



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Identificación y caracterización de compuestos con
actividad antiglicación producidos por *Spingomonas* sp., una bacteria
endófito de *Piper auritum*”**

T E S I S

Que presenta

Lory Sthephany Rochín Hernández

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directores de la Tesis:

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera

Dr. Fernando Calzada Bermejo

Ciudad de México

Diciembre, 2017.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás Rodolfo y Gloria, por su apoyo incondicional, por ser mi guía a cada paso que doy y sobre todo por su comprensión y cariño.

A mi hermano Rody, por enseñarme que las cosas más difíciles son las que más valen la pena.

A mi gorgojo Jeny, porque sin duda alguna, cada minuto a tu lado desde nuestro nacimiento es una buena razón para agradecer. Porque simplemente tu existencia, compañía y apoyo es lo mejor que me pudo haber regalado la vida, mis papás y Dios.

Al Dr. Luis Bernardo Flores Cotera por abrirme las puertas de su laboratorio, por sus enseñanzas, pero sobre todo por contagiarme un poco de su pasión por la ciencia. Porque además del ámbito profesional es alguien a quien se llega a estimar y admirar como persona.

Al Dr. Calzada por su gran ayuda y colaboración en cada momento de consulta, porque su participación y apoyo fue indispensable para el desarrollo y culminación de este proyecto. Una vez me dijo que no es casualidad llegar a la vida de una persona y ahora entiendo que no, gracias por todo.

Al Q. Fernando Maldonado García por su apoyo técnico en la implementación de metodologías realizadas en el laboratorio. Mi queridísimo Sr. Fer, gracias por su apoyo, por creer en mí y principalmente por brindarme una de las amistades más lindas y sinceras.

Al Dr. Marsch, al Dr. Frédéric y a la Dra. Zoila por su ayuda en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Luc Dendooven y al Dr. Marco por el préstamo de sus equipos de laboratorio.

Al Sr. David, Sr. Alberto y al ingeniero Calixto por su amabilidad y apoyo en la Planta piloto.

Al Sr. Humberto y todos los del laboratorio 48 por los momentos que compartimos.

A mis compañeros de generación, pero principalmente a aquellos que se alojaron en un lugarcito importante en mi corazón: Perlita, Manuchi, Yisus y Sr. Leandro. Gracias por todos los momentos, risas, dramas, regaños, enojos, consejos y pláticas ñoñas que compartimos.

Gracias a todos aquellos que formaron parte de esta etapa y que pusieron su granito de arena para que esta etapa fuera aún más agradable. A los del tenis (Che, Luis, Edgar, Areli, Lau, etc.) los del fut (Vic), del soft (Lau, Ivansuki, Rem, etc.), al Sr. Vale, Sr. Luis, al Sr. Nassi, a Anita, etc.

A todos, ¡muchas gracias!

Agradezco al CONACYT por el apoyo económico otorgado a través de la beca
710433/5860112.



Con todo mi cariño, admiración y amor...
A mis 4 personas favoritas del universo galaxial:
mi papá Rodolfo, mi mamá Gloria, mi hermaní Rody
y obviamente a mi hermosa princesa Jeny.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Diabetes: una amenaza mundial	3
1.1.1. Complicaciones de la diabetes y su relación con la formación de AGEs	4
1.2. Compuestos con actividad antiAGEs	5
1.2.1. Compuestos sintéticos antiAGEs	5
1.2.2. Compuestos naturales antiAGEs	7
1.3. Bacterias endófitas como fuente potencial de compuestos con actividad biológica	8
1.3.1. <i>Sphingomonas</i> sp. 3a-1, una bacteria endófitas de <i>Piper auritum</i>	9
1.3.1.1. Género <i>Sphingomonas</i>	10
2. JUSTIFICACIÓN	13
3. HIPÓTESIS	14
4. OBJETIVOS	14
4.1. Objetivo general	14
4.2. Objetivos particulares	14
5. MATERIALES Y MÉTODOS	15
5.1. Desarrollo experimental	15
5.1.1. Cepa	16
5.2. MÉTODOS	16
5.2.1. Conservación de la cepa 3 a-1	16
5.2.1.1. Conservación de la bacteria en glicerol al 10 % a -80 °C	16
5.2.1.2. Conservación de la bacteria por liofilización	16
5.2.2. Identificación molecular de la cepa 3a-1 a partir del gen 16S rRNA	17
5.2.2.1. Extracción de DNA genómico	17
5.2.2.2. Amplificación del gen 16S rRNA	17
5.2.3. Obtención del extracto crudo de <i>Sphingomonas</i> sp. 3a-1	19
5.2.3.1. Reactivación y preparación del cultivo de <i>Sphingomonas</i> sp. 3a-1	19
5.2.3.2. Obtención del extracto crudo de acetato de etilo	19
5.2.3.3. Obtención del extracto crudo del medio sin fermentar (control negativo)	20
5.2.4. Evaluación de la inhibición de la formación de AGEs	20
5.2.5. Separación de bandas del extracto crudo por cromatografía en placa preparativa	22

5.2.5.1. Cromatografía en placa preparativa.....	22
5.2.5.2 Extracción de las bandas seleccionadas de las cromatoplasmas preparativas.....	22
5.2.6. Evaluación de la actividad antioxidante por decoloración de β -caroteno en placa.....	23
5.2.7. Obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C	23
5.2.8. Obtención de los espectros de infrarrojo	23
5.2.9. Obtención de los espectros de cromatografía de gases acoplado a masas	24
6. RESULTADOS	25
6.1. Identificación molecular de la cepa 3a-1 a partir del gen 16S rRNA.....	25
6.2. Obtención del extracto crudo de <i>Sphingomonas</i> sp. 3a-1.....	26
6.3. Obtención de las bandas con actividad antiAGEs extraídas de las cromatoplasmas preparativas	27
6.4. Actividad antioxidante de las bandas extraídas de las cromatoplasmas preparativas	28
6.5. Identificación de los compuestos presentes en las bandas extraídas de las cromatoplasmas preparativas	29
7. DISCUSIÓN.....	48
8. CONCLUSIONES.....	55
9. PERSPECTIVAS.....	56
10. BIBLIOGRAFÍA.....	57
11. ANEXOS.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Algunos compuestos sintéticos antiAGEs	6
.Tabla 2. Compuestos bioactivos producidos por <i>Sphingomonas</i> sp.....	12
Tabla 3. Condiciones para la amplificación del gen 16S rRNA por PCR para cada conjunto de cebadores	18
Tabla 4. Componentes de reacción para la prueba de inhibición de formación de AGEs.....	21
Tabla 5. Especies más cercanas a <i>Sphingomonas</i> sp. 3a-1	26
Tabla 6. Cantidad de extracto y actividad antiAGEs de los ocho lotes	26
Tabla 7. Compuestos identificados presentes en las bandas extraídas	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia experimental del proyecto.	15
Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de productos de PCR.	25
Figura 3. Comparación por TLC del control negativo y el extracto crudo.	27
Figura 4. Gráfica de actividad antiAGEs de las bandas extraídas de las cromatoplacas preparativas.	28
Figura 5. Evaluación de la actividad antioxidante de las bandas B0, B1 y B3.	29
Figura 6. Espectro de RMN de ¹ H de la banda B0.	30
Figura 7. Espectro de RMN de ¹³ C de la banda B0.	30
Figura 8. Espectro IR de la banda B0.	31
Figura 9. Espectro RMN ¹ H de la banda B1.	32
Figura 10. Espectro IR de la banda B1.	32
Figura 11. Espectro de RMN ¹ H de la banda B3.	33
Figura 12. Espectro de IR de la banda B3.	34
Figura 13. Espectro de masas de la cicloalanil-prolina.	36
Figura 14. Espectro de masas de la cicloprolin-prolina.	37
Figura 15. Espectro de masas de la ciclofenilalanil-prolina.	38
Figura 16. Espectro de masas de la ciclofenilalanil-valina.	39
Figura 17. Espectro de masas de la ciclofenilalanil-leucina.	39
Figura 18. Espectro de masas del ácido hexadecanoico.	40
Figura 19. Espectro de masas del ácido octadecanoico.	41
Figura 20. Espectro de masas del β-Sitosterol.	42
Figura 21. Espectro de masas de la tremulona.	42
Figura 22. Espectro de masas del 3-metil-undecano.	43
Figura 23. Espectro de masas del ácido vaccénico.	44
Figura 24. Espectro de masas del MEHP.	45
Figura 25. Espectro de masas del TBEP.	46
Figura 26. Espectro de masas del ciclobutano-1,1-dicarboxamida, N,N dibenzoiloxi.	46
Figura 27. Gráfico de la actividad antiAGEs de algunos compuestos encontrados.	47
Figura 28. Estructura de dicetopiperazinas con actividad antiglicémica.	49

ABREVIATURAS

AGEs	Productos finales de glicación avanzada, del inglés Advanced Glycation End products
AMD	Asociación Mexicana de Diabetes
% antiAGEs	Porcentaje de inhibición de la formación de AGEs
BLAST	Herramienta de búsqueda por alineación de secuencias, del inglés Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Albumina sérica bovina, del inglés Bovine Serum Albumine
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CN	Control negativo
DBB	Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV
DEHP	Ftalato di etil-hexilo, del inglés Di-ethyl,hexyl phthalate
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Radical 1,1 difenil-2-picrilhidrazil, del inglés 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
mg	Miligramo
GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a masas, del inglés Gas Chromatography Mass Spectrometry
Hex	Hexano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia, del inglés High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
IDF	Federación Internacional de la Diabetes, del inglés Intenational Diabetes Federation
IR	Infrarrojo
L	Litros
MEHP	Ftalato mono etil, hexilo, del inglés Mono-ethyl,hexyl phthalate
MeOH	Metanol
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica, del inglés National Center for Biotechnology Information
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de ¹³ C
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Regulador de fosfatos, del inglés Phosphate Buffer Solution
PCR	Reacción en cadena de polimerasa, del inglés Polimerase Chain Reaction
PLC	Cromatografía en placa preparativa, del inglés Preparative Layer Chromatography
sp	Especie
TBP	Tributoxi fosfato, del inglés Tris-butoxy phosphate
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

RESUMEN

En la actualidad, la diabetes mellitus (DM) representa una de las principales amenazas a la salud humana (Zimmet *et al.*, 2001; OMS, 2016). La DM es un desorden endocrino que se caracteriza por la secreción anormal de insulina y/o resistencia a la misma, provocando hiperglucemia y con esto, predisposición a complicaciones crónicas como retinopatía, neuropatía, nefropatía, cardiopatía, etc. (Brownlee, 2001; OMS, 2016). Dichas complicaciones se originan a través de varios mecanismos, entre ellos, la formación y, subsiguiente acumulación de productos de glicación avanzada (AGEs). Se ha propuesto que los compuestos capaces de inhibir la formación de AGEs tienen un gran potencial para retrasar el desarrollo de las complicaciones diabéticas. Una fuente potencial para el descubrimiento de compuestos con actividad biológica, son los microorganismos endófitos (Strobel y Daisy, 2003).

Sphingomonas sp. 3a-1 es una bacteria endófito de *Piper auritum* (Neira, 2015). El extracto de acetato de etilo de dicha bacteria inhibió en un 68.5% la formación de AGEs. El objetivo de este trabajo fue identificar los compuestos responsables de dicha actividad. El extracto crudo fue separado por cromatografía en placa preparativa. Tres bandas (B0, B1 y B3) fueron extraídas de las placas. La concentración necesaria para inhibir en 50% la formación de AGEs (IC_{50}) fue de 1.25, 1.16 y 1.17 mg/mL para B0, B1 y B3, respectivamente. Los compuestos presentes en las bandas fueron identificados por resonancia magnética nuclear de 1H y ^{13}C , infrarrojo y en cromatografía de gases acoplado a masas. Se identificaron en total 11 compuestos producidos por *Sphingomonas* sp. 3a-1: los ciclodipéptidos fenilalanil-valina, fenilalanil-prolina, fenilalanil-leucina, alanil-prolina y prolina-prolina; el ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, ácido vaccénico, β -sitosterol, tremulona y el 3-metil undecano.

ABSTRACT

Diabetes mellitus, one of the main threats to human health of the 21st century (Zimmet *et al.*, 2001; WHO, 2016), is an endocrine disorder characterized by hyperglycemia. The increasing protein glycation produces major formation and accumulation of Advanced Glycation End products (AGEs), which plays an important role in the pathogenesis of diabetic complications such as retinopathy, neuropathy, nephropathy and heart disease (Brownlee, 2001; WHO, 2016).

It has been proposed that compounds with capacity to inhibit the AGEs formation have a great potential to delay the development of diabetic complications. Bacterial endophytes are a potential source to discover novel bioactive compounds (Strobel y Daisy, 2003). The ethyl acetate extract of *Sphingomonas* sp. 3a-1, an endophyte bacterium of *Piper auritum* (Neira, 2015) inhibited the formation of AGEs by 68.5%. The aim of this work was to identify the compound(s) produced by *Sphingomonas* sp.3a-1, accountable for the antiAGEs activity. Three bands (B0, B1 and B3) were obtained by extraction of preparative layer chromatography. The necessary concentration to inhibit by 50% the formation of AGEs (IC₅₀) was 1.25, 1.16 and 1.17 mg/mL for B0, B1 and B3, respectively.

Nuclear magnetic resonance of ¹H and ¹³C, infrared and gas chromatography coupled to masses were techniques used to identify the band's compounds. Eleven compounds produced by *Sphingomonas* sp. 3a-1 were identified: the cyclodipeptides phenylalanil-valine, phenylalanil-proline, phenylalanil-leucine, alanyl-proline and proline-proline; hexadecanoic acid, octadecanoic acid, vaccenic acid, β-sitosterol, tremulone and 3-methyl undecane.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Diabetes: una amenaza mundial

La diabetes es un desorden endocrino que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. La insulina tiene la función de transportar la glucosa proveniente de los alimentos a las células para que estas puedan producir energía (AMD, 2015, amddiabetes.org).

Existen varios tipos de diabetes, siendo los principales la:

- Diabetes tipo I o insulino dependiente: es un padecimiento autoinmune que provoca la autodestrucción de células beta (encargadas de producir la insulina) provocando su eliminación. Por esta razón, las personas con este tipo de diabetes requieren administrarse insulina exógena para sobrevivir.
- Diabetes de tipo II o no insulino dependiente: Es la más común y se caracteriza por el uso ineficaz de la insulina, ya sea por una resistencia o una deficiencia de esta.
- Diabetes gestacional: Se presenta durante el embarazo y aumenta el riesgo de padecer diabetes tipo II para la madre y el bebe.

A pesar de sus diferencias, todos los tipos de diabetes se caracterizan por el desarrollo de hiperglucemia, lo cual, con el tiempo puede dañar gravemente el corazón, vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios (IDF, 2015; OMS, 2016). La incidencia de personas con diabetes, principalmente la Tipo 2 ha aumentado drásticamente debido a los cambios en la forma de vida y en la alimentación. La Diabetes Mellitus (DM) se ha convertido en una de las mayores emergencias mundiales de salud del siglo XXI (Zimmet *et al.*, 2001; IDF, 2015). De hecho, es una de las cuatro enfermedades no transmisibles (ENT) de mayor prioridad en el mundo. Incluso, existe un plan de acción de la OMS sobre ENT 2013-2020 que los líderes mundiales se han propuesto para reducir estas enfermedades (OMS, 2016).

La OMS estima que para el año 2030, la diabetes y sus complicaciones serán la séptima

causa de mortalidad a nivel mundial (WHO, 2014). En México, la diabetes representa un problema aún mayor, ya que es la segunda causa de muerte (INEGI, 2015).

1.1.1. Complicaciones de la diabetes y su relación con la formación de AGEs

La hiperglucemia que se desarrolla en personas con diabetes es una de las principales causas del desarrollo de complicaciones como neuropatía, nefropatía, retinopatía, hipertensión y mayor riesgo de desarrollar aterosclerosis (Stitt *et al.*, 2002; Peppas *et al.*, 2003).

La mayor formación y acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) es uno de los mecanismos, inducidos por hiperglucemia, que están involucrados en la patogénesis de las complicaciones diabéticas (Brownlee, 2001).

Los AGEs son un grupo heterogéneo de moléculas cuya formación inicia con la reacción no enzimática de Maillard entre azúcares reductores y los grupos amino de las proteínas, preferencialmente de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (Stitt *et al.*, 2002). Como resultado de la reacción se producen bases de Schiff, las cuales se transforman en compuestos más estables conocidos como productos de Amadori. Posteriormente, a través de una compleja red de reacciones de deshidratación, oxidación, reducción, fragmentación y condensación se forman los AGEs (Singh *et al.*, 2001; Peppas *et al.*, 2003; Ahmed, 2005). Los AGEs se pueden dividir en tres categorías (Anexo A): los AGEs entrecruzados, que son aquellos que se componen por proteína-AGE-proteína y pueden ser fluorescentes (pentosidina y croslina), y no fluorescentes (dímero de glicoxal lisina); la otra categoría la componen los AGEs no entrecruzados que son aquellos conformados únicamente por proteína-AGE (pirralina y N-Carboximetil lisina) (Singh *et al.*, 2001). Niveles elevados de AGEs en tejidos se han relacionado con la patogénesis de las complicaciones diabéticas, pero también con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Takeuchi y Yamagishi, 2008), con procesos propios del envejecimiento e inflamación (Brownlee, 1995; Ramasamy *et al.*, 2005), e incluso con el desarrollo de cáncer (Turner, 2017).

Los AGEs pueden alterar la función, conformación y vida media de las proteínas, activar cascadas de señalización celular regulares, provocar estrés oxidativo y ocasionar daños en el DNA (Singh *et al.*, 2001; Ahmed, 2005; Turner, 2017). Lo anterior, podría ser la causa de que dichos compuestos estén involucrados en varias enfermedades. En consecuencia, la búsqueda de compuestos que inhiban la formación de AGEs representa un área potencial para el tratamiento de diversas patologías y principalmente para disminuir el desarrollo de complicaciones diabéticas.

1.2. Compuestos con actividad antiAGEs

Una gran variedad de compuestos antiAGEs han sido investigados *in vitro* e *in vivo* en modelos animales. Sin embargo, aún faltan estudios en humanos que permitan definir si es factible su uso como agentes terapéuticos (Goh y Cooper, 2008). Los compuestos antiAGEs se pueden clasificar en: 1) Agentes quelantes de carbonilo, 2) Quelantes de iones metálicos y 3) Compuestos que revierten el entrecruzamiento de AGEs (Reddy y Beyaz, 2006).

1.2.1. Compuestos sintéticos antiAGEs

El primer compuesto sintético reportado como antiAGEs fue la aminoguanidina. A pesar de tener una actividad antiAGEs sobresaliente, esta hidrazina, inhibe la diamina oxidasa y la óxido nítrico sintasa, lo cual podría ocasionar reacciones secundarias respiratorias y vasculares severas, además de afectar la respuesta inmunológica (Nilsson, 1999; Thornalley, 2003). En fase clínica, la aminoguanidina provocó efectos adversos como problemas gastrointestinales, anemia y síntomas similares a la gripe, entre otras cosas (Williams, 2004).

Existe una gran variedad de compuestos sintéticos que se han estudiado por sus propiedades como antiAGEs (Singh *et al.*, 2001; Peng *et al.*, 2011). Algunos de estos compuestos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Algunos compuestos sintéticos antiAGEs.

Compuesto	Mecanismo	Referencia
Aspirina	Acetila los grupos amino libres de las proteínas, impidiendo su unión a azúcares reductores.	(Malik y Meek, 1994)
Piridoxamina, piridoxal fosfato y pirofosfato de tiamina	Inhibidores de la conversión de productos de Amadori a AGEs.	(Booth <i>et al.</i> , 1997)
Aminoguanidina	Atrapa dicarbonilos reactivos impidiendo la formación de AGEs. Previene la formación de entrecruzamientos. Inhibe la formación de radicales libres y ROS.	(Giardino <i>et al.</i> , 1998)
Pioglitazona, metformina y pentoxifilina	Inhiben la etapa temprana de la glicación. Fármacos usados en tratamiento de complicaciones diabéticas.	(Rahbar <i>et al.</i> , 2000)
LR-90 (compuesto fenólico)	Actividad quelante e inhibición post-Amadori.	Rahbar y Figarola (2003)
Alagebrium (ALT-711) y bromuro de N-fenaciltiazolio (PTB)	Rompen o interrumpen la formación de entrecruzamientos.	(Bakris <i>et al.</i> , 2004)
Penicilamina	Actividad antioxidante. Inhibe la formación de productos de Amadori.	(Yan y Harding, 2005)
Derivados disustituidos de urea	No Definido.	(Khan <i>et al.</i> , 2009a)
Derivados de bases de bis Schiff de Isatinas (hidrazonas)	No Definido.	(Khan <i>et al.</i> , 2009b)

No obstante, pocos compuestos han sido evaluados en humanos o han sido rechazados en las fases clínicas por presentar efectos tóxicos y efectos secundarios adversos (Williams, 2004; Reddy y Beyaz, 2006).

Debido a lo anterior, la búsqueda de compuestos naturales antiAGEs representa una alternativa más promisorio y segura para el tratamiento de las complicaciones diabéticas.

1.2.2. Compuestos naturales antiAGEs

Los compuestos antiAGEs provenientes de plantas representan candidatos atractivos para el desarrollo de agentes terapéuticos. Diversos estudios han sido llevados a cabo para evaluar las propiedades hipoglucemiantes y antiAGEs de los extractos crudos de plantas. Entre los extractos de plantas con actividad antiAGEs se encuentran aquellos provenientes de *Allium cepa*, *Illicium religiosum*, *Fagopyrum esculentum*, *Origanum officinalis*, *Eugenia caryophyllata*, *Oryza sativa* (Kim y Kim, 2003), de *Ilex paraguariensis* (Lunceford y Gugliucci, 2005), de *Passiflora alata* y *Passiflora edulis* (Rudnicki *et al.*, 2007), de *Cyperus rotundus* (Ardestani y Yazdanparast, 2007) y de plantas medicinales Chinas entre ellas *Aralia taibaiensis* (Xi *et al.*, 2008). También los extractos de hojas de *Psidium guajava* L. (guayaba) (Wu *et al.*, 2009), de *Piper auritum* (Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2012) y del fruto de *Coccinia grandis* (Meenatchi *et al.*, 2017) han mostrado tener actividad antiAGEs. En dichos estudios, los análisis fitoquímicos han permitido dar una idea de los compuestos presentes en los extractos con actividad antiAGEs; destacando principalmente compuestos como ácidos orgánicos, flavonoides, esteroides, terpenos y saponinas (ver Anexo B). Además, se han reportado también ácidos grasos insaturados, witanóidos y melanoidinas con actividad antiglicación (Ođjakova *et al.*, 2012).

En muy pocos casos se ha identificado estructuralmente el compuesto antiAGEs. Por ejemplo, se determinó que la magnoferina fue el principal compuesto responsable de la actividad antiAGEs del extracto de *Cratoxylum cochinchinense* (Tang *et al.*, 2004). El compuesto, identificado como plantamajósido, aislado del extracto de *Plantago asiática*, mostró ser el compuesto activo antiglicación (Choi *et al.*, 2008).

También, se determinaron algunos de los compuestos presentes en los extractos de diferentes plantas medicinales de Canadá con actividad antiglicación, entre ellos encontraron catequina, camperol, quercetina, mirisetina, procianidinas, ácido benzoico, ácido cumárico, ácido cafeico, ácido clorogénico, entre otros (Harris *et al.*, 2011). En diferentes especies de *Ocimum* se identificaron monoterpenos, camfor, eucaliptol, farneseno, α -pineno, terpinoleno y eugenol, siendo este último el mayor inhibidor de AGEs (Singh *et al.*, 2016).

Un heteropolisacárido compuesto de ácido galacturónico, xylosa, manosa, glucosa y galactosa fue identificado en extractos de *Ribes nigrum* (grosella negra). Dicho polisacárido presentó capacidad para inhibir la formación de compuestos dicarbonilos y AGEs (Xu *et al.*, 2016).

La carnosina es un dipéptido conformado por β -alanina e histidina, encontrado naturalmente en tejidos musculares de varios animales. Se ha reportado que este dipéptido tiene actividad antioxidante, quelante de varios iones metálicos y previene la formación de AGEs (Boldyrev *et al.*, 2013)

Existe la necesidad de encontrar compuestos más eficaces para el tratamiento de las complicaciones diabéticas, que sean de fácil obtención y que no representen riesgos de efectos secundarios importantes. De aquí el interés de elucidar estructuralmente los compuestos responsables de la actividad antiAGEs en extractos con esta actividad.

1.3. Bacterias endófitas como fuente potencial de compuestos con actividad biológica

Los microorganismos endófitos son aquellos que colonizan los tejidos vivos internos de las plantas sin causar ningún efecto negativo (Bacon y White, 2000). Sin embargo, la relación planta-endófito puede ser simbiótica, mutualista y en algunos casos saprofita (Castillo y Strobel, 2007).

La colonización de las bacterias endófitas inicia con la atracción provocada por exudados producidos en las raíces, tallos y hojas de las plantas.

Existen varias rutas de colonización entre ellas la transferencia vertical a través del xilema o a través de órganos reproductivos en plantas angiospermas. La luz UV, carencia de nutrientes y desecación son factores que influyen en la colonización de las bacterias endófitas (Hardoim *et al.*, 2015). Los microorganismos endófitos obtienen nutrición y protección de la planta hospedera y a cambio, estos pueden facilitar la distribución o producción de compuestos útiles para la planta, como enzimas, fitohormonas, minerales y compuestos que les den protección contra fitopatógenos y situaciones de estrés. También pueden inducir reacciones de defensa en la planta (ISR, resistencia sistémica inducida) (Tan y Zou, 2001; Hardoim *et al.*, 2015). Los endófitos producen una gran variedad de metabolitos biológicamente activos como antibióticos, antivirales, anticancerígenos, antioxidantes, insecticidas, inmunosupresores y antidiabéticos (Strobel y Daisy, 2003). La molécula nombrada como L-783,281 extraída del hongo *Pseudomassaria* sp., endófito de una planta de la República Democrática del Congo activa la tirosina cinasa receptora de insulina. Además, en estudios con modelos diabéticos de ratón, su administración oral disminuyó significativamente los niveles de glucosa en sangre (Zhang *et al.*, 1999). De acuerdo a lo anterior, los endófitos representan una fuente potencial de compuestos bioactivos y una alternativa para el descubrimiento y desarrollo de compuestos medicinales entre ellos antiAGEs y antidiabéticos (Tan y Zou, 2001; Strobel, 2002; Elsebai *et al.*, 2014).

1.3.1. *Sphingomonas* sp. 3a-1, una bacteria endófito de *Piper auritum*

P. auritum, es una planta medicinal conocida como hoja santa, la cual es usada en la cocina tradicional como condimento en México y Latinoamérica. En el Atlas de las plantas de medicina tradicional mexicana de la UNAM (2009) la reportan como emoliente, antiinflamatorio, antidiarreico, antimicrobiano, antiespasmódico y antirreumático. Asimismo se han reportado propiedades hipoglicémicas de las hojas de *P. auritum* (Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Pérez-Gutierrez *et al.*, 2012).

Varias bacterias endófitas de *P. auritum* fueron aisladas, entre estas, sobresalieron cepas del género *Pseudomonas* y la cepa *Sphingomonas* sp. 3a-1 por la actividad antiAGEs mayor al 70% mostrada por sus extractos (Neira, 2015).

El extracto de acetato de etilo de *Sphingomonas* sp. 3a-1 inhibió la formación de AGEs un 85%. Además, se obtuvieron tres fracciones con actividad antiAGEs similar a la de su extracto (Ayala, 2015). Los compuestos responsables de dicha actividad no fueron identificados.

1.3.1.1. Género *Sphingomonas*

El género *Sphingomonas* es un grupo de bacterias Gram negativas, de forma redonda, quimioheterótrofas, estrictamente aeróbicas. Contienen glicoesfingolípidos en su membrana celular (Kawahara *et al.*, 1999) y generalmente son colonias amarillas (Balkwill *et al.*, 2006).

El género *Sphingomonas* fue dividido en: *Sphingomonas sensu stricto*, *Sphingobium*, *Novosphingobium* y *Sphingopsis* debido a la diversidad fisiológica, ecológica y filogenética que existía entre cepas de éste género (Takeuchi *et al.*, 2001).

Bacterias del género *Sphingomonas* han sido ampliamente estudiadas por su versatilidad metabólica y su capacidad de degradación de compuestos tóxicos, por ejemplo de hidrocarburos aromáticos policíclicos como fenantreno y fluorantreno (Zhong *et al.*, 2011) de colorantes azo (Ayed *et al.*, 2011) de naftaleno, fluoreno, benzofluoreno, bifenil, tolueno, xileno, triclorofenol y polietilenglicol (Leys *et al.*, 2004).

Además, el género *Sphingomonas* también ha sido estudiado por la capacidad de algunas cepas de producir exopolisacáridos conocidos como esfinganos. Dichos exopolisacáridos como el gelano son utilizados en alimentos, farmacéuticos e industria del petróleo (Seo *et al.*, 2004; Balkwill *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2011).

A pesar de su versatilidad, las cepas del género *Sphingomonas* han sido poco estudiadas por su capacidad para producir compuestos bioactivos.

Las poliaminas homoespermidina y espermidina, que se han encontrado en cepas del género *Sphingomonas* (Balkwill *et al.*, 2006), podrían tener actividad antiAGEs. Esto, debido a que se ha reportado que la espermina y espermidina protegen a las proteínas de la glicación por hexosas, triosas y precursores dicarbonilos de AGEs, además su actividad es comparable con la de la aminoguanidina y carnosina (Gugliucci y Menini, 2003).

Algunos de los estudios referidos a compuestos con actividad biológica producidos por cepas de *Sphingomonas* se muestran en la Tabla 2. No existen reportes sobre compuestos antiAGEs producidos por cepas de este género.

Tabla 2. Compuestos bioactivos producidos por *Sphingomonas* sp.

Tipo de actividad	Cepa	Compuestos	Resumen	Referencias
Anticancerígeno	<i>Sphingomonas</i> sp. M-17	Argimicina A, B y C	Aislamiento y elucidación estructural por métodos espectroscópicos (pentapéptido).	(Yamaguchi <i>et al.</i> , 2003)
*Antioxidante	<i>Sphingomonas</i> sp. (aislada de muestras de suelo de Lisboa)	β -caroteno y nostaxantina	Evaluación de diferentes fuentes de carbono y oxigenación para la producción de carotenoides.	(Silva <i>et al.</i> , 2004)
*Antioxidante	<i>Sphingomonas jaspsi</i> sp.nov.	Zeaxantina, nostoxantina y otros	Caracterización y descripción de nuevas cepas (aisladas de Misasa, Japón).	(Asker <i>et al.</i> , 2007a)
*Antioxidante	<i>Sphingomonas astaxanthinifaciens</i> sp. nov.	Astaxantina y sus derivados		(Asker <i>et al.</i> , 2007b)
Antimicrobiano	<i>Sphingomonas molluscorum</i> sp. nov. (aislada del molusco <i>Anadara broughtoni</i>)	No definido	El extracto de butanol de la cepa presentó actividad antimicrobiana contra bacterias Gram +.	(Romanenko <i>et al.</i> , 2007)
Promotor de crecimiento en plantas	<i>Sphingomonas</i> sp. LK11 (endófito de <i>Tephrosia apollinea</i>)	Ácido indolacético y gibberelinas	La aplicación de la suspensión bacteriana mejoró el crecimiento de plantas de jitomate.	(Khan <i>et al.</i> , 2014)
Promotor de la acumulación de Cadmio	<i>Sphingomonas</i> SaMR12 (endófito de <i>Sedum alfredii</i>)	No definido	La inoculación de la cepa mejoró la tolerancia de Cadmio en <i>S. alfredii</i> .	(Pan <i>et al.</i> , 2016)

*Actividad propia de carotenoides. No evaluada en las referencias.

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la diabetes mellitus se ha convertido en uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. A pesar de que existen en el mercado medicamentos para controlar la glucosa, existe la necesidad de buscar nuevas y mejores alternativas para el tratamiento de las complicaciones diabéticas.

La inhibición de la formación de AGEs representa un área de oportunidad para el descubrimiento y desarrollo de fármacos que ayuden a disminuir o retardar el desarrollo de complicaciones diabéticas y otras enfermedades.

Los microorganismos endófitos tienen un gran potencial para producir compuestos con actividad biológica. Debido a lo anterior, los endófitos representan una fuente importante para la búsqueda de compuestos de interés farmacéutico, entre ellos, compuestos con actividad antiAGEs.

Sphingomonas sp. 3a-1 es una bacteria endófito de *P. auritum*. En estudios anteriores se reportó que el extracto crudo de acetato de etilo de *Sphingomonas* sp-3a-1 es capaz de inhibir la formación de AGEs. En este contexto, la identificación y evaluación de los compuestos responsables de la actividad antiAGEs del extracto de *Sphingomonas* sp-3a-1, es el primer paso para la búsqueda de alternativas potenciales para el tratamiento de complicaciones diabéticas.

3. HIPÓTESIS

Sphingomonas sp. 3a-1, una bacteria endófito de *P. auritum*, produce compuestos capaces de inhibir la formación de AGEs, los cuales pueden ser identificados estructuralmente por medio de IR, RMN y GC-MS.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

- Caracterizar tanto estructuralmente como biológicamente los metabolitos con actividad antiAGEs producidos por *Sphingomonas* sp. 3a-1.

4.2. Objetivos particulares

- Obtener el extracto de acetato de etilo de *Sphingomonas* sp. 3a-1.
- Evaluar la capacidad del extracto para inhibir la formación de AGEs (actividad antiAGEs), mediante el método BSA-glucosa.
- Separar los compuestos con actividad antiAGEs del extracto de *Sphingomonas* sp. mediante cromatografía en placa preparativa.
- Caracterizar los compuestos activos mediante la interpretación de los espectros de infrarrojo, resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C y cromatografía de gases acoplado a masas.
- Evaluar la actividad antiAGEs de algunos de los compuestos puros encontrados en las bandas extraídas de la fracción de acetato de etilo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Desarrollo experimental

El desarrollo de este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Metabolismo Secundario del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, la estrategia experimental que se siguió para su desarrollo se muestra en la Figura 1.

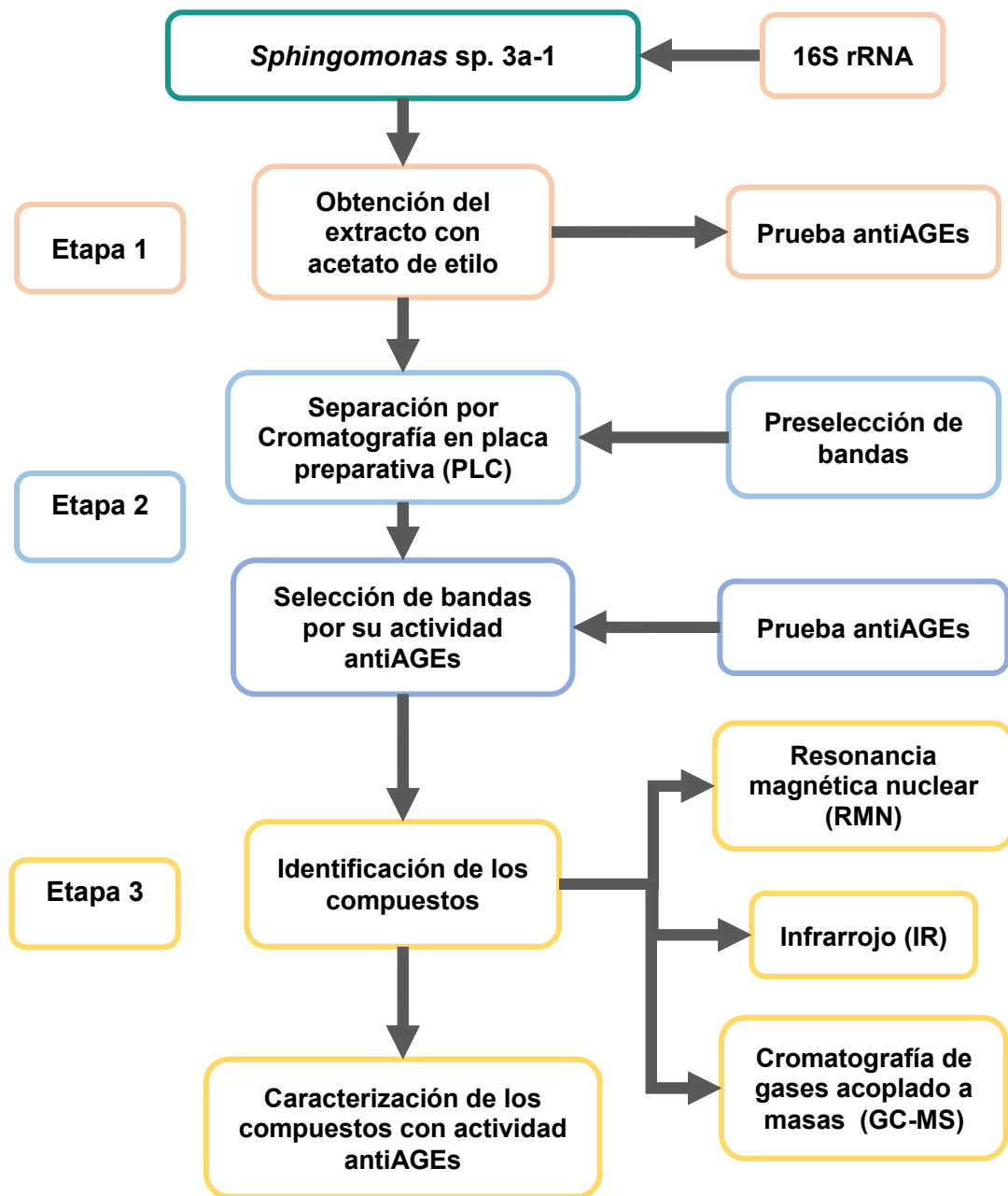


Figura 1. Estrategia experimental del proyecto.

5.1.1. Cepa

La cepa *Sphingomonas* sp. 3a-1, endófito de *P. auritum* fue obtenida de la colección microbiana propia del Laboratorio de metabolismo secundario del DBB.

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Conservación de la cepa 3 a-1

La conservación de la cepa 3 a-1 se llevó a cabo por congelación a -80 °C en solución de glicerol al 10 % (para su uso a corto plazo) y por liofilización (para su uso a largo plazo).

5.2.1.1. Conservación de la bacteria en glicerol al 10 % a -80 °C

Una asada de *Sphingomonas* sp.3a-1 se inoculó en 25 mL de caldo nutritivo (Difco, B. D.) contenidos en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Se incubó a 25 °C y 120 rpm durante 24 h. El caldo de cultivo se centrifugó por 10 min a 5,000 rpm y se descartó el sobrenadante. El paquete celular se lavó dos veces con 2.5 mL de glicerol (J.T. Baker) al 10 % estéril y frío (4 °C). Posteriormente se agitó en un vórtex Daigger Genie 2 G-560 (Scientific Industries), por 30 segundos y se centrifugó durante 10 min a 5,000 rpm. Se descartó la solución de lavado y el paquete celular se resuspendió en 2.5 mL de glicerol estéril y frío al 10 %. Se colocaron alícuotas de 0.8 mL de la suspensión bacteriana en tubos para criogénesis. Los tubos se introdujeron en nitrógeno líquido hasta que el contenido se congeló y se almacenaron a -80 °C en un ultracongelador (Sanyo) hasta su uso.

5.2.1.2. Conservación de la bacteria por liofilización

Una asada de *Sphingomonas* sp.3a-1 se inoculó en 25 mL de caldo nutritivo (Difco, B. D.) contenidos en un matraz Erlenmeyer de 125 mL. Se incubó a 25 °C y 120 rpm durante 24 h. El caldo de cultivo se centrifugó por 10 min a 5,000 rpm y se descartó el sobrenadante. El paquete celular se lavó dos veces con 2.5 mL de NaCl estéril al 0.09%, se agitó en un vórtex Daigger Genie 2 G-560 (Scientific Industries) por 30 segundos y se centrifugó por 10 min a

5,000 rpm. La solución de lavado se descartó y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de leche ultrapasteurizada, semidescremada (Alpura). Se colocaron alícuotas de 0.2 mL de la suspensión bacteriana en ampolletas de vidrio estériles. Las ampolletas se taparon con tela quirúrgica estéril, se congelaron con acetona fría y se liofilizaron en una Liofilizadora Freezone 2.5 (Labconco). Las ampolletas se sellaron con fuego y se almacenaron a temperatura de refrigeración.

5.2.2. Identificación molecular de la cepa 3a-1 a partir del gen 16S rRNA

5.2.2.1. Extracción de DNA genómico

La bacteria se inoculó en 25 mL de caldo nutritivo (Difco, B. D.) contenidos en matraces de 250 mL. Se incubó por 48 h a 25 °C y 120 rpm. Transcurrido el tiempo, se colocó 1 mL de dicho cultivo en un tubo Eppendorf y se centrifugó en una centrifuga refrigerada 5415R (Eppendorf), por 10 min a 5000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el paquete celular se lavó tres veces con 1 mL de agua inyectable PISA. El pellet bacteriano se resuspendió en 200 µL de agua inyectable PISA estéril. Las muestras se procesaron con el Kit QIAmp DNA Mini utilizando el equipo QIAcube (QIAGEN) bajo el protocolo para bacterias Gram negativas. El DNA genómico obtenido se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (w/v) a 120 V por 20 min, se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) y se visualizó en el transiluminador UV Gel Doc 2000 (Bio-Rad). El DNAg extraído se almacenó a -20 °C hasta que se usó para amplificación por PCR.

5.2.2.2. Amplificación del gen 16S rRNA

La amplificación del gen 16S rRNA se llevó a cabo utilizando tres juegos de cebadores (Sigma-Aldrich):

- B8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')
- B1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Asker *et al.*, 2007; Kurisu *et al.*, 2010)

- 816F (5'-ACGATGATAACTAGCTG-3')
1327R (5'-CTCTCGAGTTGCAGAGA-3') (Kim *et al.*, 1998)
- 337F (5'-GACTCCTACGGGAGGCWGCAG-3')
907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3')

La mezcla de reacción para la PCR fue la siguiente: 2.5 µL del cebador sentido (20 µM), 2.5 µL del cebador antisentido (20 µM), 25 µL de Taq PCR Master Mix (QIAGEN), 1 µg de DNA y 20 µL de agua PISA. Las condiciones de desnaturalización, alineamiento y extensión utilizadas para cada par de cebadores se indican en la Tabla 3. En todos los casos, se sometió la mezcla de reacción a un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 3 min, a un ciclo de elongación final de 10 min a 72°C y para conservar la reacción a corto plazo a un ciclo final a 4°C. La reacción de PCR se realizó en un termociclador T-100 (Bio-Rad).

Tabla 3. Condiciones para amplificación del gen 16S por PCR para cada conjunto de cebadores.

Conjunto de cebadores	Número de ciclos	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión
8F-1492R	35	94 °C por 30 s	47 °C por 30 s	72 °C por 90 s
816F-1327R	35	94 °C por 30 s	41.4 °C por 30 s	72 °C por 30 s
337F-907R	35	94 °C por 30 s	46 °C por 30 s	72 °C por 40 s

Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL) como se describió anteriormente. Los amplicones esperados se purificaron usando el QIAGEN Purification kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de cada amplicón fue determinada a través del NanoDrop 8000 Spectrophotometer V2.2 (Thermo Scientific), antes de su secuenciación en MacroGen Inc. (Corea).

Las secuencias parciales del gen 16S fueron alineadas y editadas con el programa Chromas Pro, y posteriormente se compararon realizando un análisis de BLAST en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). El alineamiento se realizó mediante CLUSTAL X 2.0.10 (Larkin *et al.*, 2007).

5.2.3. Obtención del extracto crudo de *Sphingomonas* sp. 3a-1

5.2.3.1. Reactivación y preparación del cultivo de *Sphingomonas* sp. 3a-1

La suspensión bacteriana de *Sphingomonas* sp. 3a-1 conservada en glicerol al 10 % se descongeló, se utilizó una asada de esta para inocular por estría cruzada placas con agar triptosa soya (Difco, B. D.). Las placas se incubaron a 25 °C durante 72 h. Posteriormente, se tomaron 10 colonias aisladas y se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de caldo nutritivo (Difco, B. D.), se incubaron a 25 °C y 120 rpm por 24 h en una incubadora Innova 43 (New Brunswick Scientific). El preinóculo fue preparado inoculando 5 mL del cultivo anterior en matraces Erlenmeyer de 1 L que contenían 200 mL de medio S-7 (Anexo C), los cuales se incubaron después a 22 °C a 120 rpm durante 24 h. Finalmente, un garrafón Pyrex con capacidad de 20 L, fue inoculado con 10 % del volumen total del cultivo, así, un garrafón con 10.8 L de medio S-7, fue inoculado con 1.2 L del cultivo anterior. La fermentación se llevó a cabo a 22 °C durante 48 h con un flujo de aire de 20 L/min (1.6 vvm).

5.2.3.2. Obtención del extracto crudo de acetato de etilo

Los extractos crudos de los cultivos de *Sphingomonas* sp. 3a-1, se obtuvieron agregando acetato de etilo grado comercial (Meyer) en una proporción 1:2 al cultivo de 48 h en dos etapas. Se mezclaron los 12 L del caldo de cultivo con 3 L de acetato de etilo durante 30 min y se dejó reposar 30 min. La fase emulsionada se recuperó y centrifugó a 3500 rpm durante 15 min a 4 °C. La fase orgánica fue recuperada y se le agregó sulfato de sodio para remover el agua del extracto. Después de agregar 3 L adicionales de acetato de etilo se procedió como ya se mencionó arriba.

El acetato de etilo se eliminó casi hasta sequedad en un rotavapor R-205 (Büchi) con temperatura del baño de 37 °C, temperatura de vapor de 35 °C y presión de vacío de 240 mbar con un ΔP de 10 mbar. El extracto obtenido se colocó en un vial ámbar de 7 mL previamente pesado y fue secado en atmósfera de nitrógeno. El vial se cerró y selló con parafilm para ser almacenado en refrigeración a 4-7 °C hasta su posterior uso.

5.2.3.3. Obtención del extracto crudo del medio sin fermentar (control negativo)

El extracto crudo del medio de cultivo sin fermentar, es decir sin el inóculo, fue utilizado como control negativo. Para cada lote se obtuvo a partir de 250 mL de medio de cultivo S-7. La extracción fue realizada mezclando los 250 mL de medio con 200 mL de acetato de etilo y licuando durante 5 min. La recuperación de la fase orgánica se llevó a cabo utilizando un embudo de separación. El secado del extracto se llevó a cabo de la misma manera que en el caso del extracto del cultivo antes mencionado.

El extracto negativo utilizado para los análisis de GC-MS fue obtenido a partir de 12 L de medio S-7.

5.2.4. Evaluación de la inhibición de la formación de AGEs

La inhibición de la formación de AGEs se evaluó *in vitro* utilizando como base la metodología de Brownlee *et al.* (1986). La reacción se llevó a cabo en viales ámbar de 3 mL. Las soluciones utilizadas fueron: solución de albúmina sérica bovina libre de proteasas (Research Organics), a una concentración de 10 mg/mL disuelta en solución amortiguadora de fosfatos PBS a pH 7.4 (Hycl), solución de glucosa (J.T. Baker) a 500 mM, disuelta en PBS y azida de sodio (Research Organics) a 0.02 %, disuelta en agua destilada. Las muestras a evaluar (extracto crudo, las bandas y los compuestos de interés) fueron disueltas en DMSO estéril (J.T. Baker) a 10 mg/mL. El control positivo, el hidrocloreuro de aminoguanidina (Sigma Aldrich) a 10 mM, fue disuelto en agua destilada.

Se agregó PBS (0.1 M a pH 7.4) para dar un volumen final de reacción de 510 µL. Los volúmenes agregados de cada componente en cada vial se muestran en la Tabla 4.

Todos los reactivos fueron esterilizados previamente por filtración a través de una membrana de 0.22 µm. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

Tabla 4. Componentes de reacción para la prueba de inhibición de formación de AGEs.

Componente	Control negativo (µL)	Control positivo (µL)	Prueba con Extracto (µL)	Blanco de extracto (µL)
Buffer PBS	300	200	200	400
BSA	100	100	100	-
Glucosa	100	100	100	-
Aminoguanidina	-	100	-	-
Extracto crudo /banda/ compuesto	-	-	100	100
Azida sódica	10	10	10	10

Las muestras se dejaron en incubación a 37 °C durante 15 días. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en placas blancas FluoroNunc de 96 pocillos, colocando 200 µL de la muestra en cada pocillo. Antes de la toma de cada muestra se homogeneizó la muestra colocando el vial por cinco segundos en un vórtex.

La inhibición de la formación de AGEs se evaluó realizando lecturas de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 370 nm y de emisión de 440 nm, en un lector de placas *CLARIOstar* (BMG-Labtech). Los parámetros básicos para las lecturas fueron: Ganancia =1000; λ Excitación: 370-16 y λ Emisión: 440-10; Lecturas con promedio orbital en 3 mm de diámetro, longitud focal de 6.4, tiempo de ajuste de 0.2 s y 40 flashes por pozo.

El porcentaje de inhibición de formación de AGEs (% antiAGEs) se calculó de la siguiente forma:

$$\% \text{ antiAGEs} = \frac{(\text{Control negativo}) - (\text{Muestra con extracto} - \text{Blanco del extracto})}{(\text{Control negativo})} * 100$$

NOTA: El blanco del extracto se consideró debido a que se observó que el propio extracto emitía fluorescencia.

5.2.5. Separación de bandas del extracto crudo por cromatografía en placa preparativa (PLC).

5.2.5.1. Cromatografía en placa preparativa.

En cromatoplasmas marca Merck de sílica gel 60 con F_{254} (0.5 mm de grosor) se señaló con lápiz, la línea de aplicación de la muestra a 2.5 cm del borde inferior, el límite del frente del solvente a 1.5 cm del borde superior y las áreas para la manipulación de la placa a 1.5 cm del borde de cada lado.

El sistema de solventes utilizado fue una mezcla de acetona (Fermont), cloroformo (Fermont), hexano (Tecsiquim) grado HPLC en proporción 50:45:5 La cámara se saturó durante una hora con la mezcla de solventes (200 mL). Antes de cada PLC se realizó una cromatografía en placa fina de prueba, en condiciones similares.

El extracto crudo (100 mg) se disolvió en 500 μ L de cloroformo y fue colocado con una pipeta Pasteur sobre la línea de aplicación. Se realizó una doble elución (aproximadamente 50 min c/u) para la separación del extracto. La placa fue visualizada bajo luz UV de longitud larga (365 nm) y longitud corta (254 nm) utilizando una lámpara de luz UVGL-25 (UVP).

5.2.5.2. Extracción de las bandas seleccionadas de las cromatoplasmas preparativas

Las bandas seleccionadas de las cromatoplasmas preparativas fueron recuperadas raspando la sílica y extrayendo tres veces con 50 mL de acetato de etilo bidestilado. Cada extracción de la sílica, se llevó a cabo sonicando durante 10 min a 30 °C. La sílica fue retirada por filtración al vacío, utilizando filtros Whatman No. 45 (tamaño de poro de 2.5 μ m) en portafiltros Swinex de 2.5 cm de diámetro. Las bandas extraídas de las PLCs se concentraron y secaron de la misma manera que el extracto crudo. Posteriormente, dichas bandas fueron almacenadas en refrigeración (4-7 °C) hasta su posterior uso.

5.2.6. Evaluación de la actividad antioxidante por decoloración de β -caroteno en placa

Un mg de cada banda extraída de las cromatoplasmas preparativas, se disolvió en 1 mL de MeOH grado HPLC (Fermont). Como control positivo se utilizó ácido ascórbico (Merck) (1 mg / 1 mL de MeOH) y como control negativo se utilizó MeOH. Se utilizaron placas de gel de sílice de 5 cm X 1.5 cm. En cada placa se colocaron con un capilar cinco aplicaciones de la banda extraída a evaluar, cinco del control positivo y cinco del control negativo en diferentes puntos. Posteriormente se rociaron las placas con una mezcla compuesta por 1 mL de ácido linoleico y 0.02 g β -caroteno (Sigma-Aldrich) disuelto en 10 mL de cloroformo. Después de 30 min las placas fueron rociadas con una solución al 0.2 % del radical estable DPPH (el cual tiene una coloración violeta). La placa se expuso a la luz hasta que los colores de fondo se convirtieron en zonas decoloradas. La coloración amarilla indica una prueba positiva a actividad antioxidante (Cuendet *et al.*, 1997; Burits y Burcar 2000).

5.2.7. Obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C

Los espectros RMN ^1H a 270 MHz y ^{13}C a 68 MHz fueron hechos en un equipo JEOL-270 MHz, utilizando cloroformo deuterado como disolvente de las bandas extraídas. Como referencia interna se usó tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos se reportan en escala delta (δ) en unidades partes por millón (ppm).

5.2.8. Obtención de los espectros de infrarrojo

Los espectros de IR de las bandas extraídas de las cromatoplasmas preparativas fueron obtenidos en un equipo Cary FTIR 630 (Agilent Technologies), utilizando cloroformo como disolvente de las bandas (5 mg en 200 μL). Para realizar las lecturas, se dejó evaporar el solvente y se utilizó el protocolo dado por “default” del equipo.

5.2.9. Obtención de los espectros de cromatografía de gases acoplado a masas

Los análisis de GC-MS del extracto crudo, extracto control y bandas extraídas fueron realizados en el Instituto de Química de la Universidad Autónoma de México. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 6890N acoplado a un espectrómetro de masas marca Jeol GCmate II bajo el método de ionización por impacto electrónico. Las condiciones del cromatógrafo de gases fueron: Temperatura inicial 40 °C durante un minuto, la temperatura se incrementó con una rapidez de 8 °C por min hasta llegar a 310 °C, la temperatura del inyector fue 310 °C. Se usó una columna modelo DB-5MS (Agilent Technologies) de 0.32 mm de diámetro y 0.25 micrones de espesor de recubrimiento interno.

6. RESULTADOS

6.1. Identificación molecular de la cepa 3a-1 a partir del gen 16S rRNA

La extracción del DNA de la cepa *Sphingomonas* sp. 3a-1, se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Posteriormente, se obtuvieron los amplicones de los tres fragmentos del gen 16S rRNA para cada conjunto de cebadores (se realizaron siete réplicas). Para el conjunto 8F-1492R se obtuvieron bandas de aproximadamente 1400 pb, (Figura 2a), para el conjunto 337F-907R de 570 pb (Figura 2b) y para el conjunto 816F-1327R de 500 pb (Figura 2c).

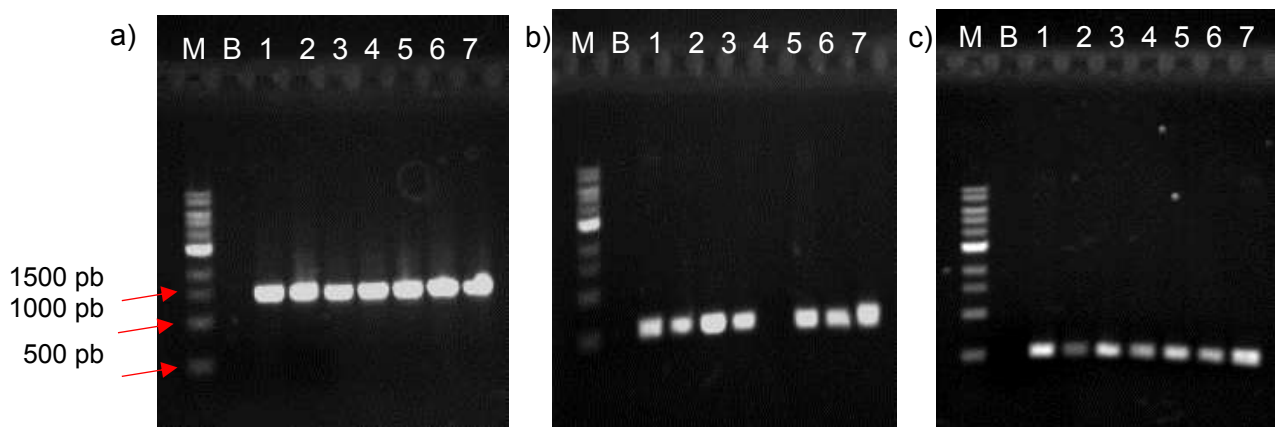


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de productos de PCR. a) Cebadores 8F-1492R. b) Cebadores 337F-907R, c) Cebadores 816F-1327R.

M: Marcador molecular; B: blanco (control negativo)

La secuencia ensamblada parcial del gen 16S rRNA (1224 pb) de *Sphingomonas* sp. 3a-1 (Anexo B) se comparó en la base de datos NCBI y se realizó el análisis de BLAST confirmando su pertenencia al género *Sphingomonas*. Algunas de las especies más cercanas a *Sphingomonas* sp. 3a-1 de acuerdo a estos resultados, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Especies más cercanas a *Sphingomonas* sp. 3a-1.

Descripción del microorganismo	No. de acceso	% de identidad
<i>Sphingomonas panaciterrae</i> DCY91	NR_146851.1	99
<i>Sphingomonas dokdonensis</i>	NR_043612.1	98
<i>Sphingomonas mucosissima</i> CP173-2	NR_042493.1	97
<i>Sphingomonas kyeonggiensis</i> THG-DT81	NR_134182.1	97
<i>Sphingomonas ginsenosidivorax</i> KHI67	NR_117830.1	97
<i>Sphingomonas faeni</i> MA-olki	NR_042129.1	96
<i>Sphingomonas aurantiaca</i> MA101b	NR_042128.1	96
<i>Sphingomonas naasensis</i> KIS18-15	NR_133864.1	96

6.2. Obtención del extracto crudo de *Sphingomonas* sp. 3a-1

En total se hicieron ocho lotes de 12 L cada uno, a los que nombramos L1 a L8. La actividad antiAGEs y cantidad de extracto crudo obtenido de cada lote se muestran en la Tabla 6. El porcentaje de inhibición de la formación de AGEs en promedio fue de 68.5 ± 9.2 % y la cantidad de extracto promedio obtenido de cada lote fue de 326 mg.

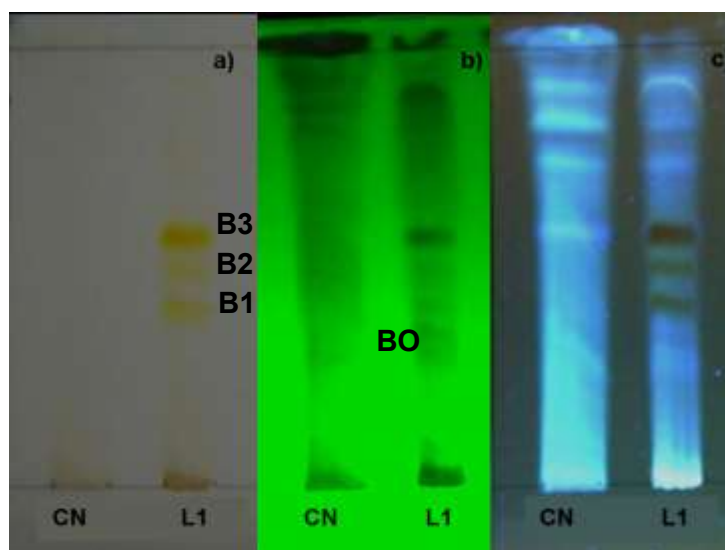
Tabla 6. Cantidad de extracto y actividad antiAGEs de los ocho lotes.

Lote	Cantidad de extracto (mg)	% AntiAGEs
L1	300	71.74 ± 2.3
L2	178	72.6 ± 9.2
L3	480	75.3 ± 9.6
L4	400	73.8 ± 6.7
L5	320	63.0 ± 6.1
L6	300	78.3 ± 1.5
L7	360	62.9 ± 8.8
L8	270	50.2 ± 4.6

Los extractos de los ocho lotes mostraron perfiles similares al compararlos por cromatografía en placa fina (TLC). El total de extracto crudo obtenido fue de 2.6 g y el rendimiento fue de 27 mg de extracto por litro de medio.

6.3. Obtención de las bandas con actividad antiAGEs extraídas de las cromatoplasmas preparativas

El extracto crudo del cultivo (L1) se comparó con el extracto del control negativo (CN) por TLC. Como se muestra en la Figura 3, en ambos extractos se observaron bandas con el mismo Rf a una longitud de onda de 365 nm (Figura 3c). Lo anterior, permitió realizar una preselección de las bandas a extraer, descartando aquellas que visualmente provenían del medio de cultivo y no del metabolismo de la bacteria.



**Figura 3. Comparación por TLC del control negativo (CN) y el extracto crudo (L1).
a) Visible, b) UV de longitud corta y c) UV de longitud larga.**

De esta manera las bandas con Rf de 0.27, 0.36, 0.45 y 0.55 nombradas B0, B1, B2 y B3, respectivamente, fueron extraídas de las placas de cromatografía preparativa.

El rendimiento de cada banda respecto al extracto crudo fue de 0.068, 0.071, 0.053 y 0.095 mg de B0, B1, B2 y B3, respectivamente por mg de extracto crudo.

El espectro de RMN ¹H de la banda B2 mostró una combinación de las señales presentes en B1 y B3, por lo que se decidió continuar trabajando únicamente con las bandas B0, B1 y B3. La actividad antiAGEs de cada banda se evaluó a tres diferentes concentraciones, los resultados se resumen en la Figura 4.

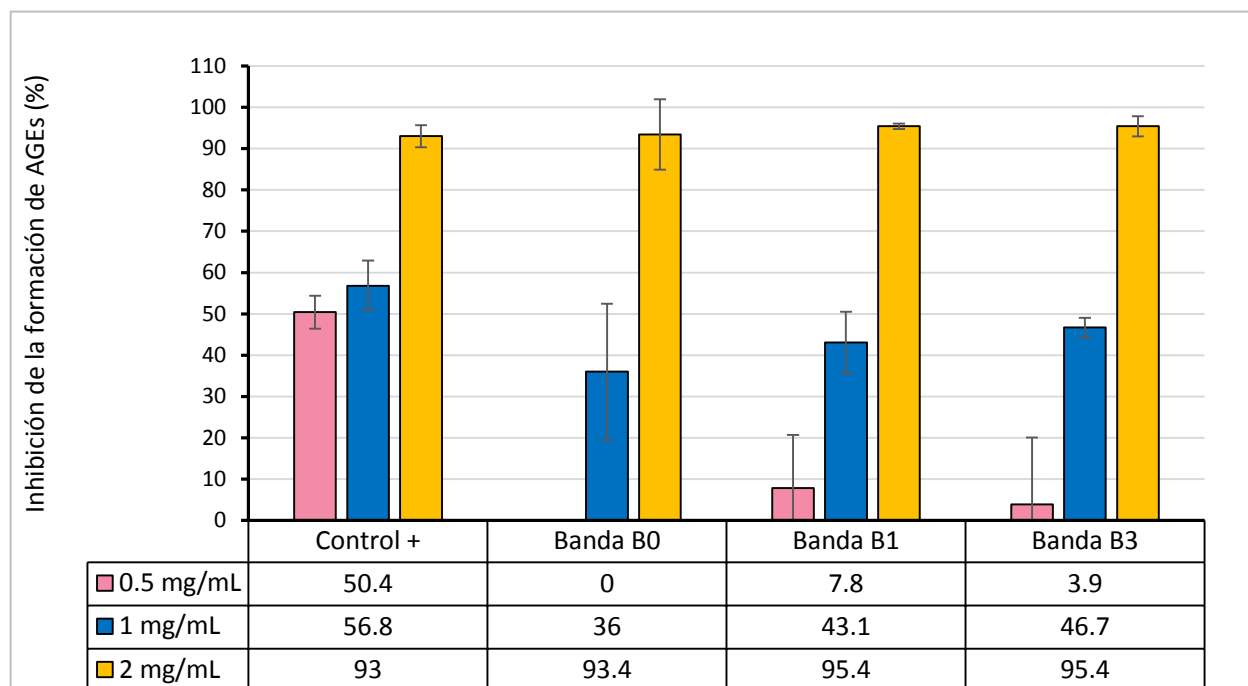


Figura 4. Gráfica de actividad antiAGEs de las bandas extraídas de las cromatoplasmas preparativas.

La IC₅₀, i.e., la concentración capaz de inhibir en 50% la formación de AGEs fue de 1.25 mg/mL, 1.17 mg/mL y 1.16 mg/mL para B0, B1 y B3, respectivamente. La IC₅₀ de la aminoguanidina (control positivo) fue de 0.49 mg/mL.

6.4. Actividad antioxidante de las bandas extraídas de las cromatoplasmas preparativas.

La actividad antioxidante de las bandas se evaluó por el método de decoloración en placa del β-caroteno. En la parte superior de cada placa se colocó un control negativo (C-), ácido ascórbico como control positivo (C+) y la banda a evaluar. Como se observa en la Figura 5 ninguna de las bandas presentó actividad antioxidante a la concentración de 1 mg/mL.

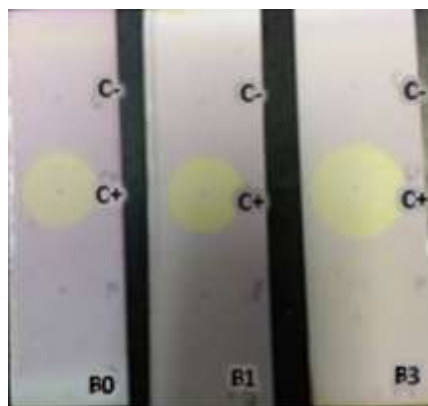


Figura 5. Evaluación de la actividad antioxidante de las bandas B0, B1 y B3.

6.5. Identificación de los compuestos presentes en las bandas extraídas de las cromatoplasmas preparativas

La determinación de los compuestos presentes en las bandas con actividad antiAGEs se realizó por análisis espectroscópicos y espectrométricos: RMN, IR y GC-MS. El extracto crudo del cultivo de *Sphingomonas* sp. 3a-1 y el extracto control negativo se analizaron por GC-MS. De acuerdo a los resultados de estos análisis se descartaron los compuestos presentes en las bandas que provenían del medio de cultivo. Por lo tanto, en los datos de GC-MS, únicamente se reportan aquellos picos provenientes de la bacteria, a menos de que se especifique lo contrario.

La **banda B0** consistió en una muestra aceitosa ligeramente amarilla cuyos datos espectroscópicos y espectrométricos fueron: RMN ^1H (Figura 6) (270 MHz, CDCl_3/TMS): δ 0.9038 (6 H, t, terminal CH_3), δ 1.2365 (n CH_2), δ 1.6698 (m, CH), δ 2.3262 (t), δ 3.4535 ($\text{CH}_2\text{-C=O}$) y δ 3.6397 ($\beta\text{CH}_2\text{-O-C=O}$), δ 4.1974 (m, $\alpha\text{CH}_2\text{-O-C=O}$), δ 7.2475 (s, CDCl_3), δ 7.5201 y δ 7.6968 (m, CH de anillo aromático).

RMN ^{13}C (Figura 7) (68 MHz, CDCl_3/TMS): δ 11.0405 y δ 14.1347 (CH_3 terminal), δ 23.0658, δ 23.8145, δ 29.0020, δ 29.7813 y δ 30.4307 (n CH_2), δ 38.8041 (CH), δ 68.2331 ($\text{CH}_2\text{-O-C=O}$), δ 77.0878 (t, CDCl_3), δ 128.8790, δ 130.9647 y δ 132.5309 (CH de anillos aromáticos), δ 168 (C=O).

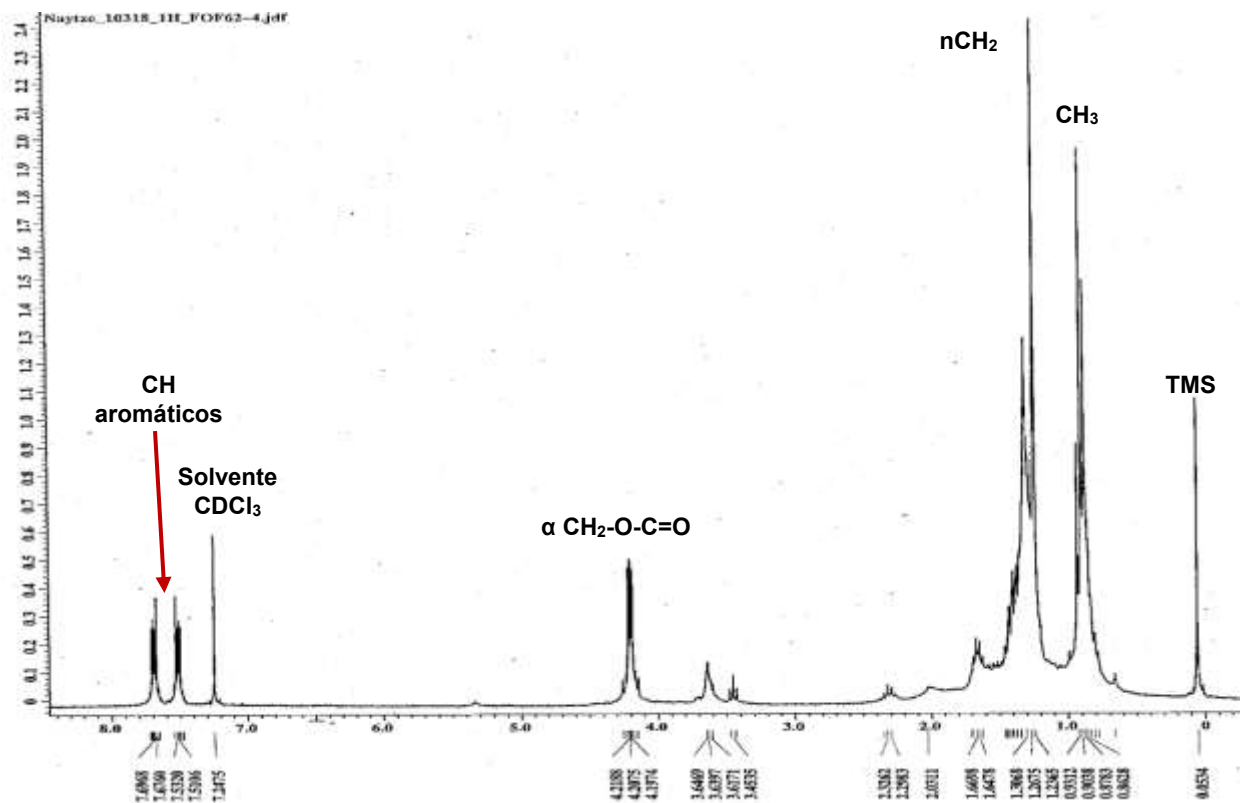


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H de la banda B0.

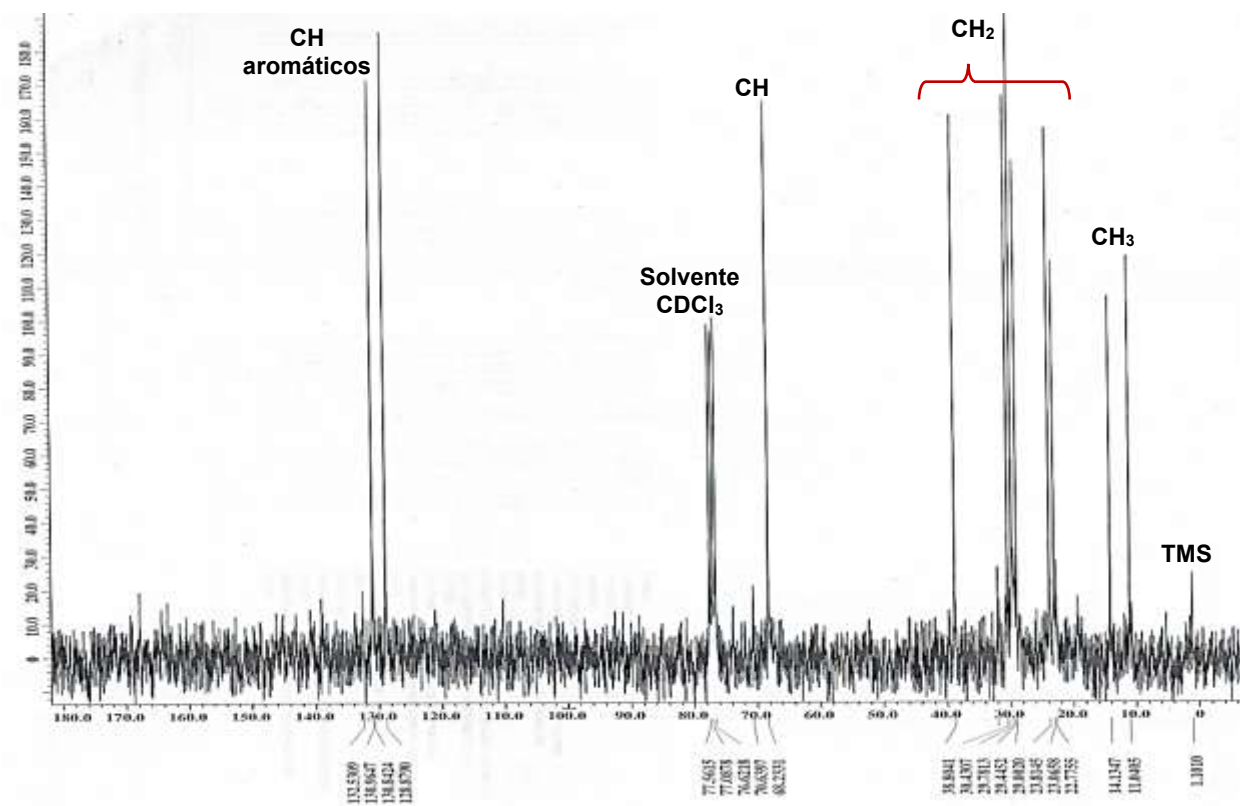


Figura 7. Espectro de RMN de ^{13}C de la banda B0.

IR (Figura 8): 2959 ($\nu_{\text{as}}\text{-CH}_3$), 2926 ($\nu_{\text{as}}\text{-CH}_2$ y aromáticos), 2857 ($\nu_{\text{s}}\text{-CH}_2$), 2360 y 2342 (sobretono δ -aromáticos), 1727 ($\nu\text{-C=O}$ de un aril éster) 1601 y 1581 (C=C anillo aromático), 1463 ($\delta_{\text{as}}\text{-CH}_3$), 1381 ($\delta_{\text{s}}\text{-CH}$), 1269 ($\nu_{\text{as}}\text{-C-O-C}$ de un aril éster), 1121 (C-O), 1072, 1040, 800, 743, 705 (anillo disustituido) cm^{-1} (Nakanishi y Solomon, 1977).

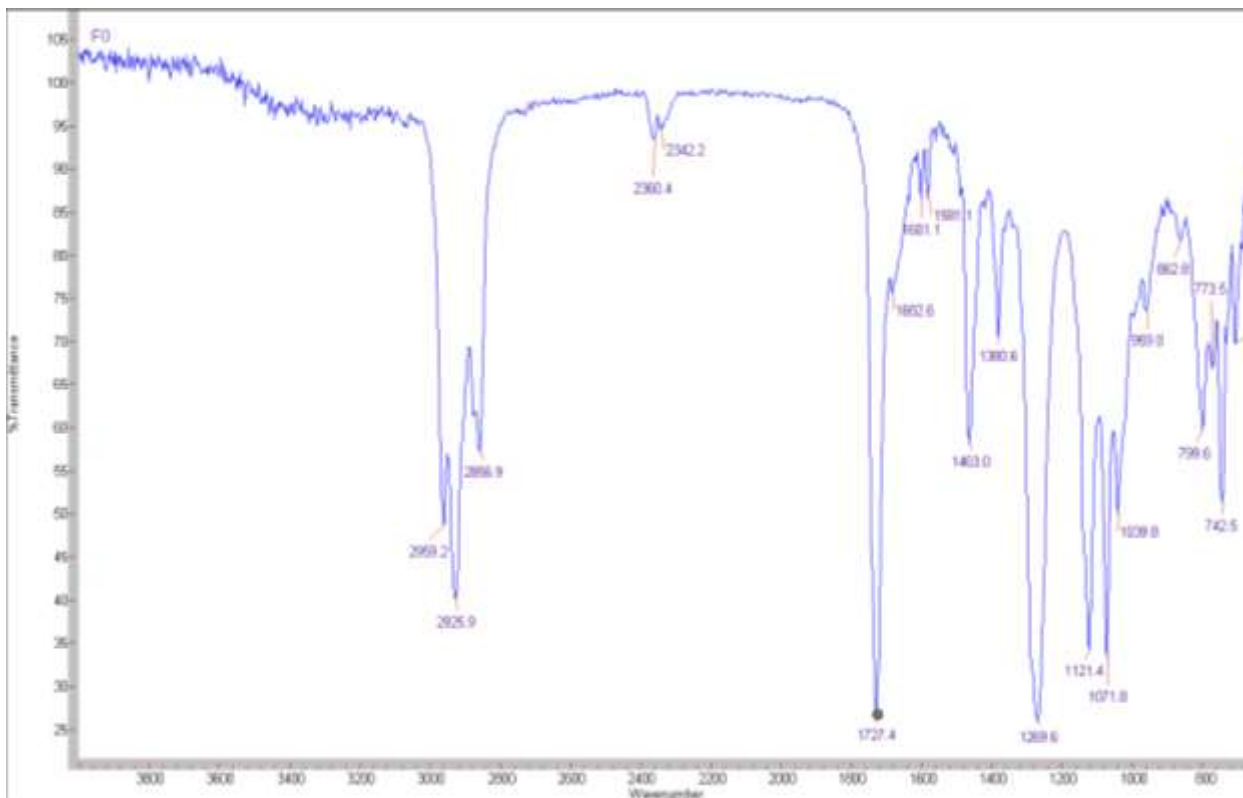


Figura 8. Espectro IR de la banda B0.

El cromatograma de GC-MS mostró la presencia de varios picos con tiempo de retención: 22.44 min, 27.4 min, 28.69 min, 33.51 min, 35.6 min, 36.35 min y 37.03 min.

La **banda B1** consistió en una muestra semisólida amarilla cuyos datos espectroscópicos y espectrométricos fueron: RMN ^1H (Figura 9) (270 MHz, CDCl_3/TMS): δ 0.8461 (terminal CH_3), 1.2217 (s, $n\text{CH}_2$), 3.4362 (m, $\text{CH}_2\text{-C=O}$), 3.6266 (m, $\text{CH}_2\text{O-C=O}$), 4.1908 (m, $\text{CH}_2\text{-OCO}$), 7.2308 (s, CDCl_3).

IR (Figura 10): 2958 ($\delta_{\text{as}}\text{-CH}_3$), 2924 ($\nu_{\text{as}}\text{-CH}_3$), 2853 ($\nu_{\text{as}}\text{-CH}_2$ y aromáticos), 1730 ($\nu\text{-C=O}$ de un aril éster), 1669, 1462 ($\delta_{\text{as}}\text{-CH}_3$), 1379, 1260, 1095, 1025, 861, 801, 758 cm^{-1} .

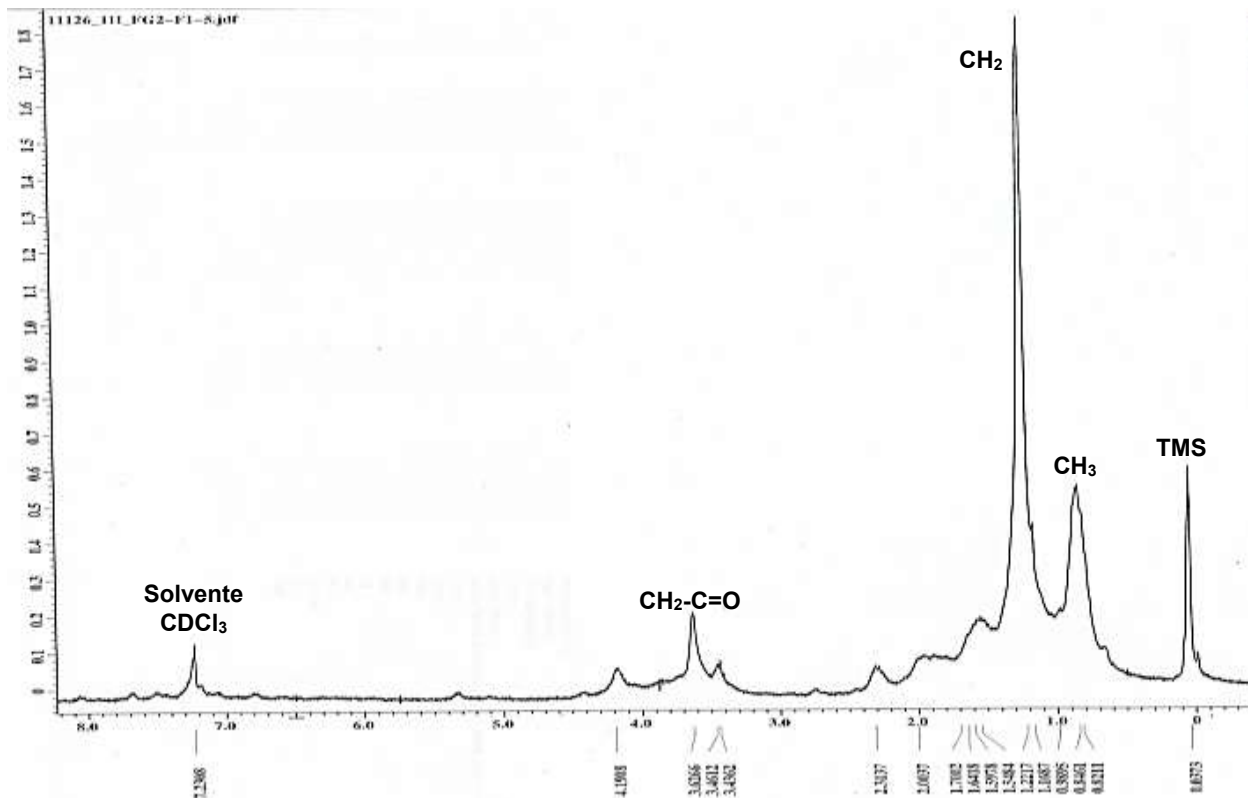


Figura 9. Espectro RMN ¹H de la banda B1.

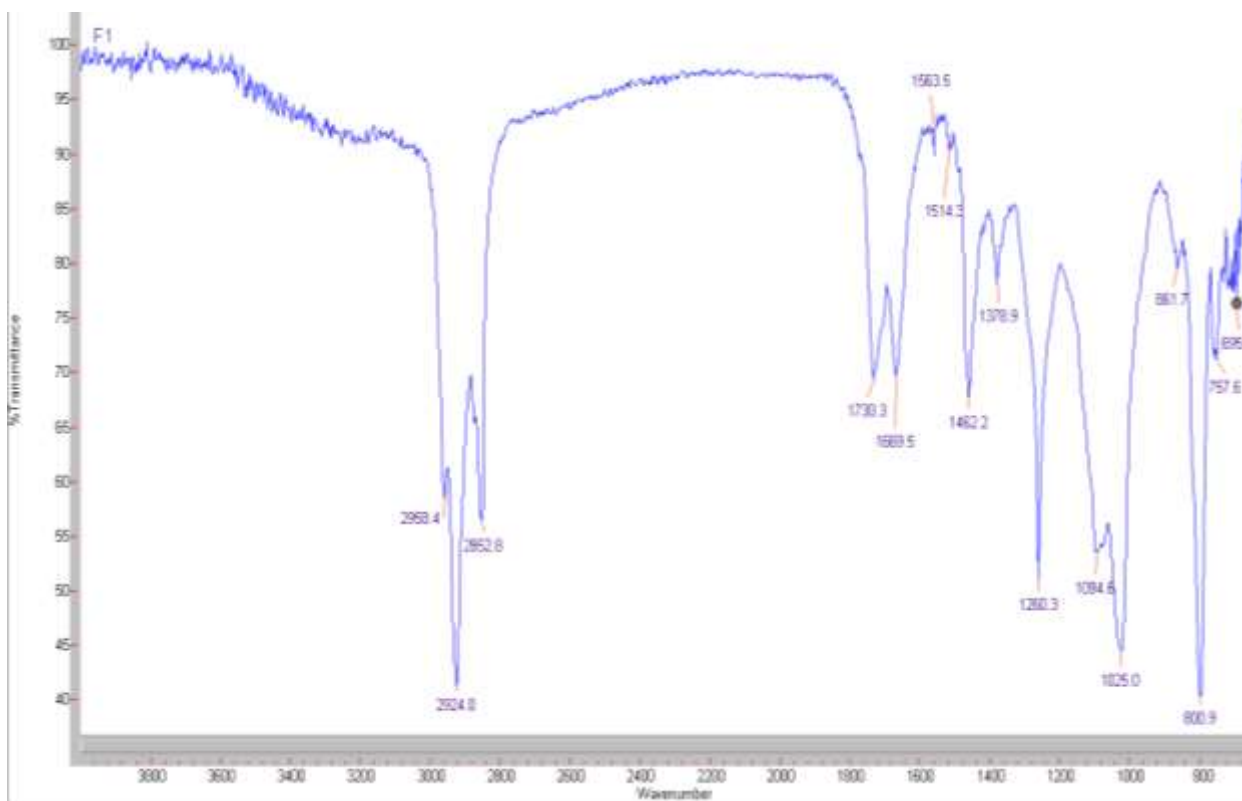


Figura 10. Espectro IR de la banda B1.

El cromatograma GC-MS mostró la presencia de varios picos con tiempo de retención: 19.11 min, 20.38 min, 21.56 min, 22.09 min, 22.41 min, 24.81 min, 25.91 min, 26.63 min, 26.9 min, 27.38 min, 27.38 min, 28.68 min, 33.5 min y 35.53 min.

La **banda B3** consistió en una muestra semisólida amarilla-café cuyos datos espectroscópicos y espectrométricos fueron: RMN ^1H (Figura 11) (270 MHz, CDCl_3/TMS): δ 0.8628 (m, terminal CH_3), 1.2365 (s, $n\text{CH}_2$), 3.4546 (t, $\gamma\text{CH}_2\text{-O-C=O}$), 3.6421 (m, $\beta\text{CH}_2\text{-O-C=O}$), 4.1944 (m, $\alpha\text{CH}_2\text{-O-CO}$), 7.2475 (s, CDCl_3), 7.4510 (m), 7.5653 (m) y 8.0682 (d) (CH aromáticos).

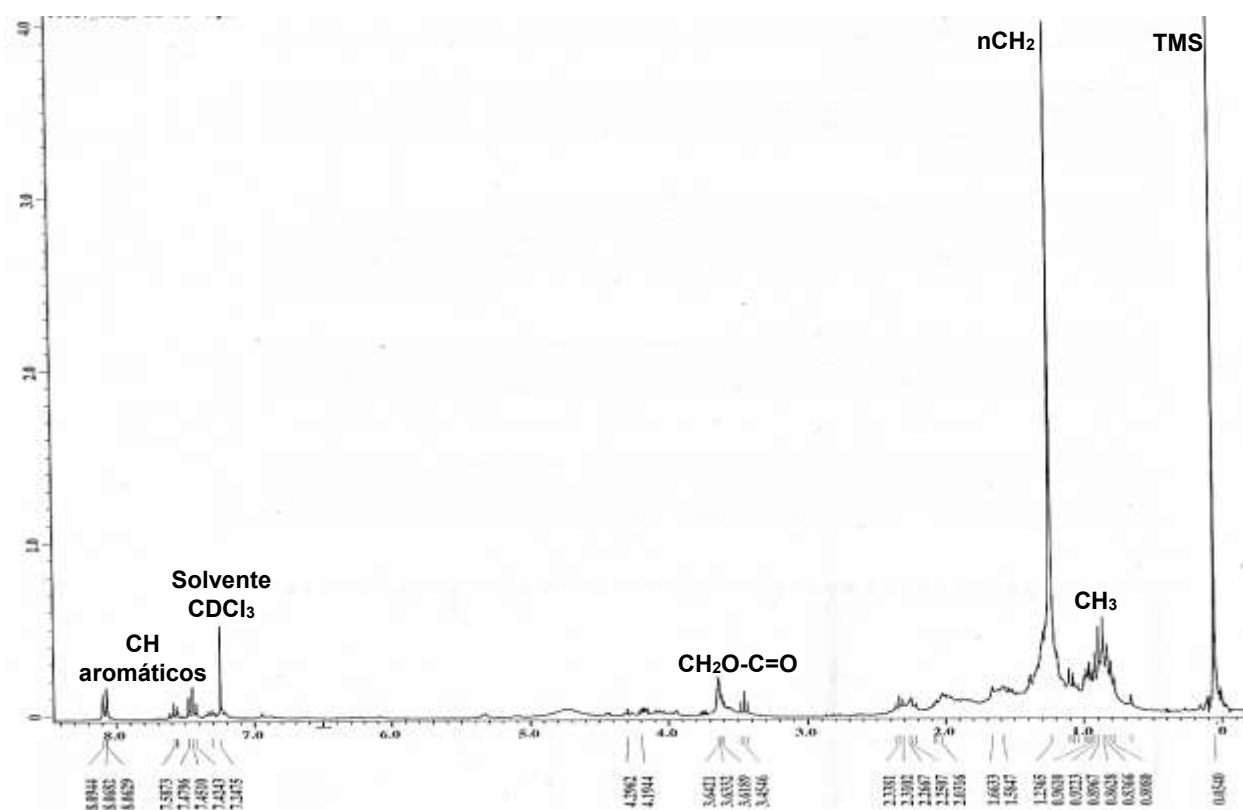


Figura 11. Espectro de RMN ^1H de la banda B3.

IR (Figura 12): 2959 ($\delta_{\text{as}}\text{-CH}_3$), 2922 ($\nu_{\text{as}}\text{-CH}_3$), 2852 ($\nu_{\text{as}}\text{-CH}_2$ y aromáticos), 2362, 1781, 1699, 1458, 1387, 1261, 1098, 1026, 861, 801, 756, 714 cm^{-1} .

El cromatograma de GC-MS mostró la presencia de varios picos con tiempo de retención: 10.66 min, 20.52 min, 22.14 min, 22.45 min, 24.83 min, 27.12 min, 27.28 min y 35.51 min.

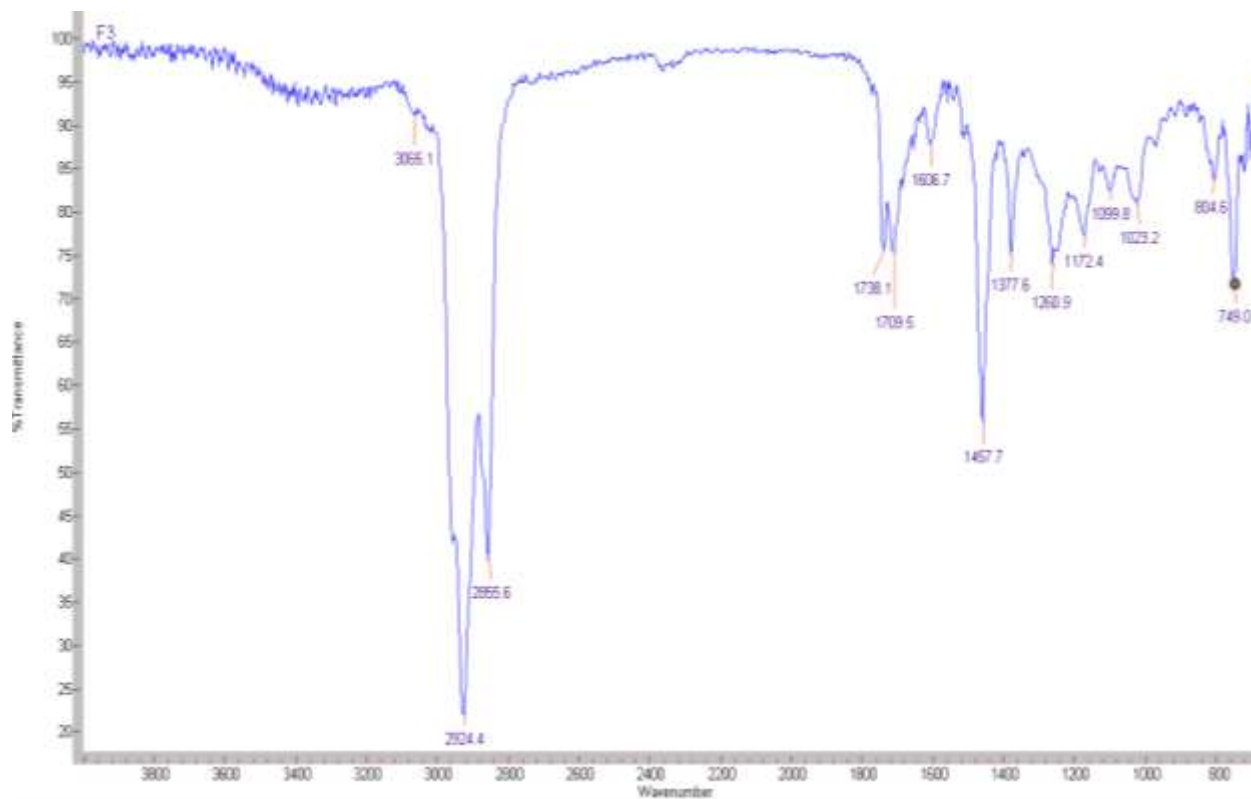


Figura 12. Espectro de IR de la banda B3.

El cromatograma de GC-MS del extracto crudo mostró algunas de las señales presentes en las bandas extraídas, i.e., los picos con tiempo de retención de 20.91 min, 24.83 min, 25.54 min, 26.3 min, 27.45 min, 36.78 min y 43.09 min.

Los compuestos que se lograron identificar de acuerdo a sus espectros de masas se enlistan en la Tabla 7.

Tabla 7. Compuestos identificados presentes en las bandas extraídas.

Compuesto propuesto	Procedencia (banda y pico)	CAS	Peso molecular y Formula química
Cicloalanil-prolina	B1-19.11 min	65556-33-4	PM. 168 C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂
Cicloprolin-prolina	B1-22.09 min	6708-06-1	PM. 194 C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₂
Ciclofenilalanil-prolina	B1-26.63 min B3-27.12 min	14705-60-3	PM.244 C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₂
Ciclofenilalanil-valina	B1-25.91 min	14474-71-6	PM. 246 C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₂
Ciclofenilalanil-leucina	B1-26.9 min	7280-77-5	PM. 260 C ₁₅ H ₂₀ N ₂ O ₂
Ácido hexadecanoico	B0-22.4 min B1-22.41 min B3-22.45 min L2-25.1 min	57-10-3	PM. 256 C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Ácido octadecanoico o esteárico	B1-24.81 min B3-24.83 min L2-27.79 min	57-11-4	PM. 284 C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Tremulona o stigmasta-3,5-dien-7-one	B0-36.35 min	20334-72-2	PM. 410 C ₂₉ H ₄₆ O
Sitosterol	B0-35.6 min B1-35.53 min	83-47-6	PM. 414 C ₂₉ H ₅₀ O
3-metil undecano	L2-25.54 min	1002-43-3	PM 170 C ₁₂ H ₂₆
Ácido vaccenico	L2-27.45 min	506-17-2	PM. 282 C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Ftalato mono etilhexil (MEHP) *	B0- 28.69 min B1-28.68 min B3-28.7 min L2-32.05 min	4376-20-9	PM. 278 C ₁₆ H ₂₂ O ₄
Fosfato de Tri-butoxi-etilo (TBEP) *	B0-27.4 min B1-27.38 min B3-27.4 min	78-51-3	PM. 398 C ₁₈ H ₃₉ O ₇ P
Ciclobutano-1,1-dicarboxamida. N,N'-di-benzoiloxi *	B3-10.66 min L2-12.32 min	65-85-0	PM. 382 C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₆

* Compuesto proveniente del medio de cultivo o del solvente.

Los espectros de masas de los ciclodipéptidos encontrados muestran señales características de las dicetopiperazinas. En los ciclodipéptidos con fenilalanina destaca la señal a m/z 91 del ion tropilio, y en los que contienen prolina la señal a m/z 70 de la pirrolina protonada.

Las señales de los ciclodipéptidos conformados por prolina concuerdan con el patrón de fragmentación propuesto por Furtado *et al.* (2007).

El espectro de la cicloalanil-prolina (Figura 13) tiene un ion molecular a m/z 168. La señal a m/z 140 representa $[M^+ - CO]$. La señal a m/z 125 equivale a $[M^+ - CH_2NHCH_2]$, y la posterior pérdida de CO de este origina el ion a m/z 97. El ion a m/z 44 pertenece al ion $[NH_2CHCH_3]$.

Las señales características de la cicloalanil-prolina coinciden con las reportadas por Brack, et al, (2014), el pico base a m/z 70 y los picos a m/z 44, 69, 97, 125 y 168.

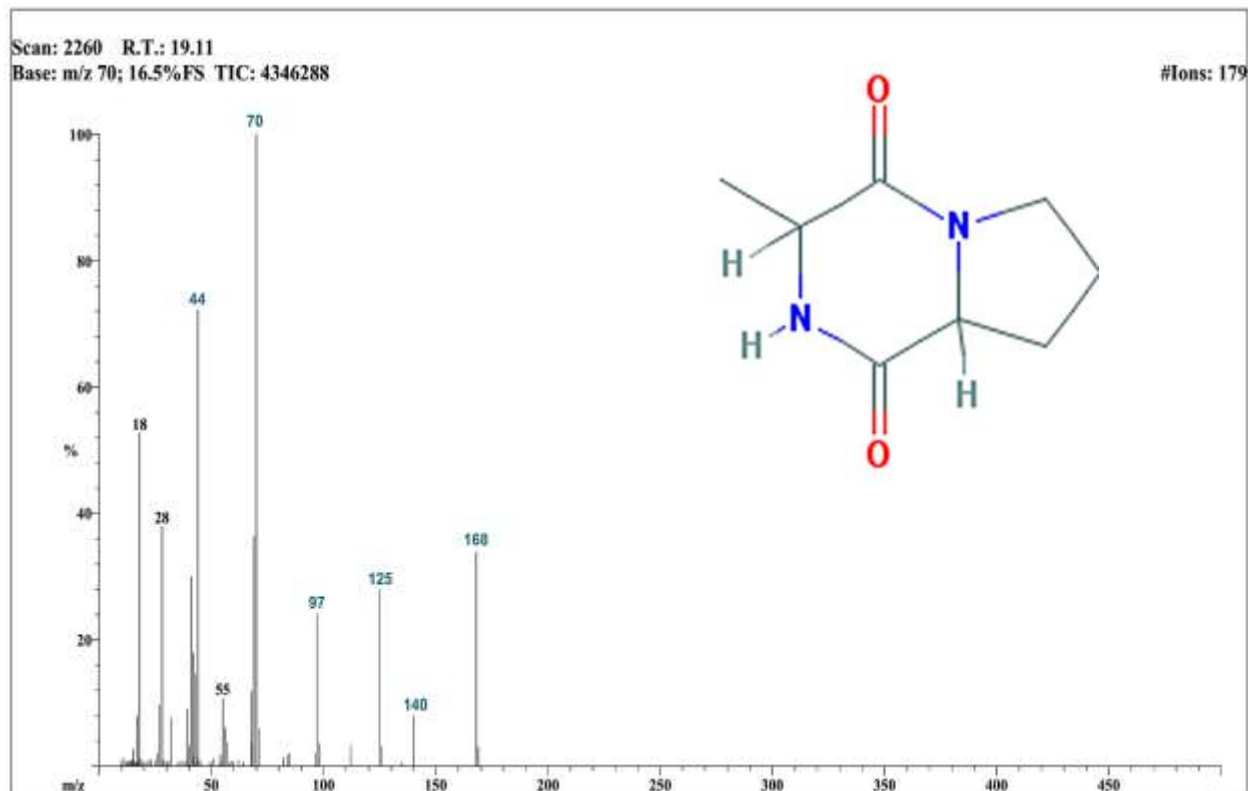


Figura 13. Espectro de masas de la cicloalanil-prolina.

El espectro correspondiente a la cicloprolin-prolina (Figura 14) tiene el ion molecular a m/z 194. El ion a m/z 124 representa $[M^+ - CH_2NHC_3H_5]$, la posterior pérdida de CO origina el ion a m/z 96. El ion a m/z 166 representa $[M^+ - CO]$, y la posterior fragmentación de este, produce el ion a m/z 57 $[NH_2CHR^2]$. La pérdida de un residuo de prolina del ion molecular origina el ion a m/z 96.

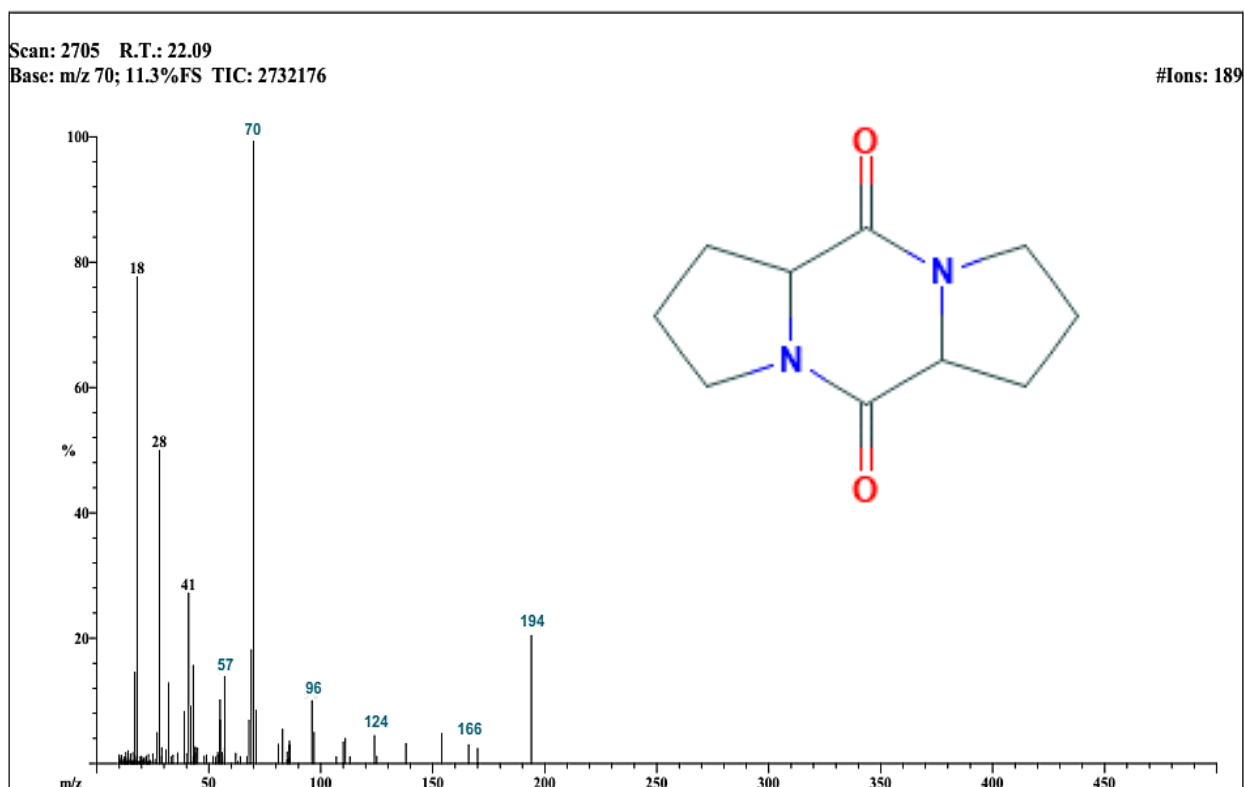


Figura 14. Espectro de masas de la cicloprolin-prolina.

En el caso del espectro del ciclofenilalanil-prolina (Figura 15) el ion molecular se observa a m/z 244, la pérdida de $-HCNO$ produce la señal a m/z 201. La señal a m/z 125 equivale a $[M^+ - CH_2NHCH_2]$, y la posterior pérdida de CO de este origina el ion a m/z 97. El ion a m/z 120 pertenece al ion $[NH_2CHC_7H_7]$. El $[M^+ - 91]$ a m/z 153 representa la pérdida del bencilo y posterior a esta por una pérdida de $-CO$ da el pico a m/z 125. Las señales características de la ciclofenilalanil-prolina coincide con las reportadas por Brack *et al.* (2014) el pico base a m/z 125 y los picos a m/z 41, 70, 91, 92, 120, 153 y 244.

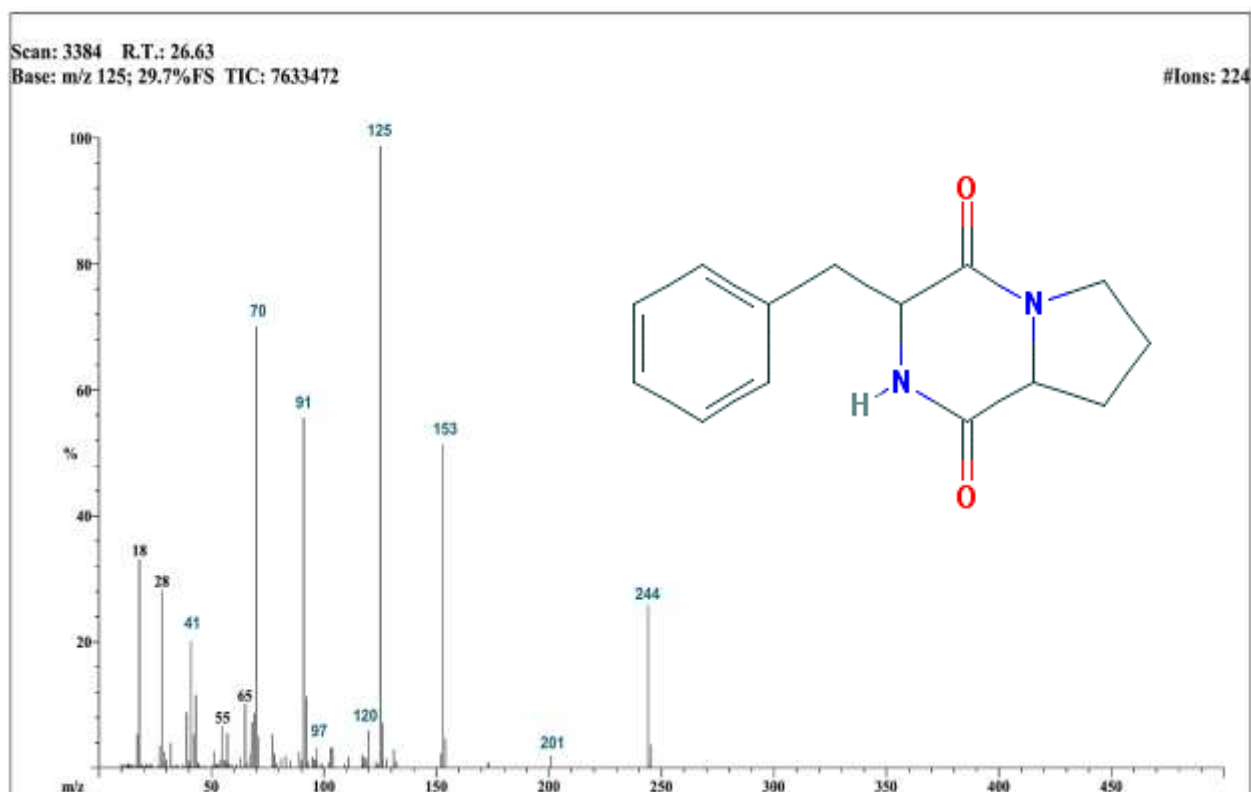


Figura 15. Espectro de masas de la ciclofenilalanil-prolina.

El espectro de la ciclofenilalanil-valina (Figura 16) presenta el ion molecular a m/z 246, la pérdida de $-C_3H_7$ de la valina produce la señal a m/z 204. El $[M^+-71]$ a m/z 175 representa la pérdida de C_4H_7O y el $[M^+-91]$ a m/z 155 la pérdida de bencilo. A m/z 120 y m/z 74 se originan los dos fragmentos de los sustituyentes unidos al NH. Además, se observan las señales de la serie $C_nH_{2n+2}N$ a m/z de 30, 44, 58 y 72. Y el pico a m/z 28 equivale al CO. Las señales características de la ciclofenilalanil-valina son aquellas a m/z 85, 91, 127, 155, 175, 204, y 246 (Zheng *et al.*, 2005).

El espectro de la ciclofenilalanil-leucina (Figura 17) tiene un ion molecular a m/z 260. La señal a m/z 204 representa la pérdida de la cadena C_4H_9 de la leucina. La pérdida del bencilo de la fenilalanina del ion molecular da la señal a m/z 169, posteriormente la pérdida de C_2H_4 da el ion a m/z 141, la pérdida de otro metilo origina el pico a m/z 113. A m/z 120 y 85 se originan los dos fragmentos de los sustituyentes unidos al NH.

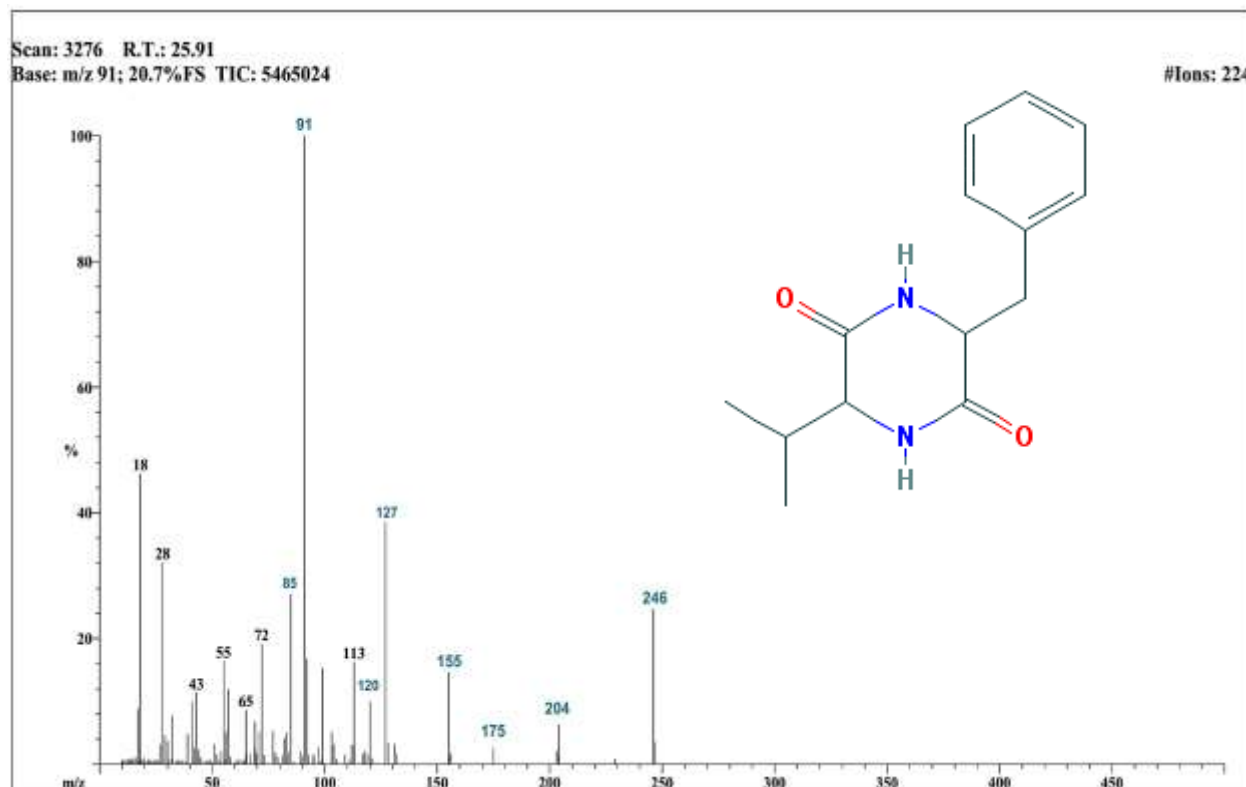


Figura 16. Espectro de masas de la ciclofenilalanil-valina.

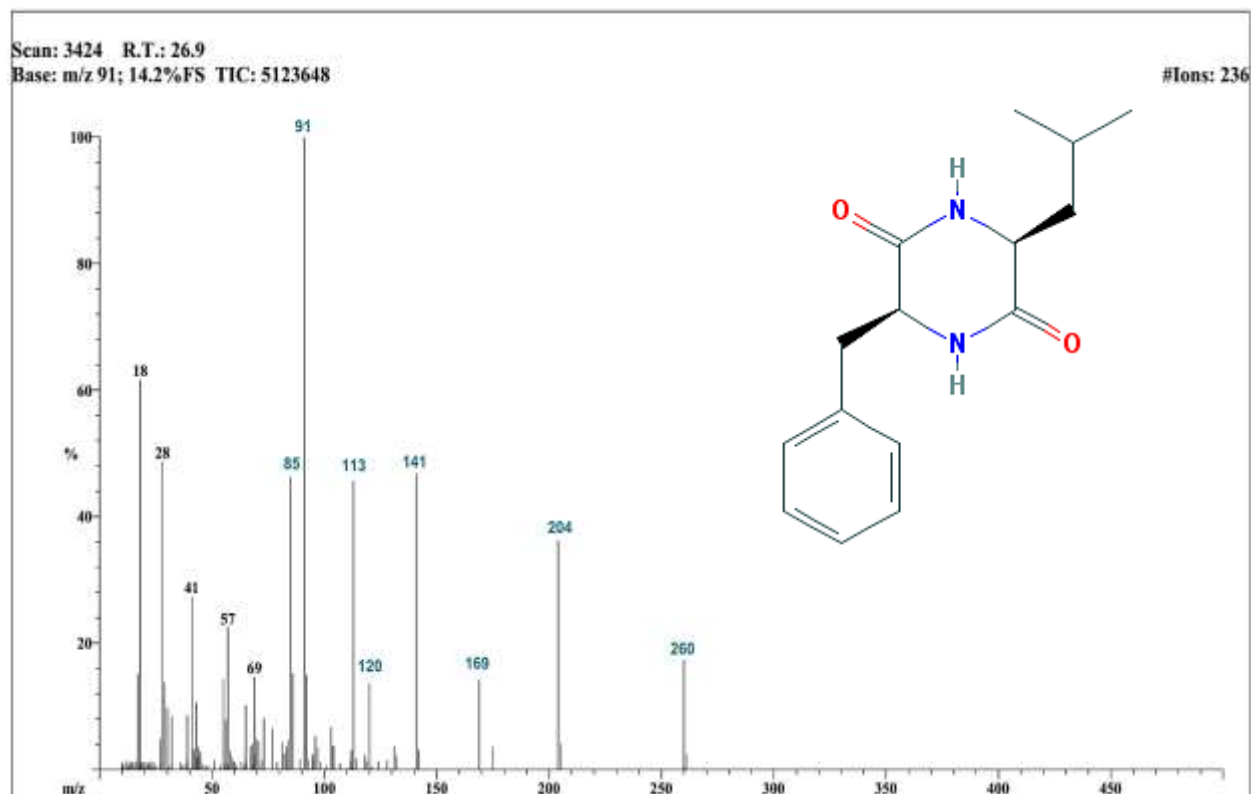


Figura 17. Espectro de masas de la ciclofenilalanil-leucina.

Los espectros correspondientes al ácido hexadecanoico (Figura 18) y al ácido octadecanoico (Figura 19) mostraron las señales características de un ácido graso. Los iones moleculares fueron aquellos a m/z 256 y 284, respectivamente. Las señales de mayor intensidad representan los fragmentos hidrocarbonados de tipo alquílico C_nH_{2n+1} a m/z 43, 57, 71, 85, 99 y 113 acompañados de señales de la serie C_nH_{2n-1} a m/z 41, 55, 69, 83, 97, 111 y 125 que en miembros superiores equivalen a fragmentos de la serie $C_nH_{2n-3}O$. También presentaron los fragmentos producidos por el rearrreglo de McLafferty a m/z 60 y el fragmento correspondiente a la pérdida de propilo $[M^+ - 43]$ a m/z 113 para el ácido hexadecanoico y a m/z 241 para el ácido octadecanoico.

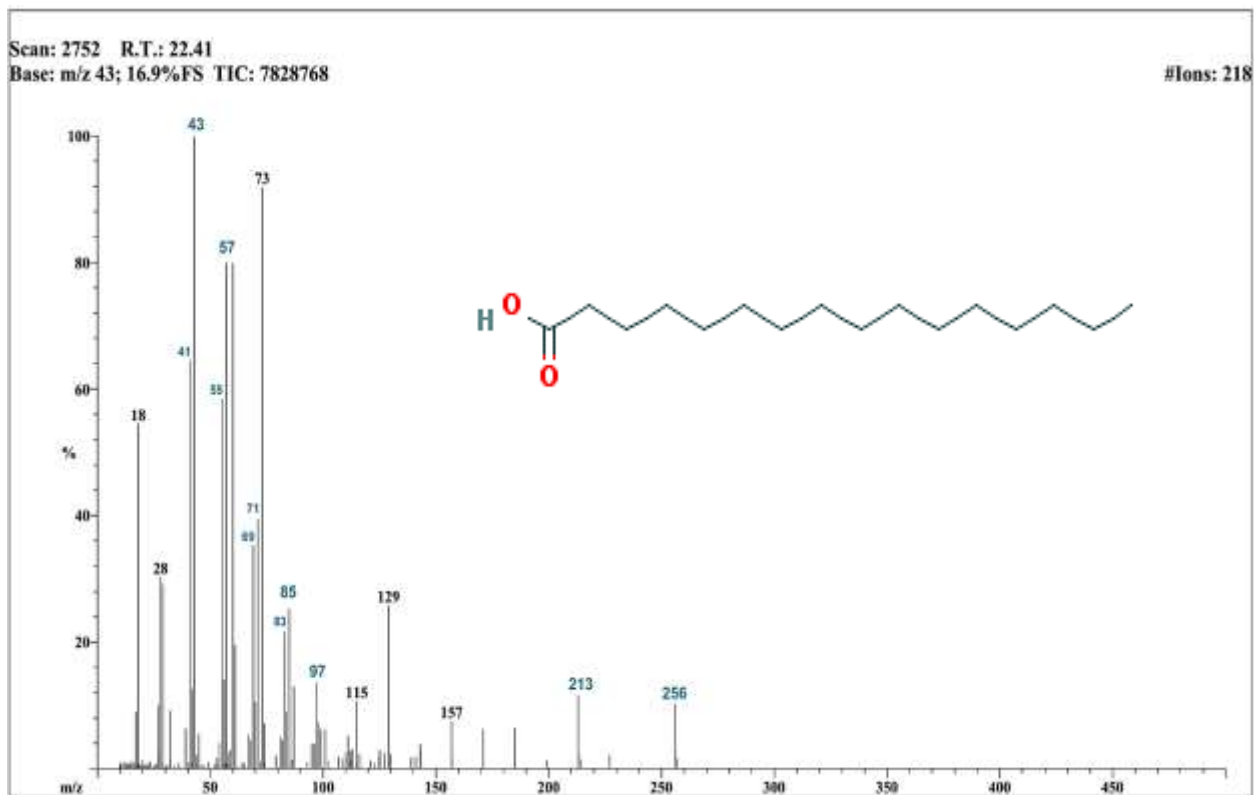


Figura 18. Espectro de masas del ácido hexadecanoico.

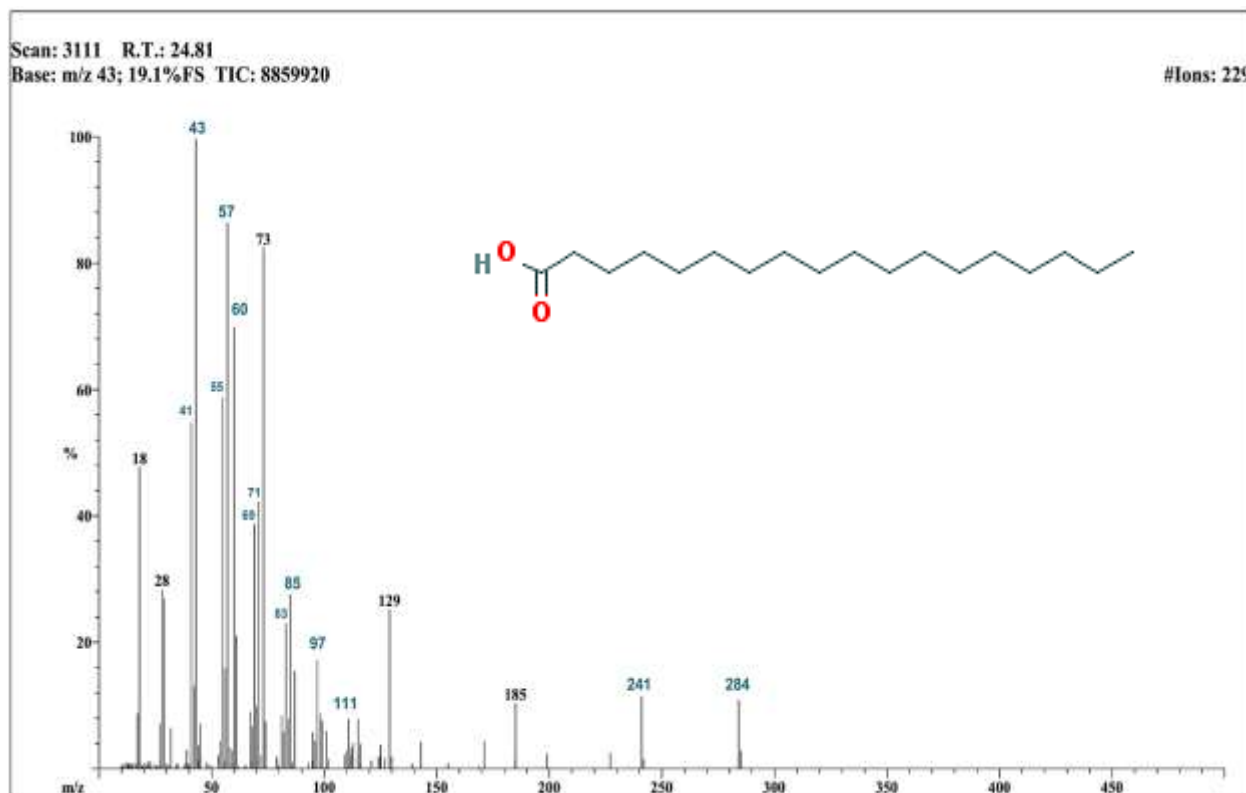


Figura 19. Espectro de masas del ácido octadecanoico.

El espectro de masas correspondiente al sitosterol (Figura 20) muestra el ion molecular a m/z 414 y iones característicos para Δ_5 -esteroles (Nes y Parish, 1989). La deshidratación del sitosterol da el ion a m/z 396, la posterior pérdida de la cadena lateral ($C_{10}H_{21}$) el ion a m/z 255 y después la pérdida de $-C_2H_2$ origina el ion a m/z 229. El ion $[M^+ - CH_3]$ a m/z 399 se deshidrata y forma el ion a m/z 381. El fragmento a m/z 273 pertenece a $[M^+ - \text{la cadena lateral } C_{10}H_{21}]$. El fragmento a m/z 231 es producido por la fisión del anillo D y su posterior deshidratación produce el ion a m/z 213.

El espectro de masas correspondiente a la tremulona o estigmasta-3,5-dien-7-ona (Figura 21) muestra el ion molecular a m/z 410 y iones característicos para esteroides con cetona en C-7 (Budzikiewicz y Djerassi, 1962). El fragmento a m/z 269 es producido por la pérdida de la cadena lateral ($C_{10}H_{21}$). La escisión β del enlace 8-14 seguido por la ruptura del enlace 12-13, 11-12 y 9-11 generan los iones a m/z 187, 174 y 161, respectivamente.

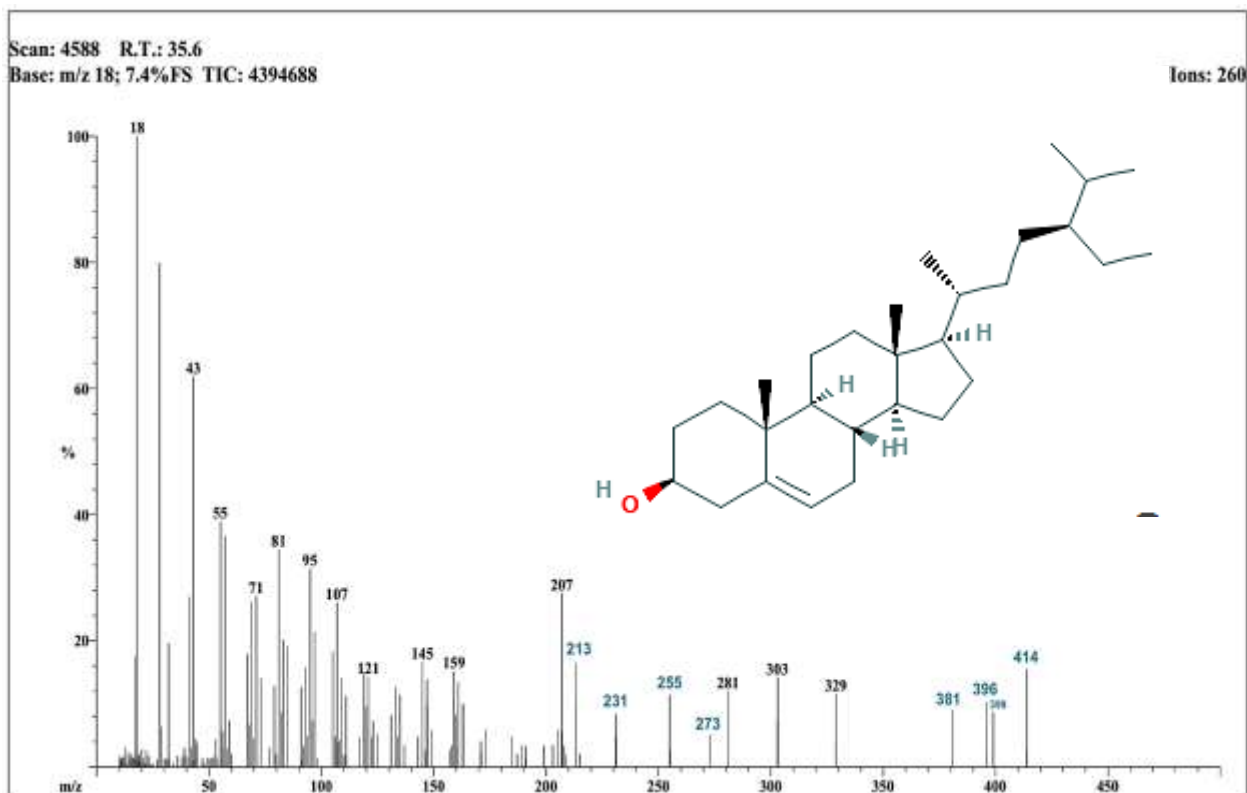


Figura 20. Espectro de masas del β -Sitosterol.

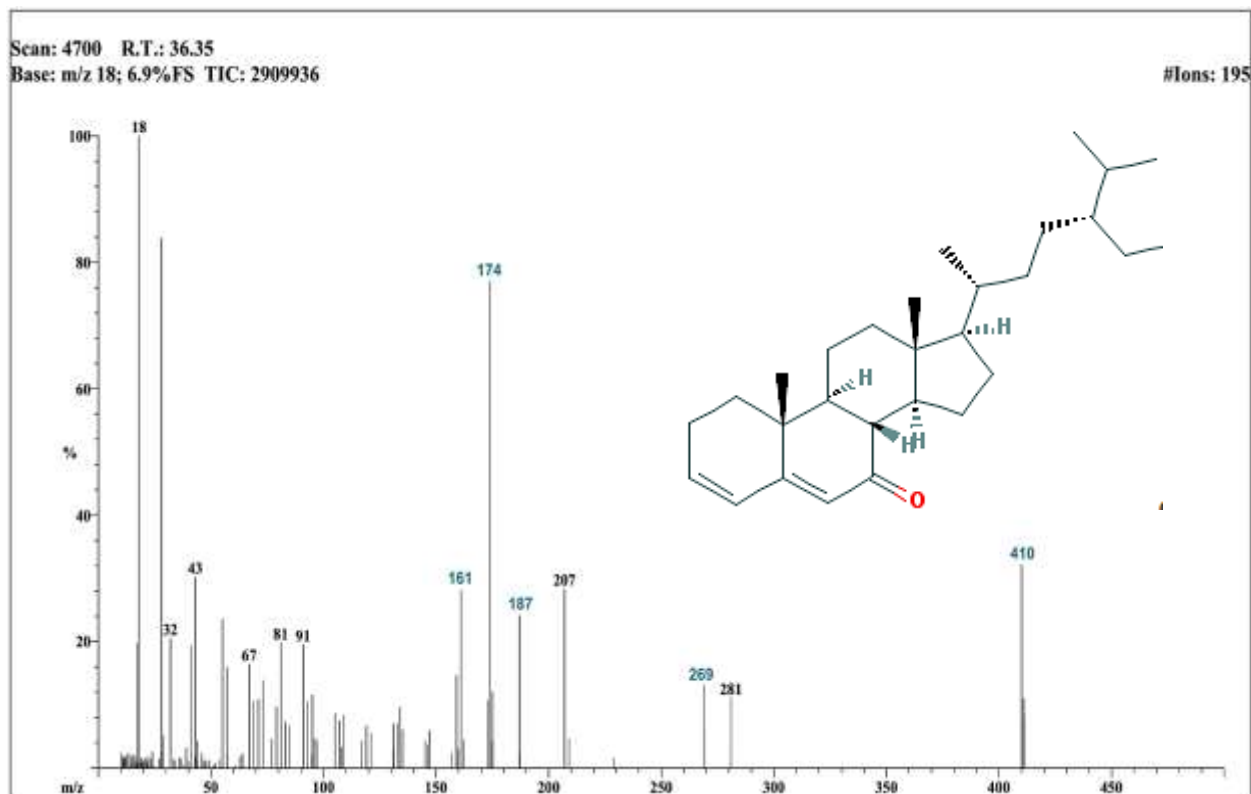


Figura 21. Espectro de masas de la tremulona.

El espectro de masas correspondiente al 3-metil-undecano (Figura 22) muestra un clásico espectro de alcanos representada por la serie a m/z 43, 57, 71, 85, 99, 113, 127, 141, 155 y el ion molecular esta a m/z 170. También muestra señales más débiles de la serie C_nH_{2n+1} a m/z 27, 41, 55, 69, 83 y 97. Debido a que los enlaces C-C se escinden con preferencia en los puntos de ramificación el fragmento a m/z 141 muestra mayor intensidad.

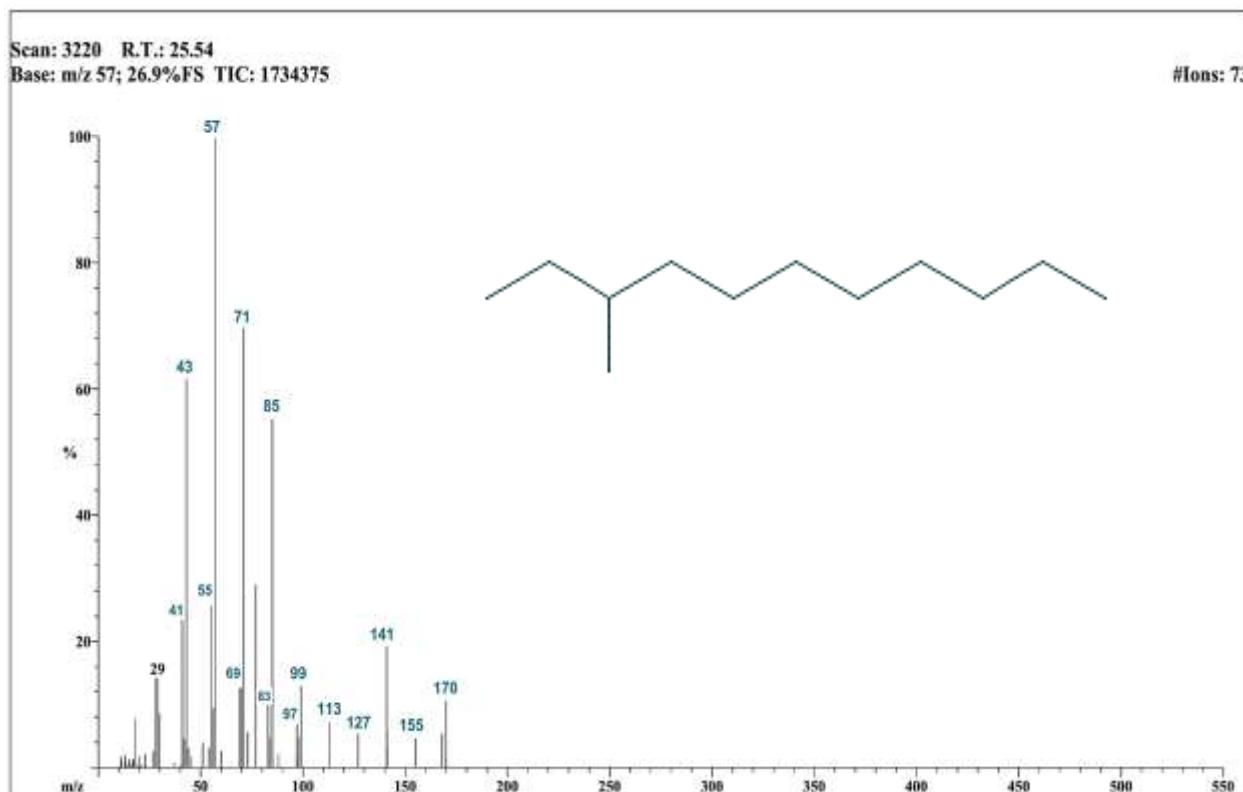


Figura 22. Espectro de masas del 3-metil-undecano.

El espectro correspondiente al ácido vaccénico (Figura 23) es característico de un ácido graso $C_{18:1}$. El ion a m/z 264 representa el $[M^+ - H_2O]$. Los máximos pertenecen a la serie C_nH_{2n-1} provocadas por la insaturación a m/z 41, 55, 69, 83, 97, 111, 125, 137 y 153. También se observan señales más débiles de la serie C_nH_{2n+1} a m/z 43, 57, 71, 85, 99, 127, 153 y de la serie C_nH_{2n-3} a m/z 39, 53, 67, 81, 95, 109, 123, 137 y 151.

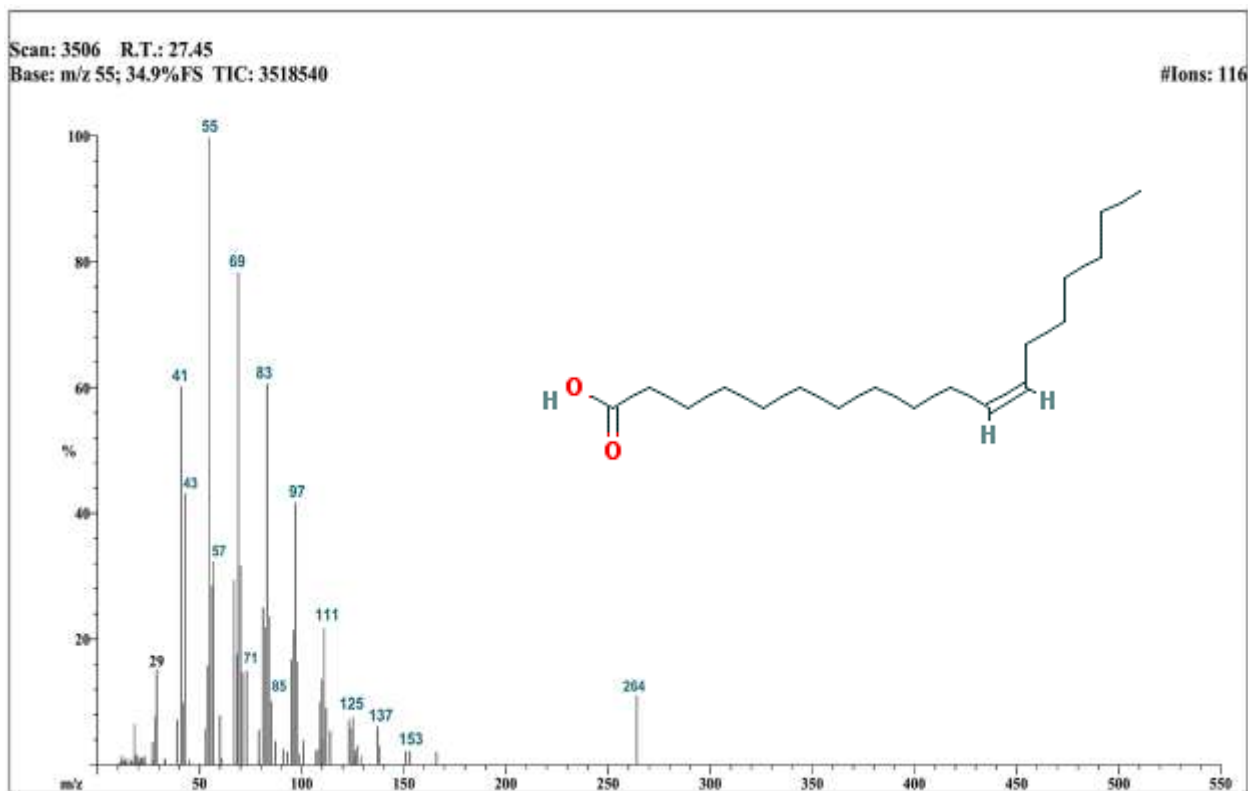


Figura 23. Espectro de masas del ácido vaccénico.

De acuerdo a la comparación de los análisis de GC-MS del control negativo, el extracto crudo y de las bandas extraídas se determinó que los compuestos que se describen a continuación no fueron producidos por *Sphingomonas* sp. 3a-1.

El espectro correspondiente al MEHP (Figura 24) muestra las señales características de un ftalato de acuerdo a lo reportado por Yin *et al.* (2014). La señal del ion $[M^+ + 1]$ se muestra a m/z 279. El pico base a m/z 149 corresponde al anhídrido protonado del ácido ftálico. La fragmentación del anhídrido anterior da los picos a m/z 121, 104, 93, 76 y 65. El pico a m/z 167 equivale al fragmento producido por la escisión del enlace O-alquílico con transposición doble de hidrógeno $[M^+ - (113 + 2)]$. El pico a m/z 113 equivale a la cadena del etilhexil (C_8H_{17}). También se observan señales de la serie C_nH_{2n+1} a m/z 43, 57 y 71 pertenecientes a la fragmentación de la cadena alquílica.

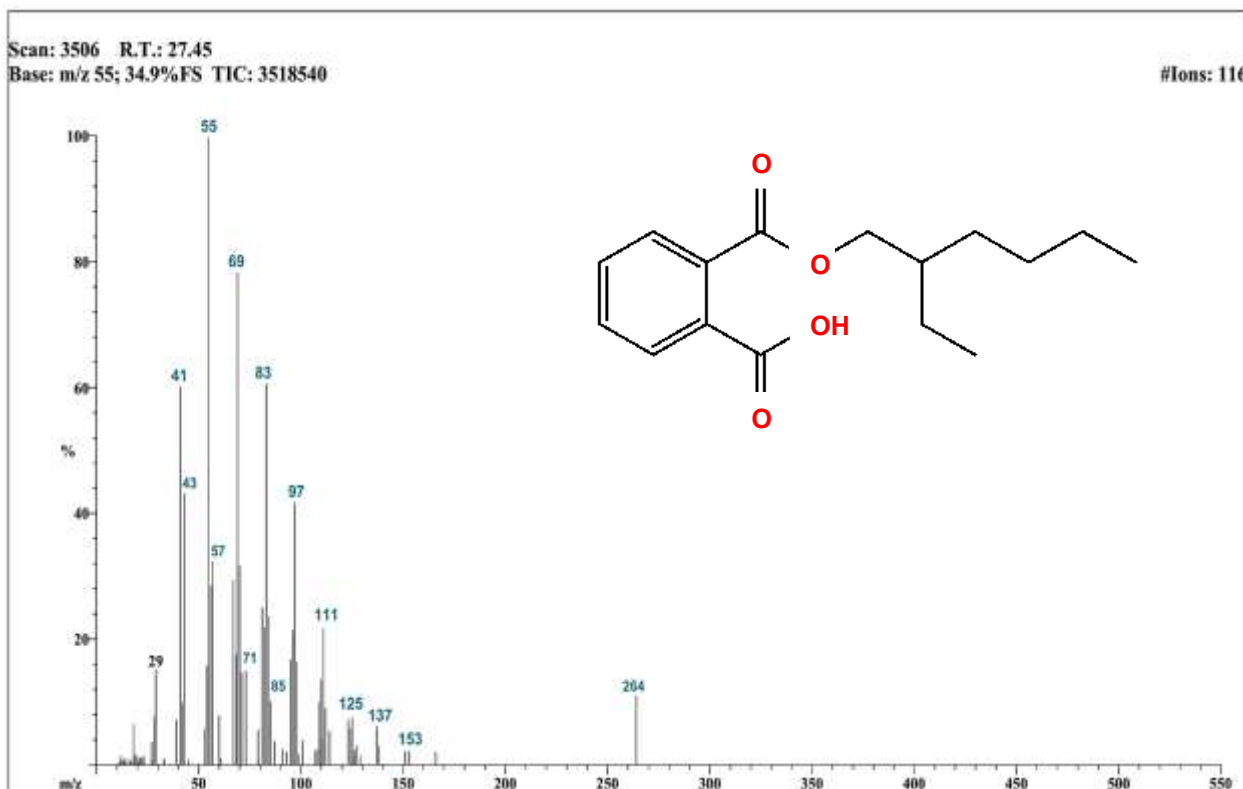


Figura 24. Espectro de masas del MEHP.

El espectro correspondiente al TBEP (Figura 25) muestra el pico perteneciente a $[M^+ - 43]$ a m/z 355. El pico a m/z 299 pertenece a la pérdida de un butoxietil más 2 H. Posteriormente por la pérdida de otro C_4H_9 dan el pico a m/z 242. La pérdida de 2 butoxietilos y la transposición de H en los oxígenos dan el pico a m/z 199. El pico a m/z 101 representa el $C_6H_{13}O$. Además, presenta picos de la serie de alcanos debida a las cadenas laterales C_nH_{2n+1} y los fragmentos de la serie $C_nH_{2n+1}O$ a m/z 31, 45 y 59.

El espectro correspondiente al ciclobutano-1,1-dicarboxamida,N,N dibenzoiloxi (Figura 26) muestra señales similares a las del ácido benzoico. El ion a m/z 122 corresponde al ácido benzoico protonado. El ion base a m/z 105 corresponde a la deshidratación del anterior. La señal a m/z 77 equivale a C_6H_5 del anillo aromático y la señal a m/z 51 a uno de sus fragmentos. La señal a m/z 28 es la que le da la identidad diferente del ácido benzoico y es debida a la fragmentación del ciclobutano presente en la molécula.

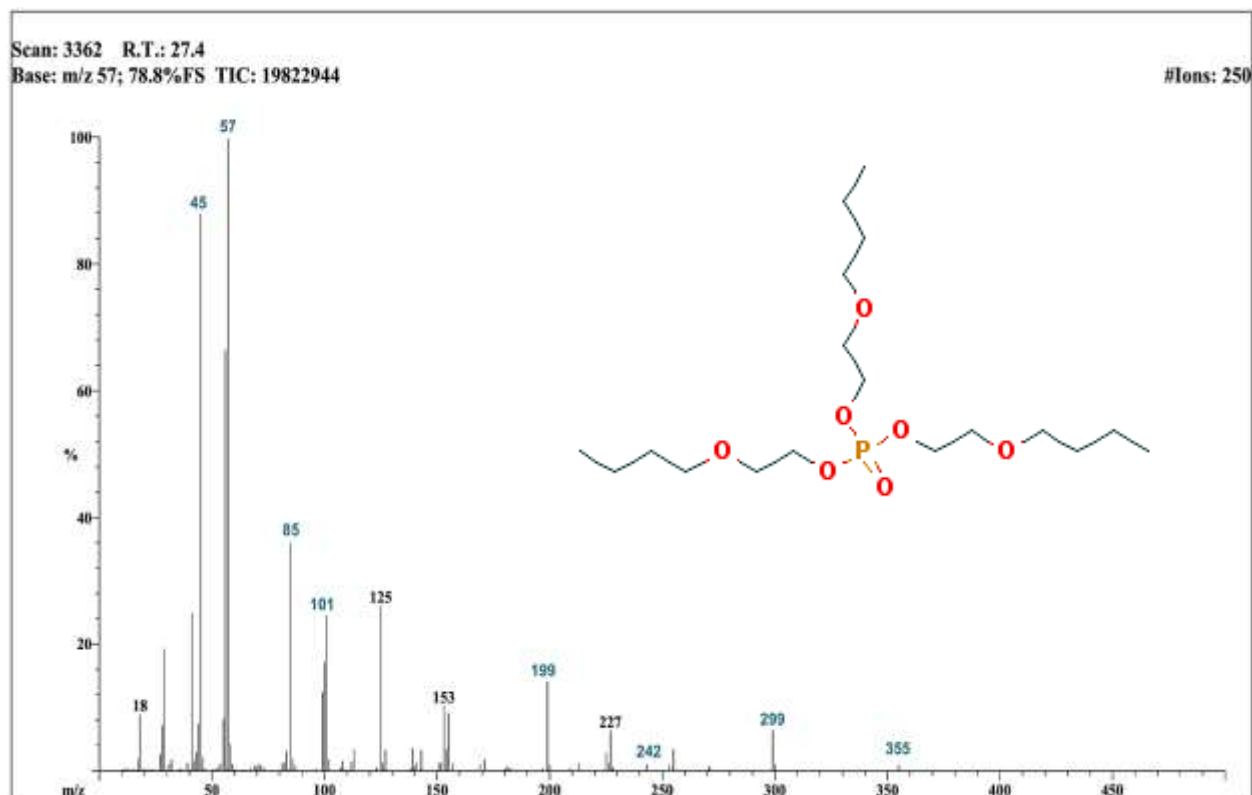


Figura 25. Espectro de masas del TBEP.

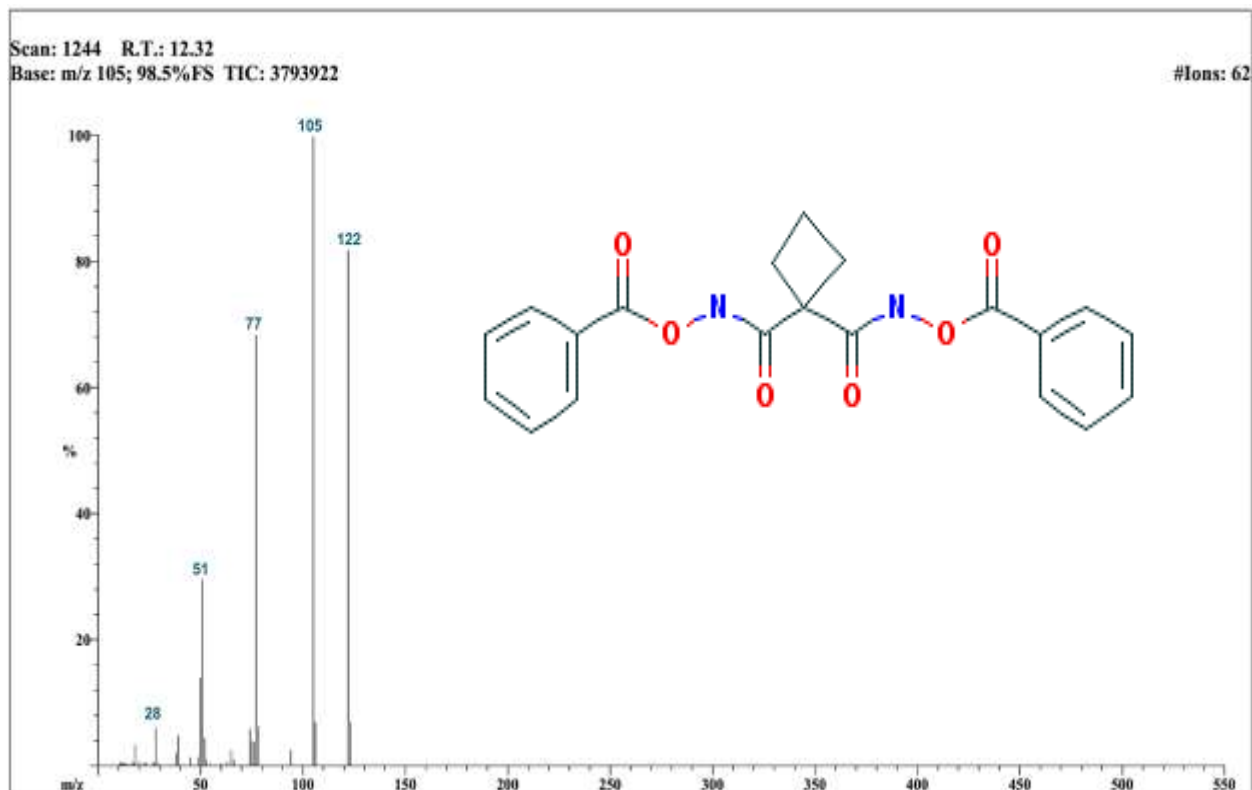


Figura 26. Espectro de masas del ciclobutano-1,1-dicarboxamida,N,N dibenzoiloxi.

El ácido hexadecanoico (AH), ácido octadecanoico (AO), β -sitosterol (SI), DEHP y MEHP se adquirieron en grado reactivo y se evaluaron por su actividad antiAGEs. Lo anterior, para definir su aportación en la actividad antiAGEs de las bandas extraídas. El AH, AO y SI se evaluaron debido a que fueron aquellos compuestos que se encontraron en las tres bandas extraídas. Con los resultados obtenidos no se pudo determinar si el ftalato encontrado era DEHP o MEHP por lo que ambos fueron evaluados. Los resultados se muestran en la Figura 27.

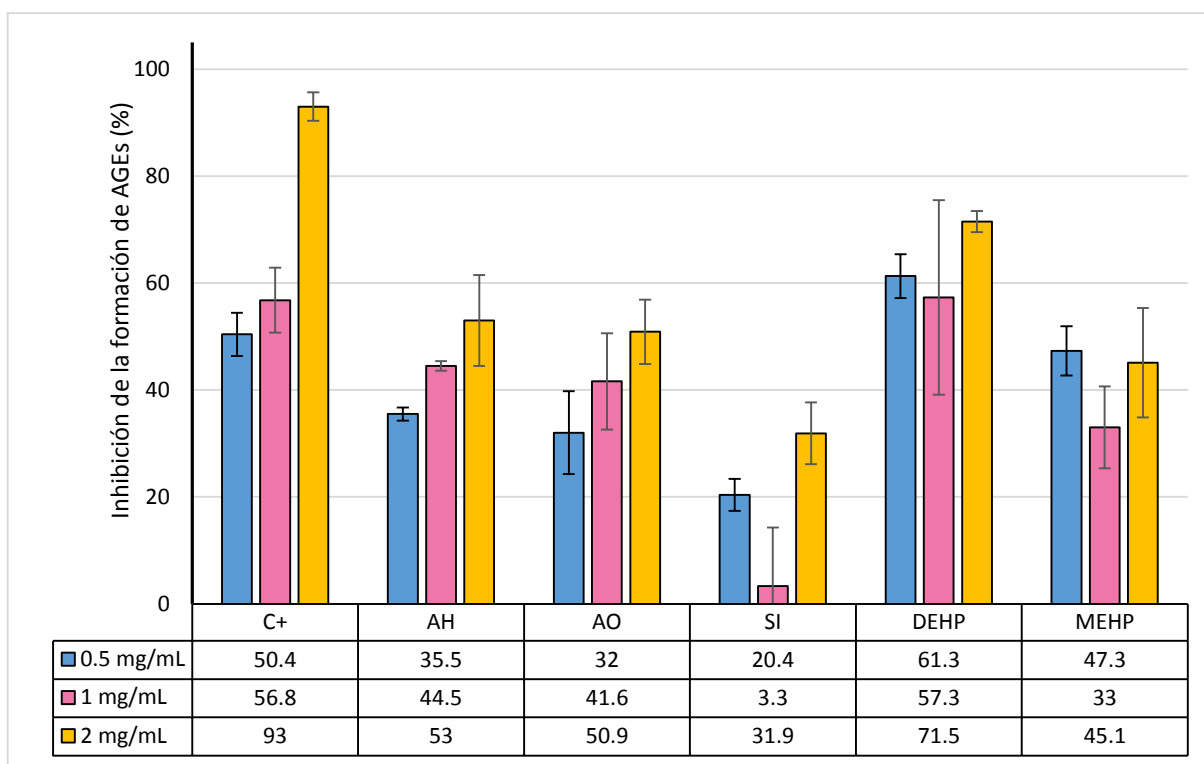


Figura 27. Gráfico de la actividad antiAGEs de algunos compuestos encontrados.

Únicamente se pudo determinar la IC_{50} del AH de 1.43 mg/mL y del AO de 1.74 mg/mL las cuales fueron mayores a la IC_{50} de la aminoguanidina de 0.49 mg/mL. Los demás compuestos identificados no fueron evaluados debido a que se obtuvieron cantidades trazas insuficientes que dificultaron su aislamiento y posterior análisis individual. Además de la falta de disponibilidad de estos compuestos comerciales para ser utilizados como estándar.

7. DISCUSIÓN

La identificación a partir del gen 16S rRNA de la *Sphingomonas* sp. 3a-1 se llevó a cabo en fragmentos con la finalidad de obtener un contig fiable en las secciones firma de las *Sphingomonas* (Takeuchi *et al.*, 2001) que permitiera determinar el género y especie de la cepa. De acuerdo a la secuencia parcial de 1224 pb obtenida en este trabajo, se determinó que la cepa 3a-1 pertenece al género *Sphingomonas sensu stricto* y tiene un alto grado de identidad (99%) con la especie *S. panaciterrae* sp. nov. Sin embargo, se requieren análisis bioquímicos, quimiotaxonómicos, fenotípicos, la secuenciación de otros fragmentos (por ejemplo, el gen *rpoB*), si es posible hibridación DNA-DNA o incluso la secuenciación del genoma para determinar si la bacteria en estudio pertenece a dicha especie.

Sphingomonas panaciterrae es una cepa productora de ácido indolacético (promotor del crecimiento en plantas) que fue aislada del suelo de un campo de ginseng de Corea del Sur (Sukweenadhi *et al.*, 2015).

Extractos de acetato de etilo de la cepa de *Sphingomonas* sp. 3a-1 se evaluaron por su actividad antiAGEs debido a los antecedentes previos (Neira, 2015; Ayala, 2015). La actividad antiAGEs del extracto obtenida en este trabajo fue de 68.5 ± 9.2 % a una concentración de 2 mg/mL. El extracto crudo fue fraccionado por PLC, se extrajeron tres bandas la B0, B1 y B3. La actividad antiAGEs de las bandas fue comparable con la actividad del control positivo, i.e., ~94% a 2 mg/mL, sin embargo, la IC_{50} de dichas bandas fue mayor a la de la aminoguanidina lo que significa que la aminoguanidina es más eficaz a menor concentración. Aunque debe tomarse en cuenta que en las bandas se encuentra una mezcla de compuestos.

La identificación de los compuestos responsables de la actividad antiAGEs se llevó a cabo con análisis espectroscópicos y espectrométricos (RMN, IR y GC-MS).

En general, de los compuestos identificados en este trabajo como productos del metabolismo de *Sphingomonas* sp. 3a-1, los más interesantes son los cinco ciclodipéptidos identificados por GC-MS: cicloalanil-prolina, ciclofenilalanil-valina, ciclofenilalanil-prolina, cicloprolin-

prolina y ciclofenilalanil-leucina. A pesar, de que varios ciclodipéptidos y 2,5-dicetopiperazinas más complejas se han encontrado en productos naturales de hongos, bacterias, plantas y mamíferos, su importancia radica en que algunas 2,5-dicetopiperazinas naturales y otros compuestos derivados sintetizados químicamente han mostrado actividad antitumoral, antiviral, antihelmítica, antifúngica, antibacteriana y antiglicémica (Martins y Carvalho, 2007; Borthwick, 2012). Existen dos reportes de dicetopiperazinas con actividad antiglicémica. La ciclodehidroalanil-leucina (Figura 28a) es una dicetopiperazina producida por *Penicillium* sp. y funciona como inhibidor selectivo de α -glucosidasas intestinales de puercos y de levaduras (Kwon *et al.*, 2000). El otro reporte es sobre la ciclohistidil-prolina, a pesar de que este es más conocido por su actividad como neuroprotector y antiinflamatorio (Bellezza *et al.*, 2014), también se ha comprobado que puede estimular la secreción de insulina (Prasad *et al.*, 2015). Además, se ha reportado que la ciclohistidil-prolina (Figura 28b), el ácido araquidónico y el zinc son compuestos que actúan de manera sinérgica como agentes antidiabéticos (Song *et al.*, 2001)

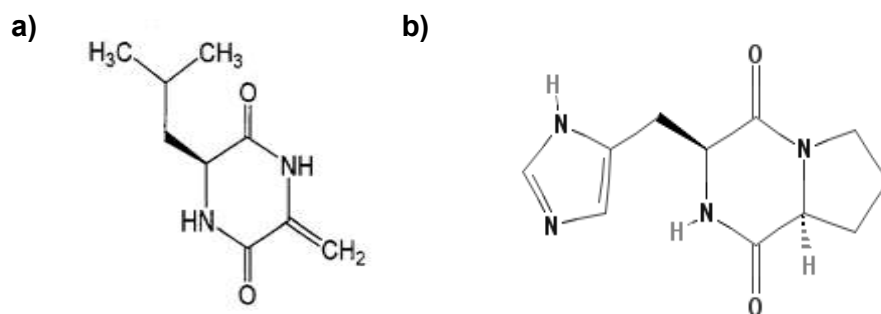


Figura 28. Estructura de dicetopiperazinas con actividad antiglicémica. a) Ciclodehidroalanil-leucina. b) Ciclohistidil-prolina.

En cuanto a los ciclodipéptidos identificados en este trabajo, algunos como la ciclofenilalanil-prolina, cicloalanil-prolina y cicloprolin-prolina han sido encontrados en bebidas como la cerveza y en alimentos procesados (Gautschi *et al.*, 1997).

Respecto a la actividad biológica de estos ciclodipéptidos, se ha reportado la actividad antimicrobiana de la cicloalanil-prolina y ciclofenilalanil-prolina aisladas de *Bacillus pumilus* (Brack *et al.*, 2014), así como de la cicloprolin-prolina aislada de una mosca (*Lucilia sericata*) (Huberman *et al.*, 2007). También se ha reportado la actividad antifúngica de la ciclo-L-fenilalanil-L-prolina aislada de *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 (Strom *et al.*, 2002) y de la ciclo-L-fenilalanil-L-prolina de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus endophyticus* (Sansinenea *et al.*, 2016).

Otra propiedad interesante que se le ha atribuido a algunos ciclodipéptidos como la L-fenilalanil-L-prolina es su participación como molécula señalizadora de percepción de cuórum o autoinducción (quorum sensing), el cual es un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de población celular (Bellezza *et al.*, 2014). Por ejemplo, la ciclofenilalanil-prolina es una molécula señal que regula la expresión de genes involucrados en la virulencia en *Vibrio vulnificus* y *V. cholerae* (de Carvalho y Abraham, 2012). Incluso se ha propuesto que algunos ciclodipéptidos tienen la capacidad de regular la traducción de señales en plantas y mamíferos (Bellezza *et al.*, 2014). La ciclofenilalanil-prolina producida por *Pseudomonas aeruginosa*, está involucrada en la comunicación bacteria-planta, en la estimulación del crecimiento vegetal mediante la activación de una respuesta auxínica (Ortiz-Castro *et al.*, 2011). Lo anterior podría explicar la función de los ciclodipéptidos encontrados en el cultivo de *Sphingomonas* sp. 3a-1 como bacteria endófito de *P. auritum*, es decir, existe la posibilidad de que estos compuestos estén relacionados con la comunicación bacteria-planta.

Existen muy pocos estudios sobre los ciclodipéptidos ciclofenilalanil-valina y ciclofenilalanil-leucina, y por lo tanto, no se ha determinado ninguna actividad biológica.

La producción de ciclodipéptidos por miembros del género *Sphingomonas* no ha sido reportada. Sin embargo, el cocultivo compuesto por *Sphingomonas* KMK-001 y *Aspergillus fumigatus* KMC-901 fue capaz de producir Glionitrina A, una dicetopiperazina disulfurada con

actividad antibiótica y antitumoral (Park *et al.*, 2009). Los ciclodipéptidos encontrados en este trabajo: la ciclofenilalanil-valina, ciclofenilalanil-prolina, ciclofenilalanil-leucina, cicloalanil-prolina y cicloprolin-prolina no han sido reportados en el género *Sphingomonas*. Además la actividad antiAGEs de estos compuestos no ha sido estudiada.

También se identificaron por GC-MS dos ácidos grasos saturados como productos del metabolismo de *Sphingomonas* sp. 3a-1; el ácido hexadecanoico o comúnmente conocido como ácido palmítico y el ácido octadecanoico o esteárico. La presencia de estos ácidos grasos se confirmó con el espectro de RMN ¹H el cual mostró señales en δ 4-3 ppm que corresponden a CH₂-O-C=O, señales de cadenas alifáticas a δ 0.84 ppm para metilos terminales y de δ 1.2-2.3 ppm de los CH₂ desplazados por la presencia de compuestos electronegativos. Adicionalmente, el espectro de infrarrojo confirmó la presencia de señales de cadena alifática y además se observaron señales del grupo funcional carbonilo (Nakanishi y Solomon, 1977).

La composición celular principal de ácidos grasos en cepas de *Sphingomonas* sp., corresponde a ácidos 18:1, 16:0 y/o 17:1 y en menor proporción 18:0 (Takeuchi *et al.*, 2001). El principal ácido graso saturado encontrado en *Sphingomonas panaciterrae* fue el ácido palmítico (Sukweenadhi *et al.*, 2015). Dichos datos, concuerdan con los ácidos grasos encontrados.

Existen reportes que mencionan que el ácido palmítico induce la resistencia a la insulina, aumenta el riesgo de enfermedades cardiovasculares y propicia el desarrollo de obesidad (Vessby *et al.*, 2002; Kien *et al.*, 2005; Risérus, 2008). Los ácidos palmítico y esteárico disminuyen la síntesis de glicógeno inducido por insulina, la oxidación de glucosa y la generación de ATP mitocondrial en células músculo-esqueléticas de rata. Se ha formulado la hipótesis de que dichos mecanismos podrían estar relacionados con el desarrollo de la resistencia a la insulina en estas células (Hirabara *et al.*, 2010).

Además de los ácidos grasos, se encontró β -sitosterol y tremulona en las bandas B0 y B1. Debido a que la estructura del β -sitosterol es muy parecida a la del colesterol, el sitosterol reduce la absorción del colesterol, inhibiendo su incorporación a las micelas del intestino delgado y por lo tanto, reduce los niveles de colesterol LDL. Lo cual lo hace útil para el tratamiento de la aterosclerosis y disminuye el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares (Lau *et al.*, 2005; Badimon *et al.*, 2010). Los esteroides también han mostrado tener actividad antitumoral (Gupta *et al.*, 2010), antiinflamatoria, antibacteriana y antifúngica (Ling y Jones, 1995).

En el extracto del cultivo de *Sphingomonas* sp. 3a-1 también se encontró 3-metil-undecano y ácido vaccénico. En una revisión realizada sobre diversos estudios del ácido vaccénico respecto a su relación con el riesgo de padecer cáncer, enfermedades cardiovasculares, resistencia a la insulina, etc. se llegó a la conclusión de que son necesarios mayores estudios para definir si su consumo es benéfico o si representa un riesgo a la salud, ya que hay resultados muy controvertidos y poco concluyentes (Field *et al.*, 2009).

Dos compuestos provenientes del metabolismo de *Sphingomonas* sp., cuyo tiempo de retención fue de 27.3 min y 35.5 min, y sus picos moleculares fueron observados a m/z 241 y 374, no se lograron identificar.

Otros compuestos, ajenos a *Sphingomonas* sp. fueron encontrados en las bandas extraídas; el ftalato, TBEP y ciclobutano-1,1-dicarboxamida, N,N'-di-benzoiloxi, los cuales se definieron como contaminante del solvente, del proceso de extracción y como artefacto proveniente del medio de cultivo, respectivamente.

En el caso del ftalato, su presencia en la banda B0 se confirmó con el espectro de RMN ^1H , dando señales propias de un anillo aromático δ 7-8 ppm, dobles enlaces del anillo δ 4-5 ppm, señales de la cadena de carbonos δ 0.9 ppm para metilos terminales y de 1.2-1.6 ppm de los CH_2 de la cadena alifática. El espectro IR también confirmó la presencia de los grupos

funcionales presentes en un ftalato. (Nakanishi y Solomon, 1977). Y el análisis de GC-MS arrojó la presencia de MEHP.

Frecuentemente, los ftalatos son encontrados como artefacto en procesos de extracción con solventes (Seibi, 1973). Sin embargo, *Pseudomonas* sp. PB01 es capaz de producir ftalato-dibutilo y ftalato-di(2-etilhexil) (Hoang *et al.*, 2008). Debido a que la cepa en estudio fue aislada de *P. auritum* junto con una mayoría de cepas del género *Pseudomonas* (Neira, 2015), existía la posibilidad de que dicho ftalato fuera producto del metabolismo de *Sphingomonas* sp. 3a-1. Sin embargo, se determinó que dicho compuesto era un contaminante ya que, apareció en el análisis de GC-MS del extracto del control negativo.

El TBEP, fue identificado por GC-MS; este compuesto es usado en solventes como retardante de flama y plastificante (PubChem CID 6540). Se determinó que fue un contaminante del proceso de extracción debido a que no se encontró en el análisis de GC-MS del control negativo.

Finalmente, la presencia del ciclobutano-1,1-dicarboxamida, N,N'-di-benzoiloxi se confirmó con espectro de RMN ¹H de la banda B3, el cual presentó un doblete a 8.06 ppm y dos tripletes en 7.56 y 7.47, característicos de compuestos aromáticos. Se determinó que este compuesto no era producto del metabolismo de la bacteria debido a su presencia en el control negativo.

La actividad antiAGEs del MEHP, DEHP, del ácido hexadecanoico, del ácido octadecanoico y del sitosterol se evaluó debido a que fueron compuestos que se encontraron en las tres bandas extraídas y se pretendía determinar su aportación en la actividad antiAGEs. A pesar de que estos compuestos mostraron actividad antiAGEs a una concentración de 2 mg/mL (entre 41-71.5%) se observó que fue menor a la presentada en las bandas extraídas (mayor al 90%).

Cepas del género *Pseudomonas* y específicamente *Pseudomonas protegens*, bacterias endófitas de *P. auritum*, producen compuestos con actividad antiAGEs, entre ellos el 2,4-diacetil fluoroglucinol (DAPG). La actividad antiAGEs aumentó al mezclar el DAPG con el ácido

5-hidroxiferúlico, a pesar de que este último no presentó actividad antiAGEs individual (Gutiérrez-García *et al*, 2017).

En ese contexto, los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten formular la hipótesis de que los compuestos presentes en las bandas extraídas actúan de manera sinérgica entre ellos confiriéndoles mayor actividad antiAGEs o que alguno(s) de los compuestos presentes que no fueron evaluados tienen mayor actividad antiAGEs.

A pesar de que el ácido palmítico y el ácido esteárico tuvieron actividad antiAGEs y su IC₅₀ fue de 1.43 mg/mL y 1.74 mg/mL, respectivamente, de acuerdo a lo mencionado anteriormente, su uso como agentes antiAGEs debe ser evaluado a detalle ya que podría ser contraproducente.

En cuanto al β -sitosterol no se han reportado efectos adversos sobre su consumo, además reduce el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares, las cuales son unas de las complicaciones diabéticas más importantes. Por lo que, a reserva de realizar análisis correspondientes a su toxicidad, podría ser un agente antiAGEs.

Los ciclodipéptido encontrados requieren ser evaluados para poder definir su actividad como agentes antiAGEs. Sin embargo, de acuerdo a la hipótesis formulada sobre la sinergia entre compuestos presentes en las bandas extraídas o la mayor actividad antiAGEs de un compuesto no evaluado, existe la posibilidad de que dichos compuestos tengan actividad antiAGEs.

8. CONCLUSIONES

- El extracto crudo de acetato de etilo de *Sphingomonas* sp. 3a-1, una bacteria endófito de *P. auritum*, inhibió la formación de AGEs en un 68.5%.
- La actividad antiAGEs de las bandas extraídas B0, B1 y B3 fue mayor a la del extracto crudo (93.4%, 95.4% y 95.4%, respectivamente).
- *Sphingomonas* sp. 3a-1 produce los ciclodipéptidos ciclofenilalanil-valina, ciclofenilalanil-prolina, ciclofenilalanil-leucina, cicloalanil-prolina y cicloprolin-prolina, los ácidos hexadecanoico, octadecanoico y vaccénico, además de β -sitosterol y tremulona.
- El ácido hexadecanoico, octadecanoico y el sitosterol tienen una moderada actividad antiAGEs (53%, 50.9% y 31.9%, respectivamente).

9. PERSPECTIVAS

- Concluir la identificación de todos los compuestos obtenidos en este trabajo.
- Evaluar la actividad antiAGEs de los ciclodipéptidos ciclofenilalanil-valina, ciclofenilalanil-prolina, ciclofenilalanil-leucina, cicloalanil-prolina y cicloprolin-prolina.
- Evaluar actividad antiAGEs de mezclas de los compuestos antiAGEs para evaluar su actividad sinérgica.
- Comprobar mediante otras técnicas *in vitro* la actividad antiAGEs para determinar el posible modo de acción de los compuestos.
- Diseñar y optimizar el medio de cultivo para la extracción de probables compuestos antiAGEs.
- Búsqueda dirigida de compuestos más polares, alcaloides, polisacáridos y poliaminas del cultivo de *Sphingomonas* sp 3a-1, para su evaluación como compuestos antiAGEs.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed, N. (2005). Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 67 (1): 3–21.
2. Andrade-Cetto, A. y Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99 (3), 325–348.
3. Ardestani, A. y Yazdanparast, R. (2007). *Cyperus rotundus* suppresses AGE formation and protein oxidation in a model of fructose-mediated protein glycooxidation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 41 (5): 572–578.
4. Asker, D., Beppu, T. y Ueda, K. (2007a). *Sphingomonas jaspsi* sp. nov., a novel carotenoid-producing bacterium isolated from Misasa, Tottori, Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (7): 1435–1441.
5. Asker, D., Beppu, T. y Ueda, K. (2007b). *Sphingomonas astaxanthinifaciens* sp. nov., a novel astaxanthin-producing bacterium of the family *Sphingomonadaceae* isolated from Misasa, Tottori, Japan. *FEMS Microbiology Letters*, 273 (2): 140–148.
6. Ayala, M. J. (2015). Caracterización del extracto de acetato de etilo y purificación de las fracciones con actividad antiglicación, de la bacteria *Sphingomonas mucosissima* 3a-1 aislada de *Piper auritum*. (Tesis de Licenciatura). México, D.F.
7. Ayed, L., Mahdhi, A., Cheref, A. y Bakhrouf, A. (2011). Decolorization and degradation of azo dye methyl red by an isolated *Sphingomonas paucimobilis*: biotoxicity and metabolites characterization. *Desalination*, 274 (1–3): 272–277.
8. Bacon, C. W. y White, J. F. (Eds.). (2000). *Microbial endophytes*. New York: M. Dekker.
9. Badimon, L., Vilahur, G. y Padro, T. (2010). Nutraceuticals and atherosclerosis: human trials. *Cardiovascular Therapeutics*, 28 (4): 202–215.
10. Bakris, G., Bank, A., Kass, D., Neutel, J., Preston, R. y Oparil, S. (2004). Advanced glycation end-product cross-link breakers: a novel approach to cardiovascular pathologies related to the aging process. *American Journal of Hypertension*, 17 (12): S23–S30.

-
11. Balkwill, D. L., Fredrickson, J. K. y Romine, M. F. (2006). *Sphingomonas* and related genera. En Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. y Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes* (pp. 605–629). New York, NY: Springer New York.
 12. Bellezza, I., Peirce, M. J. y Minelli, A. (2014). Cyclic dipeptides: from bugs to brain. *Trends in Molecular Medicine*, 20 (10): 551–558.
 13. Nilsson, B.O. (1999). Biological effects of aminoguanidine: an update. *Inflammation Research*, 48: 509–515.
 14. Boldyrev, A. A., Aldini, G. y Derave, W. (2013). Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiological Reviews*, 93 (4): 1803–1845.
 15. Booth, A. A., Khalifah, R. G., Todd, P. y Hudson, B. G. (1997). *In vitro* kinetic studies of formation of antigenic advanced glycation end products (AGEs): novel inhibition of post-amadori glycation pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (9): 5430–5437.
 16. Borthwick, A. D. (2012). 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products. *Chemical Reviews*, 112 (7): 3641–3716.
 17. Brack, C., Mikolasch, A. y Schauer, F. (2014). 2,5-Diketopiperazines produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. *Marine Biotechnology*, 16 (4): 385–395.
 18. Brownlee, M. (1995). Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annual Review of Medicine*, 46: 223–234.
 19. Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414 (6865): 813–820.
 20. Budzikiewicz, H. y Djerassi, C. (1962). Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. I. Steroid ketones. *Journal of the American Chemical Society*, 84 (8): 1430–1439.
 21. Castillo, U. y Strobel, G. (2007). Sourcing natural products from endophytic microbes. En Molyneux, R. y Colegate, S. (Eds.), *Bioactive Natural Products* (pp. 371–390). CRC Press.
 22. Choi, S. Y., Jung, S. H., Lee, H. S., Park, K. W., Yun, B. S. y Lee, K. W. (2008). Glycation inhibitory activity and the identification of an active compound in *Plantago asiatica* extract. *Phytotherapy Research*, 22 (3): 323–329.

-
23. de Carvalho, M. P. y Abraham, W. R. (2012). Antimicrobial and biofilm inhibiting diketopiperazines. *Current Medicinal Chemistry*, 19 (21): 3564–3577.
24. Elsebai, M. F., Tejesvi, M. V. y Pirttilä, A. M. (2014). Endophytes as a novel source of bioactive new structures. En Verma, V. C. y Gange, A. C. (Eds.), *Advances in Endophytic Research* (pp. 191–202). New Delhi: Springer India.
25. Field, C. J., Blewett, H. H., Proctor, S. y Vine, D. (2009). Human health benefits of vaccenic acid. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 34 (5), 979–991.
26. Freitas, F., Alves, V. D. y Reis, M. A. M. (2011). Advances in bacterial exopolysaccharides: from production to biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 29 (8): 388–398.
27. Furtado, N. A. J. C., Vessecci, R., Tomaz, J. C., Galembeck, S. E., Bastos, J. K. *et al.*, (2007). Fragmentation of diketopiperazines from *Aspergillus fumigatus* by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry*, 42 (10): 1279–1286.
28. Gautschi, M., Schmid, J. P., Peppard, T. L., Ryan, T. P., Tuorto, R. M. y Yang, X. (1997). Chemical characterization of diketopiperazines in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (8): 3183–3189.
29. Giardino, I., Fard, A. K., Hatchell, D. L. y Brownlee, M. (1998). Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*, 47 (7): 1114–1120.
30. Goh, S. Y. y Cooper, M. E. (2008). The role of advanced glycation end products in progression and complications of Diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93 (4): 1143–1152.
31. Gugliucci, A. y Menini, T. (2003). The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? *Life Sciences*, 72 (23): 2603–2616.

-
32. Gupta, P., Balwani, S., Kumar, S., Aggarwal, N., Rossi, M. *et al.* (2010). β -sitosterol among other secondary metabolites of *Piper galeatum* shows inhibition of TNF α -induced cell adhesion molecule expression on human endothelial cells. *Biochimie*, 92 (9): 1213–1221.
33. Gutiérrez-García, K., Neira-González, A., Pérez-Gutiérrez, R. M., Granados-Ramírez, G., Zarraga, R. *et al.* (2017). Phylogenomics of 2,4-Diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* and novel antiglycation endophytes from *Piper auritum*. *Journal of Natural Products*, 80 (7): 1955–1963.
34. Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S. *et al.* (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79 (3): 293–320.
35. Harris, C., Beaulieu, L. P., Fraser, M. H., Mc Intyre, K., Owen, P. *et al.* (2011). Inhibition of advanced glycation end product formation by medicinal plant extracts correlates with phenolic metabolites and antioxidant activity. *Planta Medica*, 77 (02): 196–204.
36. Hirabara, S. M., Curi, R. y Maechler, P. (2010). Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. *Journal of Cellular Physiology*, 222 (1): 187–194.
37. Hoang, V. L. T., Li, Y. y Kim, S. K. (2008). Cathepsin B inhibitory activities of phthalates isolated from a marine *Pseudomonas* strain. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18 (6): 2083–2088.
38. Huberman, L., Gollop, N., Mumcuoglu, K. Y., Breuer, E., Bhusare, S. R. *et al.* (2007). Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Medical and Veterinary Entomology*, 21 (2): 127–131.
39. International Diabetes Federation. (2015). *IDF diabetes atlas*. Brussels: International Diabetes Federation.
40. Kawahara, K., Kuraishi, H. y Zahringer, U. (1999). Chemical structure and function of glycosphingolipids of *Sphingomonas* spp. and their distribution among members of the α -4

-
- subclass of Proteobacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23: 408–413.
- Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Hussain, J. *et al.* (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, 52 (8): 689–695.
41. Khan, K. M., Saeed, S., Ali, M., Gohar, M., Zahid, J. *et al.* (2009a). Unsymmetrically disubstituted urea derivatives: a potent class of antiglycating agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17 (6): 2447–2451.
42. Khan, K. M., Khan, M., Ali, M., Taha, M., Rasheed, S. *et al.* (2009b). Synthesis of bis-Schiff bases of isatins and their antiglycation activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17 (22): 7795–7801.
43. Kien, C. L., Bunn, J. Y. y Ugrasbul, F. (2005). Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82 (2): 320–326.
44. Kim, H. Y. y Kim, K. (2003). Protein glycation inhibitory and antioxidative activities of some plant extracts *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (6): 1586–1591.
45. Kwon, O. S., Park, S. H., Yun, B. S., Pyun, Y. R. y Kim, C. J. (2000). Cyclo (dehydroala-L-Leu), an alpha-glucosidase inhibitor from *Penicillium* sp. F70614. *The Journal of Antibiotics*, 53 (9): 954–958.
46. Lau, V. W. Y., Journoud, M. y Jones, P. J. H. (2005). Plant sterols are efficacious in lowering plasma LDL and non-HDL cholesterol in hypercholesterolemic type 2 diabetic and nondiabetic persons. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81 (6): 1351–1358.
47. Leys, N. M. E. J., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M. y Springael, D. (2004). Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (4): 1944–1955.
48. Ling, W. y Jones, P. J. (1995). Dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sciences*, 57 (3), 195–206.

-
49. Lunceford, N. y Gugliucci, A. (2005). *Ilex paraguariensis* extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. *Fitoterapia*, 76 (5): 419–427.
50. Malik, N. S. y Meek, K. M. (1994). The Inhibition of sugar-induced structural alterations in collagen by aspirin and other compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 199 (2): 683–686.
51. Martins, M. B. y Carvalho, I. (2007). Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron*, 63 (40): 9923–9932.
52. Meenatchi, P., Purushothaman, A. y Maneemegalai, S. (2017). Antioxidant, antiglycation and insulinotropic properties of *Coccinia grandis* (L.) *in vitro*: possible role in prevention of diabetic complications. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7 (1): 54–64.
53. Nakanishi, K. y Solomon, P. H. (1977). *Infrared absorption spectroscopy* (2d ed). San Francisco: Holden-Day.
54. Neira, G. A. (2015). Actividades hipoglucemiante, antioxidante y antiglicación de hojas y endófitos de *Piper auritum*. (Tesis de Doctorado). CINVESTAV, México, D.F.
55. Nes, W. D. y Parish, E. J. (Eds.). (1989). *Analysis of sterols and other biologically significant steroids*. San Diego: Academic Press.
56. Odjakova, M., Popova, E., Al, M. y Mironov, R. (2012). Plant-derived agents with anti-glycation activity. En Petrescu, S. (Ed.), *Glycosylation*. InTech.
57. Organización Mundial de la Salud. (2016). *Informe mundial sobre la diabetes: resumen de orientación*. Ginebra: OMS.
58. Ortiz-Castro, R., Diaz-Perez, C., Martinez-Trujillo, M., del Rio, R. E., Campos-Garcia, J. y Lopez-Bucio, J. (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (17): 7253–7258.
59. Pan, F., Meng, Q., Wang, Q., Luo, S., Chen, B. *et al.* (2016). Endophytic bacterium *Sphingomonas* SaMR12 promotes cadmium accumulation by increasing glutathione biosynthesis in *Sedum alfredii* Hance. *Chemosphere*, 154: 358–366.

-
60. Park, H. B., Kwon, H. C., Lee, C. H. y Yang, H. O. (2009). Glionitrin A, an antibiotic-antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes. *Journal of Natural Products*, 72 (2): 248–252.
61. Zimmet, P. K., Alberti, G. M. M. y Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414: 782–787.
62. Peng, X., Ma, J., Chen, F. y Wang, M. (2011). Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products. *Food and Function*, 2 (6): 289.
63. Peppas, M., Uribarri, J. y Vlassara, H. (2003). Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: What is new and what works. *Clinical Diabetes*, 21 (4): 186–187.
64. Pérez-Gutiérrez, R. M., Flores-Cotera, L. B. y Gonzalez, A. M. N. (2012). Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from *Piper auritum* leaves *in vitro* and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. *Molecules*, 17 (12): 11897–11919.
65. Prasad, C., Imrhan, V., Juma, S., Maziarz, M., Prasad, A. *et al.* (2015). Bioactive plant metabolites in the management of non-communicable metabolic diseases: Looking at opportunities beyond the horizon. *Metabolites*, 5 (4): 733–765.
66. Rahbar, S., Natarajan, R., Yerneni, K., Scott, S., Gonzales, N. y Nadler, J. L. (2000). Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 301 (1–2): 65–77.
67. Rahbar, S. y Figarola, J. L. (2003). Novel inhibitors of advanced glycation endproducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419 (1): 63–79.
68. Ramasamy, R., Vannucci, S. J., Yan, S. S. D., Herold, K., Yan, S. F. y Schmidt, A. M. (2005). Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. *Glycobiology*, 15 (7): 16R–28R.
69. Reddy, V. P. y Beyaz, A. (2006). Inhibitors of the Maillard reaction and AGE breakers as therapeutics for multiple diseases. *Drug Discovery Today*, 11 (13–14): 646–654.

-
70. Risérus, U. (2008). Fatty acids and insulin sensitivity. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 11 (2): 100–105.
71. Romanenko, L. A., Uchino, M., Frolova, G. M., Tanaka, N., Kalinovskaya, N. I. *et al.* (2007). *Sphingomonas molluscorum* sp. nov., a novel marine isolate with antimicrobial activity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57 (2): 358–363.
72. Rudnicki, M., de Oliveira, M. R., Veiga, P. T., Reginatto, F. H., Dal-Pizzol, F. y Fonseca M. J. C. (2007). Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry*, 100 (2): 719–724.
73. Sansinenea, E., Salazar, F., Jiménez, J., Mendoza, Á. y Ortiz, A. (2016). Diketopiperazines derivatives isolated from *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus endophyticus*, establishment of their configuration by X-ray and their synthesis. *Tetrahedron Letters*, 57 (24): 2604–2607.
74. Seibi, J. (1973). *Espectrometría de masas*. Madrid: Alhambra.
75. Seo, E. J., Yoo, S. H., Oh, K. W., Cha, J., Lee, H. G. y Park, C. S. (2004). Isolation of an exopolysaccharide-producing bacterium, *Sphingomonas* sp. CS101, which forms an unusual type of sphingan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68 (5): 1146–1148.
76. Silva, C., Cabral, J. M. S. y Keulen van, F. (2004). Isolation of a β -carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas* sp. *Biotechnology Letters*, 26: 257–262.
77. Singh, P., Jayaramaiah, R. H., Agawane, S. B., Vannuruswamy, G., Korwar, A. M. *et al.* (2016). Potential dual role of eugenol in inhibiting advanced glycation end products in diabetes: proteomic and mechanistic insights. *Scientific Reports*, 6 (1): 1-13.
78. Singh, R., Barden, A., Mori, T. y Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44 (2): 129–146.
79. Song, M. K., Rosenthal, M. J., Hong, S., Harris, D. M., Hwang, I. *et al.* (2001). Synergistic antidiabetic activities of zinc, cyclo (His-Pro), and arachidonic acid. *Metabolism*, 50 (1): 53–59.
80. Stitt, A. W., Jenkins, A. J. y Cooper, M. E. (2002). Advanced glycation end products and diabetic complications. *Expert opinion Investigation Drugs*, 11 (9): 1205–1223.

-
81. Strobel, G. (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22: 315–333.
82. Strobel, G. y Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4): 491–502.
83. Strom, K., Sjogren, J., Broberg, A. y Schnurer, J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-phe-L-pro) and cyclo(L-phe-trans-4-OH-L-pro) and 3-phenyllactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (9): 4322–4327.
84. Sukweenadhi, J., Kim, Y. J., Kang, C. H., Farh, M. E. A., Nguyen, N. L. et al. (2015). *Sphingomonas panaciterrae* sp. nov., a plant growth-promoting bacterium isolated from soil of a ginseng field. *Archives of Microbiology*, 197 (8): 973–981.
85. Takeuchi, M., Hamana, K. y Hiraishi, A. (2001). Proposal of the genus *Sphingomonas sensu stricto* and three new genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, on the basis of phylogenetic and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51: 1405–1417.
86. Takeuchi, M. y Yamagishi, S. (2008). Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 14: 973–978.
87. Tan, R. X. y Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites (1987 to 2000). *Natural Product Reports*, 18 (4): 448–459.
88. Tang, S. Y., Whiteman, M., Peng, Z. F., Jenner, A., Yong, E. L. y Halliwell, B. (2004). Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional chinese medicines. *Free Radical Biology and Medicine*, 36 (12): 1575–1587.
89. Thornalley, P. J. (2003). Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 419 (1): 31–40.

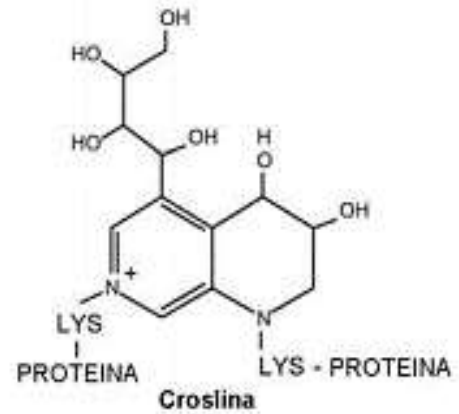
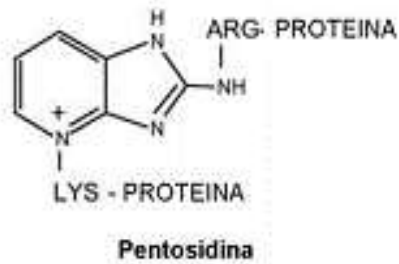
-
90. Turner, D. P. (2017). The role of advanced glycation end-products in cancer disparity. En *Advances in Cancer Research* (Vol. 133, pp. 1–22). Elsevier.
91. Vessby, B., Gustafsson, I. B., Tengblad, S., Boberg, M. y Andersson, A. (2002). Desaturation and elongation of fatty acids and insulin action. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 967: 183–195.
92. Williams, M. E. (2004). Clinical studies of advanced glycation end product inhibitors and diabetic kidney disease. *Current Diabetes Reports*, 4 (6): 441–446.
93. Wu, C. H., Huang, S. M. y Yen, G. C. (2011). Silymarin: a novel antioxidant with antiglycation and antiinflammatory properties *in vitro* and *in vivo*. *Antioxidants and Redox Signaling*, 14 (3): 353–366.
94. Wu, J. W., Hsieh, C. L., Wang, H. Y. y Chen, H. Y. (2009). Inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts and its active compounds on the glycation process of protein. *Food Chemistry*, 113 (1): 78–84.
95. Xi, M., Hai, C., Tang, H., Chen, M., Fang, K. y Liang, X. (2008). Antioxidant and antiglycation properties of total saponins extracted from traditional Chinese medicine used to treat Diabetes mellitus. *Phytotherapy Research*, 22 (2): 228–237.
96. Xu, Y., Liu, G., Yu, Z., Song, X., Li, X. *et al.* (2016). Purification, characterization and antiglycation activity of a novel polysaccharide from black currant. *Food Chemistry*, 199: 694–701.
97. Yamaguchi, T., Kobayashi, Y., Adachi, K. e Imamura, N. (2003). Argimicins B and C, new anti-cyanobacterial compounds produced by *Sphingomonas* sp. M-17. *The Journal of Antibiotics*, 56 (7): 655–657.
98. Yan, H. y Harding, J. J. (2005). Carnosine protects against the inactivation of esterase induced by glycation and a steroid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1741 (1–2): 120–126.

-
99. Yin, P., Chen, H., Liu, X., Wang, Q., Jiang, Y. y Pan, R. (2014). Mass spectral fragmentation pathways of phthalate esters by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical Letters*, 47 (9): 1579–1588.
100. Zhang, B., Salituro, G., Szalkowski, D., Li, Z., Zhang, Y. *et al.* (1999). Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science*, 284 (5416): 974–977.
101. Zhong, Y., Luan, T., Lin, L., Liu, H. y Tam, N. F. Y. (2011). Production of metabolites in the biodegradation of phenanthrene, fluoranthene and pyrene by the mixed culture of *Mycobacterium* sp. and *Sphingomonas* sp. *Bioresource Technology*, 102 (3): 2965–2972.

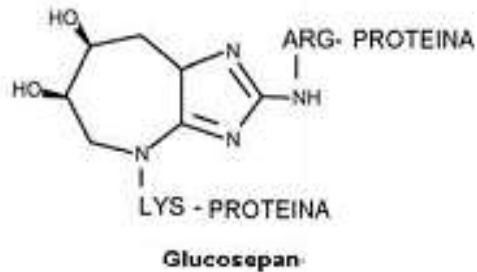
11. ANEXOS

A. Estructuras químicas de los tres tipos de AGEs

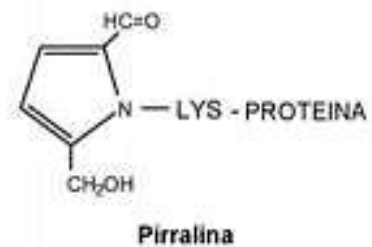
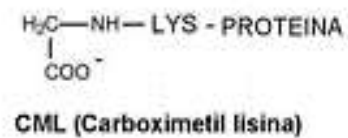
(A) AGEs entrecruzados fluorescentes:



(B) AGEs entrecruzados no fluorescentes:



(C) AGEs no entrecruzados:



B. Compuestos antiAGEs provenientes de extractos naturales

Procedencia del extracto	Compuestos	Referencia
Extractos de plantas medicinales de Korea entre ellas <i>Allium cepa</i> , <i>Illicium religiosum</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Origanum officinalis</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Pyrus pyrifolia</i> , <i>Acanthopanax senticosus</i> , <i>Eugenia caryophyllata</i> y <i>Erigeron annuus</i> .	Ácidos orgánicos y flavonoides	(Kim y Kim, 2003)
<i>Ilex paraguariensis</i>	Polifenoles	(Lunceford y Gugliucci, 2005)
<i>Passiflora alata</i> Dryander y <i>Passiflora edulis</i> Sims	Polifenoles	(Rudnicki <i>et al.</i> , 2007)
<i>Cyperus rotundus</i>	Polifenoles	(Ardestani y Yazdanparast, 2007)
Extractos de plantas medicinales Chinas entre ellas <i>Acanthopanax senticosus</i> , <i>Anemarrhena asphodeloides</i> , <i>Aralia taibaiensis</i> , <i>Asparrausi officinalis</i> , <i>Astragalus membranaceus</i> , <i>Ophiopogon japonicus</i> , <i>Panax ginseng</i> , <i>Panax notoginseng</i> , <i>Polygala tenuifolia</i> , <i>Polygonatum odoratum</i> y <i>Poria cocos</i>	Saponinas	(Xi <i>et al.</i> , 2008)
Extracto de hojas de guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.)	Ácido gálico, catequina, quercetina.	(Wu <i>et al.</i> , 2009)
Silmarina	Flavonoide	(Wu <i>et al.</i> , 2011)
Extracto de hexano de <i>Piper auritum</i>	Polifenoles	(Pérez <i>et al.</i> , 2012)
<i>Abies balsamea</i> (L.) Mill	Derivados de galocatequina	(Harris <i>et al.</i> , 2011)
<i>Gaultheria hispidula</i> (L.) Muhl.	Ácido clorogenico, catequina, epicatequina, glicósido de taxifolina, miricitrina, quercetina	
<i>Larix laricina</i> Du Roi (K. Koch)	Catequina, epicatequina, diterpenos, piceatanol, hidroxiestilbenos	
<i>Picea mariana</i> (P. Mill) BSP	Pungenina, hidroximetoxiestilbenos	
<i>Populus balsamifera</i> L.	Salicina, Salicortina, salireposido, populosido, rubranosido	
<i>Vaccinium vitis-idaea</i> L.	Ácido benzoico, ácido cumárico, ácido hidroxibenzoico, catequina, quercetina y glicósidos de cianidina	
<i>Coccinia grandis</i>	Flavonoides, alcaloides, glicósidos, saponinas esteroides, terpenoides, taninos y compuestos fenólicos.	(Meenatchi <i>et al.</i> , 2017)

C. Composición del medio de cultivo S-7.

Componente	Cantidad	Observaciones
Glucosa	1.0 g/L	
Fructosa	3.0 g/L	
Sacarosa	6.0 g/L	
Extracto de Levadura	0.5 g/L	
Peptona de soya	1.0 g/L	
Buffer de fosfatos 1 M pH 6.8	1 mL pH=6.8	
MgSO₄ *7 H₂O	0.0036 g	1 mL/L de solución 1000x
ZnSO₄ *7 H₂O	0.0025 g	1 mL/L de solución 1000x
MnCl₂ * H₂O	0.005 g	1 mL/L de solución 1000x
FeCl₃ * 4H₂O	0.002 g	1 mL/L de solución 1000x
CuSO₄	0.002 g	1 mL/L de solución 1000x
Ca(NO₃)₂ 4H₂O	0.0065g	20 mL/L de solución 50x: Esterilizar aparte y adicionar después de esterilizar
Acetato de sodio	1 g	20 mL/L de solución 50x:
Benzoato de sodio	0.1 g	Esterilizar aparte y adicionar después de esterilizar
Fenilalanina	0.005 g	2mL/L de solución 500x; esterilizar por filtración y adicionar después de esterilizar.

D. Secuencia parcial del gen 16S rDNA de *Sphingomonas* sp. 3a-1 (1224 pb)

GCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGGGATGATAATGA
CAGTACCGGGAGAATAAGCTCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG
GGAGCTAGCGTTATTCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAGTA
AGAGGTGAAAGCCCAGAGCTCAACTCTGGAATTGCCTTTTACTGACTGCATCGCTTGAATC
ATGGAGAGGTCAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAAGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGGCTGACTGGACATGTATTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGG
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTC
CGGGGACTTGGTCCTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTATCCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCTGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCGTTTGACATGGTAGGACGGCT
TCCAGAGATGGATTCCTTCCCTTCGGGGACCTACACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTC
AGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGCCTTTAGT
TACCATCATTAGTTGGGTACTCTAAAGGAACCGCCGGTGATAAGCCGGAGGAAGGTGG
GGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTACGCGCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCA
ACTACAGTGGGCAGCAATCCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCCAAAAGTTGTCTCAGTTCCG
GATTGTTCTCTGCAACTCGAGAGCATGAAGGCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCA
TGCCGCGGTGAATACGCTCCCAGGCCTTGTACACACCGCCCGTGTACACGCATGGGAG
TTGGAAGTGGACCCGTCAGGCGTCGCGCTTCTCGGATTATCACAGAGGTTCTTTAAATT
CCCATCTAACTGTTGGTTACTAAGGGCTAGGGATGACTCCTGCGGGACTTAACCACATC
TCAGAAGAGCTGACGAAGCATGCACCCGCTTTGTAGGTCCCAAGGGAAAGAATCATCTC
TGGAACCGTCTACATGTCAAAGCTGGTAAGGTTCTGCCCTTGCTTCGA