidado con una pentosa monoacetilada ($C_7H_{10}O_5$), debido a que se observó una pérdida de 174 u a partir del ión molecular m/z 475 [$C_{27}H_{38}O_7 + H$]⁺ y finalmente para el compuesto **9** se halló que éste estaba glicosidado con una pentosa diacetilada ($C_9H_{12}O_6$), debido también a la presencia de un ión base correspondiente a la pérdida de 216 u a partir del ión molecular m/z 516 [$C_{29}H_{40}O_8 + H$]⁺.

A manera de ejemplo se mostrará cómo se realizó la identificación de las Ps y de las *seco*-Ps por EM y RMN ¹H de acuerdo al tipo de azúcar con el que están glicosidados los

compuestos aislados y por comparación de estos espectros con los obtenidos anteriormente en nuestro grupo de investigación.

2.1.2 Identificación de las Ps glicosidadas con fucosa (PsG, PsP, PsQ y PsS)

En los espectros de RMN ^1H de las Ps (compuestos **1**, **2**, **6** y **7**) glicosidadas con arabinosa de acuerdo a lo observado en sus espectros de masas (Figura 2-3), se observaron de manera general la presencia de tres metilos singletes en δ 1.92 (3H, s), 1.67 (3H, s) y 1.61 (3H, s) para el compuesto **1**, δ 2.07 (3H, s), 1.71 (3H, s) y 1.67 (3H, s) para el compuesto **2**, δ 2.08 (3H, s), 1.72 (3H, s) y 1.67 (3H, s) para el compuesto **6** y δ 2.09 (3H, s), 1.72 (3H, s) y 1.67 (3H, s) para el compuesto **7**, atribuibles a un metilo sobre anillo aromático $\text{CH}_3\text{-20}$ y dos metilos sobre enlace olefínico $\text{CH}_3\text{-16}$ y $\text{CH}_3\text{-17}$, respectivamente. También se observaron, dos señales dobletes para metilos unidos a carbonos terciarios sp^3 en δ 0.99 (3H, *d*, $J = 4.8$ Hz) y 1.12 (3H, *d*, $J = 6.6$ Hz) para el compuesto **1**, δ 1.00 (3H, *d*, $J = 5.9$ Hz) y 1.20 (3H, *d*, $J = 6.6$ Hz) para el compuesto **2**, δ 1.00 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz) y 1.26 (3H, *d*, $J = 6.7$ Hz) para el compuesto **6** y δ 1.03 (3H, *d*, $J = 5.9$ Hz) y 1.26 (3H, *d*, $J = 6.8$ Hz) para el compuesto **7**, correspondientes a los $\text{CH}_3\text{-18}$ y $\text{CH}_3\text{-19}$, respectivamente, en un compuesto tipo Ps (Tabla 2-1, Figura 2-3).

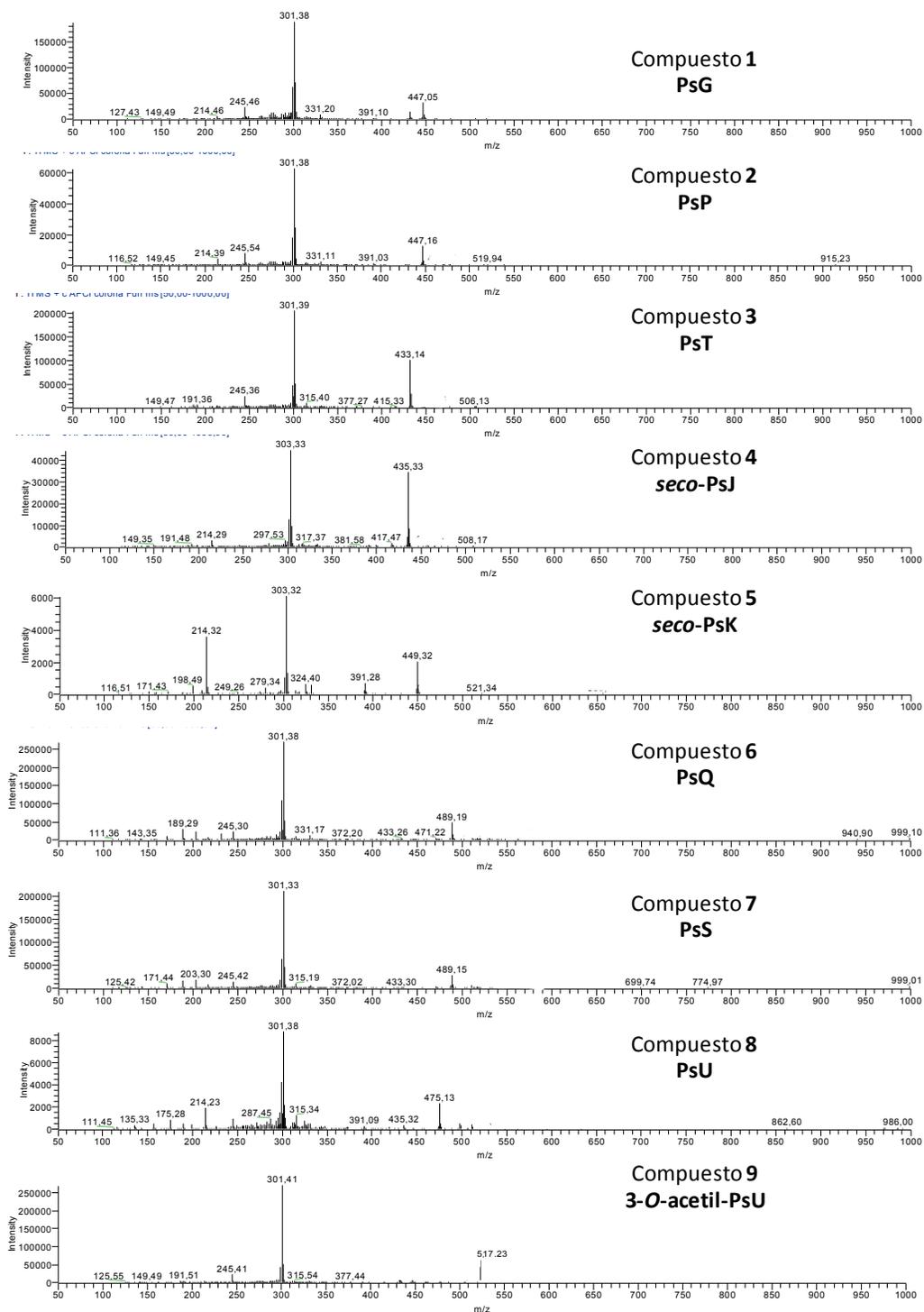


Figura 2-3. Espectro de masas en modo APCI de los compuestos 1-9 aislados a partir de la fracción polar de *P. elisabethae* (Providencia, Caribe Sur-Occidental).

Adicionalmente, se observaron en los espectros tres señales que integran cada una para un protón, en δ 3.66 (1H, *q*-like, $J = 7.2$ Hz), 2.05 (1H, *m*) y 3.32 (1H, *sextet*-like, $J = 7.8$)

para el compuesto **1**, δ 3.66 (1H, *q-like*, $J = 8.4$ Hz), 2.05 (1H, *m*) y 3.22 (1H, *sextet-like*, $J = 7.2$) para el compuesto **2**, δ 3.66 (1H, *q-like*, $J = 8.4$ Hz), 2.05 (1H, *m*) y 3.20 (1H, *sextet-like*, $J = 7.0$) para el compuesto **6** y δ 3.66 (1H, *q-like*, $J = 8.7$ Hz), 2.05 (1H, *m*) y 3.19 (1H, *sextet-like*, $J = 7.2$) para el compuesto **7**, características de los hidrógenos alílicos H-1, H-4 y H-7 y una señal doblete alrededor de 4.91 (1H, *d*, $J = 9.0$), 4.90 (1H, *d*, $J = 8.4$), 4.99 (1H, *br d*, $J = 9.2$) y 4.93 (1H, *d*, $J = 9.2$), para los compuestos **1**, **2**, **6** y **7**, respectivamente, correspondientes a un protón sobre enlace olefínico propio del protón H-14, el cual junto con las señales singletes de los dos metilos sobre enlace olefínico CH₃-16 y CH₃-17, arriba mencionadas, conforman la unidad isopropilideno en cada una de las tres Ps (Figura 2-3).

La asignación de las señales de la aglicona de los compuestos **1**, **2**, **6** y **7** se realizó por comparación con los datos reportados en la literatura para los compuestos tipo Ps aisladas de especímenes de la Isla de Providencia (PsT-W, 2-O-acetil-PsU; 3-O-acetil-PsU) (Duque *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004; Correa, 2007) (Tabla 2-1). Todo lo anterior evidenció la presencia de agliconas de Ps para estos cuatro compuestos.

Aunque todos los compuestos evidenciaron una amplia similitud entre ellos con respecto a las señales de la aglicona, se presentaron algunas diferencias notables en sus espectros de RMN ¹H para las señales que aparecen en la zona entre δ 3-5 (región de protones de azúcar), además de una señal de un metilo adicional para los compuestos **6** y **7**.

Específicamente, para los compuestos **1** y **2** aparecen en su espectro de RMN ¹H además cuatro señales en la zona entre δ 3-5 (región de protones de azúcar), las cuales junto con la señal del protón anomérico en δ 5.05 (1H, *s*) y 5.11 (1H, *d*, $J = 3.7$ Hz), respectivamente, y la señal doblete de metilo en δ 1.21 (3H, *d*, $J = 6.6$ Hz) y 1.33 (3H, *d*, $J = 6.7$ Hz), respectivamente, muestran la presencia de una unidad de deoxihexosa. La comparación de estos datos con los reportados en la literatura (Tabla 2-1) para los valores de los desplazamientos químicos y el valor de las constantes de acoplamiento permiten asignar el azúcar como la α -fucopiranososa (Rousis *et al.*, 1990; Duque *et al.*, 2004).

Para el caso de los compuestos **6** y **7** aparecen además cuatro señales en la zona entre δ 3-5, las cuales junto con la señal del protón anomérico en δ 5.16 (1H, *d*, *J* = 4.0 Hz) y δ 5.12 (1H, *d*, *J* = 3.7 Hz), respectivamente, junto con una señal doblete de metilo en δ 1.33 (3H, *d*, *J* = 6.6) y 1.35 (3H, *d*, *J* = 6.6) respectivamente, y una señal singlete de metilo en δ 2.21 (3H, *s*) para ambos compuestos, muestran la presencia de una fucopiranososa monoacetilada. La comparación de estos datos con los reportados en la literatura (Tabla 2-2) para los valores de los desplazamientos químicos y el valor de las constantes de acoplamiento permiten asignar el azúcar como α -fucopiranososa monoacetilada en el C-4' y C-2', respectivamente (Duque *et al.*, 2004, Rodríguez *et al.*, 2004).

Todo el análisis anterior y la comparación de los desplazamientos de RMN ^1H con los reportados en la literatura (Tabla 2-1), permiten concluir que el compuesto **1** corresponde a la PsG, el compuesto **2** a la PsP, el compuesto **6** a la PsQ y el compuesto **7** a la PsS (Figura 2-4), todas aisladas previamente por nosotros en especímenes de *P. elisabethae* recolectados en la Isla de Providencia (Duque *et al.*, 2004).

Tabla 2-1. Datos de RMN ^1H (600 MHz) obtenidos para las PsG, PsP, PsQ y PsS y comparación con los reportados en la literatura (500 MHz) (Duque *et al.*, 2004)

Nº	Compuesto 1: PsG δ (ppm) ^1H		Compuesto 2: PsP δ (ppm) ^1H		Compuesto 6: PsQ δ (ppm) ^1H		Compuesto 7: PsS δ (ppm) ^1H	
	Experimental	Literatura	Experimental	Literatura	Experimental	Literatura	Experimental	Literatura
1	3.66 (1H, <i>q-like</i> , 7.2)	3.66 (1H, <i>m</i> , 8.7)	3.66 (1H, <i>q-like</i> , 8.4)	3.66 (1H, <i>q-like</i> , 8.5)	3.66 (1H, <i>q-like</i> , 8.4)	3.67 (1H, <i>q-like</i> , 8.5)	3.66 (1H, <i>q-like</i> , 8.7)	3.66 (1H, <i>q-like</i> , 8.7)
2	1.93 (1H, <i>m</i>) 1.21 (1H, <i>m</i>)		1.93 (1H, <i>m</i>) 1.21 (1H, <i>m</i>)	1.93 (1H, <i>dd</i> , 10.5, 7.8) 1.21 (1H, <i>m</i>)	1.93 (1H, <i>m</i>) 1.20 (1H, <i>m</i>)	1.93 (1H, <i>m</i>) 1.22 (1H, <i>m</i>)	1.95 (1H, <i>m</i>) 1.21 (1H, <i>m</i>)	1.94 (1H, <i>m</i>) 1.21 (1H, <i>m</i>)
3	1.22 (1H, <i>m</i>)		1.23 (1H, <i>m</i>)	1.22 (1H, <i>m</i>)	1.20 (1H, <i>m</i>)	1.22 (1H, <i>m</i>)	1.23 (1H, <i>m</i>)	1.23 (1H, <i>m</i>)
4	2.05 (1H, <i>m</i>)		2.05 (1H, <i>m</i>)	2.05 (1H, <i>m</i>)	2.05 (1H, <i>m</i>)	2.05 (1H, <i>m</i>)	2.05 (1H, <i>m</i>)	2.05 (1H, <i>m</i>)
5			0.91 <i>qd</i> (1H, <i>qd</i> , 12.7, 3.2)	0.92 <i>qd</i> (1H, <i>qd</i> , 12.7, 3.2)	0.95 <i>qd</i> (1H, <i>qd</i> , 12.5, 2.9.0)	0.93 <i>qd</i> (1H, <i>qd</i> , 12.7, 3.0)	0.93 <i>qd</i> (1H, <i>qd</i> , 12.7, 3.0)	0.93 <i>qd</i> (1H, <i>qd</i> , 12.7, 3.0)
6	-		2.13 (1H, <i>m</i>) 1.30 (1H, <i>m</i>)	2.13 (1H, <i>m</i>) 1.31 (1H, <i>m</i>)	2.15 (1H, <i>m</i>) 1.30 (1H, <i>m</i>)	2.14 (1H, <i>m</i>) 1.32 (1H, <i>m</i>)	2.15 (1H, <i>m</i>) 1.32 (1H, <i>m</i>)	2.15 (1H, <i>m</i>) 1.32 (1H, <i>m</i>)
7	3.32 (1H, <i>sextet-like</i> , 7.8)	3.36 (1H, <i>m</i>)	3.22 (1H, <i>sextet-like</i> , 7.2)	3.19 (1H, <i>sextet-like</i> , 7.0)	3.20 (1H, <i>sextet-like</i> , 7.0)	3.20 (1H, <i>sextet-like</i> , 7.0)	3.19 (1H, <i>sextet-like</i> , 7.2)	3.19 (1H, <i>sextet-like</i> , 7.2)
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11								
12								
13								
14	4.91 (1H, <i>d</i> , 9.0)	4.91 (1H, <i>d</i> , 9.0)	4.90 (1H, <i>br d</i> , 8.4)	4.98 (1H, <i>br d</i> , 9.3)	4.99 (1H, <i>br d</i> , 9.2)	4.99 (1H, <i>br d</i> , 9.2)	4.93 (1H, <i>d</i> , 9.2)	4.93 (1H, <i>d</i> , 9.2)
15	-	-	-	-	-	-	-	-
16	1.61 (3H, <i>s</i>)	1.61 (3H, <i>s</i>)	1.67 (3H, <i>s</i>)	1.67 (3H, <i>s</i>)	1.67 (3H, <i>s</i>)	1.67 (3H, <i>s</i>)	1.67 (3H, <i>s</i>)	1.67 (3H, <i>s</i>)
17	1.67 (3H, <i>s</i>)	1.67 (3H, <i>s</i>)	1.71 (3H, <i>s</i>)	1.71 (3H, <i>s</i>)	1.72 (3H, <i>s</i>)	1.72 (3H, <i>s</i>)	1.72 (3H, <i>s</i>)	1.72 (3H, <i>s</i>)
18	0.99 (3H, <i>d</i> , 4.8)	0.96 (3H, <i>d</i> , 4.5)	1.00 (3H, <i>d</i> , 5.9)	1.02 (3H, <i>d</i> , 5.9)	1.00 (3H, <i>d</i> , 6.0)	1.02 (3H, <i>d</i> , 6.0)	1.03 (3H, <i>d</i> , 5.9)	1.03 (3H, <i>d</i> , 5.9)
19	1.12 (3H, <i>d</i> , 6.6)	1.11 (3H, <i>d</i> , 6.7)	1.20 (3H, <i>d</i> , 6.6)	1.25 (3H, <i>d</i> , 6.8)	1.26 (3H, <i>d</i> , 6.7)	1.26 (3H, <i>d</i> , 6.8)	1.26 (3H, <i>d</i> , 6.8)	1.25 (3H, <i>d</i> , 6.8)
20	1.92 (3H, <i>s</i>)	1.91 (3H, <i>s</i>)	2.07 (3H, <i>s</i>)	2.07 (3H, <i>s</i>)	2.08 (3H, <i>s</i>)	2.08 (3H, <i>s</i>)	2.09 (3H, <i>s</i>)	2.10 (3H, <i>s</i>)
1'	5.05 (1H, <i>s</i>)	5.06 (1H, <i>s</i>)	5.11 (1H, <i>d</i> , 3.7)	5.11 (1H, <i>d</i> , 3.7)	5.16 (1H, <i>d</i> , 4.0)	5.18 (1H, <i>d</i> , 4.0)	5.12 (1H, <i>d</i> , 3.7)	5.12 (1H, <i>d</i> , 3.7)
2'	3.89 (1H, <i>br s</i>)	3.89 (1H, <i>br s</i>)	4.03 (1H, <i>dd</i> , 9.5, 3.7)	4.03 (1H, <i>dd</i> , 9.5, 3.7)	4.27 (1H, <i>ddd</i> , 10.4, 4.0, 3.0)	4.30 (1H, <i>ddd</i> , 10.4, 4.0, 3.0)	5.26 (1H, <i>dd</i> , 10.4, 3.7)	5.24 (1H, <i>dd</i> , 10.4, 3.7)
3'	4.11 (1H, <i>br s</i>)	4.10 (1H, <i>br s</i>)	4.13 (1H, <i>br d</i> , 9.5)	4.13 (1H, <i>br d</i> , 9.5)	5.30 (1H, <i>dd</i> , 10.4, 3.0)	5.29 (1H, <i>dd</i> , 10.4, 3.0)	4.26 (1H, <i>dd</i> , 10.4, 3.2)	4.26 (1H, <i>dd</i> , 10.4, 3.2)
4'	4.11 (1H, <i>br s</i>)	4.10 (1H, <i>br s</i>)	3.89 (1H, <i>br s</i>)	3.89 (1H, <i>br s</i>)	4.06 (1H, <i>br s</i>)	4.06 (1H, <i>br s</i>)	3.95 (1H, <i>br d</i> , 3.2)	3.97 (1H, <i>br d</i> , 3.2)
5'	4.30 (1H, <i>br d</i> , 6.6)	4.32 (1H, <i>m</i>)	4.52 (1H, <i>q</i> , 6.7)	4.52 (1H, <i>q</i> , 6.7)	4.59 (1H, <i>q</i> , 6.6)	4.58 (1H, <i>q</i> , 6.6)	4.54 (1H, <i>q</i> , 6.6)	4.56 (1H, <i>q</i> , 6.6)
6'	1.21 (3H, <i>d</i> , 6.6)	1.21 (3H, <i>d</i> , 6.3)	1.33 (3H, <i>d</i> , 6.7)	1.33 (3H, <i>d</i> , 6.7)	1.33 (3H, <i>d</i> , 6.6)	1.33 (3H, <i>d</i> , 6.6)	1.35 (3H, <i>d</i> , 6.6)	1.39 (3H, <i>d</i> , 6.6)
Ac					2.21 (3H, <i>s</i>)	2.21 (3H, <i>s</i>)	2.21 (3H, <i>s</i>)	2.23 (3H, <i>s</i>)

2.1.3 Identificación de las Ps glicosidadas con arabinosa (PsT, PsU y 3-O-acetil-PsU)

En los espectros de RMN ^1H de las tres Ps glicosidadas con arabinosa (compuestos **3**, **8** y **9**) de acuerdo a su espectro de masas (Figura 2-3), se observó la presencia de tres metilos singletes en δ 1.99 (3H, s), 1.64 (3H, s) y 1.68 (3H, s) para el compuesto **3**, en δ 2.05 (3H, s), 1.66 (3H, s) y 1.72 (3H, s) para el compuesto **8** y en δ 2.07 (3H, s), 1.66 (3H, s) y 1.72 (3H, s) para el compuesto **9**, atribuibles a un metilo sobre anillo aromático CH₃-20 y a dos metilos sobre enlace olefínico CH₃-16 y CH₃-17, respectivamente. También se observaron, dos señales dobletes para metilos unidos a carbonos terciarios sp³ en δ 1.18 (3H, *d*, *J* = 6.6 Hz) y 1.04 (3H, *d*, *J* = 5.6 Hz) para el compuesto **3**, δ 1.27 (3H, *d*, *J* = 1.8 Hz) y 1.02 (3H, *d*, *J* = 5.9 Hz) para el compuesto **8** y en δ 1.26 (3H, *d*, *J* = 7.0 Hz) y 1.03 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz) para el compuesto **9**, correspondientes a los CH₃-18 y CH₃-19, respectivamente, señales características de compuestos tipo Ps (Tabla 2-2, Figure 2/).

Tabla 2-2. Datos de RMN ^1H (600 MHz) obtenidos para las PsT, PsU y 3-O-acetil-PsU y comparación con los reportados en la literatura (500 MHz) (Duque *et al.*, 2004; Correa, 2007)

Nº	Compuesto 3: PsT δ (ppm) ^1H		Compuesto 8: PsU δ (ppm) ^1H		Compuesto 9: 3-O-acetil-PsU δ (ppm) ^1H	
	Experimental	Literatura	Experimental	Literatura	Experimental	Literatura*
1	3.61 (1H, <i>q-like</i> , 8.7)	3.62 (1H, <i>q-like</i> , 8.7)	3.66 (1H, <i>m</i>)	3.67 (1H, <i>m</i>)	3.67 (1H, <i>q-like</i> , 8.4)	3.66 (1H, <i>dd</i> , 9.3, 8.4)
2	1.90 (1H, <i>dd</i> , 10.1, 6.3)	1.90 (1H, <i>dd</i> , 10.2, 6.3)	1.23 (1H, <i>m</i>)	1.23 (1H, <i>m</i>)	1.20 (1H, <i>m</i>)	1.18 (1H, <i>m</i>)
3	1.22 (1H, <i>m</i>)	1.22 (1H, <i>m</i>)	2.25 (1H, <i>m</i>)	2.25 (1H, <i>m</i>)	1.92 (1H, <i>dd</i> , 10.0, 1.4)	1.93 (1H, <i>dd</i> , 10.8, 8.0)
4	1.22 (1H, <i>m</i>)	1.23 (1H, <i>m</i>)	1.22 (1H, <i>m</i>)	1.22 (1H, <i>m</i>)	1.18 (1H, <i>m</i>)	1.24 (1H, <i>m</i>)
5	2.02 (1H, <i>m</i>)	2.02 (1H, <i>m</i>)	2.04 (1H, <i>m</i>)	2.05 (1H, <i>m</i>)	2.05 (1H, <i>m</i>)	2.05 (1H, <i>m</i>)
6	0.88 (1H, <i>qd</i> , 12.6, 3.2)	0.88 (1H, <i>qd</i> , 12.7, 3.2)	0.92 (1H, <i>qd</i> , 12.7, 3.2)	0.92 (1H, <i>qd</i> , 12.7, 3.2)	0.92 (1H, <i>m</i>)	0.92 (1H, <i>m</i>)
7	2.02 (1H, <i>m</i>)	2.02 (1H, <i>m</i>)	2.02 (1H, <i>m</i>)	2.02 (1H, <i>m</i>)	2.01 (1H, <i>m</i>)	2.01 (1H, <i>m</i>)
8	1.30 (1H, <i>m</i>)	1.30 (1H, <i>m</i>)	1.32 (1H, <i>m</i>)	1.31 (1H, <i>m</i>)	1.30 (1H, <i>m</i>)	2.07 (1H, <i>m</i>)
9	2.08 (1H, <i>m</i>)	2.08 (1H, <i>m</i>)	2.13 (1H, <i>m</i>)	2.13 (1H, <i>m</i>)	2.18 (1H, <i>m</i>)	1.30 (1H, <i>m</i>)
10	3.12 (1H, <i>sextet-like</i> , 7.2)	3.12 (1H, <i>sextet-like</i> , 7.2)	3.19 (1H, <i>m</i>)	3.19 (1H, <i>m</i>)	3.20 (1H, <i>sext</i> , 7.1)	3.18 (1H, <i>m</i>)
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	4.94 (1H, <i>br d</i> , 9.1)	4.93 (1H, <i>br d</i> , 9.3)	4.95 (1H, <i>d</i> , 9.0)	4.96 (1H, <i>d</i> , 9.1)	4.96 (1H, <i>d</i> , 9.1)	4.96 (1H, <i>brd</i> , 9.2)
15	-	-	-	-	-	-
16	1.64 (3H, <i>s</i>)	1.64 (3H, <i>s</i>)	1.66 (3H, <i>s</i>)	1.66 (3H, <i>s</i>)	1.66 (3H, <i>brs</i>)	1.66 (3H, <i>br s</i>)
17	1.68 (3H, <i>s</i>)	1.68 (3H, <i>s</i>)	1.72 (3H, <i>s</i>)	1.72 (3H, <i>s</i>)	1.72 (3H, <i>brs</i>)	1.71 (3H, <i>br s</i>)
18	1.04 (3H, <i>d</i> , 5.6)	1.00 (3H, <i>d</i> , 5.6)	1.02 (3H, <i>d</i> , 5.9)	1.02 (3H, <i>d</i> , 5.9)	1.03 (3H, <i>d</i> , 6.0)	1.02 (3H, <i>d</i> , 6.0)
19	1.18 (3H, <i>d</i> , 6.6)	1.18 (3H, <i>d</i> , 6.6)	1.27 (3H, <i>d</i> , 1.8)	1.27 (3H, <i>d</i> , 1.8)	1.26 (3H, <i>d</i> , 7.0)	1.26 (3H, <i>d</i> , 6.8)

20	1.99 (3H, s)	1.97 (3H, s)	2.05 (3H, s)	2.06 (3H, s)	2.07 (3H, s)	2.07 (3H, s)
1'	5.10 (1H, d, 2.5)	5.10 (1H, d, 2.5)	5.18 (1H, d, 3.6)	5.18 (1H, d, 3.6)	5.24 (1H, d, 3.7)	5.23 (1H, d, 3.7)
2'	4.17 (1H, brd, 7.3)	4.17 (1H, brd, 7.3)	4.11 (1H, dd, 9.8, 3.5)	4.10 (1H, dd, 9.9, 3.6)	4.31 (1H, dd, 10.3, 3.7)	4.30 (1H, dd, 10.3, 3.8)
3'	4.13 (1H, brd, 7.2)	4.12 (1H, brd, 7.3)	4.33 (1H, dd, 9.8, 3.3)	4.32 (1H, dd, 9.9, 3.4)	5.40 (1H, dd, 10.3, 3.2)	5.40 (1H, dd, 10.3, 3.2)
4'	4.08 (1H, s)	4.08 (1H, s)	5.23 (1H, m)	5.24 (1H, m)	5.44 (1H, m)	5.44 (1H, br d, 1.1)
5'_{ec}	4.25 (1H, d, 12.6)	4.25 (1H, d, 12.6)	4.37 (1H, brd, 13.0)	4.36 (1H, brd, 13.0)	4.45 (1H, d, 13.0)	4.45 (1H, d, 12.9)
5'_{ax}	3.78 (1H, d, 12.6)	3.78 (1H, d, 12.6)	3.89 (1H, dd, 13.0, 1.9)	3.89 (1H, dd, 13.0, 1.9)	3.86 (1H, dd, 13.0, 2.2)	3.85 (1H, dd, 13.0, 2.0)
Ac	-	-	2.16 (3H, s)	2.16 (3H, s)	2.11 (3H, s)	2.10 (3H, s)
Ac	-	-	-	-	2.14 (3H, s)	2.14 (3H, s)

* Datos reportados en Correa H., 2007 en un espectrómetro de RMN de (400 MHz)

Adicionalmente, se observaron en los espectros tres señales que integran cada una para un protón, en δ 3.61 (1H, *q-like*, $J = 8.7$ Hz), 2.02 (1H, *m*) y 3.12 (1H, *sextet-like*, $J = 7.2$) para el compuesto **3**, en δ 3.66 (1H, *m*), 2.04 (1H, *m*) y 3.19 (1H, *m*) para el compuesto **8** y en δ 3.67 (1H, *q-like*, $J = 8.4$), 2.05 (1H, *m*) y 3.20 (1H, *sextet-like*, $J = 7.2$) para el compuesto **9**, características de los hidrógenos alílicos H-1, H-4 y H-7 y una señal doblete en δ 4.94 (1H, *br d*, $J = 9.1$) para el compuesto **3**, en δ 4.95 (1H, *d*, $J = 9.0$) para el compuesto **8** y en δ 4.96 (1H, *d*, $J = 9.1$) para el compuesto **9**, correspondientes cada una a un protón sobre enlace olefínico propio del protón H-14, el cual junto con las señales singletes de los dos metilos sobre enlace olefínico CH₃-16 y CH₃-17, arriba mencionadas, conforman la unidad isopropilideno en cada una de las tres Ps.

La asignación de las señales de la aglicona de los compuestos **3**, **8** y **9** se realizó por comparación con los datos reportados en la literatura para los compuestos tipo Ps aisladas de especímenes de la Isla de Providencia (PsT-W, 2-O-acetil-PsU; 3-O-acetil-PsU) (Duque *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2004; Correa, 2007) (Tabla 2-2). Todo lo anterior evidenció la presencia de agliconas de Ps para estos tres compuestos.

Aunque todos los compuestos evidenciaron una amplia similitud entre ellos con respecto a las señales de la aglicona, se presentaron algunas diferencias notables en sus espectros de RMN ¹H para las señales que aparecen en la zona entre δ 3-5 (región de protones de azúcar), además de una señal de un metilo adicional para el compuesto **8** y dos señales de metilos adicionales para el compuesto **9**.

Específicamente, para el compuesto **3** aparecen además cinco señales en la zona entre δ 3-5 (región de protones de azúcar), las cuales junto con la señal del protón anomérico

en δ 5.10 (1H, *d*, $J = 2.5$ Hz) muestran la presencia de una pentopiranos. La comparación de estos datos con los reportados en la literatura (Tabla 2-2) para los valores de los desplazamientos químicos y el valor de las constantes de acoplamiento permiten asignar el azúcar como la β -arabinosa (Duque *et al.*, 2004; 2006, Correa, 2007).

Para el caso del compuesto **8** aparecen además cinco señales en la zona entre δ 3-5, las cuales junto con la señal del protón anomérico en δ 5.18 (1H, *d*, $J = 3.6$ Hz) y la señal singlete del metilo en δ 2.16 (3H, *s*) muestran la presencia de una pentopiranos monoacetilada. La comparación de estos datos con los reportados en la literatura (Tabla 2-2) para los valores de los desplazamientos químicos y el valor de las constantes de acoplamiento permiten asignar el azúcar como β -arabinosa monoacetilada en el C-4' (Duque *et al.*, 2004, Rodríguez *et al.*, 2004).

Finalmente para el caso del compuesto **9** aparecen además cinco señales en la zona entre δ 3-5, las cuales junto con la señal del protón anomérico en δ 5.24 (1H, *d*, $J = 3.7$ Hz) y dos señales singletes de metilos en δ 2.11 (3H, *s*) y 2.14 (3H, *s*) muestran la presencia de una pentopiranos diacetilada. La comparación de estos datos con los reportados en la literatura (Tabla 2-2) para los valores de los desplazamientos químicos y el valor de las constantes de acoplamiento permiten asignar el azúcar como β -arabinosa diacetilada en los carbonos C-3' y C-4' (Duque *et al.*, 2004, Rodríguez *et al.*, 2004; Correa, 2007).

Todo el análisis anterior y la comparación de los desplazamientos de las señales en RMN ^1H con los reportados en la literatura (Tabla 2-2), permiten concluir que el compuesto **3** corresponde a la PsT, el compuesto **8** a la PsU y el compuesto **9** a la 3-O-acetil-PsU (Figura 2-4), todas aisladas previamente por nosotros en especímenes de *P. elisabethae* recolectados en la Isla de Providencia (Duque *et al.*, 2004; Correa, 2007).

2.1.4 Identificación de las *seco*-Ps (*seco*-PsJ y *seco*-PsK)

En los espectros de RMN ^1H de las dos *seco*-Ps aisladas (compuestos **4** y **5**) (Tabla 2-3), se observó de manera general la presencia de tres metilos singletes en δ 2.25 (3H, *s*), 1.71 (3H, *s*) y 1.62 (3H, *s*) para el compuesto **4** y en δ 2.29 (3H, *s*), 1.71 (3H, *s*) y 1.63 (3H, *s*) para el compuesto **5**, atribuibles a un metilo sobre anillo aromático CH₃-19 y dos metilos sobre enlace olefínico CH₃-17 y CH₃-16, respectivamente. También se

observaron, dos señales dobletes para metilos unidos a carbonos terciarios sp^3 en δ 1.15 (3H, *d*, *J* = 6.9 Hz) y 0.70 (3H, *d*, *J* = 6.9 Hz) para el compuesto **4** y en δ 1.19 (3H, *d*, *J* = 6.8 Hz) y 0.71 (3H, *d*, *J* = 7.0 Hz) para el compuesto **5**, correspondientes a los CH₃-20 y CH₃-18, respectivamente, en un compuesto tipo *seco*-Ps.

Tabla 2-3. Datos de RMN ¹H (600 MHz) obtenidos para las *seco*-PsJ y *seco*-PsK y comparación con los reportados en la literatura (500 MHz) (Duque *et al.*, 2006; Correa, H., 2005)

Nº	Compuesto 4: <i>seco</i> -PsJ δ (ppm) ¹ H		Compuesto 5: <i>seco</i> -PsK δ (ppm) ¹ H	
	Experimental	Literatura	Experimental	Literatura
1	3.11 (1H, <i>m</i>)	3.12 (1H, <i>m</i>)	3.14 (1H, <i>m</i>)	3.14 (1H, <i>m</i>)
2	1.45 (1H, <i>m</i>)	1.45 (1H, <i>m</i>)	1.87 (1H, <i>ddt</i> , 12.7, 5.9, 3.4)	1.87 (1H, <i>ddt</i> , 12.7, 5.9, 3.4)
	1.85 (1H, <i>ddt</i> , 12.7, 5.9, 3.3)	1.85 (1H, <i>ddt</i> , 12.7, 5.9, 3.3)	1.47 (1H, <i>m</i>)	1.46 (1H, <i>m</i>)
3	1.66 (1H, <i>m</i>)	1.66 (1H, <i>m</i>)	1.66 (1H, <i>m</i>)	1.66 (1H, <i>m</i>)
	1.77 (1H, <i>ddt</i> , 12.7, 6.3, 3.3)	1.77 (1H, <i>ddt</i> , 12.7, 6.3, 3.3)	1.79 (1H, <i>ddt</i> , 12.7, 6.4, 3.3)	1.79 (1H, <i>ddt</i> , 12.7, 6.4, 3.3)
4	2.62 (1H, <i>m</i>)	2.62 (1H, <i>m</i>)	2.63 (1H, <i>m</i>)	2.63 (1H, <i>m</i>)
5	6.49 (1H, <i>s</i>)	6.49 (1H, <i>s</i>)	6.49 (1H, <i>s</i>)	6.49 (1H, <i>s</i>)
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	1.97 (1H, <i>m</i>)	1.97 (1H, <i>m</i>)	1.97 (1H, <i>m</i>)	1.97 (1H, <i>m</i>)
12	1.33 (1H, <i>m</i>)	1.33 (1H, <i>m</i>)	1.34 (1H, <i>m</i>)	1.34 (1H, <i>m</i>)
	1.46 (1H, <i>m</i>)	1.46 (1H, <i>m</i>)	1.46 (1H, <i>m</i>)	1.46 (1H, <i>m</i>)
13	1.95 (1H, <i>m</i>)	1.95 (1H, <i>m</i>)	1.95 (1H, <i>m</i>)	1.95 (1H, <i>m</i>)
	2.06 (1H, <i>m</i>)	2.06 (1H, <i>m</i>)	2.07 (1H, <i>m</i>)	2.07 (1H, <i>m</i>)
14	5.15 (1H, <i>m</i>)	5.14 (1H, <i>t</i> , 7.2)	5.15 (1H, <i>t</i> , 7.1)	5.15 (1H, <i>t</i> , 7.1)
15	-	-	-	-
16	1.71 (3H, <i>s</i>)	1.71 (3H, <i>s</i>)	1.71 (3H, <i>s</i>)	1.71 (3H, <i>s</i>)
17	1.62 (3H, <i>s</i>)	1.62 (3H, <i>s</i>)	1.63 (3H, <i>s</i>)	1.63 (3H, <i>s</i>)
18	0.70 (3H, <i>d</i> , 6.9)	0.70 (3H, <i>d</i> , 6.9)	0.71 (3H, <i>d</i> , 7.0)	0.71 (3H, <i>d</i> , 7.0)
19	2.25 (3H, <i>s</i>)	2.25 (3H, <i>s</i>)	2.29 (3H, <i>s</i>)	2.29 (3H, <i>s</i>)
20	1.15 (3H, <i>d</i> , 6.9)	1.15 (3H, <i>d</i> , 6.9)	1.19 (3H, <i>d</i> , 6.8)	1.19 (3H, <i>d</i> , 6.8)
1'	5.13 (1H, <i>d</i> , 3.4)	5.13 (1H, <i>d</i> , 3.4)	5.04 (1H, <i>d</i> , 3.8)	5.04 (1H, <i>d</i> , 3.8)
2'	4.17 (1H, <i>br d</i> , 9.9)	4.17 (1H, <i>br d</i> , 10.0)	3.96 (1H, <i>dd</i> , 10.0, 3.8)	3.96 (1H, <i>dd</i> , 10.0, 3.8)
3'	4.12 (1H, <i>dd</i> , 9.9, 3.5)	4.12 (1H, <i>br s</i>)	4.07 (1H, <i>dd</i> , 10.0, 3.2)	4.07 (1H, <i>dd</i> , 10.0, 3.2)
4'	4.09 (1H, <i>br s</i>)	3.86 (1H, <i>br d</i> , 3.2)	3.86 (1H, <i>br d</i> , 3.2)	3.86 (1H, <i>br d</i> , 3.2)
5'	3.84 (1H, <i>dd</i> , 12.6, 1.7)	3.84 (1H, <i>dd</i> , 12.0, 1.7)	4.51 (1H, <i>q</i> , 6.6)	4.51 (1H, <i>q</i> , 6.6)
	4.34 (1H, <i>d</i> , 12.6)	4.34 (1H, <i>d</i> , 12.0)		
6'	-	-	1.34 (3H, <i>d</i> , 6.6)	1.34 (3H, <i>d</i> , 6.6)
OH	8.38 (1H, <i>br s</i>)	8.38 (1H, <i>br s</i>)	8.33 (1H, <i>br s</i>)	8.33 (1H, <i>br s</i>)

Adicionalmente, se observaron en los espectros dos señales que integran cada una para un protón, en δ 3.11 (1H, *m*) y 2.62 (1H, *m*) para el compuesto **4** y en δ 3.14 (1H, *m*) y 2.63 (1H, *m*) para el compuesto **5**, características de los hidrógenos alílicos H-1 y H-4 y una señal triplete alrededor de δ 5.15 (1H, *t*, *J* = 7.1) en ambos espectros, correspondiente a un protón sobre enlace olefínico propio del protón H-14, el cual junto con las señales singletes de los dos metilos sobre enlace olefínico CH₃-17 y CH₃-16, arriba mencionadas, conforman la unidad isopropilideno en las dos *seco*-Ps. Hacia

campo bajo en los espectros, se observó también una señal de un protón aromático en δ 6.49 (1H, s) en ambos compuestos, la cual junto con un índice de deficiencia de hidrógenos de siete calculado desde el ión molecular, evidencian un sistema aromático pentasustituido en la aglicona, el cual tiene como uno de sus sustituyentes un grupo –OH fenólico (señal en δ 8.38 (1H, *brs*) para el compuesto **4** y en δ 8.33 (1H, *brs*) para el compuesto **5**).

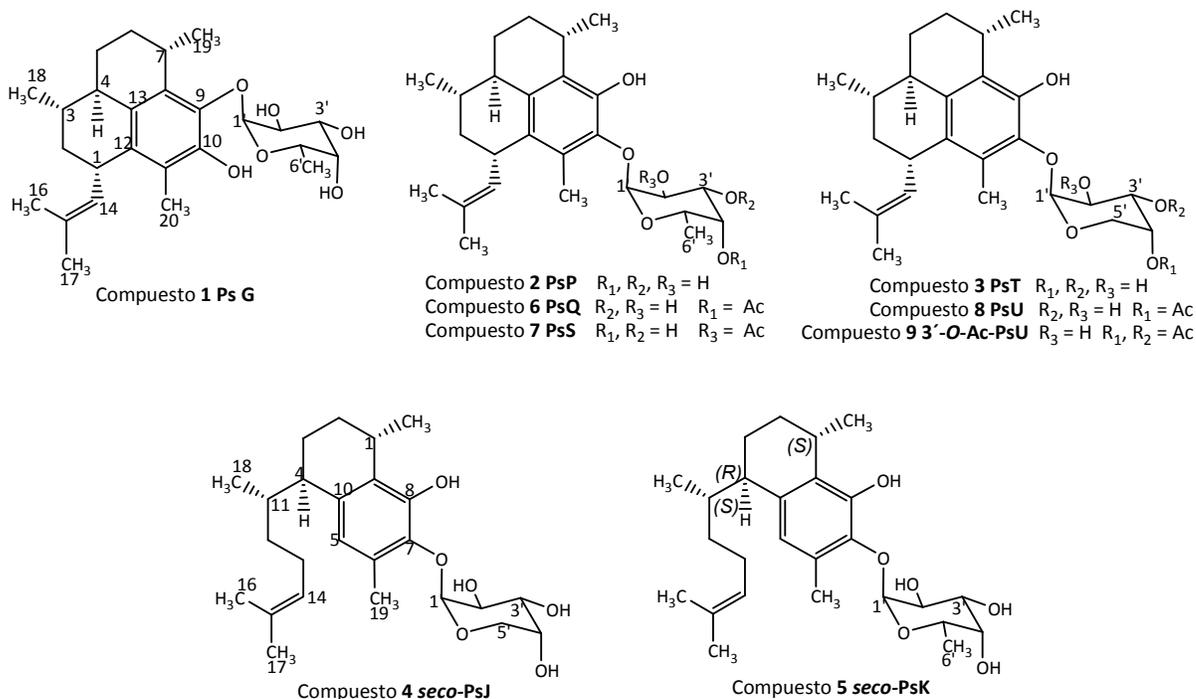


Figura 2-4 Estructura química de las Ps y *seco*-Ps (Compuestos **1-9**) aisladas de *P. elisabethae* de la Isla de Providencia (Caribe Sur-Occidental)

La asignación de las señales de la aglicona de los compuestos **4** y **5** se realizó por comparación con los datos reportados en la literatura para los compuestos tipo *seco*-Ps aisladas de especímenes de la Isla de Providencia (*seco*-PsJ y *seco*-PsK) (Duque *et al.*, 2006; Correa, 2005 y 2007) (Tabla 2-3). Todo lo anterior evidenció la presencia de agliconas de *seco*-Ps para estos dos compuestos.

Aunque ambos compuestos evidenciaron una amplia similitud entre ellos con respecto a las señales de la aglicona, se presentaron algunas diferencias notables en sus espectros de RMN 1H para las señales que aparecen en la zona entre δ 3-5 (región de protones de azúcar), además de una señal de un metilo adicional para el compuesto **5**.

Específicamente, para el compuesto **4** aparecen además cinco señales en la zona entre δ 3-5 (región de protones de azúcar), las cuales junto con la señal del protón anomérico en δ 5.13 (1H, *brd*, $J = 3.4$ Hz) muestran la presencia de una pentosa. La comparación de estos datos con los reportados en la literatura (Tabla 2-3) para los valores de los desplazamientos químicos y el valor de las constantes de acoplamiento permiten asignar el azúcar como β -arabinosa (Duque *et al.*, 2004; 2006, Correa, 2005).

Para el caso del compuesto **5** aparecen además cuatro señales en la zona entre δ 3-5, las cuales junto con la señal del protón anomérico en δ 5.04 (1H, *d*, $J = 3.8$ Hz) y la señal doblete del metilo en δ 1.34 (3H, *d*, $J = 6.6$ Hz) muestran la presencia de una deoxihexosa. La comparación de estos datos con los reportados en la literatura (Tabla 2-3) para los valores de los desplazamientos químicos y el valor de las constantes de acoplamiento permiten asignar el azúcar como α -fucosa (Duque *et al.*, 2004; 2006, Correa, 2007).

Todo el análisis anterior y la comparación de los desplazamientos de RMN ^1H con los reportados en la literatura (Tabla 2-3), permiten concluir que el compuesto **4** corresponde a la *seco*-PsJ y el compuesto **5** a la *seco*-PsK (Figura 2-4), ambas aisladas previamente por nosotros en especímenes de *P. elisabethae* recolectados en la Isla de Providencia (Duque *et al.*, 2004, 2006; Correa, 2005, 2007).

A manera de conclusión de la primera parte de este trabajo puede mencionarse que se lograron aislar mediante cromatografía flash y CLAE en fase reversa e identificar por métodos espectroscópicos convencionales (RMN ^1H y EM de ionización suave) las PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, 3-O-acetil-PsU, *seco*-PsJ, *seco*-PsK (Figura 2-4), con el fin de ampliar su potencial de aplicación, particularmente en lo que concierne a su actividad citotóxica, antimicrobiana y *antifouling* resultados que se presentan a continuación.

2.2 Ampliación del potencial de aplicación de las Ps y las seco-Ps

Si bien ha habido un gran esfuerzo para determinar la actividad biológica de las Ps y seco-Ps aisladas de muestras de *P. elisabethae* recolectadas en el norte del Mar Caribe, aún es muy poco lo conocido sobre la bioactividad de los compuestos aislados de *P. elisabethae* recolectado en la Isla de Providencia. Por esta razón, y con el objetivo de ampliar el potencial de estos compuestos y como continuación de la fase inicial del presente trabajo en donde se realizó nuevamente el aislamiento e identificación de las PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, 3-O-acetil-PsU, seco-PsJ, seco-PsK (Figura 2-5), a partir de muestras de este octocoral recolectado en la Isla de Providencia y junto con la MEDNG aislada en trabajos previos de *P. elisabethae* de la Isla de San Andrés (Figura 1-2), (Arias, 2004), se determinó por primera vez su perfil antimicrobiano contra cuatro microorganismos patógenos (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*), y adicionalmente, se estableció un perfil citotóxico más completo de estas sustancias contra cinco líneas celulares humanas (HeLa (cáncer cervical), PC-3 (cáncer de próstata), HCT116 (cáncer colorectal), MCF-7 y BJ (fibroblastos normales de piel)).

2.2.1. Actividad citotóxica de las Ps, seco-Ps y MEDNG contra líneas celulares humanas

La actividad citotóxica de las PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, 3-O-acetil-PsU, seco-PsJ, seco-PsK y MEDNG se determinó mediante el ensayo de reducción colorimétrica MTT contra cinco líneas celulares HeLa (cáncer cervical), PC-3 (cáncer de próstata), HCT116 (cáncer colorrectal), MCF-7 (cáncer de mama) y BJ (fibroblastos) (Mosmann, 1983). Aunque ningún compuesto mostró actividad significativa, de acuerdo con el valor mínimo de GI_{50} valor de 10 nM para compuestos puros sugerido por Bugelski y colaboradores (2000), todos los compuestos evaluados mostraron actividad de moderada a débil (GI_{50} 5.8-83.9 μ M) y no selectiva contra las líneas celulares tumorales y normales, como se muestra en la Tabla 2-4

Aunque ninguno de estos compuestos mostró una actividad comparable al fármaco de referencia estaurosporina (GI_{50} 13.6-105.6 nM) frente a las cuatro líneas de células

tumorales, las PsQ y PsG fueron los compuestos más activos (GI_{50} valores entre 5.8 μ M a 12.0 μ M) y MEDNG mostró moderada actividad con GI_{50} de 9.7-19.9 μ g/mL. Estos resultados son comparables a los publicados por Rodríguez *et al.* (2004), donde determinaron los valores de GI_{50} de las PsQ, PsU y PsV frente a la línea celular NCI-H460, la PsQ presentó un GI_{50} entre 1.7 a 5.8 μ M. En el mismo *screening*, las PsU y PsV fueron en general menos tóxicas (GI_{50} 20-100 μ M). Para la línea celular normal BJ (Tabla 2-4), las PsS, 3-O-acetil-PsU, PsP, PsT y *seco*-PsJ no mostraron un efecto citotóxico considerable ($GI_{50} > 10$ μ M), mientras que PsQ, PsG, *seco*-PsK y PsU mostraron actividad citotóxica moderada (GI_{50} 4.5-9.3 μ M). La MEDNG mostró una actividad moderada con GI_{50} 8.3 μ g/mL.

Si bien estos resultados muestran que las Ps, *seco*-Ps y la MEDNG presentan una actividad citotóxica moderada, estos compuestos podrían representar el punto de partida para realizar modificaciones químicas de los mismos, con el fin de mejorar su actividad, por ejemplo la hecha a la PsA a través de la metilación del grupo fenólico, para producir el derivado sintético metopterosina, el cual mostró una mejor actividad anti-inflamatoria inicial, permitiendo continuar con los siguientes estudios en fases clínicas (Mayer *et al.*, 2010). Asimismo, sería importante realizar estudios farmacológicos, en donde se evalúen las Ps, *seco*-Ps y la MEDNG como coadyuvantes que potencialicen el efecto de otras drogas anticáncer conocidas.

La selectividad de la actividad citotóxica de los compuestos, medido como el efecto diferencial en el crecimiento de diferentes tipos de líneas celulares, se hizo comparando el efecto de los compuestos para inhibir el crecimiento en células normales y tumorales. Los resultados no mostraron selectividad de los compuestos frente a las líneas utilizadas, y todos los compuestos indujeron la reducción de la supervivencia celular en una magnitud similar en todas las líneas.

Tabla 2-4 Actividad citotóxica de las Ps, *seco*-Ps y la MEDNG aisladas de *P. elisabethae* (Caribe Sur-Occidental) contra líneas tumorales humanas (HeLa, PC-3, HCT116, MCF-7) y células normales (BJ)

Compuestos	GI ₅₀ ± E.S (µM)				
	BJ	HCT116	PC-3	MCF7	HeLa
PsG	7.62 ± 0.38	12.04 ± 0.36	8.83 ± 0.54	9.42 ± 0.43	9.22 ± 0.45
PsP	10.40 ± 0.42	17.89 ± 0.45	13.77 ± 0.58	12.58 ± 0.45	10.31 ± 0.49
PsQ	4.47 ± 0.31	7.66 ± 0.27	7.81 ± 0.35	8.44 ± 0.41	5.82 ± 0.33
PsS	29.14 ± 0.45	33.50 ± 0.33	52.05 ± 0.31	26.25 ± 0.45	13.79 ± 0.39
PsT	12.94 ± 0.37	24.24 ± 0.42	21.99 ± 0.46	14.72 ± 0.46	14.58 ± 0.35
PsU	9.35 ± 0.34	23.44 ± 0.40	24.81 ± 0.34	26.46 ± 0.46	15.63 ± 0.32
3-O-acetil-PsU	62.03 ± 0.45	20.48 ± 0.48	26.45 ± 0.31	83.93 ± 0.39	44.61 ± 0.35
<i>seco</i> -PsJ	15.00 ± 0.35	31.68 ± 0.32	37.21 ± 0.41	28.02 ± 0.51	21.08 ± 0.37
<i>seco</i> -PsK	8.28 ± 0.29	13.28 ± 0.27	13.57 ± 0.38	11.45 ± 0.36	15.83 ± 0.18
MEDNG*	7.91 ± 0.17	19.90 ± 0.19	12.11 ± 0.20	9.67 ± 0.15	11.20 ± 0.15
Estaurosporina**	13.56 ± 0.35	45.56 ± 0.45	61.82 ± 0.38	176.6 ± 0.38	105.6 ± 0.41

*GI₅₀ (µg/mL), **GI₅₀ (nM)

Se pueden obtener algunas conclusiones preliminares de relaciones estructura-actividad teniendo en cuenta la actividad citotóxica. La posición de la glicosidación en el esqueleto del terpeno parece afectar el perfil de la actividad citotóxica, por ejemplo, la PsG (glicosidada en C-9 con fucopiranososa) es más activa que la PsP (glicosidada en C-10 con fucopiranososa). Además, el tipo de azúcar también influye en la actividad, por ejemplo, la PsP (glicosidada con fucopiranososa) es más activa que la PsT (glicosidada con arabinopiranososa). Del mismo modo, la PsQ (glicosidada con fucopiranososa C-4' acetilada) es más activa que la PsU (glicosidada con arabinopiranososa C-4' acetilada) y la *seco*-PsK (glicosidada con fucopiranososa) es más activa que la *seco*-PsJ (glicosidada con arabinopiranososa).

2.2.2. Actividad antimicrobiana de las Ps, *seco*-Ps y MEDNG contra microorganismos patógenos

La actividad antimicrobiana de las Ps, *seco*-Ps y MEDNG fue estudiado frente a una bacteria Gram-negativa (*P. aeruginosa*), dos bacterias Gram-positivas (*S. aureus* y *E. faecalis*) y una levadura (*C. albicans*), utilizando el método de microdilución (Vasková *et al.*, 2009). La mayoría de los compuestos evaluados mostraron un buen IC₅₀ (2.9-7.6 µM) y todos mostraron una actividad selectiva contra las bacterias Gram-positivas analizadas (Tabla 2-5), mientras que no mostraron actividad contra la bacteria Gram-negativa ni contra la levadura.

Las PsU, PsQ, PsS, *seco*-PsK y PsG fueron los compuestos más activos (IC_{50} 2.3-4.5 μ M) frente a *S. aureus*. La MEDNG mostró una buena actividad con IC_{50} 2.3 μ g/mL. Contra *E. faecalis*, las PsG, PsU y *seco*-PsK mostraron una mejor actividad (Tabla 2-5) en comparación con el fármaco de referencia la vancomicina (4.2 μ M), mientras que, la *seco*-PsJ y la PsT mostraron una actividad similar. La MEDNG mostró una buena actividad con IC_{50} 3.5 μ g/mL. Estos resultados son comparables con la actividad reportada para las PsA-E, PsK, PsX y PsY aisladas de especímenes recolectados en el Norte del Caribe (Ata *et al.*, 2004), con valores de concentración inhibitoria mínima (MIC), entre 4.2 y 8.8 μ M.

Tabla 2-5 Actividad antibacterial de las Ps, *seco*-Ps y la MEDNG aisladas de *P. elisabethae* (Caribe Sur-Occidental) contra dos bacterias Gram-positivas

Compuestos	$IC_{50} \pm E.S$ (μ M) *	
	<i>E. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>
Psg	3.14 \pm 0.22	4.48 \pm 0.18
PsP	37.35 \pm 0.29	14.91 \pm 0.20
PsQ	7.38 \pm 0.16	3.30 \pm 0.20
PsS	20.20 \pm 0.25	3.89 \pm 0.23
PsT	4.38 \pm 0.16	5.39 \pm 0.25
PsU	3.19 \pm 0.25	2.97 \pm 0.17
3-O-Ac-PsU	7.64 \pm 0.16	20.23 \pm 0.19
<i>seco</i> -PsJ	4.08 \pm 0.19	6.52 \pm 0.12
<i>seco</i> -PsK	3.82 \pm 0.21	4.20 \pm 0.16
MEDNG	3.47 \pm 0.15	2.33 \pm 0.09
Vancomicina	4.21 \pm 0.11	-
Penicilina G	-	1.61 \pm 0.08

*Todos los compuestos evaluados fueron inactivos contra la bacteria Gram-negativa *P. aeruginosa* y la levadura *C. albicans*.

La selectividad observada en el presente estudio es comparable a la reportada por Ata *et al.* (2004), quien informó que otras pseudopterosinas (PsA-E, PsK, PsX y PsY) inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas (*S. pyogenes*, *S. aureus* y *E. faecalis*), mientras que son inactivas contra bacterias Gram-negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*). Esta actividad puede estar relacionada con el hecho de que muchas bacterias Gram-negativas son resistentes a agentes tóxicos del medio ambiente, debido a la barrera de lipopolisacáridos de su membrana externa (Morton *et al.*, 1998).

El análisis de los datos presentados en la Tabla 2-5 sugiere las siguientes relaciones estructura-actividad; En primer lugar, la PsG (glicosidada en C-9 con fucopiranososa) es más activo que la PsP (glicosidada en el C-10 con fucopiranososa). En segundo lugar, la PsT (glicosidada con arabinopiranososa) es más activa que la PsP (glicosidada con fucopiranososa). Del mismo modo, PsU (con arabinosa mono acetilada) es más activa que las PsQ y PsS (con fucosa mono acetilada). Sin embargo, este comportamiento observado inicialmente en la Ps (esqueleto anfilectano) no se conserva cuando se comparan los resultados con la *seco*-Ps (esqueleto serrulatano), donde, la *seco*-PsK (glicosidada con fucopiranososa) fue más activa que la *seco*-PsJ (glicosidada con arabinopiranososa). Claramente, se requiere trabajo adicional para comprender plenamente las relaciones estructura-actividad de esta familia de terpenos.

Todos los resultados mostrados hasta el momento, amplían el potencial de aplicación de los compuestos aislados de *P. elisabethae*, donde previamente en ensayos de actividad anti-inflamatoria *in vitro*, las, PsQ, PsS, PsT y PsU mostraron niveles más altos de inhibición de la liberación de MPO que los exhibidos por los estándares dexametasona e indometacina, además las PsP y PsT también inhibieron la liberación de NO y las PsQ, PsS y PsU fueron potentes agentes captadores de NO (Correa *et al.*, 2009).

De la discusión anterior, se puede aseverar que las Ps, *seco*-Ps y la MEDNG aisladas a partir de *P. elisabethae* Colombiano, tienen un potencial *drug-like* como agentes anti-inflamatorios, antimicrobianos y citotóxicos, similar a los compuestos relacionados aislados a partir de especímenes recolectados en el Norte del Caribe (Las Bahamas, Bermudas y cayos de la Florida). Además, debido al amplio potencial de estas sustancias como aditivos comerciales en la industria cosmética, sería importante considerar al octocoral *P. elisabethae* recolectado en aguas colombianas como una fuente alternativa de tales compuestos.

Hasta el momento, los resultados obtenidos han mostrado que el gorgónido *P. elisabethae* de la Isla de Providencia es un recurso altamente promisorio, por esta razón se debe empezar a considerar cómo obtener cantidades suficientes de cada uno de estos compuestos para continuar con las fases posteriores de este estudio de bioprospección, por ejemplo la continuación de los ensayos farmacológicos encaminados

a completar los ensayos preclínicos y a empezar los ensayos clínicos, y finalmente continuar con la implementación de la comercialización de los mismos en la industria farmacéutica y cosmética.

Sin embargo, la brecha entre el potencial y la aplicación de las Ps y seco-Ps con actividad biológica explotable está directamente limitada por la poca disponibilidad de *P. elisabethae* en la Isla de Providencia, lo cual repercute negativamente en su desarrollo como producto comercial (Carter, 2002), razón por la cual se hace necesario buscar un método conveniente para la producción sustentable de Ps y seco-Ps, es así que en el presente trabajo se planteó como fuente alterna de estos compuestos, estudiar los microorganismos simbiotes aislados de *P. elisabethae* de Colombia, teniendo especial énfasis en las bacterias, ya que reportes previos han demostrado que células de *Symbiodinium* sp., purificado a partir del holobionte *P. elisabethae* recolectado en Las Bahamas, fueron capaces de convertir $^{14}\text{C-NaHCO}_3$ y $^3\text{H-geranil-geranil difosfato}$ marcados radioactivamente a uno de los primeros intermediarios biosintéticos de las Ps, el diterpeno elisabetatrieno, como también a las PsA-D (Mydlarz *et al.*, 2003). Estos resultados que sugirieron al simbiote dinoflagelado como la fuente biosintética de las Ps, sin embargo, no fue probado que la preparación en sí, de las células de los dinoflagelados estuviera libre de células bacterianas y considerando que los dinoflagelados pueden hospedar un conjunto de microorganismos bacterianos (Ashton *et al.*, 2003), la fuente biosintética de las Ps permanece sin elucidar.

Teniendo en cuenta lo anterior, las siguientes fases de este trabajo consistieron en el estudio de la determinación de la composición de la comunidad bacteriana asociada con *P. elisabethae* de la Isla de Providencia a través de métodos dependientes e independientes de cultivo, con el fin de aislar y caracterizar estos microsimbiontes asociados con este octocoral y posteriormente evaluar la capacidad de las bacterias simbiotes cultivables para producir compuestos químicos (bioactivos y no bioactivos). Estos serán los temas de las secciones 2.3 y 2.5.

2.3 Determinación de la composición de la comunidad bacteriana asociada con *P. elisabethae*

A pesar del potencial terapéutico de las Ps y *seco*-Ps aisladas de *P. elisabethae* (Rodríguez *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2009, 2011a; Sección 2.2), la ausencia de una fuente sustentable (*reliable supply*) de estos compuestos, ha retrasado su evaluación en los ensayos preclínicos y clínicos. Específicamente, para los animales recolectados en la Isla de Providencia, métodos alternos como la extracción directa, la maricultura, la acuicultura y la síntesis, han sido descartados, debido a que estos son generalmente muy difíciles de llevar a cabo y a menudo resultan en rendimientos muy bajos de los metabolitos de interés (Koopmans *et al.*, 2009; Page *et al.*, 2010), razón por la cual, otros métodos para la producción deben ser considerados.

Revisando la literatura durante los últimos años, una creciente evidencia ha implicado a las bacterias simbióticas como la fuente biosintética de algunos metabolitos previamente atribuidos a los invertebrados holobiontes marinos (Stierle *et al.*, 1988; Shigemori *et al.*, 1992; Oclarit *et al.*, 1994; Hildebrand *et al.*, 2004; Piel *et al.*, 2004; Flatt *et al.*, 2005; Ridley *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2005; Sudek *et al.*, 2007).

Así, como una continuación del presente trabajo se sugirió como método conveniente para la producción sustentable de las Ps y *seco*-Ps, evaluar el potencial de bacterias simbiotes aisladas de *P. elisabethae* de la Isla de Providencia, como posibles productores de estos compuestos u otros compuestos con actividad biológica, debido a que reportes previos de *P. elisabethae* recolectado en otra locación (Las Bahamas), demostraron que *Symbiodinium* sp., su microalga asociada, no es el microorganismos responsable de la producción de estos diterpenos (Kerr R. Comunicación personal)

Además de acuerdo a lo anterior el explorar la comunidad bacteriana asociada con *P. elisabethae* puede además de ampliar los estudios de biodiversidad en el país, dando a conocer la composición de los simbiotes bacterianos, brindar un punto de partida para direccionar experimentos apropiados que den indicios acerca del verdadero productor de los compuestos mencionados (Sección 2.5), destacando además que según recientes reportes, los simbiotes microbianos contribuyen significativamente al comportamiento y funcionamiento del holobionte, incluyendo el ciclo biogeoquímico y la resistencia a

patógenos (Mouchka *et al.*, 2010). Adicionalmente, vale la pena resaltar de esta parte del trabajo que hasta la fecha, este estudio provee el primer análisis de la comunidad bacteriana asociada con un octocoral de agua superficial (entre 0 y 30 m, Olson y Kellogg, 2010), lo cual lo convierte en un trabajo novedoso tanto desde el punto de vista biológico, como desde el punto de vista químico, al brindar nuevos organismos con el fin de realizar su exploración como bacterias productoras de sustancias químicas (bioactivas o no bioactivas).

Para conocer acerca de la comunidad bacteriana asociada con especímenes de *P. elisabethae* recolectados en la Isla de Providencia, se intentó caracterizar la comunidad bacteriana usando dos metodologías: dependientes de cultivo e independientes de cultivo. El aislamiento de la comunidad bacteriana simbiote cultivable de *P. elisabethae* se realizó empleando técnicas tradicionales de cultivo en varios medios y sus afiliaciones taxonómicas fueron determinadas por la secuenciación parcial del gen 16S rRNA. El análisis de la comunidad bacteriana total se realizó por la técnica independiente de cultivo de pirosecuenciación parcial (bTEFAP *bacterial tag-encoded FLX-Titanium amplicon pyrosequencing*) del 16S rDNA de la comunidad bacteriana, generados por PCR a partir del DNA genómico total purificado de tres individuos de *P. elisabethae*.

Para ello, una vez las muestras de *P. elisabethae* fueron recolectadas, éstas fueron lavadas exhaustivamente con agua de mar estéril (ASW), con el fin de evitar uno de los problemas más comunes en estudios que empleen técnicas dependiente e independientes de cultivo, debido a la contaminación de las muestras por parte de bacterioplankton presente en la columna de agua mar. Adicionalmente, como control de las bacterias asociadas al octocoral, en el método dependiente de cultivo una muestra de agua alrededor del octocoral fue cultivada a la par bajo las mismas condiciones empleadas para el aislamiento de las bacterias asociadas con el octocoral.

2.3.1 Caracterización de la comunidad bacteriana cultivable asociada con *P. elisabethae* por métodos dependientes de cultivo

Con el fin de aislar y cultivar el mayor número de bacterias asociadas con *P. elisabethae*, se homogeneizaron colonias del octocoral en PBS (aislamiento de bacterias epifíticas y

endofíticas), y con ayuda de un hisopo de algodón estéril fue raspada la superficie del octocoral (aislamiento de las bacterias epifíticas), logrando aislar en total de 208 aislamientos bacterianos usando técnicas de cultivo aeróbico estándar en dos medios: agar marino Difco 2216 y agar Sabouraud-Dextrosa (SD), los cuales varían en la fuente de carbono y nitrógeno. Las cepas bacterianas aisladas fueron inicialmente agrupadas de acuerdo a la fuente de donde fueron aisladas (H homogeneizado de octocoral, S: superficie del octocoral y W: agua de mar alrededor del octocoral) también por sus características microscópicas y macroscópicas junto con tinción de Gram (Tabla 2-6). El análisis por RFLP (Restriction fragment length polymorphism) de los amplicones del gen 16S rRNA empleando por separado dos enzimas de restricción (*HhaI* y *HaeIII*) permitió identificar 81 grupos de secuencias, de las cuales dos representantes de cada grupo fueron secuenciadas las regiones variables V1-V3 del gen 16S rRNA. La comparación de las secuencias resultantes reveló 40 grupos de secuencias que comparten $\geq 99\%$ de similitud. Por otro lado, aunque es ampliamente aceptado como definición de una nueva especie bacteriana basada en la identidad de la secuencia del gen 16S rRNA cuando ésta es $\geq 97\%$ (Stackebrandt y Goebel, 1994; Drancourt y Raoult, 2005), en muchos casos este valor puede ser demasiado conservador, particularmente cuando se investigan bacterias capaces de producir metabolitos secundarios bioactivos (Jensen, 2010).

Finalmente cada representante de las 40 secuencias del gen 16S rRNA fueron alineadas con secuencias de genes de 16S rRNA de cepas relacionadas, las cuales fueron identificadas a través de la búsqueda basada en BLASTn hecha en la base de datos del GenBank. El aliniamiento múltiple fue usado para comparar las secuencias y generar una matriz de similitud con las distancias genéticas (p y Kimura 2 parametro). Los árboles filogenéticos fueron construidos usando el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), con el fin de elucidar la relación taxonómica entre los aislamientos pertenecientes a los *phyla* Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria (Figura 2-5).

Tabla 2-6. Porcentaje de similitud y distancia Kimura 2 parametros de las 40 bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae* comparada con las especies más similares encontradas en la base de datos

Aislamiento	Fuente ^a	No. Acceso al GenBank	Tincion Gram	Asociacion Filogenetica ^b	Secuencia más similar No. Acceso GenBank (% de similitud) ^b	Parametro distancia Kimura 2 ^c
ACTINOBACTERIA (12)						
RKHC-35	S	JQ282807	+	Corynebacterinea	<i>Corynebacterium afermentas</i> ATCC 51403 (X82054.1) (98.23%)	98.23
RKHC-59B	H	JQ282810	+	Corynebacterinea	<i>Dietzia schimae</i> DSM 45139 (EU375845.1) (100.0%)	100.0
RKHC-26	S	JQ282804	+	Corynebacterinea	<i>Rhodococcus baikonurensis</i> DSM 44587 (AB071951.1) (100.0%)	100.0
RKHC-66A	S-H	JQ282811	+	Micrococcineae	<i>Brevibacterium casei</i> ATCC 35513 (AJ251418.1) (99.40%)	99.40
RKHC-70A	H	JQ282812	+	Micrococcineae	<i>Brevibacterium casei</i> ATCC 35513 (AJ251418.1) (99.40%)	99.40
RKHC-33	S-W	JQ282806	+	Micrococcineae	<i>Brachybacterium conglomeratum</i> DSM 10241 (AB537169.1) (100.0%)	100.0
RKHC-11	S	JQ282803	+	Micrococcineae	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i> DSM 13468 (AJ277840.1) (99.90%)	99.90
RKHC-45	S	JQ282808	+	Micrococcineae	<i>Microbacterium luteolum</i> ATCC 51474 (AB004718.1) (99.50%)	99.50
RKHC-27	H	JQ282805	+	Micrococcineae	<i>Arthrobacter koreensis</i> NBRC 16787 (AY116496.1) (100.0%)	100.0
RKHC-10	H	JQ282802	+	Micrococcineae	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 (Y16263.1) (100.0%)	100.0
RKHC-49	S	JQ282809	+	Micrococcineae	<i>Kocuria kristinae</i> ATCC 27570 (X80749.1) (99.75%)	99.75
RKHC-71A	S-H	JQ282813	+	Micrococcineae	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 4698 (AJ536198.1) (99.75 %)	99.75
FIRMICUTES (15)						
RKHC-68A	S-H-W	JQ282823	+	Bacillaceae	<i>Bacillus horneckiae</i> MTCC 9535 (EU861362.1) (100.0%)	100.0
RKHC-13	S-H-W	JQ282815	+	Bacillaceae	<i>Bacillus firmus</i> ATCC 14575 (D16268.1) (94.29%)	94.29
RKHC-21	S	JQ282816	+	Bacillaceae	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 (CP000002.3) (99.68%)	99.68
RKHC-37	S-H-W	JQ282818	+	Bacillaceae	<i>Bacillus mojavensis</i> ATCC 51516 (AB021191.1) (99.68%)	99.68
RKHC-57A		JQ282821	+	Bacillaceae	<i>Bacillus pumillus</i> ATCC 7061 (AY876289.1) (100.0%)	100.0
RKHC-69A	S-H-W	JQ282824	+	Bacillaceae	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578 (AB190217.1) (99.68%)	99.68
RKHC-9	S-H	JQ282814	+	Bacillaceae	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579 (AE016877.1) (100.0%)	100.0
RKHC-62B	S-H	JQ282822	+	Bacillaceae	<i>Oceanobacillus profundis</i> DSM 18246 (DQ386635.1) (99.70%)	99.70
RKHC-82A	H	JQ282828	+	Bacillaceae	<i>Oceanobacillus iheyensis</i> DSM 14371 (AB010863.2) (99.46%)	99.46
RKHC-8	S-H	JQ282827	+	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i> ATCC 49278 (AB073189.1) (100.0%)	100.0
RKHC-78A	S	JQ282825	+	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 (D83363.1) (100.0%)	100.0
RKHC-78B	S	JQ282826	+	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836 (L37603.1) (100.0%)	100.0
RKHC-54	H	JQ282820	+	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus equorum</i> ATCC 43958 (AB009939.1) (100.0%)	100.0
RKHC-48	S	JQ282819	+	Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus auricularis</i> ATCC 33753 (D83358.1) (99.77%)	99.77
RKHC-28	H	JQ282817	+	Staphylococcaceae	<i>Jeotgalicoccus aerulatos</i> DSM 22420 (GU295939.1) (99.83%)	99.83

PROTEOBACTERIA (13)						
RKHC-77B	H	JQ282841	-	Alphaproteobacteria	<i>Paracoccus chinensis</i> NBRC 104937 (EU660389.1) (100.0%)	100.0
RHHC-14	S-H	JQ282831	-	Alphaproteobacteria	<i>Ruegeria atlantica</i> ATCC 700000 (D88526.1) (97.85%)	97.85
RKHC-1	W	JQ282830	-	Alphaproteobacteria	<i>Erythrobacter citrius</i> DSM 14432 (AF118020.1) (99.83%)	99.83
RKHC-60A	S-W	JQ282835	-	Betaproteobacteria	<i>Tetrathiodacter mimigardefordensis</i> DSM 17166 (AY880023.1) (99.73%)	99.73
RKHC-12	H	JQ282829	-	Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter lwoffii</i> ATCC 15309 (X81665.1) (100.0%)	100.0
RKHC-61A	S	JQ282836	-	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas grimonti</i> ATCC BAA-140 (AF268029.1) (100.0%)	100.0
RKHC-25	S	JQ282833	-	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas oleovorans</i> ATCC 8062 (D84018.1) (99.70%)	99.70
RKHC-42	S-H	JQ282834	-	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas moraviensis</i> DSM 16007 (AY970952.1) (99.40%)	99.40
RKHC-23	S-W	JQ282832	-	Gammaproteobacteria	<i>Photobacterium eurosenbergii</i> LMG 22223T (AJ842344.1) (99.76%)	99.76
RKHC-63B	H	JQ282837	-	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio hollisae</i> ATCC 33564 (AJ514909.1) (99.83%)	99.83
RKHC-67B	S	JQ282838	-	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio sinaloensis</i> CAIM 797 (DQ451211.1) (100.0%)	100.0
RKHC-76A	S	JQ282839	-	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio proteolyticus</i> ATCC 15338 (X74723.1) (99.70%)	99.70
RKHC-76B	S-H	JQ282840	-	Gammaproteobacteria	<i>Vibrio communis</i> LMG 25430 (GU078672.1) (100.0%)	100.0

^a Asociación filogenética a nivel de sub-orden para las Actinobacteria, a nivel de familia para las Firmicutes y a nivel de clase para las Proteobacteria. ^b % de similitud estimado por la divergencia entre las secuencias, calculado con el número de diferencias de bases por sitio (Distancia p: es la proporción (p) de sitios de nucleótidos en la cual dos secuencias comparadas son diferentes). ^c Kimura 2 parámetros: estimado por la divergencia evolutiva entre las secuencias, calculado con el número de sustituciones de bases por sitio. Los análisis fueron realizados usando el método de parámetro de Kimura 2 (Parámetro de la distancia Kimura 2: Toma en cuenta las tasas de sustituciones transicionales y transversionales, mientras que se asume que la frecuencia de los cuatro nucleótidos es la misma y las tasas de sustituciones no varía entre sitios)

Con base en la asignación taxonómica, las 40 bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae*, fueron clasificadas (Figura 2-5) dentro de tres diferentes *phyla*: Actinobacteria (12 cepas), Firmicutes (15 cepas) y Proteobacteria (13 cepas) (Tabla 2-6). La mayoría de aislamientos pertenecieron a las clases Bacilli (15 cepas) y Actinobacteria (12 cepas), el resto de los aislamientos fueron asignadas a las clases Gammaproteobacteria (9 cepas) Alphaproteobacteria (3 cepas) y Betaproteobacteria (1 cepas). La diversidad a nivel de género fue mayor dentro de las clases Actinobacteria (10 géneros), Bacilli (5 géneros) y Gammaproteobacteria (4 géneros). *Bacillus* fue el género más abundante con siete especies identificadas, seguido por *Staphylococcus* y *Vibrio* con cuatro especies cada uno, y *Pseudomonas* con tres especies. La divergencia (Porcentaje de identidad y la distancia Kimura 2 parámetros) (Kimura, 1980) entre las secuencias de los aislamientos de *P. elisabethae* y las cepas relacionadas más cercanas son mostradas en la Tabla 2-6.

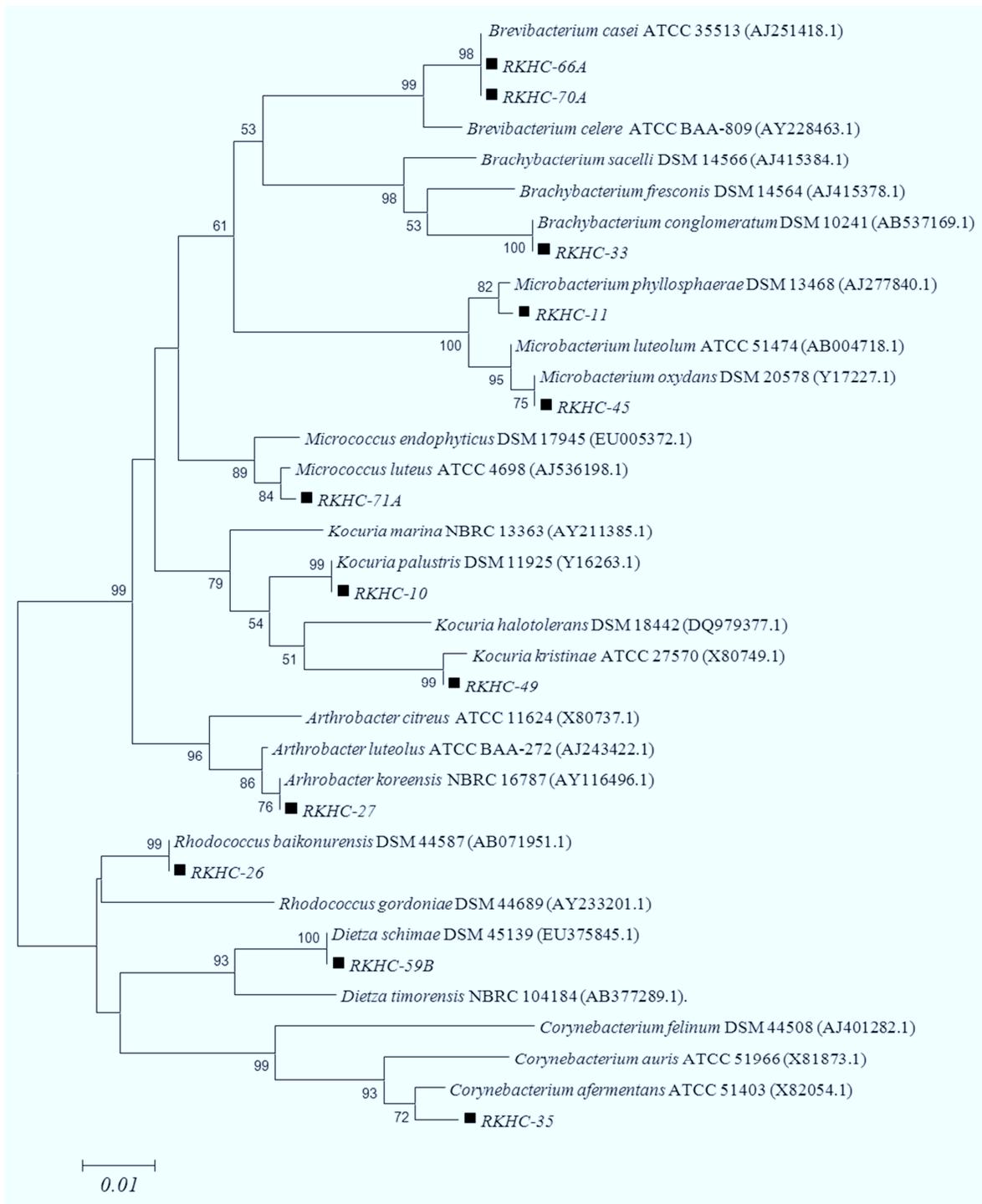
De acuerdo a estos resultados la comunidad bacteriana cultivable asociada con *P. elisabethae* está compuesta en similares proporciones por los *phyla* Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria (Tabla 2-6, Figura 2-5). Sin embargo, el *phylum* Actinobacteria (12 cepas) fue más diverso con el mayor número de géneros identificados, aunque este *phylum* solo pertenece a un único orden Actinomycetales, las bacterias pertenecientes a este orden fueron clasificadas en dos sub-órdenes Corynebacterinea (3 géneros) y Micrococccinea (6 géneros) de igual manera las bacterias del *phylum* Firmicutes (15 cepas) pertenecen a un único orden, Bacillales con 3 diferentes familias: Bacillaceae (2 géneros), Paenibacillaceae (1 género) y Staphylococcaceae (2 géneros). Por el contrario las bacterias del *phylum* Proteobacteria (13 cepas) fueron clasificadas dentro de cinco diferentes órdenes Rhodobacterales (3 géneros), Sphingomonadales (1 género), Burkholderiales (1 género), Pseudomonales (2 géneros) y Vibrionales (2 géneros).

La mayoría de las cepas tuvieron una clasificación satisfactoria con porcentajes de similitud mayores al 97.00% (nivel de especie). Sin embargo, la cepa RKHC-13 (*Bacillus firmus*) presentó un porcentaje de similitud del 94.29%. Experimentos adicionales deben ser hechos para elucidar la identidad de esta cepa, estos incluyen características morfológicas, perfiles bioquímicos, incluyendo ensayos enzimáticos de oxidasa y

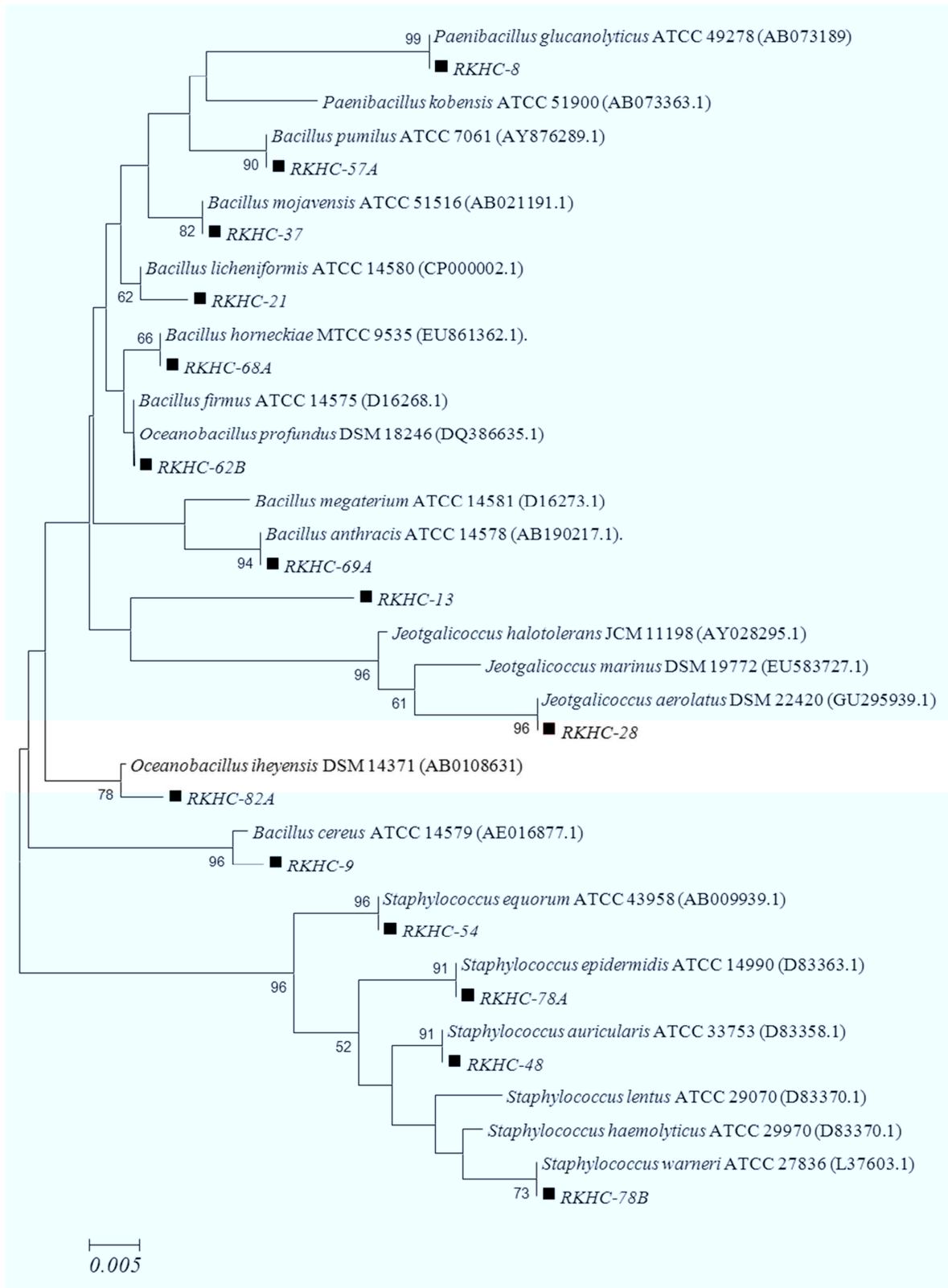
catalasa, de habilidad para metabolizar diferentes fuentes de carbohidratos y perfiles de susceptibilidad antibiótica (Drancourt y Raoult, 2005).

A través de la metodología usada tan solo podemos asegurar que 32 de las 40 bacterias aisladas son parte exclusiva de la microbiota natural asociada con *P. elisabethae*, de las 8 restantes, 7 de ellas (*Brachibacterium conglomeratum*, *Bacillus horneckiae*, *Bacillus firmu*, *Bacillus mojavenis*, *Bacillus anthracis*, *Tetrathiobacter mimigardefordensis* y *Photobacterium eurosenbergii*) fueron encontradas tanto en el octocoral (homogeneizado y la superficie) como en la muestra de agua de mar, es probable que éstas pertenezcan tanto a la microbiota del octocoral como de la columna de agua o sean contaminación de la primera. La última bacteria (*Erythrobacter citrius*) fue encontrada únicamente en la muestra de agua de mar. Las bacterias *Erythrobacter* spp., son bacterias aeróbicas, anoxigénicas y fototróficas, y por lo general se encuentran ubicuamente en aguas marinas (Koblížek *et al.*, 2003).

A. Actinobacteria



B. Firmicutes



C. Proteobacteria

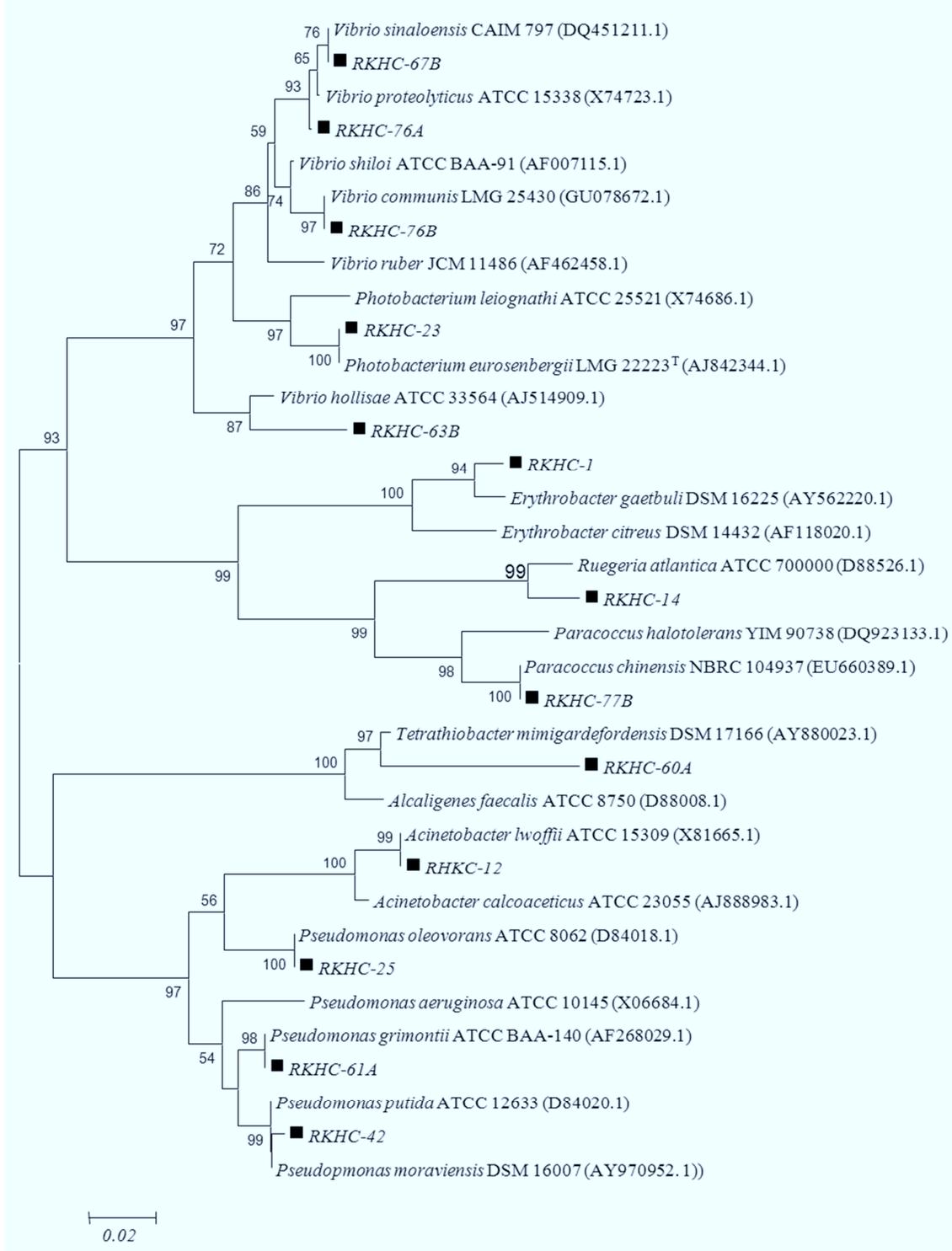


Figura 2-5. Árboles filogenéticos de las bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae*, basado en las secuencias de 16S rDNA **A.** Actinobacteria, **B.** Firmicutes, **C.** Proteobacteria. Los dendogramas fueron inferidos usando el método de Neighbor-Joining. Los árboles óptimos con el

porcentaje de arboles replica en el cual el taxa asociado se agrupan el *bootstrap* test (1000 replicas) son mostrados seguido a las ramas. Las distancias evolucionarias fueron estimadas usando el método del parámetro de Kimura 2 y están en las unidades de el número de sustituciones de bases por sitio. Los análisis filogenéticos fueron realizados en el programa MEGA4. Las colecciones de referencia fueron: ATCC: American Type Culture Collection, CAIM: Collection of Aquacultural Important Microorganisms, DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, JCM: Japan Collection of Microorganisms, LMG: Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genetica, Rijksuniversiteit, MTCC: Microbial Type Culture Collection & Gene Bank, NBRC: Biological Resource Center, YIM: Yunnan Institute of Microbiology

2.3.2 Caracterización de la comunidad bacteriana total asociada con *P. elisabethae* por métodos independientes de cultivo

Los métodos tradicionales usados para caracterizar comunidades bacterianas asociadas con invertebrados tales como librerías de clonación y métodos de huellas digitales “*fingerprinting*” generalmente cubren desde 20 hasta unos pocos cientos de secuencias, así la habilidad de estos métodos para muestrear adecuadamente distintos hábitat y describir exhaustivamente sus comunidades bacterianas, es limitado. Por el contrario, el esfuerzo de las nuevas generaciones metodológicas para secuenciar más profundamente (mayor número de individuos y secuencias más largas) permite hacer una caracterización más completa de la diversidad bacteriana, como también de la detección de mayor número de extraños filotipos (Sunagawa *et al.*, 2010; Webster *et al.*, 2010). Una de estas nuevas metodologías es la pirosecuenciación, la cual fue empleada en este estudio para realizar la caracterización de la composición y la diversidad bacteriana total de la comunidad asociada con tres individuos (**A**, **B** y **C**) de *P. elisabethae*.

La pirosecuenciación parcial se realizó en las regiones variables V1 y V2 del gen 16S rRNA, debido a que la clasificación bacteriana basada en la secuenciación de regiones variables es mucho más precisa que la clasificación basada en la secuenciación de regiones más conservadas, también debido a que la clasificación hecha por el RDP *classifier*, basada en el análisis de secuencias de fragmentos que contienen la región variable V2 tiene mayor precisión que el análisis de secuencias de fragmentos que contienen la región variable V6 (Cole *et al.*, 2009).

Una vez las muestras de los tres individuos de *P. elisabethae* fueron secuenciados, las librerías generadas fueron analizadas a través del “*pipeline*” del RDP (Ribosomal Data Project), las librerías contuvieron entre 10034 y 8727 secuencias de alta calidad con un

longitud promedio entre 418 y 408 bp, posterior a la remoción de los fragmentos de los pares de bases del *primer* y *tag* de pirosecuenciación y a la eliminación de las secuencias con longitudes menores a 250 bp (Tabla 2-7). La clasificación de las secuencias (RDP *classifier*, Wang *et al.*, 2007) identificó un pequeño número de secuencias que no pudieron ser clasificadas dentro de los dominios Bacteria (incluyendo Chloroplast) o Archaea, de las cuales la librería del individuo **B** tuvo el mayor número de secuencias no clasificadas (2.5%) mientras que la librería de los individuos **A** y **C** contuvieron un muy bajo porcentaje de secuencias no clasificadas, 0.04% y 0.09%, respectivamente (Tabla 2-7). El análisis BLASTn de las secuencias no clasificadas reveló que todas las secuencias no clasificadas de la colonia **A**, una secuencia de la colonia **B** y 8 de 9 secuencias de la colonia **C** no están relacionadas a genes de rRNA. Las secuencias no clasificadas remanentes de los individuos **A** y **B** mostraron similitudes (87%) a fragmentos genómicos del alga roja *Grateloupia lanceola* (HM767127.1), como también mostraron similitud (75-82%) a un número de bacterias no cultivadas detectadas en estudios de librerías del gen 16S rRNA de corales duros como *Monastrea faveolata* (eg. FJ203569.1; Sunagawa *et al.* 2009). No obstante, estas secuencias también mostraron similitud (80–82%) a secuencias de genes 16S rRNA mitocondriales de las algas rojas *Plocamicolax pulvinata* (HQ586061.1), *Gracilariophila oryzoides* (HQ586059.1), *Chondrus crispus* (Z47547.1) y *Gracilariopsis andersonii* (HQ586060.1).

De acuerdo al análisis de pirosecuenciación y a la clasificación hecha por el RDP *classifier* todas las librerías estuvieron contaminadas con cloroplastos. La co-amplificación de genes del 16s rRNA de procariontas y 18S rRNA de eucariotas, es debido a la ausencia de especificidad hacia procariontas de algunos pares de *primers* empleados en PCR, los cuales son basados en secuencias de 16S rDNA, razón por la cual usualmente se encuentran secuencias de organismos eucariotas en librerías de procariontas (Rivas *et al.*, 2004; Gaidos *et al.*, 2010; Barott, *et al.*, 2011). Una de las ventajas de usar *RDP classifier* como herramienta para el análisis de librerías de 16S rDNA, es que éste tiene la capacidad de clasificar secuencias de organismos eucariotas dentro del *phylum* Cyanobacteria como secuencias pertenecientes a una familia llamada Chloroplast (Cole *et al.*, 2009), permitiendo a los usuarios acceder fácilmente a esta información.

El porcentaje de secuencias de organismos eucariotas en las librerías fue entre 0.59-27.28%, y fueron clasificadas como Chloroplast pertenecientes a Streptophyta (Plantae, 1 secuencia), Chlorophyta (Alga verde, 13-46 secuencias), Bacillariophyta (Diatomeas, 8-903 secuencias), Chlorarachniophyta (Protozoas, 1-2 secuencias) y Cryptophyta (Cryptomonas, 3-7 secuencias). En general, estos resultados mostraron que *P. elisabethae* tiene asociados otros microorganismos como algas, diatomeas, protozoos y criptomonas. Sin embargo, es necesario realizar un estudio más profundo de eucariotes empleando bTEFAP con *primers* específicos para los genes 18S rRNA e ITS, con el fin de conocer profundamente la riqueza y diversidad de estos simbioses eucariotas.

El número total de secuencias bacterianas por librería después de remover las secuencias no clasificadas y los Chloroplast es listado en la Tabla 2-7. Adicionalmente, una significativa proporción de secuencias de bacterias de cada librería no pudo ser clasificada dentro de ningún *phylum* del dominio Bacteria (Tabla 2-7, Bacterias no clasificadas). Las librerías de secuencias de los individuos **A**, **B** y **C** mostraron el 10.24%, 26.63% y 5.90% de secuencias bacterianas no clasificadas respectivamente. El número de OTUs (nivel de especie D=0.03) que representan a estas secuencias corresponden a 57 (**A**), 108 (**B**) y 125 (**C**) (Tabla 2-7).

Debido a la alta proporción de secuencias que no fueron clasificadas dentro de los dominios Bacteria o Archaeae, ni clasificadas dentro de ningún *phylum* en todas las librerías de *P. elisabethae*, estas secuencias representan un inexplorado reservorio de diversidad microbiana en el ambiente. Para el 2004 estudios habían mostrado que existían al menos 50 diferentes *phyla* bacterianos y la mitad de ellos estaban compuestos completamente por bacterias no cultivables (Rappe y Giovannoni 2003; Harris *et al.*, 2004).

Tabla 2-7. Composición, riqueza y diversidad de las comunidades bacterianas totales asociadas con tres individuos de *P. elisabethae* (**A**, **B** y **C**), estimadas por las librerías de 16S rDNA de pirosecuenciación

Muestra	N° Total Secuencias (OTUs)	N° Secuencias No Clasificadas (OTUs)	N° Secuencias de Bacterias		N° Secuencias de Chloroplast (OTUs)	Promedio de la longitud de las secuencias (bp)	Distancia ^a	Riqueza ^b OTUs	Chao 1 ^c	Índice de Diversidad de Shannon (H') ^d	Índice de Equidad de Shannon (E) ^e
			Clasificadas (OTUs)	No-Clasificadas (OTUs)							
A	10034 (347)	4 (1)	8944 (279)	1027 (57)	59 (10)	408	especie 0.03	347	508.3	2.97	0.509
							clase 0.15	71	98.1	1.89	0.444
B	8727 (331)	218 (3)	3804 (204)	2324 (108)	2381 (16)	418	especie 0.03	331	434.1	3.51	0.605
							clase 0.15	60	87.1	2.03	0.497
C	9330 (846)	9 (3)	7799 (567)	551(125)	971 (151)	410	especie 0.03	846	1381.5	3.57	0.531
							clase 0.15	165	202.4	2.38	0.467

Secuencias No clasificadas: secuencias que no se pueden clasificar en ningún dominio (Bacteria o Archeae). Secuencias de bacterias no clasificadas: secuencias que fueron clasificadas como bacterias, pero no pudieron ser clasificadas dentro de ningún *phylum* identificado. ^a85% de identidad fue estimada como la distancia (D = 0.15) a nivel de clase y el 97% de identidad fue estimada como la distancia (D = 0.03) a nivel de especie. ^bRiqueza o número de unidades operacionales OTU. ^cPredicciones estadísticas no-paramétricas de la riqueza total de OTUs basado en la distribución de singletones y dobletones. ^dÍndice de Shannon de diversidad, un número mayor representa mayor diversidad (sensible a la riqueza). ^eÍndice de Equidad de Shannon un número mayor representa mayor diversidad (sensible a la uniformidad)

Dentro de las bacterias clasificadas (Figura 2-6) un rango de 12 únicos *phyla* (Chloroflexi, Lentisphaerae, Cyanobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Acidobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Firmicutes, Actinobacteria y Fusobacteria) fueron encontrados asociados con los tres individuos de *P. elisabethae* de los cuales Proteobacteria (54.06-86.39%) fue el *phylum* más abundante seguido por Bacteroidetes (1.98-2.68%), Cyanobacteria (0.27-4.54%), Actinobacteria (0.49-1.15%) y Firmicutes (0.15-0.20%). Gammaproteobacteria fue la clase más abundante (46.88-80.03%) seguido por Alphaproteobacteria (4.34-6.61%), Cyanobacteria (0.27-4.54%) y Sphingobacteria (0.92-2.55%).

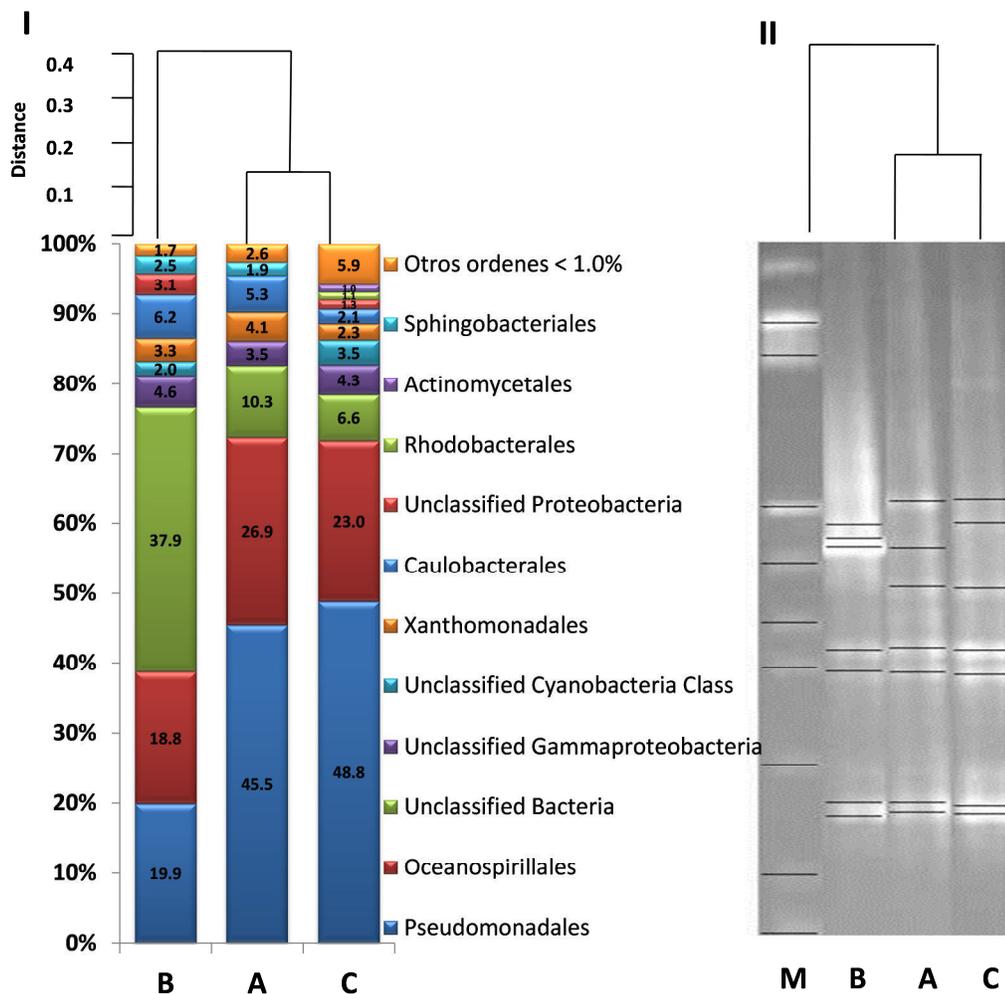


Figura 2-6 I. Composición taxonómica a nivel de clase de la comunidad bacteriana total asociada con *P. elisabethae*, de las tres librerías de 16S rDNA estimada por pirosecuenciación. Secuencias “Unclassified” no pudieron ser clasificadas dentro de ningún *phylum*, orden o clase conocido. **II.** Perfiles por DGGE de secuencias parciales de 16S rDNA obtenidas a partir del gDNA de los tres

individuos. M representa el marcador molecular 2-Log DNA ladder (0.1-10 Kb). Analisis de agrupamiento fue hecho usando el Índice de Jaccard, definido como el tamaño de la intersección dividido por el tamaño de la unión del conjunto de muestras

Las medidas de diversidad dentro de una única comunidad (parámetros de diversidad α : riqueza o número de unidades taxonómicas operacionales observadas (OTUs), número de OTUs previstos (Chao 1), índices de diversidad Shannon (H'), índices de equidad de Shannon (E) y curvas de rarefacción), fueron determinados a nivel de clase ($D=0.15$) y de especie ($D=0.03$) (Tabla 2-7, Figura 2-7). Sin importar el nivel, la comunidad bacteriana del individuo **C** fue la muestra más diversa, *i.e.* la riqueza del individuo **C** fue mayor que la riqueza de los individuos **A** y **B**, al comparar los valores de OTUs, Chao 1 y H' . Sin embargo, para los valores de E, la comunidad bacteriana asociada al individuo **B** fue la muestra más diversa (Tabla 2-5). Este comportamiento es debido a que el índice de equidad de Shannon E es sensible a diferencias en la abundancia relativa (uniformidad: medida de la diversidad que cuantifica que tan igual es la comunidad numéricamente), mientras que las otras medidas de diversidad α , son sensibles a la riqueza.

Con respecto a las curvas de rarefacción (número de secuencias de la muestra vs. el número de OTUs) presentaron una tendencia asintótica para todos los individuos a nivel de clase, mientras que a nivel de especie tan solo las graficas de las librerías de los individuos **A** y **B** fueron asintóticas (Figura 2-7), lo cual se puede interpretar como que la tasa de descubrimiento de secuencias pertenecientes a nuevas clases es bajo para todos las muestras, por el contrario, para la muestra **C** es posible descubrir secuencias que correspondan a nuevas especies si el tamaño de la muestra fuera mayor.

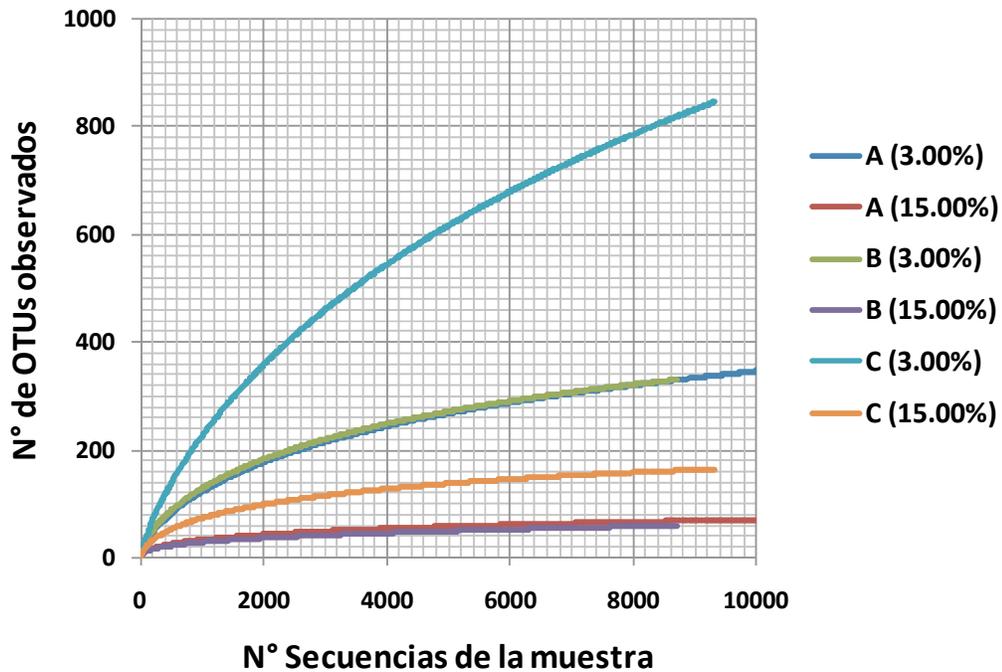


Figura 2-7 Curvas de rarefacción a nivel de clase 15% y especie 3%, del número de OTUs observados vs. el número de secuencias identificadas en las librerías de 16S rDNA de la comunidad bacteriana total asociada con tres individuos (**A**, **B** y **C**) de *P. elisabethae* estimado por pirosecuenciación

No obstante, vale la pena mencionar que en general todas las curvas de rarefacción obtenidas para el análisis de las librerías de 16S rDNA tuvieron una buena tendencia a la saturación debido a que el cubrimiento de la muestra empleando la metodología de pirosecuenciación es mucho más grande (alrededor de 10000 secuencias por muestra) en comparación a métodos tradicionales tales como librerías de clonación y DGGE (menos de 1000 clones o bandas son usualmente secuenciadas).

En general, las comunidades bacterianas asociadas con los individuos **A**, **B** y **C** presentaron algunas diferencias: el individuo **B** se caracterizó por tener el mayor número de secuencias no clasificadas así como también el mayor número de secuencias de bacterias no clasificadas y el mayor número de secuencias debidas a contaminaciones por Chloroplast, mientras que la comunidad bacteriana asociada con el individuo **C** fue la muestra más diversa con el mayor número de OTUs, y valores altos de los índices de Chao 1 y H' (Tabla 2-7). Adicionalmente, cuando se compara la composición de las secuencias de bacterias clasificadas, Gammaproteobacteria fue la clase dominante para todos los tres individuos (Figura 2-6), resultados que son comparables con la mayoría de

reportes hechos para corales sanos (Bourne *et al.*, 2005; Brück *et al.*, 2007; Santiago-Vazquez *et al.*, 2007; Webster *et al.*, 2009). Estas diferencias son más notables cuando es comparada la relación entre el número de secuencias de Gammaproteobacteria y el número de secuencias de Alphaproteobacteria, para los individuos **A** y **C** este valor es de 14:1 y 18:1 mientras que para el individuo **B** este valor es mucho menor: 7:1. Así mismo el número de secuencias bacterianas que no fueron clasificadas en la muestra **B** corresponde a casi el 37.92%, mientras que los individuos **A** y **C** contienen tan solo el 10.30% y el 6.60%, respectivamente.

Lo anterior fue confirmado por comparación de la composición de la comunidad bacteriana en los tres individuos usando el análisis de agrupamiento por el índice de similitud de Jaccard, el cual es altamente dependiente del tamaño de muestra y de la diversidad, mostrando que los individuos **A** y **C** fueron más similares entre sí, lo cual además pudo ser confirmado por el análisis de agrupamiento hecho para los perfiles de patrones de bandas por DGGE. Aunque no se pudieron obtener secuencias útiles a partir de la re amplificación del DNA obtenido a partir de las distintas bandas de los geles de DGGE, este análisis pudo ser usado para confirmar el patrón de similitud entre los individuos **A** y **C** (Figura 2-6).

Con base en la asignación taxonómica hecha por el RDP *classifier*, las 10 secuencias más numerosas (respecto a las secuencias totales) asociadas a cada individuo de *P. elisabethae* son mostradas en la Tabla 2-8. Las especies que predominan en el individuo **A** corresponden a los *phyla* Proteobacteria (8 especies/10 especies totales) y *Unclassified* Bacteria (2/10), para el individuo **B** corresponden a los *phyla* Proteobacteria (6/10) y *Unclassified* Bacteria (4/10) y finalmente para el individuo **C** predominan los *phyla* Proteobacteria (9/10) y *Unclassified* Bacteria (1/10). En todas las tres muestras *Pseudomonas* spp., y *Spongiobacter* spp., fueron los filotipos más abundantes. Otro filotipo presente fue *Brevundimonas* spp., (Alphaproteobacteria). Adicionalmente debido al bajo puntaje de similitud de las secuencias (S_ab) obtenido por el RDP *classifier*, se realizó un análisis BLASTn para todas las 10 secuencias más numerosas de cada individuo, encontrando que el porcentaje de similitud para la mayoría de filotipos fue mayor al 90% y coincide con la identificación hecha por el RDP *classifier*. Igualmente el resultado arrojado por BLASTn es de gran importancia debido a que la mayoría de

filotipos encontrados asociados con los individuos de *P. elisabethae* coinciden con reportes previamente hechos para bacterias no cultivables asociadas con corales y octocorales (Tabla 2-8).

Tabla 2-8. Las 10 más numerosas OTUs de la comunidad bacteriana total asociada con tres individuos de *P. elisabethae* (A, B y C) identificadas en las librerías de 16S rDNA de pirosecuenciación

INDIVIDUO ^a	OTU	N° secuencias	Abundancia en la muestra total (%)	Longitud bp	CLASIFICACIÓN POR RDP CLASSIFIER Y BUSQUEDA BLASTn			
					Short id/ N° GenBank	Phylum	S_ab score ^b / % identidad	Nombre de la secuencia
A (74.6%)	1	3932	39.4	407	AB021397.1	Proteobacteria	0.969	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835 ^T
					HE586387.1		99.26	<i>Pseudomonas asplenii</i> LMG 5147
	2	1380	13.8	398	AB205011.1	Proteobacteria	0.867	<i>Spongiobacter nickelotolerans</i> OOP-Ni033-1-1-2
					JF925006.1		96.51	Uncultured marine bacterium (Octocoral associated)
	3	481	4.8	384	EF630090.1	Proteobacteria	0.852	Uncultured Gammaproteobacterium (Sponge associated)
					EF089409.1		96.67	Uncultured bacterium (Coral associated)
	4	362	3.6	386	GU118339.1	Unclassified	0.968	Uncultured bacterium <i>Gven_K23</i> (Octocoral associated)
					GU118339.1		99.22	Uncultured bacterium <i>Gven_K23</i> (Octocoral associated)
	5	296	3.0	375	DQ200471.1	Unclassified	0.921	Uncultured candidate division CAB-I bacterium (Coral associated)
					AB61848.1		97.87	Uncultured bacterium (Coral associated)
6	284	2.8	493	AB021397.1	Proteobacteria	0.960	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835 ^T	
				HE586387.1		99.39	<i>Pseudomonas asplenii</i> LMG 5147	
7	198	2.0	330	DQ917887.1	Proteobacteria	0.784	Uncultured <i>Spongiobacter</i> sp. ME118 (Octocoral associated)	
				AF365796.1		98.77	Uncultured bacterium (Coral associated)	
8	190	1.9	413	AJ007801.1	Proteobacteria	0.985	<i>Brevundimonas vesicularis</i> ATCC 11426 ^T	
				AB680247.1		99.52	<i>Brevundimonas vesicularis</i> NBRC 12165 ^T	
9	162	1.6	414	AJ717390.1	Proteobacteria	0.927	<i>Brevundimonas bullata</i> AC23	
				FQ659276.1		98.79	Uncultured bacterium	
10	154	1.5	423	DQ917857.1	Proteobacteria	0.753	Uncultured <i>Vibrio</i> sp. ME2	
				DQ917904.1		96.24	Uncultured Gammaproteobacterium ME42 (Octocoral associated)	
B (63.2%)	1	1145	18.7	411	AB021397.1	Proteobacteria	1.000	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835 ^T
					HE586387.1		100.0	<i>Pseudomonas asplenii</i> LMG 5147
	2	882	14.4	351	AF211146.1	Unclassified	0.376	<i>Candidatus Carsonella ruddii</i>
					FJ203569.1		82.58	Uncultured bacterium clone SHFH642 (Coral associated)
	3	545	8.9	398	AB205011.1	Proteobacteria	0.865	<i>Spongiobacter nickelotolerans</i> OOP-Ni033-1-1-2
					JF925006.1		96.99	Uncultured marine bacterium (Octocoral associated)
	4	391	6.4	415	AF211124.1	Unclassified	0.372	<i>Candidatus Carsonella ruddii</i>
					FJ203569.1		82.98	Uncultured bacterium clone SHFH642 (Coral associated)
	5	188	3.1	409	DQ917857.1	Proteobacteria	0.777	Uncultured <i>Vibrio</i> sp. ME2
					DQ917904.1		96.83	Uncultured Gammaproteobacterium ME42 (Octocoral associated)

C (69.8%)	6	161	2.6	395	AB205011.1 AF365796.1	Proteobacteria	0.919 99.49	Uncultured <i>Spongiobacter</i> sp. ME118 (Octocoral associated) Uncultured bacterium (Coral associated)
	7	157	2.6	408	AF211124.1 FJ203569.1	<i>Unclassified</i>	0.383 82.34	<i>Candidatus</i> Carsonella ruddii Uncultured bacterium clone SHFH642 (Coral associated)
	8	138	2.3	362	AF211130.1 FJ203569.1	<i>Unclassified</i>	0.377 83.04	<i>Candidatus</i> Carsonella ruddii Uncultured bacterium clone SHFH642 (Coral associated)
	9	132	2.2	423	AJ717390.1 FQ659276.1.1	Proteobacteria	0.946 98.94	<i>Brevundimonas bullata</i> AC23 (Snow-crab associated) Uncultured bacterium
	10	131	2.1	433	JF460956.1 JF460956.1	Proteobacteria	0.953 99.08	Uncultured <i>Brevundimonas</i> sp. Uncultured <i>Brevundimonas</i> sp.
	1	3842	46.0	408	AB021397.1 AB021397.1	Proteobacteria	0.974 99.50	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835 ^T <i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835 ^T
	2	798	9.6	397	AB205011.1 DQ889929.1	Proteobacteria	0.848 94.36	<i>Spongiobacter nickelotolerans</i> OOP-Ni033-1-1-2 Uncultured <i>Spongiobacter</i> sp. clone EC27 (Octocoral associated)
	3	514	6.2	381	EF630106.1 EF089409.1	Proteobacteria	0.875 98.72	Uncultured gammaproteobacterium Uncultured bacterium clone (Coral associated)
	4	183	2.2	398	DQ917887.1 DQ917887.1	Proteobacteria	0.884 97.50	<i>Spongiobacter nickelotolerans</i> OOP-Ni033-1-1-2 Uncultured <i>Spongiobacter</i> sp. clone ME118 (Octocoral associated)
	5	170	2.0	371	DQ200463.1 AB611848.1	<i>Unclassified</i>	0.877 100.0	Uncultured candidate division CAB-I bacterium Uncultured bacterium clone (Coral associated)
	6	84	1.0	484	DQ917863.1 DQ917863.1	Proteobacteria	0.925 98.35	Uncultured <i>Spongiobacter</i> sp. clone ME19 (Octocoral associated) Uncultured <i>Spongiobacter</i> sp. clone ME19 (Octocoral associated)
	7	65	0.8	370	AJ007802.1 JN680153.1	Proteobacteria	0.972 99.46	<i>Brevundimonas intermedia</i> ATCC 15262 ^T <i>Brevundimonas</i> sp. IGS100
	8	62	0.7	386	AJ002814.1 JN230274.1	Proteobacteria	1.00 99.74	<i>Stenotrophomonas</i> sp. S3 Uncultured bacterium clone (Sea sediment)
	9	57	0.7	257	AB021397.1 JF215289.1	Proteobacteria	0.992 100.0	<i>Pseudomonas asplenii</i> ATCC 23835 ^T Uncultured bacterium clone
	10	54	0.6	358	AB194323.1 HQ120389.1	Proteobacteria	0.965 99.16	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> BL-12 Uncultured bacterium clone

^aSumatoria total de los porcentajes de las 10 OTUs más abundantes con respecto a la muestra total. ^bPuntuación de Seqmatch (S_{ab}): número de (únicos) oligómeros de 7-bases compartida entre la secuencia y una secuencia dada por el RDP, dividido entre el número más bajo de únicos oligómeros en cualquiera de las dos secuencias, un mayor número de S_{ab} representa mayor similitud con la secuencia dada por RDP

Es importante mencionar la presencia de *Spongiobacter* spp., en todas las librerías (~10%), (Tabla 2-8), aunque no fue posible cultivar ninguna de ellas en condiciones de laboratorio. Estas bacterias han sido encontradas asociadas con corales sanos (Bourne *et al.*, 2008), asimismo ha sido demostrado que la pérdida de las zooxantellas durante el blanqueamiento coralino, está también relacionada con la disminución de la abundancia de *Spongiobacter* spp. Una vez el coral es recuperado del blanqueamiento, tanto la abundancia de la zooxantella como la de *Spongiobacter* spp., retornan a sus condiciones iniciales (Bourne *et al.*, 2008). De acuerdo a lo anterior Bourne y compañía (2008) sugirieron que especies del género *Spongiobacter*, podrían estar implicadas en la exclusión de potenciales microorganismos invasores en el holobionte.

Se ha estimado que la mayoría (98-99%) de los microorganismos no pueden ser cultivados por técnicas tradicionales de cultivo (Ward *et al.*, 1990; Pace, 1997). Sin embargo, para superficies marinas vivas, ha sido reportado un porcentaje mayor de microorganismos cultivables asociados a organismos eucariotas (Jensen *et al.*, 1996). Para nuestro estudio, aunque no existe una manera exacta para estimar cuantas bacterias asociadas con *P. elisabethae* fueron capaces de cultivarse en condiciones de laboratorio, se podría asumir que las especies totales presentes en el octocoral corresponden al promedio de OTUs a nivel de especie (D=0.03%), para los 3 individuos estudiados (517 OTUs). Esto significa que se logró cultivar cerca del 7.5% (40 bacterias cultivables/517 OTUs) de la comunidad bacteriana total asociada con *P. elisabethae*.

Adicionalmente, ha sido reportado que algunos medios son específicos o pueden llegar a promover el crecimiento de diferentes clases de bacterias, por el contrario, ciertas poblaciones bacterianas pueden sufrir un choque cuando son expuestas rápidamente a condiciones ricas en nutrientes, lo cual puede resultar en la muerte celular o la inhibición del crecimiento (Berg *et al.*, 2009). Éstas podrían llegar a ser las razones por las cuales en el presente estudio se aisló un número tan bajo de bacterias asociadas con *P. elisabethae*, debido a que se utilizaron tan solo dos medios de cultivo y ambos contenían una alta concentración de nutrientes.

Es importante notar que uno de los géneros cultivables asociadas con *P. elisabethae* con más especies aisladas fue el género *Vibrio*, de las cuales tres (*V. sinaloensis*, *V.*

proteolyticus y *V. communis*) de las cuatro especies aisladas, son simbioses epifíticas; sin embargo, ninguna especie de *Vibrio* fue encontrada en el agua de mar (Tabla 2-6). Si bien, su abundancia relativa por la metodología dependiente de cultivo fue del 10% (4 *Vibrio*/40 bacterias cultivables), su abundancia en la comunidad bacteriana total determinada por el método independiente de cultivo fue relativamente bajo, solo entre 1-16 secuencias de *Vibrio* fueron encontrados en las tres librerías (datos no mostrados). Por su parte, en corales duros algunas especies de *Vibrio* (*V. shiloi* y *V. coralliitlyticus*) han estado implicadas como agentes responsables del blanqueamiento de corales y otras enfermedades coralinas (Ben-Haim *et al.*, 2003; Cervino *et al.*, 2004; Kushmaro *et al.*, 2008). Sin embargo, no ha sido completamente probado que todas las especies de *Vibrio* son las causantes de enfermedades o son organismos oportunistas capaces de sacar ventaja de corales comprometidos y proliferarse (Bourne *et al.*, 2008). Aunque en el presente estudio, especies de *Vibrio* fueron aisladas de individuos sanos de *P. elisabethae*, este género podría ser considerado un simbionte normal de este octocoral, no obstante, vale la pena aclarar que su abundancia es baja y podría estar siendo controlada por el holobionte, lo cual haría que este género no pudiera expresar posibles factores de virulencia en *P. elisabethae* o quizás debido a que en el momento de su recolección, el animal no estaba expuesto a estrés fisiológico (e.g. temperaturas elevadas) y por ende no se presentó una disminución de la resistencia del hospedero ni tampoco hubo un descontrol en el crecimiento de bacterias que aunque en condiciones normales son benignas y no patogénicas (Lesser *et al.*, 2007). Claramente trabajos adicionales en este sentido son requeridos para entender mejor el papel del género *Vibrio* en la comunidad bacteriana asociada con *P. elisabethae*.

La estructura y diversidad bacteriana de los tres individuos de *P. elisabethae*, determinada por métodos independientes de cultivo (Figura 2-6, Tabla 2-7 y 2-8), comparada a otros reportes para octocorales (Brück *et al.*, 2007), puede soportar la hipótesis probiótica de corales planteada por Reshef y colaboradores en el 2007, la cual sugiere que existe una relación dinámica entre los microorganismos simbioses y los corales en diferentes condiciones ambientales. En donde por la alteración de la estructura de la comunidad microbiana, el holobionte puede adaptarse más rápido y con mayor versatilidad a cambios en las condiciones ambientales, en comparación a un proceso que dependa de la mutación genética. Esto sugiere que los corales de hecho

pueden seleccionar comunidades microbianas específicas para su beneficio, como se mostrará más adelante en este trabajo (Sección 2.4).

Aunque es imposible elucidar la función de una comunidad microbiana basados únicamente en la filogenia, el estudio de ciertos grupos sería particularmente útil para el descubrimiento de nuevos ejemplos de ciertas funciones tales como complejos captadores de luz en las cianobacterias. Reportes en la literatura relacionadas con este tema (Baltz, 2006), sugieren una mayor diversidad con respecto al potencial biosintético de las bacterias, para la producción de productos naturales en comparación a lo que se creía previamente. Además se ha demostrado que algunos de los organismos predominantes de producción de metabolitos secundarios con actividad biológica, pertenecen a las clases Gammaproteobacteria y Actinobacteria. Algunas bacterias pertenecientes a esta primera clase han sido reportadas como fuente de antibióticos, compuestos citotóxicos y compuestos antifouling, mientras que la segunda clase ha sido estudiada porque parecen ser la primera fuente de agentes anti-bacterianos tales como policétidos y péptidos

Finalmente esta parte del trabajo abrió un panorama muy importante para direccionar las siguientes dos secciones. La primera (Sección 2.4) tomó los resultados obtenidos en la sección 2.2 de actividad selectiva de las Ps y seco-Ps contra bacterias Gram-positivas y los resultados de esta sección, los cuales mostraron que la comunidad bacteriana asociada con *P. elisabethae* de la Isla de Providencia, está compuesta principalmente por bacterias Gram-negativas, sugiriendo que estos compuestos podrían llegar a tener actividad antifouling (sustancias que inhiben o retardan el asentamiento de organismos vivos sobre una superficie viva o inanimada), manteniendo limpia la superficie de *P. elisabethae*, así como también las Ps y seco-Ps podrían llegar a tener un posible papel ecológico modulando el crecimiento de la comunidad bacteriana asociada al octocoral. La segunda sección (Sección 2.5) consideró el aislamiento de 40 bacterias cultivables como punto de partida para la búsqueda de compuestos químicos (Ps, seco-Ps u otras compuestos) con actividad biológica, si bien el porcentaje de bacterias cultivadas de *P. elisabethae* fue relativamente bajo, podemos tomar estas pocas bacterias como una muestra de los microorganismos asociados con *P. elisabethae* y realizar estudios encaminados a potencializar la producción de compuestos químicos a partir de ellas.

2.4 Evaluación de las Ps y seco-Ps como agentes moduladores del *microfouling* marino

Como se mencionó anteriormente hasta el momento, en trabajos realizados con especímenes *P. elisabethae* de la Isla de Providencia, se han aislado 13 nuevos diterpenos glicosidados: PsP-W, 2'-O-acetil-PsQ, 3'-O-acetil-PsQ, 2'-O-acetil-PsU, 3'-O-acetil-PsU y *seco*-PsK, y 5 conocidos: PsG, PsK, *seco*-PsJ, amflectosinas A y B (Duque et al., 2004, 2006; Puyana et al., 2004, Rodriguez et al., 2004), muchos de ellos con importantes propiedades farmacológicas tales como antibacteriana (selectiva contra bacterias Gram-positivas), citotóxica, anti-inflamatoria, antiviral, antimalárica y anti-tuberculosis (Rodriguez et al., 2004; Correa et al., 2009, 2011a; Sección 2.2).

Por otro lado teniendo en cuenta los siguientes considerandos: a) Las Ps y *seco*-Ps encontradas en *P. elisabethae* recolectado en Colombia, presentan estructuras químicas distintas a las aisladas de organismos recolectados en otros lugares del Caribe (diferente tipo de azúcar, posición de glicosidación y estereoquímica de la aglicona) (Sección 2.1; Marrero et al., 2010), b) Existe una diferencia con respecto a la concentración de estos compuestos, la cual puede llegar a ser dos o tres veces mayor que el contenido reportado para otros especímenes recolectados en otras locaciones del Caribe, *i.e.* en organismos de la Isla de Providencia la concentración de éstos está entre el 11% y el 16% con respecto a materia seca en comparación con los organismos de Las Bahamas cuya concentración está alrededor del 4% (Puyana et al, 2004; Look et al, 1986), c) Los resultados preliminares mostrados en este trabajo (Correa et al., 2011a; Sección 2.2), indicaron que las Ps y *seco*-Ps aisladas de muestras recolectadas en Providencia, tienen una toxicidad selectiva contra células procariontas (activo contra bacterias Gram-positivas, pero inactivo contra bacterias Gram-negativas) y células eucariotas (activo contra las células tumorales y normales, pero inactiva en contra de una levadura). Esta selectividad podría ser un indicativo de la injerencia que podrían tener estos compuestos en el control de la población epifítica del octocoral, lo cual nos llevaría a suponer que las Ps y *seco*-Ps podrían tener algún tipo de papel en la defensa del octocoral, d) Aunque los compuestos extraídos a partir de *P. elisabethae* han sido ampliamente estudiados durante los últimos 25 años, poco se sabe acerca del posible papel ecológico de estos compuestos, a excepción de los datos publicados por Thornton y Kerr en el 2002, quienes reportaron un

aumento de la biosíntesis de la PsC en respuesta a los altos niveles de depredación del molusco *Cyphoma gibbosum* y a la disminución de los niveles de la radiación UV/Vis en muestras recolectadas en Las Bahamas. e) Las observaciones de campo (Puyana M. Comunicación personal), en *P. elisabethae* de la Isla de Providencia mostrando que este octocoral posee una superficie limpia libre de *fouling* a excepción de sus propios microorganismos simbioses (bacterias y zooxantellas principalmente), siendo sólo depredado por el gasterópodo *C. gibbosum*, nos llevan a suponer que las Ps y seco-Ps podrían tener algún tipo de papel en la defensa del octocoral. Así, es probable que el holobionte *P. elisabethae* (el octocoral junto con sus organismos asociados tales como algas, protistas, hongos, bacterias, arqueas y virus, y las interacciones simbióticas entre ellos) utilice a las Ps y seco-Ps para seleccionar las bacterias y otros microorganismos que se asienten sobre su superficie y de esa manera intervenir en el primer paso del proceso del *fouling*: la fijación de los microorganismos y la posterior formación de *biofilm* (Fusetani, 2011).

Así, en esta parte del trabajo se presenta la actividad *antifouling* de las Ps y seco-Ps contra bacterias asociadas a superficies marinas con *fouling* y la capacidad de estos compuestos para interferir con la formación de *biofilm* (paso inicial en el proceso del *fouling*) de estas bacterias en superficies de poliestireno. Adicionalmente, se trata de saber si estos compuestos pueden interferir en la composición de la propia comunidad bacteriana asociada a *P. elisabethae* analizando los resultados de la composición bacteriana total encontrados por pirosecuenciación (Sección 2.3.2), así como los resultados por FISH (fluorescence *in situ* hybridization) (Zorro, 2011), previamente reportados por nuestro grupo de investigación. Además se determinó la actividad de las Ps y seco-Ps contra las bacterias cultivables aisladas de la superficie del octocoral (Sección 2.3.1). De esta manera, se intenta encontrar evidencia experimental que soporte si las Ps y seco-Ps pueden estar teniendo un efecto en el control de la selección, asentamiento y colonización de los microorganismos simbioses de la superficie del octocoral.

2.4.1 Efecto de las Ps y seco-Ps en la colonización bacteriana (*microfouling*)

El *fouling* es un proceso de múltiples pasos, en donde el asentamiento irreversible de bacterias y los *biofilms* bacterianos, son unos de los primeros pasos de este proceso, reconocidos como señalizadores fundamentales para el posterior asentamiento de muchas larvas de invertebrados y esporas de algas, seguido del establecimiento de comunidades maduras de organismos procariotas, hongos, protistas e invertebrados sobre sustratos duros tales como esponjas, cnidarios, moluscos, cirripedios, briozoos y ascidias (Holstrom y Kjelleberg, 1994; Fusetani, 2011). Este proceso intrínseco, es el resultado de una red de interacciones entre el *biofilm* inicial y la comunidad de subsecuentes colonizadores (Join *et al.*, 2002). Sin embargo, hasta lo que es sabido, no existe un bioensayo de laboratorio el cual pueda replicar dicho proceso tan complejo (Briand 2009), razón por la cual, recientemente, se han estado reportando tanto el uso del bioensayo de inhibición de crecimiento como el de la disrupción de la formación de *biofilm* de bacterias marinas asociadas con superficies con *fouling*, como indicadores del potencial *antifouling* de compuestos químicos (Fusetani, 2011).

Con el fin de demostrar que estos compuestos podrían llegar a tener algún tipo de influencia en la selección y control de la microbiota (actividad *antifouling*), se evaluó la actividad *antifouling* de las Ps y seco-Ps, específicamente su actividad antibacteriana frente a seis bacterias asociadas con superficies marinas con *fouling* y se determinó si estos compuestos podrían interferir con la formación de *biofilm* de estas cepas y de la bacteria *P. putida* IsoF usada como bacteria modelo de formación de *biofilm*.

2.4.1.1 Actividad antibacterial contra bacterias asociadas con superficies marinas con *fouling*. Utilizando el método de difusión en agar con sensidiscos se determinó el efecto de las Ps y seco-Ps contra bacterias marinas asociadas con superficies con *fouling*. La Tabla 2-9 muestra las propiedades antibacterianas de PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, seco-PsJ, seco-PsK y de los controles positivos Cu₂O y CuSO₄ (agentes *antifouling*), kanamicina y tetraciclina (agentes antibacterianos) contra las seis bacterias asociadas con superficies marinas con *fouling* (*A. lacunosa* y *Donax* sp.), previamente aisladas en nuestro grupo de investigación (Mora *et al.*, 2011).

Las PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, *seco*-PsJ y *seco*-PsK fueron activas con intensidades similares (halos de inhibición entre 9.9 mm a 20.4 mm) contra las bacterias Gram-positivas ensayadas (*O. iheyensis*, *Kocuria* sp., y *Bacillus* sp.), en contraste, ningún compuesto evaluado mostró actividad contra las bacterias Gram-negativas utilizadas (*O. pseudogringnonense* cepas 1 y 2 y *A. macleodii*). En cuanto a la actividad exhibida por los controles positivos, el CuO₂ fue el único tratamiento que inhibió el crecimiento de ambos tipo de bacterias: Gram-positivas (11.6-12.5 mm) y Gram-negativas (10.9-19.5 mm), el CuSO₄ fue activo únicamente contra la bacteria Gram-positiva *Bacillus* sp., (18.4 mm), la tetraciclina mostró actividad contra todas las bacterias Gram-positivas (11.6-17.3 mm), y la kanamicina fue activa contra todas las bacterias evaluadas (Gram-positivas (8.5-12.5 mm) y Gram-negativas (20.5-22.1 mm)) a excepción de su acción contra *O. pseudogringnonense* cepa 1 (Gram-negativa).

Tabla 2-9. Actividad antibacterial de las Ps and *seco*-Ps aisladas de *P. elisabethae*, contra seis bacterias asociadas a superficies marinas con *fouling* (*A. lacunosa* y *Donax* sp.)

Tratamiento /Bacteria	Diametro (mm) de las zonas de completa inhibición Promedio ± ESM (Diametro del disco: 5.2 mm)					
	Gram-positivas				Gram-negativas	
	<i>Oceanobacillus iheyensis</i>	<i>Kocuria sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Alteromona macleodii</i>	<i>Ochrobactrum pseudogringnonense Cepa 1</i>	<i>Ochrobactrum pseudogringnonense Cepa 2</i>
PsG	20.4±5.0	10.9±2.0	11.6±2.4	-	-	-
PsP	12.7±0.8	11.2±0.5	10.7±2.2	-	-	-
PsQ	11.7±1.6	9.9±0.3	9.3±2.4	-	-	-
PsS	12.6±1.5	12.2±2.7	8.9±1.6	-	-	-
PsT	13.5±5.9	16.2±2.7	10.8±6.0	-	-	-
PsU	16.5±2.9	15.2±2.7	17.8±6.0	-	-	-
<i>seco</i>-PsJ	14.5±4.3	13.3±1.6	11.3±1.9	-	-	-
<i>seco</i>-PsK	12.9±1.3	10.3±2.6	8.3±0.9	-	-	-
Tetraciclina	11.6±0.2	12.9±2.1	17.3±0.6	-	-	-
Kanamicina	20.5±0.3	22.1±0.2	21.1±0.3	14.6±0.3	-	8.5±0.6
Cu₂O	19.5±1.0	10.9±1.2	11.8±0.2	12.5±0.8	11.7±1.5	11.6±0.8
CuSO₄	-	-	18.4±0.6	-	-	-

2.4.1.2 Actividad Inhibitoria de la formación de *biofilm*. Las PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, *seco*-PsJ y *seco*-PsK (100, 50 y 10 µg/mL) y los controles positivos kanamicina (50 µg/mL) y tetraciclina (15 µg/mL), fueron evaluados como inhibidores de la formación del *biofilm* de las bacterias *P. putida* IsoF y de las seis bacterias mencionadas anteriormente. Todas las bacterias fueron cultivadas por separado en las placas de poliestireno durante 24 horas con el fin de garantizar tanto el crecimiento como la

formación de *biofilm* de cada una de ellas. Una vez transcurrido este tiempo de cultivo se midió la DO a 595 nm con el fin de determinar el crecimiento bacteriano y de esa manera construir gráficas del porcentaje de inhibición del crecimiento vs. tratamientos. Adicionalmente, con el fin de establecer la cantidad de *biofilm* formado, las placas fueron lavadas, teñidas con cristal violeta y su absorbancia medida a 635 nm para cuantificar la cantidad del *biofilm* formado y generar gráficas de porcentaje de inhibición de *biofilm* vs. tratamientos (Figura 2-8).

La Figura 2-8 muestra el efecto de las Ps y seco-Ps sobre la inhibición del crecimiento y la inhibición de la formación de *biofilm* de las bacterias usadas frente a los diferentes tratamientos, allí puede observarse para todas las Ps y seco-Ps dos efectos claramente diferenciados. En el primero (Figura 2-8A) estos compuestos no presentaron actividad antimicrobiana (no inhibieron el crecimiento bacteriano) ni inhibieron la formación de *biofilm* de ninguna de las bacterias Gram-negativas ensayadas (*P. putida* IsoF, *A. macleodii*, *O. pseudogrignonense* Cepas 1 y 2), por el contrario todas las Ps y seco-Ps fueron capaces de promover tanto el crecimiento como la formación de *biofilm* de estas bacterias, siendo en magnitud mucho mayor el efecto en la formación de *biofilm*. Además, todos los compuestos evaluados mostraron un efecto concentración dependiente en todas las bacterias empleadas, es decir a mayor cantidad de Ps y seco-Ps mayor promoción de la formación de *biofilm* de estas bacterias. El segundo efecto (Figura 2-8B) de las Ps y seco-Ps, fue el presentado contra las bacterias Gram-positivas utilizadas (*O. iheyensis*, *Kocuria* sp., y *Bacillus* sp.), en donde todos los compuestos fueron capaces de inhibir tanto el crecimiento bacteriano como la formación de *biofilm*, sin embargo, no se puede asegurar completamente que la inhibición del *biofilm* fue el resultado de una inhibición específica sino que también hay que considerarlo como producto de la poca cantidad de células en el medio debido a la actividad antibacteriana. Estos resultados confirman los resultados de actividad antibacterial selectiva, previamente observados en el ensayo antibacterial usando el método de difusión en agar con sensidiscos (Tabla 2-7).

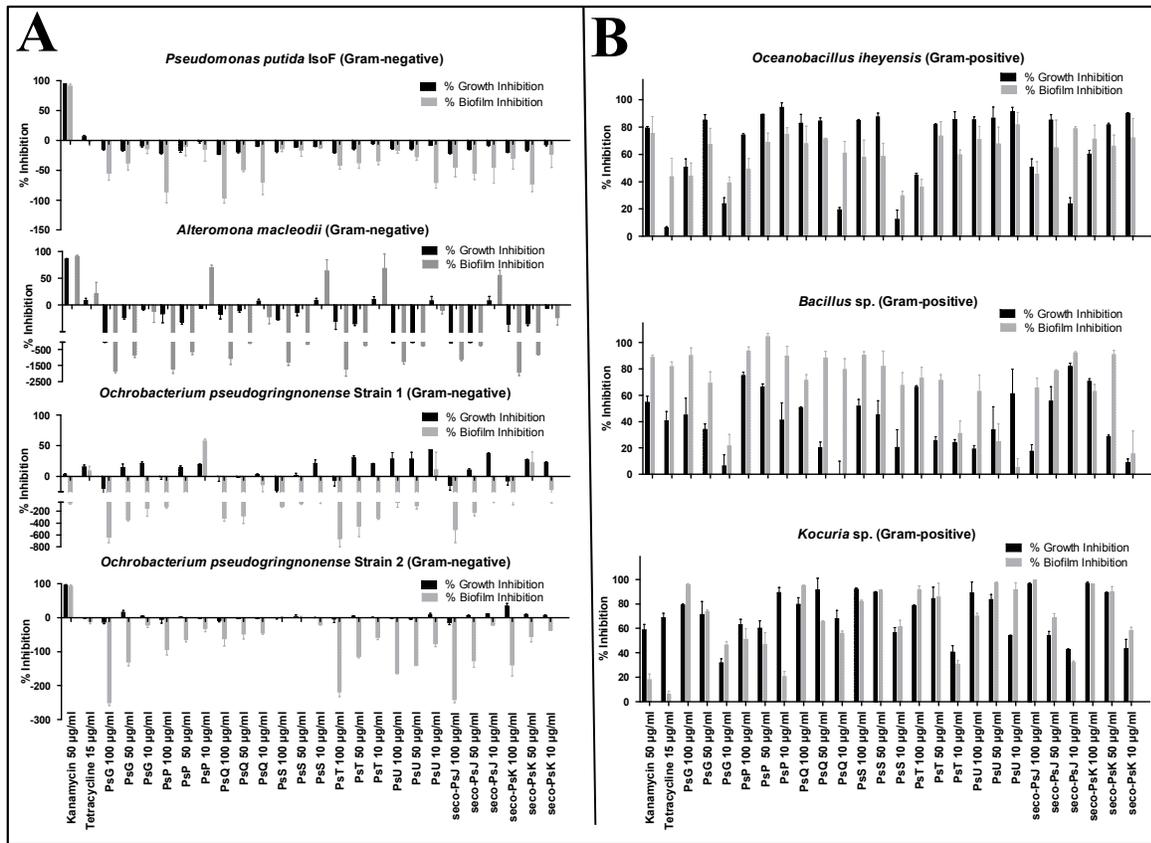


Figura 2-8. Efecto de las Ps y seco-Ps aisladas de *P. elisabethae* sobre el crecimiento y la formación de *biofilm* de **A.** *P. putida* IsoF y bacterias marinas Gram-negativas asociadas con superficies con *fouling*. **B.** Bacterias marinas Gram-positivas asociadas con superficies con *fouling*

De acuerdo con los resultados mostrados hasta el momento, se evidencia que las Ps y seco-Ps aisladas de *P. elisabethae*, poseen una actividad selectiva contra bacterias Gram-positivas asociadas con superficies marinas con *fouling*, mostrando el mismo comportamiento que el observado previamente contra patógenos humanos (Correa *et al.*, 2011a; Sección 2.2). Además, estos compuestos fueron capaces de inducir la formación de *biofilm* de bacterias marinas Gram-negativas en placas de poliestireno. Este comportamiento permitiría asumir que *P. elisabethae* produce compuestos que le brindan al holobionte (octocoral junco con su microbiota) una posible defensa contra algunos colonizadores procariontes (bacterias Gram-positivas) y simultáneamente promover el crecimiento de otros (bacterias Gram-negativas). Además se ha demostrado que la PsQ y la fracción total de Ps y seco-Ps (FPST), inhibe el crecimiento de macroalgas (*Ulva inassayinales*, *Sargassum multicum* y *Polysiphonia lanosa*) y microalgas (*Cylindrotheca closterium*, *Chlorarachnion globosum*, *Pleurochrysis roscoffensis*, *Rodhella cyanea* y

Scenedesmus armatus) e inhibe el asentamiento de un invertebrado (*Mytilus edulis*) (Helio C. Comunicación personal), esta evidencia adicional respalda que las Ps y seco-Ps además de actuar como inhibidores específicos del *microfouling*, también actúan como inhibidores de la población de *macrofouling* específicamente de organismos más grandes tales como macroalgas e invertebrados. Por lo tanto, es importante hacer hincapié en la importante interacción de las sustancias químicas con el holobionte, colocando juntos muchos factores en consideración para lograr un equilibrio completo en el organismo.

Vale la pena resaltar que a partir de los resultados obtenidos para la actividad antimicrobiana de las Ps y seco-Ps contra bacterias aisladas de superficies con *fouling*, se amplía el potencial de aplicación de estas sustancias como agentes *antifouling*. Si bien es necesario llevar a cabo experimentos de campo para corroborar su actividad, también se pueden plantear experimentos en los que se utilicen estos compuestos en mezcla con otros agentes *antifouling*. Recientemente, se ha reportado la necesidad de buscar compuestos capaces de controlar la formación de comunidades microbianas (Dobretsov *et al.*, 2011), debido que la mayoría de agentes *antifouling* conocidos no son efectivos contra algunas especies bacterianas y diatomeas, las cuales son capaces de colonizar superficies aun cubiertas con pinturas *antifouling* y afectar su desempeño. Es por eso que las Ps y seco-Ps como agentes capaces de controlar la formación de comunidades bacterianas se convierte en una solución para potencializar diferentes tratamientos contra el *fouling*.

2.4.2 Influencia de las Ps and seco-Ps en la composición de la comunidad bacteriana asociada con la superficie de *P. elisabethae*

Los resultados anteriores, dan pie para creer que la producción de Ps y seco-Ps puede ser una herramienta química que esté utilizando *P. elisabethae* para el control del crecimiento epibacterial, específicamente promoviendo el crecimiento de la población de bacterias Gram-negativas y controlando el crecimiento de bacterias Gram-positivas. Para probar si estos compuestos pueden interferir en la composición de la propia comunidad bacteriana asociada a *P. elisabethae*, se caracterizó dicha comunidad por pirosecuenciación (Sección 2.3.2) y por FISH, resultados previamente reportados (Zorro, 2011). Además se determinó la actividad de las Ps y seco-Ps contra las bacterias

cultivables aisladas de la superficie del octocoral (Sección 2.3.1). De esta manera, se intentó encontrar evidencia experimental que soporte si las Ps y seco-Ps pueden estar teniendo un efecto en el control de la selección, asentamiento y colonización de los microorganismos simbioses de la superficie del octocoral.

2.4.2.1 Comparación de los datos obtenidos para la comunidad bacteriana total asociada con *P. elisabethae* establecida por pirosecuenciación (Sección 2.3.2) y por FISH (Zorro, 2011). Para el propósito de esta parte del trabajo, las tres librerías bTEFAP 16S rDNA de *P. elisabethae* caracterizadas en la sección 2.3.2 y en Correa *et al.*, 2011b, fueron promediadas y comparadas con los resultados mostrados por FISH (Zorro, 2011). La Figura 2-9A muestra la composición taxonómica por *phyla* de la comunidad bacteriana total asociada con *P. elisabethae*, sin considerar las secuencias que no fueron clasificadas en ningún dominio (Bacteria o Archaeae) ni las secuencias que fueron clasificadas como Chloroplast pertenecientes a microorganismos eucariotas tales como algas, diatomeas, protozoos y criptomonas asociados con *P. elisabethae*, encontradas en todas las librerías (Correa *et al.*, 2011b, Sección 2.3.2).

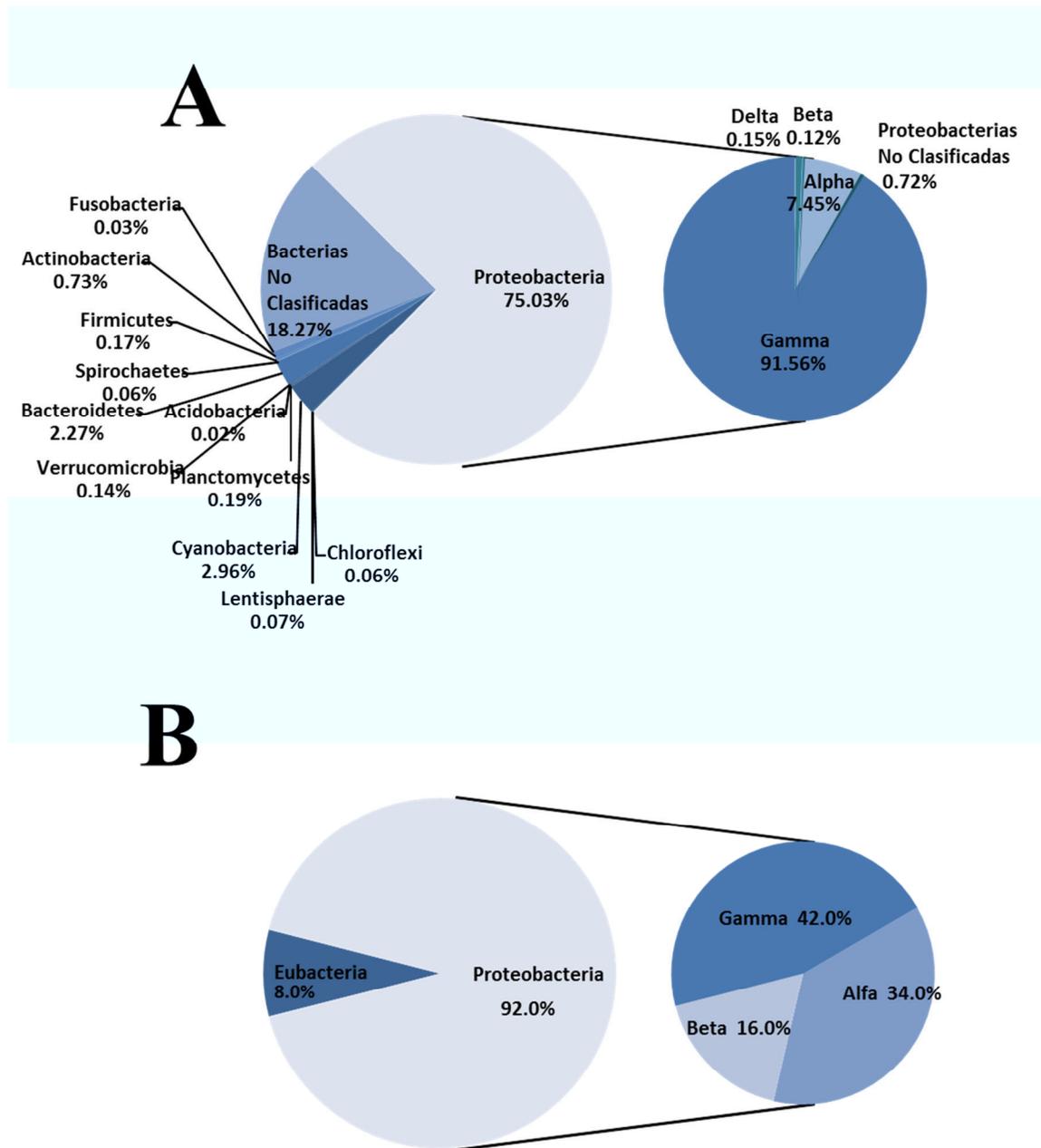


Figura 2-9. Composición taxonómica de la comunidad bacteriana total asociada con *P. elisabethae* (Caribe Sur-Occidental) **A.** Promedio del porcentaje de la composición de las librerías bTEFAP del 16S rDNA de tres individuos de *P. elisabethae*. “Bacteria no clasificadas” secuencias que no pudieron ser clasificadas dentro de ninguno de los *phyla* conocidos y “Proteobacteria no clasificadas” secuencias que no pudieron ser clasificadas dentro de ninguna clase de Proteobacteria. **B.** Promedio del porcentaje del número de células bacterianas detectadas por FISH usando sondas específicas para Eubacteria (EUB338), Alphaproteobacteria (ALF443), Gammaproteobacteria (GAM42a) y Betaproteobacteria (BET42a).

Como se muestra en la Figura 2-9A un rango de 12 *phyla* (Chloroflexi, Lentisphaerae, Cyanobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Acidobacteria, Proteobacteria,

Bacteroidetes, Spirochaetes, Firmicutes, Actinobacteria y Fusobacteria) fueron encontrados asociados con *P. elisabethae*. Además, aunque algunas secuencias fueron clasificadas dentro del dominio Bacteria, éstas no pudieron ser clasificadas dentro de ninguno de los *phyla* conocidos y fueron nombradas como (Bacterias no clasificadas), las cuales corresponden a menos del 20% de toda la comunidad. Por otra parte Proteobacteria (75.03%) fue el *phylum* más abundante seguido de Cyanobacteria (2.96%), Bacteroidetes (2.27%), y Actinobacteria (0.73%). Dentro del *phylum* Proteobacteria, Gammaproteobacteria fue la clase más abundante (92.56%), seguida por Alphaproteobacteria (7.45%), y Proteobacteria sin clasificar (secuencias de Proteobacteria que no pudieron ser clasificadas dentro de ninguna clase, 0.72%), Deltaproteobacteria (0.15%) y Betaproteobacteria (0.12%) (Figura 2-9A).

Con respecto al análisis FISH, empleando la sonda específica EUB338 se encontró que el 92% de las células bacterianas de la superficie corresponden al *phylum* Proteobacteria. Adicionalmente, se detectó que la mayoría de las bacterias asociadas con la superficie del octocoral pertenecen a la clase Gammaproteobacteria (42%), seguido por Alphaproteobacteria (34%) y Betaproteobacteria (16%). En la Figura 2-9B se muestra el porcentaje promedio de células detectadas por cada sonda específica utilizada EUB338, ALF443, GAM42a, BET42a.

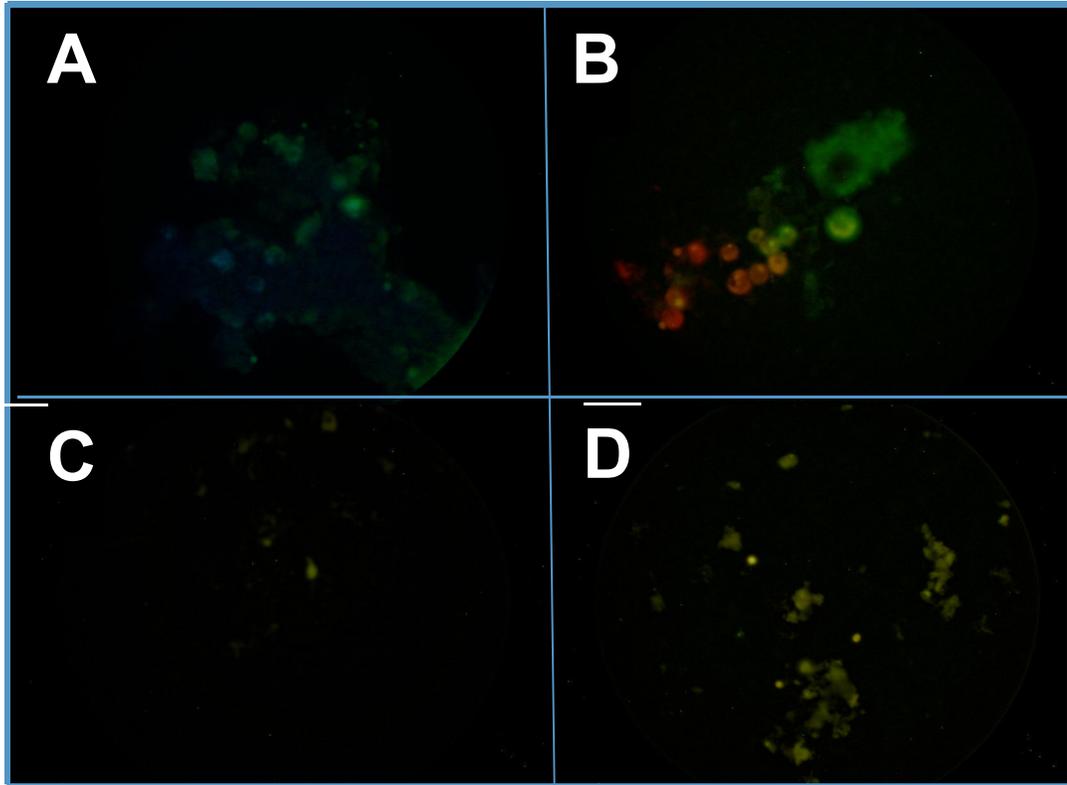


Figura 2-10. Micrografías de epifluorescencia de las bacterias presentes en la superficie de los fragmentos de *P. elisabethae* (Caribe Sur-Occidental). Las células fueron visualizadas usando sondas de FISH para Eubacteria (EUB338-Verde), Alphaproteobacteria (ALF443-Azul), Gammaproteobacteria (GAM42a-Rojo) y Betaproteobacteria (BET42a-Amarillo). Panel I. Células hibridizadas con las sondas EUB338 (verde) y ALF443 (azul) Panel II. Células hibridizadas con las sondas EUB338 (verde) y GAM42a (Rojo). Panel III. Células hibridizadas con la sonda BET42a (amarillo) y Panel IV. Células hibridizadas con la sonda EUB338 (verde) (Escala de las barras, 5 μ m)

Adicionalmente, en la Figura 2-10, se pueden observar las micrografías de epifluorescencia de células hibridizadas con las sondas EUB338 (verde) y ALF443 (azul) correspondientes al conteo total de Proteobacterias y Alphaproteobacteria, respectivamente (Panel **A**); células hibridizadas con las sondas EUB338 (verde) y GAM42a (Rojo) para Proteobacteria y Gammaproteobacteria, respectivamente (Panel **B**); células hibridizadas únicamente con la sonda BET42a (amarillo) para Betaproteobacteria (Panel **C**) e hibridizadas únicamente con la sonda EUB338 (verde) (Panel **D**). La comparación cuantitativa para estos dos últimos paneles (C y D) se realizó de forma independiente debido a que las cantidades de células bacterianas detectadas con BET42a no se distinguían con precisión con el conjunto de filtros de epifluorescencia utilizados.

Los resultados de pirosecuenciación mostraron que la abundancia natural de los *phyla* de bacterias Gram-positivas (Planctomycetes, Verrucomicrobia, Firmicutes y Actinobacteria) asociadas con *P. elisabethae*, fue realmente baja (1.253%), mientras que la abundancia de las bacterias pertenecientes a los *phyla* Gram-negativas (Chloroflexi, Lentisphaerae, Cyanobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes y Fusobacteria) correspondió al 80.5% de la comunidad bacteriana total, en donde Gammaproteobacteria fue la clase más abundante (68.69%) (Correa *et al.*, 2011b; Sección 2.3.2). Las mismas proporciones fueron observadas usando la técnica FISH (Zorro, 2011) para las bacterias asociadas con la superficie, en donde el 92% de las células detectadas están representadas en las tres clases de Proteobacteria: Gammaproteobacteria (42%), Alphaproteobacteria (34%) Betaproteobacteria (16%), esto refleja la gran abundancia de células Gram-negativas asociadas con la superficie de *P. elisabethae* donde al parecer las Ps y seco-Ps pueden tener una influencia química regulando el tipo de bacterias asociadas al octocoral.

Sin embargo, para probar si las Ps y seco-Ps tienen un efecto directo sobre la propia comunidad bacteriana asociada con *P. elisabethae*, se determinó la actividad antibacteriana de estos compuestos (fracción FPST: mezcla de Ps y seco-Ps) contra las bacterias epifíticas cultivables aisladas de la superficie de *P. elisabethae* y del agua circundante de este octocoral

2.4.2.2 Actividad de las Ps y seco-Ps contra las bacterias cultivables asociadas con la superficie de *P. elisabethae*. En total 26 cepas de las 40 bacterias aisladas e identificadas en la sección 2.3.1, pertenecientes a los tres *phyla* encontrados: Actinobacteria (8 cepas) Firmicutes (10 cepas) y Proteobacteria (8 cepas), fueron obtenidas de la superficie del octocoral (S) y del agua de mar circundante del octocoral. *Bacillus* fue el género más abundante con 5 diferentes especies seguido por *Staphylococcus* y *Pseudomonas* con 3 diferentes especies cada género (Tabla 2-10).

La Tabla 2-8 muestra además el diámetro de las zonas de completa inhibición de FPST (300 µg/disco) y de los controles antibacterianos empleados (kanamicina y tetraciclina, 30 µg/disco). Los resultados revelan que la FPST mostró un efecto bactericida selectivo

contra las bacterias cultivables Gram-positivas pertenecientes a los *phyla* Actinobacteria (halos de inhibición entre 9.3 mm y 23.3 mm) y Firmicutes (6.7-13.0 mm), mientras que ésta no mostro actividad contra ninguna bacteria Gram-negativa perteneciente al *phylum* Proteobacteria. Los agentes antibióticos, kanamicina (6.7-28.3 mm) y tetraciclina (8.7-18.3 mm) fueron activos contra la mayoría de las bacterias evaluadas. *Staphylococcus warneri*, *Pseudomonas moraviensis* y *Microbacterium luteolum* no fueron sensibles a ninguno de los controles antibacteriales; *Oceanobacillus profundis*, *Tetrathiobacter mimigardefordensis* y *Brachy bacterium conglomeratum* no fueron sensibles a la kanamicina, y *Micrococcus luteus* no fue sensible a la tetraciclina.

Tabla 2-10. Actividad antibacterial de la fracción FPST (Mezcla de Ps y seco-Ps) aislada de *P. elisabethae* contra las bacterias cultivables asociadas con la superficie de *P. elisabethae*

Código	Bacteria ^a	Fuente ^b	Diámetro (mm) de las zonas de completa inhibición Promedio ± ESM (Diámetro del disco: 5.2 mm)		
			FPST (300 µg)	Kanamycin ^a (30 µg)	Tetraciclina (30 µg)
ACTINOBACTERIA (Gram-positivas)					
RKHC-26	<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	S	13.0±0.7	9.0±0.9	9.0±0.5
RKHC-35	<i>Corynebacterium afermentas</i>	S	11.0±2.3	10.3±1.7	18.3±2.7
RKHC-45	<i>Microbacterium luteolum</i>	S	23.3±3.0	0.0±0.0	0.0±0.0
RKHC-11	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	S	19.7±3.0	11.7±0.7	8.0±2.0
RKHC-49	<i>Kocuria kristinae</i>	S	9.3±1.7	6.7±0.3	15.3±0.7
RKHC-66A	<i>Brevibacterium casei</i>	S	16.7±2.3	9.7±0.6	12.7±1.3
RKHC-33	<i>Brachy bacterium conglomeratum</i>	S-W	21.7±2.7	9.3±0.7	0.0±0.0
RKHC-71A	<i>Micrococcus luteus</i>	S	19.0±3.8	0.0±0.0	17.0±1.4
FIRMICUTES (Gram-positivas)					
RKHC-48	<i>Staphylococcus auricularis</i>	S	6.7±0.9	15.0±1.6	11.0±0.8
RKHC-78A	<i>Staphylococcus epidermis</i>	S	11.0±2.0	9.0±0.5	10.3±0.9
RKHC-78B	<i>Staphylococcus warneri</i>	S	8.7±0.7	0.0±0.0	0.0±0.0
RKHC-9	<i>Bacillus cereus</i>	S	20.3±0.7	9.0±1.4	8.7±1.1
RKHC-21	<i>Bacillus licheniformis</i>	S	14.3±2.7	11.3±2.0	20.0±1.3
RKHC-37	<i>Bacillus mojavensis</i>	S-W	10.0±0.7	20.0±2.4	14.3±2.3
RKHC-68A	<i>Bacillus horneckiae</i>	S-W	10.0±1.5	19.0±1.8	8.0±1.7
RKHC-69A	<i>Bacillus anthracis</i>	S-W	13.0±2.7	17.3±0.8	9.0±0.6
RKHC-62B	<i>Oceanobacillus profundis</i>	S	11.7±0.9	12.7±2.1	0.0±0.0
RKHC-8	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	S	11.3±2.0	15.7±1.5	12.0±0.6
PROTEOBACTERIA (Gram-negativas)					
RKHC-25	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	S	0.0±0.0	12.5±0.9	16.3±2.4
RKHC-61A	<i>Pseudomonas grimonti</i>	S	0.0±0.0	28.3±1.2	9.7±1.1
RKHC-42	<i>Pseudomonas moraviensis</i>	S	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
RKHC-67B	<i>Vibrio sinaloensis</i>	S	0.0±0.0	14.5±0.3	14.5±1.7
RKHC-76A	<i>Vibrio proteolyticus</i>	S	0.0±0.0	10.0±1.1	11.7±1.9

RKHC-23	<i>Photobacterium euosenbergii</i>	S-W	0.0±0.0	9.0±1.0	11.7±1.4
RKHC-60A	<i>Tetrathiobacter mimigardefordensis</i>	S-W	0.0±0.0	16.0±1.3	0.0±0.0
RKHC-14	<i>Ruegeria atlantica</i>	S	0.0±0.0	11.7±1.8	13.0±1.3

^a Caracterización hecha por secuenciación del gen 16S rRNA (Correa *et al.*, 2011b; Sección 2.3).

^b Las cepas bacterianas fueron clasificadas de acuerdo a la fuente de donde fueron aisladas S: bacterias aisladas de la superficie de *P. elisabethae* y W: bacterias aisladas de agua mar alrededor de *P. elisabethae*.

De acuerdo a todos los resultados mostrados hasta el momento, las Ps y *seco*-Ps parecen modular el crecimiento bacteriano (inhibiendo cierto tipo de bacterias Gram-positivas e induciendo la asociación de bacterias Gram-negativas a la superficie de *P. elisabethae*), lo cual puede sugerir un papel ecológico de estos compuestos como moduladores químicos de la epíbiosis de la superficie de *P. elisabethae*. En la Figura 2-11 se muestra un mecanismo propuesto que involucra a las Ps y *seco*-Ps como promotoras de una comunidad bacteriana simbiote específica (bacterias Gram-negativas) en la superficie del octocoral y la reducción de la abundancia de otro tipo de bacterias (bacterias Gram-positivas), logrando indirectamente inhibir las señales de asentamiento larval asociadas con el *biofilm*, así como también disuadiendo directamente el *fouling* de larvas de invertebrados o esporas de microalgas y macroalgas. Todo lo anterior tiene como consecuencia que la superficie de *P. elisabethae* se mantenga limpia, a excepción de las bacterias que este animal desea o necesita para sus fines de supervivencia.

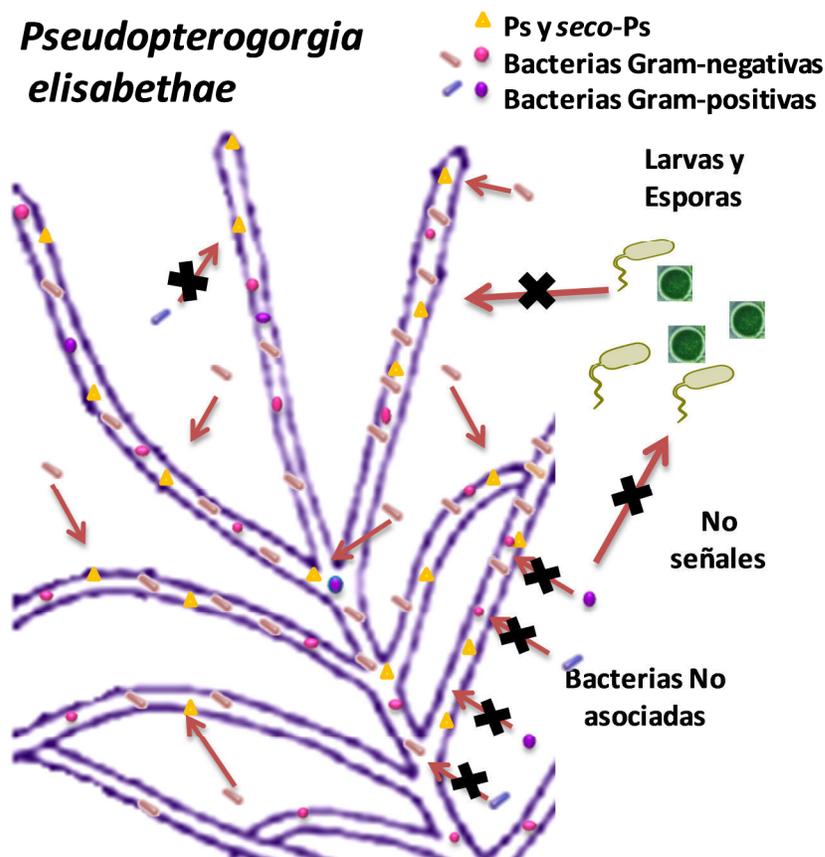


Figura 2-11. Modelo del posible mecanismo de defensa antifouling de *P. elisabethae* (Caribe Sur-Occidental) a través de las Ps y seco-Ps

En conclusión todos los experimentos mostrados en esta sección respaldan la hipótesis de que las Ps y seco-Ps tienen un papel en la selección de los organismos asociados con la superficie de este octocoral y en la regulación de sus organismos simbiotes, específicamente su comunidad bacteriana, lo que parece contribuir a mantener limpia la superficie de *P. elisabethae*.

De esta manera, es de gran importancia planear estudios adicionales para encontrar más información acerca de cómo es el mecanismo o los mecanismos de defensa de este holobionte y también como estos compuestos pueden estar involucrados. En los últimos años las asociaciones entre microorganismos e invertebrados marinos han recibido mucha atención debido a su alta importancia funcional, entre ellos la producción de compuestos por los microorganismos simbiotes cuya función es proteger al hospedero contra la depredación, asentamiento y colonización de otras especies sobre su superficie.

2.5 Evaluación de la capacidad de las bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae* para producir compuestos químicos (bioactivos o no bioactivos)

Desde el descubrimiento de la penicilina y su producción a gran escala durante la segunda guerra mundial, los microorganismos han sido objeto de múltiples estudios motivados por la gran variedad de compuestos y medicamentos que son producidos a partir de ellos (Berdy, 2005). Específicamente, para el caso de los microorganismos marinos, a pesar de que fueron inicialmente detectados en simbiosis con invertebrados desde hace muchos años, no fue sino hasta la década de los ochenta cuando el número de publicaciones de productos naturales a partir de ellos aumentó vertiginosamente, hasta el punto de igualar el número de compuestos publicados por año, al de los aislados a partir de cnidarios (Blunt *et al.*, 2011), convirtiéndose además en una fuente renovable de sustancias con estructura química novedosa, sin contraparte con los reportados para otros organismos marinos o terrestres, y con un alto potencial biomédico e industrial (Blunt *et al.*, 2011; Newman y Hill 2006; Piel, 2006).

Generalmente, los microorganismos marinos tienen la capacidad para desarrollar adaptaciones más especializadas, estables, y específicas al microambiente creado por el organismo hospedero (Egan *et al.*, 2008), allí son en gran parte los responsables del ciclo de nutrientes, así como también de la producción de moléculas bioactivas, las cuales pueden estar involucradas en la prevención de la depredación y colonización del holobionte por otros microorganismos y macroorganismos (Mydlarz *et al.*, 2010; Mouchka *et al.*, 2010).

Actualmente, el estudio de obtención de compuestos naturales a partir microorganismos comprende inicialmente su cultivo en lo posible en diferentes condiciones, seguido de la extracción y fraccionamiento de los compuestos producidos, su identificación y posterior conservación tanto de mezclas como de los compuestos puros en librerías (Penesyan *et al.*, 2010), las cuales son mucho más diversas en cuanto a la clase de compuestos presentes en ellas (posibles nuevos compuestos, diferentes tipos de esqueleto de carbono y diferente estereoquímica), en comparación a las librerías existentes de compuestos sintéticos (Ito *et al.*, 2011). Sin embargo, con el fin de evitar el largo proceso de aislamiento e identificación de compuestos con estructuras nuevas o conocidas y con

o sin actividad biológica, que se presenta como uno de los principales retos a enfrentar por parte de los científicos de productos naturales, se ha abordado el estudio de microorganismos de dos maneras en donde se prefiere utilizar la combinación cultivos microbianos miniaturizados con un *screening* químico y/o con un *screening* biológico. En el primero, el *screening* químico hace uso de técnicas de análisis como UPLC-MS (Cromatografía Líquida de ultraeficiencia acoplada a espectrometría de masas) para la búsqueda de un compuesto específico y para la construcción de librerías, como un procedimiento de derreplicación mucho más rápido y conveniente que solo hasta ahora se está empezando a usar para la identificación temprana de fuentes alternativas de compuestos nuevos o conocidos con actividad biológica (Berrue *et al.*, 2011). Sin embargo, es importante anotar que la investigación tradicional partiendo del escalamiento del cultivo, seguido de extracción, aislamiento por métodos cromatográficos convencionales y determinación estructural por los métodos espectroscópicos usuales, sigue siendo el único método para la identificación inequívoca de las sustancias producidas por microorganismos. En el segundo, el *screening* biológico permite la selección de cepas que produzcan compuestos con actividad biológica comprobable para posteriormente realizar el escalonamiento y aislamiento de los compuestos responsables de dicha actividad.

Así, en esta parte del trabajo se realizó la evaluación de la capacidad para producir sustancias químicas (bioactivas o no) por parte de las 40 bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae*, utilizando una estrategia metodológica que involucró inicialmente las siguientes etapas a) cultivo miniaturizado en placas de 24 pozos con un volumen de 5 mL b) obtención de extractos en fase sólida con los compuestos producidos en los cultivos c) realización de un *screening* químico y de un *screening* biológico de los extractos crudos de los cultivos de las 40 bacterias en cuatro medios diferentes. El *screening* químico involucró a su vez un análisis por UPLC-MS de los extractos obtenidos en el paso b para detectar la producción de Ps y seco-Ps en las 40 bacterias estudiadas en cuatro medios diferentes y la producción de otros compuestos producidos por 14 de las bacterias estudiadas y luego un análisis por derreplicación de los productos detectados en los cultivos, usando la plataforma AntiBase 2007TM. El *screening* biológico se hizo a través de los siguientes pasos a) evaluación de la actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* de los extractos de cultivo de las 40 bacterias en 4 medios diferentes b) escalamiento del cultivo de dos bacterias en los medios donde sus

productos presentaron los mayores valores de actividad c) fraccionamiento bioguiado de los extractos con el fin de encontrar el compuesto o la fracción responsable de dicha actividad y finalmente la identificación de los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana.

2.5.1 Cultivo miniaturizado de las 40 bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae* y extracción de los productos

La realización de 506 cultivos miniatura en paralelo (volumen de 5 mL en placas de 24 pozos) de las 40 bacterias cultivables de los *phyla* Actinobacteria, Firmicutes y Proteobacteria, simbiontes del octocoral *P. elisabethae*, en cuatro medios diferentes por triplicado además del blanco de cultivo (ocho medios sin inocular), permitió reducir significativamente el tiempo, gasto de reactivos y ahorro de esfuerzo. Adicionalmente, con el fin de maximizar la cantidad de sustancias adsorbidas una vez liberadas por las bacterias al medio, los cultivos se llevaron a cabo en presencia de la resina Diaion™ HP-20, un adsorbente poliaromático selectivo para compuestos hidrofóbicos (Li y Chase, 2010), que además los separa de las sales presentes en el medio; su principal ventaja frente a otras resinas es su gran área superficial (~500 m²/g) lo que le confiere una mayor capacidad de adsorción. Los rendimientos de extracción variaron dependiendo del medio de cultivo empleado, así para medios ricos en nutrientes, **B**, **TAK**, **TSB**, **MB**, **NB-IO** y **E1** se obtuvieron rangos de cantidad de extracto entre 2-20 mg, mientras que para los cultivos en medios bajos en nutrientes, **NB/10** y **MMB** los rangos estuvieron entre 0-2 mg.

En la fase del cultivo se manejó como única variable la composición del medio de acuerdo a la fuente de carbono, nitrógeno y fosfato, así como también la concentración de los nutrientes, de esa manera se utilizaron medios ricos en nutrientes (para las Actinobacteria **B**, **TAK** y **TSB**; para las Firmicutes **MB** y **TAK**; y para las Proteobacteria **TAK**, **NB-IO** y **E1**) y bajos en nutrientes (Para las Actinobacteria **MMB**; para las Firmicutes **MMB** y **NB/10** y para las Proteobacteria **MMB**) y se mantuvieron constantes factores tales como la temperatura y aireación (agitación). Es importante anotar que en nuestro diseño experimental, la selección del tiempo de incubación estuvo más encaminada a garantizar que el tiempo empleado fuera el necesario para que las bacterias llegaran a su fase exponencial de crecimiento (mayor rendimiento de

productos), particularmente en los medios bajos de nutrientes (**MMB** y **NB/10**) donde se necesitó un mayor tiempo de incubación.

En cuanto a la extracción en fase sólida utilizada, ésta permitió mayores rendimientos y menores costos en el proceso total, debido a que los compuestos de interés fueron retenidos selectivamente en la resina. Al comparar esta metodología con la que utiliza extracción con solventes se evidencia que en esta última son necesarios pasos adicionales para eliminar impurezas tales como sales y componentes del medio de cultivo.

2.5.2 Screening de compuestos químicos productos de cultivo de las bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae*

El análisis químico simultáneo a partir de extractos crudos de un número elevado de muestras sólo recientemente ha sido posible con el advenimiento de la tecnología UPLC-MS, la cual permite el análisis de un gran número de muestras en un período corto, al tiempo que la sensibilidad y resolución de la técnica ha aumentado (Toyo'oka, 2008; Yao *et al.*, 2010). Si bien, el proceso de preparación de medios, preinóculo y cultivo *per se*, implican varios días de trabajo, la inyección de las muestras y el análisis de los datos obtenidos por UPLC-MS es el paso crucial de esta metodología, aunque su tiempo de análisis sea menor. Por ejemplo en este trabajo se pudo analizar por UPLC-MS una placa de 96 pozos en menos de un día empleando aproximadamente 10 min por muestra en el instrumento, esta rápida detección química de los productos de cultivo de las bacterias es uno de los mayores aportes realizados con este diseño experimental.

La detección e identificación rápida (*screening* químico) de los compuestos producidos por las bacterias cultivables simbiotes del octocoral *P. elisabethae* se realizó con el fin de detectar la producción de Ps, *seco*-Ps y compuestos relacionados en las 40 bacterias cultivadas en cuatro medios diferentes y también con el fin de analizar los compuestos detectados en los cultivos de 14 de las bacterias estudiadas y realizar el análisis por derreplicación de estos productos, usando la plataforma AntiBase 2007TM, con esta información se construyó una librería que consta de los productos de cultivo del conjunto de 14 de las bacterias estudiadas en cuatro medios diferentes y la posterior identificación por derreplicación de algunas de las sustancias producidas si éstas habían sido previamente reportadas, así como también una primera aproximación a la búsqueda de

la mejor fuente y las mejores condiciones de cultivo para la producción de las sustancias presentes en la librería.

Una vez todos los cultivos fueron extraídos, los extractos fueron dispuestos en las placas de 96 pozos a una concentración entre 1-5 mg/mL usando como disolvente metanol grado CLAE, a un volumen final de 1 mL y analizados por UPLC-MS, en una micro columna de alta resolución en fase reversa. Las separaciones fueron monitoreadas con dos detectores universales: ELSD y MS y un detector específico PDA para sustancias con grupos cromóforos en el rango de 200-600 nm. En total se analizaron 516 muestras (480 extractos de los cultivos de las 40 bacterias en cuatro medios por triplicado más 24 extractos de los controles de los ocho medios sin inocular por triplicado y 12 blancos de solvente).

2.5.2.1 Detección de la producción de las Ps, seco-Ps y compuestos relacionados en los extractos de cultivo de las 40 bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae* usando UPLC-MS. Para determinar la posible producción de Ps y seco-Ps por parte de las bacterias 40, fueron adicionalmente analizadas bajo las mismas condiciones de UPLC-MS, todas las Ps y seco-Ps aisladas en este trabajo (Figura 2-4; Sección 2.1), así como también los diterpenos no glicosidados en equilibrio (MEDNG), aislados a partir de muestras de *P. elisabethae* de la Isla de San Andrés (Arias, 2005; Duque *et al.*, 2006), y un estándar de la aglicona de las Ps, obtenido por síntesis a partir de Ps aisladas de muestras de *P. elisabethae* de Las Bahamas, donado por el profesor Russell Kerr, UPEI, y registrando para cada sustancia su respectivo tiempo de retención (RT), y su espectro de masas en modo APCI. Luego, se realizó un estudio del espectro de masas de los estándares para seleccionar los iones diagnóstico (característicos) de cada uno de ellos (Tabla 2-11).

Tabla 2-11. Base de datos de los estándares de Ps, *seco*-Ps y compuestos relacionados con su respectivo tiempo de retención por UPLC-MS (TR), peso molecular (PM) y los iones diagnóstico observados en su espectro de masas en modo APCI

COMPUESTO	TR (min)	PM	IÓN BASE	IÓN [M+H] ⁺
Ps aglicona	5.87	300	301	301
MEDNG (Ps aglicona monoacetilada)	5.89	342	301	343
PsG (Fucosa)	5.89	446	301	447
PsP (Fucosa)	5.89	446	301	447
PsQ (Fucosa monoacetilada)	5.90	488	301	489
PsT (Arabinosa)	5.85	432	301	433
PsU (Arabinosa monoacetilada)	5.89	474	301	475
3-O-acetil-PsU (arabinosa diacetilada)	5.95	516	301	517
seco-PsJ (Arabinosa)	5.88	434	303	435
seco-PsK (Fucosa)	5.87	448	303	449

En la figura 2-12 se muestra la fragmentación de las Ps, *seco*-Ps y de los diterpenos no glicosidados MEDNG bajo EM de Ionización química en modo APCI, en donde puede observarse que los iones característicos de este tipo sustancias son básicamente los iones base en m/z de 301 para los compuestos con esqueleto diterpénico amflectano (Ps, aglicona de las Ps y MEDNG) y en m/z de 303 para los compuestos con esqueleto diterpénico serrulatano (*seco*-Ps), además de los iones $[M+H]^+$ para cada compuesto, tal como se explicó para los espectros de masas de estos compuestos en la sección 2.1.1 (Figura 2-3). Esta información constituyó el punto de partida para realizar el seguimiento de estos compuestos en los extractos de los cultivos bacterianos, siendo seleccionados específicamente los iones en m/z 301 y m/z 303 como iones diagnóstico para la detección de este tipo de sustancias, en el rango de tiempos de retención comprendido entre 5.85 y 5.95 min. Los iones $[M+H]^+$ fueron descartados como iones diagnóstico debido a su baja intensidad en el espectro de masas.

Para ilustrar el procedimiento seguido la figura 2-13 muestra el perfil cromatográfico de masas TIC (*Total Ion Chromatogram*) por UPLC-MS de dos de los estándares empleados en este estudio, la PsT (Figura 2-13A) y la *seco*-PsJ (Figura 2-13C), entre el rango de 4.5 min hasta 9.0 min, junto con los cromatogramas de masas RIC (*Reconstructed Ion Chromatogram*) siguiendo únicamente los iones diagnósticos m/z 301 (Figura 2-13B) para el caso de buscar Ps y m/z 303 (Figura 2-13C) para buscar *seco*-Ps. A manera de ejemplo, se muestra también el perfil cromatográfico de masas TIC del extracto del cultivo de la bacteria *Jeotgalicoccus aerulatos* (RKHC-28) en medio MB, replica 1 (Figura 2-13E), en donde se observa la elución de varios compuestos producidos por *J. aerulatos*

(RKHC-28) con tiempos de retención similares a los estándares empleados. Para verificar que éstos correspondían a compuestos tipo Ps o seco-Ps, se obtuvieron los perfiles RIC de esta muestra empleando los iones m/z 301 (Figura 2-13F), y m/z 303 (Figura 2-13G), descartando de esa manera que los compuestos producidos por *J. aerulatos* (RKHC-28) cuando es cultivada en **MB**, correspondieran a Ps, seco-Ps o compuestos relacionados.

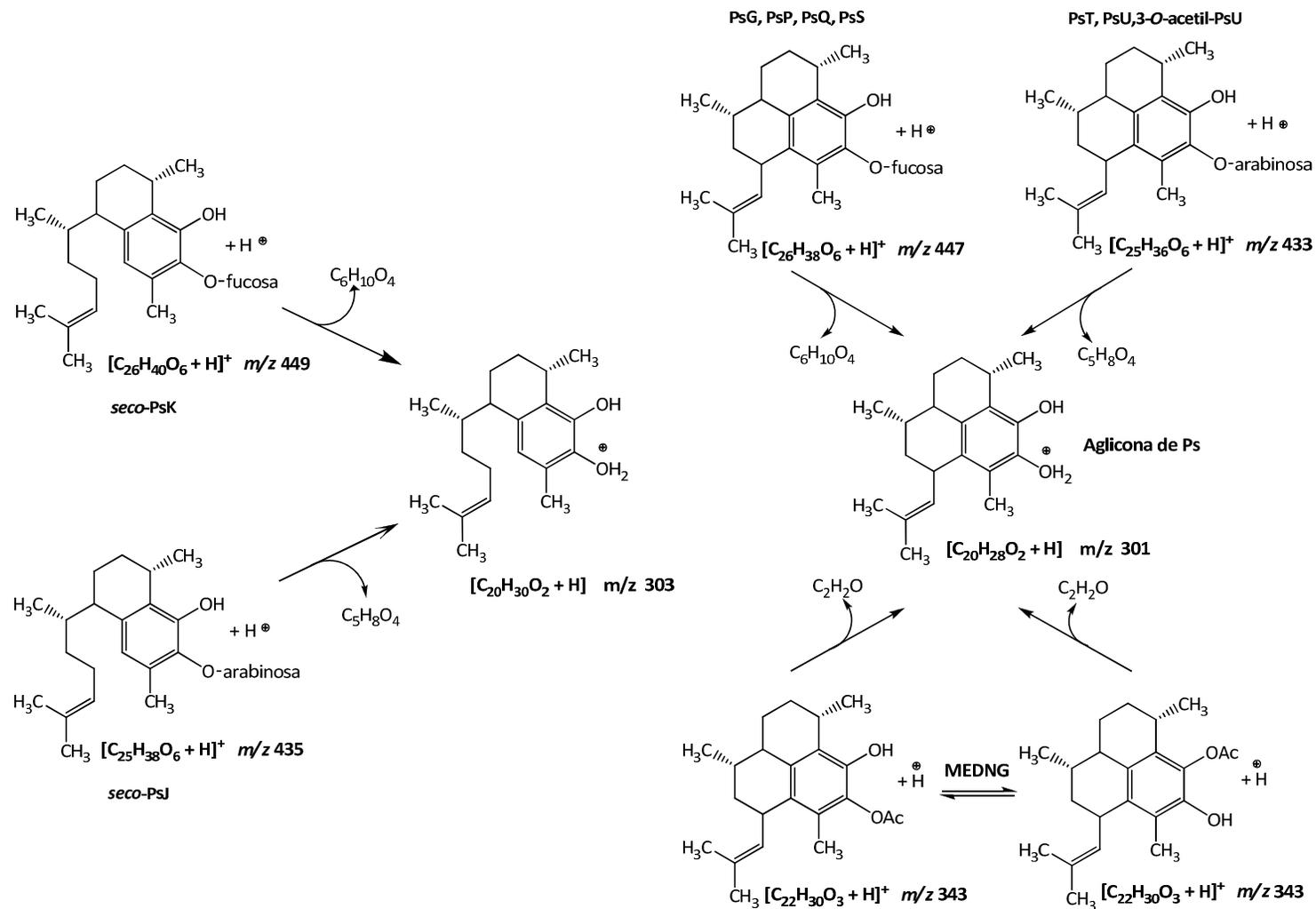


Figura 2-12. Fragmentación de compuestos tipo Ps y seco-Ps y de los diterpenos no glicosidados MEDNG bajo EM de Ionización química en modo APCI

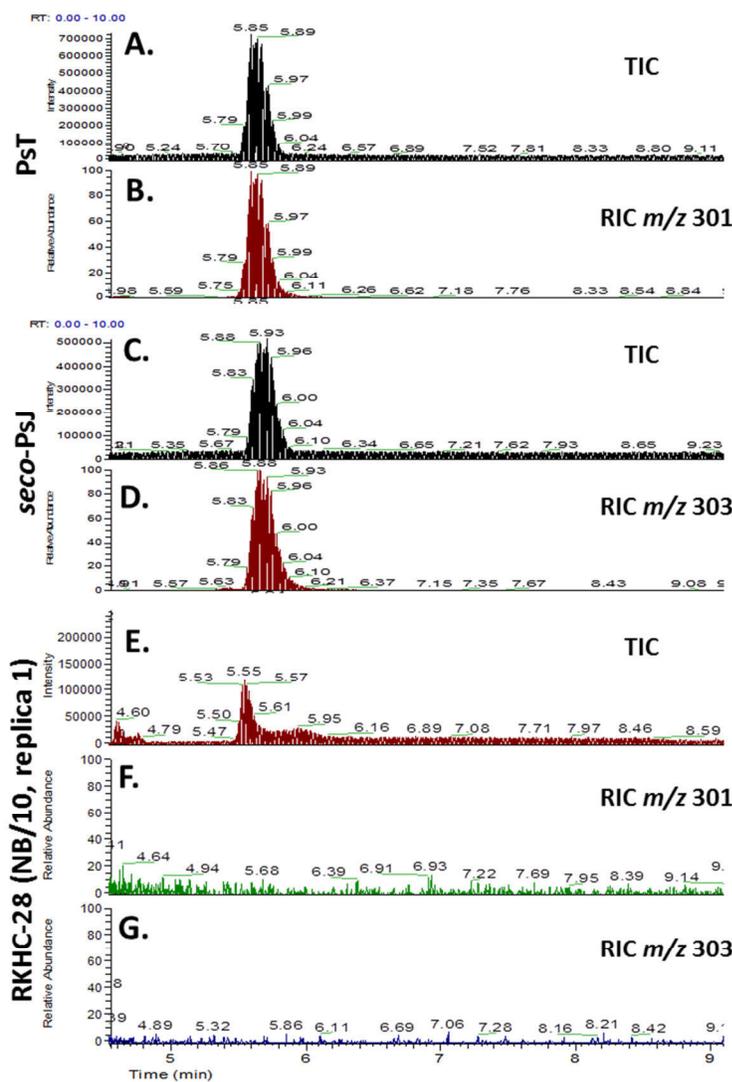


Figura 2-13. Perfil cromatográfico de masas por UPLC-MS de un estándar de PsT, un estándar de *seco*-PsJ y del extracto del cultivo de la bacteria *Jeotgalicoccus aerulatos* (RKHC-28) en medio NB/10, replica 1. **A:** TIC (*Total Ion Chromatogram*) del estándar de la PsT. **B:** RIC (*Reconstructed Ion Chromatogram*) del ión en m/z 301 de estándar de la PsT. **C:** TIC del estándar de la *seco*-PsJ. **D:** RIC del ión en m/z 303 del estándar de la *seco*-PsJ. **E:** TIC del extracto del cultivo de *J. aerulatos* (RKHC-28). **F:** RIC del ión en m/z 301 del cultivo de *J. aerulatos* (RKHC-28). **G:** RIC del ión en m/z 303 del cultivo de *J. aerulatos* (RKHC-28).

El análisis de ambos RICs obtenidos para cada una de las 516 muestras analizadas (480 extractos de los cultivos de las 40 bacterias en cuatro medios por triplicado más 24 extractos de los controles de los ocho medios sin inocular por triplicado y 12 blancos de solvente) arrojó como resultado que no hubo una producción distinguible de sustancias con un TR entre 5.70 min y 6.00 min que presentaran dentro de su EM los iones en m/z

de 301 y m/z 303 provenientes de compuestos tipo Ps o seco-Ps, indicando que bajo las condiciones de cultivo empleadas y realizando el protocolo de extracción y de análisis planteados. En el caso de observar la presencia de estos iones en el rango de tiempo seleccionado, se verificó si su espectro de masa presentaba patrones de fragmentación característicos de este tipo de sustancias, descartando de esa manera falsos positivos.

El uso de técnicas de caracterización como RMN y EM acopladas a CLAE surgió como una herramienta para el rápido análisis de muestras de origen natural. En este estudio se escogió el análisis por UPLC-MS como herramienta para la detección preliminar de Ps y seco-Ps, debido a que este tipo de sustancias presentan un espectro de masas característico, de allí que el empleo del detector de EM surja como una de sus principales ventajas. Adicionalmente, esta técnica tiene otras ventajas como el permitir trabajar con pequeñas cantidades de muestra, con tiempos de análisis cortos y un amplio espectro de polaridad de los compuestos a estudiar.

Sin embargo, a pesar de las ventajas propias de esta técnica, uno de los mayores problemas que se presentan en el estudio de los productos naturales es la baja concentración en la que normalmente estos metabolitos se encuentran en el organismo de origen o son producidos en las distintas condiciones de cultivo, en caso de ser de origen microbiano, por lo cual se hace difícil tanto su detección como aislamiento. Específicamente, para este estudio, pudo ser probable que de llegar a ser producidas las Ps y seco-Ps por alguna de las bacterias estudiadas en las diferentes condiciones de cultivo, su producción haya sido muy limitada y la concentración a la cual se encontraban en el extracto estuvo por debajo del límite de detección del método para estas sustancias. Para el caso del equipo y en las condiciones empleadas las Ps tienen un límite de detección del orden de nanogramos por mililitro (Bunyajetpong, 2011).

2.5.2.2 Análisis de los compuestos presentes en los extractos de cultivo de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes usando UPLC-MS e identificación por derreplicación con Antibase 2007™. Con el fin de tener una idea sobre el tipo de sustancias que producen las bacterias del *phylum* Firmicutes se decidió realizar el análisis de cada uno de los cromatogramas de los extractos de cultivo de 14 bacterias, en cuatro medios diferentes. Para ello cada una de las 192 muestras (14 bacterias en cuatro medios por triplicado, junto con los controles de medio y de solvente) fue

estudiada en búsqueda de los productos de cultivo de las bacterias. Así, se pudieron detectar 593 compuestos en total, sin embargo, para verificar que éstos correspondían realmente a sustancias producidas selectivamente por las bacterias, se generó la librería de los compuestos producidos por las bacterias del *phylum* Firmicutes a través del software Xcalibur™, teniendo en cuenta el tiempo de retención y el ión $[M+H]^+$ de cada uno de los compuestos detectados.

Para ello, las 593 señales distintas en los cromatogramas de masas para todo el conjunto de inyecciones, sirvieron para generar el primer insumo de la base de datos aquí reportada haciendo uso del software Xcalibur™, del equipo de UPLC-MS, el cual , realiza la búsqueda simultánea de determinada sustancia de manera cuantitativa a través de la medición del área bajo la curva de la señal con un tiempo de retención y una masa establecida, en todos los cromatogramas de masas, y genera una gráfica en tres dimensiones, donde se relaciona, la muestra (bacterias, medios sin inocular y metanol) vs. Medios de cultivo, vs. el área bajo la curva. El haber realizado el cultivo de cada bacteria por triplicado, sirvió para descartar posibles falsos positivos. El análisis de las gráficas permitió establecer cuáles de las 593 señales corresponden a ruido en el equipo (presente en todos los cromatogramas), a contaminación de la columna (presente en los cromatogramas de masas del metanol) y a componentes del medio remanentes en la resina HP-20 (presente en los cromatogramas de masas del medio). Así, se logró determinar que de las 593 señales, tan solo 46 correspondían a verdaderos productos naturales producidos por las bacterias de manera selectiva. Paso seguido se verificó para cada una de las 46 señales que el ión inicialmente observado correspondía realmente al ión $[M+H]^+$.

Aunque el proceso de selección del ión molecular no es fácil, éste se hizo teniendo en cuenta las siguientes consideraciones (Ardrey, 2003) a) la técnica de ionización fue APCI y ésta favorece la formación de especies moleculares con muy poca fragmentación, b) Se añadió a la fase móvil el modificador ácido fórmico, el cual ayuda a la protonación de las especies moleculares, favoreciendo la formación de iones $[M+H]^+$ intensos, c) Luego de seleccionar alguno de los iones presentes en el espectro como ión molecular, se buscaron iones correspondientes a pérdidas lógicas o a iones aductos lógicos, entre ellos $[M+H+Na]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+H+K]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Na+K]^+$, $[M+H+CH_3OH]^+$, $[M+Na+CH_3OH]^+$,

$[M+HCOOH]^+$, típicos en este tipo de análisis, d) Se buscó la ayuda del software Xcalibur™ con la opción de hacer la reconstrucción de los cromatogramas de masas de cada uno de los iones que no coincidieran con pérdidas o aductos lógicos a partir del ión molecular seleccionado (RICs: *Reconstructed Ion Chromatograms*), para descartar si eran productos del ruido de fondo, e) Se verificó que las pérdidas lógicas encontradas en el espectro de masas fueran congruentes con los iones de fragmentación encontrados en los espectros hijos del ión seleccionado como $[M+H]^+$. Si bien este análisis se hizo con la mayor rigurosidad, es importante aclarar que el ion seleccionado como $[M+H]^+$, mostrado en la librería (Tabla 2-12) es solo aquel que mayor probabilidad tiene de serlo.

A manera de ejemplo la Figura 2-14 muestra el análisis UPLC-MS de los productos de cultivo de la bacteria *Bacillus firmus* (RKHC-13) en **MB**. Para claridad de presentación de resultados la Figura 2-14 está dividida en cinco secciones: **A**: muestra el perfil cromatográfico del extracto de los productos de cultivo monitoreado por los tres detectores empleados PDA, ELSD y MS. **B** y **C**: Muestran los espectros de masas en modo APCI de los compuestos con tiempo de retención 4.37 min y 5.24 min, con $[M+H]^+$ en m/z 491.2 y 373.3, respectivamente. Finalmente **D** y **E**: muestran las gráficas generadas por Xcalibur™ para estos dos compuestos, mostrando en el eje X los medios utilizados **MB**, **TAK**, **MMB** y **NB/10** por triplicado, en el eje Y las 14 bacterias cultivadas junto con el control del medio sin inocular y metanol como blanco de solvente y en el eje Z el área bajo la curva de la señal de la sustancia estudiada.

La Figura 2-14D muestra cómo la sustancia **16** con tiempo de retención 4.37 min con $[M+H]^+$ en m/z 491.2 es producida únicamente por la bacteria *B. firmus* (RKHC-13) en medio **MB**, mientras que la Figura 2-14E muestra como la sustancia con tiempo de retención 5.24 min con $[M+H]^+$ en m/z 373.3 fue detectada en todos los extractos de todos los cultivos en **MB** de las 14 bacterias así como también en el extracto del control del medio, pero no en los blancos de solvente ni en los extractos de los cultivos realizados en otros medios, indicando que esta sustancia corresponde a un componente del medio **MB**.

Al analizar cada una de las 593 gráficas generadas por el software Xcalibur™, se logró determinar cuáles sustancias corresponden a componentes del medio (gráficas similares a la Figura 2-14E) y cuales corresponden a sustancias producidas selectivamente por las

bacterias (gráficas similares a la Figura 2-14D) logrando detectar en total 46 diferentes productos naturales.

La Tabla 2-12 muestra la librería de compuestos detectados como productos de cultivo de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbiotes aisladas del octocoral *P. elisabethae*, mostrando en cada caso, su tiempo de retención, el ión $[M+H]^+$, la bacteria o bacterias que producen dicho compuesto y el medio o medios en que fue producido. Adicionalmente, para cada una de las sustancias detectadas se realizó la búsqueda de su ión $[M+H]^+$ en la base de datos Antibase™ 2007, suministrando para cada sustancia el número total de compuestos reportados en la literatura y el número de compuestos reportados para los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus* con igual ión $[M+H]^+$, sin considerar el tiempo de retención como criterio de acotamiento. Es importante aclarar que la búsqueda en Antibase™ también se puede realizar con otros iones pseudomoleculares o aductos tales como $[M-H]^-$ y $[M+Na]^+$ de los compuestos de origen microbiano.

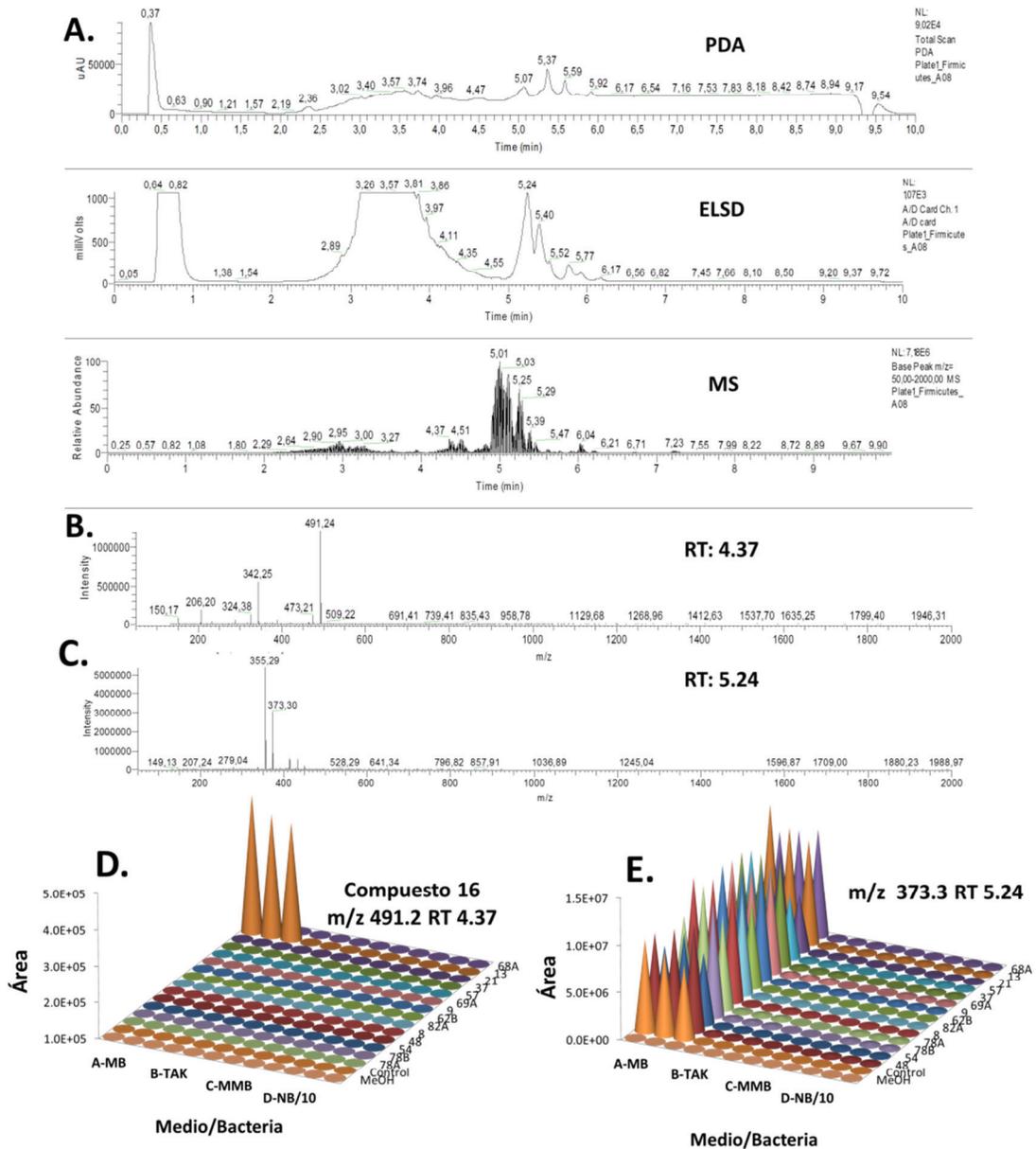


Figura 2-14. Análisis UPLC-MS de los productos de cultivo de la bacteria *Bacillus firmus* (RKHC-13) en MB. **A:** Perfil cromatográfico (detectores PDA, ELSD y MS) de los productos de cultivo. **B.** Espectro de masas en modo APCI del compuesto **16** con tiempo de retención 4.37 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 491.2. **C.** Espectro de masas en modo APCI del compuesto con tiempo de retención 5.24 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 373.3. **D.** Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la cantidad de sustancia **16** con tiempo de retención 4.37 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 491.2 **E.** Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la cantidad de sustancia con tiempo de retención 5.24 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 373.3. Medios n=3, Bacterias: 14 cepas junto con el control del medio sin inocular y Metanol como blanco de solvente.

										NB/10	NB/10							
54	495.6	8.43	TAK	TAK				TAK		TAK	TAK				TAK	TAK	56	0
55	1094.8	5.88					MB TAK			MB	MB		MB	MB	MB	MB	7	0

^a. N° total de compuestos reportados en la base de datos Antibase 2007; ^b. N° de compuestos reportados para especies a los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*. Medios de cultivo: **MB**: Caldo marino, **TAK**: Caldo Takashi, **MMB**: Caldo mínimo marino y **NB/10**: Caldo nutritivo dilución a diez.

Para la mayoría de las sustancias presentes en la librería existen más de 10 compuestos en total reportados con el mismo ión $[M+H]^+$, por esta razón llegar a aseverar cuál de esos compuestos corresponde a cada una de las sustancias detectadas con la información hasta este punto es una tarea imposible. Sin embargo, de acuerdo a estudios previos de bacterias del mismo género y revisando la bibliografía se puede llegar a una primera aproximación acerca de la estructura de la sustancia o del tipo de sustancia detectada. Un ejemplo, es el caso de la sustancia **14** detectada como producto en los cultivos de las bacterias *Bacillus pumilus* (RKHC-57) y *Bacillus mojavensis* (RKHC-37) en **MB**, **TAK** y **NB/10**, que presenta un ión $[M+H]^+$ en m/z 425.3, para la cual hay reportados en total 99 compuestos, pero de ellos solo 2 han sido aislados a partir de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* y específicamente uno de ellos la amicoumacina B (Figura 2-14) la cual fue aislada previamente del cultivo en **MB** de la cepa *B. pumilus* (SP21), encontrada en sedimentos recolectados en Las Bahamas (Berrue *et al.*, 2009). De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta que la sustancia **14** fue detectada en nuestra cepa *B. pumillus* (RKHC-57) podría sugerirse que ésta corresponde a la amicoumacina B.

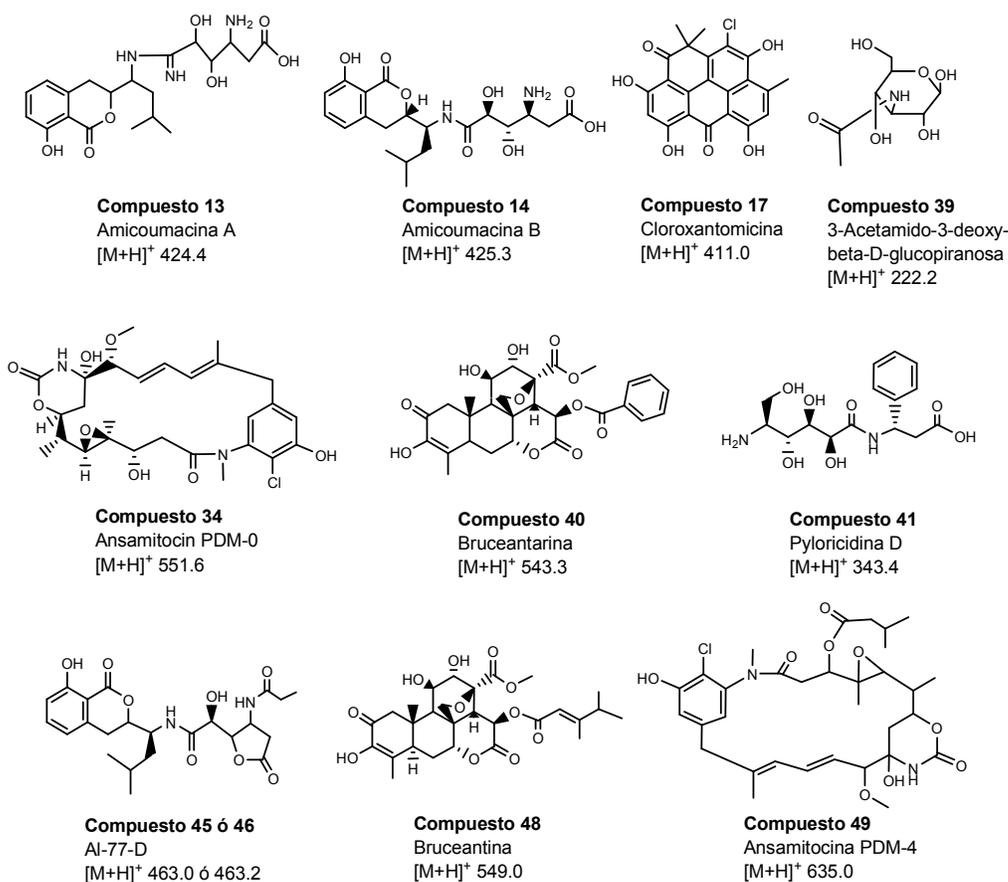


Figura 2-15. Estructuras propuestas para 10 de los compuestos encontrados en la librería de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbiotes del octocoral *P. elisabethae* (Caribe Sur-Occidental).

De esta manera podría sugerirse la estructura para 10 de los 46 compuestos (Figura 2-15) encontrados en la librería, no obstante vale la pena aclarar que hasta no realizar la comparación con patrones de referencia, y el escalamiento y posterior aislamiento de dichas sustancias no se llegará a la identificación inequívoca de las mismas. Sin embargo, esta primera aproximación se convierte en una ventaja ingente en la identificación preliminar del tipo de sustancias que son producidas por cada una de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes estudiadas y qué medios de cultivo favorecen la producción de las mismas.

Otra ventaja de construir este tipo de librerías, es conocer bajo qué condiciones son producidas las sustancias presentadas. Un par de ejemplos se muestran en la Figura 2-16. El primero se refiere a la producción del compuesto **25** con tiempo de retención de 5.74 min con un ion [M+H]⁺ en *m/z* 853.4, el cual es producido únicamente por la bacteria

B. pumillus (RKHC-57) en los medios **MB**, **TAK** y **NB/10**, siendo mayor su producción en medio **MB** y **NB/10** (Figura 2-16A). Al parecer, la producción de este metabolito no depende de la cantidad de nutrientes presentes en el medio, debido a que fue producido en un medio con baja concentración de nutrientes como NB/10, por el contrario su producción si dependerá de que tan fácilmente sean digeridas sus fuente de carbono, en este caso los medios **MB** y **NB/10** utilizan extracto de levadura y de carne respectivamente, mientras que **TAK** utiliza como fuente de carbono almidón soluble el cual es poco digerible. Adicionalmente, la adición de peptona es un factor crucial en la producción de la sustancia **25**, debido a que ésta no fue detectada en el medio **MMB** que no contiene peptona (Figura 2-16A).

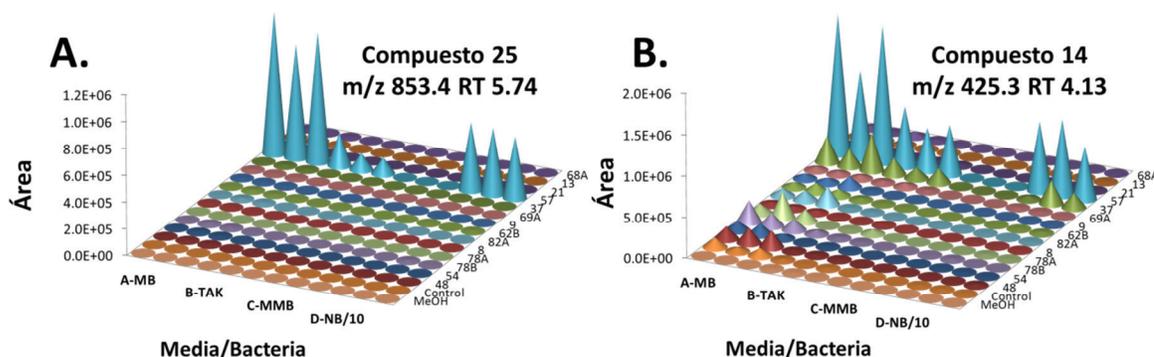


Figura 2-16. Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la producción selectiva de algunas sustancias presentes en la librería. **A.** Compuesto **25** con tiempo de retención 5.74 min y un ión $[M+H]^+$ en m/z 853.4 producido únicamente por la bacteria *Bacillus pumilus* (RKHC-57) en varios medios. **B.** Compuesto **14** con tiempo de retención 4.13 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 425.3 producido por las bacterias *Bacillus pumilus* (RKHC-57) y *Bacillus mojavensis* (RKHC-37) en varios medios. Medios n=3, Bacterias: 14 cepas junto con el control del medio sin inocular y Metanol como blanco de solvente.

Otro caso es el de sustancia **14** con tiempo de retención 4.13 min con un ion $[M+H]^+$ en m/z 425.3, la cual es producida por las bacterias *B. pumilus* (RKHC-57) y *B. mojavensis* (RKHC-37) en tres de los cuatro medios utilizados, siendo *B. pumillus* (RKHC-57) cultivada en **MB** donde mayor cantidad de sustancia fue detectada. Al parecer, la producción de este metabolito por *B. pumillus* (RKHC-57) al igual que en el ejemplo anterior no depende de la cantidad de nutrientes presentes en el medio y si de la adición de peptona en el medio de cultivo. Además, la adición de sales en el medio de nutrientes si pareciera afectar la producción de dicho metabolito, debido a que **MB** es un medio rico en sales en comparación al medio **TAK** (Figura 2-16B).

A manera de conclusión de esta parte del trabajo vale la pena mencionar que la miniaturización de los cultivos en cuatro medios diferentes de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *P. elisabethae*, junto con la extracción en fase sólida y el uso de la tecnología de UPLC-MS como herramienta química para la detección rápida de compuestos producidos y de Antibase 2007TM como herramienta de derreplicación, se tradujo en altos rendimientos de análisis y en la generación de una librería, la cual permitió descartar los componentes o productos de descomposición de los medios de cultivo, además de detectar todos los compuestos producidos por todas las bacterias ensayadas y la posterior identificación de algunas de las sustancias, previamente reportadas, así como también el avanzar en el proceso de identificación de sustancias desconocidas. Otra de las grandes ventajas de la librería generada fue realizar una primera aproximación de la búsqueda de la mejor fuente y las mejores condiciones de cultivo para la producción de las sustancias que componen nuestra librería. Esta información será muy útil en la selección racional de algunas de las bacterias y el medio de cultivo para un posterior escalamiento, aislamiento e identificación por los métodos cromatográficos y espectroscópicos comúnmente utilizados en productos naturales de los compuestos producidos.

Del mismo modo, estos resultados se convierten en el punto de partida para la planeación del escalamiento a nivel de laboratorio y posteriormente a nivel industrial de estas sustancias a partir de las bacterias empleadas. Si bien, aunque en este momento no hemos determinado la actividad biológica de estos compuestos, la determinación de su potencial de aplicación si representa un área por explorar.

Todos los resultados anteriores soportan la preferencia por el análisis preliminar de librerías por UPLC-MS, en comparación con el *screening* biológico que se mostrara a continuación, como herramienta para la detección temprana en los extractos de posibles sustancias con estructura química novedosa (en dado caso que no existieran reportes en la base de datos Antibase 2007TM) y de sustancias conocidas, las cuales en un *screening* biológico, requieren una alta inversión de tiempo y recursos para llegar a la identificación de las mismas. Destacando desde el punto de vista biológico, el reducir los ensayos para probar varias condiciones que inducen la síntesis de compuestos en sistemas vivos y

desde el punto de vista químico, el lograr en un corto tiempo una librería de compuestos para analizar y evaluar su potencial como sustancias con interés químico o potencial farmacológico.

2.5.3 Screening biológico de los productos de cultivo de las bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae*

Para nuestro caso, teniendo en cuenta que el holobionte de *P. elisabethae* ha mostrado ser fuente de numerosos compuestos con diferentes actividades biológicas, resaltando entre ellas la actividad antimicrobiana (Sección 2.2.2), en el presente trabajo se seleccionó como herramienta para el *screening* de bacterias productoras de compuestos con actividad biológica, el ensayo antimicrobiano contra cuatro cepas de microorganismos patógenos, logrando determinar que bacterias y que medios de cultivo favorecen la producción de antibióticos. Posteriormente a manera de ejemplo se realizó el escalamiento del cultivo de dos bacterias en un medio específico, con el fin de realizar un fraccionamiento bioguiado para aislar los compuestos responsables de dicha actividad.

2.5.3.1 Actividad antimicrobiana de los extractos del cultivo de las bacterias simbiotes de *P. elisabethae*. Los extractos obtenidos de los cultivos de las 40 bacterias junto con los controles de los medios sin inocular, fueron evaluados contra cuatro cepas de microorganismos patógenos: las bacterias *S. aureus* ATCC 375, *E. faecalis* ATCC 10741 y *P. aeruginosa* ATCC 14210 y la levadura *C. albicans* ATCC 14035 a una concentración de 50 µg/mL, determinando el porcentaje de inhibición de crecimiento con respecto a los controles de los extractos de los medios sin inocular (Figura 2-17).

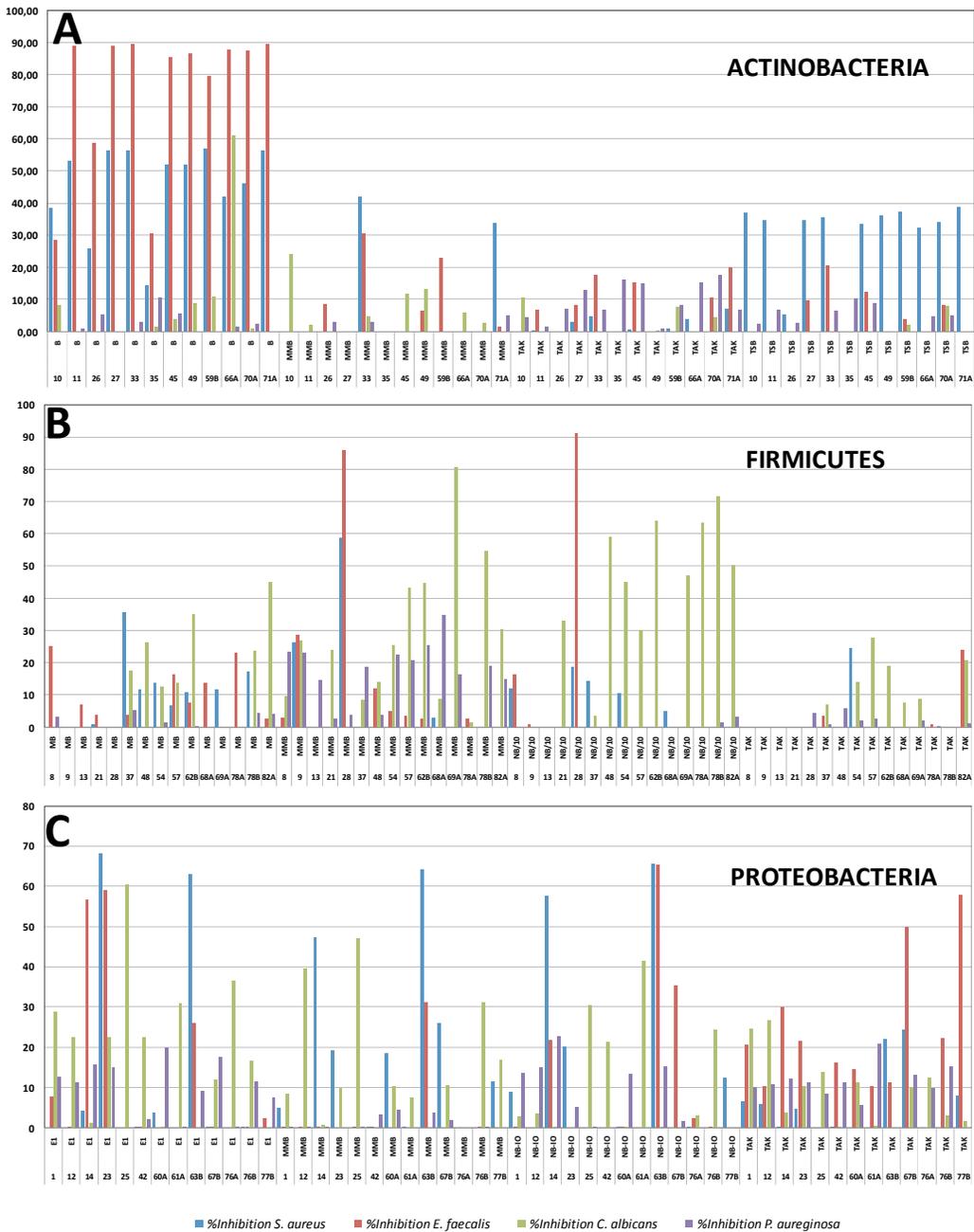


Figura 2-17. Actividad antimicrobiana de los extractos de los cultivos de las 40 bacterias en cuatro medios diferentes. **A.** Para las Actinobacterias los medios **B, MMB, TAK y TSB**. **B.** Para las Firmicutes los medios **MB, MMB, NB/10 y TAK**. **C.** Para Proteobacteria los medios **E1, MMB, NB-IO y TAK**.

La Figura 2-17 muestra los resultados de actividad antimicrobiana expresada como porcentaje de inhibición, frente a cuatro microorganismos, de los extractos de los cultivos de las 40 bacterias en cuatro medios diferentes. La Figura 2-17A muestra el porcentaje

de inhibición de los extractos de las 12 bacterias del *phylum* Actinobacteria, agrupadas por el medio de cultivo empleado, en donde claramente se muestra que todas las Actinobacterias (exceptuando a *Corynebacterium afermentas* (RKHC-35) y *Kocuria palustris* (RKHC-10), cuando son cultivadas en el medio **B**, producen sustancias capaces de inhibir más del 50% del crecimiento de la bacteria Gram-positivas *E. faecalis*. Con respecto a la actividad contra *S. aureus*, las Actinobacterias producen sustancias capaces de causar una inhibición mayor al 30%, cuando son cultivadas en los medios **B** y **TSB**. Por el contrario los extractos de las Actinobacterias no presentaron una considerable actividad contra la bacteria Gram-negativa *P. aeruginosa* ni contra la levadura *C. albicans*, exceptuando la bacteria *Brevibacterium casei* (RKHC-66A), la cual es capaz de inhibir el crecimiento de la levadura en casi un 60%.

Con respecto al grupo de las 15 bacterias del *phylum* Firmicutes (Figura 2-17B), todas las bacterias generalmente producen sustancias capaces de inhibir el crecimiento de *C. albicans*, siendo más considerable esta actividad cuando las bacterias son cultivadas en medios bajos en nutrientes (**MMB** y **NB/10**). De este grupo de bacterias vale la pena resaltar la bacteria *Jeotgalicoccus aerulatos* (RKHC-28) la cual fue la única bacteria de este *phylum* capaz de producir sustancias con una considerable actividad (mayor al 50%) contra los patógenos Gram-positivos *S. aureus* y *E. faecalis*, cuando fue cultivada en **MMB** y **NB/10**.

Por su parte los extractos del grupo de bacterias pertenecientes al *phylum* Proteobacteria (Figura 2-17C) son capaces de producir sustancias con actividad contra *S. aureus* y *C. albicans* cuando fueron cultivadas en los medios **E1**, **MMB** y **NB-IO** mientras que su cultivo en el medio **TAK** parece favorecer la producción de sustancias con actividad contra *E. faecalis*. El extracto del cultivo de la bacteria *Photobacterium eurosenbergii* (RKHC-23) en medio **E1** produce compuestos capaces de inhibir más del 50% del crecimiento de *S. aureus* y *E. faecalis*, así como también la bacteria *Vibrio hollisae* (RHHC-63B) cuando es cultivada en **E1**, **MMB** y **NB-IO** produce sustancias que inhiben más del 50% del crecimiento de *S. aureus*, a su vez cuando ésta fue cultivada en el medio **NB-IO**, su extracto presentó una considerable actividad contra *E. faecalis*.

De acuerdo a los anteriores resultados, todas las 40 bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae* son fuente de compuestos con actividad antimicrobiana. Vale la pena

resaltar de esta metodología que además de poder saber cuáles bacterias son fuente potencial de antibióticos, el diseño metodológico permitió averiguar qué medios de cultivo favorecen la síntesis de dichos compuestos.

Debido a que el principal objetivo de este *screening* biológico fue seleccionar dos bacterias para realizar el escalamiento a un litro de cultivo y posteriormente realizar un fraccionamiento bioguiado de las sustancias responsables de la actividad, inicialmente se seleccionaron los 10 extractos (bacteria y medio de cultivo) más activos contra cada uno de los microorganismos evaluados (Tabla 2-13). Al analizar los resultados mostrados en la tabla se puede observar claramente que los extractos de las bacterias mostraron una muy buena actividad contra *E. faecalis* (91-85%), seguido de la actividad que mostraron contra la levadura *C. albicans* (81-47%) y contra la *S. aureus* (68-56%). Por el contrario, los porcentajes de inhibición frente a *P. aeruginosa* fueron muy bajos con un 34% para el extracto que mejor actividad mostró (*Bacillus horneckiae* RKHC-68A cultivada en **MMB**).

Tabla 2-13. Los 10 extractos (bacteria y medio de cultivo) más activos contra cada uno de los microorganismos evaluados *S. aureus*, *E. faecalis*, *C. albicans* y *P. aeruginosa* en el screening biológico.

	<i>S. aureus</i>			<i>E. faecalis</i>			<i>C. albicans</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
	Bacteria	Medio	% Inhibición	Bacteria	Medio	% Inhibición	Bacteria	Medio	% Inhibición	Bacteria	Medio	% Inhibición
1	RKHC-23	E1	68.08	RKHC-28	NB/10	91.35	RKHC-69A	MMB	81.00	RKHC-68A	MMB	34.96
2	RKHC-63B	NB-IO	65.49	RKHC-33	B	89.70	RKHC-78B	NB/10	71.79	RKHC-62B	MMB	25.64
3	RKHC-63B	MMB	64.14	RKHC-71A	B	89.64	RKHC-62B	NB/10	64.12	RKHC-8	MMB	23.45
4	RKHC-63B	E1	62.84	RKHC-66A	B	89.38	RKHC-78A	NB/10	63.51	RKHC-9	MMB	23.07
5	RKHC-28	MMB	58.91	RKHC-27	B	89.22	RKHC-66A	B	61.25	RKHC-42	NB-IO	23.00
6	RKHC-14	NB	57.48	RKHC-11	B	88.96	RKHC-25	E1	60.34	RKHC-14	NB-IO	22.78
7	RKHC-59B	B	56.97	RKHC-70A	B	87.67	RKHC-48	NB/10	59.07	RKHC-54	MMB	22.75
8	RKHC-71A	B	56.56	RKHC-49	B	86.80	RKHC-78B	MMB	54.80	RKHC-42	E1	21.02
9	RKHC-27	B	56.28	RKHC-28	MMB	85.98	RKHC-82A	NB/10	50.46	RKHC-57	MMB	20.82
10	RKHC-33	B	56.28	RKHC-45	B	85.51	RKHC-25	MMB	47.03	RKHC-61A	TAK	20.73

Tabla 2-14. Lista de la bacterias cuyos extractos en los diferentes medios presentaron las mejores actividades antimicrobianas

	Bacteria	Phylum	Medio	Microorganismo	%Inhibición 1	%Inhibición 2	%Inhibición 3
1	RKHC-28	Firmicutes	NB/10 – MMB - MMB	<i>E. faecalis</i> y <i>S. aureus</i>	91.35	85.98	58.91
2	RKHC-33	Actinobacteria	B	<i>E. faecalis</i> y <i>S. aureus</i>	89.70	56.28	
3	RKHC-71A	Actinobacteria	B	<i>E. faecalis</i> y <i>S. aureus</i>	89.64	56.56	
4	RKHC-66A	Actinobacteria	B	<i>E. faecalis</i> y <i>C. albicans</i>	89.38	61.25	
5	RKHC-27	Actinobacteria	B	<i>E. faecalis</i> y <i>S. aureus</i>	89.22	56.28	
6	RKHC-11	Actinobacteria	B	<i>E. faecalis</i>	88.96		
7	RKHC-70A	Actinobacteria	B	<i>E. faecalis</i>	87.67		
8	RKHC-49	Actinobacteria	B	<i>E. faecalis</i>	86.80		
9	RKHC-45	Actinobacteria	B	<i>E. faecalis</i>	85.51		
10	RKHC-69A	Firmicutes	MMB	<i>C. albicans</i>	81.00		
11	RKHC-78B	Firmicutes	NB/10 - MMB	<i>C. albicans</i>	71.79	54.80	
12	RKHC-23	Proteobacteria	E1	<i>S. aureus</i>	68.08		
13	RKHC-63B	Proteobacteria	E1 - NB/10 - MMB	<i>S. aureus</i>	65.49	64.14	62.84
14	RKHC-62B	Firmicutes	NB/10 - MMB	<i>S. aureus</i> y <i>P. aureginosa</i>	64.12	25.64	
15	RKHC-78A	Firmicutes	NB/10	<i>C. albicans</i>	63.51		
16	RKHC-25	Proteobacteria	E1	<i>C. albicans</i>	60.34	47.03	
17	RKHC-48	Firmicutes	NB/10	<i>C. albicans</i>	59.07		
18	RKHC-14	Proteobacteria	NB-IO	<i>S. aureus</i> y <i>P. aureginosa</i>	57.48	22.78	
19	RKHC-59B	Actinobacteria	B	<i>S. aureus</i>	56.97		
20	RKHC-82A	Firmicutes	NB/10	<i>C. albicans</i>	50.46		
21	RKHC-68A	Firmicutes	MMB	<i>P. aureginosa</i>	34.96		
22	RKHC-8	Firmicutes	MMB	<i>P. aureginosa</i>	23.45		
23	RKHC-9	Firmicutes	MMB	<i>P. aureginosa</i>	23.07		
24	RKHC-42	Proteobacteria	NB-IO - E1	<i>P. aureginosa</i>	23.00	21.02	
25	RKHC-54	Firmicutes	MMB	<i>P. aureginosa</i>	22.75		
26	RKHC-57	Firmicutes	MMB	<i>P. aureginosa</i>	20.82		
27	RKHC-61A	Proteobacteria	TAK	<i>P. aureginosa</i>	20.73		

Con el fin de realizar la selección adecuada de las bacterias cuyos cultivos se van a escalar, la Tabla 2-14 muestra los extractos que presentaron los mejores resultados de actividad antimicrobiana en orden descendente, sin importar el microorganismo contra el cual fue activo ni el medio de cultivo empleado. De allí, se puede observar que los extractos con mejor actividad frente al menos dos microorganismos evaluados fueron los correspondientes a los cultivos de las bacterias *J. aerulatos* (RKHC-28) en **NB/10**, *B. conglomeratus* (RKHC-33), *Micrococcus luteus* (RKHC-71A), *B. casei* (RKHC-66A) y *Arthrobacter koreensis* (RKHC-27) en medio **B**. Para este trabajo se escogieron a las Actinobacterias *B. conglomeratus* (RKHC-33) y *B. casei* (RKHC-66A) para realizar el escalamiento del cultivo de ambas en medio **B**, debido a que presentaron una excelente actividad contra *E. faecalis* y *S. aureus* y contra *E. faecalis* y *C. albicans* respectivamente. Las bacterias *Micrococcus luteus* (RKHC-71A) y *Arthrobacter koreensis* (RKHC-27) fueron descartadas debido a que presentaron valores de inhibición similares a los mostrados por la bacteria *B. conglomeratus* (RKHC-33), por el contrario se escogió a *B. casei* (RKHC-66A) por ser la única Actinobacteria capaz de inhibir el crecimiento de la levadura *C. albicans*. Por su parte, debido a que las bacterias de *phylum* Firmicutes hacen parte de otros trabajos de maestría, los cuales se están llevando actualmente dentro del grupo de investigación, no se realizó el escalamiento del cultivo de *J. aerulatos* (RKHC-28) en este trabajo.

2.5.3.2 Escalamiento del cultivo y fraccionamiento bioguiado de los extractos de las Actinobacterias *Brachybacterium conglomeratus* (RKHC-33) y *Brevibacterium casei* (RKHC-66A)

Para realizar el seguimiento del compuesto(s) responsable(s) de la actividad biológica que mostraron los extractos de *B. conglomeratus* (RKHC-33) y *B. casei* (RKHC 66A), se decidió utilizar los microorganismos MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*), VRE (Vancomycin-resistant *Enterococcus*) y *C. albicans* en el bioensayo antimicrobiano como herramienta para realizar el aislamiento bioguiado, evaluando cada una de las fracciones a tres concentraciones finales 50, 25 y 5 µg/mL. Los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos y de las fracciones de las bacterias *B. conglomeratus* (RKHC-33) y *B. casei* (RKHC 66A), se muestra en las tablas 2-15 y 2-16, respectivamente.

Ambas bacterias (RKHC-33 y RKHC 66A) fueron cultivadas en medio **B** en presencia de la resina Diaion HP-20, la cual pasadas las 96 horas de incubación del cultivo, fue separada del medio de cultivo, lavada exhaustivamente y los compuestos retenidos en ella, extraídos con alcohol histológico. Los extractos resultantes fueron filtrados y concentrados a presión reducida obteniendo 627.2 mg (RKHC-33) y 757.7 mg (RKHC 66A) de extracto crudo.

El escalamiento del cultivo a un volumen de 1.0 L de ambas bacterias, hizo que los valores de actividad observados en el minicultivo de 5.0 mL disminuyeran. Específicamente para el extracto de cultivo de la bacteria *B. conglomeratus* (RKHC-33), el cual inicialmente presentó valores de inhibición mayores al 50% contra las bacterias *S. aureus* y *E. faecalis* (Tabla 2-14), el extracto crudo de un litro de cultivo solamente presento actividad moderada contra VRE (40%). Con respecto al extracto de la bacteria *B. casei* (RKHC-66A) en el minicultivo presentó actividad contra los tres microorganismos evaluados *S. aureus*, *E. faecalis* y *C. albicans* (Tabla 2-14), mientras que el extracto del cultivo a gran escala, aunque mantuvo la actividad frente a las dos bacterias (26% frente a MRSA y 41% frente a VRE), ésta disminuyo a más de la mitad del valor inicial observado en el minicultivo. Estas diferencias podrían explicarse debido a que las bacterias MRSA y VRE presentan mayor resistencia a antibióticos y también debido a que el escalamiento del cultivo hizo que no se produjeran en las mismas proporciones el compuesto o los compuestos responsables de la actividad, debido a la menor densidad poblacional que se alcanzó con el cultivo a gran escala (en ambos casos se cultivaron durante 96 horas).

Posteriormente cada uno de los extractos fue sometido a una separación cromatográfica bioguiada, realizando previamente para cada extracto una limpieza a través de una columna C-18 con el fin de eliminar la mayor cantidad de sales y componentes del medio de cultivo aun remanentes en el extracto y de esa manera obtener fracciones mas limpias y concentradas de los compuestos realmente producidos por cada una de las bacterias.

Dichas fracciones fueron individualmente separadas en cartuchos Diol y cada subfracción separada empleando diferentes tipos de cromatografías (Flash y CLAE) y fases estacionarias como se muestra en la sección experimental. Específicamente, la

separación bioguiada realizada para el extracto del cultivo de la bacteria *B. conglomeratus* (RKHC-33), permitió asegurar que la actividad mostrada por el extracto del cultivo contra VRE y *C. albicans*, no se debe a un solo compuesto o fracción en particular sino a la sumatoria de las actividades mostradas por las fracciones: A33-4D1, A33-131010-01, A33-131010-02, A33-131010-05, A33-131010-09, A33-131010-10, A33-061210-04 y A33-061210-05, contra VRE y las fracciones A33-300910-03 y A33-300910-05 contra *C. albicans*.

De acuerdo al análisis por RMN y LC-HRMS, las fracciones A33-300910-03 y A33-300910-05 corresponden a mezclas de compuestos tipo dicetopiperacinas producidas por la bacteria, A33-4D1 y A33-131010-02 corresponde a ftalatos (contaminación de los solventes), A33-131010-02 corresponde a derivados de poliestireno (contaminación de la resina Diaion HP-20) y A33-300910-03 y A33-300910-05 corresponden a soyaaponinas (contaminación del medio de cultivo). Las fracciones A33-131010-05 (5.06 mg), A33-131010-09 (3.68 mg) y A33-131010-10 (3.32 mg) trataron de separarse por CLAE en diferentes columnas C-18, C-8, Amino, Diol y HILIC pero no se encontraron condiciones para continuar con su separación.

Con respecto la separación bioguiada realizada al extracto de la bacteria *B. casei* (RKHC-66A), se puede asegurar que la actividad mostrada por el extracto total contra MRSA, VRE y *C. albicans*, se debe principalmente a una sola fracción en particular, la fracción A66A-4D2-02, la cual presentó una excelente actividad contra los tres microorganismos evaluados. Sin embargo de acuerdo a su análisis preliminar por RMN ésta fracción corresponde por lo menos a tres compuestos estructuralmente similares y se hace necesario realizar el escalamiento de cultivo, para partir de mayores cantidades de extracto y de esa manera poder realizar la separación y completa identificación de estos compuestos. Adicionalmente, se encontró que las fracciones A66A-4D4-RP4 y A66A-4D4-RP5 activas contra a *C. albicans* corresponden a compuestos tipo soyaaponinas (contaminación del medio) encontradas también en el extracto de la bacteria *B. conglomeratus* (RKHC-33). La fracción A66A-4D3 (14.51 mg) no se encontraron condiciones por CLAE en diferentes columnas C-18, C-8, Amino, Diol y HILIC, para lograr su separación.

Si bien el *screening* biológico realizado inicialmente permitió seleccionar dos bacterias productoras de compuestos con actividad antimicrobiana, la estrategia empleada para realizar el escalamiento del cultivo no fue la más apropiada, debido a que la actividad observada para los extractos crudos del minicultivo, no se mantuvo para los extractos de los cultivos en un litro. Adicionalmente, las cantidades de extracto obtenidas no fueron las suficientes para obtener cantidades suficientes de las fracciones que contenían los compuestos bioactivos y poder llegar a compuestos puros y realizar su completa identificación. Es por eso que se recomienda realizar nuevamente el escalamiento del cultivo para obtener mayores cantidades de extracto crudo, pero garantizando que factores como el volumen y el tiempo de cultivo sean las más apropiadas para maximizar la producción de los compuestos responsables de la actividad biológica seguida.

De todo lo anterior, vale resaltar que estos resultados se convierten en el punto de partida para mejorar las condiciones de escalamiento a nivel de laboratorio y posteriormente a nivel industrial de las sustancias activas a partir de las bacterias estudiadas. Si bien, aunque en este trabajo no se realizó la purificación final y la completa identificación de los compuestos responsables de la actividad biológica, es evidente que la potencialización de la producción de estas sustancias si representa un área por desarrollar.

Como conclusión general se puede asegurar que ambas aproximaciones metodológicas: *screening* químico y *screening* biológico, planteadas en este trabajo, son casi esenciales antes de emprender un estudio de escalamiento de cultivo, en donde se deben entrar a considerar variaciones en los volúmenes, tiempos y métodos de extracción para el exitoso aislamiento de sustancias químicas novedosas o con actividad biológica explotable.

3. Conclusiones y Recomendaciones

Las etapas realizadas en el presente trabajo forman parte de los estudios de bioprospección del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* como fuente de sustancias con actividad biológica, específicamente se realizó el reaislamiento de los compuestos mayoritarios tipo Ps y *seco*-Ps, se les amplió el potencial de aplicación como agentes citotóxicos, antimicrobianos y *antifouling*, y con el fin de intentar encontrar una solución al problema de suministro de estos compuestos se propuso por primera vez en el ámbito científico, estudiar los simbiontes bacterianos de este octocoral. Finalmente, para identificar los compuestos que producen las bacterias aisladas de *P. elisabethae*, éstas se cultivaron diferencialmente y se analizaron por CLAE-EM (APCI) (*screening* químico) para detectar la producción de Ps, *seco*-Ps, o compuestos estructuralmente relacionados, u otro tipo de sustancias. Con el fin de ampliar el potencial de aplicación de dichas bacterias simbiontes se propuso realizar un *screening* biológico, con el cual se determinó cuales de ellas producen compuestos con actividad antimicrobiana. Luego de realizar este trabajo se llegó a las siguientes conclusiones:

A partir del extracto polar de *P. elisabethae* de la Isla de Providencia se re-aislaron e identificaron por EM y RMN ¹H nueve compuestos mayoritarios: las pseudopterinas: PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU y 3-O-acetil-PsU y las *seco*-pseudopterinas: *seco*-PsJ y *seco*-PsK a las cuales se les determinó por primera vez su actividad antimicrobiana y *antifouling* y se realizó un reporte mas completo acerca de su actividad citotóxica

En cuanto a la actividad citotóxica se halló que tanto las Ps como las *seco*-Ps anteriormente mencionadas junto con la MEDNG aislada previamente de *P. elisabethae* de la Isla de San Andrés presentaron actividad citotóxica moderada contra cinco líneas celulares humanas (HeLa (cáncer cervical), PC-3 (cáncer de próstata), HCT116 (cáncer colorectal), MCF-7 y BJ (fibroblastos normales de piel)) siendo las PsQ y PsG los compuestos mas activos (GI₅₀ 5.8 µM-12.0 µM).

Se determinó por primera vez que las Ps y *seco*-Ps aisladas en este trabajo junto con la MEDNG presentan una buena y selectiva actividad contra las bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, mientras que fueron inactivos contra la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* y la levadura *Candida albicans*, siendo las PsU, PsQ, PsS, *seco*-PsK y PsG los compuestos más activos contra *S. aureus* (IC₅₀ 2.9–4.5 µM) y las PsG, PsU y *seco*-PsK contra *E. faecalis* (IC₅₀ 3.1–3.8 µM).

Se demostró que las Ps y *seco*-Ps presentaron actividad contra el *microfouling* marino, debido a que estas sustancias pudieron modular el crecimiento de bacterias asociadas con superficies marinas con *fouling* (inhiben el crecimiento de bacterias Gram-positivas e inducen la formación de *biofilm* de bacterias marinas Gram-negativas). Se recomienda llevar a cabo experimentos de campo para determinar su actividad en un nicho ecológico donde podrían ser aplicados estos compuestos como *antifoulants*, así como también se sugiere plantear experimentos en los que se utilicen estos compuestos en mezcla con otros agentes *antifouling* para potencializar la actividad.

Los datos anteriormente encontrados permiten concluir que el octocoral *P. elisabethae* de la Isla de Providencia tiene un gran valor como fuente importante de compuestos con aplicaciones farmacéuticas e industriales. Adicionalmente, sería interesante continuar con diferentes *screening* moleculares de alto rendimiento que permitan entender el mecanismo de acción de las actividades encontradas en el presente trabajo y también de la actividad antiinflamatoria reportada previamente por nosotros para estas mismas sustancias.

Debido al amplio mercado de Ps y *seco*-Ps como aditivos comerciales en la industria cosmética, sería importante considerar a *P. elisabethae* recolectado en aguas colombianas como una fuente alternativa de tales compuestos, buscando un método de extracción sustentable de dichos compuestos.

Continuando en el camino del proceso de bioprospección se realizó por primera vez la caracterización de la estructura y diversidad de una comunidad bacteriana total asociada con un octocoral de agua superficial (entre 0 y 30 m), específicamente la de *P.*

elisabethae recolectado en la Isla de Providencia, demostrando que está compuesta principalmente por 12 *phyla* (Chloroflexi, Lentisphaerae, Cyanobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Acidobacteria, Proteobacteria, Bacteroidetes, Spirochaetes, Firmicutes, Actinobacteria y Fusobacteria). De los cuales Proteobacteria (54.06% a 86,39%) fue el *phylum* más abundante seguido de Bacteroidetes (1.98% a 2.68%), Cyanobacteria (0.27% a 4.54%), Actinobacteria (0.49% a 1,15%) y Firmicutes (0.15% a 0.20%). Gammaproteobacteria fue la clase más abundante (46.80% a 80.03%), seguido por Alphaproteobacteria (4.34% a 6.61%), Cyanobacteria (0.27% a 4.54%) y Sphingobacteria (0.92% a 2.55%). *Pseudomonas spp.* y *Sphingobacter spp.* fueron identificadas como los filotipos más abundantes asociados con *P. elisabethae*.

Adicionalmente, se demostró que dentro de la comunidad bacteriana asociada con *P. elisabethae* se encontró una alta proporción de secuencias que no fueron clasificadas dentro de los dominios Bacteria o Archeae, ni clasificadas dentro de ningún *phylum* bacteriano, por ende estas secuencias representan un inexplorado reservorio de diversidad microbiana en el ambiente y sería posible encontrar desde nuevos *phyla* hasta nuevas especies de bacterias asociadas a este octocoral.

También como parte de la comunidad bacteriana se lograron aislar e identificar 40 bacterias asociadas a *P. elisabethae*, las cuales pertenecieron a las clases Bacilli (15 cepas), Actinobacteria (12 cepas), Gammaproteobacteria (9 cepas), Alphaproteobacteria (3 cepas) y Betaproteobacteria (1 cepa). Bacterias que representan un valioso punto de partida para identificar sustancias químicas con o sin actividad biológica.

Se demostró con datos experimentales que las Ps y seco-Ps podrían estar relacionadas con la selección, asentamiento y control de la colonización de los simbiontes microbianos, específicamente la comunidad bacteriana asociados a la superficie de *P. elisabethae* de la Isla de Providencia, lo cual puede estar relacionado con el hecho de que *P. elisabethae* mantenga una superficie limpia, libre del crecimiento de micro- y *macrofouling* excepto por sus propios microorganismos simbiontes.

Sería de gran importancia planear estudios adicionales para encontrar más información acerca de cómo es el mecanismo o los mecanismos de defensa del holobionte *P. elisabethae* y también como las Ps y *seco*-Ps podrían estar involucradas.

Con el fin de evaluar la capacidad de las 40 bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae* para producir compuestos químicos (entre ellos Ps y *seco*-Ps) bioactivos o no bioactivos se adoptó una nueva metodología que permitió la miniaturización (5.0 mL) de los cultivos en cuatro medios diferentes de las 40 bacterias simbioses del octocoral *P. elisabethae*, junto con la extracción en fase sólida empleando la resina Diaion HP-20 y el uso de la tecnología de UPLC-MS como herramientas químicas para la detección rápida de compuestos producidos por las bacterias (*screening* químico) y la determinación de la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos contra *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* como herramienta para determinar la producción de sustancias con actividad biológica por parte de alguna de las bacterias en un medio de cultivo determinado.

Se determinó que bajo las condiciones de cultivo empleadas y realizando el protocolo de extracción y de análisis planteados, no fue posible detectar la producción de compuestos tipo Ps, *seco*-Ps y/o compuestos relacionados por parte de ninguna de las 40 bacterias simbioses de *P. elisabethae* en ninguno de los cuatro medios de cultivo empleados. Debido al amplio potencial de estas sustancias es importante seguir buscando el verdadero productor de este tipo de sustancias. Se sugiere estudiar las otras clases de microorganismos asociados con *P. elisabethae* como algas, diatomeas, protozoos, criptomonas y hongos.

Adicionalmente a partir del *screening* químico realizado, se logró obtener mediante el análisis UPLC-MS empleando el software XcaliburTM del equipo, una librería de 46 compuestos producidos por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes, entre los cuales haciendo uso de la base de datos Antibase 2007TM como herramienta de derreplicación, pueden mencionarse los diez siguientes: amicoumacina A, amicoumacina B, cloroxantomicina, 3-acetoamido-3-deoxi-beta-D-glucopiranososa, ansamitocina PDM-0, bruceantarina, bruceantina, pyloricidina D, AI-77-D y ansamitocina PDM-4.

Se demostró que las principales ventajas de la metodología empleada para la creación de la librería de compuestos producidos por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes, fueron descartar los componentes o productos de descomposición de los medios de cultivo, además de detectar todos los compuestos producidos por todas las bacterias ensayadas y la posterior identificación de algunas de las sustancias, previamente reportadas. Permitiendo además con esta metodología realizar una primera aproximación de la búsqueda de la mejor fuente y las mejores condiciones de cultivo para la producción de las sustancias que componen la librería.

Por otra parte, el *screening* biológico permitió demostrar que las 40 bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae* son capaces de producir compuestos con actividad antimicrobiana frente al menos un microorganismo (*S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *C. albicans*). Resaltando que a partir de la metodología planteada en este trabajo se logró saber cuáles bacterias y qué medios de cultivo favorecen la síntesis de antibióticos.

Específicamente para las 40 bacterias estudiadas, se mostró que bajo las condiciones de minicultivo empleadas en este trabajo, las bacterias pertenecientes al grupo de Actinobacterias, cuando son cultivadas en el medio **B**, producen sustancias capaces de inhibir el crecimiento de *E. faecalis* y *S. aureus*, mientras que cuando son cultivadas en **TSB**, solo presentan actividad contra *S. aureus*. Por el contrario ninguno de los extractos de este grupo inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa* ni de *C. albicans*. Con respecto al grupo de bacterias Firmicutes cuando son cultivadas en medios bajos en nutrientes (**MMB** y **NB/10**) producen sustancias con actividad contra *C. albicans* y finalmente, para el caso del grupo de Proteobacterias, éstas son capaces de producir sustancias con actividad contra *S. aureus* y *C. albicans* cuando son cultivadas en los medios **E1**, **MMB** y **NB-10**, mientras que su cultivo en el medio **TAK** parece favorecer la producción de sustancias con actividad contra *E. faecalis*.

A partir de los resultados del *screening* biológico se pudo seleccionar los extractos de las bacterias y los medios de cultivo que presentaron los mejores resultados de actividad antimicrobiana. Específicamente para este trabajo se realizó el escalamiento a un litro de cultivo de dos de las bacterias (*Brevibacterium casei* y *Brachybacterium conglomeratum*) que presentaron buena actividad antimicrobiana y el fraccionamiento bioquímico de los extractos del cultivo de estas dos bacterias, lo cual permitió encontrar las fracciones

responsables de la actividad antimicrobiana mostrada por cada uno de los extractos. Sin embargo, debido a la poca cantidad obtenida de dichas fracciones no se pudo continuar con su estudio para poder identificar los compuestos presentes en ellas. Se sugiere realizar nuevamente el escalamiento del cultivo de estas bacterias para obtener mayores cantidades de extracto crudo, pero garantizando que factores como el volumen y el tiempo de cultivo sean las mas apropiadas para maximizar la producción de los compuestos responsables de la actividad biológica seguida.

La presente tesis constituye un reporte importante acerca del empleo de aproximaciones metodológicas que permiten producir compuestos en bacterias de manera simplificada, convirtiéndolo así, en consulta de primera mano para diferentes investigadores interesados en la producción de metabolitos por parte microorganismos, quienes se ven enfrentados a la difícil tarea de realizar grandes volúmenes de cultivo con bajos rendimientos hasta encontrar las mejores condiciones para la producción de determinada sustancia. Específicamente, este trabajo destaca desde el punto de vista biológico, el reducir los ensayos para probar varias condiciones que inducen la síntesis de compuestos en sistemas vivos y desde el punto de vista químico, el lograr en un tiempo corto una librería de compuestos para analizar y evaluar su potencial como sustancias con interés químico o potencial farmacológico.

4. Parte Experimental

4.1 Recolección y tratamiento de *P. elisabethae*

Individuos del octocoral *P. elisabethae* fueron recolectados dentro de un radio de 20 m en la Isla de Providencia (Caribe Sur-Occidental, Colombiano) mediante buceo autónomo SCUBA a una profundidad entre 20 y 30 m en el sitio El planchon (13°24'0"N y 81°23'0"W"), Isla de Providencia (Caribe Sur-Occidental, Colombia) (Figura 3-1) e identificados por la Profesora Dra. Mónica Puyana, de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Especímenes de referencia codificados como INV CNI 1612–1614, se encuentran en la colección de invertebrados del Museo de Historia Natural Marina Colombiana (MHNMC) en el Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín (INVEMAR).

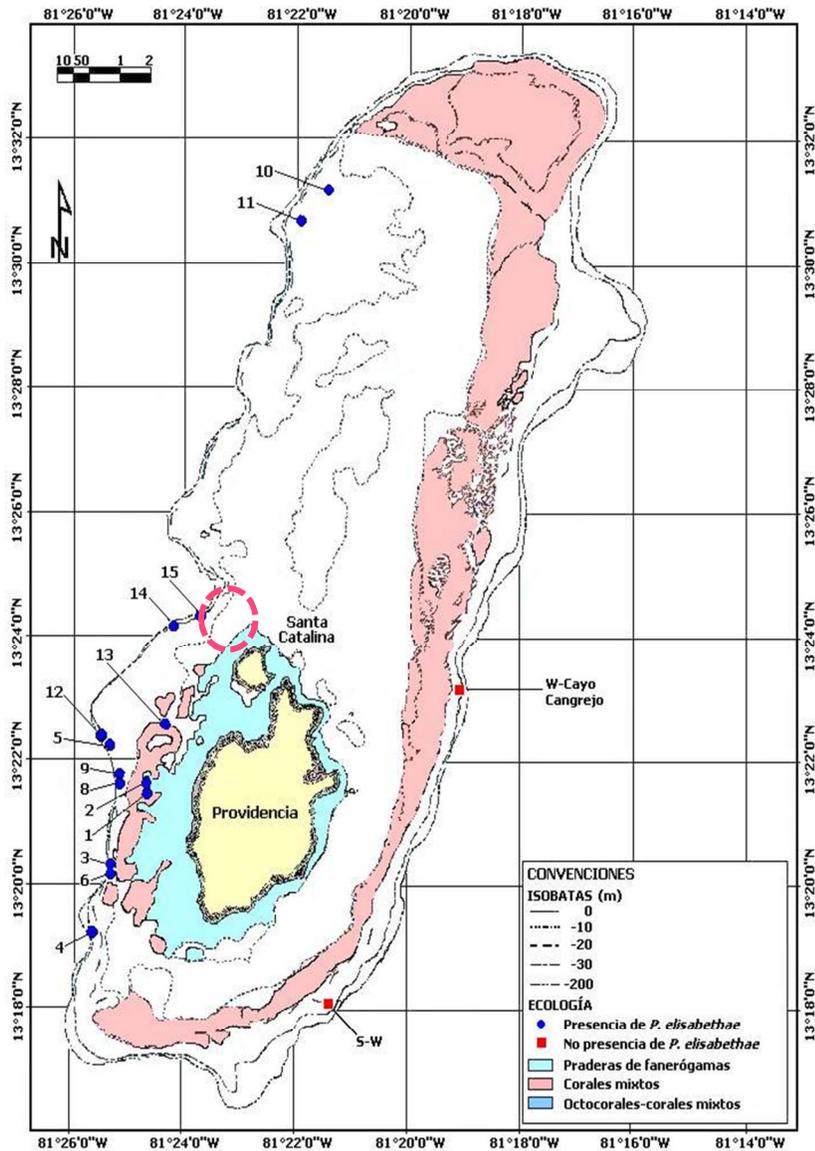


Figura 4-1 Área de recolección de *P. elisabethae* en la Isla de Providencia, Caribe Sur-Occidental. El sitio de recolección fue El planchon (13°24'0"N y 81°23'0"W"). Figura tomada de Puyana *et al.*, 2004.

Los individuos fueron cortados con escalpelos estériles y transferidos directamente bajo el agua a bolsas plásticas estériles. En la superficie, las muestras fueron transportadas al laboratorio e inmediatamente parte de las colonias fueron procesadas asépticamente para el aislamiento de las bacterias cultivables y para la extracción del DNA genómico. Todas las muestras fueron transportadas y procesadas dentro de las 2 horas siguientes a su recolección. Para preservar los tejidos del holobionte, tres individuos (**A**, **B** y **C**) de *P. elisabethae* (2.0 g), fueron lavados rigurosamente con agua de mar artificial estéril

(ASW), y transferidos asépticamente por separado a tubos Falcon de 15 mL con 5.0 mL de fenol grado biológico y estas muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. Conjuntamente, para el análisis dependiente de cultivo se tomó una muestra de agua de mar (10 mL) de alrededor del octocoral en una bolsa de plástico estéril como control de cultivo. Adicionalmente, una parte de las colonias recolectadas fueron secadas y usadas para la extracción y aislamiento de las Ps y seco-Ps para la ampliación de la actividad biológica de dichas sustancias.

4.2 Aislamiento y elucidación estructural de Ps y seco-Ps a partir de *P. elisabethae*

Fragmentos de colonias secas reunidas (30 g) se extrajeron con diclorometano-metanol (1:1), el extracto resultante se filtró y se concentró a presión reducida para obtener un aceite de color verde oscuro. El aislamiento de cada compuesto se llevó a cabo de acuerdo con nuestros procedimientos descritos previamente (Duque *et al.*, 2004; 2006) con algunas modificaciones.

Doscientos miligramos del extracto crudo fueron disueltos en la menor cantidad de etanol 96%, pasados a través de un cartucho RP-18 (500 mg), eluidos con 2 mL de acetonitrilo:agua 1:1, y analizados por CLAE-EM, con el objeto de verificar la presencia de Ps y seco-Ps en el extracto.

Luego el extracto crudo de diclorometano:metanol (1:1) fue sometido a cromatografía flash en columna C-18 eluyendo con 500 mL de cada uno de los siguientes disolventes de polaridad decreciente (metanol-agua 1:9, fracción F1, metanol-agua 1:1, F2, metanol-agua 4:1, F3, metanol 100%, F4, etanol al 100%, F5, acetona al 100%, F6, diclorometano-metanol 5:5, F7 y diclorometano 100%, F8). Las fracciones F4 y F5 (las cuales mostraron por CLAE-EM y CCD frente a dos patrones PsP y PsQ estar compuestas por la mezcla de Ps y seco-Ps) se reunieron en una sola fracción, la cual fue renombrada como fracción FPST y subsecuentemente separada con ayuda de un sistema automático de cromatografía flash (Combiflash Rf, Teledyne Isco) usando una columna Diol y como fase móvil un gradiente continuo de polaridad creciente de hexano 100% hasta hexano:etanol 6:4 en 30 min con un flujo de 85.0 mL/min, aislándose de esa

manera 10 subfracciones (FPST1-FPST10). De ellas, las subfracciones FPST4, FPST5, FPST6 y FPST7 demostraron por CLAE-EM contener mezclas de Ps y *seco*-Ps, razón por la cual fueron sometidas a CLAE preparativa en una columna Gemini C-18 (250 X 10 mm, 5 μ m) con un sistema isocrático metanol:agua 85:15 a un flujo de 3 mL/min. De esta forma se lograron aislar a partir de la fracción FPST4 la 3-O-acetil-PsU (1.0 mg), de la FPST5 las PsQ (58.1 mg), PsS (2.3 mg) y PsU (46.6 mg), de la FPST6 la *seco*-PsK (1.2 mg) y de la FPST7 las PsG (19.1 mg), PsP (9.6 mg), PsT (14.5 mg) y *seco*-PsJ (16.2 mg). La purificación final de cada uno de los compuestos se realizó por CLAE usando una columna Prodigy ODS (250 X 4.6 mm, 5 μ m) con un sistema isocrático metanol:agua 85:15 a un flujo de 1 mL/min. La identificación de los compuestos se realizó por EM y RMN y por la comparación de sus datos espectroscópicos de RMN ^1H con los reportados por nosotros para estas mismas sustancias (Duque *et al.*, 2004, 2006; Correa, 2007). La pureza de las muestras fue confirmada por CLAE.

La Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas/espectrometría de masas (CLAE-EM/EM) se realizó en un cromatógrafo Thermo, equipado con detector PDA (longitud de onda de 210 nm), una bomba y un automuestreador Accela, acoplado a un detector ELSD Seder Sedex 80 y a un detector de masa linear de trampa de iones Finnigan LXQ en modo de ionización química a presión atmosférica (APCI). Se detectaron iones positivos con masas entre 200 y 1000 u. La columna cromatográfica empleada fue una Gemini C-18 (100 X 4.6 mm, 5 μ m). Se inyectaron en todos los casos 20 μ L de cada una de las muestras con un rango de concentración 1-10 mg/mL, utilizando como fase móvil un sistema de elución de metanol:agua 80:20 durante 5 min, luego un gradiente hasta metanol 100 % en 15 min y por último 5 minutos metanol 100%, el flujo se fijó en 1 mL/min. Los espectros de RMN ^1H se registraron en un espectrómetro Bruker DRX600 (600MHz), empleando como solvente CDCl_3 .

4.3 Actividad biológica de las Ps y seco-Ps aisladas de *P. elisabethae*

4.3.1 Actividad citotóxica contra líneas celulares de humanos

4.3.1.1 Líneas celulares. Los compuestos aislados de *P. elisabethae* fueron probados contra cuatro líneas tumorales humanas: HeLa (cáncer cervical), PC-3 (cáncer de próstata), HCT116 (cáncer colorectal), MCF-7 (cáncer de mama) y la línea celular normal humana BJ (fibroblastos normales de piel), las cuales fueron mantenidas en DMEM (Medio Dubelcco modificado de Eagle) con 5% de FBS (Suero fetal bovino) y gentamicina 50 µg/mL. Los cultivos fueron guardados en frascos de cultivo de 75 cm² a 37°C, 5% CO₂ y 100% de humedad relativa, cambiando el medio por lo menos dos veces a la semana.

4.3.1.2 Actividad citotóxica por MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio).

Las células fueron cultivadas, contadas, transferidas a placas de 96 pozos e incubadas durante 24 horas antes de la adición de los compuestos de prueba. Las soluciones de ensayo de la muestra (10 µL), en las diluciones deseadas, se añadieron a los pozos que contenían las células y se incubaron durante 48 h. Se utilizó el método colorimétrico de reducción de MTT para determinar las células sobrevivientes al final del período de tratamiento (Mosmann, 1983).

Después del período de incubación, 100 µL del cultivo sobrenadante fueron removidos de cada pozo y posteriormente se adicionaron 100 µL de una solución de MTT (0.5 µg/mL) preparada en PBS, a lo restante en cada pozo. Las placas fueron incubadas a 37°C por 4 horas. La solución contenida en cada uno de los pozos, compuesta por medio de cultivo, MTT no metabolizado, y células muertas, se eliminó por succión y posteriormente 100 µL de DMSO fueron añadidos a cada pozo. El DMSO se mezcló con una pipeta y la densidad óptica fue determinada usando lector de microplacas BioTek Sinergia HT midiendo la absorbancia a 570 nm. Se calcularon los porcentajes de sobrevivencia relativos a los pozos de control (pozos que contienen sólo las células y DMSO) con respecto a la concentración de los tratamientos para luego determinar los valores de GI₅₀ (inhibición del 50% del crecimiento por sus siglas en inglés).

Las soluciones *stock* (5 µg/mL) se prepararon mediante la disolución de los compuestos puros en DMSO y se almacenaron a 4°C. Se prepararon también una serie de diluciones con medios de cultivo inmediatamente antes de la adición a las placas de prueba. La concentración de DMSO en los pozos fue constante en las diluciones (0.38% v/v). La estaurosporina se utilizó como control positivo y el vehículo (DMSO + medios de cultivo) como blanco. Los controles y los compuestos evaluados (PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, 3-O-acetil-PsU, *seco*-PsJ, *seco*-PsK y la MEDNG aislada en trabajos previos de *P. elisabethae* de la Isla de San Andrés, Arias, 2004) fueron analizados por duplicado para cada concentración y para cada línea celular a concentraciones de 5000, 1000, 500, 100, 50, 10, 5 y 1 nM, para estaurosporina (control positivo) y 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, y 20.0 µg/mL para los compuestos.

4.3.2 Actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos

4.3.2.1 Cepas microbianas y medios de cultivo. Los compuestos aislados de *P. elisabethae* fueron probados contra un grupo de microorganismos incluyendo las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 375, *Enterococcus faecalis* ATCC 10741 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14210 y la levadura *Candida albicans* ATCC 14035. Las cepas bacterianas fueron cultivadas en medio LB (Luria Bertani) y *C. albicans* se cultivó en medio SD (Sabourad Dextrosa), durante 18 horas a 37°C y 220 rpm en una incubadora humidificada.

4.3.2.2 Actividad antimicrobiana por microdilución. La actividad antimicrobiana se determinó por el método de microdilución (IC₅₀) (Vasková *et al.*, 2009), en placas de 96 pozos de microtitulación con medio líquido LB para las bacterias y el medio líquido SD. En todos los casos se hizo una dilución de los pre-inóculos con el caldo fresco. Un volumen de 180 µL de cada suspensión de microorganismos fue inoculado en cada pozo (10⁵ células/mL) y mezclado con 20 µL de soluciones de tratamiento. Las soluciones *stock* se prepararon mediante la disolución de los compuestos puros y los controles en DMSO 20% y se almacenaron a 4°C. La penicilina G (contra *S. aureus*), vancomicina (contra *E. faecalis*), gentamicina (contra *P. aeruginosa*) y nistatina (contra *C. albicans*) se utilizaron como controles positivos y el vehículo (DMSO + medio) como el blanco. La concentración final de DMSO usado para disolver los extractos fue inferior al 2%. Los

controles y los compuestos evaluados (PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, 3-O-acetil-PsU, *seco*-PsJ, *seco*-PsK y la MEDNG aislada en trabajos previos de *P. elisabethae* de la Isla de San Andrés (Arias, 2004)) se analizaron por duplicado para cada una de las siguientes concentraciones: 64.0, 32.0, 16.0, 4.0, 1.0, 0.25 y 0.06 µg/mL.

Las microplacas se incubaron durante 24 horas a 37°C y la densidad óptica fue determinada usando un lector de microplacas BioTek Sinergia HT midiendo la absorbancia a 600 nm. Para cada experimento, la corrección de la absorbancia de fondo se hizo restando el valor de la DO a 600 nm después de que los compuestos fueron agregados (tiempo 0 horas). Se calcularon los porcentajes de supervivencia de los microorganismos en relación con los controles (pozos que contienen sólo microorganismos y DMSO) y de esa manera se determinaron los valores de IC₅₀ (inhibición del 50% del crecimiento). Los IC₅₀ de los controles se determinaron en experimentos paralelos con el fin de controlar la sensibilidad de los organismos estándar de prueba.

4.3.3 Análisis estadístico

Los datos se normalizaron y se analizaron mediante regresión no lineal para determinar los valores de GI₅₀ e IC₅₀ de la curva sigmoideal dosis-respuesta. La comparación de los grupos de datos de GI₅₀ para las líneas celulares y los grupos de datos de IC₅₀ para los microorganismos fue evaluada a través de la prueba F de la suma de los cuadrados. P < 0.05 fue considerado como un indicador de importancia con el software GraphPad Prism versión 5.0.

4.4 Determinación de la composición de la comunidad bacteriana asociada con *P. elisabethae*

4.4.1 Aislamiento y caracterización de la comunidad bacteriana cultivable

4.4.1.1 Aislamiento de las bacterias cultivables. Una porción de 10 cm de longitud de tejido de *P. elisabethae* fue cortada en pequeños trozos con ayuda de escalpelo estéril y lavada con agua de mar estéril (ASW), posteriormente fue homogeneizada bajo condiciones estériles durante 3 min (20°C) con 100 mL de buffer PBS, pH 7.2, usando una licuadora Universal comercial (Brück *et al.*, 2007; Santiago-Vázquez *et al.*, 2007). Adicionalmente, con el fin de aislar la comunidad bacteriana epifítica cultivable de *P. elisabethae*, las superficies de pequeñas colonias de *P. elisabethae* fueron raspadas con un hisopo estéril y paso seguido el hisopo fue disperso en 1 mL de agua Milli Q estéril.

Posteriormente diluciones seriadas de diez del homogeneizado, de la suspensión de bacterias epifíticas y de la muestra de agua de mar control fueron preparadas y 100 µL de cada una de las diluciones 10^{-4} y 10^{-6} fueron sembradas en superficie en cajas de agar marino Difco 2216 y agar Sabouraud-Dextrosa (SD), por triplicado. Todos los medios contenían cicloheximida (250 µg/mL) para evitar la contaminación por hongos. Inmediatamente, las placas fueron incubadas aeróbicamente a temperatura ambiente y representantes de cada morfotipo de las colonias fueron serialmente cultivadas hasta obtener cultivos axénicos. Cada aislamiento fue agrupado de acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas y por tinción de Gram. Los aislamientos bacterianos se preservaron en medio marino Difco 2216 semisólido a 4°C y en caldo marino Difco 2216:glicerol (5:5) a -80°C.

4.4.1.2 Identificación de las bacterias cultivables por secuenciación del gen 16S rRNA. Para la amplificación del gen 16S rRNA de los aislamientos bacterianos, colonias puras fueron dispersas en DMSO 100% grado PCR (Sigma-Aldrich, Canada). La amplificación por PCR (50 µL volumen total) fue llevada a cabo usando EconoTaq® Plus Green 2X Master Mix (25 µL) (Lucigen, Middleton, WI), los primers 16SF27 (5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag; 0.5 µM) y 16SR1525 (5'-aag gag gtg atc cag ccg ca; 0.5 µM) y como template de DNA la suspensión celular bacteriano en DMSO (2.5 µL) (Edwards *et al.*,

1989). Las condiciones del ciclo de PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min; 35 ciclos a 95°C durante 1 min, 54°C por 1.5 min, 72°C por 2 min; una extensión final a 72°C por 7 min. Las amplificaciones fueron verificadas por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Con el fin de identificar aislamientos duplicados de las bacterias aisladas, un análisis de RFLP (Restriction fragment length polymorphism) fue llevado a cabo empleando los amplicones de 16S rDNA. Para ello cada uno de los amplicones del tamaño esperado (aproximadamente de 1.5 kb) fueron digeridos individualmente con dos enzimas de restricción *HhaI* y *HaeIII* y los digeridos examinados por electroforesis en geles agarosa al 2%. Los aislamientos duplicados fueron identificados como aquellos que presentaron idénticos patrones de restricción con ambas enzimas y fueron agrupados en 81 grupos. Finalmente los amplicones de 16S rDNA de al menos dos aislamientos pertenecientes a cada grupo de RFLP y que exhibieran una única morfología fueron purificados usando EZ-10 PCR Purification Kit (BioBasic Canada Inc., Markham, ON) y enviados a secuenciación parcial y para algunos aislamientos se realizó la secuenciación total. Las secuencias parciales de 16S rDNA fueron obtenidas usando el *primer* 16SR530 (5'- ccg cgg ctg ctg gca cgt a) mientras que secuencias completas (aproximadamente de 1.5 kb) de algunos de los aislamientos se realizó con múltiples *primers*, 16SF27, 16SR1525, 16SR530 (5'- ccg cgg ctg ctg gca cgt a) y 16SF514 (5'- gtg cca gca gcc gcg gta a) (Gontang *et al.*, 2007). Todas las secuencias fueron llevadas a cabo un ABI 3730xl DNA Analyzer en la McGill University y Genome Quebec Innovation Centre DNA sequencing facility.

Las secuencias fueron editadas usando NTI (Invitrogen, Carlsbad, CA) y alineadas usando CLUSTALX v.2.0.10 (Larkin *et al.*, 2007), encontrando en total 40 únicos aislamientos bacterianos. Los árboles filogenéticos fueron construidos calculando la distancia Kimmura 2 parametros (Kimura, 1980) y usando el algoritmo de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) en el programa MEGA versión 4.0 (<http://www.megasoftware.net>; Tamura *et al.*, 2007). La robustez de los árboles fue evaluada con 1000 *bootstrap*. Para determinar las afiliaciones taxonómicas de los aislamientos cultivables, las secuencias de 16S rDNA fueron comparadas con secuencias de 16S rDNA disponibles en la base de datos del *National Center of Biotechnology Information* (GenBank nt/nr; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) empleando el

programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool*). Las secuencias de los genes 16Sr RNA de las bacterias aisladas fueron depositados en el NCB I y sus números de acceso son JQ282802-JQ282841.

4.4.2 Caracterización de la comunidad bacteriana total

La caracterización de la comunidad bacteriana total asociada con *P. elisabethae* se realizó mediante tres métodos independientes de cultivo diferentes: por bTEFAP (*bacterial tag-encoded FLX-Titanium amplicon pyrosequencing*) (Dowd *et al.*, 2008a), por DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) (Dowd *et al.*, 2008c) y por FISH (*fluorescence in situ hybridization*) (Amann *et al.*, 1995). Para ello tres individuos de *P. elisabethae* (2.0 g) fueron lavados rigurosamente con agua de mar artificial estéril (ASW), y transferidos asépticamente por separado a tubos Falcon de 15 mL con 5.0 mL de fenol grado biológico. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

4.4.2.1 Extracción y purificación del DNA genómico (gDNA) empleado en bTEFAP y DGGE. El gDNA total fue extraído a partir de las tres muestras de los tejidos del octocoral preservados en fenol grado molecular, usando el método de extracción con fenol/cloroformo adaptado de Rowan y Powers (1992). Cada una de las muestras de tejido (0.5 g) de los individuos fueron macerados por separado en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino de octocoral e inmediatamente después, individualmente fueron suspendidos en 5.0 mL de una solución de buffer DNA que contiene proteinasa K (1 mg/mL), lisosoma (1 mg/mL), polivinilpirrolidina (9.0 mg/mL) y una solución de dodecilsulfato sódico (1% w/v). Cada una de las mezclas fue incubada durante 20 min a 37°C y después 2.5 horas a 55°C. La remoción de las partículas grandes de cada una de las muestras se realizó por centrifugación a 4500 x g durante 15 min a temperatura ambiente. La concentración de sales de los sobrenadantes de las tres muestras fue ajustada a 0.3 M con acetato de sodio (3.0 M) y después los sobrenadantes fueron extraídos dos veces con un volumen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1). Las fases orgánica y acuosa de cada una de las tres muestras fueron separadas por centrifugación (10000 x g, 10 min) y adicionalmente la fase acuosa de cada muestra fue extraída con un volumen igual de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) y de nuevo centrifugada (10000 x g, 10 min). Finalmente el DNA de las tres muestras fue

precipitado en sus respectivas fases acuosas por adición de 0.7 volúmenes de isopropanol seguido de centrifugación a 10000 x g por 20 min. Las sales residuales de cada uno de los *pellet* de DNA fueron removidas con etanol frío al 70 % (-20°C). Con el fin de remover impurezas inhibitoras de la PCR, co-extraídas con el DNA, las muestras fueron adicionalmente purificadas usando PowerClean® DNA Clean-Up Kit (MO BIO Laboratories Inc, Carlsbad, CA), eluyendo el gDNA con 50 µL de Tris-HCl 10 mM. Las muestras de gDNA fueron diluidas a una concentración final de 200 ng/µL previo a su análisis por pirosecuenciación y DGGE.

4.4.2.2 Pirosecuenciación por bTEFAP (*bacterial tag-encoded FLX-Titanium amplicon pyrosequencing*). La pirosecuenciación fue realizada como se describe por Dowd *et al.* 2008a, 2008b, 2008c, 2008d y Callaway *et al.* 2009, empleando la nueva técnica bTEFAP (*bacterial tag-encoded FLX-Titanium amplicon pyrosequencing*). El PCR en un paso requirió una mezcla de Taq DNA polimerasas HotStart y HotStart de alta fidelidad, y los amplicones originados por el primer 27F fueron numerados en relación al 16rDNA de *E. coli*. Los procedimientos de bTEFAP así como también la eliminación de las secuencias de baja calidad y la remoción de los *tag* de secuenciación fueron realizados por Research and Testing Laboratories. Las quimeras fueron identificadas usando el programa B2C2 y eliminadas de los datos obtenidos (Gontcharova *et al.*, 2010).

4.4.2.3 Análisis de la diversidad bacteriana de las librerías de 16S rDNA. Los análisis de diversidad bacteriana de las tres librerías de pirosecuenciación bTEFAP se llevaron a cabo empleando el *Pyrosequencing pipeline* disponible en la *Ribosomal Database Project's* (RDP) (<http://pyro.cme.msu.edu/index.jsp>; Cole *et al.*, 2009). Después de la limpieza inicial de las librerías, éstas fueron sometidas a un nuevo procesamiento de limpieza para la remoción de las secuencias del *primer* usado en la pirosecuenciación, así como también la eliminación de las secuencias menores a 250 pb de longitud. Una vez todas las librerías estuvieron limpias, éstas fueron clasificadas filogenéticamente de mayor a menor orden taxonómico por comparación de los amplicones de 16S rDNA con la base de datos del RDP, cuya asignación jerárquica de taxas se basa en el RDP *Naïve Bayesian classifier* de rRNA (Wang *et al.*, 2007). De mayor a menor, los rangos

taxonómicos formales son: dominio, *phylum*, clase, orden, familia, género y especie. Hay algunos rangos ocasionales como “subclase” y “suborden”. El *RDP classifier* compara con las secuencias del gen 16S rRNA de cepas conocidas (y un pequeño número de otras secuencias que representan regiones de diversidad bacteriana con unos pocos organismos nombrados). El número de *bootstrap* para que un género sea correctamente asignado es 100, generando un estimado del grado de confianza en la asignación del género. Para la asignación de órdenes superiores, los resultados son la suma de todos los géneros bajo cada taxón. Para la asignación de cada rango, el *RDP classifier* estima automáticamente la confiabilidad de la clasificación usando *bootstrapapping*. Los rangos donde las secuencias no pudieron ser asignadas con un estimado de confianza de *bootstrap* por encima del valor umbral, estas fueron clasificadas dentro del taxón artificial de “no clasificadas”. El valor umbral por defecto empleado en este análisis fue de un 80%. Con el fin de calcular la diversidad estadística de las tres librerías bTEFAP y obtener secuencias representativas de las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) pertenecientes a cada individuo, las librerías fueron alineadas empleando el programa de alineamiento INFERNAL del *RDP pyrosenquencing pipeline*, un alineador basado en la estructura secundaria y en SCFG. Seguido al alineamiento, un análisis de agrupamiento de las secuencias alineadas se realizó empleando la herramienta *RDP cluster analysis* y fueron determinados a nivel de clase ($D=0.15$) y de especie ($D=0.03$), la riqueza (OTUs), los índices de diversidad y de equidad de Shannon (H' y E), el número de OTUs previstos (Chao 1) y las curvas rarefacción (número de secuencias de la muestra vs. el número de OTUs). Finalmente las secuencias representativas de cada grupo de secuencias fueron identificadas empleando la herramienta de *RDP dereplication*, usando los archivos de alineamiento y agrupamiento como archivos de entrada. La secuencia con la menor suma de los cuadrados de la distancia entre la secuencia dentro de grupo es asignada como la secuencia representativa para ese grupo.

4.4.2.4 Identificación de las 10 especies más abundantes de cada una de las librerías de 16S rDNA. Las secuencias parciales del 16S rDNA de los 10 OTUs mas abundantes con respecto a las secuencias totales de cada librería fueron clasificadas taxonómicamente empleando la herramienta *RDP classifier (Naïve Bayesian rRNA classifier)* comparando con las secuencias registradas en la base de datos RDP (Cole *et al.*, 2009). El *RDP classifier* provee una rápida y precisa clasificación taxonómica hasta el nivel de género para las secuencias del gen 16S rRNA de 400 pb y mayores. Un valor de

bootstrap de 80% fue empleado como el umbral de confianza para las asignaciones taxonómicas. Cada secuencia buscada fue asignada a la menor jerarquía taxonómica por encima del umbral de confianza (*bootstrap* del 80%). Las secuencias más cercanas fueron introducidas en la base de datos del *GenBank* empleando las herramienta RDP *Seqmatch* (Cole *et al.*, 2009). Como opciones de búsqueda en *Seqmatch* se seleccionaron *type strain* y *nontype strain*, no cultivables y cultivables, por encima y por debajo de 1200 pb de tamaño de secuencias, nomenclatura taxonómica y 20 resultados por secuencia. La herramienta BLASTn (Altschul *et al.*, 1990) del *GenBank* fue utilizada también para obtener información acerca de las secuencias de 16S rDNA. Adicionalmente, las jerarquías taxonómicas de los resultados más cercanos obtenidos por BLASTn y RDP *classifier* para las secuencias de 16S rDNA fueron analizadas a la par con el fin de confirmar la asignación taxonómica. Secuencias con puntajes de similitud mayores al 97% (<3% de diferencia) fueron asignadas a nivel de especie, entre el 95% y 97% a nivel de género, entre 90% y 95% a nivel de familia y entre un 80% y 90% a nivel de orden.

4.4.2.5 Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE). Los *primers* eubacteriales 16S 27F+GC (5' gcc gcc tgc agc ccg cgc ccc ccg tgc ccc cgc ccc gcc gcc ggc ccg ggc gcc tta ccc ttg tta cga ctt) y P2 (5'-att acc gcg gct gct gg), fueron utilizados para generar amplicones de 16S rDNA de aproximadamente 500 bp con una CG “*clamp*”, necesaria para el análisis por DGGE. Las PCR (50 µl) fueron llevadas a cabo usando la Econotaq PLUS GREEN 2X Master Mix, los primers 27F+GC (0.5 µM) y P2 (0.5 µM), DMSO (5 %), y 100 ng de gDNA de los tres individuos *P. elisabethae*. La DGGE de los amplicones de 16S rDNA fue llevado a cabo como se describe usando DCode™ DGGE system (Bio-rad). Un gradiente de desnaturalización entre 40-70% fue escogido como las mejores condiciones para llevar a cabo la separación electroforética de los amplicones de 16S rDNA (500 bp), donde una solución de urea 7.0 M y 40% formamida fue definida como el 100%. Los geles se realizaron al 8% de acrilamida. Diferentes volúmenes de cada muestra fueron cargados para la óptima visualización de las bandas las cuales variaron en sus intensidades. El gel fue corrido a 60 V y 60°C durante 24 horas, transcurrido el tiempo el gel fue teñido como bromuro de etidio (1 mg/L) durante 1 hora y visualizadas con MultiDoc-It™ Imaging System (UVP

fluorescence imager UVP, LLC Upland, CA). El control negativo fue DMSO y el control positivo fue *E. coli*.

4.4.2.6 Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) (Tomado de Zorro, P. 2011).

Para análisis por FISH fragmentos del octocoral (2 cm) se fijaron en un volumen de formaldehído 20%/ácido acético 50%, después de 12 horas cada una de las muestras fueron raspadas para obtener exclusivamente las bacterias asociadas con la superficie de *P. elisabethae* y resuspendidas en PBS. Cada una de las muestras fijas (8 μ L) se colocó en un portaobjetos de vidrio, se secó a 46°C durante 20 min, y se cubrió con 16 μ L de agarosa de bajo punto de fusión. Estas preparaciones fueron secadas nuevamente y deshidratadas con diluciones secuenciales de etanol al 50%, 80% y 100% durante dos minutos, cada una de ellas. La hibridación se realizó con 8 μ L de buffer (360 μ L de NaCl 5 M, 40.0 μ L de Tris-Cl pH 8.0, 1 M, 700 μ L de formamida, 4.0 μ L de SDS al 10% (w/v), en un volumen final de 2 mL) y 1 μ L de cada una de las sondas marcadas (EUB338 (Alexa 488: Ex 495 nm, Em 519 nm) (Amman *et al.*, 1995), ALF443 (Cascade Blue: Ex 399nm, Em 423nm) (Hernández-Zárte y Olmos-Soto, 2006), GAM42a (Alexa 594: Ex 590nm, Em 617nm) y BET42a (Alexa 532: Ex 532 nm, 554nm) (Lee *et al.*, 2011)). Paso seguido, las muestras fueron inicialmente incubadas durante 16 horas a 46°C en una cámara con control de humedad y luego lavadas dos veces con 50 μ L del buffer (1 mL de Tris-Cl pH 8.0, 1 M, 700 μ L de NaCl 5 M, 500 μ L de EDTA 0.5 M, 50 μ L de SDS 10% (w/v) en un volumen final de 50 mL) e incubadas en la cámara con control de humedad durante 15 min a 48°C. Finalmente las placas fueron secadas al aire y preparadas para microscopía con medio Glicerol Sigma® y buffer PBS. Las células fueron detectadas en un microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss® Axiophot y las imágenes fueron obtenidas usando 100X Plan Neo-fluor Zeiss con un tiempo de exposición de medio segundo. Los filtros empleados para cada fluorocromo fueron: azul 377-464 nm, verde 470-560 nm y rojo 592-675 nm, la evaluación de autofluorescencia de las muestras de octocoral se realizó por comparación con placas fijadas de *P. elisabethae* sin sondas. En total se realizó la toma de 20 a 25 fotos por muestra para llevar a cabo el análisis FISH correspondiente. Empleando el software ImageJ se realizó el conteo de células detectadas con EUB338 y se calculó la diferencia porcentual con respecto a cada uno de las sondas empleadas, determinando para cada medida el error estándar (Lee *et al.*, 2011; Roche, 2002; Zwirgmaier *et al.*, 2003; Abramoff *et al.*, 2004).

4.5 Evaluación de las Ps y seco-Ps como agentes moduladores del *microfouling* marino

4.5.1 Efecto de las Ps y seco-Ps en la colonización bacteriana (*microfouling*)

4.5.1.1 Bacterias asociadas a superficies marinas con *fouling*. Seis cepas bacterianas marinas asociadas con superficies con *fouling* fueron obtenidas por Mora *et al.*, 2011 utilizando métodos tradicionales de cultivo, del pinacodermo de la depresión inhalante externa de la esponja *Aplysina lacunosa* y de la superficie calcárea de un bivalvo abandonado *Donax* sp., las cuales fueron recolectadas mediante buceo autónomo SCUBA a una profundidad entre 5 y 15 m en la Ensenada Granate (Parque Nacional Natural Tayrona, Caribe Norte, Colombia). Las bacterias fueron caracterizadas e identificadas usando características morfológicas y métodos moleculares (secuenciación del gen 16S rRNA) como: *Ochrobactrum pseudogringnonense* Cepas 1 y 2 (Gram-negativas), *Kocuria* sp., (Gram-positiva) y *Bacillus* sp., (Gram-positiva) aisladas de *A. lacunose*, y *Alteromona macleodii* (Gram-negativa) y *Oceanobacillus iheyensis* (Gram-positiva) aisladas de *Donax* sp., (Mora *et al.*, 2011). Los aislamientos bacterianos se preservaron en medio marino Difco 2216 semisólido a 4 °C hasta que fueron utilizados en el ensayo antibacteriano de difusión en agar con sensidisco y en el ensayo de la inhibición de la formación de *biofilm*.

4.5.1.2 Ensayo antibacteriano de difusión en agar con sensidiscos contra bacterias asociadas con superficies marinas con *fouling*. La actividad antibacteriana de las PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, *seco*-PsJ y *seco*-PsK aisladas de *P. elisabethae*, fue determinada por el ensayo de difusión con sensidiscos (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004) en agar marino contra las seis cepas bacterianas marinas asociadas a superficies con *fouling*. Treinta microgramos de cada tratamiento y de los controles positivos (óxido de cobre, Cu₂O, sulfato de cobre CuSO₄, tetraciclina y

kanamicina) fueron cargados en discos de papel circular (Whatman N ° 1, diametro del disco = 5.2 mm) por triplicado.

Las seis cepas bacterianas asociadas con *fouling* (*O. pseudogringnonense* cepas 1 y 2, *A. macleodii*, *O. iheyensis*, *Kocuria* sp., y *Bacillus* sp.) fueron incubadas en medio marino líquido durante 24 horas a 25°C, pasado el tiempo de incubación la turbidez fue ajustada con medio estéril con respecto al estándar 0.5 de la escala de McFarland. A continuación, 100 µL de cada uno de los inóculos de las bacterias cultivadas fueron sembrados en cajas de agar marino Difco 2216 e inmediatamente después cada uno de los discos de papel cargados con una cantidad fija (30 µg) de PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, seco-PsJ, seco-PsK, Cu₂O, CuSO₄, tetraciclina y kanamicina y metanol (20 µL, usado como control negativo), se colocaron por triplicado sobre las cajas. Las cajas se incubaron a 25°C durante 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación se midió el diámetro de la zona de inhibición y se volvieron a medir 48 horas después de la incubación.

4.5.1.3 Ensayo de inhibición de *biofilm*. Como organismo modelo de la formación de *biofilm* se utilizó la bacteria *Pseudomonas putida* IsoF, la cual fue donada gentilmente por la profesora Dra. Kathrin Riedel, del Departamento de Microbiología, Instituto de Biología Vegetal, Universidad de Zurich. *P. putida* IsoF se preservó en medio semisólido LB a 4°C hasta su utilización en el ensayo.

El ensayo de inhibición de la formación de *biofilm* se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por O'Toole *et al.*, 2000, empleando placas de poliestireno de microtitulación de 96 pozos. *P. putida* IsoF y las seis bacterias marinas asociadas a superficies con *fouling* (*O. pseudogringnonense* cepa 1, *O. pseudogringnonense* cepa 2, *A. macleodii*, *O. iheyensis*, *Kocuria* sp., Y *Bacillus* sp.) fueron cultivadas en medio LB y marino Difco 2216, respectivamente, durante un período no mayor a 24 horas a 37°C, una vez transcurrido este tiempo de incubación, la DO a 590 nm de cada cultivo fue ajustada entre 0.3-0.4. A partir de estos preinóculos 100 µL de cada suspensión bacteriana fue inoculada en cada pozo, exceptuando a *Kocuria* sp., la cual fue inoculada empleando una dilución de 1:200, y mezclada con tres concentraciones finales diferentes (100, 50 y 10 µg/mL) de cada uno

de los tratamientos (PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, *seco*-PsJ y *seco*-PsK). Los controles positivos kanamicina y tetraciclina fueron evaluados a una concentración final de 50 y 15 µg/mL, respectivamente. Por último, cada pozo fue completado con medio de cultivo estéril de hasta un volumen final de 200 µL. La concentración final en cada pozo de metanol utilizado para la disolución de los tratamientos no fue mayor al 0.5%. Finalmente, las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37°C, y cumplido el tiempo de incubación se determinó el efecto antimicrobiano de los diferentes tratamientos midiendo la DO 590 nm a través un lector de microplacas BIORAD 550, con el fin de determinar el porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano con respecto al control (cultivo sin tratamiento).

Para cuantificar el biofilm formado en las placas, el medio de cultivo y las células no adheridas fueron descartadas por inversión de la placa y posteriormente fueron lavadas tres veces con agua destilada (200 µL/pozo). Para la cuantificación de las bacterias adheridas a la superficie, éstas fueron teñidas durante 5 min con 200 µL/pozo de una solución de cristal violeta (1% w/v de etanol:acetona (80:20 v/v)). El exceso de colorante se eliminó nuevamente por inversión de la placa y con un lavado con agua destilada (200 µL/pozo). La tinción diferencial fue cuantificada a 620 nm utilizando un lector de microplacas BIORAD 550. Para cada experimento, la corrección de la tinción de fondo se hizo restando el valor la absorbancia del cristal violeta ligado a los controles sin inocular. Finalmente se calcularon los porcentajes de inhibición de la formación de *biofilm* con respecto al control (cultivo sin tratamiento).

4.5.2 Influencia de las Ps y *seco*-Ps en la composición de la comunidad bacteriana asociada con la superficie de *P. elisabethae*

4.5.2.1 Bacterias cultivables asociadas con la superficie de *P. elisabethae*. De las 40 bacterias marinas cultivables asociadas con *P. elisabethae* (aisladas y caracterizadas como se describe en la sección 4.4.1; Correa *et al.*, 2011b), 26 de ellas fueron aisladas de la superficie del octocoral y pertenecen a los tres *phyla* descritos Actinobacteria (Gram-positivas), Firmicutes (Gram-positivas) y Proteobacteria (Gram-negativas). Estas

bacterias se preservaron en medio marino Difco 2216 semisólido a 4°C hasta que fueron utilizadas en el ensayo antibacteriano de difusión en agar con sensidiscos.

4.5.2.2 Ensayo antibacterial de difusión en agar con sensidiscos contra las bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae*. La fracción **FPST** que contiene la mezcla total de Ps y seco-Ps aislada de *P. elisabethae*, fue evaluada usando el ensayo de difusión en agar con sensidiscos (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2004) contra las 26 bacterias cultivables de la superficie de *P. elisabethae* en agar marino Difco 2216, por triplicado (N = 3). Para ello las 26 bacterias fueron cultivadas en medio marino durante 24 horas a 25°C, pasado el tiempo de incubación la turbidez fue ajusta con medio estéril con respecto al estándar de 0.5 de la escala de McFarland. Paso seguido, 100 µL de cada uno de los inóculos de las bacterias cultivadas fueron sembradas en agar marino Difco 2216 e inmediatamente después cada uno de los disco de papel impregnado con una cantidad fija de **FPST** (300 µg), tetraciclina (30 µg), kanamicina (30 µg), y metanol (20 µL, usado como control negativo), se colocaron por triplicado sobre las cajas. Finalmente, las cajas se incubaron a 25°C durante 24 horas, transcurrido el tiempo de incubación se midió el diámetro de la zona de inhibición y se confirmaron dichas medidas 48 horas después de la incubación.

4.5.3 Análisis estadístico

Los resultados están presentados como el promedio±error estándar medio (E.S.M.). Los datos fueron sujetos a estadística descriptiva y análisis de varianza (ANOVA), complementados por el ensayo Dunnett's post hoc cuando fue apropiado. P<0.05 fue considerado como un indicativo de significancia usando el Software GraphPad, Prism V. 5.0.

4.6 Evaluación de la capacidad de las bacterias cultivables asociadas *P. elisabethae* para producir compuestos químicos (bioactivos o no bioactivos)

4.6.1 Bacterias simbiotes y preinóculo

Las 40 bacterias simbiotes cultivables aisladas por técnicas tradicionales de cultivo e identificadas morfológica y filogenéticamente estudiando la secuencia del gen ribosomal 16S rRNA de acuerdo a la metodología descrita en la sección 4.4.1 y en Correa *et al.*, 2011b, las cuales hacen parte de la colección de referencia codificada como RKHC- (Código interno), disponible en el laboratorio de Productos Naturales Marinos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, y cuyo números de acceso en el Gene Bank son JQ282814- JQ282828 fueron cultivadas en medio marino (Difco 2216) semisólido y en medio marino (Difco 2216)/glicerol (1:1) y conservadas a 4°C y a -80°C, respectivamente.

Cada una de las bacterias mencionadas fue cultivada en placas de agar sólido marino (Difco 2216) con un tiempo de cultivo no mayor a 48 h, y luego fueron utilizadas para realizar su correspondiente preinóculo en 10 mL de caldo TSB (medio digerido de soya y caseína, Difco) para las Actinobacteria, NB-IO (medio nutritivo Difco preparado en agua de mar al 50%) para las Proteobacteria y MB (caldo marino Difco 2216) para las Firmicutes, y posteriormente incubadas en condiciones aeróbicas por un período de 48 horas, a 200 rpm y a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo, el preinóculo de cada bacteria sirvió como medio de alimentación para los posteriores cultivos.

4.6.2 Condiciones de cultivo de las bacterias asociadas con *P. elisabethae* aisladas

Los medios de cultivo empleados fueron seleccionados de acuerdo al *phylum* al que pertenecen las bacterias, la fuente de carbono, nitrógeno y fosfato del medio, además de la concentración de los mismos, con el fin de estimular la producción de metabolitos secundarios. Así, para las bacterias del *phylum* Actinobacteria se utilizó: caldo B (**B**: harina de soya 12.5 g/L, NH₄Cl 1.5 g/L, Dextrosa 12.5 g/L, CaCO₃ 10 g/L, y NZ-Amina A

2.5 g/L), caldo Takashi (**TAK**: Almidón 30.0 g/L, Dextrosa 5.0 g/L, Peptona 10.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g/L, y KH_2PO_4 0.2 g/L), caldo digerido de soya y caseína (**TSB** digerido pancreático de caseína 17.0 g/L, digerido péptico de harina de soja 3.0/L, Dextrosa 2.5/L, NaCl 5.0/L, K_2HPO_4 2.5 g/L) y caldo marino mínimo (**MMB**: Glutamato de sodio 2.0 g/L, NaCl 20.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.0 g/L, MgCl_2 5.3 g/L, CaCl_2 1.25 g/L, K_2HPO_4 0.075 g/L, FeSO_4 0.025 g/L, CuSO_4 0.005 g/L, y Tris 6.1 g/L), para las bacterias del *phylum* Firmicutes se usó: caldo **MB**, caldo **TAK**, caldo **MMB** y caldo nutritivo dilución a diez (**NB/10**: Peptona 0.5 g/L y Extracto de carne 0.3 g/L) y para las bacterias del *phylum* Proteobacteria: caldo **TAK**, caldo **MMB**, caldo **E1** (**E1**: extracto de levadura 1.0 g/L, dextrosa 2.0 g/L peptona 5.0 g/L, FePO_4 0.04 g/L y sal de mar instantánea, instant ocean 27.0 g/L) y caldo nutritivo con *Instant Ocean* al 50% (**NB-IO** peptona 5.0 g/L, extracto de carne 3.0 g/L y sal de mar instantánea, *Instant Ocean* 18.0 g/L Todos los medios fueron preparados con agua desionizada y esterilizados junto con la resina Diaion™ HP-20.

Todos los cultivos se realizaron en presencia de la resina Diaion™ HP-20, la cual fue previamente activada con Metanol grado CLAE (1/2 p/v), durante un período de 4 horas, a 300 rpm a temperatura ambiente, paso seguido la resina fue filtrada y lavada tres veces con agua filtrada y purificada. Finalmente, la resina fue filtrada y agregada a los caldos de cultivo previo a su posterior esterilización.

El cultivo de las 40 bacterias se realizó en placas de poliestireno de 24 pozos de 10 mL. Doscientos cincuenta microlitros del cada preinóculo fueron puestos por triplicado en cada uno de los cuatro medios de cultivo empleados para cada *phylum*, paso seguido a la inoculación, las placas fueron cubiertas con una membrana transpirable estéril adhesiva de nylon, e incubadas aeróbicamente durante 96 horas (**B**, **TAK**, **TSB**, **MB**, **NB-IO** y **E1**) ó 144 horas (**MMB** y **NB/10**), a 200 rpm y a 30°C. En todos los casos el volumen total de cultivo fue de 5 mL y en presencia de la resina Diaion™ HP-20 a una concentración final de 10% p/v. En todos los casos se empleó un blanco correspondiente a los medios de cultivo sin inocular, el cual sirvió como control de crecimiento y de posibles componentes del medio retenidos en la resina.

4.6.3 Extracción de los productos de cultivo de las bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae*

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, las placas se dejaron decantar con el fin de eliminar con ayuda de una micropipeta la mayor cantidad de caldo de cultivo y biomasa sobrenadante, posteriormente la resina Diaion™ HP-20 fue lavada tres veces con 5 mL de agua estéril desionizada, agitando las placas de cultivo a 200 rpm a temperatura ambiente por un período mínimo de 2 horas entre cada lavado, con el fin de eliminar la mayor cantidad de sales y de medio retenidos en la resina. Para las resinas obtenidas a partir del cultivo de la bacteria RKHC-28, las Proteobacterias y Actinobacterias se realizó un lavado adicional de la resina con agua. Paso seguido se realizó la extracción por duplicado con 5 mL de alcohol grado histológico (acetato de etilo:etanol:metanol 5:90:5). Para la primera extracción se dejó la resina en contacto con el solvente por un período de 3 horas y la segunda durante la noche. Las fases orgánicas fueron reunidas y concentradas a presión reducida y pesadas con el fin de determinar la cantidad de extracto obtenido para cada cultivo.

4.6.4 *Screening* de compuestos químicos como productos de cultivo de las bacterias asociadas con *P. elisabethae* aisladas

El *screening* químico en este trabajo se realizó con dos objetivos, el primero evaluar la capacidad de producción de Ps, *seco*-Ps o compuestos relacionados por parte de las 40 bacterias cultivables asociadas a *P. elisabethae* y cultivadas por separado en cuatro medios de cultivo diferentes. El segundo objetivo se planteó para desarrollar una estrategia o aproximación metodológica con el fin de acelerar y simplificar la identificación de los compuestos que fueron producidos por las 14 bacterias pertenecientes al *phylum* Firmicutes en los cuatro medios de cultivo empleados.

4.6.4.1 Análisis por UPLC-MS. A partir del extracto crudo de cada uno de los cultivos, se prepararon diluciones de las muestras en el rango de 1-5 mg/mL con MeOH grado CLAE, para el análisis en UPLC-MS en placas de 96 pozos de 2 mL. En todos los casos se analizaron en las mismas condiciones los extractos crudos de los medios de cultivo sin inocular y un blanco de solvente (MeOH grado CLAE).

La cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS) se realizó en un cromatógrafo Thermo Scientific Accela equipado con un automuestreador Accela que permite el análisis de muestras contenidas en placas de 96 pozos. Como detectores se emplearon el detector Accela PDA (Photodiode Array) monitoreando en un rango de longitudes de onda entre 200-600 nm, el detector ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), Sedere, Sedex LT-ELSD Modelo 80LT a una temperatura de 35°C, y finalmente un MS (Mass Spectrometer), espectrómetro de masas lineal de trampa de iones Thermo Scientific LTQ en modo de ionización química a presión a atmosférica (APCI), utilizando como gas nebulizador nitrógeno. Se detectaron iones positivos con masas entre 50 y 2000 u. La columna cromatográfica empleada fue una ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 x 50 mm, 1.7 µm). Se inyectaron en todos los casos 20 µL de muestra, utilizando como fase móvil un gradiente discontinuo de polaridad con MeOH modificado con ácido fórmico al 0.1% (SOL 1) y agua modificada con ácido fórmico al 0.1% (SOL 2). Se empleó el siguiente programa: tiempo 0.0 min, SOL 1/ SOL 2 5:95, flujo 500 µL/min; 1.20 min, SOL 1/ SOL 2 95:5, 500 µL/min; 5.00 min, SOL 1 100%, 500 µL/min; 5.20 min, SOL 1 100%, 900 µL/min; 8.50 min, SOL 1 100%, 900 µL/min; 8.70 min, SOL 1 100%, 600 µL/min; 8.90 min, SOL 1/SOL 2 5:95, 900 µL/min; 9.00 min SOL 1/SOL 2 5:95, 600 µL/min y 10 min SOL 1/SOL 2 5:95, 600 µL/min.

4.6.4.2 Detección de Ps y seco-Ps y compuestos relacionados en los extractos de los cultivos. Patrones (soluciones 1 mg/mL) de todas las Ps y seco-Ps aisladas nuevamente en este trabajo (Sección 4.2), así como también la mezcla en equilibrio de diterpenos no glicosidados (MEDNG) aislada a partir de muestras de *P. elisabethae* de la Isla de San Andrés (Duque *et al.*, 2006, Arias, 2004), y un estándar de la aglicona de las Ps, obtenido por síntesis a partir de Ps aisladas de muestras de *P. elisabethae* de Las Bahamas (Donado por el profesor Russell Kerr, UPEI) fueron analizadas por UPLC-MS bajo las mismas condiciones en las que se realizó el análisis de los extractos de los cultivos de las 40 bacterias junto con los controles respectivos (medio sin inocular y solvente) (Sección 4.6.4.1). Paso seguido se procedió a generar una base de datos con cada la información obtenida para los estándares, registrando para cada sustancia su tiempo de retención junto con los iones base y $[M+H]^+$ del espectro de masas. Esta

información constituyó el punto de partida para realizar el seguimiento de estos compuestos en los extractos de los cultivos bacterianos, siendo seleccionados específicamente los iones en m/z 301 y m/z 303 como iones diagnóstico para la detección de este tipo de sustancias, en el rango de tiempos de retención comprendido entre 4.00 y 8.00 min. De esa manera fueron analizados los RICs (*Reconstructed Ion Chromatogram*) de los iones en m/z 301 y m/z 303 de cada una de las 516 muestras analizadas (480 extractos de los cultivos de las 40 bacterias en cuatro medios por triplicado más 24 extractos de los controles de los ocho medios sin inocular por triplicado y 12 blancos de solvente) con el fin de detectar compuestos tipo Ps, *seco*-Ps y compuestos relacionados en el extracto del cultivo. En el caso de observar la presencia de estos iones entre el rango de tiempo seleccionado, se verificó si su espectro de masa presentaba patrones de fragmentación característicos de este tipo de sustancias.

4.6.4.3 Detección e identificación de otros compuestos producidos por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes y construcción de una librería utilitaria de compuestos

Análisis de los cromatogramas. Una vez que todas las muestras (extractos de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes en 4 medios diferentes por triplicado, junto con los controles de medios y de MeOH. Total: 192 inyecciones) fueron analizadas por UPLC-MS, se procedió a buscar en cada uno de los cromatogramas sustancias que presentaran señal tanto en el ELSD como en el detector de masas, registrando su tiempo de retención junto con el ion $[M+H]^+$ del espectro de masas, y anotando en cada caso si el compuesto era también visible en el detector PDA, debido a grupos cromóforos en su estructura. En total se lograron identificar 593 señales distintas en los cromatogramas de masas para todo el conjunto de inyecciones, éstas sirvieron para generar el primer insumo de la base de datos aquí reportada haciendo uso del software Xcalibur™, del equipo de UPLC-MS, el cual realiza la búsqueda simultánea de determinada sustancia con un tiempo de retención y una masa establecida, en todos los cromatogramas de masas y genera una gráfica en tres dimensiones, donde se relaciona, la muestra (bacterias, medios sin inocular y metanol) vs. medios de cultivo, vs. el área bajo la curva. El haber realizado el cultivo de cada bacteria por triplicado, sirvió para descartar posibles falsos positivos. El análisis de las gráficas permitió establecer cuáles de las 593 señales corresponden a compuestos producidos, a ruido en el equipo (presente en todos los

cromatogramas de masas), a contaminación de la columna (presente en los cromatogramas de masas del metanol) y a componentes del medio remanentes en la resina HP-20 (presente en los cromatogramas de masas del medio). Así, se logró determinar que de las 593 señales, tan solo 46 correspondían a verdaderos productos naturales producidos por las bacterias de manera selectiva. Paso seguido se verificó para cada una de las 46 señales que el ión inicialmente observado correspondía realmente al ión $[M+H]^+$.

Análisis por derreplicación usando antibase. Para los 46 productos naturales detectados se realizó una búsqueda en la base de Datos Antibase 2007™ (contiene información espectroscópica de los diferentes compuestos aislados a partir de algas, microorganismos y hongos mayores incluyendo levaduras, ascomicetos, basidomicetos, y líquenes) de sustancias reportadas en la literatura con igual $[M+H]^+$, estableciendo en cada caso cuantos de esas reportes vienen de bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*.

4.6.5 Screening biológico de los productos de cultivo de las bacterias cultivables asociadas con *P. elisabethae*

3.6.5.1 Actividad antimicrobiana como herramienta para la selección de cepas que producen sustancias con actividad. Se dispusieron 100 µg de extracto crudo de cada uno de los cultivos junto los controles de medio sin inocular en placas de 96 pozos con el fin de determinar su actividad frente a cuatro microorganismos patógenos *S. aureus* ATCC 375, *E. faecalis* ATCC 10741 y *P. aeruginosa* ATCC 14210 y la levadura *C. albicans* ATCC 14035 (Sección 3.6.2.1), empleando la metodología descrita en la Sección 3.3.2.2, para ello se prepararon soluciones stocks de cada uno de los extractos en DMSO 20% y se almacenaron a 4°C hasta su uso. La penicilina G (*S. aureus*), vancomicina (*E. faecalis*), gentamicina (*P. aeruginosa*) y nistatina (*C. albicans*) se utilizaron como controles positivos y el vehículo (DMSO + medio) como el blanco. La concentración final de DMSO usado para disolver los extractos fue inferior al 2%. La concentración final de cada uno de los extractos fue de 50 µg/mL.

4.6.5.2 Escalonamiento de cultivo y extracción de los productos de cultivo de dos Actinobacterias: *Brachybacterium conglomeratus* (RKHC-33) y *Brevibacterium casei* (RKHC-66A). Para el escalamiento del cultivo se escogieron las Actinobacterias *Brachybacterium conglomeratus* (RKHC-33) y *Brevibacterium casei* (RKHC 66A), las cuales fueron cultivadas en el medio **B**. Cada una de las bacterias fue cultivada en placas de agar sólido marino (Difco 2216) con un tiempo de cultivo no mayor a 48 horas, y luego fueron utilizadas para realizar su correspondiente preinóculo en 50 mL de caldo TSB e incubadas en condiciones aeróbicas por un período de 48 horas, a 200 rpm y a una temperatura de 30°C. Transcurrido este tiempo, el preinóculo de cada bacteria sirvió como medio de alimentación para los posteriores cultivos.

Ambos cultivos se realizaron en erlenmeyers de 5 L en presencia de la resina Diaion™ HP-20 (10% p/v), previamente activada como se describe en la sección 3.6.2. Los cincuenta mililitros de cada preinóculo fueron adicionados a 950 mL de medio de cultivo **B**, paso seguido a la inoculación, los erlenmeyers fueron cubiertos con una membrana transpirable estéril de nylon, e incubadas aeróbicamente durante 96 horas a 200 rpm y a 30°C.

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, la resina Diaion™ HP-20 presente en cada cultivo fue separada del sobrenadante por filtración al vacío con ayuda de un embudo Büchner y posteriormente la resina fue lavada tres veces con 1000 mL de agua estéril desionizada, agitando a 200 rpm a temperatura ambiente por un período mínimo de 5 horas entre cada lavado, con el fin de eliminar la mayor cantidad de sales y de medio retenidos en la resina. Paso seguido se realizó la extracción una vez con 1000 mL y dos veces con 500 mL de alcohol grado histológico (acetato de etilo/etanol/metanol 5:90:5). Para la primera y segunda extracción se dejó la resina en contacto con el solvente por un período de 5 horas y la tercera durante la noche. Las fases orgánicas fueron reunidas y concentradas a presión reducida y pesadas, obteniendo 627.2 mg de extracto crudo del cultivo de la bacteria RKHC-33 y 757.7 mg de extracto crudo del cultivo de la bacteria RKHC-66A.

4.6.5.3 Fraccionamiento bioguiado de los extractos de un litro de cultivo de las bacterias *B. conglomeratus* (RKHC-33) y *B. casei* (RKHC 66A). Para realizar el seguimiento del compuesto(s) responsable de la actividad biológica que mostraron los extractos de las dos bacterias estudiadas, se decidió utilizar los microorganismos MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) ATCC 33591, VRE (Vancomycin-resistant *Enterococcus*) ATCC 379 y *C. albicans* ATCC 14035 en el bioensayo empleando la metodología Sección 3.6.2.1). Para ello se prepararon soluciones stocks de cada uno de los extractos y fracciones en DMSO 20% en tres concentraciones finales 50, 25 y 5 µg/mL.

Las figuras 4-2 y 4-3 muestran el esquema general de fraccionamiento bioguiado a los extractos de los cultivos de las bacterias *B. conglomeratus* (RKHC-33) y *B. casei* (RKHC 66A), respectivamente. Cada separación fue monitoreada por LC-MS y las fracciones ensayadas contra los tres microorganismos seleccionados. Los resultados del porcentaje de inhibición de cada uno de los extractos y subfracciones evaluadas se muestran en las tablas 4-1 y 4-2.

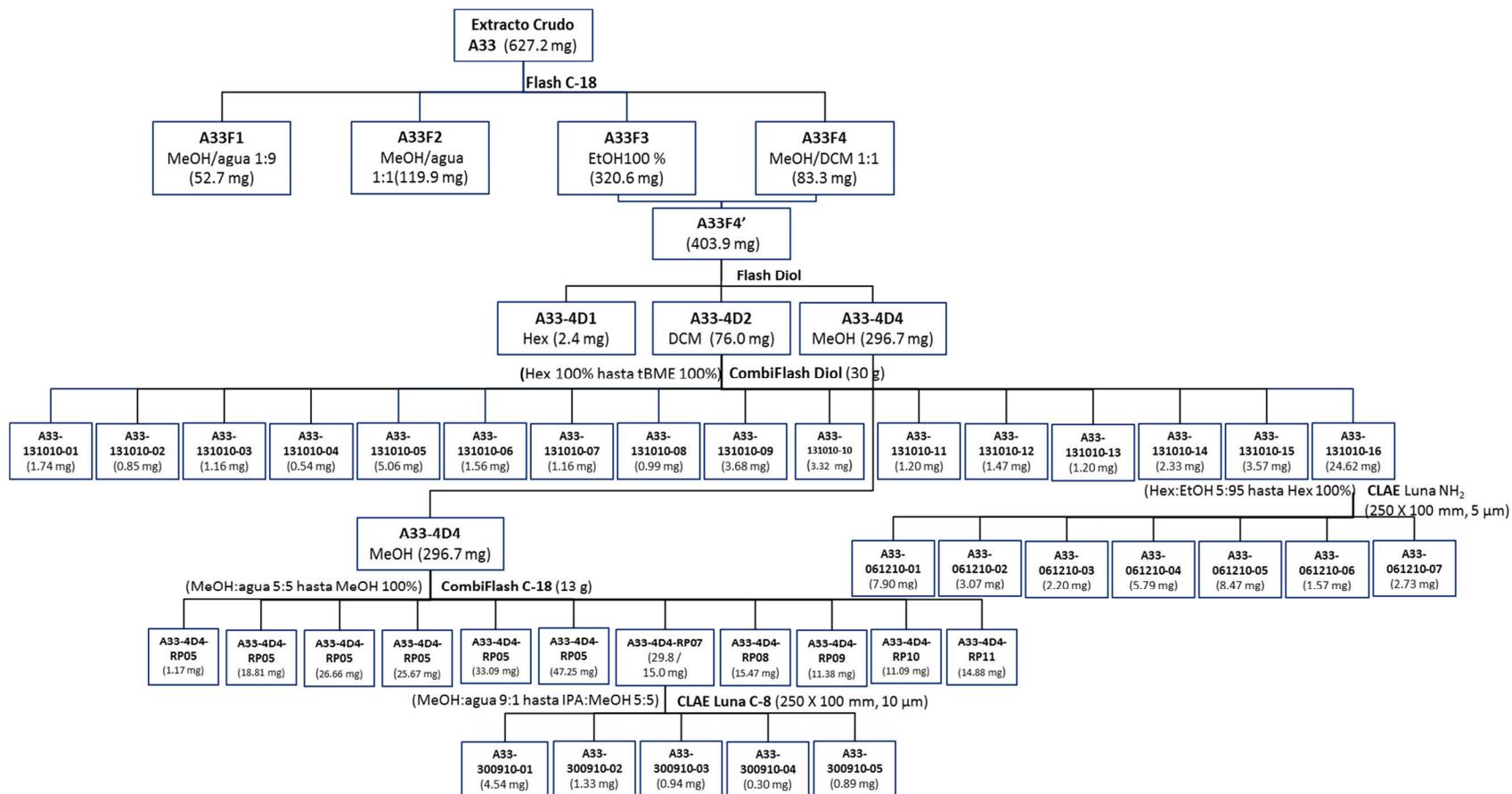


Figura 4-2. Esquema de fraccionamiento bioguido del extracto del cultivo de un litro de la bacteria *Brachybacterium conglomeratus* (RKHC-33).

Tabla 4-1. Actividad antimicrobiana contra MRSA, VRE y *C. albicans* de los extractos del cultivo y de las fracciones obtenidas a partir del cultivo de un litro de la bacteria *B. conglomeratus* (RKHC-33).

Fracción	Peso (mg)	MRSA (µg/mL)			VRE (µg/mL)			<i>C. albicans</i> (µg/mL)		
		50	25	5	50	25	5	50	25	5
Ext. Crudo A33 (5.0 mL)*		56.3	-	-	89.7	-	-	n.a.	-	-
Ext. Crudo A33 (1.0 L)	627.2	n.a.	n.a.	n.a.	40.2	41.0	41.0	n.a.	n.a.	n.a.
A33F1 (MeOH/H ₂ O 1:9)	52.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
A33F2 (MeOH/H ₂ O 1:1)	119.9	n.a.	n.a.	n.a.	8.6	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
A33F3 (EtOH)	320.6	n.a.	n.a.	n.a.	36.2	10.3	3.2	2.6	n.a.	n.a.
A33F4 (DCM)	83.3	5.8	3.6	n.a.	39.0	12.5	1.2	4.3	0.2	n.a.
A33-4D1 (Hex)	2.4	n.a.	n.a.	n.a.	30.5	29.2	27.3	n.a.	n.a.	n.a.
A33-4D2 (DCM)	76.0	n.a.	n.a.	n.a.	71.0	62.9	32.9	n.a.	n.a.	n.a.
A33-131010-01	1.74	-	-	-	45.1	49.1	29.7	-	-	-
A33-131010-02	0.85	-	-	-	40.2	33.7	14.3	-	-	-
A33-131010-03	1.16	-	-	-	15.1	11.9	9.4	-	-	-
A33-131010-04	0.54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A33-131010-05	5.06	-	-	-	49.7	31.3	15.9	-	-	-
A33-131010-06	1.56	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A33-131010-07	1.16	-	-	-	10.4	n.a.	n.a.	-	-	-
A33-131010-08	0.99	-	-	-	23.2	16.2	9.4	-	-	-
A33-131010-09	3.68	-	-	-	33.7	30.5	24.0	-	-	-
A33-131010-10	3.32	-	-	-	32.9	27.3	14.6	-	-	-
A33-131010-11	1.20	-	-	-	24.3	12.7	9.4	-	-	-
A33-131010-12	1.47	-	-	-	20.0	19.2	20.8	-	-	-
A33-131010-13	1.20	-	-	-	24.8	13.5	11.1	-	-	-
A33-131010-14	2.33	-	-	-	20.6	8.6	9.4	-	-	-
A33-131010-15	3.57	-	-	-	23.5	11.9	11.1	-	-	-
A33-131010-15	24.62	-	-	-	17.0	8.6	7.5	-	-	-
A33-131010-16	1.74	-	-	-	45.1	49.1	29.7	-	-	-
A33-061210-01	7.90	-	-	-	8.6	7.8	8.4	-	-	-
A33-061210-02	3.07	-	-	-	11.9	0.5	2.2	-	-	-
A33-061210-03	2.20	-	-	-	8.6	6.2	20.0	-	-	-
A33-061210-04	5.79	-	-	-	29.7	24.8	10.3	-	-	-
A33-061210-05	8.47	-	-	-	28.5	26.7	22.4	-	-	-
A33-061210-06	1.57	-	-	-	19.1	19.3	10.4	-	-	-
A33-061210-07	2.73	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.	-	-	-
A33-4D4	296.7	n.a.	n.a.	n.a.	21.3	8.3	3.9	43.4	31.6	19.0
A33-4D4-RP1	1.17	-	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.
A33-4D4-RP2	18.81	-	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.
A33-4D4-RP3	26.66	-	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.
A33-4D4-RP4	25.67	-	-	-	-	-	-	21.6	n.a.	n.a.
A33-4D4-RP5	33.09	-	-	-	-	-	-	8.8	6.5	n.a.
A33-4D4-RP6	47.25	-	-	-	-	-	-	6.8	n.a.	n.a.
A33-4D4-RP7	29.82	-	-	-	-	-	-	48.5	31.9	n.a.
A33-300910-01	4.54	-	-	-	-	-	-	6.8	n.a.	n.a.
A33-300910-02	1.33	-	-	-	-	-	-	19.9	12.4	12.5
A33-300910-03	0.94	-	-	-	-	-	-	34.9	36.0	7.7
A33-300910-04	0.30	-	-	-	-	-	-	44.0	28.8	12.7
A33-300910-05	0.89	-	-	-	-	-	-	56.0	32.3	26.0

A33-300910-06	3.80	-	-	-	-	-	-	34.5	22.5	18.5
A33-4D4-RP8	15.47							35.3	11.0.	n.a.
A33-4D4-RP9	11.38							45.4	5.7	n.a.
A33-4D4-RP10	11.09							29.0	8.9	6.3
A33-4D4-RP11	14.88							19.1	10.7	2.9

*Valores de la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. faecalis* de los extractos crudos del cultivo miniaturizado de las bacterias *B. conglomeratus* (RKHC-33) y *B. casei* (RKHC 66A). No activo: n.a

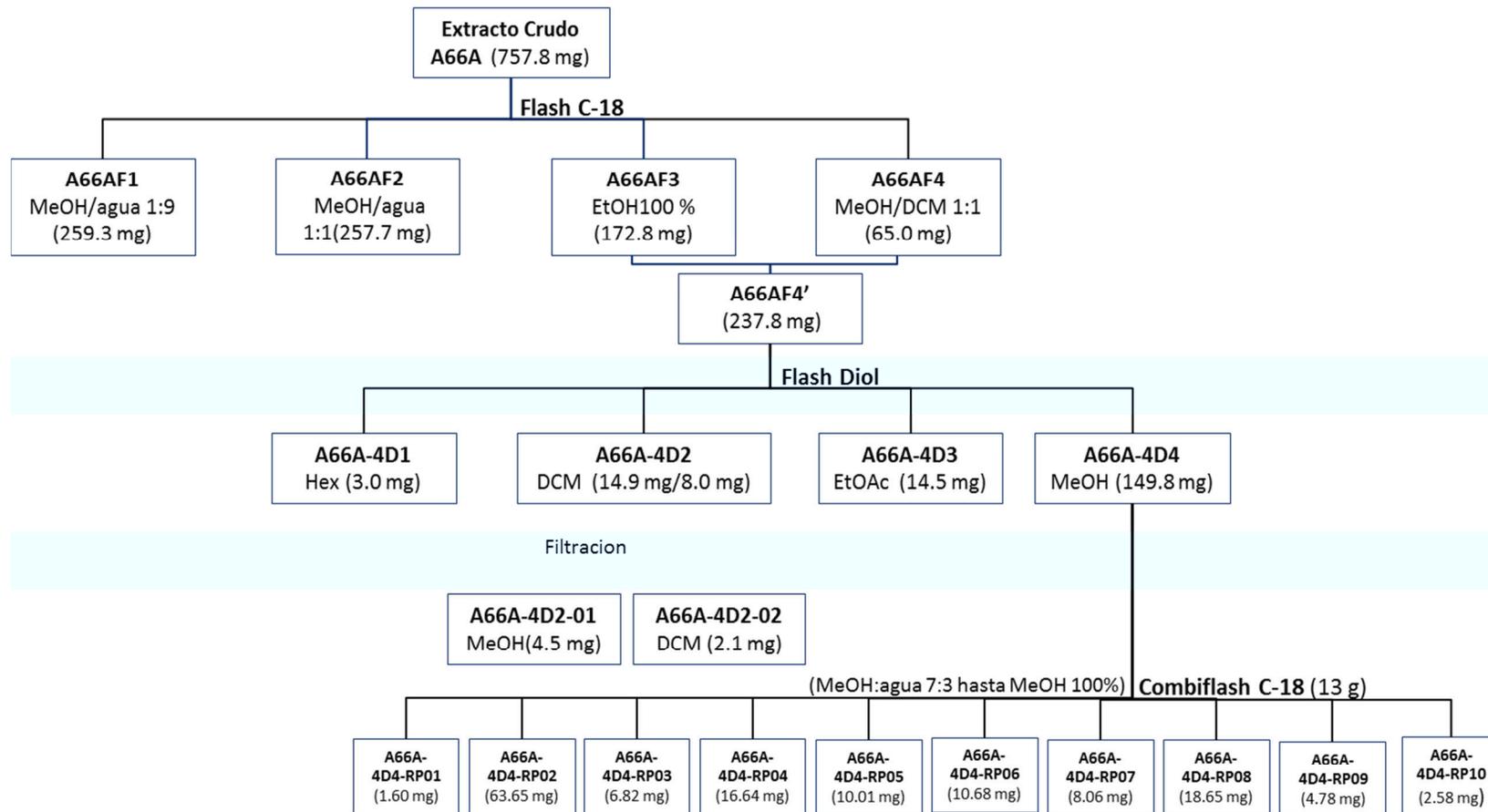


Figura 4-3. Esquema de fraccionamiento bioguiado del extracto del cultivo de un litro de la bacteria *Brevibacterium casei* (RKHC-66A).

Tabla 4-2. Actividad antimicrobiana contra MRSA, VRE y *C. albicans* de los extractos del cultivo y de las fracciones obtenidas a partir del cultivo de la bacteria *B. casei* (RKHC 66A).

Fracción	Peso (mg)	MRSA (µg/mL)			VRE (µg/mL)			<i>C. albicans</i> (µg/mL)		
		50	25	5	50	25	5	50	25	5
Ext. Crudo A66A (5.0 mL)*		41.8	-	-	89.4	-	-	61.3	-	-
Ext. Crudo A66A (1.0 L)	757.7	26.9	n.a.	n.a.	41.0	32.5	7.7	16.3	3.0	n.a.
A66AF1 (MeOH/H ₂ O 1:9)	259.2	n.a.	n.a.	n.a.	2.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
A66AF2 (MeOH/H ₂ O 1:1)	257.6	n.a.	n.a.	n.a.	12.4	n.a.	n.a.	1.2	n.a.	n.a.
A66AF3 (EtOH)	172.8	n.a.	n.a.	n.a.	52.6	34.8	7.0	13.8	13.5	n.a.
A66AF4 (DCM)	65.0	97.3	66.1	23.1	68.0	42.5	1.5	28.9	12.5	n.a.
A66A-4D1 (Hex)	3.09	1.9	n.a.	n.a.	8.5	19.3	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
A66A-4D2 (DCM)	14.97	100.5	100.2	97.3	86.6	91.2	38.7	29.7	21.6	13.7
A66A-4D2-01 (MeOH)	4.50	11.6	4.8	n.a.	22.0	11.7	1.3	1.4	n.a.	n.a.
A66A-4D2-02 (DCM)	2.10	103.8	102.7	100.5	109.8	104.4	68.0	101.1	100.6	58.0
A66A-4D3 (AcOEt)	14.51	59.6	19.6	n.a.	74.2	57.2	25.5	44.7	32.7	n.a.
A66A-4D4 (MeOH)	149.78	7.3	n.a.	n.a.	1.5	n.a.	n.a.	44.5	27.0	n.a.
A66A-4D4-RP01	1.60	-	-	-	-	-	-	12.8	n.a.	n.a.
A66A-4D4-RP02	63.65	-	-	-	-	-	-	19.5	n.a.	n.a.
A66A-4D4-RP03	6.82	-	-	-	-	-	-	15.1	n.a.	n.a.
A66A-4D4-RP04	16.64	-	-	-	-	-	-	57.2	51.8	n.a.
A66A-4D4-RP05	10.01	-	-	-	-	-	-	29.8	n.a.	n.a.
A66A-4D4-RP06	10.68	-	-	-	-	-	-	n.a.	n.a.	n.a.
A66A-4D4-RP07	8.06	-	-	-	-	-	-	20.9	n.a.	n.a.
A66A-4D4-RP08	18.65	-	-	-	-	-	-	5.3	n.a.	n.a.
A66A-4D4-RP09	4.78	-	-	-	-	-	-	6.0	n.a.	n.a.
A66A-4D4-RP10	2.58	-	-	-	-	-	-	1.5	n.a.	n.a.

*Valores de la actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. faecalis* de los extractos crudos del cultivo miniaturizado de la bacteria *B. casei* (RKHC 66A). No activo: n.a.

5. Bibliografía

Abràmoff, M. D., Hospitals, I., Ram, S. J. **2004**. Image processing with image. *J. Biophot. Int.*, 11:36-42.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. **1990**. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, 215:403-410.

Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. **1995**. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* 59:143-169.

Aphios. **2011**. <http://www.aphios.com>. Último acceso octubre de 2011.

Arai, T., Takahashi, K., Nakahara, S., Kubo, A. **1980**. The structure of a novel antitumor antibiotic, saframycin A. *Experientia*, 36:1025-1027.

Ardrey, R. E. **2003**. Liquid chromatographic-mass spectrometry: An introduction. John Wiley & Sons Ltda. Chichester, England. ISBN: 0-471-49801-7.

Arias, L. A. **2004** Contribución al estudio químico del gorgonáceo *Pseudopterogorgia elisabethae* recolectado en la Isla de San Andrés y evaluación de la posible actividad antiinflamatoria de sus metabolitos mayoritarios. Trabajo de Grado Química. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Ashton, M., Rosado, W., Govind, N.S., Tosteson, T.R. **2003**. Culturable and non-culturable bacterial symbionts in the toxic dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis*. *Toxicon*, 42:419-424.

Ata, A., Kerr, R. G., Moya, C. E., Jacobs, R. S. **2003**. Identification of anti-inflammatory diterpenes from the marine gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Tetrahedron*, 59, 4215-4222.

Ata, A., Win, H. Y., Holt, D., Holloway, P., Segstro, E. P., Jayatilake, G. S. **2004**. New antibacterial diterpenes from *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Helv. Chim. Acta*, 87:1090-1098.

Baltz, R.H. **2006**. Molecular engineering approaches to peptide, polyketide and other antibiotics. *Nat. Biotechnol.*, 24:1533-1540.

Barott, K.L., Rodriguez-Brito, B., Janouškovec, J., Marhaver, K.L., Smith, J.E., Keeling, P., Rohwer, F.L. **2011**. Microbial diversity associated with four functional groups of

benthic reef algae and the reef-building coral *Montastraea annularisemi*. *Environ. Microbiol.*, 13:1-13.

Becerro, M. A., Goetz, G., Paul, V., Scheuer, P. J. **2001**. Chemical defenses of the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens* and its host alga *Bryopsis* sp. *J. Chem. Ecol.*, 27, 2287-2299.

Ben-Haim, Y., Zicherman-Keren, M., Rosenberg, E. **2003**. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio corallilyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69:4236-4242.

Berdy J. **2005**. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, 58:1-26

Berg, K.A., Lyra, C., Sivonen, K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P., Rapala, J. **2009**. High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms. *ISME J.*, 3:314-325.

Berrue, F., Ibrahim, A., Boland, P., Kerr, R. **2009**. Newly isolated marine *Bacillus pumilus* (SP21). A source of novel lipoamides and other antimicrobial agents. *Pure Appl. Chem.*, 81:1027- 1031.

Berrue, F., Withers, S. T., Haltli, B., Withers, J., Kerr, R. **2011**. Chemical screening method for the rapid identification of microbial sources of marine invertebrate-associated metabolites. *Mar. Drugs.*, 9:369-381.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, H. M., Northcote, P. T., Prinsep, M. R. **2011**. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 28:196-268 y todas las revisiones anteriores de los mismos autores citadas en esta referencia (2003-2009).

Bourne, D.G., Iida, Y., Uthicke, S., Smith-Keune, C. **2008**. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *ISME J.*, 2:350-363.

Bourne, D.G., Munn, C.B. **2005**. Diversity of bacteria associated with the octocoral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Environ. Microbiol.*, 7:1162-1174.

Brantley, S. E., Molinski, T. F., Preston, C. M. DeLong, E. F. **1995**. Brominated acetylenic fatty acids from *Xestospongia* sp., a marine sponge-bacteria association. *Tetrahedron*, 54:7667-7672.

Briand, J-F. **2009**. Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. *Biofouling* 25:297-311.

Brück, T. B., Brück, W. M., Santiago-Vazquez, L. Z., McCarthy, P. J., Kerr, R. G. **2007**. Diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate deep water octocorals *Leptogorgia minimata*, *Iciligorgia schrammi*, and *Swiftia exertia*. *Mar. Biotechnol.*, 9, 561-576.

Bugelski, P.J., Atif, U., Molton, S., Toeg, I., Lord, P.G., Morgan, G. **2000**. A strategy for primary high throughput cytotoxicity screening in pharmaceutical toxicology. *Pharm. Res.*, 17:1265-1272.

Butler, M. S. **2008**. Natural products to drugs: Natural product-derived compounds in clinical trial. *Nat. Prod. Rep.*, 25:475-516.

Callaway, T.R., Dowd, S.E., Wolcott, R.D., Sun, Y., McReynolds, J.L., Edrington, T.S., Byrd, J.A., Anderson, R.C., Krueger, N., Nisbet, D.J. **2009**. Evaluation of the bacterial diversity in fecal contents of laying hens fed various molting diets by using bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing. *Poult. Sci.*, 88:298-302.

Carter, G. T. **2002**. Marine Natural Products as a Resource for Drug Discovery: Opportunities and Challenges, en *Marine Biotechnology in the Twenty-First Century: Problems, Promise, and Products*, National Academy of Sciences, United States of America P.47

Cervino, J.M., Hayes, R.L., Polson, S.W., Polson, S.C., Goreau, T.J., Martinez, R.J., Smith, G.W. **2004**. Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to yellow blotch/band disease in Caribbean corals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:6855–6864.

Chelossia, E., Milanese, M., Milano, A., Pronzato, R., Riccardi, G. **2004**. Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 309:21–33.

Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. **2009**. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.*, 37:D141-D145.

Coll, J. **1992**. The chemistry and chemical ecology of octocorals (Coelenterata, Anthozoa, Octocorallia). *Chem. Rev.*, 92, 613-631.

Connolly, J. D., Hill, R. A. **1992**. Dictionary of terpenoids, Chapman and Hall, New York.

Corey, E. J., Carpino, P. **1989**. Enantiospecific total synthesis of pseudopterosins A and E. *J. Am. Chem. Soc.*, 111:5472-5474.

Corey, E. J., Lazerwith, S. E. **1998**. A direct and efficient sterecontrolled synthetic route to the pseudopterosins. Potent marine anti-inflammatory agents. *J. Am. Chem. Soc.*, 120:12777-12782.

Correa, H. **2005**. Aislamiento e identificación de una nueva *seco*-pseudopterosina (*seco*-PsJ) del gorgonáceo *Pseudopterogorgia elisabethae* de la Isla de Providencia. Trabajo de Grado Química. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Correa, H. **2007**. Bioprospección del coral blando *Pseudopterogorgia elisabethae* como fuente de sustancias antiinflamatorias, analgésicas y citotóxicas. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Correa, H., Valenzuela, A.L., Ospina, L.F., Duque, C. **2009**. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *J. Inflamm.*, 6:5 doi: 10.1186/1476-9255-6-5.

Correa, H., Aristizabal, F., Duque, C., Kerr, R. **2011**. Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudopterins and seco-pseudopterins isolated from the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* of San Andrés and Providencia Islands (SW Caribbean). *Mar. Drugs*, 9:334-344.

Correa, H., Aristizabal, F., Duque, C., Kerr, R. **2011a**. Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudopterins and seco-pseudopterins isolated from the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* of San Andrés and Providencia Islands (Southwest Caribbean Sea). *Mar. Drugs* 9:334-344.

Correa, H., Haltli, B., Duque, C., Kerr, R. **2011b**. Bacterial community associated with the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at Providencia Island (SW Caribbean Sea). *In preparation*.

Cueto, M., Jensen, P. R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E., Clardy, J. **2001**. Pestalone a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. *J. Nat. Prod.*, 64:1444–1446.

Cuevas, C., Pérez, M., Martín, M. J., Chicharro, J. L., Fernández-Rivas, C., Flores, M., Francesch, A., Gallego, P., Zarzuelo, M., de la Calle, F., García, J., Polanco, C., Rodríguez, I., Manzanares, I. **2000**. Synthesis of Ecteinascidin ET-743 and Phthalascidin Pt-650 from Cyanosafraicin B. *Org. Lett.*, 2:2545–2548.

Cuevas, C., Francesch, A. **2009**. Development of Yondelis (trabectedin, ET-743). A semisynthetic process solves the supply problem. *Nat. Prod. Rep.*, 26:322–327

Dahms, H-U., Gao, Q-F., Hwang, J-S. **2007**. Optimized maintenance and larval production of the bryozoan *Bugula neritina* (Bugulidae: Gymnolaemata) in the laboratory for larval settlement assays in antifouling research. *Aquaculture*, 265:169-175.

Dairi, T. **2005**. Studies on biosynthetic genes and enzymes of isoprenoids produced by actinomycetes. *J. Antibiot.*, 58:227-243.

Davidson, S. K., Allen, S. W., Lim, G. E., Anderson, C. M., Haygood, M. G. **2001**. Evidence for the biosynthesis of briostatins by the bacterial symbiont *Candidatus "Endobugula sertula"* of the bryozoan *Bugula neritina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4531-4537.

Degnan, B. M., Hawkins, C. J., Lavin, M. F., McCaffrey, E. J., Parry, D. L., Ven den Brenk, A. L., Watters, D. J. 1989. New cyclic peptides with cytotoxic activity from the ascidian *Lissoclinum patella*. *J. Med. Chem.* 32, 1349-1354.

Dobretsov, S., Teplitzki, M., Bayer, M., Gunasekera, S., Proksch, P., Paul, V. J. **2011**. Inhibition of marine biofouling by bacterial quorum sensing inhibitors. *Biofouling*, 27:893-905.

- Dorigo, U., Volatier, L., Humbert, J. F. **2005**. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water Res.*, 39:2207-2218.
- Dowd, S. E., Callaway, T. R., Wolcott, R. D., Sun, Y., Mckeehan, T., Hagevoort, R. G., Edrington, T. S. **2008a**. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* 8:125.
- Dowd, S. E., Sun, Y., Secor, P. R., Rhoads, D. D., Wolcott, B. M., James, G. A., Wolcott, R. D. **2008b**. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiol.*, 8:43 doi: 10.1186/1471-2180-8-43.
- Dowd, S. E., Sun, Y., Wolcott, R. D., Domingo, A., Carroll, J. A. **2008c**. Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned Salmonella-infected pigs. *Foodborne Pathog. Dis.*, 5:459-472.
- Dowd, S. E., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeehan, T., Smith, E., Rhoads, D. **2008d**. Polymicrobial nature of chronic diabetic foot ulcer biofilm infections determined using bacterial tag encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *PLoS. ONE.*, 3:e3326.
- Drancourt, M., Raoult, D. **2005**. Sequence-based identification of new bacteria: a proposition for creation of an orphan bacterium repository. *J. Clin. Microbiol.*, 43:4311-4315.
- Duckworth, A. R., Battershill, C. N., Schiel, D. R., Bergquist, P. R. **1999**. Farming sponges for the production of bioactive metabolites. *Mem. Qld. Mus.*, 44:155-159.
- Duque, C., Puyana, M., Narvaez, G., Paz, A., Osorno, O., Hara, N., Fujimoto, Y. **2004**. Pseudopterogorgia P-V. New compounds from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* from Providencia Island, Colombian Caribbean. *Tetrahedron*, 60:10627-10635.
- Duque, C., Puyana, M., Castellanos, L., Arias, A., Correa, H., Osorno, O., Asai, T., Hara, N., Fujimoto, Y. **2006**. Further studies on the constituents of gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andrés and Providencia Islands, Colombian Caribbean: isolation of a putative biosynthetic intermediate leading to erogorgiane. *Tetrahedron*, 62:4205-4213.
- Duque, C. **2010**. *Pseudopterogorgia elisabethae* de San Andrés y Providencia, una pluma de mar con excelente potencial como fuente de productos naturales con aplicación industrial. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 34:89-103.
- Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E.C. **1989**. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic. Acids. Res.*, 17:7843-7853.

- Egan S, Thomas T, Kjelleberg S. **2008**. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Curr. Opin. Microbiol.*, 11:219-225.
- Faulkner, D. J. **2000**. Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 77, 135–145.
- Faulkner, D. J. **2002**. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 19, 1-48 y todas las revisiones anteriores del mismo autor citadas en esta referencia. (1977, 1984, 1986-2001).
- Fenical, W. **1987**. Marine soft corals of the genus *Pseudopterogorgia*: a resource for novel anti-inflammatory diterpenoids. *J. Nat. Prod.* 50, 1001-1008.
- Ferns, T. A., Kerr, R. G. **2005**. Identification of amphilectosins as key intermediates in pseudopterosin biosynthesis. *J. Org. Chem.* 70, 6152-6157.
- Flatt, P., Gautschi, J., Thacker, R., Musafija-Girt, M., Crews, P., Gerwick, W. **2005**. Identification of the cellular site of polychlorinated peptide biosynthesis in the marine sponge *Dysidea* (Lamellodysidea) herbacea and symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongelliae* by CARD-FISH analysis. *Mar. Biol.*, 147:761–774.
- Friedrich, A. B., Merket, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P., Hentschel, U. **1999**. Microbial diversity in marine sponges *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mar Biol.*, 134:461-470.
- Friedrich, A. B., Fischer, I., Proksch, P., Hacker, J., Hentschel, U. **2001**. Temporal variation of microbial diversity of the microbial associated with mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 38:105-113.
- Fusetani, N., Clare, A. S. (eds). **2006**. Antifouling compounds. Springer ed. Berlin, Heidelberg. 225 pp.
- Fusetani, N. **2011**. Antifouling marine natural products. *Nat. Prod. Rep.*, 28:400-441.
- Gaidos, E., Rusch, A., Ilardo, M. **2010**. Ribosomal tag pyrosequencing of DNA and RNA from benthic coral reef microbiota: community spatial structure, rare members and nitrogen-cycling guilds. *Environ. Microbiol.*, 13:1-15.
- Gallagher, K. A., Fenical, W., Jensen, P. R. **2010**. Hybrid isoprenoid secondary metabolite production in terrestrial and marine actinomycetes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 21:794-800.
- Giovannoni, S. J., Bristchgi, T. B., Moyer, C. L., et al. **1990**. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*, 345:60-63.
- Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R. **2007**. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:3272-3282.
- Gontcharova, V., Youn, E., Wolcott, R.D., Hollister, E.B., Gentry, T.J., Dowd, S.E. **2010**. Black Box Chimera Check (B2C2): a Windows-Based Software for Batch Depletion of Chimeras from Bacterial 16S rRNA Gene Datasets. *Open. Microbiol. J.*, 11:47-52.

Gopichand, Y., Schmitz, F. J. **1978**. Marine natural products: Fuscol, a new elemene-type diterpene alcohol from the gorgonian *Eunicea fusca*. *Tetrahedron Lett.*, 19, 3641-3644.

Gross, H., König, G.M. **2006**. Terpenoids from marine organisms: unique structures and their pharmacological potential. *Phytochem. Rev.*, 5: 115–141.

Hadas, E., Shpigel, M., Ilan, M. **2005**. "Sea ranching of the marine sponge *Negombata magnifica* (Demospongiae, *Latrunculiidae*) as a first step for latrunculin B mass production" *Aquaculture*, 244:159-169.

Haefner, B. **2003**. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *DDT.*, 8:536–544.

Hamann, M. T., Scheuer, P. J. **1993**. Kahalalide F: a bioactive depsipeptide from the sacoglossan mollusk *Elysia rufescens* and the green alga *Bryopsis* sp. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 5825–5826.

Harder, T., Lau, S. C. K., Tam, W-Y., Qian, P-Y. **2004**. A bacterial culture-independent method to investigate chemically mediated control of bacterial epibiosis in marine invertebrates by using TRFLP analysis and natural bacterial populations. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 47:93-99.

Harris, J.K., Kelley, S.T., Pace, N.R. **2004**. New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:845–849.

Heckrodt, T. J., Mulzer, J. **2005**. Marine Natural Products from *Pseudopterogorgia elisabethae*: structures, biosynthesis, pharmacology, and total synthesis. In *Natural Products Synthesis II*, 1st ed.; Mulzer, J., Eds.; Springer Berlin Heidelberg: New York, USA, Volume 244, pp. 1–41.

Hellio, C., Bremer, G., Pons, A., Le Gal, Y., Bourgougnon, N. **2000**. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany (France). *J. Appl. Microbiol. Biotech.*, 54:543-549.

Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C., Hacker, J. **2001**. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35:305– 312

Hernández-Zárate, G., Olmos-Soto, J., **2006**. Identification of bacterial diversity in the oyster *Crassostrea gigas* by fluorescent *in situ* hybridization and polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.*, 100:664-672.

Hildebrand, M., Waggoner, L. E., Lim, G. E., Sharp, K. H., Ridley, C. P., Haygood, M. G. **2004**. Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. *Nat. Prod. Rep.*, 21:122–142.

- Hill, R. T., Enticknap, J. J., Peraud, O., Anderson, M. A., Kasanah, N., Rao, K. V., Bowling, J. J., Hamann, M. T. **2007**. Microbial symbionts of marine invertebrates: Implications for drug discovery. Conference Programme and Proceedings. Manapro XII, Auckland, New Zealand.
- Hoarau, C., Day, D., Moya, C., Wu, G., Hackim, A., Jacobs, R.S., Little, R.D. **2008**. iso-PsE.a new pseudopterosin. *Tetrahedron Lett.*, 49:4604–4606.
- Hölstrom, C. Kjelleberg, S., **1994**. The effect of external biological factors on settlement of marine invertebrate larvae and new antifouling technology. *Biofouling* 8:147-160.
- Hongxiang, X., Min, W., Xiaogu, W., Junyi, Y., Chunsheng, W. **2008**. Bacterial diversity in deep-sea sediment from northeastern Pacific Ocean. *Acta Ecológica Sinica*, 28, 479–485.
- Ikeda, Y., Shimada, Y., Honjo, K., Okumoto, T., Munakata, T. **1983**. Safracins, new antitumor antibiotics. III. Biological activity. *J. Antibiot.*, 36:1290-1294.
- Irschik, H., Trowitzsch-Kienast, W., Gerth, K., Höfle, G., Reichenbach, H. **1988**. Saframycin Mx1, a new natural saframycin isolated from a myxobacterium. *J. Antibiot.*, 41:993-998.
- Ito, T., Odake, T., Katoh, H., Yamaguchi, Y., Aoki, M. **2011** High-Throughput profiling of microbial extracts. *J. Nat. Prod.*, 74:983-988.
- Ivanova, E. P., Sawabe, T., Zhukova, N. V., Gorshkova, N. V., Nedashkovskaya, O. I., Hayashi, K., Frolova, G. M., Sergeev, A. F., Pavel, K. F., Mikhailov, V. V., Nicolau D. V. **2003**. Occurrence and Diversity of Mesophilic *Shewanella* Strains Isolated from the North-West Pacific Ocean. *System. Appl. Microbiol.*, 26:293-301.
- Jacobson, P. B., Jacobs, R. S., **1992**. Fuscocide: an anti-inflammatory marine natural product which selectively inhibits 5-lipoxygenase. Part 1: physiological and biochemical studies in murine inflammatory models. *J. Pharm. Exp. Ther.*, 262, 866–873.
- Jensen, P. R., Kauffman, C. A., Fenical, W. **1996**. High recovery of culturable bacteria from the surfaces of marine algae. *Mar. Biol.*, 126:1–7.
- Jensen, P.R. **2010**. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 37:219-224.
- Johansson, S., Göransson, U., Luijendijk, T., Backlund, A., Claeson, P., Bohlin, L. **2002**. A neutrophil multitarget functional bioassay to detect anti-inflammatory natural products. *J. Nat. Prod.*, 65, 32-41.
- Joint, I., Callow, M. E., Callow, J. A., Clarke, K. R. **2000**. Cell to cell communication across to prokaryote-eukaryote boundary. *Science*, 298:1207.
- Kerr, R. G., Lawry, J., Gush, K. A. **1996**. *In vitro* biosynthetic studies of the briostatins, anticancer agents from the marine briozoan *Bugula neritina*. *Tetrahedron Lett.*, 37:8305-8308.

- Kijoa, A., Sawanwong, P. **2004**. Drugs and cosmetics from the sea. *Mar. Drugs.*, 2:72–82.
- Kimura, M. **1980**. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, 16:111-120.
- Kobayashi, J., Ishibashi, M. **1993**. Bioactive metabolites of symbiotic marine microorganism. *Chem. Rev.*, 93:1753-1769.
- Kobayashi, J., Ohizumi, Y., Nakamura, H., Yamakado, T., Matsuzaki, T., Hirata, Y. **1983**. Ca-antagonistic substance from soft coral of the genus *Sarcophyton*. *Experientia*, 39, 67-69.
- Koblížek, M., Bějá, O., Bidigare, R.R., Christensen, S., Benitez-Nelson, B., Vetriani, C., Kolber, M. C., Falkowski, P. G., Kolber, Z. S. **2003**. Isolation and characterization of *Erythrobacter* sp. strains from the upper ocean. *Arch. Microbiol.*, 180:327–338.
- Kohl, A. C., Ata, A., Kerr, R. G. **2003a**. Pseudopterosin biosynthesis-pathway elucidation, enzymology, and a proposed production method for anti-inflammatory metabolites from *Pseudopterogorgia elisabethae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30:495-499.
- Kohl, A.C., Kerr, R. G. **2003b** Pseudopterosin biosynthesis: aromatization of the diterpene cyclase product, elisabethatriene. *Mar. Drugs*, 1:54-65.
- Koopmans, M., Martens, D., Wijffels R. H. **2009**. Towards commercial production of sponge medicines. *Mar. Drugs.*, 7:787-802.
- Kushmaro, A., Rosenberg, E., Fine, M., Ben-Haim, Y., Loya, Y. **1998**. Effect of temperature on bleaching of the coral *Oculina patagonica* by *Vibrio shiloi* AK-1. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 171:131–137.
- Lam, C., Harder, T. **2007**. Marine macroalgae affect abundance and community richness of bacterioplankton in close proximity. *J. Phycol.*, 43:874-881.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H. **2007**. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- Lesser, M. P., Bythell, J. C., Gates, R. D., Johnstone, R. W., Hoegh-Guldberg, O. **2007**. Are infectious diseases really killing corals? Alternative interpretation of the experimental and ecological data. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 346:36-44.
- Li J, Chase H. W. **2010**. Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Nat. Prod. Rep.*, 27:1493–1510.
- Li, Z-Y., He, L-M., Wu, J., Jiang, Q. **2006**. Bacterial community diversity associated with four marine sponges from the South China Sea based on 16S rDNA-DGGE fingerprinting. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 329:75-85.

- Long, P. F., Dunlap, W. C., Batershill, C. N., Jaspar, M. **2005**. Shotgun cloning and heterologous expression of the patellamide gene cluster as a strategy for achieving sustained metabolite production. *Chem. Bio. Chem.*, 6:1760-1765.
- Look, S. A., Fenical, W., Jacobs, R. S., Clardy, J. **1986a**. The pseudopterosins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopteroorgia elisabethae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 6238-6240.
- Look, S. A., Fenical, W., Matsumoto, G. K., Clardy, J. **1986b**. The pseudopterosins: a new class of anti-inflammatory and analgesic diterpene pentosides from the marine sea whip *Pseudopteroorgia elisabethae* (Octocorallia). *J. Org. Chem.* 51, 5140-5145.
- Look, S. A., Fenical, W. **1987**. The seco-pseudopterosins, new anti-inflammatory diterpene-glycosides from a Caribbean gorgonian octocoral of the genus *Pseudopteroorgia*. *Tetrahedron* 43:3363-3370.
- Mans, D., Da Rocha, A., Schwartzmann, G. **2000**. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anticancer compounds. *Oncologist.*, 5:185-198.
- Marrero, J., Rodriguez, I. I., Rodriguez, A. D. **2010**. The natural products chemistry of the gorgonian genus *Pseudopteroorgia* (Octocorallia:Gorgoniidae). In *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, 1st ed.; Mander, L., Liu, H.-W., Eds.; Elsevier: Oxford, UK, Volume 2, pp. 363–428.
- Mayer, A. M. S., Jacobson, P. B., Fenical, W., Jacobs, R. S., Glaser, K. B. **1998**. Pharmacological characterization of the Pseudopterosins: Novel antiinflammatory natural products isolated from the Caribbean soft coral, *Pseudopteroorgia elisabethae*. *Life Sciences*, 62:PL401-407.
- Mayer, A. M. S., Glaser, K. B., Cuevas, C., Jacobs, R. S., Kem, W., Little, R. D., McIntosh, J. M., Newman, D. J., Potts, B., Shuster, D. E. **2010**. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol. Sci.*, 31:255–265.
- Ministerio de Salud. **1993**. Resolución 8430. Normas para la Investigación biomédica con animales.
- Mora-Cristancho, J., Arévalo-Ferro, C., Ramos, F. A., Tello, E., And Duque, C., Lhullier, C., Falkenberg, M., Schenkel, E. P. **2011**. Antifouling activities against colonizer marine bacteria of extracts from marine invertebrates collected in the Colombian Caribbean sea and in the Brazilian coast (Santa Catarina). *Z. Naturforsch.*, 66:515–526.
- Morton, L. H. G., Greenway, D.L.A., Gaylarde, C.C., Surman, S.B. **1998**. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 41:247–259.
- Mosmann, T., **1983**. Rapid Colorimetric Assay for cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assay. *J. Immunol. Met.*, 65:55-63.

- Moss, C., Green, D. H., Perez, B., Valasco, A., Henriquez, R., McKenzie, J. D. **2003**. Intracellular bacteria associated with ascidian *Ecteinascidia turbinata*: phylogenetic and *in situ* hybridization analysis. *Mar. Biol.*, 143:99-110.
- Mouchka, M. E., Hewson, I., Harvell, C. D. **2010**. Coral-Associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Integr. Comp. Biol.*, 50:662-674.
- Murakami, Y., Oshima, Y., Yasumoto, T. **1982**. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bull Jp Soc Sci Fish* 48:69-72.
- Mydlarz, L. D., Jacobs, R. S., Boehnlein, J., Kerr, R. **2003**. Pseudopterosin Biosynthesis in *Symbiodinium* sp., the dinoflagellate symbiont of *Pseudopterogorgia elisabethae*, *Chem. Biol.*, 10:1051-1056.
- Mydlarz, L. D., McGinty, E. S., Harvell, C. D. **2010**. What are the physiological and immunological responses of coral to climate warming and disease?. *J Exp Biol.*, 213:934-945.
- National Committee For Clinical Laboratory Standards. **2004**. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Fourteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-514. CCLS, Wayne, PA.
- Newberger, N. C., Ranzer, L. K., Boehnlein, J. M., Kerr, R. G. **2006**. Induction of terpene biosynthesis in dinoflagellate symbionts of Caribbean gorgonians. *Phytochem.*, 67:2133-2139.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., Snader, K. M. **2003**. Natural products as source of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.*, 66:1022-1037.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. **2004**. Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *J. Nat. Prod.*, 67:1216-1238.
- Newman D. J., Cragg, G. M. **2007**. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.*, 70:461-477.
- Newman D. J., Cragg G. M. **2010**. Natural products in medicinal chemistry. *Bio. Med. Chem.*, 17:2120.
- Newman, D. J., Hill, R. T. **2006**. New drugs from marine microbes: the tide is turning. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33:539-544.
- O'Toole, G. A., Kaplan, H. B., Kolter, R. **2000**. Biofilm formation as microbial development. *Ann. Rev. Microbiol.*, 54:49-79.
- Oclarit, J. M., Okada, H., Ohta, S., Kaminura, K., Yamaoka, Y., Iizuka, T., Miyashiro, S., Ikegami, S., **1994**. Anti-*Bacillus* substance in the marine sponge, *Hyatella* species, by an associated *Vibrio* species bacterium. *Microbios.*, 78:7-16.

- Olguin-Urbe, G., Abou-Mansour, E., Boulander, A., Debard, H., Francisco, C., Combaut, G. **1997**. 6-bromoindole-3-carbaldehyde, from an *Actinobacter* sp. bacterium associated with the ascidian *Stomozoa murray*. *J. Chem. Ecol.*, 23, 25-07-2521.
- Olson, J. B., Kellogg, C. A. **2010**. Microbial ecology of corals, sponges and algae in mesophotic coral environments. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 73:17-30.
- Omae, I. **2003**. General aspects of tin-free antifouling paints. *Chem. Rev.*, 103:3431-3458.
- Osinga, R., Tramper, J., Wijffels, R.H. **1999**. Cultivation of marine sponges. *Mar. Biotechnol.*, 1:509-532.
- Pace, N. R. **1997**. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276:734-740.
- Page, M. J., Handley, S. J., Northcote, P. T., Cairney, D., Willan, R. C. **2010**. Successes and pitfalls of the aquaculture of the sponge *Mycale hentscheli*. *Aquaculture*, 312:52-61.
- Paul, V. J., Arthur, K. E., Ritson-Williams, R., Ross, C., Sharp, K. **2007**. Chemical defenses: from compounds to communities. *Biol. Bull.*, 213:226-251.
- Penesyán, A., Kjelleberg, S., Egan, S. **2010**. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Mar. Drugs*, 8:438-459.
- Peng, J., Shen X., El Sayed, K. A., Dunbar, C., Perry, T. L., Wilkins, S. P., Hamann, M. T., Babzin, S., Huesing J., Camp, R., Prinsen, M., Krupa, D., Wideman, M. A. **2003**. Marine natural products as prototype agrochemical agents. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2246-2252.
- Perez-Matos, A.E., Rosado, W., Govind, N.S. **2007**. Bacterial diversity associated with the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92:155-164.
- Pettit, G. T. **1991**. The briostatins. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.*, 57:153-195.
- Pettit, G. T., Herald, C. L., Doubek, D. L., Herald, C. L. **1982**. Isolation and structure of briostatina 1. *J. Am. Chem. Soc.*, 104:6846-6848.
- Pharmamar. **2011**. <http://www.pharmamar.com>. Último acceso noviembre de 2011.
- Piel, J., Hui, D., Wen, G., Butzke, D., Platzer, M., Fusetani, N., Matsungaga, S. **2004**. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 101:16222-16227.
- Piel, J. **2004**. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.*, 21:519-538.
- Piel, J. **2006**. Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. *Curr. Med. Chem.*, 13:39-50.

- Pomponi, S. A. **1999**. The bioprocess-technological potential of the sea. *J. Biotechnol.*, 70: 5-13.
- Potts, B. C.; Faulkner, D. J. 1992. Phospholipase A₂ inhibitors from marine organisms. *J. Nat. Prod.*, 55, 1707-1717.
- Proksch, P., Edrade, R. A., Ebel, R. **2002**. Drugs from the seas. Current status and microbiological implication. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59:125-134.
- Proksch, P., Edrade, R. A., Ebel, R. **2003**. Drugs from the sea. Opportunities and obstacles. *Mar. Drugs*, 1:5-17.
- Puyana, M., Narvaez, G., Paz, A, Osorno, O., Duque, C. **2004**. Pseudopectosin content variability of the purple sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* at the Islands of San Andrés and Providencia (SW Caribbean). *J. Chem. Ecol.*, 30:1183–1201.
- Qian, P-Y., Xu, Y., Fusetani, N. **2010**. Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. *Biofouling*, 26:223-234.
- Rappe, M. S., Giovannoni, S. J. **2003**. The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.*, 57:369–394.
- Rath, C. M., Janto, B., Earl, J., Ahmed, A., Hu, F.Z., Hiller, L., Dahlgren, M., Kreft, R., Yu, F., Wolff, J. J., Kweon, H. K., Christiansen, M. A., Håkansson, K., Williams, R. M., Ehrlich, G. D., Sherman, D. H. **2011**. Meta-omic characterization of the marine invertebrate microbial consortium that produces the chemotherapeutic natural product ET-743. *ACS. Chem. Biol.*, Sep 20.
- Reshef, L., Koren, O., Loya, Y., Zilber-Rosenberg, I., Rosenberg, E. **2006**. The coral probiotic hypothesis. *Environ. Microbiol.*, 8:2068–2073.
- Ridley, C. P., Bergquist, P. R., Harper, M. K., Faulkner, D. J., Hooper, J. N. A., Haygood, M. G. **2005**. Speciation and biosynthetic variation in four dictyoceratid sponges and their cyanobacterial symbiont, *Oscillatoria spongelliae*. *Chem. Biol.*, 12:397–406.
- Rinehart, K. L., Holt, T. G., Fregeau, N. L., Stroh, J. G., Keifer, P. A., Sun, F., Li, L. H., Martin, D. G. **1990**. Ectinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ectinascidia turbinata*. *J. Org. Chem.*, 55:4512-4515.
- Rivas, R., Velázquez, E., Zurdo-Piñeiro, J. L., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. **2004**. Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *J. Microbiol. Methods.*, 56:413–426.
- Roche Diagnostics. 2002. *Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual* R. D. GMBH, 3rd ed. Roche Diagnostics
- Rodriguez, J. **2003**. Mirando nuestro entorno. Productos naturales de origen marino. *Anales de la real sociedad española de química*, 2:5-13.

- Rodríguez, I. I., Shi, Y-P., García, O. J., Rodríguez, A. D., Mayer, A. M. S., Sánchez, J A., Ortega, E., And González, J. **2004**. New pseudopterosin and seco-pseudopterosin diterpene glycosides from two colombian isolates of *Pseudopteroorgia elisabethae* and their diverse biological activities. *J. Nat. Prod.*, 67:1672-1680.
- Roussis, V., Wu, Z., Fenical, W., Strobel, S. A., Van Duyne, D., Clardy, J. **1990**. New anti-inflammatory pseudopterosins from the marine octocoral *Pseudopteroorgia elisabethae*. *J. Org. Chem.*, 55:4916-4922.
- Rowan, R., Powers, D. A. **1992**. Ribosomal RNA sequences and the diversity of symbiotic dinoflagellates (zooxanthellae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89:3639-3643.
- Saitou, N., Nei, M. **1987**. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing 37 phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4:406-425.
- Santiago-Vazquez, L. Z., Brück, T. B., Brück, W. M., Duque-Alarcon, A. P., McCarthy, P. J., Kerr, R.G. **2007**. The Diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate hexacoral *Cirrihipathes lutkeni*. *ISME J.*, 1:654-659.
- Schmidt, E. W., Obraztsova, A. Y., Davidson, S. K., Faulkner, D. J., Haygood, M. G. **2000**. Identification of the antifungal peptidecontaining symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, "Candidatus *Entotheonella palauensis*". *Mar. Biol.*, 136:969-977.
- Schmidt, E. W., Neslon, J. T., Rasko, D. A., Sudek, S., Eisen, J. A., Haygood, M. G., Ravel J. **2005**. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 102:7315-7320.
- Schmitz, F. J. Vanderah, D. J., Hollenbeak, K. H., Enwall, C. E. L., Gopichand, Y., Sengupta, P. K., Hossain, M. B., Vanderhelm, D. **1988**. Metabolites from marine sponge *Tedania ignis*. A new antisanediol and several known diketopiperazines. *J. Org. Chem.*, 54:3941-3945.
- Shigemori, H., Bae, M. A., Yazawa, K., Sasaki, T., Kobayashi, J. **1992**. Alteramide A, a new tetracyclic alkaloid from a bacterium *Alteromonas* sp. associated with the marine sponge *Halichondria okadai*. *J. Org. Chem.*, 57:4317-20.
- Shin, J., Fenical, W. **1991**. Fuscoides A-D: anti-inflammatory diterpenoid glycosides of new structural classes from the caribbean gorgonian *Eunicea fusca*. *J. Org. Chem.*, 56:3153-3158.
- Shu, Y-Z. **1998**. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. *J. Nat. Prod.* 61:1053-1071.
- Sings, H. L., Rinerhart, K. L. **1996**. Compounds produced from potential tunicate-blue-green-algal symbiosis: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 17:385-396.

Smith, C. J., Danilowicz, B. S., Meijer, W. G. **2007**. Characterization of the bacterial community associated with the surface and mucus layer of whitening (Merlangius merlangus) *FEMS Microbiol. Ecol.*, 62:90-97.

Stackebrandt, E., Goebel, B. M. **1994**. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44:846-849.

Stierle, A. C., Cardellina, J. H., Singleton, F. L. **1988**. A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia*, 44:1021.

Sudek, S., Lopanik, N. B., Waggoner, L. E., Hildebrand, M., Anderson, C., Liu, H., Patel, A., Sherman, D. H., Haygood, M. G. **2007**. Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "*Candidatus Endobugula sertula*", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J. Nat. Prod.*, 70:67-74.

Sunagawa, S., DeSantis, T. Z., Piceno, Y. M., Brodie, E. L., DeSalvo, M. K., Voolstra, C. R., Weil, E., Andersen, G. L., Medina, M. **2009**. Bacterial diversity and White Plague Disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *ISME J.*, 3:512-521.

Sunagawa, S., Woodley, C. M., Medina, M. **2010**. Threatened corals provide underexplored microbial habitats. *PLoS. One.*, 5; e9554.

Bunyajetpong, S. **2011**. Identification of a pseudopterogin-producing bacterium from the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* and discovery of inhibitors of tunicate larval settlement PhD Thesis. Faculty of Veterinary Medicine. Department of Biomedical Sciences. University of Prince Edward Island, Charlottetown, PEI, Canada..

Tachibana, K., Scheuer, P. J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Van Engen, D., Clardy, J. **1981**. Okadaic acid: A cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.*, 103:2469-2471.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. **2007**. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics 16 Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24:1596-1599.

Tello, E., Castellanos, H., Arevalo, C., Duque, C. **2009**. Cembranoid diterpenes from the Caribbean sea whip *Eunicea knighti*. *J. Nat. Prod.*, 72:1595-1602.

Thornton, R. S. And Kerr, R. **2002**. Induction of pseudopterogins biosynthesis in the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. *J. Chem. Ecol.*, 28:2083-2090.

Toyo'oka T. **2008**. Determination methods for biologically active compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry: application to the analyses of pharmaceuticals, foods, plants, environments, metabonomics, and metabolomics. *J. Chromatogr. Sci.*, 46:233-247.

- Uthicke, S., McGuire, K. **2007**. Bacterial communities in Great Barrier Reef calcareous sediments: Contrasting 16S rDNA libraries from nearshore and outer shelf reefs. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 72:188-200.
- Vasková, Z., Stachová, P., Krupková, L., Hudecová, D., Valigura, D. **2009**. Bis(nitrobenzoato)copper(II) complexes with nicotinamide, preparation, structure and properties. *Acta Chim. Slov.*, 2:77–87.
- Wang, Q, Garrity, G. M., Tiedje, J. M., Cole, J. R. **2007**. Naïve Bayesian *Classifier* for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:5261-5267.
- Ward, D. M., Weller, R., Bateson, M. M. **1990**. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 345:63–65.
- Webster, N., Bourne, D. **2007**. Bacterial community structure associated with the Antarctic soft coral, *Alcyonium antarcticum*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59:81–94.
- Webster, N. S., Taylor, M. W., Behnam, F., Lückner, S., Rattei, T., Whalan, S., Horn, M., Wagner, M. **2010**. Deep sequencing reveals exceptional diversity and modes of transmission for bacterial sponge symbionts. *Environ. Microbiol.*, 12:2070-2082
- Woolf, H. B. **1981**. Editor. *Webster's New Collegiate Dictionary*, G&C Merriam Co., Springfield, MA
- Yakimova, M. M., Cappelloa, S., Crisafia, E., Tursib, A., Savinic, A., Corsellic, C., Scarfid, S., Giulianoa, L. **2006**. Phylogenetic survey of metabolically active microbial communities associated with the deep-sea coral *Lophelia pertusa* from the Apulian plateau, *Central Mediterranean Sea Deep-Sea Res. Part I*, 53:62–75.
- Yao, S., Wu, T., Li, X., Tu, B., Song, H. **2010**. Ten years of research into phytomedicines analysis—an era in new technologies and methods. *Curr. Pharm. Anal.*, 6:269-288.
- Yebra D. M., Kiil, S., Dam-Johansen, K. **2004**. Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coat*, 50:75-104.
- Zea, S., De Weerd W. H. **1999**. *Haliclona* (*Haliclona*) *epiphytica* sp., (Porifera, Demospongiae, Haplosclerida), a seaweed-dwelling sponge from the Colombian Caribbean” *Beaufortia.*, 49:171-176.
- Zorro, P. **2011**. Caracterizaciones de las comunidades bacterianas de los octocorales *Eunicea* sp., y *Pseudopterogorgia elisabethae*. Tesis de Maestría Ciencias-Bioquímica. Facultad de Ciencias. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Zwirgmaier, K., Wolfgang, L., Schleifer, K-H. **2003**. Improved fluorescence *in situ* hybridization of individual microbial cells using polynucleotide probes: the network hypothesis. *Syst. Appl. Microbiol.*, 26:227-237.

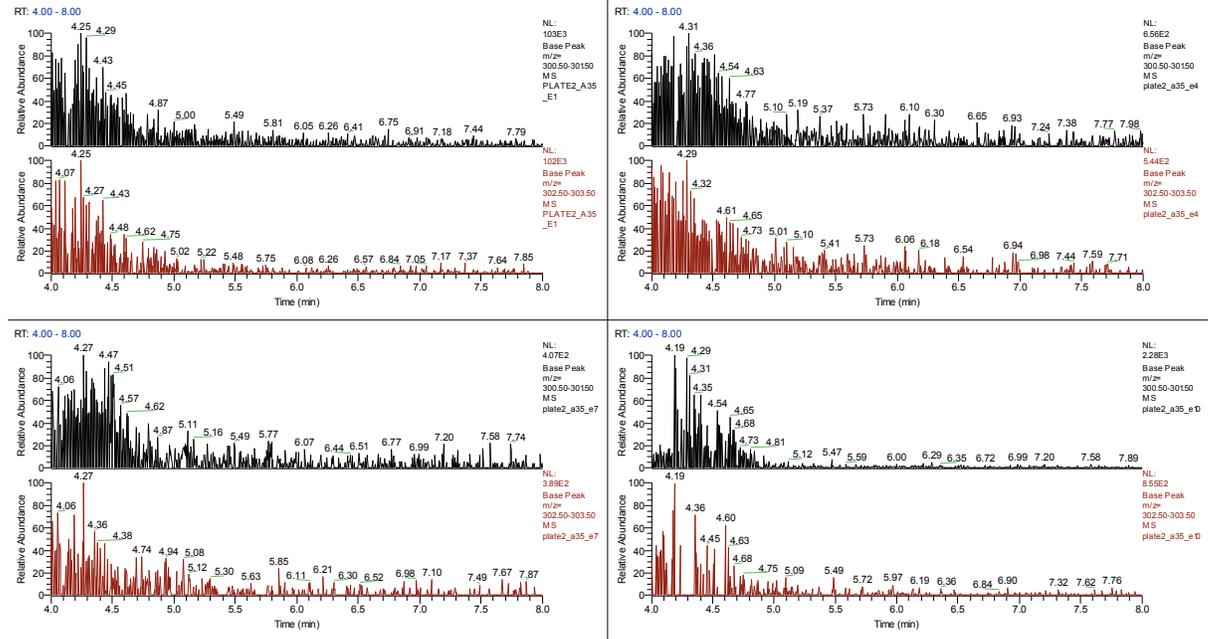
ANEXO 1

RIC m/z 301 Y RIC m/z 303 de los extractos de cultivo de las Actinobacteria

RKHC-35 *Corynebacterium afermentas* Medios: **B, TSB** (arriba), **TAK, MMB** (abajo)

c:\xcalibur...070710\plate2_a35_e10

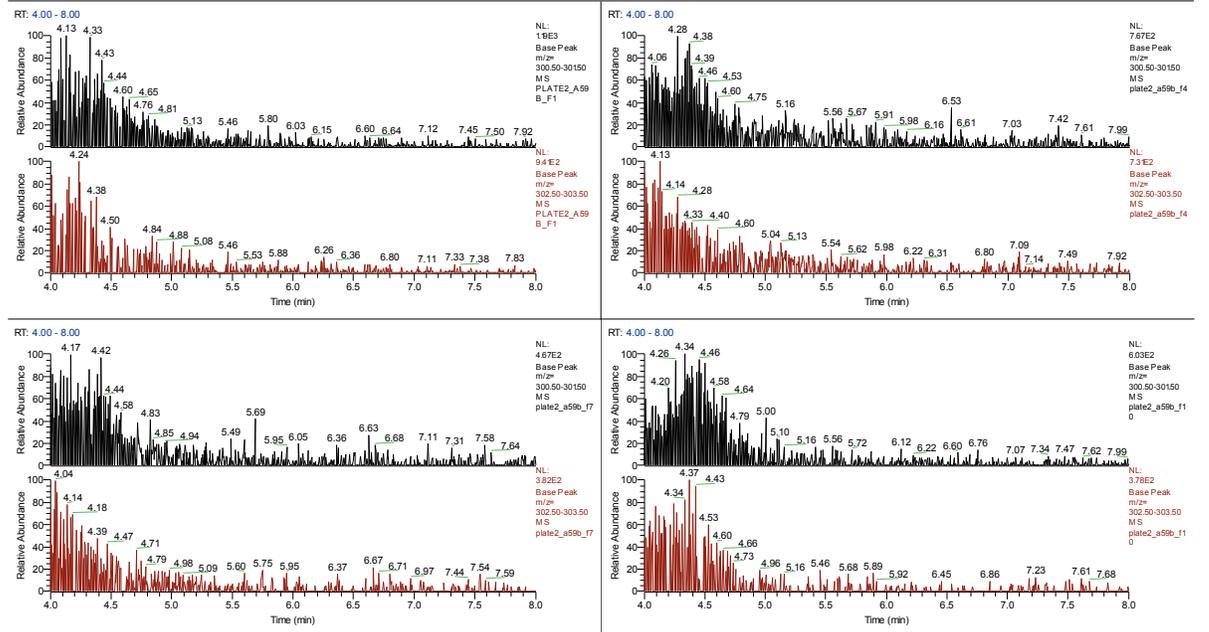
08/07/2010 2:11:27 AM



RKHC-59B *Dietzia schimae* Medios: **B, TSB** (arriba), **TAK, MMB** (abajo)

c:\xcalibur...070710\plate2_a59b_f10

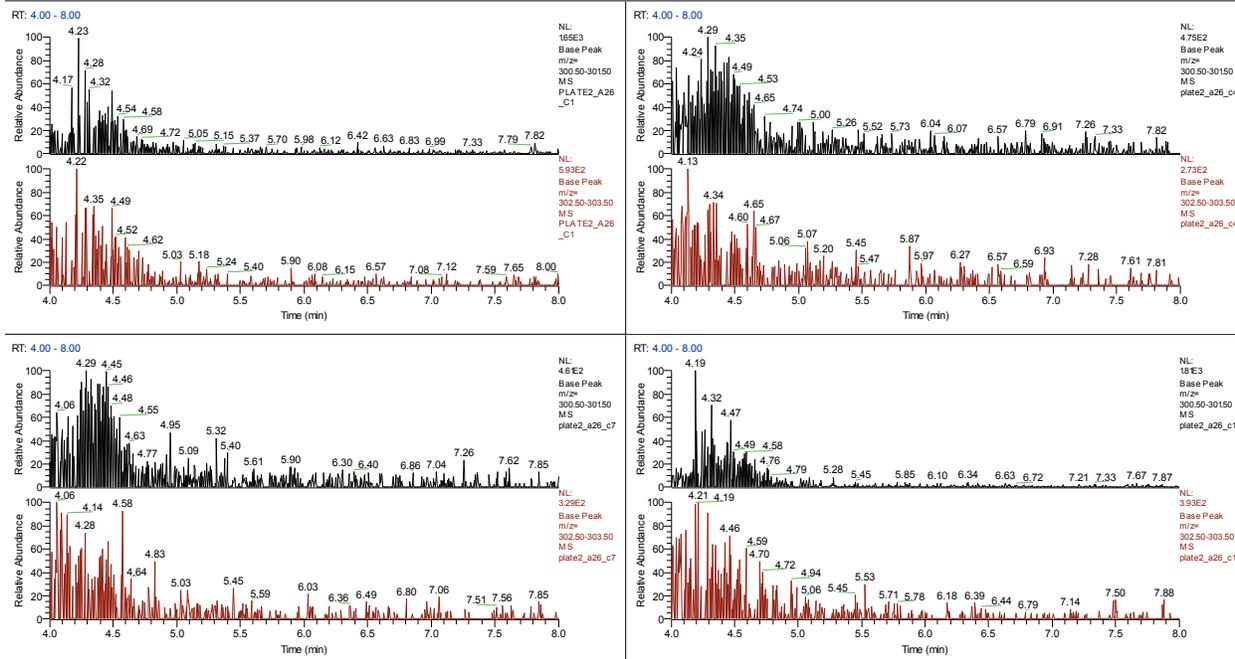
08/07/2010 4:22:10 AM



RKHC-26 *Rhodococcus baikonurensis* Medios: B, TSB (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...070710\plate2_a26_c10

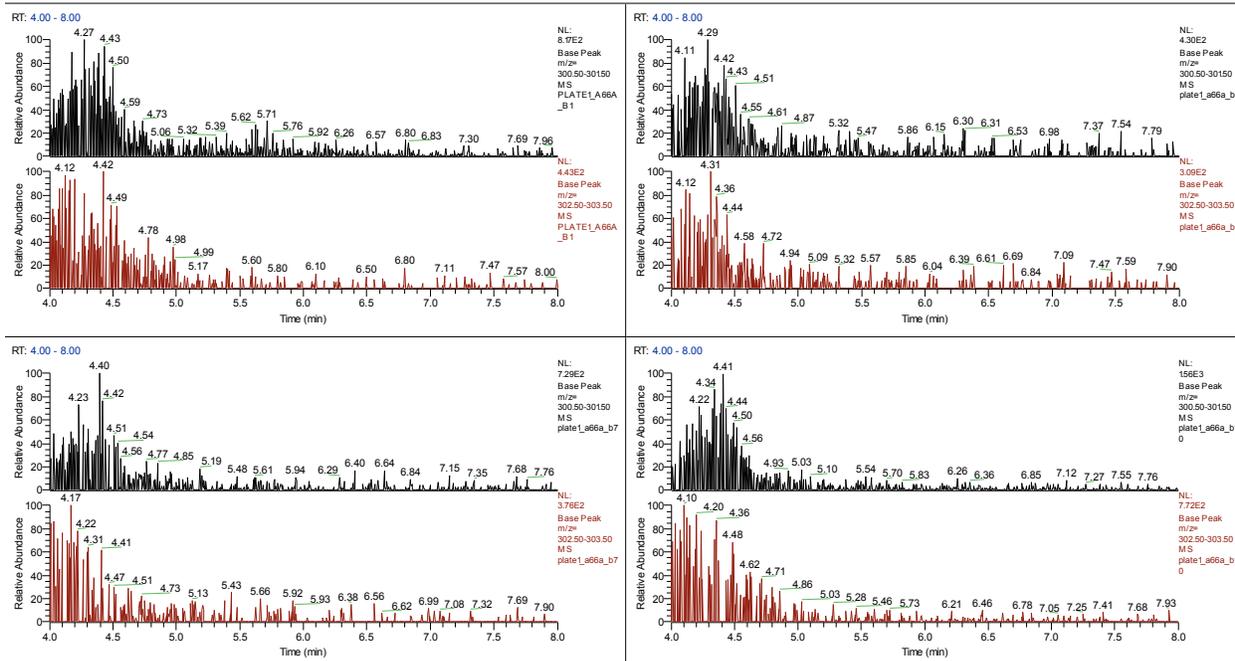
07/07/2010 9:50:12 PM



RKHC-66A *Brevibacterium casei* Medios: B, TSB (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...060710\plate1_a66a_b10

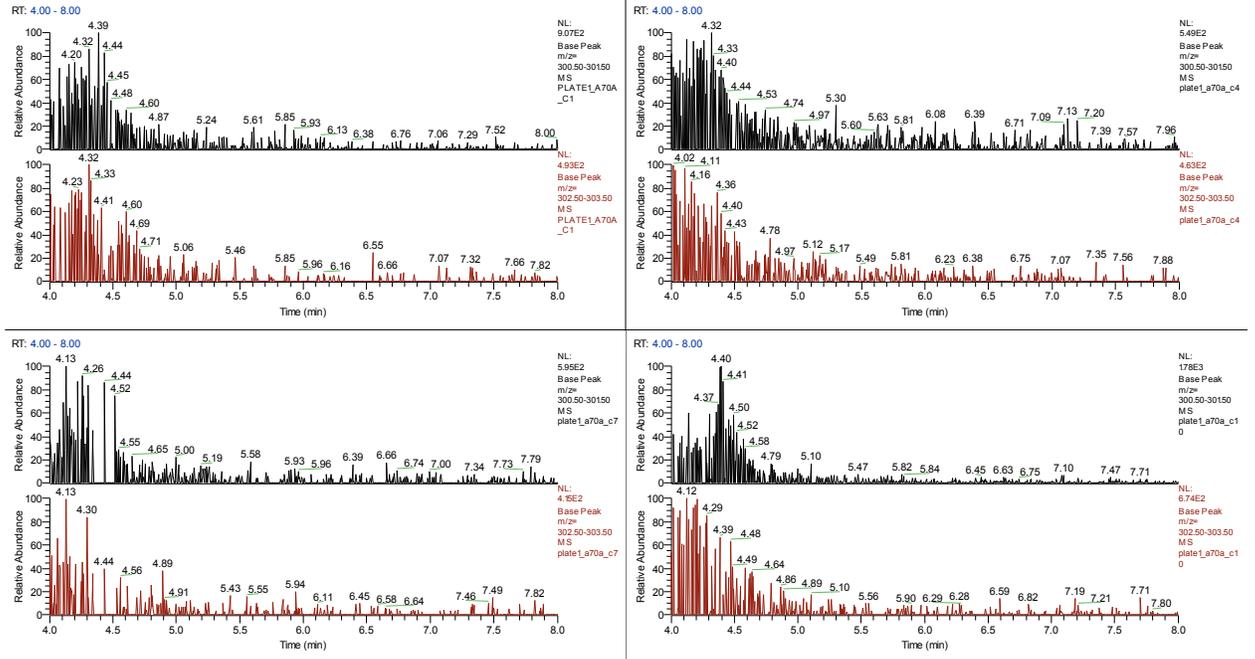
06/07/2010 7:22:15 PM



RKHC-70A *Brevibacterium casei* Medios: B, TSB (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...060710\plate1_a70a_c10

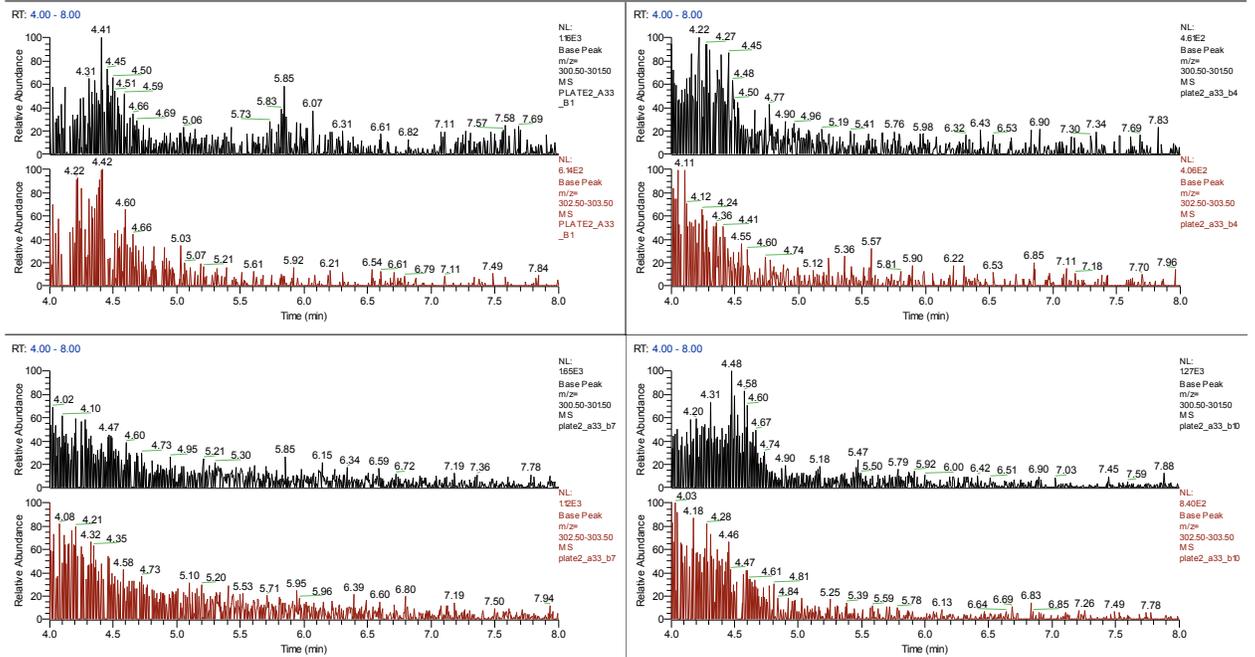
06/07/2010 9:33:02 PM



RKHC-33 *Brachybacterium conglomeratum* Medios: B, TSB (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...070710\plate2_a33_b10

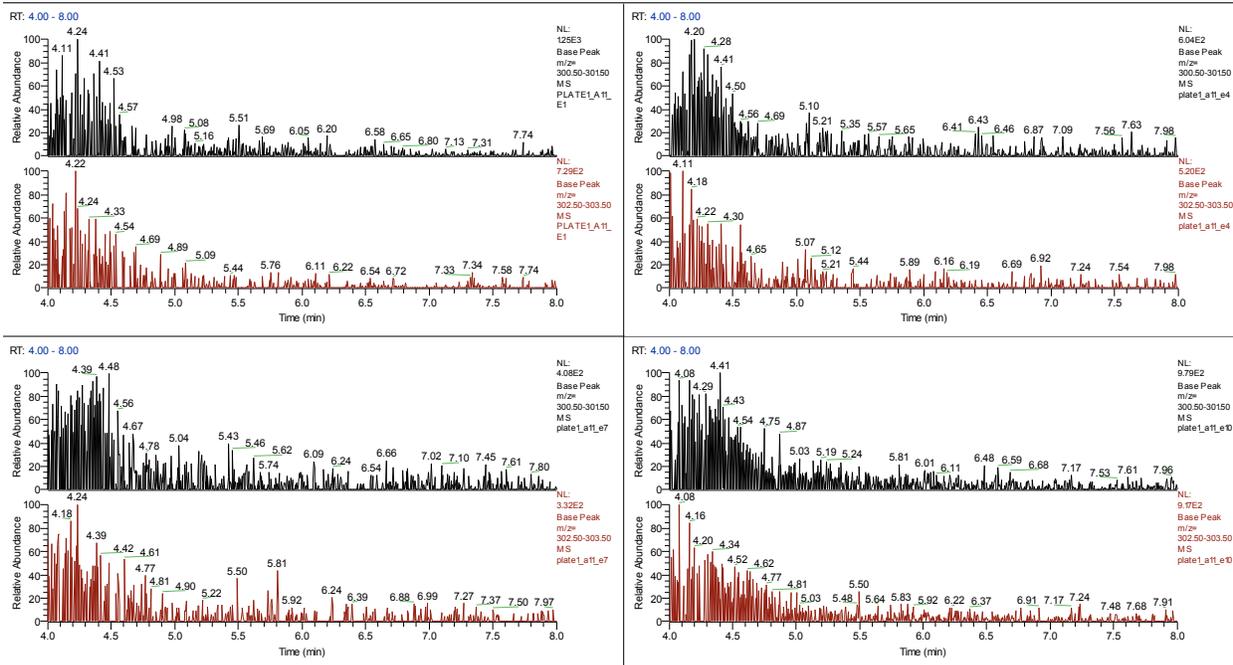
07/07/2010 7:39:28 PM



RKHC-11 *Microbacterium phyllosphaerae* Medios: B, TSB (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...060710\plate1_a11_e10

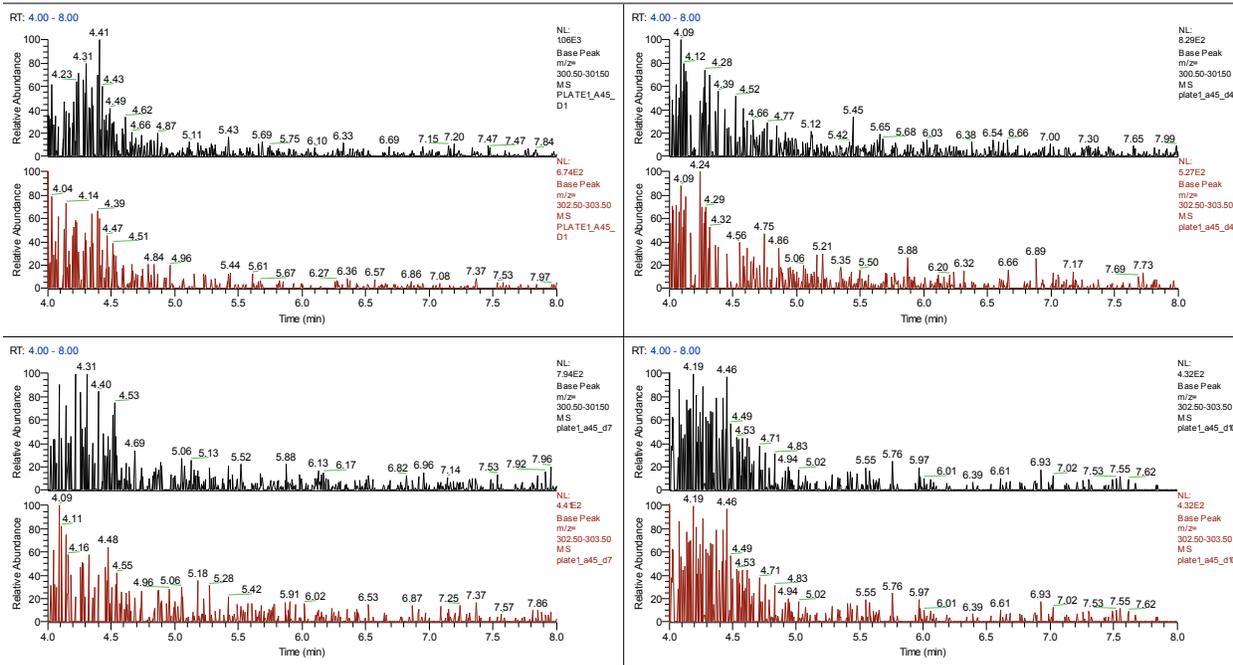
07/07/2010 1:54:19 AM



RKHC-45 *Microbacterium luteolum* Medios: B, TSB (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...060710\plate1_a45_d10

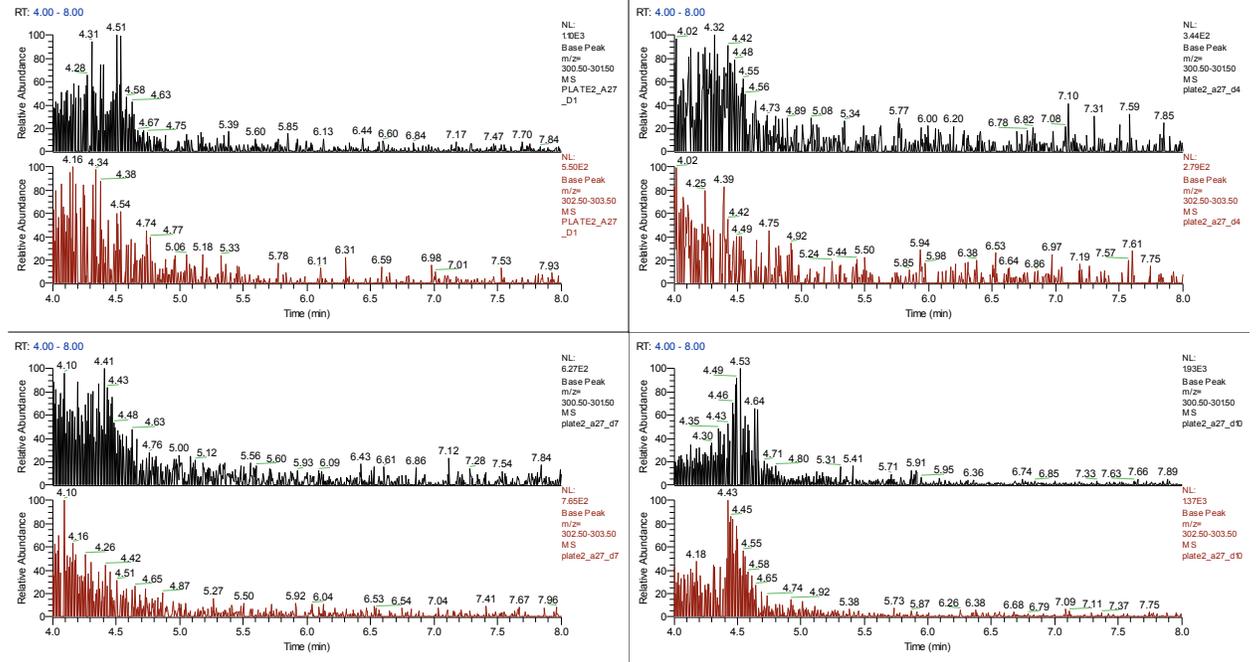
06/07/2010 11:43:38 PM



RKHC-27 *Athrobacter koreensis* Medios: B, TSB (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...070710\plate2_a27_d10

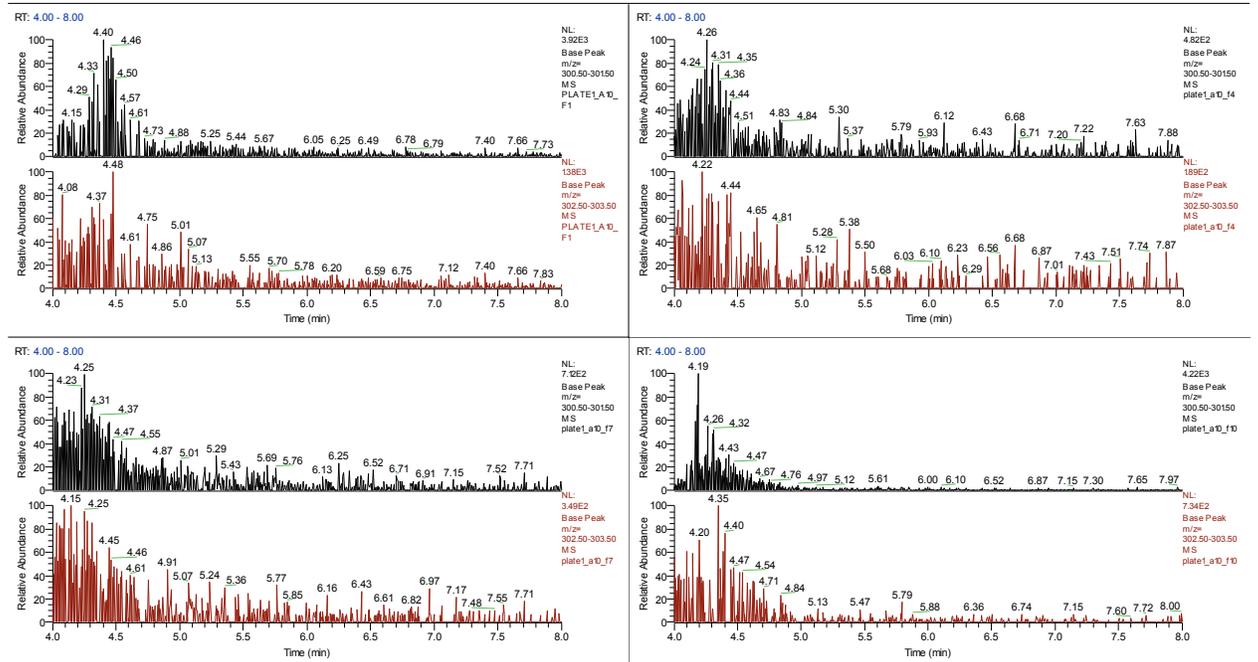
08/07/2010 12:00:54 AM



RKHC-10 *Kocuria palustris* Medios: B, TSB (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...060710\plate1_a10_f10

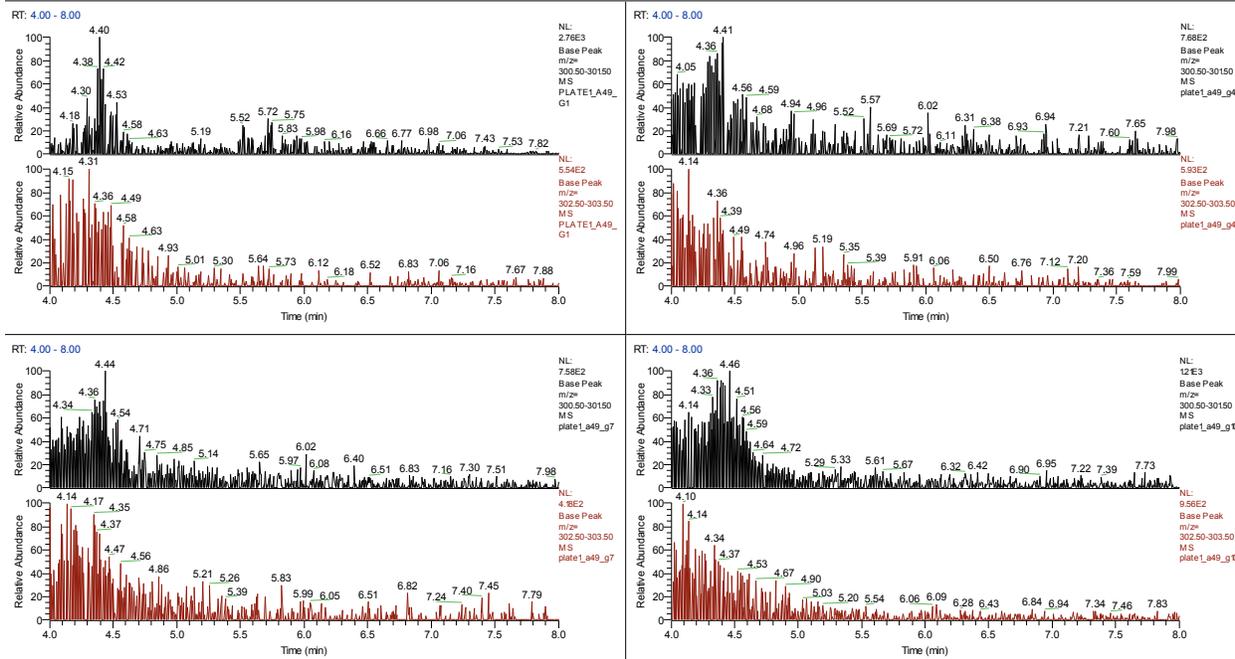
07/07/2010 4:04:55 AM



RKHC-49 *Kocuria kristinae* Medios: B, TSB (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...060710\plate1_a49_g10

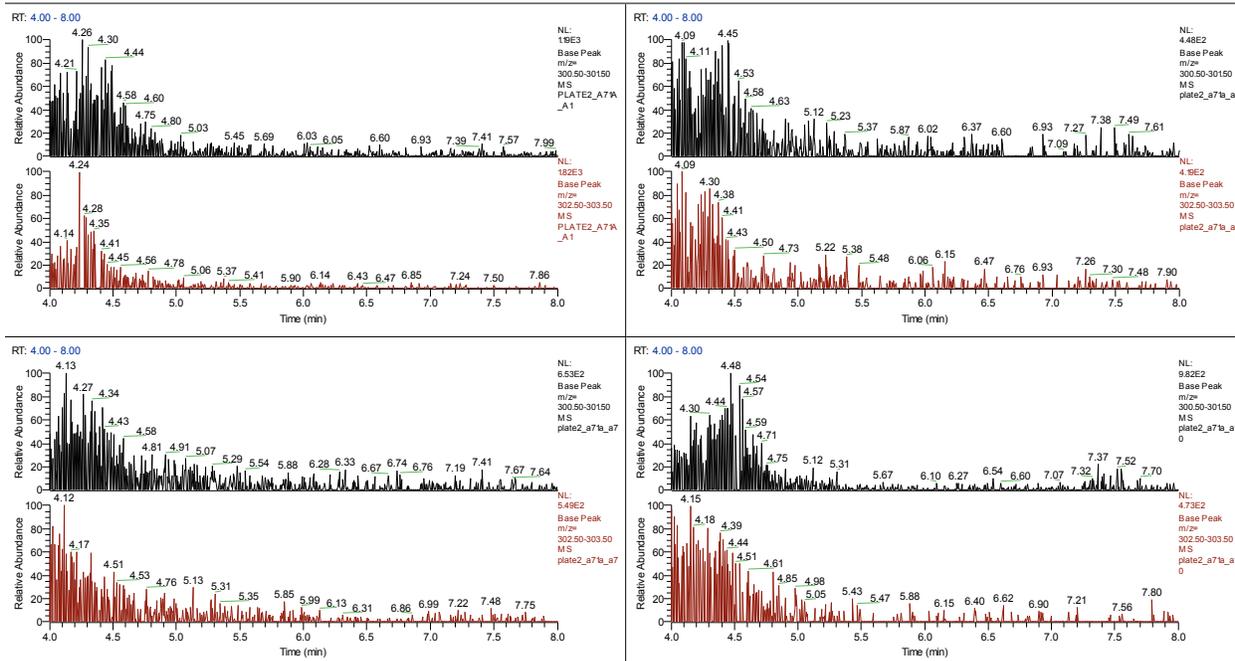
07/07/2010 6:15:35 AM



RKHC-71A *Micrococcus luteus* Medios: B, TSB (arriba), TAK, MMB (abajo)

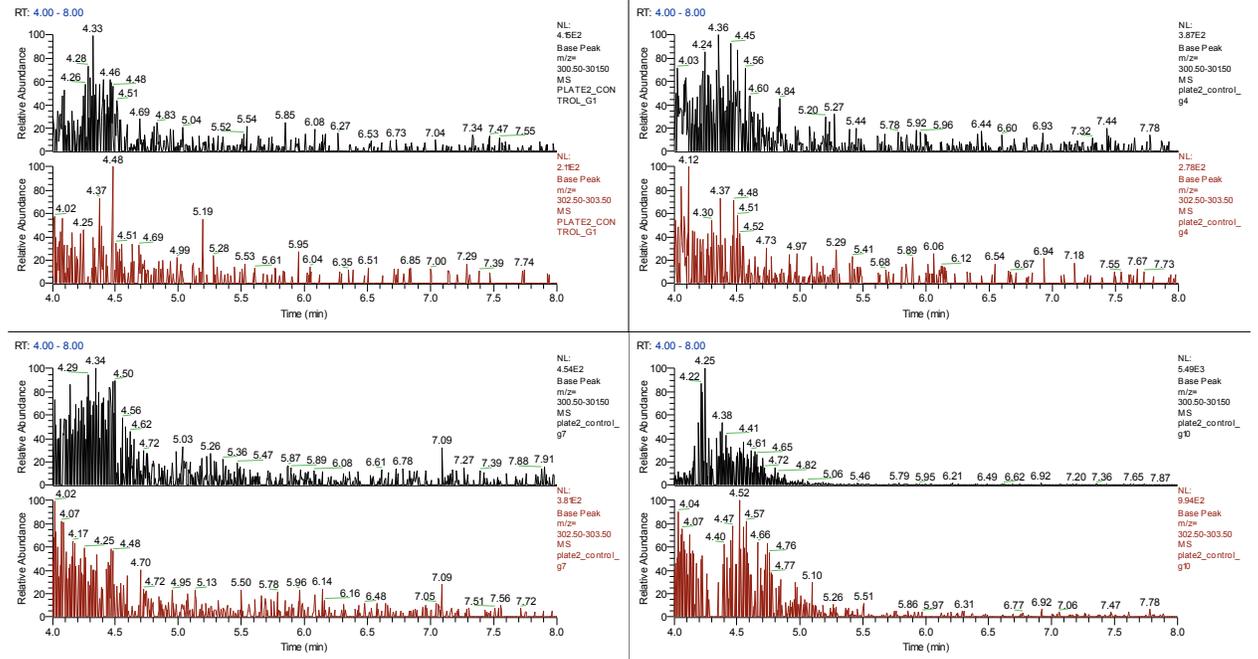
c:\xcalibur\...070710\plate2_a71a_a10

07/07/2010 5:28:39 PM



CONTROL MEDIOS: B, TSB (arriba), TAK, MMB (abajo)

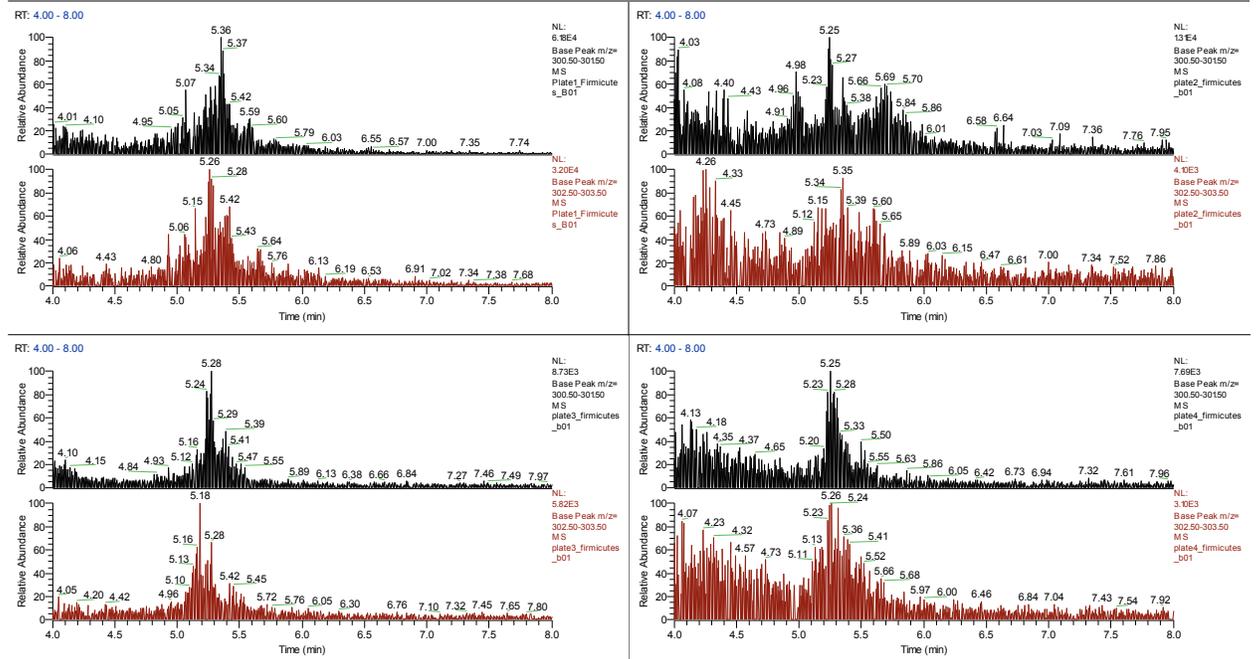
c:\xcalibur...\plate2_control_g10 08/07/2010 6:32:44 AM



RIC m/z 301 Y RIC m/z 303 de los extractos de cultivo de las Firmicutes

RKHC-68A Bacillus horneckiae Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

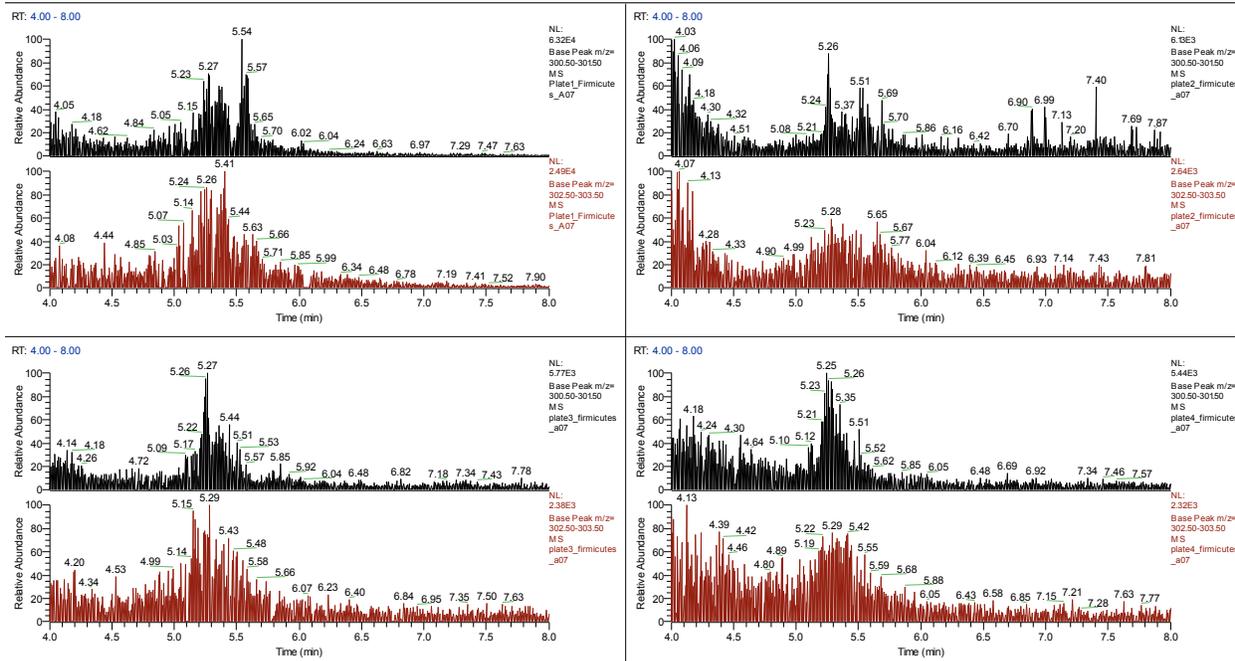
c:\xcalibur...\plate4_firmicutes_b01 02/11/2009 7:51:29 PM



RKHC-13 *Bacillus firmus* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate4_firmicutes_a07

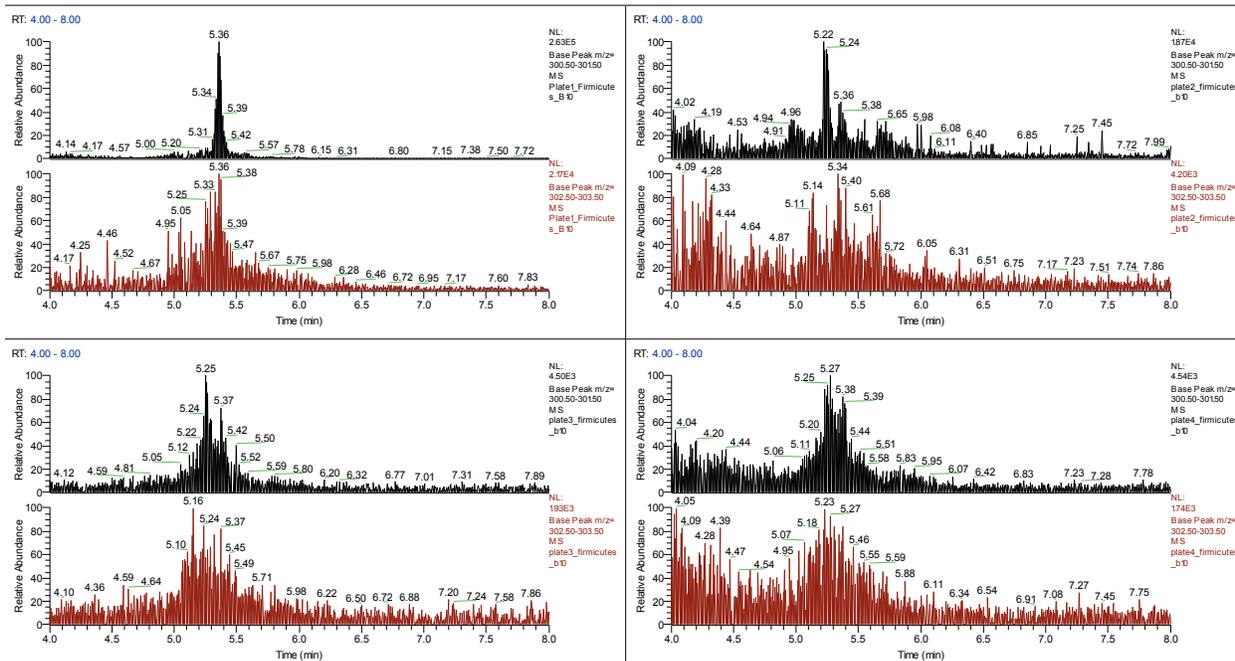
02/11/2009 6:45:16 PM



RKHC-21 *Bacillus licheniformis* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

C:\xcalibur\...Plate1_Firmicutes_B10

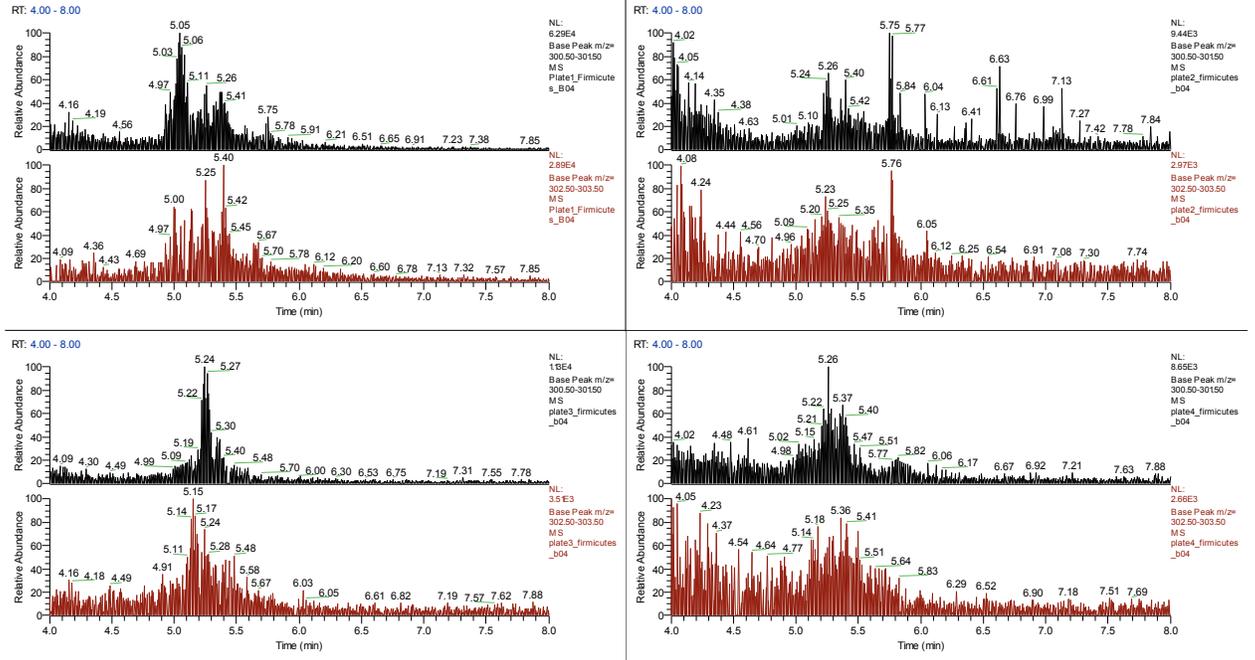
29/10/2009 5:55:45 PM



RKHC-37 *Bacillus mojavensis* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate4_firmicutes_b04

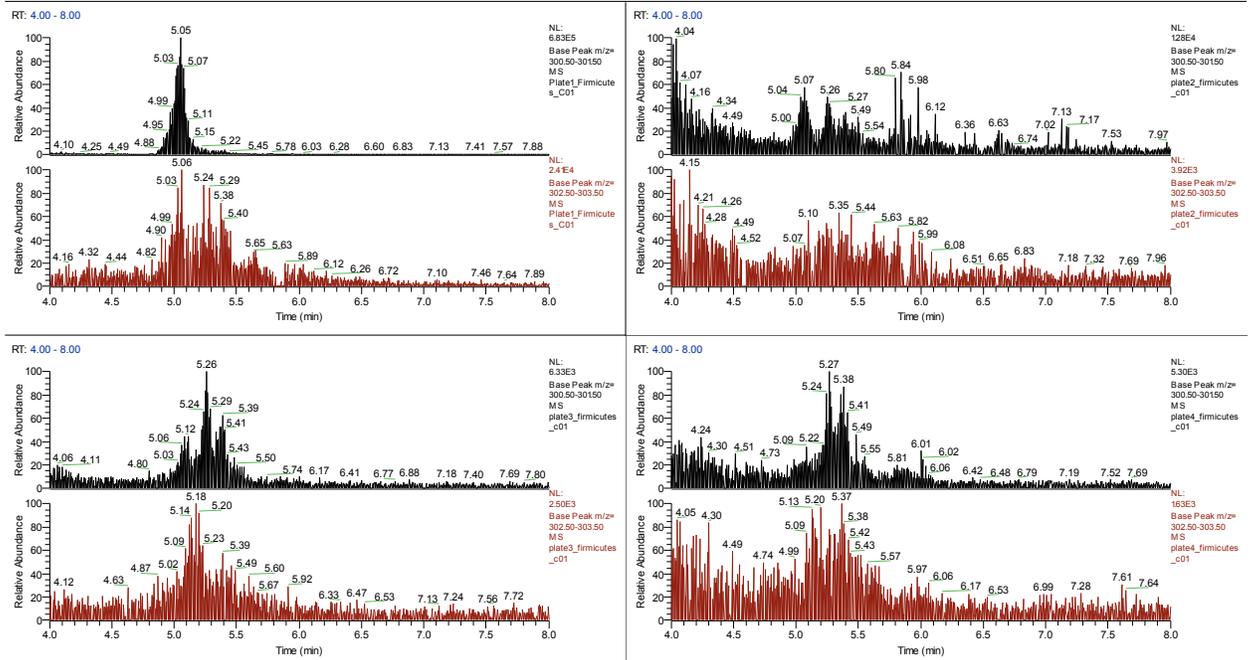
02/11/2009 8:24:38 PM



RKHC-57A *Bacillus pumillus* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate4_firmicutes_c01

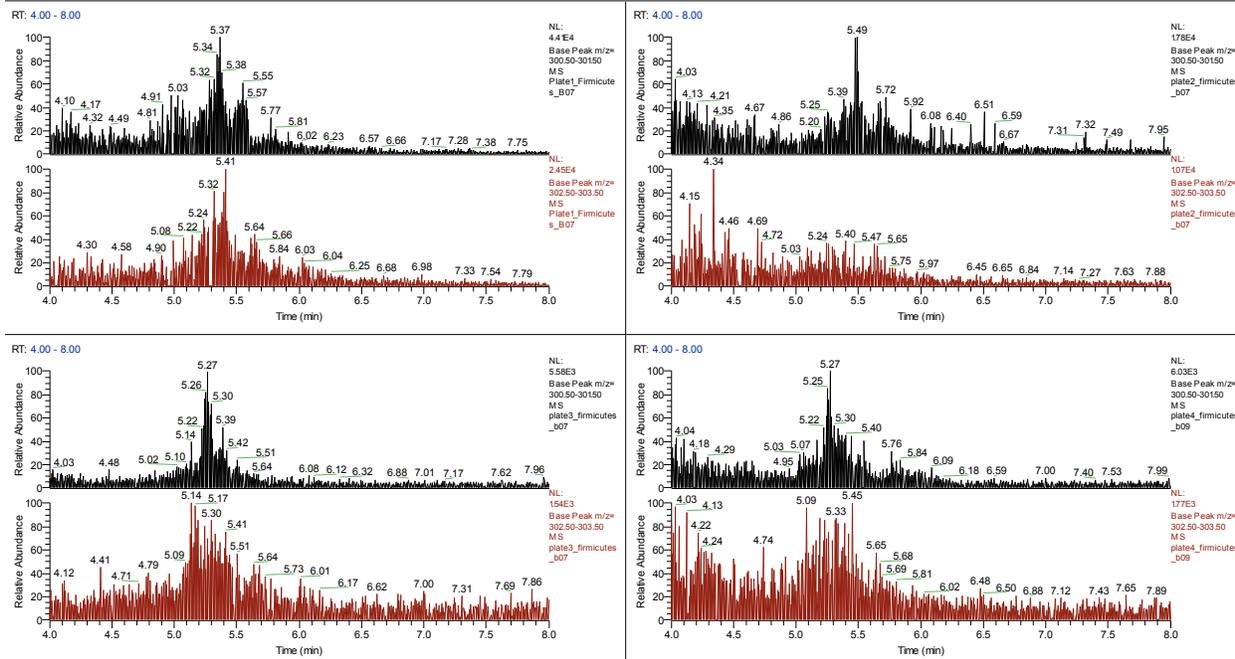
02/11/2009 10:04:02 PM



RKHC-69A *Bacillus anthracis* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate2_firmicutes_b07

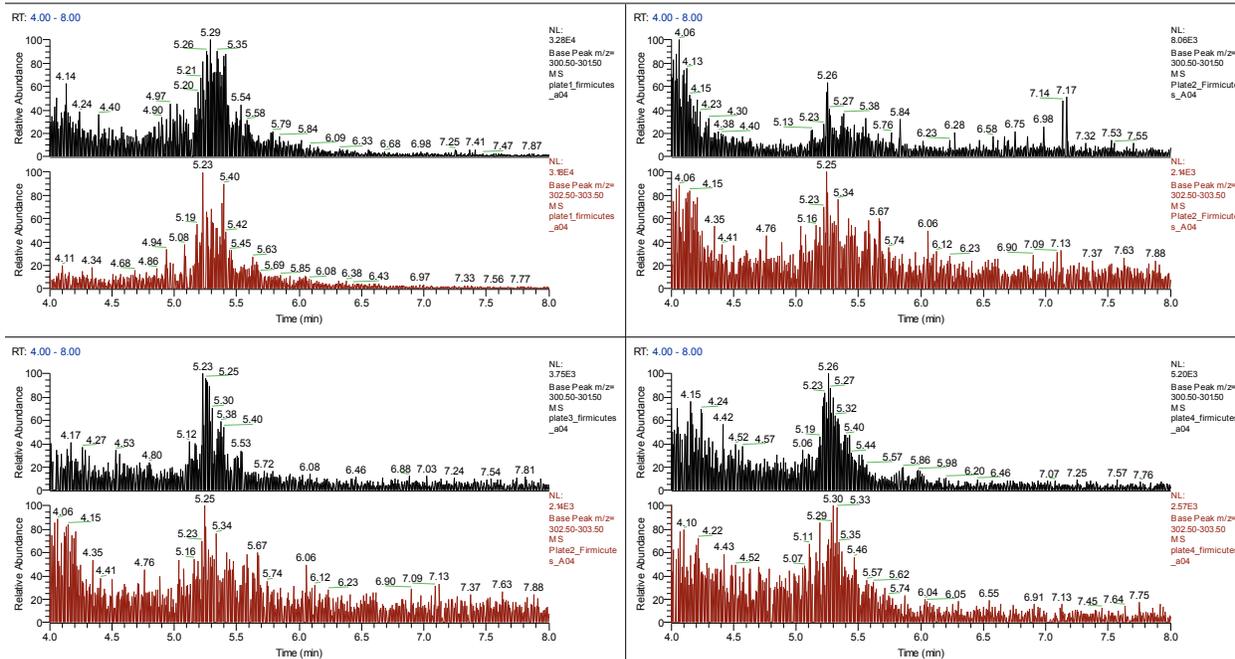
30/10/2009 5:23:51 PM



RKHC-9 *Bacillus cereus* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate1_firmicutes_a04

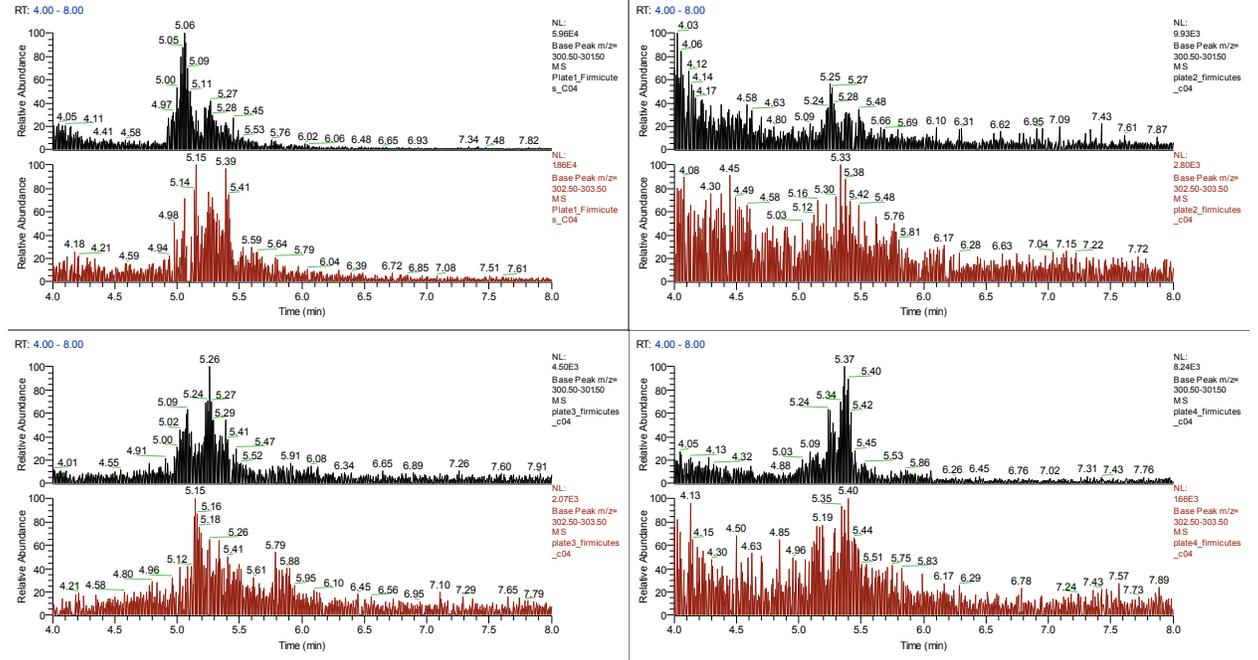
29/10/2009 2:36:53 PM



RKHC-62B *Oceanobacillus profundis* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate3_firmicutes_c04

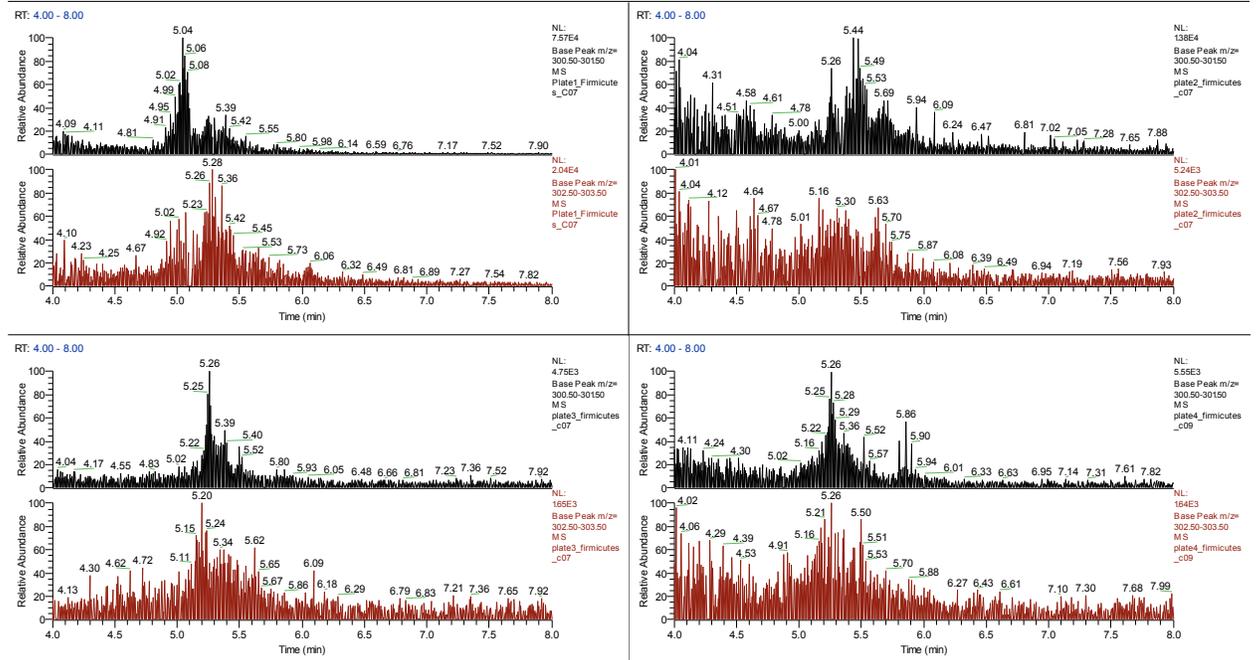
01/11/2009 11:56:52 PM



RKHC-82A *Oceanobacillus iheyensis* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate4_firmicutes_c09

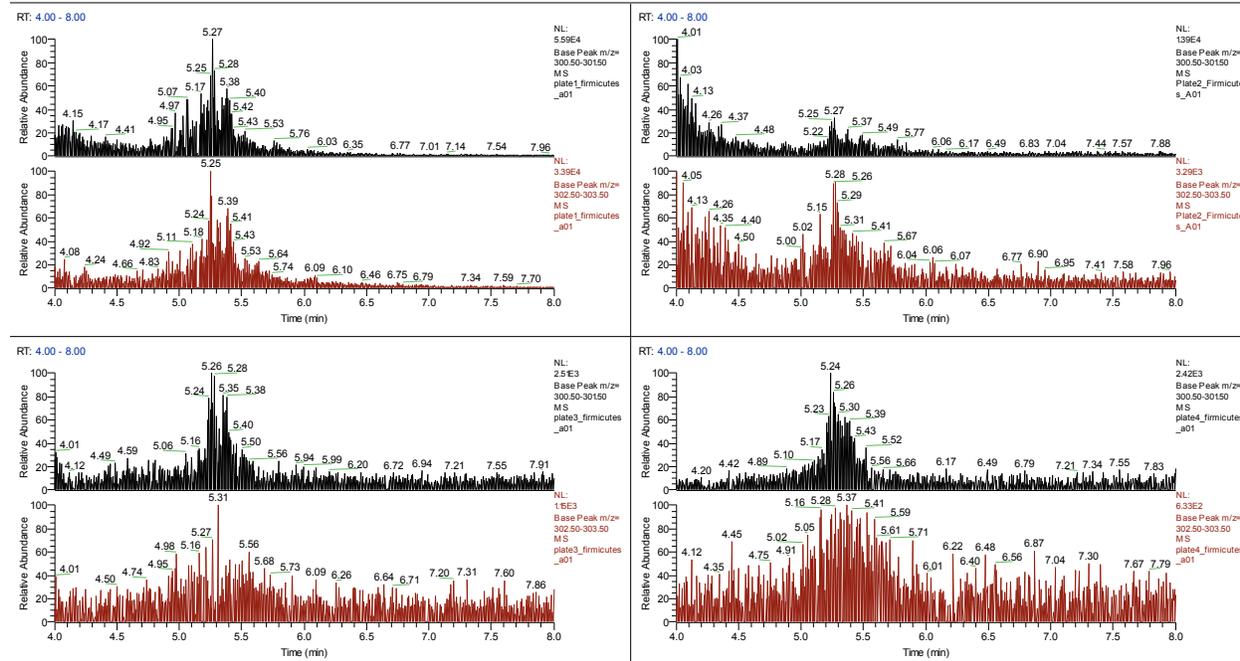
02/11/2009 11:32:27 PM



RKHC-8 *Paenibacillus glucanolyticus* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate4_firmicutes_a01

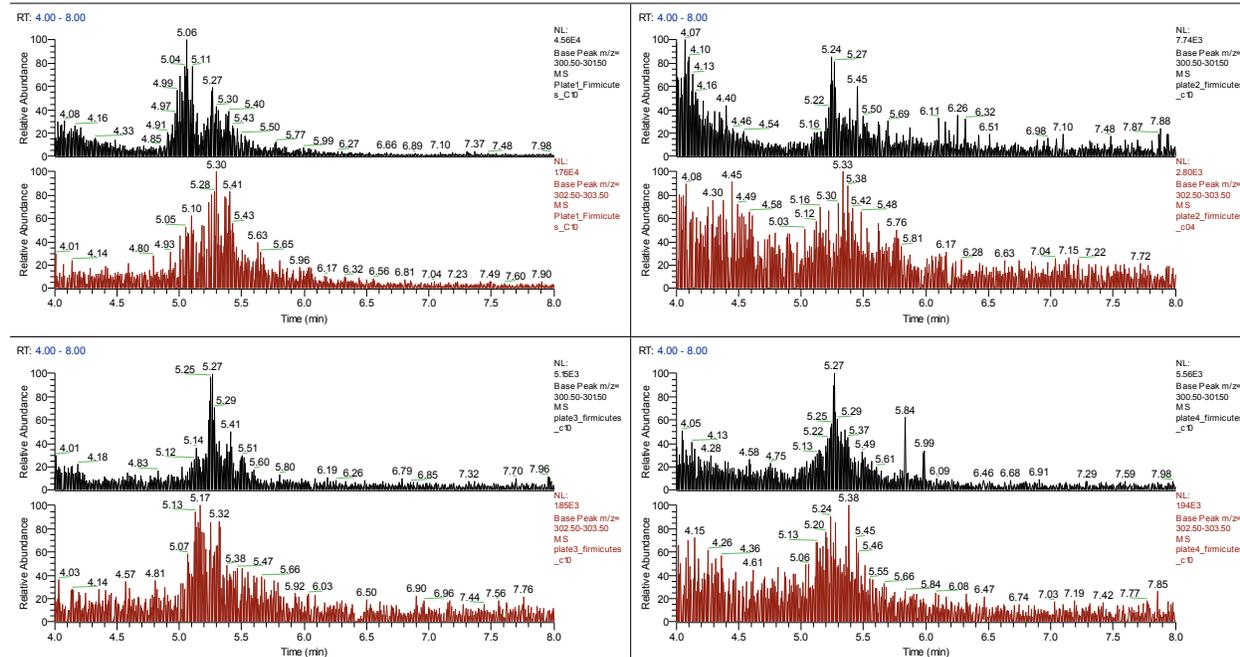
02/11/2009 5:38:59 PM



RKHC-78A *Staphylococcus epidermidis* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate4_firmicutes_c10

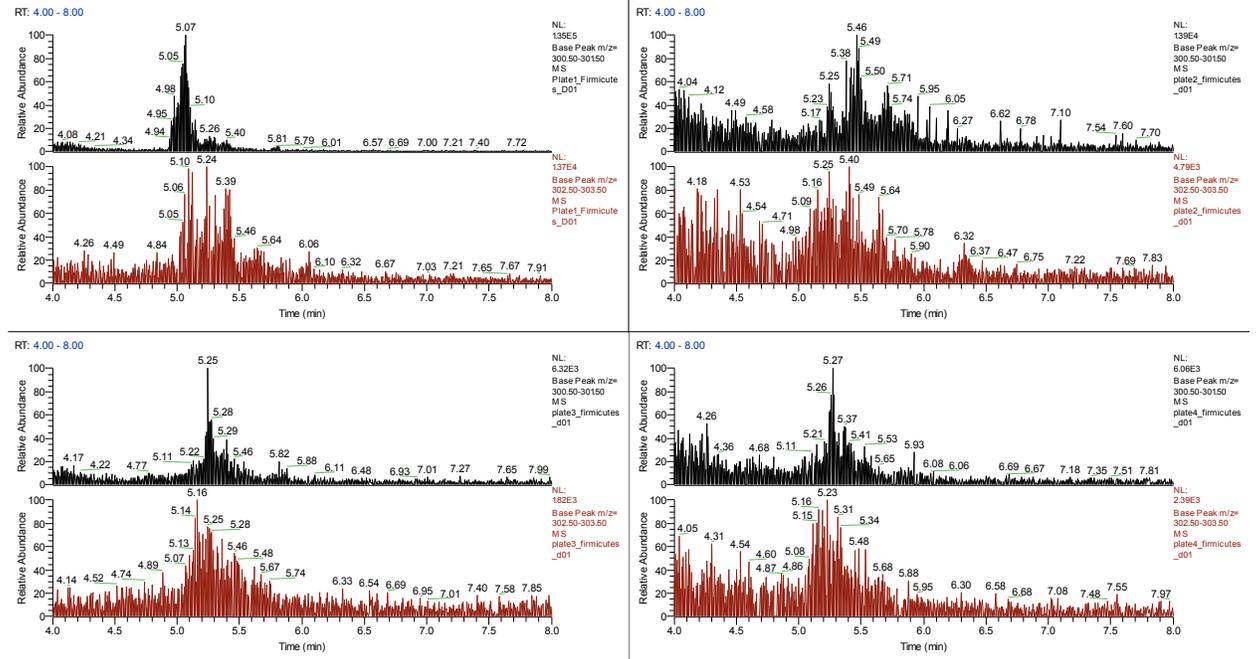
02/11/2009 11:43:31 PM



RKHC-78B *Staphylococcus warneri* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate4_firmicutes_d01

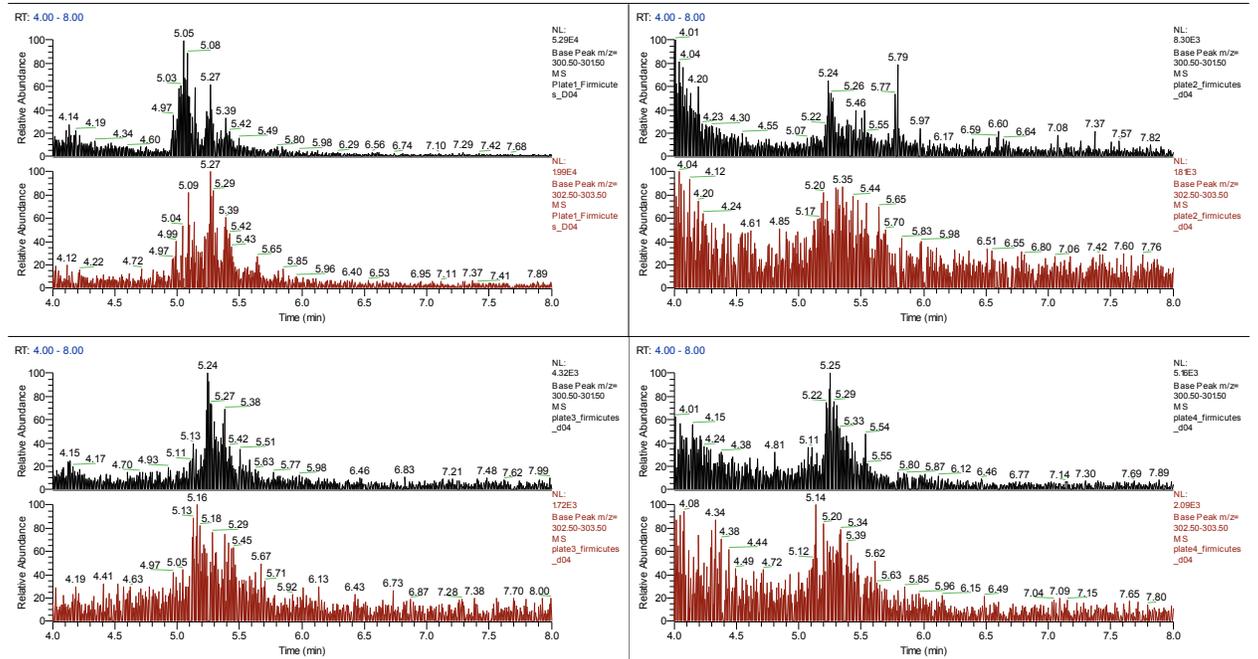
03/11/2009 12:16:36 AM



RKHC-54 *Staphylococcus equorum* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate3_firmicutes_d04

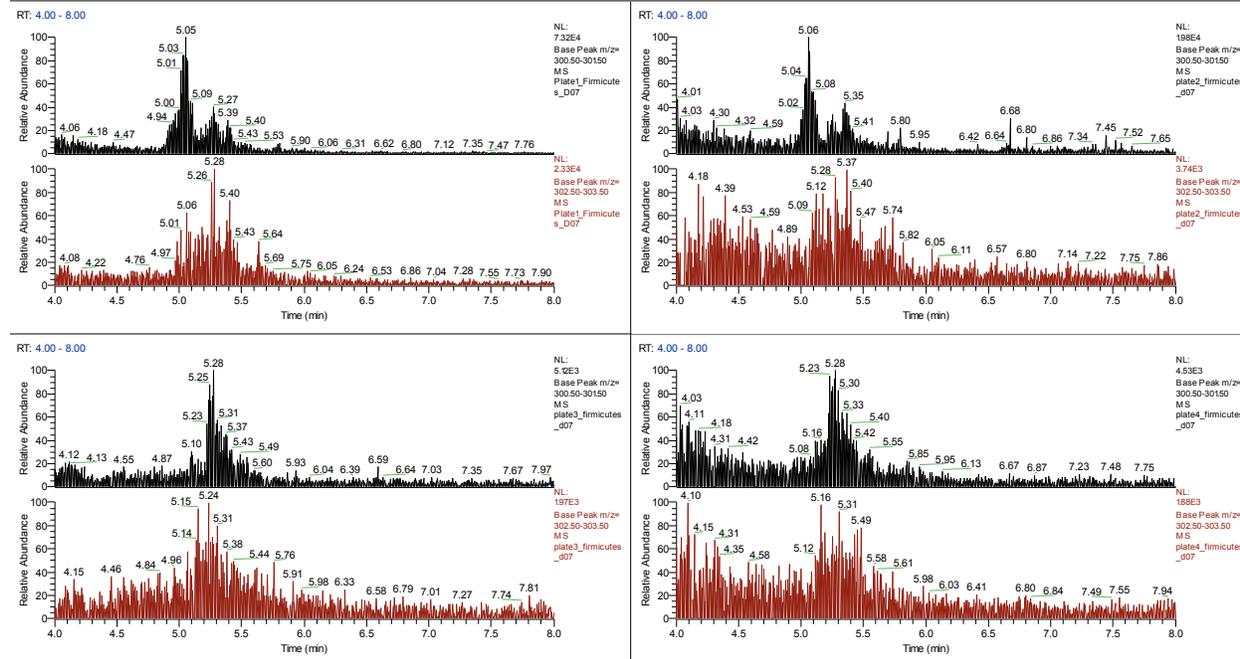
02/11/2009 2:09:20 AM



RKHC-48 *Staphylococcus auricularis* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...plate4_firmicutes_d07

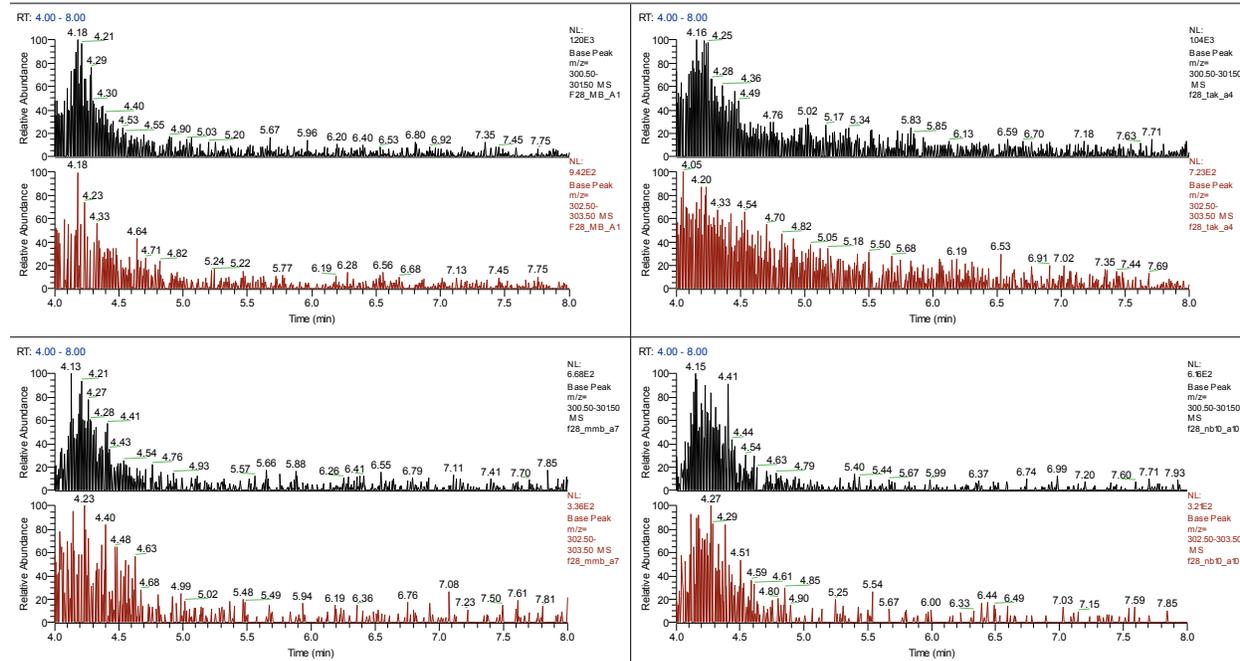
03/11/2009 1:23:04 AM



RKHC-28 *Jeotgalicoccus aerulatos* Medios: MB, TAK (arriba), MMB, NB/10 (abajo)

c:\xcalibur\...030710f28_nb10_a10

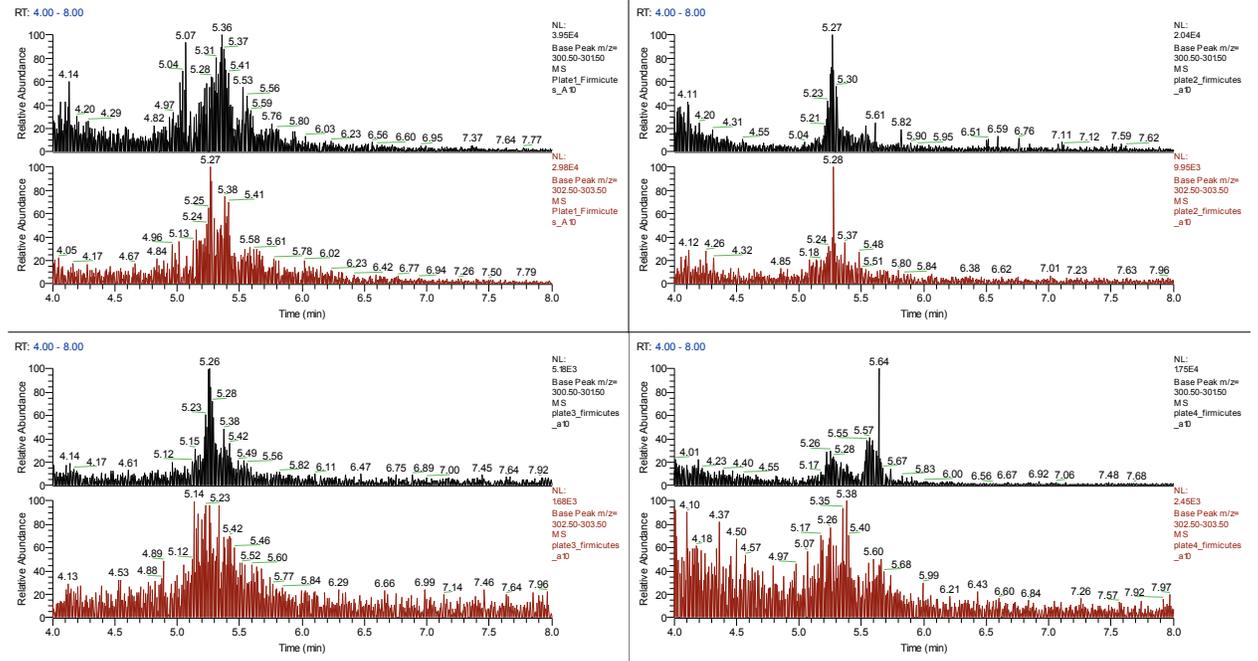
02/07/2010 2:44:54 PM



CONTROL MEDIOS: MB, TAK (arriba), NB/10, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...plate4_firmicutes_a10

02/11/2009 7:18:23 PM

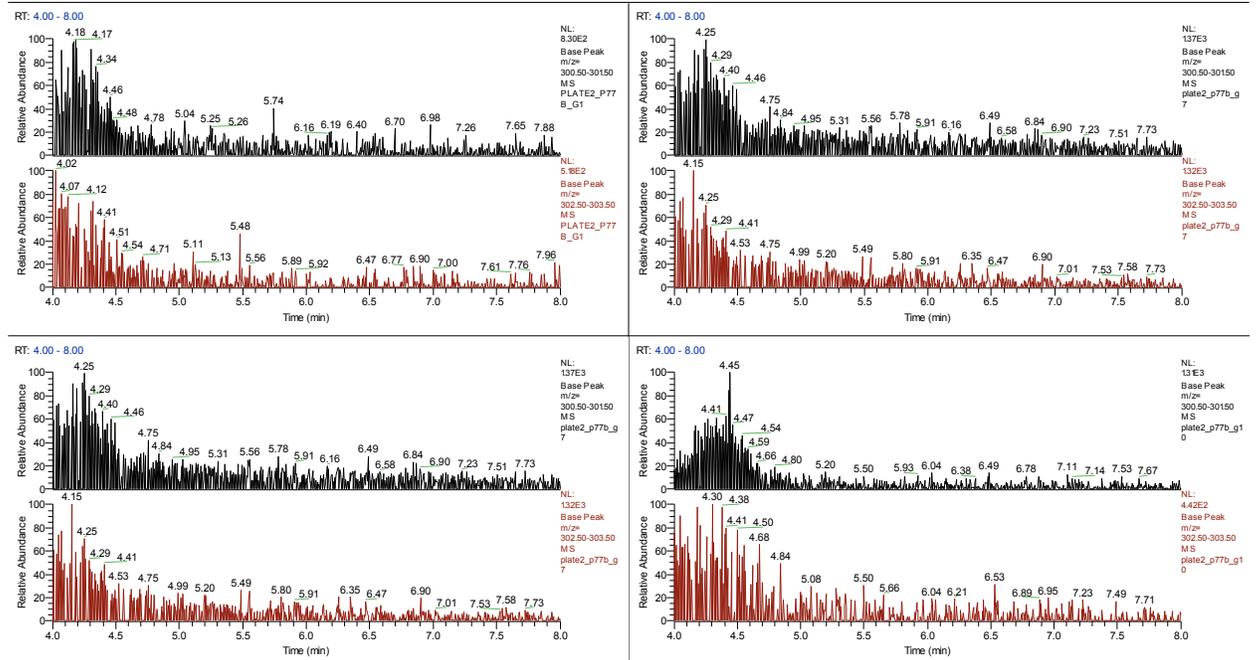


RIC m/z 301 Y RIC m/z 303 de los extractos de cultivo de las Proteobacteria

RKHC-77B *Paracoccus chinensis* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...050710\plate2_p77b_g10

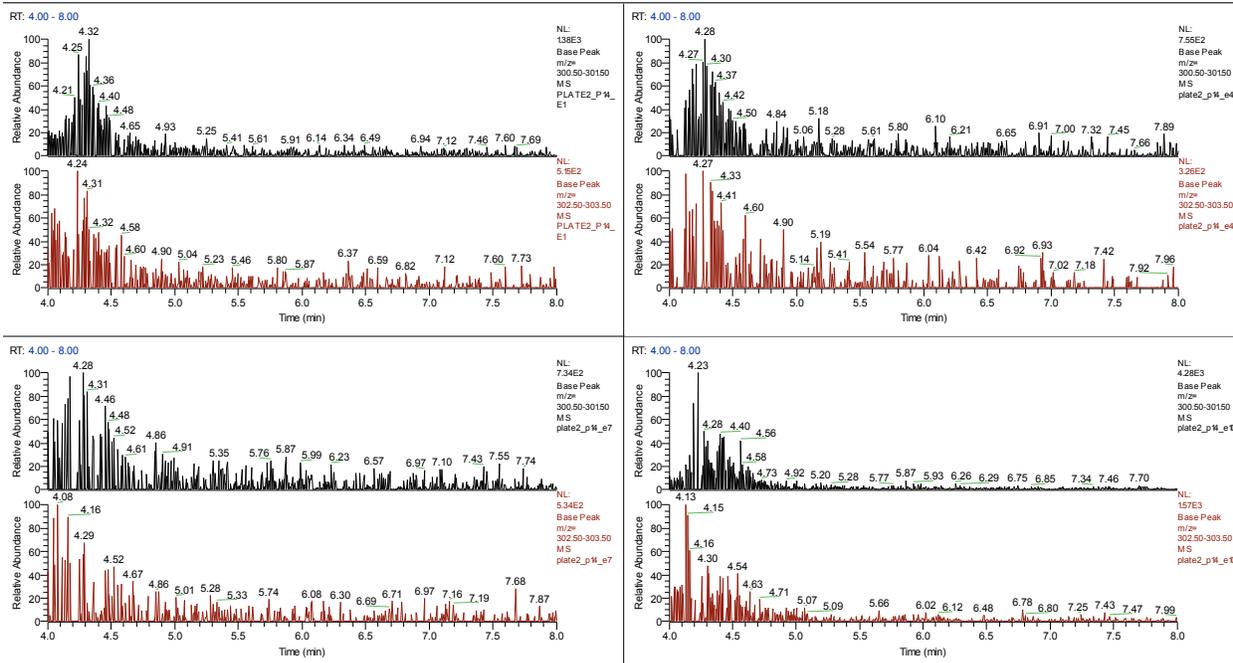
06/07/2010 2:32:00 AM



RKHC-14 *Ruegeria atlantica* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...050710\plate2_p14_e10

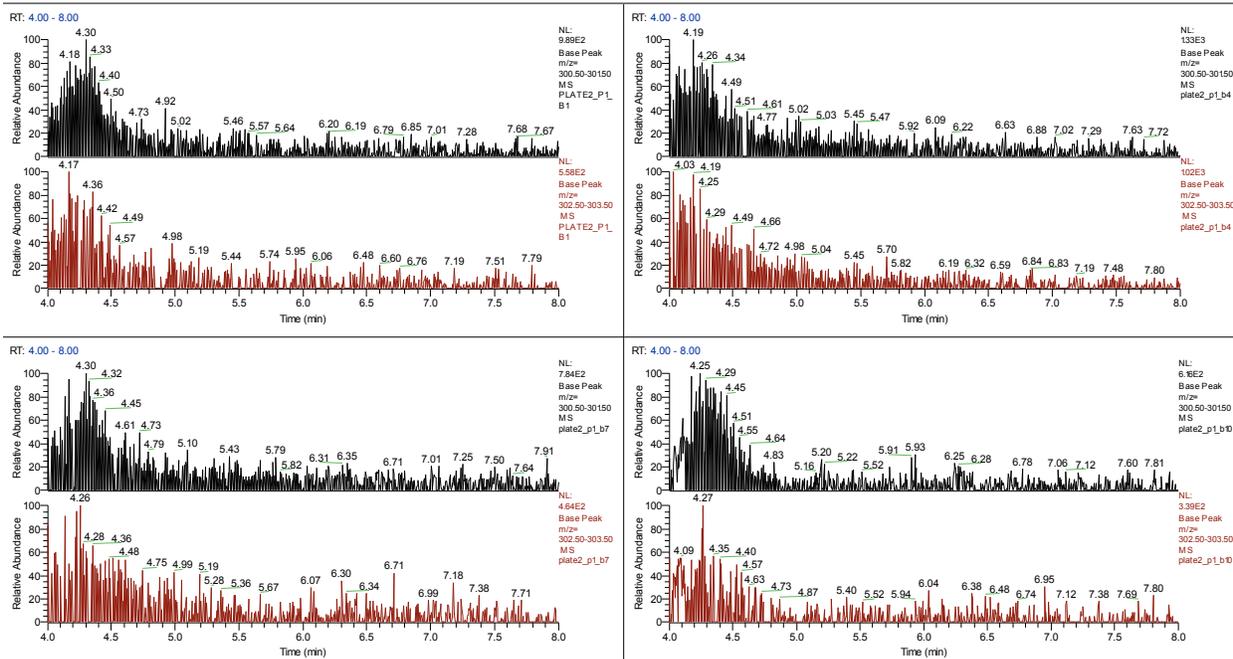
05/07/2010 10:10:31 PM



RKHC-1 *Erythrobacter citrius* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...050710\plate2_p1_b10

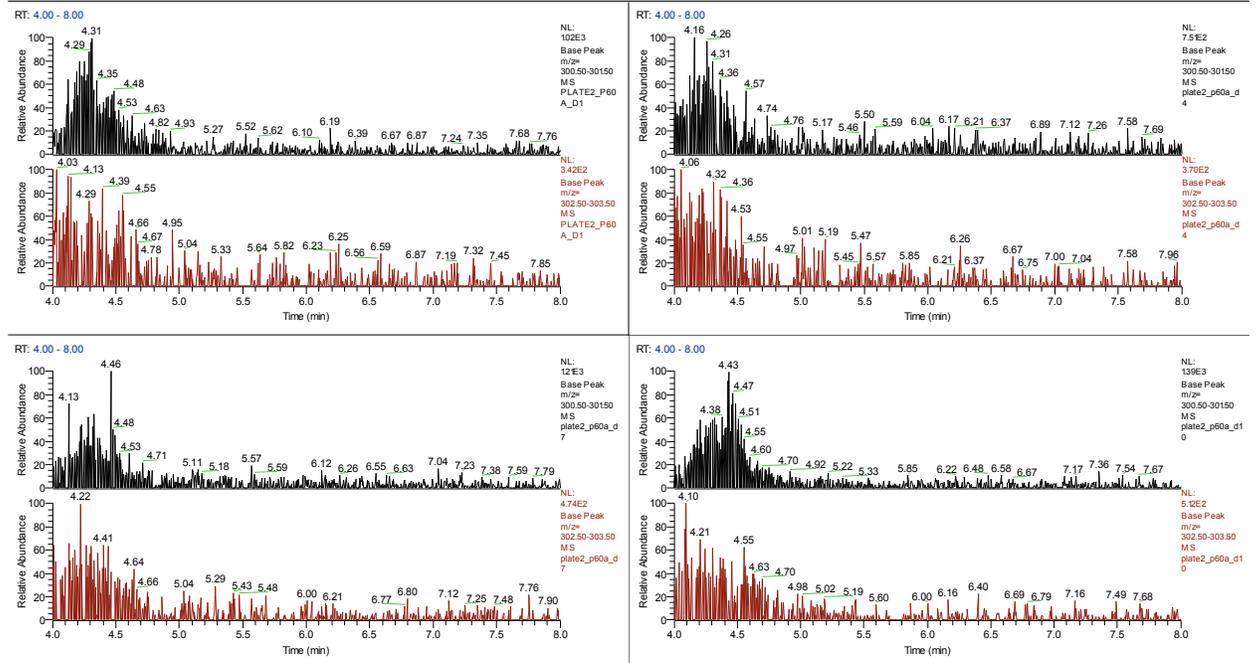
05/07/2010 3:38:20 PM



RKHC-60A *Tetrathibacter mimigardefordensis* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...050710\plate2_p60a_d10

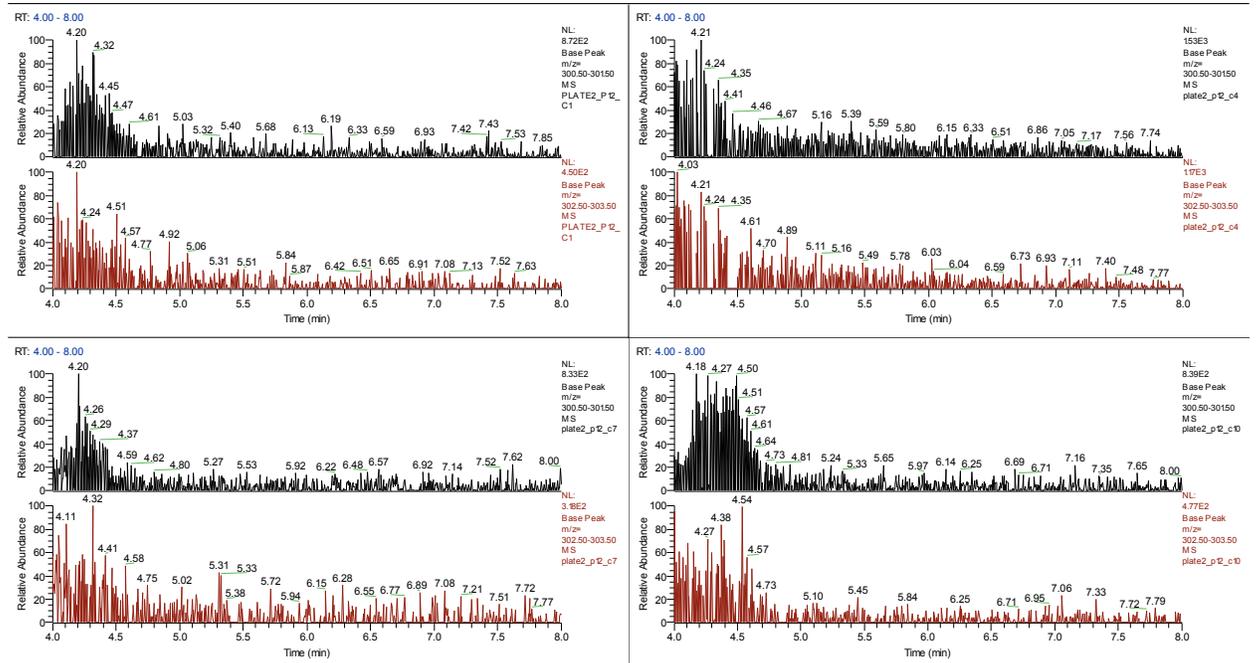
05/07/2010 7:59:43 PM



RKHC-12 *Acinetobacter Iwoffii* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...050710\plate2_p12_c10

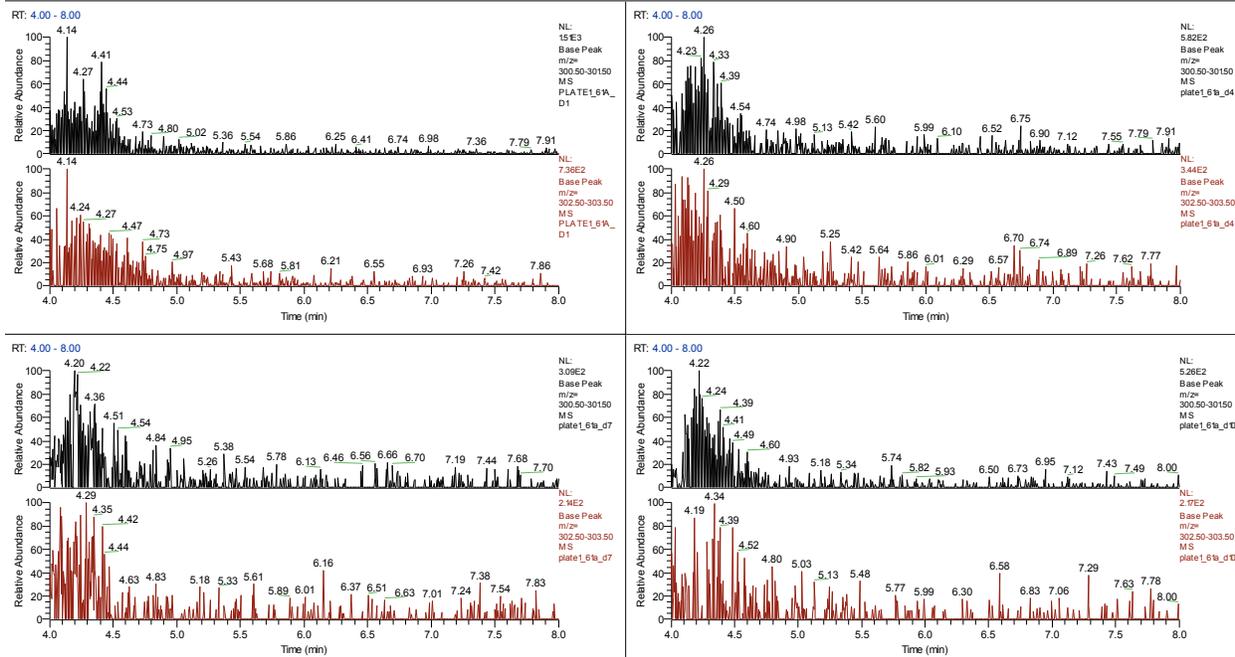
05/07/2010 5:48:59 PM



RKHC-61A *Pseudomonas grimonti* Medios NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

C:\xcalibur\...040710\PLATE1_61A_D1

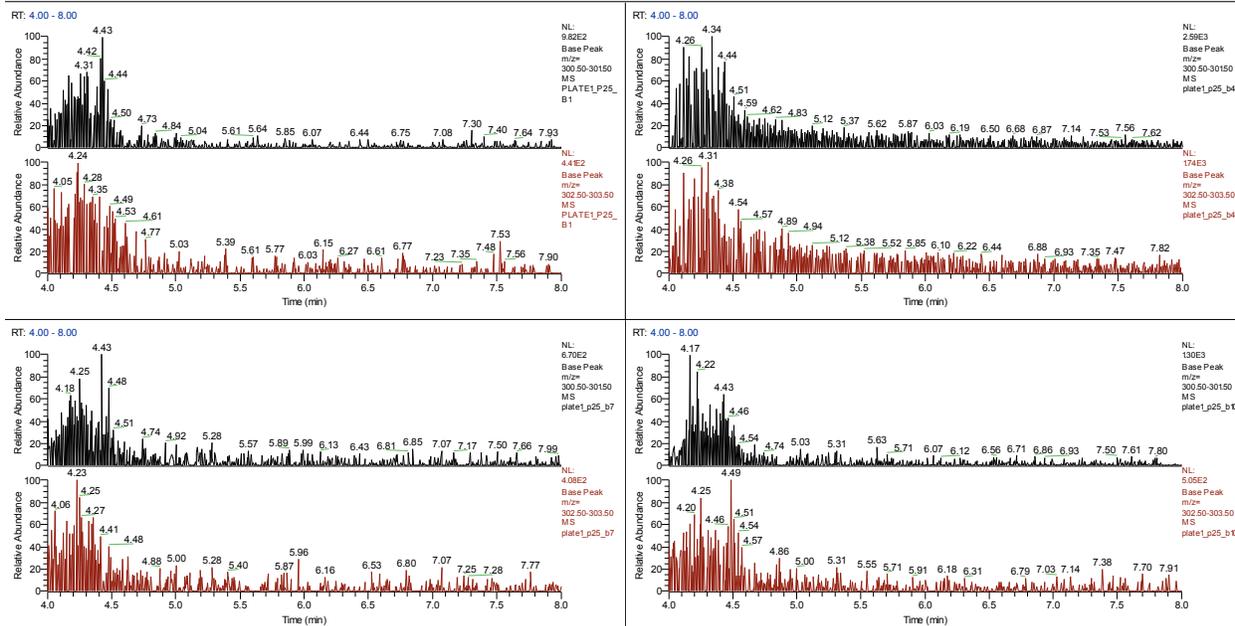
04/07/2010 6:49:27 PM



RKHC-25 *Pseudomonas oleovorans* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...040710\plate1_p25_b10

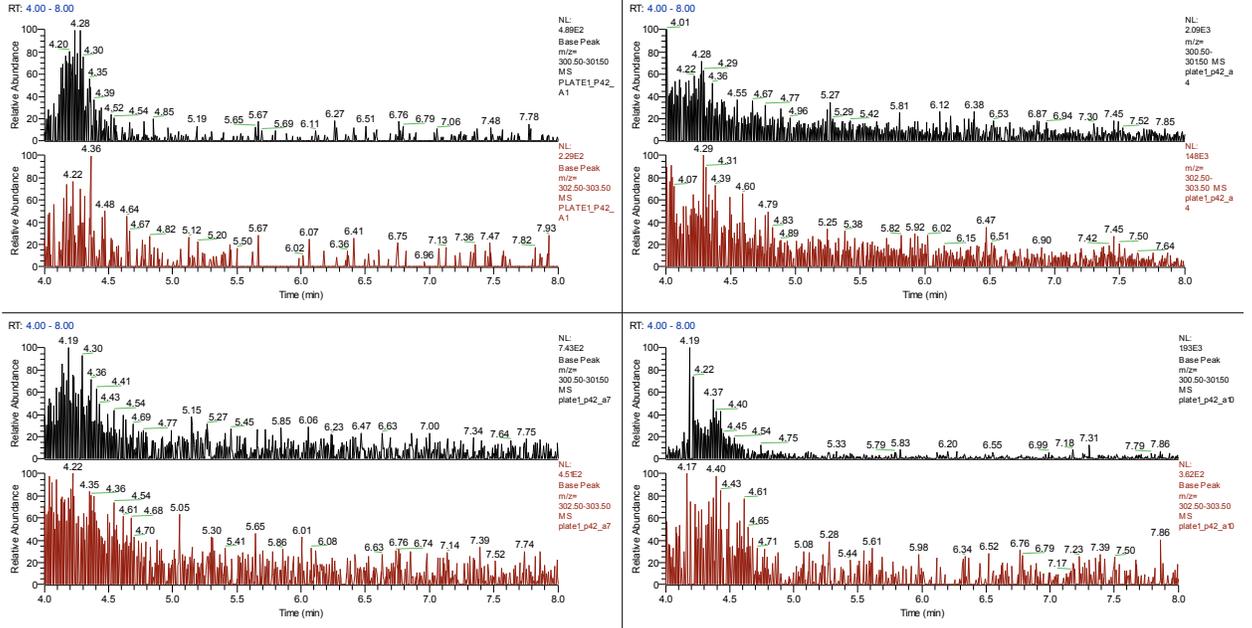
04/07/2010 4:06:01 PM



RKHC-42 *Pseudomonas moraviensis* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...040710\plate1_p42_a10

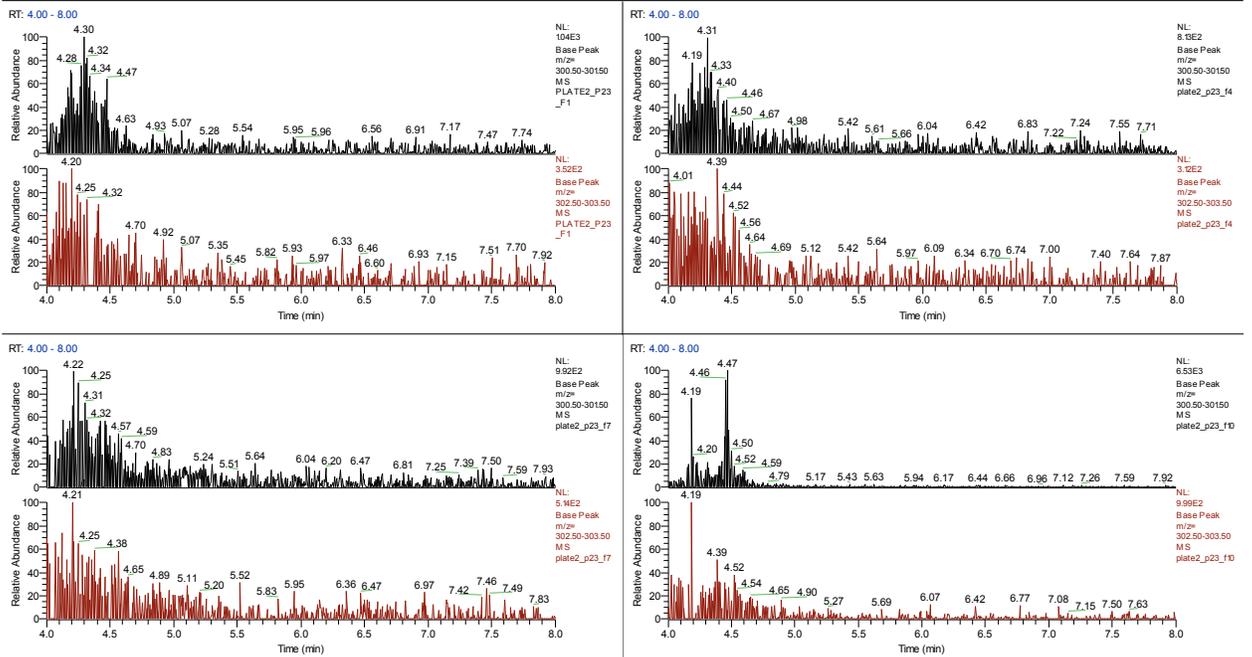
04/07/2010 1:55:14 PM



RKHC-23 *Photobacterium eurosenbergii* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...050710\plate2_p23_f10

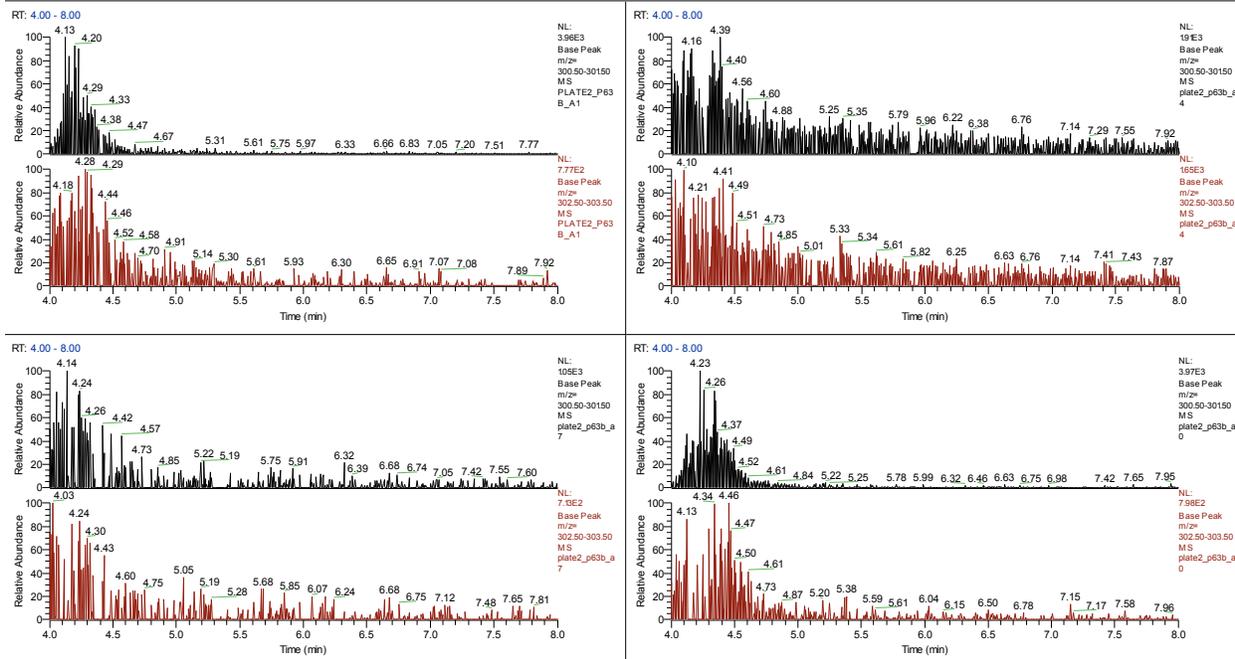
06/07/2010 12:21:18 AM



RKHC-63B *Vibrio hollisae* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...050710\plate2_p63b_a10

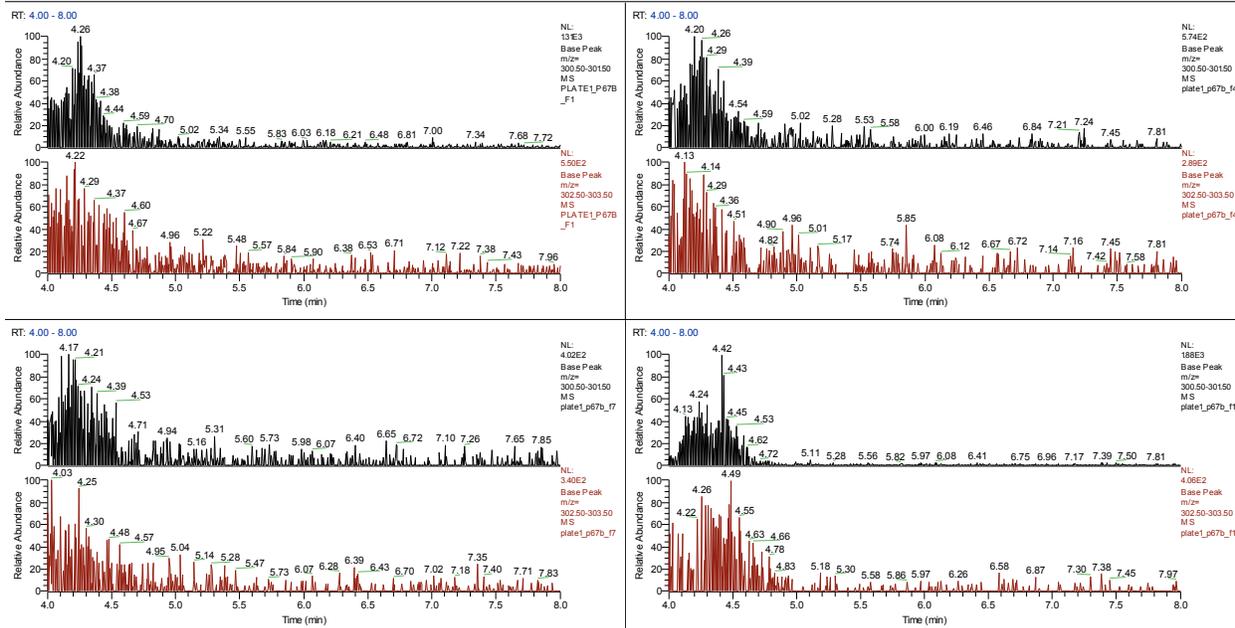
05/07/2010 1:27:21 PM



RKHC-67B *Vibrio sinaloensis* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...040710\plate1_p67b_f10

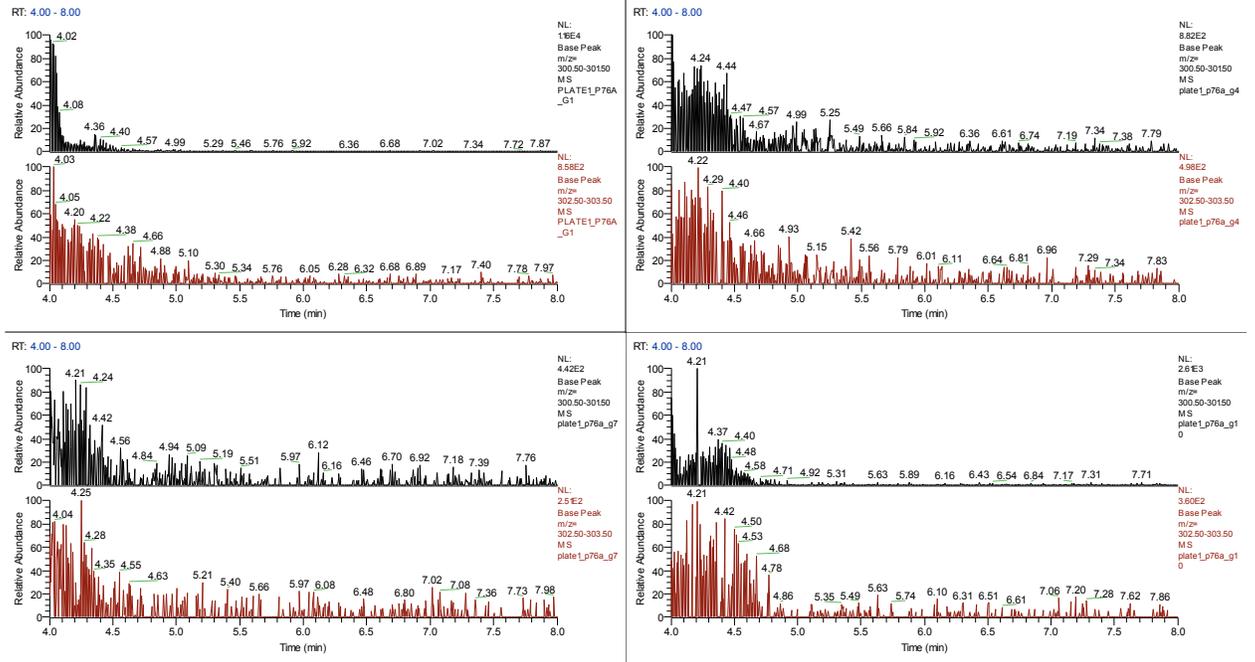
05/07/2010 12:49:00 AM



RKHC-76A *Vibrio proteolyticus* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...040710\plate1_p76a_g10

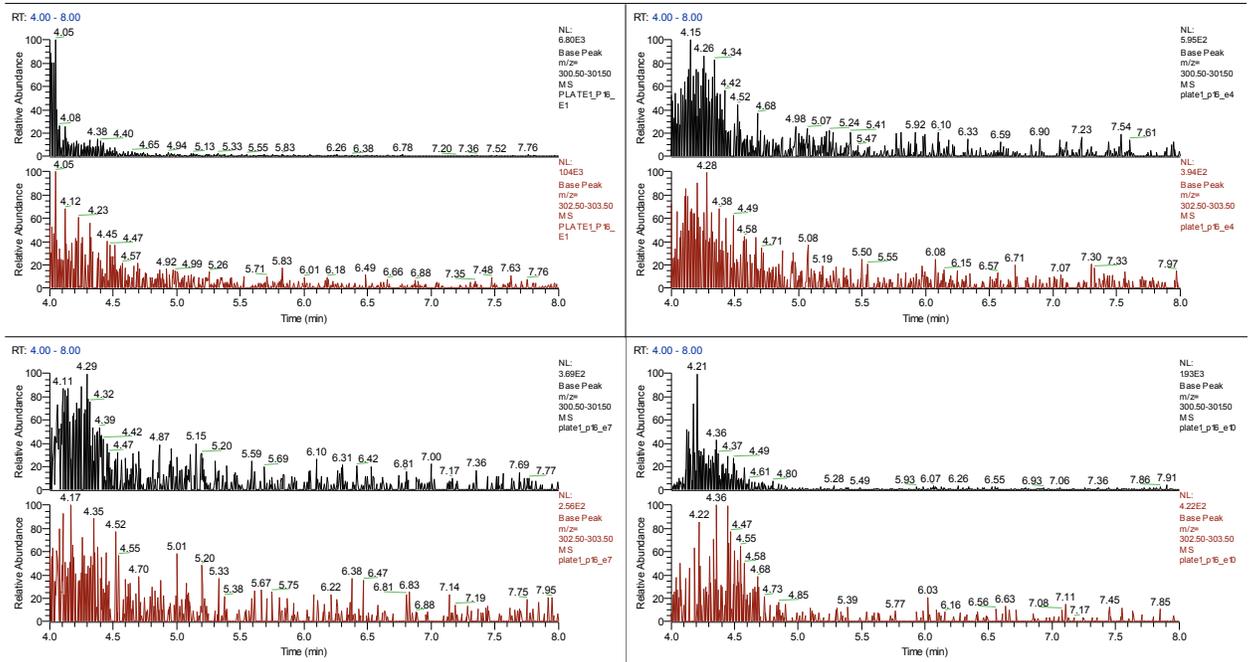
05/07/2010 2:59:34 AM



RKHC-76B *Vibrio communis* Medios: NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...040710\plate1_p16_e10

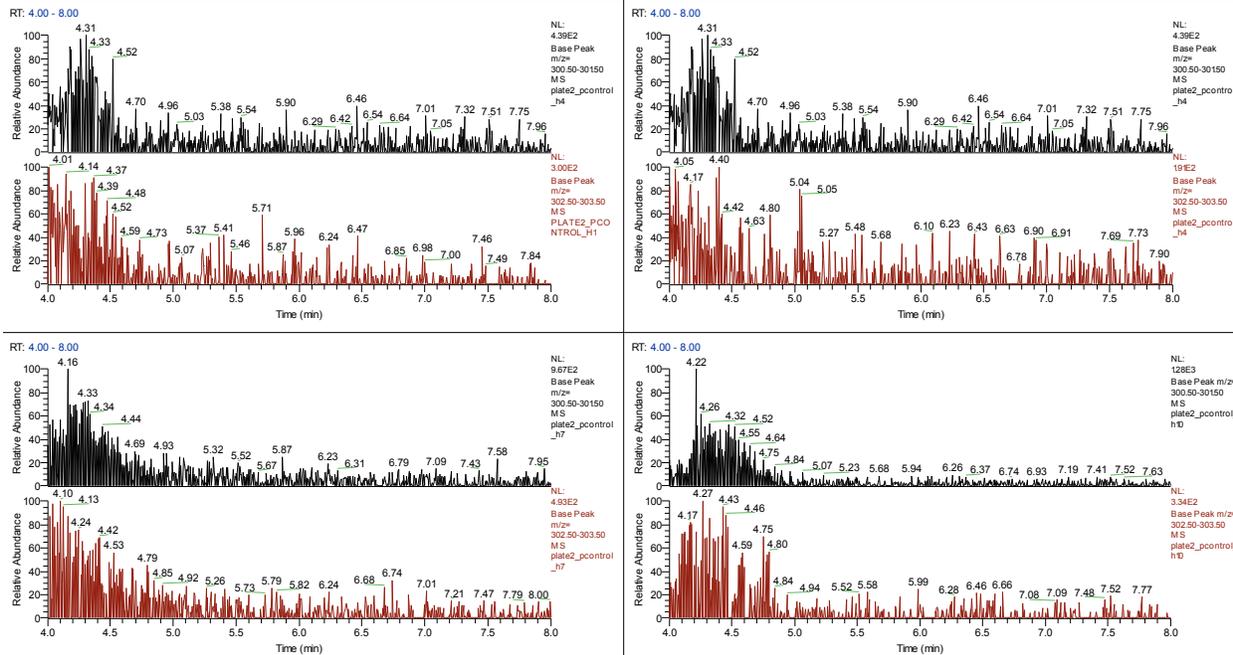
04/07/2010 10:38:19 PM



CONTROL MEDIOS NB-IO, E1 (arriba), TAK, MMB (abajo)

c:\xcalibur\...plate2_pcontrol_h4

06/07/2010 3:37:21 AM



ANEXO 2

Producción Científica

Artículos

Correa, H., Aristizabal, F., Duque, C., Kerr, R. **2011a**. Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudopterosins and seco-pseudopterosins isolated from the octocoral *Pseudopteroergorgia elisabethae* of San Andrés and Providencia islands (SW Caribbean). *Mar Drugs*, 9:334-344, doi: 10.3390/md9030334.

Correa, H., Berrués, F., Haltli, B., Duque, C., Kerr, R. **2011b**. Rápida construcción de una librería de los productos de cultivo de 14 bacterias del *phylum* firmicutes simbioses del octocoral *Pseudopteroergorgia elisabethae* de la Isla de Providencia (Caribe Sur-Occidental). *Rev Acad Colomb Cienc* 35: 277-288.

Correa, H., Haltli, B., Duque, C., Kerr, R. **2012a**. Bacterial community associated with the octocoral *Pseudopteroergorgia elisabethae* collected at Providencia Island (SW Caribbean Sea). *En preparación*

Correa, H., Zorro, P., Arevalo, C., Duque, C. **2012b**. Pseudopterosins G and P-U and seco-pseudopterosins J and K isolated from the octocoral *Pseudopteroergorgia elisabethae* collected at the Providencia Island (SW Caribbean): Possible ecological role. *En preparación*

Intervenciones en Congresos

Correa, H., Duque, C. Estudios de bioprospección del gorgonáceo *Pseudopteroergorgia elisabethae* recolectado en las Islas de San Andrés y Providencia (COL) En SENALMAR, Isla de San Andrés, Colombia, Mayo **2008**, Plenary Presentation, Presentación Oral.

Correa, H., Duque, C., Kerr, R. Bioprospecting studies of the octocoral *Pseudopteroergorgia elisabethae* Providencia (COL) En 1st Atlantic Marine Conference, Charlottetown, Canada Septiembre **2009**, Presentación Oral.

Correa, H., Lanteigne, M., Haltli, B., Berrués, F., Duque, C., Kerr, R. Bio-screening of bacteria isolated from *Pseudopteroergorgia elisabethae* Providencia (COL) En 2nd Atlantic Marine Conference, Charlottetown, Canada, Septiembre **2010**, Presentación Oral.

Duque, C., **Correa, H.**, Tello, E. Vast chemical diversity of the *Pseudopteroergorgia* and *Eunicea* octocoral genera in the Colombian Caribbean sea. En XXIX Congreso Latinoamericano de Química, Cartagena, Colombia, Octubre **2010**. Presentación Plenaria.

Correa, H., Haltli, B., Kerr, R., Aristizabal, F., Hellio, C., Duque, C. Actividad citotóxica, antimicrobiana y antifouling de algunos compuestos aislados del octocoral

Pseudopterogorgia elisabethae. En XXIX Congreso Latinoamericano de Química, Cartagena, Colombia, Octubre **2010**, Presentación Oral.

Correa, H., Haltli, B., Duque, C., Kerr, R. Análisis por LC-MS de los productos de fermentación de bacterias del phylum Firmicutes asociadas al octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. En XXIX Congreso Latinoamericano de Química, Cartagena, Colombia, Octubre **2010**. Presentación Oral-Poster.

Duque, C., **Correa, H.**, Tello, E. Composición química y actividad biológica vs aprovechamiento de recursos marinos y costeros. En SENALMAR, Cali, Colombia, Octubre **2010**, Presentación Plenaria.

Correa, H., Haltli, B., Duque, C., Kerr, R. Microbial diversity of the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at Providencia Island (Colombia). 13th International Symposium of Marine Natural Products (MANAPRO), Phuket, Tailandia, Octubre **2010**, Presentación Oral-Poster.

Correa, H., Duque, C. *Pseudopterogorgia elisabethae* de San Andrés y Providencia, un octocoral con excelente potencial como fuente de productos naturales con actividad biológica. International Conference on New Discoveries of the Brain. Ciudad de Panama, Panama, Mayo **2011**, Poster.

Martínez, D., **Correa, H.**, Castellanos, L., Ramos, F., Arévalo, C., Duque, C. Búsqueda de compuestos bioactivos a partir de bacterias del phylum Firmicutes asociadas con el octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* recolectado en la Isla de Providencia. II Simposio Taller "Las ciencias del mar en la universidad nacional de Colombia", CECIMAR, Santa Marta, Colombia, Diciembre **2011**, Presentación Oral.

Pinzón, A., **Correa, H.**, Ramos, F., Arévalo, C., Duque, C. *Screening* de actividad antimicrobiana de los productos de cultivo de bacterias del phylum Firmicutes asociadas al octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. II Simposio Taller "Las ciencias del mar en la universidad nacional de Colombia", CECIMAR, Santa Marta, Colombia, Diciembre **2011**, Presentación Oral.

Article

Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Pseudopterosins and *seco*-Pseudopterosins Isolated from the Octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* of San Andrés and Providencia Islands (Southwest Caribbean Sea)

Hebelin Correa ¹, Fabio Aristizabal ², Carmenza Duque ^{1,*} and Russell Kerr ^{3,*}

¹ Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Cra. 30 N° 45-03, Bogotá D.C., Colombia; E-Mail: hcorreav@unal.edu.co (H.C.)

² Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Cra. 30 N° 45-03, Bogotá D.C., Colombia; E-Mail: faaristizabalg@unal.edu.co (F.A.)

³ Departments of Chemistry and Biomedical Sciences, University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, C1A 4P3, Charlottetown, PEI, Canada

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: cduqueb@unal.edu.co (C.D.); rkerr@upei.ca (R.K.); Tel.: +57-1-2714617 (C.D.); +1-902-5660565 (R.K.); Fax: +57-1-3165220 (C.D.); +1-902-5667445 (R.K.).

Received: 8 February 2011; in revised form: 24 February 2011 / Accepted: 25 February 2011 / Published: 4 March 2011

Abstract: To expand the potential of pseudopterosins and *seco*-pseudopterosins isolated from the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* of San Andrés and Providencia islands (southwest Caribbean Sea), we report the anti-microbial profile against four pathogenic microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*) and report a more complete cytotoxic profile against five human cells lines (HeLa, PC-3, HCT116, MCF-7 and BJ) for the compounds PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, 3-*O*-acetyl-PsU, *seco*-PsJ, *seco*-PsK and IMNGD. For the cytotoxic profiles, all compounds evaluated showed moderate and non-selective activity against both tumor and normal cell lines, where PsQ and PsG were the most active compounds (GI₅₀ values between 5.8 μM to 12.0 μM). With respect to their anti-microbial activity the compounds showed good and selective activity against the Gram-positive bacteria, while they did not show activity against the Gram-negative bacterium or yeast. PsU, PsQ, PsS, *seco*-PsK and PsG were the most active compounds (IC₅₀ 2.9–4.5 μM) against *S. aureus* and PsG, PsU and *seco*-PsK showed good activity (IC₅₀ 3.1–3.8 μM) against *E. faecalis*, comparable to the reference drug vancomycin (4.2 μM).

Keywords: marine natural products; pseudopterosins; *seco*-pseudopterosins; *Pseudoptero-gorgia elisabethae*; cytotoxic activity; antimicrobial activity

1. Introduction

The discovery of selective and potent therapeutic activity of pseudopterosins and *seco*-pseudopterosins isolated from the octocoral *Pseudoptero-gorgia elisabethae* [1–14] and the high degree of chemical variation among specimens collected at different locations throughout the Caribbean region [1,2], have motivated several authors to pursue this field of study. Thus far, 30 pseudopterosins (PsA–Y, *iso*-PsE, 2-*O*-Ac-PsQ, 3-*O*-Ac-PsQ, 2-*O*-Ac-PsU and 2-*O*-Ac-PsQ) [3–11] and 11 *seco*-pseudopterosins (*seco*-PsA–K) [8–13] have been isolated from specimens collected in the Bahamas, Bermuda, the Florida Keys and the Colombian islands of San Andrés and Providencia.

The pseudopterosins (PsA–D, PsE, *iso*-PsE, PsM–O, PsX and PsY) and *seco*-pseudopterosins (*seco*-PsA–G) isolated from specimens collected in the North Caribbean Sea (the Bahamas, Bermuda and the Florida Keys) have been evaluated as anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial agents [2–6,8,12]. Among them, PsN, PsA, *iso*-PsE and PsE were found to be the most potent compounds in mouse ear anti-inflammatory assays [3,4,6,8]. Furthermore PsA and PsE, appeared to prevent eicosanoid biosynthesis by inhibition of PLA₂, 5-LO and COX, degranulation of leukocytes and the consequent liberation of lysosomal enzymes [15,16]. PsA–E, PsK, PsX, PsY and *seco*-PsA–D showed excellent and selective activity against the Gram-positive bacteria *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, and *Enterococcus faecalis* [5,12]. Pseudopterosins are also used in several skin care products [1,17]. Methopterosin is a simple derivative of PsA and has completed Phase I and II clinical trials as a wound healing agent [17–20].

Specimens of *P. elisabethae* collected in the southwest Caribbean Sea, specifically at the Islands of San Andres and Providencia (Colombia), have been shown to contain new pseudopterosins (PsP–V, 2-*O*-Ac-PsQ, 3-*O*-Ac-PsQ, 2-*O*-Ac-PsU and 2-*O*-Ac-PsQ, PsG and PsK), *seco*-pseudopterosins (*seco*-PsH–K), and an inter-converting mixture of non-glycosylated diterpenes (10-acetoxy-9-hydroxy- and 9-acetoxy-10-hydroxy-amphilecta-8,10,12,14-tetraenes (IMNGD)) [7,9–11]. However, only a limited number of these compounds has been evaluated for anti-inflammatory [21], anti-tuberculosis, anti-viral, anti-malarial and anti-cancer [11] activity.

In regards to their anti-inflammatory activity, our experiments showed that fractions enriched with pseudopterosins (PsG, PsK, PsP, PsQ, PsS, PsT and PsU) and *seco*-pseudopterosins (*seco*-PsJ and *seco*-PsK) were able to inhibit the inflammation in a 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-acetate (TPA)-induced edema assay, with results comparable to those shown by indomethacin used as the control standard [21]. Additionally, in *in vitro* experiments, PsQ, PsS, PsT, PsU and IMNGD showed good activity for the inhibition of MPO release; PsP, PsT and IMNGD inhibit NO release [21] and PsR inhibited thromboxane B₂ (TXB₂) and the superoxide anion (O₂[−]) [11].

In other experiments, PsP was evaluated for anti-viral activity (against HSV-1, HSV-2, HVMV and VZV), and PsQ, PsR, PsU, PsV, *seco*-PsH and *seco*-PsI evaluated as anti-malaria agents (against *Plasmodium falciparum*) and as anti-tuberculosis agents (against *Mycobacterium tuberculosis*

H₃₇Rv) [11]. There is only one report discussing the cytotoxic activity of PsQ, PsR, PsU, PsV, and 3-*O*-acetyl-PsU against MCF-7 (breast cancer), NCI-H460 (non-small-cell lung cancer), and SF-268 (CNS) cells [11]. These data suggest that some of these pseudopterosins have some cytotoxicity but lack potency.

While there has been considerable effort towards characterizing the biological activity of pseudopterosins isolated from octocoral samples collected in the northern Caribbean, much is unknown about the bioactivity of such compounds isolated from octocoral collected from the Islands of San Andrés and Providencia. For this reason, and with a goal of expanding the potential of these compounds, here we report for the first time the antimicrobial profile against four pathogen microorganisms (*S. aureus*, *E. faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*) and report a more complete cytotoxic profile against five human cells lines (HeLa, PC-3, HCT116, MCF-7 and BJ) for the compounds: PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, 3-*O*-acetyl-PsU, *seco*-PsJ, *seco*-PsK and IMNGD (Figure 1).

2. Results and Discussion

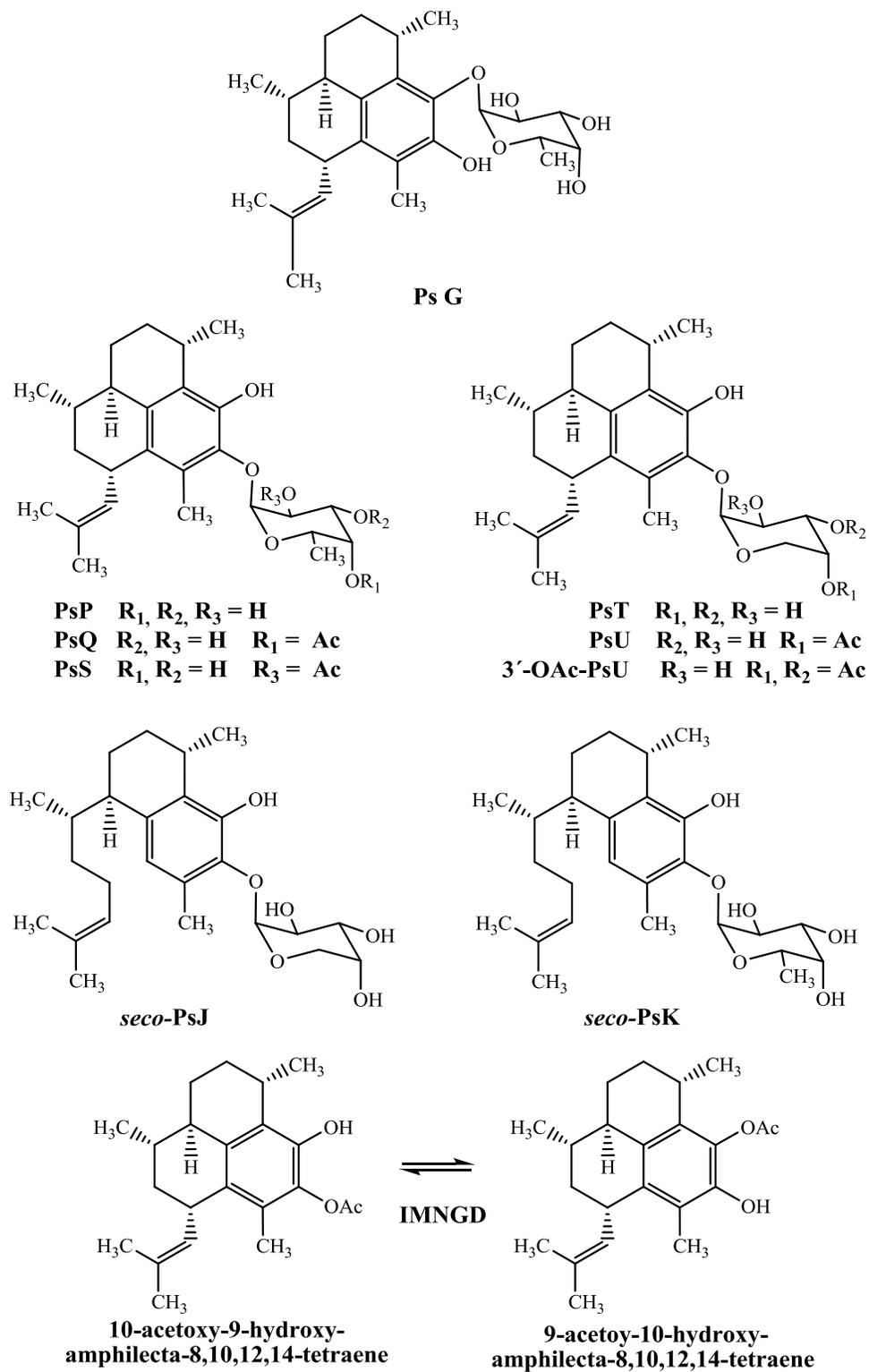
In this study, PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, 3-*O*-acetyl-PsU, *seco*-PsJ, *seco*-PsK and IMNGD were isolated (Figure 1) by flash chromatography and HPLC and identified by spectroscopic means. The structures of all compounds were previously reported by us [7,10], and preliminary assessment of their cytotoxic (Table 1) and antimicrobial (Table 2) properties is presented here.

2.1. Cytotoxic Activity

The cytotoxic activity of the pseudopterosins (PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU and 3-*O*-acetyl-PsU), *seco*-pseudopterosins (*seco*-PsJ and *seco*-PsK) and IMNGD against five cell lines: HeLa (cervical cancer), PC-3 (prostate cancer), HCT116 (colorectal cancer), MCF-7 (breast cancer) and BJ (fibroblasts) was investigated using the MTT reduction colorimetric assay [22]. Although no compound showed significant activity, according to the GI₅₀ cut off value of 10 nM for pure compounds suggested by Bugelski *et al.* [23], all compounds evaluated showed moderate to weak (GI₅₀ 5.8–83.9 μM) and non-selective activity against both tumor and normal cell lines as shown in Table 1.

While none of these compound showed comparable activity to the reference drug staurosporine (GI₅₀ 13.6–105.6 nM) against the four tumor cell lines, PsQ and PsG were the most active compounds (GI₅₀ values between 5.8 μM to 12.0 μM) and IMNGD showed a moderate activity with GI₅₀ values of 9.7–19.9 μg/mL. These results are comparable with those previously reported by Rodriguez *et al.* [11], who determined the GI₅₀ values for PsQ, PsU and PsV in the NCI-H460-cell line. Results for PsQ showed a GI₅₀ between 1.7–5.8 μM. In the same screen, PsU and PsV were generally much less toxic (GI₅₀ 20–100 μM). For the normal cell line BJ (Table 1), PsS, 3-*O*-acetyl-PsU, PsP, PsT and *seco*-PsJ did not show a considerable cytotoxic effect (GI₅₀ > 10 μM) while PsQ, PsG, *seco*-PsK and PsU showed a moderate cytotoxic activity (GI₅₀ 4.5–9.3 μM). The IMNGD showed a moderate activity with GI₅₀ of 8.3 μg/mL.

Figure 1. Chemical structures of pseudopterosins, *seco*-pseudopterosins and IMNGD isolated from *P. elisabethae* (SW Caribbean Sea).



The selectivity of the cytotoxic activity of the compounds, measured as the differential effect on growth of different types of cell lines, was made by comparing the effect of the compounds on

inhibiting cell growth in both normal and tumor cells. The results showed no selectivity of compounds between the lines used, and all compounds induced reduction in cell survival to a similar magnitude in all lines.

Table 1. Cytotoxic effect of diterpenes isolated from *P. elisabethae* (SW Caribbean) in human cancer cell lines (HeLa, PC-3, HCT116, MCF-7) and normal BJ cells.

Compounds	GI ₅₀ ± S.E (μM)				
	HeLa	PC-3	HCT116	MCF7	BJ
PsG	9.22 ± 0.45	8.83 ± 0.54	12.04 ± 0.36	9.42 ± 0.43	7.62 ± 0.38
PsP	10.31 ± 0.49	13.77 ± 0.58	17.89 ± 0.45	12.58 ± 0.45	10.40 ± 0.42
PsQ	5.82 ± 0.33	7.81 ± 0.35	7.66 ± 0.27	8.44 ± 0.41	4.47 ± 0.31
PsS	13.79 ± 0.39	52.05 ± 0.31	33.50 ± 0.33	26.25 ± 0.45	29.14 ± 0.45
PsT	14.58 ± 0.35	21.99 ± 0.46	24.24 ± 0.42	14.72 ± 0.46	12.94 ± 0.37
PsU	15.63 ± 0.32	24.81 ± 0.34	23.44 ± 0.40	26.46 ± 0.46	9.35 ± 0.34
3- <i>O</i> -Ac-PsU	44.61 ± 0.35	26.45 ± 0.31	20.48 ± 0.48	83.93 ± 0.39	62.03 ± 0.45
<i>seco</i> -PsJ	21.08 ± 0.37	37.21 ± 0.41	31.68 ± 0.32	28.02 ± 0.51	15.00 ± 0.35
<i>seco</i> -PsK	15.83 ± 0.18	13.57 ± 0.38	13.28 ± 0.27	11.45 ± 0.36	8.28 ± 0.29
IMNGD*	11.20 ± 0.15	12.11 ± 0.20	19.90 ± 0.19	9.67 ± 0.15	7.91 ± 0.17
Staurosporine**	105.6 ± 0.41	61.82 ± 0.38	45.56 ± 0.45	176.6 ± 0.38	13.56 ± 0.35

* GI₅₀ (μg/mL), ** GI₅₀ (nM)

Preliminary conclusions regarding structure-activity relationships can be drawn from an examination of the cytotoxic activity. The position of glycosylation on the terpene skeleton appears to affect the inhibitory activity profile as, for example, PsG (glycosylated in C-9 with fucopyranose) is more active than PsP (glycosylated in C-10 with fucopyranose). Further, the type of sugar moiety also influences the activity as, for example, PsP which is glycosylated with fucopyranose is more active than PsT which is glycosylated with arabinopyranose. Likewise, PsQ (C-4' mono-acetylated fucose as sugar moiety) is more active than PsU (C-4' mono-acetylated arabinose as sugar moiety) and *seco*-PsK (non-acetylated fucose as sugar moiety) is more active than *seco*-PsJ (mono-acetylated arabinose as sugar moiety).

2.2. Antimicrobial Activity

The antimicrobial activity of the pseudopterosins, *seco*-pseudopterosins and IMNGD was investigated against one Gram-negative bacterium (*P. aeruginosa*), two Gram-positive bacteria (*S. aureus* and *E. faecalis*) and one yeast (*C. albicans*), using a microdilution method [24]. The majority of compounds evaluated showed a good IC₅₀ (2.9–7.64 μM) and all showed a selective activity against both Gram-positive bacteria tested (Table 2), while they did not show activity against the Gram-negative bacterium or the yeast.

PsU, PsQ, PsS, *seco*-PsK, PsG were the most active compounds (IC₅₀ 2.3–4.5 μM) against *S. aureus*. The IMNGD showed good activity with IC₅₀ of 2.3 μg/mL. For *E. faecalis*, PsG, PsU and *seco*-PsK showed better activity (Table 2) compared to the reference drug vancomycin (4.2 μM) while, *seco*-PsJ and PsT exhibited similar activity. The IMNGD showed good activity, with an IC₅₀ of

3.5 $\mu\text{g/mL}$. These results are comparable with the activity previously reported for PsA-E, PsK, PsX and PsY isolated from specimens collected in the north Caribbean Sea [5], which were reported to have minimum inhibitory concentration (MIC) values between 4.2 and 8.8 μM .

The selectivity observed in our study is comparable to that reported by Ata *et al.*, [5] who reported that other pseudopterosins (PsA-E, PsK, PsX and PsY) inhibit the growth of Gram-positive bacteria (*S. pyogenes*, *S. aureus*, and *E. faecalis*), while they were inactive against Gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*). This finding can be related to the fact that many Gram-negative bacteria are resistant to toxic agents in the environment, due to the barrier of lipopolysaccharides on their outer membrane [25].

Table 2. Antibacterial activity of diterpenes isolated from *P. elisabethae* (SW Caribbean) in two Gram-positive bacteria.

Compounds	IC ₅₀ ± S.E (μM) *	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>
PsG	4.48 ± 0.18	3.14 ± 0.22
PsP	14.91 ± 0.20	37.35 ± 0.29
PsQ	3.30 ± 0.20	7.38 ± 0.16
PsS	3.89 ± 0.23	20.20 ± 0.25
PsT	5.39 ± 0.25	4.38 ± 0.16
PsU	2.97 ± 0.17	3.19 ± 0.25
3-O-Ac-PsU	20.23 ± 0.19	7.64 ± 0.16
<i>seco</i> -PsJ	6.52 ± 0.12	4.08 ± 0.19
<i>seco</i> -PsK	4.20 ± 0.16	3.82 ± 0.21
IMNGD**	2.33 ± 0.09	3.47 ± 0.15
Penicillin G	1.61 ± 0.08	-
Vancomycin	-	4.21 ± 0.11

* All compounds evaluated were inactive against the Gram-negative bacterium *P. aeruginosa* and the yeast *C. albicans*. **IC₅₀ (μg/mL).

Examination of the data in Table 2 suggests the following structure–activity relationships. Firstly, PsG (glycosylated in C-9 with fucopyranose) is more active than PsP (glycosylated in C-10 with fucopyranose). Secondly, PsT glycosylated with arabinopyranose is more active than PsP, which is glycosylated with fucopyranose. Likewise, PsU (mono-acetylated arabinose as sugar moiety) is more active than PsQ and PsS (mono-acetylated fucose as sugar moiety). However, this behavior initially observed in pseudopterosins (amphilectane skeleton) is not retained when the results are compared with *seco*-pseudopterosins (serrulatane skeleton), where, the *seco*-PsK (glycosylated with fucopyranose) showed more activity than *seco*-PsJ (glycosylated with arabinopyranose). Clearly, additional work is required to fully understand the structure–activity relationships for this family of terpenes.

From the above discussion, one can note that the pseudopterosins, *seco*-pseudopterosins and IMNGD isolated from *P. elisabethae* collected at the Islands of San Andrés and Providencia (southwest Caribbean Sea) have a similar drug-like potential as the related compounds isolated from specimens collected in the north Caribbean Sea (the Bahamas, Bermuda and the Florida Keys). Further, due to their wide applicability in commercial additives, in the cosmetic industry, it might be

important to consider *P. elisabethae* collected in Colombian waters as an alternative source of such compounds. As has been shown, the anti-inflammatory, anti-microbial and cytotoxic activity of this family of compounds isolated from *P. elisabethae* collected at different locations at the Caribbean Sea are quite similar, regardless of a small number of differences in their structure (type of sugar moiety, position of glycosylation and stereochemistry).

3. Experimental Section

3.1. Chemicals and Reagents

The following substances were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA): Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), staurosporine, vancomycin, penicillin G, gentamicin, nystatin, Luria-Bertani Broth (LB) and Sabouraud Dextrose broth (SD). Fetal bovine serum (FBS), salts for phosphate buffered saline (PBS) solution and organic solvents, were purchased from WRW (PA, USA).

3.2. Octocoral Collection

Fragments of individual colonies of *P. elisabethae* were collected by SCUBA (ca. 20–30 m depth) at Providencia and San Andrés islands (SW Caribbean) and identified by Dr. Monica Puyana. Voucher specimens coded as INV CNI 1612–1616, were deposited at the invertebrate collection of Museo de Historia Natural Marina Colombiana (MHNMC) at Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín (INVEMAR).

3.3. Isolation and Structure Elucidation of Compounds from *P. elisabethae*

The dried colony fragments (30 g) from each location were extracted separately with a dichloromethane-methanol (1:1) mixture. The resulting extracts were filtered and concentrated by rotary evaporation to obtain a dark green oil. The isolation of each compound was carried out according to our previously described procedures [7,10] with some modifications. Each extract was subjected separately to flash C18 column chromatography and eluted with 500 mL of each solvent mixture of decreasing polarity (methanol-water 1:9, fraction **F1**; methanol-water 1:1, **F2**; methanol-water 4:1, **F3**; methanol 100% **F4**; ethanol 100% **F5**; acetone 100%, **F6**; dichloromethane-methanol 5:5, **F7**; and dichloromethane 100%, **F8**). Checking by LC-MS and TLC, the fractions **F4** and **F5** from the Providencia extract contained a mixture of pseudopterosins and *seco*-pseudopterosins and **F5** from the San Andrés extract contained the interconverting mixture of non-glycosylated diterpenes (IMNGD). Fraction **F4** and **F5** from Providencia were mixed and subsequently separated by flash chromatography using a diol column (150 g) yielding PsG (19.1 mg), PsP (9.6 mg), PsQ (58.1 mg), PsS (2.3 mg), PsT (14.5 mg), PsU (46.6 mg), 3-*O*-Ac-PsU (3.5 mg), *seco*-PsJ (16.2 mg) and *seco*-PsK (1.2 mg). Final purification of all compounds was performed on HPLC, using a column Gemini C-18 (5 μ m, 10 \times 250 mm) and MeOH-water (9:1) as the mobile phase with a 3.0 mL/min flow rate. The isolated compounds were carefully identified by comparison of their spectral data with that shown by our previously isolated compounds [7,8]. Purity was confirmed by HPLC and NMR.

3.4. Cell Lines

The cell lines HeLa (cervical cancer), PC-3 (prostate cancer), HCT116 (colorectal cancer), MCF-7 (breast cancer) and normal human cell line BJ (skin fibroblasts) were used and maintained in DMEM with 5% of FBS and gentamicin 50 µg/mL. Cultures were held in 75 cm² culture flasks at 37 °C, 5% CO₂ and 100% relative humidity, changing media at least twice a week.

3.5. Cytotoxic Assay

Cells were harvested, counted, and transferred into 96 well plates and incubated for 24 h prior to the addition of the test compounds. Test sample solutions (10 µL) at the desired dilutions were added to the wells containing the cells and incubated for 48 h. Microtitration colorimetric method of MTT reduction was used to determine surviving cells at the end of the treatment period [22].

A solution of MTT (0.5 mg/mL) was prepared in PBS and 100 µL of this solution was added to each well after the removal of 100 µL of treatment solution. The plates were incubated at 37 °C for 4 h. The solution in each well, containing media, unmetabolized MTT, and dead cells, was removed by suction and 100 µL of DMSO was added to each well. The DMSO was mixed by pipetting and optical density was recorded using a BioTek Synergy HT microplate reader to measure the absorbance at 570 nm. Percentages of cell survival relative to vehicle control wells (wells containing only cells and DMSO) were calculated.

Stock solutions (5 mg/mL) were prepared by dissolving pure compounds in DMSO and storing at 4 °C. Serial dilutions with culture media were prepared just prior to addition to test plates. The concentration of DMSO in wells was consistent across dilutions at 0.38% v/v. Staurosporine was used as the positive control and vehicle (DMSO + media) as blank. Control and test compounds (PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, 3-O-Ac-PsU, *seco*-PsJ, *seco*-PsK and IMNGD) were assayed in duplicate for each concentration and replicated for each cell line at concentrations of 5000, 1000, 500, 100, 50, 10, 5 and 1 nM for staurosporine and 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, and 20.0 µg/mL for compounds.

3.6. Microbial Strains and Culture Media

Compounds isolated from *P. elisabethae* were tested against a panel of microorganisms including the bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 375, *Enterococcus faecalis* ATCC 10741, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14210 and the yeast *Candida albicans* ATCC 14035. Bacterial strains were cultured in Luria-Bertani Broth (LB) and *C. albicans* was cultured in Sabouraud dextrose broth (SD), for 18 h at 37 °C and 220 rpm in a humidified incubator.

3.7. Antimicrobial Assay

The antimicrobial activity was determined by a microdilution method (IC₅₀) in 96-well microtiter plates using LB media for bacteria and SD media for the yeast seeded liquid media [24]. In all cases, a pre-inoculated dilution was made with fresh broth. A volume of 180 µL of each microorganism suspension was inoculated in each well (10⁵ cells/mL) and mixed with 20 µL of treatment solutions. Stock solutions were prepared by dissolving pure compounds and controls in 20% DMSO and storing at 4 °C. Penicillin G (*S. aureus*), vancomycin (*E. faecalis*), gentamicin (*P. aeruginosa*) and nystatin

(*C. albicans*) were used as positive controls and vehicle (DMSO + media) as blank. The final DMSO concentration used for dissolving the extracts was less than 20%. Controls and test compounds (PsG, PsP, PsQ, PsS, PsT, PsU, 3-O-Ac-PsU, *seco*-PsJ, *seco*-PsK and IMNGD) were assayed in duplicate for each of the following concentrations: 64.0, 32.0, 16.0, 4.0, 1.0, 0.25 and 0.06 µg/mL.

Microplates were incubated for 24 h at 37 °C and optical density was recorded using a BioTek Synergy HT microplate reader to measure the absorbance at 600 nm. For each experiment, correction for background absorbance was made by subtracting the value for OD₆₀₀ after the compounds were added (time 0 h). Percentages of microorganism survival relative to vehicle control wells (wells containing only microorganism and DMSO) were calculated. The IC₅₀ of the controls were also determined in parallel experiments in order to control for the sensitivity of the standard test organisms.

3.8. Statistical Analysis

Data were normalized and analyzed using non-linear regression to elucidate IC₅₀ values from sigmoidal dose-response curves. Comparison between cell lines and microorganisms used extra sum-of-squares F test to evaluate IC₅₀ between data sets. P < 0.05 was considered as indicative of significance using GraphPad Software, Prism V. 5.0.

4. Conclusions

All results presented here contribute to the demonstration that the compounds isolated from *P. elisabethae* (SW Caribbean) are promising molecules with potentially useful antimicrobial activity profiles. This confirms that this marine organism has great value as a source of lead compounds with pharmaceutical applications. Specifically, PsU, PsQ, PsS, *seco*-PsK and PsG are the most promising anti-bacterial agents. For this reason, it will be interesting to continue with molecular targeted high-throughput screens in order to understand their mechanism of action.

Acknowledgements

This work was partially financed by grants from Colciencias and Universidad Nacional de Colombia. The Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial granted permission (permission No. 4 of 10/02/2010) for collecting samples and performing the research on *P. elisabethae* at the archipelago of San Andrés and Providencia, Colombian Caribbean. R. Kerr gratefully acknowledges financial support from the Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC), the Canada Research Chair Program, the University of Prince Edward Island, the Atlantic Innovation Fund, and the Jeanne and Jean-Louis Lévesque Foundation.

References

1. Marrero, J.; Rodriguez, I.I.; Rodriguez, A.D. The natural products chemistry of the gorgonian genus Pseudopterogorgia (Octocorallia:Gorgoniidae). In *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, 1st ed.; Mander, L., Liu, H.-W., Eds.; Elsevier: Oxford, UK, 2010; Volume 2, pp. 363–428.

2. Heckrodt, T.J.; Mulzer, J. Marine Natural Products from *Pseudopterogorgia elisabethae*: structures, biosynthesis, pharmacology, and total synthesis. In *Natural Products Synthesis II*, 1st ed.; Mulzer, J., Ed.; Springer Berlin Heidelberg: New York, NY, USA, 2005; Volume 244, pp. 1–41.
3. Look, S.A.; Fenical, W.; Jacobs, R.S.; Clardy, J. The pseudopterოსins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, *83*, 6238–6240.
4. Roussis, V.; Wu, Z.; Fenical, W.; Strobel, S.A.; van-Duyne, D.; Clardy, J. New antiinflammatory pseudopterოსins from the marine octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 4916–4922.
5. Ata, A.; Win, H.Y.; Holt, D.; Holloway, P.; Segstro, E.P.; Jayatilake, G.S. New antibacterial diterpenes from *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 1090–1098.
6. Hoarau, C.; Day, D.; Moya, C.; Wu, G.; Hackim, A.; Jacobs, R.S.; Little, R.D. *iso*-PsE, a new pseudopterოსin. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 4604–4606.
7. Duque, C.; Puyana, M.; Narvaez, G.; Paz, A.; Osorno, O.; Hara, N.; Fujimoto, Y. Pseudopterოსins P-V. New compounds from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* from Providencia Island, Colombian Caribbean. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10627–10635.
8. Ata, A.; Kerr, R.G.; Moya, C.E.; Jacobs, R.S. Identification of anti-inflammatory diterpenes from the marine gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 4215–4222.
9. Puyana, M.; Narvaez, G.; Paz, A.; Osorno, O.; Duque, C. Pseudopterოსin content variability of the purple sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae* at the Islands of San Andrés and Providencia (SW Caribbean). *J. Chem. Ecol.* **2004**, *30*, 1183–1201.
10. Duque, C.; Puyana, M.; Castellanos, L.; Arias, A.; Correa, H.; Osorno, O.; Asai, T.; Hara, N.; Fujimoto, Y. Further studies on the constituents of gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andrés and Providencia islands, Colombian Caribbean: isolation of a putative biosynthetic intermediate leading to erogorgiane. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 4205–4213.
11. Rodríguez, I.I.; Shi, Y.-P.; García, O.J.; Rodríguez, A.D.; Mayer, A.M.S.; Sánchez, J.A.; Ortega, E.; González, J. New pseudopterოსin and *seco*-pseudopterოსin diterpene glycosides from two Colombian isolates of *Pseudopterogorgia elisabethae* and their diverse biological activities. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1672–1680.
12. Look, S.A.; Fenical, W. The *seco*-pseudopterოსins: new anti-inflammatory diterpene-glycosides from a Caribbean gorgonian octocoral of the genus *Pseudopterogorgia*. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 3363–3370.
13. Ferns, T.A.; Kerr, R.G. Identification of amphilectosins as key intermediates in pseudopterოსin biosynthesis. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 6152–6152.
14. Duque, C. *Pseudopterogorgia elisabethae* de San Andrés y Providencia, una pluma de mar con excelente potencial como fuente de productos naturales con aplicación industrial. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **2010**, *34*, 89–103.
15. Potts, B.C.; Faulkner, D.J. Phospholipase A2 inhibitors from marine organisms. *J. Nat. Prod.* **1992**, *55*, 1707–1717.

16. Mayer, A.M.S.; Jacobson, P.B.; Fenical, W.; Jacobs, R.S.; Glaser, K.B. Pharmacological characterization of the pseudopterins: novel anti-inflammatory natural products isolated from the Caribbean soft coral *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Life Sci.* **1998**, *62*, PL 401–407.
17. Kijoa, A.; Sawanwong, P. Drugs and cosmetics from the sea. *Mar. Drugs* **2004**, *2*, 72–82.
18. Gross, H.; König, G.M. Terpenoids from marine organisms: unique structures and their pharmacological potential. *Phytochem. Rev.* **2006**, *5*, 115–141.
19. Haefner, B. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discov. Today* **2003**, *8*, 536–544.
20. Mayer, A.M.S.; Glaser, K.B.; Cuevas, C.; Jacobs, R.S.; Kem, W.; Little, R.D.; McIntosh, J.M.; Newman, D.J.; Potts, B.; Shuster, D.E. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol. Sci.* **2010**, *31*, 255–265.
21. Correa, H.; Valenzuela, A.L.; Ospina, L.F.; Duque, C. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *J. Inflamm.* **2009**, *6*, doi: 10.1186/1476-9255-6-5.
22. Mosmann, T.J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63.
23. Bugelski, P.J.; Atif, U.; Molton, S.; Toeg, I.; Lord, P.G.; Morgan, G. A strategy for primary high throughput cytotoxicity screening in pharmaceutical toxicology. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 1265–1272.
24. Vasková, Z.; Stachová, P.; Krupková, L.; Hudecová, D.; Valigura, D. Bis(nitrobenzoato)copper(II) complexes with nicotinamide, preparation, structure and properties. *Acta Chim. Slov.* **2009**, *2*, 77–87.
25. Morton, L.H.G.; Greenway, D.L.A.; Gaylarde, C.C.; Surman, S.B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *Int. Biodeter. Biodegr.* **1998**, *41*, 247–259.

Samples Availability: Available from the authors.

© 2011 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

RÁPIDA CONSTRUCCIÓN DE UNA LIBRERÍA DE LOS PRODUCTOS DE CULTIVO DE 14 BACTERIAS DEL *PHYLUM* FIRMICUTES SIMBIONTES DEL OCTOCORAL *PSEUDOPTEROGORGIA* *ELISABETHAE* DE LA ISLA DE PROVIDENCIA (CARIBE SUR-OCCIDENTAL)

Hebelin Correa¹, Fabrice Berrué², Brad Haltli², Carmenza Duque^{1,*}, Russell Kerr^{2,3*}

Resumen

Correa H., F. Berrué, B. Haltli, C. Duque, R. Kerr: Rápida construcción de una librería de los productos de cultivo de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* de la isla de Providencia (Caribe Sur-occidental). Rev. Acad. Colomb. Cienc. **35** (136): 337-348, 2011. ISSN 0370-3908.

El presente trabajo, describe el desarrollo de una estrategia metodológica para acelerar y simplificar la detección e identificación de los compuestos producidos en cuatro medios de cultivo diferentes, por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* de la Isla de Providencia, Caribe Sur-Occidental. El proceso involucró la miniaturización de los cultivos bacterianos, la extracción en fase sólida de los productos usando la resina Diaion™ HP-20, el análisis por UPLC-MS de los mismos y finalmente la generación de una librería que permitió descartar los componentes o productos de descomposición de los medios de cultivo, además de detectar 46 compuestos producidos por el total de las bacterias y la posterior identificación de 10 de ellos, haciendo uso de la base de datos Antibase 2007™ como herramienta de derreplicación de las sustancias detectadas.

Palabras clave: librería de productos producidos por bacterias del *phylum* Firmicutes; *screening* químico de productos de cultivo de bacterias del *phylum* Firmicutes; Bacterias asociadas con *Pseudopterogorgia elisabethae*; UPLC-MS; Identificación por Antibase 2007™.

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

² Department of Chemistry, University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, C1A 4P3, Charlottetown, PEI, Canadá.

³ Department of Biomedical Sciences, University of Prince Edward Island, 550 University Avenue, C1A 4P3, Charlottetown, PEI, Canadá.

* E-mails: rkerr@upei.ca (R.K.); cduqueb@unal.edu.co (C.D.)

Abstract

This paper describes a convenient strategy to accelerate and simplify the detection and identification of compounds produced in four different culture media, by 14 bacteria of the *phylum* Firmicutes, symbionts of the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at Providencia Island, South-West Caribbean. The process involved: bacterial culture miniaturization, solid phase extraction of the products using the resin Diaion™ HP-20, the analysis by UPLC-MS of the products and finally the generation of the library, that allows to discard culture media components detecting 46 compounds produced by all bacteria and the subsequent identification of 10 of them, using the database Antibase 2007™ as a tool for dereplication of these substances.

Key words: library of the products produced by bacteria belonging to the *phylum* Firmicutes; chemical screening of compounds produced by bacteria belonging to the *phylum* Firmicutes; *Pseudopterogorgia elisabethae*-associated bacteria; UPLC-MS; Identification by Antibase 2007™.

Introducción

Desde el descubrimiento de la penicilina y su producción a gran escala durante la segunda guerra mundial, los microorganismos han sido objeto de múltiples estudios motivados por la gran variedad de compuestos y medicamentos que son producidos a partir de ellos (Berdy, 2005). Específicamente, para el caso de los microorganismos marinos, a pesar de que fueron inicialmente detectados en simbiosis con invertebrados desde hace muchos años, no fue sino hasta la década de los ochenta cuando el número de publicaciones de productos naturales a partir de ellos aumentó vertiginosamente, hasta el punto de igualar el número de compuestos publicados por año, al de los aislados a partir de cnidarios (Blunt *et al.* 2009), convirtiéndose además en una fuente renovable de sustancias con estructura química novedosa, sin contraparte con los reportados para otros organismos marinos o terrestres, y con un alto potencial biomédico e industrial (Blunt *et al.* 2011; Newman y Hill 2006; Piel, 2006).

Generalmente, los microorganismos marinos pueden encontrarse en forma libre o en organizaciones simbióticas con invertebrados, desarrollando adaptaciones más especializadas, estables, y específicas al microambiente creado por el organismo hospedero (Egan *et al.* 2008), allí son en gran parte los responsables del ciclo de nutrientes, así como también de la producción de moléculas bioactivas, las cuales pueden estar involucradas en la prevención de la depredación y colonización del holobionte por otros microorganismos y macroorganismos (Mydlarz *et al.* 2010; Mouchka *et al.* 2010).

Actualmente, el estudio de obtención de compuestos naturales a partir microorganismos comprende inicialmente su cultivo en lo posible en diferentes condiciones, seguido de la extracción y fraccionamiento de los compuestos

producidos, su identificación y posterior conservación tanto de mezclas como de los compuestos puros en librerías (Penesyan *et al.* 2010), las cuales son mucho más diversas en cuanto a la clase de compuestos presentes en ellas (posibles nuevos compuestos, diferentes tipos de esqueleto de carbono y diferente estereoquímica), en comparación a las librerías existentes de compuestos sintéticos (Ito *et al.* 2011). Sin embargo, con el fin de evitar el largo proceso de aislamiento e identificación de compuestos con estructuras nuevas o conocidas y con actividad biológica, que se presenta como uno de los principales retos a enfrentar por parte de los científicos de productos naturales, se prefiere utilizar la combinación cultivos microbianos miniaturizados con técnicas de análisis como UPLC-MS (Cromatografía líquida de ultraeficiencia acoplada a espectrometría de masas) para la construcción de dichas librerías, como un procedimiento de derreplicación mucho más rápido y conveniente que solo hasta ahora se está empezando a usar para la identificación temprana de fuentes alternas de compuestos nuevos o conocidos con actividad biológica (Berrue *et al.* 2011). Sin embargo, es importante anotar que la investigación tradicional partiendo del escalamiento del cultivo, seguido de extracción, aislamiento por métodos cromatográficos convencionales y determinación estructural por los métodos espectroscópicos usuales, sigue siendo el único método para la identificación inequívoca de las sustancias producidas por microorganismos.

Por otro lado, en el estudio de microorganismos marinos simbióticos, la cercana asociación metabólica entre los microorganismos y su hospedero hace difícil revelar cuál es el organismo u organismos responsables de la producción de un determinado metabolito, en algunos casos se ha demostrado que muchos de los productos bioactivos, atribuidos previamente a los invertebrados, son producidos

dos por sus microorganismos asociados (Flatt *et al.* 2005; Ridley *et al.* 2005; Hildebrand *et al.* 2004). Por ejemplo en el caso del briozoo *Bugula neritina* productor del macrólido briostatina, potente agente anticáncer comercial, se ha establecido que es en realidad su bacteria simbiote *Endobugula serluta* quien produce el metabolito bioactivo (Sudek *et al.* 2007). Otro ejemplo es Yondelis® un medicamento antitumoral, descubierto en el tunicado colonial *Ecteinascidia turbinata*, el cual es actualmente sintetizado a partir del precursor biosintético la ciano-safracina B producida por la bacteria *Pseudomonas fluorescens* (Mayer *et al.* 2010). También vale la pena mencionar el aislamiento de la kahalalida F, un agente anticáncer muy próximo a ser aprobado como droga comercial, a partir del cultivo de la bacteria *Vibrio* sp., este compuesto inicialmente fue aislado del molusco *Elysia rufescens* (Hill *et al.* 2007).

En el caso del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*, el cual ha sido fuente de más de 100 compuestos diferentes con estructura química novedosa y con diversas actividades biológicas (Marrero *et al.* 2010; Heckrodt y Mulzer, 2005) y particularmente el recolectado por nosotros en la Isla de Providencia (Caribe Colombiano, Sur-Occidental), del cual aislamos los compuestos PsP-V, PsG, PsK, *seco*-PsJ y *seco*-PsK (Duque *et al.* 2004, 2006) con actividades antiinflamatoria, citotóxica y antimicrobiana promisorias (Correa *et al.* 2009, 2011a), éstos no han podido continuar en fases posteriores de bioprospección para su implementación como drogas, debido a problemas de suministro, convirtiéndose éste en la mayor limitación para su posible aplicación en la industria farmacéutica y cosmética (Mayer *et al.* 2010; Newman y Hill, 2006). Por esta razón el estudio de sus microsimbiontes como posible fuente de los compuestos bioactivos mencionados resulta ser una tarea inaplazable.

Así, el presente trabajo describe el desarrollo de una estrategia o aproximación metodológica para acelerar y simplificar la identificación de los compuestos producidos por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbiotes del octocoral *P. elisabethae*, previamente caracterizadas morfológica y filogenéticamente usando la secuencia del gen ribosomal 16S rRNA (Correa *et al.* 2011b), generando una librería de los compuestos producidos por dichas bacterias cultivadas en cuatro medios diferentes. Este trabajo involucró varias etapas secuenciales: a) cultivo miniaturizado de las bacterias en placas multipozos de 5 ml b) extracción de los compuestos producidos en los cultivos c) *screening*-químico rápido de los extractos que contiene los compuestos producidos por las bacterias por UPLC-MS y d) análisis posterior por derreplicación de los productos detectados en los cultivos, usando la plataforma AntiBase 2007™.

Parte experimental

Recolección de *P. elisabethae*

Fragmentos del octocoral *P. elisabethae* fueron recolectados en la Isla de Providencia (Caribe Sur-Occidental, Colombiano) mediante buceo autónomo SCUBA a una profundidad entre 20 y 30 m en mayo de 2008 e identificados por la profesora Mónica Puyana de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Especímenes de referencia codificados como INV CNI 1612-1616, se encuentran en la colección de invertebrados del Museo de Historia Natural Marina Colombiana (MHNMC) en el Instituto de Investigaciones Marinas de Punta Betín (INVEMAR).

Bacterias simbiotes de *P. elisabethae*

Del cnidario mencionado se aislaron las bacterias simbiotes cultivables, por técnicas tradicionales de cultivo y se identificaron morfológica y filogenéticamente estudiando la secuencia del gen ribosomal 16S rRNA de acuerdo a la metodología descrita por Correa *et al.* 2011b. De las 40 bacterias simbiotes aisladas, 14 bacterias del *phylum* Firmicutes pertenecientes a las familias Bacillaceae: *Bacillus firmus* (RKHC-13), *Bacillus horneckiae* (RKHC-68A), *Bacillus licheniformis* (RKHC-21), *Bacillus mojavensis* (RKHC-37), *Bacillus pumilus* (RKHC-57A), *Bacillus anthracis* (RKHC-13), *Bacillus cereus* (RKHC-9) *Oceanobacillus profundis* (RKHC-62B) y *Oceanobacillus iheyensis* (RKHC-82A); Paenibacillaceae: *Paenibacillus glucanolyticus* (RKHC-8); y Staphylococcaceae: *Staphylococcus epidermidis* (RKHC-78A), *Staphylococcus warneri* (RKHC-78B), *Staphylococcus equorum* (RKHC-54) y *Staphylococcus auricularis* (RKHC-48), fueron utilizadas en este trabajo. Estas bacterias hacen parte de la colección de referencia codificada como RKHC (Código interno), disponible en el laboratorio de Productos Naturales Marinos del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, cuya clasificación y números de acceso en el GenBank (JQ282814-JQ282828) están reportadas en Correa *et al.* 2011b. Las bacterias fueron cultivadas en medio marino (Difco 2216) semisólido y en medio marino (Difco 2216) /glicerol (1:1) y conservadas a 4°C y a -80°C, respectivamente.

Preinóculo

Cada una de las bacterias arriba mencionadas fueron cultivadas en placas de agar sólido marino (Difco 2216) por un tiempo no mayor a 48 h, luego fueron utilizadas para realizar su correspondiente inóculo en 10 ml de medio (Difco 2216) y posteriormente incubadas en condiciones aeróbicas por un período de 48 h, a 200 rpm y a una temperatura de 37°C. Transcurrido este tiempo, el preinóculo de

cada bacteria sirvió como medio de alimentación para los posteriores cultivos.

Condiciones de cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron seleccionados de acuerdo a la fuente de carbono, nitrógeno y fosfato, además de la concentración de los mismos, con el fin de estimular la producción de metabolitos secundarios, éstos fueron caldo marino (**MB**: Peptona 5,0 g/l, Extracto de levadura 1,0 g/l, Citrato férrico 0,1 g/l, NaCl 19,45 g/l, MgCl₂ 5,9 g/l, MgSO₄ 3,24 g/l, CaCl₂ 1,8 g/l, KCl 0,55 g/l, NaHCO₃ 0,16 g/l, KBr 0,08 g/l, SrCl₂ 0,034 g/l, Ácido bórico 0,022 g/l, Silicato de sodio 0,004 g/l, NaF 0,0024 g/l, NH₄NO₃ 0,0016 g/l, Na₂HPO₄ 0,008 g/l), caldo marino mínimo (**MMB**: Glutamato de sodio 2,0 g/l, NaCl 20,0 g/l, MgSO₄·7H₂O 7,0 g/l, MgCl₂ 5,3 g/l, CaCl₂ 1,25 g/l, K₂HPO₄ 0,075 g/l, FeSO₄ 0,025 g/l, CuSO₄ 0,005 g/l, y Tris 6,1 g/l), caldo Takashi (**TAK**: Almidón 30,0 g/l, Dextrosa 5,0 g/l, Peptona 10,0 g/l, MgSO₄·7H₂O 0,5 g/l, Na₂HPO₄·12H₂O 0,5 g/l, y KH₂PO₄ 0,2 g/l) y caldo nutritivo dilución a diez (**NB/10**: Peptona 0,5 g/l y Extracto de carne 0,3 g/l). Todos los medios fueron preparados con agua desionizada y esterilizados junto con la resina Diaion™ HP-20.

Todos los cultivos se realizaron en presencia de la resina Diaion™ HP-20, la cual fue previamente activada con MeOH grado HPLC (1/2 p/v), durante un período de 4 h, a 300 rpm a temperatura ambiente, paso seguido la resina fue filtrada y lavada tres veces con agua Milli Q. Finalmente, la resina fue filtrada y agregada a los caldos de cultivo previo a su posterior esterilización.

El cultivo de las 14 bacterias se realizó en placas de poliestireno de 24 pozos de 10 ml. Doscientos cincuenta microlitros del preinóculo fueron puestos por triplicado en cada uno de los cuatro medios de cultivo empleados, paso seguido a la inoculación, las placas fueron cubiertas con una membrana transpirable estéril adhesiva de nylon, e incubadas aeróbicamente durante 96 h (MB y TAK) ó 144 h (MMB y NB/10), a 200 rpm y a 30°C. En todos los casos el volumen total de cultivo fue de 5 ml y en presencia de la resina Diaion™ HP-20 a una concentración final de 10% p/v. En todos los casos se empleó un blanco correspondiente a los medios de cultivo sin inocular, el cual sirvió como control de crecimiento y de posibles componentes del medio retenidos en la resina.

Extracción

Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, las placas se dejaron decantar con el fin de eliminar con ayuda de una micropipeta, la mayor cantidad de caldo de cultivo

y biomasa sobrenadante, posteriormente la resina Diaion™ HP-20 fue lavada tres veces con 5 ml de agua estéril desionizada, agitando las placas de cultivo a 200 rpm a temperatura ambiente por un período mínimo de 2 h entre cada lavado, con el fin de eliminar la mayor cantidad de sales y de medio retenidos en la resina. Paso seguido se realizó la extracción por duplicado con 5 ml de alcohol grado histológico (AcOEt/EtOH/MeOH 5:90:5). Para la primera extracción se dejó la resina en contacto con el solvente por un período de 3 h y la segunda durante la noche. Las fases orgánicas fueron reunidas y concentradas a presión reducida y pesadas con el fin de determinar la cantidad de extracto obtenido para cada cultivo.

Análisis por UPLC-MS

A partir del extracto crudo de cada uno de los cultivos, se prepararon diluciones de las muestras en el rango de 1-5 mg/ml con MeOH grado HPLC, para el análisis en UPLC-MS en placas de 96 pozos de 2 ml. En todos los casos se analizaron en las mismas condiciones los extractos crudos de los medios de cultivo sin inocular y un blanco de solvente (MeOH grado HPLC).

La cromatografía líquida de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS) se realizó en un cromatógrafo Thermo Scientific Accela equipado con un automuestreador Accela que permite el análisis de muestras contenidas en placas de 96 pozos. Como detectores se emplearon el detector Accela PDA (Photodiode Array) monitoreando en un rango de longitudes de onda entre 200-600 nm, el detector ELSD (Evaporative Light Scattering Detector), Sedere, Sedex LT-ELSD Modelo 80LT a una temperatura de 35°C, y finalmente un MS (Mass Spectrometer), espectrómetro de masas lineal de trampa de iones Thermo Scientific LTQ en modo de ionización química a presión a atmosférica (APCI), utilizando como gas nebulizador nitrógeno. Se detectaron iones positivos con masas entre 50 y 2000 u. La columna cromatográfica empleada fue una ACQUITY UPLC BEH C18, 2.1 x 50 mm, 1.7 µm. Se inyectaron en todos los casos 20 µl de muestra, utilizando como fase móvil un gradiente discontinuo de polaridad con MeOH modificado con ácido fórmico al 0.1% (SOL 1) y agua modificada con ácido fórmico al 0.1% (SOL 2). Se empleó el siguiente programa: tiempo 0.0 min, SOL 1/SOL 2 5:95, flujo 500 µl/min; 1.20 min, SOL 1/SOL 2 95:5, 500 µl/min; 5.00 min, SOL 1 100%, 500 µl/min; 5.20 min, SOL 1 100%, 900 µl/min; 8.50 min, SOL 1 100%, 900 µl/min; 8.70 min, SOL 1 100%, 600 µl/min; 8.90 min, SOL 1/SOL 2 5:95, 900 µl/min; 9.00 min SOL 1/SOL 2 5:95, 600 µl/min y 10 min SOL 1/SOL 2 5:95, 600 µl/min.

Análisis de los cromatogramas

Una vez que todas las muestras (extractos de las 14 bacterias en 4 medios diferentes por triplicado, junto con los controles de medios y de MeOH. Total: 192 inyecciones) fueron analizadas por UPLC-MS, se procedió a buscar en cada uno de los cromatogramas sustancias que presentaran señal tanto en el ELSD como en el detector de masas, registrando su tiempo de retención junto con el ion $[M+H]^+$ del espectro de masas, y anotando en cada caso si el compuesto era también visible en el detector PDA, debido a grupos cromóforos en su estructura. En total se lograron identificar 593 señales distintas en los cromatogramas para todo el conjunto de inyecciones, éstas sirvieron para generar el primer insumo de la base de datos aquí reportada haciendo uso del software Xcalibur™, del equipo de UPLC-MS, el cual realiza la búsqueda simultánea de determinada sustancia con un tiempo de retención y una masa establecida, en todos los cromatogramas, y genera una gráfica en tres dimensiones, donde se relaciona, la muestra (bacterias, medios sin inocular y metanol) vs. medios de cultivo, vs. el área bajo la curva. El haber realizado el cultivo de cada bacteria por triplicado, sirvió para descartar posibles falsos positivos. El análisis de las gráficas permitió establecer cuáles de las 593 señales corresponden a ruido en el equipo (presente en todos los cromatogramas), a contaminación de la columna (presente en los cromatogramas del MeOH) y a componentes del medio remanentes en la resina HP-20 (presente en los cromatogramas del medio). Así, se logró determinar que de las 593 señales, tan solo 46 correspondían a verdaderos productos naturales producidos por las bacterias de manera selectiva. Paso seguido se verificó para cada una de las 46 señales que el ión inicialmente observado correspondía realmente al ión $[M+H]^+$.

Aunque el proceso de selección del ión molecular no es fácil, éste se hizo teniendo en cuenta las siguientes consideraciones (Ardrey, 2003): i) la técnica de ionización fue APCI y ésta favorece la formación de especies moleculares con muy poca fragmentación, ii) Se añadió a la fase móvil el modificador ácido fórmico, el cual ayuda a la protonación de las especies moleculares, favoreciendo la formación de iones $[M+H]^+$ intensos, iii) Luego de seleccionar alguno de los iones presentes en el espectro como ión molecular, se buscaron iones correspondientes a pérdidas lógicas o a iones aductos lógicos, entre ellos $[M+H+Na]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+H+K]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Na+K]^+$, $[M+H+CH_3OH]^+$, $[M+Na+CH_3OH]^+$, $[M+HCOOH]^+$, típicos en este tipo de análisis, iv) Se buscó la ayuda del software Xcalibur™ con la opción de hacer la reconstrucción de los cromatogramas de cada uno de los iones que no coincidie-

ran con pérdidas o aductos lógicos a partir del ión molecular seleccionado (RICs, por sus siglas en inglés de Reconstructed ion chromatograms), para descartar si eran productos del ruido de fondo, v) Se verificó que las pérdidas lógicas encontradas en el espectro de masas fueran congruentes con los iones de fragmentación encontrados en los espectros hijos del ión seleccionado como $[M+H]^+$. Si bien este análisis se hizo con la mayor rigurosidad, es importante aclarar que el ion seleccionado como $[M+H]^+$, mostrado en la Tabla 1, es solo aquel que mayor probabilidad tiene de serlo.

Análisis por derreplicación usando Antibase 2007™

Para los 46 productos naturales detectados se realizó una búsqueda en la base de Datos Antibase 2007™ (contiene información espectroscópica de los diferentes compuestos aislados a partir de algas, microorganismos y hongos mayores incluyendo levaduras, ascomicetos, basidomicetos, y líquenes) de sustancias reportadas en la literatura con igual $[M+H]^+$, estableciendo en cada caso cuantos de esas reportes vienen de bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*.

Resultados y análisis de resultados

La detección e identificación rápida (*screening* químico) de los compuestos producidos por 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *P. elisabethae* se realizó utilizando una estrategia metodológica que involucra las siguientes etapas secuenciales: a) cultivo miniaturizado en placas de 24 pozos con un volumen de 5 ml b) extracción en fase sólida de los compuestos producidos en los cultivos c) Análisis por UPLC-MS de los extractos obtenidos en el paso b y d) Análisis por derreplicación de los productos detectados en los cultivos, usando la plataforma AntiBase 2007™. Con esta información se construyó una librería que consta de los productos de cultivo del conjunto de bacterias estudiadas en cuatro medios diferentes y la posterior identificación por derreplicación de algunas de las sustancias previamente reportadas, así como también una primera aproximación a la búsqueda de la mejor fuente y las mejores condiciones de cultivo para la producción de las sustancias presentes en la librería.

Cultivo miniaturizado de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes y extracción de los productos

La realización de 180 cultivos miniatura en paralelo (volumen de 5 ml en placas de 24 pozos) de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *P. elisabethae*, en cuatro medios diferentes por triplicado además del blan-

co de cultivo (medio sin inocular), permitió reducir significativamente el tiempo, gasto de reactivos y ahorro de esfuerzo. Adicionalmente, con el fin de maximizar la cantidad de sustancias adsorbidas una vez liberadas por las bacterias al medio, los cultivos se llevaron a cabo en presencia de la resina Diaion™ HP-20, un adsorbente poliaromático selectivo para compuestos hidrofóbicos (Li y Chase, 2010), que además los separa de las sales presentes en el medio; su principal ventaja frente a otras resinas es su gran área superficial (~500 m²/g) lo que le confiere una mayor capacidad de adsorción. Los rendimientos de extracción variaron dependiendo del medio de cultivo empleado, así para medios ricos en nutrientes, MB y TAK se obtuvieron rangos de cantidad de extracto entre 3-10 mg y 5-15 mg respectivamente, mientras que para los cultivos en medios bajos en nutrientes, NB/10 y MMB los rangos estuvieron entre 0-1 mg y 1-2 mg respectivamente.

En la fase del cultivo se manejó como única variable la composición del medio, usando dos ricos en nutrientes (MB y TAK) y dos bajos en nutrientes (MMB y NB/10) y se mantuvieron constantes factores tales como la temperatura y aireación (agitación). Es importante anotar que en nuestro diseño experimental, la selección del tiempo de incubación estuvo más encaminada a garantizar que el tiempo empleado fuera el necesario para que las bacterias llegaran a su fase exponencial de crecimiento (mayor rendimiento de productos), particularmente en los medios bajos de nutrientes (MMB y NB/10) donde se necesitó un mayor tiempo de incubación.

La extracción en fase sólida utilizada en esta aproximación metodológica permitió mayores rendimientos y menores costos en el proceso total, debido a que los compuestos de interés fueron retenidos selectivamente en la resina. Al comparar esta metodología con la que utiliza extracción con solventes se evidencia que en esta última son necesarios pasos adicionales para eliminar impurezas tales como sales y componentes del medio de cultivo.

Análisis de los compuestos presentes en los extractos de cultivo de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes usando UPLC-MS e identificación por derreplicación usando Antibase 2007™

El análisis químico simultáneo a partir de extractos crudos de un número elevado de muestras sólo recientemente ha sido posible con el advenimiento de la tecnología UPLC-MS que permite el análisis de un gran número de muestras en un período corto, al tiempo que la sensibilidad y resolución de la técnica ha aumentado (Toyo'oka, 2008; Yao *et al.* 2010). Si bien, el proceso de preparación de medios, preinóculo y cultivo *per se*, implican varios días de traba-

jo, la inyección de las muestras y el análisis de los datos obtenidos por UPLC-MS es el paso crucial de esta metodología aunque su tiempo de análisis sea menor. Por ejemplo en este trabajo se pudo analizar por UPLC-MS una placa de 96 pozos en menos de un día empleando aproximadamente 10 min por muestra en el instrumento, esta rápida detección química de los productos de cultivo de las bacterias es uno de los mayores aportes realizados con este diseño experimental.

Una vez todos los cultivos fueron extraídos, los extractos fueron dispuestos en las placas de 96 pozos a una concentración entre 1-5 mg/ml usando como disolvente MeOH grado HPLC, a un volumen final de 1 ml y analizados por UPLC-MS, en una micro columna de alta resolución en fase reversa. Las separaciones fueron monitoreadas con dos detectores universales: ELSD y MS y un detector específico PDA para sustancias con grupos cromóforos en el rango de 200-600 nm. En total se analizaron 192 muestras (168 extractos de los cultivos de las 14 bacterias en cuatro medios por triplicado más 12 extractos de los controles de los cuatro medios por triplicado y 12 blancos de solvente), un ejemplo particular de estos resultados se muestra en la Figura 1.

La Figura 1 muestra el análisis UPLC-MS de los productos de cultivo de la bacteria *Bacillus firmus* (RKHC-13) en MB. Para claridad de presentación de resultados la Figura 1 está dividida en cinco secciones: **1A**: muestra el perfil cromatográfico del extracto de los productos de cultivo monitoreado por los tres detectores empleados PDA, ELSD y MS. **1B** y **1C**: Muestran los espectros de masas en modo APCI de los compuestos con tiempo de retención 4.37 min y 5.24 min, con $[M+H]^+$ en m/z 491.2 y 373.3, respectivamente. Finalmente en **1D** y **1E**: muestran las gráficas generadas por Xcalibur™ para estos dos compuestos, mostrando en el eje X los medios utilizados MB, TAK, MMB y NB/10 por triplicado, en el eje Y las 14 bacterias cultivadas junto con el control del medio sin inocular y MeOH como blanco de solvente y en el eje Z el área bajo la curva de la señal de la sustancia estudiada.

Cada una de las 192 muestras fue estudiada en búsqueda de los productos de cultivo de las bacterias, en la manera descrita anteriormente. Así, se pudieron detectar 593 compuestos en total, sin embargo, para verificar que éstos correspondían realmente a sustancias producidas selectivamente por las bacterias, se generó la librería de los compuestos producidos por las bacterias del *phylum* Firmicutes a través del software Xcalibur™, teniendo en cuenta el tiempo de retención y el ión $[M+H]^+$ de cada uno de los compuestos detectados. Una vez generada dicha librería,

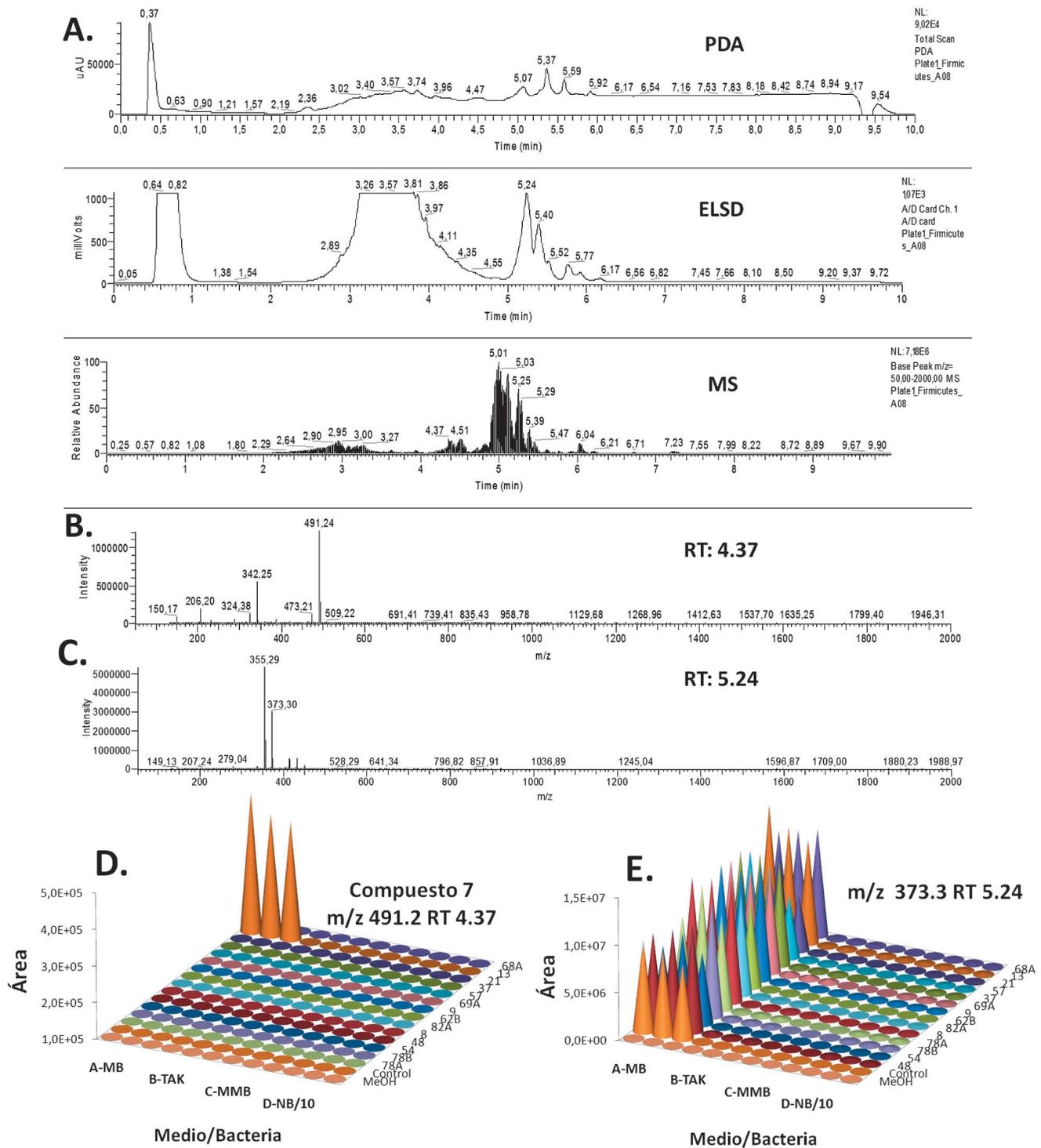


Figura 1. Análisis UPLC-MS de los productos de cultivo de la bacteria *Bacillus firmus* (RKHC-13) en MB. **1A:** Perfil cromatográfico (detectores PDA, ELSD y MS) de los productos de cultivo. **1B:** Espectro de masas en modo APCI del compuesto 7 con tiempo de retención 4.37 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 491.2. **1C:** Espectro de masas en modo APCI del compuesto con tiempo de retención 5.24 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 373.3. **1D:** Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la cantidad de sustancia 7 con tiempo de retención 4.37 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 491.2 **1E:** Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la cantidad de sustancia con tiempo de retención 5.24 min con un ión $[M+H]^+$ en m/z 373.3. Medios n=3, Bacterias: 14 cepas junto con el control del medio sin inocular y MeOH como blanco de solvente.

el software es capaz de buscar en todos los cromatogramas la presencia de cada señal a través de la detección del ion $[M+H]^+$ con un tiempo de retención determinado, de manera cuantitativa a través de la medición del área bajo la curva de la señal en los cromatogramas, permitiendo al usuario visualizar de manera sencilla que bacteria y en qué condiciones son producidos cada uno de los 593 compuestos.

La Figura 1D muestra cómo la sustancia 7 con tiempo de retención 4.37 min con $[M+H]^+$ en m/z 491.2 es producida únicamente por la bacteria *B. firmus* (RKHC-13) en medio MB, mientras que la sustancia con tiempo de retención 5.24 min con $[M+H]^+$ en m/z 373.3 (Figura 1E) fue detectada en todos los extractos de todos los cultivos en MB de las 14 bacterias así como también en el extracto del control del medio, pero no en los blancos de solvente ni en los extractos de los cultivos realizados en otros medios, indicando que esta sustancia corresponde a un componente del medio MB.

Al analizar cada una de las 593 gráficas generadas por el software Xcalibur™, se logró determinar cuáles sustancias corresponden a componentes del medio (gráficas similares a la Figura 1E) y cuales corresponden a sustancias producidas selectivamente por las bacterias (gráficas similares a la Figura 1D) logrando detectar en total 46 diferentes productos naturales.

La Tabla 1 muestra la librería de compuestos detectados como productos de cultivo de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbiotes aisladas del octocoral *P. elisabethae*, mostrando en cada caso, su tiempo de retención, el ion $[M+H]^+$, la bacteria o bacterias que producen dicho compuesto y el medio o medios en que fue producido. Adicionalmente, para cada una de las sustancias detectadas se realizó la búsqueda de su ion $[M+H]^+$ en la base de datos Antibase™ 2007, suministrando para cada sustancia el número total de compuestos reportados en la literatura y el número de compuestos reportados para los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus* con igual ion $[M+H]^+$, sin considerar el tiempo de retención como criterio de acotamiento. Es importante aclarar que la búsqueda se puede realizar con otros iones pseudomoleculares o aductos tales como $[M-H]^-$ y $[M+Na]^+$ de los compuestos de origen microbiano.

Para la mayoría de las sustancias presentes en la librería existen más de 10 compuestos en total reportados con el mismo ion $[M+H]^+$, por esta razón llegar a aseverar cuál de esos compuestos corresponde a cada una de las sustancias detectadas con la información hasta este punto es una tarea imposible. Sin embargo, de acuerdo a estudios previos de bacterias del mismo género y revisando la bi-

bliografía se puede llegar a una primera aproximación acerca de la estructura de la sustancia o del tipo de sustancia detectada. Un ejemplo, es el caso de la sustancia 5 detectada como producto en los cultivos de las bacterias *Bacillus pumilus* (RKHC-57) y *Bacillus mojavensis* (RKHC-37) en MB, TAK y NB/10, que presenta un ion $[M+H]^+$ en m/z 425.3, para la cual hay reportados en total 99 compuestos, pero de ellos solo 2 han sido aislados a partir de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* y específicamente uno de ellos la amicoumacina B (Figura 2) fue aislada previamente del cultivo en MB de la cepa *B. pumilus* (SP21), encontrada en sedimentos recolectados en Las Bahamas (Berrue *et al.* 2009). De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta que la sustancia 5 fue detectada en nuestra cepa *B. pumilus* (RKHC-57) podríamos sugerir que ésta corresponde a la amicoumacina B.

De esta manera sugerimos la estructura para 10 de los 46 compuestos (Figura 2) encontrados en nuestra librería, no obstante vale la pena aclarar que hasta no realizar la comparación con patrones de referencia, y el escalamiento y posterior aislamiento e identificación de dichas sustancias no se llegará a la identificación inequívoca de las mismas. Trabajos en esta dirección están siendo llevados a cabo en nuestro laboratorio. Sin embargo, esta primera aproximación se convierte en una ventaja ingente en la identificación preliminar del tipo de sustancias que son producidas por cada una de las 14 bacterias del *phylum* Firmicutes estudiadas y qué medios de cultivo favorecen la producción de las mismas.

Otra ventaja de construir este tipo de librerías, es conocer bajo qué condiciones son producidas las sustancias presentes en ella. Un par de ejemplos se presentan en la Figura 3. El primero se refiere a la producción del compuesto 16 con tiempo de retención de 5.74 min con un ion $[M+H]^+$ en m/z 853.4, el cual es producido únicamente por la bacteria *B. pumilus* (RKHC-57) en los medios MB, TAK y NB/10, siendo mayor su producción en medio MB y NB/10 (Figura 3A). Al parecer, la producción de este metabolito no depende de la cantidad de nutrientes presentes en el medio, debido a que fue producido en un medio con baja concentración de nutrientes como NB/10, por el contrario su producción si dependerá de que tan fácilmente sean digeridas sus fuente de carbono, en este caso los medios MB y NB/10 utilizan extracto de levadura y de carne respectivamente, mientras que TAK utiliza como fuente de carbono almidón soluble el cual es poco digerible. Adicionalmente, la adición de peptona es un factor crucial en la producción de la sustancia 16, debido a que ésta no fue detectada en el medio MMB que no contiene peptona (Figura 3A).

Tabla 1. Librería de compuestos detectados como productos de cultivo en los medios MB, TAK, MMB y NB/10 de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbiotes del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*.

Compuesto Nº	[M+H] ⁺ m/z	RT	<i>Bacillus</i>							<i>Oceanobacillus</i>		<i>Paenibacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>				Nº compuestos reportados en Antibase		
			21	68A	13	9	57	69 ^a	37	62B	82A	8	54	48	78A	78B	Totales ^a	Genero ^b	
1	226.2	2.78				MMB												10	0
2	226.2	3.15			MMB	MMB					MMB							10	0
3	619.2	3.81		MB	MB	MB			MB TAK	MB TAK	TAK	TAK						46	0
4	424.4	4.05							MB	MB								23	3
5	425.3	4.13							MB TAK NB/10	MB TAK NB/10								99	2
6	799.3	4.18										MB						9	0
7	491.2	4.37			MB													29	0
8	411.0	4.5	MB TAK	MB TAK														106	1
9	256.2	4.98	MB TAK	MB TAK														15	0
10	419.3	4.6	MB TAK NB/10	MB TAK NB/10						MB TAK NB/10	MB TAK NB/10							67	0
11	419.2	4.75	MB TAK NB/10	MB TAK NB/10						MB TAK NB/10	MB TAK NB/10							67	0
12	186.2	5.04						TAK NB/10		TAK NB/10								12	0
13	274.4	5.31	MMB	MMB														14	0
14	724.4	5.34							TAK									12	0
15	478.2	5.55										MB						35	0
16	853.4	5.74						MB TAK NB/10										18	0
17	1036.6	5.76						MB		MB								15	10
18	1080.6	5.76						MB		MB								6	0
19	1050.6	5.83						MB										13	7
20	1078.5	6.05						MB										11	0
21	1072.8	5.86						MB NB/10										15	4
22	737.6	5.89						MB										11	0
23	758.6	6.07						MB TAK NB/10										15	0
24	1036.6	6.16						MB MMB		MMB								15	10
25	551.6	7.17				TAK	TAK			TAK								46	1
26	537.4	7.53			TAK													43	0
27	531.2	2.66	TAK	MB TAK	MB	MB				MB								74	0
28	600.2	2.7	TAK	TAK						MB								20	0
29	527.2	2.93	TAK	MB TAK	MB	MB			MB	MB								52	0
30	222.2	3.89	MB TAK	MB TAK	MB	MB			MB	MB		MB						14	1
31	543.3	3.59	TAK	TAK														19	1
32	343.4	4.22	MB TAK	MB TAK	MB	MB			MB	MB		MB						89	1
33	206.3	4.48	MB TAK NB/10	MB TAK NB/10	MB	MB			MB	MB		MB						16	0
34	291.0	3.98							MB TAK		TAK	TAK			TAK	TAK		101	0
35	308.1	3.98							MB TAK		TAK	TAK			TAK	TAK		27	0
36	463.0	4.50							MB TAK		TAK	TAK			TAK	TAK		45	2
37	463.2	4.29							MB TAK		TAK	TAK			TAK	TAK		45	2
38	549.2	4.52							MB TAK		TAK	TAK			TAK	TAK		48	1
39	549.0	4.65							MB TAK		TAK	TAK			TAK	TAK		48	1
40	635.0	4.78							MB TAK		TAK	TAK			TAK	TAK		27	2
41	721.0	4.91							MB TAK		TAK	TAK			TAK	TAK		8	0
42	1065.0	5.11							MB TAK		TAK	TAK			TAK	TAK		8	7
43	807.0	4.92							MB TAK		TAK				TAK	TAK		14	0
44	675.3	5.12							TAK		TAK NB/10	TAK NB/10		NB/10	NB/10	NB/10		19	0
45	495.6	8.43	TAK	TAK					TAK		TAK	TAK			TAK	TAK		56	0
46	1094.8	5.88						MB TAK NB/10			MB	MB		MB	MB	MB	MB	7	0

^a. Número total de compuestos reportados en la base de datos Antibase 2007.

^b. Número de compuestos reportados para especies a los géneros *Bacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus* y *Staphylococcus*. Medios de cultivo: MB: Caldo marino, TAK: Caldo Takashi, MMB: Caldo mínimo marino y NB/10: Caldo nutritivo dilución a diez.

Otro caso es el de sustancia **5** con tiempo de retención 4.13 min con un ion [M+H]⁺ en m/z 425.3, la cual es producida por las bacterias *B. pumilus* (RKHC-57) y *B. mojavensis* (RKHC-37) en tres de los cuatro medios utilizados, siendo *B. pumilus* (RKHC-57) cultivada en MB donde mayor can-

tidad de sustancia fue detectada. Al parecer, la producción de este metabolito por *B. pumilus* (RKHC-57) al igual que en el ejemplo anterior no depende de la cantidad de nutrientes presentes en el medio y si de la adición de peptona en el medio de cultivo. Además, la adición de sa-

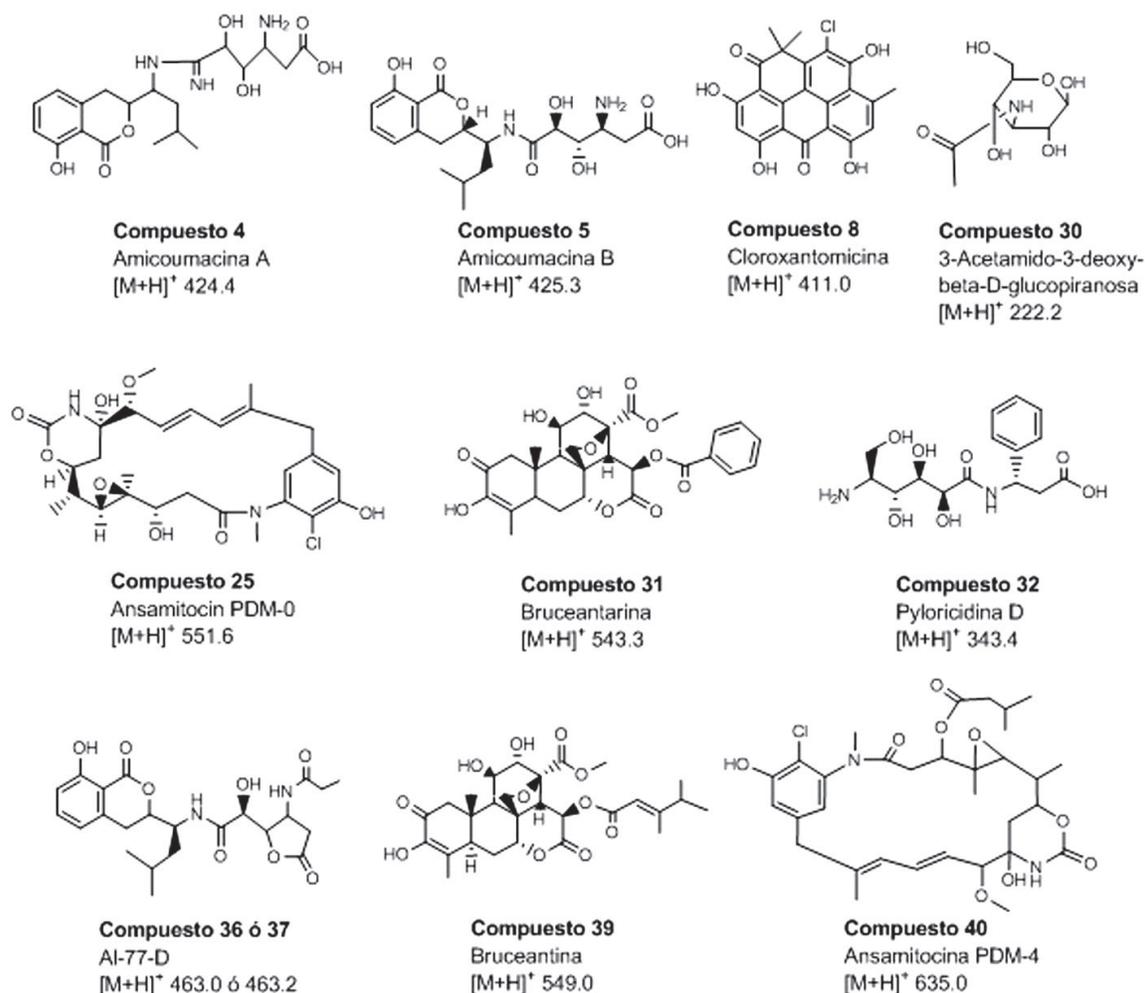


Figura 2. Estructuras propuestas para 10 de los compuestos encontrados en la librería de las 14 bacterias del phylum Firmicutes simbiotes del octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*.

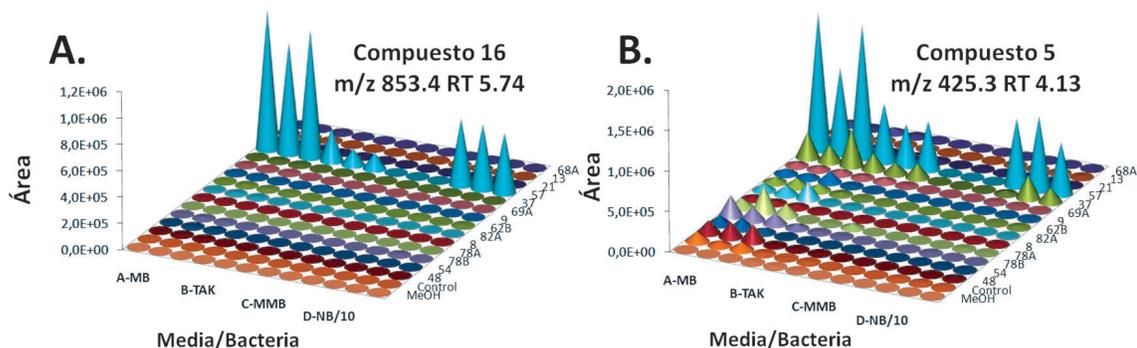


Figura 3. Análisis comparativo Medio vs. Bacteria vs. Área de la producción selectiva de algunas sustancias presentes en la librería. **A.** Compuesto 16 con tiempo de retención 5.74 min y un ión [M+H]⁺ en m/z 853.4 producido únicamente por la bacteria *Bacillus pumilus* (RKHC-57) en varios medios. **B.** Compuesto 5 con tiempo de retención 4.13 min con un ión [M+H]⁺ en m/z 425.3 producido por las bacterias *Bacillus pumilus* (RKHC-57) y *Bacillus mojavensis* (RKHC-37) en varios medios. Medios n=3, Bacterias: 14 cepas junto con el control del medio sin inocular y MeOH como blanco de solvente.

les en el medio de nutrientes si pareciera afectar la producción de dicho metabolito, debido a que MB es un medio rico en sales en comparación al medio TAK (Figura 3B).

Como conclusión del presente trabajo vale la pena mencionar que la miniaturización de los cultivos en cuatro medios diferentes de 14 bacterias del *phylum* Firmicutes simbioses del octocoral *P. elisabethae*, junto con la extracción en fase sólida y el uso de la tecnología de UPLC-MS como herramienta química para la detección rápida de compuestos producidos y de Antibase 2007™ como herramienta de derreplicación, se tradujo en altos rendimientos de análisis y en la generación de una librería, la cual permitió descartar los componentes o productos de descomposición de los medios de cultivo, además de detectar todos los compuestos producidos por todas las bacterias ensayadas y la posterior identificación de algunas de las sustancias, previamente reportadas, así como también el avanzar en el proceso de identificación de sustancias desconocidas. Otra de las grandes ventajas de la librería generada fue realizar una primera aproximación a la búsqueda de la mejor fuente y de las mejores condiciones de cultivo para la producción de las sustancias que componen nuestra librería. Esta información será muy útil en la selección racional de algunas de las bacterias y del medio de cultivo más conveniente para el posterior escalamiento del cultivo y aislamiento e identificación de los compuestos producidos usando los métodos cromatográficos y espectroscópicos comúnmente utilizados en productos naturales.

Así, los resultados mostrados en este trabajo se convierten en el punto de partida para la planeación del escalamiento a nivel de laboratorio y posteriormente a nivel industrial de estas sustancias a partir de las bacterias empleadas. Aunque en este momento no se ha determinado la actividad biológica de estos compuestos, la determinación de su potencial de aplicación si representa un área muy interesante por explorar.

Todos los resultados anteriores soportan la preferencia por el análisis preliminar de librerías por UPLC-MS, en comparación con el *screening* bioguiado, como herramienta para la detección temprana en los extractos de posibles sustancias con estructura química novedosa (en dado caso que no existieran reportes en la base de datos Antibase) y de sustancias conocidas, las cuales en un *screening* bioguiado requerirían de una alta inversión de tiempo y recursos para llegar a la identificación de las mismas.

Adicionalmente este artículo se constituye en un reporte importante acerca del empleo de aproximaciones metodológicas que permiten identificar compuestos en bacterias de manera simplificada, convirtiéndose así, en

consulta de primera mano para diferentes investigadores interesados en la producción de metabolitos a partir de microorganismos, quienes se ven enfrentados a la difícil tarea de realizar cultivos con gran cantidad de material y/o con bajos rendimientos hasta encontrar las mejores condiciones para la producción de determinada sustancia. Es por ello que este trabajo destaca desde el punto de vista biológico, el reducir los ensayos para probar varias condiciones que inducen la síntesis de compuestos en sistemas vivos y desde el punto de vista químico, el lograr en un tiempo corto una librería de compuestos para analizar y evaluar su potencial como sustancias con interés químico o potencial farmacológico.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por Colciencias y la Universidad Nacional de Colombia. Los autores agradecen al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial por el permiso para recolección de las muestras en la Isla de Providencia (SW Caribe) (permiso No. 4 of 10/02/2010). RK, FB, BH y HC agradecen el soporte financiero de Natural Sciences and Engineering Council of Canada (NSERC), Canada Research Chair Program, University of Prince Edward Island, Atlantic Innovation Fund, y Jeanne and Jean-Louis Lévesque Foundation.

Bibliografía

- Ardrey RE.** 2003. Liquid chromatographic-mass spectrometry: An introduction. John Wiley & Sons Ltda. Chichester, England. ISBN: 0-471-49801-7.
- Berdy J.** 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 58:1-26.
- Berrue F, Ibrahim A, Boland P, Kerr R.** 2009. Newly isolated marine *Bacillus pumilus* (SP21). A source of novel lipoamides and other antimicrobial agents. *Pure Appl. Chem.* 81:1027-1031.
- Berrue F, Withers ST, Haltli B, Withers J, Kerr R.** 2011. Chemical screening method for the rapid identification of microbial sources of marine invertebrate-associated metabolites. *Mar Drugs* 9:369-381.
- Blunt JW, Copp BR, Munro HM, Northcote PT, Prinsep MR.** 2009. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 26:170-244.
- Blunt JW, Copp BR, Munro HM, Northcote PT, Prinsep MR.** 2011. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 28:196-268.
- Correa H, Valenzuela AL, Ospina LF, Duque C.** 2009. Anti-inflammatory effects of the gorgonian *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at the Islands of Providencia and San Andrés (SW Caribbean). *J Inflamm* 6:doi: 10.1186/1476-9255-6-5.
- Correa H, Aristizabal F, Duque F, Kerr R.** 2011a. Cytotoxic and antimicrobial activity of pseudopterins and seco-

pseudopterოსins isolated from the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* of San Andrés and Providencia Islands (Southwest Caribbean Sea). *Mar Drugs* 9:334-344.

- Correa H, Haltli B, Duque C, Kerr R.** 2011b. Bacterial community associated with the octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected at Providencia Island (SW Caribbean sea). En preparación.
- Duque C, Puyana M, Narvaez G, Paz A, Osorno O, Hara N, Fujimoto Y.** 2004. Pseudopterოსins P-V. New compounds from the gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* from Providencia Island, Colombian Caribbean. *Tetrahedron* 60:10627-10635.
- Duque C, Puyana M, Castellanos L, Arias A, Correa H, Osorno O, Asai T, Hara N, Fujimoto Y.** 2006. Further studies on the constituents of gorgonian octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae* collected in San Andrés and Providencia islands, Colombian Caribbean: isolation of a putative biosynthetic intermediate leading to erogorgiane. *Tetrahedron* 62:4205-4213.
- Egan S, Thomas T, Kjelleberg S.** 2008. Unlocking the diversity and biotechnological potential of marine surface associated microbial communities. *Curr Opin Microbiol* 11:219-225.
- Flatt P, Gautschi J, Thacker R, Musafija-Girt M, Crews P, Gerwick W.** 2005. Identification of the cellular site of polychlorinated peptide biosynthesis in the marine sponge *Dysidea (Lamellodysidea) herbacea* and symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongelliae* by CARD-FISH analysis. *Mar Biol* 147:761-774.
- Heckrodt TJ, Mulzer J.** 2005. Marine natural products from *Pseudopterogorgia elisabethae*: structures, biosynthesis, pharmacology, and total synthesis. In *Natural products synthesis II*. Volumen 244. 1st edition. Edited by Mulzer J. New York: Springer Berlin Heidelberg 1-41.
- Hildebrand M, Waggoner LE, Lim GE, Sharp KH, Ridley CP, Haygood MG.** 2004. Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. *Nat Prod Rep* 21:122-142.
- Hill RT, Enticknap JJ, Peraud O, Anderson MA, Kasanah N, Rao KV, Bowling JJ, Hamann MT.** 2007. Microbial symbionts of marine invertebrates: Implications for drug discovery. Conference Programme and Proceedings. Manapro XII, Auckland, New Zealand.
- Ito T, Otake T, Katoh H, Yamaguchi Y, Aoki M.** 2011. High-Throughput profiling of microbial extracts. *J Nat Prod* 74:983-988.
- Li J, Chase HW.** 2010. Development of adsorptive (non-ionic) macroporous resins and their uses in the purification of pharmacologically-active natural products from plant sources. *Nat Prod Rep* 27:1493-1510.
- Marrero J, Rodriguez II, Rodriguez AD.** 2010. The natural products chemistry of the gorgonian genus *Pseudopterogorgia* (Octocorallia:Gorgoniidae). In *Comprehensive natural products II: chemistry and biology*. 1st edition. Edited by Mander L, Liu H-W. Oxford: Elsevier, p. 363-428.
- Mayer AMS, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, McIntosh JM, Newman DJ, Potts B, Shuster DE.** 2010. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol Sci* 31:255-265.
- Mouchka ME, Hewson I, Harvell CD.** 2010. Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. *Integr Comp Biol* 50:662-674.
- Mydlarz LD, McGinty ES, Harvell CD.** 2010. What are the physiological and immunological responses of coral to climate warming and disease?. *J Exp Biol* 213:934-945.
- Newman D, Hill R.** 2006. New drugs from marine microbes: the tide is turning. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:539-544.
- Penesyan A, Kjelleberg S, Egan S.** 2010. Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Mar Drugs* 8:438-459.
- Piel J.** 2006. Bacterial symbionts: prospects for the sustainable production of invertebrate-derived pharmaceuticals. *Curr Med Chem* 13:39-50.
- Ridley CP, Bergquist PR, Harper MK, Faulkner DJ, Hooper JNA, Haygood MG.** 2005. Speciation and biosynthetic variation in four dictyoceratid sponges and their cyanobacterial symbiont *Oscillatoria spongelliae*. *Chem Biol* 12:397-406.
- Sudek S, Lopanik NB, Waggoner LE, Hildebrand M, Anderson C, Liu H, Patel A, Sherman DH, Haygood MG.** 2007. Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "Candidatus *Endobugula sertula*", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. *J Nat Prod* 70:67-74.
- Toyo'oka T.** 2008. Determination methods for biologically active compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry: application to the analyses of pharmaceuticals, foods, plants, environments, metabolomics, and metabolomics. *J Chromatogr Sci* 46:233-247.
- Yao S, Wu T, Li X, Tu B, Song H.** 2010. Ten years of research into phytomedicines analysis-an era in new technologies and methods. *Curr Pharm Anal* 6:269-288.

Recibido: agosto 7 de 2011.

Aceptado para su publicación: agosto 30 de 2011.