



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD DEPARTAMENTO
DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

Nombre del proyecto

Validación de la técnica de DPPH-CLAR como método para la actividad antioxidante de metabolitos secundarios hidrofílicos extraídos de actinobacterias.

Alumna

Salazar Quiroz Perla Nayelli

Matrícula: 2152027580

Asesores internos

Dra. Herminia Inés Pérez Méndez No Económico. 6276

Dr. Omar Esteban Valencia Ledezma No Económico. 35799

Lugar de realización: Laboratorio de Biotransformaciones (N-201) en la Unidad Interdisciplinaria de Docencia, Investigación y Servicio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco.

Fecha inicio: 26 Octubre 2018

Fecha de terminación: 30 Abril 2019

ÍNDICE

1. Marco teórico	4-12
1.1 Radicales libres	4
1.2 Estrés oxidativo	4
1.3 Definición de un antioxidante	4
1.4 Fuentes exógenas de un antioxidante	6
1.5 Actinobacterias	8
1.6 Morfología	8
1.7 Hábitat	9
1.8 Importancia de las actinobacterias	9
1.9 <i>Gordonia</i> sp	10
1.10 Taxonomía de <i>Gordonia</i> sp	11
1.11 Determinación de la actividad antioxidante	12
1.12 Método DPPH	12
2. Objetivos	15
2.1 Objetivos específicos	15
3. Metodología	16-20
3.1 Crecimiento de <i>Gordonia</i> sp por fermentación en medio GYEA	16
3.2 Extracción selectiva de metabolitos secundarios hidrofílicos de <i>Gordonia</i> s p	16
3.3 Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios	16
3.4 Determinación del método analítico	18
3.5 Test de actividad antioxidante usando la técnica de DPPH- CLAR	19
3.6 Diagrama de flujo del procedimiento desarrollado	20

4. Resultados y discusión	21
4.1 Crecimiento de <i>Gordonia</i> sp	21
4.2 Extracción de metabolitos secundarios hidrófilicos	21
4.3 Caracterización de metabolitos por screening fisicoquímico	24
4.4 Desarrollo del método analítico	24
4.5 Resultado de estándares y asignación de picos	29
4.6 Prueba de DPPH	31
5. Conclusión	31
6. Objetivos y metas alcanzadas	31
7. Recomendaciones	32
8. Bibliografía	32

1. Marco Teórico

1.1 Radicales libres

Un radical libre es aquella sustancia química que tiene en su estructura uno o más electrones no apareados. Es altamente reactiva y clave para formar otros radicales libres en cadena, además por la vida media que es de microsegundos, ocurre una rápida propagación con moléculas aledañas y mayor daño potencial. De hecho, un radical libre puede afectar 1 millón de moléculas durante la reacción en cadena. Los compuestos en cuestión forman parte de las llamadas especies reactivas del oxígeno ERO (Especies reactivas de oxígeno). Los radicales libres se liberan durante el metabolismo humano, y también se producen por contaminantes ambientales, (atmosféricos, acuáticos, de suelos), radiaciones (ultravioleta, gamma, hertziana), entre otros. Se pueden relacionar con el consumo o uso de tóxicos como el alcohol, tabaco y drogas o debido a una alimentación no adecuada, exposición a fertilizantes o pesticidas. Se incluye además el metabolismo de algunos químicos y elevado estrés físico o psicológico.¹

La energía vital de nuestro cuerpo se concentra en unas pequeñas estructuras celulares llamadas mitocondrias y que queman el oxígeno que respiramos. El problema es que el mismo elemento que permite nuestra vida, el oxígeno es el principal generador de radicales libres, ya que son las responsables del envejecimiento y de la mayor parte de los procesos degenerativos. Por otra parte, absorbemos también radicales libres que se generan en el exterior. Por ejemplo, con el tabaco, la contaminación y rayos solares.²

1.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es un término asociado a las células y a la acción de un radical libre que le afecta, así en condiciones normales se da un equilibrio entre la producción de radicales libres u otras especies reactivas con los mecanismos antioxidantes (exógeno y endógeno). Este equilibrio permite que la toxicidad por oxidación sea menor y con menos daño celular. Cuando se rompe el equilibrio, éste se podrá asociar con un déficit en el sistema antioxidante o por la proliferación descontrolada de los radicales libres.³

1.3 Definición de un antioxidante

Un antioxidante dietético es una sustancia que forma parte de los alimentos de consumo cotidiano, puede prevenir efectos adversos de especies reactivas sobre las funciones fisiológicas normales de los humanos. Las propiedades antioxidantes no solo deben estudiarse por sus interacciones químico-biológicas, sino en función del deterioro oxidativo que afecta a los alimentos. Se utilizan en la industria alimentaria adicionados a grasas u otros productos para retrasar procesos de oxidación, en tanto previenen el comienzo de la rancidez oxidativa.

Asociado a la función antioxidante se considera el proceso de óxido-reducción que remite a dos momentos básicos: a) oxidación que implica pérdida de electrones de hidrógeno con la ganancia de oxígeno en la molécula b) reducción que significa ganancia de electrones de hidrógeno con la pérdida de oxígeno. Así el oxidante se reduce al reaccionar con aquella molécula que oxida. Este proceso es cotidiano en el organismo humano y representa el conocido balance rédox.⁴⁻⁶

En el caso de la diabetes los posibles mecanismos de acción de los antioxidantes se relacionan con la inhibición en el intestino de la digestión de los carbohidratos, en particular la glucosa, cuya liberación se halla modulada también por el hígado. Asimismo, podrían estimular la secreción de insulina en el páncreas y activar los receptores de esta. Otros efectos pueden ser la modulación de las rutas genéticas. Un dato relevante es que la metformina que se utiliza para el tratamiento de pacientes diabéticos resulta un poderoso antioxidante que disminuye la formación de radicales libres.

Respecto al cáncer se señala que si los radicales libres afectan el DNA (ácido desoxirribonucleico) pueden ocurrir mutaciones que en su momento se transforman en células cancerosas. Se señala la relación entre cáncer gástrico derivado de la presencia de *Helicobacter pylori*, bacteria que causa gastritis crónica y que puede conducir a lesiones precancerosas relacionadas con el estrés oxidativo. En el caso del cáncer de mama aumenta la evidencia de que el riesgo de esta enfermedad, asociada con los genotipos humanos relacionados al estrés oxidativo, pueden modificarse con el consumo de frutas y vegetales. Se estudia la variación genética de diversas enzimas que participan en la protección endógena del proceso de óxidoreducción del organismo y su respuesta hacia el consumo exógeno de antioxidantes provenientes de frutas y vegetales.

Es posible que las enfermedades neurodegenerativas sean de las más estudiadas en el contexto del estrés oxidativo. Se ha advertido el aumento del deterioro de proteínas específicas por la presencia elevada de las especies reactivas del oxígeno. De igual manera en algunas zonas del cerebro ocurre la disminución de algunos metales de transición propias del efecto oxidativo ($Fe^{+2} \rightarrow Fe^{+3}$), lo cual agrava la enfermedad.

De igual manera se ha estudiado la relación de los antioxidantes y sus niveles, como se muestra en la **Figura 1** con la artritis reumatoide, anemia, síndrome metabólico, esclerosis múltiple, trastornos nefrológicos, pancreatitis, arrugas prematuras, resequedad de la piel, dermatitis y asma entre otros padecimientos que en la actualidad abordan las investigaciones en curso.⁷

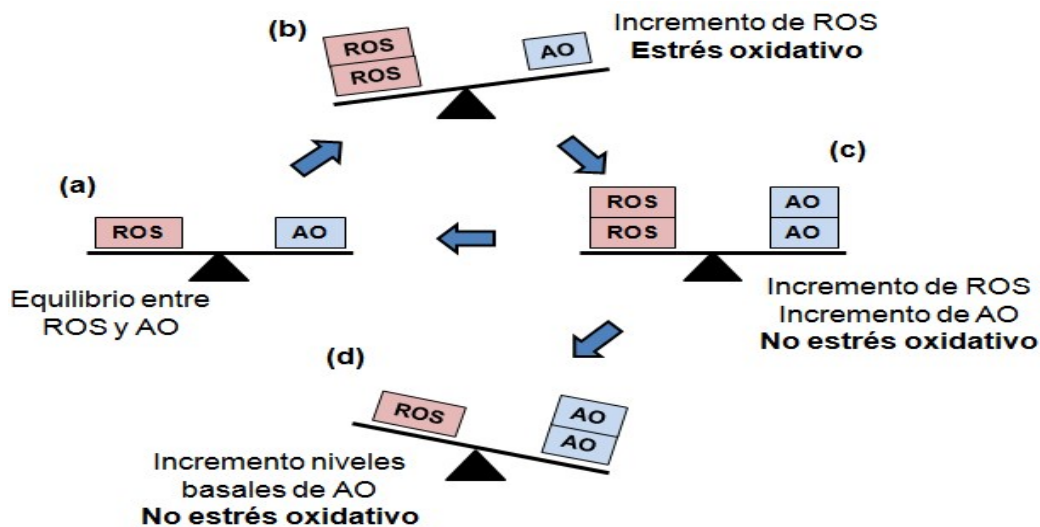


Figura 1. Relación entre las especies reactivas de oxígeno (ROS), los niveles de actividad antioxidante.⁸

1.4 Fuentes exógenas de antioxidantes

Entre los antioxidantes hay varias familias de principios activos como los polifenoles y los fitoestrógenos. Entre los primeros se encuentran los flavonoides y los taninos, ampliamente estudiados.

Respecto de los flavonoides se pueden señalar sólo como ejemplo las antocianidinas (rojo-azulado de las fresas), catequinas (té verde y negro), citroflavonoides (naranja, que da sabor amargo a lo naranja, limón, toronja), isoflavonoides (genisteína y daidzeína presentes en soya y sus derivados), protoantocianidinas en semillas de uva y vino tinto. Otro tipo de antioxidantes son los *taninos* (polifenoles) presentes en el vino, con su característica de astringencia. No sólo son útiles a la industria alimentaria sino también en la de cosméticos.

En lo que respecta a los fitoestrógenos (isoflavonas, lignanos, flavonoides) se encuentran particularmente en las proteínas de la soya o sus derivados. Su uso más importante se asocia con la terapia de reemplazo hormonal para mujeres con síntomas de menopausia y osteoporosis durante el climaterio. Los compuestos relevantes son la genisteína y daidzeína que también se biosintetizan en abundancia en la cascarilla de semillas de linaza y centeno.

Los *Terpenos* son productos naturales que contienen de unidades de isopreno. Su estructura típica contiene esqueletos carbonados, clasificados en hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos. Los terpenos pueden encontrarse en fuentes vegetales libres o formando glucósidos.

Las *saponinas* son glicósidos hidrosolubles, con propiedades tensoactivas y hemolíticas. Estos metabolitos también ejercen una actividad biológica y

farmacológica, destacándose su efecto pesticida, insecticida, anti-protozoarios, antiinflamatorio, así como su actividad citotóxica frente a varias neoplasias.

Los *Esteroides* desde un punto de vista químico, son lípidos derivados del colesterol, el cual proviene a su vez de tejidos animales. Las plantas no lo sintetizan, pero los animales producen su propio colesterol y es indispensable para la estructura y funcionamiento celular.⁹⁻¹¹

Los *Carbohidratos*, son moléculas que tienen como función primordial dotar de energía al cuerpo humano, a través de la formación de glucosa.¹²

Los *Glucósidos*, incrementan la fuerza y velocidad de las contracciones cardíacas. Su efecto en el miocardio se produce tanto en los pacientes enfermos como en los de corazón sano. En los pacientes con fallo cardíaco congestivo, los glucósidos cardiotónicos producen disminución refleja de resistencia periférica por aumento de la contracción miocárdica. Esta acción compensa el efecto directo vasoconstrictor del fármaco y la resistencia periférica se reduce. Los efectos serán máximos en insuficiencia cardíaca sistólica, pero no está aconsejado su uso en insuficiencia diastólica.¹²

Las *Cumarinas* son probablemente los metabolitos más comunes derivados de diversas rutas biosintéticas.

Los *Alcaloides* representan un grupo de compuestos químicos complejos e interesantes, los cuales son producidos por el metabolismo secundario de organismos vivientes en diferentes biotipos, estos compuestos químicos son relativamente comunes en el reino de los seres vivos y en el medio ambiente.¹³

Las *Proteínas* son biomoléculas más versátiles y diversas de la célula. Están presentes en todos los procesos biológicos, indicativo de la capacidad que tienen para desarrollar un amplio espectro de funciones, la estructura de una proteína es la forma espacial más estable que adopta en cierto ambiente, el cual depende directamente de una secuencia de aminoácidos.¹⁴

Las *Antocianinas* representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible por el ojo humano. Estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo, hasta el azul de varias frutas y vegetales. El interés de estos pigmentos antociánicos en investigación científica, ha incrementado, debido no solamente al color que confieren, sino a su probable papel en la reducción de enfermedades como el cáncer, diabetes; a sus efectos antiinflamatorios y mejoramiento de agudeza visual y comportamiento cognitivo.¹⁵

1.5 Actinobacterias

Las *Actinobacterias* son un grupo de bacterias Gram positivas, con alto contenido de guanina y citosina características por la formación de hifas filamentosas que normalmente no se fragmentan y producen esporas asexuales. Taxonómicamente conforman el orden de *Actinomycetales* de la clase *Actinobacteria*.¹⁶

Son conocidos desde hace más de cien años y fueron considerados durante gran parte de este tiempo como un grupo de organismos “exóticos” con rasgos morfológicos parecidos tanto a bacterias como a hongos. De esta forma, las Actinobacterias fueron clasificadas en un principio como hongos, puesto que compartían la existencia de hifas aéreas. Actualmente y sobre la base de la composición química de la membrana celular, en particular su composición en lípidos y peptidoglicanos, estos microorganismos forman parte del dominio *Bacteria*.¹⁶

1.6 Morfología

Su morfología los distingue de los demás organismos procariotas. A lo largo de su ciclo de vida presentan una morfología muy variada que puede comprender desde formas unicelulares cilíndricas y cocoidales hasta una compleja organización micelial. En algunos casos presentan estructuras de diferenciación especiales como esporangios, que han jugado un papel fundamental en la identificación y clasificación de estas bacterias. Su desarrollo se traduce en un proceso multicelular que conduce a la diferenciación en estructuras organizadas. Sin embargo, la colonia madura no es el producto final del desarrollo sino una parte de su ciclo de crecimiento, formación y germinación de esporas y expansión.¹⁷

El crecimiento comienza con la germinación de una spora sobre un sustrato sólido que genera hifas que se ramifican a intervalos más o menos regulares y que se extiende radialmente. El micelio resultante, o micelio vegetativo, consiste en hifas que o bien penetran en el sustrato o bien crecen sobre su superficie. Cuando crecen en un sustrato sólido como el agar, la red ramificada de hifas que desarrollan crece tanto sobre la superficie del sustrato como en su interior, formando un “micelio de sustrato”. Los tabiques dividen habitualmente las hifas en células largas (20µm o más) que contienen varios nucleoides. A veces, se forma una masa análoga a un tejido, que recibe el nombre de talo. Muchas *Actinobacterias* tienen un micelio aéreo que se extiende por encima del sustrato y forma esporas asexuales, de pared fina, llamadas conidios o conidiosporas, en las puntas de los filamentos. Si están situadas en un esporangio, reciben el nombre de esporangiosporas. La formación de esporas se desarrolla en respuesta a la privación de nutrientes. La mayoría no son especialmente termorresistentes, pero soportan la desecación, por lo tanto, tienen un considerable valor adaptativo.¹⁷

Este tipo de crecimiento representa una de las características principales de las *Actinobacterias* y ha sido relacionado con su habilidad para degradar la materia orgánica insoluble presente en el medio ambiente mediante enzimas extracelulares. Posteriormente, se desarrollan ramificaciones aéreas del micelio vegetativo que dan lugar al micelio aéreo. Estas hifas aéreas sufren un proceso de diferenciación que incluye por un lado diferentes cambios morfológicos según la especie y por otro la formación de las esporas. El ciclo de desarrollo se completa con la germinación de las esporas y la expansión de la colonia.¹⁷

La formación de esporas en el micelio vegetativo se ha descrito frecuentemente en varios géneros como, por ejemplo: *Saccharopolyspora*, *Micromonospora*, *Thermoactinomyces* y ocasionalmente el género *Streptomyces*. Sin embargo, aunque en ciertos géneros esté sólo asociada al micelio vegetativo, la formación de esporas es una característica normal del micelio aéreo. La mayoría de las *Actinobacterias* son inmóviles, cuando existe movilidad, se limita a las esporas flageladas. La composición de la pared celular de los actinomicetos varía mucho según los grupos y tiene una importancia taxonómica considerable.¹⁷

1.7 Hábitat

Las *Actinobacterias* son microorganismos generalmente saprófitos y como tales, comparten su entrono con otras bacterias y hongos filamentosos, formando una comunidad ecológica interconectada. Descritos en una amplia variedad de entornos, tanto naturales como modificados por el hombre, pueden desarrollarse sobre un amplio rango de substratos como tierra, material vegetal vivo o en descomposición, agua salada, agua dulce, estiércol o composta.¹⁸

Algunas especies pueden formar asociaciones ecológicas beneficiosas con plantas o animales o bien se han descrito como agentes causales de ciertas enfermedades en humanos y animales. De esta forma, se ha demostrado que algunas especies de actinomicetos que están presentes en la rizosfera de diversas plantas son efectivos antagonistas de hongos patógenos. En una interrelación más estrecha, colonizan los tejidos internos de la planta como patógenos, como es el caso de *Streptomyces scabies*, *S. acidiscabies* y *S. turgidiscabies*; o bien con un balance favorable para ambos como sucede en la simbiosis Franki-plantas actinorrícicas.¹⁸

1.8 Importancia de las Actinobacterias

Las *Actinobacterias* tienen una importancia práctica considerable. Son fundamentalmente habitantes de la tierra y están ampliamente distribuidos, pueden degradar una enorme cantidad y variedad de compuestos orgánicos y son muy importantes en la mineralización de la materia orgánica. Las *Actinobacterias* producen la mayor parte de los antibióticos naturales de importancia en medicina. Aunque la mayoría de las *Actinobacterias* son organismos de vida libre, algunos son patógenos para los seres humanos, ciertos animales y algunas plantas.¹⁹ Una de las características que distinguen a estas bacterias del resto es la capacidad de

producir un amplio espectro de metabolitos secundarios que son utilizados con fines terapéuticos por su actividad como antineoplásicos, antibióticos, inmunomoduladores, inhibidores enzimáticos, etc.

La búsqueda de compuestos a partir de microorganismos continúa siendo hoy día la principal fuente de nuevos antimicrobianos, y son las *Actinobacterias* aisladas del suelo, las principales bacterias productoras de los metabolitos conocidas hasta hoy. De cultivos de éstas se han aislado importantes agentes terapéuticos como aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas. Las bacterias del suelo siguen siendo estudiadas, pero hay una notable merma en el hallazgo de nuevos productos, estimándose que más del 90% de los cultivos bioactivos descubiertos producen agentes ya informados o son variaciones menores de uno ya descrito. Por ello, se han reorientado estudios hacia otros ambientes, como sedimentos de ríos, lagos y océanos, así como plantas y animales, que ofrecen la posibilidad de encontrar cepas silvestres no descritas que produzcan nuevos metabolitos secundarios farmacológicamente activos.¹⁹

Estos microorganismos resultan ser abundantes en suelos, tanto o más que las micobacterias, sin embargo, también se encuentran en ambientes acuáticos, dulces y marinos. Dentro de sus características particulares presentan un olor típico a suelo húmedo por la producción de un metabolito llamado geosmina, adicionalmente presentan una actividad metabólica alta, producen terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares con las que son capaces de degradar la materia orgánica de origen vegetal y animal. Como la gran mayoría de bacterias que son abundantes en suelo, presentan un importante papel ecológico en el mismo.^{20,21}

1.9. *Gordonia*

El género *Gordonia* ha atraído mucho interés en los últimos años por una variedad de razones. La mayoría de las especies se aislaron debido a su capacidad para degradar xenobióticos, contaminantes ambientales o polímeros naturales lentamente biodegradables, así como para transformar o sintetizar compuestos posiblemente útiles. La variedad de compuestos químicos transformados, biodegradados y sintetizados por *Gordonia* hace que estas bacterias sean potencialmente útiles para la biotecnología ambiental e industrial.

Sin embargo, debido a que algunas especies de *Gordonia* son patógenos oportunistas, su aplicación en el medio ambiente puede estar restringida en algunos casos. Las características fenotípicas valiosas de las especies de *Gordonia* pueden transferirse genéticamente a otros microorganismos. Estudios recientes han revelado vectores de clonación mejorados que permiten la transferencia de genes entre diferentes especies de *Gordonia* o la transferencia de genes extraños de *Escherichiacoli* a *Gordonia* sp. y la expresión de dichos genes.²²

La investigación actual también se centra en varias especies que se sabe que causan infecciones, especialmente en los seres humanos. Las especies de *Gordonia* se han aislado de diversos biotipos nativos, como la rizosfera del suelo o del manglar, de hábitats de gran influencia industrial, como los pozos productores de petróleo o el suelo contaminado con hidrocarburos, de fuentes artificiales como biorreactores o biofiltros de tratamiento de aguas residuales y de humanos enfermos. El género *Gordonia* pertenece filogenéticamente al suborden *Corynebacterineae*, el grupo de ácido micólico dentro del orden *Actinomycetales*, y su clasificación ha cambiado drásticamente en los últimos años, se han reclasificado varias especies y se han descrito muchas especies novedosas.²²

1.10 Taxonomía de *Gordonia*

En 1971, Tsukamura, S., 2006,²³ propuso a *Gordonia* como un nuevo género para bacterias corineformes aisladas de esputos de pacientes con enfermedad pulmonar o de suelo. El nombre de este género novedoso fue elegido para rendir homenaje a la bacterióloga estadounidense Ruth E. Gordon. Los miembros de este género se distinguen de las micobacterias de rápido crecimiento por su ligera resistencia a los ácidos y la ausencia de arilsulfatasa, y del género *Nocardia* por su capacidad para reducir el nitrato y la ausencia de un micelio. Solo seis años después, Goodfellow J., Alderson C., 1999²⁴ descartaron este taxón y transfirieron *Mycobacterium rhodochrous* y el "complejo de rodochrous", incluidos los representantes del género *Gordonia*, al género *Rhodococcus*. Sin embargo, los estudios sobre el ácido micólico (ácido 3-hidroxi-graso α -ramificado de alto peso molecular) y la composición de la menaquinona revelaron variaciones heterogéneas dentro del género *Rhodococcus*: mientras que *Rhodococcus* sp. por lo general contienen ácidos micólicos con 34 a 52 átomos de carbono, las menaquinonas con 8 unidades de isopreno y 2 átomos de hidrógeno agregados a la doble cadena lateral de isopreno [MK-8 (H2)] como la forma principal de menaquinona.²⁵

Se encontró que el género *Gordonia* (*Gordonia bronchialis*, *Gordonia rubripertincta* (anteriormente *Gordonia rubra* y *Gordoniaterrae*) contenían ácidos micólicos de 48 a 66 átomos de carbono y menaquinonas dihidrogenadas con 9 unidades de isopreno [MK-9 (H2)] como la menaquinona predominante. El análisis adicional de las similitudes de 16S rRNA condujo a un renacimiento del género *Gordonia* por Stackebrandt con las tres especies mencionadas anteriormente y, además, *Rhodococcus sputi* como *Gordonia sputi*. Después de la reclasificación de *Rhodococcus aichiensis* y *Nocardia amarae* al género *Gordonia* como *Gordonia aichiensis* y *Gordonia amarae*, este taxón se convirtió en un género bien definido dentro del orden *Actinomycetales*.²⁵

En 1997, el nombre correcto etimológicamente de *Gordonia* fue propuesto por Stackebrandt, 2007.²⁶ De acuerdo con su nuevo sistema de clasificación jerárquica, *Gordonia* es el género tipo de *Gordoniaceae* (la familia *Gordonia*) dentro del suborden *Corynebacterineae*. Este suborden incluye también las

familias *Corynebacteriaceae*, *Dietziaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Nocardiaceae*, *Tsukamurellaceae* y *Williamsiaceae*. Desde el informe de *Gordonia hydrophobica* como una nueva especie, el número de miembros válidamente descritos de este género ha aumentado considerablemente. En la actualidad, el género *Gordonia* comprende 19 especies válidamente publicadas y al menos 2 especies adicionales están en proceso de clasificación. Mientras tanto, se ha demostrado que las gordonias están distribuidas de forma ubicua en la naturaleza.^{25,26}

1.11 Determinación de la actividad antioxidante

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo*. La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo.

Los métodos más utilizados son ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfúrico) y DPPH (2,2-Difenil-1-hidracilpicril). Ambos presentan una excelente estabilidad en ciertas condiciones, aunque también muestran diferencias. El DPPH es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, mientras que el ABTS tiene que ser generado tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato de potasio, ABAP), enzimática (peroxidasa, mioglobulina), o también electroquímica. Con el ABTS se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, mientras que el DPPH solo puede disolverse en medio orgánico. El radical ABTS tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico, mientras que el DPPH presenta un pico de absorbancia a 515 nm, y otro método es el DMPD (Dimetil-4-fenienediamina) a 505 nm.^{27,28}

1.12 Método de DPPH

Los radicales libres son moléculas o fragmentos de moléculas caracterizadas por tener uno o más electrones desapareados en su orbital externo, condición que los torna altamente reactivos. En el ser humano se generan radicales libres en la cadena respiratoria mitocondrial, cuando reacciona el peróxido de hidrógeno con el ion ferroso, por la acción catalítica de la ciclooxigenasa, la reacción de vitamina C con el ión ferroso, por acción de la NADPH reductasa, etc. En los seres vivos existen sistemas de defensa antioxidante que tienen la propiedad de impedir la acción nociva de los radicales libres, habiendo antioxidantes de naturaleza enzimática como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc., así como, sustancias no enzimáticas: ascorbato, ferritina, ceruloplasmina, polifenoles, antocianinas.^{29,30}

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales, pero aquella que ha recibido una preferencial atención es la técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH. Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante. Los estudios cinéticos muestran que este proceso ocurre a través de una reacción de pseudo primer orden la que puede seguirse midiendo la disminución de absorbancia en función del tiempo. Esta medición permite observar una primera fase muy rápida, seguida anteriormente por una reacción lenta, lo que podría atribuirse a un proceso de dimerización de los productos de la reacción.^{29,30}

La reacción antes descrita, entre el DPPH y un antioxidante, podemos representarla de la siguiente manera, en la figura 2:



Figura 2. Reacción entre el DPPH y un antioxidante²⁹

Por cuyo motivo, las condiciones de ensayo en que se mide la capacidad antioxidante puede describirse por la siguiente ecuación que se muestra en la figura

3:

$$\frac{d[\text{DPPH}^*]}{dt} = k_{\text{obs}} [\text{DPPH}^*]_t$$

Figura 3. Ecuación para la determinación de la capacidad antioxidante²⁹

La determinación de la concentración de compuestos antioxidantes utilizando la técnica del DPPH ha sido descrita hace más de cincuenta años, pero se ha observado que distintos autores no utilizan la misma concentración de DPPH en los medios de reacción y por ello no permite realizar una evaluación precisa, considerando especialmente que los resultados experimentales se expresan como el valor de la concentración inhibitoria máxima media (IC_{50}), es decir, la concentración de la muestra problema que produce una inhibición del 50% del radical libre DPPH. En tal sentido, podemos considerar que el valor IC_{50} es dependiente de la concentración del DPPH, así como, de la naturaleza del compuesto antioxidante.^{29,30}

El tiempo de medida necesario para realizar las medidas de DPPH (30 minutos) en comparación con el método ABTS (1 minuto), supone una desventaja en su aplicación, en adición también al elevado costo de la DPPH. Debe señalarse que, a pesar de las diferencias metodológicas, los resultados que se obtienen con los métodos ABTS y DPPH permiten alcanzar conclusiones prácticamente similares. Los resultados obtenidos con el método DMPD, no son consistentes con los obtenidos mediante los ensayos de la ABTS y DPPH. Dichos valores son bajos, poco reproducibles y en algunos casos incoherentes, Es importante buscar técnicas alternativas para la medición antioxidante debido a los altos costos de las pruebas ya conocidas.²⁹

2. Objetivo

Validar la técnica de DPPH-CLAR como método para medir la actividad antioxidante de metabolitos secundarios hidrofílicos.

2.1 Objetivos específicos.

- 1.- Crecimiento y fermentación de *Gordonia* sp en medio GYEA
- 2.- Extraer los metabolitos secundarios hidrofílicos de *Gordonia* sp
- 3.- Análisis de los metabolitos secundarios hidrofílicos de *Gordonia* sp
4. Analizar la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios hidrofílicos de *Gordonia* sp

3. Metodología

3.1 Crecimiento de *Gordonia sp* por fermentación en medio GYEA

El crecimiento se lleva a cabo sembrando por estría cruzada en cajas Petri de plástico estéril con el medio sólido GYEA (glucosa 10 g/L extracto de levadura 10 g/L, agar 12 g/L). Las cajas Petri se incuban aeróbicamente durante 10 días a 30°C.³¹

En matraces Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 125 mL del medio líquido GYEA (glucosa 10 g/L, extracto de levadura 10 g/L), se inoculan con la cepa de *Gordonia* sp. (Con crecimiento o desarrollo en placas de agar por 10 días) a 2830°C, 150 rpm, durante 6 días. El medio se centrifuga a 4500 rpm por 15 minutos, para separar la biomasa (B) y el sobrenadante (S).³¹

3.2 Extracción selectiva de metabolitos secundarios hidrofílicos de *Gordonia sp*

Se llevan a cabo la extracción de los metabolitos hidrofílicos de la biomasa (previamente a esta biomasa se le extrajeron los metabolitos hidrofóbicos) con disolventes de mediana a alta polaridad tales como acetato de etilo (Extracto 1) y metanol (Extracto 2). La técnica consistió en aplicar la extracción de la biomasa usando primero acetato de etilo para posteriormente terminar con una extracción con metanol. De esta forma aseguramos obtener extractos con cierta selectividad.³¹

3.3 Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios

A los extractos 1 y 2 se les realizó el análisis de los metabolitos secundarios hidrofílicos usando protocolos estandarizados para la determinación de compuestos hidrofílicos, los cuales se encuentran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Pruebas para el análisis preliminar de metabolitos secundarios hidrofílicos

Metabolitos	Pruebas	Observaciones
Taninos (Prueba de Braymer)	2 mL de extracto + 2 mL de H ₂ O + 2-3 gotas de FeCl ₃ (5%)	Precipitado verde

Flavonoides	1 mL de extracto + 1 mL de Pb (OAc) ₄ (10%)	Coloración amarilla
Terpenos	2 mL de extracto + 2 mL de (CH ₃ CO) ₂ + 2-3 gotas de H ₂ SO ₄ concentrado.	Coloración rojo intenso
Saponinas (Prueba de espuma)	(a) 5 mL de extracto + 5 mL de H ₂ O + calor (b) 5 mL de extracto + Aceite de oliva (pocas gotas)	Aparece espuma Formas de emulsión
Esteroides (Prueba de Salkowski)	2 mL de extracto + 2 mL de CHCl ₃ + 2 mL de H ₂ SO ₄ (concentrado)	Anillo marrón rojizo en la unión
Phlobatannis (Prueba de Precipitación)	2 mL de extracto + 2 mL de Cl (1%) + calor	Precipitado rojo
Carbohidratos (Prueba de Molisch)	2 mL de extracto + 10 mL de H ₂ O + 2 gotas de onaftol (20%) + 2 mL de H ₂ SO ₄ (concentrado)	Anillo violeta en la unión
Glucósidos (Prueba de Liebermann)	2 mL de extracto + 2 mL de CHCl ₃ + 2 mL de CH ₃ COOH	Violeta a azul a coloración verde
Cumarinas	2 mL de extracto + 2 mL de NaOH (10%)	Coloración amarilla
Alcaloides (Prueba de Hager)	2 mL de extracto + pocas gotas de reactivo de Hager	Precipitado amarillo
Proteínas (Prueba de Xanthoproteic)	1 mL de extracto + 1 mL de H ₂ SO ₄ (concentrado)	Precipitado blanco
Emodinas	2 mL de extracto + 2 mL de NH ₄ OH + 3 mL de Benceno	Coloración roja
Antraquinonas (Prueba de Borntrager)	3 mL de extracto + 3 mL de benceno + 5 mL de NH ₃ (10%)	Rosa, violeta o coloración roja en capa amónica

Antocianinas	2 mL de extracto + 2 mL de HCl (2N) + NH ₃	Rojo rosáceo a violeta azulado en capa amónica
Leucoantocianinas vueltas	5 mL de extracto + 5 mL de Alcohol Isoamilo	Capa orgánica dentro de rojo
Monosacáridos (Prueba de Barfoed)	En cada 0.5 g de los extractos y disolver en agua destilada, luego filtrar- A 1 mL de filtrado mezclar con 1 mL de agente Barfoed en un tubo de ensayo calentar a baño María por 2 minutos.	Un precipitado rojo de óxido de cobre es considerado un resultado positivo
Azúcares reductores libres (Prueba de Fehling)	En cada tubo de ensayo agregar 0.5 g de los extractos disolver en agua destilada y filtrar. Al filtrado calentarlo en baño María y agregar reactivo de Fehling.	La formación de un precipitado rojo de óxido de cobre indica la presencia de azúcares reductores

3.4 Desarrollo del método analítico

Para definir los parámetros adecuados para el análisis por CLAR se realizaron las siguientes pruebas ver **Tabla 2**, en donde se observan todas las condiciones empleadas para este análisis. Los flujos se analizaron con cada fase móvil y con los tres diferentes volúmenes de inyección.

Tabla 2. Variables evaluadas en la determinación del método analítico.

Columna	Flujos mL/min	Temp. columna(°C)	Longitud de onda (nm)	Fase móvil ACN:H ₂ O	Volumen de inyección
---------	---------------	-------------------	-----------------------	---------------------------------	----------------------

Waters Symetry	0.3	25°C	210	60:40	20 µL
	0.5		275	70:30	50 µL
	0.8		300	95:5	80 µL
	1		450		
	1.2		510		
Columna	Flujos mL/min	Temp. te columna(°C)	Longitud de onda (nm)	Fase móvil H₂O:ACN	Volumen de inyección
Waters Symetry	0.3	25°C	210	50:50	20 µL
	0.5		275	70:30	50 µL
	0.8		300	95:5	80 µL
	1		450	98:2	
	1.2		517		

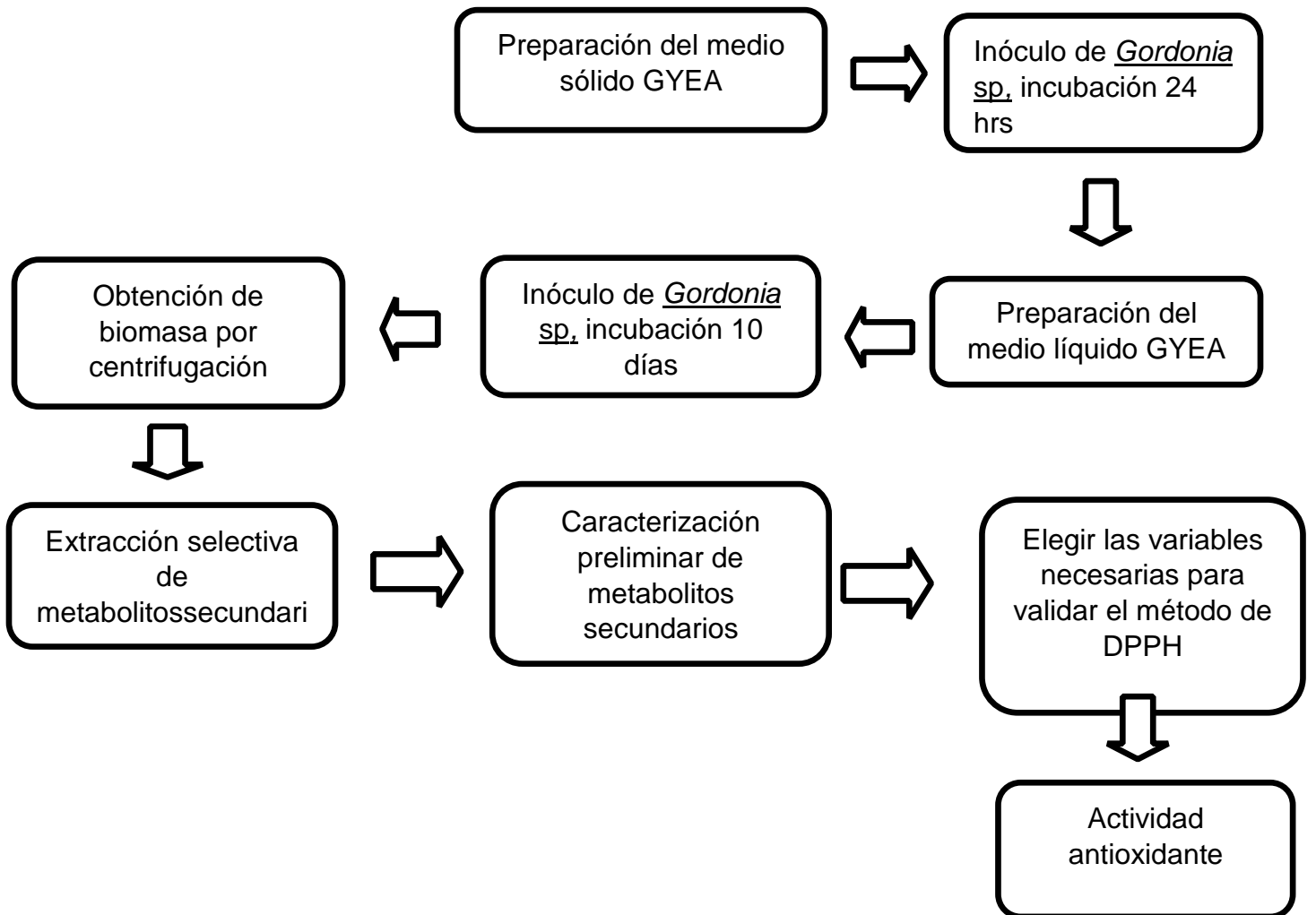
3.5 Realizar la prueba de actividad antioxidante usando la técnica de DPPH- CLAR

La actividad antioxidante se evalúa a cada uno de los extractos (1 y 2) con una proporción DPPH:extracto 1:1, la reacción se calienta a 36°C durante media hora, se determinará la cantidad de radical DPPH consumido mediante CLAR-DAD, para determinar el porcentaje de actividad antioxidante se utiliza la siguiente fórmula.

$$\%Act Antiox = \frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} \quad \%Act Antiox = \frac{A_{inicial} - A_{final}}{A_{inicial}} \times 100$$

Donde *A inicial* es el área del pico del blanco de DDPH y *A final* es el área del pico de DPPH con los extractos 1 y 2. Se realiza una regresión Probit para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de los extractos.³²

3.6 Diagrama de flujo del procedimiento desarrollado.



4. Resultados y discusión

4.1 Crecimiento de *Gordonia* sp.



Se obtuvo un crecimiento favorable en el medio de cultivo sólido, de acuerdo con lo reportado por Peña C., 2016,³³ las colonias presentaron una coloración naranja, superficie lisa y borde irregular, el crecimiento en el medio líquido, se obtuvo 9.972 g de biomasa de tres lotes realizados. La cual se usó para realizar la extracción de los metabolitos secundarios generados con disolventes de mediana a alta polaridad.

4.2 Extracción selectiva de metabolitos secundarios hidrofílicos de *Gordonia sp.*

La obtención de la biomasa para realizar la extracción de los metabolitos secundarios hidrofílicos se realizó a partir de los tres lotes, estos gramos se usaron para realizarlas pruebas de extracción y un perfil cualitativo de metabolitos secundarios.

En lo que respecta a los disolventes seleccionados para la extracción de metabolitos secundarios polares se seleccionó al acetato de etilo como disolventes de mediana polaridad y metanol como disolvente de alta polaridad. Esto permitió la obtención selectiva de los diferentes metabolitos generados por la bacteria estudiada. En la **tabla 3** se muestran las cromatografías en capa fina (CCF) en diferentes fases móviles de las extracciones con acetato de etilo (Ext. 1) y con metanol (Ext. 2).


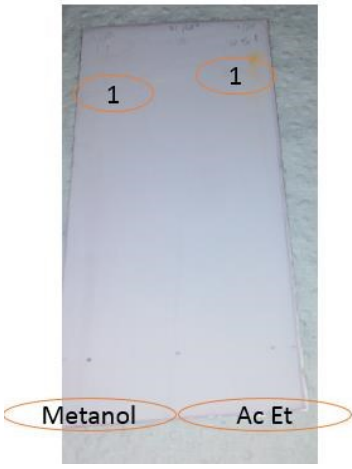
Tabla 3. CCF realizada a los extractos 1 y 2

Metanol (Ext. 2) y acetato de etilo (Ext. 1)	Metanol (Ext. 2) y acetato de etilo (Ext. 1)
<p data-bbox="365 289 592 321">70:30 ACN:H₂O</p> 	<p data-bbox="950 289 1177 321">50:50 ACN:H₂O</p> 

Se realizaron cromatoplasmas para la extracción de metabolitos secundarios con metanol y acetato de etilo, la cantidad total de la biomasa analizada fue de 9.15 g. Se obtuvieron diversos compuestos con la extracción de los diferentes disolventes, se observan 3 compuestos por extracto, se realizaron pruebas con diferentes fases móviles: etanol: acetato de etilo 60:40 y éter de petróleo:metanol:triethylamina 15:1:1, sin embargo la mejor separación de los compuestos la obtuvimos con una mezcla de ACN:H₂O de 70:30 ya que al aumentar la polaridad lo que observamos fue que no se separaban los compuestos.

Una vez realizadas las cromatoplasmas con el fin de identificar preliminarmente la cantidad de compuestos presentes en los extractos 1 y 2 usando los diferentes disolventes se les realizó la prueba de actividad antioxidante por cromatografía en capa fina, con el fin de obtener desde esta etapa una aproximación hacia una actividad farmacológica favorable por parte de los compuestos extraídos en la **Tabla 4** se muestra la prueba con los extractos 1 y 2.

Tabla 4. Resultados de la técnica de DPPH-CCF con los extractos 1 y 2

Metanol (Ext. 2) y acetato de etilo (Ext. 1)	Metanol (Ext. 2) y acetato de etilo (Ext. 1)
<p data-bbox="365 289 602 321">70:30 ACN:H₂O</p> 	<p data-bbox="954 289 1192 321">70:30 ACN:H₂O</p> 

En las pruebas de DPPH en los Ext. 1 y Ext. 2, se obtuvo un compuesto con actividad antioxidante para cada uno de ellos.

Con los resultados en la prueba de DPPH para los extractos 1 y 2 se observó una actividad antioxidante positiva al menos en uno de metabolitos extraídos (1) por la reacción con el DPPH dando una coloración amarilla. Este hecho es importante ya que a pesar de ser una prueba preliminar ya nos permite dar un acercamiento de la actividad antioxidante ampliamente reportada en metabolitos extraídos de este género.

El radical libre DPPH es susceptible a reaccionar con los compuestos antioxidantes de los metabolitos obtenidos porque ceden un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante de acuerdo con Guija E., 2015,³⁴ originando la coloración amarilla en los metabolitos antioxidantes de la placa, generalmente son compuestos fenólicos y flavonoides totales los que forman parte de esta actividad según Castañeda B., 2008,³⁵ aunque también la ausencia de los metabolitos antioxidantes pueden estar relacionados con las condiciones ambientales (temperatura externa, cantidad de luz) y con el tiempo de almacenamiento a que se sometió la solución de acuerdo con Niño J., 2005.³⁶

4.3 Caracterización de metabolitos por screening fisicoquímico

Se procedió a realizar las pruebas preliminares a los extractos 1 y 2 en donde se corroboró la presencia de algunos metabolitos secundarios los cuales se resumen en la **Tabla 5**. Se obtuvieron: extracto 1, cumarinas, alcaloides y monosacáridos y en el extracto 2, flavonoides, saponinas y alcaloides.

Tabla 5. Screening fisicoquímico de las pruebas preliminares de los extractos 1 y 2

Metabolitos	Extracto 1	Extracto 2
Taninos (Prueba de Braymer)	Negativo	Negativo
Flavonoides	Negativo	Positivo
Terpenos	Negativo	Negativo
Saponinas (Prueba de espuma)	Negativo	Positivo
Pholobatannis (Prueba de Precipitación)	Negativo	Negativo
Carbohidratos (Prueba de Molisch)	Negativo	Negativo
Cumarinas	Positivo	Negativo
Alcaloides (Prueba de Hager)	Positivo	Positivo
Proteínas (Prueba de Xanthoproteic)	Negativo	Negativo
Monosacáridos (Prueba de Barfoed)	Positivo	Negativo
Azucares reductores libres (Prueba de Fehling)	Negativo	Negativo

4.4 Desarrollo del método analítico

Las pruebas realizadas con la fase móvil ACN:H₂O, mostraron una poca eficiencia en la separación de los picos y por lo tanto una resolución inadecuada, el ACN en mayor proporción, no mejoraba la resolución, siendo esta la finalidad en un método, descartándose las fases con mayor proporción de ACN, **ver figura 4**, donde se observa un cromatograma con proporción 95:5, ACN:H₂O con poca

resolución. Se eligió la longitud de onda de 210 nm debido a que es la absorbancia donde se obtiene la mayor absorción UV de la mayoría de los compuestos, sin embargo, se realizó un barrido espectral **figuras 5 y 6**—donde se aprecia el espectro de los picos correspondientes a 10.68 y 12.66 minutos obteniendo similitud en los espectros y concluyendo que es el mismo compuesto.

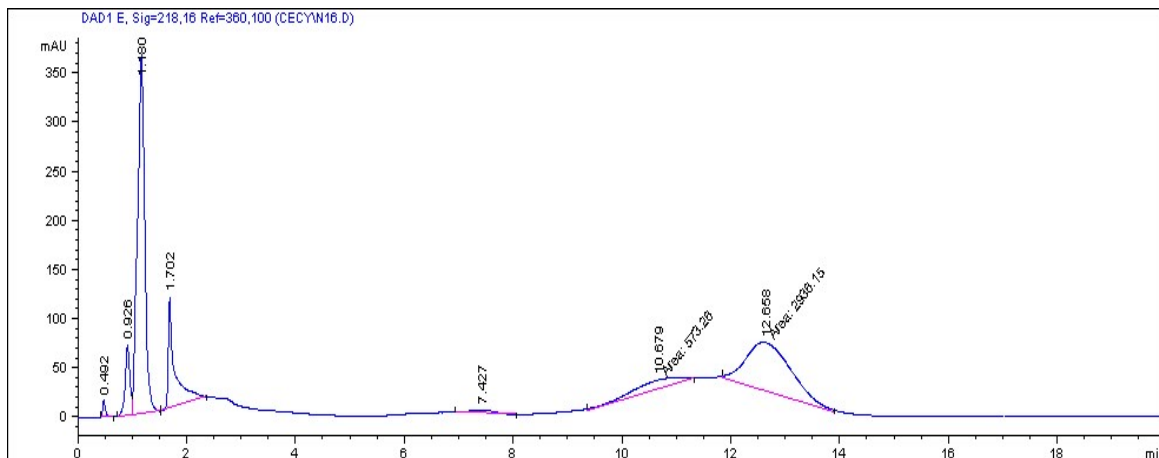


Figura 4. Cromatograma del extracto 1, fase móvil ACN: H₂O (95:5), 0.8 mL/ min, 50 μ L de inyección.

Se contrasta en el espectro UV de los picos 10.679 y 12.658 que los picos observados provienen del mismo compuesto

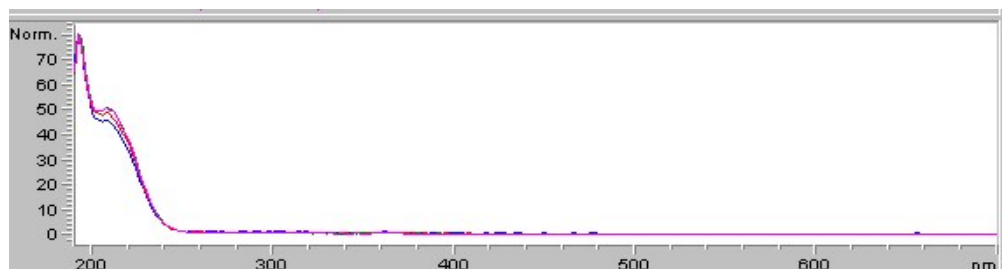


Figura 5. Espectro UV pico 10.68 min.

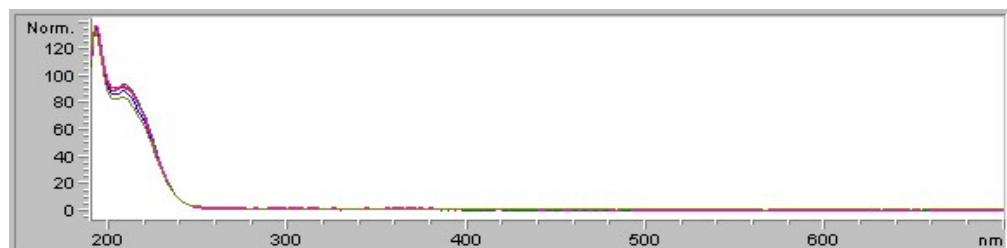


Figura 6. Espectro UV pico 12.658 min.

Al aumentar la proporción de agua, aumenta la resolución pero afecta la viscosidad y aumentan los tiempos de retención, se perjudica el análisis

ocasionando que este sea más largo, en algunos cromatogramas se observa que hay componentes después de los 20 minutos aunque puede que no sean significativos, de acuerdo con Alba M. 2010, menciona que la concentración en estos análisis cromatográficos es un parámetro importante al momento de definir las condiciones adecuadas, el efecto de la concentración de muestra (μg de muestra/ g de relleno) afecta en la eficacia de la columna. Para las aplicaciones con columnas de reparto y adsorción, la eficacia decrece notablemente con la cantidad de muestra, como se muestra en la **figura 7**, sin embargo, se observa mayor cantidad de compuestos.³⁷

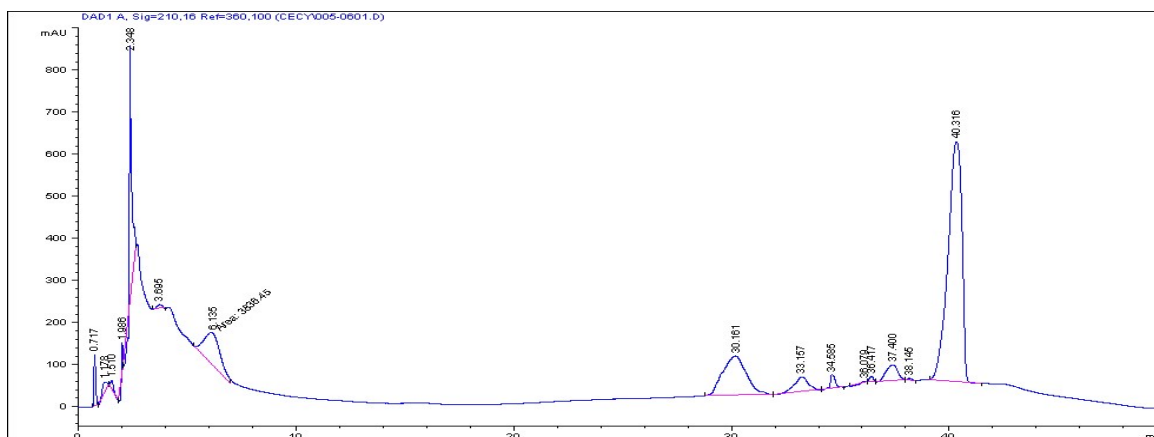


Figura 7. Cromatograma del extracto 1, fase móvil $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (98:2), 1.2 mL/ min, 50 μL de inyección.

En el espectro UV de los siguientes picos (6.135, 37.4 y 40.319 min) se puede observar que se trata de compuestos diferentes, los cuales presentan un grado de pureza espectral bueno, por lo que se determina que una mayor proporción de agua mejora nuestra separación ver **figuras 8, 9 y 10**.

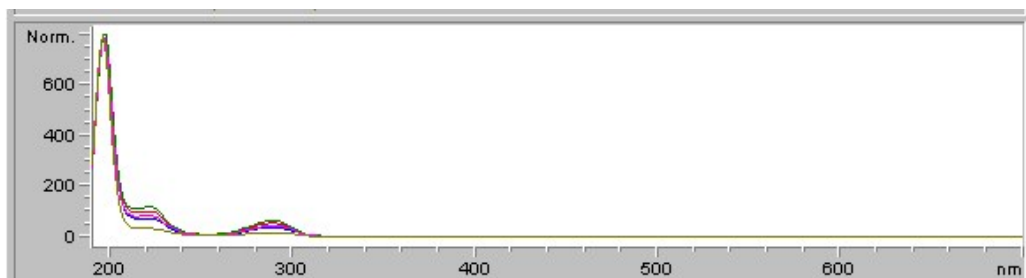


Figura 8. Espectro UV pico 6.135 min.

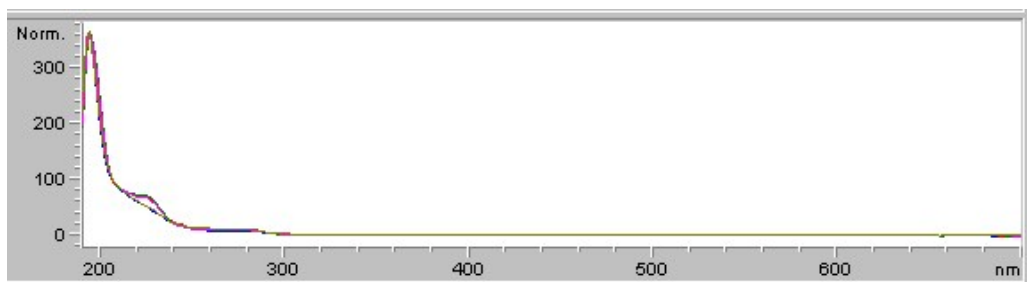


Figura 9. Espectro UV pico 37.4 min.

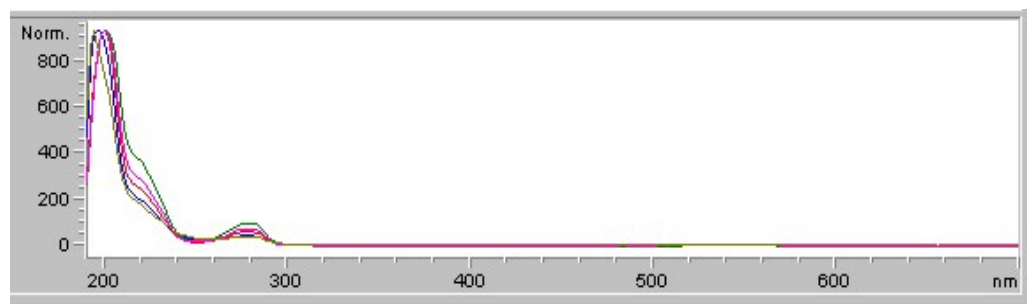


Figura 10. Espectro UV pico 40.319 min.

EL análisis realizado al extracto 2, se obtuvo un comportamiento similar al del extracto 1, en la **figura 11**, se observa que, al aumentar la proporción de agua, se obtienen más compuestos al tener una mejor separación.

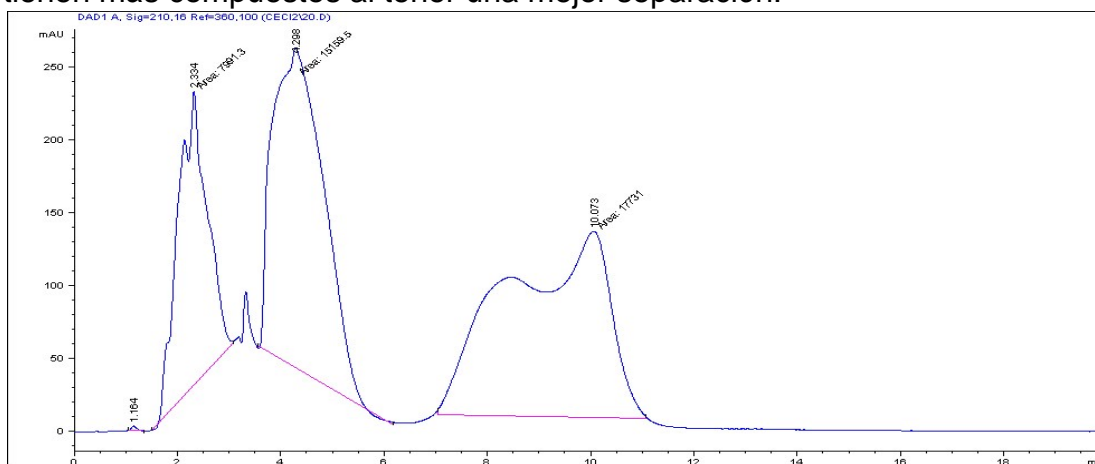


Figura 11. Cromatograma del extracto 2 fase móvil H₂O:ACN (70:30), 0.3 mL/ min

Además, se comprueba en el espectro UV que el pico de 4.298 min en una proporción H₂O:ACN (70:30), no es un solo compuesto, sino que hay solapamiento de al menos dos compuestos. Esto pone en evidencia que nuestra resolución no es adecuada ver **figura 12**.

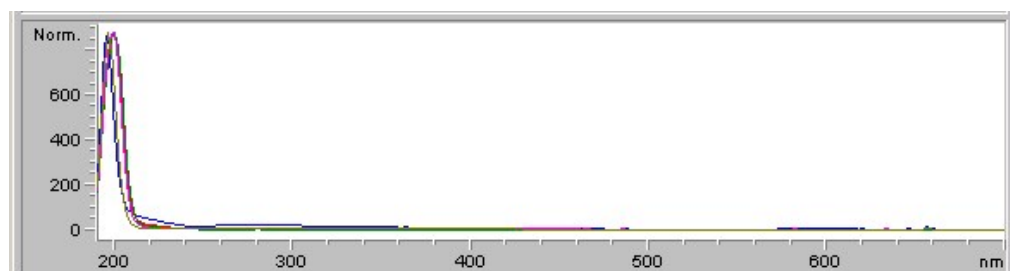


Figura 12. Espectro UV pico 4.298 min.

Se puede constatar que el mejor método es el de H₂O:ACN (98:2), **figura 13** ya que se separan mejor los compuestos en ambos extractos, entre más se aumenta la proporción de agua en la fase móvil, mejor resolución se tendrán en los picos, al tener una alta proporción de ACN no mejoró la resolución, por lo que los tiempos de retención fueron demasiado largos, siendo extractos crudos es importante comentar que la resolución en los picos no será perfecta, se recomienda realizar una purificación por cromatografía en columna de los extractos crudos para reanalizar las muestras por CLAR.

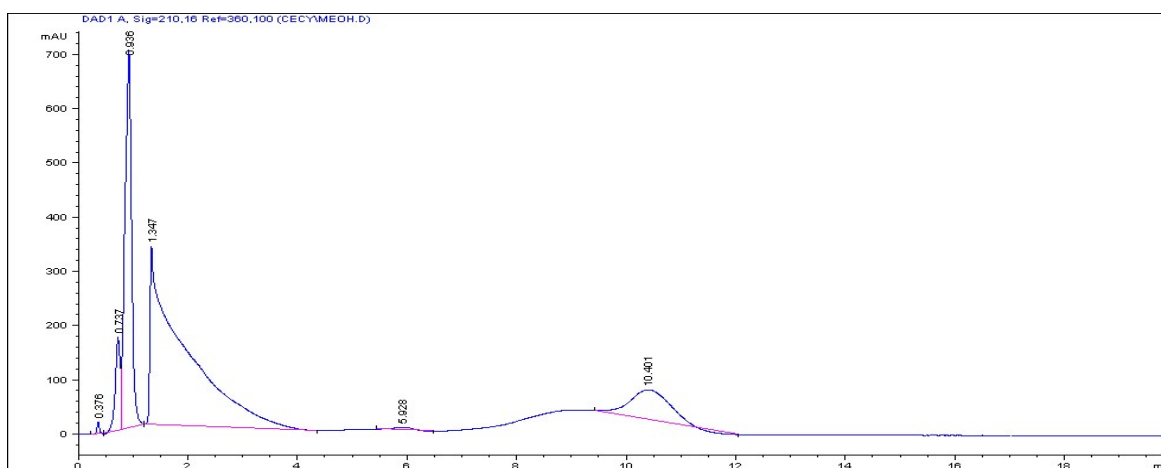


Figura 13. Cromatograma del extracto 2 fase móvil H₂O:ACN (98:2), 1.2 mL/ min, 80 µL de inyección

En la **figura 14**, se presenta el espectro de absorción UV correspondiente al pico 10.4 min., notando que es un pico bastante puro, lo que nos indica que solo se trata de un solo compuesto.

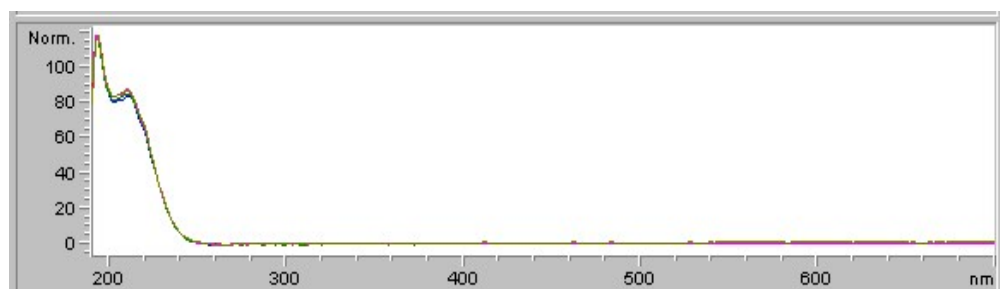


Figura 14. Espectro UV, pico 10.401 min.

4.5 Resultado de estándares y asignación de picos

ÁCIDO CUMARICO

Algunas bacterias tienen comportamiento láctico, es decir que producen enzimas necesarias para llevar a cabo su crecimiento, se ha demostrado que poseen un potente efecto inhibitorio para el desarrollo de otras bacterias de acuerdo con Zavaleta J., 2005.³⁸ En el extracto 2, se presenta un pico de 1.347 min., comparado con el cromatograma del ácido cumarico, hay una probabilidad de que se presente este tipo de metabolito en el extracto, coincidiendo con el pico 1.409 min. del estándar.

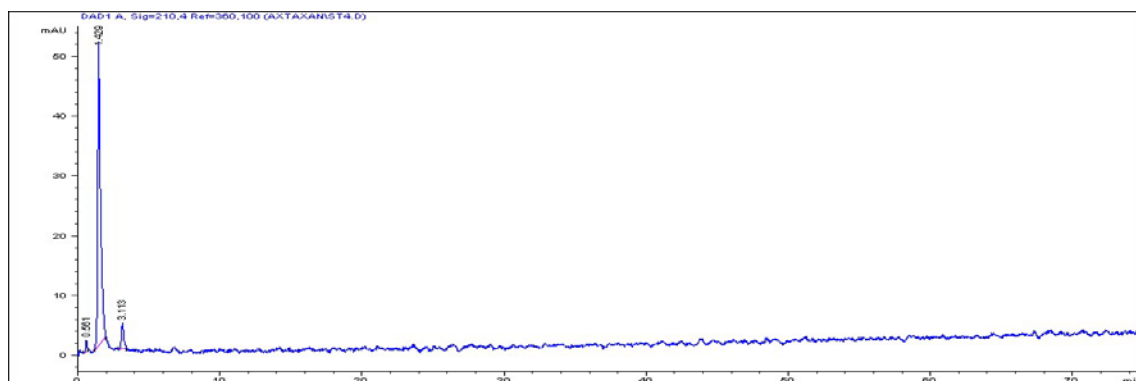


Figura 15. Cromatograma del ácido cumarico, columna wáter symetry, H₂O:ACN (98:2), 1.2 mL/min, 50 µl, longitudes de onda 210, 200, 218, 275 y 280 nm

ASTAXANTINA

Según Quinata A., 2008,³⁹ la astaxantina figura 16, debido a sus características fisicoquímicas se encuentra en la familia de los carotenoides, los cuales son responsables de dar una coloración amarillenta roja y anaranjada a las bacterias. En los extractos 1 y 2, se tienen picos de 0.717 min. y 0.737 min., respectivamente, los cuales concuerdan con los tiempos de retención encontrados desde 0.706 min. a 1.042 min. en el estándar con ello se puede inferir la presencia de carotenoides o compuestos con estructura similar a la astaxantina.

La presencia de compuestos de esta índole es evidente desde el crecimiento bacteriano en donde se evidencia una generación de coloración asociada a compuestos como los carotenoides, los cuales además de presentar diversas actividades farmacológicas están ligados a realizar una actividad antioxidante.

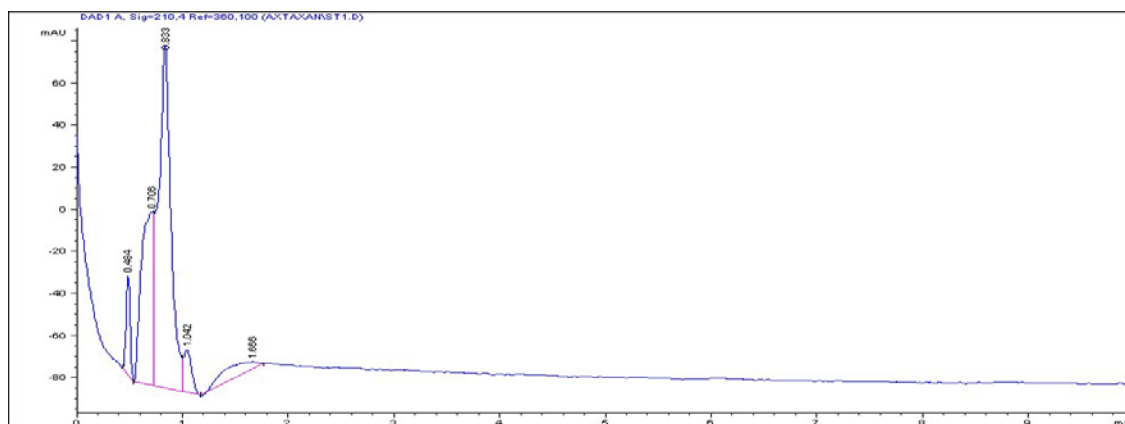


Figura 16. Cromatograma de astaxantina, columna wáter symetry, H₂O:ACN (98:2), 1.2 mL/min, 50 µl, longitudes de onda 210, 200, 218, 275 y 280 nm

FLAVONOIDES

Los flavonoides se encuentran en vegetales, semillas y metabolitos que producen las bacterias, considerándose con actividad antioxidante y eliminadores de radicales libres, de acuerdo con Martínez S., 2002.⁴⁰ El pico de 0.737 min del extracto 2, se pueden asociar a flavonoides acorde con el Screening fisicoquímico y con el cromatograma del estándar de flavonoide (**figura 17**)

En el extracto 1, se obtuvieron cumarinas, alcaloides y monosacáridos y en el extracto 2 flavonoides, saponinas y alcaloides.

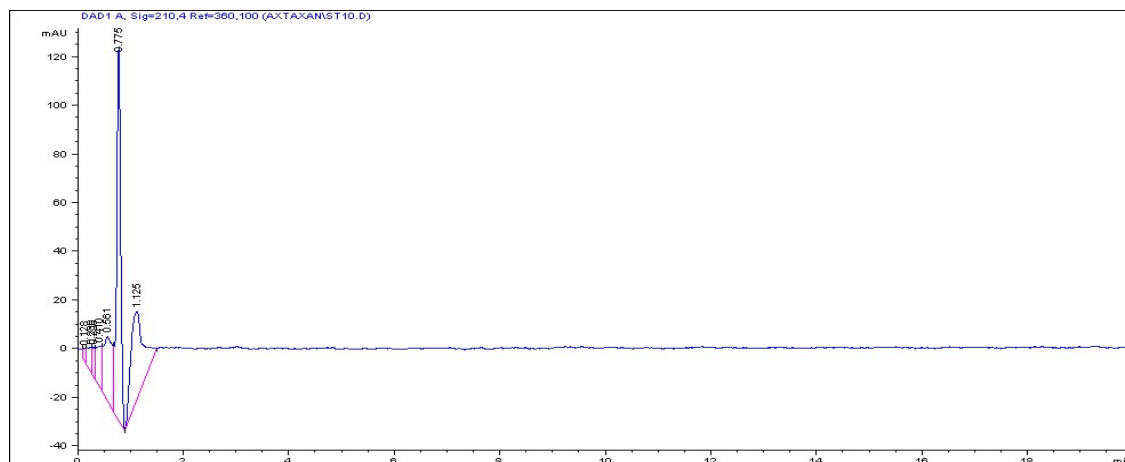


Figura 17. Cromatograma de Flavonoides, columna wáter symetry, H₂O:ACN (98:2), 1.2 mL/min, 50 µl, longitudes de onda 210, 200, 218, 275 y 280 nm

Al comparar con los estándares de ambos extractos se corrobora que los resultados obtenidos en el screening metabólico concuerdan, encontrándose igualmente flavonoides y cumarinas que son compuestos antioxidantes, eliminadores de radicales libres y con efectos inhibitorios para otras bacterias. Respecto de los demás metabolitos encontrados sería conveniente realizar una

determinación más precisa realizando una purificación por columna de los extractos crudos y contar con una batería más amplia de estándares.

4.6 Prueba de DPPH-CLAR

En la prueba de DPPH, no se obtuvieron los cromatogramas deseados, debido al tiempo y a la cantidad de muestra para poder realizar estas pruebas. Desde la determinación de la actividad antioxidante por CCF, se evidenció la presencia de dicha actividad muy asociada a los metabolitos secundarios que se infieren presenta la cepa. Se recomienda la obtención de una mayor cantidad de biomasa y con ello incrementar la concentración de los diferentes metabolitos secundarios generados por esta cepa bacteriana.

5. CONCLUSIONES

Se obtuvo el crecimiento y fermentación de *Gordonia* sp. en medio GYEA. Se extrajeron los metabolitos secundarios hidrofílicos de *Gordonia* sp. con disolventes de mediana a alta polaridad, los cuales se identificaron por el screen fisicoquímico y se analizó la actividad antioxidante de éstos por CCF-DPPH. El metabolismo bacteriano de *Gordonia* sp. podría ser de gran ayuda para la innovación y desarrollo de fármacos nuevos y diversos compuestos antioxidantes útiles para el tratamiento de diversas afecciones.

6. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADAS

El objetivo del proyecto fue la determinación de la actividad antioxidante y los parámetros analíticos que permitieran realizar la validación del método.

Los objetivos específicos fueron:

- 1.- Crecimiento y fermentación de *Gordonia* sp en medio GYEA
- 2.- Extraer los metabolitos secundarios hidrofílicos de *Gordonia* sp
- 3.- Análisis de los metabolitos secundarios hidrofílicos de *Gordonia* sp
4. Analizar la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios hidrofílicos de *Gordonia* sp.

Cuando se realizan este tipo de proyectos es determinante contar con condiciones adecuadas en el laboratorio, como esterilidad en el manejo de cepas y fermentación, así como un cromatógrafo calibrado y adecuado para el mismo.

El método para cuantificar y determinar la actividad antioxidante de DPPH, es económico, factible y fácil de realizar en un laboratorio de investigación, sin

embargo, se debe considerar la correcta preparación del reactivo, lo que permite apreciar los compuestos antioxidantes tanto por CCF como por CLAR.

El uso de disolventes como el acetato de etilo y metanol en las técnicas de extracción nos permitió obtener únicamente metabolitos secundarios producidos por la cepa en estudio de mediana a alta polaridad. *Gordonia* sp. contiene metabolitos antioxidantes de diversas familias principalmente flavonas y cumarinas, este resultado se corroboró tanto por CLAR como por el screen fisicoquímico realizado y de acuerdo con los estándares analizados se pudo realizar una identificación de estos compuestos en la cepa de *Gordonia* sp. estudiada.

Por lo cual los cuatro objetivos específicos del proyecto se alcanzaron, es evidente que por lo complejo de trabajar con bacterias no se realizaron una mayor cantidad de pruebas, sin embargo, en el proyecto se logró el desarrollo del método analítico.

7. RECOMENDACIONES

Se sugiere que en posteriores servicios sociales se realicen más pruebas para realizar la validación del método analítico como está marcado en la normatividad vigente.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Reyes, A., Galicia, M., Carrillo, M. *Antioxidantes: la magia de lo natural*. Rev Tlatemoani. 2011; (8),1-16.
2. Litch, M. *Radicales libres*. Rev. Academia Salud. 2000; (2), 8-14.
3. Céspedes, E., Rodríguez, K., Llópiz, N., Cruz, N. *Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento*. Rev Cubana Invest Biomed. 2019; (3),186-190.
4. Patthamakanokporn, O., Puwastien, P., Nitithamyong, A., Sirichakwal. *P Changes of antioxidant activity and total phenolic compounds during storage of selected fruits*. J Food Composition Analysis. 2008; (2), 241-248.
5. Pastene, E. *Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante*. Boletín Latinoam Caribe Plantas Med Aromáticas. 2009; (8), 449-455.
6. Llancari, A., Matos, A. *Valoración de los nutrientes y antioxidantes en la salud humana e industria alimentaria*. En: Universidad Peruana Unión. I Congreso Nacional de Investigación. 2011; (4), 2-4.

7. Quintanar, M., Calderón, J. *La capacidad antioxidante total. Bases y Aplicaciones.* Rev Educación Bioq. 2009; 28(3), 89-101.
8. Núñez, A. *Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades.* Rev Cubana Salud Pública. 2011; (37), 644-660.
9. Raja V. *Antibiotic stress.* Environmental and Experimental Botany. 2017; (1), 128137.
10. Coronado H., Vega S., Gutiérrez R. *Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana.* Rev. Chilena Nutricional. 2015; (2), 1-7.
11. Creus G. *Compuestos esteroideos, un análisis de sus beneficios para la salud.* Ambito Farmacéutico Nutrición. 2000; (6), 121-129.
12. Caba, M. *Esteroides anabólicos.* Rev de Divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. 2006;(2), 52-70.
13. Patzi, M. *Carbohidratos.* Rev de Actualización Clínica de Investigación. 2014; (1), 41.
14. Chang, L. *Caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antibacteriana in vitro.* Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2013; (4), 187195.
15. Campos, Ma. *Alkaloids-secrets of life: Rev Mexicana de Ciencias Farmacéuticas.* 2007; 38 (4), 38-51.
16. Cuevas, C. *Las proteínas desordenadas y su función: Una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés.* Rev Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. 2011; (2), 97-105.
17. Garzón, G. *Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: Revisión.* 2008; 13 (3), 27-36.
18. Lee, M. D., Dunne, T. S., Siegel, M. M., Chang, C. C., Morton, G. O. & Borders, D. B. *Calichemicins, a novel family of antitumor antibiotics. 1. Chemistry and partial structure of calichemicin (gamma 1).* J Am Chem Soc. 1987; (6), 34-64.
19. Fernández, C. R. *Análisis de la diversidad de Actinomicetos asociados a raíces de Lupinus angustifolius. Trabajo de Grado. Departamento de Microbiología y genética. Universidad de Salamanca. Salamanca. 2005; (1), 102-107.*
20. Finstein, M.S. and Morris, L.M. *Microbiology of municipal solid waste composting.* Adv. Appl. Microbiology. 1975; (19), 113–151.

21. Jensen, P. R. & Fenical, W. *Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria, ecological perspectives*. *RevAnn*.1994; (48), 559- 584.
22. Demain, A. L. y Fang, A. *Emerging Concepts of Secondary Metabolism in Actinomycetes*. *Actinomycetologica*. 1995; (9), 98-117.
23. Tsukamura, S. *Producción de inulinasa utilizando polvo de ajo (Allium sativum) como sustrato potencial en Streptomyces sp.*, *Journal of Food Engineering*. 2006;(3), 486-491.
24. Goodfellow J., Alderson C., "Inulinasa de *Kluyveromyces marxianus*: Composición del medio de cultivo y extracción de enzimas", *Brazilian Journal Chemical Engineering*. 1999; (6), 237-245.
25. Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. y Hopwood, D. A. *Practical Streptomyces Genetics* Norwich, UK: The John Innes Foundation. 2000; (5),32-57.
26. Stackebrandt B., "Caracterización de la endoinulinasa termoestable de una nueva cepa *Bacillus smithii* T7", *Bioquímica y biotecnología aplicada*. 2007; (3), 498506.
27. Franco, C. *Utilización de los actinomicetos en procesos de biofertilización*. *Rev Peru biol*.2009; 16 (2), 239-242.
28. Broker, D. *Biology of the Metabolically Diverse Genus Gordonia*.*American Society for Microbiology*. 2004;(6),3195-3204.
29. Kuskoski, A. *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en pulpa de frutos*. 2005; (5), 726-732.
30. Poma, E. *Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para la capacidad antioxidante*. 2015; (1), 57-60.
31. Alves, D. Pergentino D. *Assessment of in vitro antioxidant potential of the terpene compound*. *Journal of Basic and Applied Pharmaceuticals Sciences*. 2016; (4), 65-68.
32. Nieto, M., Estrada, L. "Capacidad antioxidante de flavonoides ", *Revista Mexicana de Ciencias*. 2007;(5), 805-811.
33. Peña, C. *Infección cutánea por Gordonia*. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2016 ;(10), 685-686.
34. Guija E. *Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante*. 2015; (15),57-60.
35. Castañeda, B. *Evaluación de la capacidad antioxidante de plantas medicinales peruanas nativas e introducidas*. 2008; (1), 42-46.

36. Niño, J. *Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales*. 2005; (2), 321-325.
37. Alba, M. *Determinación cuantitativa de G-1 en un concentrado emulsionable mediante cromatografía de gas capilar*. *Revista CENIC, Ciencias Químicas*, 2010; (41), 1-11.
38. Zavaleta J. *Capacidad antioxidante y principales ácidos fenólicos y flavonoides*. *Revista Redalyc*. 2005; (1), 1-13.
39. Quintana. A. *Carotenoides ¿Qué son?* *Revista Redalyc*. 2008;(1), 1-16.
40. Martínez S., *Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes*. *Revista Nutrición Hospitalaria*. 2002; (6), 271-278.