

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RR. NN.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título universitario en:

INGENIERA E INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RR. NN.

TEMA:

ANÁLISIS QUÍMICO MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS Y
ESPECTROSCÓPICAS DE LOS ANTIBIÓTICOS PRODUCIDOS POR LAS
BACTERIAS *Micrococcus luteus* Y *Streptococcus* sp., AISLADAS DEL
SUELO.

AUTORES:

ARÉVALO PUETATE CARMEN GABRIELA

CRUZ MORENO RAÍ SEBASTIAN

DIRECTORA.

DRA. MALDONADO RODRÍGUEZ MARÍA ELENA

Quito, julio de 2020

Cesión de derechos de autor

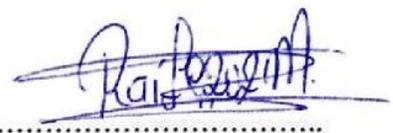
En nuestra facultad consciente, Arévalo Puetate Carmen Gabriela con documento de identificación N° 0401888326 y Cruz Moreno Raí Sebastian con documento de identificación N° 1724832900, autores del trabajo de titulación titulado: "Análisis químico mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas de los antibióticos producidos por las bacterias *Micrococcus luteus* y *Streptococcus* sp., aisladas del suelo", cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derecho patrimoniales en acuerdo a lo estipulado en la Ley de Propiedad Intelectual. Dicho trabajo se ha desarrollado para la obtención del título universitario: Ingeniera e Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales.

En concordancia, redacto este documento en la entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Arévalo Puetate Carmen Gabriela

C.I. 0401888326



Cruz Moreno Raí Sebastian

C.I. 1724832900

Declaración de coautoría del docente tutor/a

Yo, María Elena Maldonado Rodríguez, declaro que bajo mi asesoría se desarrolló el trabajo de titulación: "Análisis químico mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas de los antibióticos producidos por las bacterias *Micrococcus luteus* y *Streptococcus* sp., aisladas del suelo", realizado por Arévalo Puetate Carmen Gabriela y Cruz Moreno Raí Sebastian, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.



Maldonado Rodríguez María Elena

C.I. 1707743157

Dedicatoria

Dedicado a Dios por ser mi fortaleza en momentos de debilidad y dificultad; a mi familia, por ser mi motivación de cada día, en especial a mi padre Fabián, quien, en todos estos años con su trabajo, sacrificio y amor incondicional, hizo posible que hoy culmine mi carrera profesional, a mi madre Silvana, por enseñarme a que cada sacrificio tiene su recompensa, a mis abuelos, José y Carmen, por cada uno de sus consejos y oraciones para que siempre estuviera bien, a pesar de estar lejos de casa. A Raí por estar conmigo en todo momento, e iluminar mi vida a través de sus consejos, su amor, y paciencia para hoy estar cumpliendo juntos esta meta anhelada.

Gabriela

Dedicado a mi padre Luis, mi guía durante toda mi vida, a pesar que juntos hemos pasado momentos difíciles, siempre hemos sido el apoyo incondicional uno del otro. A mi madre Mariana, mi ángel, a quien hace 7 años atrás prometí seguir adelante y obtener mi título profesional y desde donde me cuide hacerla sentir orgullosa por este logro. A mi hermano Luis, por ser un buen ejemplo en el ámbito social y académico, siempre saliendo adelante con mucho ánimo y contando con el apoyo familiar. A Gabriela, quien es una de las personas más importantes en mi vida, siendo mi compañera inseparable durante este transcurso universitario, brindándome siempre su apoyo incondicional con mucho amor, y siempre con los valores que la caracterizan como una excelente persona

Raí

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana por ser la sede de todo el conocimiento adquirido durante estos años. A cada uno de los docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales por sus conocimientos y experiencias brindadas a lo largo de nuestros estudios. Al Ing. Diego Guzmán por la colaboración al inicio de nuestro proyecto. Al PhD. Paco Noriega por brindarnos sus conocimientos durante la realización de nuestro proyecto. Al laboratorio de Ciencias de la Vida por facilitarnos los materiales e instalaciones para la realización de nuestro proyecto y a cada uno de su personal.

Nuestro agradecimiento a nuestra tutora PhD. María Elena Maldonado principal colaboradora durante todo el proceso, quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo del proyecto de investigación en del Grupo de Investigación BIOARN.

Yo Gabriela agradezco a Dios por permitir tener presente a mis abuelos José y Carmen, quienes han sido un pilar fundamental para tener los valores que hoy me caracterizan como persona, y me han sabido brindar su cariño y amor a través de la vida, a mi padre Fabián porque sin él esta meta no sería posible, y a cada uno de mis hermanos Leonardo, Diana, Alex y Carissa, porque sin sus palabras de aliento este camino no hubiera sido el mismo, gracias por confiar en mí.

Yo Raí doy mi más sincero agradecimiento a mis tíos Ramiro y Gladys por el apoyo incondicional y su amor durante cada etapa de mi vida universitaria, a mis padrinos Hugo y Susana que me han apoyado y estado pendiente en los momentos en los cuales más los he necesitado, a mi tía Cecilia por su comprensión y consejos que me han sabido sacar adelante con cada adversidad, a mi abuelita Beatriz por brindarme su apoyo día a día sin ningún prejuicio siempre cuidándome con la bendición de Dios.

Índice de contenido

Introducción	1
1. Marco conceptual.....	3
1.1. Microorganismos.....	3
1.1.1. Microorganismos en el suelo.....	3
1.2. Cepas productoras de antibióticos.....	4
1.2.1. Género <i>Micrococcus</i>	4
1.2.1.1. Especie <i>Micrococcus luteus</i>	4
1.2.2. Género <i>Streptococcus</i> sp.....	4
1.3. Antibióticos.....	5
1.3.1. Clasificación de los antibióticos.....	5
1.3.1.1. Según la estructura química.....	5
1.3.1.2. Según el espectro de acción.....	7
1.3.1.3. Según el mecanismo de acción.....	7
1.3.2. Producción de antibióticos.....	7
1.3.2.1. Tipos de biorreactores.....	7
1.3.3. Extracción de antibióticos.....	8
1.4. Análisis químico.....	9
1.4.1. Espectrofotometría infrarroja (IR).....	9
1.4.2. Cromatografía en capa fina (TLC).....	11
1.4.3. Espectrofotometría de masas (MS).....	12
1.5. Análisis microbiológico	13
1.5.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC).....	13
1.5.1.1. Microdilución en caldo.....	13
1.5.2. Bioautografía.....	14

2. Metodología.....	16
2.1. Reactivación de los microorganismos <i>Streptococcus</i> sp. y <i>Micrococcus luteus</i>	16
2.2. Producción de metabolito secundario en biorreactor.....	17
2.2.1. Preparación del preinóculo u overnight.....	17
2.2.1.1. Estandarización del inóculo.....	17
2.2.2. Inoculación de overnight en biorreactor.....	18
2.2.3. Centrifugación biomasa.....	19
2.3. Obtención de antibiótico.....	19
2.4. Análisis químico de los antibióticos.....	20
2.4.1. Espectrofotometría infrarroja (IR).....	20
2.4.1.1. Preparación de la muestra.....	20
2.4.1.2. Análisis de la muestra.....	21
2.4.2. Cromatografía en capa fina (TLC).....	21
2.4.3. Espectrometría de masas (MS).....	22
2.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	22
2.5.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC).....	22
2.5.1.1. Preparación de suspensión de microorganismos de control.....	22
2.5.1.2. Preparación de muestras estándar de antibióticos.....	23
2.5.1.3. Preparación del Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC).....	23
2.5.1.4. Microdilución en caldo.....	23
2.5.1.5. Adición de Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC).....	26
2.5.2. Bioautografía.....	26
2.5.2.1. Preparación de placa cromatográfica.....	26
2.5.2.2. Preparación de microorganismo control <i>Bacillus Spizizenii</i> ATCC 6633 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.....	26
2.5.2.3. Preparación del Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC).....	26
2.5.2.4. Técnica de inmersión.....	26

3. Resultados y discusión.....	28
3.1. Producción de antibiótico.....	28
3.2. Análisis químico de los antibióticos.....	29
3.2.1. Espectrofotometría infrarroja (IR).....	29
3.2.2. Cromatografía en capa fina (TLC).....	30
3.2.3. Espectrofotometría de masas (MS).....	32
3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	33
3.3.1. Bioautografía.....	33
3.3.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC).	34
3.3.2.1. Análisis del porcentaje de inhibición de <i>Bacillus spizizenii</i> frente al antibiótico PAP48	38
3.3.2.2. Análisis del porcentaje de inhibición de <i>Bacillus spizizenii</i> frente al antibiótico PAP49G3A.	39
3.3.2.3. Análisis del porcentaje de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiótico PAP48.	40
3.3.2.4. Análisis del porcentaje de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiótico PAP49G3A.	42
3.3.2.5. Análisis del porcentaje de inhibición del antibiótico PAP48 entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus spizizenii</i>	43
3.3.2.6. Análisis del porcentaje de inhibición del antibiótico PAP49G3A entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus spizizenii</i>	44
Conclusiones	46
Recomendaciones.....	47
Referencias bibliográficas	48
Anexos.....	57

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de antibióticos según su estructura química.....	6
Tabla 2. Diseño de la microplaca con las concentraciones de los antibióticos utilizados en µg/mL para microorganismos control ATCC 6633 y ATCC 9027.....	25
Tabla 3. Cantidad de antibiótico producido por cada microorganismo.	28
Tabla 4. Factor de retención de cada antibiótico (Ver Anexo 3 y Anexo 4).....	31
Tabla 5. Peso molecular del grupo de antibióticos β-Lactámicos.....	33
Tabla 6. Absorbancias de microplaca 1, usando el equipo Microplate Reader.....	35
Tabla 7. Absorbancias de microplaca 2, usando el equipo Microplate Reader.....	35
Tabla 8. Porcentaje de Inhibición de <i>Bacillus spizizenii</i> frente al antibiótico PAP48	36
Tabla 9. Porcentaje de Inhibición de <i>Bacillus spizizenii</i> frente al antibiótico PAP49G3A.....	36
Tabla 10. Porcentaje de Inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiótico PAP48.	37
Tabla 11. Porcentaje de Inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente al antibiótico PAP49G3A	37

Índice de figuras

Figura 1. Espectro electromagnético de infrarrojo IR entre 13000 cm^{-1} y 10 cm^{-1}	9
Figura 2. Infrarrojo medio entre 4000 cm^{-1} hasta 200 cm^{-1}	10
Figura 3. Grupos funciones en espectro de 4500 cm^{-1} a 650 cm^{-1}	10
Figura 4. Crecimiento de cepas PAP48 y PAP49G3 en medio de cultivo TSA.....	16
Figura 5. Obtención de overnight de PAP48 y PAP49G3 en medio ISP2.....	18
Figura 6. Preinóculo de cepas PAP48 y PAP49G3 en medio de cultivo ISP2.....	19
Figura 7. Diagrama del proceso de extracción de antibióticos.....	20
Figura 8. Diseño de microplaca 1 con <i>Bacillus spizizenii</i>	24
Figura 9. Diseño de microplaca 2 con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
Figura 10. Análisis del antibiótico PAP48 contra <i>Bacillus spizizenii</i>	39
Figura 11. Análisis del antibiótico PAP49G3A contra <i>Bacillus spizizenii</i>	40
Figura 12. Análisis del antibiótico PAP48 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
Figura 13. Análisis del antibiótico PAP49G3A contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
Figura 14. Análisis del porcentaje de inhibición del antibiótico PAP48 entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus spizizenii</i>	44
Figura 15. Análisis del porcentaje de inhibición del antibiótico PAP49G3A entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus spizizenii</i>	45

Índice de anexos

Anexo 1. Espectros Infrarrojos del Antibiótico producido por <i>Streptococcus</i> sp. con la presencia de grupo amino, hidroxilo, alcanos, alquenos.	57
Anexo 2. Espectros Infrarrojos del Antibiótico producido por <i>Micrococcus luteu</i> . con la presencia de grupo amino, hidroxilo, alcanos, alquenos y la presencia de anillo aromático.	58
Anexo 3. Cromatografía en capa fina (TLC) bajo luz UV a 254 nm – absorbancia (A), a 365 nm fluorescencia (B) de PAP48.	59
Anexo 4. Cromatografía TLC bajo luz UV a 254 nm – absorbancia (A), a 365 nm fluorescencia (B) de PAP49G3A.	60
Anexo 5. Espectrofometría de masas (MS) del antibiótico PAP48 en <i>R_f</i> de 0,10 con un peso molecular de 353,27 debido al salto de electrón por presencia de Ácido acético.	61
Anexo 6. Espectrofometría de masas (MS) del antibiótico PAP49G3A en <i>R_f</i> de 0,12 con un peso molecular de 413,27 debido al salto de electrón por presencia de Ácido acético.	62
Anexo 7. Bioautografía del antibiótico PAP48 contra <i>Bacillus spizizenii</i> , con halo de inhibición de 8,9 mm.	63
Anexo 8. Bioautografía del antibiótico PAP48 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , con halo de inhibición de 13,2 mm.	64
Anexo 9. Bioautografía del antibiótico PAP49G3A contra <i>Bacillus spizizenii</i> , con halo de inhibición de 8,3 mm,	65
Anexo 10. Bioautografía de antibiótico PAP49G3A contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , con halo de inhibición de 11,5 mm.	66
Anexo 11. Microplaca 1. Medio Müller Hinton Broth estéril + Antibióticos PAP48, PAP49G3A y Control positivo Gentamicina + <i>Bacillus spizizenii</i>	67

Anexo 12. Microplaca 2. Medio TSB estéril + Antibióticos PAP48, PAP49G3A y Control positivo Gentamicina + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
Anexo 13. Prueba Shapiro Wilks (A) y análisis de varianza (B) del antibiótico PAP48 contra <i>Bacillus spizizenii</i>	69
Anexo 14. Prueba Shapiro Wilks (A) y análisis de varianza (B) del antibiótico PAP49G3A contra <i>Bacillus spizizenii</i>	70
Anexo 15. Prueba Shapiro Wilks (A) y análisis de varianza (B) del antibiótico PAP48 contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71
Anexo 16. Prueba Shapiro Wilks (A) y análisis de varianza (B) del antibiótico PAP49G3A contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72
Anexo 17. Análisis de varianza del antibiótico PAP48 entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus spizizenii</i>	73
Anexo 18. Análisis de varianza del antibiótico PAP49G3A entre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Bacillus spizizenii</i>	73

Resumen

La presente investigación se basa en la extracción, caracterización y análisis de los antibióticos producidos por *Micrococcus luteus* y *Streptococcus* sp. codificadas como PAP49G3A y PAP48 respectivamente, mediante técnicas como: Espectrofotometría Infrarroja (IR) donde se visualizó grupos funcionales amino lo que le confieren la capacidad antimicrobiana, con la cromatografía en capa fina (TLC) se logró separar la fracción antibiótica para posteriormente analizar mediante la técnica de espectrofotometría de masas, con la espectrofotometría de masas se conoció el peso molecular de 92,31 mg/mol para PAP48, y el peso molecular de 93,31mg/mol para PAP49G3A, armando así la posible estructura química de cada antibiótico; con las pruebas de actividad antimicrobiana como: Concentración Mínima Inhibitoria se verificó que PAP48 a una concentración de 300 µg/mL inhibe el crecimiento en un 88,70 % de *Bacillus spizizenii* y 86,60 % en *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que PAP49G3A a una concentración de 300 µg/mL inhibe el crecimiento en un 91,46 % de *Bacillus spizizenii* y 89,88 % en *Pseudomonas aeruginosa*; usando la técnica de Bioautografía, se identificó el modo de acción de los extractos de antibióticos frente a microorganismos patógenos de control inhibiendo su crecimiento.

Palabras Clave: *Bacillus spizizenii*, *Pseudomonas aeruginosa*, MIC, IR, MS

Abstract

This research is based on the extraction, characterization and analysis of antibiotics produced by *Micrococcus luteus* and *Streptococcus* sp. encoded as PAP49G3A and PAP48 respectively, using techniques such as: Infrared Spectrophotometry (IR) where amino functional groups were visualized, which confer antimicrobial capacity, with thin layer chromatography (TLC), the antibiotic fraction was separated and subsequently analyzed by mass spectrophotometry technique, with the mass spectrophotometry the molecular weight of 92.31 mg/mol for PAP48 was known, and the molecular weight of 93.31 mg/mol for PAP49G3A, thus assembling the possible chemical structure of each antibiotic; With tests of antimicrobial activity such as: Minimum Inhibitory Concentration it was verified that PAP48 at a concentration of 300 mg / mL inhibits the growth in 88.70 % of *Bacillus spizizenii* and 86,60 % in *Pseudomonas aeruginosa*, while PAP49G3A at a concentration 300 mg / mL inhibits growth in 91,46% of *Bacillus spizizenii* and 89,88 % in *Pseudomonas aeruginosa*; using the Bioautography technique, the mode of action of antibiotic extracts against control pathogenic microorganisms was identified by inhibiting their growth.

Keywords: *Bacillus spizizenii*, *Pseudomonas aeruginosa*, MIC, IR, MS.

Introducción

Los microorganismos son organismos vivos que se encuentran en diversos lugares del ambiente (aire, agua, y suelo), como en el exterior e interior de células de individuos superiores (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009, p. 747), estos organismos sintetizan sustancias como antibióticos; que presentan actividades antimicrobianas, ya que no permiten el crecimiento de microorganismos patógenos causantes de enfermedades infecciosas (Arranz, 2017).

El trabajo realizado por Fleming, donde se descubrió la penicilina a partir de hongos, condujo a investigar nuevos antibióticos y a buscar otros microorganismos presentes en la naturaleza con actividad antimicrobiana (Quesada, 2018). En la década de los 40 y 60 se vivió la edad de oro, y se obtuvo a partir de bacterias del suelo varios antibióticos que son de uso clínico, estos antibióticos difieren unos de otros por sus propiedades físicas, químicas, por su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano; es decir, los diferentes microorganismos sobre los cuales pueden actuar los antibióticos (Patiño, 2003).

Sin embargo, la utilización irracional de antibióticos generó la resistencia antimicrobiana (Angles, 2018), que fue señalada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2017, como una problemática mundial que aqueja la salud humana, por lo que decidió mejorar la investigación y el desarrollo de nuevas sustancias bioactivas y perfeccionar las existentes (Quiñones, 2017). Según Montaña, Sandoval, Camargo, & Sánchez, (2010), el suelo presenta una riqueza microbiana que posiblemente ayudará a mejorar problemas de alimenticios, ambientales o de salud, debido a que apenas se conoce su población microbiana.

Ante lo mencionado la presente investigación, tiene como objetivo analizar químicamente mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas a los antibióticos producidos por las bacterias *Micrococcus luteus* y *Streptococcus* sp. aisladas del suelo, basándose en los resultados obtenidos en el trabajo experimental elaborado por Bastidas & Vaca (2018), quienes señalaron que el antibiótico producido por *Streptococcus* sp. codificado como PAP48 y el antibiótico *Micrococcus luteus* codificado como PAP49G3A tienen actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos en el cuarto día. Según Farraj, Varghese, Vágvölgyi, & Mahmoud (2019), para lograr la máxima producción de antibióticos a partir de microorganismos se utiliza factores como temperatura, pH, tiempo y composición del medio de cultivo.

Además, utilizar técnicas analíticas como: espectrofotometría Infrarrojo (IR), cromatografía en capa fina (TLC), Espectrofotometría de masas (MS), permitirán realizar un análisis para identificar la posible estructura química de los extractos de antibióticos. En tanto que las técnicas de Bioautografía y Microdilución en Caldo (MIC), resultan ser adecuadas para aislar y localizar sustancias con actividad antibacteriana específica contra microorganismos patógenos, como lo demostró (Guzmán, 2018) al conocer la concentración mínima inhibitoria (MIC) de antibióticos aislados de muestras del suelo frente a bacterias.

Capítulo 1

1. Marco conceptual.

1.1. Microorganismos.

Los microorganismos son las formas de vida más primitivas y numerosas que habitan en la Tierra, debido a su capacidad y eficiencia metabólica para crecer y adaptarse rápidamente a los diversos ambientes del planeta. Estos individuos son esenciales para el funcionamiento de sistemas ecológicos, biotecnológicos y metabólicos de los cuales depende la continuidad de la vida (Montaño et al., 2010).

Además, en los microorganismos ocurren diversas reacciones químicas que producen sustancias conocidas como: metabolitos primarios que son fundamentales para el crecimiento de los mismos, y metabolitos secundarios que sirven de mecanismo de defensa entre especies del medioambiente y son de interés económico e industrial; entre los más conocidos y estudiados se tiene: antibióticos, micotoxinas, alcaloides, pigmentos e inhibidores enzimáticos (Hernández, Alfaro, & Ronald, 2003).

1.1.1. Microorganismos en el suelo.

El suelo presenta gran diversidad de microorganismos formada por: hongos, actinomicetos, bacterias y protozoarios, por lo que, investigaciones realizadas en la mitad del siglo XX, en la micro fauna del suelo evidenció bacterias y actinomicetos con capacidad de producir antibióticos como Vancomicina (*Streptomyces orientalis*), Eritromicina (*Streptomyces erythreus*), Estreptomina (*Streptomyces griseus*), entre otros (Ness, 2015).

Según (Quesada, 2018) “El 99 % de las bacterias del medioambiente podrían contribuir al desarrollo de nuevos antibióticos; por esto, la continua investigación sobre microorganismos del suelo posibilita la obtención de nuevos compuestos antibióticos”

1.2. Cepas productoras de antibióticos.

1.2.1. Género *Micrococcus*.

Este género pertenece al grupo de bacterias Gram positiva, cocos que aparecen en las tétradas, generalmente son aeróbicos estrictos (Trejo et al., 2015). *Micrococcus* en particular son organismos que normalmente se localizan en la micro flora cutánea, productos lácteos, suelos y agua, (Rosales, Acosta, Santos, & Gonzalez, 2009).

1.2.1.1. Especie *Micrococcus luteus*.

Esta especie de bacteria tiene uno de los genomas más pequeños secuenciados hasta la fecha rico en guanina y citosina, su cultivo en placa produce colonias de color amarillo o rosa cuando crecen sobre un medio sólido (Trejo et al., 2015).

Micrococcus luteus se caracteriza por contener en su pared celular unidades peptídicas de L-lisina, posee un sistema multienzimático de transporte de electrones ligados a la membrana celular, su crecimiento debe ser controlado a una temperatura de 30 °C (Rosales et al., 2009).

1.2.2. Género *Streptococcus* sp.

Los *Streptococcus* son bacterias Gram positivas, anaerobias facultativas que aparecen formando cadenas, se subdividen en diferentes grupos que incluyen una o más especies, mediante anticuerpos que reconocen a los antígenos de superficie (Murray, 2013).

Poseen pared celular, tienen similitud con el grupo de actinomicetos, estas bacterias habitan en el suelo, y representan 1 - 20 % la población presente en el microambiente (Prescott, 2009). La temperatura para el crecimiento es de 35 °C, su metabolismo es fermentativo, y requieren de medios específicos para su proliferación (Rodríguez, 2006).

1.3. Antibióticos.

Los antibióticos son sustancias bioactivas, producto del metabolismo secundario de microorganismos, con capacidad de destruir las bacterias, inhibir su crecimiento o desarrollo a bajas concentraciones; son sustancias de origen sintético o natural con toxicidad selectiva ante microorganismos patógenos sin la destrucción de células hospederas (Morales, 2018).

Estos son utilizados como antimicrobianos para combatir enfermedades infecciosas de forma terapéutica, además, de 4.000 sustancias bioactivas solo 50 se han utilizado como: inhibidores enzimáticos, conservantes alimentarios, promotores del crecimiento en animales y plantas (Smith, 2004, p. 133).

1.3.1. Clasificación de los antibióticos.

La clasificación de los antibióticos más utilizada es según su estructura química, sin embargo, existen clasificaciones basadas en el espectro y mecanismo de acción.

1.3.1.1. Según la estructura química.

Los antimicrobianos como se muestra en la tabla No. 1 conforman familias, con un grupo funcional característico, y propiedades farmacológicas y fisicoquímicas similares (Guzmán, 2018).

Tabla 1.

Clasificación de antibióticos según su estructura química.

Familia	Grupo funcional	Subfamilia	Antibiótico
β-lactámicos	Anillo β-lactámico compuesto por 3 átomos de carbono y 1 átomo de Nitrógeno	Penicilinas	Penicilina, Ampicilina, Amoxicilina
		Cefalosporinas	Cefotaxima, Ceftriaxona
		Monobactámicos	Aztreonam
		Carbapenemos	Imipenem, Meropenem
		Inhibidores betalactámicos	Ácido Clavulánico, Sulbactam, Tezobactam
Aminoglucósidos	Uno o varios azúcares aminados unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol	Estreptomicina	Estreptomicina
		Kanamicina	Kanamycin, Amicacina, Tobramicina
		Gentamicina	Gentamicina, Netilmicina
		Neomicina	Neomicina
Glucopéptidos	Un heptapéptido		Vancomicina, Teicoplanina
Macrólidos	Un anillo lactónico unido por enlaces glucosídicos con azúcares aminados		Eritromicina, Claritromicina, Raxitromicina, Azitromicina
Tetraciclinas	Un núcleo policíclico común, formado por 4 anillos bencénicos unidos		Tetraciclinas, Minociclina,
Sulfonamidas	Un grupo amino		Sulfisoxazole, Sulfametoxazole
Quinolonas	Dos anillos, con un N en la posición 1, un grupo carboxilo en la posición 3		Ácido Nalidíxico, Quinolonas Fluoradas

Fuente: (Colán & Gaspar, 2015; Hoyo, 2017).

1.3.1.2. Según el espectro de acción.

Los antibióticos ejercen efecto sobre un determinado número de bacterias patógenas, los de amplio espectro, actúan sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas; mientras los de espectro reducido, son activos sobre bacterias Gram negativas (Quintana, 2002).

1.3.1.3. Según el mecanismo de acción.

Para que actúe el antibiótico es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre en las bacterias y alcance la concentración adecuada; el mecanismo de acción es: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana, alteración sobre la membrana citoplasmática, inhibición de la síntesis de proteínas, e inhibición del metabolismo patógeno (Chavez, 2015; Mateos, 2015).

Según (Morales, 2018) menciona que “Algunos antibióticos son bactericidas, eliminan la bacteria; y otros son bacteriostáticos, impiden su crecimiento y/o desarrollo”

1.3.2. Producción de antibióticos.

A través de los años la producción de antibióticos por fermentación industrial se ha optimizado, facilitando el crecimiento microbiano por gemación o fisión binaria dentro de fermentadores, permitiendo reducir costos e incrementar rendimiento en la producción.

1.3.2.1. Tipos de biorreactores.

Los biorreactores o fermentadores, son recipientes agitados mecánicamente y aireados, constituidos de sistemas que requieren de procesos de consumo de energía o transferencia de materia; éstos presentan entradas y salidas de nutrientes, control de pH y temperatura, introducción de inóculo, métodos de agitación y esterilidad (Rabassa, Pérez, Pérez, González, & Álvarez, 2015).

Las formas de operación de un biorreactor son: continuo, semicontinuo y discontinuo.

- **Modo continuo:** es un sistema abierto utilizado a gran escala, que consiste en mantener de forma continua una corriente de alimentación de nutrientes y otra de salida de productos o residuos; así los microorganismos podrán mantener su fase exponencial mediante el suministro constante de biomasa (Smith, 2004).
- **Modo discontinuo:** es un sistema cerrado utilizado para la producción a pequeña o gran escala, presenta un solo momento para suministro de nutrientes o sustratos necesarios; el volumen se mantiene constante y se controla temperatura, pH y velocidad de agitación; la cinética del microorganismo se mantiene en fase exponencial tan solo un tiempo y pronto alcanza la fase estacionaria (Smith, 2004).
- **Modo semicontinuo:** sistema de alimentación semicontinuo, es decir, los sustratos se añaden escalonadamente, porque algunos nutrientes tienden a ser inhibitorios sobre el crecimiento del microorganismo o determinados procesos de la producción del producto (Rabassa et al., 2015).

1.3.3. Extracción de antibióticos.

En la extracción de los antibiótico inicialmente se procede a la separación de los microorganismos de la fase líquida mediante técnicas de filtración o centrifugación, además se incluyen técnicas como: la extracción con solventes, el intercambio iónico, la ultrafiltración, la precipitación, y la cristalización; para finalmente obtener un producto puro empleado en preparaciones farmacéuticas (Bu'lock & Kristiansen, 1987).

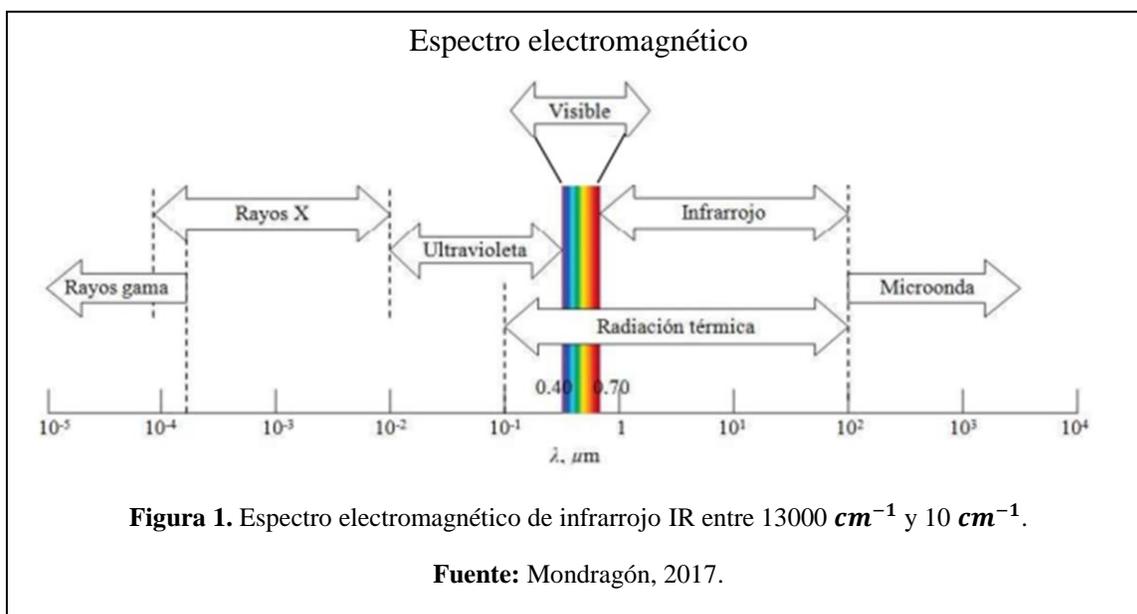
- **Extracción líquido-líquido:** técnica muy usada para separar componentes de una muestra en estado líquido, consiste en la transferencia de analitos, desde la muestra a un disolvente inmiscible, producida en dos fases por diferencia de solubilidad de los mismos. Para

determinar el solvente es necesario conocer la polaridad de los analitos, la afinidad por la sustancia que deseamos separar y que sea relativamente volátil para su fácil eliminación por evaporación (García, 2016).

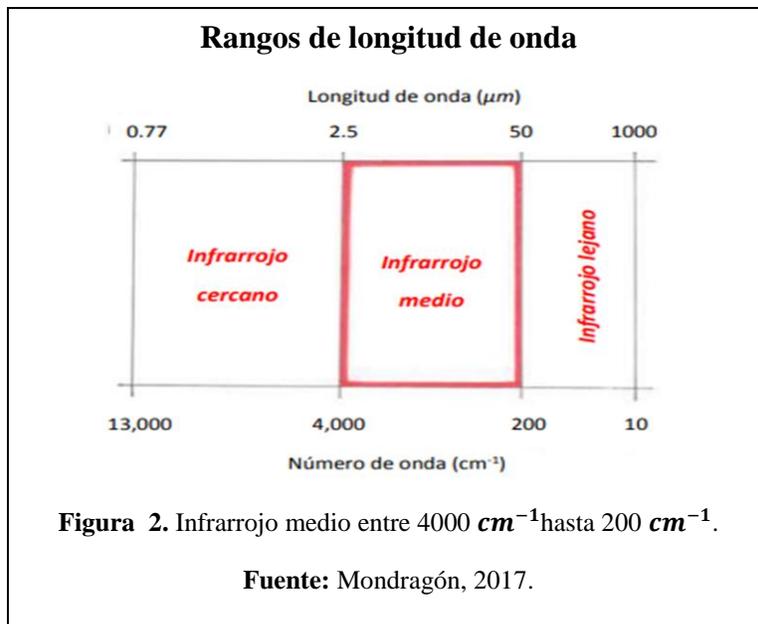
1.4. Análisis químico.

1.4.1. Espectrofotometría infrarroja (IR).

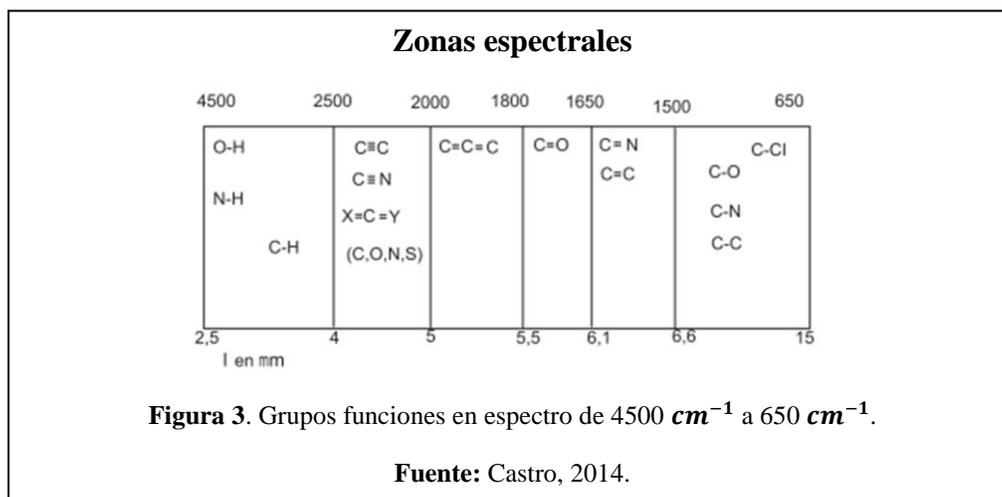
La espectrofotometría IR es un ensayo de identificación, que se fundamenta en la radiación electromagnética de la región a evaluar, y la absorción por parte de la materia a número de onda entre 13000 cm^{-1} y 10 cm^{-1} como se muestra en la Figura 1, aplicado en muestras sólidas, líquidas o gaseosas. (Bermejo & Moreno, 2014).



El espectrofotómetro contiene fuente de luz, interferómetro o monocromador y detector, utilizados para la obtención de infrarrojos cercanos, medios y lejano, siendo el IR medio el lugar de las principales aplicaciones y frecuencias correspondientes, ubicada en el número de onda de 4000 cm^{-1} hasta 200 cm^{-1} , Figura 2 (Bermejo & Moreno, 2014).



Para analizar los resultados de manera sencilla tomando en cuenta las zonas espectrales se utiliza la espectrofotometría infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR), la cual es una herramienta que se utiliza para la detección de contaminantes comunes, subproductos de la degradación de aceites, agua y aditivos; dentro del espectro infrarrojo existen dos regiones, la llamada “grupos funcionales” en un número de onda de 4500 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} , y “región dactilar” a número de onda de 1500 cm^{-1} a 650 cm^{-1} , Figura 3 (Castro, 2014; Skoog, West, Holler, & Crouch, 2014).



1.4.2. Cromatografía en capa fina (TLC).

La cromatografía consiste en la presencia de dos fases: una fase estacionaria que permanece inmóvil dentro del sistema, y una fase móvil que se desplaza a lo largo de él; la separación de las muestras varía según la velocidad con la que se mueve cada sustancia en relación a las fases. El medio cromatográfico (columna, placa o papel) funciona como un controlador de la velocidad de cada sustancia que constituye la mezcla, logrando así su separación, detección, y caracterización química (Gutiérrez, 2002).

La cromatografía en capa fina (TLC), se basa en adsorción, distribución de masa o diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de las moléculas; esta técnica permite la separación de sustancias polares (aminas, alcoholes, ácidos carboxílicos) en un adsorbente de sílica gel que se encuentra sobre una placa de vidrio, denominado también como fase estacionaria (Jiménez & Rodríguez, 2018).

La fase móvil debe tener menos polaridad que la fase estacionaria, puede ser un solo disolvente o dos miscibles de distinta polaridad con bajos puntos de ebullición; tomando como base la serie eluotrópica de solventes, a continuación se ordena los mismos por su polaridad: Hexano < Tetraclorometano < Cloroformo < Diclorometano < Acetato de Etilo < Acetona < 2- Propanol < Metanol < Agua (Corzo, 2019).

El revelado de la placa cromatográfica consiste en la utilización de un indicador de luz ultravioleta a longitud de onda de 254 nm y 366 nm, este absorbe la luz UV y emite la luz visible, cuando exista la presencia de un compuesto activo el indicador evita que se absorba la luz UV, y se visualiza una mancha en la placa que señala la presencia de un compuesto. Cuando un compuesto no absorbe la luz UV, se necesita utilizar un agente revelador para la visualización de

la placa cromatográfica; este tiene que reaccionar con los compuestos adsorbidos proporcionando compuestos de color violeta rosado (Macas & Guzñay, 2013).

El factor de retención (R_f) de la fase estacionaria, es la distancia que recorre el compuesto frente al solvente, esto es una constante para cada sustancia siempre que se encuentre a las mismas condiciones en cuanto a temperatura, tiempo de corrida, solventes usados, volumen y concentración de los compuestos aplicados (Macas & Guzñay, 2013). Según (Corzo, 2019) este coeficiente se define por la siguiente expresión:

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el solvente}}$$

1.4.3. Espectrofotometría de masas (MS).

La espectrometría de masas es una técnica que permite con una mínima cantidad de muestra el análisis estructural y cuantificación (peso molecular) de moléculas naturales o sintéticas a través de espectros de masas; para lo cual se transforman iones gaseosos los componentes de una muestra en sin alterar su composición, al atravesar campos magnéticos éstos se fragmentan en función de su relación masa/carga (m/z) para poder ser detectados (Dong, Liu, & Guo, 2018). Una vez que se generan los iones por (MS) se proceden a analizar en base a su rango de masa definido por la relación entre la masa del pico de interés mediante una relación de la masa del pico de interés dividido por el ancho del pico en una fracción específica de la altura del pico (Song & Spezia, 2018).

1.5. Análisis microbiológico

1.5.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC).

La concentración mínima inhibitoria es la que se encarga de inhibir la producción y crecimiento de una cepa bacteria, en base a un sistema de análisis donde el agente antimicrobiano se encuentra determinado por diluciones seriadas hasta llegar a su mínima concentración $\mu\text{g/mL}$, con la interpretación de (S) susceptible, (I) intermedio o (R) resistente según criterios del Comité de estándares de laboratorio (NCCLS) (Coyle, Cavalieri, Rankin, Harbeck, & Sautter, 2006).

Resultado susceptible aumenta la probabilidad que el agente antimicrobiano inhiba el crecimiento de microorganismos patógenos, en resultado intermedio significa que la utilización a concentraciones mayores ayuda a la inhibición de bacterias, el resultado resistente señala que la probabilidad de un crecimiento microbiano sea alto (Taroco, Seija, & Vignoli, 2008).

La MIC es una guía para la selección de un antibiótico o agentes con actividad antimicrobiana y permite determinar de manera precisa la concentración de los mismos contra patógenos (CDC; OMS, 2009). La determinación de la MIC puede realizarse por: micro o macro dilución en caldo, difusión en agar.

1.5.1.1. Microdilución en caldo.

Es una técnica de sensibilidad antimicrobiana, donde se prepara medios de cultivo conjunto con diferentes concentraciones del compuesto a evaluar, donde posteriormente el microorganismo será inoculado (Rodríguez, 2015).

Para esta técnica se utilizan placas de 96 pocillos cuyo volumen por pocillo es de 360 μL , donde cada placa puede contener de 8 a 12 diluciones, se utiliza una columna como control negativo y

otra como control positivo. La ausencia de turbidez del medio de cultivo indica la presencia de actividad antimicrobiana (Coyle et al., 2006; García, 2014).

El crecimiento de microorganismos es inversamente proporcional a la concentración del compuesto antimicrobiano, mediante la utilización del espectrofotómetro se mide el porcentaje de transmisión o absorción de la luz que pasa por los pocillos a una determinada longitud de onda.

El uso de sales de Tretrazolio permite la visualización de crecimiento microbiano con la coloración rojiza de los tejidos (García, 2014).

Como los componentes antimicrobianos poseen baja solubilidad cuando son inmersos en agua, la utilización de solventes orgánicos es necesario para lograr la dispersión, se suele utilizar Dimetilsulfóxido (DMSO) no excediendo el 5 % del volumen final (García, 2014).

1.5.2. Bioautografía.

Bioautografía es la técnica más utilizada para pruebas de sensibilidad in vitro, permitiendo la detección de componentes con actividad antimicrobiana y el aislamiento de los componentes presentes, la bioautografía se puede emplear como: bioautografía de difusión en agar, bioautografía directa en la placa de cromatografía en capa fina y bioautografía de superposición del agar (Lizcano & Vergara, 2008; Rodríguez, 2015).

- **Bioautografía por difusión en agar:** es la transferencia por difusión del componente antimicrobiano a través de una placa cromatográfica de TLC que se encuentra sobre agar inoculado con el microorganismo.
- **Bioautografía directa:** los microorganismos crecen directamente en la placa cromatográfica de TLC después de agregar el medio de cultivo.

- **Bioautografía de superposición del agar:** el medio de agar sembrado se coloca sobre la capa cromatográfica de la TLC, permitiendo la difusión del compuesto (Rodríguez, 2015).

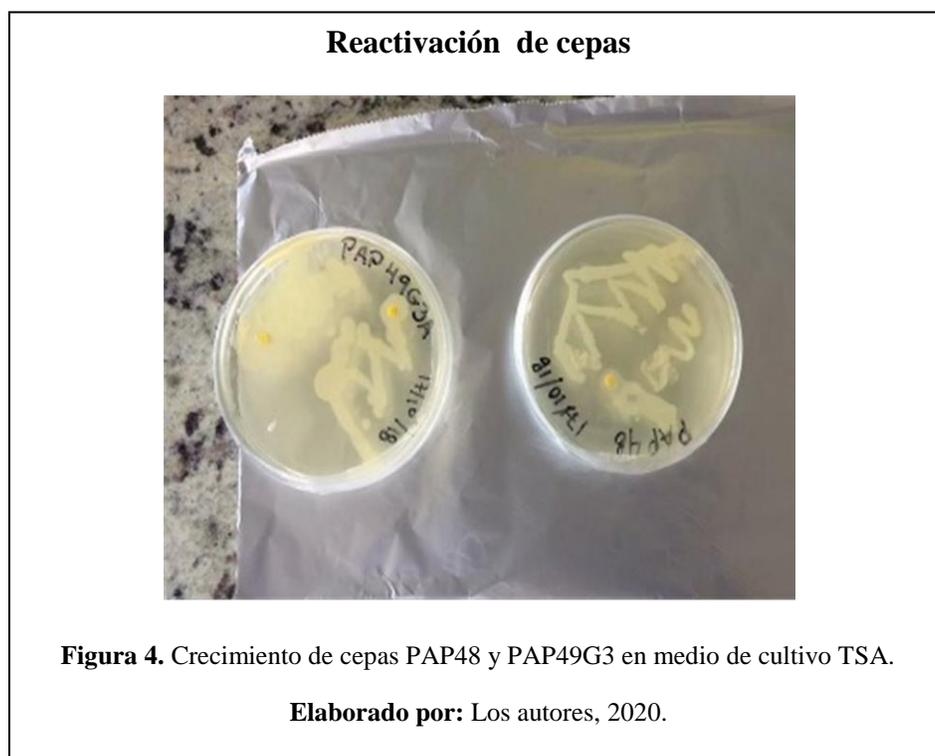
La utilización de reactivos reveladores por ejemplo Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC), ayudan a la visualización de zonas con presencia antimicrobiana, coloreando intensamente de púrpura las zonas con presencia de la enzima deshidrogenasa que se encuentra presente en microorganismos vivos, la ausencia de coloración indica la inhibición del crecimiento de microorganismos señalando la presencia de agentes antimicrobianos (García, 2014; I. Rodríguez, 2015)

Capítulo 2

2. Metodología.

2.1. Reactivación de los microorganismos *Streptococcus* sp. y *Micrococcus luteus*.

Los microorganismos *Streptococcus* sp. y *Micrococcus luteus* codificados con el código PAP48 y PAP49G3A respectivamente, se reactivaron en medio de cultivo Tripticasa Soya Agar (TSA), preparado, dispensado y esterilizado en Placas Petri, con la ayuda de un asa de siembra estéril se seleccionó una perla de cada uno de los CRIOBANK de las cepas PAP48 y PAP49G3A y se inoculó por todo el medio de cultivo en forma de estrías, posteriormente se llevó a la incubadora (Modelo New Brunswick™, Marca Excella® E24) a 35 °C durante 24 horas, Figura 4.



2.2. Producción de metabolito secundario en biorreactor.

2.2.1. Preparación del preinóculo u overnight.

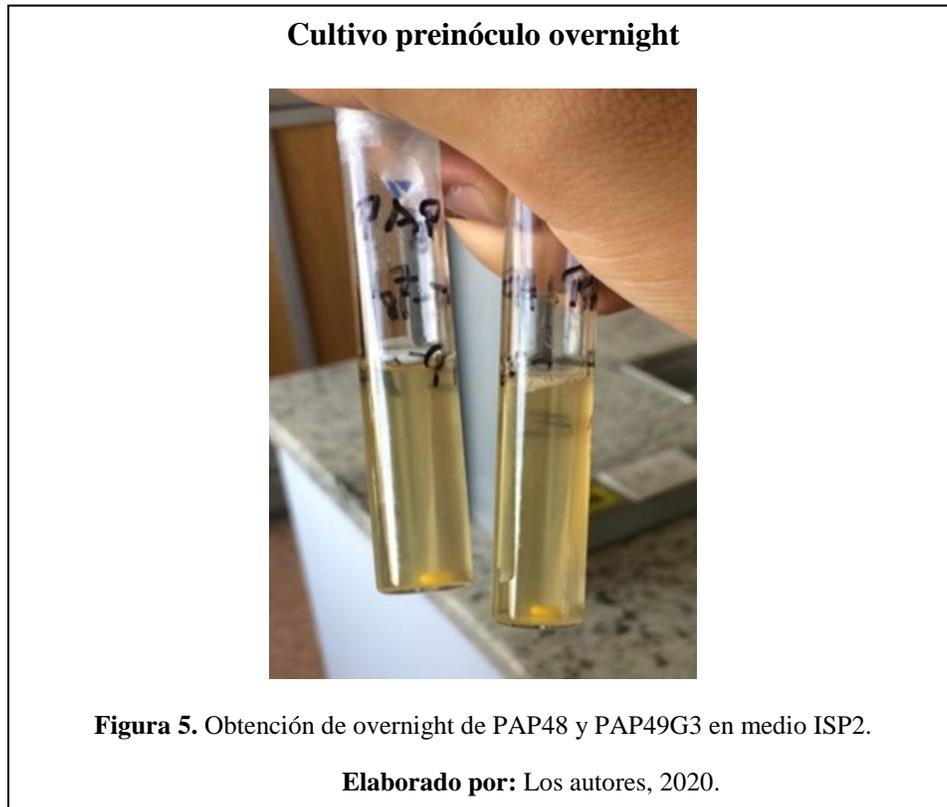
El medio de cultivo de cultivo ISP2 (International *Streptomyces* Project) se utiliza para la producción de metabolitos secundarios ya que acumula compuestos biológicamente activos dentro de la producción de biomasa (Protasov et al., 2017). Para la preparación de medio de cultivo ISP2 se tomó en cuenta las especificaciones descritas por (Gorrín, 2018; Zimbro, Power, Miller, Wilson, & Johnson, 2009) donde por cada litro de producción de medio de cultivo se utiliza: extracto de levadura, 4 g/L; malta, 10 g/L; dextrosa, 4 g/L, que proporcionan nitrógeno, aminoácidos, vitaminas y dextrosa como fuente de carbono, dicho medio de cultivo debe encontrarse en un pH de $7,3 \pm 0,02$.

El medio de cultivo mencionado anteriormente, se dispensó en tubos de ensayo de 20 mL y se esterilizó en la autoclave; luego se realizó un raspado con el asa de siembra estéril a la cepa PAP48 reactivada, se inoculó en un tubo de ensayo con el medio de cultivo preparado y finalmente se llevó a la incubadora (Marca New Brunswick™, Modelo Excella® E24) a una temperatura de 30 °C durante 24 horas, Figura 5. De la misma manera se procede con la cepa PAP49G3A reactivada.

2.2.1.1. Estandarización del inóculo.

Se siguió la metodología descrita por (Carlone & Pompei, 2013) expresa que la turbidez del medio de cultivo con bacterias se iguala añadiendo concentración bacteriana o solución salina estéril, para posteriormente colocar en una celda de espectrofotometría y mediante un espectrofotómetro (Marca Shimadzu UV Mini, Modelo 1240), se mide la absorbancia entre 0,080 – 0,100 a una longitud de onda de 625 nm, con una concentración de 1×10^8 UFC/mL,

equivalente a 0,5 en referencia a la escala de turbidez de McFarland. Este procedimiento se implementó tanto para las cepas PAP48 como PAP49G3A.



2.2.2. Inoculación de overnight en biorreactor.

Previa preparación y esterilización de 2000 mL del medio de cultivo ISP2 dentro del biorreactor (Marca News Brunswick BioFlo, Modelo CelliGen 115®); se incorporó el preinóculo overnight de la cepa PAP48 dentro del mismo; de igual manera se procedió con la cepa PAP49G3A, figura 6. Cada una de las cepas se incubó en diferentes periodos de tiempo, así que PAP48 durante 4 días, a una temperatura de 30 °C, pH de $7,3 \pm 0,02$ y 150 rpm; mientras que PAP49G3A durante 4 días, a una temperatura de 35 °C, pH de $7,3 \pm 0,02$ y 150 rpm.

Biorreactor con ISP2



Figura 6. Preinóculo de cepas PAP48 y PAP49G3 en medio de cultivo ISP2.

Elaborado por: Los autores, 2020.

2.2.3. Centrifugación biomasa.

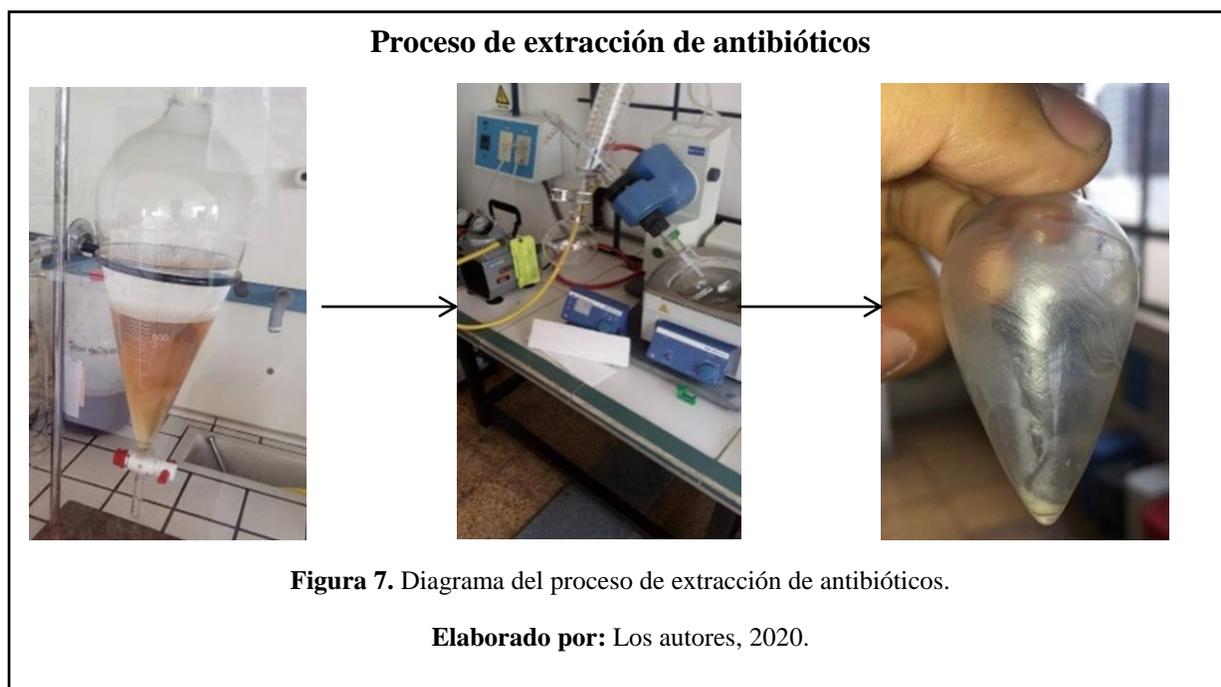
Transcurrido el periodo de producción de cada uno de los microorganismos, se extrajo la biomasa del biorreactor en tubos Falcon para su traslado hasta la centrifuga (Marca Hermle, Modelo Z400), durante 15 minutos a 3000 rpm, obteniendo así la sedimentación de biomasa y el sobrenadante que contiene el metabolito secundario; el sobrenadante se recolectó en dos frascos ámbar estériles de 1000 mL cada uno y se refrigeró hasta su respectivo uso. Este procedimiento se aplicó para ambas cepas microbianas.

2.3. Obtención de antibiótico.

Para la obtención del antibiótico se realizó la extracción líquido-líquido (sobrenadante-Diclorometano) en una proporción 1:1, dentro de embudos de decantación de 1000 mL, luego se

agito hasta la formación de una emulsión para dispersar las moléculas del antibiótico en el solvente, posteriormente se dejó reposar la emulsión a fin de que se separe en dos fases: la fase orgánica de moléculas insolubles en agua y la fase acuosa.

A continuación, se desechó la fase acuosa y se recolecto la fase orgánica en un matraz de fondo redondo, que se llevó al rotavapor (Marca IKA®, Modelo RV 10 basic), a condiciones de 30 °C, 50 rpm y 400 mbar, evaporando el solvente y recolectando el antibiótico en balones de destilación de 30 mL tarados, obteniendo el peso real de cada uno de los antibióticos producidos por PAP48 y PAP49G3A, Figura 7.



2.4. Análisis químico de los antibióticos.

2.4.1. Espectrofotometría infrarroja (IR).

2.4.1.1. Preparación de la muestra.

Para muestras sólidas como es el caso de cada uno de los antibióticos analizados, se tomó la metodología descrita por (Bermejo & Moreno, 2014). Se realizó una pastilla dentro de los discos

de troquel, la cual contiene el antibiótico y Bromuro de Potasio (KBr) en una concentración 1:10 respectivamente. Este procedimiento se aplicó tanto al antibiótico de la cepa PAP48 como PAP49G3A.

2.4.1.2. Análisis de la muestra.

Se utilizó el espectrofotómetro IR (Marca Spectrum, Modelo BX FT-IR) con el software Spectrum v5.3.1, inicialmente se realizó el registro del espectro sin la muestra, permitiendo recoger trazas de agua y CO₂ que se encuentren en el ambiente. Una vez realizado esto, se procedió al análisis y registro del espectro para cada muestra de antibiótico PAP48 y PAP49G3A.

2.4.2. Cromatografía en capa fina (TLC).

Se realizó una dilución de 30 mg de antibiótico en 1 mL de Diclorometano, posteriormente con ayuda del equipo LINOMAT-5 se sembró 20 µL de muestra sobre una placa de sílica gel (Sigma-Aldrich®, L × W 10 cm×10 cm con factor de fluorescencia a 254 nm) como fase estacionaria. La siembra sobre la cromatoplaqueta de cada muestra de antibiótico se realizó por cuadruplicado.

En la cámara cromatográfica previamente seca, se añadió 80 mL de la fase móvil (Acetato de Etilo y Cloroformo en concentración 1:1); y se colocó papel filtro de las mismas dimensiones de la cámara para saturar el ambiente por un tiempo de 40 minutos. La placa de sílica gel sembrada con la muestra, se introdujo dentro de la cámara cromatográfica hasta que la fase móvil recorra 9 cm por toda la placa, posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente los residuos del solvente por un tiempo de 15 minutos.

La lectura de la placa cromatográfica se realizó en una lámpara ultravioleta (UV) (Marca CAMAG UV, Modelo Cabinet), se identificaron distancias recorridas por las manchas a longitudes de onda de 254 nm (absorbancia) y 365 nm (fluorescencia) para el cálculo del factor

de retención (*R_f*) de los compuestos activos. Además, se utilizó para el revelado de la placa Vainillina-Ácido Sulfúrico en concentración de 2 mg/50 mL, se atomizó sobre la placa y se procedió a calentar a 120 °C hasta el cambio de coloración. Este procedimiento se aplicó tanto al antibiótico de la cepa PAP48 como de PAP49G3A.

2.4.3. Espectrometría de masas (MS).

La técnica instrumental de Espectrometría de Masa (MS), se utilizó para identificar la estructura química de los antibióticos extraídos de las bacterias *Streptococcus* sp. y *Micrococcus luteus*, preparando un vial con raspado de placa TLC de *R_f*: 0, 12 para PAP48 y aforarlo hasta 1 mL con metanol, de la misma manera se procede a realizar el raspado en el *R_f*: 0,10 de PAP49G3A y aforarlo con metanol.

Posteriormente se colocó cada muestra en 100 mL de ácido acético al 0,1 % en Metanol, y se inyectó en el equipo espectrofotómetro de masas (MS) (Marca Orbitrap extractiva, Modelo A0793).

2.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana

2.5.1. Concentración mínima inhibitoria (MIC).

2.5.1.1. Preparación de suspensión de microorganismos de control.

Se utilizó el microorganismo *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 para el control de bacterias Gram positivas, que se inoculó en medio de cultivo Müller Hinton Broth e incubó durante 18 - 24 horas a 30 °C. El microorganismo *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, se utilizó para el control de bacterias Gram negativas, éste se inoculó en medio de cultivo TSA (Tripticasa Soya Agar) e incubó durante 18 - 24 horas a 35 °C.

Posteriormente cada microorganismo de control se llevó al espectrofotómetro UV (Marca Shimadzu UV, Modelo mini 1240), implementando la estandarización del inóculo descrita en el literal 2.2.1.1.

2.5.1.2. Preparación de muestras estándar de antibióticos.

El solvente químico Dimetilsulfóxido (DMSO) empleado en estudios microbiológicos, se utilizó para diluir el antibiótico de la cepa PAP48 a una concentración de 30 mg/mL, y el antibiótico de la cepa PAP49G3A a una concentración de 25 mg/mL.

La Gentamicina es un antibiótico de amplio espectro que se utilizó en la MIC como un control positivo de las muestras, esta se diluyó a una concentración de 25 mg/mL con el solvente químico Dimetilsulfóxido (DMSO).

2.5.1.3. Preparación del Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC).

Para la preparación del colorante a una concentración del 1 %, se pesó 100 mg de Cloruro de Trifeniltetrazolio conjunto con 10 mL de agua estéril, esta preparación debe estar cubierta con papel aluminio y en refrigeración 4 horas antes de realizar el bioensayo.

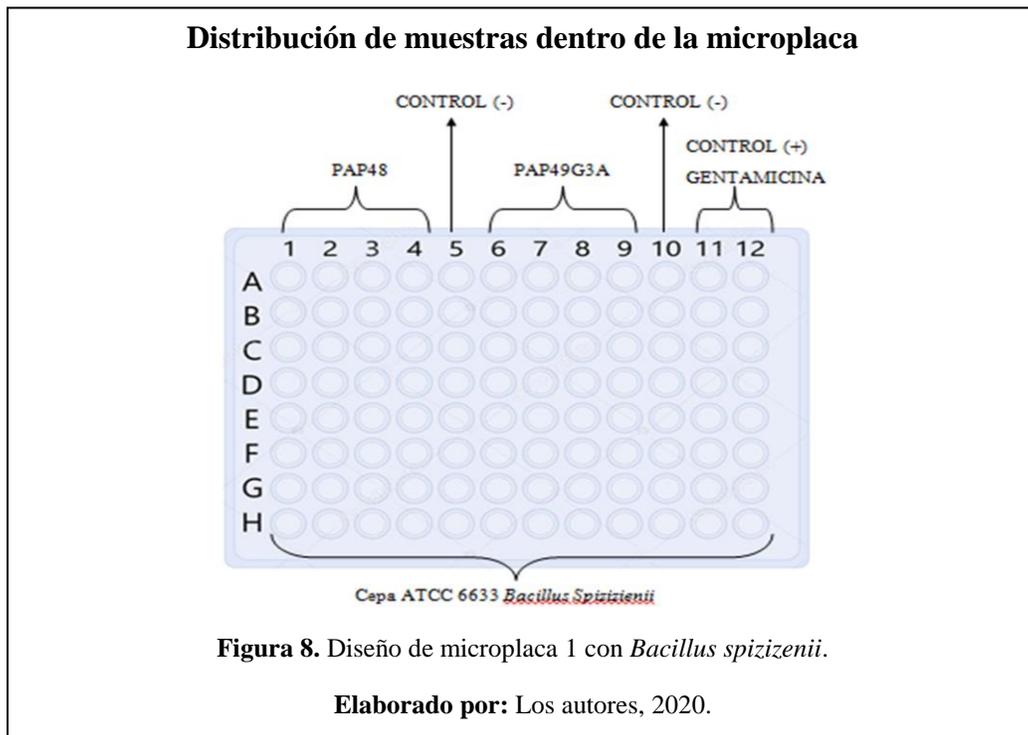
2.5.1.4. Microdilución en caldo.

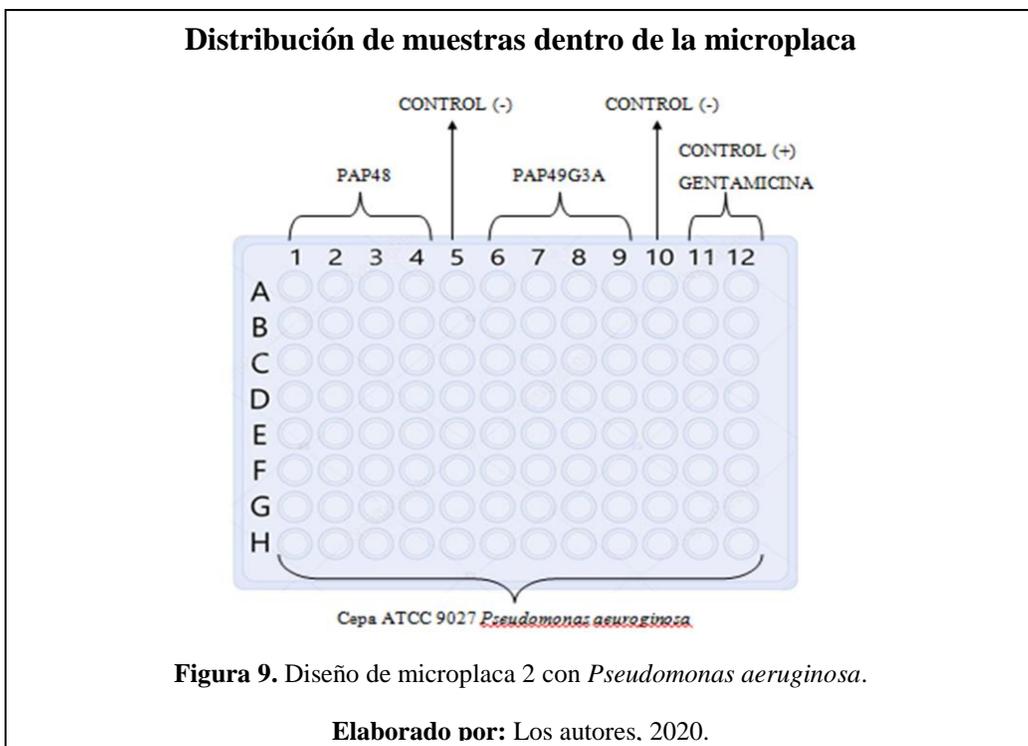
Se emplearon microplacas de poliestireno de 96 celdillas (Marca VWR®) que contienen 8 diluciones y la capacidad de albergar 12 diferentes agentes microbianos; cada celdilla es de 200 μ L de solución.

En la microplaca 1, en la fila A las celdillas de A₁ - A₁₂ se colocó 180 μ L de medio de cultivo Müller Hinton Broth estéril, salvo en A₅ y A₁₀ que se colocó 200 μ L, que servirán de “blanco”; se llenó las celdillas A₁ - A₄ con 20 μ L del antibiótico PAP48 y las celdillas A₆ - A₉ con 20 μ L del

antibiótico PAP49G3A; en las celdillas A₁₁ - A₁₂ se incorporó 20 µL de Gentamicina como “control positivo” y se homogenizó las muestras con la pipeta multicanal.

A partir de la fila B hasta la fila H, se añadió 100 µL de medio de cultivo Müller Hinton Broth en cada celdilla. Luego con una pipeta multicanal, se homogenizó la mezcla y se tomó 100 µL de la fila A y se traspasó a la fila B, así sucesivamente hasta llegar a la fila H, desechando 100 µL al final. A continuación, se inocularon en las 96 celdillas 100 µL de la bacteria control *Bacillus spizizenii* ATCC 6633, y se llevó la microplaca a una incubadora rotatoria (Marca New Brunswick™ Excella®, Modelo E24) de 18 - 24 horas a 30 °C y 70 rpm, Figura 8.





Se realizó la microplaca 2, con la diferencia que se utilizó medio de cultivo Tripticasa Soya Broth (TSB) para la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, Figura 9. En la Tabla 2 se indica las concentraciones de cada uno de los antibióticos que se utilizó en la microplaca.

Tabla 2.

Diseño de la microplaca con concentraciones de antibióticos ($\mu\text{g/mL}$) para microorganismos control ATCC 6633 y ATCC 9027.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	300	300	300	300	-	300	300	300	300	-	400	400
B	150	150	150	150	-	150	150	150	150	-	200	200
C	75	75	75	75	-	75	75	75	75	-	100	100
D	37,5	37,5	37,5	37,5	-	37,50	37,5	37,5	37,5	-	50	50
E	18,75	18,75	18,75	18,75	-	18,75	18,75	18,75	18,75	-	25	25
F	9,38	9,38	9,38	9,38	-	9,38	9,38	9,38	9,38	-	12,5	12,5
G	4,69	4,69	4,69	4,69	-	4,69	4,69	4,69	4,69	-	6,25	6,25
H	2,34	2,34	2,34	2,34	-	2,34	2,34	2,34	2,34	-	3,13	3,13

Elaborado por: Los autores, 2020.

2.5.1.5. Adición de Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC).

Transcurrido el periodo de incubación de cada una de las microplacas, se añadió sobre cada celdilla con la pipeta multicanal 25 µL de la solución TTC al 1 % previamente preparada, posteriormente se llevó a la incubadora rotatoria (Marca New Brunswick™ Excella®, Modelo E24) durante 45 minutos a 30 °C y 50 rpm.

La lectura de cada microplaca se realizó de manera cualitativa, donde se visualizó el cambio de coloración en lugares que tengan la presencia de microorganismos; y de manera cuantitativa, donde se utilizó el equipo Micropilote Reader, obteniendo así las absorbancias de cada una de las celdillas para su posterior análisis estadístico.

2.5.2. Bioautografía.

2.5.2.1. Preparación de placa cromatográfica.

Para la preparación de la placa de sílica gel se siguió la metodología descrita en el literal 2.4.2 para cada uno de los antibióticos.

2.5.2.2. Preparación de microorganismo control *Bacillus Spizizenii* ATCC 6633 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Se utilizó la metodología descrita en los literales 2.4.4.1.

2.5.2.3. Preparación del Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC).

Se utilizó la metodología descrita en el literal 2.4.4.3.

2.5.2.4. Técnica de inmersión.

Se siguió la metodología mencionada por Ochoa & Sarmiento (2018), la placa cromatográfica sembrada con el antibiótico PAP48 se colocó dentro una caja Petri de 20 cm de diámetro. Luego

se agregó lentamente medio de cultivo Müller Hinton Agar inoculado previamente con 1 mL de solución bacteriana *Bacillus spizizenii* ATCC 6633 y 1 mL de solución TTC al 1 %; éste proceso se realizó a una temperatura menor a 40 °C para evitar la inactivación del microorganismo y la formación de burbujas de aire. Finalmente, se dejó solidificar el agar en una refrigeradora por 40 minutos para facilitar la difusión de las sustancias bioactivas en el medio, y se incubó durante 24 - 72 horas a 30 °C. De igual manera se procedió con el antibiótico de la cepa PAP49G3A.

Para el microorganismo control *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 se utilizó el medio de cultivo Trypticase Soya Agar (TSA) a una temperatura de 35 °C.

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a visualizar y medir el halo de inhibición, como también el factor de retención (*R_f*) producto de la actividad antimicrobiana producida.

2.6. Análisis estadístico.

Para el análisis de los porcentajes de inhibición de las pruebas de Concentración Mínima Inhibitoria, se realizó mediante el programa estadístico InfoStat Versión 2019, los cuales proporcionaron información clara y ordenada en relación a las concentraciones de cada antibiótico y a los porcentajes de inhibición. Dentro del programa estadístico InfoStat se desarrolló un análisis de Diseño Completamente al Azar (DCA), conjunto con pruebas de Shapiro-Wilks determinando si los datos son paramétricos para proceder a realizar las pruebas de ANOVA a un nivel de significancia de 0,05 %.

Capítulo 3

3. Resultados y discusión.

3.1. Producción de antibiótico.

Para la separación de cada antibiótico se empleó el método de extracción de líquido-líquido (Tejeda, Montesinos, & Guzmán, 2011) porque se basa en las diferencias de solubilidad de los componentes de la mezcla en un disolvente adecuado. Según Moreno, Rodríguez, Olmo, & García (2017) mencionan que para la extracción de compuestos orgánicos polares puede usarse solventes químicos miscibles en agua, partiendo de una separación de fases de un medio acuoso que contiene los analitos y un solvente químico miscible en agua como el Diclorometano.

En la Tabla 3 se muestra la cantidad de antibiótico (mg) producido por cada microorganismo en sus respectivos días de producción.

Tabla 3.

Cantidad de antibiótico producido por cada microorganismo.

Microorganismo	Codificación	Días de producción	Cantidad de medio de cultivo (mL)	Cantidad de antibiótico (mg)
<i>Streptococcus</i> sp.	PAP48	4	2000	92,31
<i>Micrococcus luteus</i>	PAP49G3A	4	2000	93,30

Elaborado por: Los autores, 2020.

3.2. Análisis químico de los antibióticos.

3.2.1. Espectrofotometría infrarroja (IR).

En la lectura del espectro del antibiótico PAP48 se identifican varios grupos funcionales como: grupos aminos (N-H) en la vibración superior a los 3600 cm^{-1} , un grupo hidroxilo (O-H) con vibración de alargamiento entre los 3200 a 3600 cm^{-1} , grupos alcanos (C-H) en frecuencia de 2800 a 2900 cm^{-1} , y de 1400 a 1500 cm^{-1} , en la región de 1600 a 1800 cm^{-1} se expuso absorción para grupos funcionales de doble enlace (Ver Anexo 1).

En el espectro del antibiótico PAP49G3A se reconocen diferentes grupos funcionales como: grupos aminos (N-H) en posición superior a los 3500 cm^{-1} , un grupo hidroxilo (O-H) entre 2900 a 3200 con un estiramiento de un anillo aromático, grupos alcanos (C-H) en frecuencia de 2800 a 2900 cm^{-1} y de 1400 a 1500 cm^{-1} , dobles enlaces en frecuencia de 1600 a 1800 cm^{-1} , y finalmente la presencia de grupos carboxilos en frecuencia menor a los 1200 cm^{-1} (Ver Anexo 2).

Ambos antibióticos presentan dentro de la estructura grupos aminos (N-H), que según Jiménez & Guerrero (2011) argumentan que la estructura de cada antibiótico debe presentar un grupo amino para conferir la actividad antimicrobiana. Además, dentro del grupo de antibióticos β -lactámicos existe la presencia de anillos aromáticos, como también existe un subgrupo que añade un hidroxilo en su estructura (Brugueras & Morejón, 1998), lo cual es característico en los resultados de la muestra del antibiótico PAP48.

En el antibiótico PAP49G3A se observa un grupo hidroxilo (O-H) de entre 2900 a 3200 cm^{-1} con un estiramiento de un grupo aromático, que es característico del grupo de betalactamasas. Como mencionan Espinosa & Hernáiz (2002); Skoog et al. (2014) la presencia de grupos aromáticos en

la estructura origina antibióticos del grupo β -lactámicos que suelen ser de amplio espectro, además siempre llevan un grupo amino.

3.2.2. Cromatografía en capa fina (TLC).

Los antibióticos se evaluaron a través de la técnica cromatografía en capa fina (TLC), para evaluar los componentes de cada antibiótico, como fase estacionaria se utilizaron placas de sílica gel (Sigma-Aldrich®, L \times W 10 cm \times 10 cm con factor de fluorescencia a 254 nm) con la siembra de cada antibiótico sobre la placa por cuadruplicado usando el equipo LINOMAT-5; la fase móvil en concentración 1:1 de cloroformo: acetato de etilo permitió la separación de las moléculas. Según Esther & Padrón (2005) la TLC permite la separación de componentes que se encuentran en la fase estacionaria, por efecto de la fase móvil que transporta las sustancias a lo largo de la placa cromatográfica.

En la placa cromatográfica de los antibióticos PAP48 y PAP49G3A, se observaron bandas UV visible usando la cámara UV (Marca CAMAG UV, Modelo: Cabinet) a longitudes de onda de 254 nm y 366 nm (Ver Anexo 3 y Anexo 4). En la publicación de Rabel & Sherma (2018) menciona que después del desarrollo y secado la placa cromatográfica, se puede iluminar con una longitud de onda ultravioleta (UV) a 254 nm, que activa un indicador fluorescente en la superficie del gel de sílica, emitiendo fluorescencia verde, azul claro o blanco, lo cual depende de la fluorescencia del compuesto usado. Según Reich & Do (2017) la visualización a longitud de onda de 366 nm permite la detección de todos los componentes dentro de la placa cromatográfica.

En la Tabla 4 se muestra el cálculo del factor de retención (R_f) de cada una de las bandas visualizadas en la cámara UV- visible.

Tabla 4.

Factor de retención de cada antibiótico (Ver Anexo 3 y Anexo 4).

Microorganismo	Código	N° Rf	Constante
<i>Streptococcus</i> sp.	PAP48	Rf 1	0,12
		Rf 2	0,56
<i>Micrococcus luteus</i>	PAP49G3A	Rf 1	0,1
		Rf 2	0,13
		Rf 3	0,35
		Rf 4	0,58

Elaborado por: Los autores, 2020.

Según Macas & Guzñay (2013) las moléculas orgánicas se encuentran adsorbidas en la fase estacionaria y a medida que se produce el desplazamiento por la fase móvil, las moléculas comienzan a separarse. En el factor de retención se mide el recorrido del soluto sobre el recorrido del solvente, éste tiene un valor constante para cada compuesto en unas condiciones cromatográficas determinadas (adsorbente, disolvente, tamaño de la cubeta, temperatura, etc.) que son imposibles de repetir, y por eso se realiza varias muestras en la misma placa cromatográfica.

Para una mejor visualización de la separación de las moléculas orgánicas, se utiliza el revelador vainillina/ácido sulfúrico, dejando calentar hasta el cambio de coloración. Según Fatima, Aftab, Shaaban, Thorson, & Sajid (2019) al utilizar un revelador las manchas pueden ser de colores: violeta, azul, verde, amarillo lo que expresa la presencia de diferentes clases estructurales de metabolitos secundarios.

3.2.3. Espectrofotometría de masas (MS).

Los antibióticos se evaluaron a través del espectrofotómetro de masas, para evaluar los componentes de cada antibiótico, ácido acético es utilizado para poder identificar el salto de protón en cada molécula antibiótica dentro del equipo. Según López, (2015) la (MS) permite el tamizaje de drogas y fármacos para propósitos clínicos.

En el análisis del *Rf*: 0,12 de la muestra antibiótica PAP48, se obtuvo un peso molecular de 353,27 g/mol (Ver Anexo 5), sin embargo debido al salto del electrón se restó 1 hidrógeno, obteniendo como resultado 352,27 g/mol. El análisis del *Rf*: 0,10 de la muestra antibiótico PAP49G3A, se obtuvo un peso molecular de 413,27 g/mol (Ver Anexo 6), y de la misma manera se restó un hidrógeno por el salto del electrón, obteniendo un peso molecular de 412,27 g/mol. Según López, (2015) las drogas poseen pesos moleculares pequeños, con propiedades volátiles, lo cual son ideales para el análisis (MS), la identificación de un compuesto desconocido se puede lograr por comparación de su espectro de masas en base de datos o relacionando su peso molecular con biblioteca de datos.

El peso molecular obtenido de los antibióticos PAP48 y PAP49G3A dan la posibilidad de enmarcarlos en el grupo de antibióticos β -Lactámicos, debido a que dentro de este grupo los pesos moleculares se encuentran entre 356,34 g/mol a 475,516 g/mol, Tabla 5.

Tabla 5.

Peso molecular del grupo de antibióticos β -Lactámicos.

Grupo	Subgrupo	Antibiótico	Peso molecular
β -Lactámicos	Penicilinas	Penicilina	334,4 - 356,34 g/mol
		Ampicilina	349,406 g/mol
		Amoxicilina	365,4 g/mol
	Cefalosporinas	Cefalotina	396,44 g/mol
		Cefuroxima	424,386 g/mol
		Cefotaxima	455,47 g/mol
		Cefepima	480,56 g/mol
	Carbapenemes	Aztreonam	435,435 g/mol
	Inhibidores de las β -lactamasas	Imipenem	299,347 g/mol
		Meropenem	383,464 g/mol
		Ertapenem	475,516 g/mol
		Ácido Clavulánico	199,16 g/mol

Elaborado por: Los autores, 2020.

3.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana

3.3.1. Bioautografía.

En la Bioautografía de inmersión, se determinó la actividad antibacteriana de los compuestos separados en la TLC. Los resultados de ésta técnica indicaron que el antibiótico PAP48 tuvo actividad antimicrobiana contra los dos microorganismos de control a un R_f 0,12. Los halos de inhibición fueron: 8,9 mm de *Bacillus spizizenii* y de 13,2 mm de *Pseudomonas aeruginosa* (Ver Anexo 7 y Anexo 8), mientras el antibiótico PAP49G3A mostró actividad antibiótica a un R_f 0,10 para *Bacillus spizizenii* con un halo de inhibición de 8,3 mm y de 11,5 mm de *Pseudomonas aeruginosa* (Ver Anexo 9 y Anexo 10).

Para la interpretación de resultados se utiliza Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC) como un indicador de la actividad enzimática microbiana, según (Bravi, 2018) menciona que los reveladores de la actividad deshidrogenasa de los microorganismos vivos, reducen Cloruro de Trifeniltetrazolio (TTC) en Formazán, compuesto que forma un precipitado de color rojo, confirmando así la presencia de microorganismos en zonas metabólicamente activas, mientras que en las zonas incoloras se registra inhibición antimicrobiana, es decir ausencia de microorganismos.

3.3.2. Concentración mínima inhibitoria (MIC).

La MIC es una técnica utilizada para evaluar la actividad antibacteriana de un compuesto, determinando la concentración mínima de una dilución para la inhibición del crecimiento bacteriano (Vassallo, Besinis, Boden, & Handy, 2018). Se realizó un análisis cualitativo de las microplacas y mediante la utilización del TTC se pudo visualizar la presencia o ausencia de microorganismos por el cambio de coloración. Según Saviano & Lourenço (2018) se clasifican las zonas de inhibición según la intensidad de color rojizo como: fuerte, mediano o débil, para identificar la inhibición de microorganismos.

En la microplaca 1 (Ver Anexo 11) inoculada con *Bacillus spizizenii*, el antibiótico PAP48 sufre cambio de coloración a partir de la concentración de 37,5 µg/mL ubicada en la fila D, mientras que PAP49G3A la coloración empieza a partir de la concentración de 18,8 µg/mL ubicada en la fila E. En la microplaca 2 (Ver Anexo 12) inoculada con *Pseudomonas aeruginosa*, PAP48 y PAP49G3A sufren cambios de coloración en la concentración de 18,8 µg/mL ubicada en la fila E. Cada uno de las celdillas “blanco” tuvo cambio de coloración desde la fila A hasta la fila H debido a la presencia de microorganismos, en el control positivo de Gentamicina utilizado para *Bacillus spizizenii* y *Pseudomonas aeruginosa* no se evidencio crecimiento microbiano.

La lectura cuantitativa de las microplacas se realizó a través del equipo Microplate Reader, midiendo las absorbancias de cada una de las celdillas, en la Tabla 6 y Tabla 7 se muestran las absorbancias de la microplaca 1 y 2 respectivamente.

Tabla 6.

Absorbancias de microplaca 1, usando el equipo Microplate Reader.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,08	0,07	0,08	0,12	0,78	0,08	0,08	0,07	0,08	0,91	0,07	0,08
B	0,09	0,08	0,09	0,15	0,69	0,09	0,1	0,08	0,09	0,75	0,08	0,09
C	0,1	0,08	0,11	0,16	0,8	0,16	0,1	0,11	0,11	0,7	0,09	0,11
D	0,11	0,11	0,19	0,34	0,98	0,19	0,12	0,13	0,17	0,71	0,11	0,12
E	0,11	0,41	0,23	0,53	0,82	0,23	0,18	0,22	0,21	0,55	0,11	0,12
F	0,59	0,62	0,6	0,6	0,82	0,42	0,47	0,54	0,54	0,98	0,12	0,14
G	0,73	0,73	0,72	0,68	0,81	0,62	0,58	0,62	0,65	0,67	0,13	0,14
H	0,98	0,84	0,93	0,83	0,99	0,85	0,78	0,76	0,76	0,86	0,14	0,15

Elaborado por: Los autores, 2020.

Tabla 7.

Absorbancias de microplaca 2, usando el equipo Microplate Reader.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,14	0,13	0,14	0,12	0,98	0,12	0,13	0,12	0,11	1,16	0,13	0,11
B	0,16	0,14	0,15	0,15	1,1	0,13	0,14	0,14	0,13	1,31	0,13	0,11
C	0,16	0,16	0,16	0,16	1,14	0,14	0,15	0,15	0,16	0,93	0,14	0,16
D	0,19	0,19	0,19	0,2	0,86	0,16	0,17	0,16	0,2	1,12	0,16	0,14
E	0,71	0,24	0,23	0,25	0,99	0,49	0,43	0,46	0,58	0,98	0,15	0,14
F	0,77	0,79	0,6	0,41	0,99	0,82	0,57	0,76	0,75	0,87	0,15	0,16
G	0,89	0,95	0,72	0,76	0,9	0,9	0,88	0,93	0,98	1,24	0,12	0,17
H	0,98	1,1	0,93	1,1	1,32	1,04	1,08	1,1	1,12	1,32	0,15	0,15

Elaborado por: Los autores, 2020.

Se calculó el porcentaje de inhibición de PAP48 y PAP49G3A, frente a *Bacillus spizizenii* y *Pseudomonas aeruginosa* Tabla 8, Tabla 9, Tabla 10 y Tabla 11. Según Doroteo, Díaz, Terry, & Rojas, (2013) el porcentaje de inhibición se calcula de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición: } \frac{(\text{Absorbancia de control} - \text{absorbancia de la muestra}) \times 100}{\text{Absorbancia de control}}$$

Tabla 8.

Porcentaje de Inhibición de *Bacillus spizizenii* frente al antibiótico PAP48.

Concentración (µg/mL)	% de inhibición			
	1	2	3	4
300	90,12	91,01	89,47	84,21
150	86,87	88,02	87,45	79,08
75	87,92	89,66	86,3	80,2
37,5	88,82	89,02	80,39	65,55
18,8	86,11	49,57	71,99	34,96
9,4	28,76	24,64	27,31	27,06
4,7	10,16	9,05	11,28	15,99
2,3	1,11	14,86	5,97	16,28

Elaborado por: Los autores, 2020.

Tabla 9.

Porcentaje de Inhibición de *Bacillus spizizenii* frente al antibiótico PAP49G3A.

Concentración (µg/mL)	% de inhibición			
	1	2	3	4
300	91,52	91,41	92,07	90,86
150	88,27	87,33	89,6	87,73
75	77,84	85,37	84,38	84,38
37,5	73,06	82,93	81,81	76,16
18,8	58,53	66,42	58,9	60,92
9,4	57,42	52,74	45,53	45,02
4,7	7,29	13,69	8,48	3,72
2,3	0,23	9,23	11,45	10,75

Elaborado por: Los autores, 2020.

Tabla 10.

Porcentaje de Inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* frente al antibiótico PAP48.

Concentración (µg/mL)	% de inhibición			
	1	2	3	4
300	85,81	86,93	86,22	87,44
150	85,57	87,02	86,48	86,84
75	85,86	85,69	86,22	86,04
37,5	78,36	77,66	77,66	76,85
18,8	27,81	75,94	76,74	75,23
9,4	22,21	20,39	39,25	58,52
4,7	1,45	-5,87	20,54	15,55
2,3	25,74	16,78	29,38	16,55

Elaborado por: Los autores, 2020.

Tabla 11.

Porcentaje de Inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* frente al antibiótico PAP49G3A.

Concentración (µg/mL)	% de inhibición			
	1	2	3	4
300	89,97	89,01	89,97	90,57
150	89,74	89,28	89,51	89,74
75	84,66	83,69	84,44	82,73
37,5	85,47	85,02	86,01	82,51
18,8	50,31	56,31	53,46	41,04
9,4	5,77	33,83	12,12	12,93
4,7	27,04	28,74	24,37	20,49
2,3	21,75	18,35	16,69	15,41

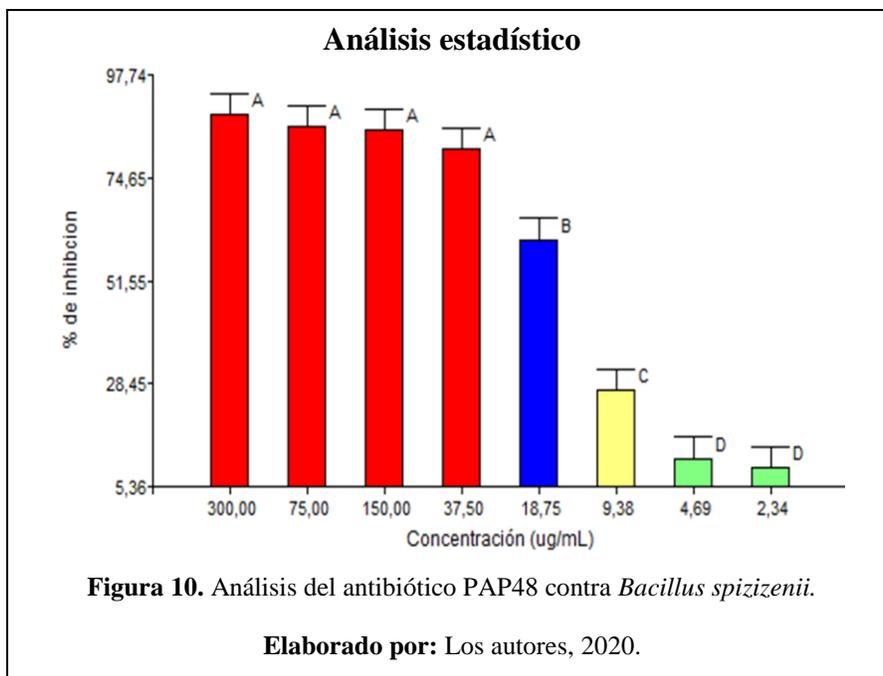
Elaborado por: Los autores, 2020.

3.3.2.1. Análisis del porcentaje de inhibición de *Bacillus spizizenii* frente al antibiótico PAP48.

Mediante la prueba de Shapiro-Wilks (Ver Anexo No. 13) se determinó que la mayoría de datos son paramétricos al presentar un p-valor $> \alpha=0,05$, por eso se realizó una prueba ANOVA.

En el análisis de varianza (Ver Anexo 13) se relacionan las concentraciones de antibiótico utilizadas con la inhibición de *Bacillus spizizenii*, presentando un Fisher de 51,48 con un p-valor $<0,001$, lo cual indica la existencia de diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones utilizadas del antibiótico PAP48 contra *Bacillus spizizenii*, es decir al menos una concentración es diferente.

En la prueba de ANOVA Post-Hoc de Duncan con 5 % de significancia, se muestran 8 concentraciones del antibiótico con 4 rangos estadísticamente significativos (A), (B), (C), (D) Figura 10. El rango A conformado por las concentraciones de antibiótico 300 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$, 37,5 $\mu\text{g/mL}$, presento los porcentajes de inhibición más altos 88,70 %, 85,36 %, 86,02 %, 80,95 % respectivamente, se considera este rango con las diferentes concentraciones del antibiótico PAP48 óptimo para inhibir el crecimiento de *Bacillus spizizenii*. Los rangos B, C, D con las concentraciones de antibiótico 18,75 $\mu\text{g/mL}$, 9,38 $\mu\text{g/mL}$, 4,69 $\mu\text{g/mL}$, 2,34 $\mu\text{g/mL}$, presentaron porcentajes de inhibición menores a los del rango A, es decir no presentaron inhibición bacteriana.



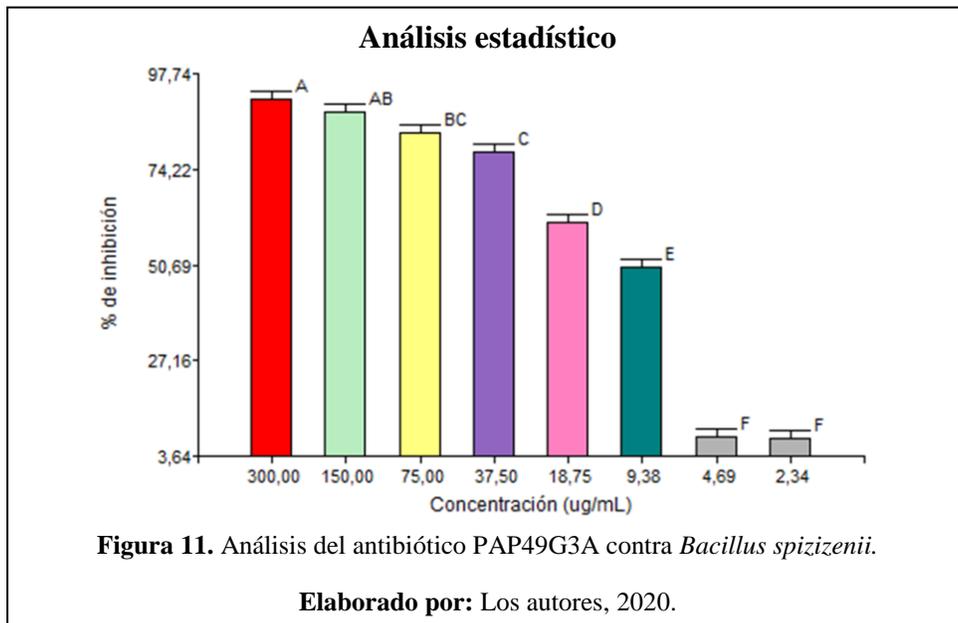
3.3.2.2. Análisis del porcentaje de inhibición de *Bacillus spizizenii* frente al antibiótico PAP49G3A.

Mediante la prueba de Shapiro-Wilks (Ver Anexo 14) se determinó que la mayoría de datos son paramétricos al presentar un p-valor $> \alpha=0,05$, por eso se realizó una prueba ANOVA.

En el análisis de varianza (Ver Anexo 14) se relacionan las concentraciones de antibiótico utilizadas con la inhibición de *Bacillus spizizenii*, presentando un Fisher de 289,65 con un p-valor $<0,001$, lo cual indica la existencia de diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones utilizadas del antibiótico PAP49G3A contra *Bacillus spizizenii*, es decir al menos una concentración es diferente.

En la prueba de ANOVA Post-Hoc de Duncan con 5 % de significancia, se muestran 8 concentraciones del antibiótico con 7 rangos estadísticamente significativos (A), (AB), (BC), (C), (D), (E) figura 11. Los rangos A, AB, BC, C con las concentraciones de 300 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$, 37,50 $\mu\text{g/mL}$, presentan los mayores porcentajes de inhibición respectivamente 91,47

%, 88,23 %, 82,99 %, 78,49 %, por lo que se consideran estos rangos con las diferentes concentraciones del antibiótico PAP49G3A óptimos para inhibir el crecimiento de *Bacillus spizizenii*. El rango D conformado por la concentración de 18,75 µg/mL, generó un porcentaje de inhibición del 61,19 %, el rango E con una concentración de 9,38 µg/mL, presento un porcentaje de inhibición de 50,18 %, y el rango F conformado por dos concentraciones 4,69 µg/mL, 2,34 µg/mL originó un porcentaje de inhibición respectivamente del 8,30 % y 7,92 %, de modo que estos rangos presentan una menor inhibición en comparación a los otros resultados.



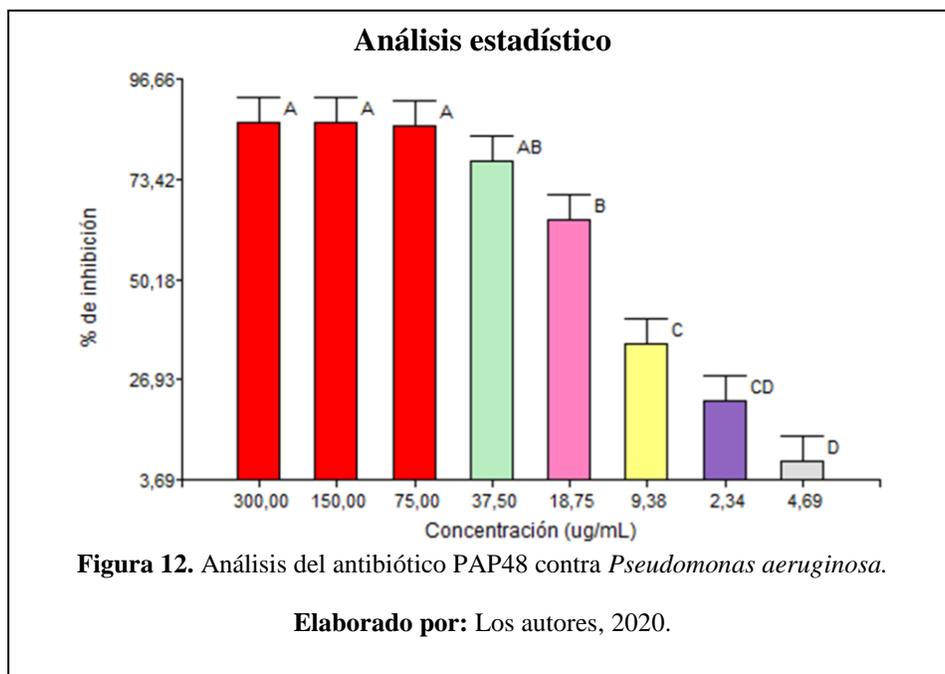
3.3.2.3. Análisis del porcentaje de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* frente al antibiótico PAP48.

Mediante la prueba de Shapiro-Wilks (Ver Anexo 15) se determinó que la mayoría de datos son paramétricos al presentar un p-valor $> \alpha=0,05$, por eso se realizó una prueba ANOVA.

En el análisis de varianza (Ver Anexo 15) se relacionan las concentraciones de antibiótico utilizadas con la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa*, presentando un Fisher de 27,29 con un

p-valor <0,001, lo cual indica la existencia de diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones utilizadas del antibiótico PAP48 contra *Pseudomonas aeruginosa*, es decir al menos una concentración es diferente.

En la prueba de ANOVA Post-Hoc de Duncan con 5 % de significancia, se muestran 8 concentraciones del antibiótico con 6 rangos estadísticamente significativos (A), (AB), (B), (C), (CD), (D) Figura 12. El rango A conformado por las concentraciones de 300 µg/mL, 150 µg/mL, 75 µg/mL, presenta el porcentaje de inhibición más alto 86,60 %, además los rangos AB, B con las concentraciones de 37,50 µg/mL y 18,75 µg/mL presentan los porcentajes de inhibición respectivamente 77,63 %, 63,93 %, por lo cual, se consideran estos rangos con las diferentes concentraciones del antibiótico PAP48 óptimos para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. En cambio, los rangos C, CD, D con concentraciones respectivamente 9,38 µg/mL, 2,34 µg/mL, 4,69 µg/mL presentan una menor inhibición en comparación a los otros resultados.

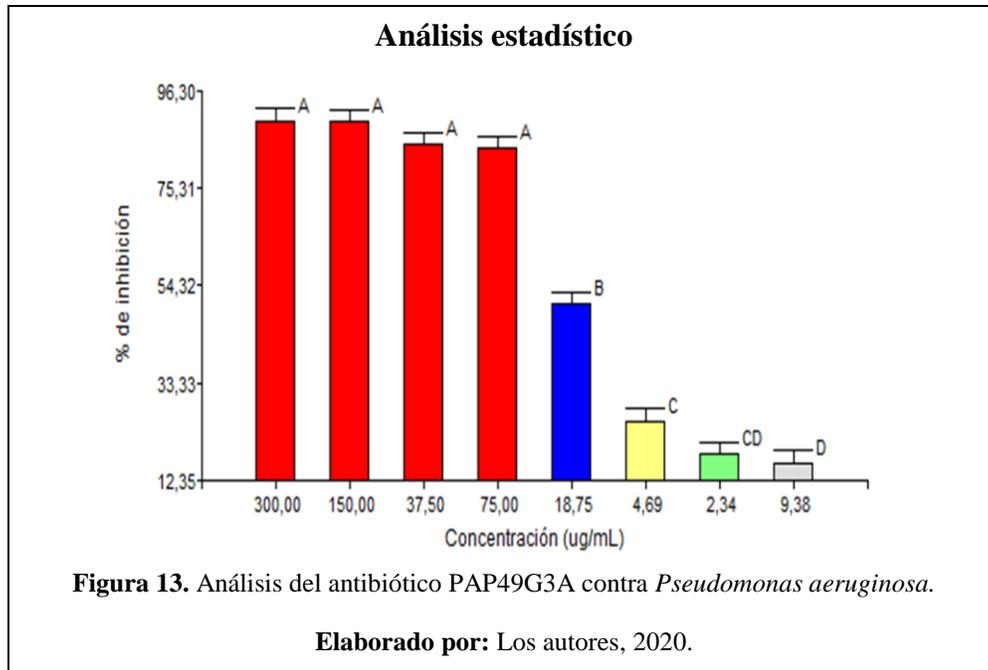


3.3.2.4. Análisis del porcentaje de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* frente al antibiótico PAP49G3A.

Mediante la prueba de Shapiro-Wilks (Ver Anexo 16) se determinó que la mayoría de datos son paramétricos al presentar un p-valor $> \alpha=0,05$, por eso se realizó una prueba ANOVA.

En el análisis de varianza (Ver Anexo 16) se relacionan las concentraciones de antibiótico utilizadas con la inhibición de *Pseudomonas aeruginosa*, presentando un Fisher de 165,95 con un p-valor $<0,001$, lo cual indica la existencia de diferencia estadísticamente significativa en las concentraciones utilizadas del antibiótico PAP49G3A contra *Pseudomonas aeruginosa*, es decir al menos una concentración es diferente.

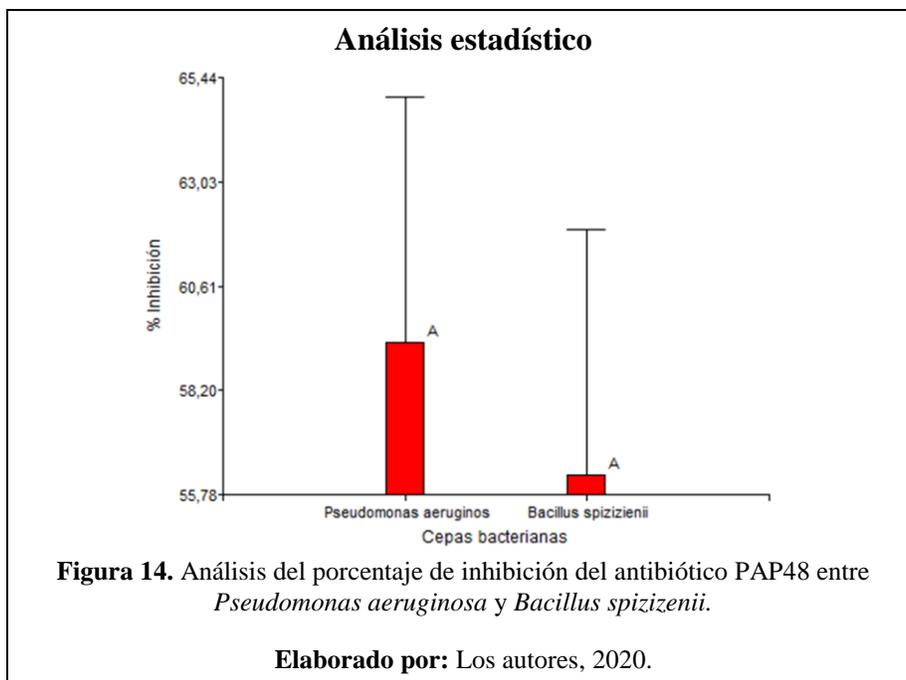
En la prueba de ANOVA Post-Hoc de Duncan con 5 % de significancia, se muestran 8 concentraciones del antibiótico con 4 rangos estadísticamente significativos (A), (B), (C), (D) Figura 13. El rango A conformado por las concentraciones de antibiótico 300 $\mu\text{g/mL}$, 150 $\mu\text{g/mL}$, 37,5 $\mu\text{g/mL}$, 75 $\mu\text{g/mL}$, presento el porcentaje de inhibición más altos 89,88 %, de modo que se considera este rango con las diferentes concentraciones del antibiótico PAP49G3A óptimo para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Los rangos B, C, CD, D con las concentraciones de antibiótico 18,75 $\mu\text{g/mL}$, 4,69 $\mu\text{g/mL}$, 2,34 $\mu\text{g/mL}$, 9,38 $\mu\text{g/mL}$, presentaron porcentajes de inhibición menores a los del rango A ya que, no presentaron inhibición bacteriana.



3.3.2.5. Análisis del porcentaje de inhibición del antibiótico PAP48 entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*.

En el análisis de varianza (Ver Anexo 17) se relaciona los porcentajes de inhibición del antibiótico PAP48 entre los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*, presentando un Fisher de 0,15 con un p-valor 0,70; lo cual indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en los porcentajes de inhibición entre *Pseudomonas aeruginosa*, y *Bacillus spizizenii*.

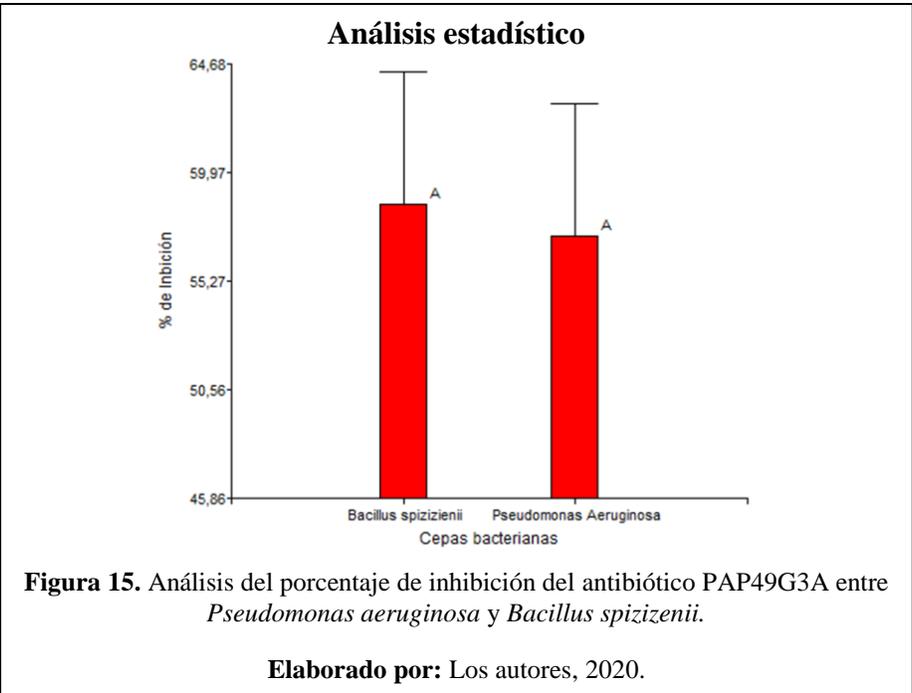
En la prueba de ANOVA Post-Hoc de Duncan con 5 % de significancia, se muestran las dos cepas bacterianas con un solo rango estadísticamente significativo Figura 14. El rango A al estar conformado por *Pseudomonas aeruginosa*, y *Bacillus spizizenii* presentó porcentajes de inhibición similares respectivamente 59,30 % y 56,22 %, es decir el tratamiento con el antibiótico PAP48 inhibe de igual manera los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* c *Bacillus spizizenii*.



3.3.2.6. Análisis del porcentaje de inhibición del antibiótico PAP49G3A entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*.

En el análisis de varianza (Ver Anexo 18) se relaciona los porcentajes de inhibición del antibiótico PAP48 entre los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*, presentando un Fisher de 0,15 con un p-valor 0,7044, lo cual indica que no existe diferencia estadísticamente significativa en los porcentajes de inhibición entre *Pseudomonas aeruginosa*, y *Bacillus spizizenii*.

En la prueba de ANOVA Post-Hoc de Duncan con 5 % de significancia, se muestran las dos cepas bacterianas con un solo rango estadísticamente significativo Figura 14. El rango A al estar conformado por *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus spizizenii* presentó porcentajes de inhibición similares respectivamente 59,30 % y 56,22 %, es decir que el tratamiento con el antibiótico PAP48 inhibe de igual manera los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* como *Bacillus spizizenii*.



Conclusiones

En la producción de los antibióticos, la utilización de 2 litros de medio de cultivo ISP2 permitió obtener: 92,31 mg/mol de PAP48 producido por *Streptococcus* sp. a los 4 días de crecimiento microbiano; mientras que 93,31 mg/mol de PAP49G3A producido por *Micrococcus luteus* a los 4 días de crecimiento microbiano.

En la lectura del espectro infrarrojo (IR) se determinaron grupos funcionales que les confieren la acción antibiótica para PAP48 y PAP49G3A; la Cromatografía en capa fina (TLC) con una fase móvil en concentración 1:1 de cloroformo: acetato de etilo permitió la correcta separación de las moléculas para el análisis Espectrofotométrico de masas (MS) donde se determinó el peso molecular de 352,27 g/mol para PAP48 y de 412,27 g/mol para PAP49G3A, y su posible clasificación como antibióticos β -lactámicos.

En la prueba de bioautografía, el antibiótico PAP48 tuvo actividad antimicrobiana contra *Bacillus spizizenii* y *Pseudomonas aeruginosa* a un R_f 0,12, mientras el antibiótico PAP49G3A mostró actividad antibiótica a un R_f 0,10 contra los dos microorganismos control.

La prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), evaluó que el antibiótico PAP48 y PAP49G3A a una concentración de 300 μ g/mL inhiben el crecimiento de *Bacillus spizizenii* y *Pseudomonas aeruginosa* en un porcentaje similar, es decir que estos antibióticos presentan similar inhibición antes estos microorganismos control.

Recomendaciones

Realizar estudios moleculares de electroforesis en gel de poliacrilamida para identificar de manera exacta por comparación de aminoácidos si cada antibiótico pertenece al grupo de los β -lactámicos.

Evaluar la estructura molecular mediante resonancia magnética, la secuenciación de aminoácidos de cada antibiótico y su posible semejanza evolutiva y funcional con el grupo de los β -lactámicos.

Se sugiere realizar una aplicación de técnicas espectrofotométricas como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la posible purificación de los antibióticos.

Referencias bibliográficas

- Angles, E. (2018). Uso racional de antimicrobianos y resistencia bacteriana ¿hacia dónde vamos? *Revista Medica Herediana*, 29(1), 3. <https://doi.org/10.20453/rmh.v29i1.3253>
- Arranz, A. (2017). *Antibióticos En El Suelo*. Universidad Complutense.
- Bastidas, Y., & Vaca, J. (2018). *CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PROVENIENTES DE SUELOS DE LOS CANTONES QUITO Y RUMIÑAHUI*. Universidad Politecnica Salesiana. <https://doi.org/10.20868/UPM.thesis.39079>
- Bermejo, R., & Moreno, A. (2014). Análisis Instrumental. In E. SINTESIS (Ed.), *Capítulo 8 Análisis Infrarrojo* (p. 468). Madrid.
- Bravi, V. (2018). *Aislamiento y determinación de la estructura química de principios activos presentes en Eugenia uniflora L., obtenidos de compuestos solubles en éter de petróleo*. Universidad Nacional de la Plata. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/71832/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Brugueras, M., & Morejón, M. (1998). Antibacterianos de Acción Sistémica. Parte I. Antibióticos Betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), 15. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/mgi/v14n4/mgi08498.pdf>
- Bu'lock, J., & Kristiansen, B. (1987). *Basic Biotechnology*. (Ilustrada, Ed.) (Academic.). Zaragoza: ACRIBIA, S.A.
- Carlone, N., & Pompei, R. (2013). *Microbiología Farmaceutica* (2a ed.). Napoles.
- Castro, F. (2014). *Análisis Instrumental algunos métodos fotométricos y electrométricos apuntes*

de clase (2a ed.). Bogotá: U.T.P.

CDC; OMS. (2009). Manual para las pruebas de identificación y susceptibilidad antimicrobiana. *Medicina y Laboratorio*, 15(11–12), 549–587.

Chavez, R. (2015). *Conocimientos , actitudes y prácticas del consumo de antibióticos en la población del distrito de Jesús*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA. Retrieved from http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/handle/UNSCH/1166/TesisFar430_Cha.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Colán, C., & Gaspar, Ó. (2015). *Estudio de utilización de antibacterianos de reserva en las unidades de cuidados críticos e intermedios del Hospital Nacional Dos de Mayo durante 2012-2013*. Universidad WEINER. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Corzo, A. (2019). *Técnicas de análisis en química orgánica CROMATOGRAFÍA* (1a ed.). Santiago del Estero. Retrieved from <https://fcf.unse.edu.ar/archivos/series-didacticas/SD-44-Cromatografia-CORZO.pdf>

Coyle, M., Cavalieri, S. J., Rankin, I. D., Harbeck, R. J., & Sautter, R. L. (2006). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. Retrieved from <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>

Dong, Y., Liu, J., & Guo, T. (2018). Introduction of Mass Spectrometry and Ambient Ionization Techniques. In *Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry* (p. 373). Beijing: John Wiley & Sons, Incorporated.

Doroteo, V. H., Díaz, C., Terry, C., & Rojas, R. (2013). COMPUESTOS FENÓLICOS Y

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE IN VITRO DE 6 PLANTAS PERUANAS, 79(1), 13–20.

Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v79n1/a03v79n1.pdf>

Espinosa, P., & Hernáiz, M. (2002). Síntesis Quimioenzimática para la Obtención de Compuestos Antiinfecciosos. *Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.*, 20. Retrieved from https://pdfs.semanticscholar.org/bd54/ca047ca6ad93e6f4237d914414623cadf97c.pdf?_ga=2.203160593.1073504607.1583730574-429005166.1583730574

Esther, M., & Padrón, T. (2005). *MÉTODOS FÍSICOS DE SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE SUSTANCIAS ORGÁNICAS*. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. [https://doi.org/84 – 689 - 1114 - 3](https://doi.org/84-689-1114-3)

Farraj, D. A. Al, Varghese, R., Vágvölgyi, C., & Mahmoud, A. H. (2019). Antibiotics production in optimized culture condition using low cost substrates from *Streptomyces* sp . AS4 isolated from mangrove soil substrates from *Streptomyces* sp . AS4 isolated from mangrove soil. *Journal of King Saud University - Science*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.12.008>

Fatima, A., Aftab, U., Shaaban, K. A., Thorson, J. S., & Sajid, I. (2019). Spore forming Actinobacterial diversity of Cholistan Desert Pakistan : Polyphasic taxonomy , antimicrobial potential and chemical profiling, 1–17. Retrieved from <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s12866-019-1414-x>

García, M. (2014). *Aplicación de aceites esenciales para el control de bacteriosis que afectan la producción de Solanum lycopersicum L . (tomate)*. Universidad ORT Uruguay. Retrieved from https://dspace.ort.edu.uy/bitstream/handle/20.500.11968/3120/Material_completo.pdf?sequence=-1&isAllowed=y

García, M. (2016). *Nuevas estrategias analíticas de extracciones selectivas en continuo*

acopladas a la cromatografía de líquidos para la determinación de antibióticos en muestras biológicas. UNED. Retrieved from <http://e-spacio.uned.es/mwg-internal/de5fs23hu73ds/progress?id=IVKaVcJmZA-6uYCGHA11GwWVBgl8mNUwkAyAJuqIEFw,&dl>

Gorrín, Y. (2018). *Caracterización genética de actinomicetos aislados en suelos de Tenerife y evaluación de su potencial biotecnológico Genetic characterization of Actinomycetes isolated from soils of Tenerife and assessment of their biotechnological potential Trabajo de Fi.* Universidad La Laguna. Retrieved from https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/9644/Caracterizacion_genetica_de_actinomicetos_aislados_en_suelos_de_Tenerife_y_evaluacion_de_su_potencial_biotecnologico.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Gutiérrez, M. C. (2002). La cromatografía líquida: Aplicación de la TLC a la separación de colorantes. *Boletín Intexter Del Instituto de Investigación Textil y de Cooperación Industrial*, (122), 29–34. Retrieved from https://www.academia.edu/31565474/LA_CROMATOGRAFÍA_LÍQUIDA_APLICACIÓN_DE_LA_TLC_A_LA_SEPARACIÓN_DE_COLORANTES

Guzmán, D. (2018). *Análisis químico del antibiótico producido por Bacillus megaterium aislado de muestras de suelo, mediante cromatografía y técnicas espectroscópicas.* Universidad Politécnica Salesiana.

Hernández, A., Alfaro, I., & Ronald, A. (2003). *Microbiología Industrial.* San José: EUNED. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&printsec=frontcover&dq=microbiologi>

a+industrial&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjqiO-b0-

DIAhVE1VkKHxEwCXEQ6AEIKDAA#v=onepage&q&f=false

Hoyo, V. (2017). *Resistencia a antibióticos*. Universidad de Cantabria. Retrieved from [https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/11660/Hoyo Victoria.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/11660/Hoyo_Victoria.pdf?sequence=4&isAllowed=y) Santisteban

Jiménez, A., & Guerrero, R. (2011). *GENÉTICA MOLECULAR BACTERIANA*. (E. R. S.A., Ed.). Barcelona.

Jiménez, L., & Rodríguez, Y. (2018). *Determinacion de una técnica selectiva por cromatografía en capa fina para identificación de benzodiazepinas*. Universidad Norbert Wiener. Retrieved from [http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/2760/TESIS Jimenez Laura - Rodriguez Yessica.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/2760/TESIS_Jimenez_Laura_Rodriguez_Yessica.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Lizcano, A., & Vergara, J. (2008). *EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y/O ACEITES ESENCIALES DE LAS ESPECIES VEGETALES Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata FRENTE A MICRORGANISMOS PATÓGENOS Y FITOPATÓGEN*. Pontificia Universidad Javeriana. Retrieved from <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>

López, R. (2015). Monitoreo de fármacos por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en el laboratorio clínico del Hospital Nacional Psiquiátrico. *Revista Cúpula*, 29(1), 17–22. Retrieved from <https://docplayer.es/6721924-Monitoreo-de-farmacos-por-cromatografia-de-gases-acoplado-a-espectrometria-de-masas-en-el-laboratorio-clinico-del-hospital-nacional-psiquiatrico.html>

Macas, V., & Guñay, N. (2013). *Determinación de compuestos benzodiazepínicos en muestras de aspirado gástrico por el método de cromatografía en capa fina, que ingresan al laboratorio de química forense del departamento de criminalística de la policía judicial de Chimborazo durante el p.* Universidad Nacional de Chmborazo. Retrieved from <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/1089/1/UNACH-EC-LAB.CLIN-2013-0012..pdf>

Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). *BROCK, Biología de los microorganismos* (12va Ed.). Madrid.

Mateos, P. (2015). Tema 20. Agentes antimicrobianos y microorganismos. *Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca*, 9. Retrieved from <http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema20.html>

Mondragón, P. (2017). *Espectroscopia de infrarrojo para todos* (1a ed.). Guadalajara.

Montaño, N., Sandoval, L., Camargo, S., & Sánchez, J. (2010). Los microorganismos : pequeños gigantes. *Elementos: Ciencia y Cultura*, 77(febrero-abril), 15–23.

Morales, M. (2018). *Prevalencia de la dispensación de medicamentos antimicrobianos en farmacias y boticas privadas de Sechura, abril - junio, 2018*. Universidad San Pedro. Retrieved from http://repositorio.usanpedro.edu.pe/bitstream/handle/USANPEDRO/9232/Tesis_60134.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Moreno, D., Rodríguez, R., Olmo, M., & García, A. M. (2017). Talanta Validation of a new method based on salting-out assisted liquid-liquid extraction and UHPLC-MS / MS for the determination of betalactam antibiotics in infant dairy products. *Talanta*, 167(December 2016), 493–498. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.02.045>

Murray, T. (2013). ESTREPTOCOCOS. *The Microbe Library, Edición 23*.

Ness, E. (2015). The Hunt for Antibiotics in Soil. *Soil Horizons*, 56(5), 6.
<https://doi.org/10.2136/sh2015-56-5-f>

Ochoa, L., & Sarmiento, A. (2018). *ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE VEGETAL *Bucquetia glutinosa* (L. f.) DC. (Melastomataceae) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA*. Universidad de ciencias ambientales y aplicadas. Retrieved from [https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/996/1/TESIS 2018-05-22.pdf](https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/996/1/TESIS%2018-05-22.pdf)

Patiño, D. (2003). ¿Porqué las bacterias se hacen resistente a la acción de los antibióticos? *Umbral Científico*, 3, 48–56.

Prescott, H. (2009). *Mirobiologia*. (McGraw-Hill, Ed.) (7 ed.).

Protasov, E., Axenov-Gribanov, D., Rebets, Y., Voytsekhovskaya, I., Tokovenko, B., Shatilina, Z., ... Timofeyev, M. (2017). The diversity and antibiotic properties of actinobacteria associated with endemic deepwater amphipods of Lake Baikal. *Antonie van Leeuwenhoek*, 110(12), 1293–1611. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10482-017-0910-y>

Quesada, S. (2018). *Antibióticos En El Suelo*. Universidad Complutense.

Quiñones, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque “Una salud”. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3), 1–17.

Quintana, A. (2002). *Antibióticos. Bases Microbiológicas del uso de antimicrobianos*. Uruguay: Universidad de la República. Retrieved from [http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap 28.pdf](http://www.higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap28.pdf)

Rabassa, G., Pérez, A., Pérez, E., González, E., & Álvarez, E. (2015). La microbiología industrial

como herramienta efectiva en la obtención de productos de alta demanda. *Revista Vitual Pro*, 32.

Retrieved from

https://www.researchgate.net/publication/321059252_La_microbiologia_industrial_como_herramienta_efectiva_en_la_obtencion_de_productos_de_alta_demanda

Rabel, F., & Sherma, J. (2018). *Thin-Layer Chromatography — Plate Technology* ☆. *Encyclopedia of Analytical Science, 3rd Edition* (3rd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14456-7>

Reich, E., & Do, T. T. K. (2017). *THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY | Method Development* ☆. *Encyclopedia of Analytical Science 3rd edition* (3rd ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14313-6>

Rodríguez, G. (2006). *Géneros Streptococcus y Enterococcus*.

Rodríguez, I. (2015). *OBTENCIÓN DE FRACCIONES Y/O AISLAMIENTO DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA CEPAS DE Staphylococcus aureus A PARTIR DE Cordia boissier*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Retrieved from <http://eprints.uanl.mx/13720/1/1080238514.pdf>

Rosales, V., Acosta, J., Santos, D., & Gonzalez, M. (2009). MICROCOCCUS. *Universidad Privada Telesup, Facultad de Agroindustria*, 2–14.

Saviano, A. M., & Lourenço, F. R. (2018). Talanta Rapid microbiological methods (RMMs) for evaluating the activity of cephalosporin antibiotics employing triphenyltetrazolium chloride. *Talanta*, 185(April), 520–527. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.020>

Skoog, D., West, D., Holler, J., & Crouch, S. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9th

ed.). Cengage Learning.

Smith, J. (2004). *Biotecnología* (4ta Ed.). Zaragoza: ACRIBIA, S.A.

Song, K., & Spezia, R. (2018). *Theoretical Mass Spectrometry*. Barlín: De Gruyter, Inc.

Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacterología y Virología Médica*, 36(Cim), 663–671.
<https://doi.org/10.3989/Pirineos.2010.165006>

Tejeda, A., Montesinos, R., & Guzmán, R. (2011). *Bioseparaciones* (2a ed.). México: Pearson Education, S.A.

Trejo, W. H., Kirsch, D. R., Biskupiak, J. E., Meyers, E., Gillum, A. M., & Dean, L. (2015). NEOBERNINAMYCIN, A NEW ANTIBIOTIC PRODUCED BY MICROCOCCUS LUTEUS, (May), 684–687.

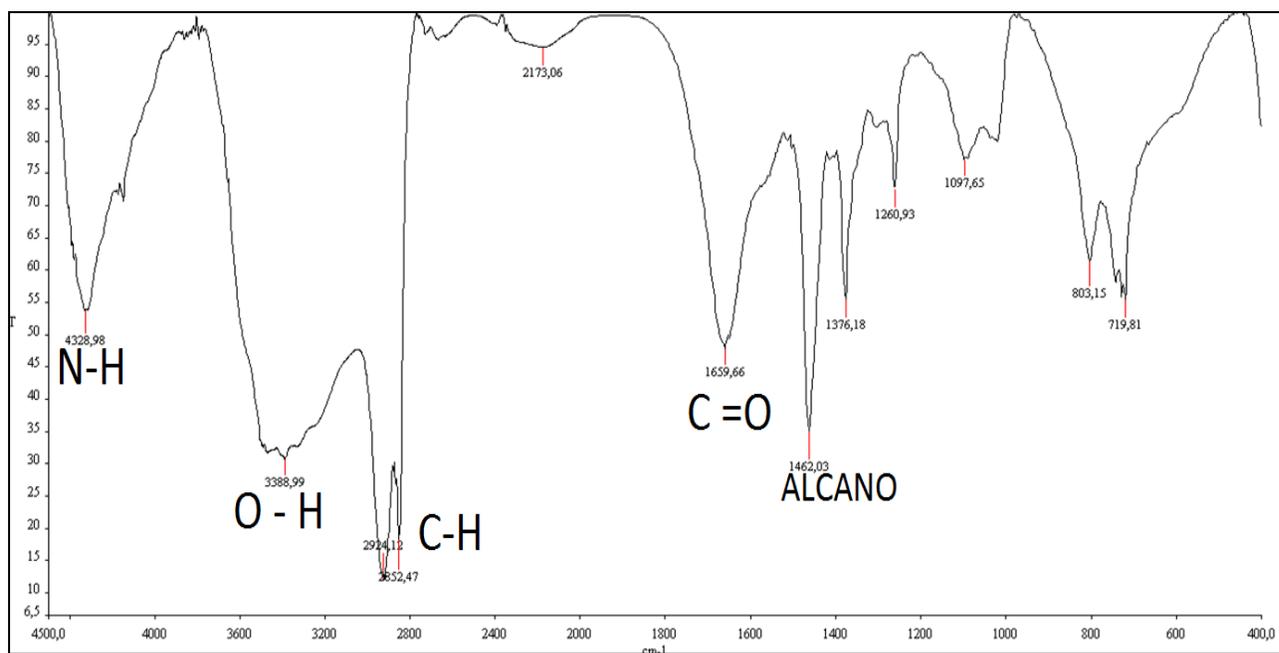
Vassallo, J., Besinis, A., Boden, R., & Handy, R. D. (2018). Ecotoxicology and Environmental Safety The minimum inhibitory concentration (MIC) assay with Escherichia coli : An early tier in the environmental hazard assessment of nanomaterials? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (April), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.085>

Zimbro, M. J., Power, D. A., Miller, S. M., Wilson, G. E., & Johnson, J. A. (2009). *Difco™ & BBL™ Manual Manual of Microbiological Culture Media* (2da Editio). Sparks, Maryland.

Anexo

Anexo 1.

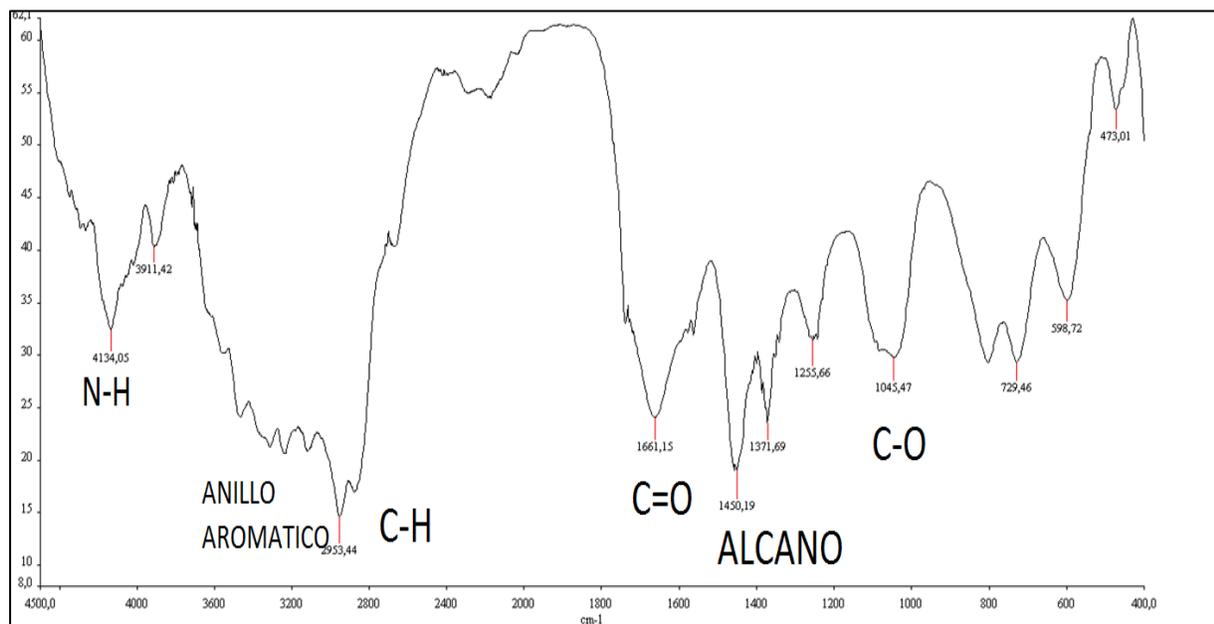
Espectros Infrarrojos del Antibiótico producido por *Streptococcus* sp. con la presencia de grupo amino, hidroxilo, alcanos, alquenos.



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 2.

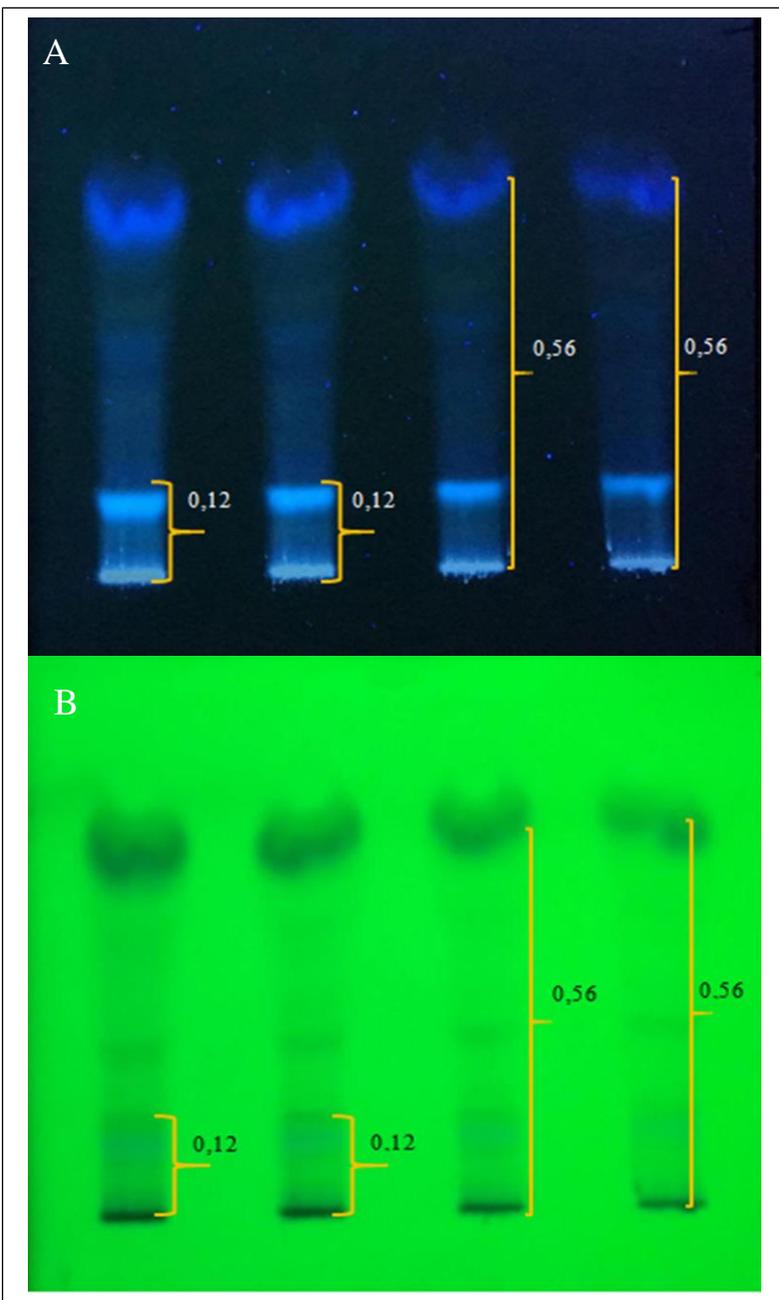
Espectros Infrarrojos del Antibiótico producido por *Micrococcus luteu*. con la presencia de grupo amino, hidroxilo, alcanos, alquenos y la presencia de anillo aromático.



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 3.

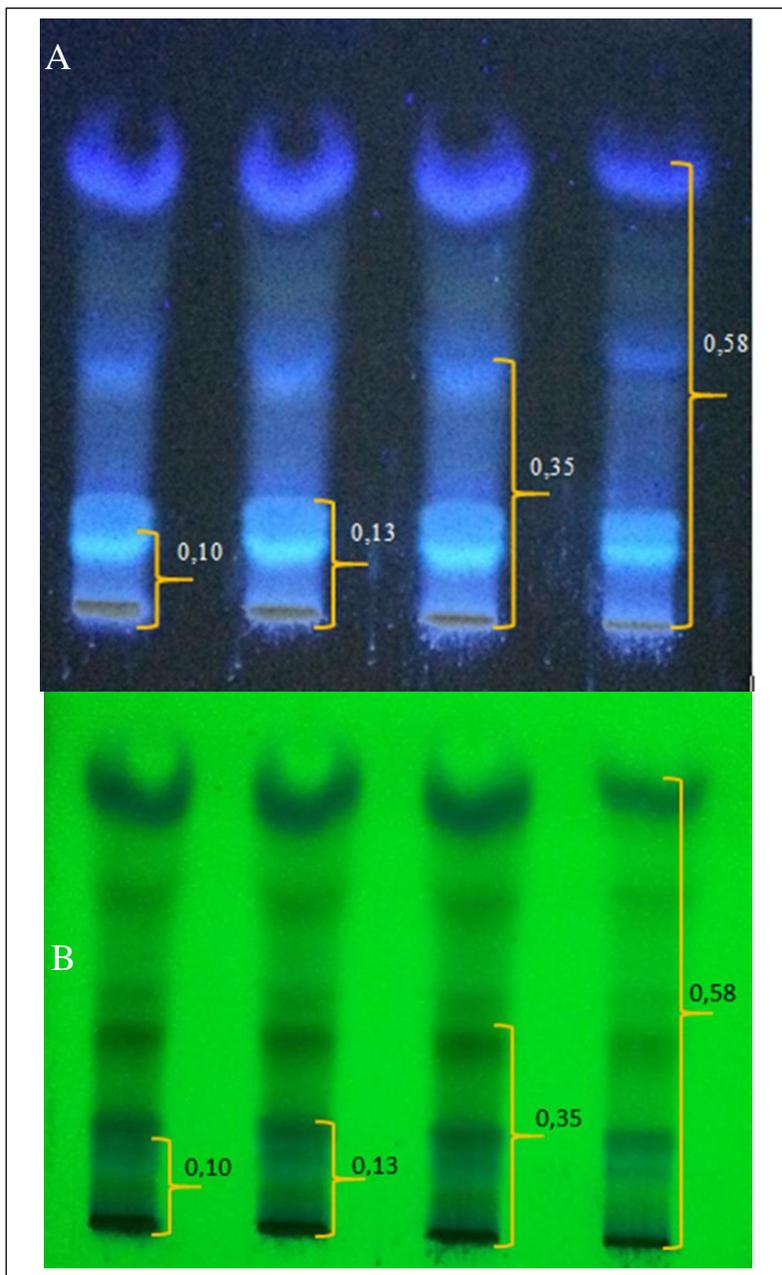
Cromatografía en capa fina (TLC) bajo luz UV a 254 nm – absorbancia (A), a 365 nm fluorescencia (B) de PAP48.



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 4.

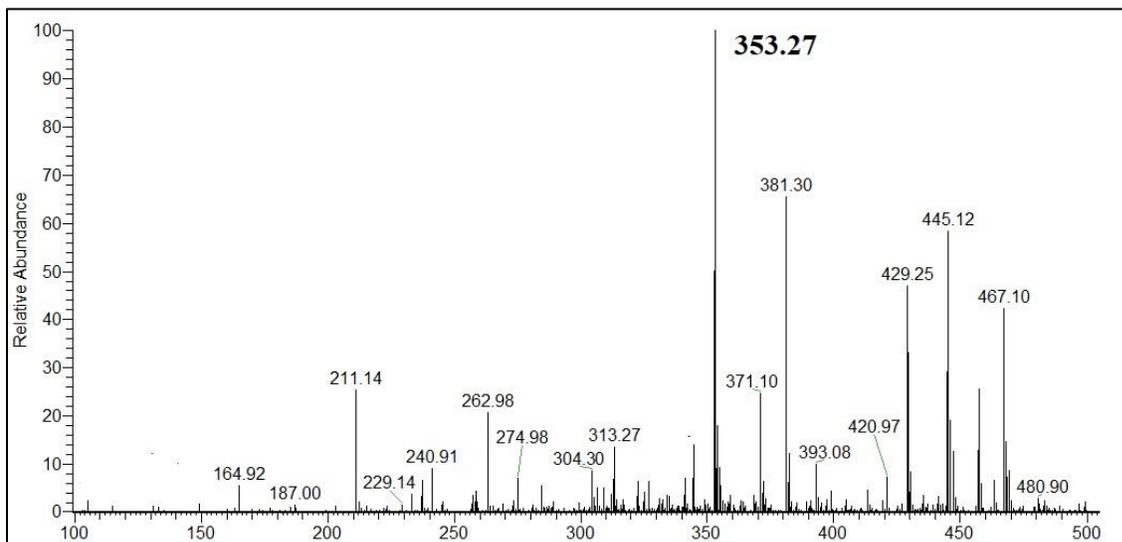
Cromatografía TLC bajo luz UV a 254 nm – absorbanza (A), a 365 nm fluorescencia (B) de PAP49G3A.



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 5.

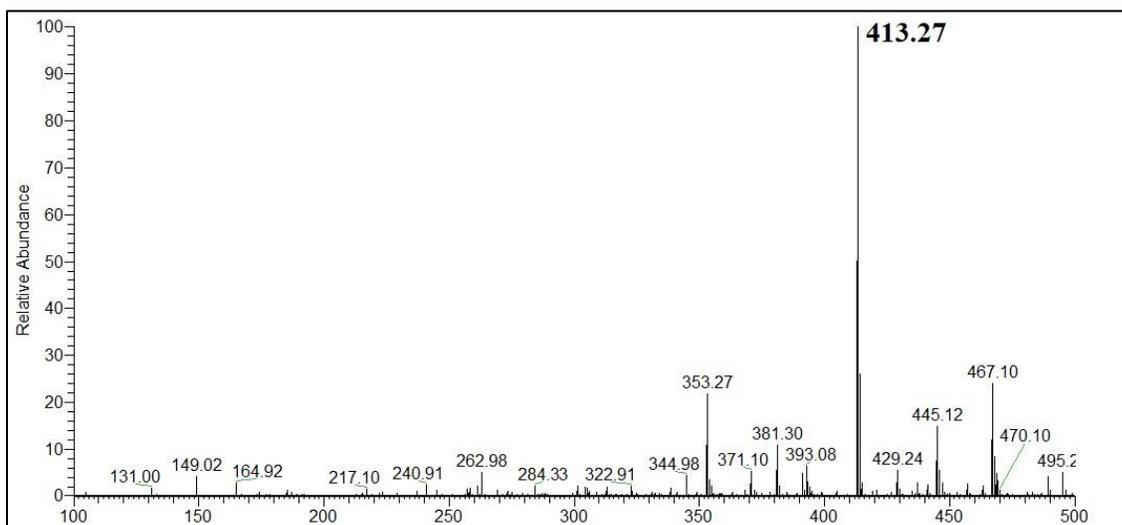
Espectrofometría de masas (MS) del antibiótico PAP48 en *Rf* de 0,10 con un peso molecular de 353,27 debido al salto de electrón por presencia de Ácido acético.



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 6.

Espectrofometría de masas (MS) del antibiótico PAP49G3A en R_f de 0,12 con un peso molecular de 413,27 debido al salto de electrón por presencia de Ácido acético.



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 7.

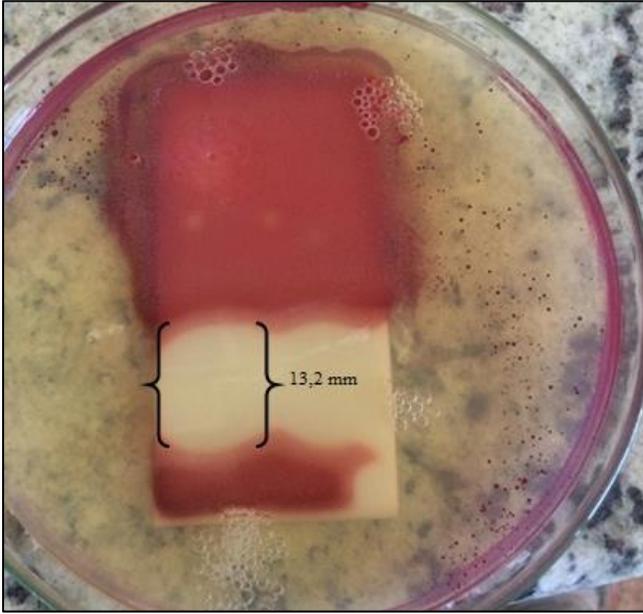
Bioautografía del antibiótico PAP48 contra *Bacillus spizizenii*, con halo de inhibición de 8,9 mm



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 8.

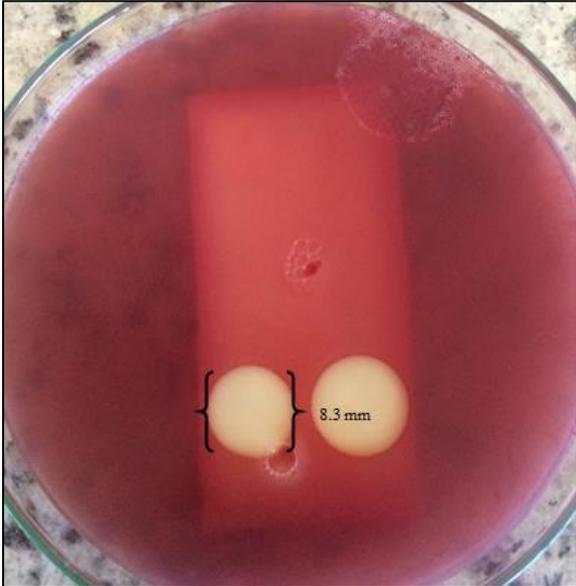
Bioautografía del antibiótico PAP48 contra *Pseudomonas aeruginosa*, con halo de inhibición de 13,2 mm.



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 9.

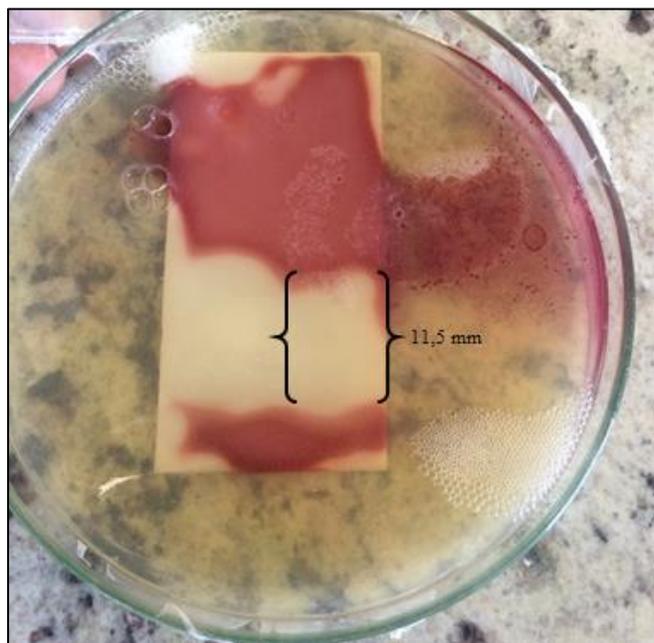
Bioautografía del antibiótico PAP49G3A contra *Bacillus spizizenii*, con halo de inhibición de 8,3 mm,



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 10.

Bioautografía de antibiótico PAP49G3A contra *Pseudomonas aeruginosa*, con halo de inhibición de 11,5 mm.



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 11.

Microplaca 1. Medio Müller Hinton Broth estéril + Antibióticos PAP48, PAP49G3A y Control positivo Gentamicina + *Bacillus spizizenii*.



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 12.

Microplaca 2. Medio TSB estéril + Antibióticos PAP48, PAP49G3A y Control positivo
Gentamicina + *Pseudomonas aeruginosa*.



Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 13.

Prueba Shapiro Wilks (A) y análisis de varianza (B) del antibiótico PAP48 contra *Bacillus spizizenii*.

(A)						
Concentracion (µg/mL)	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
2,34	⊗ Inhibición	4	9,56	7,25	0,88	0,3833
4,69	⊗ Inhibición	4	11,62	3,05	0,88	0,3710
9,38	⊗ Inhibición	4	26,94	1,71	0,95	0,7036
18,75	⊗ Inhibición	4	60,66	22,80	0,96	0,7541
37,50	⊗ Inhibición	4	80,95	11,02	0,84	0,1968
75,00	⊗ Inhibición	4	86,02	4,12	0,90	0,4749
150,00	⊗ Inhibición	4	85,36	4,21	0,74	0,0320
300,00	⊗ Inhibición	4	88,70	3,06	0,82	0,1471

(B)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo	33787,89	7	4826,84	51,48	<0,0001	
Concentracion (µg/mL)	33787,89	7	4826,84	51,48	<0,0001	
Error	2250,40	24	93,77			
Total	36038,29	31				

Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 14.

Prueba Shapiro Wilks (A) y análisis de varianza (B) del antibiótico PAP49G3A contra *Bacillus spizizenii*.

(A)

Concentración ug/mL	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
2,34	% de Inbicion	4	7,92	5,21	0,78	0,0822
4,69	% de Inbicion	4	8,30	4,13	0,98	0,8711
9,38	% de Inbicion	4	50,18	5,98	0,87	0,3050
18,75	% de Inbicion	4	61,19	3,64	0,83	0,1811
37,50	% de Inbicion	4	78,49	4,68	0,89	0,4262
75,00	% de Inbicion	4	82,99	3,47	0,75	0,0440
150,00	% de Inbicion	4	88,23	0,99	0,93	0,5732
300,00	% de Inbicion	4	91,47	0,50	0,99	0,9166

(B)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	32504,08	7	4643,44	289,65	<0,0001
Concentración ug/mL	32504,08	7	4643,44	289,65	<0,0001
Error	384,75	24	16,03		
Total	32888,83	31			

Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 15.

Prueba Shapiro Wilks (A) y análisis de varianza (B) del antibiótico PAP48 contra *Pseudomonas aeruginosa*.

(A)

Concentracion (µg/mL)	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
2,34	⊗ Inhibición	4	22,11	6,46	0,83	0,1723
4,69	⊗ Inhibición	4	16,61	11,09	0,92	0,5543
9,38	⊗ Inhibición	4	35,09	17,78	0,88	0,3625
18,75	⊗ Inhibición	4	63,93	24,09	0,66	<0,0001
37,50	⊗ Inhibición	4	77,63	0,62	0,95	0,7161
75,00	⊗ Inhibición	4	85,95	0,23	0,99	0,9214
150,00	⊗ Inhibición	4	86,48	0,65	0,89	0,4188
300,00	⊗ Inhibición	4	86,60	0,73	0,96	0,7459

(B)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	25372,28	7	3624,61	27,29	<0,0001
Concentracion (µg/mL)	25372,28	7	3624,61	27,29	<0,0001
Error	3187,18	24	132,80		
Total	28559,45	31			

Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 16.

Prueba Shapiro Wilks (A) y análisis de varianza (B) del antibiótico PAP49G3A contra

Pseudomonas aeruginosa.

(A)

Concentración ug/mL	Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
2,34	% de Inbicion	4	18,05	2,74	0,95	0,6882
4,69	% de Inbicion	4	25,16	3,60	0,96	0,7518
9,38	% de Inbicion	4	16,16	12,21	0,85	0,2460
18,75	% de Inbicion	4	50,28	6,63	0,92	0,5568
37,50	% de Inbicion	4	84,75	1,55	0,86	0,2726
75,00	% de Inbicion	4	83,88	0,87	0,92	0,5287
150,00	% de Inbicion	4	89,57	0,22	0,85	0,2462
300,00	% de Inbicion	4	89,88	0,65	0,93	0,5996

(B)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	31511,38	7	4501,63	165,95	<0,0001
Concentración ug/mL	31511,38	7	4501,63	165,95	<0,0001
Error	651,04	24	27,13		
Total	32162,42	31			

Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 17.

Análisis de varianza del antibiótico PAP48 entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	151,35	1	151,35	0,15	0,7044
Cepas bacterianas	151,35	1	151,35	0,15	0,7044
Error	64599,55	62	1041,93		
Total	64750,90	63			

Elaborado por: Los autores, 2020.

Anexo 18.

Análisis de varianza del antibiótico PAP49G3A entre *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus spizizenii*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	30,41	1	30,41	0,03	0,8654
Cepas bacterianas	30,41	1	30,41	0,03	0,8654
Error	65050,73	62	1049,21		
Total	65081,14	63			

Elaborado por: Los autores, 2020.