



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

Nombre del proyecto.

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

Alumno.

Zarate Jiménez Ana Cecilia

Matrícula. 2153059611

Asesores.

Dra. Herminia Inés Pérez Méndez

N° Económico: 6276

Dra. Lucia Ortega Cabello

N° Económico: 36083

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 de inicio: 29 de Octubre de 2018

Fecha terminación: 30 de Abril de 2019

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. ¿Qué es un antioxidante?.....	5
2.1.1. Radicales libres, producción y acción.....	5
2.1.2. Proceso de oxidación.....	6
2.1.3. Estrés oxidativo.....	6
2.2. Métodos para medir actividad antioxidante.....	6
2.2.1. El método DPPH.....	7
2.2.2. Optimización del método DPPH.....	8
2.3. Metabolitos secundarios.....	9
2.3.1. Metabolitos secundarios lipofílicos.....	9
2.4. Importancia de las actinobacterias en biotecnología.....	11
2.4.1. Género <i>Gordonia</i>	11
3. OBJETIVOS.....	12
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. METODOLOGÍA.....	13
4.1. Crecimiento de <i>Gordonia</i> sp. por fermentación en medio GYEA.....	13
4.2. Extracción selectiva de metabolitos secundarios lipofílicos.....	13
4.3. Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios mediante CCF y DPPH-CCF.....	13
4.3.1 Cromatografía de capa fina (CCF).....	13
4.3.2. DPPH-CCF.....	13
4.3.3. Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios mediante screening de metabolitos secundarios.....	13
4.4. Caracterización de los extractos mediante CLAR.....	14
4.5. Prueba de actividad antioxidante por DPPH-CLAR.....	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
5.1. Crecimiento de <i>Gordonia</i> sp. por fermentación en medio GYEA.....	15

5.2. Extracción selectiva de metabolitos secundarios lipofílicos.....	15
5.3. Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios mediante CCF y DPPH-CCF de las extracciones hexano y éter isopropílico.....	15
5.3.1. Cromatografía de capa fina (CCF).....	15
5.3.2. DPPH-CCF (Prueba de solución DPPH (60mg/mL).....	16
5.3.3. Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios mediante screening de metabolitos secundarios.....	17
5.4 Desarrollo del método para la caracterización de los extractos 1 y 2 por CLAR.....	18
5.4.1. Pruebas preliminares (método CCF).....	18
5.4.1.1. Fase móvil: Acetonitrilo: agua.....	18
5.4.1.2. Fase móvil: Acetonitrilo: metanol.....	18
5.4.1.3. Fase móvil: n-propanol: agua.....	19
5.4.2. Pruebas en CLAR.....	19
5.4.2.1. Comparación de los estándares con el extracto 1.....	22
5.4.2.2. Comparación de los estándares con el extracto 2.....	23
5.5. Medición de la actividad antioxidante de los extractos con la técnica de DPPH-CLAR.....	25
6. CONCLUSIONES.....	26
7. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS.....	27
8. RECOMENDACIONES.....	28
9. BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad causa impacto entre los consumidores el denominado "mercado de la salud" que cada día se expande en el mundo; este incluye los alimentos con antioxidantes considerados alimentos funcionales y que, entre otras definiciones, se pueden describir como productos alimenticios (animal o vegetal) naturales o industrializados que forman parte de la dieta diaria y que además de aportar nutrientes, tienen otros componentes bioactivos.¹

Las propiedades antioxidantes no sólo deben estudiarse por sus interacciones químico-biológicas, sino por su función en el deterioro oxidativo que afecta a los alimentos. Los antioxidantes se utilizan en la industria alimentaria adicionados a las grasas u otros productos para retrasar los procesos de oxidación, en tanto previenen el comienzo de la degradación oxidativa (grasas).¹

Entre los antioxidantes hay varias familias de metabolitos secundarios hidrofóbicos o lipofílicos de interés y entre éstos están los: flavonoides lipofílicos, terpenoides, monoterpenos, sesquiterpenos, politerpenos, diterpenos, quinonas, antraquinonas y tetraterpenos (carotenoides).^{1,2}

Los metabolitos secundarios son productos naturales no esenciales para el organismo que los produce, pero les confiere una ventaja para su supervivencia. Como los pigmentos, moléculas bioactivas (antibióticos) entre otros.³ El grupo de metabolitos secundarios antioxidantes más numeroso y diversificado son los terpenoides, estos compuestos se derivan de una estructura básica de 5 carbonos (C₅H₈), se clasifican en función del número de estas unidades en su esqueleto. Entre los terpenoides, los componentes más importantes pertenecen a las familias monoterpenoides y sesquiterpenoides. Por otro lado, los fenilpropanoides se derivan principalmente de la fenilalanina, un aminoácido aromático sintetizado.²

Las bacterias del grupo de los actinomicetos o actinobacterias (principalmente del Orden *Actinomycetales*) son el principal grupo de organismos productores de metabolitos, con el género *Streptomyces* a la cabeza y detrás especies de los géneros *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* y *Streptosporangium*.³ Además de la producción de metabolitos secundarios con actividad biológica, también se les reconoce por producir diversas enzimas extracelulares como las lipasas, fosfolipasas, nucleasas, proteasas, amilasas, quitinasas, lignina-hidrolasas, celulasas, entre otras.⁴

El género *Gordonia* fue propuesto originariamente por Tsukamura en 1971⁵ para algunos actinomicetos débilmente ácido-alcohol resistente, aislado del suelo y de esputos de pacientes con enfermedades pulmonares. Las tres especies originales *G. bronchialis*, *G. rubropertincta* y *G. terrae* fueron transferidas en 1977 por Goodfellow y Alderson.⁶ El género *Gordonia* incluye pequeños bacilos y formas cocáceas, pueden formar hifas con ramificaciones en ángulo recto, son aerobios, Grampositivos o Gram-variable, catalasa positivos y normalmente parcialmente ácido-alcohol resistentes. Forman colonias marronáceas, rosas, naranjas o rojas cuyas células se encuentran en algunos casos formando agregados.⁷

En general, existen varias aproximaciones para la clasificación de métodos para medir la actividad antioxidante. Una de ellas se basa en clasificar los métodos como directos e indirectos, mientras que otra los clasifica de acuerdo con el mecanismo mediante el cual sucede el proceso antioxidante.⁴ Algunos métodos ampliamente usados como el ácido 2,2'-azino-bis(3-

etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) y el 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) se fundamentan en la estabilización de radicales libres sintéticos metaestables, cuya reacción con un antioxidante genera un cambio que puede ser detectado instrumentalmente. El ensayo de actividad antioxidante utilizando el radical DPPH se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar dicho radical, esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 517 nm.⁸

Los resultados se suelen expresar como CI_{50} , es decir, la concentración de antioxidante necesaria para inhibir un 50% del DPPH•. Sin embargo, han surgido otros parámetros como la eficiencia anti-radicalaria (EA) basada en la cinética de la reacción y que involucran, además de la concentración de antioxidante, el tiempo necesario para ejercer su efecto. Entre las ventajas de este método están su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental; sin embargo, entre las desventajas están la dificultad de interpretar los resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el del radical.⁴

Por lo tanto, es importante buscar técnicas alternativas para medir la actividad antioxidante con este radical, siendo la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) una técnica analítica que podría permitir la medición específica del DPPH, resolviendo así la desventaja mencionada anteriormente.⁸

2. MARCO TEORICO

2.1. ¿Qué es un antioxidante?

Un antioxidante puede ser definido como cualquier molécula capaz de prevenir o retardar la oxidación (pérdida de uno o más electrones) de otras moléculas, generalmente sustratos biológicos como lípidos, proteínas o ácidos nucleicos. La oxidación de tales sustratos podrá ser iniciada por dos tipos de especies reactivas: los radicales libres y aquellas especies que, sin ser radicales libres, son suficientemente reactivas para inducir la oxidación de sustratos como los mencionados.⁹

Los antioxidantes son compuestos químicos que el cuerpo humano utiliza para eliminar radicales libres, que son sustancias químicas muy reactivas que introducen oxígeno en las células y producen la oxidación de sus diferentes partes, alteraciones en el ADN y cambios diversos que aceleran el envejecimiento del cuerpo. Lo anterior se debe a que el oxígeno, aunque es imprescindible para la vida, es también un elemento químico muy reactivo. El propio cuerpo genera radicales libres para su propio uso (control de musculatura, eliminación de bacterias, regulación de la actividad de los órganos, etc.), pero al mismo tiempo genera antioxidantes para eliminar los radicales libres sobrantes, ya que estas sustancias son muy agresivas.¹⁰

2.1.1. Radicales libres, producción y acción

Un radical libre es aquella figura 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. Los compuestos en cuestión forman parte de los llamados especies reactivas de oxígeno (ERO) o ROS (Reactive Oxygen Species).¹

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.¹

2.1.2. Proceso de oxidación

Asociado a la función antioxidante se considera el proceso 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 par óxido-reductor o balance redóx.¹

2.1.3. Estrés oxidativo

En determinadas circunstancias, la producción de radicales libres puede aumentar en forma descontrolada, situación conocida con el nombre de estrés oxidativo. El concepto expresa la existencia de un desequilibrio entre las velocidades de producción y de destrucción de las moléculas tóxicas que da lugar a un aumento en la concentración celular de los radicales libres.¹¹

Existen evidencias que sugieren la existencia de una relación entre el estrés oxidativo y el origen de numerosas enfermedades. Por ejemplo, las células fagocíticas del sistema inmune (neutrófilos, monocitos, macrófagos y eosinófilos) que defienden al organismo contra la agresión de agentes extraños, producen grandes cantidades de radicales libres como parte del mecanismo que les permite destruir dichos agentes. Aunque esto constituye una defensa esencial contra la infección, hay enfermedades tales como la artritis reumatoide que se produce por exceso de activación fagocitaria y el consecuente daño a los tejidos.¹¹

En el caso del Síndrome de Fatiga Crónica se ha encontrado que el estrés oxidativo y más específicamente la peroxidación lipídica contribuyen a esta enfermedad y a algunos de sus síntomas, demostrándose que los pacientes presentan concentraciones significativamente aumentadas de F2- isoprostanos (productos derivados de la oxidación no enzimática del ácido araquidónico presente en los lípidos de las membranas celulares) junto con otros marcadores claves del estrés oxidativo.^{11, 12}

2.2. Métodos para medir 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 o cromóforas de naturaleza radical. Alternativamente, diversos compuestos cromóforos (ABTS, DPPH, DMPD, DMPO y FRAP) son utilizados para determinar la

capacidad de los compuestos fenólicos, antioxidantes exógenos (se incluyen la vitamina E, la vitamina C) y los carotenoides que contienen los frutos para captar los radicales libres generados.⁸

Los métodos más aplicados son ABTS y DPPH. 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, y otro método es el DMPD sólo soluble en medio acuoso. 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 el DMPD a 505 nm.⁸

2.2.1. El método DPPH

Este ensayo fue propuesto originalmente por Brand-Williams. El DPPH[•] (Figura 1) es uno de los pocos radicales orgánicos estables a comparación de ABTS, DMPD, DMPO y FRAP. Presenta una fuerte coloración violeta, es comercialmente disponible. El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH[•], esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 517 nm.⁸ El objetivo de una optimización del ensayo DPPH es evaluar la capacidad antioxidante en condiciones normales y comparándolo con dos distintos métodos.¹³

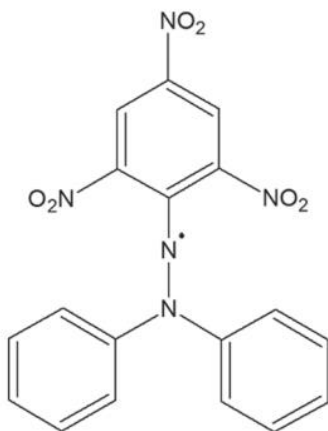


Figura 1. Estructura química del radical libre metaestable DPPH[•]

Los métodos están basados en medir la captación del radical libre DPPH[•] por parte de una estructura antioxidante. Este radical estable presenta en disolución un color violeta oscuro. El electrón desapareado da un máximo de absorción a 514 nm y es color morado. Cuando una solución de DPPH[•] se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces aparece la forma reducida DPPH-H provocando un cambio en el color de morado a amarillo Figura 2. Esta diferencia de absorbancia nos indicará la capacidad antioxidante del alimento o del extracto en estudio.¹³

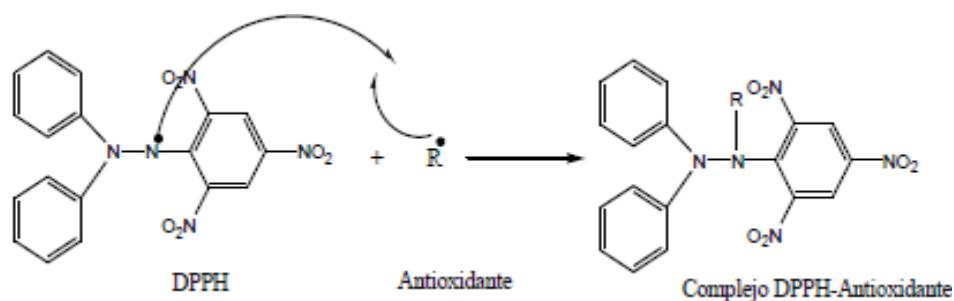


Figura 2. Reacción química del radical libre metaestable DPPH• en presencia de un compuesto antioxidante

Los resultados se suelen expresar como CI_{50} , es decir, la concentración de antioxidante necesaria para inhibir un 50% del DPPH•. Entre las ventajas de este método están su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental; sin embargo, entre las desventajas están la dificultad de interpretar los resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el del radical. Adicionalmente el DPPH• es un radical estable, centrado en nitrógeno, que dista mucho de parecerse a las especies reactivas de importancia biológica; de hecho, muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo no lo hacen con DPPH•, debido al impedimento estérico que representa la estructura química que rodea al radical, lo cual hace que sustancias pequeñas generalmente muestren una mayor actividad.¹⁴

2.2.2. Optimización del método DPPH

Es importante la optimización de los métodos de análisis de actividad antioxidante para evitar datos erróneos; Estos métodos deben ser rápidos, reproducibles y requerir cantidades pequeñas de los compuestos químicos por analizar, además de no estar influenciados por las propiedades físicas de dichos compuestos.¹⁵

Los distintos métodos pueden diferir en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción. Por ello es importante tener en consideración aspectos como el grado de absorción de los compuestos, los productos del metabolismo que generan y la actividad de estos.¹⁶

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas una preferencial atención es la técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo conocido por las siglas DPPH. La determinación de compuestos antioxidantes utilizando la técnica del DPPH ha sido descrita hace más de cincuenta años, sin embargo, no utilizan la misma concentración del DPPH en los medios de reacción y por ello no permite realizar una evaluación precisa, considerando especialmente que los resultados experimentales se expresan como CI_{50} .¹⁷

En tal sentido, podemos considerar que el valor CI_{50} es dependiente de la concentración del DPPH, así como, de la naturaleza del compuesto antioxidante.

Se validaron los métodos CLAR y de DPPH donde los resultados demostraron que estas metodologías son adecuadas y confiables para cuantificación y determinación de la actividad antioxidante, respectivamente.¹⁷

Sin embargo, se han realizado diversas modificaciones entre ellas el uso de CLAR para distinguir entre los radicales y antioxidantes con la misma longitud de onda. El cálculo del porcentaje de contribución para asignar el mejor antioxidante y las posibles interacciones, así como el cálculo de EC₂₀ para ajuste lineal, el DPPH en forma seca utilizando micropocillos como soporte y acoplado con escáner para mejorar la sensibilidad.¹⁸⁻²⁰

2.3. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son aquellos compuestos orgánicos sintetizados por el organismo que no tienen un rol directo en el crecimiento o reproducción de este. A diferencia de lo que sucede con los metabolitos primarios, la ausencia de algún metabolito secundario no le impide la supervivencia, si bien se verá afectado por ella, a veces gravemente. En el caso de los microorganismos, los metabolitos secundarios mejor conocidos son los antibióticos. En la trofofase (fase de crecimiento de los microorganismos) no se producen metabolitos secundarios. Es en la idiofase normalmente, cuando se producen (fase en la que el microorganismo no crece, pero sigue metabólicamente activo). Para que se produzca el metabolito secundario, primero hay que asegurar unas condiciones óptimas durante la trofofase.²¹

Los metabolitos secundarios se dividen en los que contienen nitrógeno que incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos y los no nitrogenados que se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides. La variedad estructural está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación.²²

En general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; los esteroides y sesquiterpenos se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que la biosíntesis de algunas aminas y alcaloides tiene lugar en la mitocondria.²²

2.3.1. Metabolitos secundarios lipofílicos

Los principales metabolitos secundarios con propiedades no polares o lipofílicos son taninos, terpenos, saponinas, esteroides, alcaloides, flavonoides, cumarinas, carbohidratos, glucósidos, proteínas, emodinas, antraquinonas, antocianinas, leucoantocianinas y compuestos fenólicos. Los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento en el cultivo de producción, pero sirven en diversas funciones para la supervivencia en la naturaleza.²¹

La mayoría de los metabolitos secundarios son excretados al medio externo. Este hecho puede estar relacionado tanto con la eliminación de material tóxico de la célula como con la existencia de una función propia de estas moléculas, o con ambos a la vez.²²

Algunos de los papeles que pueden desempeñar los metabolitos secundarios en la célula microbiana pueden estar integrados en procesos globales de la célula, mientras que otros pueden desempeñar funciones específicas.²¹ En el Cuadro 1 se muestran las principales características de cada metabolito secundario de origen lipofílico.

Cuadro 1. Principales características de los distintos metabolitos secundarios lipofílicos^{21,23}

Metabolito secundario	Características
Taninos	Son polímeros polifenólicos solubles en agua, de alto peso molecular. La presencia de un gran número de grupos hidroxilo fenólicos les brinda la capacidad de formar complejos principalmente con las proteínas y en menor medida con iones metal, aminoácidos y polisacáridos.
Terpenos	Son compuestos orgánicos aromáticos volátiles que están constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, llamado isopreno. Son los metabolitos secundarios que dan las características organolépticas de las plantas y que constituyen la mayor parte del aceite esencial.
Saponinas	Son compuestos bioactivos encontrados principalmente en plantas, pero también en algunos organismos marinos e insectos. De acuerdo con el carácter químico de la aglicona (conocido como sapogenina) se dividen en esteroides y triterpenoides.
Esteroides	Son compuestos orgánicos derivados del núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano, que se compone de vitaminas y hormonas. Se sintetizan a partir del colesterol. Son hormonas lipofílicas que atraviesan libremente la membrana plasmática.
Alcaloides	Los alcaloides son compuestos heterocíclicos que generalmente se sintetizan a partir de aminoácidos, tales como triptofano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina, solos o combinados con Terpenoides.
Flavonoides	Son compuestos polifenólicos que comprenden quince átomos de carbono, con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos.
Cumarinas	Constituyen una clase de metabolitos secundarios, ampliamente distribuidos en el reino vegetal, pudiendo también ser encontrados en hongos y bacterias. Estructuralmente son lactonas del ácido <i>o</i> -hidróxi-cinámico (2H-1-benzopiran-2-onas).
Carbohidratos	Son compuestos químicos formados estructuralmente por tres elementos solamente: el carbono, el hidrógeno y, por último, el oxígeno.
Glucósidos	Son moléculas compuestas por un glúcido y un compuesto no glúcido. Los glucósidos desempeñan numerosos papeles importantes en los organismos vivos. Se hidrolizan en presencia de agua y una enzima, generando azúcares importantes en el metabolismo.
Proteínas	Son necesarias para la vida, sobre todo por su función plástica (constituyen el 80 % del protoplasma deshidratado de toda célula), pero también por sus funciones biorreguladoras (forman parte de las enzimas) y de defensa (los anticuerpos son proteínas)
Antraquinonas	Son quinonas tricíclicas derivadas del antraceno que a menudo contienen uno o más grupos hidroxilo.
Antocianinas	Son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos.
Leucoantocianinas	Son compuestos químicos incoloros relacionados con antocianidinas y antocianinas. Leucoantocianinas se pueden encontrar en <i>Anadenanthera</i> peregrina y en varias especies de <i>Nepenthes</i>
Compuestos fenólicos	Son compuestos orgánicos en cuyas estructuras moleculares contienen al

	menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a lo menos a un grupo hidroxilo
--	---

2.4. Importancia de las actinobacterias en biotecnología

Los actinomicetos o actinobacterias son la principal fuente bacteriana de metabolitos secundarios, siendo el género *Streptomyces* uno de los más importantes productores. Participan activamente en la descomposición de la materia orgánica de los suelos. La importancia de estas bacterias radica en que algunas especies producen metabolitos bioactivos empleados en el tratamiento de enfermedades provocadas por microorganismos patógenos, debido a que la mayor parte de los antibióticos usados actualmente en medicina provienen de este género.¹⁸ Son el principal grupo de organismos productores de metabolitos, con el género *Streptomyces* a la cabeza y detrás especies de los géneros *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* y *Streptosporangium*.^{3,4}

Las Actinobacterias o actinomicetos es un grupo de bacterias de distribución mundial y muy abundantes en suelos, sobre o dentro de los animales, en ambientes acuáticos dulceacuícolas y marinos y en prácticamente cualquier superficie natural.

Las características más relevantes de la clase *Actinobacteria* son:

- Es el segundo grupo principal de las bacterias gram positivas
- Tienen un alto contenido de guanina y citosina
- Contiene más de 30 familias
- Su morfología es de bacilos y filamentosas
- Son principalmente aerobias, pero algunos tales como *Actinomyces israelii* pueden crecer bajo condiciones anaerobias
- Algunas especies son capaces de producir esporas
- El filo *Actinobacteria* es conocido por las sustancias químicas que son capaces de producir algunas de sus especies, las cuales han sido explotadas por las industrias farmacéuticas para la producción de medicamentos.²⁴

Las actinobacterias forman un grupo de microorganismos morfológicamente muy heterogéneo. Muchos de ellos forman filamentos ramificados o hifas y esporas asexuales. Se pueden encontrar organismos que forman micelio ramificado y bien diferenciado como es el caso del género *Streptomyces*, otros que poseen hifas que se pueden fragmentar, como es el caso del género *Nocardia*; además varios géneros como *Gordonia* y *Mycobacterium* que poseen formas cocobacilares.²⁵

2.4.1. Género *Gordonia*

Este género fue propuesto originariamente por Tsukamura en 1971⁵ para algunos actinomicetos débilmente ácido-alcohol resistente, aislados del suelo y de esputos de pacientes con enfermedades pulmonares. Las tres especies originales *G. bronchialis*, *G. rubropertincta* y *G. terrae* fueron transferidas en 1977 por Goodfellow y Alderson⁶ al género *Rhodococcus* desapareciendo

como tal el género *Gordonia*. Actualmente existen 19 especies de *Gordonia* válidamente descritas y al menos dos en proceso de clasificación.⁷

El género incluye pequeños bacilos y formas cocáceas, pueden formar hifas con ramificaciones en ángulo recto, son aerobios, Gram positivos o Gram-variable, catalasa positivos y normalmente parcialmente ácido-alcohol resistentes. Forman colonias marronáceas, rosas, naranjas o rojas cuyas células se encuentran en algunos casos formando agregados. La pared celular contiene ácido diaminopimérico y los azúcares mayoritarios son galactosa y arabinosa. Poseen ácidos micólicos de 48-66 átomos de carbono. El género *Gordonia* ha sido considerado como patógeno oportunista aislado de esputos de pacientes con afecciones pulmonares como *G. sputi* y *G. bronchialis* o como productor de bacteremias.⁷

El género *Gordonia* se caracteriza por tener ácidos micólicos en su superficie celular, lo que les confiere alta hidrofobicidad. Esta hidrofobicidad unida al hecho de que muchas especies forman filamentos ramificados es la principal causa de la producción de espumas biológicas en depuradoras de aguas residuales en el proceso de depuración.^{26, 27}

El género *Gordonia* son de gran interés medioambiental y biotecnológico, así como candidato para el uso industrial, gracias a sus propiedades biodegradadoras, los cuales pueden degradar hidrocarburos, así como otros contaminantes tóxicos y compuestos naturales difíciles de eliminar. Igualmente, su potencial metabólico y la tipología de las moléculas que puede sintetizar, lo hace un buen candidato de interés industrial.²⁷

Estos compuestos incluyen L- elisina, gordonina (péptido glicosilado), biosurfactantes tales como glucolípidos, lipopéptidos, y compuestos poliméricos de alto peso molecular, tales como polisacáridos como el gordonan, lipoproteínas y lipopolisacáridos. Producen colonias con la pigmentación de color rojizo, lo que indica su capacidad para sintetizar cantidades significativas de los carotenoides así como aminoácidos aplicables para fines farmacéuticos como el imidazol-2-il.²⁸

3. OBJETIVOS.

3.1. OBJETIVO GENERAL.

Validación de la técnica DPPH-CLAR como método para evaluar la actividad antioxidante de metabolitos secundarios lipofílicos de *Gordonia* sp.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Crecimiento y fermentación de *Gordonia* sp. en medio GYEA
- Extraer los metabolitos secundarios lipofílicos de *Gordonia* sp.
- Análisis de los metabolitos secundarios lipofílicos de *Gordonia* sp.
- Analizar la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios lipofílicos de *Gordonia* sp. mediante la técnica de DPPH-CLAR.

4. METODOLOGÍA.

4.1. Crecimiento de *Gordonia* sp. por fermentación en medio GYEA

El crecimiento se llevó 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 incubaron aeróbicamente durante 10 días a 30°C.²⁹

En matraces Erlenmeyer, conteniendo el medio líquido GYEA (glucosa 10 g/L, extracto de levadura 10 g/L), se inocularon con la cepa de *Gordonia* sp. (Con crecimiento o desarrollo en placas de agar por 10 días). Se colocaron en el agitador rotatorio a una temperatura de 28-30°C a 150 rpm, por 6 días. El medio se centrifugó a 3600 rpm por 15 minutos, para separar la biomasa y esta fue liofilizada.³⁰

4.2. Extracción selectiva de metabolitos secundarios lipofílicos.

Se pesó 1 g de la biomasa liofilizada en un tubo de centrifuga de 20 mL. Los extractos lipofílicos se obtuvieron extrayendo primero con hexano (Ext. 1) y posteriormente con éter isopropílico (Ext. 2).

4.3. Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios mediante CCF y DPPH-CCF

4.3.1. Cromatografía de capa fina (CCF)

Se prepararon cámaras de elución con las siguientes fases móviles, hexano:acetato de etilo (95:5) y éter de petróleo: acetona:trietilamina (80:15:5). En ellas se colocaron las cromatoplasmas con los extractos 1 y 2 obtenidos. Las cromatoplasmas se revelaron con la lámpara UV.

4.3.2. DPPH-CCF

Se preparó la solución de DPPH (60 mg/mL) en metanol. En la cromatoplasma se aplicaron los extractos 1 y 2 se eluyen en las fases móviles anteriores se seca la placa y se le adiciona la solución de DPPH hasta cubrirla. Se colocan las placas en la estufa a 36°C por 30 minutos, los compuestos que ejercen actividad antioxidante deberán observarse como puntos amarillos en un fondo morado.

4.3.3. Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios mediante screening de metabolitos secundarios

A los extractos 1 y 2 se les realizó el análisis de los metabolitos secundarios lipofílicos usando protocolos estandarizados para la determinación de compuestos hidrofílicos,³¹ los cuales se encuentran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Pruebas para el análisis preliminar de metabolitos secundarios^{32, 33}

Metabolitos	Prueba	Observación
Taninos (Prueba de Brayme)	2mL extracto + 2mL H ₂ O + 2-3 gotas FeCl ₃ (5%)	Precipitado verde
Flavonoides	1 mL extracto + 1 mL Pb (OAc) ₄ (10%)	Coloración amarilla
Terpenoides	2 mL extracto + 2 mL (CH ₃ CO) ₂ O + 2-3 gotas H ₂ SO ₄ conc.	Coloración rojo oscuro
Saponinas (Prueba de espuma)	(a) 5 mL extracto + 5 mL H ₂ O + calor (b) 5 mL extracto + aceite de oliva	Aparece espuma

	(pocas gotas)	Formación de emulsión
Esteroides (Prueba de Salkowski)	2 mL extracto + 2 mL CHCl ₃ + H ₂ SO ₄ (conc.)	Anillo marrón rojizo en el cruce
Pholobatannis (Prueba de precipitación)	2 mL extracto + 2 mL HCl (1%) + calor	Precipitado rojo
Carbohidratos (Prueba de Molisch)	2 mL extracto + 10 mL H ₂ O + 2 gotas alfa-naftol etanólico (20%) + 2 mL H ₂ SO ₄ (conc.)	Anillo violeta rojizo en el cruce
Glucósidos (Prueba de Liebermann)	2 mL extracto + 2 mL CHCl ₃ + 2 mL CH ₃ COOH	Coloración violeta a azul a verde
Cumarinas	2 mL extracto + 3 mL NaOH (10%)	Coloración amarilla
Alcaloides (Prueba de Hager)	2 mL extracto + algunas gotas de reactivo de hager	Precipitado amarillo
Proteínas (Prueba Xantoproteica)	1 mL extracto + 1 mL H ₂ SO ₄ (conc)	Precipitado blanco
Emodinas	2 mL extracto + 2 mL NH ₄ OH + 3 mL Benceno	Coloración roja
Antraquinonas (Prueba de Borntrager)	3 mL extracto + 3 mL benceno + 5 mL NH ₃ (10%)	Coloración rosa, violeta o roja en capa amónica
Antocianinas	2 mL extracto + 2 mL HCL (2N) + NH ₃	Color rojo rosado a violeta azulado
Leucoantocianinas vueltas	5 mL extracto + 5 mL alcohol lisoamílico	Capa orgánica en rojo
Compuesto fenólicos	0.5 g muestra + 10 mL agua destilada + 2 gotas FeCl ₃ (1%)	Coloración Negro-azulada, Negro-grisácea, Verde-azulado con precipitado

4.4. Caracterización de los extractos mediante CLAR

La caracterización se lleva a cabo con una columna Waters Symmetry C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 µm), variando proporciones de fase móvil, velocidad de flujo, volumen de inyección y longitudes de onda. Para su posible identificación, se prepararon estándares de lisina, ác. cumárico, flavona, ác. ferúlico, ác. clorogénico, narigina y se corrieron en el método una vez desarrollado.¹⁷

4.5. Prueba de actividad antioxidante por DPPH-CLAR

Una vez desarrollado el método el método por CLAR se preparó una solución de DPPH (40 µg/mL) en metanol y se mezcló con los extractos 1 y 2, la reacción se incubó a 36°C durante media hora, se preparó un blanco de DPPH, se determinó el porcentaje de DPPH consumido mediante la siguiente fórmula:

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

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 crudos. Se realizará una regresión Probit para determinar la Cl₅₀ de los extractos.^{17, 34}

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Crecimiento de *Gordonia* sp. por fermentación en medio GYEA

La cepa se inoculó en medio líquido GYEA donde se obtuvo un crecimiento adecuado; Estos medios se centrifugaron de tal manera que se obtuvo la biomasa, la cual se liofilizó, obteniéndose una cantidad de biomasa promedio de tres lotes de 3.25 ± 0.38 g.

5.2. Extracción selectiva de metabolitos secundarios lipofílicos

En las extracciones de hexano y éter isopropílico se obtuvieron una cantidad de extracto promedio de 0.77 g (Ext. 1) y 0.57 g (Ext. 2) respectivamente por gramo de biomasa. Observando que en la extracción con hexano es mayor, por lo tanto, hay una mayor selectividad para la extracción de metabolitos de origen lipofílico. En la imagen 1 se observan los extractos de la extracción con hexano (1) y de éter isopropílico (2).

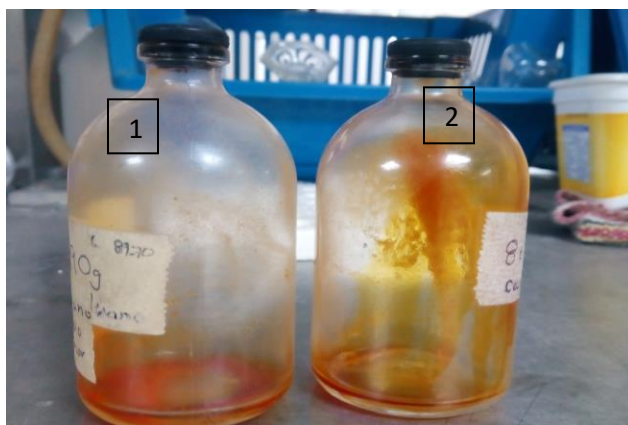


Imagen 1. Extractos (1) y (2)

5.3. Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios mediante CCF y DPPH-CCF de las extracciones con hexano y éter isopropílico

5.3.1. Cromatografía de capa fina (CCF)

Con los extractos 1 y 2 se realizaron pruebas, con dos fases móviles: hexano:acetato de etilo (95:5) y con éter de petróleo:acetona:trietilamina (80:15:5). Para observar en qué fase móvil se obtiene mejor separación de los metabolitos extraídos. En la Imagen 2 se muestran las cromatoplasmas con las diferentes fases móviles y extractos así como en el Cuadro 3 los valores de RF de los compuestos observados en cada cromatoplasma. Donde hay un mayor número de metabolitos es en el Ext. 1 con la fase móvil de hexano:acetato de etilo, sin embargo en el Ext. 2 en ambas fases móviles se observó solo un metabolito que de acuerdo a su $RF=0.6$ se puede tratar del mismo compuesto.

Cuadro 3. Valores de RF de los compuestos en la cromatografía de capa fina (CCF)

Punto	hexano: acetato de etilo (95:5)		éter de petróleo:acetona:trietilamina (80:15:5)	
	Ext. 1	Ext. 2	Ext. 1	Ext. 2
a)	0.1	0.6	0.3	0.6
b)	0.4	-	-	-
c)	0.5	-	0.5	-
d)	0.6	-	0.6	-
e)	0.7	-	-	-

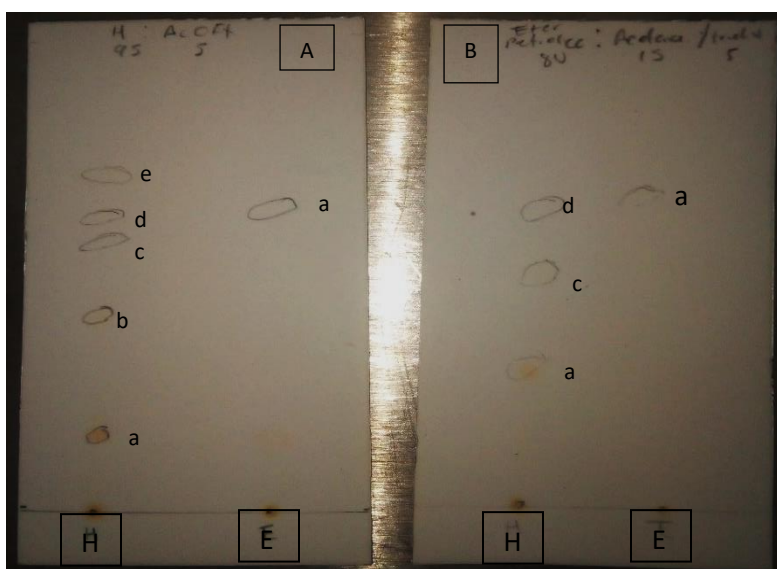


Imagen 2. Cromatoplasmas reveladas con lámpara de UV. (A) hexano: acetato de etilo (95:5) y (B) éter de petróleo: acetona: trietilamina (80:15:5), H: Ext. 1, E: Ext. 2.

Observando las cromatoplasmas y el Cuadro anterior, podemos determinar en el caso del Ext. 1 una mejor separación con la fase móvil de hexano: acetato de etilo. En lo que respecta a la fase móvil de éter de petróleo: acetona: trietilamina, se nota que probablemente en las manchas con RF de 0.5 y 0.6 pudieron haber coeluido algunos de los metabolitos observados con la fase móvil de hexano: acetato de etilo.

5.3.2. DPPH-CCF (Prueba de solución DPPH (60mg/mL).

En la Imagen 3 se muestra la cromatoplasma con los extractos 1 y 2 con el radical DPPH eluidas con hexano: acetato de etilo (95:5) observándose tres compuestos con actividad antioxidante con mediana y baja polaridad para el extracto 1 y para el extracto 2 se ve solo un compuesto que es similar su RF al observado en el extracto 1, pudiendo ser el mismo metabolito.

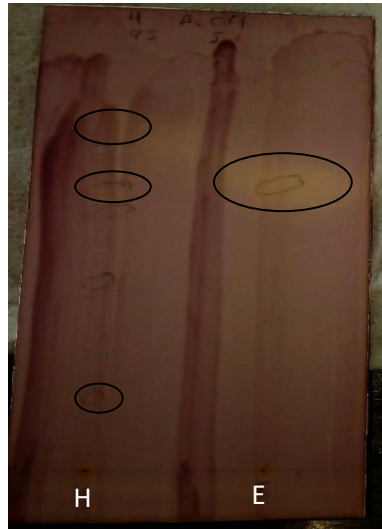


Imagen 3. Cromatopla de los extractos 1 (H) y 2 (E) con el radical DPPH

5.3.3. Caracterización preliminar de los metabolitos secundarios mediante screening de metabolitos secundarios

En el Cuadro 4 se muestran los resultados obtenidos del screening de metabolitos secundarios. Donde se observaron un mayor número de metabolitos en el extracto 1 a comparación del extracto 2. Cabe notar que, en la detección de flavonoides, esteroides y emodinas la coloración fue mucho más intensa en el extracto 1, por lo tanto, se podría decir que se encuentran en mayor cantidad. Siendo consistente con la cromatopla anterior en donde se observan más compuestos con potencial actividad antioxidante en el extracto 1. Por lo tanto, el hexano extrajo un mayor número de metabolitos secundarios con actividad antioxidante.

Cuadro 4. Resultados del screening de metabolitos secundarios

Prueba	Extracto 1	Extracto 2
1 Taninos (prueba de brayme)	+	+
2 Flavonoides	+	+
3 Terpenoides	+	+
4 Saponinas	+	-
5 Esteroides	+	+
6 Pholobatannis	-	-
7 Carbohidratos	+	-
8 Glucósidos	-	-
9 Cumarinas	+	+

10 Alcaloides	+	+
11 Proteínas	+	+
12 Emodinas	+	+

5.4. Desarrollo del método para la caracterización de los extractos 1 Y 2 por CLAR

5.4.1. Pruebas preliminares (método CCF)

Debido a que se obtuvieron metabolitos de naturaleza lipofílica se utilizó una fase móvil de mediana a alta polaridad, donde de acuerdo con la literatura las fases móviles adecuadas para separar metabolitos lipofílicos son acetonitrilo: agua, acetonitrilo: metanol y n-propanol: agua.³⁵⁻³⁸ Las cuales se mezclaron en diferente proporción para obtener diferentes polaridades.

5.4.1.1. Fase móvil: acetonitrilo:agua

En la Imagen 4 se muestran las cromatoplasmas eluidas en las distintas proporciones de la fase móvil. En donde podemos observar que en el caso del extracto 2 se observa una mejor separación de metabolitos en la proporción de fase móvil 70:30. En lo que respecta al extracto 1 no se observa separación de metabolitos en ninguna de las fases probadas.

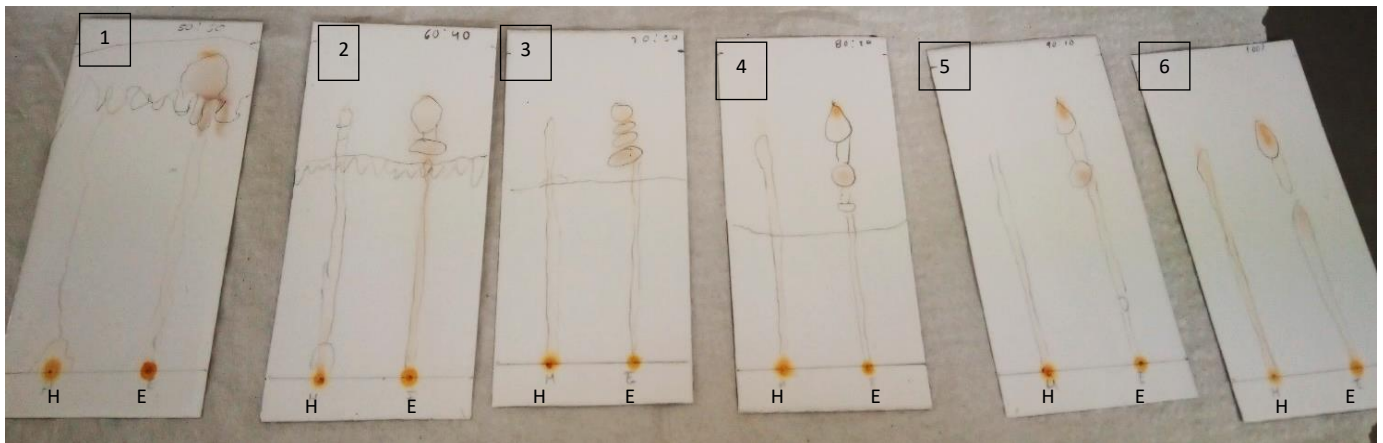


Imagen 4. Cromatoplasmas en fase móvil acetonitrilo: agua (1) 50%:50%, (2) 60%:40%, (3) 70%:30%, (4) 80%:20%, (5) 90%:10% y (6) Acetonitrilo 100%. Donde H: extracto 1 y E: extracto 2

5.4.1.2 Fase móvil: acetonitrilo:metanol

En la Imagen 5 se muestran las cromatoplasmas eluidas en las distintas proporciones de la fase móvil. En donde podemos observar que en el caso del extracto 2 se observa una mejor separación de metabolitos conforme incrementa la cantidad de acetonitrilo, sin embargo la separación no es tan buena como en la fase móvil acetonitrilo:agua. En lo que respecta al extracto 1 se observó un comportamiento similar a la fase móvil anterior.

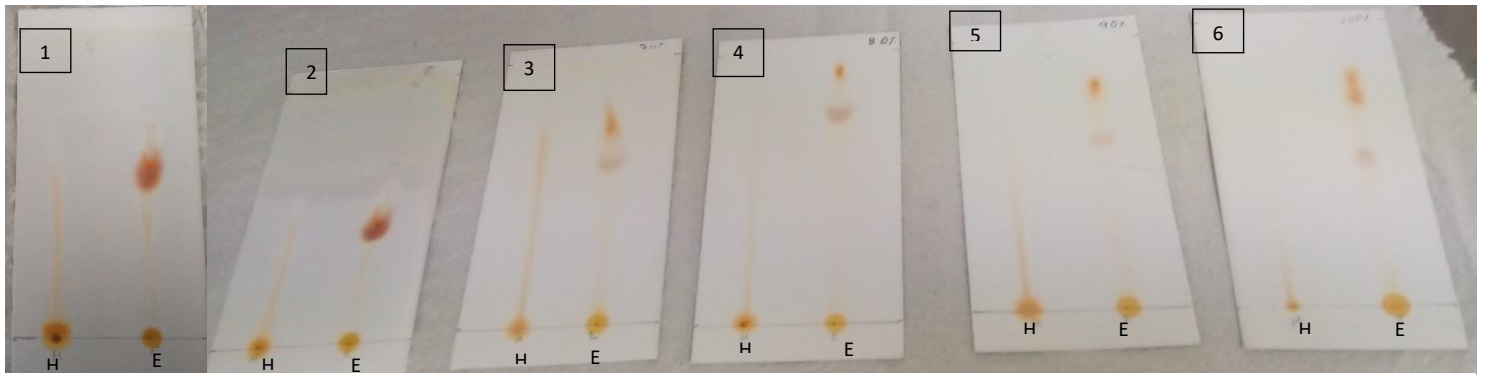


Imagen 5. Cromatoplas en fase móvil acetonitrilo: metanol (1) 50%:50%, (2) 60%:40%, (3) 70%:30%, (4) 80%:20%, (5) 90%:10% y (6) Acetonitrilo 100%. Donde H: extracto 1 y E: extracto 2

5.4.1.3. Fase móvil: n-propanol:agua

En la Imagen 6 se muestran las cromatoplas eluidas en las distintas proporciones de la fase móvil. En donde podemos observar que en esta fase se logró una separación de metabolitos en el extracto 1 comparado con el extracto 2.

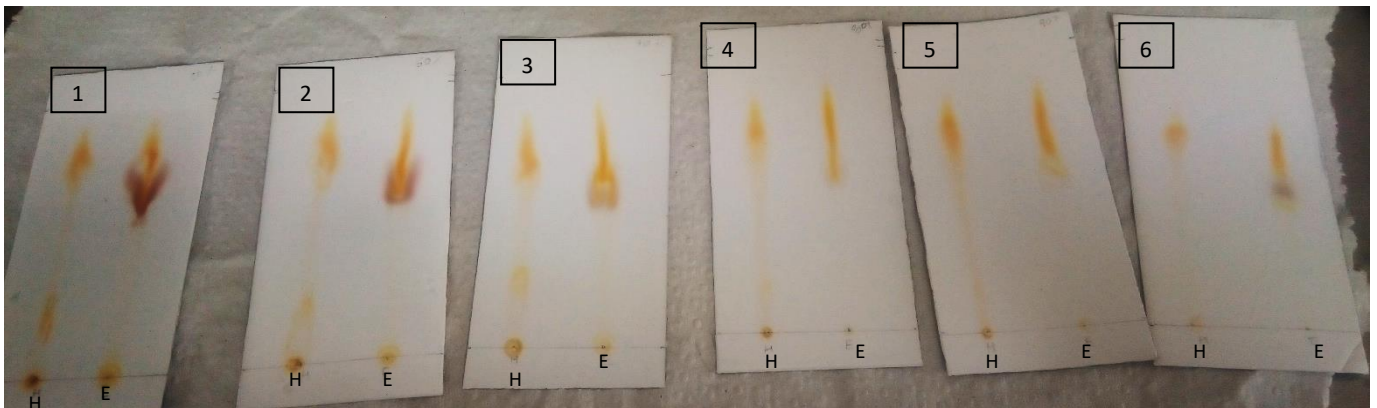


Imagen 6. Cromatoplas en fase móvil n-propanol: agua (1) 50%:50%, (2) 60%:40%, (3) 70%:30%, (4) 80%:20%, (5) 90%:10% y (6) Acetonitrilo 100%. Donde H: extracto 1 y E: extracto 2

5.4.2. Pruebas en CLAR

De acuerdo con los resultados preliminares de CCF se eligió la fase móvil de acetonitrilo:agua para iniciar las pruebas con CLAR, debido a que en esta fase se obtuvo una mejor separación de los compuestos en el extracto 2. En el Cuadro 5 se muestran las diferentes pruebas realizadas con modificaciones de proporción de la fase móvil, velocidad de flujo, volumen de inyección y longitudes de onda.

Cuadro 5. Pruebas con CLAR

Extractos	Columna	Flujo (mL/min)	Longitud de onda (nm)	Fase móvil		Volumen de inyección (ul)
1	Waters symmetry	0.3	210 218 220 275 300 450 517	ACN:H ₂ O (95:5)		80
				ACN:H ₂ O (80:20)		80
				ACN:H ₂ O (20:80)		50
				ACN:H ₂ O (95:5)		50
		0.5		ACN:H ₂ O (70:30)		80
						50
						20
				ACN:H ₂ O (50:50)		50
				ACN:H ₂ O (95:5)		50
				ACN:H ₂ O (70:30)		80
		0.8				50
				ACN:H ₂ O (2:98)		20
		2		Waters symmetry	0.3	210 218 220 275 300 450 517
ACN:H ₂ O (80:20)			80			
ACN:H ₂ O (70:30)			80			
			50			
0.5			20			
	ACN:H ₂ O (50:50)		50			
	ACN:H ₂ O (70:30)		80			
			50			
0.8	ACN:H ₂ O (40:60)		50			
	Gradiente		20			
	0.5		0.8			
					ACN:H ₂ O (20:80)	

		Gradiente			ACN:H ₂ O (10:90)	ACN:H ₂ O (60:40)	20
		0.5	0.8				
		Gradiente			ACN:H ₂ O (5:95)	ACN:H ₂ O (70:30)	
		0.5	0.8				
		Gradiente			ACN:H ₂ O (2:98)	ACN:H ₂ O (80:20)	
		0.5	0.8				

En donde las mejores condiciones para la separación de metabolitos del extracto 1 fue con una fase móvil acetonitrilo:agua (2:98) a un flujo de 1.2 mL/min con un volumen de inyección de 20 µL y una detección a 210 nm (Imagen 7) en donde se observan 5 señales con tiempos de retención de: 0.591, 0.703, 1.418, 1.575 y 6.013 minutos.

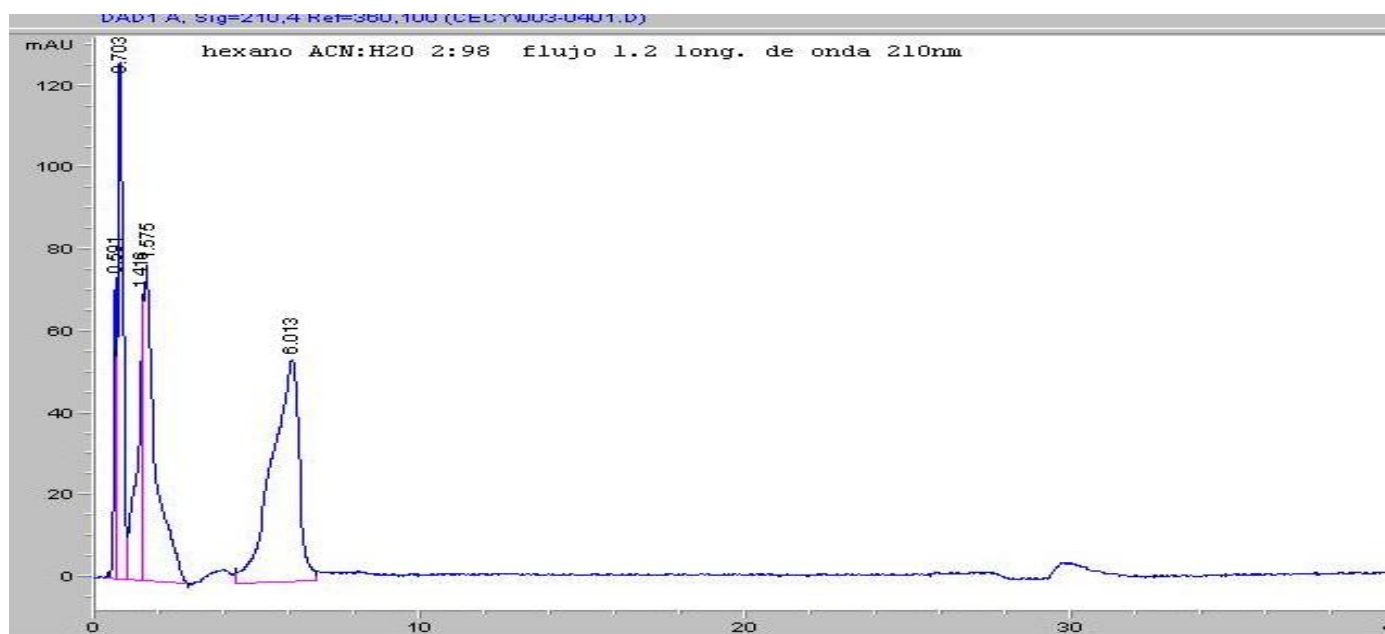


Imagen 7. Cromatografía del extracto 1 a una longitud de onda de 210 nm

En lo que respecta al extracto 2, las mejores condiciones para separar los metabolitos presentes fue utilizando una fase móvil inicial de acetonitrilo:agua (2:98) a un flujo de 0.5 mL/min con una elución en gradiente a acetonitrilo:agua (80:20) a un flujo de 0.8 mL/min, 20 µL de inyección y detección a 210 nm (Imagen 8) observándose señales a los 1.431, 1.656, 1.824, 2.617, 3.099, 3.540 y 39.398 minutos.

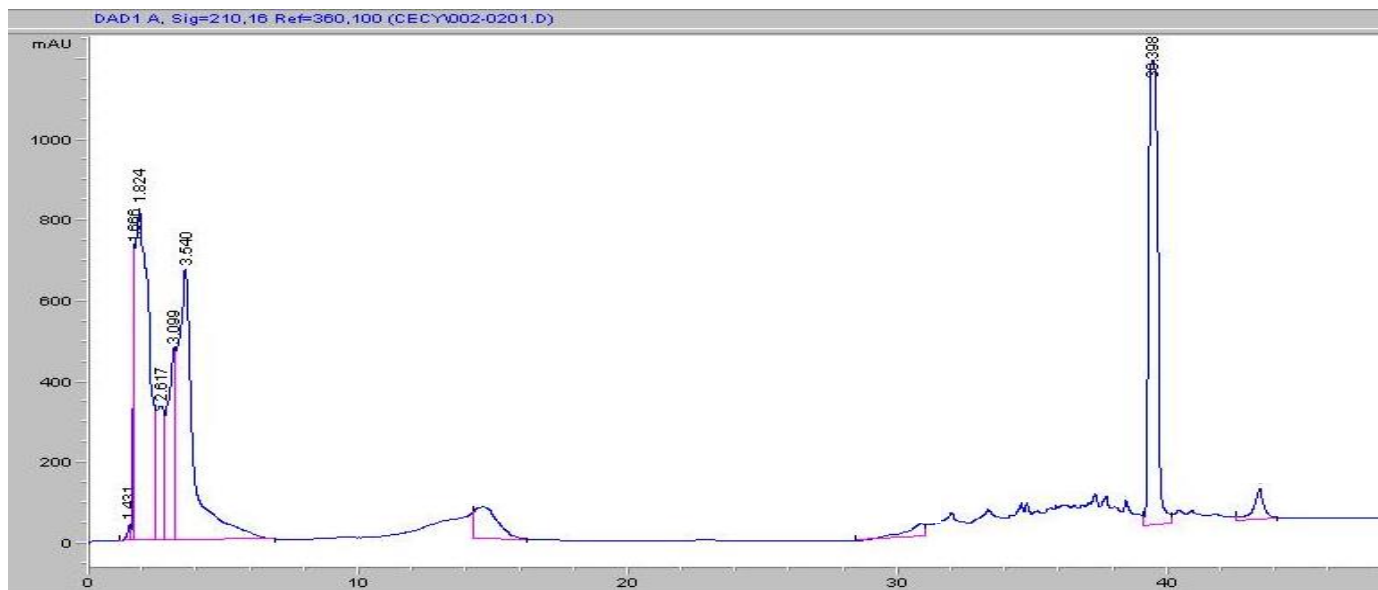


Imagen 8. Cromatografía del extracto 2 a una longitud de onda de 210 nm

5.4.2.1. Comparación de los estándares con el extracto 1

Con el método desarrollado para el extracto 1 se halló que casi todos los estándares (ácido cumárico, naringina, ácido ferúlico, flavona) eluían demasiado rápido para poder realizar una posible identificación de metabolitos donde se pudo hallar que el estándar de lisina se retenía durante el primer minuto de la corrida observándose un espectro similar con alguno de los metabolitos hallados en el extracto 1 (Imagen 9).

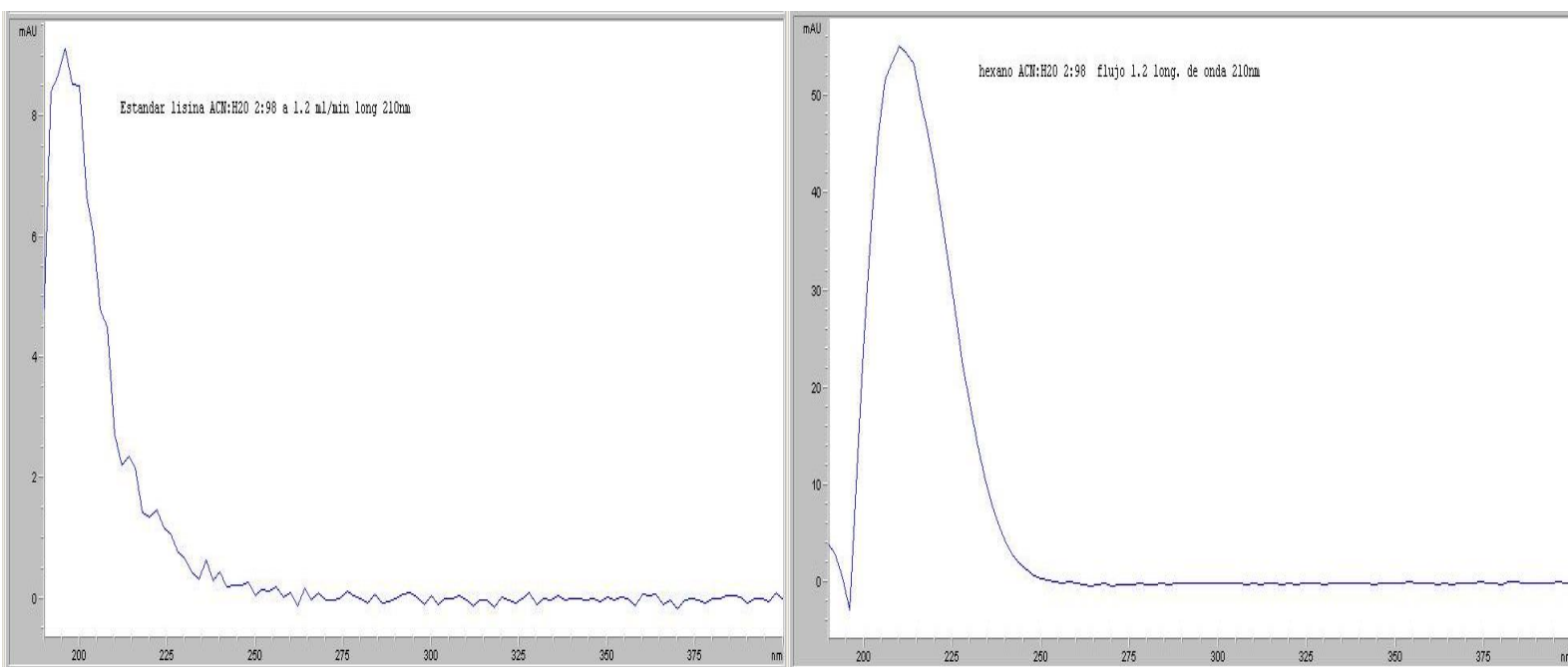


Imagen 9. Comparación de los espectros UV-vis del estándar de lisina y el extracto 1

5.4.2.2. Comparación de los estándares con el extracto 2

Con el método desarrollado para el extracto 2 se halló que casi todos los estándares eluían entre los 30 y los 40 minutos observando en el Cuadro 6 los tiempos de retención de dichos estándares.

Cuadro 6. Tiempos de retención de los estándares

Estándar	Tiempo de retención (min)
Ácido cumárico	30.639
Naringina	31.666
Ácido ferúlico	33.449
Flavona	36.662

En la imagen 10 se muestra la comparación de los espectros UV-vis de la muestra de ác. cumárico y de la señal del extracto 2 a los 39.398 minutos. Observándose que el ácido cumárico presenta 3 máximos de absorción (200, 225 y 275 nm) mientras que el metabolito del extracto 2 se observan 2 máximos de absorción (215 y 275 nm) con un ligero hombro cercano a los 200 nm. Por lo que se puede decir que no está este compuesto en el extracto 2.

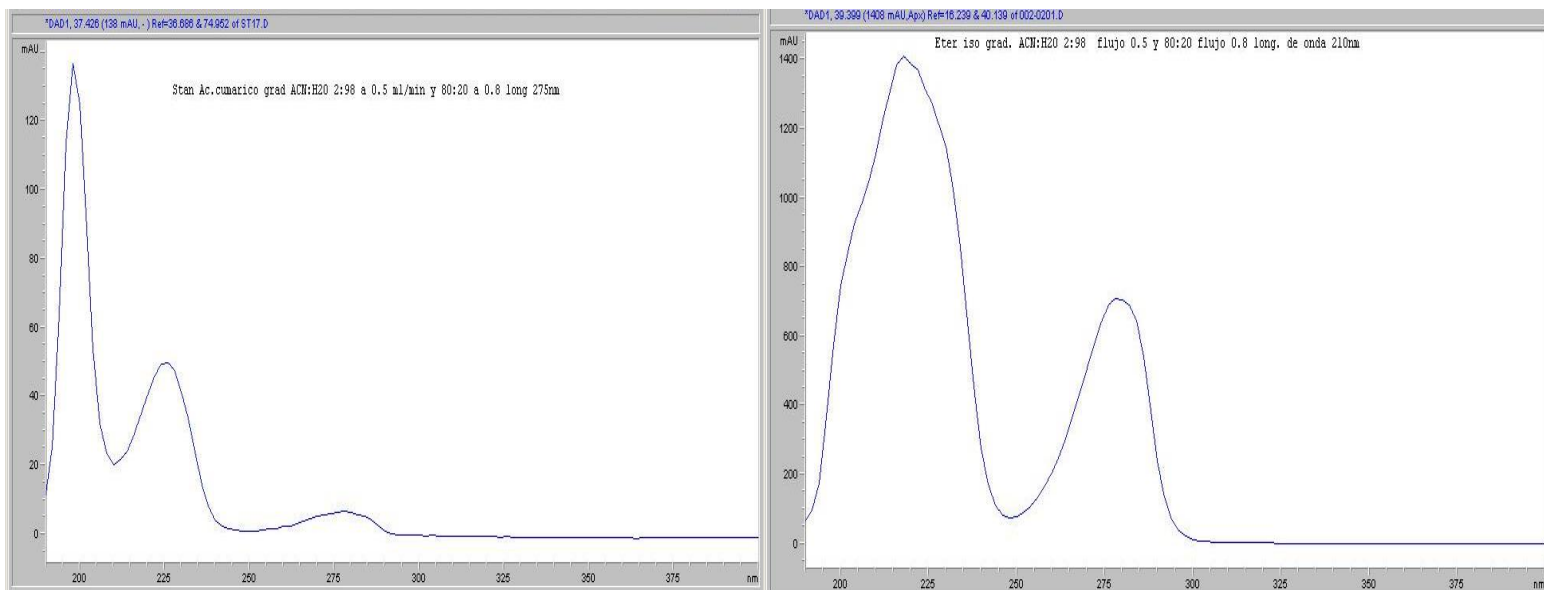


Imagen 10. Comparación de los espectros UV-vis del estándar de ác. cumarico y el extracto 2

En la imagen 11 se muestra la comparación de los espectros UV-vis del estándar de naringina y del extracto 2 a los 39.398 minutos. Observándose que la naringina presenta 2 máximos de absorción (220 y 285 nm) con un ligero hombro cercano a los 200 nm. Comparando el espectro de la señal de 39.398 minutos de la Imagen anterior se observa un comportamiento muy similar; el cual podríamos decir que este metabolito es un posible análogo de naringina ya que las absorciones pueden variar, siendo este comportamiento típico de flavonas y flavonoides.³⁹ Por lo tanto se

puede decir que se trata de un análogo de naringina con una cadena alifática en uno de los extremos de la molécula debido al tiempo de retención. Siendo consistente con los resultados del screening metabólico del extracto 2 en el que se determinó presencia de flavonoides (Cuadro 4).

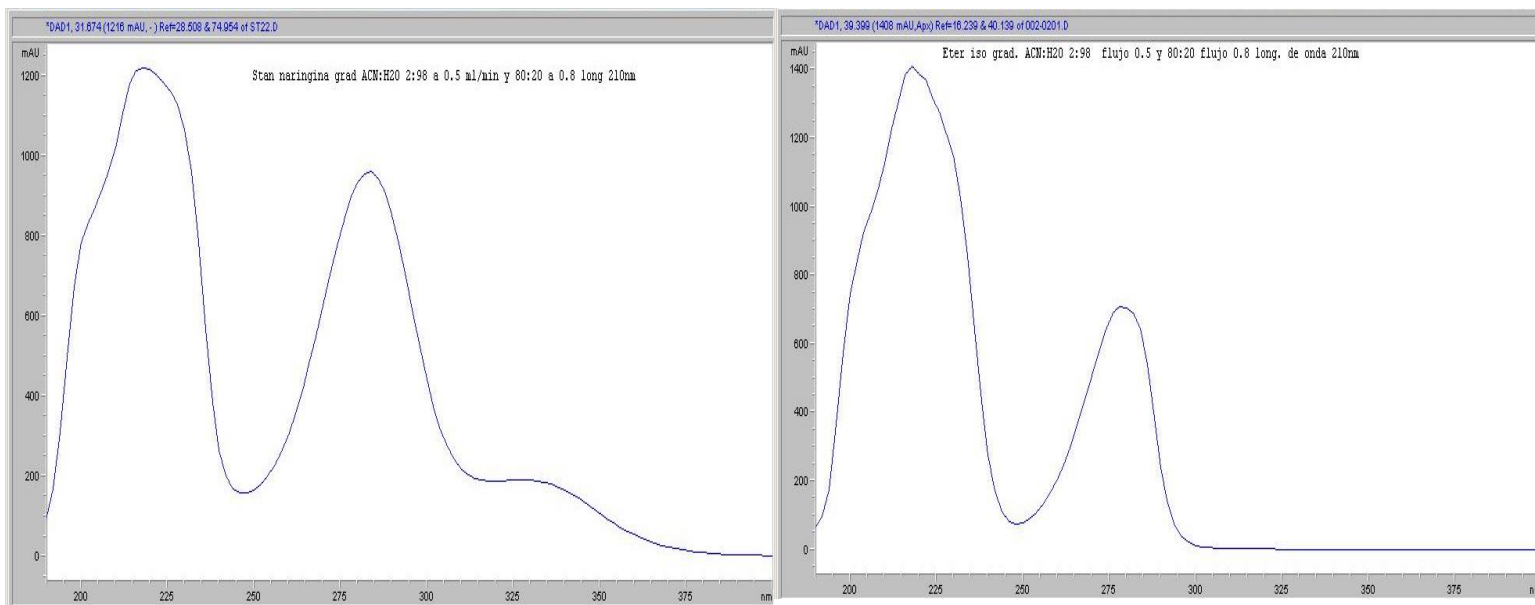


Imagen 11. Comparación de los espectros UV-vis del estándar de naringina y el extracto 2

En la Imagen 12 se muestra la comparación de los espectros UV-vis de la muestra de ácido ferúlico y de la señal del extracto 2 a los 39.398 minutos. Observándose que el ácido ferúlico presenta 3 máximos de absorción (205, 235 y 285 nm) mientras que el metabolito del extracto 2 se observan 2 máximos de absorción (215 y 275 nm) con un ligero hombro cercano a los 200 nm. Por lo que se puede decir que no está este compuesto en el extracto 2.

En la Imagen 13 se muestra la comparación de los espectros UV-vis de la muestra de flavona y de la señal del extracto 2 a los 39.398 minutos. Observándose que la flavona presenta 3 máximos de absorción (200, 250 y 300 nm) mientras que el metabolito del extracto 2 se observan 2 máximos de absorción (215 y 275 nm) con un ligero hombro cercano a los 200 nm. Por lo que se puede decir que no está este compuesto en el extracto 2.

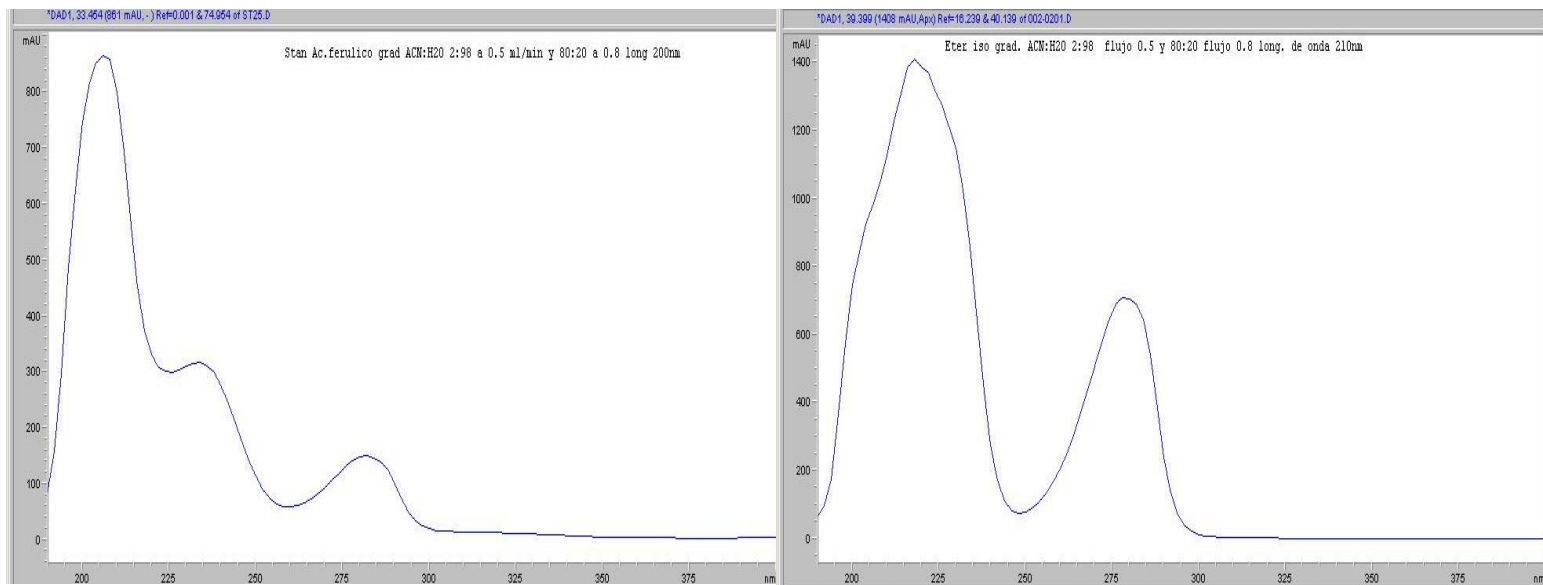


Imagen 12. Comparación de los espectros UV-vis del estándar de ác. ferulico y el extracto 2

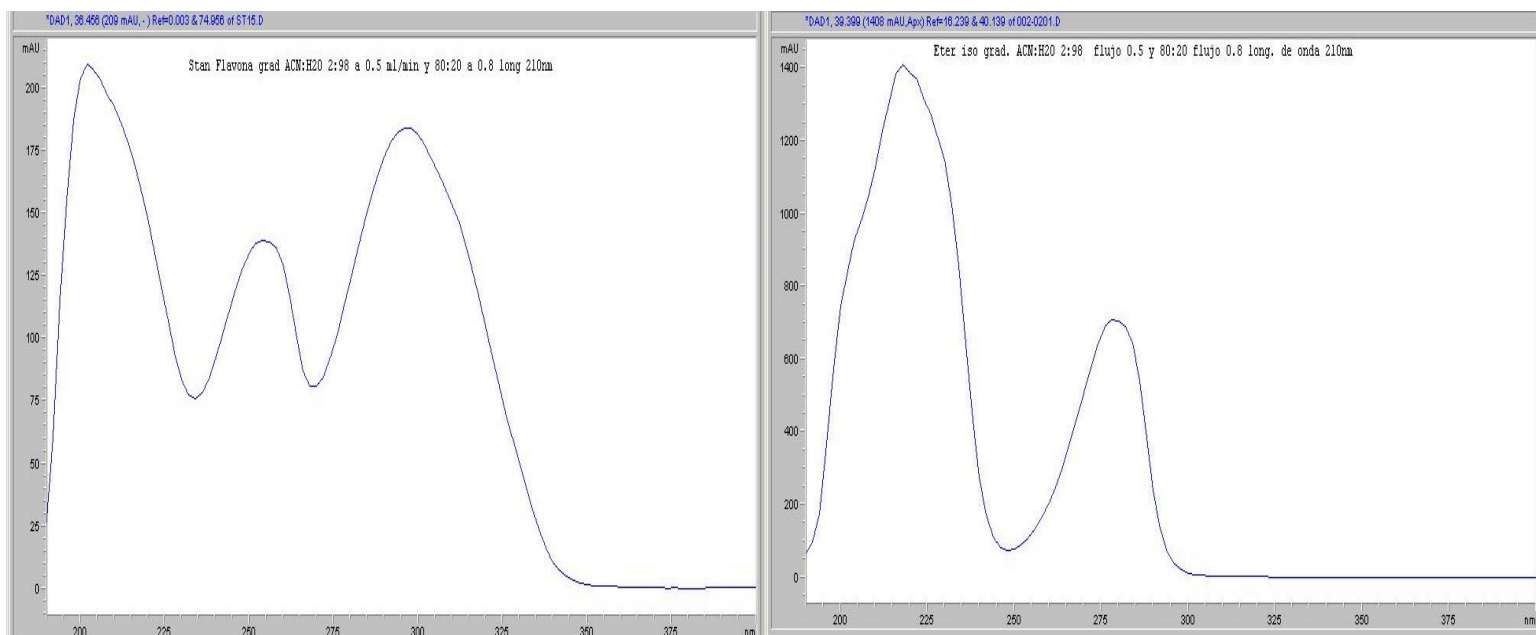


Imagen 13. Comparación de los espectros UV-vis del estándar de flavona y el extracto 2

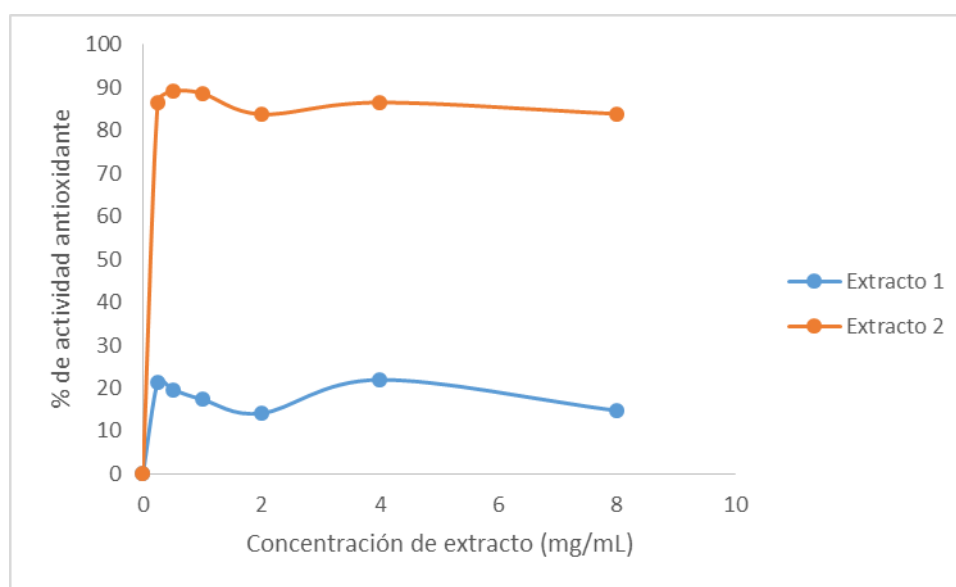
5.5. Medición de la actividad antioxidante de los extractos con la técnica de DPPH-CLAR

Una vez desarrollado el método por CLAR se preparó una solución de DPPH (40 µg/mL) en metanol y se mezcló con los extractos 1 Y 2, se determinó el porcentaje de DPPH. En el Cuadro 7 y Gráfica 1 se muestran los resultados de la actividad antioxidante.

Cuadro 7. Porcentajes de actividad antioxidante de los extractos

Concentración de los extractos (mg/mL)	Extracto 1(%)	Extracto 2 (%)
0.25	21.33±3.10	86.50±0.71
0.5	19.68±1.68	89.12±0.18
1	17.39±7.90	88.66±0.80
2	14.14±17.11	83.80±2.86
4	21.97±6.04	86.54±5.32
8	14.75±16.94	83.90±1.23

Gráfica 1. Porcentajes de actividad antioxidante



En el Cuadro 6 y Gráfica 1 se observa que el extracto 2 tiene mejor actividad antioxidante y menor variación que el extracto 1; en la Gráfica 1 se muestra que ambos extractos siguen un comportamiento similar en el que se llega a un máximo de actividad (21.97% y 89.12% para los extractos 1 y 2 respectivamente) y posteriormente se mantiene constante, pudiendo decir en base al máximo de dicha actividad que el extracto 2 es más eficaz que el extracto 1. Observando la Imagen 3 se destaca que el extracto 1 presenta tres compuestos con potencial antioxidante en CCF, mientras que en el extracto 2 nada más presentó un compuesto con potencial actividad. La menor actividad antioxidante en el extracto 1 puede deberse a que acorde con la literatura la mezcla de dos o más antioxidantes pueden llevar a un sinergismo o a un antagonismo en dicha actividad.⁴⁰

6. CONCLUSIONES

- Se obtuvo el crecimiento de *Gordonia* sp. en medio GYEA con un peso de biomasa promedio de 3.25 ± 0.38 g.

- Se obtuvo una mayor cantidad de metabolitos secundarios en el extracto 1 (hexano) comparado con el extracto 2 (éter isopropílico), 0.77 g y 0.57 g respectivamente por gramo de biomasa.
- Se determinó mediante CCF que el extracto 1 presenta 3 compuestos con actividad antioxidante, mientras que el extracto 2 tuvo un metabolito con dicha actividad.
- Entre los metabolitos extraídos que pueden observarse en las pruebas realizadas se encuentran en ambos extractos taninos, flavonoides, terpenoides, esteroides, cumarinas, alcaloides, proteínas y emodinas, mientras que solamente el extracto 1 presentó además de los metabolitos mencionados anteriormente saponinas y carbohidratos
- Se determinó que la mejor mezcla de disolventes para separar los metabolitos de ambos extractos por CLAR fue con acetonitrilo y agua. En donde el extracto 1 presentó un tiempo de retención y un espectro UV-vis similares con lisina, mientras que el extracto 2 un espectro parecido al de naringina, siendo probablemente un análogo de esta.
- Se determinó que el extracto 2 presentó una actividad antioxidante más eficaz (89.12% de actividad máxima), comparado con el extracto 1 (21.97% de actividad máxima) probablemente por un antagonismo entre los compuestos presentes en este extracto.

7. OBJETIVOS Y METAS ALCANZADOS

Dentro de los objetivos alcanzados en el presente proyecto se logró el crecimiento y la fermentación de *Gordonia* sp. en medio GYEA obteniéndose una biomasa promedio de 3.25 ± 0.38 g a partir de la cual se realizó exitosamente la extracción de los metabolitos lipofílicos de *Gordonia* sp. Determinándose mediante el screening metabólico presencia de diversos compuestos con actividad antioxidante para el cual el análisis por CLAR permitió determinar que en el extracto 1 (hexano) se encuentra un compuesto similar a la lisina, mientras que el extracto 2 (éter isopropílico) se halló un posible análogo de naringina, llevándose a cabo el análisis de los metabolitos secundarios lipofílicos de la cepa en estudio. Una vez desarrollado el método de CLAR se llevó a cabo de manera preliminar la actividad antioxidante de los metabolitos lipofílicos demostrándose que el extracto 2 presenta mayor eficacia en dicha actividad cumpliendo el objetivo de analizar la actividad antioxidante de dichos metabolitos. Se concluye que un 85% del proyecto se llevó a cabo.

En lo que respecta al 15% restante el cual era la validación del método de DPPH-CLAR para la actividad antioxidante de metabolitos lipofílicos, no se pudo llevar a cabo debido a complicaciones técnicas con el crecimiento de la cepa (principalmente contaminación) así como en el desarrollo de los métodos analíticos por CLAR. Sin embargo, los análisis de actividad antioxidante llevados a cabo en esta investigación nos proporcionan un primer acercamiento hacia el desarrollo de un método de actividad antioxidante utilizando el radical DPPH usando la técnica de CLAR.

Cabe destacar que el proyecto se expuso en modalidad cartel en el 6° Simposio Iberoamericano de Farmacia Social que se llevó a cabo en esta casa de estudios el 3 y 4 de octubre del año en curso con el título “Caracterización preliminar de metabolitos secundarios hidrofóbicos con actividad antioxidante de *Gordonia* sp.” ganando el 1° lugar en la categoría de Productos Naturales.

8. RECOMENDACIONES

- Se recomienda optimizar el método de análisis por CLAR para el extracto de hexano para llevar a cabo una mejor asignación con los estándares utilizados en el presente proyecto.
- Al identificar en el extracto de éter isopropílico un posible análogo de naringina, se recomienda desarrollar y validar el método de cuantificación de flavonoides presentes en este extracto y la actividad antioxidante de DPPH-CLAR usando los demás estándares para evaluar parámetros de especificidad y comparación de la actividad de los estándares contra el extracto.
- Se recomienda profundizar la caracterización de ambos extractos con técnicas analíticas complementarias como espectrometría de masas por ionización por electrospray para lograr una elucidación estructural completa de los metabolitos lipofílicos presentes en *Gordonia* sp.

9. BIBLIOGRAFIA

¹ Coronado M., Vega León Rey Gutiérrez S., Vázquez M., Radilla C. 2015. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr*; 42(2): 206-212.

² Velez-Terranova M., Campos R., Sánchez-Guerrero H. 2014. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*; 17(3): 489-499.

³ Evangelizta Z., Quiñones E. E., Rincón G. 2017. Potencial biotecnológico de las actinobacterias aisladas de suelos de México como fuente natural de moléculas bioactivas: compuestos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas. *Temas de Ciencia y Tecnología*; 21(63): 39-51.

⁴ Fuertes C. M., Roque M., Tristan M. 2014. Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* c.p Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. *Ciencia e Investigación*; 1(2): 71-80.

⁵ Tsukamura M. 1982. Numerical analysis of the taxonomy of *Nocardiaceae* and *Rhodococci*. *Microbiol Inmunol*; 26: 1101-1119.

⁶ Goodfellow M., Minnikin D. E. 1977. Nocardioform bacteria. *Ann Rev Microbiol*; 31: 159-180.

⁷ Cuesta G. 2004. Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de mycolata formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos. Universidad politécnica de valencia departamento de biotecnología. Tesis. Universitat Politècnica de Valencia.

⁸ Kuskoski M., Asuero A. G., Troncoso A. M., Mancini-Filho J., Fett R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc Tecnol Aliment*; 25(4): 726-732.

⁹ Antioxidantes: definición, clasificación y conceptos generales. 2006. recuperado el 07 de enero de 2019:

<https://www.portalantioxidantes.com/antioxidantes/>

- ¹⁰ Avello M., Suwalsky M. 2006. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* (Concep); 494: 161-172.
- ¹¹ Zamora J. D. 2007. AntioxidantEs: micronutrientes en lucha por la salud. *Rev Chil Nutr*; 34(1): 17-26.
- ¹² Puchades Montesa M., González Rico M. A., Solís Salguero M. A., Torregrosa Maicas I., Tormos Muñoz M. C. Sáez Tormo G., Juan García I., Miguel Carrasco A. 2009. Study of oxidative stress in advance renal disease. *Nefrología*; 29(5): 464-473.
- ¹³ Jimenez Monreal A. M., Sanchez Manzanera M., Martinez Tomé M. 2012. Optimización del método captación del radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café. *Anales de Veterinaria de Murcia*; 28(2012): 67-78.
- ¹⁴ Huet Breña C. 2017. Métodos analíticos para la determinación de antioxidantes en muestras biológicas. Tesis. Universidad Complutense de Madrid.
- ¹⁵ Martinez Vasquez, J. 2007. Evaluación de la actividad antioxidante de extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*. Tesis. Universidad Tecnológica de la Mixteca.
- ¹⁶ Coba P., Mayacu Tivi L., Vidari G. 2010. Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*; 11(1): 22-30.
- ¹⁷ Guija-Poma, E., Inocente-Camones M. A., Ponce-Pardo J, Zarzosa-Norabuena E. 2015. Evaluación de la técnica 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz Med*; 15(1): 57-60.
- ¹⁸ Ortega Cabello L., Pérez Méndez H. I., Manjarrez Álvarez N., López-Luna A., Solís Oba A., Solís Oba M. 2016. Comparación de la actividad antioxidante de carotenoides en extractos crudos y pre-purificados de actinobacterias marinas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*; 47(2): 60-65.
- ¹⁹ Apak R., Özyürek M., Güçlü K., Çapanoğlu E. 2016. Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. *J Agric Food Chem*; 64: 997-1027.
- ²⁰ Shi S., Ma Y., Zhang Y., Liu L., Liu Q., Peng M., Xiong X. 2012. Systematic separation and purification of 18 antioxidants from *Pueraria lobata* flower using HSCC target-guided by DPPH-HPLC experiment. *Sep Purif Technol*; 89: 225-233.
- ²¹ Metabolismo secundario. Recuperado el 10 de enero de 2019:
<https://studylib.es/doc/5639078/metabolismo-secundario>
- ²² Sepulveda Jimenez G., Porta Ducoing H., Rocha Sosa M. 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana De Fitopatología*, 355.
- ²³ Gonzales, M. 2011. Metabolitos. Recuperado el 10 de enero de 2019:
<https://quimica.laguia2000.com/elementos-quimicos>
- ²⁴ Características actinobacterias. Recuperado el 10 de enero de 2019:

https://actinobacteriasblog.wordpress.com/inicio_actinobacterias/caracteristicas-actinobacterias/

²⁵ Betancur Jaramillo L. A. 2018. Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos. Tesis. Universidad Nacional de Colombia.

²⁶ González Villa, T. 2012. Microbiología industrial y biotecnología microbiana. Semáforo; 53: 29-60.

²⁷ Jiménez Galisteo M. G. 2015. Actividad formadora de canales transmembrana en la superficie de *Gordonia jacobaea*. Tesis. Universidad de Barcelona.

²⁸ Arenskötter M., Bröker D., Steinbüchel, A. 2004. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. Appl Environ Microbiol; 70(6): 3195-3204.

²⁹ Ortega Cabello L., Pérez Méndez H. I., Manjarrez Alvarez N., Solís Oba A., López-Luna A. 2017. Efecto de las sales de hierro en *Rhodococcus* sp. y *Gordonia* sp. en la producción de carotenoides. Revista Mexicana de Ingeniería Química; 16(1): 1-10.

³⁰ Baskar V., Madhanraj P., Kanimozhi K., Panneerselvam A. 2010. Characterization of carotenoids from *Streptomyces* sp. of marine and freshwater environment. Arch Appl Sci Res; 2(6): 380-388.

³¹ Pudi N., Varikuti G., Badana A. K., Gavara M., Kumari S. 2016. Studies on optimization of growth parameters for enhanced production of antibiotic alkaloids by isolated marine actinomycetes. J App Pharm Sci; 6(10): 181-188.

³² El mundo de las plantas. Recuperado el 30 de septiembre de 2018:

<https://fitopolis.wordpress.com/category/ensayos-fitoquimicos/>

³³ Yadav M., Chatterji S., Gupta S., Watal G. 2014. Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. Int J Pharm Pharm Sci; 6(5): 539-542.

³⁴ Uribe-Holguín C. 2010. Evaluación de la actividad antioxidante de las hojas de pentacalia corymbosa y pentacalia nítida. Tesis. Facultad Pontificia Universidad.

³⁵ Varas Pacheco, D. 2004. Analisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica HPLC. Tesis. Universidad Austral de Chile.

³⁶ Muñoz Valencia R. 2008. Desarrollo de métodos cromatográficos para la determinación de esteroides (corticoides y anabolizantes) en piensos y aguas de consumo animal. Tesis. Universidad Complutense de Madrid.

³⁷ Díaz Viciado R. E. 2007. Farmacología de terpenoides de *Helianthus annuus* L. Tesis. Real academia Nacional de Farmacia.

³⁸ Oliveros-Bastidas A., Codero I., Paredes D., Buendia D., Macías Domínguez F. A. 2011. Extracción y cuantificación de cumarina mediante HPLC-UV en extractos hidroetanólico de semillas de *Dipteryx odorata*. Rev Latinoam Quim; 39(1-2): 17-31.

³⁹ Tenorio Domínguez, M. 2016. Flavonoides extraídos de la cascara de naranja tangelo (*Citrus reticulata* x *Citrus paradisi*) y su aplicación como antioxidante natural en el aceite vegetal sachá inchi (*Plukenetia volubilis*). Scientia Agropecuaria; 7(4): 419-431.

⁴⁰ Rodríguez Perón J. M., Venereo Gutiérrez J. R., Acosta Cabrera E. B., Leyva Moreno U., Mora S. R. 2002. Presente y futuro de los antioxidantes en el tratamiento de la hipertensión arterial esencial. Rev Cub Med Mil; 31(4).