UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Búsqueda de Compuestos Inhibidores de *Quorum Sensing* (IQS) a Partir de Extractos de Origen Natural. Primera Fase

José Feliciano Brango Vanegas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2011

Búsqueda de Compuestos Inhibidores de *Quorum Sensing* (IQS) a Partir de Extractos de Origen Natural. Primera Fase

José Feliciano Brango Vanegas

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias – Química

Directores:
Dr. M.Sc. Leonardo Castellanos Hernández
Ph.D. M.Sc. Catalina Arevalo Ferro

Línea de Investigación:
Química de Productos Naturales

Grupo de Investigación:
Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia. Departamento de Química
Grupo de Investigación:
Comunicación y Comunidades Bacterianas. Departamento de Biología

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2011

A mis padres y especialmente a mi hermana Sidys Brango

Agradecimientos

A la Universidad Nacional de Colombia por permitirme adelantar estudios de maestría.

A los profesores Leonardo Catellanos, Freddy Ramos y la profesora Catalina Arevalo por toda su colaboración y su orientación durante este tiempo.

A los integrantes del grupo de investigación "Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia" y "Comunicación y Comunidades Bacterianas" por permitirme estar en sus instalaciones.

Agradecimientos al proyecto: Aislamiento de *N*-acilhomoserinlactonas de algunas bacterias procedentes del mar Caribe Colombiano como evidencia de la existencia de circuitos de *quorum sensing;* financiado por el Banco de la Republica.

A mis padres, hermanas y demás familiares puesto que sin ellos hubiese sido muy difícil.

También a Edisson, Angela, Diana, Jairo, Geisson, Tatiana, Anny, Pamela, Miguel, Sebastian y también a otras personas.

Resumen

La búsqueda de sustancias inhibidoras de *quorum sensing* (IQS) a partir de fuentes naturales resulta interesante por sus aplicaciones en las ciencias biomédicas y en la prevención del *fouling*. En esta investigación se exploraron 52 extractos de organismos marinos y plantas como fuentes de IQS usando dos biosensores. Esto permitió identificar que aproximadamente la cuarta parte de los extractos marinos son bioactivos. Luego se procedió a seleccionar los tres extractos más activos para su estudio químico. Así, a partir del extracto polar de *Cecropia pachystachya*, el más activo, se aislaron flavonoides que mostraron inhibición de *quorum sensing*, sin afectar el crecimiento de microorganismos; lo que sugiere que estos compuestos tienen un gran potencial para su uso en tecnologías anti*fouling*. Asimismo, los extractos de las esponjas *Ircinia felix* y *Svenzea tubulosa* presentaron actividad IQS moderada, identificándose mezclas de ácidos grasos como las responsables de la actividad. Para la primera especie además se identificaron algunos furanosesterterpenos, relacionados estructuralmente con moléculas autoinductoras del QS, la cuales mostraron moderada actividad IQS.

Palabras clave: *Quorum sensing* (QS), *fouling*, *Cecropia pachystachya*, Esponjas, furanosesterterpenos.

Abstract

The searching of quorum sensing inhibitors (QSI) from natural sources is interesting because of the applications in biomedical sciences and preventing fouling. This research explored 52 extracts of marine organisms and plants as sources of QSI using two biosensors. This revealed that approximately quarter of marine extracts evaluated were bioactive. Then it was proceeded to select the three most active extracts for chemical study. Thus, from the polar extract of *Cecropia pachystachya*, the most active extract, there were isolated flavonoids that showed an important quorum sensing inhibition without affecting the growth of microorganisms, suggesting that these compounds have great potential for use in antifouling technologies. In addition, extracts of the sponges *Ircinia felix* and *Svenzea tubulosa* presented moderate QSI, where it was identified a mixture of fatty acids as responsable for bioactivity. For *Ircinia felix* there were also identified furanosesterterpenes, structurally related with autoinducer molecules of QS, with moderate IQS actyivity.

Keywords: *Quorum sensing* (QS), *fouling*, *Cecropia pachystachya*, Sponges, furanosesterterpenes.

Contenido

	Pág.
Resumen	**X**
Lista de Figuras	**XII**
Lista de Tablas	**XV**
Lista de Símbolos y Abreviaturas	**XVI**
Introducción	**1**
Capítulo 1 *Quorum sensing* **y su Inhibición**	**3**
Capítulo 2 **Búsqueda de Inhibidores de** *Quorum sensing* **en Extractos de Organismos Marinos y Vegetales**	**41**
Capítulo 3 **Compuestos Inhibidores de** *Quorum sensing* **(IQS) de** *Cecropia pachystachya* **Trécul**	**65**
Capítulo 4 **Estudio Químico de las Esponjas** *Svenzea tubulosa* **e** *Ircinia felix* **como Fuentes de Compuestos Inhibidores de** *Quorum Sensing*	**107**
Conclusiones y Recomendaciones	**139**
Producción Científica	**141**
Anexo A	**143**
Anexo B	**147**

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1.1 Moléculas autoinductoras y de señalización encontradas en diferentes especies de bacterias **6**
Figura 1.2 Sistema de *quorum sensing* LuxI/LuxR en *Vibrio fischeri*, similar para la mayoría de las bacterias gram negativas **8**
Figura 1.3 Sistema de *quorum sensing* tipo doble componente en bacterias gram positivas **10**
Figura 1.4 Biosíntesis de acilhomoserinlactonas (AHLs) **11**
Figura 1.5 Algunos análogos de *S*-adenosilmetionina (SAM) con actividad inhibitoria de *quorum sensing* **12**
Figura 1.6 Compuestos IQS aislados del extracto de ajo **17**
Figura 1.7 L-canavanina aislada de la leguminosa *Medicago sativa* con actividad IQS **17**
Figura 1.8 Componentes del aceite esencial del clavo **18**
Figura 1.9 Algunos de los flavonoides reportados por modular la expresión de genes en bacterias **19**
Figura 1.10 Flavonoides y compuestos fenólicos con propiedades IQS **21**
Figura 1.11 Estructuras del ácido tánico y el galato de (-)-epigalocatequina **22**
Figura 1.12 Algunos compuestos de origen microbiano con actividad IQS **23**
Figura 1.13 Algunos volátiles de bacterias ensayados como IQS **25**
Figura 1.14 Compuestos con actividad IQS obtenidos a partir de cianobacterias **26**
Figura 1.15 Furanonas bromadas asiladas del alga roja *Delisea pulchra* **27**
Figura 1.16. Alcaloides inhibidores de QS aislados del briozoo *Flustra foliacea* **27**
Figura 1.17 Sesterterpenos con actividad IQS aislados de la esponja *Luffariella variabilis* **28**
Figura 1.18 Compuestos aislado de la macroalga marina *Ahnfeltiopsis flabelliformis* **28**
Figura 1.19 Alcaloide con actividad IQS aislado de una hormiga **29**
Figura 1.20 AHLs sintéticas y análogos con actividad antagonista sobre las proteínas tipo LuxR **30**
F**igura 1.21** AHLs sintéticas y análogos con actividad antagonista y agonitas de proteínas tipo LuxR **31**
Figura 1.22 Furanonas sintéticas basadas en las aisladas de *Delisea pulchra* **31**
Figura 1.23 Furanonas que inducen asentamiento de larvas de *Hydroides elegans* y *Bugula neritina* **33**

Figura 2.1 Fotografías de los resultados del ensayo de inhibición de *quorum sensing* usando el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 para los extractos de *Svenzea tubulosa*, *Ircinia felix*, *Cecropia pachystachya* **50**
Figura 2.2 Fotografía de los resultados de inhibición de crecimiento contra *C. violaceum* ATCC 31532 del extracto de la alga *Dictyota* sp2 **50**
Figura 2.3 Porcentaje de extractos y fracciones que inhiben *quorum sensing* en *C. violaceum* ATCC 31532 para los grupo de organismos ensayados **54**
Figura 2.4 Sesterterpenos estructuralmente similares entre sí. Estas moléculas guardan relación estructural con las AHLs por el anillo lacónico y la cadena lateral hidrocarbonada **58**

Figura 3.1 Flavonoides aislados del genero *Cecropia* **69**
Figura 3.2 Terpenos asilados del genero *Cecropia* **70**
Figura 3.3a Compuestos aislados de *Cecropia obtusifolia* **71**
Figura 3.3b Catequinas y procianidinas aisladas de arboles de *Cecropia* **72**
Figura 3.4 Fotografías de los resultados del ensayo de inhibición de *quorum sensing* con *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 para las fracciones y algunos compuestos de *Cecropia pachystachya* **81**
Figura 3.5 Fotografía de los resultados del ensayo de inhibición de *quorum sensing* con *Escherichia coli* pSB403 para las fracciones y algunos compuestos de *Cecropia pachystachya* **81**
Figura 3.6 Perfiles cromatográficos obtenidos por CLAE-DAD para la fracción acuosa residual, la fracción butanólica y la fracción metanólica de *Cecropia pachystachya* **84**
Figura 3.7 Perfil obtenido por CLAE preparativa correspondiente a la fracción metanólica de *Cecropia pachystachya* Trécul **85**
Figura 3.8 Espectros de HRESIMS para el compuesto **2** **86**
Figura 3.9 Espectro de RMN ^{1}H para el compuesto **2** **87**
Figura 3.10 Espectros de HRESIMS para los compuestos **3** y **4** **88**
Figura 3.11 Espectro de RMN ^{1}H para el compuesto **4** **89**
Figura 3.12 Espectro de RMN ^{13}C para el compuesto **4** **90**
Figura 3.13 Correlaciones HMBC para el compuesto **4** **91**
Figura 3.14 Algunas de las correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **4** **91**
Figura 3.15 Masas tándem sobre el fragmento a *m/z* 370 para la orientina e isoorientina **92**
Figura 3.16 Espectros de HRESIMS para el compuesto **9** **95**
Figura 3.17 Esquema de fragmentación propuesto para el compuesto **9** en modo IES en modo positivo **96**
Figura 3.18 Estructura de los compuestos activos de la fracción metanólica de *Cecropia pachystachya* **96**
Figura 3.19 Fotografías de los resultados del ensayo de inhibición de *quorum sensing* con *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 para los diferentes tratamientos de compuestos activos de *Cecropia pachystachya* **98**
Figura 3.20 Fotografías de los resultados del ensayo de inhibición de crecimiento de la fracción metanólica de *Cecropia pachystachya* contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 23591, y *Saccharomyces cerevisiae* **100**

Figura 3.21 Porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano vs concentración de los compuestos de *Cecropia pachystachya* contra *Staphylococcus aureus* **101**
Figura 3.22 Porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano vs concentración de los compuestos de *Cecropia pachystachya* contra *Pseudomonas aeruginosa* **101**

Figura 4.1 Furanosesterterpenos biológicamente activos aislados de especies de *Ircinia* **109**
Figura 4.2 Esquema del fraccionamiento del extracto de diclorometano (DCM) de *Svenzea tubulos*a **114**
Figura 4.3 Esquema del fraccionamiento del extracto de diclorometano (DCM) de *Ircinia felix* **115**
Figura 4.4 Fotografías de los ensayos de IQS para la fracción lipídica (STF2), fracción STF4 de la esponja *Svenzea tubulosa*; y la fracción lipídica, IFF1, y la fracción de furanosesterterpenos no acetilada de *Ircinia felix* **119**
Figura 4.5 Espectro de masas del ester metílico del ácido hexadecanoico **120**
Figura 4.6 Espectro de masas del ester metílico del ácido 11-metilhexadecanoico **120**
Figura 4.7 Espectro de masas del ester metílico del del ácido 11-octadecenoico **121**
Figura 4.8 Espectro de masas del ester metílico del del ácido 5,9-tetracosadienoico **122**
Figura 4.9 Correlaciones HSQC y HMBC para del compuesto **1** de *Svenzea tubulosa* **125**
Figura 4.10 Perfil obtenido por CLAE para la mezcla de furanosesterterpenos acetilados, procedentes de *Ircinia felix* **128**
Figura 4.11 Espectro de RMN ^{1}H delcompuesto **2** de *Ircinia felix* **129**
Figura 4.12 Espectro DEPT 135 delcompuesto **2** de *Ircinia felix* **130**
Figura 4.13 Furanosesterterpenos aislados de *Ircinia felix* **131**

Lista de Tablas

Pág.

Tabla 2.1 Resultados de la actividad inhibitoria de QS y bactericida de los extractos y fracciones de organismos marinos y vegetales. **51**

Tabla 3.1 Resultados del ensayo de IQS con *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, para la fracción metanólica, la fracción acuosa residual, la fracción butanólica, la fracción de diclorometano y los compuestos aislados de *Cecropia pachystachya.* **82**
Tabla 3.2 Resultados del ensayo de IQS con *Escherichia coli* pSB403, para la fracción metanólica (F.MeOH) y algunos compuestos aislados de *Cecropia pachystachya.* **83**
Tabla 3.3 Datos de RMN para los compuestos **2** (DMSO-d_6), **4** (CD_3OD:DMSO-d_6) y compuesto **6** (DMSO-d_6). **94**
Tabla 3.4 Resultados del ensayo de IQS con *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, para diferentes mezclas de compuestos activos de *Cecropia pachystachay*. **99**

Tabla 4.1 Resultados del ensayo de IQS con *C. violaceum* ATCC 13532 para las fracciones, y compuestos aislados de *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix*. **119**
Tabla 4.2 Composición de esteres metílicos en las esponjas *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix* **123**
Tabla 4.3 Datos de RMN ^{1}H y ^{13}C de los compuestos aislados e identificados de las esponjas. Los espectros fueron tomados en $CDCl_3$. **127**

Lista de Símbolos y Abreviaturas

$[\alpha]_D$	Rotación óptica específica
AcOEt	Acetato de etilo
AHLs	Acil homoserinlactonas
CC Flash	Cromotografía en columna flash
CCD	Cromotografía en capa delgada
CG-EM	Cromatografé de gases acoplada a espectrometría de masas
COSY	Espectroscopia de correlación exclusiva
d	Doblete
d.i.	Diámetro interno
DEPT	*Distorsionless enhacement by polarization transfer*
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfoxido
ECL	Longitud equivalente de cadena
EM	Espectrometria de masas
HMBC	*Heteronuclear multiple bond correlation*
HSQC	*Heteronuclear single quantum correlation*
Hz	Hercio
IES	Ionización por electrospray
IQS	Inhibidores de *quorum sensing*/ Inhibición de *quorum sensing*
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
PNM	Productos naturals marinos
QS	*Quorum sensing*
rf	Relación de flujo
RMN	Espectroscopia de resonancia magnetica nuclear
s	Singlete
tr	Tiempo de retención
UV	Ultravioleta
δ	Desplazamiento químico (RMN)
λ	Longitud de onda

Introducción

El *quorum sensing* es un fenómeno de comunicación célula-célula donde las bacterias utilizan el lenguaje químico para la regulación de genes cuando la concentración celular es alta. Este fenómeno les confiere un cambio fisiológico y/o morfológico, permitiéndoles coordinar actividades y actuar de forma grupal (GREENBERG, 2003; ZHUN & SUN, 2008). La comunicación intercelular se relaciona con algunos problemas para la salud humana como la expresión de los factores de virulencia de bacterias infecciosas oportunistas en algunas enfermedades crónicas. En la bibliografía especializada está bien descrito como las biopelículas bacterianas son responsables, en gran medida, de la resistencia de algunas bacterias patógenas frente a los antibióticos y los sistemas de defensa del organismo, dado que cuando ellas están inmersas en las biopelículas difícilmente son atacadas por los antibióticos o las células del sistema inmune (GREENBERG, 2003; RASMUSSEN & GIVSKOV, 2006). La consolidación de estas biopelículas está en gran medida gobernada por *quorum sensing*. Las biopelículas en ciertas especies logran un grado de organización estratificado, caracterizado por grupos heterogéneos de organismos individuales, en los cuales es posible encontrar a bacterias de una misma especie en distintas regiones, exhibiendo comportamientos diferentes (GREENBERG, 2003). Es decir comportándose más como una comunidad que como células aisladas.

El *quorum sensing* también se relaciona con algunos problemas de índole más industrial, como lo es el *fouling* en estructuras sumergidas. Este es un problema grave para embarcaciones, plataformas petroleras, tuberías, muelles y demás, porque la adhesión de organismos marinos causa problemas de corrosión sobre las superficies, reduciendo la durabilidad y aumentado los costos por mantenimiento y exceso de consumo de combustible en el caso de los buques (CALIXTO *et al*., 2007). El proceso del *biofouling* empieza con la colonización de la superficie por parte de microorganismos, particularmente bacterias, que una vez asentados dan lugar a la formación de una biopelícula estratificada, la cual emite señales químicas que algunos macroorganismos identifican. Así, el *quorum sensing* también parece estar involucrado en el proceso de colonización por parte de eucariotas multicelulares, puesto que el asentamiento de las larvas de los eucariotas está mediado, entre otros factores, por señales químicas, las cuales pueden ser producidas por la biopelícula.

Estas señales pueden o no inducir asentamiento y metamorfosis en muchas especies (CRAIG *et al*., 1997). En la actualidad se han identificado a estas biopelículas como un *target* para la prevención del *fouling*, pues se espera si se impide su formación, mediante la inhibición de *quorum sensing*, el proceso del *fouling* causado por macroorganismos puede ser controlado o al menos retardado (FUSETANI, 2011).

En este orden de ideas, a nivel mundial se están desarrollando nuevas investigaciones que buscan identificar sustancias inhibidoras del *quorum sensing* (GREENBERG, 2003), con aplicaciones en tecnologías anti*foulant* y drogas antipatogénicas (DOBRETSOV *et al*., 2009; FUSETANI, 2011).

En este trabajo se planteó la búsqueda bioguiada de sustancias inhibidoras de *quorum sensing,* en fuentes naturales como vegetales e invertebrados marinos. En el capitulo 1 se presentará una revisión en detalle del fenómeno de QS, haciendo énfasis en las señales que intervienen; los sistemas y mecanismos de regulación genética, y los factores expresados. Así mismo, se presentarán ejemplos de inhibidores de *quorum sensing*, particularmente los asilados de fuentes naturales, sus modos de acción y métodos de detección; la relación existente entre los organismos que son fuente de estos inhibidores y las bacterias asociadas al organismo, y se terminará con una discusión de la relación entre el *quorum sensing* y el *fouling*. En el capítulo 2 se presentará el trabajo experimental de bioprospección de organismos marinos de Colombia y Brasil, así como de plantas de Brasil, como fuente de sustancias IQS. Vale la pena resaltar que este trabajo de bioprospección es el tercero de este tipo sobre organismos marinos en el mundo, haciendo parte del primer trabajo realizado en Colombia. El capítulo 3 presenta los resultados obtenidos en la búsqueda de IQS de *Cecropia pachystachya*, cuyo extracto fue el más activo entre los ensayados. En este capítulo se presenta la elucidación estructural de algunos constituyentes por técnicas espectroscópicas, asi como su actividad IQS y los resultados obtenidos en los ensayos antibacteriales, encontrando resultados promisorios que se describen en el mismo. El capítulo 4 presenta la identificación de algunos compuestos de las esponjas *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix,* y los resultados obtenidos con ellos en los ensayos de IQS.

1 *Quorum sensing* y su Inhibición

CONTENIDO

	Pág.
1.1 *Quorum Sensing*	**4**
1.2 Sistemas de *Quorum Sensing,* Mecanismos y Moléculas Autoinductoras	**5**
1.3 Modos de Acción de Inhibidores de *Quorum Sensing*	**10**
1.3.1 Inhibición de la Biosíntesis de las Moléculas Autoinductoras	**11**
1.3.2 Inhibición e Inactivación de las Moléculas Autoinductoras	**12**
1.3.3 Inhibición por Acción Sobre los Receptores	**13**
1.4 Métodos de Detección de Sustancias Inhibidoras de *Quorum Sensing*	**13**
1.5 Algunos Compuestos con Acción Inhibitoria de *Quorum Sensing*	**15**
1.5.1 Productos Naturales Inhibidores de *Quorum Sensing*	**15**
1.5.1.1 Inhibidores de *Quorum Sensing* Obtenidos a Partir de Plantas	**15**
Flavonoides y Compuestos Fenólicos Inhibidores de *Quorum Sensing*	**18**
1.5.1.2 Inhibidores de *Quorum Sensing* Obtenidos a Partir de Microorganismos	**23**
1.5.1.3 Inhibidores de *Quorum Sensing* Aislados a Partir de Organismos Marinos	**26**
1.5.1.4 Otras Fuentes de Inhibidores de *Quorum Sensing*	**28**
1.5.2 Inhibidores Sintéticos de *Quorum Sensing*	**29**
1.6 Relación Entre *Quorum Sensing* y *Fouling*	**32**
1.7 Conclusiones	**34**
1.8 Bibliografía	**34**

1.1 *QUORUM SENSING*

Se conoce como *quorum sensing* a la comunicación celular bacteriana mediada por señales químicas, denominadas moléculas autoiductoras o moléculas de señalización. Estas moléculas son producidas por la bacteria de manera constante, y son utilizadas en el proceso de comunicación celular, cuando la población celular ha alcanzado un umbral –el *quorum*-, permitiéndoles a las bacterias no sólo monitorear la densidad poblacional sino también sincronizar su expresión genética. El proceso de comunicación consta de dos distintos programas de expresión genética que dependen del número de células. El primero de ellos es aquel en donde la concentración celular es baja y se caracteriza porque predomina un comportamiento individual; y el segundo donde hay una densidad celular alta que se refleja en un comportamiento social (NG & BASSLER, 2009), que lleva a las bacterias a tener un comportamiento similar al de un organismo multicelular. Se cree que el hecho de establecer estas comunidades, en lugar de elegir una existencia como células aisladas, proporciona importantes ventajas adaptativas al grupo de bacterias. Entre éstas están: mejorar el acceso a nichos ambientales, mejorar sus capacidades de defensa contra otros microorganismos procariotas y eucariotas, ó contra los mecanismos de defensa del huésped, y facilitar así la adaptación a las cambiantes condiciones ambientales (FERLUGA *et al*., 2008).

Más en detalle, el fenómeno de QS comienza con la síntesis de las moléculas autoinductoras dentro de las células. Estas moléculas se difunden a través de las membranas, y su difusión al igual que la detección es dependiente del tipo de bacteria (gram negativas o gram positivas) como lo veremos más adelante. Una vez aumenta la población celular, lo hace también la concentración de las moléculas y solo cuando se alcanza la concentración mínima requerida de estas (que refleja la población bacteriana), unos receptores cognados en las células las reciben y forman complejos capaces de activar cascadas de transducción de señales que resultan en un cambio de la expresión genética de la población. Entre las expresiones observadas en diferentes bacterias se encuentran la bioluminiscencia; la producción de exopolisacáridos, necesarios en la producción y maduración de biopelículas; los tipos de motilidad bacteriana; la producción de compuestos antimicrobianos y pigmentos; y la esporulación, entre otros factores de virulencia, los cuales varían de una especie de bacteria a otra (GREENBERG, 2003; BOYER & WISNIEWSKI-DYÉ, 2009; NG & BASSLER, 2009).

La bioluminiscencia fue el primer fenómeno observado asociado al *quorum sensing*, y se dio en la bacteria marina *Vibrio fischeri*. En esta bacteria se observó que la producción de bioluminiscencia ocurría a una alta densidad celular y era regulada mediante moléculas de señalización. Posteriormente se logró establecer que esta bacteria podía monitorear su densidad celular coordinando el comportamiento poblacional mediante la regulación de sus expresiones genéticas en función de los

cambios en la densidad bacteriana y en la concentración de las moléculas autoinductoras (WHITEHEAD *et al*., 2001; WAGNER & IGLEWSKI, 2008). Después de un tiempo, se pudo establecer que este fenómeno estaba muy difundido entre las diferentes especies de bacterias, y más recientemente se ha observado en hongos, e incluso en células cancerígenas.

1.2 SISTEMAS DE *QUORUM SENSING*, MECANISMOS Y MOLÉCULAS AUTOINDUCTORAS

Los autoinductores pueden ser de diferentes tipos, siendo los más importantes y ampliamente conocidos las *N*-acilhomoserinlactonas (conocidas como AHLs ó AI-1), los derivados del 2-metil-2,3,4,5-tetrahidroxitetrahidrofurano (entre ellos el AI-2), los compuestos relacionados con la adrenalina (AI-3), algunos compuestos derivados del indol y quinolonas (SHPAKOV, 2009), algunos compuestos peptídicos, y los ácidos grasos con cadenas laterales de 10, 12 y 14 átomos de carbono, con insaturación de configuración *cis* usualmente en C-2 y C-4 (Figura 1.1) (DENG *et al*., 2011).

La mayoría de los sistema de *quorum sensing* conocidos funcionan de forma similar, independientemente de que la bacteria sea gram negativa o gram positiva. Generalmente, ellos comprenden la producción basal de la molécula de señalización, la detección y respuesta a las fluctuaciones en la concentración del autoiductor por parte de la población bacteriana (NG & BASSLER, 2009). Actualmente, se conocen dos tipos de sistema de comunicación; el primero donde la señal producida por la bacteria es asimilada por organismos superiores (comunicación inter-reinos); y el segundo en el que la señal es detectada no sólo por los otros organismos, sino también por las bacterias mismas. Este último sistema al parecer está involucrado en la adaptación al medio ambiente y es más común en bacterias asociadas a organismos superiores (KONAKLIEVA & PLOTKIN, 2006; SHPAKOV, 2009).

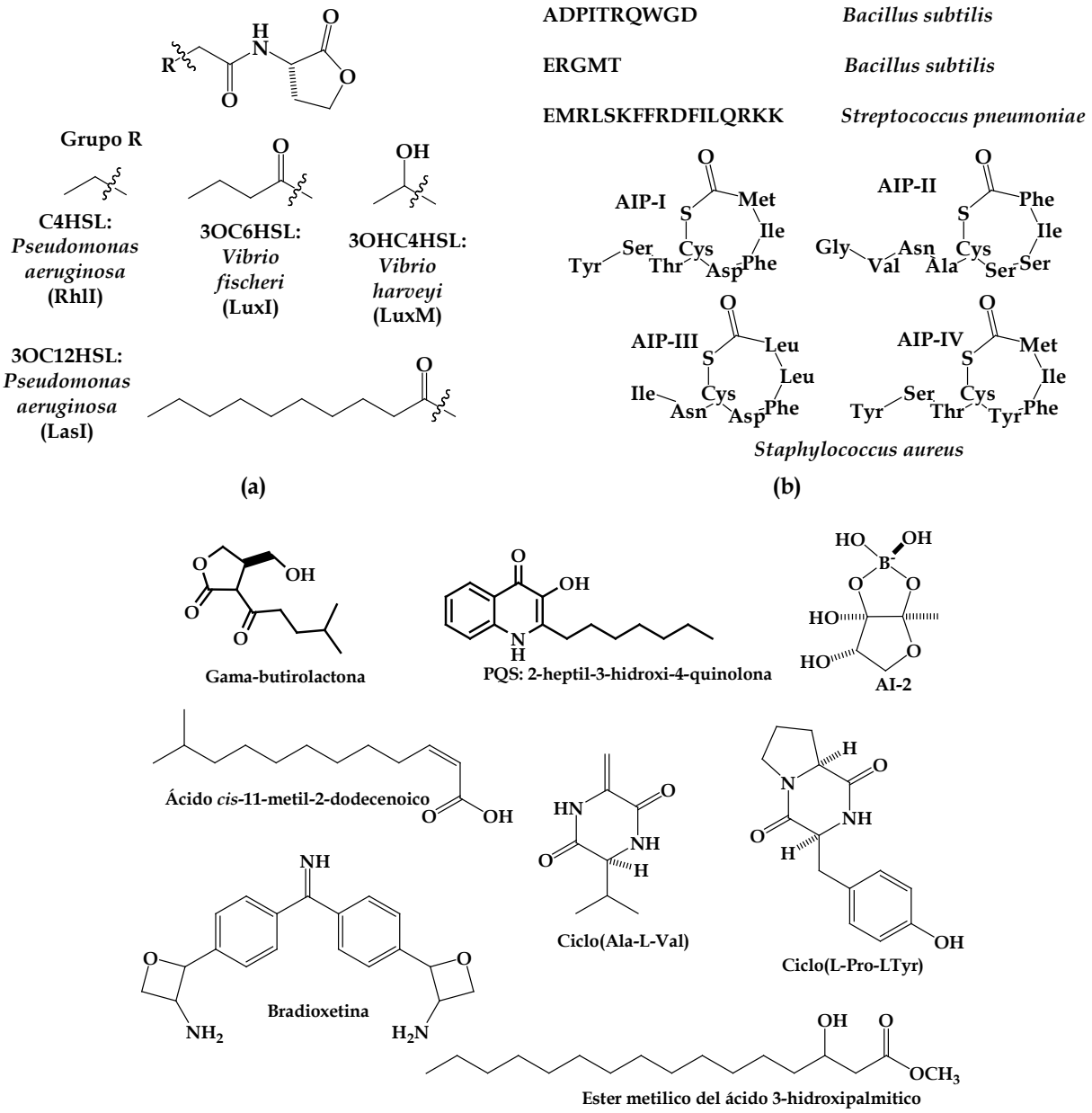


Figura 1.1 Moléculas autoinductoras y de señalización encontradas en diferentes especies de bacterias. **(a)** Acilhomoserinlactonas, AHLs, en bacterias gram negativa; **(b)** Péptidos en bacterias gram positivas

Los mecanismos y las moléculas que participan en la comunicación bacteriana, varían dependiendo del tipo de bacterias. Las bacterias gram negativas y la mayoría de las proteobacterias emplean como moléculas autoinductoras las *N*-acilhomoserinlactonas (AHLs), cuya cadena acilica va desde los 4 hasta los 18 átomos de carbono. Por el contrario las bacterias gram positivas usan péptidos pequeños que son captados por un receptor en la membrana celular (NG &

BASSLER, 2009). También se han detectados otras moléculas autoinductoras de bajo peso molecular, como el ácido *cis*-11-metil-2-dodecenoico de *Xanthomonas campestris* (BARBER *et al*., 1997; WANG *et al*., 2004); el ester metílico del ácido 3-hidroxipalmitico encontrado en *Ralstonia solanacearum* (FLAVIER *et al*., 1997*)*; la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona de *Pseudomonas aeruginosa* (VAN HOUDT *et al*., 2004), y los dipéptidos cíclicos (2,5-dicetopiperazinas), consideradas como moléculas señal útiles en la comunicación interespecies e inter-reinos, aislados de bacterias como *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. alcaligenes*, *Proteus mirabilis*, *Enterrobacter agglomerans*, *Vibrio vulnificus*, y *Citrobacter freundii* (CAMPBELL *et al*., 2009). En la Figura 1.1 se observan las estructuras de diferentes moléculas de señalización.

De otro lado el AI-2 es considerado como el autoindutor universal, ya que está presente y es capaz de inducir expresión de genes en una gran variedad de bacterias tanto gram negativas como gram positivas. Además es capaz de promover la comunicación interespecies (CHEN *et al*., 2002; GALLOWAY *et al*., 2011). También se han encontrado moléculas de señalización inter-reinos en asociaciones entre plantas y bacterias, entre ellas vale la pena mencionar la bradioxetina (Figura 1.1), la cual se encontró en *Bradyrhizobium japonicum* (simbionte de la soya), como un factor Nod (factores de nodulación) y cuya inducción está dada por las isoflavonas producidas por la planta (LOH *et al*., 2002).

Las bacterias gram negativas han sido las más estudiadas en cuanto a sistemas de QS. Entre ellas se destaca *Vibrio fischeri*, que presenta un sistema denominado LuxI/LuxR, cuyo mecanismo se desarrolla por la participación de estas dos proteínas. Cabe decir que la mayoría de los sistemas en bacterias gram negativas se representan con una nomenclatura similar. A continuación se describirá como ocurre el mecanismo de comunicación en *V. fischeri,* mediado por *N*-3-oxo-hexanoil-homoserinlactona (3OC6HSL): La primera proteína, llamada LuxI sintasa codificada a partir del gen *luxI*, cataliza la reacción de síntesis de 3OC6HSL, molécula que es producida en forma basal por cada bacteria. Una vez la población bacteriana alcanza la densidad suficiente, la molécula de señalización (3OC6HSL) llega a la concentración umbral, siendo así que comienza la difusión (difusión pasiva) entre las diferentes células. La segunda proteína, LuxR, actúa recibiendo a la molécula de señalización 3OC6HSL para la formación del complejo estable LuxR-3OC6HSL, que opera como regulador transcripcional modulando la expresión de los genes objetivos: el gen *luxI* (retroalimentación, de ahí que estas moléculas también se denominen como autoinductoras); y el operón de luminiscencia *luxCDABEG*, que conforman la caja *lux,* localizados arriba del gen regulador de *quorum sensing* (*luxR)* (Figura 1.2) (RASMUSSEN & GIVSKOV, 2006; WAGNER & IGLEWSKI, 2008; NG & BASSLER, 2009).

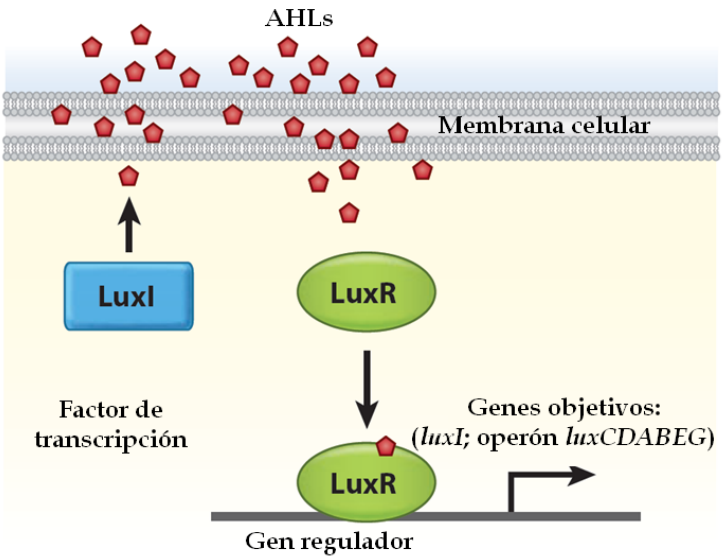


Figura 1.2 Sistema de *quorum sensing* LuxI/LuxR en *Vibrio fischeri*, similar para la mayoría de las bacterias gram negativas (NG & BASSLER, 2009)

La especificidad en la interacción entre las AHLs con el receptor tipo LuxR es determinada por el largo de la cadena del grupo acil y la presencia o no de grupos oxigenados en la posición C-3. Estas caracteristicas son las determinantes para que una AHL se enlace a un regulador específico y actuen en la transcripción. Sin embargo, algunas AHLs pueden interactuar con receptores de superficie de la célula, como se observa en el caso de la AHL de *Vibrio harveyi* y *V. Cholerae*, que son capaces de unirse a LuxN, que esta relacionada a LuxR (SHPAKOV, 2009). También es importante mencionar que el receptor LuxR es inestable, y su unión con el autoinductor lo estabiliza permitiéndole cumplir con las funciones antes descritas, es decir que en ausencia del autoinductor (a una densidad bacteriana baja) LuxR se degrada y el mecanismo genético no se activa (DOBRETSOV *et al*., 2009).

Algunos mecanismos de *quorum sensing* mediados por AHLs han sido descritos para bacterias gram negativas asociadas a plantas. En las asociaciones plantas-microorganismos muchos de los fenotipos inducidos por las bacterias en respuesta a las señales (que pueden provenir tanto de las bacterias como del huésped) incluyen desde patogenicidad, competencia por espacio y conjugación, hasta la producción de metabolitos antifúngicos. En rizobios, por ejemplo, las AHLs median la expresión de genes involucrados en la colonización e invasión al hospedero (COOPER, 2007). Es así que encontramos a bacterias que inducen ataques patogénicos solamente a altas densidades celulares, lo que les permite, con alta probabilidad, sobrepasar la resistencia del hospedero. Como respuesta a lo anterior algunas plantas producen compuestos que mimetizan el comportamiento de las AHLs y pueden de esta forma

inhibir al autoinductor o estimular los comportamientos de inducción en caso que lo necesite. Algunas de estas entidades químicas producto de las plantas huésped, no han sido identificadas pero parecen ser diferentes a cualquiera de los autoinductores conocidos. Ciertas evidencias sugieren que los autoinductores pueden ser usados por la planta como inductores para activar sus defensas. No obstante, toda este tipo de interacciones, ya sea de autoinducción positiva sobre la bacteria, como también de interferencia por parte de la planta, es visto como un importante papel en patogénesis y asociaciones simbióticas (BRENCIC & WINANS, 2005).

Desde el punto de vista biomédico, los sistemas de *quorum sensing* más importantes son los de las bacterias patógenas. Un ejemplo de ellas es *Pseudomonas aeruginosa,* uno de los principales oportunistas en pacientes con fibrosis quística; la cual presenta sistemas análogos al encontrado en *Vibrio fischeri*. Este patógeno tiene tres sistemas, entre ellos LasI/LasR y RhlI/RhlR, cuyas moléculas señalizadoras son 3OC12HSL y C4HSL, respectivamente. Estos sistemas de QS están involucrados en la expresión de algunos factores de virulencia y biopelículas (RASMUSSEN & GIVSKOV, 2006; NG & BASSLER, 2009). También se ha descrito la presencia de un tercer sistema de *quorum sensing* para *Pseudomonas aeruginosa*, basado en quinolonas como señales moleculares, que interactúa con las AHLs contribuyendo también a la patogenicidad (VANDEPUTTE *et al*., 2010). Otro patógeno de interés es *Burkholderia cepacia*, que generalmente está presente en personas con fibrosis quística. *Burkholderia cepacia* emplea C8HSL y en menor proporción C6HSL en un sistema de *quorum sensing* que regula la formación de biopelícula, aglutinación, y motilidad *swarming*. De otro lado se han realizado estudios con ambas bacterias (*P. aeruginosa* y *B. cepacia*), encontrando que los cultivos de *P. aeruginosa* a los que se le adiciona *B. cepacia* muestran un aumento en los factores de virulencia, lo que deja ver que existe comunicación celular entre ambas especies. La regulación de diversos fenotipos aparentemente no relacionados en cultivos mixtos de ambas bacterias, son atribuidos posiblemente a la constitución de un sistema de regulación global (RIEDEL *et al*., 2003).

De otro lado, para el caso de las bacterias gram positivas se ha establecido que emplean péptidos impermeables a las membranas biológicas, debido a esto la secreción de ellos usualmente es llevada a cabo por transporte activo. Durante la secreción, estos péptidos pueden sufrir transformaciones postranscripcionales, tales como una ciclación. Los receptores de estas moléculas no se encuentran en el citoplasma, sino que están en las membranas bacterianas. Así, cuando existe la cantidad requerida para su detección, los péptidos se enlazan a las proteínas señalizadoras y de esta forma se activan cascadas de fosforilación. Estos receptores extramembranales también llamados proteínas de señalización de doble componente, generalmente consisten de una membrana enlazada a un receptor histidina quinasa y un receptor cognado citoplasmático regulador de la respuesta, el cual funciona como regulador transcripcional (NG & BASSLER, 2009). Cuando el

péptido se enlaza extracelularmente, la histidina quinasa se autofosforila y transfiere un grupo fosfato al receptor regulador, el cual actúa como factor de transcripción (Figura 1.3).

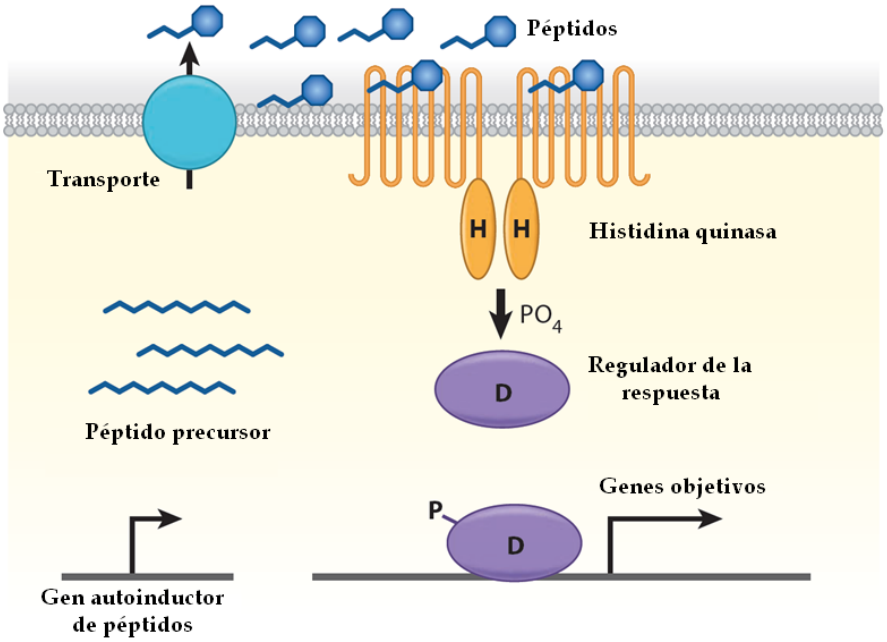


Figura 1.3 Sistema de *quorum sensing* tipo doble componente en bacterias gram positivas (NG & BASSLER, 2009)

1.3 MODOS DE ACCIÓN DE INHIBIDORES DE *QUORUM SENSING*

Como se mencionó anteriormente los sistemas de *quorum sensing* más estudiados son los de las bacterias gram negativas. Por lo cual no es de extrañar que sean ellos los que más atención han recibido en la búsqueda de inhibidores de *quorum sensing*. A continuación se describen los posibles modos de acción de este tipo de inhibidores.

Se han descrito cuatro estrategias para inhibir los sistemas de *quorum sensing* en bacterias gram negativas. Estos sistemas tienen como blancos: La biosíntesis de AHLs, es decir inhibir el QS al impedir la biosíntesis; las AHLs, inhibir el QS a través de la degradación de las AHLs una vez son producidas; el sitio de unión de las AHLs en las proteínas tipo LuxR o sus equivalentes, impidiendo que se forme el complejo LuxR-AHL y por lo tanto no se activen los sistemas génicos; y finalmente, la inhibición de la transcripción del ADN (RASMUSSEN & GIVSKOV, 2006; DOBRETSOV *et al*., 2009). A continuación se discuten las tres primeras estrategias mencionadas, pues éstas son las más ampliamente descritas en la bibliografía que busca compuestos con actividad IQS.

1.3.1 INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE LAS MOLÉCULAS AUTOINDUCTORAS

Las AHLs son sintetizadas por proteínas tipo LuxI a partir de derivados de ácidos grasos conjugados con la proteína transportadora de grupo acilo (acil-ACP) y un anillo de homoserinlactona, que proviene de la *S*-adenosilmetionina (SAM). Las diferentes proteínas tipo LuxI reconocen por igual al precursor común, SAM, y específicamente a la proteína acil-ACP, que contiene grupos acilo de diferente longitud de cadena lateral y de diferente estado de oxidación en la posición C-3 (FUQUA & GREENBERG, 2002). La síntesis comienza con un ataque nucleofílico sobre el carbono carboxílico C-1 de la molécula acil-ACP por parte del grupo amino de SAM, seguido por la lactonización de SAM que resulta en la formación del anillo y la liberación de la AHL (Figura 1.4) (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003).

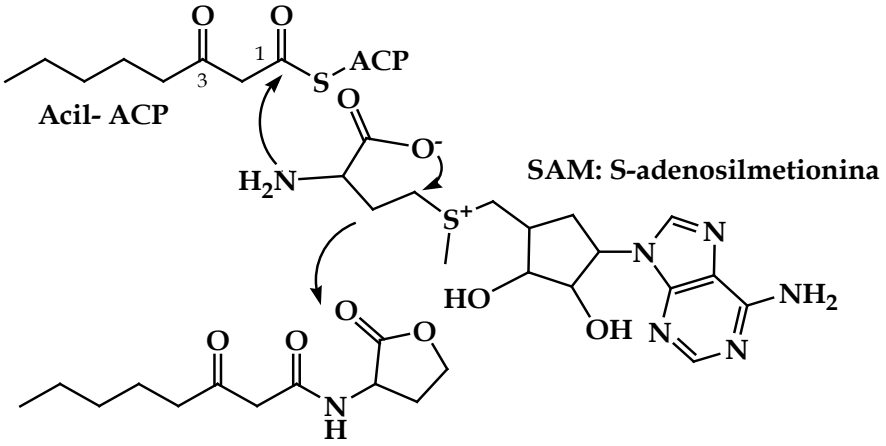


Figura 1.4 Biosíntesis de acilhomoserinlactonas (AHLs)

Del conocimiento anterior se pudo inferir que sustancias homologas a SAM, pueden ser recibidas por las proteínas tipos LuxI, reduciendo la síntesis efectiva de las AHLs naturales. Entre este tipo de compuestos se han identificado: L/D-*S*-adenosilhomocisteina, sinefungina y butiril-SAM (Figura 1.5), que han demostrado ser capaces de inactivar la sintasa RhlI de *P. aeruginosa* (RASMUSSEN & GIVSKOV, 2006).

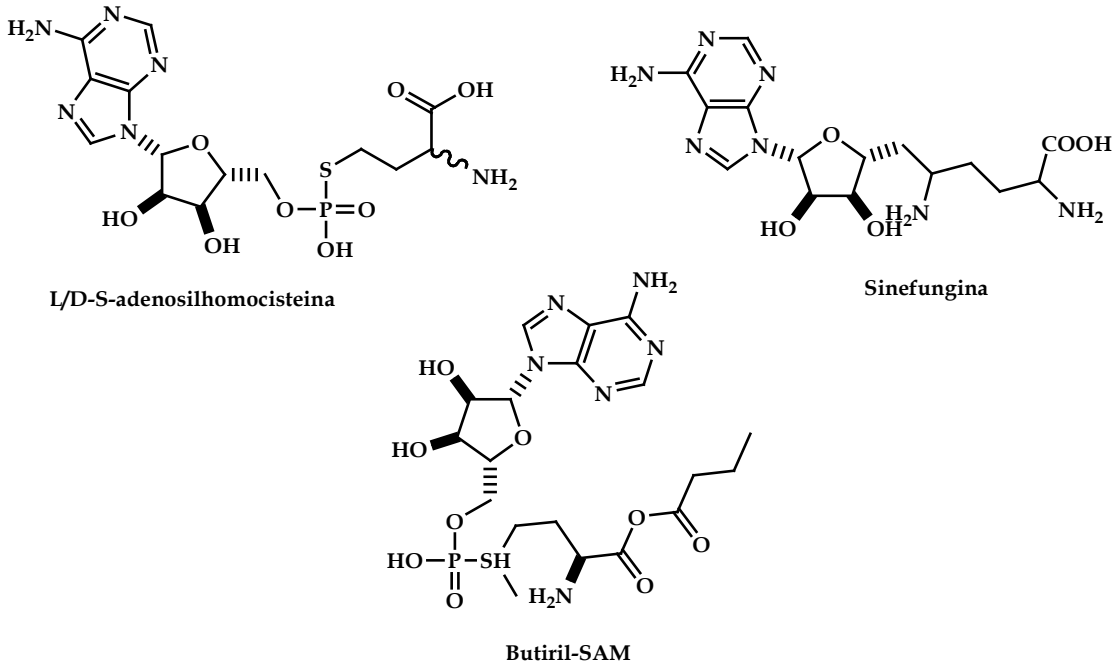


Figura 1.5 Algunos análogos de *S*-adenosilmetionina (SAM) con actividad inhibitoria de *quorum sensing*

1.3.2 INHIBICIÓN E INACTIVACIÓN DE LAS MOLÉCULAS AUTOINDUCTORAS

La segunda forma de inhibir el QS es por degradación de las AHLs una vez éstas han sido producidas, así se ha observado que algunas plantas y bacterias son capaces de producir enzimas que las degradan: AHL-lactonasas y AHL-acilasas. Ambas enzimas transforman las AHLs en productos que son incapaces de activar los sistemas de *quorum sensing*. Como ejemplos se pueden citar las AHL-lactonasas de bacterias gram positivas como *Bacillus thuringiensis*, *B. cereus, B. mycoides*, *Arthrobacter* sp. y gram negativas como *Agrobacterium tumefaciens*. Estas enzimas son capaz de saponificar el anillo lactónico de las AHLs, mecanismo que se emplea presumiblemente para competir por espacio y nutrientes (DOBRETSOV *et al*., 2009). No obstante, también se ha observado que algunas bacterias pueden degradar las AHLs por asimilación y metabolización de las mismas, un ejemplo de esto es *Variovorax paradoxus,* la cual utiliza las AHLs como la única fuente de energía y nitrógeno, interrumpiendo de esta manera el proceso de señalización de las bacterias que comparten su mismo entorno (GONZÁLEZ & MARKETON, 2003).

Otra estrategia para degradar las AHLs aprovecha el hecho de que los pH básicos provocan lactolisis en ellas; así, se puede citar como ejemplo algunas plantas, que cuando son infectadas por bacterias patógenas que usan sistemas de *quorum sensing*

para el control de expresión de factores de virulencia, incrementan el pH en la zona de infección reduciendo de esta forma el ataque (RASMUSSEN & GIVSKOV, 2006).

1.3.3 INHIBICIÓN POR ACCIÓN SOBRE LOS RECEPTORES

Otra forma de interferir el QS es actuando sobre los receptores de las AHLs, más específicamente sobre las proteínas tipo LuxR. Este modo se fundamenta en el hecho de que ciertas sustancias mimetizan las AHLs, siendo capaces de enlazarse por competición a los sitios de unión de los receptores (DOBRETSOV *et al*., 2009). Así, se han diseñado muchos compuestos de origen sintéticos basados en la estructuras de las AHLs, dichos compuestos presentan variaciones que pueden consistir desde el remplazó del anillo de la homoserinlactona por un sistema de anillo de 5 ó 6 átomo de carbono, hasta el cambio de la cadena acílica por otros grupos, e incluir arreglos estructurales de otras moléculas IQS, como es el caso de los átomos de azufre que han sido identificados en compuestos IQS del ajo. Algunas de estas moléculas han mostrado poseer actividad como antagonistas o agonistas de las AHLs frente a los receptores (RASMUSSEN & GIVSKOV, 2006). De otro lado, también se han aislados e identificado una gran cantidad de sustancias de origen natural que presentan la capacidad de interactuar con éstos receptores mediante un mecanismo agonista o antagonista. Algunas de estas sustancias son mencionadas más adelante.

1.4 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE SUSTANCIAS INHIBIDORAS DE *QUORUM SENSING*

Los compuestos IQS, tanto de origen natural o sintéticos, se han detectado mediante el empleo de biosensores, que son cepas bacterianas capaces de producir un fenotipo controlado por QS fácilmente medible u observable (pigmentos, fluoresencia, enzimas u otros). Estos biosensores suelen ser cepas bacterianas mutadas, mediante modificación de los genes involucrados, y han sido ampliamente utilizados para la detección de sistemas de *quorum sensing* y el aislamiento bioguiado de sustancias que interfieran en los mismos. Debido a que la inhibición de QS se ha estudiado extensamente en bacterias gram negativas, algunos de los biosensores empleados contienen plásmidos involucrados en el *quorum sensing*, que han sido modificados y que sólo funcionan en presencia de AHLs específicas, ya que pueden contener diferentes receptores que modulan la expresión de diferentes fenotipos; mientras otros pueden consistir de la ausencia de los genes involucrados en la comunicación, como por ejemplo en aquellos que requieren AHL exógenas. Un ejemplo de este último tipo de biosensores es *Escherichia coli* pSB403, que posee un plásmido modificado de *Vibrio fischeri.* Esta bacteria no posee el gen que codifica para la síntesis de la proteína LuxI, por lo que le es imposible la producción de AHLs, pero sí tiene la capacidad de sintetizar el receptor LuxR, y por lo tanto recibir las AHLs

exógenas; además de poseer el operón responsable de la expresión de la bioluminiscencia. Así, *E. coli* pSB403 responde a las AHLs exógenas con cadenas carbonadas entre 6 y 8 átomos, con y sin oxigenación en el C-3 (RAVN *et al*., 2001). Usualmente los ensayos llevados a cabo con ella son acompañados de una cepa productora de AHLs, como *Pseudomonas putida* IsoF. Este biosensor también es ampliamente utilizado para la detección de AHLs, como también de agonistas y antagonistas de QS. También existen cepas nativas de bacterias que son utilizadas como biosensores. Estas cepas son capaces de producir y detectar las AHLs por sí mismos, y expresar pigmentos. Un ejemplo es *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 que expresa violaceína en presencia de su propia AHLs: la *N*-hexanoil-L-homoserin lactona C6HSL (McCLEAN *et al*.; 1997); o *Serratia rubidaea* JCM 14263, que controla la producción de prodigiosina, un pigmento rojo (KANAGASABHAPATHY *et al*., 2009). En la parte experimental de este trabajo se emplearon *E. coli* pSB403 y *C. violaceum* ATCC 31532 como biosensores, para la identificación de extractos y compuestos puros con actividad IQS.

Otros cepas empleadas para la búsqueda de IQS son los biosensores selectivos de inhibidores de *quorum sensing* (SIQS). Este tipo de biosensores constan de un gen regulador (homologo a *luxR*) y un gen controlador fusionado a un gen suicida. En presencia de moléculas de señalización (AHLs), el gen bajo el control del *quorum sensing* es transcrito causando la muerte celular; por el contrario en presencia de sustancias IQS, la producción del tóxico es detenida y la bacteria puede crecer normalmente. En estos sistemas se observa el crecimiento bacteriano como resultado positivo para sustancias IQS (RASMUSSEN *et al*., 2005; SKINDERSOE *et al*., 2008).

Finalmente, otros biosensores aprovechan el hecho de que algunas bacterias poseen flagelos, particularmente si ellas crecen sobre superficies sólidas, que pueden emplear en una forma de motilidad llamada *swarming*. Este tipo de locomoción es estrictamente dependiente de la habilidad de las bacterias (en una superficie adherente) de someterse a un proceso de diferenciación, caracterizado por la producción de pilis. Este mecanismo se considera como un comportamiento de respuesta frente a la superficie, en el que las bacterias cambian su expresión genética desarrollando una gran cantidad de flagelos de mayor longitud, los cuales les dan la capacidad de actuar como una población multicelular colonizando rápidamente sustratos sólidos en búsqueda de nutrientes (CALVIO *et al*., 2005). Así, un método indirecto de ensayar la inhibición de sistemas de *quorum sensing* es mediante la observación de la motilidad de algunas cepas que la expresan: *Escherichia coli* O157:H7, y *Pseudomonas aeruginosa* PA-01 (VATTEM *et al.* 2007).

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de *quorum sensing* es necesario cuantificar los efectos bactericidas de los extractos, fracciones y compuestos, mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) que afecta el crecimiento bacteriano, esto se realiza para evitar falsos positivos en la detección

de IQS, y tener certeza de que el compuestos o extracto tiene esta propiedad y que no sea bactericida.

1.5 ALGUNOS COMPUESTOS CON ACCIÓN INHIBITORIA DE *QUORUM SENSING*

El *quorum sensing* regula los procesos fundamentales de virulencia en las bacterias, y la interferencia en los mecanismos de comunicación celular es una estrategia racional para atenuar los factores de virulencia. En este campo las investigaciones están encaminadas a desarrollar estrategias capaces de interferir los sistemas de *quorum sensing* y frenar la resistencia de las bacterias hacia las sustancias antibióticas (VANDEPUTTE *et al*., 2010), así como también buscar solución a algunos problemas relacionados con el fenómeno de comunicación, entre ellos el *fouling*.

Entre las estrategias de inhibición de QS, la intercepción de las AHLs mediante la unión de ligandos sintéticos o de origen naturales en las proteínas tipo LuxR representa la manera más conocida de controlar los sistemas de *quorum sensing* en bacterias gram negativas. Durante los últimos años los esfuerzos por encontrar sustancias inhibidoras de la comunicación se ha centrado en esta área. En este contexto, la búsqueda de sustancias IQS se ha llevado tanto para compuestos de origen natural como sintético, pasando por el modelamiento computacional de ellos y de AHLs, para luego llevar a cabo su síntesis química (CAMPBELL *et al*., 2009). A continuación se resumen las investigaciones hechas en cuanto a la búsqueda e identificación de sustancias inhibitorias de *quorum sensing* en fuentes naturales, así como también aquellos inhibidores de origen sintético.

1.5.1 PRODUCTOS NATURALES INHIBIDORES DE *QUORUM SENSING*

Desde el punto de vista de los productos naturales las algas, las plantas, al igual que los invertebrados marinos y los microorganismos han sido estudiados en búsqueda de compuestos que interfieran con el *quorum sensing* de bacterias gram negativas. La producción de compuestos inhibidores por alguno de los organismos anteriores ha sido vista como un mecanismo de protección y regulación de las comunidades bacterianas con las que se enfrenta el organismo productor (KONAKLIEVA & PLOTKIN, 2006).

1.5.1.1 INHIBIDORES DE *QUORUM SENSING* OBTENIDOS A PARTIR DE PLANTAS

Las plantas han sido una fuente importante en la búsqueda de compuestos químicos para el tratamiento de los diferentes males patogénicos que afectan al hombre. No obstante, la búsqueda de sustancias activas contra bacterias ha cambiado de enfoque, dejando un poco rezagado el que priorizaba la búsqueda de sustancias con

actividad bactericida, y centrándose más en la búsqueda de moléculas capaces de interferir con el *quorum sensing* de las bacterias, puesto que este se relaciona con sus virulencias, sin disparar los mecanismos de defensa bacterianos y por tanto no se genera resistencia. En este sentido, los trabajos realizados sobre la búsqueda de drogas antipatogénicas, como han sido llamados los inhibidores de *quorum sensing*, muestran que una gran variedad de organismos vegetales pueden modular el comportamiento en la expresión genética de bacterias mediante la inducción de metabolitos secundarios que pueden mimetizar las moléculas de señalización bacterianas.

Lo anterior se puede entender porque las plantas han evolucionado y han establecido, por cuidadosa regulación, asociaciones simbióticas con las bacterias, por lo tanto no puede ser sorprendente que los organismos superiores sean capaces de percibir y responder a las señales bacterianas (HUBER *et al.*, 2003). A continuación se presentan algunos ejemplos de estos trabajos, donde resulta llamativo que la mayor parte de éstos se han realizado sobre extractos sin que se identifique las sustancias puras responsables de la actividad.

Algunos estudios sistemáticos de plantas ya han sido hechos. Entre ellos Al-Hussaini et al. en 2009 evaluaron los extractos de diferentes partes de ocho plantas (*Tecoma capensis*, *Populus nigra*, *Populus alba*, *Sonchus oleraceus*, *Lavandula angustifolia*, *Rosmarinus officinalis*, *Laurus nobilis* y *Jasminum sambac*) ensayando su actividad inhibitoria de *quorum sensing* frente a *Chromobacterium violaceum*. Los resultaros indicaron que los extractos de las plantas *Sonchus oleraceus* y *Laurus nobilis* mostraron buena actividad (AL-HUSSAINI & MAHASNEH, 2009). También cabe mencionar el *screening* sobre extractos de plantas del Sur de Florida, realizados contra *Chromobacterium violaceum*, *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, en donde seis plantas resultaron promisorias como fuentes de compuestos IQS (ADONIZIO *et al.,* 2006 y 2008).

De otro lado algunas plantas empleadas en la preparación de alimentos se han identificado como fuente de compuestos con actividad IQS. Así, Vattem et al. en 2007 evaluaron la inhibición de *quorum sensing* en *Chromobacterium violaceum* de los extractos de arándano agrio, arándano silvestre, frambuesa, mora, fresa y uva; también extractos de especies y hierbas, entre las que estaban el orégano, el romero, la albahaca, el tomillo, la col, la cúrcuma y el jengibre. Los resultados mostraron que fueron más activos los extractos de las especies y hierbas. El extracto de albahaca fue el de más alta actividad, seguido por los extractos de tomillo, romero, jengibre y cúrcuma; mientras el extracto de orégano no mostró actividad. Entre los extractos de frutas, el de frambuesa, arándano y uva, fueron los más activos. Ellos también realizaron la cuantificación de la concentración subletal de los extractos sobre la motilidad *swarming* expresada por las bacterias patógenas *Escherichia coli* (EC)O157:H7 y *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Los resultados obtenidos en el ensayo

de motilidad *swarming* revelaron que todos los extractos fueron activos contra *P. aeruginosa* PAO1, siendo los de las frutas los de más alta actividad (VATTEM *et al*., 2007).

El extracto de ajo (*Allium sativum*), el cual también posee actividad antibiótica, exhibe actividad inhibitoria y reguladora de sistemas de *quorum sensing*. Del ajo se han aislado compuestos azufrados que se observan en la Figura 1.6, los cuales actúan como inhibidores de QS (KONAKLIEVA & PLOTKIN, 2006).

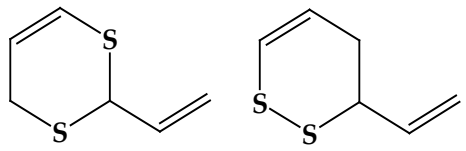
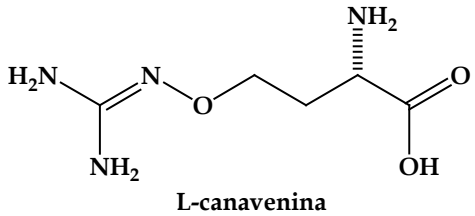


Figura 1.6 Compuestos IQS aislados del extracto de ajo

Algunas plantas leguminosas como la arveja, la soya, el arroz y *Medicago truncatula* producen compuestos que actúan como miméticos de AHLs, interfiriendo en algunos biosensores con receptores tipo LuxR (TEPLITSKI *et al*., 2000). A pesar de que muchas de las estructuras de estas sustancias no han sido determinadas, algunas ya comienzan a conocerse. Un ejemplo es la inhibición de la expresión de exopolisacáridos por parte del derivado amino ácido L-canavanina en *Sinorhizobium meliloti*. L-canavanina (Figura 1.7) es un análogo de arginina producido por semillas de la leguminosa *Medicago sativa*. Se cree que el posible mecanismo de inhibición es a través del impedimento del plegamiento de la proteína reguladora de *quorum sensing* (ExpR) en esta bacteria (KESHAVAN *et al*., 2005). La existencia e intervención de tales compuestos en las relaciones ecológicas entre leguminosas y bacterias sugiere que la plantas llevan el control de la regulación (BOYER & WISNIEWSKI-DYÉ, 2009).



L-canavenina

Figura 1.7 L-canavanina aislada de la leguminosa *Medicago sativa* con actividad IQS

De otro lado los aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), canela, lavanda y menta poseen actividad inhibitoria de QS. El análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas proporcionó información acerca del contenido del aceite de clavos, en el cual se logró identificar el eugenol como el constituyente mayoritario, además de otros constituyentes minoritarios entre los que

estaban el β-cariofileno, isocariofileno, óxido de cariofileno, 1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metil etil) naftaleno y el acetato de 1,6-octadiene-ol-,3,7-dimetil (Figura 1.8). Sin embargo, el ensayo del eugenol puro no mostró inhibición de QS por lo que el compuesto responsable de la actividad del aceite no ha sido determinado (KHAN *et al*., 2009).

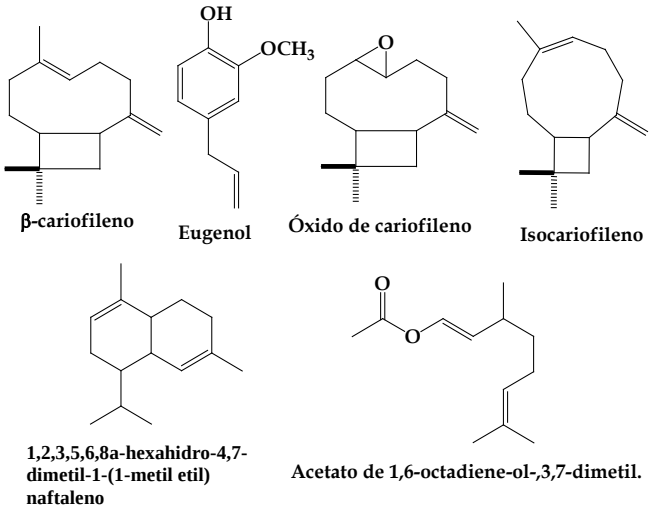


Figura 1.8 Componentes del aceite esencial del clavo. El aceite es activo pero no se ha identificado cuál es el componente responsable

FLAVONOIDES Y COMPUESTOS FENÓLICOS INHIBIDORES DE *QUORUM SENSING*

Los compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides han sido ampliamente estudiados porque han mostrado una amplia gama de actividades biológicas entre las que encontramos: actividad antioxidante, anticancerígena, antimutagénica, antiinflamatoria, sedante, antialérgica y antimicrobiana (LIU *et al*., 2010). Algunas de las funciones ecológicas de los flavonoides ya han sido descritas, tal como su intervención en el transporte de las auxinas y su importancia en la atracción de algunos animales benéficos, por sus llamativos colores, hacia algunas partes específicas de las plantas. En la actualidad, también se ha establecido que ellos parecen cubrir otras funciones más relacionadas con la regulación de genes y señalización molecular interreinos (MATHESIUS & WATT, 2011).

Al ver en detalle las relaciones simbióticas entre plantas y rizobios, se puede comprender que la formación de nódulos es un proceso que inicia en la planta con la detección de las señales moleculares bacterianas. Estas moléculas son denominadas factores Nod y son productos de la expresión de los genes *nod* en las bacterias, llevada a cabo por las proteínas reguladoras NodCs. Los flavonoides de las plantas

son capaces de inducir la producción de factores Nod. Recientemente se ha sugerido que la presencia de un flavonoides apropiado puede permitir la unión de la proteína NodC en el sitio del gen promotor en la molécula de ADN, permitiendo así que la ARN polimerasa inicie la transcripción del gen. Sin embargo, la interacción entre las proteínas NodC y los flavonoides no necesariamente resulta en transcripción, pues se han descrito algunos flavonoides que a pesar de enlazarse a los receptores no inducen expresión. Así, sólo algunos flavonoides específicos pueden activar la expresión de genes en ciertas bacterias. Aquí cabe decir que las proteínas NodC de varios rizobios pueden responder a un set de flavonoides, pero no existe correlación entre el número de flavonoides capaces de activar la expresión en varias especies de bacterias y la variedad de las plantas hospederas (COOPER, 2007). Los flavonoides que presentan oxigenación en los carbonos C-4 y C-7 son reconocidos por inducir los genes *nod*, entre ellos la luteolina y la genisteina son responsables de la activación de factores Nod en varios rizobios. Otros como la quercetina pueden activar factores de virulencia, tal como lo hace en *Pseudomonas syringae* (Figura 1.9). De ahí que ellos sean considerados como moléculas capaces de alterar sistemas de *quorum sensing* (BRENCIC & WINANS, 2005).

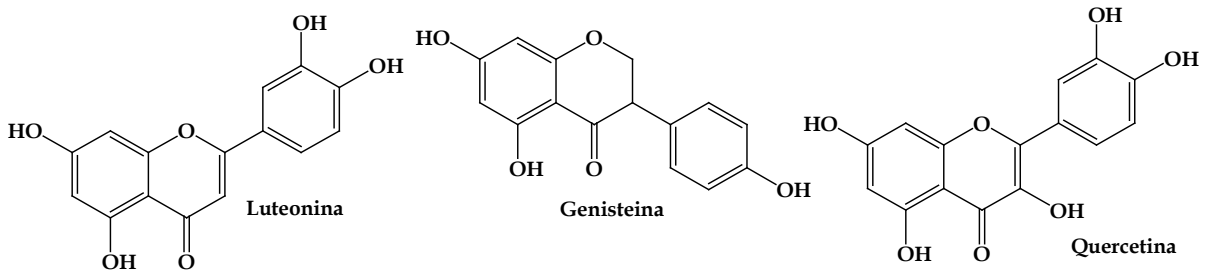


Figura 1.9 Algunos de los flavonoides reportados por modular la expresión de genes en bacterias. La luteonina y la genisteina, inducen la expresión de factores Nod en rizobios; la quercetina, por el contrario induce la expresión de factores de virulencia en *Pseudomonas syringae*

Se ha encontrado que los extractos de hoja y corteza de *Combretum albiflorum*, poseen compuestos inhibidores de *quorum sensing* capaces de afectar la producción de piocianina (un factor de virulencia) en *P. aeruginosa* PAO1. Del extracto de corteza, rico en flavonoides, se logró identificar la catequina como uno de los compuestos inhibidores de *quorum sensing.* La catequina, (Figura 1.10), mostró inhibición de la expresión de la violaceína sin afectar el crecimiento de *Chromobacterium violaceum* CV026. (VANDEPUTTE *et al*., 2010). La quercetina junto con la naringenina, la naringina, la sinensetina, la hesperidina, la apigenina, el kaempferol, la rutina, la neohesperedina, y la neoeriocitrina, (Figura 1.10), fueron ensayados contra *V. harveyi* BB886 y *V. harveyi* MM32, además de examinar la inhibición de la formación de biopelículas de estos compuestos en *E. coli* O157:H7. Los resultados mostraron que todos los flavonoides, excepto hesperidina y neoeriocitrina, poseen actividad inhibitoria de bioluminiscencia en *V. harveyi.* En cuanto a la inhibición de la formación de biopelículas en *E. coli*, todos presentaron actividad, exceptuando la

hesperidina. De ellos, naringenina y quercetina presentaron la más potente actividad en los ensayos contra *E. coli* (VIKRAM *et al*., 2010).

De los extractos acuosos de hojas y frutos de un espécimen de *Moringa oleífera* se lograron identificar por CLAE y EM/EM compuestos fenólicos entre los que se encuentran el ácido gálico, el ácido clorogénico, el ácido elágico, el ácido ferúlico, el kaempferol, la quercetina y la vanillina (Figura 1.10). Ambos extractos mostraron actividad moduladora de *quorum sensing* al usar como biosensor *C. violaceum* 12472, observándose disminución en la expresión de la violaceína sin observar actividad bactericida (SINGH *et al*., 2009). No obstante no se individualizó el compuesto responsable de la actividad.

Hasta el momento se habían investigado las propiedades antibacteriales de la miel desde el punto de vista de viabilidad celular; sin embargo, un estudio de inhibición de la comunicación bacteriana fue llevado a cabo con mieles uniflorales, lográndose establecer que poseen esta propiedad. No obstante, el contenido de compuestos constituyentes, identificados por CLAE-EM/EM, de algunas de las mieles más activas y de las mieles de menor actividad resultó ser muy parecido en cuanto a su compuestos fenólicos (flavonoides y derivados del ácido hidroxicinnámico), pero no en cuanto a su cantidad relativa. Se cree que las propiedades conservantes de la miel es debida a estos compuestos, y que la potencialización de la actividad se basa en que algunos de ellos son marcadores moleculares de las plantas (TRUCHADO *et al*., 2009). No obstante, no se individualizaron los compuestos responsables de la actividad.

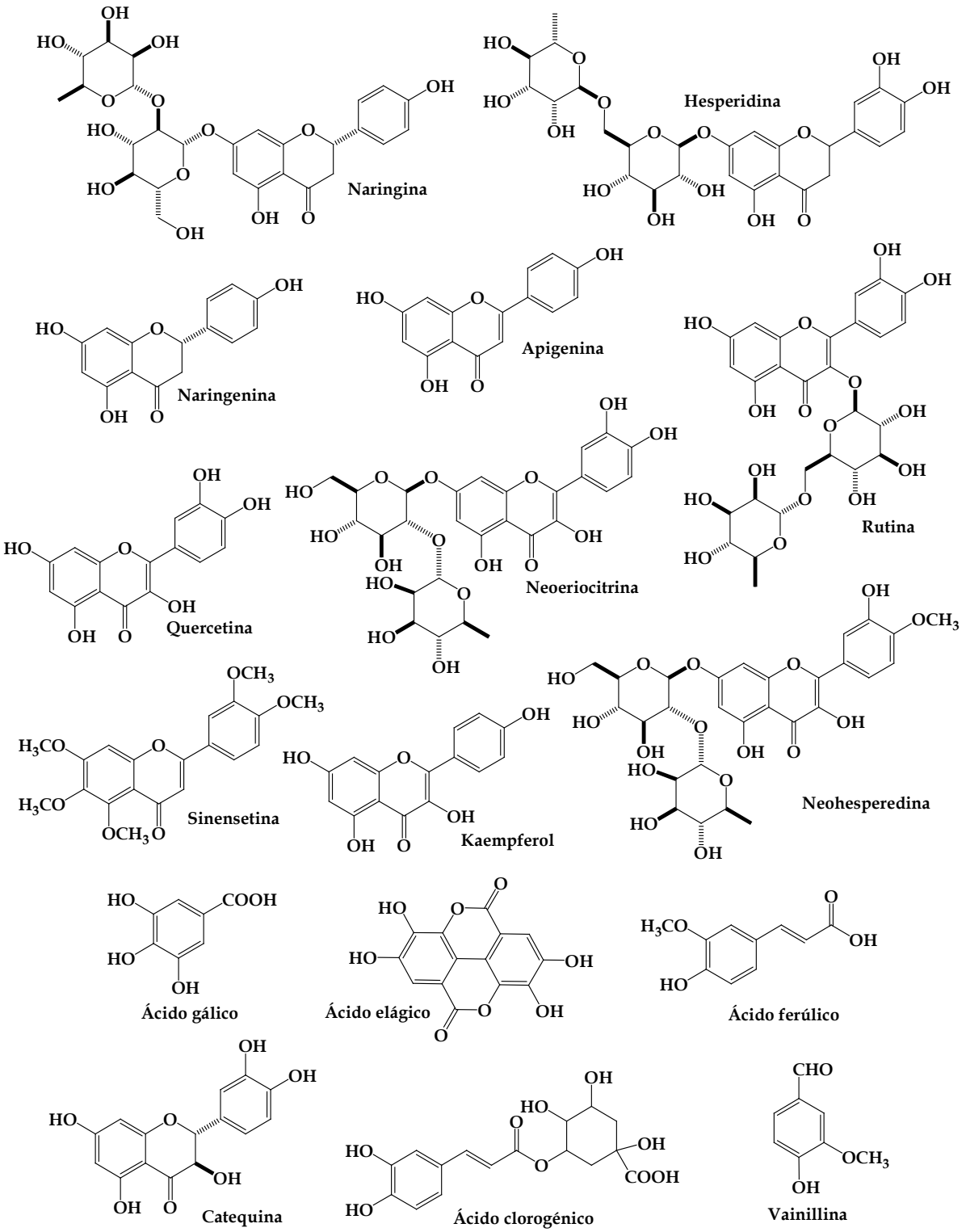


Figura 1.10 Flavonoides y compuestos fenólicos con propiedades IQS. La hesperidina no se mostró activa como IQS

De manera similar, fueron ensayados los compuestos galato de (-)-epigalocatequina, el ácido elágico y ácido tánico (Figura 1.11), todos comúnmente producidos por las plantas, usando las cepas *Burkholderia cepacia* H111, *Escherichia coli* MT102 (pSB403) y *Pseudomonas putida* (pKR-C12). Estos experimentos permitieron determinar el efecto de las sustancias sobre la inhibición de biopelícula y la motilidad *swarming*, la bioluminiscencia, y la fluorescencia, respectivamente. De igual forma, se evaluó la actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano de cada uno de los compuestos contra las cepas. Se encontró que todos los compuestos presentaron antagonismo frente las AHLs en los ensayos de inhibición de fluorescencia y bioluminiscencia a concentraciones por debajo de la concentración mínima inhibitoria de crecimiento. El galato de (-)-epigalocatequina resultó ser el más activo, seguido del ácido elágico. Sin embargo, el ácido tánico no presentó actividad en los ensayos de inhibición de biopelícula, ni en los de motilidad *swarming* (HUBER *et al*., 2003).

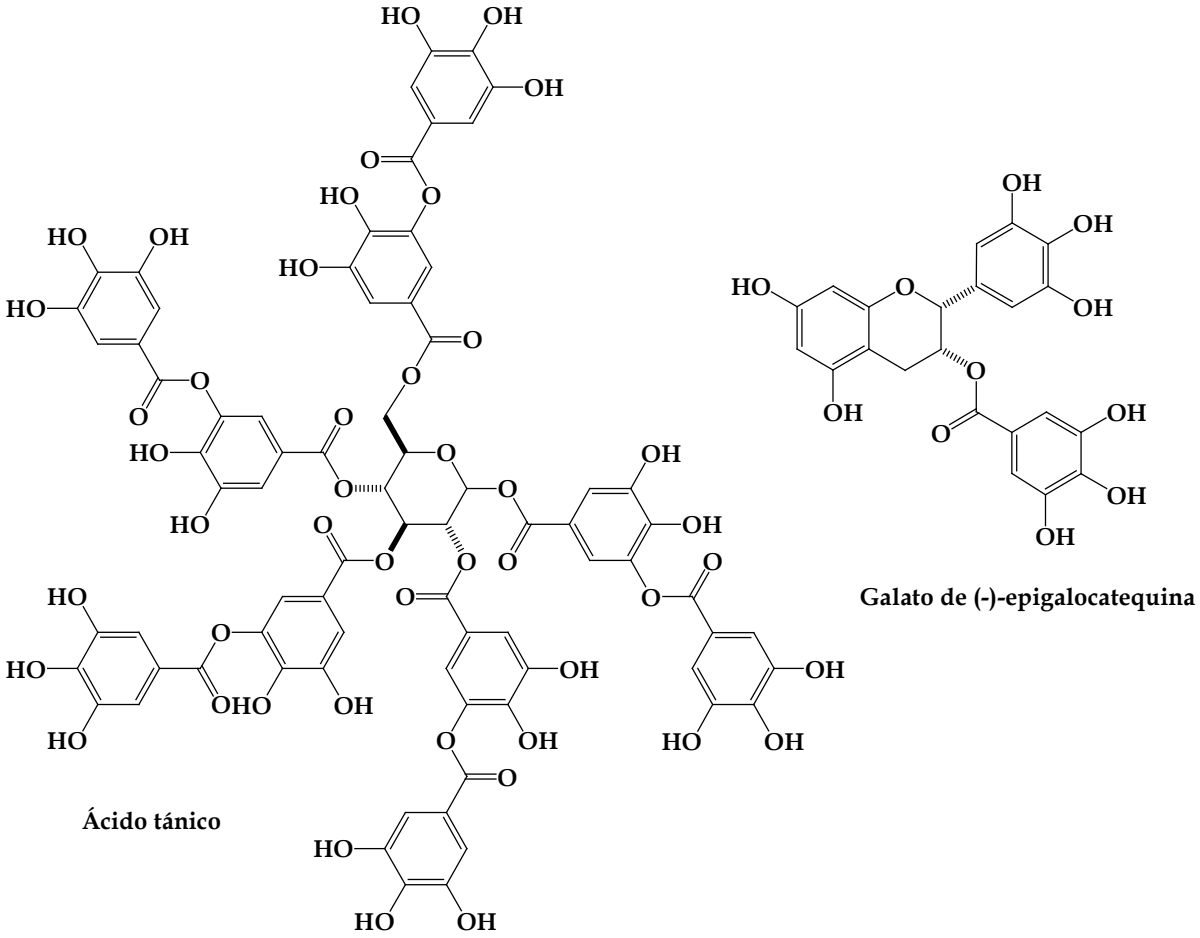


Figura 1.11 Estructuras del ácido tánico y el galato de (-)-epigalocatequina

1.5.1.2 INHIBIDORES DE *QUORUM SENSING* OBTENIDOS A PARTIR DE MICROORGANISMOS

Así como las plantas, algunas bacterias son capaces de interferir con la comunicación celular de otras. Un ejemplo de este tipo es la bacteria gram positiva *Halobacillus salinus*, que produce fenetilamida (Figura 1.12) que inhiben la regulación de bioluminiscencia en *Vibrio harveyi* y la producción de violaceína en *Chromobacterium violaceum*. Este metabolito secundario no es tóxico y puede actuar como antagonista en el *quorum sensing* por competencia con la AHL sobre los receptores, pero aun hoy en día el mecanismo no es claro (BOYER & WISNIEWSKI-DYÉ, 2009).

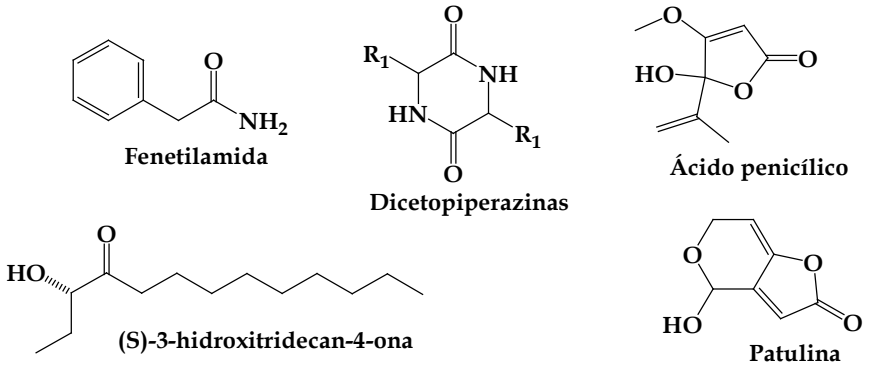


Figura 1.12 Algunos compuestos de origen microbiano con actividad IQS

Vibrio cholera produce (*S*)-3-hidroxitridecan-4-ona (Figura 1.12), que se enlaza a la proteína CqsS provocando la inactivación de la proteína LuxO, la cual regula la actividad funcional del factor de transcripción HapR y por lo tanto controla la expresión de los genes responsables de virulencia y formación de biopelículas en sí mismas (SHPAKOV, 2009). Esta bacteria expresa a baja densidad celular sus factores de virulencia, sin embargo mediante un sistema de regulación en el que emplea la molécula antes mencionada, *V. cholera* reprime su virulencia (HIGGINS *et al*., 2007).

Las dicetopiperazinas (Figura 1.12), que son dipéptidos cíclicos, han sido aisladas con diferentes radicales del sobrenadante de *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans* y *Pseudomonas putida.* También aisladas de levaduras, líquenes, hongos y en algunos tejidos de mamíferos, son capaces de activar o antagonizar algunos sistemas de *quorum sensing* tipo LuxR, tales como la motilidad *swarming* en *Serratia liquefaciens*. Aunque el rol ecológico de estas moléculas aun no se ha logrado establecer, se sugiere que cumplen un papel de comunicación celular entre especies diferentes (BOYER & WISNIEWSKI-DYÉ, 2009).

En un *screening* hecho a parti de extractos de 50 hongos del genero *Penicillium,* se encontraron los compuestos ácido penicílico y patulina (Figura 1.12), que inhiben la expresión de genes control del *quorum sensing* en *P. aeruginosa*; se ha reportado que

la patulina puede aumentar la susceptibilidad de las biopelículas a la tobramicina (RASMUSSEN *et al*., 2005).

Sustancias no identificadas han sido también aisladas del alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, las cuales mimetizan las AHLs y estimulan los receptores LasR (*Pseudomonas aeruginosa)* y CepR (*Burkholderia cepacia*) en cepas de biosensores, pero no en los receptores LuxR (*Vibrio fischeri*), AhyR (*Aeromonas hydrophila*) o CviR (*Chromobacterium violaceum*) sugiriendo que estos compuestos afectan diferentemente la señalización en los sistemas de *quorum sensing* (BOYER & WISNIEWSKI-DYÉ, 2009).

Schulz et al. evaluaron la actividad antiproliferativa de algunos volátiles de bacterias contra hongos, levaduras y bacterias (Figura 1.13); y la actividad inhibitoria de QS contra dos biosensores: *E. coli* MT102 (pJBA132) y *Pseudomonas putida* F117 (pRK-C12). Entre los compuestos ensayados estaban ácidos, alcoholes, lactonas, cetonas, amidas, pirazinas, compuestos de azufre, compuestos aromáticos entre otros volátiles comúnmente encontrados en bacterias. En la actividad antimicrobiana de los compuestos, las γ-butirilactonas fueron activas contra bacterias, hongos y levaduras; mientras que la actividad fue nula cuando presentaban una expansión en el anillo (anillos de 6 y 7 átomos). Entre los compuestos de azufre, el único con actividad fue el *S*-metil benzotioato contra hongos y levaduras. Las γ-butirilactonas, 10-metilundec-2-en-4-olida, 10-metilundec-3-en-4-olida, 10-metildodec-2-en-4-olida; y la δ-lactona 10-metilundecan-5-olida, mostraron ser activas en la inhibición de la florescencia en *Pseudomonas putida* F117, siendo esta última lactona la de más alta actividad. De otro lado las lactonas 10-metilundecan-4-olida y 10-metildodecan-4-olida, las cuales no presentan doble enlace en el anillo, estimularon la respuesta del biosensor, comportamiento atribuido posiblemente a la similitud estructural de estas lactonas con las AHLs. Los compuestos con mayor actividad contra *E. coli* MT102 fueron: la 2-metil-4-tetradecanona, la 2-pentilpiridina, el *S*-metil-3-(metilsulfanil)propanetioato, y el isovelerato de furfurilo que también mostró actividad antimicrobiana. En general, de los resultados obtenidos en la inhibición de QS por parte de estos volátiles microbianos se encontró que el 25% de los compuestos fueron capaces de reducir la actividad del *P. putida* F117, mientras que el 19% de los compuestos mostró actividad inhibitoria contra *E. coli* MT102 (SCHULZ *et al*., 2010).

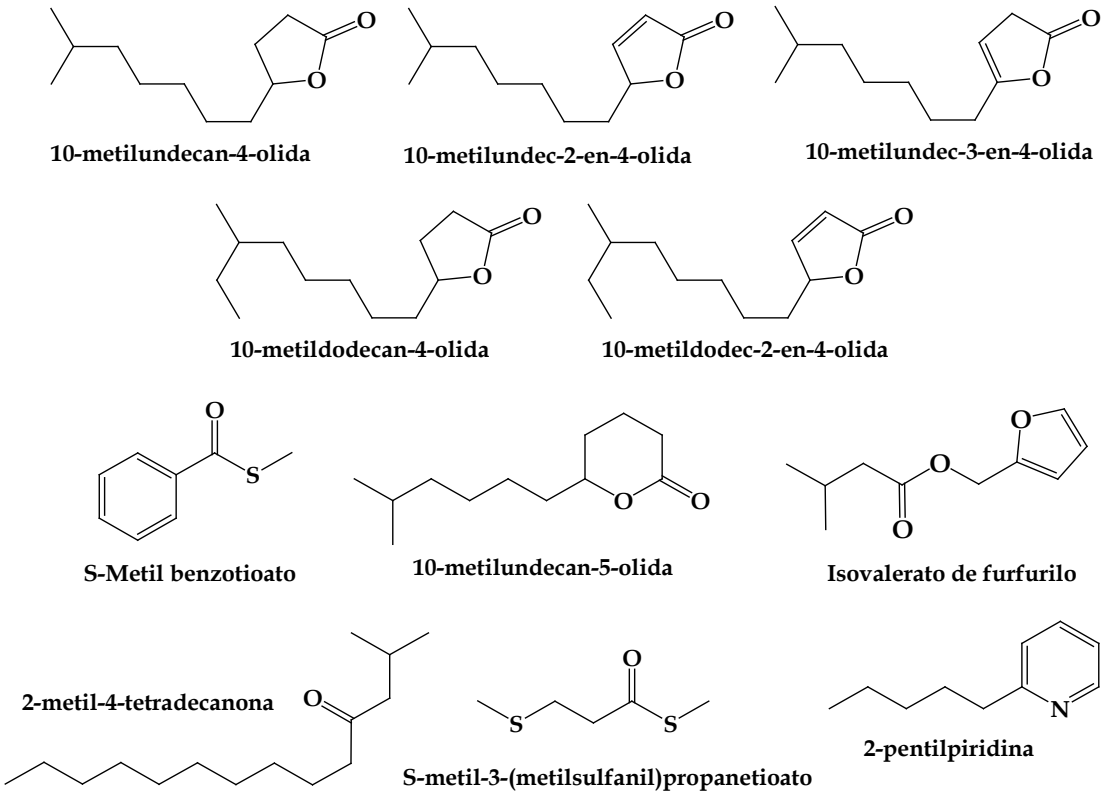


Figura 1.13 Algunos volátiles de bacterias ensayados como IQS

Los ácidos tumónoicos E - H (Figura 1.14), aislados de la cianobacteria *Blennothrix cantharidosmum,* mostraron actividad inhibitoria de QS moderada frente al sistema LuxI/LuxR de *Vibrio fischeri* (cepa nativa). De ellos, el ácido tumónoico F mostró ser el más activo con un IC_{50} de 62 µM (CLARK *et al*., 2008). Mientras de la cianobacteria *Lyngbya majuscula* se han obtenido las malingamidas, que junto con la malingolida (MAL) (Figura 1.14), han mostrado actividad inhibitoria de QS (DOBRETSOV *et al*., 2010; KWAN *et al*., 2010).

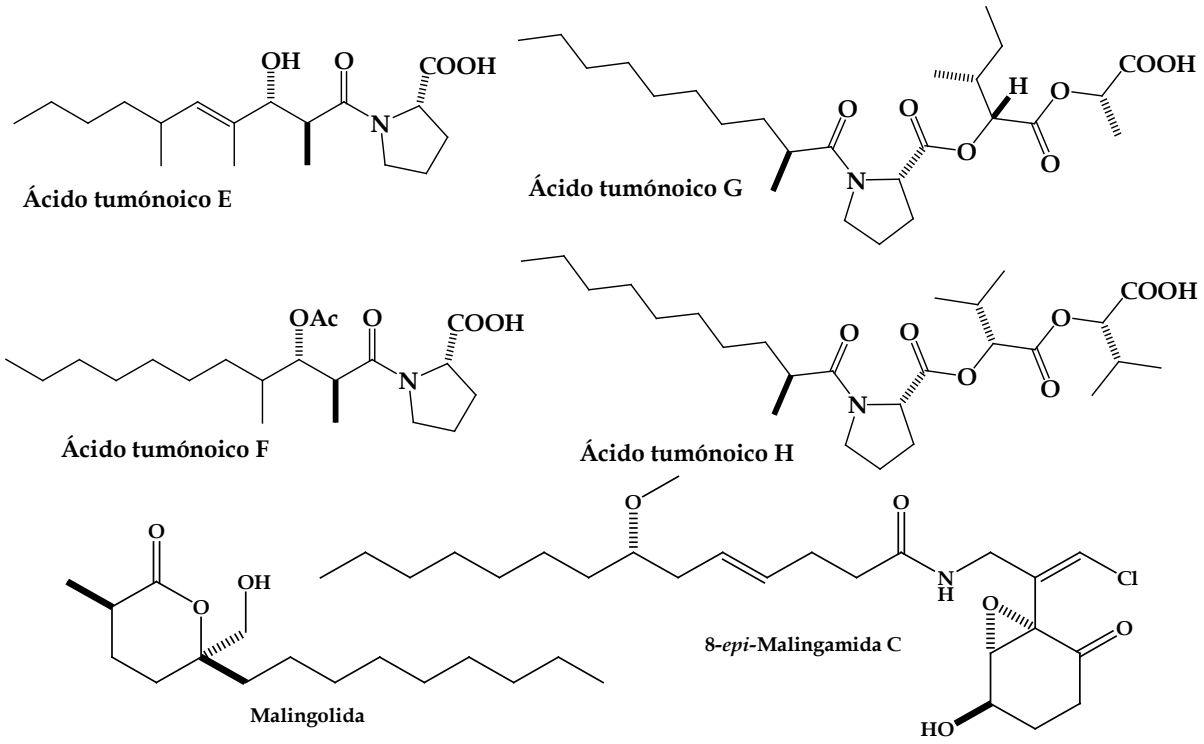


Figura 1.14 Compuestos con actividad IQS obtenidos a partir de cianobacterias

1.5.1.3 INHIBIDORES DE *QUORUM SENSING* AISLADOS A PARTIR DE ORGANISMOS MARINOS

El ejemplo más ampliamente estudiado de inhibidores de *quorum sensing* en organismos marinos, es la producción de furanonas bromadas (Figura 1.15) por parte de alga roja *Delisea pulchra*. Las furanonas actúan en múltiples especies de bacterias gram negativas, enlazándose a los receptores proteínicos tipo LuxR, inactivándolas y reduciendo la vida media de la proteína. Lo anterior mediante la formación de un complejo poco estable (KONAKLIEVA & PLOTKIN, 2006). Estas furanonas inhiben la motilidad *swarming* en *Serratia liquefaciens*, reducen la virulencia y la bioluminiscencia en *Vibrio harveyi*; y alteran la arquitectura de las biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa* (BOYER & WISNIEWSKI-DYÉ, 2009). Estas sustancias también han mostrado una excelente actividad como anti*founling* (HUBER *et al*., 2003). Sin embargo por efectos de toxicidad, sus estudios clínicos no han avanzado mucho.

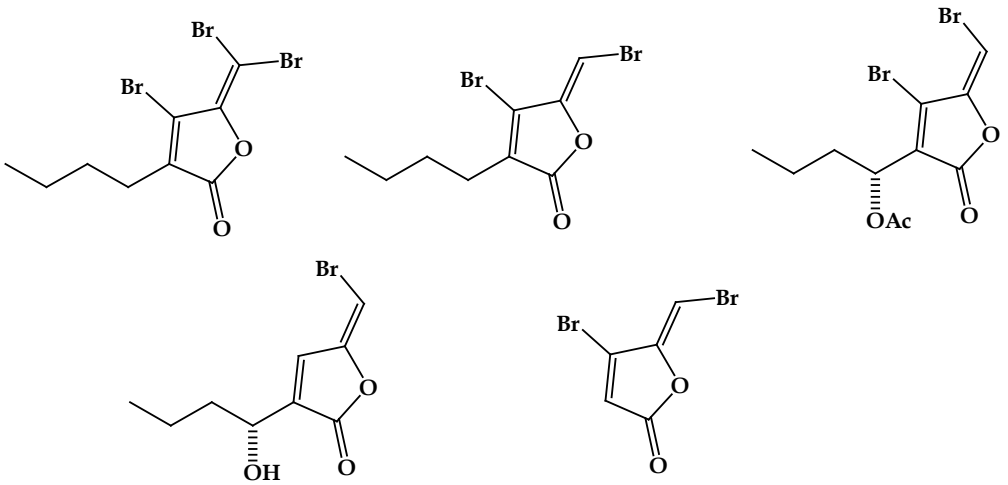


Figura 1.15 Furanonas bromadas asiladas del alga roja *Delisea pulchra*

Otro ejemplo de compuestos de origen marino con actividad inhibitoria de *quorum sensing*, son los alcaloides bromados (Figura 1.16) producidos por el briozoo *Flustra foliacea*, que mostraron efectos antagonistas frente las AHLs en sistemas de *quorum sensing* ensayados con cepas de bacterias biosensoras (*Pseudomonas putida* pKR-C12, *P. putida* pAS-C8, y *Escherichia coli* pSB403) (PETERS *et al*., 2003).

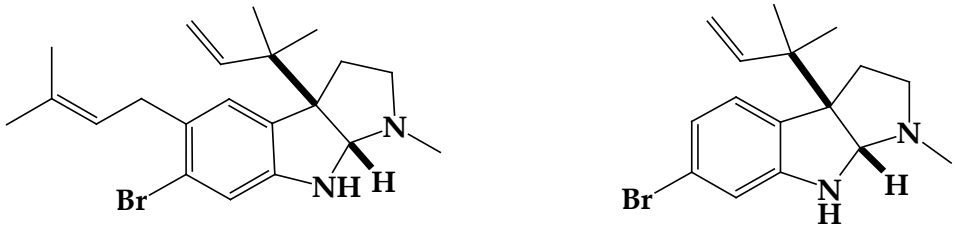


Figura 1.16. Alcaloides inhibidores de QS aislados del briozoo *Flustra foliacea*

Existen pocos ejemplos de búsquedas sistemáticas de IQS en organismos marinos, a pesar del probado éxito que éstos han tenido en otras ramas de la medicina, particularmente en la búsqueda de anticancerígenos (CRAGG *et al*., 2009). Skindersoe y colaboradores llevaron a cabo una evaluación de la actividad inhibitoria de *quorum sensing* de 284 extractos de diferentes especies marinas, entre las que están algas, ascidias, esponjas y corales (duros y blandos), provenientes de la Gran Barrera de Arrecife de Australia. Encontraron que el 23% de los extractos fueron activos sobre un sistema general de *quorum sensing*, regulado mediante un mecanismo tipo LuxR; de ellos el 56% fueron activos en un ensayo frente a sistemas de *quorum sensing* de *P. aeruginosa*. Esta evaluación permitió la identificación de manoalida, el monoacetato de manoalida y la secomanoalida (Figura 1.17), de la esponja *Luffariella variabilis,* como compuestos capaces de inhibir el *quorum sensing* (SKINDERSOE *et al*., 2008).

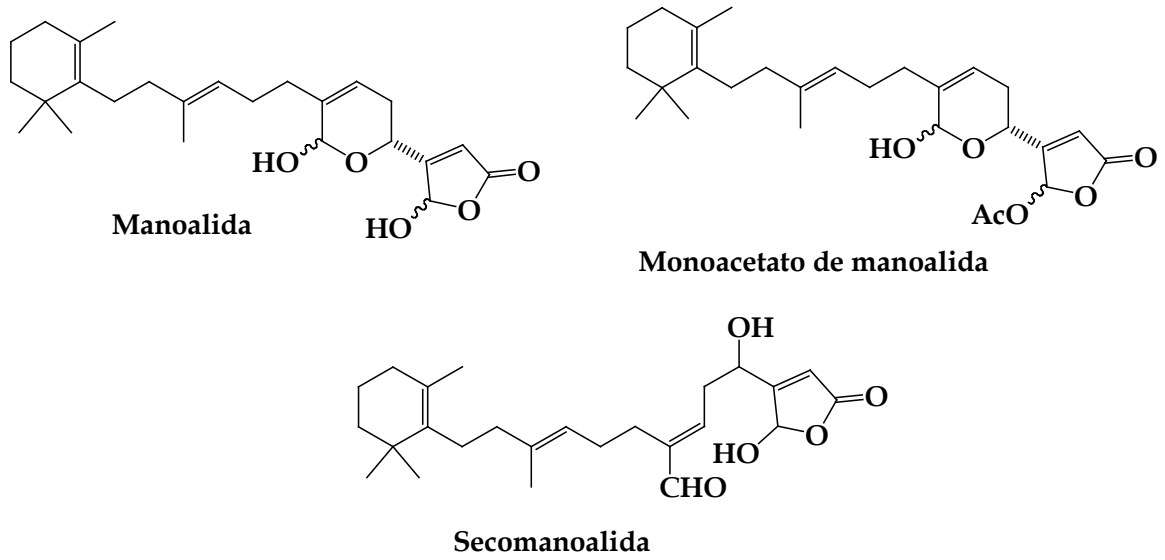


Figura 1.17 Sesterterpenos con actividad IQS aislados de la esponja *Luffariella variabilis*

La macroalga marina *Ahnfeltiopsis flabelliformis* produce las sustancias: floridósido, betonicina y ácido isetionico (Figura 1.18), los cuales en mezcla interfieren con el QS dependiente de AHLs. Ni el ácido isetionico, ni floridosido mostraron actividad cuando fueron ensayados de manera individual contra *Agrobacterium tumefaciens* NTL4; sin embargo cuando se mezclaban los dos inhibían el QS de manera dependiente de la dosis. El mecanismos de acción de estos compuesto es desconocido (KIM *et al*., 2007; LIU *et al.,* 2008).

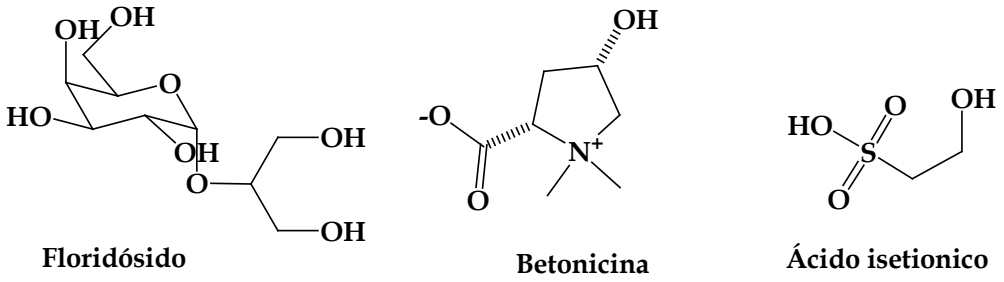
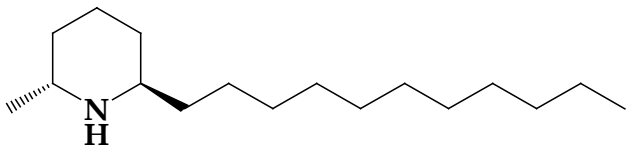


Figura 1.18 Compuestos aislado de la macroalga marina *Ahnfeltiopsis flabelliformis*

1.5.1.4 OTRAS FUENTES DE INHIBIDORES DE *QUORUM SENSING*

Recientemente, el alcaloide solenopsina A (Figura 1.19) producido por la hormiga *Solenopsis invicta*, mostró una efectiva disrupción del sistema de *quorum sensing* RhlI/RhlR de *P. aeruginosa (*PARK *et al*., 2008).



Solenopsina A

Figura 1.19 Alcaloide con actividad IQS aislado de una hormiga

La producción de enzimas que desactivan las AHLs ha sido detectada en fuentes naturales. Un ejemplo es el alga marina *Laminaria digitata,* que posee un sistema de haloperoxidasas, las cuales son capaz de mediar la inactivación de 3OAHL, previniendo así el *fouling* sobre su superficie. Por otro lado, algunas líneas celulares de mamíferos expresan paraoxonasas, que son capaz de hidrolizar el anillo lactónico de AHLs, lográndose ver como un mecanismo de defensa que impide la regulación de la expresión de factores de virulencia de bacterias patógenas (BOYER & WISNIEWSKI-DYÉ, 2009).

1.5.2 INHIBIDORES SINTÉTICOS DE *QUORUM SENSING*

Como hemos mencionado anteriormente, las moléculas autoinductoras más comúnmente usadas por las bacterias gram negativas son las AHLs, las cuales son detectadas por un receptor cognado del tipo Lux. Este hecho ha inspirado el desarrollo de AHLs no nativas, y de otras moléculas similares, para ser ensayadas como inhibidores ó moduladores de *quorum sensing.* Así, en los últimos años se han sintetizado estructuras basadas en AHLs con cambios en la cadena lateral y en el anillo lactona que incluyen la adición de átomos de carbono, el cambio del oxigeno por azufre en la lactona para dar lugar a la formación de tiolactonas, el cambio de la δ-lactona por anillos de 6 miembros con diversas sustituciones (hidroxilaciones, grupos cetos, etc). También se ha intentado modificaciones en el enlace amida. En la Figura 1.20 se pueden observar algunas estructuras de origen sintético, basadas en AHLs, reconocidas por ser sustancias antagonistas y agonistas de las AHLs naturales en diferentes proteínas tipo LuxR.

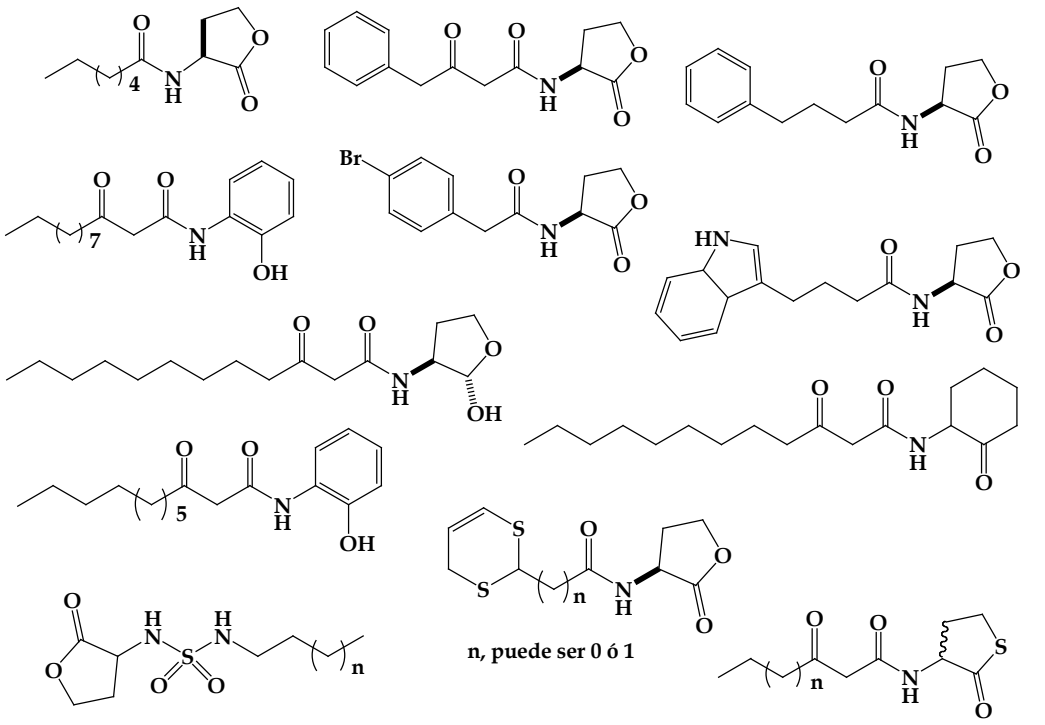


Figura 1.20 AHLs sintéticas y análogos con actividad antagonista sobre las proteínas tipo LuxR. Las tiolactonas a diferencia de las demás moléculas son agonistas, ellas son consideradas "super-activadores" de la función de las proteínas tipo LuxR (KONAKLIEVA & PLOTKIN, 2006; GESKE *et al*., 2007; FREZZA *et al*., 2008)

Geske y colaboradores sintetizaron una gran variedad de homólogos de AHLs, los cuales fueron ensayados como moduladores de *quorum sensing*. Para ello hicieron uso de cepas como: *A. tumefaciens* WCF47 (pCF372); *E. coli* DH5α (pJN105L pSC11); *V. fischeri* ES114 (Δ-*luxI*) y *P. aeruginosa* PAO1, que permiten evaluar sustancias que actúan como agonistas o antagonistas. Entre las sustancias ensayadas, los compuestos C10HSL, 4-bromofenilpropionil-HSL, 4-yodofenil-HSL, 3-nitrofenil-HSL y 4-trifluorometoxi-fenoxi-HSL (Figura 1.21) son antagonistas de las proteínas R en los diferentes biosensores. Entre ellos el que exhibe la más alta actividad contra la proteína LasR de *P. aeruginosa* fue el compuesto fluorado (4-trifluorometoxi-fenoxi-HSL). Entre los agonistas, se encuentra la AHL C12HSL, frente a la proteína LasR, y el compuesto 3-nitrofenil-HSL, que presentó también agonismo frente a la proteína LuxR de *Vibrio fischeri* (GESKE *et al*., 2007).

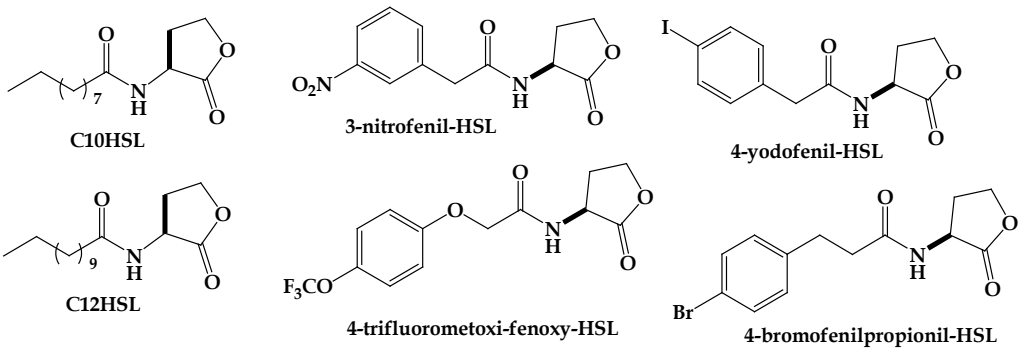


Figura 1.21 AHLs sintéticas y análogos con actividad antagonista y agonitas de proteínas tipo LuxR

Otros compuestos que han sido inspiradores para los químicos orgánicos en la búsqueda de IQS son las furanonas halogenadas, aisladas de la alga *Delisea pulchra.* Algunas furanonas sintéticas con variadas modificaciones en la cadena lateral fueron ensayadas contra diferentes biosensores para determinar su actividad inhibitoria de QS. En la Figura 1.22 se muestran las moléculas sintetizadas. Los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la biopelícula de *Salmonella enterica,* indicaron que las furanonas sin cadena alquílica (furanonas 1 y 2) fueron las de más alta actividad, pero también las más tóxicas, en comparación con las alquiladas. La toxicidad puede ser atribuida a la alta solubilidad de las primeras. De otro lado, las furanonas 3–alquiladas, con cadenas que van desde dos a seis átomos de carbono, con un átomo de bromo en el anillo y otro en la cadena de metilideno mostraron ser capaces de inhibir la biopelícula de Salmonella (furanonas 3, 4 y 5), siendo estas las más promisorias por su baja toxicidad. Las furanonas con cadena alquílica en el C-3, con más de seis átomos de carbono, presentaron actividad limitada (furanonas 6, 7 y 8), mientras las furanonas dibromodas en el metilideno (furanonas 9 y 10) no fueron activas (JANSSENS *et al*., 2008).

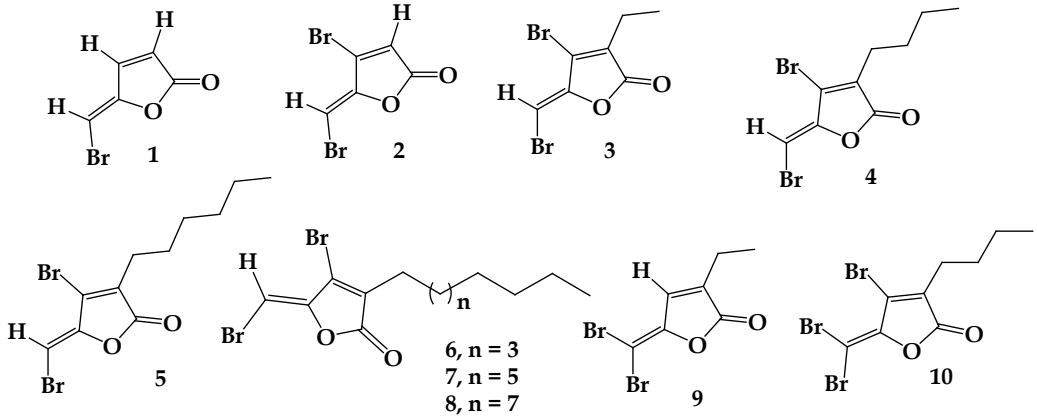


Figura 1.22 Furanonas sintéticas basadas en las aisladas de *Delisea pulchra*

1.6 RELACIÓN ENTRE *QUORUM SENSING* Y *FOULING*

El fenómeno natural de colonización de superficies sumergidas es conocido como *fouling*, y es un problema que afecta a las estructuras inanimadas construidas por el hombre, porque con el tiempo se produce corrosión y deterioro del material. El *fouling* ha sido reconocido como un proceso que comienza segundos después de la inmersión, y que inicia por la adsorción, sobre la superficie sumergida, de compuestos químicos como glicoproteínas, polisacáridos, entre otros (WAHL, 1989; FLEMMING, 2002). Posteriormente, se presenta la adhesión de bacterias, las cuales tienden a formar una biopelícula mediante producción de exopolisacáridos, lo cual es regulado por *quorum sensing* (FUQUA & GREENBERG, 2002); por último, toma lugar el asentamiento de eucariontas multicelulares, cuya etapa de fijación está influenciada por varios factores, entre los que están las señales químicas producidas por la biopelícula previamente formada (FUSETANI, 1997; CRAIG *et al*., 1997).

El *quorum sensing* contribuye con la formación y maduración de biopelículas en la etapa de colonización bacteriana (DOBRETSOV *et al*., 2009); y las biopelículas pueden inducir el asentamiento y desarrollo de larvas de invertebrados y esporas de algas marinas, pues se ha observado que las larvas de algunos invertebrados marinos sésiles, cuando buscan una superficie para colonizar y desarrollarse, responden a las biopelículas para asentarse o no sobre la superficie previamente colonizada por las bacterias, lo que se explica por la simple detección de las moléculas de señalización bacterianas.

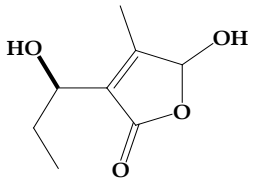
De otro lado se han observado invertebrados sésiles y algunas macroalgas que no son afectados por el *fouling*, lo que sugiere, que ellos pueden producir sustancias químicas que impiden el asentamiento y desarrollo de los "invasores". Estas moléculas pueden actuar directamente sobre el invertebrado marino y/o sus larvas; sobre las esporas de organismos colonizadores vegetales, o sobre las bacterias que forman la biopelícula, y ejercer efectos biocidas, produciendo muerte celular, ó de forma bacteriostática por inhibición de procesos fisiológicos normales. Esta última forma incluye la supresión de la expresión genética que interviene en la comunicación celular, es decir por inhibición de *quorum sensing* (DOBRETSOV *et al*.; 2009; FUSETANI, 2011).

Tanto las bacterias marinas asociadas a invertebrados, como las que se encuentran en forma de vida libre, han mostrado ser capaces de activar sistemas de *quorum sensing* en biosensores, sugiriendo que en las condiciones ambientales del mar ellas producen AHLs (DOBRETSOV *et al*., 2009; CUADRADO, 2009). Las bacterias gram negativas son las más abundantes del medio marino, cuando ellas forman biopelículas pueden inducir el asentamiento de esporas y larvas de macroorganismos. Estudios realizados sobre zooesporas de algas del genero *Ulva* demostraron que estas se asientan más sobre las superficies que liberan AHLs con

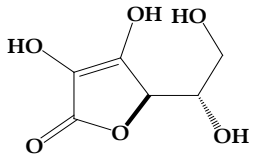
cadenas de longitud mediana, como la *N*-(3-hidroxi-hexanoil)-L-homoserinlactona (3OHC6HSL), en comparación con las AHLs de cadena corta. Así mismo, el asentamiento de las larvas del poliqueto *Hydroides elegans* se ha correlacionado con la densidad bacteriana dentro de la biopelícula; sin embargo, estudios a diferentes concentraciones de AHLs, indicaron que no inducen asentamiento y metamorfosis en las larvas (DOBRETSOV *et al*., 2009). En otros estudios se ha mostrado que AHLs de cadenas larga inducen asentamiento de las larvas de *Balanus amphitrite*, pero no son efectivas como señales de la biopelícula marina. Así, la mayoría de los resultados sugieren que las AHLs no están involucradas en el asentamiento larval, pero que ellas pueden actuar en combinación con otros factores de asentamiento (DOBRETSOV *et al*., 2009).

Como se mencionó anteriormente existen dos tipos de comunicación que involucran tanto a bacteria como hospedero, cuya interacción de comunicación beneficia en uno de los casos la supervivencia de las bacterias. Sin importar que tipo de autoinductores sean empleados (pues ellos dependerán de las bacterias), los hospederos también responden regulando el comportamiento poblacional de las bacterias, mediante la producción de compuestos que interfieren el *quorum sensing* que ellas realizan. Estos organismos lo hacen mediante la cooptación de la maquinaria que controla la expresión de los factores de colonización (KONAKLIEVA & PLOTKIN, 2006). Así, los organismos marinos responden a las señales bacterianas de *quorum sensing*, pero también interfieren con ellas, presumiblemente para controlar el crecimiento de bacterias "aliens", invasoras ó ajenas, las cuales podrían conducir a la formación de biopelícula y epibiosis indeseadas (DOBRETSOV *et al*.; 2009). Estas señales han sido denominadas como inhibidores de *quorum sensing* (RASMUSSEN & GIVSKOV, 2006).

Algunas sustancias similares a AHLs, presentan efectos indirectos en el asentamiento de eucariotas; tal es el caso de las moléculas 5-hidroxi-3[(1*R*)-1-hidroxipropil]-4-metilfuran-2(5*H*)-ona y (5*R*)-3,4-dihidroxi-5-[(1*S*)-1,2-dihidroxietil]furan-2(5*H*)-ona (Figura 1.23) que inhiben el asentamiento microbiano, y que se refleja en el establecimiento larval de los organismos *Hydroides elegans* y el briozoo *Bugula neritina* (DOBRETSOV *et al*., 2009).



5-hidroxi-3[(1R)-1-hidroxipropil]-4-metilfuran-2(5H)-ona



(5R)-3,4-dihidroxi-5-[(1S)-1,2-dihidroxietil]furan-2(5H)-ona

Figura 1.23 Furanonas que inducen asentamiento de larvas de *Hydroides elegans* y *Bugula neritina*

Como se ha sugerido, algunas larvas de invertebrados marinos prefieren un asentamiento sobre una biopelícula particular, entonces la disrupción de estas biopelículas bacterianas llevada a cabo por algunos organismos marinos puede conducir a una reducción del *fouling*.

1.7 CONCLUSIONES

Esta revisión deja claro que la búsqueda de compuestos con actividad inhibitoria de *quorum sensing* es una necesidad de la ciencia moderna. Estos compuestos pueden tener aplicación en el campo de la medicina, como medicamentos antipatogénicos por ejemplo, y en el campo de las tecnologías anti*fouling*, entre otros. Lo anterior junto con la enorme biodiversidad de nuestro país hace interesante, y necesario, el empezar con estas investigaciones, dándole de esta manera nuevas aplicaciones a nuestra biodiversidad, tales como la identificación de compuestos con actividad inhibitoria de *quorum sensing*.

1.9 BIBLIOGRAFÍA

ADONIZIO, A. L.; DOWNUM, K.; BENNETT, B.C.; MATHEE, K. Antiquorum sensing activity of medicinal plants in Southern Florida. *J Ethnopharmacol.* 2006, 103(6):427–435.

ADONIZIO, A.; KONG, K-F.; MATHEE, K. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimic Agents Chemother*. 2008, 52(1):198–203.

AGUR, Z.; KOGAN, Y.; LEVI, L.; HARRISON, H., LAMB, R.; KIRNASOVSKY, O. U.; CLARKE, R. B. Disruption of a quorum sensing mechanism triggers tumorigenesis: a simple discrete model corroborated by experiments in mammary cancer stem cells. *Biol Direct*. 2010, 5(20):1-11.

AL-HUSSAINI, R.; MAHASNEH, M. Microbial growth and quorum sensing antagonist activities of herbal plants extracts. *Molecules.* 2009, 14(9):3425-3435.

BARBER, C. E.; TANG, J. L.; FENG, J. X.; PAN, M. Q.; WILSON, T. J. G.; SLATER, H.; DOW, J. M.; WILLIAMS, P.; DANIELS, M. J. A novel regulatory system requered for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by small difusible signal molecule. *Molec Microbiol.* 1997, 24(3):555-566.

BOYER, M.; WISNIEWSKI-DYÉ, F. Cell-cell signalling in bacteria: not simply a matter of quorum. *FEMS. Microbiol Ecol*. 2009, 70(1):1–19.

BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Molec Biol Reviews*. 2005, 69(1):155–194.

CALIXTO, D.; VELOSA, L. M.; ACOSTA, E. M.; PUYANA, M.; MORALES, A.; PANQUEVA, J. H.; MEZA, M. J. Valoración de la efectividad antiincrustante de recubrimientos aplicados a embarcaciones que operan en la Bahía de Cartagena. *Ciencia y Tecnología de Buques*. 2007, 1:17-26.

CALVIO, C.; CELANDRONI, F.; GHELARDI, E.; AMATI, G.; SALVETTI, S.; CECILIANI, F.; GALIZZI, A.; SENESI, S. Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *J Bacteriol*. 2005, 187(15):5356–5366.

CAMPBELL, J.; LIN, Q.; GESKE, G. D.; BLACKWELL, H. E. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. *Acs Chem Biol*. 2009, 4(12):1051-1059.

CHEN, X.; SCHAUDER, S.; POTIER, N.; VAN DORSSELAER, A.; PELCZER, I.; BASSLER, B. L.; HUGHSON, F. M. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*. 2002, 415(6871):545-549.

CLARK, B. R.; ENGENE, N.; TEASDALE, M. E.; ROWLEY, D. C.; MATAINAHO, T.; VALERIOTE, F. A.; GERWICK, W. H. Natural products chemistry and taxonomy of the marine cyanobacterium *Blennothrix cantharidosmum. J Nat Prod.* 2008, 71(9): 1530–1537.

COOPER, J. E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol*. 2007, 103(5):1355–1365.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chem Rev.* 2009, 109(7):3012–3043.

CRAIG, J.; LEWIS, T.; NICHOLS, D.; DEGNAN, B. Bacterial induction of settlement and metamorphosis in marine invertebrates. *Int Coral Reef Sym.* 1997, 2:1219-1224.

CUADRADO, C. T. Aislamiento de *N*-acilhomoserinlactonas de algunas bacterias precedentes del mar Caribe colombiano, como evidencia de la existencia de circuitos de *quorum sensing*. Tesis de Maestría en Ciencias – Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia. 2009.

DEMBITSKY, V. M.; AL AZIZ, A. A.; SREBNIK, M. Natural and synthetic small boron-containing molecules as potential inhibitors of bacterial and fungal quorum sensing. 2011. *Chem Rev*. 111(1):209–237.

DENG, Y.; WU, J.; TAO, F. ZHANG, L-H. Listening to a new language: DSF-Based quorum sensing in gram-negative bacteria. *Chem Rev*. 2011, 111(1): 160–173.

DOBRETSOV, S.; TEPLITSKI, M.; ALAGELY, A.; GUNASEKERA, S. P.; PAUL, V. J. Malyngolide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with quorum sensing circuitry. *Environ Microbiol Reports*, 2010 2(6):739–744.

DOBRETSOV, S.; TEPLITSKI, M.; PAUL, V. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*. 2009, 25(5):413–427.

FERLUGA, S.; STEINDLER, L.; VENTURI, V. Chapter 4. *N*-Acyl homoserine lactone quorum sensing in gram-negative Rhizobacteria. P. Karlovsky (ed.), *Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology 14.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2008. 69-90.

FLAVIER. A. B.; CLOUGH, J.; SCHELL, M. A.; DENNY, T. P. Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Molec Microbiol*. 1997, 26(2):251-259.

FLEMMING, H. Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002, 59(6):629–640.

FREZZA, M.; SOULÈRE, L.; REVERCHON, S.; GUILIANI, N.; JEREZ, C.; QUENEAU, Y.; DOUTHEAU, A. Synthetic homoserine lactone-derived sulfonylureas as inhibitors of *Vibrio fischeri* quorum sensing regulator. *Bioorg Med Chem*. 2008, 16(7): 3550–3556.

FUQUA, C.; GREENBERG, E. P. Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signaling. *Nate Reviews: Molec Cell Biol*. 2002, 3(9):685-695.

FUSETANI, N. Antifouling marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2011, 28:400-410.

FUSETANI, N. Marine natural products influencing larval settlement and metamorphosi of benthic invertebrates. *Curr Org Chem.* 1997. 1:127-152.

GALLOWAY, W. R. J. D.; HODGKINSON, J. T.; BOWDEN, S. D. WELCH, M.; SPRING, D. R. Quorum sensing in gram-negative bacteria: Small-molecule

modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev*. 2011, 111(1):28–67.

GESKE, G. D.; O'NEILL, J. C.; MILLER, D. M.; MATTMANN, M. E.; BLACKWELL, H. E. Modulation of bacterial quorum sensing with synthetic ligands: systematic evaluation of *N*-acylated homoserine lactones in multiple species and new insights into their mechanisms of action. *J Amer Chem Soc.* 2007, 129(44):13613-13625.

GONZÁLEZ, J. E.; MARKETON, M. M. Quorum sensing in nitrogen-fixing Rhizobia. *Microbiol Molec Biol Reviews*. 2003, 76(4):574–592.

GREENBERG, E. Bacterial communication and group behavior. *J Clin Invest.* 2003, 112(9):1288–1290.

HICKSON, J. YAMADA, S. D.; BERGER, J.; ALVERDY, J.; O'KEEFE, J.; BASSLER, B.; RINKER-SCHAEFFER, C. Societal interactions in ovarian cancer metastasis: a quorum-sensing hypothesis. *Clin Exp Metastasis*. 2009(1): 26:67–76.

HIGGINS, D. A.; POMIANEK, M. E.; KRAML, C. M.; TAYLOR, R. K. SEMMELHACK, M. F.; BASSLER, B. L. The major *Vibrio cholerae* autoinducer and its role in virulence factor production. *Nature.* 2007, 450(7171):883–886.

HUBER, B.; EBERL, L.; FEUCHT, W.; POLSTER, J. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Z. Naturforsch C.* 2003, 58c(11-12):879-884.

JANSSENS, J. C. A.; STEENACKERS, H.; ROBIJNS, S.; GELLENS, E.; LEVIN, J.; ZHAO, H.; HERMANS, K.; DE COSTER, D.; VERHOEVEN, T. L.; MARCHAL, K.; VANDERLEYDEN, *J*. DE VOS, D. E.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol*. 2008, 74(21):6639–6648.

KANAGASABHAPATHY, M.; YAMAZAKI, G.; ISHIDA, G.; SASAKI, H.; NAGATA, S. Presence of quorum-sensing inhibitor-like compounds from bacteria isolated from the brown alga *Colpomenia sinuosa*. *Lett Appl Microbiol*. 2009, 49(5):573-579.

KESHAVAN, N.; CHOWDHARY, P.; HAINES, D.; GONZALEZ, *J*. L-Canavanine made by *Medicago sativa* interferes with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol*. 2005, 187(24):8427–8436.

KHAN, M.; ZAHIN, M.; HASAN, S.; HUSAIN, F.; AHMAD, I. Inhibition of quorum sensing regulated bacterial functions by plant essential oils with special reference to clove oil. *Lett Appl Microbiol.* 2009, 49(3):354–360.

KIM, J. S.; KIM, Y. H.; SEO, Y. W.; PARK, S. Quorum sensing inhibitors from the red alga, *Ahnfeltiopsis flabelliformis. Biotechnol Bioprocess Eng*. 2007, 12(3):308-311.
KONAKLIEVA, M.; PLOTKIN, B. Chemical communication – Do we have a quorum?. *Mini Rev Med Chem*. 2006, 6(7):817-825.

KWAN, J. C.; TEPLITSKI, M.; GUNASEKERA, S. P.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Isolation and biological evaluation of 8-epi-Malyngamide C from the Floridian marine cyanobacterium *Lyngbya majuscule*. *J Nat Prod.* 2010, 73(3):463–466.

LIU, H. B.; KOH, K. P.; KIM, J. S.; SEO, Y.; PARK, S. The effects of betonicine, floridoside, and isethionic acid from the red alga *Ahnfeltiopsis flabelliformis* on quorum-sensing activity. *Biotechnol Bioproc Eng*. 2008, 13(4):458–463.

LIU, H.; MOU, Y.; ZHAO, J.; WANG, J.; ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, D.; HAN, J.; YU, Z.; YANG, F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules.* 2010, 15(11):7933-7945.

LOH, J.; CARLSON, R. W.; YORK, W. S.; STACEY, G. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002, 99(22):14446–14451.

MATHESIUS, U.; WATT, M. Progress in botany. Rhizosphere signals for plant-microbe interactions: Implications for field-grown plants. 2011, 72:125-161.

McCLEAN, K. H.; WINSON, M. K.; FISH, L.; TAYLOR, A.; CHHABRA, S. R.; CAMARA, M.; DAYKIN, M.; LAMB, J. H.; SWIFT, S.; BYCROFT, B. W.; STEWART, G. S. A. B.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology.* 1997, 143(Pt 12):3703-3711.

NG, W-L.; BASSLER, B. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet.* 2009, 43:197–222.

PARK, J.; KAUFMANN, G.; BOWEN, J.; ARBISER, J.; JANDA, K. Solenopsin A, a venom alkaloid from the fire ant *Solenopsis invicta*, inhibits quorum-sensing signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis.* 2008, 198(8):1198–1201.

PETERS, L.; KÖNIG, G.; WRIGHT, A.; PUKALL, R.; STACKEBRANDT, E.; EBERL, L.; RIEDEL, K. Secondary metabolites of *Flustra foliacea* and their Influence on bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2003, 69(6):3469–3475.

RASMUSSEN T.; GIVSKOV M. Quorum sensing inhibitors as anti-patogenic drugs. *Int J Med Microbiol.* 2006, 296(2-3):149-161.

RASMUSSEN, T. B.; BJARNSHOLT, T.; SKINDERSOE, M. E.; HENTZER, M.; KRISTOFFERSEN, P.; KÖTE, M.; NIELSEN, J.; EBERL, E.; GIVSKOV, M. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol.* 2005, 187(5):1799–1814.

RASMUSSEN, T.; SKINDERSOE, M.; BJARNSHOLT, T. PHIPPS, R.; CHRISTENSEN, K.; JENSEN, P.; ANDERSEN, J.; KOCH, B.; LARSEN, T.; HENTZER, M.; EBERL, L.; HOIBY, N.; GIVSKOV, M. Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology*. 2005, 151(Pt 5):1325–1340.

RAVN, L.; CHRISTENSEN, A, B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.;GRAM, L. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *J Microbiol Meth*. 2001, 44(3):239–251.

RIEDEL, K.; AREVALO-FERRO, C.; REIL, G.; GÖRG, A.; LOTTSPEICH, F.; EBERL, L. Analysis of the quorum-sensing regulon of the opportunistic pathogen *Burkholderia cepacia* H111 by proteomics. *Electrophoresis.* 2003, 24(4):740–750.

SCHULZ, S.; DICKSCHAT, J. S.; KUNZE, B.; WAGNER-DOBLER, I.; DIESTEL, R.; SASSE, F. Biological activity of volatiles from marine and terrestrial bacteria. *Mar Drugs.* 2010, 8(12):2976-2987.

SHPAKOV. A. O. QS-Type bacterial signal molecules of nonpeptide origin. *Microbiology,* 2009, 78(2):133–143.

SINGH, B. N.; SINGH, B. R.; SINGH, R. L.; PRAKASH, D.; DHAKAREY, R.; G. UPADHYAY, G.; SINGH, H. B. Oxidative DNA damage protective activity, antioxidant and anti-quorum sensing potentials of *Moringa oleifera*. *Food Chem Toxicol*. 2009, 47(6):1109–1116.

SKINDERSOE, M.; ETTINGER-EPSTEIN, P.; RASMUSSEN, T.; BJARNSHOLT, T.; DE NYS, R.; GIVSKOV, M. Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Mar Biotechno (NY)*. 2008, 10(1):56–63.

TEPLITSKI, M.; ROBINSON, J.; BAUER, W. Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 2000, 13(6):637–648.

TRUCHADO, P. LOPEZ-GALVEZ, F.; GIL, M. I.; TOMAS-BARBERAN, F. A.; ALLENDE, A. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chem.* 2009, 115(4):1337–1344.

VAN HOUDT, R.; AERSTEN, A.; JANSEN, A.; QUINTANA, A.; MICHIELS, C. Biofilm formation and cell-to-cell signalling in gram-negative bacteria isolated from a food processing environment. *J Appl Microbiol*. 2004, 96(1):177-184.

VANDEPUTTE, O. M.; KIENDREBEOGO, M.; RAJAONSON, S.; DIALLO, B.; MOL, A.; EL JAZIRI, M.; BAUCHER, M. Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76(1):243–253.

VATTEM, D.; MIHALIK, K.; CRIXELL, S.; MCLEAN, R. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia.* 2007, 78(4):302–310.

VIKRAM, A.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JESUDHASAN, P. R.; PILLAI, S. D.; PATIL. B. S. Suppression of bacterial cell–cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoides. *J Appl Microbiol.* 2010, 109(2):515–527.

WAGNER, V.; IGLEWSKI, B. *P. aeruginosa* biofilms in CF infection. *Clinic Rev Allergy Immunol.* 2008, 35(3):124–134.

WAHL, M. Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar Ecol Prog Ser.* 1989, 58:175-189.

WANG, L-H.; HE, Y.; GAO, Y.; WU, J. E.; DONG, Y-H.; HE, C.; WANG, S. X.; WENG, L-X.; XU, J-L; TAY, L.; FANG, R. X.; ZHANG, L-H. A bacterial cell–cell communication signal with cross-kingdom structural analogues. *Molec Microbiol.* 2004, 51(3):903–912).

WHITEHEAD, N.; BARNARD, A.; SLATER, H.; SIMPSON, N.; SALMOND, G. Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS. Microbiol Rev.* 2001, 25(4):365-404.

ZHUN, H.; SUN, S. J. Inhibition of bacterial quorum sensing-regulated behaviors by *Tremella fuciformis* extract. *Curr Microbiol*. 2008, 57(5):418–422.

2 Búsqueda de Inhibidores de *Quorum sensing* en Extractos de Organismos Marinos y Vegetales

CONTENIDO

	Pág.
Abstract	**42**
Resumen	**42**
2.1 Introducción	**43**
2.2 Parte experimental	**45**
2.2.1 Generalidades	**45**
2.2.2 Obtención de Extractos	**46**
2.2.3 Bioensayo de Actividad de Inhibición de *Quorum Sensing*	**47**
2.3 Resultados y Discusión	**47**
2.4 Conclusiones	**58**
2.5 Bibliografía	**59**

ABSTRACT

In bacterium, the cell density dependent gene expression is mediated by signaling molecules in a phenomenon called quorum sensing (QS). This phenomenon controls formation and maturation of bacterial biofilms, which plays a key role in the development of biofouling and antibiotic resistance by pathogenic bacterial strains. There is evidence that some organisms, both marine and terrestrial origin can modulate the genetic behavior of the bacteria through cognate signals, which may act by inhibiting the QS in associated bacteria (for example, in pathogenic bacteria) or induce production of beneficial substances in the case of symbiosis. Some of these metabolites have been considered as modulators of QS, and a source for the control of virulence and biofilms in pathogenic bacteria and promoters of biofouling. This chapter describes the evaluation of 52 natural extracts as quorum sensing inhibitors (QSI) bacterial, using as biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. The extracts used correspond to 48 extracts from marine organisms collected in the Colombian Caribbean Sea and the Brazilian Coast, and 4 fractions from plants of the genus *Cecropia* from Brazil. This includes 22 sponges, 6 soft corals, 9 algae, 7 cyanobacteria, 1 zooanthid and 2 plant species of the genus *Cecropia*. The results showed that the polar organic fractions of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* and organic fractions from sponges *Ircinia felix* and *Svenzea tubulosa* were the extracts higher inhibition of QS. Also observed that extracts from *Niphates caycedoi*, *Cliona tenuis, Ptilocaulis walpersi* and *Petrosia pellasarca*; extracts from *Laurencia catarinensis*, *Laurencia obtusa*, *Dictyota* sp1 and *Dictyota* sp2, as well as the cyanobacterial mats extracts *Symploca hydnoides* (80%) + *Phormidium* sp (20%) and *Blennothrix glutinosa* (70%) + *Lyngbya* sp (30%) had antibacterial activity against the biosensor.

RESUMEN

En bacterias, la expresión de genes dependientes de la densidad celular es mediada por moléculas de señalización, en un fenómeno llamado *quroum sensing* (QS). Este fenómeno controla la formación y maduración de las biopelículas bacterianas, las cuales a su vez juegan un papel importante en el desarrollo del *biofouling*, y en la resistencia a los antibióticos por parte de algunas bacterias patógenas. Existe evidencia de que algunos organismos, tanto de origen marino como terrestre, pueden modular el comportamiento genético de sus bacterias asociadas mediante señales cognadas, las cuales pueden actuar inhibiendo el QS en las bacterias (en bacterias patógenas por ejemplo) o inducir la producción de sustancias benéficas en el caso de simbiosis. Algunos de estos metabolitos han sido considerados como moduladores de QS, y constituyen una fuente para el control de virulencia y biopelículas en bacterias patógenas y promotoras de *biofouling*. En este capítulo se describe la evaluación de 52 extractos naturales como inhibidores de *quorum sensing* (IQS) bacteriano usando como biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532.

Los extractos empleados corresponden a 48 extractos de organismos marinos recolectados en el Mar Caribe Colombiano y la Costa Brasileña; y 4 fracciones de plantas del género *Cecropia* procedentes de Brasil. Los organismos incluyeron 22 especies de esponjas, 6 de corales blandos, 9 de algas, 7 cianobacterias, 1 de zoantido y 2 especies de plantas del género *Cecropia*. Los resultados mostraron que las fracciones orgánicas polares del extracto acuoso de *Cecropia pachystachya,* y las fracciones orgánicas de las esponjas *Ircinia felix* y *Svenzea tubulosa* fueron los extractos que presentaron mayor inhibición de QS. También se observó que los extractos de las esponjas *Niphates caycedoi*, *Cliona tenuis*, *Ptilocaulis walpersi*, y *Petrosia pellasarca;* los extractos de las algas *Laurencia catarinensis*, *Laurencia obtusa*, *Dictyota* sp1 y *Dictyota* sp2; así como los extractos de los *mats* de cianobacterias conformados por los consorcios *Symploca hydnoides* (80%) + *Phormidium* sp (20%) y *Blennothrix glutinosa* (70%) + *Lyngbya* sp (30%) presentaron una actividad antibacterial contra el biosensor.

2.1 INTRODUCCIÓN

El estudio de los productos naturales marinos se ha constituido en un área muy interesante de la química actual, pues la enorme diversidad química, así como la potente actividad biológica, que han mostrado muchas de las sustancias aislada a partir de organismos marinos, ha llevado al desarrollo de nuevos y potentes medicamentos contra el cáncer y otras afecciones del hombre (BLUNT *et al.,* 2011). Muchas de estas moléculas son responsables de la adaptabilidad de los organismos marinos a un entorno cambiante; además de estar involucrados en la relación simbiótica entre los macroorganismos marinos y sus microorganismos asociados, la cual ha sido ampliamente documentada. Esta relación en muchos casos está mediada por señalización química, haciendo que este consorcio de múltiples organismos se comporte como una unidad bioquímica y fisiológica, lo cual es fundamental para el equilibrio de todo el ecosistema (HARVELL *et al.,* 2007). De otro lado, las plantas al igual que los organismos marinos, también han sido una fuente importante de metabolitos secundarios con actividad biológica, y en algunos casos la producción de estos compuestos puede estar siendo influenciada por algún tipo de señalización, que involucra de igual forma a microorganismos (HUBER *et al.,* 2003).

La estructura y densidad relativa de las poblaciones microbianas asociadas a los organismos está en constante cambio, y esta alteración influye directamente en la salud del organismo, así como en la producción de sustancias bioactivas. En este sentido, el consorcio de microorganismos asociados al huésped puede ser modulado mediante un sistema de regulación de genes que involucre tanto a las sustancias bioactivas del hospedero, como a las mismas moléculas de señalización microbianas. La regulación de genes en bacterias es llevado a cabo por moléculas químicas en un fenómeno conocido como *quorum sensing* (QS). Estas señales químicas (*N*-

acilhomoserinlactonas, AHLs, para bacterias gram negativas) también son responsables de comunicación interreinos, es decir, que ellas pueden ser detectadas no solo por las bacterias productoras, sino también por el hospedero, y en ocasiones por otros organismos ajenos a estos dos (LOWERY *et al.,* 2008).

Debido al QS las bacterias se comportan de una manera muy diferente cuando están organizadas en una comunidad compleja que cuando están aisladas. Estando en comunidad coordinan la expresión de diferentes fenotipos que les proporciona resistencia y adaptabilidad al medio ambiente. Entre estos fenotipos encontramos la producción de antibióticos y pigmentos, la esporulación, el intercambio de ADN, la expresión y la secreción de factores de virulencia, la bioluminiscencia, y la formación de biopelículas (NG & BASSLER, 2009; BOYER & WISNIEWSKI-DYÉ, 2009). Las biopelículas bacterianas son comunidades sésiles de bacterias asociadas a una superficie, las células bacterianas se encuentran sumergidas en una matriz de polisacáridos, proteínas y ADN. La biopelícula le confiere a la comunidad bacteriana ventajas, tales como una mayor resistencia a los antibióticos y mejor defensa ante el ataque del sistema inmune del hospedero. La posterior maduración de estas biopelículas es también controlada por QS, que regula muchos fenotipos como la producción de exopolisacárido (EPS), adhesinas y otros requisitos fundamentales para la consolidación de una matriz mucho más estable (DICKSCHAT, 2010).

Además de los problemas de salud antes referidos, las biopelículas impactan a la humanidad de muchas formas, ya que ellas pueden formarse en ambientas naturales, instrumentos médicos e industriales. Entre ellos la formación de biopelículas en dispositivos médicos, como catéteres o implantes a menudo resulta en una dificultad para tratar las infecciones crónicas (LÓPEZ *et al.,* 2010). También se ha observado que algunas biopelículas, que se forman sobre superficies sumergidas en el mar son mediadores importantes en el asentamiento de larvas de muchos invertebrados marinos, es decir que tienen un papel fundamental en la consolidación del *biofouling*, el cual afecta de manera importante a la industria marítima. Por lo anterior el control de la formación de biopelículas sobre las superficies de estructuras hechas por el hombre se convierte en un blanco para controlar el *fouling,* y dado que el QS juega un papel importante en la consolidación del la biopelícula la búsqueda de nuevos inhibidores de *quorum sensing* (IQS) se ha identificado como una nueva aproximación para la reducción del macro*fouling* (DOBRETSOV *et al.,* 2009). Esta aproximación ha tomado cada vez más importancia en la literatura científica (FUSETANI, 2011).

Una de las alternativas más prometedoras para el control de biopelículas es el uso de productos naturales, que para el caso de los organismos marinos son extraídos de algunos invertebrados sésiles y algas con una superficie libre de macro*fouling,* lo que podría ser un indicativo de la producción de compuestos con propiedades de

disuasión de asentamiento. Dentro de estos productos naturales de origen marino con propiedad anti*fouling*, se pueden tener compuestos con propiedades IQS (MESEGUER *et al.,* 2004; QIAN *et al.,* 2007). De otro lado algunos vegetales, como es el caso de algunas leguminosas, pueden modular el comportamiento genético de las bacterias asociadas, para su beneficio, esto también es llevado a cabo por moléculas químicas producidos por la planta (BRENCIC & WINANS, 2005).

Como se mencionó en el capítulo 1, los compuestos IQS en bacterias gram negativas pueden actuar de cuatro maneras diferentes. Estas son: la inhibición de la biosíntesis de las moléculas señalizadoras (las AHLs); la degradación de las moléculas señales (AHLs); bloqueando los sitios de unión específicos de las AHLs a las proteínas tipo LuxR; y finalmente, inhibiendo la transcripción del ADN (DOBRETSOV *et al.,* 2009). Un IQS suprime la expresión genética específica de las bacterias sin causar su muerte, y dado que los mecanismos de supervivencia de las bacterias no son inducidos por los compuestos IQS, estos no generan resistencia bacteriana. Esta característica ha llevado a la industria farmacéutica a identificar a esta clase de compuestos IQS como prometedores para el diseño y desarrollo de compuestos antipatogénicos, útiles en el control microbiano de infecciones crónicas (RASMUSSEN & GIVSKOV, 2006). Las nuevas alternativas terapéuticas destinadas a prevenir y tratar las infecciones graves se han centrando en reducir al mínimo el uso de antibióticos, incluyendo algunas terapias de modulación de QS con antibióticos macrólidos, vacunas de QS, e IQS competitivos, que han demostrado ser útiles en la disminución de la traducción de toxinas moduladas por QS en las bacteria patógenas, o por activación prematura de la respuesta de QS para alertar al sistema inmune de bacterias a una baja densidad celular (MARTIN *et al.,* 2008).

Finalmente, en este capítulo se describen y analizan los resultados del ensayo de inhibición de *quorum sensing,* usando como biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, de 48 extractos de organismos marinos recolectados en el Mar Caribe Colombiano y la Costa Brasileña; y 4 fracciones de plantas del género *Cecropia* procedentes de Brasil. Estos experimentos permitirán seleccionar los extractos más activos y promisorios, con el fin de hacer el estudio químico bioguiado sobre ellos, lo que permitirá identificar compuestos con actividad IQS que luego puedan ser usados en pinturas anti*fouling*.

2.2 PARTE EXPERIMENTAL

2.2.1 GENERALIDADES

Los solventes utilizados en la obtención de los extractos de los organismos fueron metanol, diclorometano, hexano, acetato de etilo y butanol, todos grado analítico.

La cromatografía en columna realizada para los extractos de las algas del género *Dictyota* se hizo sobre sílica gel 60 (70-230 MESH ASTM - Merck®).

Chromobacterium violaceum ATCC 31532 fue cultivado en medio CASO – Merck®. Para los ensayos en cajas de petri, se utilizó este mismo medio con agar bacteriológico (Agar No. 1) – Oxoid al 1.2%. La bacteria fue crecida en una incubadora orbital Heidolph Unimax 1010, a 27 °C.

2.2.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Los organismos marinos fueron recolectados en la Bahía de Santa Marta e Islas del Rosario en el Caribe Colombiano; otros proceden de la Costa de Santa Catarina en Brasil. Los organismos fueron mantenidos congelados hasta su extracción. Una vez secos, fueron cortados en trozos pequeños y extraídos tres veces con DCM:MeOH (1:1), el solvente se evaporó hasta obtener los extractos crudos, los cuales fueron almacenados a 4 °C hasta antes de su uso. Los extractos de *Svenzea tubulosa* y *Neopetrosia carbonaria* fueron sometidos a partición mediante la metodología modificada de Kupchan (KUPCHAN *et al.*, 1973; ANTA *et al.*, 2002), obteniendo las fracciones solubles en diclorometano (F.DCM), butanol (F.BuOH) y agua (F.H_2O), las cuales también fueron ensayadas. Los extractos de las algas del género *Dictyota* fueron obtenidos con acetato de etilo por 24 horas, y después de ser concentrados a presión reducida, cada extracto fue sometido a cromatografía en columna sobre silica gel 60 Mesh y carbón activado (ubicado en la superficie) eluyendo con mezclas de hexano:AcOEt 1:1 y 0:1. Posteriormente las fracciones fueron reunidas, concentradas y evaluadas.

El árbol *Cecropia pachystachya* Trécul fue recolectado en Viamão – Rio Grande do Sul, mientras *Cecropia glaziovii* Sneth fue recolectado en Florianapolis - Santa Catarina; ambos en el sur de Brasil. Las partes aéreas de ambas plantas fueron sometidas a infusión en agua por 30 minutos obteniendo de esta forma los extractos acuosos, los cuales fueron filtrados, congelados y liofilizados. Los extractos acuosos fueron pasados a través de amberlita XAD-16, lavados con agua para eliminar azúcares y amino ácidos, y posteriormente eluídos con metanol; después de su filtración fueron concentrados a presión reducida para obtener las fracciones metanólicas (F.MeOH). De otro lado, el extracto acuoso resultado de la infusión de *C. pachystachya* también fue sometido a partición con acetato de etilo (F.AcOEt) y posteriormente con butanol (F.BuOH), obteniendo además la fracción acuosa residual (COSTA, 2009). El origen geográfico así como la clasificación de los especímenes ensayados se presenta en la Tabla 2.1.

Los procedimientos de extracción y fraccionamiento de ambas plantas; al igual que los extractos de las algas que proceden de Brasil fueron realizados en el Grupo de Estudio en Productos Naturales y Sintéticos (GEPRONAS) de la Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – Brasil. Estas muestras nos fueron suministradas por ellos en un acuerdo de cooperación con nuestro grupo de investigación.

2.2.3 BIOENSAYO DE ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE *QUORUM SENSING*

Como biosensor para la evaluación de la actividad inhibitoria de *quorum sensing* se utilizó *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, una bacteria gram negativa que expresa un pigmento púrpura denominado violaceína cuando la comunicación celular es alcanzada, fenómeno que es llevado a cabo por su propia molécula de señalización (*N*-hexanoil-L-homoserin lactona: C6HSL) (McCLEAN *et al.,* 1997).

El bioensayo fue realizado mediante la metodología de halos de inhibición utilizando sensidiscos estériles de 5 mm de diámetros (FERRARO *et al.,* 2003). La bacteria fue inoculada en medio líquido durante toda una noche. A partir de 100 µL del inóculo, la bacteria fue sembrada sobre la superficie del agar. Luego los sensidiscos estériles, previamente impregnados con el extracto o fracción, junto con el control negativo (sensidisco cargado con 10 µL de metanol, y dejado evaporar), fueron colocados sobre la superficie del agar una vez el solvente se evaporó. Las cantidades de extractos y fracciones ensayadas fueron 100, 200, 300 y 400 µg por sensidisco, empleando una alícuota apropiada de una solución metanólica madre. Las cajas con el agar, la bacteria y los sensidiscos fueron incubadas a 27 °C, y las lecturas de los diámetros de inhibición en mm fueron realizadas a las 24 y 48 horas. Cada ensayo fue realizado por triplicado. El ensayo fue tomado como positivo cuando se observó halos de inhibición en la expresión de la violaceína, sin que se afectara la viabilidad celular en la misma zona de inhibición. Los extractos que causaban disminución, o muerte, en el crecimiento bacteriano fueron clasificados como bactericidas y no como IQS.

2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muchos estudios han demostrado la capacidad de los compuestos naturales para bloquear los sistemas de QS. Entre ellos, las plantas ornamentales, medicinales y comestibles han sido los ejemplos más estudiados como fuentes de compuestos IQS (DOBRETSOV *et al.,* 2009; DICKSCHAT, 2010). De estos, cabe mencionar el estudio sistemático realizado sobre extractos de plantas procedentes del Sur de Florida, donde se evaluaron cincuenta especies como fuentes IQS. En este *screening* se utilizaron *Chromobacterium violaceum* y *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 (pZLR4)

como cepas biosensoras, y se encontró que seis plantas fueron promisorias como fuente de IQS, debido a que mostraron actividad en la inhibición de los factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (ADONIZIO *et al.,* 2006 y 2008). No obstante en pocos casos se ha llegado a identificar los compuestos responsables de la actividad. En el capítulo anterior se puede consultar una revisión completa de compuestos naturales con esta actividad.

Si bien es de esperarse que los organismos marinos sean una fuente importante de compuestos con actividad IQS, hay pocos ejemplos de estudios sistemáticos de esta actividad en este tipo de organismos. Hasta donde llega nuestro conocimiento solo hay dos ejemplos de revisiones sistemáticas. En la primera investigación se evaluaron 79 extractos de 25 especies de organismos marinos recogidos en aguas de la Florida, en la cual se encontró que las cianobacterias tienen un alto potencial como fuente de IQS (DOBRETSOV *et al.,* 2009). Es más, DOBRETSOV *et al* continuaron con el estudio e identificaron que de los 25 extractos de AcOEt:MeOH (1:1) de cianobacterias procedentes de aguas de la Florida, Belice y Oman, 19 extractos son activos, logrando identificar al compuesto malingolida (MAL) como un potente IQS en el extracto de *Lyngbya majuscula* (DOBRETSOV *et al.,* 2010). El otro estudio utilizó extractos crudos de organismos marinos de la Gran Barrera de Coral de Australia. Los autores identificaron la manoalida en la esponja *Luffariella variabilis* como responsable de la actividad inhibitoria de QS del extracto crudo. Este compuesto es conocido como un agente anti-inflamatorio, y su estructura tiene un anillo lactónico que se asemeja a la estructura de las AHLs. Este compuesto fue encontrado activo frente al sistema fusionado *lasB::gfp* (ASV) de *P. aeruginosa* (SKINDERSOE *et al.,* 2008).

No obstante, algunos compuestos obtenidos a partir de fuentes marinas han sido identificados como potentes IQS. Entre ellos se deben destacar las furanonas halogenadas encontradas en la alga *Delisea pulchra*, que han demostrado ser uno de los compuestos IQS más prometedores, y que además posee un gran potencial como agentes anti*fouling* (BOYER & WISNIEWSKI-DYÉ, 2009). Por otro lado, tres compuestos (floridosido, betonicina y ácido isetionico) aislado del alga roja *Ahnfeltiopsis flabelliformis* mostrarón una prometedora actividad inhibitoria de QS en el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 QS (KIM *et al.,* 2007). Otro ejemplo son los alcaloides bromados que se encontraron en el briozoo *Flustra foliacea*, ensayados con *P. putida* PKR-C12, *P. putida* PAS-C8 y *E. coli* pSB403 (PETERS *et al.,* 2003).

Dentro del contexto anterior, en este capítulo se muestran y discuten los resultados de la evaluación de la actividad inhibitoria de QS de una gran cantidad de organismos marinos, y algunas plantas de Brasil, con el fin de aportar conocimiento de la actividad biológica de la biodiversidad de nuestro país y de Brasil, enmarcados dentro de los estudios de bioprospección que son recomendados por las políticas de

investigación de nuestro país (CONPES No. 3697, 2011). Los organismos marinos seleccionados para el ensayo se caracterizaron por presentar una superficie limpia de macroorganismos, lo que puede sugerir que ellos poseen mecanismos químicos de control de la epibiosis, y por ende podría ser posible que contengan compuestos capaces de inhibir la biopelícula bacteriana a través de compuestos IQS. De otro lado, los macroorganismos seleccionados poseen comunidades de microorganismos en su superficie, los cuales le pueden estar influyendo en el control ecológico que evita el asentamiento de otros macroorganismos. Este control se puede hacer mediante compuestos químicos producidos por el organismo marino (el huesped), o por los microorganismos asociados, o por ambos, es decir por el holobionte. Como se mencionó anteriormente, en este control ecológico el QS juega un papel determinante debido a la regulación de la maduración del biopelículas, causando un asentamiento selectivo de las bacterias, larvas u otros microorganismos eucariotas (BOYER & WISNIEWSKI-DYÉ, 2009), y finalmente, regulando también la población de los macroorganismos que se puedan asentar.

Para la evaluación de la actividad biológica de los extractos se usaron ensayos de difusión de disco, con el fin de evaluar la actividad inhibitoria de QS frente a *C. violaceum*, además de la antibacteriana de los 52 extractos. Entre los extractos de los organismos evaluados estaban 4 de plantas, y 48 de organismos marinos (25 extractos de esponjas, 6 de corales blandos, 9 de algas, 7 de cianobacterias y 1 zoantido).

En la Tabla 2.1 se muestran los resultados tanto de la actividad IQS como antibacteriana utilizando diferentes cantidades de extractos y fracciones como se describió en la sección experimental. Un extracto prometedor como fuente de compuestos inhibidores de *quorum sensing* debería mostrar un halo de inhibición de la expresión de la violaceína en el biosensor *Chromobacterium violaceum*, sin afectar el proceso de crecimiento de este. En la Figura 2.1 se muestra a manera de ejemplo los resultados obtenidos con los extractos de *Svenzea tubulosa*, *Ircinia felix* y *Cecropia pachystachya*, en ellos se puede ver un halo de disminución de violaceína, sin que se afecte el crecimiento de la bacteria. En esta misma figura se puede observar el control negativo (sensidiscos designados como "CN") que no muestra ni inhibición de crecimiento ni tampoco inhibición de QS. Por otro lado en la Figura 2.2 se muestran los resultados obtenidos con el extracto de alga *Dictyota* sp2 en la cual si vemos inhibición de crecimiento bacteriano a las cantidades ensayadas, por lo que su extracto se clasificó como inhibidor de crecimiento y no como IQS.

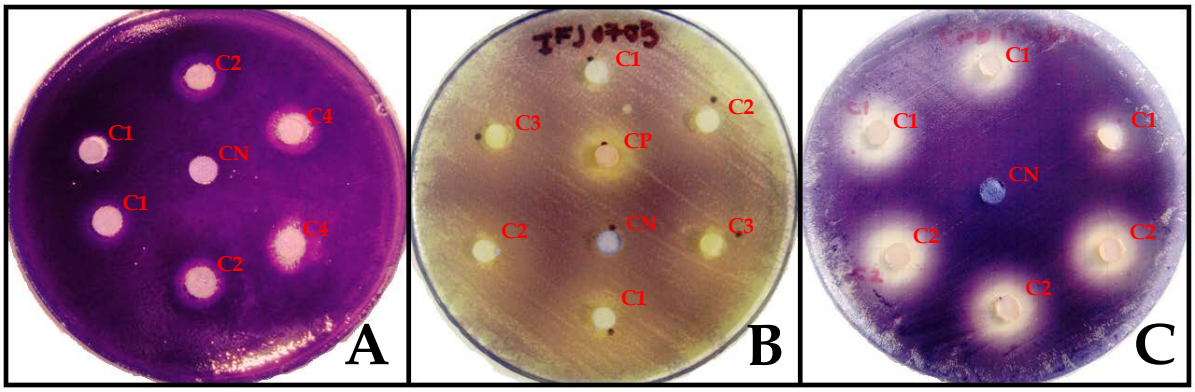


Figura 2.1 Fotografías de los resultados del ensayo de inhibición de *quorum sensing* usando el biosensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 para los extractos de **(A)** *Svenzea tubulosa* (F.DCM); **(B)** *Ircinia felix*; **(C)** *Cecropia pachystachya* (F.MeOH). Las cantidades ensayadas de cada extracto fueron C1=100 µg, C2=200 µg, C3=300 µg, y C4=400 µg por disco. CP= 100 µg de la fracción F.MeOH de *C. pachystachya*; CN= control negativo (10 µL de metanol, y previa evaporación antes de colocarlo)

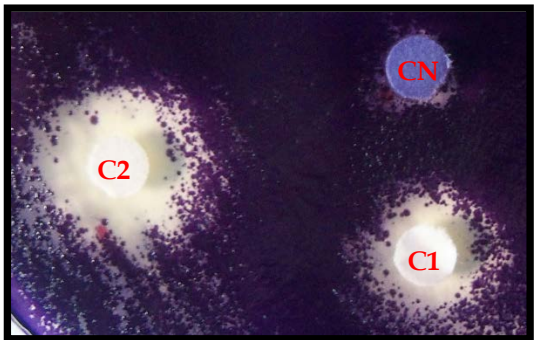


Figura 2.2 Fotografía de los resultados de inhibición de crecimiento contra *C. violaceum* ATCC 31532 a C1=100 y C2=200 µg del extracto de la alga *Dictyota* sp2 por disco. CN= control negativo (10 µL de metanol y previa evaporación antes de colocarlo)

Tabla 2.1 Resultados de la actividad inhibitoria de QS y bactericida de los extractos y fracciones de organismos marinos y vegetales.

	Organismo (sinonimía)	Número de Colección	Origen Geográfico	*Chromobacterium violaceum* ATCC 31532							
				Inhibición de crecimiento				Inhibición de *quorum sensing*			
				100 µg	200 µg	300 µg	400 µg	100 µg	200 µg	300 µg	400 µg
Esponjas	***Agelas citrine***	**INV-POR 969**	**Islas del Rosario (Col)**	**-**	**-**	**NE**	**-**	**-**	**-**	**NE**	**++**
	Agelas tubulata	ICN-MHN(Po) 154	Santa Marta (Col)	-	-	NE	NE	-	-	NE	NE
	Agelas marron	ICN-MHN(Po) 0149	Islas del Rosario (Col)	-	-	NE	-	-	-	NE	-
	Aka cachacrouense	**INV-POR-412**	**Santa Marta (Col)**	**-**	**-**	**NE**	**NE**	**+++**	**+++**	**NE**	**NE**
	*Niphates caycedoi (Amphimedon caycedoi)**	INV-POR 223	Islas del Rosario (Col)	-	+++	NE	++++	-	-	NE	-
	Biemna cribaria	INV-POR-890	Santa Marta (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
	Cliona delitrix	INV-MHN(Po)-189	San Andrés (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
	Cliona tenuis	INV-POR-669	Islas del Rosario (Col)	+++	+++	NE	NE	-	-	NE	NE
	Cliona varians	INV-POR-339	Santa Marta (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
	Iotrochota arenosa (*Iotrochota inminuta*)*	INV-POR-883	Santa Marta (Col)	-	-	NE	-	-	-	NE	-
	Ircinia felix	**INV-POR-014**	**Santa Marta (Col)**	**-**	**-**	**-**	**-**	**++**	**++**	**+++**	**+++**
	Lissodendoryx colombiensis	ICN-MHN-PO 0246	Islas del Rosario (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
	Muriceopsis sp.	ICN-MHN-PO 0254	Santa Marta (Col)	-	-	NE	NE	-	-	NE	NE
	Petrosia pellasarca	ICN-MHN-PO 0240	Islas del Rosario (Col)	NE	-	NE	+++	NE	-	NE	-
	Ptilocaulis walpersi	ICN-MHN-PO 0248	Islas del Rosario (Col)	NE	+++	NE	+++	NE	-	NE	-
	Svenzea tubulosa	**ICN-MHN-PO 0249**	**Islas del Rosario (Col)**	**-**	**-**	**NE**	**-**	**-**	**++++**	**NE**	**+++**
	***Svenzea tubulosa* (F.DCM)**	**ICN-MHN-PO 0249**	**Islas del Rosario (Col)**	**-**	**-**	**NE**	**-**	**++**	**+++**	**NE**	**+++**
	Topsentia ophiraphidites	ICN-MHN-PO 0243	Islas del Rosario (Col)	-	-	NE	-	-	-	NE	-
	Neopetrosia carbonaria* (F.DCM) (*Xestospongia carbonaria*)	**ICN-MHN-PO 0244**	**Islas del Rosario (Col)**	**-**	**-**	**NE**	**-**	**++++**	**-**	**NE**	**+++**
	***Neopetrosia carbonaria* (F.BuOH)**	**ICN-MHN-PO 0244**	**Islas del Rosario (Col)**	**-**	**-**	**NE**	**-**	**-**	**-**	**NE**	**++++**
	Neopetrosia carbonaria ($F.H_2O$)	ICN-MHN-PO 0244	Islas del Rosario (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
	Neopetrosia muta (*Xestospongia muta*)*	ICN-MHN-PO 0247	Islas del Rosario (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
	Neopetrosia proxima (*Xestospongia proxima*)*	ICN-MHN-PO 0239	Islas del Rosario (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
	Neopetrosia rosariensis (*Xestospongia rosariensis*)*	ICN-MHN-PO 0245	Islas del Rosario (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
	Neopetrosia subtriangularis* (*Xestospongia subtriangularis*)	**ICN-MHN-PO 0242**	**Islas del Rosario (Col)**	**-**	**-**	**NE**	**-**	**++++**	**++**	**NE**	**++**
Corales blandos	*Eunicea succinea*	ICN-MHN-PO 0251	Santa Marta (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
	Eunicea fusca	ICN-MHN-PO 0252	Santa Marta (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
	Eunicea sp1	-	Santa Marta (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
	Erythropodium caribaeorum	**INV-CNI-1193**	**Santa Marta (Col)**	**-**	**-**	**NE**	**-**	**-**	**-**	**NE**	**+++**
	Pseudopterogorgia elisabethae (Providencia)	INV-CNI-1612-1614	Providencia y San Andrés (Col)	-	-	NE	NE	-	-	NE	NE
	Pseudopterogorgia elisabethae (San Andrés)	INV-CNI-1615-1616	Providencia y San Andrés (Col)	NE	-	NE	-	NE	-	NE	-
Zoantido	*Palythoa caribaeorum*	ICN-MHN-PO 0255	Santa Marta (Col)	-	-	NE	-	-	+++	NE	-
Algas	*Laurencia catarinensis*	FLOR 14516	Ilha do Arvoredo (Bra)	++	+++	NE	+++	-	-	NE	-
	Laurencia flagellifera	FLOR 14521	Praia da Sepultura, Bombinhas (Bra)	-	-	NE	-	-	-	NE	-
	Laurencia majuscule	FLOR 14524	Ilha do Francês, Florianópolis (Bra)	-	++	NE	-	-	-	NE	-
	Laurencia microcladia	FLOR 14520	Praia da Sepultura, Bombinhas (Bra)	_	-	NE	-	-	-	NE	-
	Laurencia obtuse	FLOR 14512	Praia de Canasvieiras, Florianópolis (Bra)	++	+++	NE	++++	-	-	NE	-
	Dictyota sp1	-	Santa Marta (Col)	-	++	+++	NE	-	-	-	NE
	Dictyota sp2	-	Santa Marta (Col)	+++	++++	++++	NE	-	-	-	NE
	Dictyota sp3	-	Santa Marta (Col)	-	-	-	NE	-	-	-	NE
	Canistrocarpus cervicornis	-	Santa Marta (Col)	-	-	-	NE	-	-	-	NE

Continuación Tabla 2.1.

	Organismo (sinonimía)	Número de Colección	Origen Geográfico	*Chromobacterium violaceum* ATCC 31532							
				Inhibición de crecimiento				Inhibición de *quorum sensing*			
				100 µg	200 µg	300 µg	400 µg	100 µg	200 µg	300 µg	400 µg
Cianobacterias	*Oscillatoria nigro-viridis*	-	Providencia y San Andrés (Col)	++	+++	++++	NE	-	-	-	NE
	Symploca hydnoides (80%) + *Phormidium* sp (20%)	-	Providencia y San Andrés (Col)	-	+	++	NE	-	-	-	NE
	Oscillatoria margaritifera + *Phormidium sp*	-	Providencia y San Andrés (Col)	-	-	-	-	-	-	-	NE
	Blennothrix glutinosa (70%) + *Lyngbya* sp (30%)	-	Providencia y San Andrés (Col)	++	+++	++++	NE	-	-	-	NE
	Symplo ca hydnoides	-	Providencia y San Andrés (Col)	-	-	-	NE	-	-	-	NE
	Symploca hydnoides (80%) + *Phormidium* sp (20%)	-	Providencia y San Andrés (Col)	++	+++	++++	NE	-	-	-	NE
	Lyngbya sordida + *L. majuscula*	-	Providencia y San Andrés (Col)	-	-	-	NE	-	-	-	NE
Plantas	***Cecropia glaziovii* Sneth (F.MeOH)**	**FLOR 37143**	**Florianópolis (Bra)**	**-**	**-**	**-**	**NE**	**-**	**-**	**++**	**NE**
	***Cecropia pachystachya* Trécul (F.MeOH)**	**ICN.150025**	**Viamão (Bra)**	**-**	**-**	**-**	**NE**	**+++**	**++++**	**++++**	**NE**
	Cecropia pachystachya Trécul (F.AcOEt)	ICN.150025	Viamão (Bra)	-	-	-	NE	-	-	-	NE
	***Cecropia pachystachya* Trécul (F.BuOH)**	**ICN.150025**	**Viamão (Bra)**	**-**	**-**	**-**	**NE**	**++**	**+++**	**++++**	**NE**

Diámetro de sensidisco: 5 mm.

Diámetro de inhibición de *quorum sensing*: Negativo (-). Positivos, para 5-7 mm (+), 7-9 mm (++), 9-12 mm (+++), mayores a 12 mm (++++). NE: No ensayado. F.BuOH: fracción butanólica; F.MeOH: fracción metanólica; F.AcOEt: fracción de acetato de etilo; F.DCM: fracción de diclorometano.

La Tabla 2.1 resume los resultados del ensayo de inhibición de QS con *C. violaceum* ATCC 31532 para los diferentes grupos de organismos ensayados, en donde se encontró que 13 (25%) de los 52 extractos ensayados resultaron activos. De estos 13 extractos, 8 correspondieron a extractos de esponjas (15.4 %), 1 a octocorales (1.9 %), 1 al zoantido (1.9 %) y 3 corresponden a las *Cecropias* (5.8 %) (Figura 2.3). Los extractos de las algas, al igual que las de las cianobacterias no mostraron actividad de inhibición de QS a las cantidades mostradas, sin embargo aquellas algas y cianobacterias que mostraron inhibición de crecimiento fueron evaluadas a cantidades menores (20, 34 y 40 µg, datos no mostrados), detectando actividad inhibitoria de QS para el consorcio de las cianobacterias *Blennothrix glutinosa* (70%) + *Lyngbya* sp (30%), como también para las algas *Dictyota* sp1 y *Dictyota* sp2. De esta manera se pudo establecer que las esponjas, y particularmente las plantas del género *Cecropia*, son los organismos con mayor potencial para encontrar compuestos con actividad inhibitoria de QS frente al biosensor *C. violaceum* ATCC 31532.

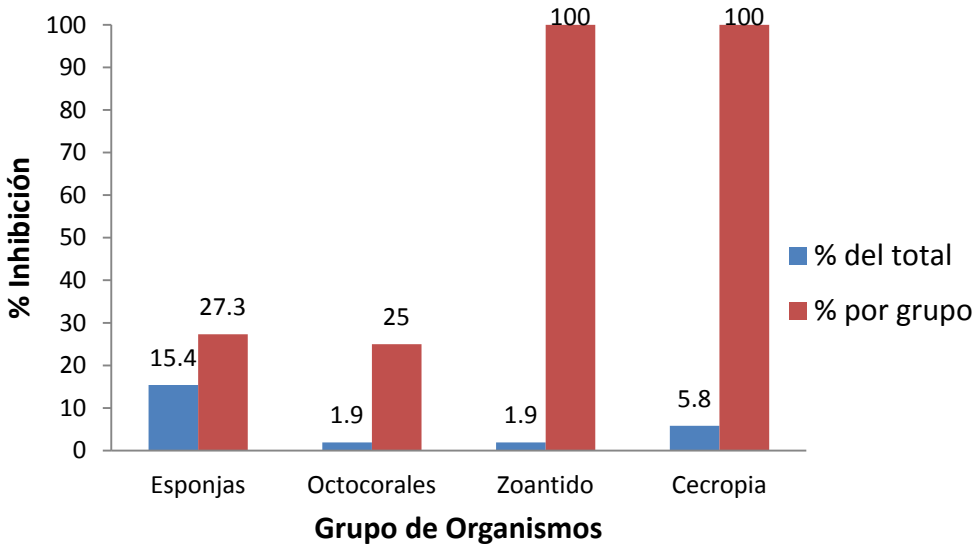


Figura 2.3 En color azul el porcentaje de extractos y fracciones activos como IQS en *C. violaceum* ATCC 31532 con respecto al total de los organismos ensayados. En color rojo el porcentaje de organismos que tienen la propiedad IQS expresado sobre cada grupo de organismos

En la Tabla 2.1 se puede observar que tanto la fracción metanólica como la fracción butanólica de *C. pachystachya* presentaron la más alta actividad en la disrupción de la comunicación de *C. violaceum*, seguida por los extractos crudos de las esponjas *Ircinia felix*, *Svenzea tubulosa*, *Neopetrosia subtrinagularis* y *Aka cachacrouense*; al igual que las fracciones de diclorometano de *S. tubulosa* y de *Neopetrosia carbonaria*, y la fracción butanólica de esta última esponja. De otro lado los extractos del octocoral *Erythropodium caribaeorum* y la del zoantido *Palythoa caribaeorum* mostraron actividad moderada. Cabe mencionar que ninguno de estos extractos mostró actividad

antibacteriana, lo cual puede ser un indicativo de un uso seguro como anti*foulants*, y ellos pueden representar una prometedora fuente de moléculas que podrían actuar como compuestos antipatogénicos capaces de actuar contra las cepas de bacterias resistentes a antibióticos.

Estos resultados contrastan con lo encontrado por Quintana en 2008, quien usando *E. coli* psB401 como biosensor, en la evaluación de los mismos extractos marinos, encontró que los corales blandos eran más promisorios como fuentes de IQS en el sistema de *E. coli* psB401, y no las esponjas como se observó en este estudio. Al relacionar los datos de la actividad inhibitoria de QS de los extractos evaluados con *C. violaceum* ATCC 31532 y los obtenido con *E. coli* psB401, se pudo establecer que los extractos crudos de esponjas *S. tubulosa, I. felix* y la fracción de butanólica de *N. carbonaria* son los más prometedores como fuente de compuestos activos IQS. Esto debido a que todos ellos presentaron actividad frente a los dos biosensores, sin afectar la viabilidad celular.

La Tabla 2.1 también muestra la actividad antibacteriana contra *C. violaceum* de los extractos evaluados. Se encontró que los extractos de las esponjas *Niphates caycedoi*, *Cliona tenuis*, *Ptilocaulis walpersi*, y *Petrosia pellasarca*, los extractos de las algas *Laurencia catarinensis, Laurencia obtusa*, *Dictyota* sp1 y *Dictyota* sp2; y los extractos de las cianobacterias *Oscillatoria nigro-viridis,* y de los consorcios *Blennothrix glutinosa* (70%) + *Lyngbya* sp (30%), y *Symploca hydnoides* (80%) + *Phormidium* sp (20%) mostraron una fuerte actividad antibacteriana contra *C. violaceum* ATCC 31532 a algunas de las dosis evaluadas (100 - 400 µg/disco). Lo anterior plantea que estos extractos no son una fuente promisoria de compuestos con actividad IQS, aunque posiblemente si de compuestos antibacterianos.

Es de resaltar que algunos de los extractos que mostraron inhibición de crecimiento (extracto del consorcio de las cianobacterias *Blennothrix glutinosa* (70%) + *Lyngbya* sp (30%); y los extractos de las algas *Dictyota* sp1 y *Dictyota* sp2), también presentaron inhibición de QS cuando se ensayaron a concentraciones menores. Este fenómeno genera dudas en cuanto a si la inhibición de la expresión de la violaceína es debida a un efecto bactericida del extracto, el cual reduce la densidad celular por debajo del *quorum*, haciendo que no se alcanza el fenómeno de comunicación; o si realmente se da por un fenómeno de IQS, pues es sabido que algunos antibióticos en cantidades subinhibitoria, es decir donde no se inhibe el crecimiento bacteriano, son capaces de inhibir el *quorum sensing* (KWAN *et al*., 2010), e incluso algunos otros lo pueden inducir generando respuestas por parte de las bacterias (ROMERO *et al*., 2011).

Los resultados de actividad antibacteriana para las esponjas del género *Ptilocaulis* pueden atribuirse a la posible presencia de los alcaloides tipo guanidina, los cuales han mostrado tener actividad antimicrobiana. En el 2003 se identificó a partir de la esponja *Ptilocaulis spiculifer* una guanidina cíclica, con actividad antibacteriana

contra a *Staphylococcus aureus* (YANG *et al.,* 2003). De otro lado, las algas del género *Laurencia* han mostrado ser fuente de sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y acetogeninas que suelen tener uno o más átomos de halógeno. Este compuestos fueron reconocidos por diversas actividades, tales como citotóxica y antibacteriana (LHULLIE *et al.,* 2010). Las algas del género *Dictyota* contienen diterpenos tipo dolabelanos a los cuales se le atribuido actividad citotóxica contra diversas líneas de células cancerígenas, daños en el ADN (AYYAD *et al*., 2011), y actividad antiviral (ABRANTES *et al*., 2010). Con respecto a la actividad antibacteriana de las cianobacterias, se puede decir que ellas han sido ampliamente reconocidas por su capacidad de biosintetizar péptidos cíclicos y lineales, a los cuales se les ha reconocido su actividad contra diferentes parásitos y líneas celulares. Por ejemplo, las viridamidas (péptidos lineales), aplisiatoxinas y análogos relacionados a las oscillatoxinas -sustancias estructuralmente relacionadas a las briostatinas (lactonas macrociclicas)- han sido aisladas de *Oscillatoria nigro-viridis* (WENDER *et al*., 1988; SIMMONS *et al*., 2008; CHLIPALA *et al*., 2010). De las especies de cianobacterias pertenecientes al género *Blennothrix* se han aislado lingbiastatinas y ácidos tumónoicos, los cuales han mostrado actividad inhibitoria de elastasas y antimalárica moderada respectivamente (TAORI *et al*., 2007; CLARK *et al*., 2008). De *Symploca hydnoides* se han aislado los depsipeptidos cíclicos, denominados veraguamidas, los cuales mostraron actividad citotóxica contra líneas celulares cancerígenas (SALVADOR *et al*., 2011). De una especie de *Symploca*, endémica de Key Largo – Florida, se identificó el depsipetido macrocíclico: Largazole, que es un inhibidor de la histona deacetilasa, enzima implicada en procesos biológicos como la diferenciación celular, proliferación y apoptosis (COLE *et al*., 2011).

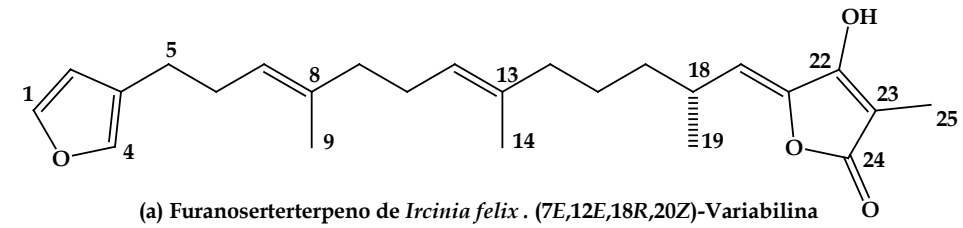
Los resultados antibacteriales con *C. violaceum* concuerdan con los datos obtenidos en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, donde muchos de los extractos aquí utilizados fueron probados frente a una colección de 12 cepas de bacterias marinas aisladas de las superficies colonizadas (MORA-CRISTANCHO *et al.,* 2011). En ese trabajo se identificaron los extractos de las especies *Cliona tenuis*, *Ptilocaulis walpersi*, *Laurencia catarinensis* y *Laurencia obtusa* como fuente de compuestos con actividad antibacterial, los cuales también presentaron actividad antibiótica contra *C. violaceum*.

Como resultado de los ensayos de inhibición de QS, usando los biosensores *C. violaceum* y *E. coli*, al igual que los obtenidos en los ensayos antibacteriales empleando cepas marinas, se pudo concluir que por presentar actividad inhibitoria de QS y no ser bactericidas, las esponjas *S. tubulosa*, *I. felix* y *N. carbonaria*, son los fuentes marinas más promisorias como fuente de compuestos IQS, y anti*foulants*. Así mismo, se pudo establecer que algunas especies de *Cecropia* poseen potente actividad IQS. A continuación se discute lo que se conoce de la composición química de cada una de las especies identificadas como promisorias.

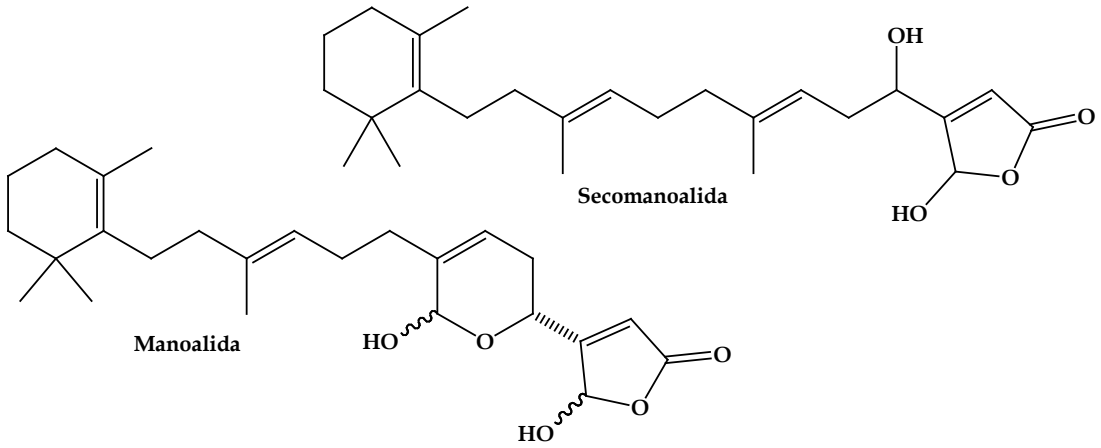
La esponja marina *Svenzea tubulosa*, anteriormente conocida como *Pseudoaxinella tubulosa*, no tiene informes sobre su composición química. No obstante, las esponjas de este género son reconocidas por ser fuente de ácidos grasos de cadena larga, compuestos esteroidales, y compuestos péptidicos, alguno de ellos con actividad antibacteriana (SJÖSTRAND *et al.,* 1981; KONG *et al.*, 1992). Cuando se ensayó la fracción orgánica de esta esponjas como fuente de compuestos IQS, se encontró que ella concentra la actividad observada en el extracto crudo, por lo que compuestos lipídicos o del tipo esteroidal podrían ser los responsables de dicha actividad.

Estudios químicos de esponjas del género *Neopetrosia* ha permitido aislar alcaloides del tipo quinolínico, además de otros compuestos nitrogenados que presentan actividad citotóxica y antimicrobiana, entre otras (NAKAO *et al.,* 2004; DE ALMEIDA LEONE *et al.,* 2008). En particular de *N. carbonaria*, anteriormente conocida como *Xestospongia carbonaria*, fue posible aislar alcaloides polares del tipo acridina, con reconocida actividad contra el cáncer (THALE *et al.,* 2002). Estos alcaloides se presentan en la fracción butanólica, la cual fue activa en la interrupción de los sistemas de QS de *C. violaceum* como también cuando Quintana en 2008 uso *E. coli*. En consecuencia, cabe suponer que estos alcaloides son responsables de la actividad inhibitoria de QS del extracto ensayado, pero esto aún no se ha demostrado. Los alcaloides acridina guardan estrecha relación con los dipeptidos cíclicos (2,5-dicetopiperazinas) de hongos y bacterias, las cuales han sido reportadas como moléculas de señalización interreinos e inhibidoras de QS (CAMPBELL *et al*., 2009; FUSETANI, 2011).

Las esponjas del género *Ircinia* son reconocidas como fuente de furanosesterterpenos (Figura 2.4a) con propiedades analgésicas, antimicrobianas, citotóxicas y antitumorales (MARTÍNEZ *et al.,* 1997). Estos compuestos están relacionados estructuralmente con manoalida y la secomanoalida, (Figura 2.4b), aislados de *Luffariella variabilis* (SKINDERSOE *et al.,* 2008), con probada actividad IQS. Adicionalmente, estos furanosesterterpenos están relacionados estructuralmente con las AHLs, por contener un anillo de furanona con una cadena lateral hidrocarbonada. A pesar de lo anterior, los furanosesterterpenos presentes en *I. felix* no han sido probados como IQS.



(a) Furanoserterterpeno de *Ircinia felix* . (7*E*,12*E*,18*R*,20*Z*)-Variabilina



(b) Sesterterpenos de *Luffariella variabilis*

Figura 2.4 Sesterterpenos estructuralmente similares entre sí. Estas moléculas guardan relación estructural con las AHLs por el anillo lacónico y la cadena lateral hidrocarbonada

En cuanto al extracto polar de la especie de "yarumo" *C. pachystachya* se pudo establecer que fue una de las especies más potentes en el ensayo de inhibición de QS. Esta especie ha sido objeto de estudios químicos donde se han logrado caracterizar compuestos fenólicos entre los que se cuentan tanto flavonoides como taninos. La fracción metanólica y la fracción butanólica, ensayados aquí, son ricos en flavonoides *C*-glicocidados y otros compuestos fenólicos (COSTA *et al*., 2011). Cabe decir que los compuestos fenólicos, y entre ellos los flavonoides, últimamente están siendo estudiados como moléculas IQS porque parecen estar involucrados en la señalización interreinos, ya que se ha probado que son responsables de modular el comportamiento de bacterias asociadas en plantas (MATHESIUS & WATT 2011).

2.4 CONCLUSIONES

Los resultados de la evaluación de la actividad IQS de los extractos ensayados, 48 de especies marinas y cuatro de plantas, sugieren que las especies marinas, particularmente las esponjas, son una fuente importante de compuestos IQS, y que se deben abordar estudios de bioprospección más ambiciosos que permitan

identificar nuevas fuentes de compuestos con esta actividad, lo que permitirá valorar de mejor manera nuestra biodiversidad.

Adicionalmente, se estableció que entre las especies evaluadas los extractos de *Svenzea tubulosa, Ircinia felix, Neopetrosia carbonaria* y *Cecropia pachystachya* son los más activos como inhibidores de QS sin mostrar actividad antibacteriana. Por lo que su estudio químico debe ser abordado con el fin de identificar los compuestos responsables de dicha actividad. Estos compuestos pueden encontrar aplicación en la industria naviera que busca evitar la colonización de superficies sumergidas sin causar efectos tóxicos sobre los organismos colonizadores, o en la industria farmacéutica, por su aplicación como medicamentos antipatogénicos.

De otro lado también se identificaron extractos de organismos marinos que tienen actividad antibacterial contra *C. violaceum* ATCC 31532. Entre los organismos marinos, las esponjas *Cliona tenuis* y *Ptilocaulis walpersi*; las algas *Laurencia catarinensis, Laurencia obtusa*, *Dictyota* sp1 y *Dictyota* sp2; y las cianobacterias *Oscillatoria nigro-viridis,* y los *mats* conformados por *Blennothrix glutinosa* (70%) + *Lyngbya* sp (30%), y *Symploca hydnoides* (80%) + *Phormidium* sp (20%) son promisorios para buscar en ellos sustancias antimicrobianas y/o citotóxicas.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

ABRANTES, J. L.; BARBOSA, J.; CAVALCANTI, D.; PEREIRA, R. C.; FREDERICO FONTES, C. L.; TEIXEIRA, V. L.; MORENO SOUZA, T. L.; PAIXÃO, I. C. The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae *Dictyota pfaffii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. *Planta Med*. 2010, 76(4):339-344.

ADONIZIO, A. L.; DOWNUM, K.; BENNETT, B.C.; MATHEE, K. Antiquorum sensing activity of medicinal plants in southern Florida. *J Ethnopharmacol.* 2006, 103(6):427–435.

ADONIZIO, A.; KONG, K-F.; MATHEE, K. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008, 52(1):198–203.

ANTA, C.; GONZÁLES, N.; SANTAFÉ, G.; RODRÍGUEZ, J.; JIMÉNEZ, C. New Xenia diterpenoids from the Indonesian soft coral *Xenia* sp. *J Nat Prod*. 2002, 65(5):766-768.

AYYAD, S. E.; MAKKI, M. S.; AL-KAYAL, N. S.; BASAIF, S. A.; EL-FOTY, K. O.; ASIRI, A. M.; ALARIF, W. M.; BADRIA, F. A. Cytotoxic and protective DNA

damage of three new diterpenoids from the brown alga *Dictoyota dichotoma*. *Eur J Med Chem*. 2011, 46(1):175-182.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 2011, 28(2):196-268.

BOYER, M.; WISNIEWSKI-DYÉ, F. Cell-cell signalling in bacteria: Not simply a matter of quorum. *FEMS Microbiol Ecol.* 2009, 70(1):1-19.

BRENCIC, A.; WINANS. S.C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005, 69(1):155–194.

CAMPBELL, J.; LIN, Q.; GESKE, G. D.; BLACKWELL, H. E. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. *Acs Chem Biol.* 2009, 4(12):1051-1059.

CHLIPALA, G. E.; TRI, P. H; VAN HUNG, N.; KRUNIC, A.; SHIM, S. H.; SOEJARTO, D. D.; ORJALA, J. Nhatrangins A and A, Aplysiatoxin-related metabolites from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* from Vietnam. *J Nat Prod.* 2010, 73(4):784–787.

CLARK, B. R.; ENGENE, N.; TEASDALE, M. E.; ROWLEY, D. C.; MATAINAHO, T.; VALERIOTE, F. A.; GERWICK, W. H. Natural products chemistry and taxonomy of the marine cyanobacterium *Blennothrix cantharidosmum. J Nat Prod.* 2008, 71(9): 1530–1537.

COLE, K.E.; DOWLING, D. P.; BOONE, M. A.; PHILLIPS, A. J.; CHRISTIANSON, D. W. Structural basis of the antiproliferative activity of largazole, a depsipeptide inhibitor of the histone deacetylases. *J Am Chem Soc*. 2011,133(32):12474-12477. Epub 2011 Jul 26.

COSTA, G. M., SCHENKEL, E. P., REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia. Nat Prod Commun*. 2011, 6(6):913-920
DE ALMEIDA LEONE, P.; CARROLL, A. R.; TOWERZEY, L.; KING, G.; MCARDLE, B. M.; KERN, G. FISHER, S.; HOOPER, J. N. A.; QUINN, R. J. Exiguaquinol: A novel pentacyclic hydroquinone from *Neopetrosia exigua* that inhibits *Helicobacter pylori* MurI. *Org Lett*. 2008, 10(12):2585-2588.

DICKSCHAT, J. S. Quorum sensing and bacterial biofilms. *Nat Prod Rep*. 2010, 27(3):343-369.

DOBRETSOV, S.; TEPLITSKI, M.; ALAGELY, A.; GUNASEKERA, S. P.; PAUL, V. J. Malyngolide from the cyanobacterium *Lyngbya majuscula* interferes with quorum sensing circuitry. *Environ Microbiol Reports*, 2010 2(6):739–744.

DOBRETSOV, S.; TEPLITSKI, M.; PAUL, V. Mini-review: quorum sensing in the marine environment and its relationship to biofouling. *Biofouling*. 2009, 25(5):413-427.

Documento CONPES No. 3697. Consejo Nacional de Política Económica y Social. Departamento Nacional de Planeación. Política para el Desarrollo Comercial de la Biotecnología a Partir del Uso Sostenible de la Biodiversidad. República de Colombia. Bogotá. 2011.

FERRARO, M. J.; WIKLER, M. A.; CRAIG, W. A.; DUDLEY, M. N.; ELIOPOULOS, G. M.; HECHT, D. W.; HINDLER, J.; RELLER, L. B.; SHELDON, A. T. JR.; SWENSON, J. M.; TENOVER, F. C.; TESTA, R. T.; WEINSTEIN, M. P. NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibily tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – Sixth edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

FUSETANI, N. Antifouling marine natural products. *Nat Prod Rep*. 2011, 28:400-410.
HARVELL, D.; JORDÁN-DAHLGREN, E.; MERKEL, S.; ROSENBERG, E.; RAYMUNDO, L.; SMITH, G.; WEIL, E.; WILLIS, B. Coral disease, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. *Oceanography*. 2007, 20(1):172-195.

HUBER, B.; EBERL, L.; FEUCHT, W.; POLSTER, J. Influence of polyphenols on bacterial biofilm formation and quorum-sensing. *Z Naturforsch*. 2003, 58c:879-884.

KIM, J. S.; KIM, Y. H.; SEO, Y. W.; PARK, S. Quorum sensing inhibitors from the red alga, *Ahnfeltiopsis flabelliformis. Biotechno Bioproc Eng*. 2007,12(3):308-311.

KONG, F.; BURGOYNE, D. L.; ANDERSEN, J.; ALLEN, T. M. Pseudoaxinellin, a cyclic heptapeptide isolated from the Papua New Guinea sponge *Pseudoaxinella massa*. *Tetrahedron Lett*. 1992, 33(23):3269-3272.

KUPCHAN, S. M.; BRITTON, R. W.; ZIEGLER, M. F.; SIGEL, C.W. Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolide from *Brucea antidysenterical*. *J Org Chem.* 1973, 38(1):178-179.

KWAN, J. C.; TEPLITSKI, M.; GUNASEKERA, S. P.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Isolation and biological evaluation of 8-epi-Malyngamide C from the Floridian marine cyanobacterium *Lyngbya majuscule*. *J Nat Prod.* 2010, 73(3):463–466.

LHULLIE, C.; FALKENBERG, M.; IOANNOU, E.; QUESADA, A; PAPAZAFIRI, P.; ANTUNES-HORTA, P.; SCHENKEL, E. P.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. Cytotoxic halogenated metabolites from the Brazilian red alga *Laurencia catarinensis*. *J Nat Prod*. 2010, 73(1):27-32.

LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010, 1-11

LOWERY, C. A.; DICKERSON, T. J.; JANDA, K. D. Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing. *Chem Soc Rev*. 2008, 37(7):1337-1346.

MARTIN, C.A.; HOVEN, A.D.; COOK, A.M. Therapeutic frontiers: preventing and treating infectious diseases by inhibiting bacterial quorum sensing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008, 27:635-642.

MARTÍNEZ, A.; DUQUE, C.; SATO, N.; FUJIMOTO, Y. (8Z, 13Z, 20Z)-Strobilinin and (7Z, 13Z, 20Z)-Felixinin: New furanosesterterpene tetronic acids from marine sponges of the genus *Ircinia*. *Chem Pharm Bull*. 1997, 45(1):181-184.

MATHESIUS, U.; WATT, M. Rhizosphere signals for plant-microbe interactions: implications for field-grown plants. *Progress in Botany 72*. 2011, 72:125-161.

McCLEAN, K. H.; WINSON, M. K.; FISH, L.; TAYLOR, A.; CHHABRA, S. R.; CAMARA, M.; DAYKIN, M.; LAMB, J. H.; SWIFT, S.; BYCROFT, B. W.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology*. 1997, 143(12):3703-3711.

MESEGUER, D.; KIIL, S.; DAM-JOHANSEN, K. Antifouling technology—past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coat*. 2004, 50(2):75-104.

MORA-CRISTANCHO, J. A.; AREVALO-FERRO, C.; RAMOS, F. A.; TELLO, E.; DUQUE, C.; LHULLIER, C.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL, E. P. Antifouling activities against colonizer marine bacteria of extracts from marine invertebrates collected in the Colombian Carribean Sea and in the Brazilian Coast (Santa Catarina). *Z Naturforsch* C. 2011, 66c:515-526.

NAKAO, Y.; SHIROIWA, T.; MURAYAMA, S.; MATSUNAGA, S.; GOTO, Y.; MATSUMOTO, Y.; FUSETANI, N. Identification of Renieramycin A as an antileishmanial substance in a marine sponge *Neopetrosia* sp. *Mar Drugs*. 2004, 2(2):55-62.

NG, W. L.; BASSLER, B. L. Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet*. 2009, 43:197-222.

PETERS, L.; KÖNIG, G.M.; WRIGHT, A.D.; PUKALL, R.; STACKEBRANDT, E.; EBERL, L.; RIEDEL, K. Secondary metabolites of *Flustra foliacea* and their influence on bacteria. *App Environ Microbiol*. 2003, 69(6):3469-3475.

QIAN, P.Y.; LAU, S.C.K.; DAHMS, H.U.; DOBRETSOV, S.; HARDER, T. Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture. *Mar Biotechnol*. 2007, 9(4):399-410.

QUINTANA, J.; CASTELLANOS, L.; ARÉVALO, C. Adaptación de una técnica para la evaluación de la actividad inhibitoria de *quorum sensing* de extractos de organismos marinos. Trabajo de grado en Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia. 2008.

RASMUSSEN, T.B.; GIVSKOV, M. Quorum sensing inhibitors as anti-patogenic drugs. *Int J Med Microb*. 2006, 296(2-3):149-161.

ROMERO, D.; TRAXLER, M. F.; LÓPEZ, D.; KOLTER, R. Antibiotics as Signal Molecules. *Chem Rev.* 2011, 111(9):5492–5505.

SALVADOR, L. A.; BIGGS, J. S.; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Veraguamides A-G, cyclic hexadepsipeptides from a dolastatin 16-producing cyanobacterium *Symploca cf. hydnoides* from Guam. *J Nat Prod*. 2011, 74(5):917-927.

SIMMONS, T. L.; ENGENE, N.; UREÑA, L. D.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; GERWICK, L.; GERWICK, W. H. Viridamides A and B, lipodepsipeptides with antiprotozoal activity from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigro-viridis*. *J Nat Prod.* 2008, 71(9):1544–1550.

SJÖSTRAND, U.; KORNPROBST, J. M.; DJERASSI, C. Minor and trace sterols from marine invertebrates 29. (22E)-ergosta-5,22,25-trien-3β-ol and (22E,24R)-24,26-dimethylcholesta-5,22,25(27)-trien-3β-ol. Two new marine sterols from the sponge *Pseudopxinella lunachata*. *Steroids*. 1981, 38(3):355-364.

SKINDERSOE, M.; ETTINGER-EPSTEIN, P.; RASMUSSEN, T.; BJARNSHOLT, T.; DE NYS, R.; GIVSKOV, M. Quorum sensing antagonism from marine organisms. *Mar Biotechnol*. 2008, 10(1):56-63.

TAORI, K.; MATTHEW, S.; ROCCA, J. R. ; PAUL, V. J.; LUESCH, H. Lyngbyastatins 5-7, potent elastase inhibitors from Floridian marine cyanobacteria, *Lyngbya* spp. *J Nat Prod*. 2007, 70(10):1593-1600.

THALE, Z.; JOHNSON, T.; TENNEY, K.; WENZEL, P. J.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J.; MEDIA, J.; PIETRASZKIEWICZ, H.; VALERIOTE, F. A.; CREWS, P. Structures and cytotoxic properties of sponge-derived bisannulated acridines. *J Org Chem*. 2002, 67(26):9384-9391.

WENDER, P. A.; CRIBBS, C. M.; KOEHLER, K. F.; SHARKEY, N. A.; HERALD, C. L.; KAMANO, Y.; PETTIT, G. R.; BLUMBERG, P. M. Modeling of the bryostatins to the phorbol ester pharmacophore on protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988, 85(19):7197-7201.

YANG, S. W.; CHAN, T.M.; POMPONI, S.A.; CHEN, G.; WRIGHT, A.E.; PATEL, M. GULLO, V.; PRAMANIK, B.; CHU, M. A new bicyclic guanidine alkaloid, Sch 575948, from a marine sponge*, Ptilocaulis spiculifer*. *J Antibiot*. 2003, 56(11):970-972.

3 Compuestos Inhibidores de *Quorum sensing* (IQS) de *Cecropia pachystachya* Trécul

CONTENIDO

	Pág.
Abstract	**66**
Resumen	**66**
3.1 Introducción	**67**
3.1.1 Género *Cecropia*	**67**
3.2 Parte experimental	**73**
3.2.1 Generalidades	**73**
3.2.2 Material Vegetal	**75**
3.2.3 Extracción	**75**
3.2.4 Fraccionamiento y Aislamiento de los Compuestos	**76**
3.2.5 Bioensayo de Actividad de Inhibición de *Quorum Sensing*	**76**
3.2.6 Ensayo de Inhibición de Crecimiento Microbiano	**78**
3.2.7 identificación de los Compuestos Activos	**79**
3.3 Resultados y Discusión	**80**
3.4 Conclusiones	**101**
3.5 Bibliografía	**102**

ABSTRACT

The genus *Cecropia* comprises about 60 species, which are widely distributed in Latin America. In traditional medicine, extracts of the parts of these plants have been used to treat some diseases that affect humanity, among which are, asthma, bronchitis, hypertension, inflammation, heart disease, as well as other attributing properties such as anxiolytic, hypoglycemic and relaxing. In recent years, chemical and pharmacological studies on this genus have been interesting and some of the properties of both extracts and compounds have been reported for some species. In a screening of extracts as sources of quorum sensing inhibitor compounds (IQS) was found to *Cecropia pachystachya* Trécul as a promising source of substances with this property. This chapter describes the process of fractionation and identification of some compounds isolated from the leaves of *Cecropia pachystachya*, as well as IQS activity (alone and in mixture) against two different biosensors (*Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 and *Escherichia coli* pSB403). Between the isolated compounds are chlorogenic acid (**2**), isoorientin (**3**), orientin (**4**), isovitexin (**6**), vitexin (**7**), and rutin (**9**). Among them, the rutin (**9**) showed the greatest activity. None of the compuetos presented growth inhibition biosensors, or against other microorganisms tested.

RESUMEN

El género *Cecropia* comprende alrededor de 60 especies, las cuales están ampliamente distribuidas en Latinoamérica. En medicina tradicional los extractos de las partes de estas plantas han sido usados para el tratamiento de algunas dolencias que afectan a la humanidad, entre las que están, el asma, la bronquitis, la hipertensión, inflamación, enfermedades del corazón, además de atribuirles otras propiedades tales como ansiolítica, hipoglicemiante y relajantes. En los últimos años, los estudios químicos y farmacológicos sobre este género han sido interesantes y algunas de las propiedades tanto de extractos como de compuestos han sido reportadas para algunas especies. En un *screening* de extractos como fuentes de compuestos inhibidores de *quorum sensing* (IQS) se encontró a *Cecropia pachystachya* Trécul como una fuente promisoria de sustancias con esta propiedad. En este capítulo se describe el proceso de fraccionamiento e identificación de algunos compuestos aislados de las hojas de *Cecropia pachystachya,* así como también la actividad IQS (solos y en mezcla) contra dos biosensores diferentes (*Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 y *Escherichia coli* pSB403). Entre los compuestos asilados están el ácido clorogenico (**2**), la isoorientina (**3**), la orientina (**4**), la isovitexina (**6**), la vitexina (**7**), y la rutina (**9**). Entre ellos, la rutina (**9**) mostro la mayor actividad. Ninguno de los compuetos presentó inhibición de crecimiento de los biosensores, ni contra otros microorganismos ensayados.

3.1 INTRODUCCIÓN

Las biopelículas bacterianas se han identificado como problemáticas en medicina y en la industria naviera, pues son causantes de enfermedades y problemas asociados a la corrosión de superficies sumergidas, por lo cual se han desarrollado diversos sistemas para su tratamiento, incluyendo antibióticos, raspados mecánicos, superficies modificadas, etc. De un lado, las bacterias patógenas oportunistas cuando son tratadas con antibióticos se convierten, con el tiempo, en cepas resistentes mucho más virulentas. La incidencia de este problema repercute en la necesidad de desarrollar nuevas sustancias activas contras estas cepas; sin embargo, la velocidad de desarrollo de dichas sustancias es más lenta y no va a la par con la velocidad adaptación de las bacterias a los tratamientos con antibióticos. De otro lado, para el tratamiento del *fouling*, que en sus etapas iniciales involucra la formación de biopelículas que inducen el asentamiento de macroorganismos, se han utilizado sustancias tóxicas y poco biodegradables que afectan a toda la fauna marina por igual y no sólo a los organismos involucrados en el *fouling* (FUSETANI, 2011).

Con el fin de evitar la problemática causada en ambos casos, y partiendo del hecho que el *quorum sensing* (QS) controla tanto la virulencia como la formación y maduración de películas en las bacterias patógenas e involucradas en el micro*fouling*, se ha venido abordando la interrupción de los sistemas de QS en estas bacterias como una alternativa para el control de las biopelículas. Adicionalmente, en la literatura especializada está bien descrito como algunos organismos pueden controlar las comunidades bacterianas asociadas a ellos, mediante la secreción de moléculas propias que interrumpen o interfieren con el fenómeno de comunicación en las bacterias. Es así, como ciertas plantas tienen la maquinaria metabólica necesaria para controlar a las poblaciones microbianas simbióticas (COOPER, 2007). Pero no sólo la comunicación ocurre en relaciones simbióticas, la comunicación puede ser llevada a cabo como un sistema de defensa, donde los organismos superiores mantiene bajo control las poblaciones de bacterias, mediante la inhibición de genes bacterianos virulentos controlados por QS, en otras palabras, por antagonistas e inhibidores de *quorum sensing* (IQS) (COOPER, 2007). Por lo anterior, la búsqueda de IQS en plantas es una opción para la identificación de nuevas moléculas con esta propiedad.

3.1.1 GÉNERO *CECROPIA*

Los árboles del género *Cecropia* comparten características de la vegetación secundaria, ellos pueden alcanzar hasta 25 metros de altura, los tallos son de gran tamaño, huecos, y tabicados en los nudos de los cuales se desprenden raíces zancudas. Las hojas, también de gran tamaño, son alternas, compuestas y dispuestas

en espiral, la textura y color difieren según la especie (BERG & FRANCO-ROSELLO, 2005; COSTA, 2009). Estos árboles son conocidos en Latinoamérica como ambaibo, guarumo, yagrumo o yarumo (BERG & FRANCO-ROSELLO, 2005). Anteriormente, el género *Cecropia* había sido clasificado en la familia Moraceae, pero estudios genéticos lo encontraron más relacionado con la familia Urticaceae, en tanto que varios expertos prefieren catalogarlo en una familia propia, Cecropiaceae. El género comprende unas 60 especies de árboles que se encuentran en regiones de América central y Suramérica; y están ampliamente distribuidas en Argentina, Brasil, Colombia, México y Paraguay (BERG & FRANCO-ROSELLO, 2005; COSTA *et al*., 2011).

En Colombia encontramos alrededor de 50 especies de *Cecropia* las cuales están presentes mayoritariamente en las regiones pacífica, amazónica y andina. En la amazonía se encuentra un total de 25 especies entre las que están *C. distachya, C. latiloba, C. marginalis, C. putumayonis, C. idroboi* y *C. pachystachya* entre otras (BERG & FRANCO-ROSELLO, 2005).

Las especies de *Cecropia* son utilizadas por el hombre en diferentes formas. Por su alto contenido de taninos la cáscara es utilizada en la industria marroquinera para el curtido de pieles; los tallos huecos son empleados en la fabricación de instrumentos musicales de viento; la madera es útil para la extracción de celulosa y fabricación de papel, entre otros usos (BERG & FRANCO-ROSELLO, 2005; COSTA, 2009). En medicina tradicional las infusiones de estas especies son ampliamente utilizadas para el tratamiento de la tos, el asma, la bronquitis, la presión arterial alta, la inflamación, enfermedades del corazón, y como diurético (COSTA *et al*., 2011).

En los últimos años se han realizado un gran número de estudios fitoquímicos y farmacológicos de estas plantas, debido no sólo a la gran distribución de éstas en Latinoamérica, sino, y por sobre todo, a su amplio uso en medicina tradicional (COSTA *et al*., 2011). A continuación se describen algunos estudios químicos y farmacológicos llevados a cabo sobre especies del género *Cecropia*. Entre los constituyentes mayoritarios aislados se tienen terpenos, esteroides y compuestos fenólicos.

Las infusiones de las hojas de *Cecropia lyratiloba* son utilizadas tradicionalmente como agentes antihipertensivos. Estudios llevados a cabo sobre el extracto metanólico de las hojas y la fracción rica en flavonoides de C. *lyratiloba,* han mostrado que esta posee acción vasodilatadora significativa; sin embargo, el efecto de los flavonoides (isoorientina, orientina e isovitexina, Figura 3.1) ensayados por separado fue menor. Se sugiere que el efecto de la fracción es debida a otros constituyentes o a un efecto sinérgico de los flavonoides (RAMOS ALMEIDA *et al*.; 2006). También en las hojas de esta planta se encontró una *C*-glicosilflavona, la 6-*C*-

galactosil-6”-*O*-β-galactopiranósido, sin que se le describiera alguna actividad biológica (OLIVEIRA *et al*., 2003). De otro lado, en las raíces de esta planta se encontraron los triterpenos: ácido euscaphico, ácido torméntico, ácido 2α-acetil torméntico y ácido 3β-acetil torméntico (Figura 3.2); los cuales mostraron actividad *in vitro* contra líneas celulares de leucemia (DA GRAÇA ROCHA *et al*., 2007).

El extracto hidroalcohólico, al igual que el extracto rico en flavonoides, de *Cecropia palmata* ha mostrado poseer actividad antioxidante (SILVA *et al*., 2007). De esta planta se han reportado compuestos como el β-sitosterol, el ácido ursólico, ácido pomólico, α-amirina, β-amirina y derivados del estigmaesterol (Figura 3.2) (COSTA *et al*., 2011).

Se han aislado de *Cecropia obtusa* la β-amirinona y derivados de los ácidos oleanólico y ursolicos (COSTA *et al*., 2011). De las raíces y del tallo de *C. catharinensis* fueron aislados los triterpenos 2α-acetoxi-3β,19α-dihidroxi-11α,12α-epoxi-ursan-28,13β-olido; 3β-acetoxi-2α,19α-dihidroxi-11α,12α-epoxi-ursan-28,13β-olido y ácido 2-*O*-acetileuscaphico (Figura 3.2) (MACHADO *et al*., 2008).

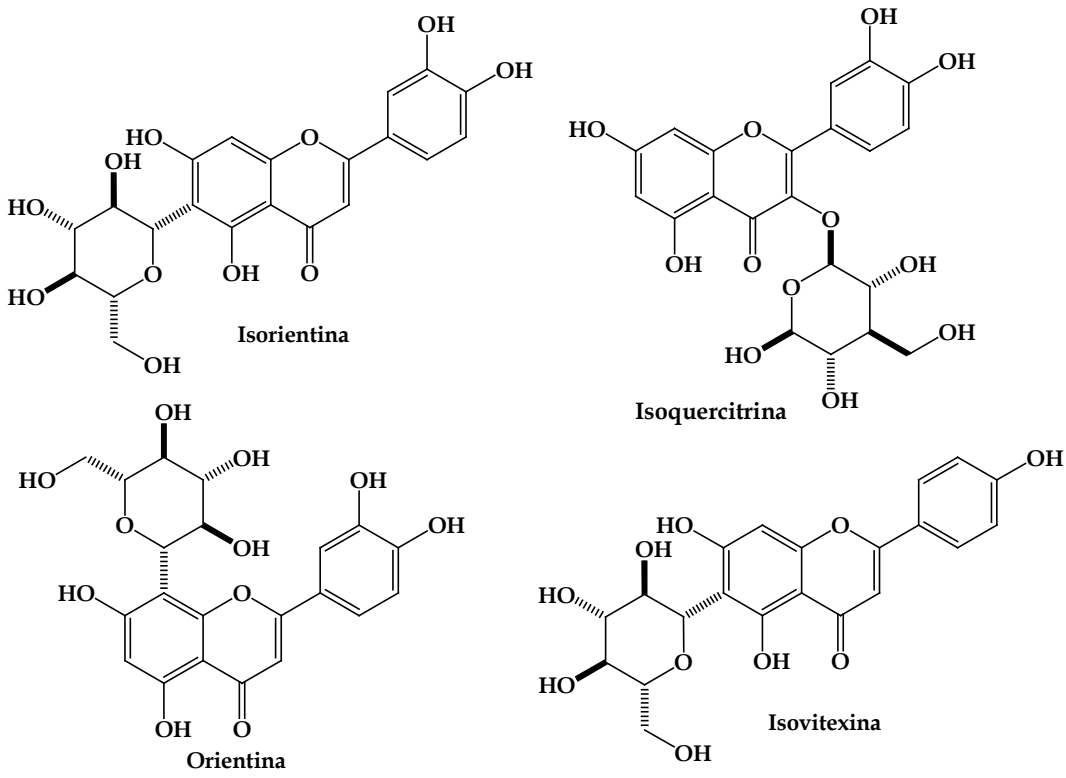


Figura 3.1 Flavonoides aislados del genero *Cecropia*

Los extractos orgánicos de las hojas de *C. obtusifolia* mostraron un efecto vasorelajante sobre anillos aórticos de ratas. En el extracto de diclorometano se identificaron como compuestos constituyentes: el ácido palmítico, esteárico y

vaníllico, también los esteroides estigmast-4-en-3-ona; 4-colesten-3,24-diona; 4,22-colestadien-3-ona; y los compuestos 4-vinil-2-metoxi-fenol; 2-metilbenzaldehído; 2,3-dihidrobenzofurano y 3'-metoxiacetofenona (Figura 3.3a) (GUERRERO *et al*., 2010). Debido a que la decocción de esta especie es utilizada para el tratamiento de la diabetes tipo II, los extractos acuoso y butanólico de las hojas de esta *Cecropia,* fueron ensayados para observar su efecto hipoglicémico en ratas con diabetes inducida. Los resultados mostraron que ambos extractos fueron activos. Los constituyentes mayoritarios en ambos extractos fueron la isoorientina y el ácido clorogénico (ANDRADE-CETTO & WIEDENFELD, 2001).

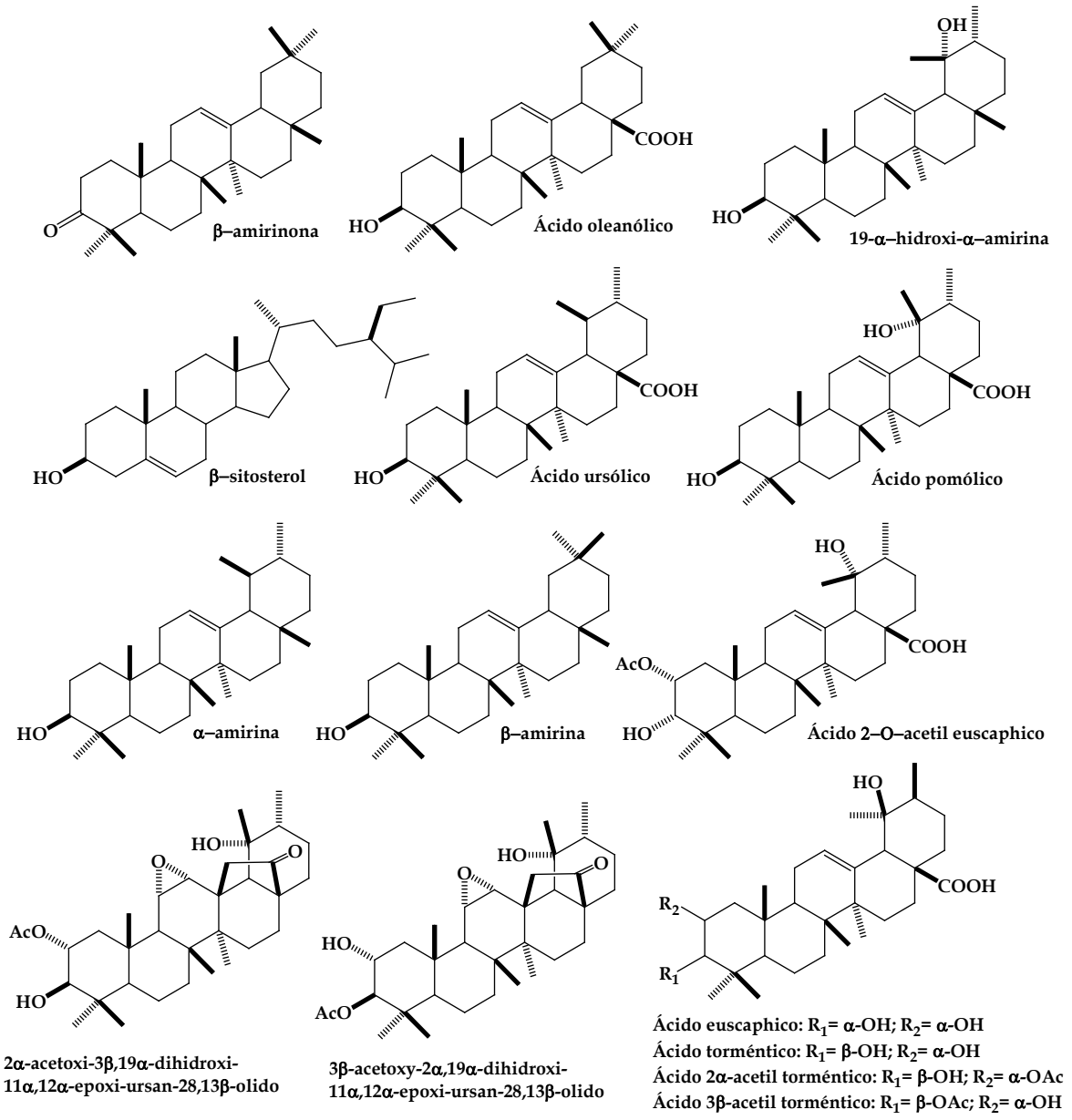


Figura 3.2 Terpenos asilados del genero *Cecropia*

El extracto acuoso de *C. glaziovii,* obtenido por infusión, está constituido por un 12% de catequinas, 19% de procianidinas y 19% de flavonoides. Este extracto posee actividad antihipertensiva, broncodilatadora y ansiolítica entre otras (ROCHA *et al*., 2002; TANAE *et al*., 2007; SOUCCAR *et al*., 2008). El extracto butanólico de *C. glaziovii* posee efecto antidepresivo juzgado en un ensayo realizado con ratas. De este extracto los compuestos más activos fueron catequina, catequina-(4α→8)-*ent*-catequina (isómero de procianidina B3) y procianidina B2 (Figura 3.3b) (ROCHA *et al*., 2007). Estos compuestos, junto con procianidina B5, epicatequina, procianidina C1, aislados del mismo extracto de la planta, mostraron una inducción pronunciada de hipotensión en ratas; lo que no fue mostrado por los flavonoides orientina, isoorientina e isovitexina, también identificados en esta especie (LIMA-LANDMAN *et al*., 2007). Esta misma especie de *Cecropia* presentó actividad antiviral *in vitro* contra el virus del herpes tipo I y II. Este estudio fue realizado sobre el extracto metanólico de las partes aéreas de la planta, el cual mostró, por su perfil en CLAE, estar constituido por flavonoides *C*-glicosidados, entre los cuales se identificaron la isoorientina y la isovitexina, además de otros compuestos polifenólicos en cantidades de trazas. La actividad antiviral de este extracto se le atribuye principalmente a estos flavonoides *C*-glicosidados (SILVA *et al*., 2010).

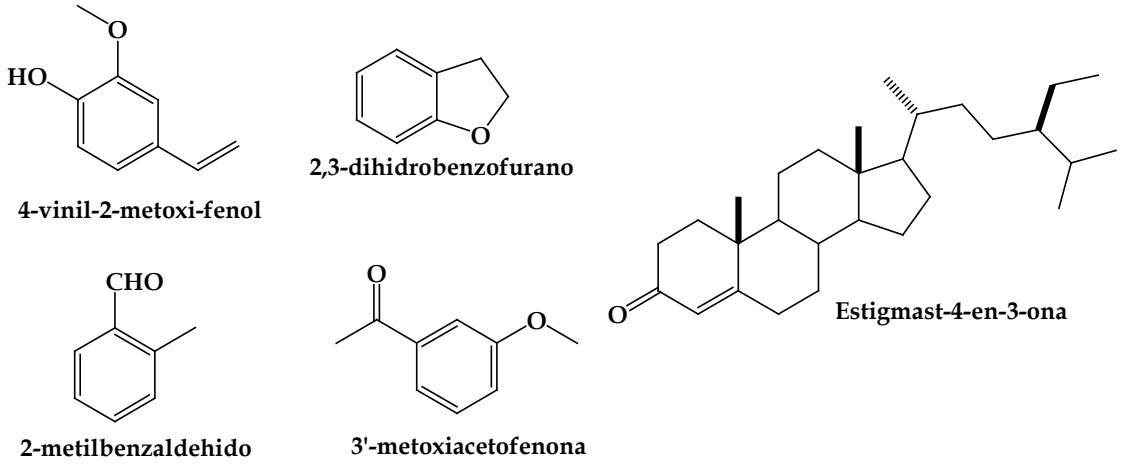


Figura 3.3a Compuestos aislados de *Cecropia obtusifolia*

En el caso particular de *Cecropia pachystachya*, objeto de este estudio, los reportes etnofarmacológicos indican que la infusión de las hojas tiene actividad antitusiva, expectorante, antiasmática y tiene efecto hipoglicemiante. Un estudio farmacológico llevado a cabo sobre el extracto metanólico de esta especie mostró efecto hipoglicemiante y antioxidante. De otro lado, en el estudio químico de este extracto se lograron identificar los flavonoides *C*-glicosidados orientina, isoorientina e isovitexina, además del ácido clorogénico (ARAGÃO *et al*., 2010).

En *C. pachystachya* también se han reportados triterpenos como la α-amirina, la 19-α-hidroxi-α-amirina, el ácido pomólico (Figura 3.2), y el ácido oleanólico, alguno de los

cuales ha presentado actividad antiinflamatoria (HIKAWCZUK *et al*., 1998). También los extractos etanólicos de madera, raíces y hojas de esta especie han sido estudiados químicamente, ya que estos han mostrado actividad antimalárica contra dos especies de *Plasmodium*. El extracto de las raíces fue el que mostró mejor actividad, en éste se identificaron como constituyentes el β-sitosterol y el ácido torméntico, que también resultaron ser activos en ensayos *in vivo*. Sin embargo, sólo el ácido torméntico mostró ser capaz de inhibir el crecimiento de parásitos de *Plasmodium falciparum* resistentes a la cloroquina, reduciendo parasitemia con un IC_{50} entre 10 y 15 µg/mL (TEIXEIRA UCHÔA *et al*., 2010).

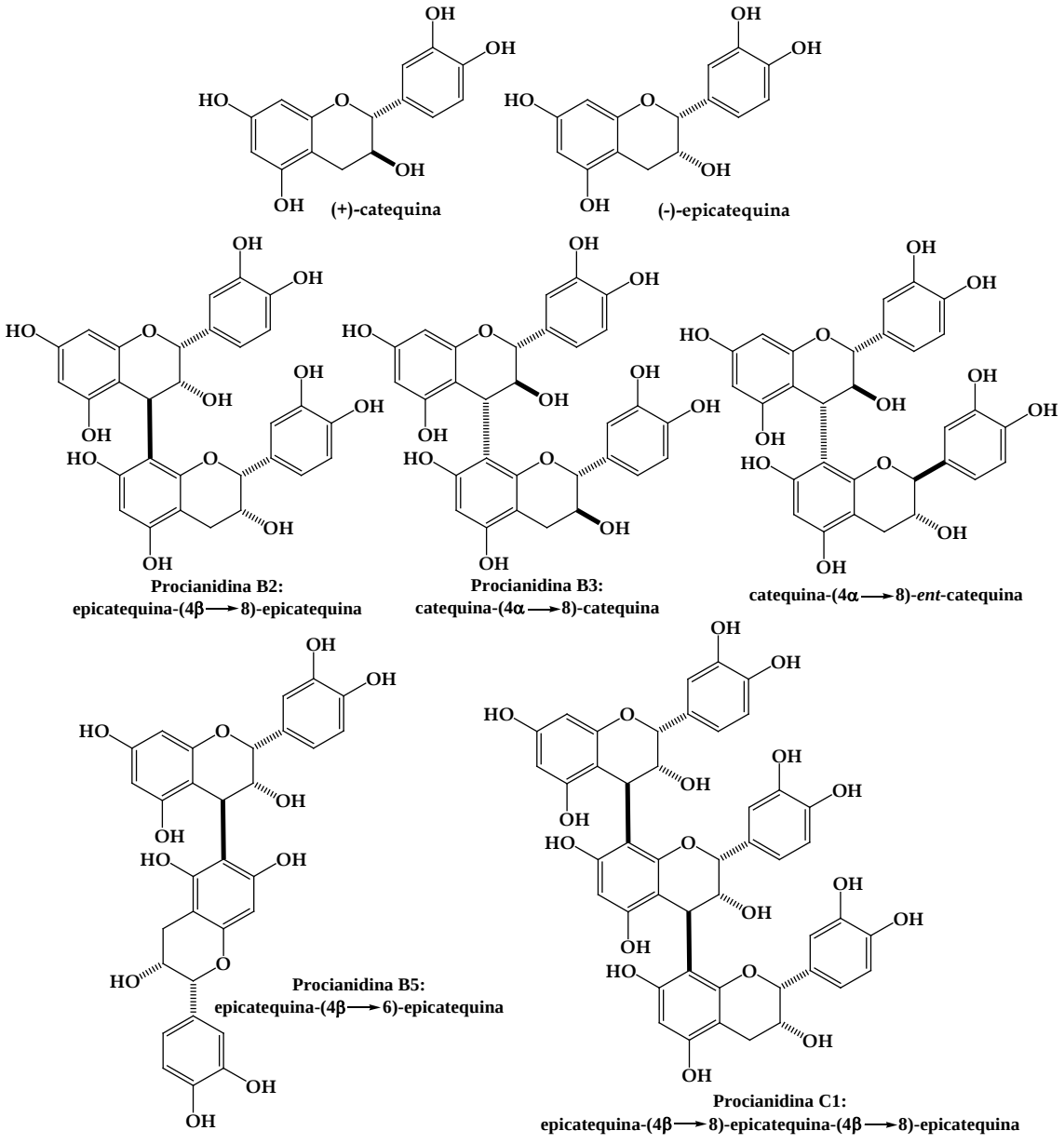


Figura 3.3b Catequinas y procianidinas aisladas de arboles de *Cecropia*

La inhibición de enzima convertidora de angiotesina (ACE, por su sigla en inglés) es considerada actualmente como una estrategia terapéutica útil para el tratamiento de la hipertensión arterial. En un estudio donde se evaluó la actividad inhibitoria de la ACE, por parte de extractos y compuestos de diferentes plantas, se encontró que los flavonoides *C*-glicosidados y las proantocianidinas son activos. Esos compuestos fueron aislados de diferentes extractos de hojas de tres especies de *Cecropia* (*C. pachystachya, C. glaziovii,* y *C. hololeuca*) procedentes de Brasil. La actividad en la inhibición de la ACE fue sugerida como una sinergia entre los flavonoides y proantocianidinas. En este estudio se identifico la isoquercetrina (Figura 3.1), como uno de los constituyentes de *C. pachystachya* (LACAILLE-DUBOIS *et al*., 2001).

Finalmente, en el capítulo 2 se estableció que el extracto metanólico de *Cecropia pachystachya* resultó muy activo en el ensayo de inhibición de *quorum sensing* con *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, sin afectar el crecimiento de la bacteria. Este capítulo se enfoca en la identificación de los compuestos responsable de la actividad de este extracto empleando como biosensores *C. violaceum* y *Escherichia coli* pSB403. Así mismo, se busca evaluar sus propiedades bactericidas.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 GENERALIDADES

Los solventes utilizados en la obtención de los extractos de los organismos fueron metanol, diclorometano, y butanol, todos grado analítico. Los solventes empleados en la CLAE fueron grado cromatográfico. Los patrones de vitexina e isovitexina fueron obtenidos en nuestro grupo de investigación a partir de especies de *Passiflora* y caracterizados mediante técnicas espectroscópicas de RMN mono y bidimensional, EM de alta resolución y UV. El patrón de rutina (Sigma-Aldrich) fue proporcionado por el Grupo de Estudio en Productos Naturales y Sintéticos (GEPRONAS) de la Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – Brasil.

Los espectros ultravioleta fueron registrados en un espectrofotómetro UV-Vis Cary 50-Agilent, utilizando soluciones metanólicas de los compuestos. Los espectros de infrarrojo fueron registrados en un espectrofotómetro IRPrestinge-21 FTIR-Shimadzu. Los experimentos de resonancia magnética nuclear fueron obtenidos en un equipo Bruker AVANCE 400, a 400 MHz para ^{1}H y 100 MHz para ^{13}C.

Los datos de rotación específica fueron obtenidos en un polarímetro ADP440+, algunas lecturas fueron realizadas utilizando metanol grado HPLC – Honeywell, y otras en agua desionizada. En todos los casos se indica el solvente y la concentración.

Los experimentos de cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de arreglo de diodos en modo analítico (CLAE-DAD) fueron llevados a cabo en un equipo Merck-Hitachi 6000 equipado con una bomba terciaria L-6200A y un detector DAD L-4500. Como fase móvil se utilizó un sistema isocrático en el que se mezcló 15% del solvente A (tetrahidrofurano, acetonitrilo e isopropanol en proporciones 8:3:2) con solución acuosa de ácido fórmico al 0.5% (solvente B). El flujo utilizado fue de 1.0 mL/min. Se empleó una columna Luna® C18 (250x4.6 mm; d.i. 5 µm) Phenomenex.

La CLAE preparativa se llevó a cabo en un equipo Merck-Hitachi 6000 equipado con una bomba L-6000A y un detector UV-VIS de onda fija L-4250. La longitud de onda seleccionada fue de 340 nm. Se utilizó como fase móvil la mezcla de solventes mencionada anteriormente a un flujo de 2.5 mL/min. Se empleó una columna LiChroCART®-LiChrospher® 100 C18 (250x10 mm; d.i. 10 µm) Merck.

Los análisis de CL-IES-EM fueron llevados a cabo en un equipo LCMS-2010EV-Shimadzu, equipado con dos bombas independientes LC-20A y un detector de UV-Vis SPD-20A, acoplado a un espectrometro de masa MS-2010. La detección en UV se hizo a 260 y 340 nm. La fase móvil consistió en dos soluciones: el solvente A, constituido por una mezcla de: acetonitrilo: ácido fórmico 1%: agua en proporciones 3:10:87; y el solvente B, constituido por los mismos solventes pero en proporciones de 50:10:40. Se empleó el siguiente gradiente: de 0 a 20 min desde el 94 al 80% de A; de 20 a 35 min desde el 80 al 60% de A; de 35 a 40 min desde el 60 al 40% de A; de 40 a 45 min desde el 40 al 30% de A; y finalizando, de 45 a 50 min desde el 30 al 0% de A. La columna utilizada fue una Premier C18 (150x4.6 mm; d.i. 3 µm) Shimadzu. El voltaje de fragmentación fue de 1.5 kV, la temperatura de CDL fue 300 °C y su voltaje se mantuvo en 150V. Se usó nitrógeno como gas nebulizador a un flujo de 1L/min, y el rango de masas evaluado fue de 200-2000 Da, tanto en modo positivo como negativo.

Los experimentos de CCD fueron realizados sobre cromatofolios de sílica gel 60 Merck F_{254}. Después de la elución las placas se observaron a la luz UV a 254 y 366 nm, y posteriormente se asperjaron con una solución de reactivo natural (difenilboriloxietilamina) al 1% en metanol, para posteriormente ser visualizadas a 366 nm. Bajo estas condiciones, los flavonoides con núcleo apigenina revelan de color verde, mientras aquellos que tienen núcleo luteolina revelan de color amarillo, y las saponinas revelan de color rojo (WAGNER & BLADT, 1996).

Para los ensayos de inhibición de *quorum sensing* se emplearon dos biosensores. El primero de ellos fue *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, que fue crecido en medio de triptona y soya (TSB) - Scharlau®. Para los ensayos en cajas de petri se utilizó este medio con agar bacteriológico (Agar No. 1) – Oxoid al 1.2%; la temperatura de crecimiento de *C. violaceum* fue de 27 °C. El segundo biosensor fue

Escherichia coli pSB403, en conjunto con *Pseudomonas putida* IsoF, ésta ultima bacteria fue empleada como fuente exógena de AHLs. Tanto *E. coli* como *P. putida* fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5% y cloruro de sodio al 0.5%) a 37 °C durante la noche. Después de 24 horas, los inóculos de cada bacteria fueron sembrados en fondo. La cantidad de agar se ajustó para obtener cajas con 0.8% del mismo, según lo descrito por Quintana en 2008. La bioluminiscencia fue detectada en un digitalizador de geles ChemiDoc™ XRS+. Model Universal Hood II - BIO-RAD. Las bacterias fueron crecidas en una incubadora orbital Heidolph Unimax 1010. Los biosensores fueron donados por Dra. Katrin Riedel del Departamento de Microbiología del Instituto de Biología de Plantas de Zúrich- Suiza, a la Profesora Catalina Arevalo.

Las cepas utilizadas en los bioensayos de actividad antimicrobiana, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, fueron donadas por el Profesor Edelberto Silva del departamento de Química Farmacéutica de la Universidad Nacional de Colombia - Bogotá; la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* fue donada por la Profesora Angélica Kundson de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia – Bogotá. Las cepas de bacterias fueron crecidas en medio de triptona y soya (TSB) - Scharlau®. Como agar se utilizó Mueller Hilton al 1.2%. La levadura, fue crecida en medio Sabourau dextrosa y se utilizó este medio con agar al 1.2% para los ensayos en cajas de petri.

Para el ensayo de inhibición de crecimiento bacteriano se usaron como cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Las bacterias fueron crecida en medio de triptona y soya (TSB) - Scharlau®. Los ensayos fueron realizados en placa de micropozos (placa de cultivo celular MICROTEST™ de 96 pozos). Estas cepas fueron proporcionadas por el grupo de investigación Comunicación y Comunidades Bacterianas del Departamento de Biología de la Universidad Nacional de Colombia – Bogotá, dirigido por la Profesora Catalina Arévalo.

3.2.2. MATERIAL VEGETAL

Cecropia pachystachya Trécul fue recolectada en Viamão, estado de Rio Grande do Sul - Brasil, en Marzo de 2007. Un espécimen de herbario se encuentra en el Departamento de Botánica de la Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - Brasil bajo el código ICN.150025 (COSTA, 2009).

3.2.3 EXTRACCIÓN

Las partes aéreas de *Cecropia pachystachya* fueron secadas, molidas y luego sometidas a infusión acuosa en relación 1:10 (p/v) por 30 minutos, obteniendo el extracto

acuoso, el cual fue filtrado, congelado y liofilizado. El procedimiento de extracción fue realizado por triplicado y proporcionó el 13% de rendimiento p/p. Luego, 1 g de este extracto fue sometido a fraccionamiento utilizando el método modificado de Kupchan (KUPCHAN *et al.*, 1973; ANTA *et al.*, 2002) como sigue: El extracto acuoso fue sometido a partición con DCM:H_2O (1:1) obteniendo la fracción de diclorometano y la fracción acuosa. La fracción acuosa, fue extraída con un volumen igual de butanol, generándose en el proceso la fracción acuosa residual, F.Acuo.R (598 mg) y la fracción butanólica, F.BuOH (400 mg). Todas ellas fueron concentradas hasta sequedad en rota evaporador o liofilizador.

Por otro lado, el extracto acuoso fue retenido sobre amberlita XAD-16, y posteriormente eluído con metanol, después de su filtración fue concentrado a presión reducida (COSTA, 2009), el extracto así obtenido se denominará fracción metanólica, F.MeOH.

Los extractos y fracciones de *C. pachystachya* fueron obtenidos en el Grupo de Estudio en Productos Naturales y Sintéticos (GEPRONAS) de la Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – Brasil, y nos fueron suministrados por ellos en el marco de un convenio de cooperación de investigación (Colciencias-CNPq358-2007).

3.2.4. FRACCIONAMIENTO Y AISLAMIENTO DE LOS COMPUESTOS

Los análisis de CLAE-DAD se realizaron en las condiciones antes descritas. Se prepararon soluciones a 1 mg/mL de las fracciones (metanólica, acuosa residual y butanólica) en la fase móvil; se inyectaron 50 µL de las soluciones obteniendo los perfiles cromatográficos, y los espectros de UV para cada uno de los picos cromatográficos obtenidos. Para los análisis por CL-IES-EM también se prepararon soluciones a 1 mg/mL de las fracciones en la fase móvil, pero se inyectaron solamente 30 µL. En este experimento se obtuvieron los perfiles cromatográficos, juntos con los espectros de masa en modo positivo y negativo.

Se separaron 100 mg del la fracción metanólica (F.MeOH) por CLAE preparativa. Este experimento proporcionó 9 compuestos químicos de naturaleza fenólica que fueron evaluados en los ensayos de inhibición de QS. Los procedimientos de identificación se describirán más adelante.

3.2.5 BIOENSAYO DE ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE *QUORUM SENSING*

Para los ensayos de inhibición de QS con *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 se siguió la metodología de halos de inhibición, utilizando sensidiscos estériles de 5

mm de diámetros (FERRARO *et al.,* 2003). *Chromobacterium violaceum*, es una bacteria gram negativa que utiliza como AHL la *N*-3-hexanoil-L-homoserin lactona para la expresión del pigmento púrpura denominado violaceína (McCLEAN *et al.,* 1997). La bacteria fue inoculada en medio tripticasa de soya durante toda una noche. A partir de 100 µL del inóculo, la bacteria fue sembrada en la superficie del agar. Los sensidiscos estériles, previamente impregnados de una la solución metanólica de los compuestos, fracciones, el control positivo y el control negativo, fueron colocados sobre la superficie del agar donde crecía la bacteria. Las cantidades ensayadas para los compuestos fueron de 7.5, 15, 30, 40, 50, 75 y 100 µg/disco; mientras para las fracciones se ensayaron 100, 200 y 300 µg/disco. Cada experimento fue realizado por triplicado. Como control positivo se usó el extracto metanólico de *C. pachystachya* a 100 µg/disco y como control negativo se usaron 10 µL de metanol. Antes de la ubicación de los sensidiscos se dejó evaporar el solvente en todos los casos. Luego, las cajas con agar, sensidiscos cargados y bacteria fueron incubadas, las lecturas de los diámetros de inhibición en mm se llevaron a cabo a las 24 y 48 horas, las medidas se hicieron con el empleo de un nonio. Como resultado positivo de inhibición de QS se debe observar un halo de inhibición de la violaceína (o su disminución) sin observar inhibición del crecimiento bacteriano.

También se empleó para los ensayos de inhibición de QS el biosensor *Escherichia coli* pSB403 que contiene un plásmido modificado de *Vibrio fischeri* que le permite producir bioluminiscencia en presencia de AHLs. Este biosensor presenta ausencia del gen responsable de la producción de la sintasa LuxI, por lo que no puede producir las AHLs; sin embargo puede detectarlas porque produce el receptor LuxR. Este biosensor detecta AHLs con cadenas carbonadas entre 6 y 8 átomos de carbono, con y sin oxigenación en el C-3 (RAVN *et al*., 2001), y expresa bioluminiscencia en presencia de las AHLs suministradas por una fuente exógena, en este caso *Pseudomonas putida* IsoF. Para los ensayos de inhibición de QS ambas bacterias fueron sembradas al tiempo en fondo en agar semisólido (0.8% de agar). Posteriormente, a las cajas con agar semisólido y con las bacterias en fondo se les abrieron pozos de 3 mm de diámetros. Los compuestos y fracciones a evaluar se disolvieron en dimetilsulfoxido al 0.5% en agua desionizada estéril. En los pozos se aplicaron cantidades suficientes de la solución a ensayar, de tal manara que se obtuvieran 15, 30 y 35 µg/pozo para compuestos, y 100, 200 y 300 µg/pozo para las fracciones o extractos. Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada cantidad. Como control negativo se emplearon 10 µL de solvente utilizado en la preparación de las soluciones. Posteriormente, las cajas fueron incubadas y después de 18 horas la bioluminiscencia fue observa y fotografiada. Como resultado positivo de inhibición de QS se debían observar halos de inhibición de la expresión de la bioluminiscencia (color negro), sin que se afectara la viabilidad bacteriana. Este procedimiento fue adaptado del implementado por Quintana en 2008.

3.2.6 ENSAYO DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO MICROBIANO

Para la evaluación del efecto antimicrobiano de fracciones y compuestos puros, se siguieron dos metodologías, una cualitativa y otra cuantitativa.

En la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de la fracción metanólica se emplearon dos cepas de bacterias (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 33591), y una de levadura: *Saccharomyces cerevisiae*. La metodología utilizada fue la de halos de inhibición utilizando sensidiscos. Las bacterias fueron inoculadas en medio de tripticasa y soya durante toda una noche; mientras para la levadura se utilizó medio Sabourau dextrosa. A partir de 100 µL de cada inóculo, cada microorganismo fue sembrado en la superficie del agar (Mueller Hilton, para las bacterias; y Sabourau dextrosa para la levadura). Los sensidiscos estériles, previamente impregnados de una solución metanólica de la F.MeOH de *C. pachystachya* fueron colocados sobre la superficie del agar que contenía el microorganismo. Las cantidades ensayadas fueron 100, 200 y 300 µg/disco. Como control positivo se usaron siembra en pozo de una solución acuosa de tetraciclina para las bacterias, y ciclohexinida para la levadura, la cantidad utilizada fue de 1.5 y 2.1 µg/pozo respectivamente. Como control negativo se usaron 10 µL de metanol. Antes de la ubicación de los sensidiscos se dejó evaporar el solvente en todos los casos. Cada experimento fue realizado por triplicado. Luego, las cajas fueron incubadas a 37 °C y los resultados fueron observados al cabo de las 24 horas para las bacterias, y 48 horas para la levadura.

La metodología utilizada para la evaluación de la actividad bactericida cuantitativa de los compuestos activos en el ensayo de IQS fue mediante dilución en placas multipozos, empleando como cepas *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Cada bacteria fue inoculada en medio de triptona y soya, y se incubaron a 37 °C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica, a 600 nm, de entre 0.2-0.3 Abs. Los compuestos a evaluar fueron disueltos en dimetilsulfuxido y completados a volumen con medio de cultivo fresco, de tal manara que se obtuvieran soluciones de concentración conocida del compuesto y con un 0.5% de DMSO. Luego en cada pozo, se añadieron 20 µL de la suspensión de la bacteria, una alícuota apropiada de la solución del compuesto y se completo a volumen (a 200 µL) con medio estéril. Las concentraciones finales de los compuestos en los pozos fueron 2.5, 12.5 y 100 ppm. Como blanco de viabilidad celular se empleó el inóculo en medio fresco. Las cajas fueron incubadas durante 48 horas a 37ºC. La absorbancia fue fijada a cero usando la medida del pozo con 200 µL de medio fresco. Los experimentos se realizaron por triplicado. Trascurrido el tiempo de incubación, se tomó una medición de la absorbancia del cultivo a 621 nm para cada tratamiento. Con las fórmulas que se muestran a continuación se calcularon los datos de porcentaje de inhibición de crecimiento. Esta metodología fue adaptada de la desarrollada por Martínez en 2010.

$$\%CB = \frac{P°}{P} * 100 \qquad \%ICB = 100 - \%CB$$

Donde, %CB es el porcentaje de crecimiento de la bacteria.
P° es la absorbancia promedio obtenida para cada tratamiento.
P es la absorbancia del blanco de viabilidad celular.
%ICB es el porcentaje de crecimiento bacteriano.

3.2.7 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS

Los compuestos activos fueron identificados mediante diferentes técnicas espectroscópicas (UV, RMN y EM). Adicionalmente, se llevaron a cabo coinyecciones en CLAE usando patrones puros, para esto se prepararon soluciones de los compuestos a 1 mg/mL y se analizaron por CLAE-DAD bajos las condiciones anteriormente mostradas; de igual forma se realizó para los patrones de vitexina, isovitexina y rutina por separado; finalmente, se inyectó una mezcla del compuesto aislado y el patrón correspondiente (coiyencción). A continuación se muestran los datos espectroscópicos para cada uno de los compuestos activos.

Compuesto 2. Ácido clorogénico. Sólido blanco. $[\alpha]_D^{25}$ -33.9 (*c* 0.66, H_2O) **EM-IES en modo negativo** *m/z*: 353.0709 $[M-H]^-$ (Calc. 353.0878, $C_{16}H_{17}O_9$), 707.1670 $[2M-H]^-$. λ_{max} 230 y 330 nm. **EM-IES en modo positivo** *m/z*: 377.0788 $[M+Na]^+$ (Calc. 377.0849, $C_{16}H_{18}NaO_9$), 731.1627 $[2M+Na]^+$. **IR (KBr)** V_{max} 3387, 1720, 1604, 1180, 810 cm^{-1}. **RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-*d*$_6$) δ (ppm):** 7.43 (1H, d, *J*=15.8 Hz, H-10), 7.03 (1H, bs, H-2′), 6.98 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-6′), 6.76 (1H, d, *J*=7.8 Hz, H-5′), 6.18 (1H, d, *J*=15.8 Hz, H-9), 5.10 (1H, m, H-3), 3.93 (1H, d, H-5), 3.52 (1H, m, H-4), 1.97 (2H, m, H-6 y H-2), 1.90 (2H, m, H-6 y H-2).

Compuesto 3. Isoorientina. Sólido amarillo. $[\alpha]_D^{25}$ -34.7 (*c* 0.70, CH_3OH). **EM-IES en modo negativo** *m/z:* 447.0832 $[M-H]^-$ (Calc. 447.0933, $C_{21}H_{19}O_{11}$). **EM-IES en modo positivo** *m/z:* 449.1027 $[M+H]^+$ (Calc. 449.1078, $C_{21}H_{21}O_{11}$). λ_{max} 260, 274 y 348 nm (EM/EM). **IR (KBr)** V_{max} 3371, 1712, 1612, 1357, 1188, 779 cm^{-1}.

Compuesto 4. Orientina. Sólido amarillo. $[\alpha]_D^{25}$ -85.8 (*c* 1.10, CH_3OH). **EM-IES en modo negativo** *m/z:* 447.0842 $[M-H]^-$ (Calc. 447.0933, $C_{21}H_{19}O_{11}$). **EM-IES en modo positivo** *m/z*: 449.1027 $[M+H]^+$ (Calc. 449.1078, $C_{21}H_{21}O_{11}$). λ_{max} 260, 273 y 347 nm. **IR (KBr)** V_{max} 3332, 1720, 1620, 1357, 1180, 1080, 840 cm^{-1}. **RMN ^{1}H (400 MHz, CD_3OD:DMSO-*d*$_6$) δ (ppm):** 7.43 (1H, d, *J*=8 Hz, H-6′), 7.42 (1H, s, H-2′), 6.95 (1H, d, *J*=8 Hz, H-5′), 6.64 (1H, s, H-3), 6.55 (1H, S, H-6), 4.87 (1H, d, *J*= 9.6 Hz, H-1′′), 4.16 (1H, t, *J*=9.6 Hz, H-2′′), 3.87 (1H, d, *J*=11.5 Hz, H-6′′a), 3.71 (1H, dd, *J*=11.5 y 4.8 Hz, H-6′′b), 3.44 (3H, m, H-3′′, H-4′′, H-5′′). **RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD:DMSO-*d*$_6$) δ (ppm):** 182.5 (C, C-4), 164.6 (C, C-2), 163.4 (C, C-7), 160.7 (C, C-9), 157.2 (C, C-5), 149.7 (C, C-4′), 145.8 (C, C-3′), 122.2 (C, C-1′), 119.1 (CH, C-6′), 115.7 (CH, C-2′), 113.1

(CH, C-5′), 108.2 (C, C-8), 103.9 (C, C-10), 102.9 (CH, C-3), 93.9 (CH, C-6), 81.4 (CH, C-5′′), 78.8 (CH, C-3′′), 73.9 (CH, C-1′′), 71.2 (CH, C-2′′), 70.5 (CH, C-4′′), 61.6 (CH_2, C-6′′).

Compuesto 6. Isovitexina**,** Sólido amarillo. $[\alpha]_D^{25}$ -36.8 (*c* 0.73, CH_3OH). **EM-IES en modo positivo** *m/z*: 433.1073 $[M+H]^+$ (Calc. 433.1135, $C_{21}H_{21}O_{10}$). λ_{max} 270 y 347 nm. **RMN ^{1}H (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm):** 7.93 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-3′ y H-5′), 6.92 (2H, d, *J*=8.6 Hz, H-2′ y H-6′), 6.79 (1H, s, H-3), 6.50 (1H, s, H-8), 4.64 (1H, d, *J*=8.0 Hz, H-1′′).

Compuesto 7. Vitexina, Sólido amarillo. $[\alpha]_D^{25}$ 26.2 (*c* 0.53, CH_3OH). **EM-IES en modo negativo** *m/z*: 431.0874 $[M-H]^-$ (Calc. 431.0984, $C_{21}H_{19}O_{10}$). **EM-IES en modo positivo** *m/z*: 433.1078 $[M+H]^+$ (Calc. 433.1135, $C_{21}H_{21}O_{10}$). λ_{max} 270 y 347 nm. **IR (KBr)** V_{max} 3402, 1720, 1612, 1365, 1280, 1111, 840 cm^{-1}.

Compuesto 9. Rutina**,** Solido amarillo. $[\alpha]_D^{25}$ 33.8 (*c* 0.60, CH_3OH). **EM-IES en modo negativo** *m/z*: 609.1340 $[M-H]^-$ (Calc. 609.1461, $C_{27}H_{29}O_{16}$), 463.0823 $[M-H-146]^-$. **EM-IES en modo positivo** *m/z*: 611.1537 $[M+H]^+$ (Calc. 611.1607, $C_{27}H_{31}O_{16}$), 487.0799 $[M+Na-146]^+$, 465.0995 $[M-146]^+$, 303.0441 $[M-146-162]^+$. λ_{max} 250 y 356 nm. **IR (KBr)** V_{max} 3402, 1612, 1450, 1365, 1195, 1064, 817 cm^{-1}.

3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos de inhibición de *quorum sensing* con *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 demostraron que la fracción metanólica, la fracción acuosa residual y la fracción butanólica de *Cecropia pachystachya* Trécul, presentaron excelente actividad en la disrupción de la comunicación de este biosensor. Ninguna de las muestras ensayadas presentó efectos bactericidas sobre el biosensor, lo que significa que *C. pachystachya* es una fuente promisoria de metabolitos con actividad inhibitoria del *quorum sensing* (Figura 3.4, Tabla 3.1). La fracción metanólica también fue evaluada en cuanto a su actividad IQS frente a *E. coli* pSB403, observándose inhibición la bioluminiscencia en todas las concentraciones ensayadas (Figura 3.5, Tabla 3.2). Cabe resaltar que la metodología utilizada para la obtención del extracto crudo fue mediante infusión acuosa, la forma tradicional de tratar esta planta medicinal.

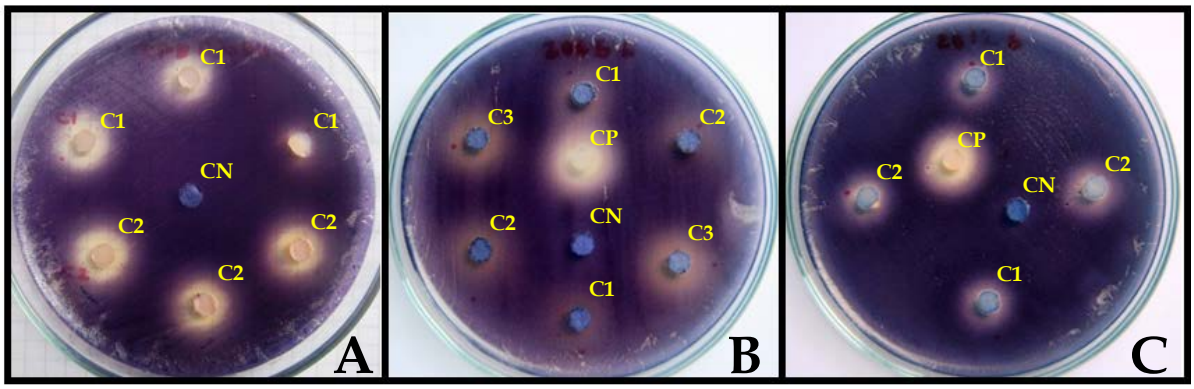


Figura 3.4 Fotografías de los resultados del ensayo de inhibición de *quorum sensing* con *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. **(A)** F.MeOH: C1=100 µg/disco, C2=200 µg/disco; **(B)** compuesto 4: C1=50 µg/disco, C2=75 µg/disco, C3=100 µg/disco; y **(C)** compuesto 9: C1=40 µg/disco, C2=50 µg/disco; CP= control positivo (100 µg/disco de F.MeOH); CN= control negativo (10 µL/disco de metanol, con previa evaporación antes de colocarlo).

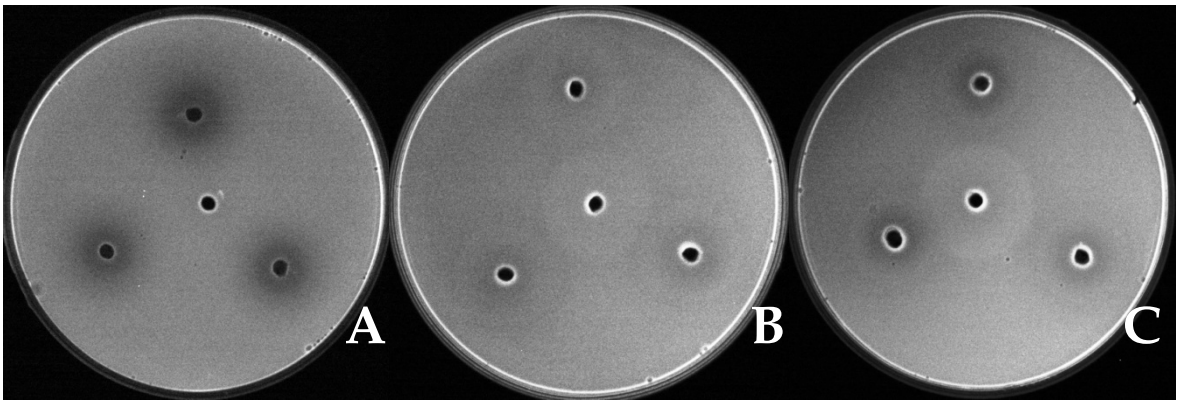


Figura 3.5 Fotografía de los resultados del ensayo de inhibición de *quorum sensing* con *Escherichia coli* pSB403. **(A)** F.MeOH a 300 µg/pozo; **(B)** compuesto **3** a 30 µg/pozo; y **(C)** compuesto **4** a 30 µg/pozo. Todos son replicas de la misma concentración. El pozo del centro en todas las cajas corresponde al control negativo (10 µL de solución de dimetilsulfoxido al 5% en agua estéril).

Tabla 3.1 Resultados del ensayo de IQS con *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, para la fracción metanólica (F.MeOH), la fracción acuosa residual (F.Acuo.R), la fracción butanólica (F.BuOH), la fracción de diclorometano (F.DCM) y los compuestos aislados de *Cecropia pachystachya.*

Fracción y/o compuesto	**Dosis (Resultados)**								
F.MeOH†	-	10 µg (-)	30 µg {+}	-	60 µg {++}*	-	100 µg (+++)	200 µg (++++)	300 µg (++++)
F.Acuo.R	-	-	-	-	-	-	100 µg (++)	200 µg (+++)	300 µg (++++)
F.BuOH	-	-	-	-	-	-	100 µg (+++)	200 µg (++++)	300 µg (++++)
F. DCM	-	-	-	-	-	-	100 µg (-)	200 µg (-)	300 µg (-)
1	-	15 µg (-)	30 µg (-)	-	50 µg (-)	-	-	-	-
2	**7.5 µg (-)**	**15 µg (-)**	**30 µg (-)**	**40 µg (-)**	**50 µg {+}**	**80 µg {++}***	**100 (++)**	-	-
3	**7.5 µg (-)**	**15 µg (-)**	**30 µg (-)**	**40 µg (+++)**	**50 µg (++++)**	**-**	**-**	**-**	**-**
4	**7.5 µg (-)**	**15 µg (-)**	**30 µg (-)**	**-**	**50 µg (+++)**	**75 µg (++++)**	**100 µg (++++)**	**-**	**-**
5	7.5 µg (-)	15 µg (-)	30 µg (-)	40 µg (-)	50 µg {+}*	-	-	-	-
6	7.5 µg (-)	15 µg (-)	30 µg (-)	40 µg (-)	50 µg {+}*	-	-	-	-
7	**7.5 µg (+)**	**15 µg (++)**	**30 µg (+++)**	**40 µg (++++)**	**50g (++++)**	**-**	**-**	**-**	**-**
8	7.5 µg (-)	15 µg (-)	30 µg (-)	-	-	-	-	-	-
9	**7.5 µg (-)**	**15 µg (+++)**	**30 µg (+++)**	**40 µg (++++)**	**50g (++++)**	**-**	**-**	**-**	**-**

Diámetro de sensidisco: 5 mm.

Diámetro de inhibición de *quorum sensing*: Negativo (-). Positivos: para halos de 5-7 mm (+), 7-9 mm (++), 9-12 mm (+++), mayores a 12 mm (++++). Para halos muy difusos con disminución de cantidad de violaceína: {+/++}*, significando el número de + lo mismo que lo anterior.

† Fracción tomada como control positivo para los ensayos con los compuestos puros. La cantidad utilizada en cada sensidisco fue de 100 µg.

Tabla 3.2 Resultados del ensayo de IQS con *Escherichia coli* pSB403, para la fracción metanólica (F.MeOH) y algunos compuestos aislados de *Cecropia pachystachya.*

Fracción y/o compuesto	**Dosis (Resultados)**		
F.MeOH	**100 µg (++)**	**200 µg (+++)**	**300 µg (++++)**
2	15 µg (-)	30 µg (-)	45 µg (-)
3	**15 µg (-)**	**30 µg (-)**	**45 µg (++)**
4	**15 µg (+)**	**30 µg (++)**	**45 µg (+++)**
5	15 µg (-)	30 µg (-)	45 µg (-)
6	**15 µg (-)**	**30 µg (-)**	**45 µg (+++)**
7	15 µg (-)	30 µg (-)	45 µg (-)
9	**15 µg (-)**	**30 µg (++)**	**45 µg (+++)**

Diámetro del pozo: 3 mm.
Diámetro de inhibición de *quorum sensing*: Negativo (-). Positivos para halos de 5-7 mm (+), 7-9 mm (++), 9-12 mm (+++), y mayores a 12 mm (++++).

Los perfiles cromatográficos obtenidos por CLAE-DAD (Figura 3.6) para cada una de las fracciones mostraron que la fracción acuosa residual es más rica en compuestos de menor tiempo de retención, más polares, que la fracción butanólica. Mientras la fracción metanólica está enriquecida en todos los componentes, incluyendo los constituyentes de menor y mayor tiempo de retención presentados en los perfiles de las fracciones antes descritas. De igual forma la fracción butanólica y la fracción metanólica fueron analizadas por CL-IES-EM. Este procedimiento permitió establecer que los constituyentes de la fracción butanólica están presentes en la fracción metanólica. Por estas razones, junto con los hechos de ser la fracción más abundante y más activa, se escogió la F.MeOH para ser separada por CLAE preparativa.

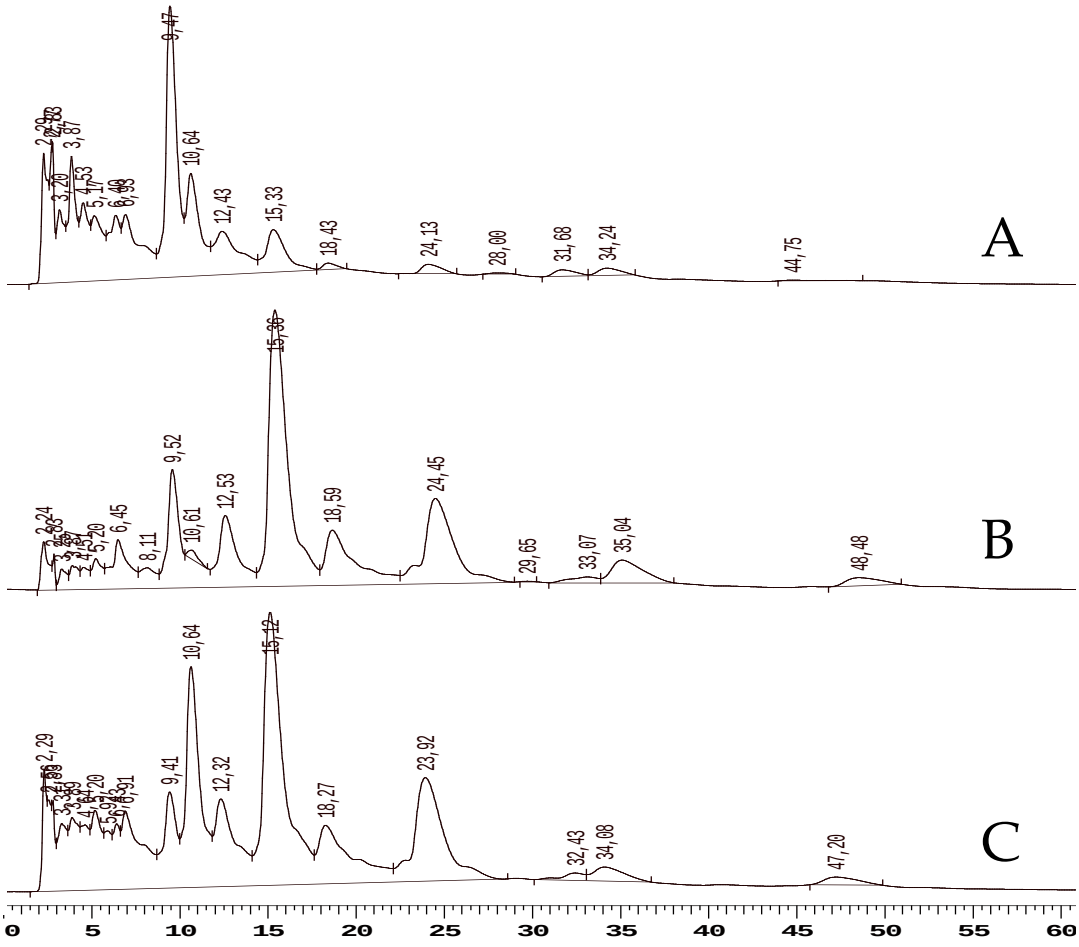


Figura 3.6 Perfiles cromatográficos obtenidos por CLAE-DAD para **(A)** Fracción acuosa residual (F.Acuo.R); **(B)** Fracción butanólica (F.BuOH) y **(C)** Fracción metanólica (F.MeOH). Registrados a 340 nm

Así, la fracción metanólica fue separada por CLAE preparativa (Figura 3.7) rindiendo 9 compuestos de naturaleza fenólica. Con el fin de saber cuáles de los compuestos constituyentes eran los responsables de la actividad inhibidora de QS observada en la fracción metanólica, cada uno de ellos fue ensayado inicialmente con *C. violaceum* y complementariamente con *E. coli.* De los compuestos ensayados; los compuestos **2, 3, 4, 6, 7** y **9** presentaron inhibición de *quorum sensing*, por lo que se procedió a su identificación. A continuación se presentará la identificación de cada uno de los compuestos activo, y al final del capítulo se discutirá su actividad biológica.

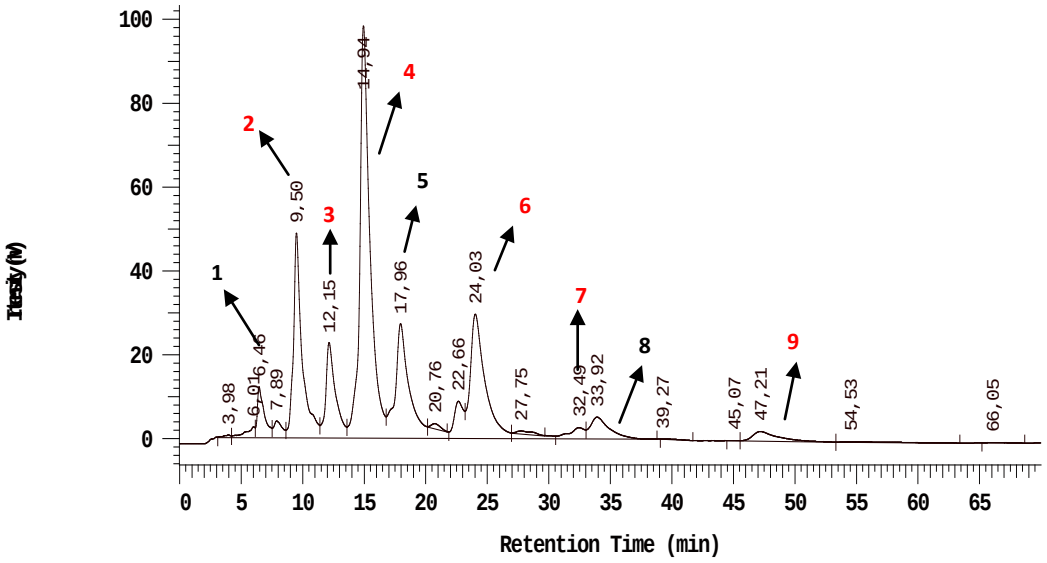


Figura 3.7 Perfil obtenido por CLAE preparativa correspondiente a la fracción metanólica (F.MeOH) de *Cecropia pachystachya* Trécul, detectado a 340 nm. Los compuestos resaltados en rojo mostraron actividad IQS. Los compuestos **2, 3, 4, 7** y **9** mostraron ser activos contra *C. violaceum* ATCC 31532. Los compuestos **3, 4, 6** y **9** mostraron actividad contra *E. coli* pSB403.

El compuesto **2** (8.9 mg) fue aislado como un sólido blanco. El espectro de masas de alta resolución en modo negativo (Figura 3.8) para este compuesto muestra un ión a *m/z* 353.0797 $[M-H]^-$, que concuerda con la formula molecular $C_{16}H_{17}O_9$; también se observa un ión a *m/z* 707.1670 que corresponde al ión $[2M-H]^-$, el cual se ha observado en los espectro de masas obtenidos por ionización suave para compuestos fenólicos (DA SILVEIRA *et al*., 2010). De otro lado en el espectro de masas de alta resolución en modo positivo (Figura 3.8) se observa el aducto $[M+Na]^+$ a *m/z* 377.0788 el cual concuerda con la formula molecular $C_{16}H_{18}O_9Na$. Este conjunto de datos permitió concluir que la formula molecular para **2** es $C_{16}H_{18}O_9$, indicando la presencia de 8 grados de instauración. El espectro de UV, registrado en metanol, muestra dos bandas de absorción en 300 y 330 nm, las cuales sugieren la presencia de un anillo aromático con grupos cromóforos (Anexo AI).

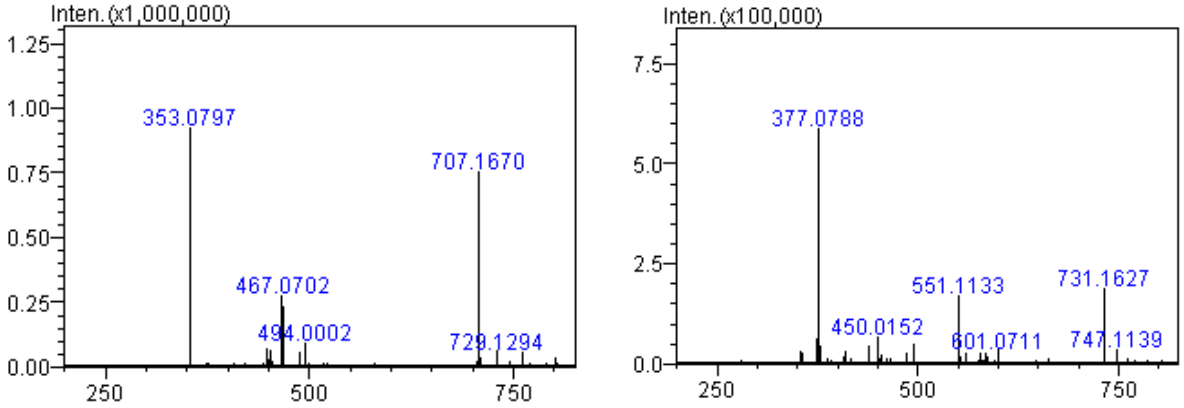


Figura 3.8 Espectros de HRESIMS para el compuesto **2**. Izquierda: modo negativo; Derecha: modo positivo.

El espectro de RMN ^{1}H (Figura 3.9) para este compuesto **2** presenta señales de protones aromáticos en δ_H 7.03 (1H, s); 6.98 (1H, d, *J*=8.0 Hz) y 6.76 (1H, d, *J*=8.0 Hz) que son características de un anillo trisustituido con grupos altamente activantes, a juzgar por sus desplazamientos químicos. Los dobletes con constantes de acoplamiento de 8.0 Hz indican una ubicación *orto* de estos protones en el anillo aromático. Adicionalmente, se observan en el espectro de RMN ^{1}H otras dos señales en δ_H 7.43 (1H, d, *J*=16 Hz) y 6.18 (1H, d, *J*=16 Hz) que corresponden a los protones olefínicos de un sistema α,β insaturado a un C=O, cuyo valor de la constante de acoplamiento indica una configuración *Z* en este doble enlace (CREWS *et al*.; 2010). Todo lo anterior es coherente con la presencia de un radical de ácido cinnámico sustituido con dos grupos hidroxilos en el anillo aromático, lo que justifica 6 de las 8 insaturaciones del compuesto **2**. De igual forma en el espectro de RMN ^{1}H se observan señales de protones de oximetinos en δ_H 5.10 (1H, m), 3.93 (1H, d) y 3.52 (1H, m); y señales de protones de metilenos en δ_H 1.97 y 1.90, que resuenan como un multiplete e integran para 4 átomos de hidrógeno; estos últimos datos son congruentes con un residuo de ácido quínico, que justifican los dos grados de insaturaciones restantes. Todos estos datos permitieron confirmar la estructura de **2** como la del ácido clorogénico, encontrándose una correcta correspondencia entre los datos de resonancia obtenidos experimentalmente y los informados en la literatura (http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB03164). Este compuestos ya había sido identificado en *C. pachystachya* (COSTA, 2009). Los datos de resonancia se muestran en la Tabla 3.3.

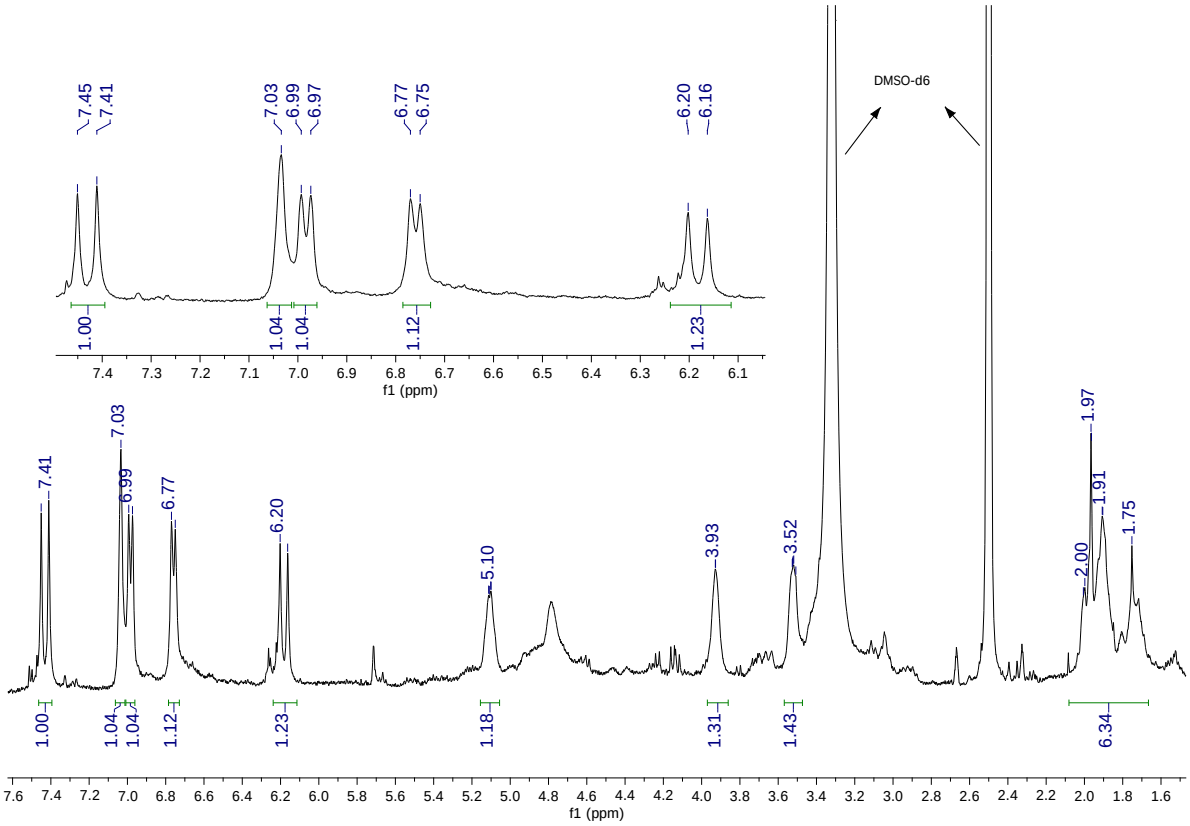


Figura 3.9 Espectro de RMN ^{1}H para el compuesto **2** registrado en DMSO-d_6.

Los compuesto **3** (7.6 mg) y **4** (16.9 mg) mostraron ser isómeros, pues a juzgar por sus espectros de masas de alta resolución, tanto en modo positivo como negativo (Figura 3.10), tienen la misma fórmula molecular $C_{21}H_{20}O_{11}$. De igual forma ambos compuestos mostraron tener espectros de ultravioleta similares, ellos muestran bandas de absorción en 260, 273 y 347 nm (Anexo AII). El valor de la longitud de onda para la última banda es característico de las flavonas (suele aparecer entre 310-350 nm), e indica la ausencia de oxigenación en C-3, flavonoles, en cuyo caso se observaría un desplazamiento batocrómico entre 330-385 nm para esta banda (ANDERSEN & MARKHAM, 2006). Esto deja claro que **3** y **4** son flavonoides con un núcleo flavona.

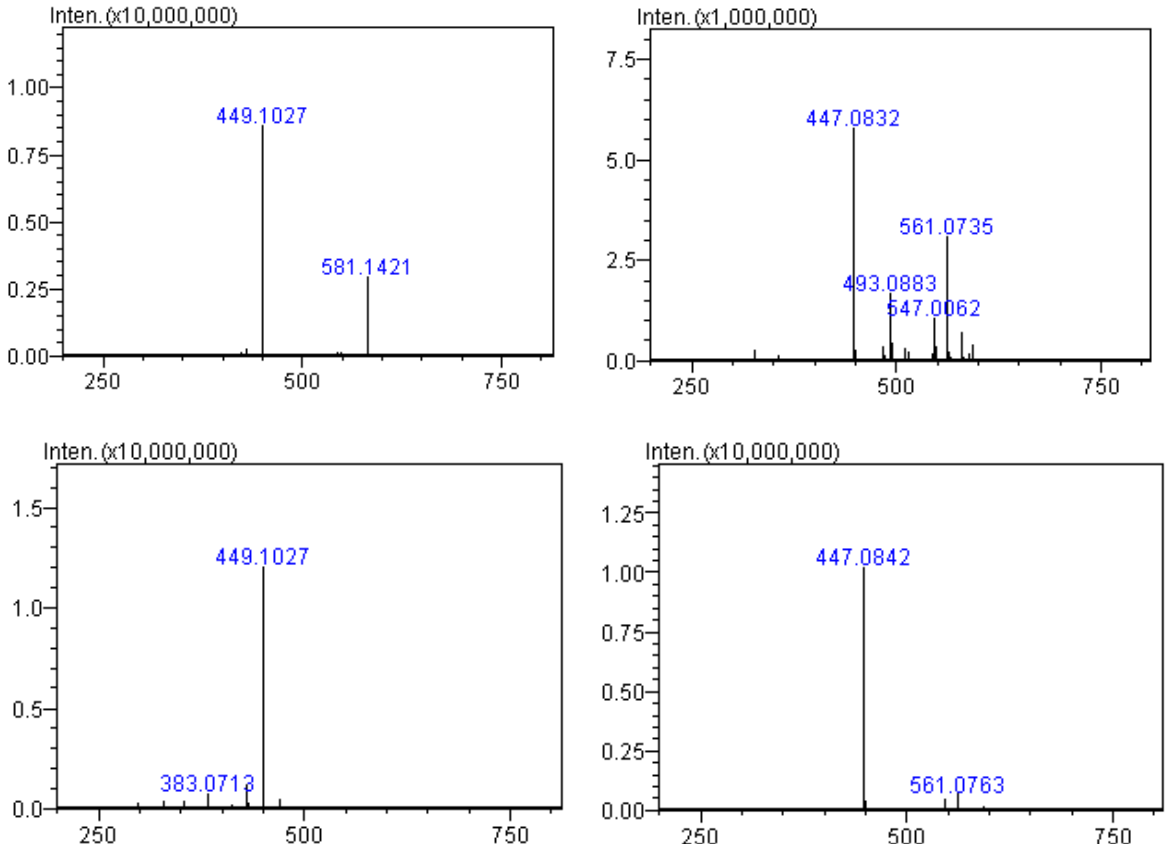


Figura 3.10 Espectros de HRESIMS para los compuestos, **3** (arriba) y **4** (abajo). Izquierda: modo positivo; Derecha: modo negativo.

El espectro de RMN ^{1}H para el compuesto **4** (Figura 3.11) presenta señales de protones en δ_H 7.43 (1H, d, *J*=8.0 Hz); 7.42 (1H, s) y 6.95 (1H, d, *J*=8.0 Hz), características de un anillo aromático trisustituido. La multiplicidad y las constantes de acoplamiento indican una ubicación *orto*- entre dos protones (el primero y el tercero mencionados), y la presencia de un protón aislado (segundo en mención). Este sistema es el que se observa típicamente para el anillo B de los flavonoides con núcleo luteolina. También se observa un singlete en δ_H 6.64 (1H, s) correspondiente al protón α de un sistema α,β insaturado a un carbonilo, y una señal en δ_H 6.55 (1H, s) atribuida a un protón aromático aislado en el anillo A que se encuentra entre dos grupos altamente activantes. Todas estas señales son características para los flavonoides con núcleo luteolina. El espectro también muestra señales para un residuo de azúcar, en δ_H 4.87 (1H, d, *J*= 9.6 Hz), 4.16 (1H, t, *J*=9.6 Hz), 3.87 (1H, d, *J*=11.5 Hz), 3.71 (1H, dd, *J*=11.5 y 4.8 y Hz), y 3,44 (3H, m) correspondientes a protones oximetinos. El desplazamiento de la primera señal es característico para el

protón anomérico[1], y el valor de la constante de acoplamiento (9.6 Hz) sugiere una ubicación *trans* diaxial entre este protón y el de H-2'', lo que indica que se trata del anómero α-glicosidado. El desplazamiento químico de las señales de los protones del azúcar, junto con las constantes de acoplamiento, sugieren la presencia de una α-glucosa, lo que se vio confirmado mediante el análisis de las señales del espectro de RMN ^{13}C (Figura 3.12), el cual presenta señales características para carbonos aromáticos, y carbonos alifáticos oxigenados.

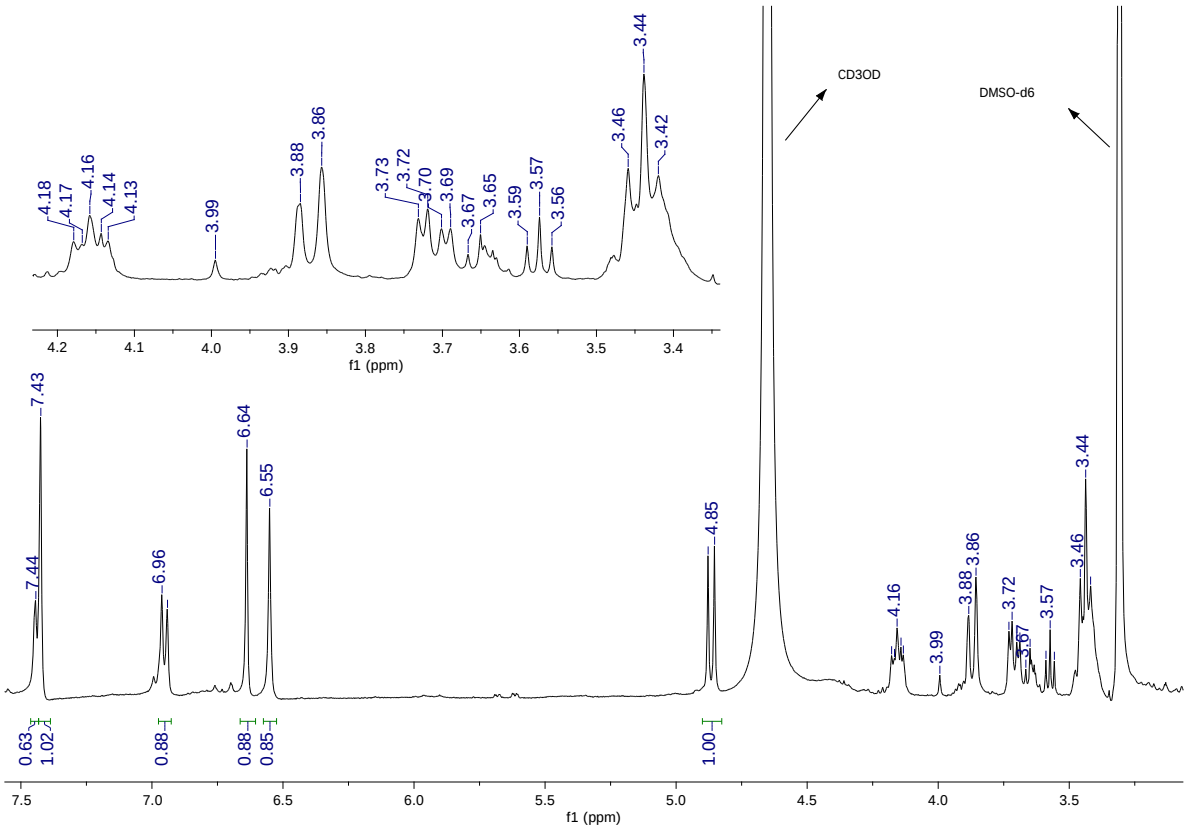


Figura 3.11 Espectro de RMN ^{1}H para el compuesto **4** registrado en CD_3OD:DMSO-d_6.

En el espectro de RMN ^{13}C para **4**, se observa una señal característica de un carbono carbonílico en δ_C 182.5, que por su desplazamiento hacia campo bajo, debe corresponder al carbonilo de un sistema α,β-insaturado, y es característico del C-4 en el anillo C de las flavonas. En este espectro también son evidentes las señales de los carbonos olefínicos del mismo sistema, en δ_C 102.9 y 164.6, correspondientes al C-3 y C-2, respectivamente. Estos desplazamientos confirman lo sugerido por UV, en cuanto a la no oxigenación del C-3, y permiten confirmar la identificación del núcleo

[1] El protón anomérico hace referencia al protón del carbono hemiacetalico en *O*-glicósidos; sin embargo, en *C*-glicósidos no existe tal hidrogeno, pues no se trata de un hemiacetal, no obstante se mantiene el nombre por analogía.

de **4** como flavona. Las señales de carbonos aromáticos en δ_C 163.4 (C-7), 160.7 (C-9), 157.2 (C-5), 149.7 (C-4′), 145.8 (C-3′), 122.2 (C-1′), 119.1 (C-6′), 115.7 (C-2′), 113.1 (C-5′), 108.2 (C-8), 103.9 (C-10) y 93.9 (C-6) pertenecen a los carbonos de los anillo A y B, entre ellos los primeros cinco nombrados son carbonos oxigenados. También se observan 6 señales entre 81.4 y 61.6 ppm, que corresponden a un residuo de azúcar. Cabe destacar entre ellas la señal en δ_C 73.9, correspondiente al carbono C-1′′, cuyo desplazamiento indica la presencia de un flavonoide *C*-glicosidado y no *O*-glicosidado, pues si este fuera el caso se esperaría un desplazamiento en torno de 100 ppm (AGRAWAL, 1989).

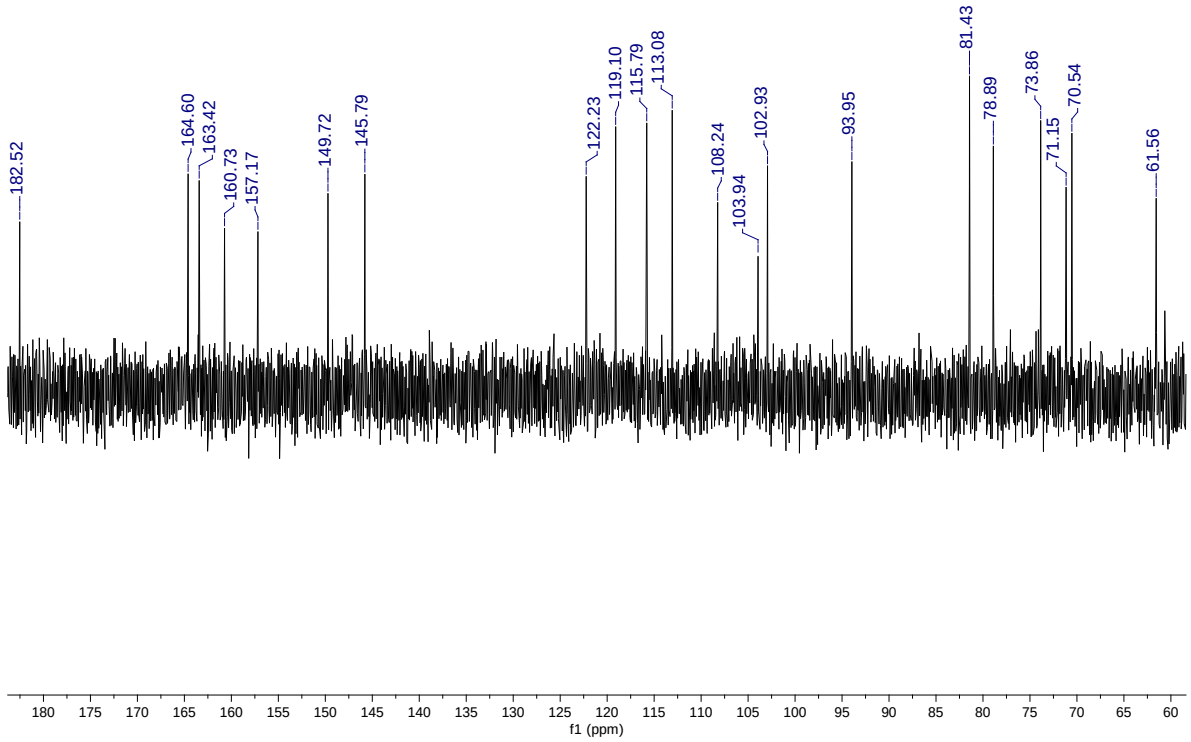


Figura 3.12 Espectro de RMN ^{13}C para el compuesto **4** en CD_3OD:DMSO-d_6.

Con el fin de determinar el sitio de unión del azúcar a la flavona se llevaron a cabo experimentos HMBC. El *crosspeak* entre el protón anomérico en δ_H 4.87 (1H, d, *J*= 9.6 Hz, H″-1) y los carbonos en δ_C 160.7 (C-9), 163.4 (C-7) y 108.2 (C-8) permitió determinar que el azúcar se une a la aglicona por el carbono C-8 (Figura 3.13). Otras correlaciones importantes en HMBC se presentan en la Figura 3.14.

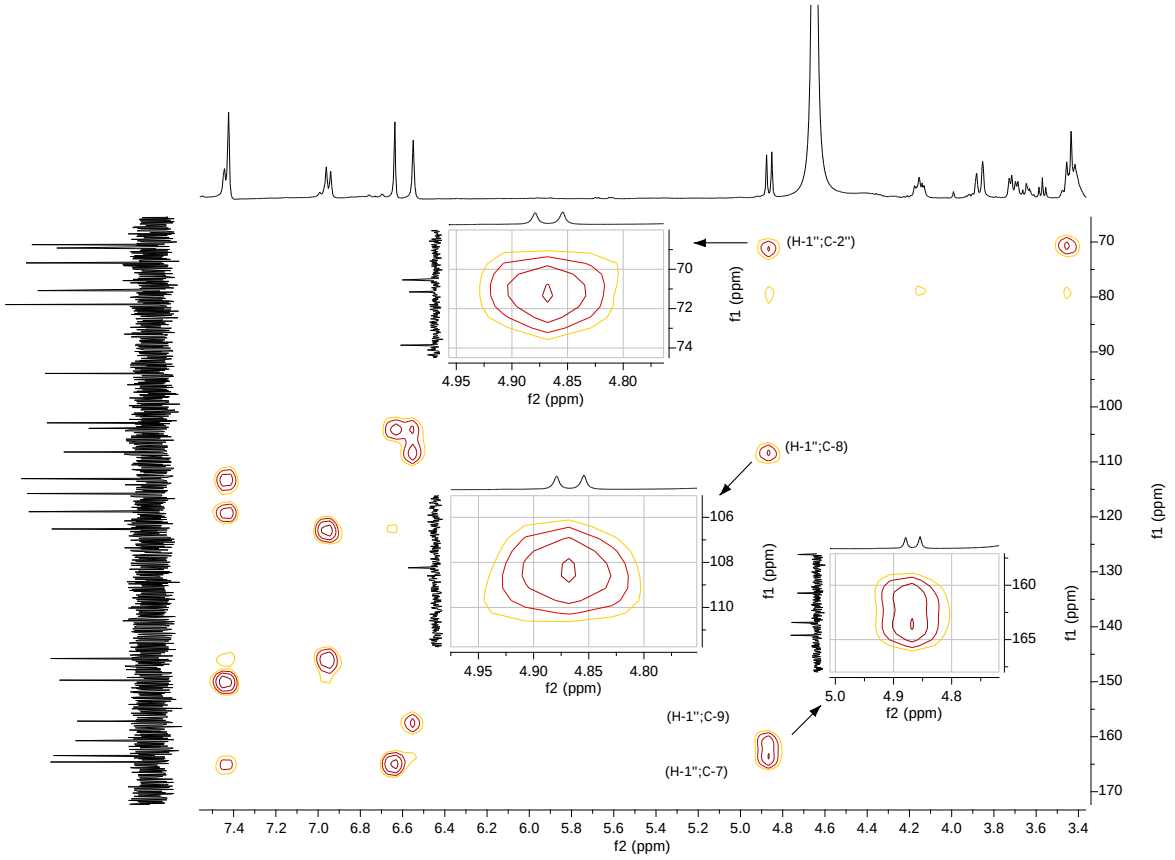


Figura 3.13 Correlaciones HMBC para el compuesto **4**.

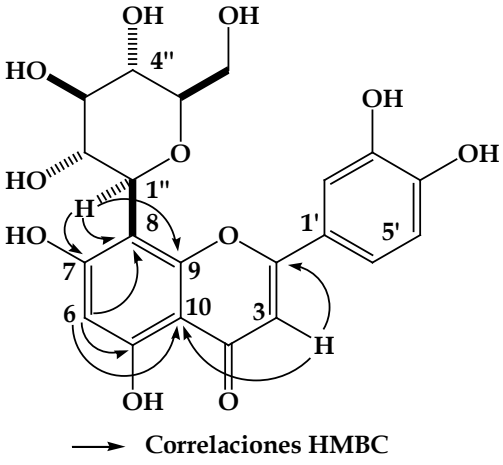


Figura 3.14 Algunas de las correlaciones observadas en el espectro HMBC para el compuesto **4**.

Todo el análisis anterior permitió identificar al compuesto **4** como orientina. Los datos de RMN ^{1}H y ^{13}C para este compuesto se resumen en la Tabla 3.3. Todos los datos anteriores son congruentes con los datos de la literatura.

El compuesto **3** no pudo ser identificado por RMN dada a su baja solubilidad en los disolventes ensayados (DMSO-*d6* y CD_3OD); sin embargo, el espectro de masas, el orden de elusión y el espectro de ultravioleta sugieren que **3** es la isoorientina, un isómero estructural de la orientina (compuesto **4**) (ZHANG *et al*., 2005; ANDERSEN &; MARKHAM, 2006; ZUCOLOTTO *et al*., 2011). La diferenciación entre estos dos isómeros recientemente se está realizando por EM/EM. En este orden de ideas, los experimentos de EM/EM en modo positivo sobre el fragmento en *m/z* 329, generado en ambos compuestos a partir de la primera fragmentación, proporcionan fragmentos característicos y únicos que dependen de la ubicación de la hexosa (ya sea en C-6 o C-8). En la Figura 3.15, se muestran las fragmentaciones características que presentan ambos compuestos según la literatura (WARIDEL *et al*., 2001; ANDERSEN & MARKHAM, 2006). En el espectro experimental de EM/EM de **3** para el fragmento *m/z* 329 se encontraron los fragmentos típicos para una C-6 hexosa: *m/z* 177 y 149, lo que permitió confirmar la identidad de **3** como isoorientina.

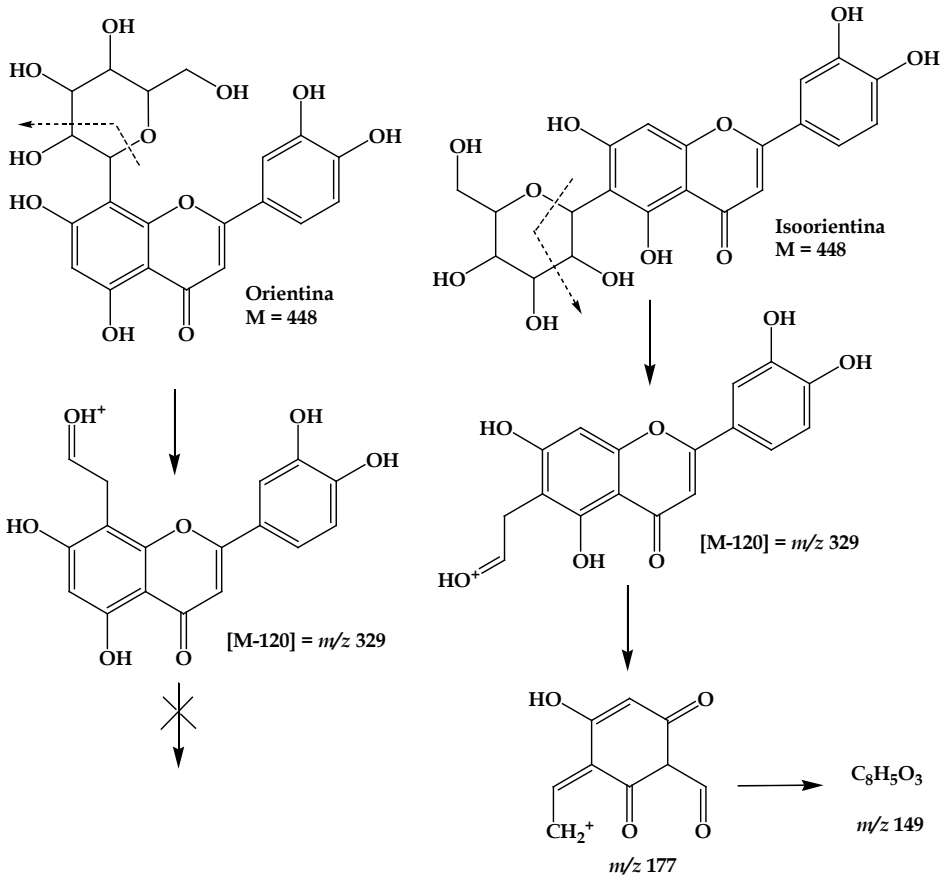


Figura 3.15 Masas tándem sobre el fragmento a *m/z* 329 para la orientina e isoorientina. En la isoorientina se observan los fragmentos a *m/z* 177 y 149, ambos con abundancia relativa alta; en la orientina por el contrario no se observan estos iones.

De manera similar a la anterior se procedió para los compuestos **6** (10 mg) y **7** (4 mg), que mostraron ser isómeros a juzgar por sus espectros de masa de alta resolución (Anexo AIII), de los que se deduce una fórmula molecular de $C_{21}H_{20}O_{10}$ consistente con un IDH de 12. Los espectros de ultravioleta (Anexo AIV) muestran dos bandas de absorción en 270 y 347 nm con la forma típica de flavonoides con núcleo apigenina (ZHANG *et al*., 2005; ANDERSEN &; MARKHAM, 2006). El espectro de RMN ^{1}H para el compuesto **6** (Anexo AV), muestra señales de protones aromáticos en δ_H 7.93 y 6.92, ambas señales resuenan como un doblete (J=8.6 Hz) e integran para dos protones, lo que indica una disposición *orto*- entre los protones que dan origen a estas señales. Estos desplazamientos y esta multiplicidad son característicos de los protones del anillo B en los flavonoides con núcleo apigenina. De igual manera, se observan señales de protones en δ_H 6.79 (1H, s) y 6.50 (1H, s), que corresponden al protón en C-3 de un sistema carbonílico α,β-insaturado y al único protón del anillo A, respectivamente. Adicionalmente, en el espectro de RMN ^{1}H del compuesto **6** se observan señales de protones oximetinos entre δ_H 4.80 y 3.16 ppm característicos del residuo de azúcar. Entre ellas que se destaca la señal en δ_H 4.64 (1H, d, J=8.0 Hz) que corresponde al protón anomérico, indicando que el compuesto **6** es un α-*C*-glicósido a juzgar por el valor de la constante de acoplamiento. Desafortunadamente las otras señales del azúcar se ven oscurecidas por la señal del agua del disolvente. Los datos de resonancia para el compuesto **6** se muestran en la Tabla 3.3. Estos datos son iguales a los reportados para la isovitexina en la bibliografía (PENG *et al*., 2005). Para confirmar lo anterior, se realizaron coinyecciones del compuesto **6** con un patrón de isovitexina; en el Anexo AVI se pueden observar los diferentes cromatogramas obtenidos para el compuesto **6** puro, el patrón de isovitexina y la mezcla de los dos anteriores, con lo que se pudo establecer que se tratan del mismo compuesto, dada la coelusión observada. Con todo el análisis anterior, se concluye que el compuesto **6** es la isovitexina.

Tabla 3.3 Datos de RMN para los compuestos **2** (DMSO-d_6), **4** (CD_3OD:DMSO-d_6) y compuesto **6** (DMSO-d_6).

Posición	Compuesto 2	Compuesto 4		Compuesto 6
	δ_H	δ_H	δ_C	δ_H
2	1.97 y 1.90 (2H, m)	-	164.6	-
3	5.10 (1H, m)	6.64 (1H, s)	102.9	6.79 (1H, s)
4	3.52 (1H, m)	-	182.5	-
5	3.93 (1H, d)	-	157.2	-
6	1.97 y 1.90 (2H, m)	6.55 (1H, s)	93.9	-
7	-	-	163.4	-
8	-	-	108.2	6.50 (1H, s)
9	-	-	160.7	-
10	-	-	103.9	-
1′	-	-	122.2	-
2′	7.03 (1H, bs)	7.42 (1H, s)	115.7	6.92 (2H, d, *J*=8.6 Hz)
3′	-	-	145.8	7.93 (2H, d, *J*=8.6 Hz)
4′	-	-	149.7	-
5′	6.76 (1H, d, *J*=8.0 Hz)	6.95 (1H, d, *J*=8.0 Hz)	113.1	7.93 (2H, d, *J*=8.6 Hz)
6′	6.98 (1H, d, *J*=8.0 Hz)	7.43 (1H, d, *J*=8.0 Hz)	119.1	6.92 (2H, d, *J*=8.6 Hz)
7′	7.43 (1H, d, *J*=16 Hz)	-	-	-
8′	6.18 (1H, d, *J*=16 Hz)	-	-	-
1″	-	4.87 (1H, d, *J*= 9,6 Hz)	73.9	4.64 (1H, d, *J*=8.0 Hz)
2″	-	4.16 (1H, t, *J*=9,6 Hz)	71.2	-
3″	-	3.44 (1H, m)	78.8	-
4″	-	3.44 (1H, m)	70.5	-
5″	-	3.44 (1H, m)	81.4	-
6″	-	a: 3.87 (1H, d, *J*=11.5 Hz) b: 3.71 (1H, dd, *J*=4.8, 11.5 Hz)	61.6	-

Debido a la poca solubilidad del compuesto **7,** éste no pudo ser identificado por RMN; sin embargo, tanto el orden de elusión, como los espectros de masas y el espectro de ultravioleta sugieren que se trata de la vitexina, un isómero estructural de la isovitexina (compuesto **6**) (MÜLLER *et al*., 2005; ANDERSEN &; MARKHAM, 2006; ZUCOLOTTO *et al*., 2011). La diferenciación de estos dos isómeros ha sido realizada mediante experimentos de EM/EM. Puesto que al obtener la fragmentación del ión a *m/z* 313, se obtienen los fragmentos a *m/z* 177 y 147 para los *C*-glicosidados en C-6, en este caso la isovitexina, mientras estos fragmentos no son observados en aquellos glicosidados en C-8, para este caso vitexina (WARIDEL *et al*., 2001; ANDERSEN & MARKHAM, 2006). En el espectro experimental de EM/EM de **7** para el fragmento *m/z* 313 no se encontraron los iones *m/z* 177 y 147, que indican la presencia de una *C*-glicosidación en C-6, lo que es congruente con la vitexina. La coinyeccion del compuesto **7** con un patrón puro de vitexina, llevado a cabo en CLAE-DAD, permitió observar su coelusión (Anexo AVIII). Todos los datos anteriores permitieron identificar al compuesto **7** como la vitexina.

Los espectros de masas de alta resolución para el compuesto **9** sugieren una formula molecular de $C_{27}H_{30}O_{16}$, a juzgar por el ión molecular en *m/z* 609.13430 correspondiente a $[M-H]^-$ y el ión *m/z* 611.1537 correspondiente a $[M+H]^+$ (Figura 3.16). Esta fórmula es consistente con una unidad de hexosa adicional con respecto a los compuestos **5** y **6**, y con un IDH de 13, lo que es congruente con la unidad de azúcar adicional propuesta. De otro lado el espectro UV (Anexo AIX) muestra señales de absorbancia en 257 y 356 nm, que son características de flavonoides tipo flavonol, es decir de un flavonoide oxigenado en C-3[2]. Adicionalmente, en el espectro de masas en modo negativo se observa un segundo ión en *m/z* 463.0823 ($C_{21}H_{19}O_{12}$), correspondiente a $[M-146]^-$, que es congruente con la pérdida de una deoxihexosa (por ejemplo ramnosa o fucosa). Esta deoxihexosa debe estar unida a través de un oxígeno al resto de la molécula, a juzgar por la fórmula del ión $[M-146]^-$. Estas mismas conclusiones se obtienen al analizar el espectro IES en modo positivo por la presencia del ión en *m/z* 465.0995 ($C_{21}H_{21}O_{12}$). El espectro en modo positivo también muestra un ión abundante en *m/z* 303.0442 ($C_{15}H_{11}O_7$) correspondiente a la pérdida de las dos unidades de azúcar (una unidad de hexosa y una unidad de deoxihexosa), que deben estar enlazadas a través de un oxígeno al núcleo del flavonoide, que debe corresponder a la quercetina a juzgar por ión en 303.0441 ($C_{15}H_{11}O_7$) y el espectro UV. De esta manera se concluye que el compuesto **9** corresponde a un flavonoide tipo quercetina diglicosidado, y a diferencia de los compuestos anteriores, los azucares están unidos a través de oxígenos. La información anterior se resume en la Figura 3.17. Todas estas características son propias de la rutina. Para comprobar lo anterior, se procedió a realizar una coinyección entre un patrón de rutina y el compuesto **9** (Anexo AX), encontrando que coeluyen y confirmando que se trata del mismo compuesto.

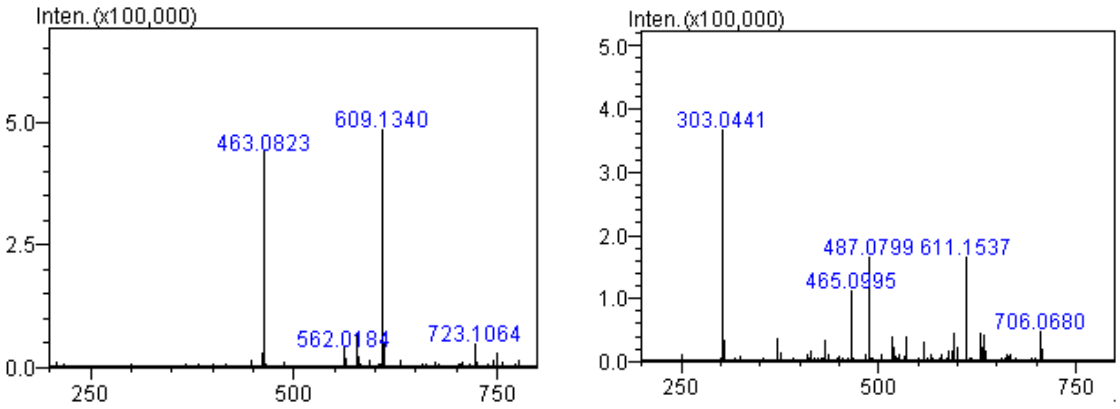


Figura 3.16 Espectros de HRESIMS para el compuesto **9**. Izquierda: modo negativo; Derecha: modo positivo.

[2] La λ para las flavonas está entre 310-350 nm, mientras para flavonoles entre 330-385 nm (DUCREY *et al.*, 1995; ANDERSEN & MARKHAM, 2006).

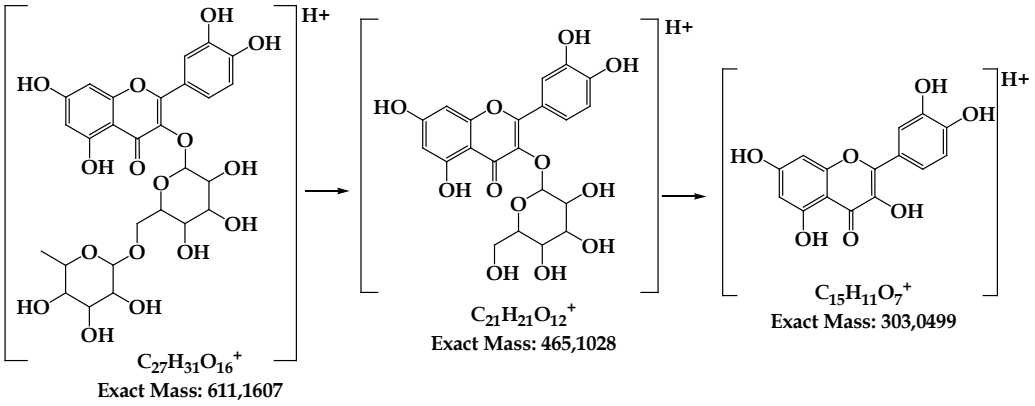


Figura 3.17 Esquema de fragmentación propuesto para el compuesto **9** en modo IES en modo positivo.

A continuación se observa la Figura 3.18, la cual muestra los compuestos activos e identificados en la fracción metanólica de *C. pachystachya*. Los compuestos **1**, **5** y **8** por el contrario no fueron activos, y son minoritarios por tanto no fueron identificados.

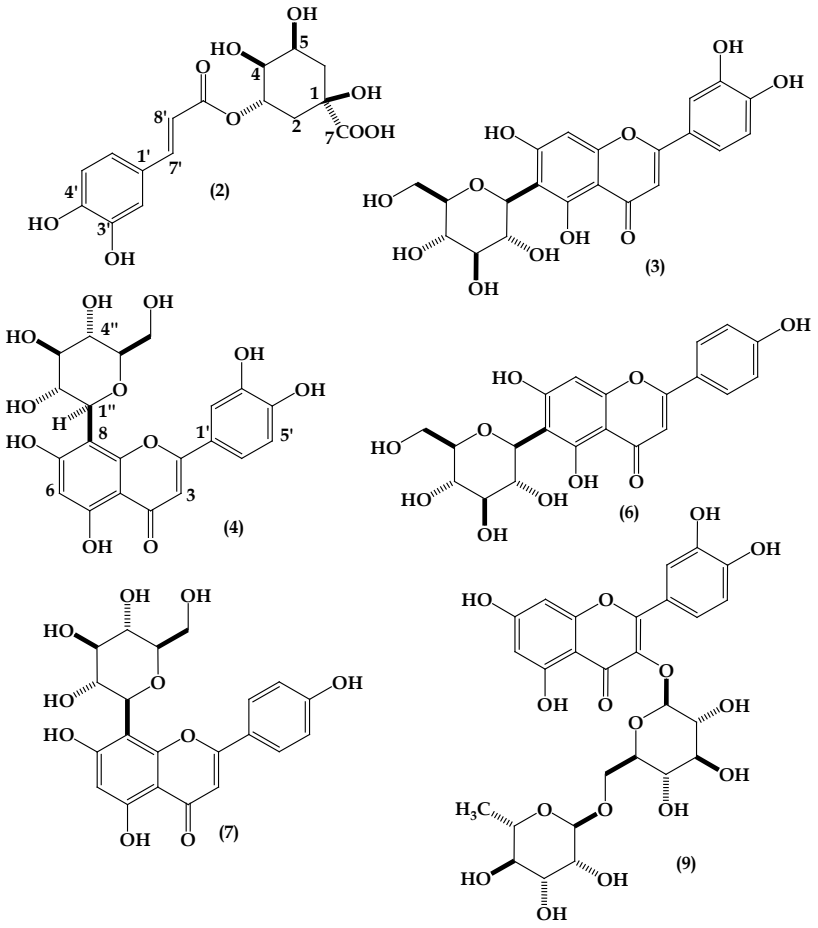


Figura 3.18 Estructura de los compuestos activos de la fracción metanólica de *Cecropia pachystachya*.

En la Tabla 3.1 se resumen los resultados del ensayo de inhibición de QS con *C. violaceum* para los compuestos aislados. Los compuestos **7** y **9** son los que mostraron las más alta actividad, puesto que fueron los que inhibieron la expresión de la violaceína a la menor cantidad ensayada (7.5 µg/disco). Mientras los compuestos **3** y **4** mostraron una actividad moderada, ya que tan sólo se observó inhibición de QS a dosis de 40 y 50 µg/disco, respectivamente. El compuesto menos activo fue el **2,** que presentó únicamente actividad al ser ensayado por encima de 80 µg/disco. Cabe decir que la actividad de inhibición de *quorum sensing* es dependiente de la concentración, tanto para los compuestos puros como para las fracciones ensayadas al realizar los experimentos con *C. violaceum*. Ninguno de los compuestos mostró un efecto bactericida, lo que indica que la concentración mínima inhibitoria de crecimiento (MIC) contra *C. violaceum* ATCC 31532 está por encima de las cantidades ensayadas en los experimentos de inhibición de QS. De otro lado, no es evidente la relación entra la estructura y la actividad de los flavonoides, sin embargo el menos activo (ácido cloroégnico) no mantiene el mismo núcleo de los demás compuestos (flavonoides). Era de esperarse que el compuesto **2** presentara una buena actividad IQS ya que es un derivado del ácido cinámico, compuestos reconocidos por su actividad IQS, que es atribuida al sistema α,β-insaturado que puede reaccionar como un aceptor de Michael, tal y como se ha propuesto para muchos inhibidores de sistemas de *Vibrio* spp (BRACKMAN *et al*., 2011).

Cuando los compuestos activos con *C. violaceum* fueron evaluados con *E. coli* pSB403 se observó que **4** y **9** son los más activos, mientras que **3** y **6** mostraron actividad moderada (Tabla 3.2). Estos resultados concuerdan parcialmente con los obtenidos en el ensayo con *C. violaceum,* puesto que en ambos casos el compuesto **9** es el más activo, siendo el único compuesto diglicosidado de todos. De otro lado, el compuesto **4** que presentó actividad moderada con *C. violaceum,* mostró con *E. coli* una actividad mayor. Caso contrario se presentó para **3**, el cual mostró una mayor actividad con *C. violaceum.* Por otra parte, los compuestos **2, 5** y **7** no mostraron actividad cuando se empleó como biosensor *E. coli*. Es de resaltar el caso del compuesto **7**, que mostró una alta actividad con *C. violaceum* y no mostró ninguna actividad con el segundo biosensor. En este caso tampoco es evidente la relación estructura actividad entre los flavonoides.

Con el fin de observar si existe sinergismo entre los compuestos activos, éstos fueron evaluados en mezclas contra *C. violaceum*. Los tratamientos empleados y los resultados se muestran en la Figura 3.19 y la Tabla 3.4 y. Los mejores tratamientos fueron aquellos en los cuales el compuesto **9** está presente, que es el compuesto más activo de todos. No obstante, no se observó ningún aumento significativo en la actividad de los tratamientos, por lo que no se puede afirmar claramente que exista un efecto sinérgico, ya que el aumento de la actividad IQS es proporcional a las cantidades de los compuestos de más alta actividad en los tratamientos. En el único

caso en el que parece haber algo de sinergismo es en las mezclas conformadas por **2**, **3** y **4,** que resultaron fuertemente activas a pesar de que en ningún caso se superaron los 30 µg por compuesto, sabiendo que a esta cantidad ninguno de ellos es activo individualmente. De otro lado, resultan llamativos los resultados obtenidos en la mezcla de los compuestos **3**, **4** y **7,** que son menos activas de lo esperado. A pesar de la presencia del compuesto activo **7,** en cantidades de 15 y 30 µg, no se observa inhibición de QS. Lo mismo se observa para las mezclas de **2, 4** y **7**.

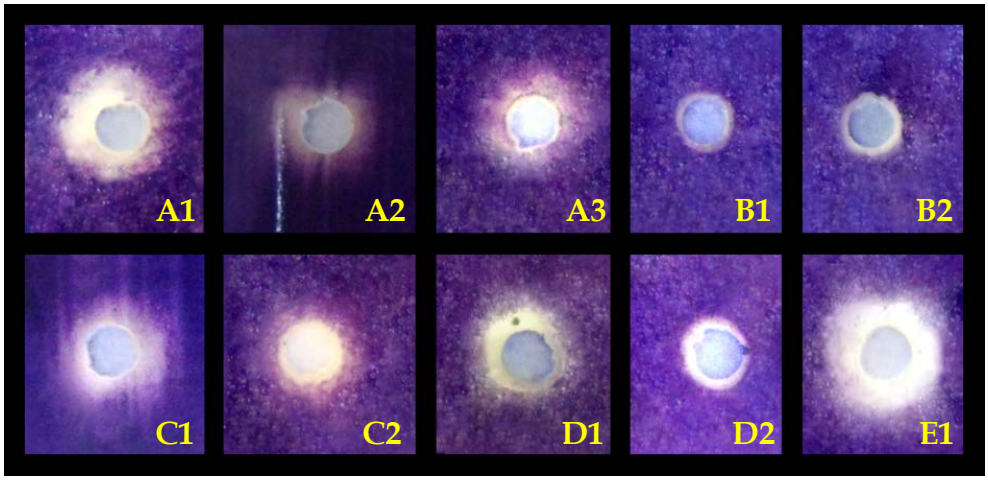


Figura 3.19 Fotografías de los resultados del ensayo de inhibición de *quorum sensing* con *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 para los diferentes tratamientos de compuestos activos. Los códigos **A1-A3** corresponde a mezclas de los compuestos **3**, **4** y **9**; los **B1** y **B2** son mezclas de los compuestos **2**, **4** y **7**; los **C1** y **C2** son mezclas de los compuestos **4**, 7 y **9;** los **D1** y **D2** son mezclas de los compuestos **2**, **3**, y **4;** finalmente, **E1** corresponde a mezcla de los compuestos **2** y **9.** Las cantidades empleadas en cada tratamiento se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4 Resultados del ensayo de IQS con *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532, para diferentes mezclas de compuestos activos de *Cecropia pachystachay*.

Compuestos en mezcla	**Relación de mezcla en μg (Resultado)**			
2	15 y 30 (-)			
3	15 y 30 (-)			
4	15 y 30 (-)			
5	15 (-)			
6	16 (-)			
7	**15 (++)**	**30 (+++)**		
9	**7.5 (-)**	**15 (+++)**	**30 (+++)**	
3:4:7			15:30:15 (-)	15:15:15 (-)
3:4:9	**30:15:15 (+++): (A1)**	**15:15:30 (++): (A2)**	**15:30:15 (+++): (A3)**	
2:4:7	**30:15:15 (+): (B1)**		**15:30:15 (+): (B2)**	
4:7:9		**15:15:30 (+++): (C1)**	**15:30:15 (+++): (C2)**	
2:3				15:15 (-)
2:4				15:15 (-)
2:3:4	**30:15:15 (++): (D2)**	15:15:30 (-)	**15:30:15 (+++): (D1)**	15:15:15 (-)
2:9	30:7.5 (-)		**15:30 (++++): (E1)**	
3:4	30:15 (-)		15:30 (-)	

Diámetro de sensidisco: 5 mm. Diámetro de inhibición de *quorum sensing*: Negativo (-). Positivos: para halos de 5-7 mm (+), 7-9 mm (++), 9-12 mm (+++), mayores a 12 mm (++++).

Con todo lo anterior quedó establecido que los compuestos **2**, **3**, **4**, **6**, **7**, y **9** exhiben inhibición de QS en *C. violaceum* ó *E. coli,* al igual que la fracción metanólica de *C. pachystachya.* Sin embargo, un inhibidor de QS con potencial uso industrial o biomédico no debe ser letal para la gran mayoría de microorganismos. Para esto se planteó evaluar la actividad antimicrobiana de la fracción metanólica de *C. pachystachya,* y de los compuestos en dos bioensayos distintos, uno empleando una metodología cualitativa y otra cuantitativa.

En la metodología cualitativa se empleó una bacteria gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 33591), una gram negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922), y una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Las cepas bacterias seleccionadas son sensibles y no tienen mecanismos de resistencia conocidos, por lo que son útiles para detectar sustancias antibacterianas aún en bajas concentraciones, como es el caso de los extractos y fracciones. La fracción metanólica, (F.MeOH), fue evaluada a las mismas cantidades en las que se observó actividad inhibidora de QS contra los dos biosensores; encontrando que no presentó actividad antimicrobiana a estas cantidades contra ninguna de las tres cepas evaluadas (Figura 3.20). Por lo que se pudo establecer que esta fracción tiene gran potencial como fuente de compuestos IQS, dada su alta actividad IQS y su muy baja toxicidad frente los microorganismos.

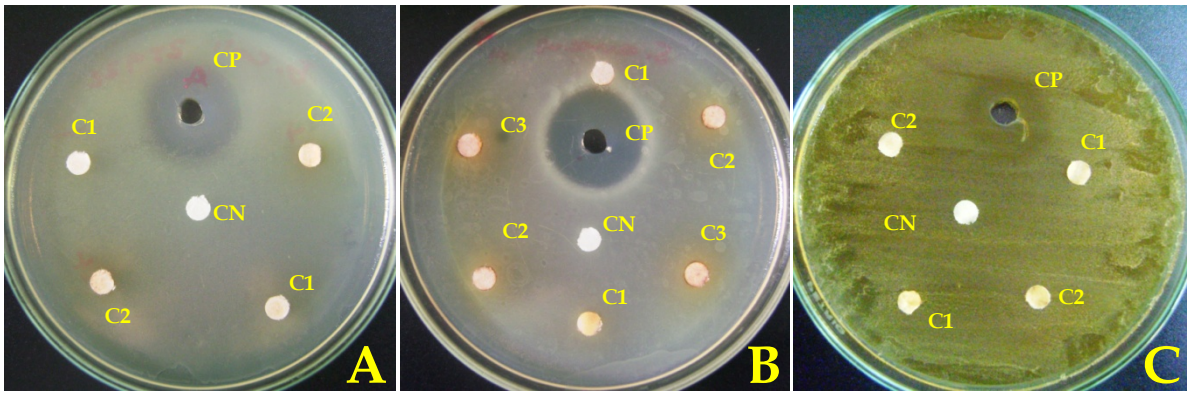


Figura 3.20 Fotografías de los resultados del ensayo de inhibición de crecimiento de la fracción metanólica (F.MeOH) de *C. pachystachya* contra: **(A)** *Escherichia coli* ATCC 25922, **(B)** *Staphylococcus aureus* ATCC 23591, y **(C)** *Saccharomyces cerevisiae*. C1=100 µg/disco, C2=200 µg/disco, C3=300 µg/disco; CP= control positivo (tetraciclina a 1.5 µg/pozo, en los ensayos con las bacterias; y cicloheximida a 2.1 µg/pozo para la levadura); CN= control negativo (10 µL/disco de metanol, con previa evaporación antes de colocarlo)

En la metodología cuantitativa de inhibición de crecimiento se evaluaron los compuestos activos como IQS a tres diferentes concentraciones (2.5, 12.5 y 100 ppm), empleando dos cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Todos los compuestos mostraron porcentajes de inhibición dependientes de la concentración, no obstante ningún compuesto presentó un efecto fuerte sobre el crecimiento bacteriano. El porcentaje de inhibición de crecimiento fue inferior al 32% de la población para todos los casos, lo anterior juzgando a la máxima concentración ensayada (100 ppm) (Figura 3.21 y 3.22). Esta información sugiere que los valores de IC_{50} de inhibición de crecimiento para los todos los compuestos están muy por encima de 100 ppm. Los compuestos con un mayor efecto sobre el crecimiento en ambas bacterias fueron **2**, **9** y **7**. Todo lo anterior permitió establecer que tanto la fracción metanólica como los compuestos activos en el ensayo de inhibición de QS son promisorios y pueden ser utilizados como anti*fouling* y antipatogénicos puesto que no tienen efecto bactericida, y por lo tanto se esperaría que no generen resistencia en las bacterias promotoras de *fouling* y en aquellas patógenas que sean sometidas a tratamientos con estos compuestos. Cuando se evaluó el crecimiento bacteriano contra *P. aeruginosa*, se observó, para todos los compuestos a 100 ppm una disminución de la piocianina (pigmento de color verde y factor de virulencia de esta bacteria), lo que podría sugerir un mecanismos de inhibición del pigmento por parte de estos compuestos.

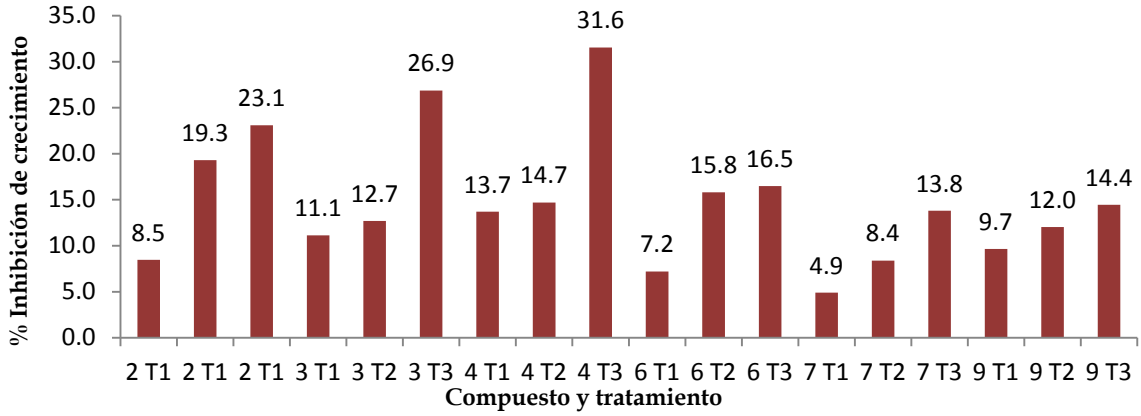


Figura 3.21 Porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano vs concentración de los compuestos **2**, **3**, **4**, **6**, **7** y **9** a diferentes concentraciones T1=2.5, T2=12.5 y T3= 100 ppm contra *Staphylococcus aureus*

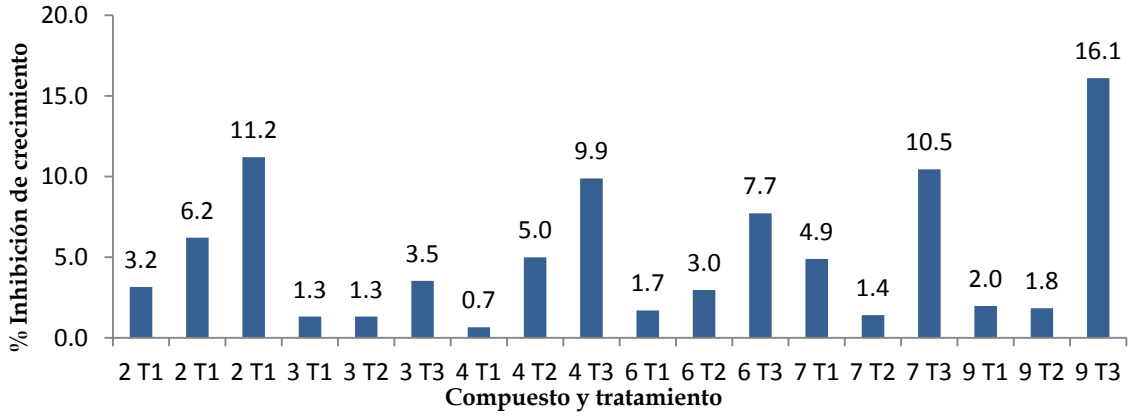


Figura 3.22 Porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano vs concentración de los compuestos **2**, **3**, **4**, **6**, **7** y **9** a diferentes concentraciones T1=2.5, T2=12.5 y T3= 100 ppm contra *Pseudomonas aeruginosa*

4.4 CONCLUSIONES

La fracción metanólica de *Cecropia pachystachya* Trécul, que mostró excelente actividad en la inhibición de *quorum sensing* contra *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 y *Escherichia coli* pSB403, mostró estar constituida por compuestos fenólicos. El fraccionamiento por CLAE de esta fracción permitió el aislamiento de 9 compuestos, de los cuales 6 fueron activos y corresponden a: el ácido clorogenico (**2**), la isoorientina (**3**), la orientina (**4**), la isovitexina (**6**), la vitexina (**7**) y la rutina (**9**).

Los compuestos activos mostraron ser capaces de inhibir los sistemas de QS de los dos biosensores empleados (*C. violaceum* y *E. coli* pSB403), sin afectar el crecimiento

algunas bacterias (gram negativas y gram positivas). Este hecho hace que los compuestos de *C. pachystachya,* y sus fracciones, puedan ser considerados como excelentes candidatos para la realización de estudios tecnológicos que permitan su aplicación como inhibidores de QS, por ejemplo en el campo de pinturas anti*fouling* y dentrificos.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

AGRAWAL, P. K. Studies in Organic Chemistry 39. Carbon-13 NMR of Flavonoids. Elsevier Science Publishers B. V. New York. 1989.

ANDERSEN, Ø. M.; MARKHAM, K. M. Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications. Taylor & Francis Group. New York. 2006.

ANDRADE-CETTO, A.; WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2001, 78(2-3):145–149.

ANTA, C.; GONZÁLES, N.; SANTAFÉ, G.; RODRÍGUEZ, J.; JIMÉNEZ, C. New Xenia diterpenoids from the Indonesian soft coral *Xenia* sp. *J Nat Prod*. 2002, 65(5):766-768.

ARAGÃO, D. M. O.; GUARIZE, L.; LANINI, L., DA COSTA, J. C.; GARCIA, R. M. G.; SCIO, E. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2010, 128(3):629–633.

BERG, C. C.; FRANCO-ROSELLO, P. Cecropia. Flora Neotropica. Monograph No. 94. The New York Botanical Garden. New York. 2005.

BRACKMAN, G.; COS, P.; MAES, L.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011. 55(6):2655-2661.

COOPER, J. E. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol*. 2007, 103(5):1355–1365.

COSTA, G. M. Estudo fitoquímico comparativo entre *Cecropia glaziovii* Sneth. e *Cecropia pachystachya* Trécul. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – Brasil. 2009.

COSTA, G. M., SCHENKEL, E. P., REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia. Nat Prod Commun*. 2011, 6(6):913-920.

CREWS, P.; RODRÍGUEZ, J.; JASPARS, M. Organic Structure Analysis. Second Edition. Oxford University Press. New York. 2010.

DA GRAÇA ROCHA, G.; SIMÕES, M.; ARAUJO LÚCIO, K.; RODRIGUES OLIVEIRA, R.; COELHO KAPLAN M. A.; ROCHA GATTASS, C. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba* are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. *Bioorg Med Chem*. 2007, 15(23):7355–7360.

DA SILVEIRA, C. V.; TREVISAN, M. T. S.; RIOS, J. B.; ERBEN, G.; HAUBNER, R.; PFUNDSTEIN, B.; OWEN. R. W. Secondary plant substances in various extracts of the leaves, fruits, stem and bark of *Caraipa densifolia* Mart. *Food Chem Toxicol.* 2010. 48(6):1597–1606.

Disponible en http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB03164. Consultado en Noviembre, 5 del 2011.

DUCREY, B.; WOLFENDER, J. L.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Analysis of flavonol glycosides of thirteen *Epilobium* species (onagraceae) by LC-UV and thermospray LC-MS. *Phytochemistry* 1995, 38(1):129-137.

FERRARO, M. J.; WIKLER, M. A.; CRAIG, W. A.; DUDLEY, M. N.; ELIOPOULOS, G. M.; HECHT, D. W.; HINDLER, J.; RELLER, L. B.; SHELDON, A. T. JR.; SWENSON, J. M.; TENOVER, F. C.; TESTA, R. T.; WEINSTEIN, M. P. Methods for dilution antimicrobial susceptibily tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – Sixth edition. NCCLS document M7-A6. Pennsylvania – USA. 2003.

GUERRERO, E. I.; MORÁN-PINZÓN, J. A.; ORTÍZ, L. G.; OLMEDO, D.; DEL OLMO, E.; LÓPEZ-PÉREZ, J. L.; SAN FELICIANO, A.; GUPTA, M. P. Vasoactive effects of different fractions from two Panamanians plants used in Amerindian traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2010, 131(2):497-501.

HIKAWCZUK, V. J.; SAAD, J. R.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A. O.; GIORDANO, O. S. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya. An Asociac Química Argentina*. 1998, 86(3-6):167-170.

KUPCHAN, S. M.; BRITTON, R. W.; ZIEGLER, M. F.; SIGEL, C.W. Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolide from *Brucea antidysenterical*. *J Org Chem*. 1973, 38(1):178-179.

LACAILLE-DUBOIS, M. A.; FRANCK. U.; WAGNER, H. Search for potential Angiotensin Converting Enzyme (ACE)-inhibitors from plants. *Phytomedicine*. 2001, 8(1):47–52.

LIMA-LANDMAN, M. T. R.; BORGES, A. C. R.; CYSNEIROS, R. M.; DE LIMA; T. C. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Antihypertensive effect of a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth in rats: An in vivo approach to the hypotensive mechanism. *Phytomedicine.* 2007, 14(5):314–320.

MACHADO, E. C.; YUNES, R. A.; MALHEIROS, A.; GOMEZ, E. C.; DELLE MONACHE, F. Two new 11α,12α-epoxy-ursan-28,13β-olides and other triterpenes from *Cecropia catharinensis*. *Nat Prod Research*. 2008, 22(15):1310-1316.

MARTÍNEZ, Y. R. Evaluación de un bioensayo para medir la inhibición de biopelículas bacterianas como indicativo de la actividad anti*fouling* de compuestos de origen natural. Tesis de Maestría en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia. 2010.

McCLEAN, K. H.; WINSON, M. K.; FISH, L.; TAYLOR, A.; CHHABRA, S. R.; CAMARA, M.; DAYKIN, M.; LAMB, J. H.; SWIFT, S.; BYCROFT, B. W.; STEWART, G. S.; WILLIAMS, P. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. *Microbiology*. 1997, 143(12):3703-3711.

MÜLLER, S. D.; VASCONCELOS, S. B.; COELHO, M.; BIAVATTI, M. W. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. *J Pharm Biomed Anal.* 2005, 37(2):399-403.

OLIVEIRA, R. R.; MORAES, M. C. C.; CASTILHO, R. O.; VALENTE, A. P.; CARAUTA, J. P. P.; LOPES, D.; KAPLAN, M. A. C. High-speed countercurrent chromatography as a valuable tool to isolate *C*-glycosylflavones from *Cecropia lyratiloba* Miquel. *Phytochem Anal*. 2003, 14(2):96-99.

PENG, J.; FAN, G.; HONG, Z.; CHAI, Y.; WU, Y. Preparative separation of isovitexin and isoorientin from *Patrinia villosa* Juss by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr* A. 2005, 1074(1-2):111–115.

QUINTANA, J.; CASTELLANOS, L.; ARÉVALO, C. Adaptación de una técnica para la evaluación de la actividad inhibitoria de *quorum sensing* de extractos de organismos marinos. Trabajo de grado en Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia. 2008.

RAMOS ALMEIDA, R.; MONTANI RAIMUNDO, J.; RODRIGUES OLIVEIRA, R.; COELHO KAPLAN, M. A.; ROCAH GATTASS, C.; TAKASHI SUDO, R.; ZAPATA-SUDO. G. Activity of *Cecropia lyratiloba* extract on contractility of cardiac and smooth muscles in wistar rats. *Clin Experiment Pharm Physiol.* 2006, 33(1-2):109–113.

RAVN, L.; CHRISTENSEN, A, B.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.;GRAM, L. Methods for detecting acylated homoserine lactones produced by gram-negative bacteria and their application in studies of AHL-production kinetics. *J Microbiol Meth*. 2001, 44(3):239–251.

ROCHA, F. F.; LAPA, A. J.; DE LIMA, T. C. M. Evaluation of the anxiolytic-like effects of *Cecropia glaziovii* Sneth in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2002, 71(1-2):183–190.

ROCHA, F. F.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; SOUCCAR, C.; TANAE, M. M.; DE LIMA, T. C. M.; LAPA, A. J. Antidepressant-like effect of *Cecropia glaziovii* Sneth and its constituents – In vivo and in vitro characterization of the underlying mechanism. *Phytomedicine*. 2007, 14(6):396–402.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chem*. 2007, 101(3):1012–1018.

SILVA, I. T.; COSTA, G. M.; STOCO, P. H.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H.; SIMÕES, C. M. O. In vitro antiherpes effects of a *C*-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. *Lett Appl Microbiol*. 2010, 51(2):143–148.

SOUCCAR, C.; CYSNEIROS, R. M.; TANAE, M. M.; TORRES, L. M. B.; LIMA-LANDMAN, M. T. R; LAPA, A. J. Inhibition of gastric acid secretion by a standardized aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth and underlying mechanism. *Phytomedicine*. 2008, 15(6-7):462–469.

TANAE, M. M.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; DE LIMA, T. C. M.; SOUCCAR, C.; LAPA, A. J. Chemical standardization of the aqueous extract of *Cecropia glaziovii* Sneth endowed with antihypertensive, bronchodilator, antiacid secretion and antidepressant-like activities. *Phytomedicine*. 2007, 14(5):309–313.

TEIXEIRA UCHÔA, V.; DE PAULA, R. C.; KRETTLI, L. G.; GOULART SANTANA, A. E.; KRETTLI, A. U. Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya. Drug Dev Res.* 2010, 71(1):82–91.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant Drug Analysis: a thin layer chromatography atlas. Second Edition. Springer. Berlin. 1996.

WARIDEL, P; WOLFENDER, J-L.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry and ión-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of *C*-glycosidic flavonoid isomers. *J Chromatogr A*. 2001, 926(1):29–41.

ZHANG, Y.; BAO, B.; LU, B.; REN, Y.; TIE, T.; ZHANG, Y. Determination of flavone *C*-glucosides in antioxidant of bamboo leaves (AOB) fortified foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet diode array detection. *J Chromatogr A*. 2005, 1065(2):177–185.

ZUCOLOTTO, S, M.; FAGUNDES, C.; REGINATTO, F. H.; RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L.; DUQUE, C.; SCHENKEL, E. P. Analysis of C-glycosyl flavonoids from South American *Passiflora* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Phytochem Anal*. 2011, 1-8.

4 Estudio Químico de las Esponjas *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix* como Fuentes de Compuestos Inhibidores de *Quorum Sensing*

CONTENIDO

	Pág.
4.1 Introducción	**108**
4.2 Parte Experimental	**110**
4.2.1 Generalidades	**110**
4.2.2 Material Animal	**112**
4.2.3 Extracción y Fraccionamiento	**112**
4.2.4 Obtención de Esteres Metílicos	**116**
4.2.5 Obtención de los Derivados Acetilados de los Furanosesterterpenos	**116**
4.2.6 Bioensayo de Actividad de Inhibición de *Quorum Sensing*	**116**
4.2.7 Identificación de los Compuestos Activos	**117**
4.3 Resultados y Discusión	**118**
4.4 Conclusiones	**134**
4.5 Bibliografía	**135**

4.1 INTRODUCCIÓN

La química de los productos naturales marinos ha crecido extraordinariamente en los últimos 40 años. Esto resulta lógico si consideramos que la extensión del mar abarca el 70 % del globo, y éste es el mayor centro de biodiversidad conocido. Adicionalmente, muchos de los organismos que habitan en el mar son sésiles y deben usar compuestos químicos para comunicarse, y competir por el espacio y los recursos de sistema, por lo anterior no es sorprendente que los organismos marinos produzcan una enorme gama de sustancias con actividad biológica potencialmente aprovechable por el hombre. Todo esto ha hecho que se considere al océano como una fuente excepcional de moléculas con diferentes aplicaciones biomédicas (HAY, 2009; BLUNT *et al*., 2011).

En los ambientes marinos la producción de compuestos con propiedades antimicrobianas y anti*fouling* es de vital importancia para muchos organismos sésiles, los cuales así se aseguran de no permitir la formación de biopelículas peligrosas sobre su superficie. Entre estos organismos se destacan, por la enorme capacidad de biosintetizar metabolitos bioactivos, las esponjas, las cuales han sido objeto de múltiples estudios químicos. Esta capacidad ha sido interpretada por diferentes investigadores como una estrategia de supervivencia que han desarrollado estos animales, no solo para protegerse contra depredadores sino que también para hacer más fácil su alimentación (STOWE *et al*., 2011). Así, las esponjas han sido fuente de una gran cantidad de sustancias nuevas con características estructurales únicas sin contraparte en el medio terrestre. Muchas de estas sustancias han demostrado una amplia gama de actividades biológicas de uso terapéutico para diferentes enfermedades (BLUNT *et al*., 2011). En este marco, vale la pena destacar que ellas han sido la fuente de tres (Ara-A, Ara-C y el mesilato de erubilina) de los seis medicamentos en el mercado de origen en PNM. Adicionalmente, se ha observado el desarrollo de una gran cantidad de compuestos, obtenidos a partir de esponjas, como agentes anti*fouling* (FUSETANI, 2011; MAYER, 2011).

Las esponjas del género *Ircinia* son una fuente valiosa de sustancias naturales bioactivas con estructuras sesterterpénicas que contienen una cadena poliprenílica y por lo menos un anillo furano al extremo de dicha cadena (GONZÁLEZ *et al*., 1983; BARROW *et al*., 1988;). A estos furanosesterterpenos se les ha comprobado actividad antimicrobiana, citotóxica y antiinflamatoria. En la Figura 4.1 se pueden observar algunos de los furanosesterterpenos aislados de diferentes especies de *Ircinia*, los cuales comparten las características estructurales anteriormente mencionadas (CIMINO *et al.*, 1972; GONZÁLEZ *et al*., 1983; MANES & CREWS, 1986; KATO *et al.*, 1986; BARROW *et al*., 1988; FAULKNER, 1988; ORTIZ & RODRIGUEZ, 1990; MURRAY *et al*., 1993).

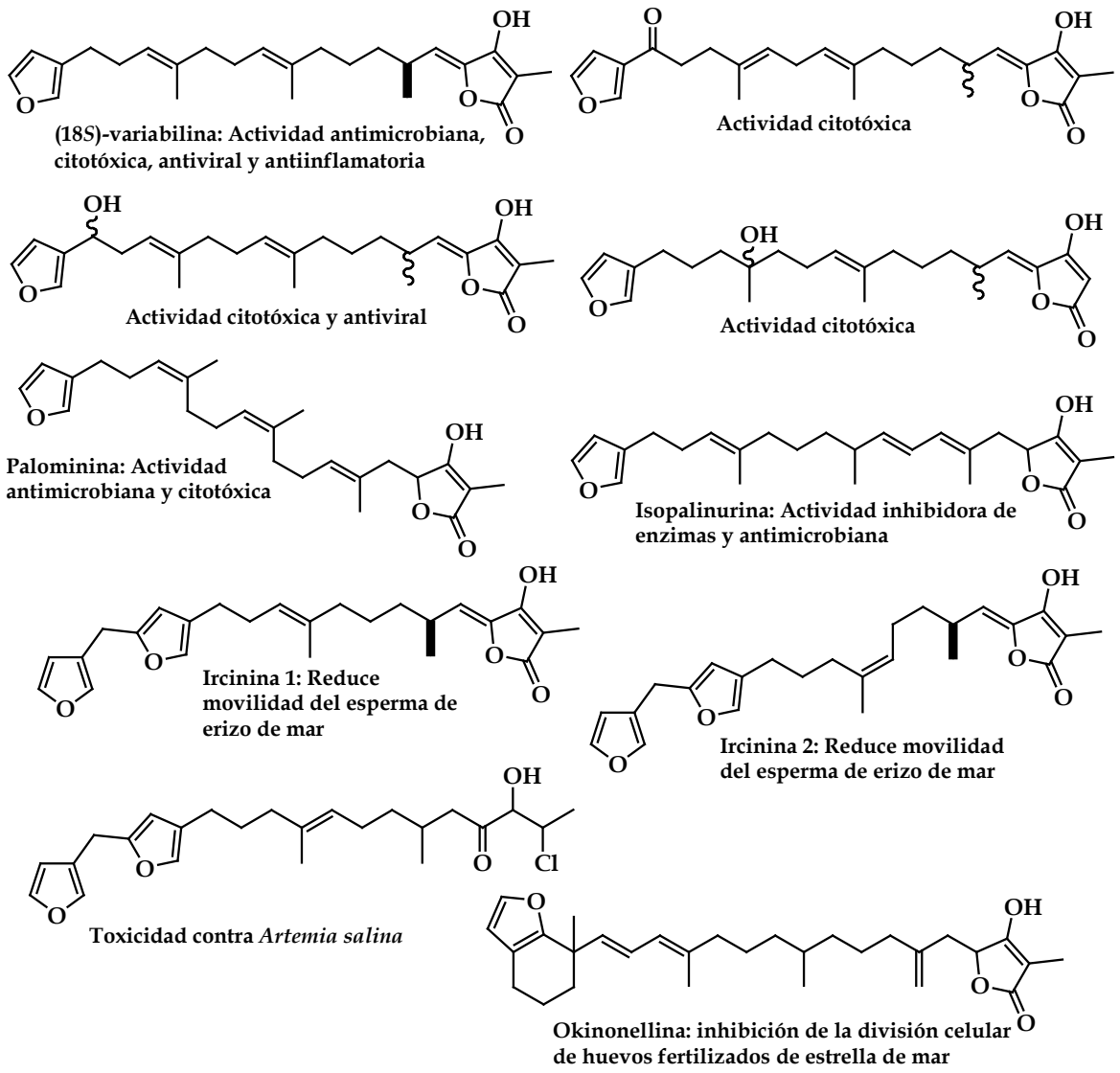


Figura 4.1 Furanosesterterpenos biológicamente activos aislados de especies de *Ircinia*. La okinonellina fue aislada de *Spongionella* sp. (orden Dytioceratida)

De un espécimen de *Ircinia felix,* recolectado en el Caribe Colombiano (Santa Marta), se identificaron el acetato de (8*Z*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-strobilinina; acetato de (7*Z*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-felixinina; acetato de (8*E*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-strobilinina; acetato de (7*E*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-felixinina; y el acetato de (7*E*,12*Z*,18*R*,20*Z*)-variabilina los cuales presentaron propiedades antimicrobianas. Adicionalmente, también se identificó un éster metílico de ácido graso, el 11-metiloctadecanoato de variabilina, cuya estructura resultó novedosa para la química de productos naturales (MARTINEZ *et al*., 1995; MARTINEZ, *et al*., 1997). El estudio de los volátiles de esta especie permitió identificar compuestos azufrados, compuestos nitrogenados y halogenados, a los cuales se les atribuye la actividad antimicrobiana detectada en el extracto de

volátiles. Se cree que estos compuestos pueden estar involucrados en control de *fouling* y defensa contra microorganismos (DUQUE *et al*. 2001). En cuanto a la composición de ácidos grasos se han identificado algunos como el ácido 23-metil-5,9-tetracosadienoico, el ácido 5,9-tetracosadienoico, el ácido 23-metil-5,9-tetracosadienoico y el ácido 5,9-pentacosadienoico, que también han sido encontrados en otras especies de *Ircinia* (CARBALLEIRA *et al*., 1991).

En cuanto a la esponja *Svenzea tubulosa* no se encuentran referencias que den cuenta de su composición química. Esta esponja estuvo clasificada dentro del género *Pseudoaxinella,* y durante un tiempo fue conocida como *Pseudoaxinella tubulosa* (sinonimia). Las esponjas de este antiguo género son reconocidas por ser fuente de ácidos grasos de cadena larga, compuestos esteroidales, y compuestos peptídicos, algunos de ellos con actividad antibacteriana (SJÖSTRAND *et al.,* 1981; KONG *et al.,* 1992; CASTELLANOS *et al*., 2003). Recientemente de *Pseudoaxinella flava* se aislaron los diterpenos con función isonitrilo con propiedades anticancerigenas contra células resistentes (LAMORAL-THEYS *et al.,* 2011).

Los extractos orgánicos de las esponjas *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix* resultaron fuertemente activos en los ensayos de inhibición del *quorum sensing* (capitulo 2), usando los biosensores *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532; y *Escherichia coli* pSB401 (QUINTANA, 2008). En este capítulo se describe el proceso de asilamiento bioguiado e identificación de algunos de los compuestos responsables de la actividad inhibitoria de QS de ambos extractos.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1 GENERALIDADES

Los solventes utilizados para la obtención de los extractos y los fraccionamientos de las esponjas fueron metanol, diclorometano, benceno, hexano y acetato de etilo; todos de grado analítico. También se usó metanol grado cromatográfico para los experimentos de CLAE.

Los experimentos de resonancia magnética nuclear fueron obtenidos en un equipo Bruker AVANCE 400, a 400 MHz para ^{1}H y 100 MHz para ^{13}C. Los datos de rotación específica fueron obtenidos en un polarímetro ADP440+; las lecturas fueron realizadas utilizando metanol grado HPLC – Honeywell.

Para la cromatografía en cada delgada (CCD) se utilizaron cromatofolios de sílica gel 60 F_{254} de Merck ®. Después de la elución, fueron observadas en luz ultravioleta a 254 y 366 nm. Como reveladores se utilizaron sulfato cérico amónico al 1% en ácido

sulfúrico y metanol; y ácido fosfomolíbdico en isopropanol al 0.5%. Después de asperjado el revelador se calentó a 100 °C para ambos reveladores.

Para la cromatografía en columna, tanto flash (CC Flash) como al vacío, se utilizó sílica gel 60 (0.040-0.063 nm) Merck®.

Los análisis por la técnica combinada de cromatografía de gases–espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron en un equipo GCMS-QP2010 Shimadzu. Para los análisis de la mezcla de furanosesterterpenos de la esponja *Ircinia felix* se utilizó una columna capilar de silica fundida SHRXi-5ms Shimadzu de 30 m x 0.25 mm d.i. (espesor de película: 0.25 μm). Las temperaturas de la columna, el inyector, y la fuente de ionización se menatuvieron constantes en 240 °C, 250 °C, y 305 °C. Como gas de arrastre se uso helio. Se usó un voltaje de ionización de 70 eV.

Para las condiciones de análisis de ácidos grasos, se utilizó el mismo equipo y la misma columna. El programa de temperatura utilizado para el análisis de esteres metílicos fue desde 130° C, por 4 min, hasta 305° C, por 35 min, a una velocidad de 4° C/min. Las temperturas del detector e inyección se mantuvieron a 300° C.

Los experimentos de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) en modo analítico fueron realizados en un equipo Merck-Hitachi 6000 equipado con una bomba terciaria L-6200A y un detector de DAD L-4500. La CLAE preparativa se llevó a cabo en un equipo Merck-Hitachi 6000 equipado con una bomba L-6000A y un detector UV-VIS de onda fija L-4250.

Para la CLAE-DAD analítica de las muestras de *Svenzea tubulosa*, se utilizó un sistema en gradiente iniciando desde MeOH:H_2O (1:1) hasta metanol 100% por 20 min, seguido de una elusión isocrática con metanol hasta los 40 min. El flujo utilizado fue de 1 mL/min y la columna fue una Luna® C18 (250x4.6 mm; d.i. 5 μm) Phenomenex.

Para los análisis de CLAE de las muestras de *Ircinia felix* en modo analítico se utilizó un sistema isocrático de MeOH:H_2O (80:20) detectando a 310 nm. El flujo utilizado fue de 1.0 mL/min. Como fase estacionaria se empleó una columna Hypersll ODS (100x4.6 mm; d.i. 5 μm) Hewlett Packard.

Para la CLAE preparativa de ambas muestras se utilizó una columna Nucleosil 120 C18 (300x8 mm; d.i. 10 μm) Scharlau Science. La fase móvil empleada fue MeOH:H_2O (95:5) a un flujo de 2 mL/min, y se detectaron los picos a 310 nm para *Ircinia felix* y 210 nm para *Svenzea tubulosa.*

4.2.2. MATERIAL ANIMAL

Varios individuos de *Svenzea tubulosa* fueron recolectados en aguas marítimas de Isla Arena, Bolívar – Colombia, en Abril de 2008, a una profundidad de 6 metros. Un espécimen de la esponja se encuentra depositado bajo el código ICN-MHN-PO 0249 en el Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá.

Ircinia felix fue recolectada en aguas de Punta Betin, Santa Marta – Colombia, en Noviembre de 2009, a 19 metros de profundidad. Un espécimen testigo (voucher) se encuentra depositada en INVEMAR bajo el código INV-POR-014.

Ambos especímenes fueron colectados e identificados por el Dr. Sven Zea del Instituto CECIMAR – Universidad Nacional de Colombia.

4.2.3 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO

La esponja *Svenzea tubulosa* (173.3 g, peso húmedo) fue cortada en trozos pequeños y sometida a extracción con DCM:MeOH (1:1) por maceración durante 1 hora, después el extracto fue filtrado y concentrado a presión reducida. Este procedimiento fue realizado por triplicado. El extracto crudo obtenido (6.1 g) fue fraccionado mediante mezcla de DCM:H_2O (1:1), obteniendo una fracción de diclorometano (2.4 g) y otra fracción acuosa. La fracción acuosa fue extraída con un volumen igual de butanol, generándose en el proceso la fracción acuosa residual y la fracción butanólica, las cuales fueron concentradas hasta sequedad.

La esponja *Ircinia felix* fue tratada de forma similar a la anterior, empleando 562.2 g de esponja húmeda y obteniendo 35.3 g de extracto crudo. De este se obtuvieron 4.5 g de extracto de diclorometano.

A los extractos de DCM de ambas esponjas se les realizó un fraccionamiento grueso sobre sílica gel, utilizando un gradiente discontinuo de solventes en orden creciente de polaridad (desde benceno 100% hasta AcOEt:MeOH (1:1)). Estas fracciones fueron monitoreadas por CCD y concentradas a presión reducida, para después ser evaluadas en el ensayo de inhibición de *quorum sensing* con *C. violaceum* ATCC 31532. Luegos, las fracciones activas fueron separadas por CC Flash. Las Figura 4.2 y 4.3 muestran los esquemas de fraccionamiento para los extractos orgánicos de ambas esponjas. En los esquemas también se observan las fracciones activas en el ensayo bioguiado de inhibición de QS contra *C. violaceum*. A continuación se detalla el procedimiento para cada una.

El extracto de diclorometano de *Svensea tubulosa* fue fraccionado por cromatografía al vacío con gradiente de solvente discontinuo obteniendo seis fracciones (STF1-STF6). El ensayo de actividad IQS permitió identificar a STF2 y STF4 como activas. La fracción STF2 fue sometida a esterificación tal y como se explica más adelante. Estos derivados se analizaron mediante CG-EM. De otro lado, la fracción STF4 fue fraccionada por CC Flash obteniendo 9 fracciones (STF4-1 a STF4-9). La única fracción activa de esta columna fue STF4-6, que fue posteriormente separada por CLAE preparativa en las condiciones antes descritas.

La cromatografía al vacío del extracto orgánico de *I. felix* proporcionó siete fracciones (IFF1-IFF7). Las fracciones IFF1 y IFF3, eluidas con benceno:AcOEt 95:5 y benceno:AcOEt 7:3, respectivamente; resultaron activas en el ensayo de IQS con *C. violaceum*. Las primera fracción, IFF1, fue sometida a reacciones de derivatización para la obtención de esteres metílicos, el procedimiento se detalla más adelante. De otro lado, la fracción IFF3 fue separada por CC Flash dos veces hasta obtener una fracción de compuestos tipo sesterterpenos (IFF3-2-3), la cual resultó activa en el ensayo de IQS. Una parte de esta última fracción fue separada por CCD preparativa y sometida a ensayo de IQS. La otra parte fue acetilada (el procedimiento se describe más adelante), y posteriormente separada por CLAE preparativa y análisis por CG-EM.

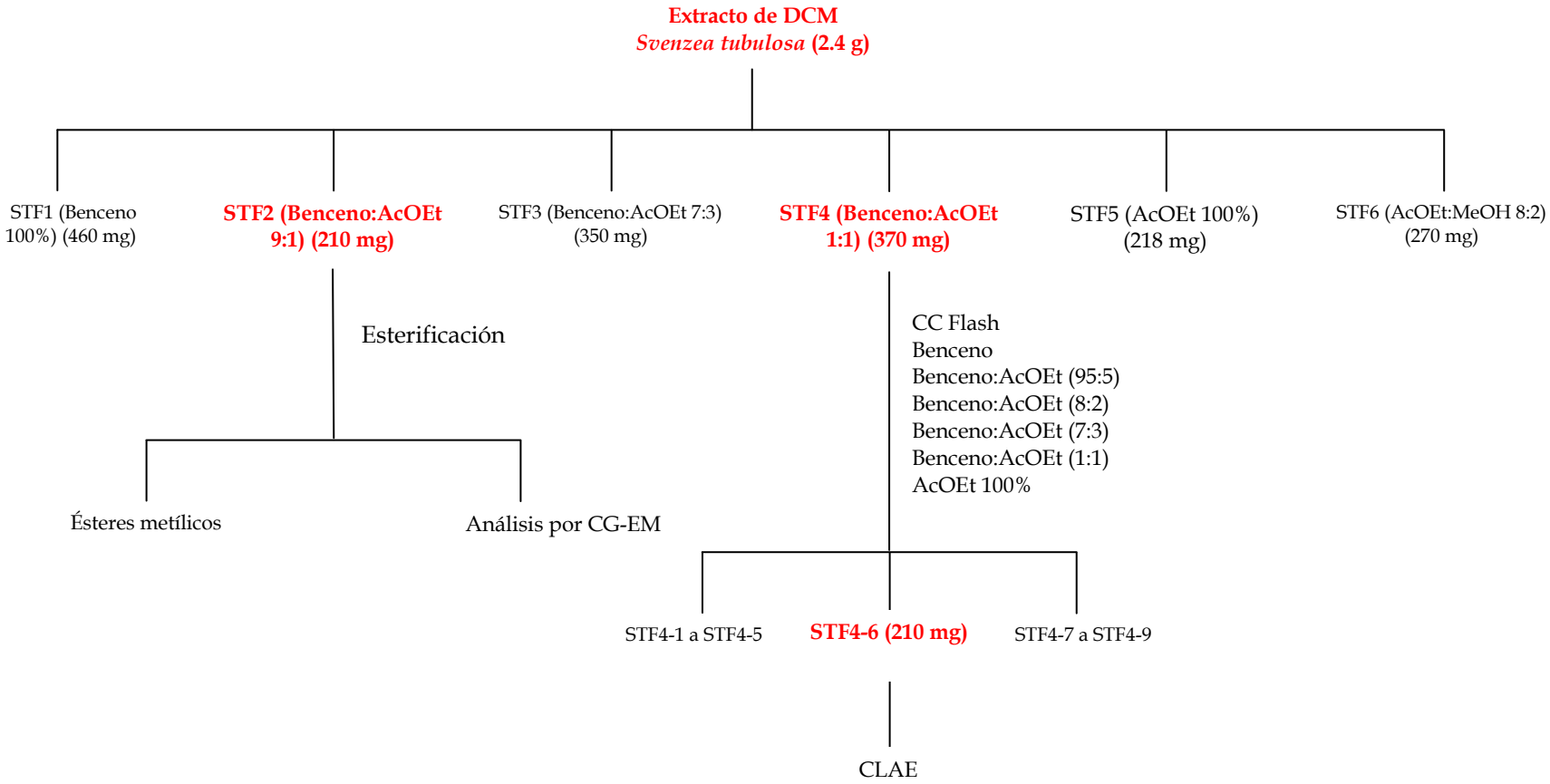


Figura 4.2 Esquema del fraccionamiento del extracto de diclorometano (DCM) de *Svenzea tubulos*. Las fracciones resaltadas en rojo son las que resultaron activas en el ensayo de inhibición de QS con *C. violaceum* ATCC 31532

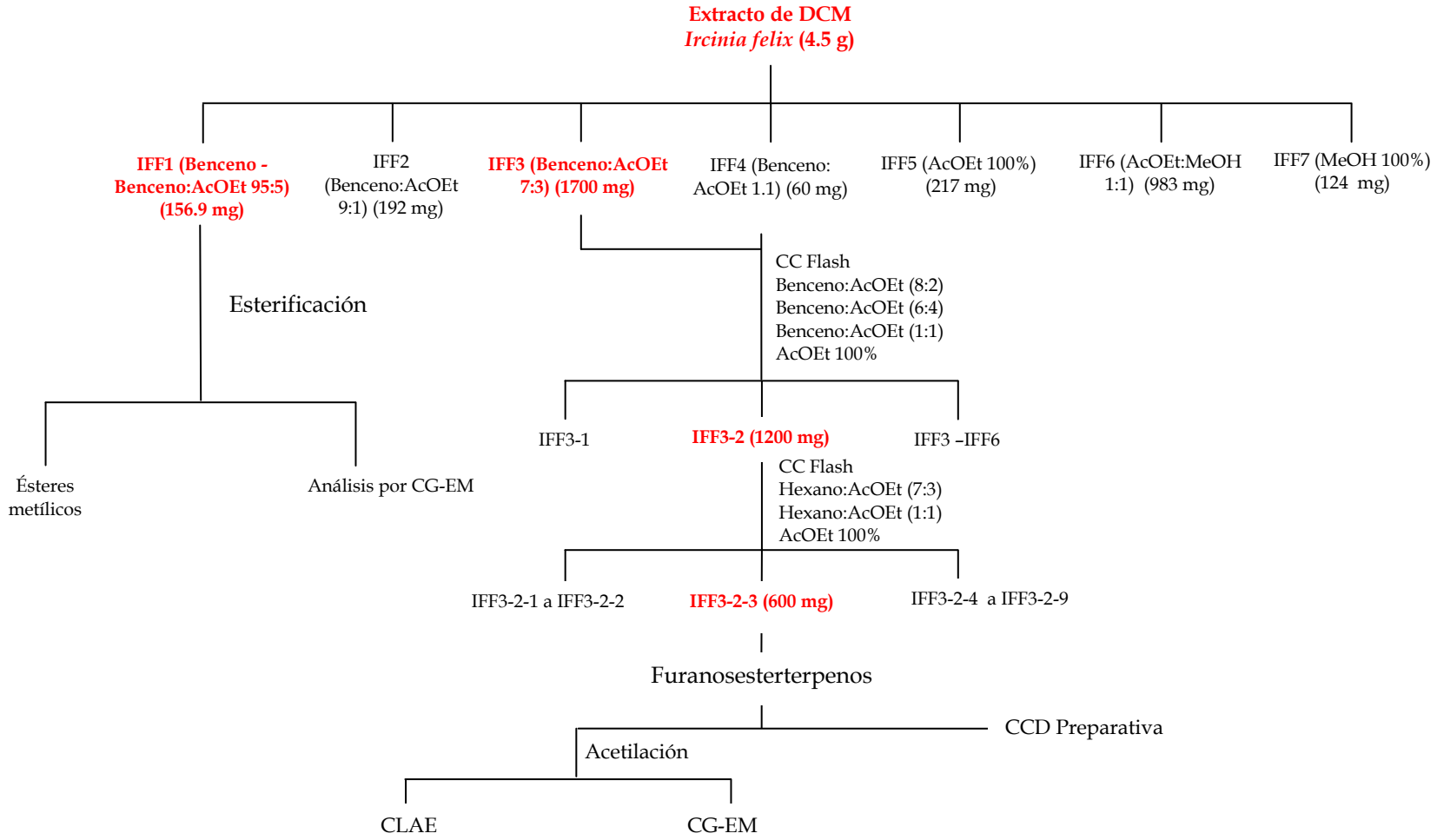


Figura 4.3 Esquema del fraccionamiento del extracto de diclorometano (DCM) de *Ircinia felix*. De igual forma las letras en rojo significan que estas fracciones fueron activas en el ensayo de inhibición de QS con *C. violaceum* ATCC 31532

4.2.4 OBTENCIÓN DE ESTERES METÍLICOS

Una porción de la fracción STF2 (24 mg) fue disuelta con 1.5 mL de una solución de hidróxido de potasio al 10% en metanol, y puesta en reflujo durante 2 horas. Después, se añadieron 2.5 mL de BF_3 al 14% en metanol calentando a reflujo durante 2 horas. A la mezcla de reacción se le añadió una solución sobresaturada de NaCl, y posteriormente fue extraída con benceno. Los extractos orgánicos, luego de ser secados sobre Na_2SO_4 anhidro, fueron concentrados y purificados por CC Flash utilizando como eluente mezcla de hexano:AcOEt (75:5 y 1:1). Los esteres metílicos son eluidos con la primera mezcla mencionada.

De forma similar, la fracción IFF1 de *Ircinia felix* fue esterificada para obtener los respectivos derivados, los cuales después de ser purificados fueron analizados por CG-EM-IE.

4.2.5 OBTENCIÓN DE LOS DERIVADOS ACETILADOS DE LOS FURANOSESTERTERPENOS

300 mg de la mezcla de furanosesterterpenos fue sometida a reacción de acetilación, en agitación, con 6 mL de mezcla anhídrido acético y piridina en proporciones (1:2) por 24 horas. La reacción fue monitoreada por CCD, en donde se observó que los furanosesterterpenos acetilados mostraron un rf de 0.9 cuando son eluidos con benceno:AcOEt (5:1). Después, la mezcla de reacción fue concentrada, y extraída con tres volúmenes de AcOEt en una extracción líquido-líquido con solución fría de HCl al 5%. La fase orgánica fue secada sobre Na_2SO_4 anhidro y posteriormente filtrada y concentrada a presión reducida. La fracción de furanosesterterpenos acetilada (332,7 mg) fue purificada por CC Flash con hexano:AcOEt (8:2), donde se obtuvieron 26 mg de furanosesterterpenos acetilados.

4.2.6 BIOENSAYO DE ACTIVIDAD DE INHIBICIÓN DE *QUORUM SENSING*

Para los ensayos de inhibición de *quorum sensing* se empleó *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 como cepa biosensora, la metodología utilizada en la evaluación de las fracciones y compuestos fue la descrita en el capítulo 3. Las cantidades ensayadas para los compuestos fueron de 7.5, 15, 22.5, 25, 30, 35, 37.5, 45 y75 µg/disco; mientras para las fracciones se ensayaron 100, 200, 300 y 400 µg/disco. Como control positivo se usó el extracto metanólico de *C. pachystachya* a 100 µg/disco.

4.2.7 IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS ACTIVOS

Los compuestos fueron identificados mediante la interpretación rigurosa de los espectros de RMN ^{1}H y ^{13}C, y EM. A continuación se muestran los datos de los compuestos aislados.

Compuesto 1. 5,8-epidioxi-22*E*-ergosta-6,22-dien-3-ol, Sólido blanco. **RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):** 6.50 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-7), 6.24 (1H, d, *J*=8.5 Hz, H-6), 5.22 (1H, m), H-23), 5.14 (1H, m, H-22), 3.96 (1H, m, H-3), 2.11 (1H, dd, *J*=13.8 y 3.4 Hz, H-4a), 2.02 (1H, m, H-20), 1.96 (1H, m, H-12a), 1.95 (1H, m, H-1a), 1.92 (1H, m, H-4b), 1.84 (1H, m, H-24), 1.83 (1H, m, H-2b), 1.74 (1H, m, H-16a), 1.69 (1H, m, H-1b), 1.60 (1H, m, H-15), 1.53 (1H, m, H-14), 1.52 (1H, m, H-2b), 1.51(1H, m, H-9), 1.49 (1H, m, H-11a), 1.46 (1H, m, H-25), 1.40 (1H, m), 1.35 (1H, m, H-16b), 1.22 (1H, m, H-12b), 1.20 (1H, m, H-11b), 1.20 (1H, m, H-17), 0.99 (3H, d, *J*=6.6 Hz, H-21), 0.90 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H-28), 0.88 (3H, s, H-19), 0.83 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H-27), 0.82 (3H, s, H-18), 0.81 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H-26). **RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):** 135.6 (CH, C6), 135.3 (CH, C22), 132.4 (CH, C23), 130.9 (CH, C7), 82.3 (C, C5), 79.6 (C, C8), 66.6 (CH, C3), 56.3 (CH, C17), 51.8 (CH, C14), 51.2 (CH, C9), 44.7 (C, C13), 42.9 (CH, C24), 39.9 (CH, C20), 39.5 (CH_2, C12), 37.1 (C, C10), 37.1 (CH_2, C4), 34.8 (CH_2, C1), 33.2 (CH, C25), 30.3 (CH_2, C2), 28.8 (CH_2, C16), 23.6 (CH_2, C11), 21.0 (CH_3, C21), 20.1 (CH_3, C27), 20.8 (CH_2, C15), 19.8 (CH_3, C26), 17.7 (CH_3, C28), 18.3(CH_3, C19), 13.0 (CH_3, C18).

Compuesto 2. Acetato de (7*E*,12*E*,18*R*,20*Z*)-variabilina, Aceite incoloro. $[\alpha]_D^{25}$ 26.1 (*c* 0.167, CH_3OH). **RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):** 7.33 (1H, s, H-1), 7.20 (1H, s, H-4), 6.28 (1H, s, H-2), 5.16 (1H, t, *J*=6.9 Hz, H-7), 5.07 (1H, t, *J*=6.9 Hz, H-12), 5.04 (1H, d, *J*=10.2 Hz, H-20), 2.81 (1H, m, H-18), 2.44 (2H, t, *J*=7.4 Hz, H-5a y H-5b), 2.35 (3H, s, H-27), 2.23 (2H, c, *J*=14.7 y 7.4 Hz, H-6a y H-6b), 2.05 (2H, m, *J*=8.0 y 7.6 Hz, H-11a y H-11b), 1.98 (2H, t, *J*=7.8 Hz, H-10a y H-10b), 1.94 (2H, t, *J*=7.0 Hz, H-15a y H-15b), 1.82 (3H, s, H-25), 1.58 (3H, s, H-9), 1.55 (3H, s, H-14), 1.34(4H, m, H-16), 1.34 (4H, m, H-17), 1.05 (3H, d, *J*=6.7 Hz, H-19). **RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):** 142.5 (CH, C1), 138.8 (CH, C4), 124.4 (CH, C12), 123.7 (CH, C7), 111.1 (CH, C2), 39.7 (CH_2, C10), 39.5 (CH_2, C15), 36.6 (CH_2, C17), 31.1 (CH, C18), 28.4 (CH_2, C6), 26.6 (CH_2, C11), 25.7 (CH_2, C16), 25.0 (CH_2, C5), 20.6 (CH_3, C27), 20.5 (CH_3, C19), 16.1 (CH_3, C9), 15.8 (CH_3, C14), 116.7 (CH, C20), 8.4 (CH_3, C26).

Fracción I. Aceite incoloro. $[\alpha]_D^{25}$ 23.0 (*c* 0.193, CH_3OH). **Componente Ia.** Acetato de (7*Z*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-felixinina. **RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):** 7.35 (1H, m, H-1), 7.21 (1H, s, H-4), 6.27 (1H, s, H-2), 5.15 (1H, t, *J*=6.7 Hz, H-7), 5.08 (1H, t, *J*=6.8 Hz, H-15), 5.04 (1H, d, *J*=10.2 Hz, H-20), 2.82 (1H, m, H-18), 2.43 (2H, t, H-5a y H-5b), 2.35 (3H, s, H-27), 2.22 (2H, c, *J*=7.5 Hz, H-6a y H-6b), 1.96 - 2.06 (m, H-16, H-12 y H-10), 1.82 (3H, s, H-25), 1.65 (3H, s, H-14 y H-9), 1.43 – 1.33 (m, H-17 y H-11), 1.05 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H-19). **Componente Ib.** Acetato de (8*Z*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-strobilinina. **RMN ^{1}H**

(400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.34 (1H, m, H-1), 7.21 (1H, s, H-4), 6.27 (1H, s, H-2), 5.12 (1H, t, *J*=6.7 Hz, H-10), 5.08 (1H, t, *J*=6.8 Hz, H-15), 5.04 (1H, d, *J*=10.2 Hz, H-20), 2.82 (1H, m, H-18), 2.39 (2H, t, H-5a y H-5b), 2.34 (3H, s, H-27), 2.03 (2H, m, H-7), 1.96 - 2.06 (m, H-16 y H-12), 1.82 (3H, s, H-25), 1.67 (3H, s, H-14 y H-9), 1.62 (m, H-6), 1.43 – 1.33 (m, H-17 y H-11), 1.05 (3H, d, *J*=6.8 Hz, H-19).

Fracción II. Aceite incoloro. $[\alpha]_D^{25}$ 23.5 (*c* 0.20, CH_3OH). **Componente IIa.** Acetato de (7*E*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-felixinina. **RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):** 7.34 (1H, m, H-1), 7.20 (1H, s, H-4), 6.27 (1H, s, H-2), 5.16 (1H, m, H-7), 5.08 (m, H-15), 5.05 (1H, d, *J*=10.3 Hz, H-20), 2.82 (1H, m, H-18), 2.44 (2H, t, *J*=6.5 Hz, H-5a y H-5b), 2.35 (3H, s, H-27), 2.25 (2H, t, *J*=6.5 Hz, H-6a y H-6b), 1.95 - 2.09 (m, H-11 y H-10), 1.88 – 1.95 (m, H-16, H-12), 1.81 (3H, s, H-25), 1.65 (3H, s, H-14), 1.57 (3H, s, H-9), 1.30 – 1.50 (m, H-17), 1.06 (3H, d, *J*=6.7 Hz, H-19). **Componente IIb.** Acetato de (8*E*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-strobilinina. **RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):** 7.34 (1H, m, H-1), 7.20 (1H, s, H-4), 6.26 (1H, s, H-2), 5.08 (m, H-10), 5.08 (1H, m, H-15 y H-10), 5.04 (1H, d, *J*=10.3 Hz, H-20), 2.82 (1H, m, H-18), 2.37 (2H, t, H-5a y H-5b), 2.34 (3H, s, H-27), 1.95-2.09 (m, H-16, H-12, H-7), 1.81 (3H, s, H-25), 1.67 (3H, s, H-14), 1.58 (3H, s, H-9), 1.64 (m, H-6), 1.30 – 1.50 (m, H-17 y H-11), 1.05 (3H, d, *J*=6.7 Hz, H-19).

4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La bioprospección de los organismos marinos llevada a cabo en el capitulo dos, permitió establecer que los extractos orgánicos de las esponjas *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix* tienen una alta actividad de inhibición de QS contra *C. violaceum* ATCC 31532, sin afectar su crecimiento. Esta característica hace de estos extractos una fuente promisoria de compuestos con actividad IQS.

Buscando establecer cuáles son los compuestos con actividad IQS en el extracto orgánico de *Svenzea tubulosa,* éste fue fraccionado por CC Flash, encontrando que las fracciones STF2 y STF4 presentaron actividad en el ensayo de IQS (Figura 4.4, Tabla 4.1). La primera fracción, STF2, mostró ser una mezcla de ácidos grasos según su perfil por CCD (empleando patrones de ácido grasos: ácido linoleico y ácido tetracosanoico) y sus espectros de RMN. Por lo anterior se decidió obtener sus ésteres metílicos para su análisis por CG-EM. El fraccionamiento por CC Flash de la segunda fracción activa, STF4, proporcionó como constituyentes mayoritarios una mezcla de esteroides oxigenados (STF4-6), según sus espectros de RMN. Los ensayos de inhibición de QS sugirieron que esta fracción (STF4-6) fue medianamente activa. La separación por CLAE preparativa permitió obtener al compuesto **1** como mayoritario.

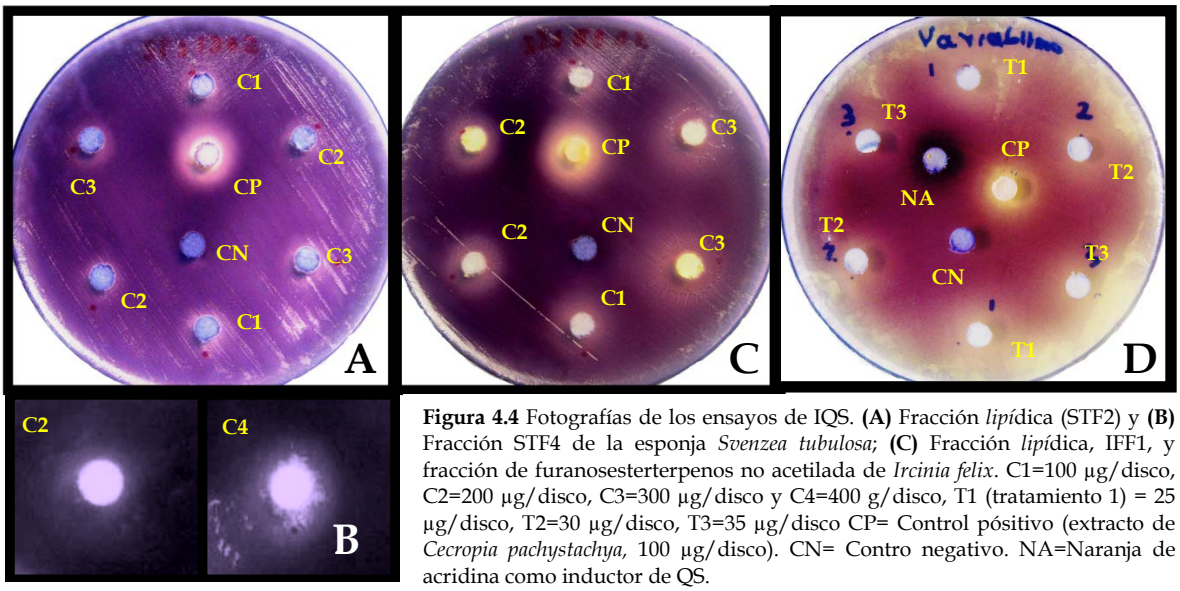


Figura 4.4 Fotografías de los ensayos de IQS. **(A)** Fracción *lipí*dica (STF2) y **(B)** Fracción STF4 de la esponja *Svenzea tubulosa*; **(C)** Fracción *lipí*dica, IFF1, y fracción de furanosesterterpenos no acetilada de *Ircinia felix*. C1=100 µg/disco, C2=200 µg/disco, C3=300 µg/disco y C4=400 g/disco, T1 (tratamiento 1) = 25 µg/disco, T2=30 µg/disco, T3=35 µg/disco CP= Control pósitivo (extracto de *Cecropia pachystachya*, 100 µg/disco). CN= Contro negativo. NA=Naranja de acridina como inductor de QS.

Tabla 4.1 Resultados del ensayo de IQS con *C. violaceum* ATCC 13532, para las fracciones, y compuestos aislados de *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix*.

Fracción o compuesto	Dosis (Resultados)					
STF2	**-**	**-**	**100 µg (+++)**	**200 µg (+++)**	**300 µg (+++)**	**-**
STF4	**-**	**-**	**-**	**200 µg (++)**	**-**	**400 µg (+++)**
IFF1	**-**	**-**	**100 µg (+++)**	**200 µg (++++)**	**300 µg (++++)**	**-**
Mezcla de Furanosesterterpenos	**25 µg (++++)**	**30 µg (++++)**	**35 µg (++++)**	**-**	**-**	**-**
Mezcla de Furanosesterterpenos acetilados	25 µg (-)	-	50 µg (-)	75 µg (-)	-	-
Compuesto 1	7.5 µg (-)	15 µg (-)	30 µg (-)	-	-	-
Fracción I	7.5 µg (-)	15 µg (-)	22.5 µg (-)	30 µg (-)	37.5 µg (-)	45 µg (-)
Fracción II	7.5 µg (-)	15 µg (-)	22.5 µg (-)	30 µg (-)	37.5 µg (-)	45 µg (-)
Fracción III	7.5 µg (-)	15 µg (-)	22.5 µg (-)	30 µg (-)	37.5 µg (-)	45 µg (-)

Diámetro de sensidisco: 5 mm.
Diámetro de inhibición de *quorum sensing*: Negativo (-). Positivos: para halos de 5-7 mm (+), 7-9 mm (++), 9-12 mm (+++), mayores a 12 mm (++++). Para halos muy difusos con disminución de cantidad de violaceína.

A continuación se describe la elucidación estructural de algunos ácidos grasos de la primera fracción así como la elucidación estructural del compuesto **1**. Para el caso de los ácidos grasos se elucidará a manera de ejemplo: Un ácido graso saturado, un ácido graso ramificado, un ácido graso con una insaturación y una ácido graso con dos dobles enlaces que corresponden a un ejemplo de cada de uno de los tipos de ácidos grasos encontrados.

ÁCIDO GRASO SATURADO

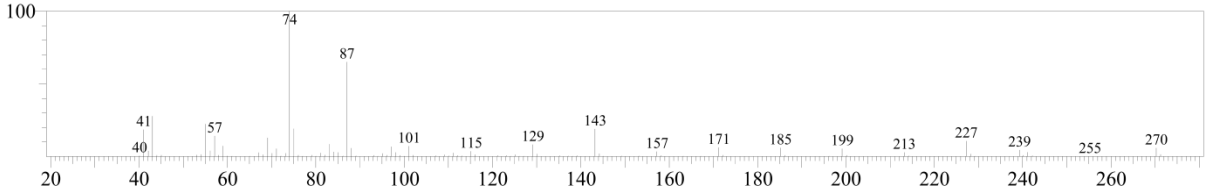


Figura 4.5 Espectro de masas del ester metílico del ácido hexadecanoico

Este ácido graso eluyó con un tr 24.62 en la muetsra STF2 metilada, que corresponde a un ECL[3] de 16.01, lo que sugiere un ácido graso de 16 átomos de carbono de cadena lineal. Su espectro de masas por impacto electrónico (Figura 4.5) muestra un ión molecular en *m/z* 270 correspondiente con la formula molecular $C_{17}H_{34}O_2$. El espectro presenta las fragmentaciones típicas de un ester metílico de ácido graso saturado, a juzgar por el ión acilio $[CH_3(CH_2)_{14}\text{-}C{\equiv}O]^+$ a *m/z* 239 y el fragmento en *m/z* 74, resultado de la ruptura entre el C-α y C-β según un arreglo tipo McLafferty. También el espectro muestra la serie de fragmentos de formula $[CH_3OCO(CH_2)_n]^+$ *m/z* 241 (M^+-29), 227 (M^+-43), 213 (M^+-57), 199 (M^+-71), 185 (M^+-85), 171 (M^+-99), 157 (M^+-113), 143 (M^+-127), 129 (M^+-141), 115 (M^+-155), 101 (M^+-169), 87 (M^+-183); la serie alquílica $[C_nH_{2n+1}]^+$ *m/z*: 43, 57, 71 y 85; los fragmentos de la serie alquenílica $[C_nH_{2n-1}]^+$ *m/z*: 41, 55, 69, 83 y 97. Todo lo anterior permitió identificar a este compuesto como el ester metílico del ácido hexadecanoico (RODRÍGUEZ *et al.*, 2010; CASTELLANOS *et al.*, 2010).

ÁCIDO GRASO RAMIFICADO

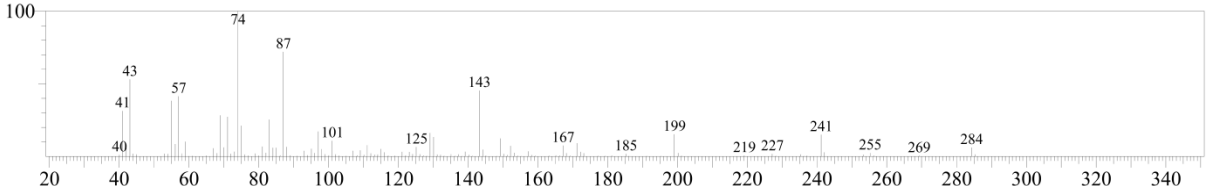


Figura 4.6 Espectro de masas del ester metílico del ácido 11-metilhexadecanoico

[3] Longitud equivalente de cadena: $ECL(x) = 2\frac{Log\ tr(x) - \log tr(n)}{\log tr(n+2) - \log tr(n)} + ECL(n)$, donde *tr(x)* es el tiempo de retención del ester metílico de ácido graso al que se le está calculando el ECL; *tr(n)* es el tiempo de retención del ester metílico del ácido graso de referencia (mezcla patrón de esteres metílicos de ácidos grasos de cadena normal C10-C20) que eluye antes; *tr(n+2)* es el tiempo de retención del ester metílico del ácido graso de referencia que eluye después. Los datos de tr y los espectros de masas se encuentran en el anexo electrónico.

Este ácido graso eluyó con un tr 25.66 en la muestra STF2 metilada, que corresponde a un ECL de 16.49, lo que sugiere un ácido graso de 17 átomos de carbono. El espectro (Figura 4.6) muestra un ión molecular en *m/z* 284 correspondiente con la formula molecular $C_{18}H_{36}O_2$. La forma general del espectro es típica de un éster metílico de ácido graso saturado como lo muestra el ión acilio $[CH_3(CH_2)_{15}\text{-}C{\equiv}O]^+$ *m/z* 253, el fragmento *m/z* 74 resultado de la ruptura entre el C-α y C-β con transposición de hidrogeno tipo McLafferty; la serie de fragmentos de la fórmula $[CH_3OCO(CH_2)_n]^+$ *m/z* 255 (M^+-29), 241 (M^+-43), 227 (M^+-57), 199 (M^+-85), 185 (M^+-99), 171 (M^+-113), 157 (M^+-127), 143 (M^+-141), 129 (M^+-155), 115 (M^+-169), 101 (M^+-183), 87 (M^+-197); la serie alquílica $[C_nH_{2n+1}]^+$ *m/z*: 43, 57, 71 y 85; y también la serie alquenílica $[C_nH_{2n-1}]^+$ *m/z*: 41, 55, 69, 83, 97, 111 y 125. Con lo anterior se estableció que este compuesto es el ester metílico de un ácido graso saturado de 17 átomos de carbono. A juzgar por su ECL se sugiere que corresponde al ester metílico del ácido 11-metilhexadecanoico (RODRÍGUEZ *et al.*, 2010; CASTELLANOS *et al.,* 2010).

ÁCIDO GRASO CON UNA INSATURACIÓN

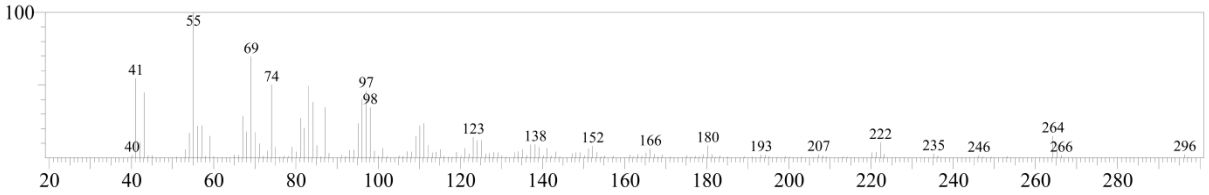


Figura 4.7 Espectro de masas del ester metílico del del ácido 11-octadecenoico

Este ácido graso eluyó con un tr 28.86 en la muetsra STF2 metilada, que corresponde a un ECL de 17.83, lo que sugiere un ácido graso de 18 átomos de carbono. El espectro de masas (Figura 4.7) muestra un ión molecular en *m/z* 296 correspondiente con la formula molecular $C_{19}H_{36}O_2$. La forma general del espectro es típica de un éster metílico de ácido graso monoinsaturado como lo muestran los fragmentos: *m/z* 74 resultado de la ruptura entre el C-α y C-β con transposición de hidrogeno tipo McLafferty, *m/z* 264 (M^+-32), *m/z* 222 (M^+-74), *m/z* 180 (M^+-116)74), la serie alquílica $[C_nH_{2n+1}]^+$ de baja intensidad *m/z*: 43, 57, 71, 85 y 99; la serie alquenílica $[C_nH_{2n-1}]^+$ más intensa *m/z*: 41, 55 (pico base), 69, 83, 97, 111, 125, 139, 153 y 266 (M^+-30). Así, todo lo anterior indica que se trata de un ácido graso monoinsaturado de 18 átomos de carbono. Se sugiere que es el ester metílico del ácido 11-octadecenoico a juzgar por su ECL (RODRÍGUEZ *et al.*, 2010; CASTELLANOS *et al.,* 2010).

ÁCIDO GRASO CON DOS DOBLES ENLACES

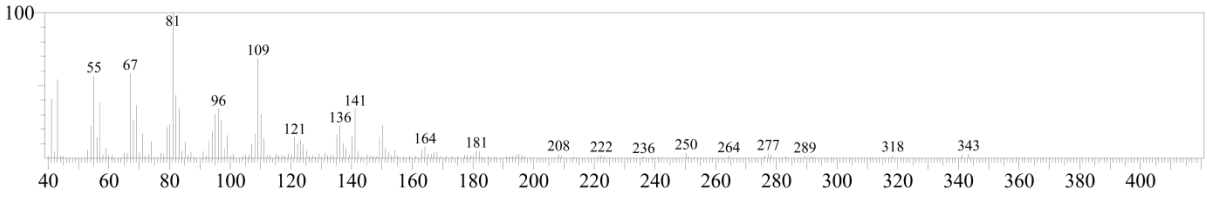


Figura 4.8 Espectro de masas del ester metílico del del ácido 5,9-tetracosadienoico

Este ácido graso eluyó con un tr 42.37 en la muetsra STF2 metilada, que corresponde a un ECL de 23.70, lo que sugiere un ácido graso de 24 átomos de carbono. La forma general del espectro (Figura 4.8) es característica de un ester metílico de ácido graso diinsaturado como lo muestran fragmentos: *m/z* 74, la serie alquílica $[C_nH_{2n+1}]^+$ *m/z*: 43, 57, 71, 85, 99, 113, 155, 169, 183; la serie alquenílica $[C_nH_{2n-1}]^+$ *m/z*: 41, 55, 69, 83, 97, 111, 125, 139, 153, 167, 181; la serie $[C_nH_{2n-3}]^+$ mas intensa *m/z* 53, 67, 81, 95, 109, 123, 137, 151, 179, 207, 221, 235, 249, 263, 277, 191 y la serie $[C_nH_{2n-5}]^+$ *m/z* 79, 93, 107, 121, 135, 149 y 163. Estas dos últimas series son típicas de espectros de ésteres metílicos de ácidos grasos diinsaturados. Los ácidos grasos con cadenas insaturadas en $\Delta^{5,9}$ son muy comunes en el phylum Porifera, y a juzgar por su ECL se sugiere que este compuesto corresponde al ester metílico de ácido 5,9-tetracosadienoico (RODRÍGUEZ *et al.,* 2010; CASTELLANOS *et al.,* 2010).

En la Tabla 4.2 se encuentra los ácidos grasos mayoritarios identificados en las fracciones activas de las esponjas *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix*. La identificación de ellos se realizo mediante el análisis de sus espectros de masas y comparación con sus ECL reportados en la literatura (RODRÍGUEZ *et al.,* 2010; CASTELLANOS *et al.,* 2010).

Tabla 4.2 Composición de esteres metílicos en las esponjas *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix*

No.	Ester metílico de ácido graso	Nombre común		*Svenzea tubulosa*	*Ircinia felix*
	Nombre del ácido		ECL[a] prom.	%	%
1	Ácido tetradecanoico	Ácido mirístico	14.00	1.14	6.10
2	Ácido 13-metiltetradecanoico		14.70	ND	4.09
3	Ácido 12-metiltetradecanoico		14.78	ND	1.39
4	Ácido pentadecanoico		15.07	ND	1.21
5	Ácido 14-metilpentadecanoico		15.67	ND	1.08
6	Ácido 9-hexadecenoico	Ácido palmitoleico	15.81	1.18	2.16
7	Ácido hexadecanoico	Ácido palmítico	16.01	15.31	27.81
8	Ácido 10-heptadecenoico		16.42	ND	3.12
9	Ácido 11-metilhexadecanoico		16.48	2.55	2.11
10	Ácido 15-metilhexadecanoico		16.65	ND	1.58
11	Ácido 14-metilhexadecanoico		16.69	1.30	2.51
12	Ácido 7-heptadecenoico		16.74	ND	1.08
13	Ácido 10-heptadecenoico		16.78	ND	1.86
14	Ácido 9-heptadecenoico		16.83	ND	0.67
15	Ácido heptadecanoico	Ácido margárico	17.06	1.99	0.87
16	Ácido 9-octadecenoico	Ácido oleico	17.71	15.29	2.44
17	Ácido 11-octadecenoico	Ácido vaccénico	17.77	5.61	4.28
18	Ácido 13-octadecenoico		17.83	2.52	2.32
19	Ácido octadecanoico	Ácido esteárico	18.00	5.24	5.61
20	Ácido 11-metiloctadecanoico		18.45	5.68	5.03
21	Ácido 15-metiloctadecanoico		18.64	1.90	7.76
22	Ácido 17-metiloctadecanoico		18.68	1.05	ND
23	Ácido nonadecanoico		19.00	1.31	ND
24	Ácido 18-metilnonadecanoico		19.67	1.77	ND
25	Ácido 11-eicosenoico		19.76	1.85	ND
26	Ácido eicosanoico	Ácido araquidico	20.00	2.94	1.04
27	Ácido saturado C21		20.36	2.09	2.33
28	Ácido 17-metileicosanoico		20.57	2.29	1.28
29	Ácido 19-metileicosanoico		20.65	3.97	ND
30	No identificado		21.50	ND	0.76
31	No identificado		21.55	ND	0.97
32	Ácido docosanoico	Ácido Behénico	22.00	1.16	ND
33	Ácido 16-tricosenoico		22.95	2.59	1.36
34	No identificado		23.05	2.23	ND
35	Ácido 4,17-tetracosadienoico		23.42	ND	2.76
36	Ácido 5,9-tetracosadienoico		23.70	1.43	ND
37	Ácido 14-tetracosenoico		23.80	2.00	ND
38	Ácido tetracosanoico	Ácido lignocerico	24.00	1.29	ND
39	Ácido 8-pentacosenoico		24.67	2.11	ND
40	Ácido 17-pentacosenoico		24.78	1.94	ND
41	Ácido 5,9-hexacosadienoico		25.42	6.65	ND
42	No identificado		26.00	1.62	ND

[a] Longitud equivalente de cadena por sus siglas en ingles; ND: no determinado.

En la fracción de ácidos grasos libres de *Svenzea tubulosa,* analizados por CG-EM como sus derivados de esteres metílicos, se encontró que el hexadecanoato de metilo (ester metílico del ácido palmítico) y el 9-octadecenoato de metilo (ester metílico del ácido oleico), son los esteres mas abudnadantes, con porcentajes relativos del 15.3% aprox.; seguidamente se encuentra el 5,9-hexacosadienato de metilo (6.6 %), el 11-metiloctadecanoato de metilo (5.6%) y el octadecanoato de metilo (ester metílico del ácido esteárico) (5.2 %). Los ácidos grasos insaturados son los que predominan con un porcentaje aproximado de 62.3 %, mientras que el 37.7 % corresponde a ácidos grasos saturados (de los cuales el 20.5 % son ramificados y el 17.2 % son lineales). En cuanto a la longitud de cadena se encontró que varía entre 14 y 26 átomos de carbono, predominando los de 18 átomos, seguidos por los de 16. Este comportamiento es usual en esponjas con la diferencia que en el caso de *S. tubulosa* hay una muy poca abundancia de ácidos grasos de cadena larga (CASTELLANOS *et al.,* 2010).

Adicionalmente, en *Svenzea tubulosa* la fracción STF4, que resultó activa, permitió el aislamiento del compuesto **1** como el componente mayoritario de la subfracción activa STF4-6. El espectro de RMN ^{1}H de **1** (Anexo BI) presenta dos señales doblete en δ_H 6.50 (1H, d, *J*=8.5 Hz) y 6.24 (1H, d, *J*=8.5 Hz), que son características de protones olefínicos en sistemas epidioxi; una señal para protones olefínicos en δ_H 5.18 (2H, m); una señal multiplete en δ_H 3.96, característica de un metino oxigenado, y que es característica del protón en C-3 para los esteroides. Adicionalmente, se ven señales para 6 metilos en δ_H 0.99 (3H, d, *J*=6.6 Hz), 0.90 (3H, d, *J*=6.8 Hz), 0.88 (3H, s), 0.83 (3H, d, *J*=6.8 Hz), 0.82 (3H, s), y 0.81 (3H, d, *J*=6.8 Hz), indicando la presencia de dos metilos sobres carbonos cuaternarios y cuatro metilos sobre metinos sp^3. Todo lo anterior sugiere la presencia de un esteroide oxigenado con cadena lateral insaturada y metilada (KOBORI *et al*., 2006). El espectro de RMN ^{13}C (Anexo BII), muestra la presencia de 28 señales para carbono. El análisis de este espectro permitió identificar la presencia de 11 señales de metinos (a δ_C 135.6, 130.9, 135.3, 132.4, 66.6, 56.3, 51.8, 51.2, 42.9, 39.9, 33.2), 7 de metilenos (a δ_C 39.5, 37.1, 34.8, 30.3, 28.8, 23.6, 20.8), 6 de metilos (a δ_C 21.0, 20.1, 19.8, 18.3, 17.7, 13.0,) y 4 señales de carbonos cuaternarios (a δ_C 82.3, 79.6, 44.7, 37.1). Las señales de carácter oleofínico en δ_C 135.6 (CH); 135.3 (CH); 132.4 (CH); y 130.9 (CH) confirman la presencia de dobles enlaces disustituidos en la molécula; la señal en δ_C 66.6 corresponde a un metino oxigenado y es típica de C-3 en los esteroles; las señales de carbono cuaternario oxigenado en δ_C 82.3 y 79.6 corresponden a las señales reportadas para los carbones C-5 y C-8 en epidioxiesteroles (KOBORI *et al*., 2006).

El estudio de los espectros COSY ^{1}H-^{1}H (Anexo BIII), HSQC (Anexo BIV), y HMBC (Anexo BV), permitió construir algunos sistemas de spin que confirman un doble enlace en el C-22 cuya geometría es *E,* deducida por las constantes de la acoplamiento. También se observa las correlaciones en HMBC entre la señal del

protón olefinico en δ_H 6.50 (H-7) y la señal del carbono cuaternario en δ_C 79.6 (C-8), y entre la señal del protón en δ_H 6.24 (H-6) y el carbono en δ_C 82.3 (C-5) confirmándose de esta forma el sistema epidioxiesterol en la molécula (Figura 4.9). Los datos de las correlaciones encontradas en los experimento bidimensionales, al igual que los datos de multiplicidad y desplazamiento químico en RMN ^{1}H y ^{13}C (Tabla 4.3) para el compuesto **1** permitieron establecer que se trata del 5,8-epidioxi-22*E*-ergosta-6,22-dien-3-ol (KOBORI *et al.*, 2006). Lo anterior fue confirmado por comparación de los datos experimentales con los datos de la literatura.

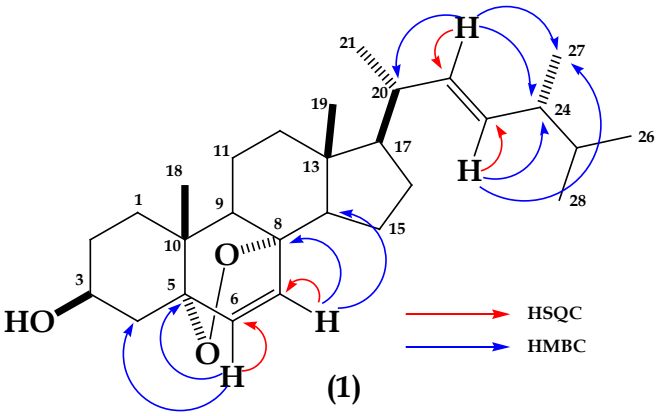


Figura 4.9 Correlaciones HSQC (rojo) y HMBC (azul) para del compuesto **1** de *Svenzea tubulosa*

En *Ircinia felix* se identificaron dos fracciones activas en el ensayo IQS: la IFF1 y la IFF3 (Figura 4.4, Tabla 4.1); la primera mostró estar constituida por ácidos grasos a juzgar por su comportamiento en CCD y su espectro de RMN ^{1}H, por lo cual se decidió preparar los derivados ésteres metílicos que se analizaron de manera análoga los ácidos grasos de *Svenzea tubulosa*. La composición de ácidos grasos se reportó en la Tabla 4.2. En esta fracción se encontró que el hexadecanoato de metilo (ester metílico del ácido palmítico) (27.8 %) es el más abundante, seguido del 15-metiloctadecanoato de metilo (7.7 %), el tetradecanoato de metilo (ester metílico del ácido mirístico) (6.1 %), el octadecanoato de metilo (ester metílico del ácido esteárico) (5.6 %) y el 11-metiloctadecanoato de metilo (5.0 %). En esta esponja los ácidos grasos saturados son los que predominan con un 71.8 % (de los cuales 26.8 % son ramificados y el 45 % son de cadena lineal), mientras que los ácidos grasos insaturados están en menor proporción (aproximadamente el 28 %). Los ácidos grasos que conforman la fracción de ácidos grasos libres de *I. felix* presentan cadenas entre 14 y 24 átomos de carbono. Los de mayor porcentaje son los de 16 átomos de carbono, seguido por los de 18 átomos de carbono. Al igual que en *S. tubulosa* la composición de ácidos grasos de *I. felix* es usual en esponjas, pero en esta ultima hay una muy poca abundancia de ácidos grasos de cadena larga (CASTELLANOS *et al.*, 2010).

Luego, IFF3 fue fraccionada sucesivamente por CC Flash y las subfracciones fueron ensayadas con *C. violaceum.* El ensayo de IQS permitió detectar a la fracción IFF3-2-3 como responsable de la actividad. La fracción IFF3-2-3 mostró, según su movilidad en CCD y su espectro UV, estar constituidas por furanosesterterpenos, ya que su rf (0.32 en benceno:AcOEt 5:1) es idéntico a los patrones de furanosesterterpenos aislados anteriormente en el laboratorio a partir de esponjas del género *Ircinia.* Debido a la inestabilidad reportada para estos compuestos fue necesario acetilarlos para luego proceder a su separación por CLAE preparativo, proporcionando tres fracciones, tal y como se observa en el perfil cromatográfico obtenido (Figura 4.10).

Tabla 4.3 Datos de RMN ^{1}H y ^{13}C de los compuestos aislados e identificados de las esponjas. Los espectros fueron tomados en $CDCl_3$.

No. C	Compuesto 1		Compuesto 2		Fracción I		Fracción II	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H (componente Ia)	δ_H (componente Ib)	δ_H (componente IIa)	δ_H (componente IIb)
1	1.69 (1H, m) 1.95 (1H, m)	34.8	7.33 (1H, s)	142.5	7.35 (1H, m)	7.34 (1H, m)	7.34 (1H, m)	7.34 (1H, m)
2	1.52 (1H, m) 1.83 (1H, m)	30.3	6.28 (1H, s)	111.1	6.27 (1H, s)	6.27 (1H, s)	6.27 (1H, s)	6.26 (1H, s)
3	3.96 (1H, m)	66.6	-	-	-	-	-	-
4	1.92 (1H, m) 2.11 (1H, dd, *J*=13.8 y 3.4 Hz)	37.1	7.20 (1H, s)	138.8	7.21 (1H, s)	7.21 (1H, s)	7.20 (1H, s)	7.20 (1H, s)
5	-	82.3	2.44 (2H, t, *J*=7.4 Hz)	25.0	2.43 (2H, t)	2.39 (2H, t)	2.44 (2H, t, *J*=6.5)	2.37 (2H, t)
6	6.24 (1H, d, *J*=8.5 Hz)	135.6	2.23 (2H, c, *J*=14.7 y 7.4 Hz)	28.4	2.22 (2H, c, *J*=7.5 Hz)	1.62 (m)	2.25 (2H, t, *J*=6.5)	1.64 (m)
7	6.50 (1H, d, *J*=8.5 Hz)	130.9	5.16 (1H, t, *J*=6.9 Hz)	123.7	5.15 (1H, t, *J*=6.7 Hz)	2.03 (2H, m)	5.16 (1H, m)	1.95 – 2.09 (m)
8	-	79.6	-	-	-	-	-	-
9	1.51(1H, m)	51.2	1.58 (3H, s)	16.1	1.65 (3H, s)	1.67 (3H, s)	1.57 (3H,s)	1.58 (3H, s)
10	-	37.1	1.98 (2H, t, *J*=7.8 Hz)	39.7	1.96 - 2.06, (m)	5.12 (1H, t, *J*=6.7 Hz)	1.95 – 2.09 (m)	5.08 (m)
11	1.20 (1H, m) 1.49 (1H, m)	23.6	2.05 (2H, m, *J*=8.0 y 7.6 Hz)	26.6	1.43 – 1.33 (m)	1.43 – 1.33 (m)	1.95 – 2.09 (m)	1.30 – 1.50 (m)
12	1.22 (1H, m) 1.96 (1H, m)	39.5	5.07 (1H, t, *J*=6.9 Hz)	124.4	1.96 - 2.06 (m)	1.96 - 2.06 (m)	1.88 – 1.95 (m)	1.95 – 2.09 (m)
13	-	44.7	-	-	-	-	-	-
14	1.53 (1H, m)	51.8	1.55 (3H, s)	15.8	1.65 (3H, s)	1.67 (3H, s)	1.65 (3H, s)	1.67 (3H, s)
15	1.40 (1H, m) 1.60 (1H, m)	20.8	1.94 (2H, t, *J*=7.0 Hz)	39.5	5.08 (1H, t, *J*=6.8 Hz)	5.08 (1H, t, *J*=6.8 Hz)	5.08 (m)	5.08 (m)
16	1.35 (1H, m) 1.74 (1H, m)	28.8	1.34(4H, m)	25.7	1.96- 2.06 (m)	1.96 - 2.06 (m)	1.88 – 1.95 (m)	1.95 – 2.09 (m)
17	1.20 (1H, m)	56.3	1.34 (4H, m)	36.6	1.43 – 1.33 (m)	1.43 – 1.33 (m)	1.30 – 1.50 (m)	1.30 – 1.50 (m)
18	0.82 (3H, s)	13.0	2.81 (1H, m)	31.1	2.82 (1H, m)	2.82 (1H, m)	2.82 (1H, m)	2.82 (1H, m)
19	0.88 (3H, s)	18.3	1.05 (3H, d, *J*=6.7 Hz)	20.5	1.05 (3H, d, *J*=6.8 Hz)	1.05 (3H, d, *J*=6.8 Hz)	1.06 (3H, d, *J*=6.7 Hz)	1.05 (3H, *J*=6.7 Hz)
20	2.02 (1H, m)	39.9	5.04 (1H, d, *J*=10.2 Hz)	116.7	5.04 (1H, d, *J*=10.2 Hz)	5.04 (1H, d, *J*=10.2 Hz)	5.05 (1H, d, *J*=10.3 Hz)	5.04 (1H, d, *J*=10.3 Hz)
21	0.99 (3H, d, *J*=6.6 Hz)	21.0	-	-	-	-	-	-
22	5.14 (1H, m)	135.3	-	-	-	-	-	-
23	5.22 (1H, m)	132.4	-	-	-	-	-	-
24	1.84 (1H, m)	42.9	-	-	-	-	-	-
25	1.46 (1H, m)	33.2	1.82 (3H, s)	8.4	1.82 (3H, s)	1.82 (3H, s)	1.81 (3H, s)	1.81 (3H, s)
26	0.81 (3H, d, *J*=6.8 Hz)	19.8	-		-	-	-	-
27	0.83 (3H, d, *J*=6.8 Hz)	20.1	2.35 (3H, s)	20.6	2.35 (3H, s)	2.34 (3H, s)	2.35 (3H, s)	2.34 (3H, s)
28	0.90 (3H, d, *J*=6.8 Hz)	17.7	-	-	-	-	-	-

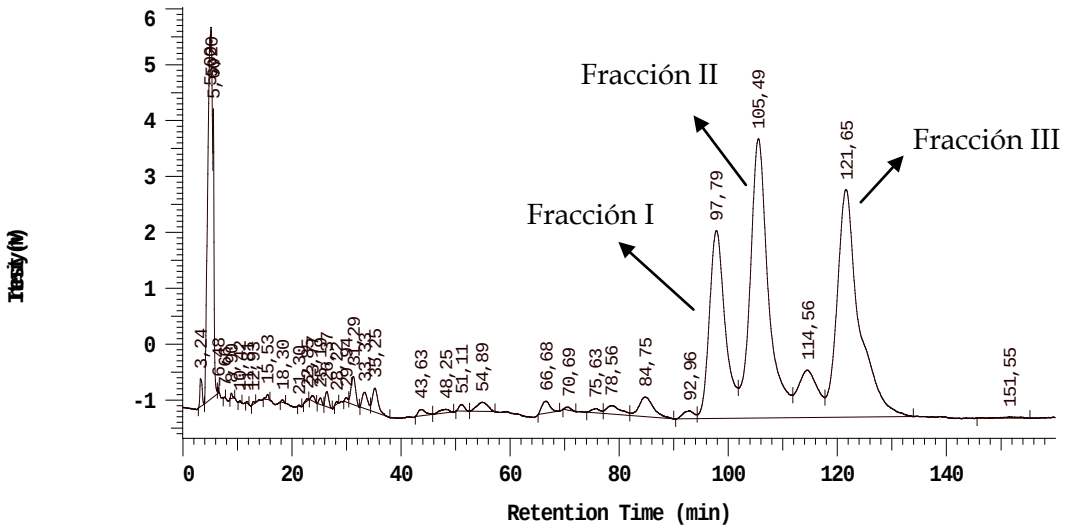


Figura 4.10 Perfil obtenido por CLAE para la mezcla de furanosesterterpenos acetilados, procedentes de *Ircinia felix*

A continuación se presenta la elucidación estructural de algunos de los constituyentes aislados de la mezcla de furanosesterterpenos y posteriormente se discutirá sus resultados en los ensayos de inhibición de QS para las fracciones aisladas.

El compuestos **2** (6 mg)**,** obtenido de la fracción III**,** fue aislado como un aceite incoloro. El espectro de RMN ^{1}H (Figura 4.11) muestra señales de protones aromáticos en δ_H 7.33 (1H, s), 7.20 (1H, s) y 6.28 (1H, s), características de un anillo furano β-sustituido (BARROW *et al*., 1988). Presenta señales en δ_H 5.04 (1H, d, *J*=10.2 Hz), 2.81 (1H, m), 2.35 (3H, s), y 1.82 (3H, s), características de un ácido tetrónico acetilado (DAVIS & CAPON, 1994). Las señales en δ_H 5.07 (1H, t, *J*=6.9 Hz) y 5.16 (1H, t, *J*=6.9 Hz) indican la presencia de dos protones olefínicos en la molécula. En el espectro también se observan una señal doblete en δ_H 1.05 (3H, d, *J*=6.7) característica de un metilo sobre un carbono metino sp^3; y señales de singletes en 1.58 (3H, s) y 1.55 (3H, s), que son debidas a protones de metilos sobre carbonos vinílicos sobre enlaces dobles trisustituídos con geometría *E* (DAVIS & CAPON, 1994). El análisis del experimento DEPT 135 (Figura 4.12) permitió identificar 6 señales de carbonos metinos sp^2 en δ_H 142.5, 138.8, 124.4, 123.7, 116.7 y 111.1; 7 señales de carbonos de metilenos sp^3 en δ_H 39.7, 39.5, 36.6, 31.1, 28.44, 26.56, 25.7 y 25.0; y 5 señales de metilos en 20.6, 20.5, 16.1, 15.8, 8.4. La comparación de las señales de ambos espectros con los espectros de RMN ^{1}H y ^{13}C reportados en la bibliografía para furanosesterterpenos (GONZÁLEZ *et al*., 1983; BARROW *et al*., 1988; KERNAN & CAMBIE, 1991; DAVIS & CAPON, 1994; MARTINEZ *et al*., 1997), permitió identificar la presencia de dos dobles enlaces con configuración *E* en el compuesto **2**. La ausencia de señales de carbonos metílicos alrededor de 23 ppm y de carbonos metilénicos alrededor de 32 ppm, y la presencia de las señales de carbonos metílicos

en 16.1 ppm (metilo vinilico en 1.58 ppm) y 15.8 ppm (singlete en 1.55 ppm), al igual que las señales de los dos carbonos metilénicos en 39.7 y 39.5 ppm en el experimento DEPT 135, permitieron confirmar la geometría de los dobles enlaces trisustuidos como *E*. Con todo lo anterior se logró indentificar al compuesto presente en la fracción III como el acetato de (7*E*,12*E*,18*R*,20*Z*)-variabilina, cuyos datos de RMN ^{1}H y ^{13}C (Tabla 4.3) concuerdan con los reportados en 1997 por Martinez y colaboradores.

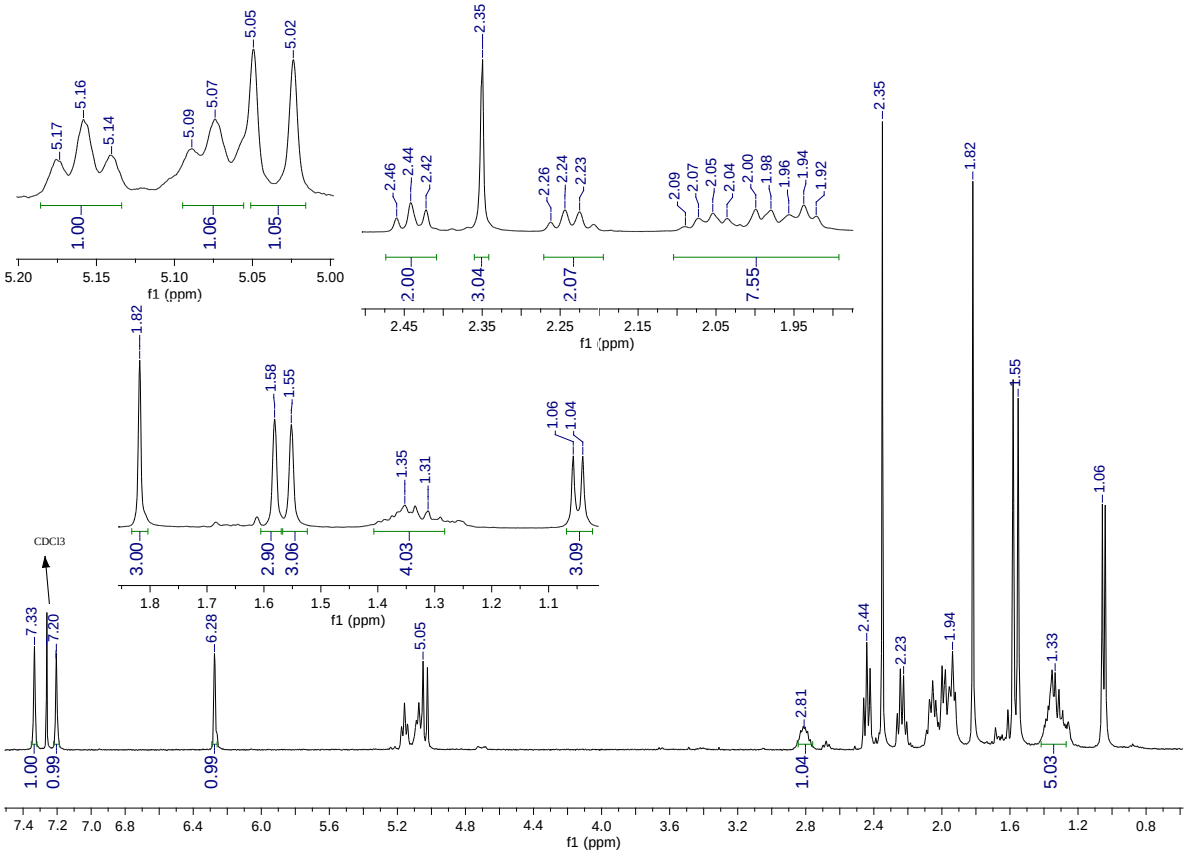


Figura 4.11 Espectro de RMN ^{1}H del compuesto **2** de *Ircinia felix*

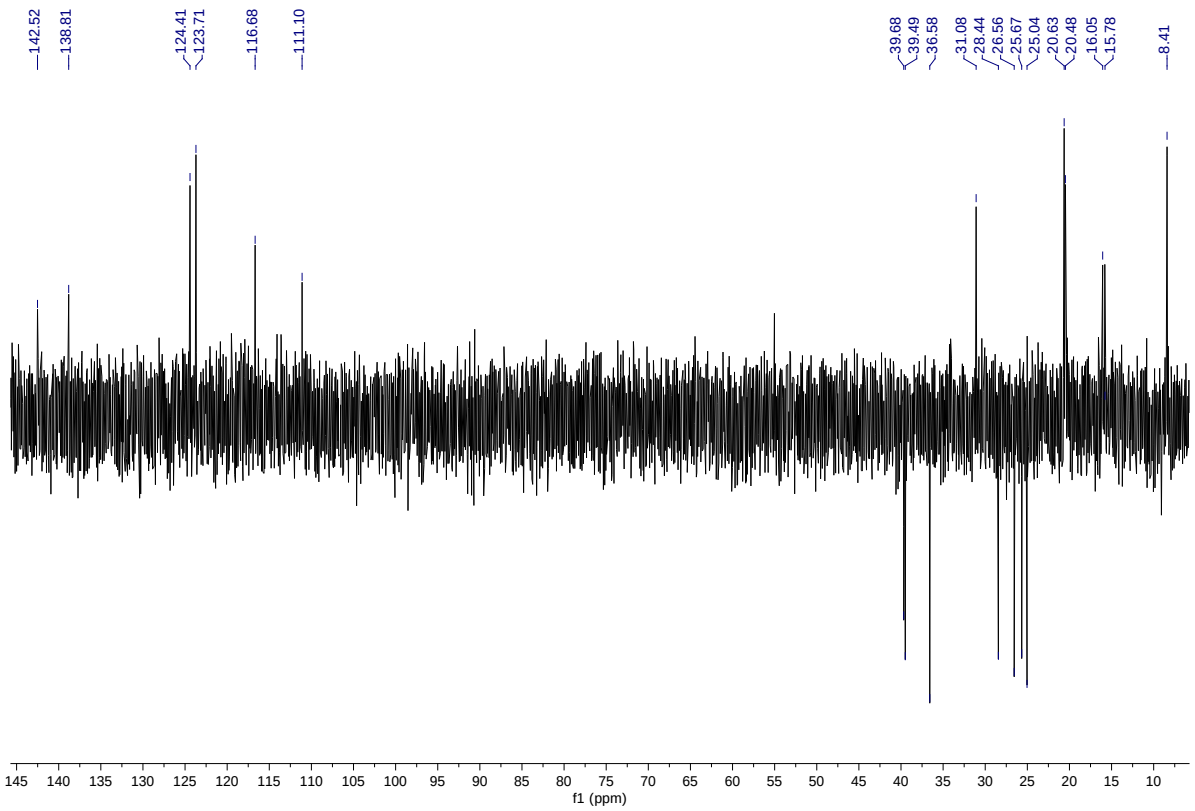


Figura 4.12 Espectro DEPT 135 del compuesto **2** de *Ircinia felix*

El espectro de RMN ^{1}H (Anexo BVI) para la fracción I (2.0 mg), muestra las señales de protones olefínicos características de un anillo furano *β*-sustituido, en δ_H 7.34, 7.21 y 6.27; y de la funcionalidad ácido tetronico acetilada en δ_H 5.04 (d, *J*=10.2 Hz), 2.82 (m), 2.35 (s) y 2.34 (s), 1.82 (s) y 1.05 (d, *J*=6.7 Hz). El espectro también muestra varias señales complejas en el rango de 5.17 y 5.07 ppm que hacen evidente la presencia de una gran cantidad de protones olefínicos. La presencia de señales adicionales en δ_H 7.35 (señal solapada parcialmente con el otro singlete en 7.34 ppm) y en δ_H 2.35 (singlete ancho solapado con otro en 2.34 ppm), hace evidente la existencia de una mezcla de dos componentes. En el espectro también se muestran dos señales de singletes en δ_H 1.67 y 1.65, que corresponden a metilos vinílicos. El desplazamiento químico de estas dos señales es característico de metilos sobre dobles enlaces trisustituidos con geometría *Z (*ORTIZ & RODRIGUEZ, 1990). Con esta evidencia se pudo deducir que los constituyentes poseen dobles enlaces trisustituidos con geometría *Z.* La comparación de los datos de RMN ^{1}H, con los datos reportados en la bibliografía permitió identificar a los compuestos en la mezcla como el acetato de (8Z,13Z,18R,20Z)-strobilinina y acetato de (7Z,13Z,18R,20Z)-felixinina, los cuales fueron aislados e identificados en un espécimen de *Ircinia felix* del Caribe Colombiano por Martinez et al., 1997. Los datos de RMN ^{1}H para componentes de la mezcla se muestran en la Tabla 4.3.

Al igual que la fracción I, el espectro de RMN ^{1}H de la fracción II (2.5 mg) (Anexo BVII), presenta las señales caracteriesticas de un anillo furano *β*-sustituido (δ_H 7.34, 7.21 y6.27) y de la funcionalidad ácido tetrónico acetilada (5.04 (d, *J*=11.8 Hz), 2.82 (m), 2.35 (s), 2.35 (s) y 2.34 (s), 1.81 (s) y 1.05 (d, *J*=6.7 Hz). Varias señales complejas en el rango de 5.06-5.03 ppm evidencian la presencia de otros protones olefínicos. Ademas se observan señales adicionales que evidencia la mezcla de dos compuestos. Es así que se observan dos singlestes en 6.27 y 6.26 ppm, dos dobletes en 5.06 y 5.03 ppm (*J*=10.3 Hz), y dos dobletes en 1.06 y 1.05 ppm (*J*=6.7 Hz). Ademas se observan claramente cuatro singletes en 1.57, 1.58, 1.65 y 1.67 ppm, correspondientes a cuatro grupos metilos vinílicos localizados sobre dobles enlaces trisustituidos. Los dos primeros por su desplazamiento químico corresponden a metilos vinilicos sobre dobles enlaces trisustituidos con geometría *E*, mientras los dos últimos corresponden a metilos de un sistema similar pero con configuración *Z* (ORTIZ & RODRIGUEZ, 1990). Los desplazamientos de los últimos cuatro metilos sugieren que la mezcla puede estar constituida de los isómeros *E,Z*, o una mezcla de dos isómeros *E,E* y *Z,Z*. El espectro de RMN-^{1}H de la fracción II es idéntico al obtenido por Martinez en 1996, en los cuales se identificaron los compuestos acetado de (8*E*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-strobilinina y acetato de (7*E*,13*Z*,18*R*,20*Z*)-felixinina, del espécimen *Ircinia felix* del Caribe Colombiano, objeto de estudio de su trabajo. Los datos de RMN-^{1}H para los componentes de la fracción II se muestran en la Tabla 4.2. Estos datos concuerdan con los reportados en la bibliografía (MARTINEZ *et al*., 1997). En la Figura 4.13 se observan los compuestos indetificados en *Ircinia felix*.

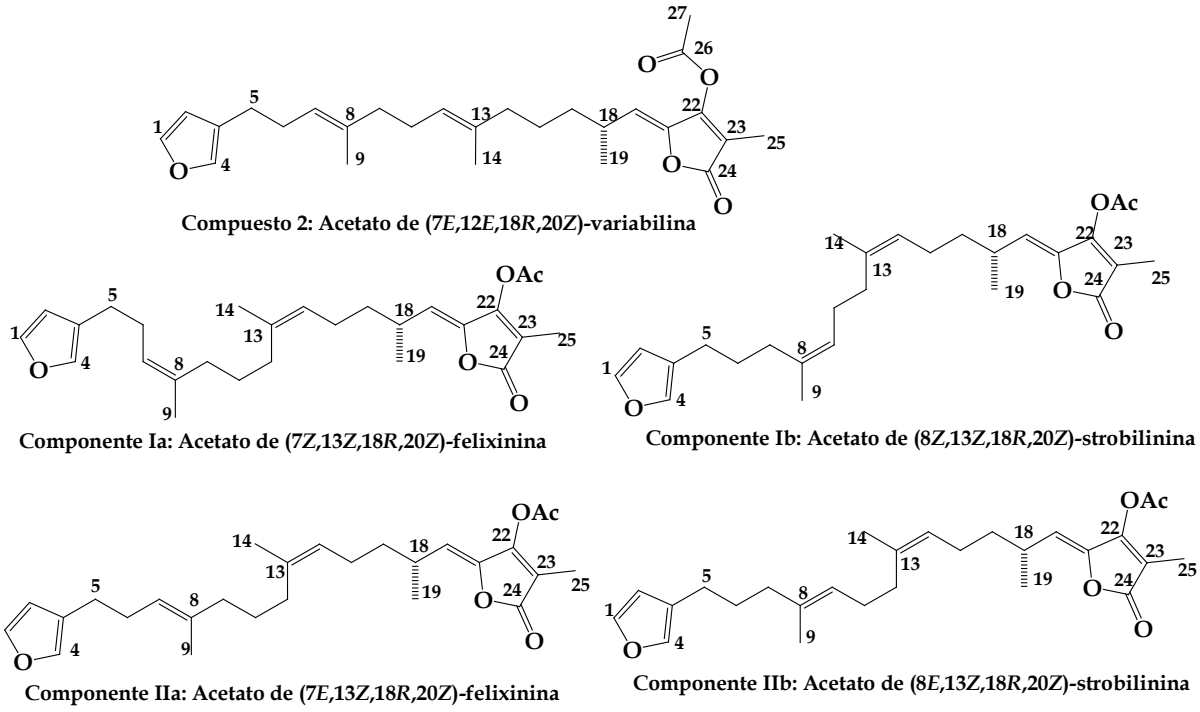


Figura 4.13 Furanosesterterpenos aislados de *Ircinia felix*

DISCUSIÓN DE IQS DE LOS COMPUESTOS AISLADOS

El aislamiento e identificaion de los compuetos mayoritarios de la fracciones activas de las esponjas *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix* permitió la identificación de tres tipos de compuestos; a saber, ácidos grasos libres (para ambas especies), epidioxiesteroles (para *S. tubulosa*) y furanosesterterpenos (para *I. felix*). A continuación se discuten los resultados de cada uno.

Los ácidos grasos identificados por Widmer et al. en la fracción hidrofobica del lavado de la carne de aves de corral (*poultry meat wash,* PMW), la cual inhibe el QS en la cepa reportera *Vibrio harveyi* BB170, son a los que se le atribuye la actividad IQS. Entre los ácidos mayoritarios identificados, se encuentran el ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico y ácido esteárico. Todos ellos por separado y en mezcla (en concentraciones detectables por CG) mostraron inhibición de la expresión de AI-2. Sin embargo, la inhibición del QS observada por la mezcla artificial de los ácidos grasos mayoritarios fue menor que la observada por el control de PMW, sugieriendo que la presencia de ácidos grasos minoritarios o de otros compuestos presentes es la mezcla natural, puede estar potencializando la actividad IQS de los ácidos grasos mayoritarios.

Se ha sugerido que la IQS en *V. harveyi* BB170, así como su modulación, por parte de los ácidos grasos se podrían deber a que ellos serían capaces de enlazarse a LuxS e impedir su función, o a que ellos interferirían en el sistema de transporte que emplea la bacteria para la captación de AI-2 del ambiente (WIDMER *et al.* 2007).

De otro lado, y recientemente algunos ácidos grasos encontrados en bacterias gram negativas han sido identificados como *diffusible signal factors* (DSF, por sus siglas en ingles) en los sistemas de QS; además de las moléculas de señalización y autoiductores que fueron mencionados en el capítulo 1. Las DSF son un grupo de ácidos grasos de 10, 12 y 14 átomos de carbono, algunos con insaturaciones en el carbono 2 o 4, con configuración *cis* en el doble enlace, y algunos con un grupo isopropilo terminal. Estas moléculas inicialmente fueron encontradas en *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (*Xcc*) y han sido consideradas como moléculas de señalización de QS, por ser encontradas en bacterias gram negativas que producen patogenicidad. En *Xcc* se encontró que las DSF inducen la producción de proteasas y endoglucanasas (DENG *et al*., 2011). La actividad de estas moléculas frente a la modulación de sistemas de QS es atribuida a la configuración del doble enlace en el átomo C-2. En estudios de actividad sobre genes que expresan virulencia controlados por el ácido *cis*-11-metil-2-dodecenoico (11-Me-C_{12}:Δ^2) en *Xcc*, se encontró que la configuración *cis* de este doble enlace en C-2 aumenta considerablemente la actividad en comparación a cuando se utilizaba el ácido con

configuración *trans* o el ácido saturado. Pero este comportamiento no puede ser extrapolado a otros sistemas u otras bacterias.

En *Stenotrophomonas maltophilia,* por ejemplo, tanto el ácido *cis*-11-metil-2-dodecenoico como su derivado saturado (ácido 11-metildodecenoico) son igual de efectivos estimulando la translocación independiente de flagelos. En *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae,* que expresa exopolisacaridos regulados por QS, se encontró que tanto las los ácidos de 12 átomos con la insaturación en C-2, y con y sin sustituciones metilo en el C-11, mostraron similar actividad, sugiriendo que la actividad no se afecta por la presencia o ausencia del metilo en C-11. En esta última bacteria, el ácido 11-Me-C_{12}:$\Delta^{2,5}$, mostró reducir la actividad en la producción de exopolisacáridos (DENG *et al*., 2011).

El ensayo de IQS de de las fracciones de ácidos grasos de las esponjas *S. tubulosa* e *I. felix* presentaron moderada actividad IQS en *Chromabecarium violaceum* ATCC 31532. No obstante no se evaluó ningún compuesto por separado, por lo que no es posible individualizar el o los ácidos grasos responsables de la actividad IQS. Siendo muy importante resaltar que cuando se evaluó la mezcla esterificada la actividad se perdió, indicando que la presencia del grupo OH del ácido es fundamental para la actividad.

Como se mencionó antes la presencia de grupo metilos, incluyendo los que tienen terminación *iso-,* e insaturacion en C-2 y C-4 de la cadena del ácido graso pueden afectar significativamente la modulación de QS en diferentes bacterias, siendo así que la actividad puede aumentar o disminuir. En este orden de ideas, en ambas especies de esponjas se detectaron ácidos grasos metilados, a los cuales se les podría atribuír la actividad IQS en *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532; no obstante se deben llevar a cabo experimentos que respalden esta hipótesis. Adicionalmente, no se encontraron ácidos insaturados en C-2 o C-4, y éstos son muy poco comunes en Porifera. Entre los ácidos grasos identificados en ambas esponjas, el ácido palmítico, el ácido esteárico y el ácido oleico han sido identifcados como inhibidroes del QS en la cepa *V. harveyii* BB170. De ellos, el primero en mención es el más abundante en ambas especies. La actividad IQS que presentan las fracciones de ácidos grasos libres de las esponjas *S. tubulosa* e *I. felix* frente *C. violaceum* ATCC 31532 podría atribuirse a estos compuestos ó a otros ácidos grasos presentes, no obstante falta experimentos, lo anterior teniendo en cuenta que no se trata del mismo biosensor en el que la actividad de los ácidos grasos puros fue encontrada.

El epidioxiesterol **1** de*Svenzea tubulosa* no mostró actividad IQS a pesar de venir de una fracción altamente activa constituida por otro tipo de esteroides minoritarios. Para los compuestos esteroidales no se le ha demostrado actividad IQS, lo que concuerda con los resultados obtenidos aquí. La actividad que presentó la fracción

puede ser debida a la presencia de compuestos minoritarios que no fueron identificados en este trabajo.

De otro lado la mezcla rica en furanosesterterpenos de *I. felix* mostró ser promisoria en la disrupción del QS, puesto que no inhibió el crecimiento del biosensor y es moderadamente activa. Se esperaba que la actividad IQS de los componentes de esta fracción fuera potente, dada la relación estructural de estos terpenos con las AHLs, y otras moléculas activas IQS como las furanonas halogenadas, la manoalida y análogas de esta. El ensayo con los compuestos purificados no se pudo llevar a cabo dada la inestabilidad de estos compuetos al ser purificados. Por lo anterior se procedió a acetilarlos, y a realizar el ensayo con la mezcla, encontrando que no resultaron activos. Lo mismo fue observado cuando se ensayaron cada uno de las compuestos acetilados separados. De todo lo anterior se deduce que la hidroxilación en el C-22, en los furanosesterterpenos, es determinante en la inhibición de QS ya que la naturaleza química del anillo lactona sin acetilar, por su efecto resonante, puede contribuir a interacciones entre estas moleculas y las proteínas tipo LuxR en *C. violaceum*, contribuyendo de esta forma a la inhibición de QS. Se ha determinado que los buenos aceptores de Michael en δ-lactonas insaturadas son mejores inhibidores de QS (BRACKMAN *et al*., 2011), lo que se esperaría para el compuesto sin acetilar y no en el acetilado, en cuyo caso el carbocation en ε estaría impedido y estabilizado por el carbonilo del acetilo evitando que actue como un aceptor de Michael.

Estos resultados están de acuerdo con lo encontrado por Zea et al. en 1990, en el que se propone que estos compuestos tienen una ventaja adaptativa para la esponja, pues se encuentran en una mayor concentración en la parte pertiferica de la esponjas, y aumenta su concentración al manipular la esponjas (ZEA *et al.,* 1990). El papel de estos compuestos puede ser no sólo como antibióticos y antimicrobianos, sino también como inhibidores de QS a bajas concentaciones.

4.4 CONCLUSIONES

De las esponjas *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix* se logró aislar sustancias inhibidoras de QS. En ambas esponjas se encontraron como sustancias activas ácidos grasos con cadena entre 14 y 26 átomos de carbonos.

Adicionalmente, de la esponja *Ircinia felix* se aisló una fracción rica en furanosesterterpenos que presentó actividad IQS moderada, sin afectar el crecimiento del biosensor. Estructuralmente estos furanosesterterpenos están relacionados con las AHLs y otros IQS; lo anterior puede explicar la actividad IQS contra *C. violaceum* ATCC 31532, sugiriendo un mecaniosmo de acción similar y que será dependiente de la presencia de un hidroxilo en el carbono 22. No obstante se

requiere mayor experimentación para conocer el verdadero potencial de estos compuestos como IQS aprovechables por el hombre.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

BARROW, C. J.; BLUNT, J. W.; MUNRO, M. H. G.; PERRY, N. B. Oxygenated furanosesterterpene tetronic acids from a sponge of the genus *Ircinia*. *J Nat Prod.* 1988, 51(6):1294-1288.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; MUNRO, M. H. G.; NORTHCOTE, P. T.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. *Nat Prod Rep*. 2011, 28(2):196-268. Y referencias anteriores de la misma serie.

BRACKMAN, G.; COS, P.; MAES, L.; NELIS, H. J.; COENYE, T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011. 55(6):2655-2661.

CARBALLEIRA, N. M.; SHALABI, F.; CRUZ, C.; RODRIGUEZ, J.; RODRIGUEZ, E. Comparative study of the fatty acid composition of sponges of the genus *Ircinia*. Identification of the new 23-methyl-5,9-tetracosadienoic acid. *Comp Biochem Physiol B*. 1991, 100(3):489-492.

CASTELLANOS, L.; MAYORGA, H.; DUQUE, C. Study of the chemical composition and antifouling activity of the marine sponge *Cliona delitrix* extract. *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*. 2010, 17(2):209-224

CASTELLANOS, L.; ZEA, S.; OSORNO, O.; DUQUE, C. Phylogenetic analysis of the order Halichondrida (Porifera, Demospongiae), using 3β-hydroxisterols as chemical character. *Biochem Syt Ecol*. 2003, 31:1163-1183.

CIMINO, G.; DE STEFANO, F.; MINALE, L.; FATTORUSSO, E. Ircinin-1 and -2, linear sesterterpenes from the marine sponge *Ircinia oros. Tetrahedron*. 1972, 28(2):333-341.

DAVIS, R.; CAPON, C. Two for One: Structure revision of the marine sesterterpene tetronic acid strobilinin to (8*Z*,13*E*,20*Z*)-strobilinin and (8*E*,13*Z*,20*Z*)-strobilinin. *Aust J Chem*. 1994, 47(5):933-936

DENG, Y.; WU, J.; TAO, F. ZHANG, L-H. Listening to a new language: DSF-Based quorum sensing in gram-negative bacteria. *Chem Rev*. 2011, 111 (1): 160–173.

DUQUE, C.; BONILLA, A.; BAUTISTA, E.; ZEA, S. Exudation of low molecular weight compounds (thiobismethane, methyl isocyanide, and methyl isothiocyanate) as a possible chemical defense mechanism in the marine sponge *Ircinia felix*. *Biochem Syst Ecol.* 2001, 29(5):459-467).

FAULKNER. D. J. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 1988, 5(6)-613-663.

FUSETANI, N. Antifouling marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2011, 28:400-410.
GONZÁLEZ, A.; LÓPEZ, M.; SAN MARTÍN, A. On the stereochemistry and biogenesis of C_{21} linear furanoterpenes in *Ircinia* sp. *J Nat Prod*. 1983, 46(2):256-261.

HAY, M . E. Marine chemical ecology: Chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annu Rev Mar Sci.* 2009, 1:193-212.

KATO, Y.; FUSETANI, N.; MATSUNAGA, S.; HASHIMOTO, K. Okinonellins A and B, two novel furanosesterterpenes, which inhibit cell division of fertilized starfish eggs, from the marine sponge*Spongionella* sp. *Cell Mol Life Sci.* 1986, 42(11-12):1299-1300.

KERNAN, M. R.; CAMBIE, R. C. Chemistry of sponges, XI.[1] 22-deoxwariabilin, a new sesterterpene from the sponge *Thorecta* sp. *J Nat Prod*. 1991, 54(1):265-268.

KOBORI M.; YOSHIDA M.; OHNISHI-KAMEYAMA M.; TAKEI T.; SHINMOTO H. 5α,8α-Epidioxy-22*E*-ergosta-6,9(11),22-trien-3β-ol from an edible mushroom suppresses growth of HL60 leukemia and HT29 colon adenocarcinoma cells. *Biol Pharm Bull.* 2006. 29(4):755-759.

KONG, F.; BURGOYNE, D. L.; ANDERSEN, J.; ALLEN, T. M. Pseudoaxinellin, a cyclic heptapeptide isolated from the Papua New Guinea sponge *Pseudoaxinella massa*. *Tetrahedron Lett*. 1992, 33(23):3269-3272.

LAMORAL-THEYS, D.; FATTORUSSO, E.; MANGONI, A.; PERINU, C.; KISS, R.; COSTANTINO, V. Evaluation of the antiproliferative activity of diterpene isonitriles from the sponge *pseudoaxinella flava* in apoptosis-sensitive and apoptosis-resistant cancer cell lines. *J Nat Prod*. 2011, 74(10):2299-2303.

LAMORAL-THEYS, D.; FATTORUSSO, E.; MANGONI, A.; PERINU, C.; KISS, R.; COSTANTINO, V. Evaluation of the antiproliferative activity of diterpene isonitriles from the sponge *Pseudoaxinella flava* in apoptosis-sensitive and apoptosis-resistant cancer cell lines. *J Nat Prod*. 2011, 74(10):2299-2303).

MANES, L. W.; CREWS, P. The use of two-dimensional NMR and relaxation reagents to determine stereochemical features in acyclic sesterterpenes. *J Nat Prod.* 1986, 49(5):787-793.

MARTINEZ, A. Estudio químico y de actividad biológica de esponjas marinas colombianas del genero *Ircinia.* Tesis de Doctorado en Ciencias – Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia. 1996.

MARTINEZ, A.; DUQUE, C.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Variabilin 11-metiloctadecanoate, a branched-chain fatty acid ester of furanosesterpene tetronic acid, from sponge *Ircinia felix. Nat Prod Lett.* 1995, 6:281-284.

MARTINEZ, A.; DUQUE, C.; SATO, N. FUJIMOTO, Y. (8*Z*,13*Z*,20*Z*)-stronbolinin and (7*Z*,13*Z*,20*Z*)-felixinin: New furanosesterpene tetronic acid from marine sponge of genus *Ircinia. Chem Pharm Bull.* 1997, 45(1):181-184.

MAYER, A. M. S. Disponible en http://marinepharmacology.midwestern.edu/index.htm. Consultado en Noviembre, 18 del 2011.

MURRAY, L.; SIM, A. T. R.; ROSTAS, J. A. P.; CAPON, R, J. Isopalinurin: a mild protein phosphatase inhibitor from a southern australian marine sponge, *Dysidea* sp. *Aust J Chem*. 1993, 46(8): 1291-1294.

ORTIZ, M.; RODRIGUEZ, A. D. Palominin, a novel furanosesterterpene from a Caribbean sponge *Iricinia sp. Tetrahedron*. 1990, 46(4): 1119-1124.

QUINTANA, J.; CASTELLANOS, L.; ARÉVALO, C. Adaptación de una técnica para la evaluación de la actividad inhibitoria de *quorum sensing* de extractos de organismos marinos. Trabajo de grado en Química. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá – Colombia. 2008.

RODRÍGUEZ, W.; OSORNO, O.; RAMOS, F. A.; DUQUE, C.; ZEA, S. New fatty acids from Colombian Caribbean Sea sponges. *Biochem Syst Ecol*. 2010, 38, 774–783.

SJÖSTRAND. U.; KORNPROBST, J. M.; DJERASSI, C. Minor and trace sterols from marine invertebrates 29. (22E)-ergosta-5,22,25-trien-3β-ol and (22E,24R)-24,26-dimethylcholesta-5,22,25(27)-trien-3β-ol. Two new marine sterols from the sponge *Pseudopxinella lunachata*. *Steroids*. 1981, 38(3):355-364.

STOWE, S. D.; RICHARDS, J. J.; TUCKER, A. T.; THOMPSON, R.; MELANDER, C.; CAVANAGH, J. Anti-Biofilm compounds derived from marine sponges. *Mar Drug.* 2011, 9(10):2010-2035.

WIDMER, K.W.; SONI, K. A.; HUME, M. E.; BEIER, R. C.; JESUDHASAN, P.; PILLAI, S. D. Identification of poultry meat-derived fatty acids functioning as quorum sensing signal inhibitors to Autoinducer-2 (AI-2). *J Food Sci.* 2007, 72(9):M363-M368.

ZEA, S.; PARRA, F. J.; MARTINEZ, A.; DUQUE C. Production of bioactive furanosesterterpene tetronic acids as possible internal chemical defense mechanism in the sponge *Ircinia felix* (Porifera: Desmospongiae). *Memoirs of Queensland Museum.* 1997, 44:687-696.

Conclusiones y Recomendaciones

Los resultados de la evaluación de la actividad IQS de los extractos ensayados, 48 de especies marinas y cuatro de plantas, sugieren que las especies marinas, particularmente las esponjas, son una fuente importante de compuestos IQS, y que se deben abordar estudios de bioprospección más ambiciosos que permitan identificar nuevas fuentes de compuestos con esta actividad, lo que permitirá valorar de mejor manera nuestra biodiversidad. Adicionalmente, se estableció que entre las especies evaluadas los extractos de *Svenzea tubulosa, Ircinia felix, Neopetrosia carbonaria* y *Cecropia pachystachya* son los más activos como inhibidores de QS sin mostrar actividad antibacteriana. Por lo que su estudio químico debe ser abordado con el fin de identificar los compuestos responsables de dicha actividad. Estos compuestos pueden encontrar aplicación en la industria naviera que busca evitar la colonización de superficies sumergidas sin causar efectos tóxicos sobre los organismos colonizadores, o en la industria farmacéutica, por su aplicación como medicamentos antipatogénicos.

De otro lado también se identificaron extractos de organismos marinos que tienen actividad antibacterial contra *C. violaceum* ATCC 31532. Entre los organismos marinos, las esponjas *Cliona tenuis* y *Ptilocaulis walpersi*; las algas *Laurencia catarinensis, Laurencia obtusa*, *Dictyota* sp1 y *Dictyota* sp2; y las cianobacterias *Oscillatoria nigro-viridis,* y los *mats* conformados por *Blennothrix glutinosa* (70%) + *Lyngbya* sp (30%), y *Symploca hydnoides* (80%) + *Phormidium* sp (20%) son promisorios en la búsqueda de sustancias antimicrobianas y/o citotóxicas.

La fracción metanólica de *Cecropia pachystachya* Trécul, que mostró excelente actividad en la inhibición de *quorum sensing* contra *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532 y *Escherichia coli* pSB403, está constituida por compuestos fenólicos. El fraccionamiento por CLAE de esta fracción permitió el aislamiento de 9 compuestos, de los cuales 6 fueron activos y corresponden a: el ácido clorogénico, la isoorientina, la orientina, la isovitexina, la vitexina y la rutina. Estos compuestos mostraron ser capaces de inhibir los sistemas de QS de los dos biosensores empleados y estar en altas concentraciones en las hojas de la planta. Este hecho hace que los compuestos de *C. pachystachya,* y sus fracciones, puedan ser considerados como excelentes candidatos para la realización de estudios tecnológicos que permitan su aplicación como inhibidores de QS, por ejemplo en el campo de pinturas anti*fouling* y

dentrificos. Se recomienda realizar ensayos de inhibición de biopelículas para los compuestos aislados, y evaluar la fracción metanólica de *C. pachystachya* como aditivo de pinturas anti*fouling* en ensayos en campo. Debido a que Colombia presenta una gran diversidad de especies de *Cecropia* se recomienda el estudio químico de estas especies en cuanto a la actividad IQS de sus fracciones y sus constituyentes. Así mismo, se recomienta el estudio de especies de *Passiflora* como fuente de compuestos IQS por tambien presentar ellas flavonoides *C*-glicosidados.

De las esponjas *Svenzea tubulosa* e *Ircinia felix* se logró aislar sustancias inhibidoras de QS. En ambas esponjas se encontraron como sustancias activas ácidos grasos con cadena laterales entre 14 y 26 átomos de carbonos. Algunos de ellos con reconocida actividad IQS frente a algunas bacterias biosensoras, como los ácidos palmítico, esteárico y oléico. Adicionalemente, de la esponja *Ircinia felix* se aisló una fracción rica en furanosesterterpenos que presentó actividad IQS moderada, sin afectar el crecimiento de *C. violaceum*. La estructura de estas moléculas es similar a las AHLs, moléculas autoinductoras de QS en bacterias gram negativas, lo que puede explicar la actividad detectada en estos compuestos.

Se recomienda continuar con estudios mecanisticos de la forma de acción de los compuetos más activos (mezcla de furanosesterterpenos, rutina y flavonoides *C*-glicosidados). La aplicación tecnológica de estos compuestos estará limitada al encuentro de nuevas fuentes sustentables de algunos de ellos. Este problema no se tiene en el casos de los flavonoides de *Cecropia pachystachya,* puesto que están presentes en especies del género *Passiflora*, para algunas de las cuales ya se tienen cultivos industrializados.

Producción Científica

Articulo sometido

MARINE ORGANISMS AS SOURCE OF EXTRACTS TO DISRUPT BACTERIAL COMMUNICATION. Jairo I. QUINTANA B., José BRANGO-VANEGAS., Leonardo CASTELLANOS H., Catalina ARÉVALO F., Carmenza DUQUE. Revista Vitae. 2011

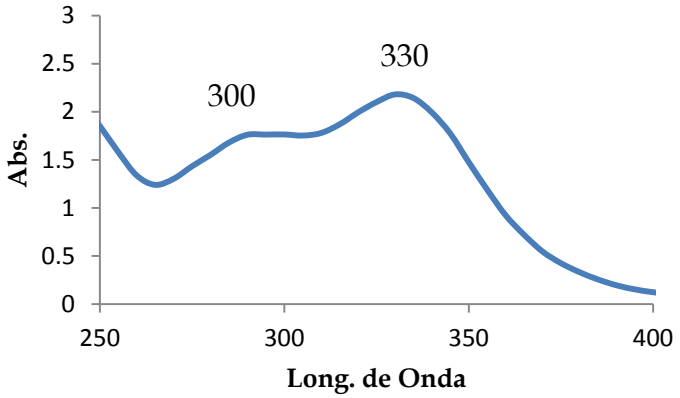
Ponencia Oral

EXTRACTOS DE ESPONJAS DEL CARIBE COLOMBIANO INHIBEN EL *QUORUM SENSING* (QS) EN *Chromobacterium violaceum* ATCC 31532. José BRANGO-VANEGAS; Leonardo CASTELLANOS HERNÁNDEZ; Catalina AREVALO-FERRO; Freddy RAMOS RODRÍGUEZ. SIMPOSIO TALLER. LAS CIENCIAS DEL MAR EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA Universidad Nacional de Colombia sede Caribe, CECIMAR, Santa Marta. 2011.

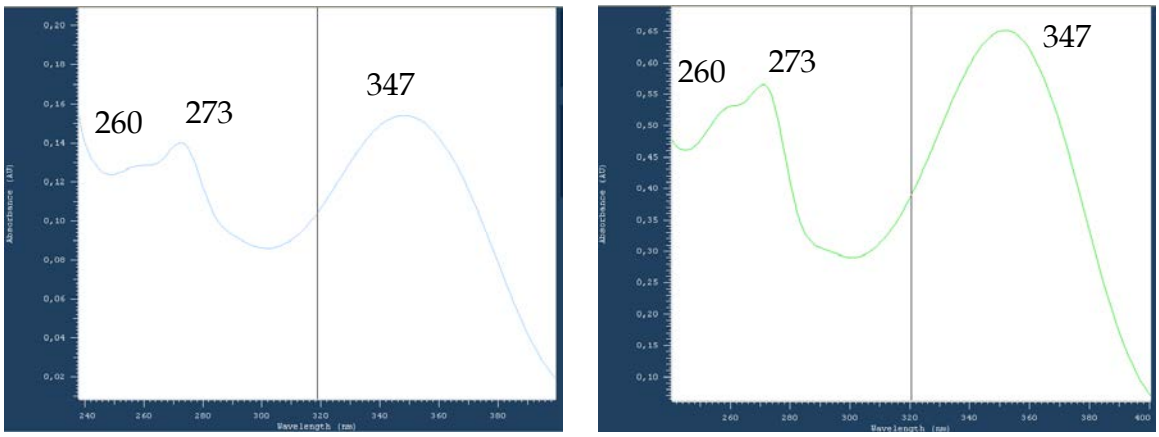
Participación en Congresos

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE *QUORUM SENSING* DE EXTRACTOS DE ORGANISMOS MARINOS. Leonardo CASTELLANOS HERNÁNDEZ, Jairo Iván QUINTANA BULLA, José Feliciano BRANGO VANEGAS, Catalina ARÉVALO FERRO. XXIX Congreso Latinoamericano de Química – CLAQ 2010. Modalidad de POSTER. Cartagena 2010.

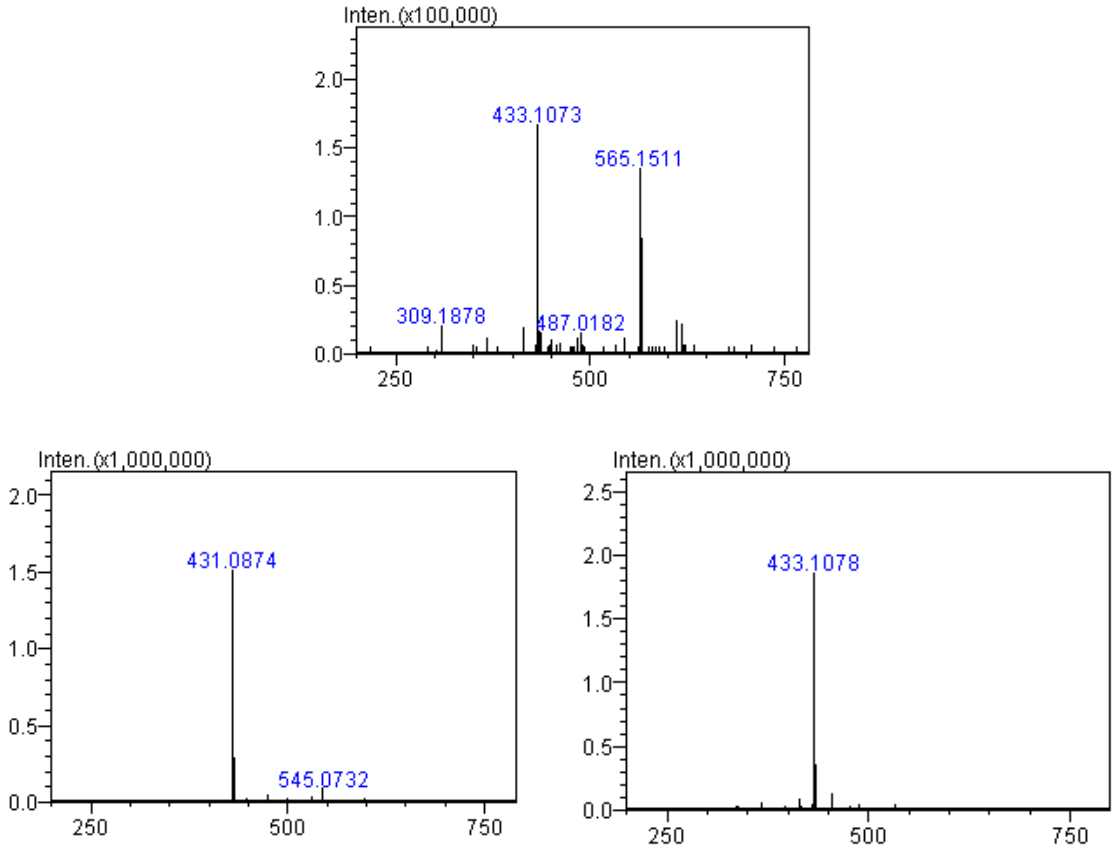
AnexoA: Anexos del Capítulo 3



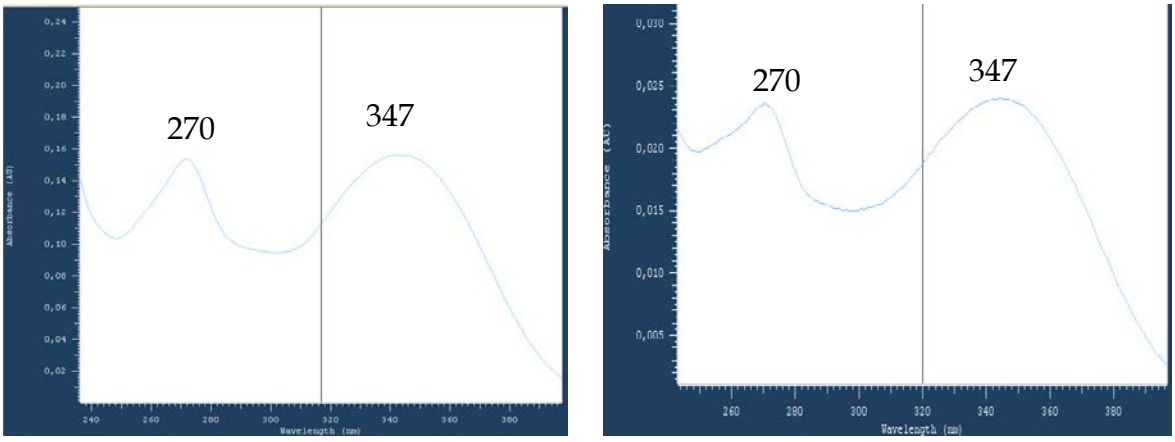
Anexo AI Espectro de UV registrado en metanol para el compuesto **2**



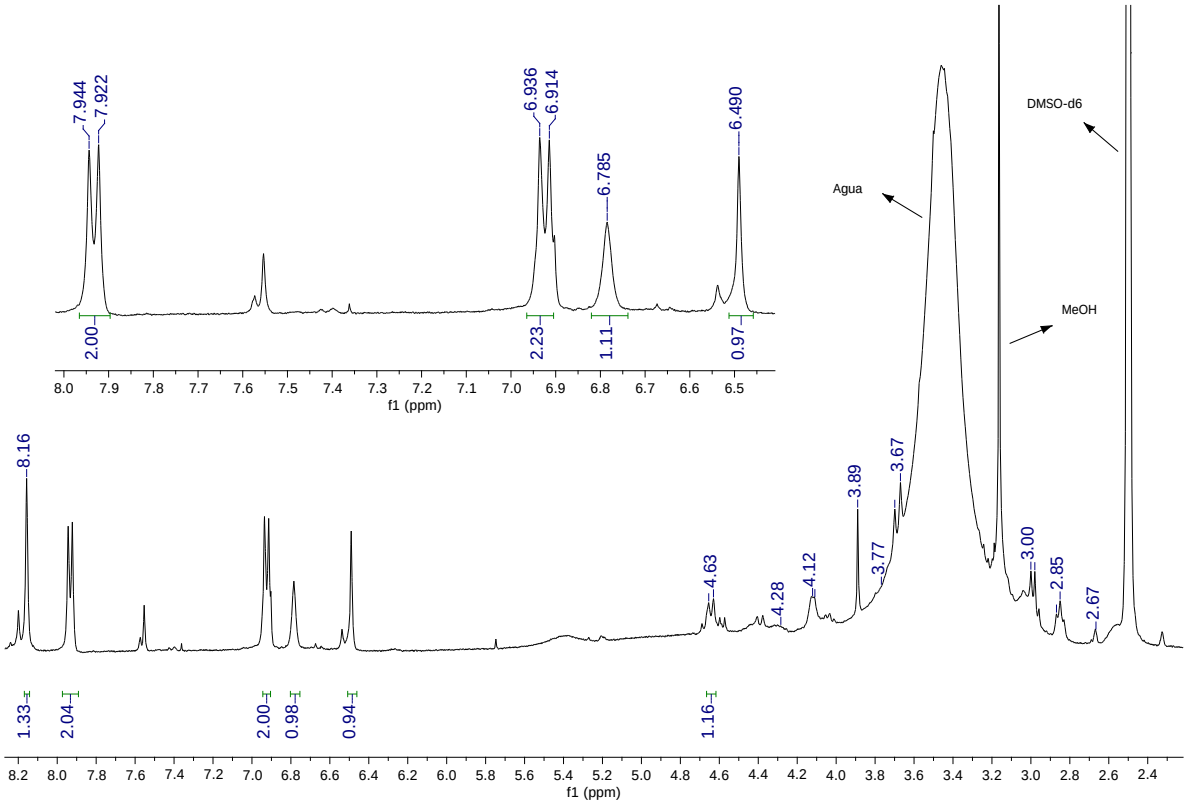
Anexo AII Espectros de ultravioleta para los compuestos, **3 (**izquierda) y compuesto **4** (derecha)



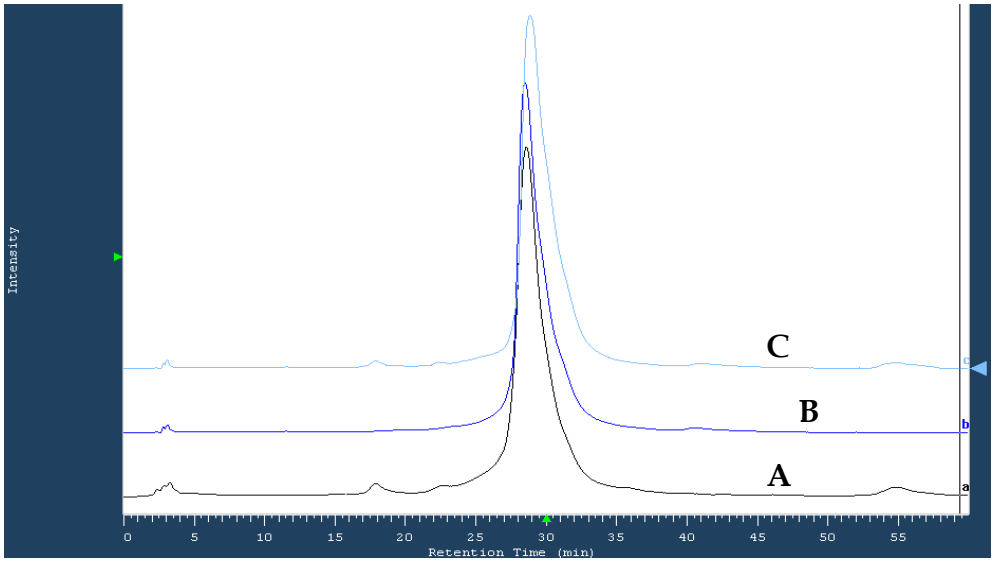
Anexo AIII Espectros de HRESIMS para los compuestos, **6** (arriba, en modo positivo) y **7** (abajo, izquierda: modo positivo; derecha: modo negativo)



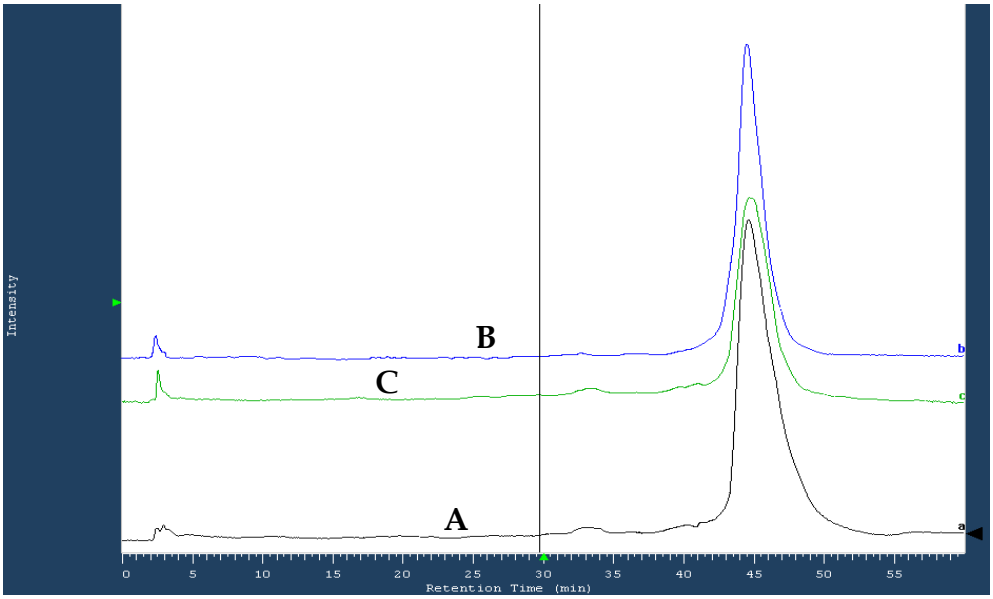
Anexo AIV Espectros de ultravioleta para los compuestos, **6 (**izquierda) y compuesto **7** (derecha)



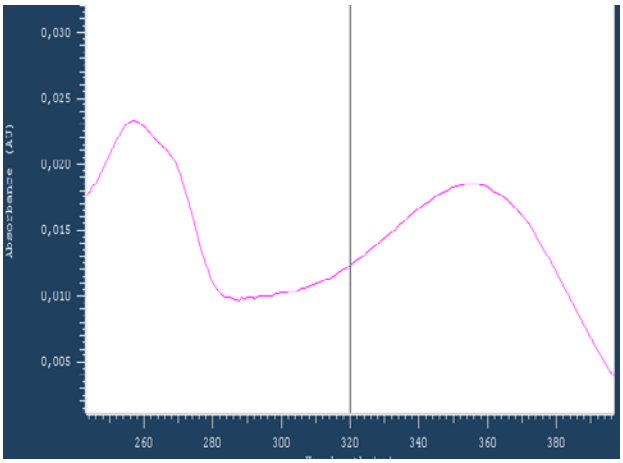
Anexo AV Espectro de RMN ^{1}H para el compuesto **6** registrado en DMSO-d_6



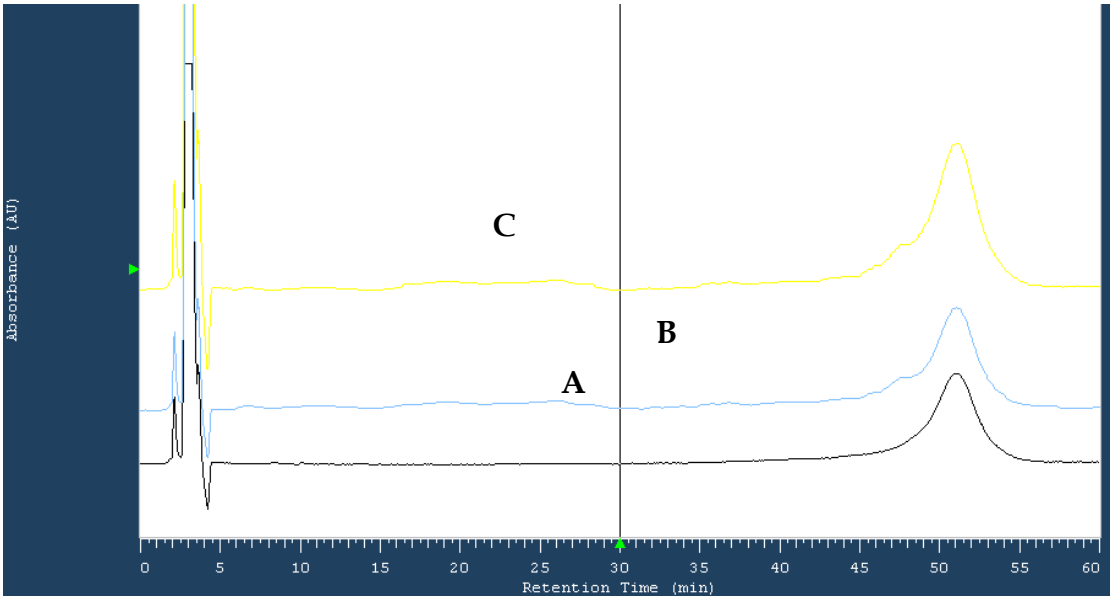
Anexo AVI Perfiles cromatograficos de: **(A)** Compuesto **6**, tr. 28.51 min; **(B)** Patrón de isovitexina, tr. 28.50 min; **(C)** Mezcla del compuesto **6** y patrón de isovitexina, tr. 28.50 min



Anexo AVIII Perfiles cromatograficos de: **(A)** Mezcla del compuesto **7** y patrón de vitexina, tr. 44.61 min; **(B)** Patrón de vitexina, tr. 44.60 min; **(C)** Compuesto **7,** tr. 44.62 min

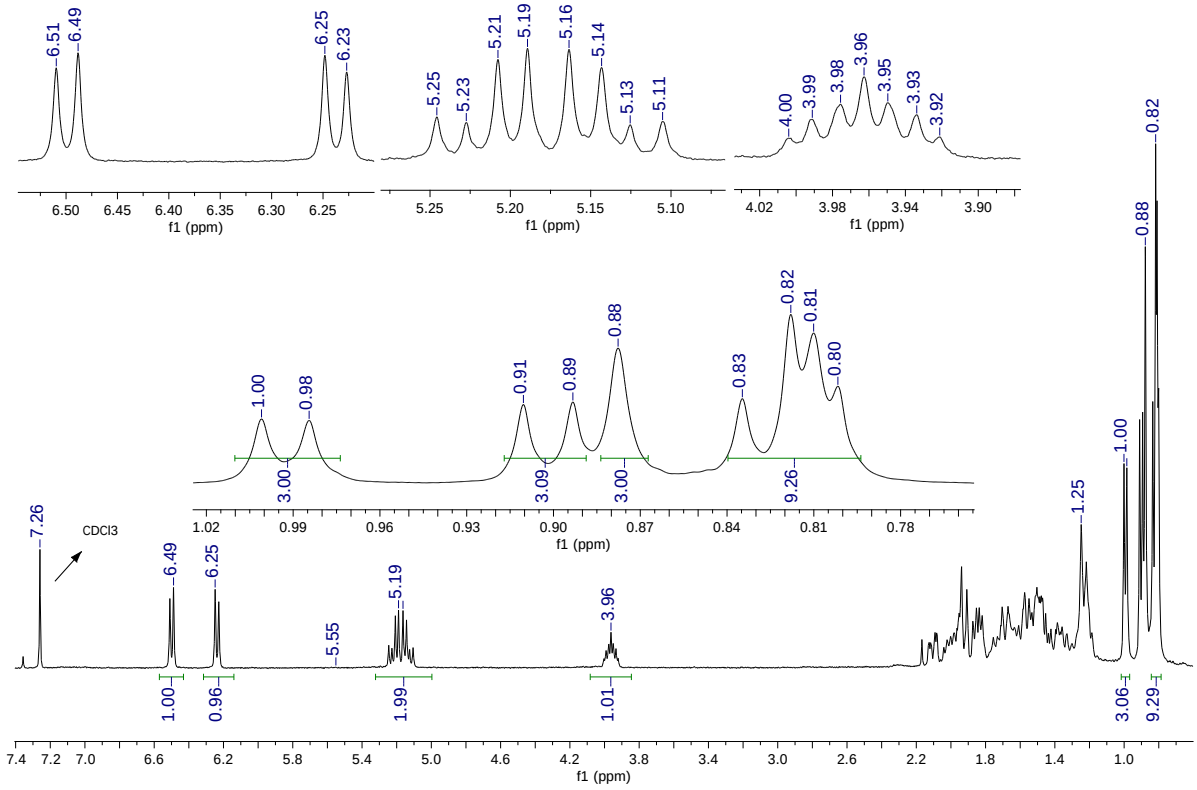


Anexo AIX Espectro de UV para el compuesto **9**

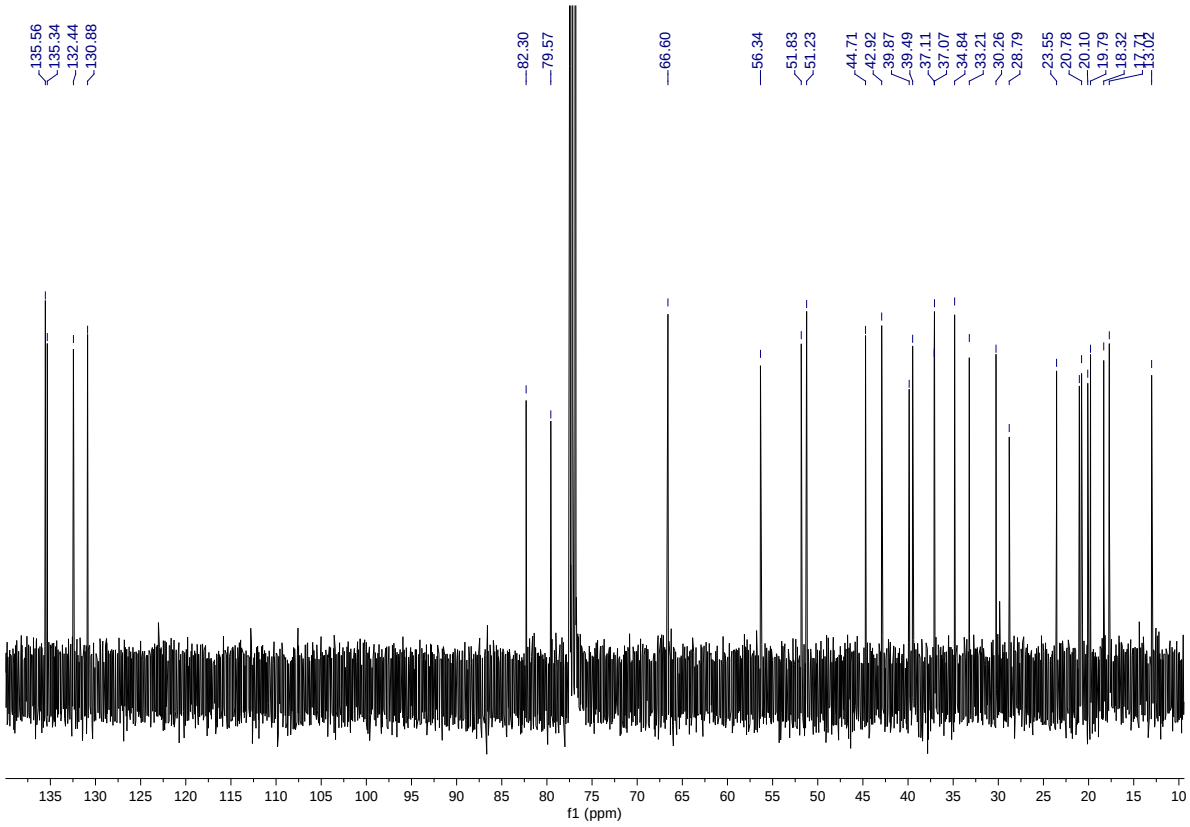


Anexo AX Perfiles cromatograficos de: **(A)** patrón de rutina, tr. 51.5 min; **(B)** Compuesto **9,** tr. 51.5 min; **(C)** Mezcla del compuesto **9** y patrón de rutina, tr. 51.5 min

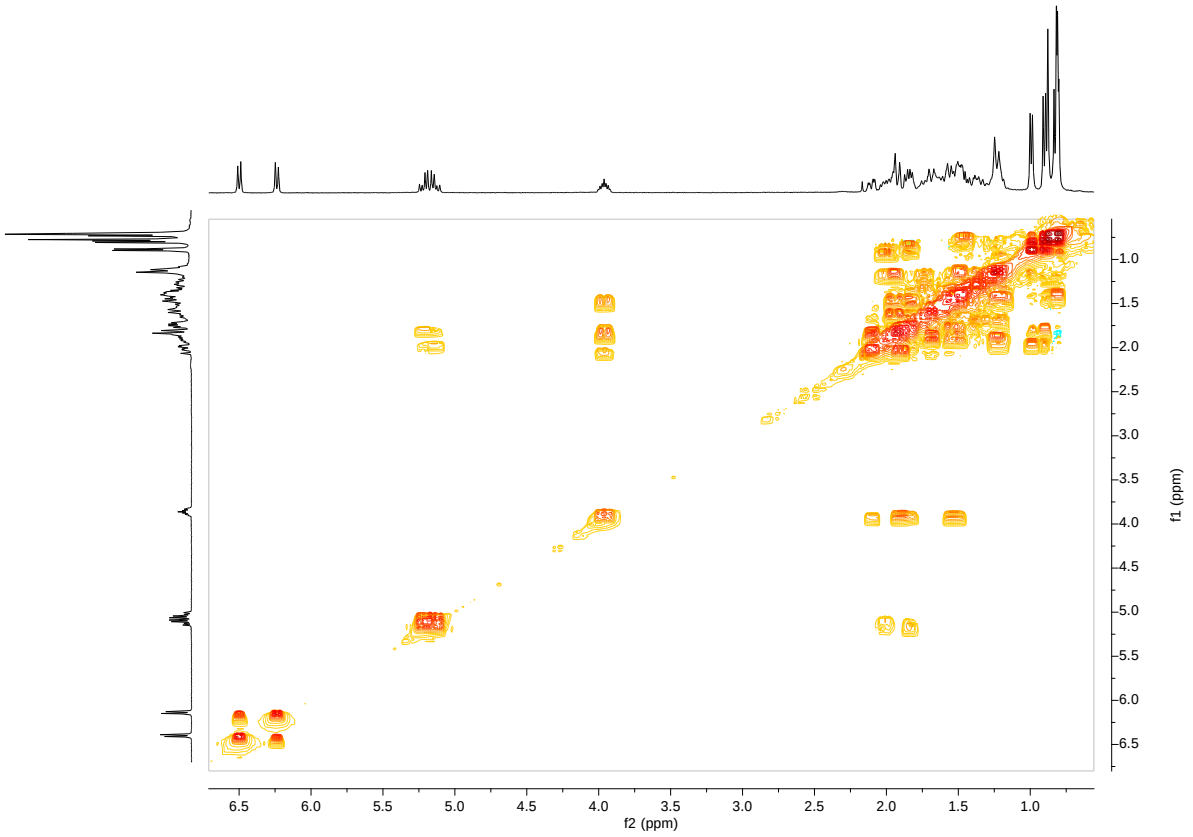
Anexo B: Anexos del Capítulo 4



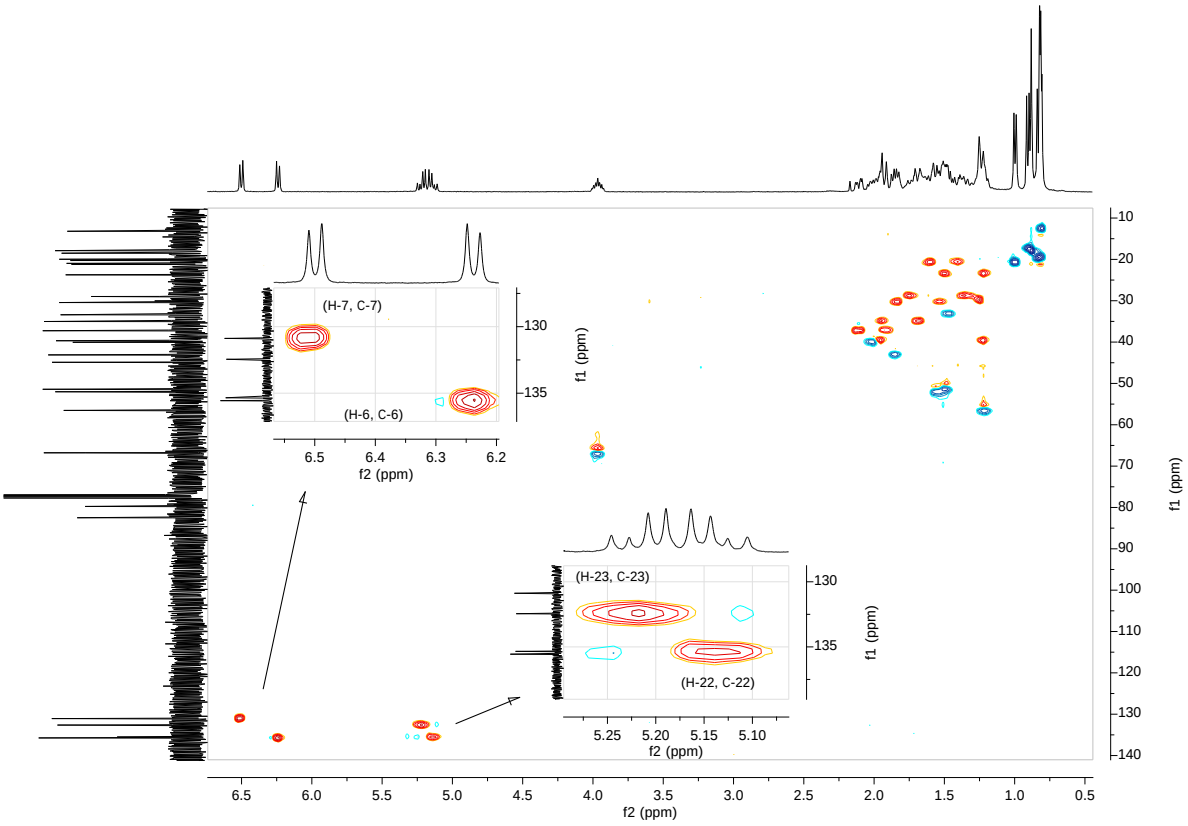
Anexo BI Espectro de RMN ^{1}H para el compuesto **1** de *Svenzea tubulosa* registrado en $CDCl_3$



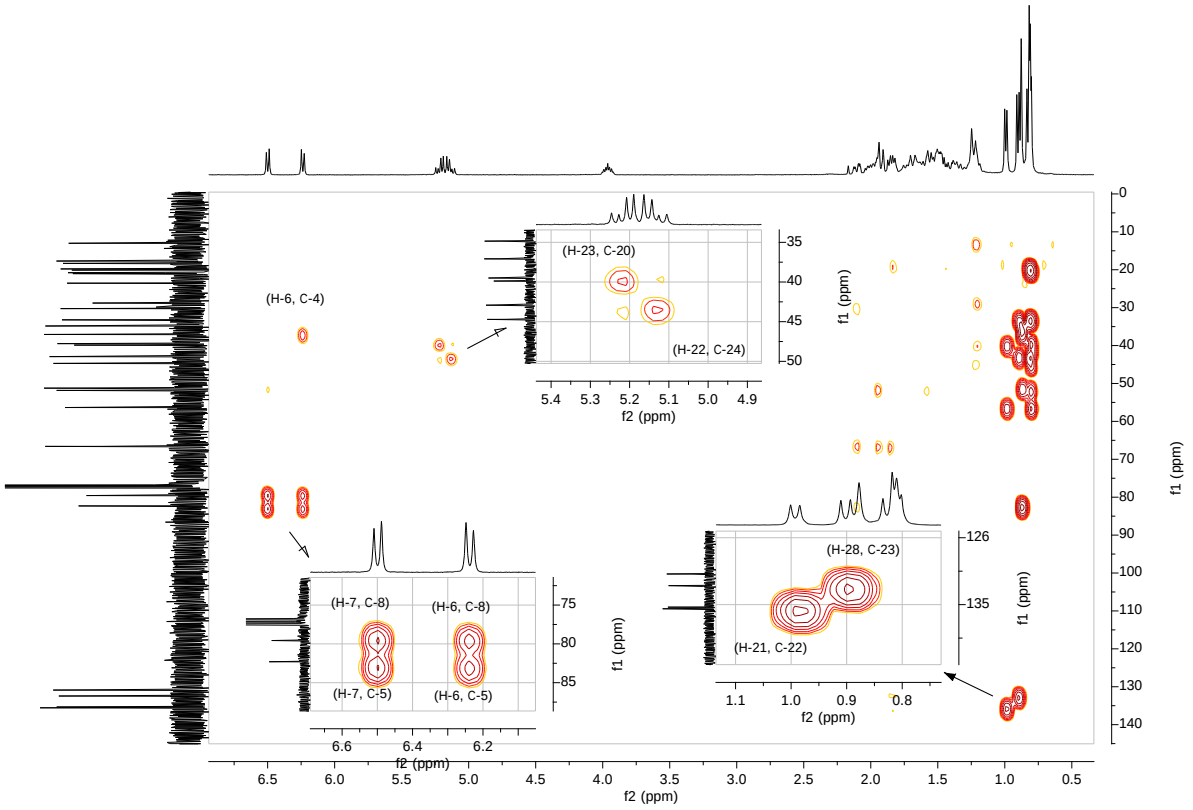
Anexo BII Espectro de RMN ^{13}C para el compuesto **1** de *Svenzea tubulosa* registrado en $CDCl_3$



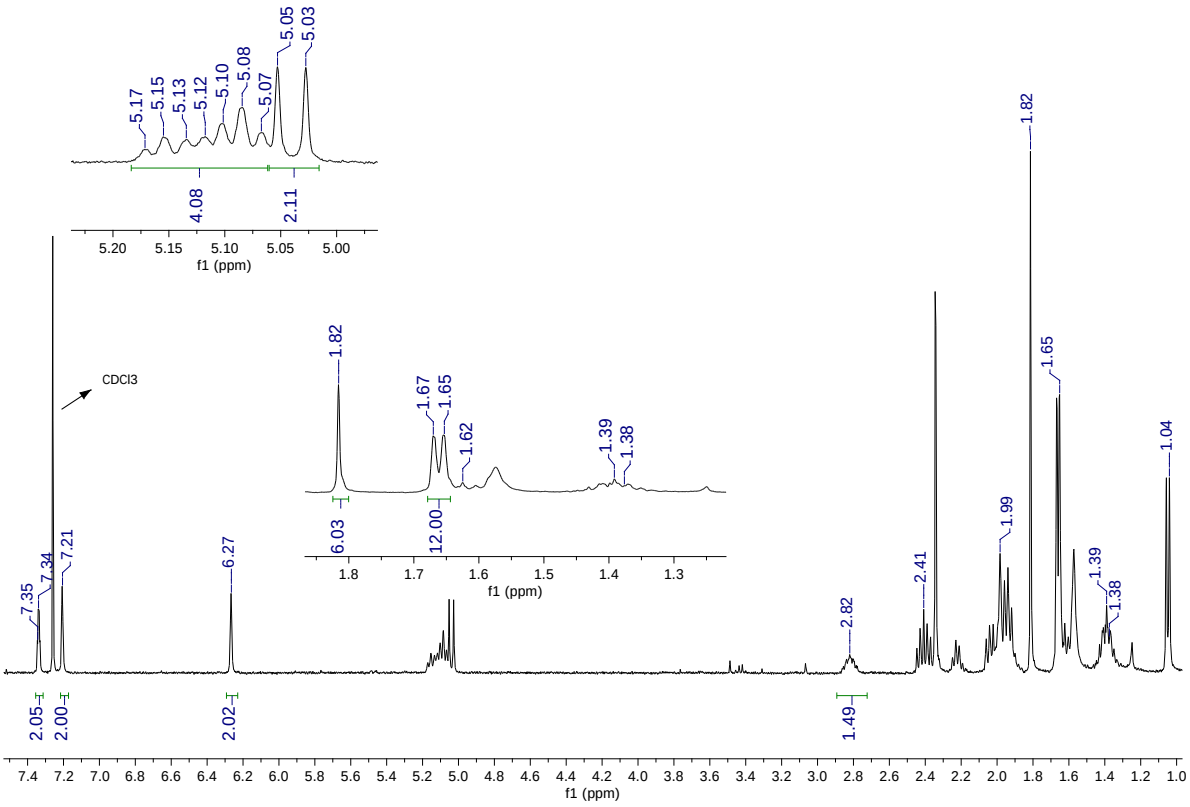
Anexo BIII Espectro COSY ^{1}H-^{1}H para el compuesto **1** de *Svenzea tubulosa*



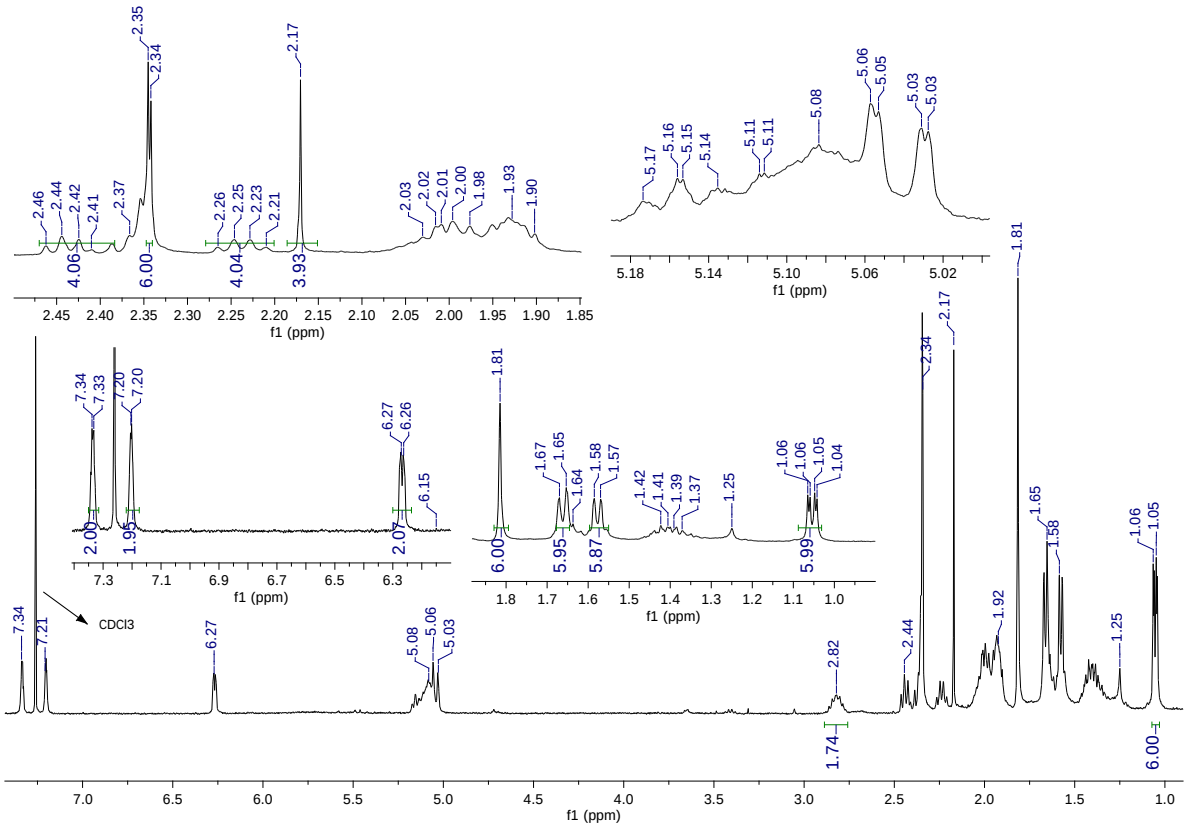
Anexo BIV Espectro de HSQC para el compuesto **1** de *Svenzea tubulosa*



Anexo BV Espectro de HMBC para el compuesto **1** de *Svenzea tubulosa*



Anexo BVI Espectro de RMN ^{1}H de la fracción I de la esponja *Ircinia felix*



Anexo BVII Espectro de RMN ^{1}H de la fracción II de la esponja *Ircinia felix*