

UNIVERSIDADE DA CORUÑA



Detección de Sideróforos Presentes en  
Bacterias Patógenas en Peces de Acuicultura.  
Búsqueda de funcionales adecuados para la  
metodología DFT-NMR en moléculas sencillas  
con átomos de azufre.

---

Memoria presentada como Trabajo de Fin de Máster de la modalidad  
investigadora del Máster Universitario en Ciencias, Tecnología y  
Gestión Ambiental

**Juan Carlos de la Cruz Fuentes Monteverde**

**Septiembre 2013**

Trabajo realizado en los laboratorios de Química Orgánica,  
Departamento de Química Fundamental, Universidad de A Coruña, en el  
grupo de investigación PRONAMAR, bajo la dirección de los profesores  
doctores D. Jaime Rodríguez González y D. Carlos Jiménez González.

Este trabajo fue subvencionado mediante proyectos financiados por la  
Xunta de Galicia (Proyecto Ref. 110PXIB235157PR) y el Ministerio de  
Ciencia e Innovación (Proyecto Ref. AGL AGL2009-12266-C02-  
022009-1226)

# Contenido

<b>Agradecimientos</b> .....	9
<b>Abreviaturas y Acrónimos</b> .....	11
<b>Resumen</b> .....	12
Summary .....	12
Resumo.....	12
<b>1. Introducción</b> .....	14
Química de productos naturales marinos .....	14
Acuicultura.....	14
Patógenos en peces .....	15
Microorganismos asociadas a las piscifactorías .....	17
Edwardsielosis.....	17
Vibriosis .....	17
Sideróforos producidos por la familia <i>Vibrio</i> y <i>Enterobacteriaceae</i> .....	19
Resolución de estructuras por métodos computacionales .....	21
<b>2. Objetivos</b> .....	23
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	25
<b>Equipamiento</b> .....	25
<b>Reactivos</b> .....	25
<b>Procedimientos de separación</b> .....	25
<b>Objetivo 1.</b> Demostrar que la biosíntesis de sideróforos tipo vanrobactina es recurrente en la especie <i>Vibrio</i> .....	25
Fraccionamiento del <i>V. ordali</i> .....	25
Fraccionamiento del <i>V. metschnikovii</i> , <i>V. harveyi</i> y <i>V. pelagius</i> .....	26
<b>Objetivo 2.</b> Probar que la movilización por conjugación entre bacterias patógenas de plásmidos involucrados en la biosíntesis de sideróforos puede proveer de nuevas funciones a la bacteria receptora .....	27

<b>Objetivo 3.</b> Determinación de los sideróforos de la bacteria patógena, <i>Edwardsiella tarda</i> , para la que se propuso por análisis genómicos.....	28
<b>Objetivo 4.</b> Búsqueda de un funcional y conjunto base adecuado para la determinación desplazamientos químicos en modelos sencillos con átomos de azufre .....	29
<b>3. Resultados y Discusión .....</b>	<b>31</b>
<b>Objetivo 1.</b> Demostrar que la biosíntesis de sideróforos tipo vanrobactina es recurrente en la especie <i>Vibrio</i> .....	31
<b>Objetivo 2.</b> Probar que la movilización por conjugación entre bacterias patógenas de plásmidos involucrados en la biosíntesis de sideróforos, puede proveer nuevas funciones a la bacteria receptora .....	43
<b>Objetivo 3.</b> Determinación de los sideróforos de la bacteria patógena, <i>Edwardsiella tarda</i> , para la que se propuso por análisis genómicos la presencia de vibrioferrina .....	47
<b>Objetivo 4.</b> Búsqueda de un funcional y conjunto base adecuado para la determinación desplazamientos químicos en modelos sencillos con átomos de azufre .....	50
<b>4.a</b> Búsqueda del espacio conformacional mediante módulo GMMX .....	52
<b>4.b</b> Cálculo de energía DFT mediante el funcional híbrido B3LYP y el conjunto base 6-31G(d).....	54
4.b.1 Cálculos correspondientes al sulfuro de dietilo.....	54
4.b.2 Cálculos correspondientes al sulfuro de isopropilo.....	60
<b>4.c</b> Comparación .....	66
4.c.1 Señales promedio del sulfuro de dietilo .....	67
4.c.2 Señales promedio del sulfuro de isopropilo.....	68
<b>4. Conclusiones.....</b>	<b>73</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>75</b>

<b>Tabla 1.</b> Producción de pescado por captura y en piscifactorías a nivel mundial y en España para el año 2009 .....	15
<b>Tabla 2.</b> Algunos sideróforos producidos por la familia <i>Vibrionaceae</i> . .....	19
<b>Tabla 3.</b> Algunos sideróforos producidos por la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	20
<b>Tabla 3.</b> Sideróforos tipo vancrobactina detectados en las especies <i>V. metschnikovii</i> , <i>V. harveyi</i> y <i>V. pelagius</i> .....	27
<b>Tabla 5.</b> Energía asociada a los confórmeros encontrados dentro de una ventana de 3.5 kcal/mol del sulfuro de dietilo. Obtenidos mediante el programa PC Model 9.....	52
<b>Tabla 6.</b> Energía asociada a los confórmeros encontrados dentro de una ventana de 3.5 kcal/mol del sulfuro de <i>isopropilo</i> . Obtenidos mediante el el programa PC Model 9.....	52
<b>Tabla 7.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional MPW1PWP1 y el conjunto base 6-311G (2d,p) .....	54
<b>Tabla 8.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional MPW1PWP1 y el conjunto base 6-311G (d,p) .....	55
<b>Tabla 9.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional PBEPBE y el conjunto base 6-311G (2d,p) .....	56
<b>Tabla 10.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional PBEPBE y el conjunto base 6-311G (d,p) .....	57
<b>Tabla 11.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional WB97XD y el conjunto base 6-311G (2d,p) .....	58
<b>Tabla 12.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional WB97XD y el conjunto base 6-311G (d,p) .....	59
<b>Tabla 13.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de <i>isopropilo</i> . Calculado mediante el funcional MPW1PWP1 y el conjunto base 6-311G (2d,p) .....	60
<b>Tabla 14.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de <i>isopropilo</i> . Calculado mediante el funcional MPW1PWP1 y el conjunto base 6-311G(d,p) .....	61
<b>Tabla 15.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de <i>isopropilo</i> . Calculado mediante el funcional PBEPBE y el conjunto base 6-311G(2d,p) .....	62
<b>Tabla 16.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de <i>isopropilo</i> . Calculado mediante el funcional PBEPBE y el conjunto base 6-311G(d,p) .....	63
<b>Tabla 17.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de <i>isopropilo</i> . Calculado mediante el funcional WB97XD y el conjunto base 6-311G(2d,p) .....	64

<b>Tabla 18.</b> Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de <i>isopropilo</i> . Calculado mediante el funcional WB97XD y el conjunto base 6-311G(d,p) .....	65
<b>Tabla 19.</b> Diferencia absoluta entre los desplazamientos químicos de carbono-13 calculados mediante diferentes combinaciones funcional/conjunto base y los valores reportados en la bibliografía para el sulfuro de dietilo.....	67
<b>Tabla 20.</b> Diferencia absoluta entre los desplazamientos químicos de carbono-13 calculados mediante diferentes combinaciones funcional/conjunto base y los valores reportados en la bibliografía para el sulfuro de <i>isopropilo</i> .....	68
<b>Tabla 21.</b> Resumen de las diferencias de desplazamientos químicos de carbono-13 entre los valores experimentales y los calculados con diferentes combinaciones de funcionales/conjunto base para el sulfuro de dietilo.....	69
<b>Tabla 22.</b> Resumen de las diferencias de desplazamientos químicos de carbono-13 entre los valores experimentales y los calculados con diferentes combinaciones de funcionales/conjunto base para el sulfuro de <i>isopropilo</i> .....	71
<b>Figura 1.</b> Lesiones externas en rodaballo características de infección por <i>E. tarda</i> , en la zona dorsal (derecha), zonas decoloradas en la piel, ojos con tumefacciones y bocas hemorrágicas y en la zona ventral (izquierda) zonas hemorrágicas y/o con abundantes petequias.....	18
<b>Figura 2.</b> Grupo de peces con la sintomatología característica de la vibriosis.....	18
<b>Figura 3.</b> Algunos sideróforos aislados de <i>Vibrio</i> sp. ....	20
<b>Figura 4.</b> Algunos sideróforos aislados de la familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	21
<b>Figura 5.</b> Esquema de fraccionamiento del extracto libre de células de <i>Vibrio ordali</i> mediante cartuchos HLB .....	26
<b>Figura 6.</b> Esquema de fraccionamiento para la obtención del complejo piscibactina-Ga(III) a partir de la cepa mutante <i>Vibrio alginolyticus pvsA</i> mediante cartucho Oasis® HLB .....	28
<b>Figura 7.</b> Esquema de fraccionamiento del extracto libre de células de la bacteria <i>E. tarda</i> mediante resina Amberlite® XAD-4 y LC/MS.....	29
<b>Figura 8.</b> Moléculas orgánicas sencillas contentivas de átomos de azufre.....	30
<b>Figura 9.</b> Sideróforos tipo vanrobactina identificados en <i>V. metschnikovii</i> , <i>V. ordali</i> , <i>V. harveyi</i> y <i>V. pelagius</i> . ....	32
<b>Figura 10.</b> Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de <i>V. ordali</i> que contenía vanrobactina eluída con H <sub>2</sub> O y CH <sub>3</sub> CN (1:1) en cartucho OASIS® HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con $t_R=4.68$ min .....	33

<b>Figura 11.</b> Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de <i>V. ordali</i> que contenía divancrobactina eluída con CH <sub>3</sub> CN en cartucho OASIS ®HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con $t_R= 5.46$ min.....	34
<b>Figura 12.</b> Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de <i>V. metschnikovii</i> que contenía vancrobactina eluída con H <sub>2</sub> O y CH <sub>3</sub> CN (1:1) en cartucho OASIS ®HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con $t_R= 4.61$ min. ....	35
<b>Figura 13.</b> Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de <i>V. metschnikovii</i> que contenía divancrobactina eluída con CH <sub>3</sub> CN en cartucho OASIS ®HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con $t_R= 5.44$ min.....	36
<b>Figura 14.</b> Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de <i>V. harveyi</i> que contenía vancrobactina eluída con H <sub>2</sub> O y CH <sub>3</sub> CN (1:1) en cartucho OASIS ®HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con $t_R= 4.66$ min. ....	37
<b>Figura 15.</b> Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de <i>V. harveyi</i> que contenía divancrobactina eluída con CH <sub>3</sub> CN en cartucho OASIS ®HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con $t_R= 5.49$ min.....	38
<b>Figura 16.</b> Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de <i>V. pelagius</i> que contenía vancrobactina eluída con H <sub>2</sub> O y CH <sub>3</sub> CN (1:1) en cartucho OASIS ®HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con $t_R= 4.64$ min. ....	39
<b>Figura 17.</b> Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de <i>V. pelagius</i> que contenía divancrobactina eluída con H <sub>2</sub> O y CH <sub>3</sub> CN (1:1), en cartucho OASIS ®HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) .....	40
<b>Figura 18.</b> Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de <i>V. pelagius</i> que contenía vancrobactina eluída con CH <sub>3</sub> CN en cartucho OASIS ®HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con $t_R= 4.66$ min.....	41
<b>Figura 19.</b> Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de <i>V. pelagius</i> que contenía divancrobactina eluída con CH <sub>3</sub> CN en cartucho OASIS ®HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo).....	42
<b>Figura 20.</b> Introducción de un marcador de kanamicina en el plásmido pPHDP70 por intercambio alélico. ....	43
<b>Figura 21.</b> Estructura del sideróforo piscibactina (a) y del complejo piscibactina-Ga(III) (b) identificado en la cepa mutante <i>Vibrio alginolyticus pvsA</i> . ....	44
<b>Figura 22.</b> Cromatograma LC-DAD-MS de la fracción de la cepa mutante <i>V. alginolyticus pvsA</i> que contenía el complejo-Ga(III) eluída con H <sub>2</sub> O y CH <sub>3</sub> CN (1:1), en cartucho OASIS ®HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con $t_R=8.79$ min.....	45

<b>Figura 23.</b> Cromatograma LC-DAD-MS de la fracción de la cepa mutante <i>V. alginolyticus</i> <i>pvsA</i> que contenía el complejo-Fe(III) eluída con H <sub>2</sub> O y CH <sub>3</sub> CN (1:1), en cartucho OASIS <sup>®</sup> HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con <i>t<sub>R</sub></i> =10.20 min .....	46
<b>Figura 24.</b> Sideróforo vibrioferrina de <i>E. Tarda</i> identificado por HPLC-DAD-HRMS en forma aducto [M+Na] <sup>+</sup> .....	47
<b>Figura 25.</b> Cromatograma LC-DAD-MS de la fracción de <i>E. tarda</i> que contenía vibrioferrina en forma de aducto ([M+Na] <sup>+</sup> ) eluída con H <sub>2</sub> O, en columna de Amberlite <sup>®</sup> XAD-4. Espectro de masas (abajo) correspondiente al pico con <i>t<sub>R</sub></i> =1.83 min.....	49
<b>Figura 26.</b> Algunos metabolitos secundarios aislado por el grupo de investigación PRONAMAR .....	50
<b>Figura 27.</b> Estructuras empleadas en los cálculos de desplazamiento químico de <sup>13</sup> C.....	52



## Agradecimientos

A los profesores Jaime Rodríguez y Carlos Jiménez, por aceptarme en su grupo de investigación y por el trato cordial que han tenido siempre para con mi persona

A María Blanco, Montserrat Martínez y Ricardo Riveiros por compartir conmigo este año de trabajo

A la profesora Soledad Muniategui, por su mano amiga en todo momento

A mi primo William Guevara y tío Manuel Monteverde, por su tremendo apoyo en las gestiones de mi traslado a España

A Gely Rama, por estar junto a mí en los últimos meses de la realización de este proyecto

*A Mercedes y Oscar, por siempre animarme a seguir adelante*

## Abreviaturas y Acrónimos

°C	Grados centígrados
B3LYP	Funcional híbrido de Lee-Yang-Parr
DFT	Teoría de Funcionales de Densidad
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
h	Horas
HLB	Hidrophilic-Lipophilic Balance
LC-MS	Espectrometría Líquido-Masas
min	Minutos
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
SPE	Extracción en Fase Sólida
TFA	Ácido trifluoro acético
uma	Unidades de Masa Atómica
XAD	Soporte adsorbente hidrofóbico polimérico

## Resumen

Las bacterias de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* son responsables de grandes pérdidas económicas en todo el mundo. En este sentido las investigaciones para encontrar un mecanismo de control de estas son pertinentes. En este trabajo de fin de grado se ha demostrado que la síntesis de sideróforos tipo vanrobactina es recurrente en la especie *Vibrio*. Además hemos comprobado que la movilización por conjugación de plásmidos involucrados en la biosíntesis de sideróforos entre bacterias patógenas puede proveer de nuevas funciones a la bacteria receptora. También hemos comprobado la existencia del sideróforo vibrioferrina, propuesto por previamente por análisis genómicos, en la bacteria patógena *Edwardsiella tarda*. Finalmente se encontró una combinación funcional y conjunto base adecuada para la determinación desplazamientos químicos de carbono-13 mediante cálculos DFT en modelos sencillos con átomos de azufre.

## Summary

*Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae* bacteria are responsible for considerable economic losses worldwide. In order to find a control mechanism of this fact makes any research related very relevant. In this memory we found that the synthesis of vanrobactin-type siderophores is recurrent in all *Vibrio* species. Also we have demonstrated that the mobilization by plasmid conjugation involved in the biosynthesis of siderophores in pathogenic bacteria may provide new functions to a recipient bacterium. Furthermore we have detected the siderophore vibrioferrina in a pathogenic bacteria *Edwardsiella tarda*, previously proposed by genomic analysis. Finally we found a suitable pair functional/basis set for determine  $^{13}\text{C}$  chemical shifts on simple models containing sulfur atoms.

## Resumo

As bacterias da familia *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae* son responsables de grandes perdas económicas en todo o mundo. E por iso moi importante todas as investigacións posibles co fin de atopar os mecanismos de control destas bacterias. Iste traballo de fin de grado mostra que a síntese de sideróforos tipo vanrobactina é recorrente en especies de *Vibrio*. Asemade vimos de demostrar que a mobilización por conxugación dun plasmídeo responsable na biosíntese de sideróforos en bacterias patóxenas, poden proporcionar novas funcións a bacteria receptora. Tamén determinanos que o sideróforo vibrioferrina está presente na bacteria patóxenas *Edwardsiella tarda*, composto proposto con

anterioridade pola análise xenómica. Finalmente, atopamos un funcional e un conxunto base adecuado para determinar os desplazamentos químicos de carbono-13 en modelos simples con átomos de xofre.

# 1. Introducción

## Química de productos naturales marinos

Los años que corren han visto un considerable progreso en las investigaciones en metabolitos secundarios bioactivos de microorganismos, plantas y organismos marinos. Estos compuestos poseen las más diversas e inusuales estructuras así como muy interesantes propiedades, antimicrobianas (Kumar, et al., 2013), antiinflamatorias (Jin-Ching, et al., 2013), citotóxicas (CHARAN, et al., 2004) o antioxidantes (Dao-Zong, et al., 2011). Es comúnmente aceptado que los metabolitos secundarios tienen funciones defensivas o de captación de nutrientes del medio marino (Lakshmi & Kumar, 2009) (Manning, et al., 2006) por lo que deberían ser explotados como posibles fuentes de drogas contra diferentes enfermedades. Por las dificultades que reviste su aislamiento ha sido una labor retadora y al mismo tiempo productiva, por ser la fuente más promisoría para el desarrollo de estas drogas (Espada, et al., 2011)

## Acuicultura

La acuicultura es definida como cría de organismos acuáticos. Esta práctica ha sido impulsada mayoritariamente por capitales privados, contribuyendo a la seguridad alimentaria mediante la producción directa de comida originaria del mar y generando fuentes de empleo. En adición a esto la acuicultura comercial ha sido convertida en un negocio rentable que genera grandes ganancias. (Hishamunda & Ridler, 2003)

Las dos últimas décadas han sido testigo de un incremento marcado en la producción de pescado proveniente de granjas y a su vez una substancial reducción en los precios del producto. Al mismo tiempo que la captura de peces en estado salvaje se ha estancado o incluso reducido, se ha producido un aumento en la demanda de peces provenientes de las piscifactorías. Entre los mercados de mayor importancia en la Unión Europea se encuentran: el salmón del atlántico, el pez gato americano, trucha y la lubina. No solo se tiene en común el incremento en la producción por medio de la acuicultura sino también la reducción en los precios (Asche, et al., 2001) (Sadovy & Lau, 2002)

La acuicultura marina tiene el potencial de suplir las necesidades de alimentos marinos del mundo y generar medios de vida e ingreso. Sin embargo, esta solo puede operar dependiendo de fuentes naturales, para ello, deben ser comprendidos los lazos que

unen esta práctica con las fuentes salvajes: huevos, alimento para peces y prácticas marino-culturales. (Sadovy & Lau, 2002). La producción proveniente de la acuicultura se incrementó aproximadamente en un 11% anual entre 1985 y 1995, esto representó un crecimiento mayor que la producción de carne bovina o porcina; convirtiéndose de esta manera en la fuente de producción de comida de mayor y más rápido crecimiento del mundo.

Información proveniente de la FAO predice un crecimiento sostenido en la demanda de alimentos provenientes del mar. (Hishamunda & Ridler, 2003). Muchos países ha usado la acuicultura para producción intensiva de peces, entre ellos Turquía (Rad & Köksal, 2000), Hong Kong y España (Sadovy & Lau, 2002) arrojando cantidades significativas de ingresos para ellos. Estas cifras indican que a nivel mundial y español, durante el 2009, el 38.5 y el 22.8 % de la producción de pescado respectivamente se debió a la producción de piscifactorías. (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010)

**Tabla 1.** Producción de pescado por captura y en piscifactorías a nivel mundial y en España para el año 2009

Lugar	Captura (ton)	Acuicultura (ton)	Total (ton)
Mundo	88918040	55680738	144598.778
España	904959	266476	1.171.435

Antes de considerar la explotación comercial de una especie es necesario poseer un amplio rango de conocimientos biotecnológicos, sobre todo los concernientes a hábitos reproductivos, cría, desarrollo y enfermedades. Muchos de los aspectos biológicos concernientes a esta actividad están ya resueltos y han permitido un incremento en las ganancias substancial; por otro lado aún está pendiente la diseminación de enfermedades que cada cierto tiempo azotan las piscifactorías (Luna Sotorrío, 2002).

## Patógenos en peces

El hierro es un elemento esencial para la mayoría de los organismos vivos, dado que cumple diversos roles en importantes procesos biológicos como síntesis y reparación de ácido nucleico, respiración, transporte fotosintético, reducción de nitratos, fijación de nitrógeno y desintoxicación de radicales libres. (Funahashi, et al., 2002). Sin embargo, el hierro existe formando complejos insolubles que son inaccesibles a las bacterias, la concentración de hierro disuelto en las masas de agua dulce y salada es particularmente

baja ( $<0.4 \mu\text{M}$ ), incluso en aguas abiertas es incluso más bajo que en la mayoría de los ambientes terrestres (Bruland, et al., 1991) (Matsuo, et al., 2011). En los mamíferos el hierro mayoritariamente se encuentra ocupando lugar dentro de las células en forma de hemoglobina y la pequeñas cantidades de hierro extracelular es secuestrado por proteínas con alta afinidad a enlazarse con hierro.

Para sobreponerse a tales condiciones de restricción de hierro, la mayoría de los patógenos pueden expresar sistemas de transporte de alta afinidad para eficientemente obtener hierro de una o más de estas fuentes de hierro. Uno de estos mecanismos es la asimilación directa de hemoglobina y captura de hierro de transferrina o lactoferrina a través de receptores bacterianos específicos.

Otro mecanismo envuelve la producción y secreción de sideróforos. Estos compuesto químicos, son definidos como agentes específicos para el transporte de iones férricos mediante su quelación, enlazando a la transferrina o lactoferrina, poseen un bajo peso molecular, y son producidos tanto por especies de microorganismos eucariotas como procariontes bajo condiciones de deficiencia de hierro. (Griffiths, et al., 1984). Una vez que el hierro ha sido capturado por estos, el complejo sideróforo-Fe(III) es llevado dentro de las células bacterianas mediante receptores celulares adaptados a reconocer específicamente esos ligandos y transportadores. Adicionalmente, para aprovechar las diversas fuentes de hierro que pudieran estar presentes en sus alrededores, algunas bacterias expresan sistemas adicionales de transporte incluyendo receptores que los habilitan a utilizar exógenos o heterólogo sideróforos producidos por otras especies microbianas. Su habilidad de utilizar el hierro de huéspedes ha sido asociado con la patogenicidad de las bacterias (Funahashi, et al., 2002). Es conocido que su biosíntesis es reprimida en ambientes con alta concentración de hierro. (Rachid & Ahmed, 2005), extensos estudios sobre su aislamiento (Espada, et al., 2011), estructura (Manning, et al., 2008), transporte (Neilands, 1995) y genética molecular (Gärdes, et al., 2013) han sido desarrollados en la última década. Sin embargo el estudio de sideróforos marinos aún se encuentra menos extendido en comparación a su contra parte terrestre, y se dispone de una menor cantidad de estructuras elucidadas.

La virulencia en las bacterias patógenas en peces de acuicultura ha sido relacionada, según evidencia experimental, con la presencia de sideróforos y su cantidad producida. (Matsuo, et al., 2011) Entre las enfermedades que son producidas por esas bacterias son de destacar la vibriosis, la edwardsielosis y la pasteurelosis.



## Microorganismos asociados a las piscifactorías

### Edwardsiellosis

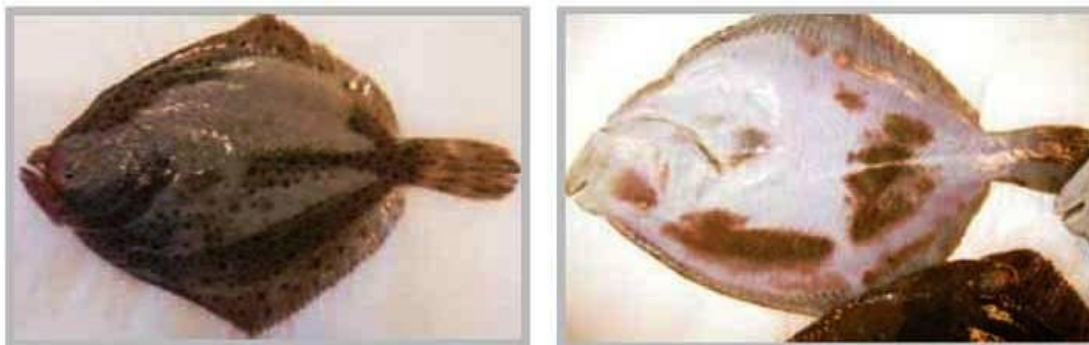
Es una infección bacteriana importante causada por las bacterias *E. tarda* y *E. ictaluri*, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Responsable de pérdidas comerciales importantes en piscifactorías de agua dulce y salada. (Soto, et al., 2012) En los últimos tiempos la vacunación se ha convertido en un tema importante para la prevención de esta enfermedad. (Mosharraf, et al., 2009).

*E. tarda*, causa una enfermedad de putrefacción enfisematosa en bagres y gangrenas en varias especies de peces (**Figura 1**). Esta enfermedad tiene un efecto económico considerable en la industria de acuicultura, siendo reportado que esta bacteria causa infecciones en las especies de acuicultura *Paralichthys olivaceu* (en Japón), *Scophthalmus maximus*, (en España), *Anguilla japonica* (en Taiwan) y en *Silurus asotusk*, (en Corea). Esta enfermedad ocurre más frecuentemente en los meses cálidos del año. La *E. tarda* también causa infecciones en serpientes, leones marinos, aves y ganado. Adicionalmente *E. tarde* es un importante patógeno zoonótico asociado frecuentemente con gastroenteritis, diarrea y meningitis en humanos, por lo que la eliminación de este patógeno de acuarios o piscifactorías es vital. (Mainous & Smith, 2010)

La Edwardsiellosis es una infección subclínica crónica en piscifactorías, y solamente se hace presente cuando los pescados son procesados. Los peces infectados pueden contaminar los equipos de procesamiento, lo que implica detener las plantas para desinfectar las maquinarias.

### Vibriosis

La vibriosis es una de las más serias infecciones en los cultivos marinos a nivel mundial. Las especies bajo el género *Vibrio*, familia *Vibrionaceae*, se encuentran en estuarios y ecosistemas marinos. La vibriosis es una amenaza seria la industria de la acuicultura siendo la responsable de mortalidad masiva de peces y mariscos alrededor del mundo. Las bacterias del género *Vibrio* son las dominantes en piscifactorías de agua salada, consistiendo del 60% del total de las bacterias heterotróficas y patógenas oportunistas.



**Figura 1.** Lesiones externas en rodaballo características de infección por *E. tarda*, en la zona dorsal (derecha), zonas decoloradas en la piel, ojos con tumefacciones y bocas hemorrágicas y en la zona ventral (izquierda) zonas hemorrágicas y/o con abundantes petequias.

Si la infección por *Vibrio* no es controlada se volverá sistémica, resultando en la muerte del pez. Para controlar la enfermedad se utilizan antibióticos y agentes quimioterapéuticos. (Annie & Lipton, 2012). Los síntomas de la infección de vibriosis son piel oscura, branquias pálidas, exoftalmia, áreas hemorragias en la zona de la boca y en la base de las aletas, opacidad en la cornea, úlceras en la superficie de la piel y acumulación de fluido en la cavidad peritoneal (**Figura 2**) (Annie & Lipton, 2012)



**Figura 2.** Grupo de peces con la sintomatología característica de la vibriosis

Entre las especies que de vibrio, que ha sido identificadas como patógenos agresivos y recurrentes en las piscifactorías en el Europa y Asia están el *V. ordalii* (Schiewe, et al., 1981); *V. metschnikovii* (Wan, et al., 2011); *V. pelagius* (Ringø, et al., 2008) y *V. harveyi* (Ping-Chung, et al., 1996)

Las bacterias pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* están extendidas en el ambiente marino. En la actualidad se conocen 128 especies de *Vibrio*. Muchos de ellos son conocidos por patogenicidad y relaciones simbióticas. A pesar de su habilidad de interactuar con los eucariotes, los vibrios se encuentran en su mayoría inexplorados y de su habilidad de producir metabolitos secundarios y su estudio se ha limitado solo a una pequeña cantidad de especies. (Mansson, et al., 2011). Los miembros de esta familia están distribuidos en el ambiente marino, incluyendo estuarios, aguas costeras y sedimentos. Dentro de esta familia se conocen siete géneros: *Allivibrio* (6 especies), *Enterovibrio* (4 especies), *Salinivibrio* (6 especies), *Catencoccus* (1 especie), *Grimontia* (1 especie), *Vibrio* (89 especies) y *Photobacterium* (21 especies) (Mansson, et al., 2011)

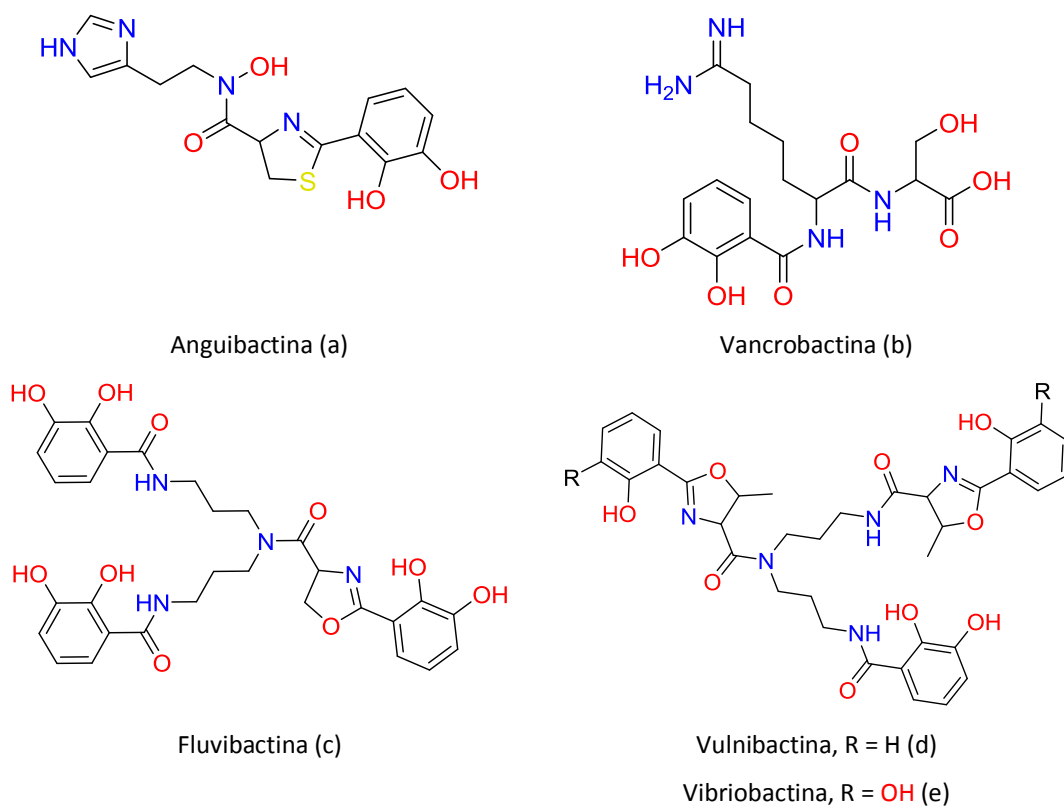
### Sideróforos producidos por la familia *Vibrio* y *Enterobacteriaceae*

Un amplio rango de sideróforos aislado de organismos marinos, entre los cuales los producidos por las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae* gozan de gran diversidad estructural. Estos presentan gran interés y son un reflejo de la diversidad química y sirven para cuantificar el potencial biosintético de estos grupos de bacterias. (Figura 3, Figura 4) (Mansson, et al., 2011) (Griffiths, et al., 1984). A continuación se presentan algunos de los sideróforos más representativos de ambas familias:

**Tabla 2.** Algunos sideróforos producidos por la familia *Vibrionaceae*.

Nombre	Clase de compuesto	Fuente
<b>Anguibactina</b>	Catecol hidroxamato	<i>V. anguillarum</i>
<b>Aerobactina</b>	Hidroxamato	<i>Vibrio sp.</i>
<b>Divancrobactina</b>	Catecol	<i>Vibrio sp.</i>
<b>Fluvibactina</b>	Catecol Hidroxifenil-oxazolono	<i>V. fluvialis</i>
<b>Vancrobactina</b>	Catecol	<i>V. anguillarum</i>
<b>Vibriobactina</b>	Catecol Hidroxifenil-oxazolona	<i>V. cholerae</i>
<b>Vibrioferina</b>	Carboxilato	<i>V. parahaemolyticus</i>
<b>Vulnibactina</b>	Catecol Hidroxifenil-oxazolona	<i>V. vulnificus</i>

Tomado de: (Mansson, et al., 2011)

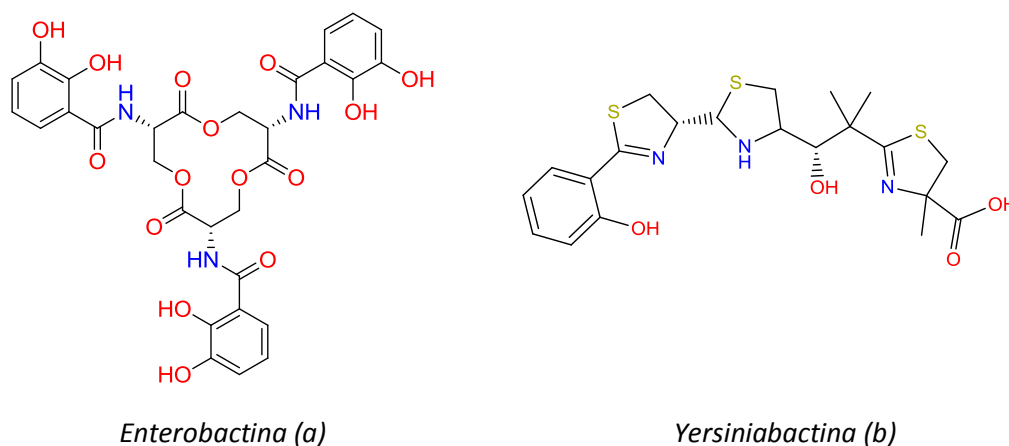


**Figura 3.** Algunos sideróforos aislados de *Vibrio* sp.

**Tabla 3.** Algunos sideróforos producidos por la familia *Enterobacteriaceae*

Nombre	Clase de compuesto	Fuente
Enterobactina	Catecol	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhimurium</i>
Yersiniabactina		<i>Yersinia pestis</i>
Ferrioxamina E	Tri-hidroxamato cíclico	<i>Enterobacter agglomerans</i>

Tomado de: (Mokracka, et al., 2004) (Anon., 1988)



**Figura 4.** Algunos sideróforos aislados de la familia *Enterobacteriaceae*

Esta ocurrencia cosmopolita de los metabolitos indica una alta incidencia de transferencia genética horizontal, la cual levanta interesantes preguntas concernientes a la función ecológica de algunas de estas moléculas. En estos subyace una potencial fuente de compuestos bioactivos junto con los desafíos asociados a su investigación. (Mansson, et al., 2011).

## Resolución de estructuras por métodos computacionales

Recientemente, la relación entre los desplazamientos químicos de RMN y la determinación estructural han sido motivo de intensas investigaciones y un número crecientes de aplicaciones que explorar tal relación. Dado que los desplazamientos químicos están fuertemente gobernados por la geometría molecular, la configuración de los estereo centros existentes añade una conducta conformación particular que claramente afecta a estos desplazamientos químicos; en este sentido las moléculas que contiene átomos de azufre como es el caso del grupo tiazolidino, (Rauter, et al., 2005), tio-azúcares (Aguirre-Valderrama & Dobado, 2006) y más recientemente sideróforos provenientes de organismo marinos (Souto, et al., 2012) poseen un entorno particular que le confiere un particular interés para su estudio.

Los estudios DFT como herramienta para determinar diferentes propiedades de moléculas orgánicas se ha convertido en un estándar en los métodos computacionales para la determinación estructural. Uno de los usos particulares de estos procedimientos es la aplicación al cálculo de desplazamientos químicos teóricos de RMN, los cuales son poderosas herramientas tanto para la asignación estructural como para la asignación de

estructuras. (Cen-Pacheco, et al., 2013) Actualmente este grupo de investigación puede predecir desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con un grado de precisión que permite la elucidación estructural de moléculas orgánicas complejas. (Souto, et al., 2012)

Los conceptos expuestos en las páginas anteriores nos llevarán a encontrar respuesta a una serie de planteamientos explicados en los objetivos siguientes, enmarcados dentro de los proyectos desarrollados por este grupo de investigación

## 2. Objetivos

Este trabajo se encuentra enmarcado dentro del Proyecto *Análisis estructural de los sideróforos producidos por las dos subespecies de Photobacterium damsela: desarrollo de nuevos antibacterianos y vacunas* Subproyecto dentro del proyecto coordinado titulado: *“Análisis comparativo de la síntesis de sideróforos en las subsp de Photobacterium damsela: nuevos métodos de prevención y control de la vibriosis y la pasteurelosis en peces, Referencia GL2012-39274-C02-02*, proyecto vigente subvencionado por la Ministerio de Economía y Competitividad

Como objetivos específicos planteados para este trabajo de investigación, fueron propuestos:

- **Objetivo 1.** Demostrar que la biosíntesis de sideróforos tipo vanrobactina es recurrente en la especie *Vibrio*

Se pretende demostrar que los sideróforos tipo vanrobactina no está limitados únicamente a las especies *V. anguillarum* y *V. campbelli*. Para ello se estudiaron en varias cepas, de entre una colección de 100 aisladas en peces, la presencia de este compuesto mediante el uso de SPE con cartuchos HLB y para la detección la técnica híbrida LC/MS

- **Objetivo 2.** Probar que la movilización por conjugación entre bacterias patógenas de plásmidos involucrados en la biosíntesis de sideróforos, puede proveer nuevas funciones a la bacteria receptora

Para ello se estudiará la presencia de piscibactina en un mutante de *Vibrio alginolyticus* al que se le incorporó por conjugación el plásmido pPHDP70, que se sabe que es el responsable de la síntesis y transporte de piscibactina, un sideróforo aislado de la bacteria *Photobacterium damsela subsp piscicida*

- **Objetivo 3.** Determinación de los sideróforos de la bacteria patógena, *Edwardsiella tarda*, para la que se propuso por análisis genómicos la presencia de vibrioferrina

El grupo de microbiología con el cual colabora nuestro grupo de investigación logró identificar un cluster genes en la bacteria *Edwardsiella tarda*, similar a los implicados en la biosíntesis del sideróforo vibrioferrina. Se pretende confirmar la presencia de este

sideróforo en esa bacteria mediante su extracción de un cultivo de una cepa con la resina Amberlita® XDA-4 y la posterior detección mediante LC/MS

- **Objetivo 4.** Búsqueda de un funcional y conjunto base adecuado para la determinación desplazamientos químicos en modelos sencillos con átomos de azufre

Se pretende encontrar los funcionales y conjuntos base adecuados a la hora de estimar teóricamente los desplazamientos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  utilizando métodos computacionales basados en la teoría de funcionales de densidad (DFT) en compuestos con átomos de azufre. Para ello se realizará un estudio a modelos muy sencillos con estas características, sulfuro de dietilo y sulfuro de isopropilo, y los desplazamientos teóricos estimados con diferentes funcionales y conjuntos base se compararon con datos experimentales.



## 3. Materiales y Métodos

### Equipamiento

La separación cromatográfica fue realizada en un sistema de Cromatografía Líquida Agilent 1100 equipado con un sistema degasificador, bomba cuaternaria, automuestreador, compartimento de columna y un detector de diodos (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). La longitud de onda del UV fue ajustada a 214 nm, con un ancho de banda de 8 nm. Los espectros de masas fueron realizados en modo de ionización electrospray usando un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher) acoplado a un sistema de HPLC Accela de Thermo . Las medidas de masa fueron adquiridas en modo ionización positiva sobre un rango de masa de 100-700 uma.

Se usaron cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) marca Oasis<sup>®</sup> HLB de la marca Waters (Milford, MA, USA), y adicionalmente también se realizaron extracciones con la resina lipofílica XAD-4 de la marca Amberlite<sup>®</sup>.

### Reactivos

El acetonitrilo y metanol grado analítico usado fue obtenido de Lab Scand (Dublín, Irlanda), ácido trifluoroacético y fórmico fue adquirido de Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), la solución N de amonio en MeOH (CH<sub>3</sub>OH:7N NH<sub>3</sub>) de la casa comercial Accros (Geel, Belgium) y el agua ultrapura se obtuvo usando un sistema Milli-Q plus de la casa Millipore (Bedford, MA, USA).

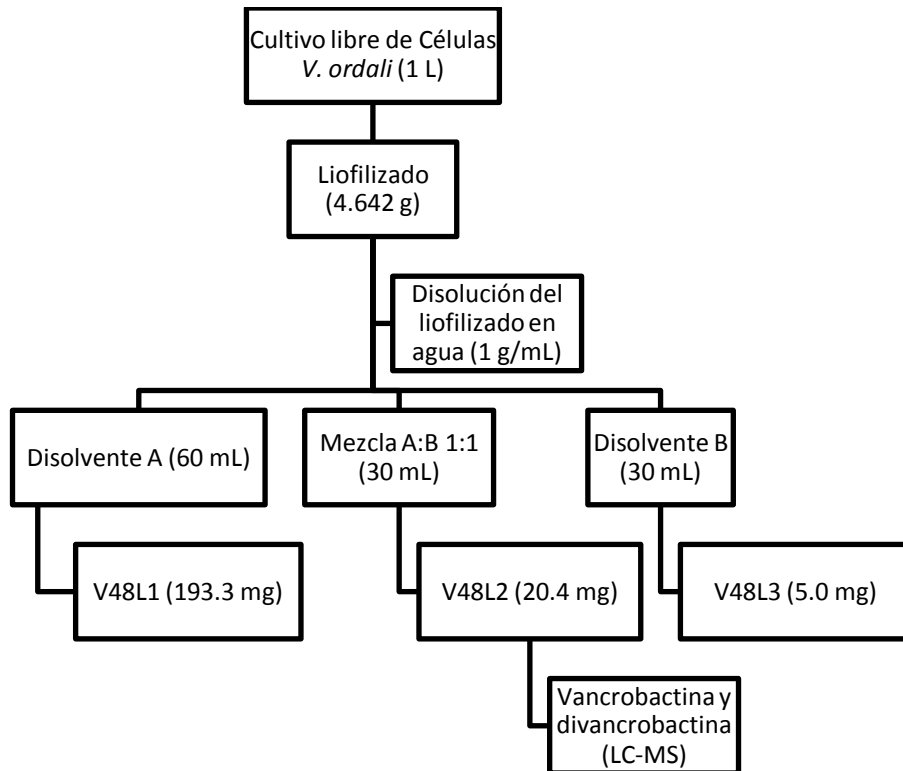
### Procedimientos de separación

**Objetivo 1. Demostrar que la biosíntesis de sideróforos tipo vancrobactina es recurrente en la especie *Vibrio***

#### **Fraccionamiento del *V. ordali***

Un litro de cultivo libre de células de *V. ordali* fue liofilizado para dar 4.642 g de material. Las fases móvil empleadas en la SPE fueron agua (Disolvente A) y acetonitrilo (Disolvente B), cada uno conteniendo 0.1% TFA (v/v). El cartucho fue acondicionado y equilibrado con 60 mL de disolvente B y 60 mL de disolvente A. Posteriormente, es cargado con la muestra disuelta en agua (1 g/mL). A continuación, se lavó con 60 mL de disolvente A, 30 mL de una mezcla de disolvente A:B 1:1 y finalmente con 30 mL de disolvente B. Los

sideróforos vancrobactina y divancrobactina eluyeron en la segunda fracción y fueron detectados por LC/MS a partir de sus iones pseudomoleculares  $m/z$  398 ( $[M+H]^+$ ) y  $m/z$  777 ( $[M+H]^+$ ) respectivamente. Cada una de las tres fracciones V48L1, V48L2 y V48L3 (**Figura 5**) fue concentrada a sequedad obteniéndose 193,3; 20,4 y 5,0 mg respectivamente. (Espada, et al., 2011)



**Figura 5.** Esquema de fraccionamiento del extracto libre de células de *Vibrio ordali* mediante cartuchos HLB

#### **Fraccionamiento del *V. metschnikovii*, *V. harveyi* y *V. pelagius***

Se procedió de igual manera para las especies *V. metschnikovii*, *V. harveyi* y *V. pelagius*, lográndose detectar la presencia de sideróforos tipo vancrobactina según se muestra a continuación.

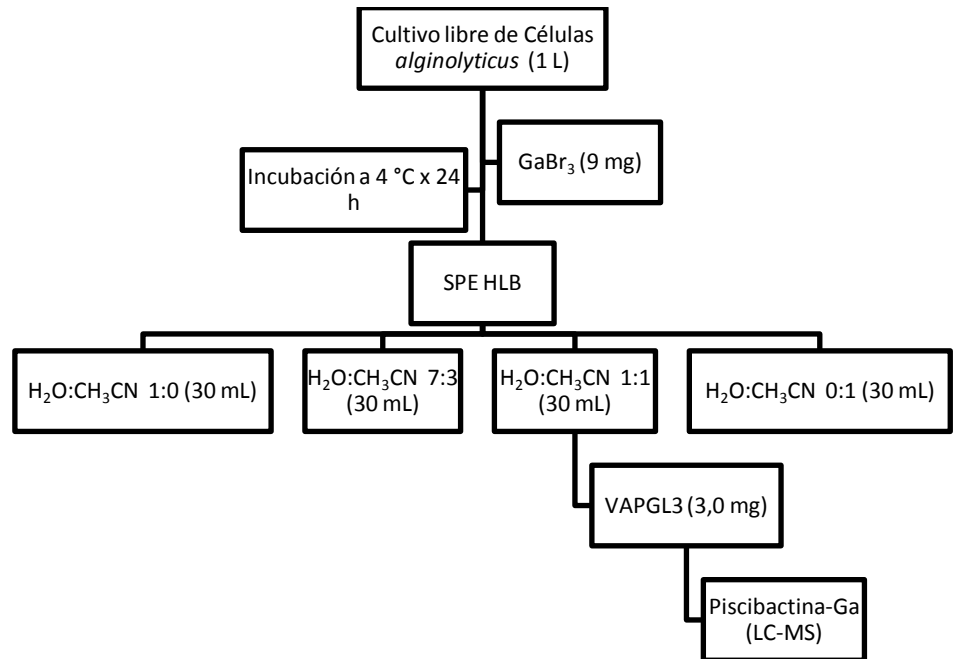
**Tabla 4.** Sideróforos tipo vancrobactina detectados en las especies *V. metschnikovii*, *V. harveyi* y *V. pelagius*

Bacterias	Fracciones eluidas en HLB	Masa (mg)	Sideróforo	
			Vancrobactina	Divancrobactina
<i>V. metschnikovii</i>	V62L1	608.0	-	-
	V62L2	35.0	+	+
	V62L3	8.4	-	-
<i>V. harveyi</i>	V15L1	728.5	-	-
	V15L2	19.3	-	-
	V15L3	3.3	+	+
<i>V. pelagius</i>	V99L1	633.1	-	-
	V99L2	21.2	+	+
	V99L3	1.5	+	+

**Objetivo 2. Probar que la movilización por conjugación entre bacterias patógenas de plásmidos involucrados en la biosíntesis de sideróforos, puede proveer nuevas funciones a la bacteria receptora**

Un litro de cultivo libre de células de la cepa mutante *Vibrio alginolyticus pvsA* se concentró a presión reducida (39 °C) y luego se dividió en dos porciones de 150 mL. A continuación 9 mg de GaBr<sub>3</sub> (o 8 mg de FeCl<sub>3</sub>) fueron lentamente añadidos a cada porción durante 5 min y gentilmente agitados por 10 min adicionales. Luego de que ambas disoluciones fueron incubadas durante 24 h a 4 °C, 75 mL de cada una de ellas fueron fraccionadas por SPE a través de un cartucho Oasis® HLB (35 cm<sup>3</sup>, 6 g), el cual se eluyó con 30 mL las siguientes mezclas de disolvente; H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 1:0, 7:3, 1:1 y 0:1, para obtener 4 fracciones, que fueron nombradas para la incubada con Ga(III): VAPGL1, VAPGL2, VAPGL3 y VAPGL4, y VAPFL1, VAPFL2, VAPFL3 y VAPFL4, para la incubada con Fe(III) (**Figura 6**). Las fracciones VAPGL3 y VAPFL3, eluidas con H<sub>2</sub>O: CH<sub>3</sub>CN 1:1 fueron analizadas por LC/MS usando una columna Atlantis dC18 (100X4.6 mm, 5 μm) (Waters) con una fase móvil consistente de un gradiente de 35 min de 10 a 100 % CH<sub>3</sub>CN en H<sub>2</sub>O (v/v), luego 5 min a 100 % CH<sub>3</sub>CN. El análisis de la fracción VAPGL3 (H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>CN 1:1) (3,0 mg) mostró la presencia a  $t_R = 8.79$  min de un pico cuyo espectro de masas que presentó el cluster isotópico del complejo de piscibactina-Ga(III) a 520/521 (**Figura 21**) (**Figura 22**). La banda UV característico del acomplejamiento del metal no se encontró en su espectro de UV debido a

la baja concentración del complejo en la muestra. El análisis de LC/MS de la fracción VAPFL3 (0,9 mg) mostro la presencia de un compuesto con  $t_R=10.20$  min cuyo espectro de masas exhibió un ión pseudomolecular  $[M+H]^+$  a  $m/z$  507, que se diferencia en 13 unidades del complejo piscibactina-Ga(III). En vista, de que no se encontró el cluster isotópico típico del complejo de piscibactina-Fe(III) pareciera indicar que no se formó dicho complejo (Souto, et al., 2012)

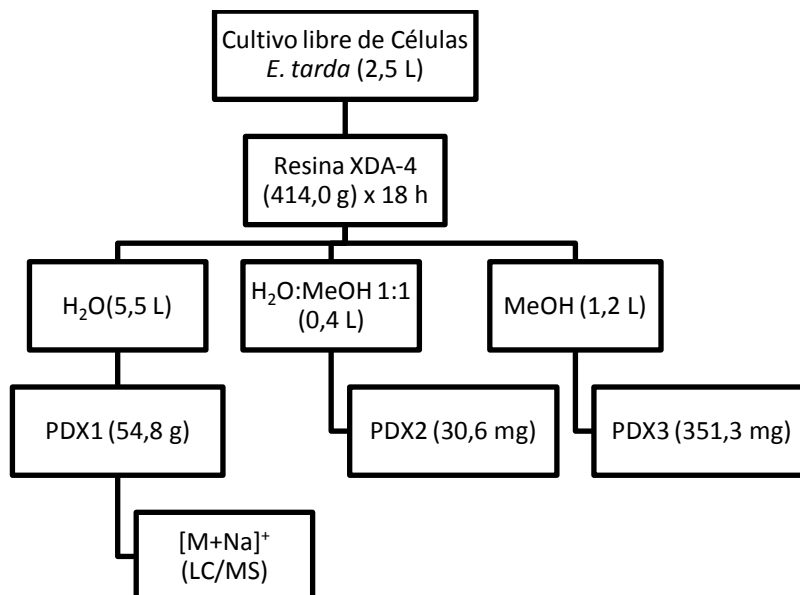


**Figura 6.** Esquema de fraccionamiento para la obtención del complejo piscibactina-Ga(III) a partir de la cepa mutante *Vibrio alginolyticus pvsA* mediante cartucho Oasis® HLB

### **Objetivo 3. Determinación de los sideróforos de la bacteria patógena, *Edwardsiella tarda*, para la que se propuso por análisis genómicos**

Dos litros de cultivo libre de células de la bacteria *Edwardsiella tarda* fueron acidificados hasta  $pH = 2,5$  con HCl. Posteriormente se mezclaron con 414 g de resina Amberlite® XAD-4 y se dejaron en agitados (18 h). Seguidamente la mezcla fue colocada en una columna de cromatografía adecuada y lavada, a un flujo de 1mL/min) con los disolventes H<sub>2</sub>O (hasta que no se detecto la presencia de sales) (5.5 L), H<sub>2</sub>O:MeOH 1:1 (0,4 L) y MeOH (1,2), obteniéndose tres fracciones: PDX1 (54.8 g), PDX2 (30.6 mg) y PDX3 (351,3 mg) (**Figura 7**). El sideróforo vibrioferrina (VF) fue identificado por LC/MS de alta resolución como parte de un ión pseudomolecular  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  457, a  $t_R= 1,83$  min, en la fracción acuosa (PDX1) usando una columna Atlantis dC18 (100X4.6 mm, 5  $\mu$ m) (Waters) con una

fase móvil consistente de un gradiente de 35 min de 10 a 100 % CH<sub>3</sub>CN en H<sub>2</sub>O (v/v), luego 5 min a 100 % CH<sub>3</sub>CN y finalmente 10 min desde 100 % hasta 10 % CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (v/v), a un flujo de 1 mL/min. (Amin, et al., 2007, p. 2)

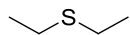


**Figura 7.** Esquema de fraccionamiento del extracto libre de células de la bacteria *E. tarda* mediante resina Amberlite® XAD-4 y LC/MS

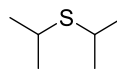
#### **Objetivo 4. Búsqueda de un funcional y conjunto base adecuado para la determinación desplazamientos químicos en modelos sencillos con átomos de azufre**

Las moléculas sulfuro de dietilo y sulfuro de isopropilo (**Figura 8**), fueron sometidas a una búsqueda conformacional usando el módulo GMMX del programa PC-Model versión 9.0, con una ventana energética de menos de 3.5 kcal/mol. Los confórmeros obtenidos fueron comparados energética y estructuralmente con el módulo de comparación del ChemBio3D Ultra 12.0, encontrándose 6 y 11 confórmeros respectivamente mediante el programa Gaussian 09. A continuación se utilizaron cálculos DFT para estimar los desplazamientos químicos de RMN de <sup>13</sup>C utilizándose los diferentes funcionales: MPW1PWP1, PBEPBE y WB97XD, y los conjuntos base: 6-311G(2d,p) y 6-311G(d,p). Finalmente se miraron que para funcional /conjunto base se acercaba al desplazamiento químico experimental. La mejor estimación en ambas moléculas fue a través del funcional WB97XD y el conjunto base 6-311G (2d,p). La diferencia entre la señal de RMN de <sup>13</sup>C teórica y experimental, en el sulfuro de dietilo fue de: C1 y C5: 2,1 y C2 y C4: 7,9 ppm, y

para el sulfuro de isopropilo C1, C5, C6 y C7: 1,6 y C2 y C4: 8,1 ppm. (Nieto, 2013) (Cen-Pacheco, et al., 2013)



*Sulfuro de dietilo (a)*



*Sulfuro de isopropilo (b)*

**Figura 8.** Moléculas orgánicas sencillas contentivas de átomos de azufre

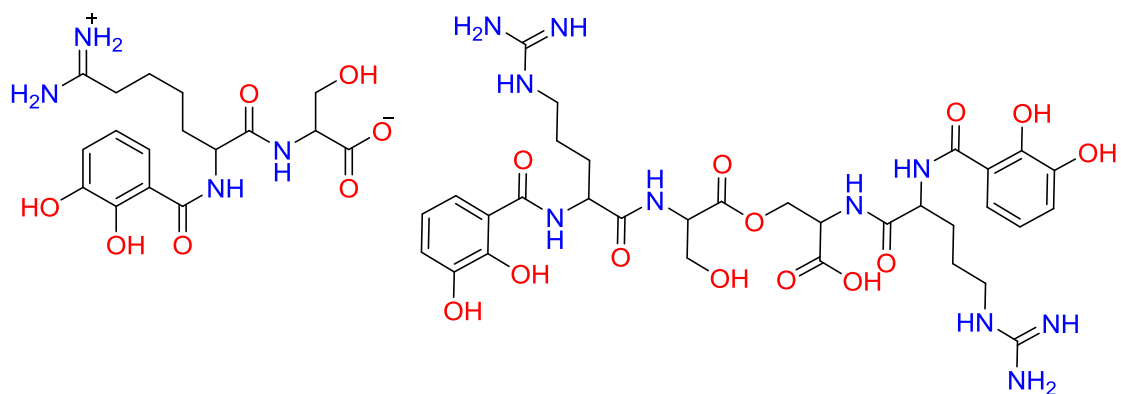
### 3. Resultados y Discusión

**Objetivo 1. Demostrar que la biosíntesis de sideróforos tipo vancrobactina es recurrente en la especie *Vibrio***

La producción de sideróforos por los microorganismos marinos está encaminada a vencer la limitación en la disponibilidad de hierro (III) existente en este medio, de tal manera que el desarrollo un sistema de biosíntesis de sideróforos favorece la viabilidad, considerándose en muchos casos como factores de virulencia. La producción de sideróforo vancrobactina, junto a su dímero y trímero, (**Figura 9**) ha sido anteriormente reportado en el *V. campbelli*, bacteria responsable de enormes pérdidas en las piscifactorías alrededor del mundo. (Balado, et al., 2006) (Sandy, et al., 2010). Trabajos realizados sobre el *V. anguillarum*, demostraron que el sideróforo vancrobactina es utilizado a través del receptor de membrana externa *FvTA*, y por lo tanto es el sideróforo ancestral de esta especie. (Soengas, et al., 2006)

Para lograr una detección rápida y eficiente de los sideróforos tipos vancrobactina en las distintas de *Vibrio*, se utilizó una técnica basada en el uso de un sistema HLB-HPLC/MS, desarrollado por el grupo de investigación donde se desarrolló este trabajo. El sistema hidrofílico-lipofílico se fundamenta en las propiedades de retención del cartucho polimérico HLB. La naturaleza y la altamente específica área superficial de esta resina polimérica permite fraccionar extractos crudos logrando extraer y separar de forma rápida y eficiente metabolitos hidrofílicos usando cantidades mínimas de disolvente (**Figura 5**). (Espada, et al., 2011).

De los resultados obtenidos (**Tabla 4**, pág. 27. **Figuras 10-19** pág. 33 - 42), se evidencia la presencia de los sideróforos vancrobactina y divancrobactina (**Figura 9**) como un marcado de especie para la familia *Vibrionaceae*, al igual que la sideróforo catecólico enterobactina, presente en prácticamente todas las enterobacterias (Griffiths, et al., 1984) y se deduce que la producción de los mismos tiene una larga historia evolutiva asociada al género *Vibrio*. Finalmente la gran influencia que los mecanismos de síntesis de sideróforos tiene sobre la viabilidad de las células parece que promueve la dispersión de este tipo de genes entre especies. Aunque no se pudo detectar la presencia de trivancrobactina, aún no puede descartarse completamente su presencia en algunos de los sobrenadantes.

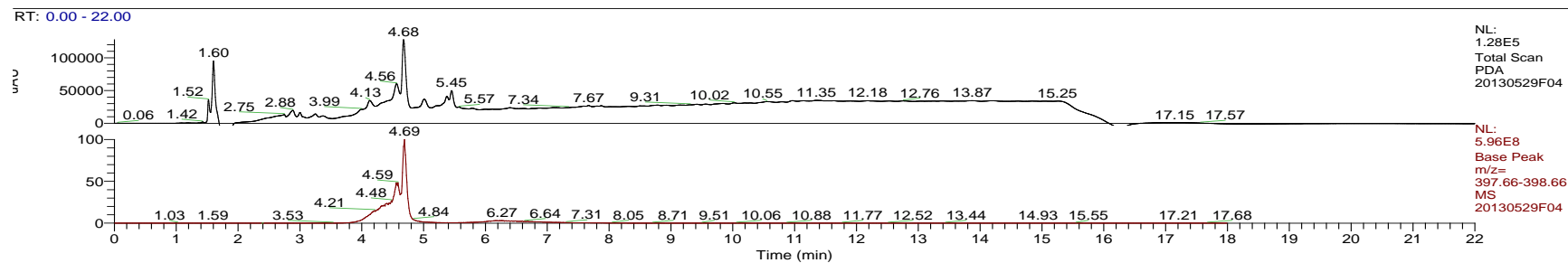


*Vancrobactina (a)*

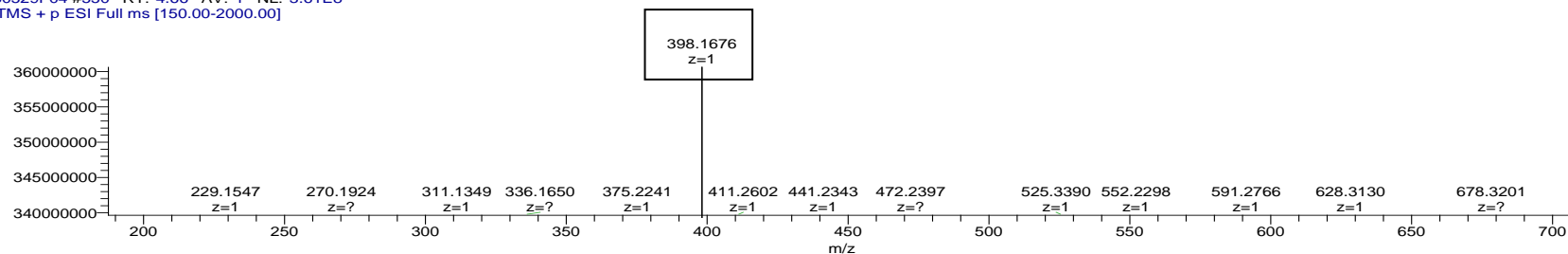
*Divanchrobactina (b)*

**Figura 9.** Sideróforos tipo vancrobactina identificados en *V. metschnikovii*, *V. ordali*, *V. harveyi* y *V. pelagius*.

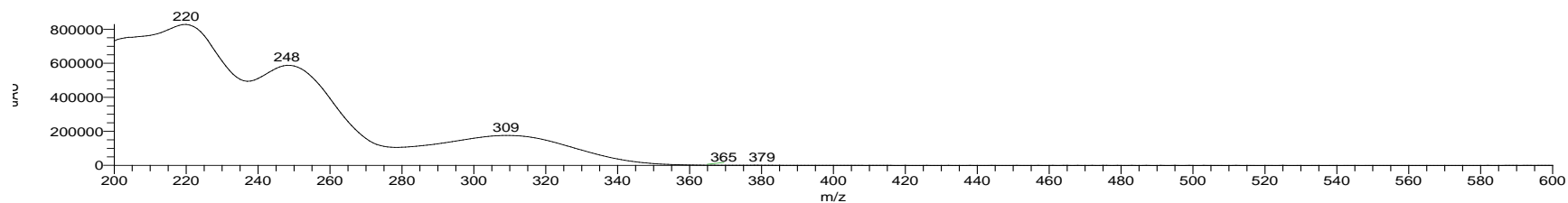




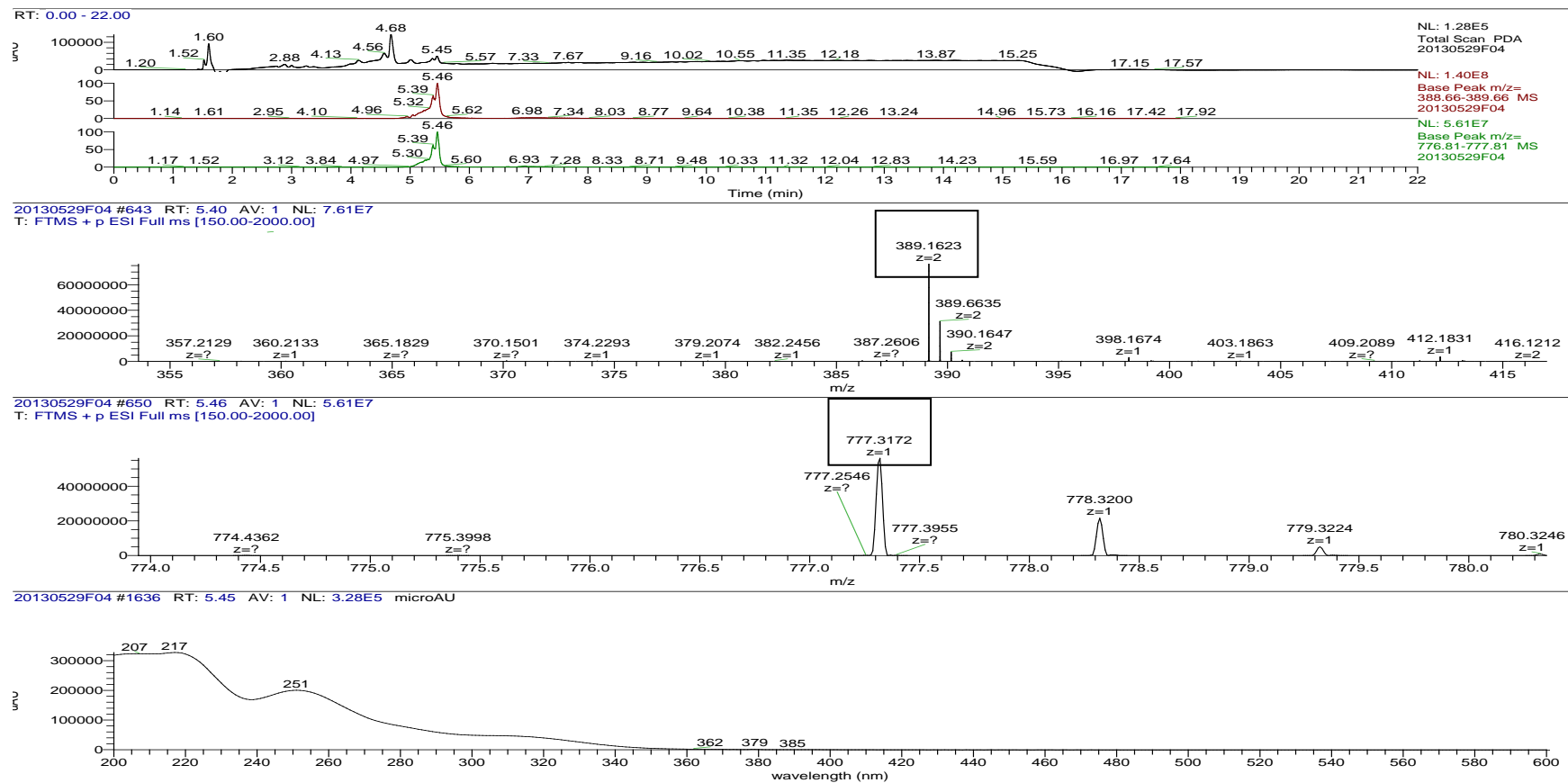
20130529F04 #550 RT: 4.66 AV: 1 NL: 3.61E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



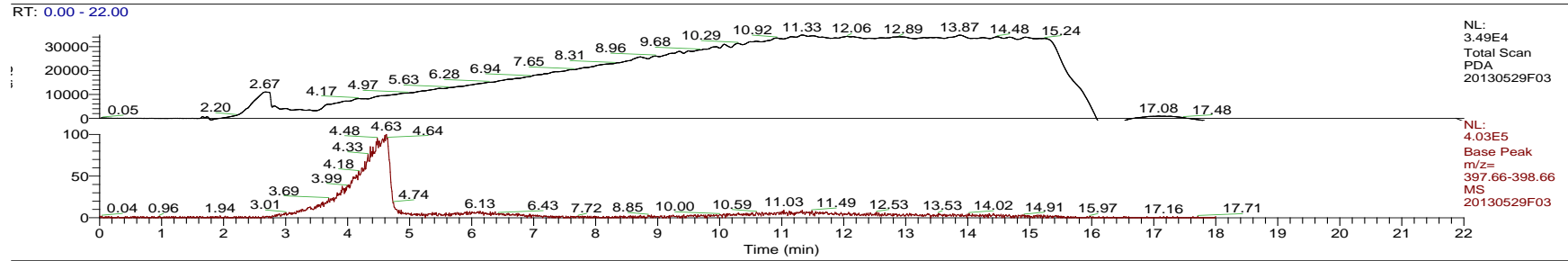
20130529F04 #1405 RT: 4.68 AV: 1 NL: 8.28E5 microAU



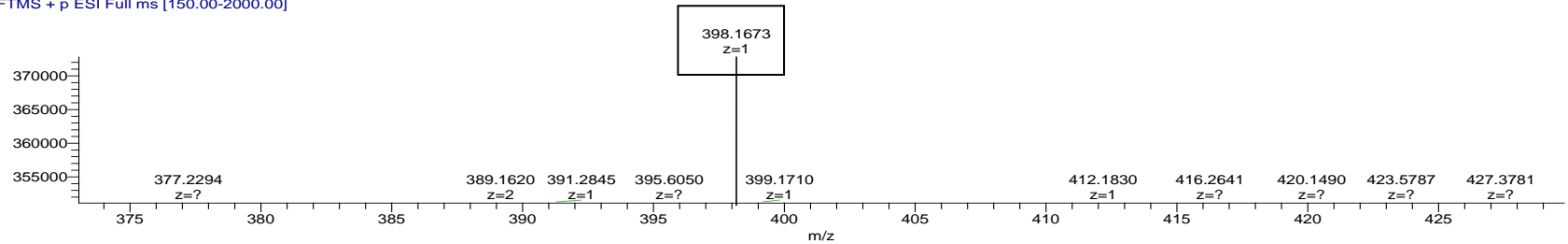
**Figura 10.** Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de *V. ordali* que contenía vanrobactina eluída con H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>CN (1:1) en cartucho OASIS<sup>®</sup>HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con  $t_R=4.68$  min



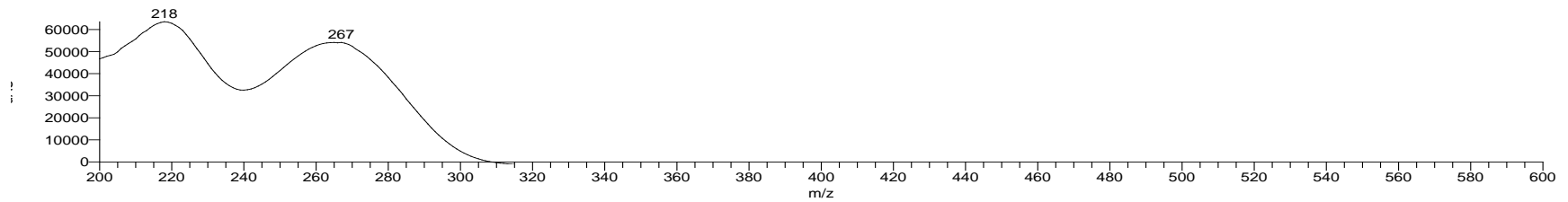
**Figura 11.** Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de *V. ordali* que contenía divancrobactina eluída con  $\text{CH}_3\text{CN}$  en cartucho OASIS<sup>®</sup> HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con  $t_R = 5.46$  min



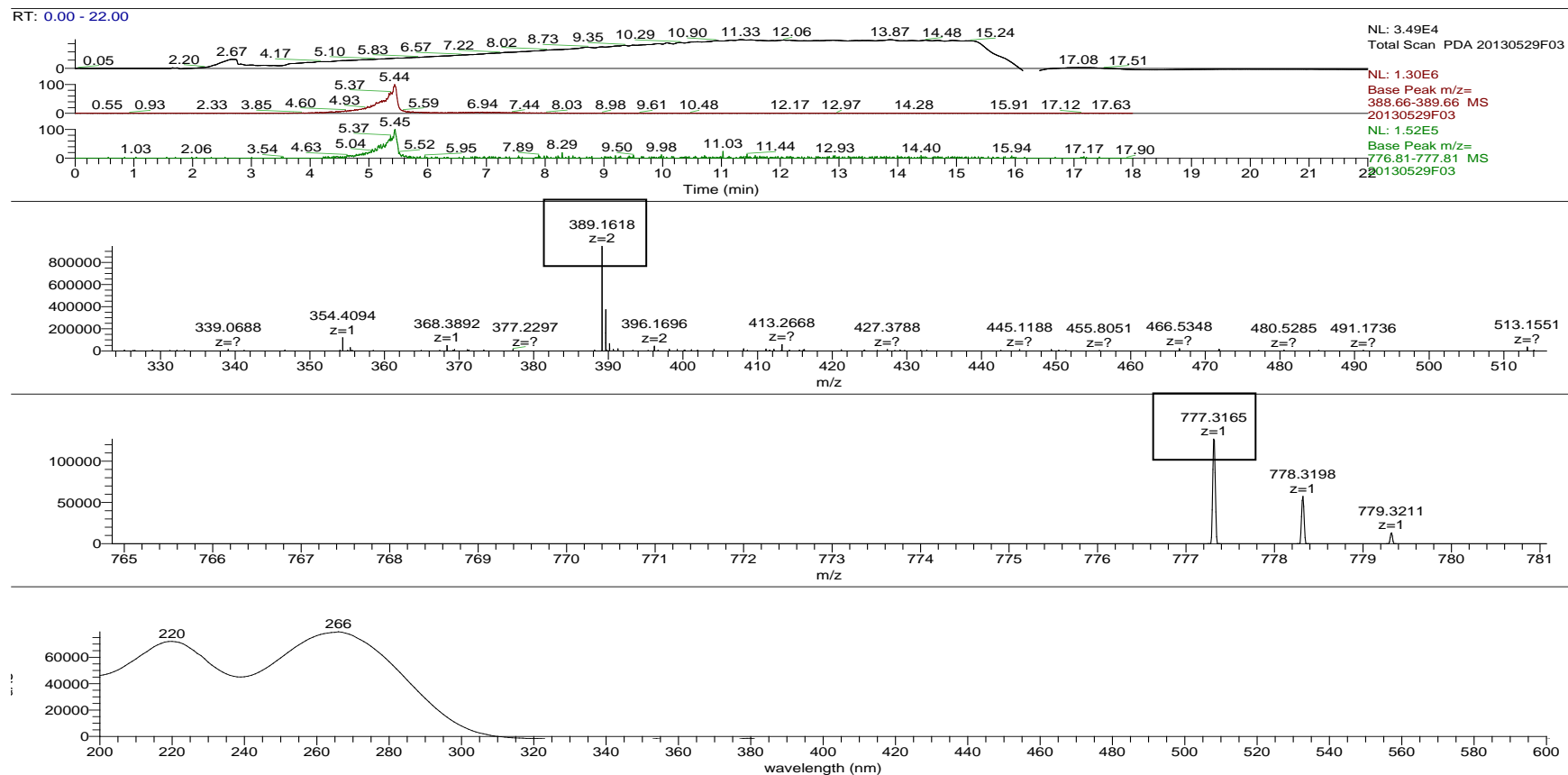
20130529F03 #530 RT: 4.61 AV: 1 NL: 3.73E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



20130529F03 #1370 RT: 4.56 AV: 1 NL: 6.35E4 microAU

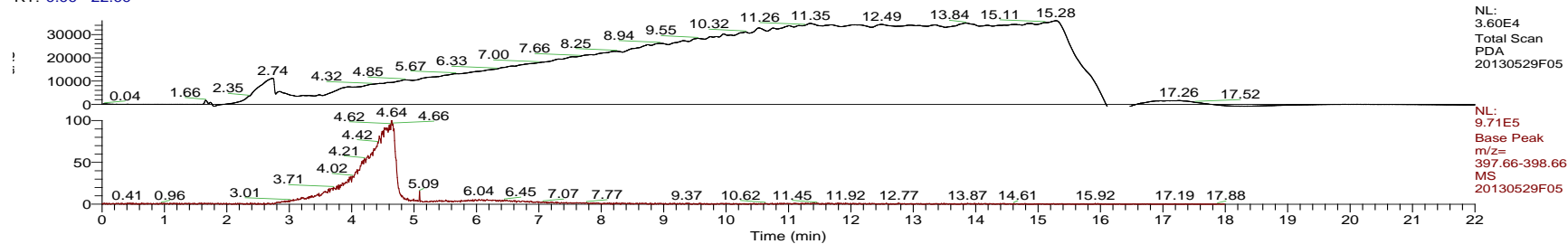
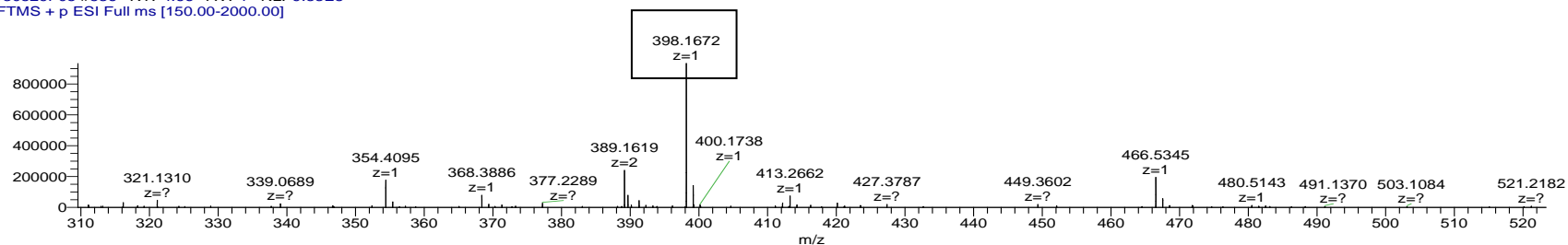


**Figura 12.** Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de *V. metschnikovii* que contenía vanrobactina eluída con H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>CN (1:1) en cartucho OASIS<sup>®</sup>HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con  $t_R= 4.61$  min.

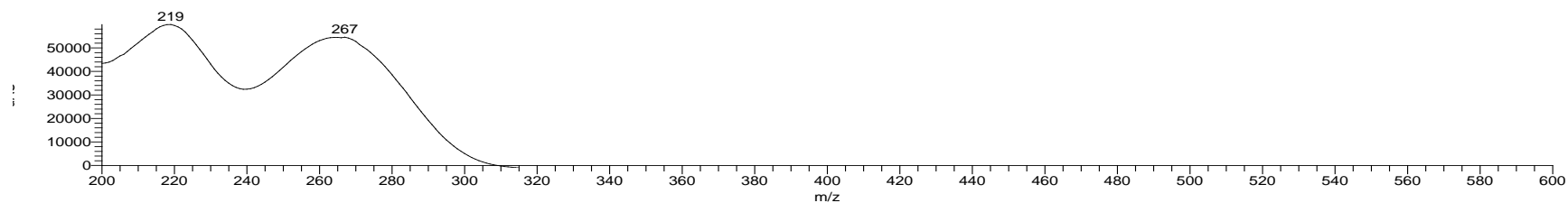


**Figura 13.** Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de *V. metschnikovii* que contenía divancrobactina eluída con CH<sub>3</sub>CN en cartucho OASIS® HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con  $t_R = 5.44$  min.

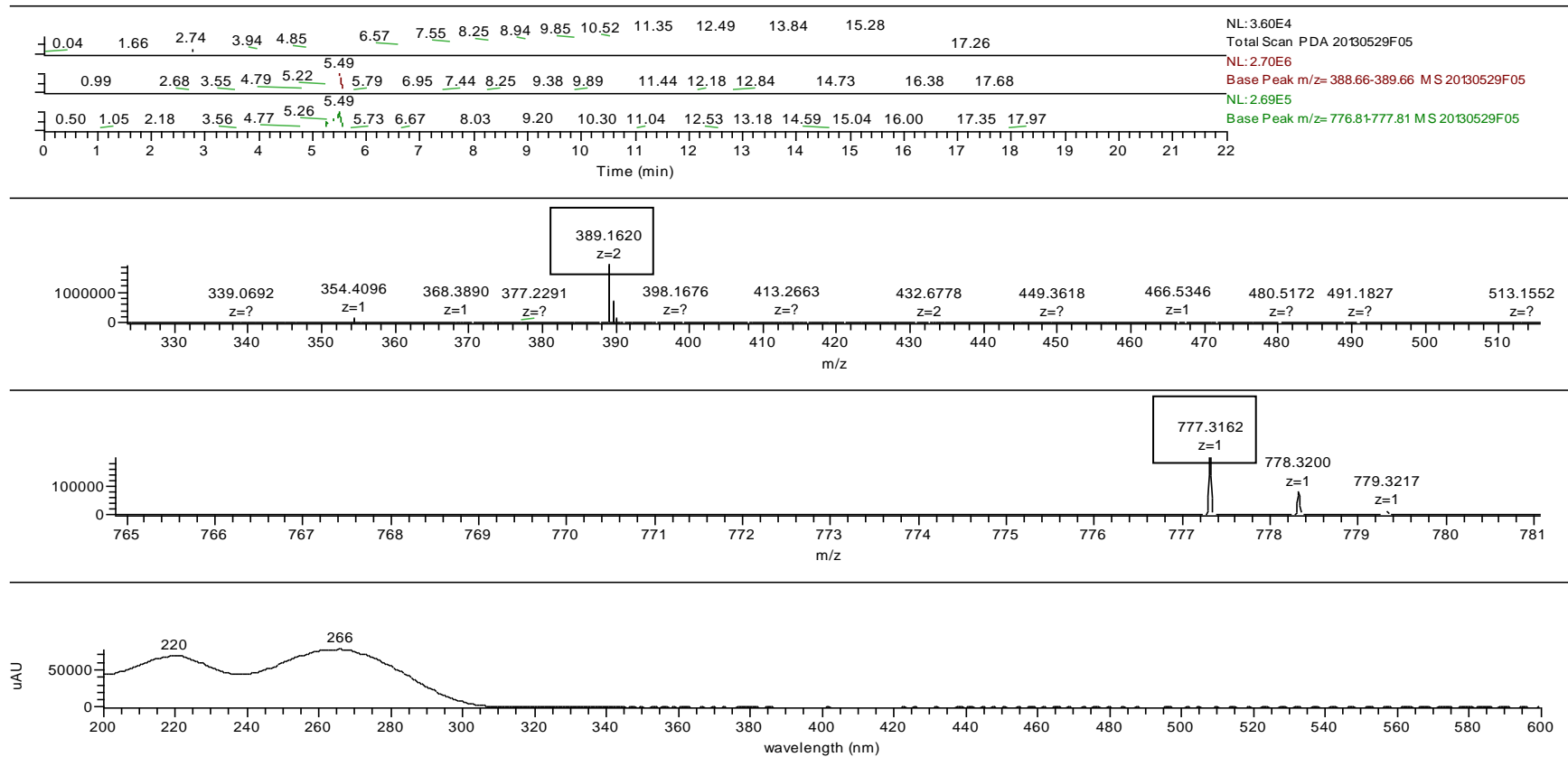
RT: 0.00 - 22.00

20130529F05 #536 RT: 4.66 AV: 1 NL: 9.33E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

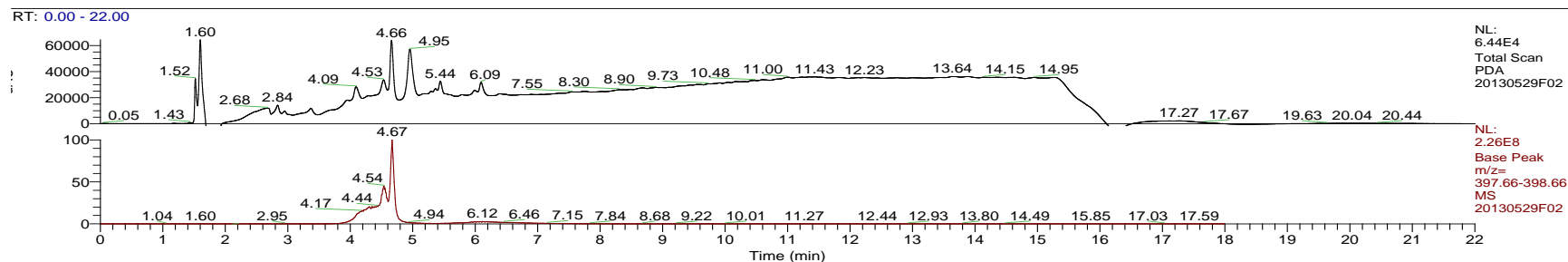
20130529F05 #1378 RT: 4.59 AV: 1 NL: 5.99E4 microAU



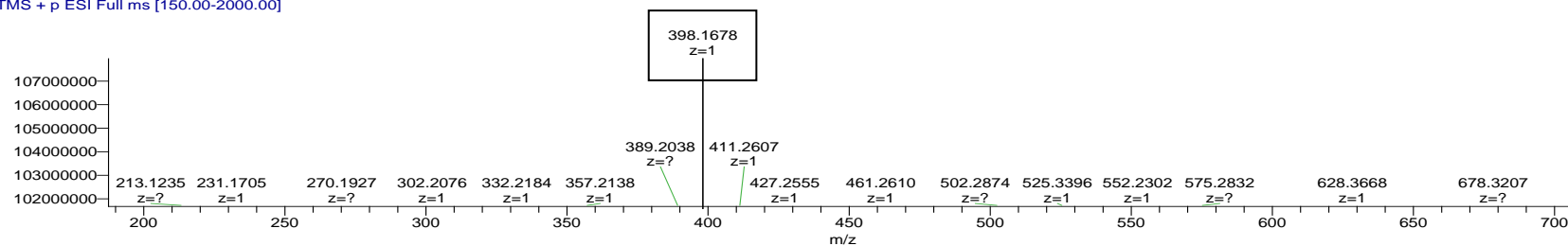
**Figura 14.** Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de *V. harveyi* que contenía vancrobactina eluída con H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>CN (1:1) en cartucho OASIS<sup>®</sup> HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con  $t_R = 4.66$  min.



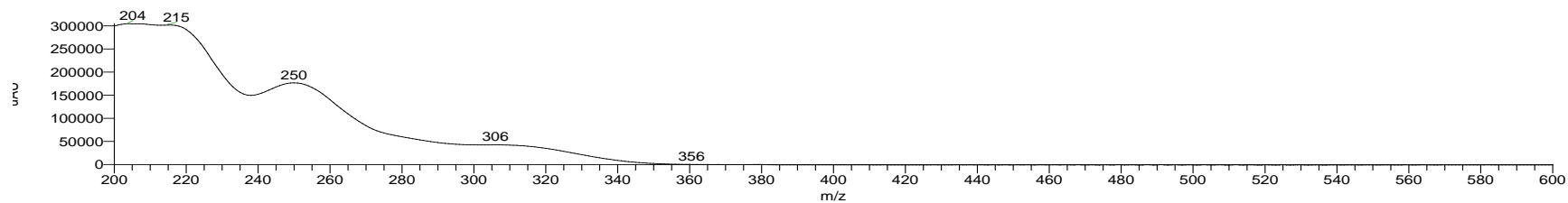
**Figura 15.** Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de *V. harveyi* que contenía divancrobactina eluída con  $\text{CH}_3\text{CN}$  en cartucho OASIS<sup>®</sup>HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con  $t_R=5.49$  min.



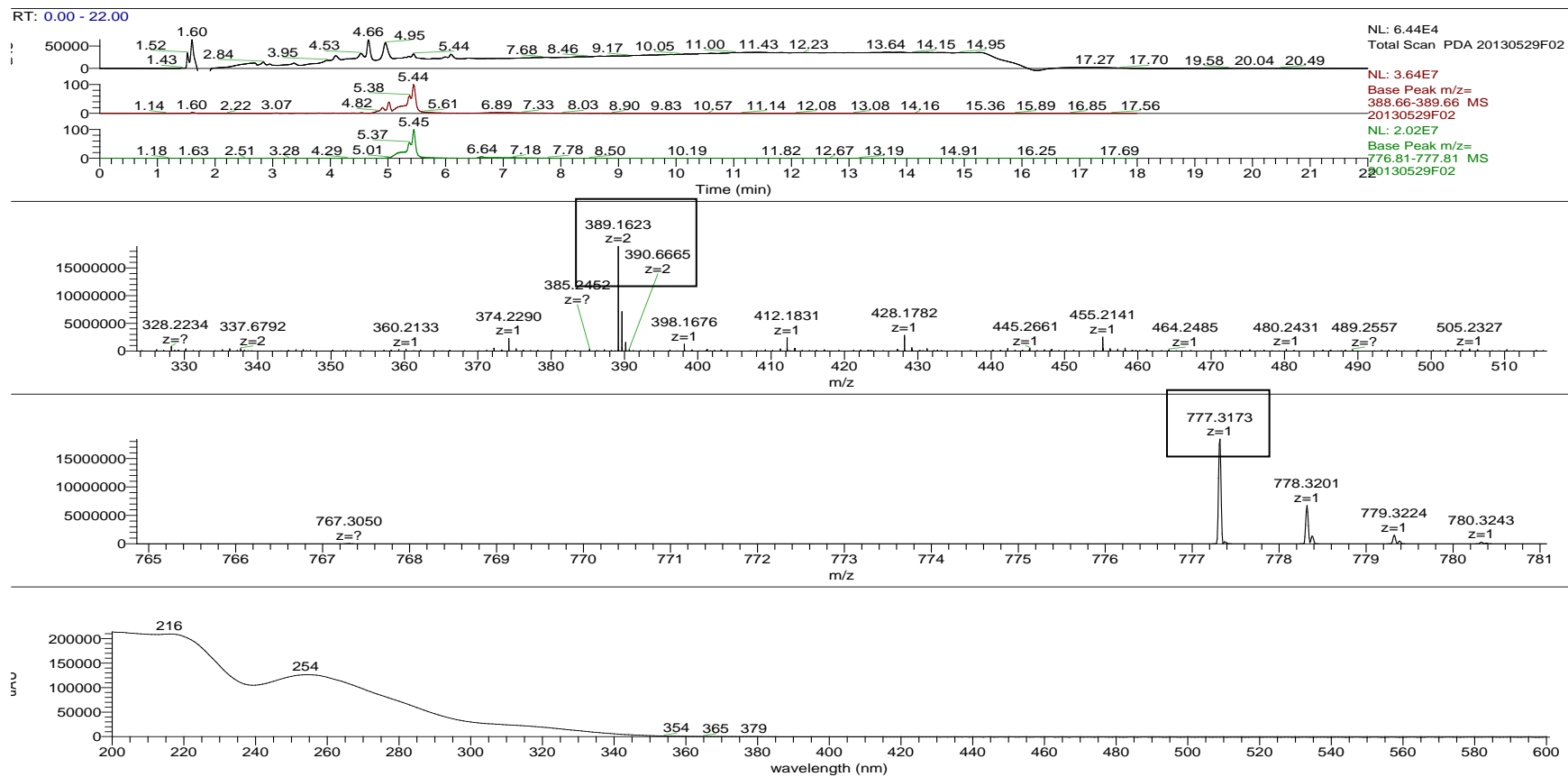
20130529F02 #548 RT: 4.64 AV: 1 NL: 1.08E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



20130529F02 #1392 RT: 4.64 AV: 1 NL: 3.05E5 microAU

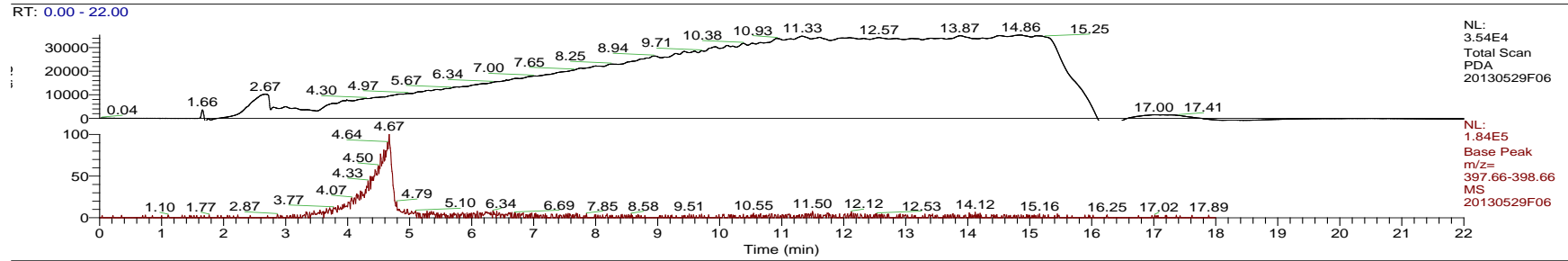


**Figura 16.** Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de *V. pelagius* que contenía vanrobactina eluída con H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>CN (1:1) en cartucho OASIS® HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con  $t_R = 4.64$  min.

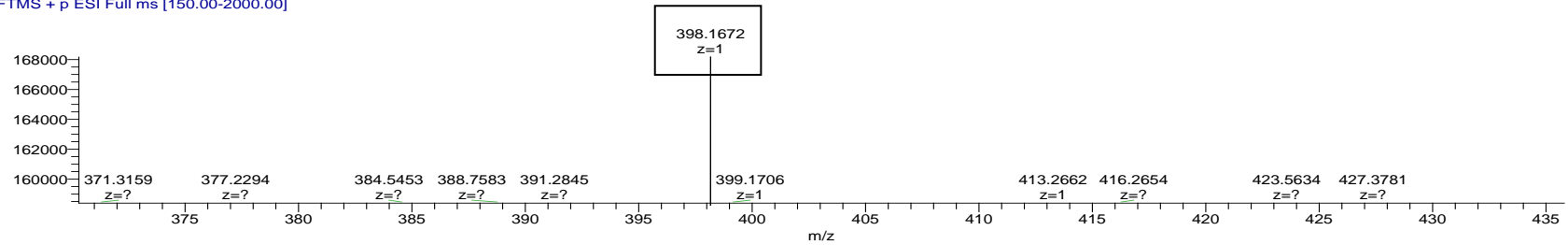


**Figura 17.** Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de *V. pelagius* que contenía divancrobactina eluída con H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>CN (1:1), en cartucho OASIS® HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo)

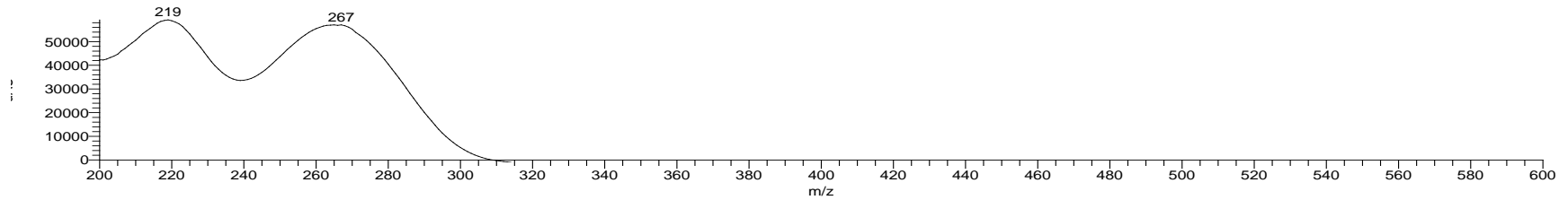




20130529F06 #536 RT: 4.66 AV: 1 NL: 1.68E5  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

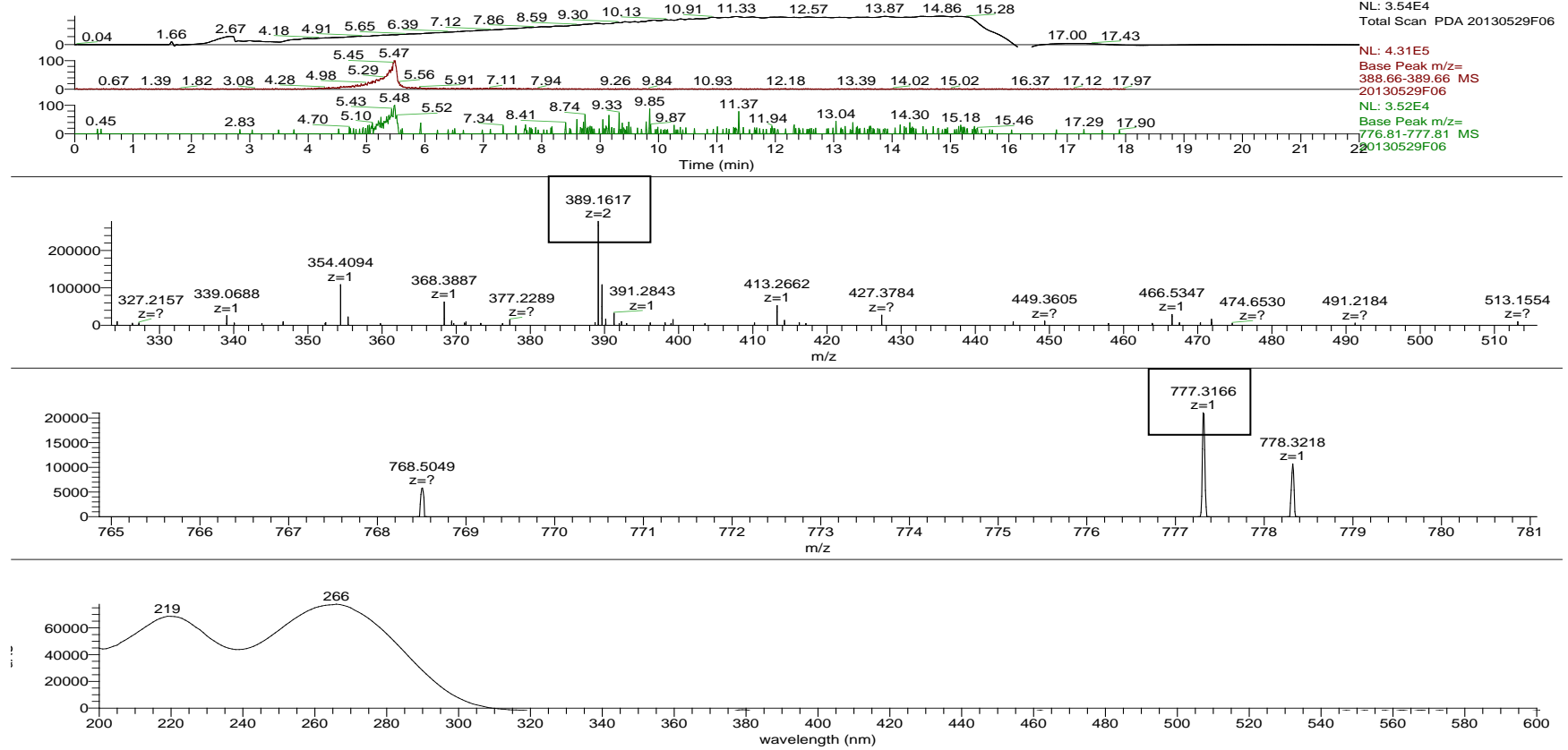


20130529F06 #1407 RT: 4.69 AV: 1 NL: 5.92E4 microAU



**Figura 18.** Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de *V. pelagius* que contenía vanrobactina eluída con  $\text{CH}_3\text{CN}$  en cartucho OASIS<sup>®</sup> HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con  $t_R=4.66$  min.

RT: 0.00 - 22.00



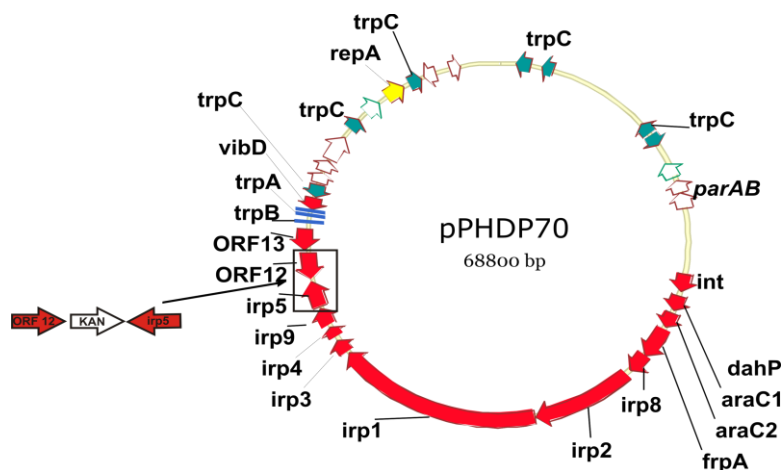
**Figura 19.** Cromatograma HPLC-DAD-MS de la fracción de *V. pelagius* que contenía divancrobactina eluída con CH<sub>3</sub>CN en cartucho OASIS<sup>®</sup> HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo).

Objetivo 2. Probar que la movilización por conjugación entre bacterias patógenas de plásmidos involucrados en la biosíntesis de sideróforos, puede proveer nuevas funciones a la bacteria receptora

*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, bacteria perteneciente a la familia *Vibrionaceae*, es el agente causante de la Pasteurelosis, una enfermedad altamente virulenta y perjudicial en la acuicultura a nivel mundial, inclusive en España. Es sabido que la cepa europea de esta bacteria es portadora del plásmido de 70 kb (pPHDP70), el cual contiene una región de 35 kb que guarda semejanza con la isla de patogenicidad (PAI) encontrada en la *Yersinia* HPI. Esta isla codifica la síntesis y transporte del sideróforo piscibactina. (Osorio, et al., 2006) (Souto, et al., 2012)

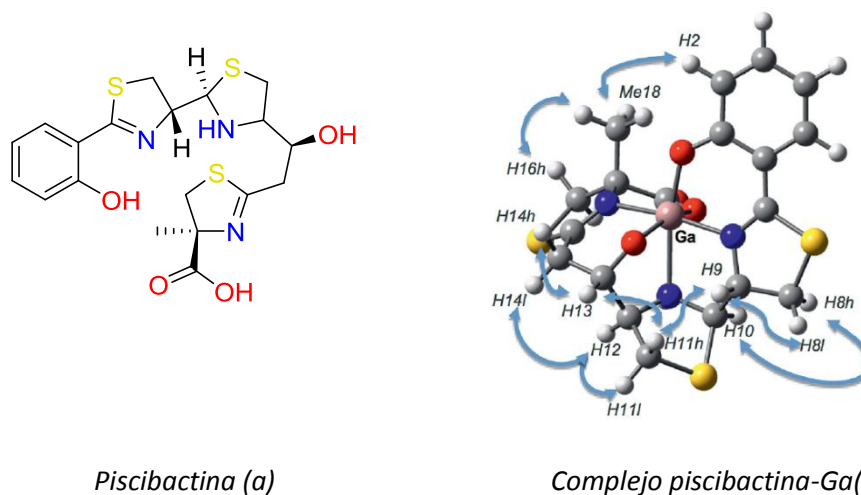
En este estudio se analizó la capacidad de producir piscibactina por el *Vibrio alginolyticus*, mediante la transferencia por conjugación del plásmido pPHDP70, proveniente de la *Photobacterium Damsela* subsp. *piscicida*. Esto fue logrado por el grupo de microbiología del Profesor Manuel Lemos de la Universidad de Santiago, con el colaboramos en este proyecto, mediante la introducción de marcador de resistencia dentro del plásmido por intercambio alélico. (Figura 20).

El experimento reveló que el pPHDP70 puede ser eficientemente movilizado al patógeno *Vibrio alginolyticus*; la incorporación del plásmido permitió a la cepa mutante *V. alginolyticus pvsA* (la cual no era capaz de sintetizar nativamente el sideróforo vibrioferrina) crecer en condiciones de restricción de hierro, alcanzando los niveles de la cepa salvaje.



**Figura 20.** Introducción de un marcador de kanamicina en el plásmido pPHDP70 por intercambio alélico.

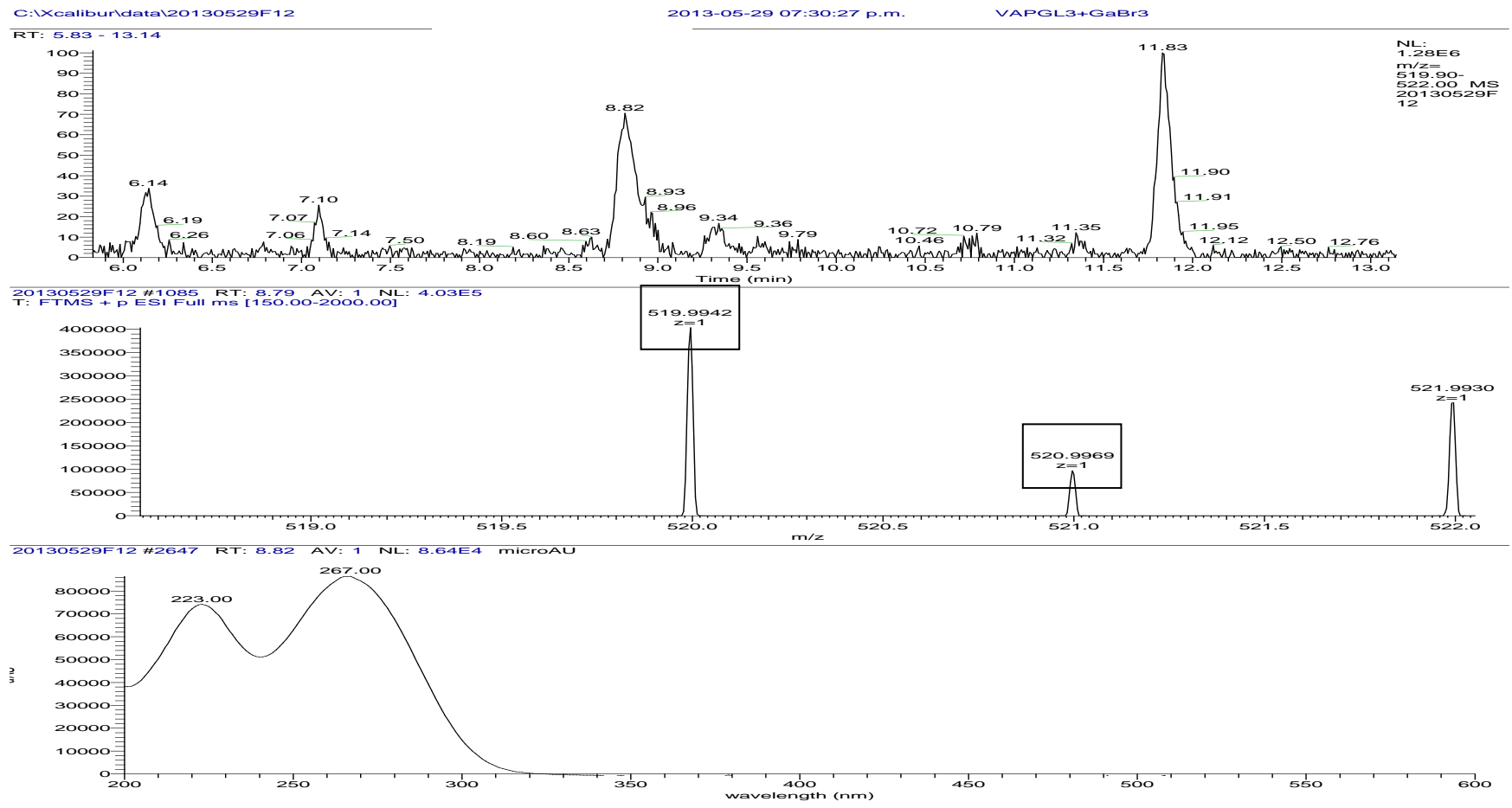
Esto llevo a pensar que la bacteria había recuperado su viabilidad porque era capaz de producir el sideróforo piscibactina. En este sentido, se logró probar la presencia del sideróforo mediante la detección del complejo piscibactina-Ga(III) (**Figura 21**) por LC-DAD-MS; en el cultivo libre de células de la cepa mutante *V. alginolyticus pvsA*, crecido en condiciones deficientes de hierro (**Figura 22** y **Figura 23**). Este resultado indica que el plásmido pPHDP70 puede ofrecer la habilidad de producir y utilizar un nuevo sideróforo en un huésped heterólogo. Dado que el pPHDP70 contribuye a la virulencia de la *P. damselae* subsp. *Piscicida*, su movilización a otras bacterias patógenas en el ambiente marino podría crear una generación de variantes genéticas con nuevas propiedades virulentas.



*Piscibactina (a)*

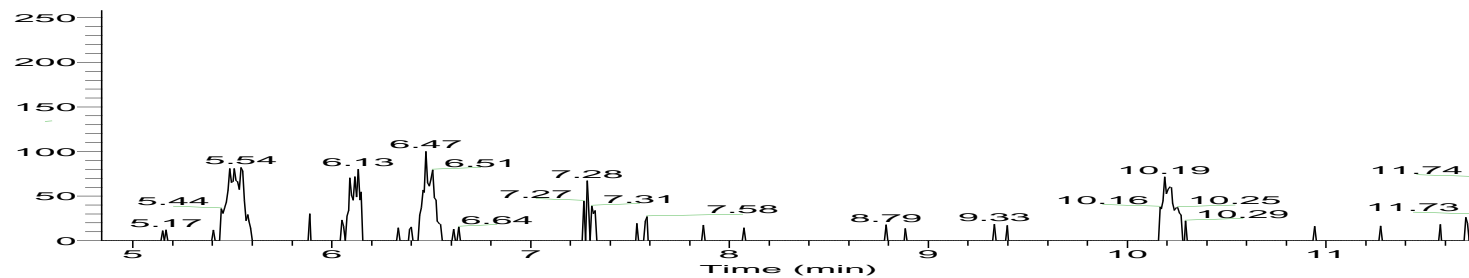
*Complejo piscibactina-Ga(III) (b)*

**Figura 21.** Estructura del sideróforo piscibactina (a) y del complejo piscibactina-Ga(III) (b) identificado en la cepa mutante *Vibrio alginolyticus pvsA*.



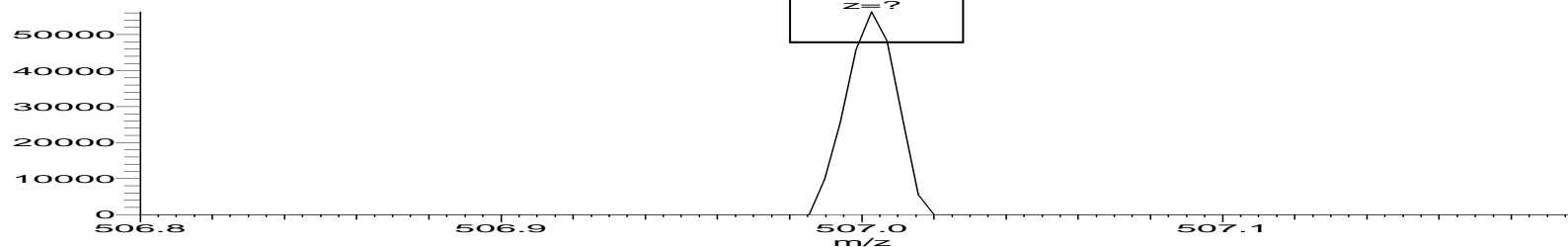
**Figura 22.** Cromatograma LC-DAD-MS de la fracción de la cepa mutante *V. alginolyticus pvsA* que contenía el complejo-Ga(III) eluída con H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>CN (1:1), en cartucho OASIS<sup>®</sup>HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con  $t_R=8.79$  min.

RT: 4.84 - 11.76

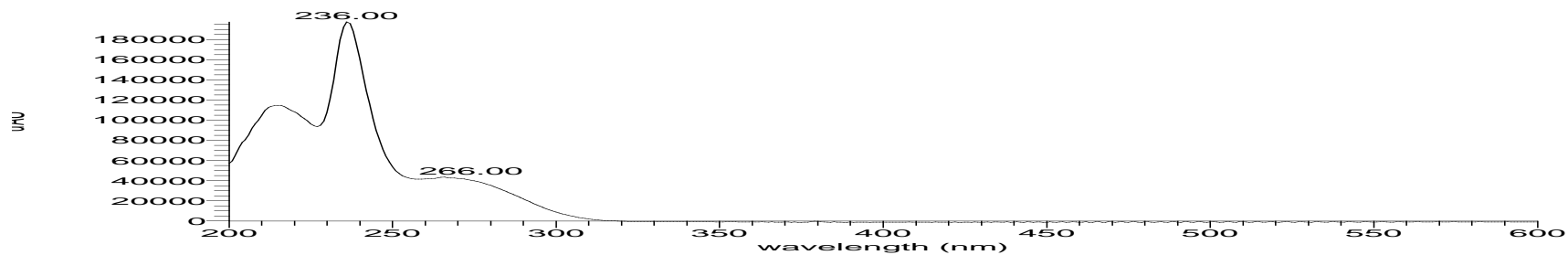


NL:  
1.07E5  
m/z=  
506.80-  
507.20 MS  
20130529F  
13

20130529F13 #1249 RT: 10.20 AV: 1 NL: 5.63E4  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-2000.00]



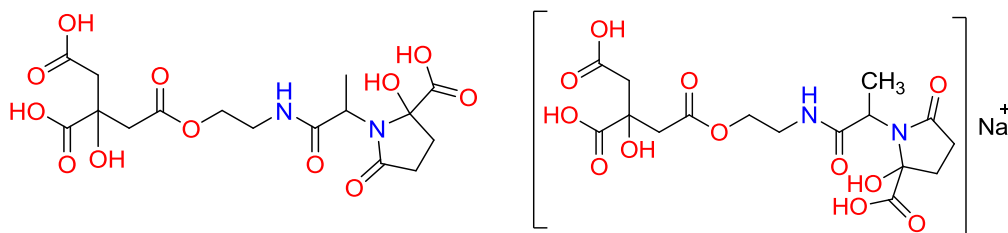
20130529F13 #3058 RT: 10.19 AV: 1 NL: 1.97E5 microAU



**Figura 23.** Cromatograma LC-DAD-MS de la fracción de la cepa mutante *V. alginolyticus pvsA* que contenía el complejo-Fe(III) eluída con H<sub>2</sub>O y CH<sub>3</sub>CN (1:1), en cartucho OASIS<sup>®</sup>HLB (arriba). Espectro de masas (medio) y espectro UV (abajo) correspondiente al pico con  $t_R=10.20$  min

### Objetivo 3. Determinación de los sideróforos de la bacteria patógena, *Edwardsiella tarda*, para la que se propuso por análisis genómicos la presencia de vibrioferrina

Una gran cantidad y variedad de sideróforos ha sido descrita de distintos géneros de microorganismos marinos, cuya síntesis es reprimida en medios con altas concentraciones de hierro. El sideróforo vibrioferrina (**Figura 24**), miembro de la clase carboxilato, ha sido identificado y asociado con la patogenicidad en algunas bacterias de marino, tal es el caso del *Vibrio parahaemolyticus*, *Marinobacter* spp. DG870, 879 y 979 y *M. algicola* DG893, todos ellos relacionados con problemas a la salud pública. (Yamamoto, et al., 1994) (Amin, et al., 2007) (Amin, et al., 2009)



**Figura 24.** Sideróforo vibrioferrina de *E. Tarda* identificado por HPLC-DAD-HRMS en forma aducto  $[M+Na]^+$ .

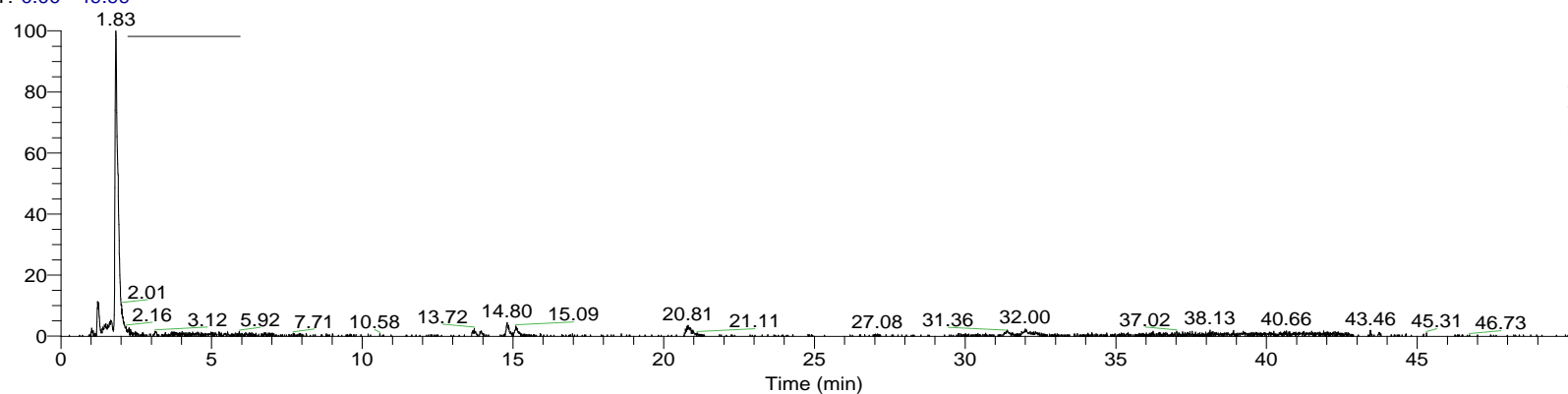
Las últimas décadas han visto avances significativos en la genómica, alcanzándose la posibilidad de predecir la producción de metabolitos en microorganismos. (Balado, et al., 2006). (Funahashi, et al., 2002) Mediante estudios genéticos se encontró un clúster de genes asociado con la producción del sideróforo vibrioferrina en la bacteria *Edwardsiella tarda*. Esto fue confirmado analizándose la fracción acuosa (PDX1) procedente de la columna de resina Amberlite® XAD-4 por LC-DAD-HRMS (**Figura 7**). Resinas poliméricas como esta son idóneas para el fraccionamiento de extractos acuosos donde se sospecha la presencias de compuestos con estructuras anfipáticas; en particular, la XAD-4 es ampliamente usada en la separación de compuesto de relativo bajo peso molecular. En los análisis realizados a PDX1, se muestra la presencia del ión pseudomolecular  $[M+Na]^+$  a  $m/z$  457 (masa exacta: 457.1070, **Figura 25**) como era de esperar; dada la gran concentración de sales presentes en el medio de cultivo. Aún resta analizar por parte de nuestro grupo de investigación, las fracciones menos polares del fraccionamiento del cultivo libre de células

de la *Edwardsiella tarda*, donde, por sus características anfifílicas se espera encontrar el sideróforo en mayor concentración.

Haber detectado la presencia del sideróforo vibrioferrina en esta cepa valida nuevamente los estudios genómicos como vía para la predicción de metabolitos secundarios en bacterias de origen marino. Igualmente, podría sugerirse que algunos sideróforos no sólo participan en la captura de hierro para los procesos biológicos de las bacterias, sino también actúan en la incorporación de otros elementos también esenciales en los procesos biológicos. (Amin, et al., 2009)

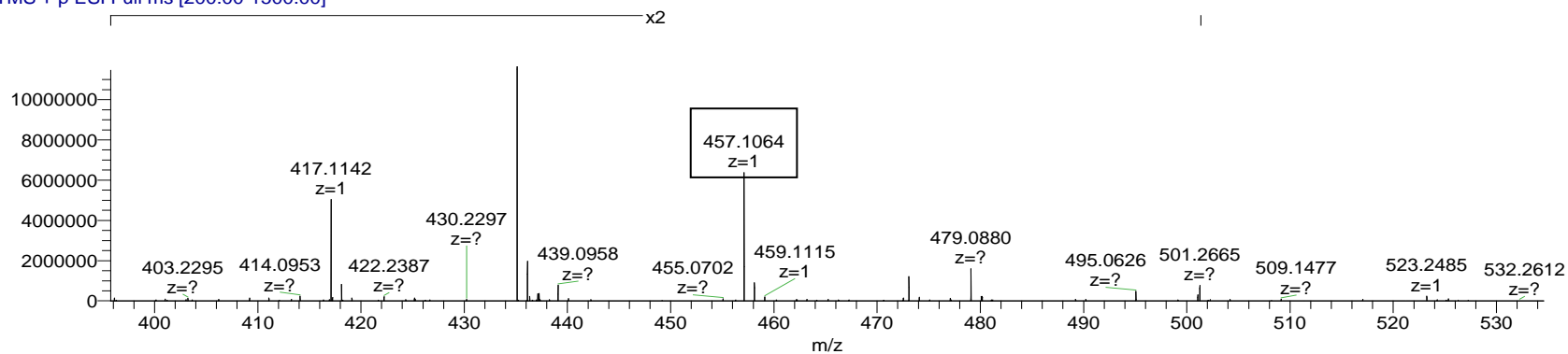


RT: 0.00 - 49.99



NL:  
3.34E6  
m/z=  
456.60-  
457.60 MS  
20130814F  
12

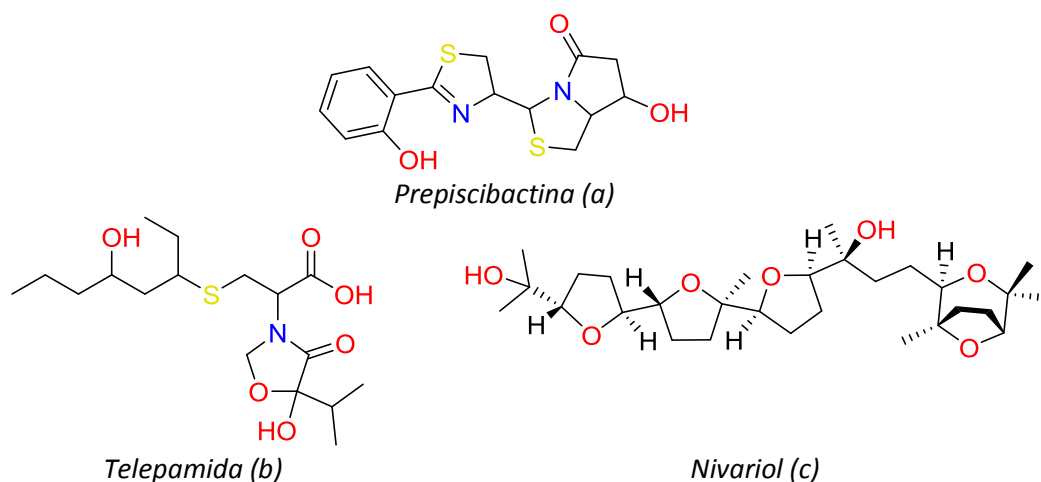
20130814F12 #227 RT: 1.83 AV: 1 NL: 5.96E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [200.00-1500.00]



**Figura 25.** Cromatograma LC-DAD-MS de la fracción de *E. tarda* que contenía vibrioferrina en forma de aducto ( $[M+Na]^+$ ) eluída con  $H_2O$ , en columna de Amberlite<sup>®</sup> XAD-4. Espectro de masas (abajo) correspondiente al pico con  $t_R=1.83$  min

#### Objetivo 4. Búsqueda de un funcional y conjunto base adecuado para la determinación desplazamientos químicos en modelos sencillos con átomos de azufre

La asignación de estereoquímica es usualmente uno de los cuellos de botella en la determinación estructural de productos naturales. Este hecho se hace más significativo en el aislamiento de compuestos de naturaleza desconocida o aquellos que proceden de una síntesis no-estereoselectiva donde son usados métodos sintéticos no-estereoespecíficos. Una de las herramientas que ayudan a la resolución de estos problemas son los cálculos computacionales aplicados a la resolución estructural y estados de transición; en concreto una de las armas más potentes que se utilizan hoy en día en los métodos computacionales es el cálculo de desplazamientos químicos de RMN con el fin de decidir la estequiometría de un compuesto, o de describir entre posibles isómeros de un compuesto dado. El grupo de investigación PRONAMAR tiene una larga experiencia en el uso de estas metodologías. En los años recientes ha logrado dar con la configuración relativa y absoluta de varios compuestos provenientes de organismos marinos, tal es el caso de la telepamida aislada del *Thelepus crispus*, un anélido poliqueto (Nieto, 2013), el nivariol, un polieter pentacíclico aislado de la *Laurencia viridis* (Cen-Pacheco, et al., 2013), la prepiscibactina (**Figura 26**) y piscibactina (**Figura 21** (a)) aislada del *P. damselae* subsp. *piscicida* (Souto, et al., 2012)



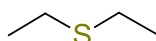
**Figura 26.** Algunos metabolitos secundarios aislado por el grupo de investigación PRONAMAR

Un aspecto que queremos abordar en con esta metodología es la aplicabilidad de los cálculos computacionales a sideróforos. La diversidad estructural de lo sideróforos ha sido ampliamente estudiada, (**Tabla 2**) por muchos autores. En esta metodología

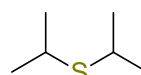
aplicaremos cálculos DFT donde necesario el conocimiento de conjuntos base y funcionales adecuados para alcanzar aproximaciones adecuadas, en este sentido, realizamos el cálculo de desplazamientos de RMN  $^{13}\text{C}$  en modelos sencillos con átomos de azufre. Con esto se espera contribuir de forma significativa a la determinación posible de análogos de la piscibactina, trabajo enmarcado dentro de uno de los proyectos que actualmente desarrolla este grupo.

#### 4.a Búsqueda del espacio conformacional mediante módulo GMMX

Para esto se eligieron modelos sencillos con átomos de azufre, sulfuro de dietilo y sulfuro de *isopropilo* (**Figura 27**). Estas estructuras fueron sometidas a una búsqueda conformacional, con el modulo GMMX del programa PC Model 9, usando una ventana energética correspondiente al 99.95 % de la población (<3.5 kcal/mol) y encontraron 7 y 15 conformeros respectivamente, a continuación se muestra la energía asociada con los mismo.



*Sulfuro de dietilo (a)*



*Sulfuro de isopropilo (b)*

**Figura 27.** Estructuras empleadas en los cálculos de desplazamiento químico de  $^{13}\text{C}$

**Tabla 5.** Energía asociada a los conformeros encontrados dentro de una ventana de 3.5 kcal/mol del sulfuro de dietilo. Obtenidos mediante el programa PC Model 9

Confórmero	Energía (Eh)
M1-1	4.07E-03
M1-2	4.64E-03
M1-3	4.64E-03
M1-4	4.64E-03
M1-5	5.35E-03
M1-6	6.43E-03
M1-7	6.43E-03

**Tabla 6.** Energía asociada a los conformeros encontrados dentro de una ventana de 3.5 kcal/mol del sulfuro de *isopropilo*. Obtenidos mediante el el programa PC Model 9

Confórmero	Energía (Eh)
M2-1	8.26E-03
M2-2	8.26E-03
M2-3	8.53E-03
M2-4	8.53E-03
M2-5	9.06E-03
M2-6	9.06E-03
M2-7	9.06E-03
M2-8	9.78E-03
M2-9	9.78E-03
M2-10	9.78E-03
M2-11	9.78E-03
M2-12	1.16E-02
M2-13	1.16E-02
M2-14	1.16E-02
M2-15	1.16E-02

Luego de realizar una la comparación energética y estructural, mediante el módulo de comparación del ChemBio3D 12.0, ambas lista se redujeron a 6 y 11 conformeros respectivamente. Quedaron eliminados de la **Tabla 5** el conformero: M1-4 (idéntico al M1-3) y de la **Tabla 6** los conformeros: M2-4, 7, 14 y 15

El siguiente paso consistió en el cálculo de la energía a nivel DFT de cada uno de los conformeros utilizando en funcional de Lee-Yang-Parr B3LYP y el conjunto base 6-31-G(d). Esta combinación da muy buenos resultados para moléculas orgánicas y nos permite calcular la población de cada conformero. Después se pasó a calcular los desplazamientos químicos de carbono-13 mediante la aproximación GIAO (Gauge Independent Atomic Orbitals) para cada uno de los conformeros utilizando los funcionales MPW1PWP1, PBEPBE y WB97XD con los conjuntos base 6-311 G(d,p) y 6-311G(2d,p). Todos estos cálculos fueron realizados utilizando el software Gaussian 9.0.

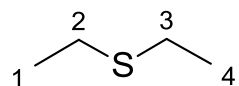
Se muestran los resultados obtenidos en las siguientes tablas:

#### 4.b Cálculo de energía DFT mediante el funcional híbrido B3LYP y el conjunto base 6-31G(d)

##### 4.b.1 Cálculos correspondientes al sulfuro de dietilo

**Tabla 7.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional MPW1PWP1 y el conjunto base 6-311G (2d,p)

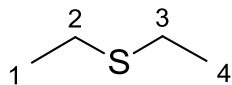
Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)*	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)				Desplazamientos medios (ppm)	
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$
<b>MPW1PWP1</b>	6-311G (2d,p)	M1-1	-556.6806211	16.69	14.0	36.0	36.0	14.0		
		M1-2	-556.6804462	16.68	16.5	35.2	32.9	13.8		
		M1-3	-556.6804442	16.68	13.8	33.0	35.2	16.5		
		M1-5	-556.6803111	16.68	15.0	28.8	28.8	15.0		
		M1-6	-556.6787323	16.63	21.7	36.4	38.1	19.5		
		M1-7	-556.6787318	16.63	19.5	38.1	36.4	21.7		
		<b>Desplazamiento promedio</b>					<b>16.7</b>	<b>34.6</b>	<b>34.6</b>	<b>16.7</b>



\*DFT-B3LYP 6-31G (d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol

**Tabla 8.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional MPW1PWP1 y el conjunto base 6-311G (d,p)

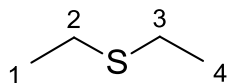
Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)*	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)				Desplazamientos medios (ppm)	
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$
MPW1PWP1	6-311G (d,p)	M1-1	-556.674153	16.68	21.9	43.3	43.3	21.9		
		M1-2	-556.674165	16.68	24.5	42.6	40.4	21.8		
		M1-3	-556.674163	16.68	21.8	40.4	42.6	24.5		
		M1-5	-556.674236	16.68	23.0	36.3	36.3	23.0		
		M1-6	-556.672719	16.64	29.7	44.0	45.7	27.5		
		M1-7	-556.672718	16.64	27.5	45.7	44.0	29.7		
		<b>Desplazamiento promedio</b>					<b>24.7</b>	<b>42.0</b>	<b>42.0</b>	<b>24.7</b>



\*DFT-B3LYP 6-31G (d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol

**Tabla 9.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional PBEPBE y el conjunto base 6-311G (2d,p)

Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)*	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)				Desplazamientos medios (ppm)	
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$
PBEPBE	6-311G (2d,p)	M1-1	-556.2921973	16.68	13.9	38.7	38.7	13.9		
		M1-2	-556.2922653	16.68	16.5	37.8	35.4	13.8		
		M1-3	-556.2922654	16.68	13.8	35.5	37.8	16.5		
		M1-5	-556.2923948	16.68	14.7	30.7	30.7	14.7		
		M1-6	-556.2909272	16.64	22.3	39.2	41.0	19.9		
		M1-7	-556.2909266	16.64	20.0	41.0	39.2	22.3		
		<b>Desplazamiento promedio</b>					<b>16.9</b>	<b>37.2</b>	<b>37.2</b>	<b>16.9</b>

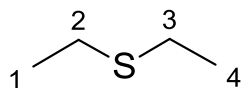


\*DFT-B3LYP 6-31G (d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol



**Tabla 10.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional PBEPBE y el conjunto base 6-311G (d,p)

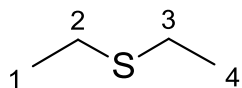
Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)*	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)				Desplazamientos medios (ppm)	
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$
PBEPBE	6-311G (d,p)	M1-1	-556.286144	16.67	14.3	38.6	38.6	14.3		
		M1-2	-556.286400	16.68	17.0	37.7	35.4	14.2		
		M1-3	-556.286401	16.68	4.2	35.4	37.7	17.0		
		M1-5	-556.286739	16.69	15.2	30.8	30.8	15.2		
		M1-6	-556.285318	16.65	22.8	39.4	41.2	20.4		
		M1-7	-556.285317	16.65	20.4	41.2	39.4	22.8		
		<b>Desplazamiento promedio</b>					<b>15.7</b>	<b>37.2</b>	<b>37.2</b>	<b>17.3</b>



\*DFT-B3LYP 6-31G (d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol

**Tabla 11.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional WB97XD y el conjunto base 6-311G (2d,p)

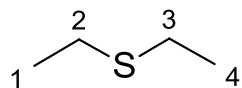
Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)*	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)				Desplazamientos medios (ppm)	
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$
WB97XD	6-311G(2d,p)	M1-1	-556.6469792	16.66	14.0	34.7	34.7	14.0		
		M1-2	-556.6475481	16.68	16.8	34.0	31.8	14.0		
		M1-3	-556.6475465	16.68	14.0	31.8	34.0	16.8		
		M1-5	-556.6480562	16.69	15.4	27.9	27.9	15.4		
		M1-6	-556.6465605	16.65	21.8	35.2	37.0	19.6		
		M1-7	-556.6465603	16.65	19.6	37.0	35.2	21.8		
		<b>Desplazamiento promedio</b>					<b>16.9</b>	<b>33.4</b>	<b>33.4</b>	<b>16.9</b>



\*DFT-B3LYP 6-31G (d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol

**Tabla 12.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de dietilo. Calculados mediante el funcional WB97XD y el conjunto base 6-311G (d,p)

Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)*	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)				Desplazamientos medios (ppm)	
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$
WB97XD	6-311G (d,p)	M1-1	-556.64041346	16.65	14.3	34.4	34.4	14.3		
		M1-2	-556.64114929	16.67	17.2	33.9	31.7	14.4		
		M1-3	-556.64114797	16.67	14.4	31.7	33.9	17.2		
		M1-5	-556.64186178	16.69	15.9	27.9	27.9	15.9		
		M1-6	-556.64042963	16.65	22.3	35.3	37.1	20.1		
		M1-7	-556.64042960	16.65	20.1	37.0	35.3	22.3		
		<b>Desplazamiento promedio</b>					<b>17.4</b>	<b>33.4</b>	<b>33.4</b>	<b>17.4</b>

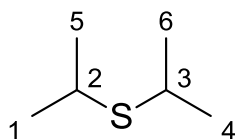


\*DFT-B3LYP 6-31G(d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol

#### 4.b.2 Cálculos correspondientes al sulfuro de isopropilo

**Tabla 13.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de *isopropilo*. Calculado mediante el funcional MPW1PWP1 y el conjunto base 6-311G (2d,p)

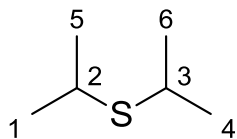
Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)						Desplazamientos medios (ppm)				
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_5$	$\delta C_6$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$	$\delta C_{5-6}$		
MPW1PWP1	6-311G (2d,p)	1	-635.31329	9.12	23.5	41.5	41.5	23.5	22.7	22.7					
		2	-635.31329	9.12	22.7	41.5	41.5	22.7	23.5	23.5					
		3	-635.31329	9.12	22.7	41.5	41.5	22.7	23.5	23.5					
		5	-635.31153	9.10	28.1	47.0	48.0	23.1	26.0	25.9					
		6	-635.31153	9.10	25.9	48.0	47.0	26.0	23.1	28.1					
		8	-635.31034	9.08	25.2	45.3	38.4	28.7	24.4	26.0					
		9	-635.31034	9.08	24.4	45.3	38.4	26.0	25.2	28.7					
		10	-635.31034	9.08	28.7	38.4	45.3	25.2	26.0	24.4					
		11	-635.31034	9.08	26.0	38.4	45.3	24.4	28.7	25.2					
		12	-635.30972	9.07	22.5	44.5	40.3	23.4	27.8	27.9					
		13	-635.30972	9.07	27.9	40.3	44.5	27.8	23.4	22.5					
		<b>Desplazamiento promedio</b>					<b>25.2</b>	<b>42.9</b>	<b>42.9</b>	<b>24.9</b>	<b>24.9</b>	<b>25.3</b>	<b>27.9</b>	<b>42.4</b>	<b>23.0</b>



\*DFT-B3LYP 6-31G(d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol

**Tabla 14.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de *isopropilo*. Calculado mediante el funcional MPW1PWP1 y el conjunto base 6-311G(d,p)

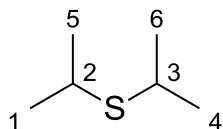
Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)						Desplazamientos medios (ppm)				
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_5$	$\delta C_6$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$	$\delta C_{5-6}$		
MPW1PWP1	6-311G(d,p)	1	-635.30597	9.12	31.6	48.9	48.9	31.6	30.8	30.8					
		2	-635.30597	9.12	30.7	48.9	48.9	30.7	31.5	31.5					
		3	-635.30597	9.12	30.7	48.8	48.8	30.7	31.5	31.5					
		5	-635.30440	9.10	36.3	54.7	55.4	31.2	34.1	33.9					
		6	-635.30440	9.10	33.9	55.4	54.7	34.1	31.2	36.3					
		8	-635.30330	9.08	33.3	52.8	46.0	36.8	32.4	34.1					
		9	-635.30330	9.08	32.4	52.8	46.0	34.1	33.3	36.8					
		10	-635.30330	9.08	36.8	46.0	52.8	33.3	34.1	32.4					
		11	-635.30330	9.08	34.1	46.0	52.8	32.4	36.8	33.3					
		12	-635.30247	9.07	30.4	52.0	47.8	31.5	35.9	36.0					
		13	-635.30247	9.07	36.0	47.8	52.0	35.9	31.5	30.4					
		<b>Desplazamiento promedio</b>					<b>33.3</b>	<b>50.4</b>	<b>50.4</b>	<b>32.9</b>	<b>33.0</b>	<b>33.4</b>	<b>33.1</b>	<b>50.4</b>	<b>33.2</b>



\*DFT-B3LYP 6-31G(d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol

**Tabla 15.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de *isopropilo*. Calculado mediante el funcional PBEPBE y el conjunto base 6-311G(2d,p)

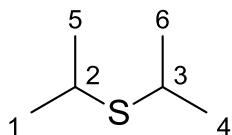
Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)						Desplazamientos medios (ppm)				
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_5$	$\delta C_6$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$	$\delta C_{5-6}$		
PBEPBE	6-311G (2d,p)	1	-634.82911	9.12	23.8	44.9	44.9	23.8	23.2	23.2					
		2	-634.82910	9.12	23.1	44.9	44.9	23.1	23.9	23.9					
		3	-634.82910	9.12	23.1	44.9	44.9	23.1	23.9	23.9					
		5	-634.82740	9.09	28.9	50.9	51.8	23.6	26.6	26.5					
		6	-634.82740	9.09	26.5	51.8	50.9	26.6	23.6	28.9					
		8	-634.82632	9.08	26.0	48.8	41.4	29.5	24.8	26.6					
		9	-634.82632	9.08	24.8	48.8	41.4	26.6	26.0	29.5					
		10	-634.82632	9.08	29.5	41.4	48.8	26.0	26.6	24.8					
		11	-634.82632	9.08	26.6	41.4	48.8	24.8	29.5	26.0					
		12	-634.82583	9.07	22.9	48.0	43.5	23.9	28.6	28.8					
		13	-634.82583	9.07	28.8	43.5	48.0	28.6	23.9	22.9					
		<b>Desplazamiento promedio</b>					<b>25.8</b>	<b>46.3</b>	<b>46.3</b>	<b>25.4</b>	<b>25.5</b>	<b>25.9</b>	<b>25.6</b>	<b>46.3</b>	<b>25.7</b>



\*DFT-B3LYP 6-31G(d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol

**Tabla 16.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de *isopropilo*. Calculado mediante el funcional PBEPBE y el conjunto base 6-311G(d,p)

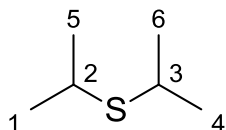
Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)						Desplazamientos medios (ppm)				
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_5$	$\delta C_6$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$	$\delta C_{5-6}$		
PBEPBE	6-311G(d,p)	1	-634.82247	9.12	24.4	44.8	44.8	24.4	23.7	23.7					
		2	-634.82246	9.12	23.6	44.7	44.7	23.6	24.3	24.3					
		3	-634.82246	9.12	23.6	44.7	44.7	23.6	24.3	24.3					
		5	-634.82093	9.09	29.4	51.1	51.7	24.2	27.1	27.0					
		6	-634.82093	9.09	27.0	51.7	51.1	27.1	24.2	29.4					
		8	-634.81994	9.08	26.5	48.8	41.4	0.1	25.3	27.1					
		9	-634.81994	9.08	25.3	48.8	41.4	27.1	26.5	30.1					
		10	-634.81994	9.08	30.1	41.4	48.8	26.4	27.1	25.3					
		11	-634.81994	9.08	27.1	41.4	48.8	25.3	30.1	26.5					
		12	-634.81925	9.07	23.3	48.0	43.5	24.5	29.1	29.4					
		13	-634.81925	9.07	29.4	43.5	48.0	29.1	24.5	23.3					
		<b>Desplazamiento promedio</b>					<b>26.3</b>	<b>46.3</b>	<b>46.3</b>	<b>23.2</b>	<b>26.0</b>	<b>26.4</b>	<b>24.8</b>	<b>46.3</b>	<b>26.2</b>



\*DFT-B3LYP 6-31G(d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol

**Tabla 17.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de *isopropilo*. Calculado mediante el funcional WB97XD y el conjunto base 6-311G(2d,p)

Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)						Desplazamientos medios (ppm)				
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_5$	$\delta C_6$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$	$\delta C_{5-6}$		
WB97XD	6-311G(2d,p)	1	-635.27730	9.11	23.9	40.2	40.2	23.9	22.8	22.8					
		2	-635.27736	9.11	22.7	40.2	40.2	22.7	23.9	23.9					
		3	-635.27736	9.11	22.7	40.2	40.2	22.7	23.9	23.9					
		5	-635.27579	9.09	28.4	45.6	46.6	23.2	26.2	26.2					
		6	-635.27579	9.09	26.2	46.6	45.6	26.2	23.2	28.4					
		8	-635.27548	9.08	25.4	43.9	37.2	28.9	24.7	26.2					
		9	-635.27548	9.08	24.7	43.9	37.2	26.2	25.4	28.9					
		10	-635.27548	9.08	28.9	37.2	43.9	25.4	26.2	24.7					
		11	-635.27548	9.08	26.2	37.2	43.9	24.7	28.9	25.4					
		12	-635.27492	9.08	22.7	43.2	39.0	23.5	28.1	28.1					
		13	-635.27492	9.08	28.1	39.0	43.2	28.1	23.5	22.7					
		<b>Desplazamiento promedio</b>					<b>25.5</b>	<b>41.6</b>	<b>41.6</b>	<b>25.0</b>	<b>25.2</b>	<b>25.6</b>	<b>25.3</b>	<b>41.6</b>	<b>25.4</b>

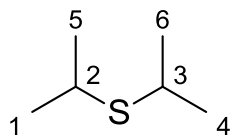


\*DFT-B3LYP 6-31G(d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol



**Tabla 18.** Desplazamientos químicos de carbono-13 para el sulfuro de *isopropilo*. Calculado mediante el funcional WB97XD y el conjunto base 6-311G(d,p)

Funcional	Conjunto Base	Confórmero	Energía (Eh)	Contribución a la población (%)	Desplazamientos (ppm)						Desplazamientos medios (ppm)				
					$\delta C_1$	$\delta C_2$	$\delta C_3$	$\delta C_4$	$\delta C_5$	$\delta C_6$	$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$	$\delta C_{5-6}$		
WB97XD	6-311G(d,p)	1	-635.26975	9.11	24.5	40.2	40.2	24.5	23.3	23.3					
		2	-635.26980	9.11	23.3	40.3	40.3	23.3	24.4	24.4					
		3	-635.26980	9.11	23.3	40.3	40.3	23.3	24.4	24.4					
		5	-635.26842	9.09	29.0	45.9	46.5	23.8	26.8	26.7					
		6	-635.26842	9.09	26.7	46.5	45.9	26.8	23.8	29.0					
		8	-635.26821	9.09	26.0	44.0	37.5	29.6	25.3	26.8					
		9	-635.26821	9.09	25.3	44.0	37.5	26.8	26.0	29.6					
		10	-635.26821	9.09	29.6	37.5	44.0	26.0	26.8	25.3					
		11	-635.26821	9.09	26.8	37.5	44.0	25.3	29.6	26.0					
		12	-635.26744	9.07	23.2	43.2	39.1	24.1	28.7	28.7					
		13	-635.26744	9.07	28.7	39.1	43.2	28.7	24.1	23.2					
					<b>Desplazamiento promedio</b>		<b>26.0</b>	<b>41.7</b>	<b>41.7</b>	<b>25.7</b>	<b>25.8</b>	<b>26.1</b>	<b>25.9</b>	<b>41.7</b>	<b>26.0</b>

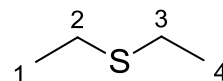


\*DFT-B3LYP 6-31G(d). Energía en Hartrees 1 Eh = 627.509 469 kcal/mol

#### 4.c Comparación

Con la información anterior se realizó una comparación entre las señales promedio de los valores obtenidos para cada una de las combinaciones Funcional/conjunto base y los valores de desplazamientos químicos experimentales recogidos en la librería Aldrich de RMN. Es de resaltar que por la simetría de ambas moléculas se esperaban desplazamientos químicos con esas características, en los casos donde no fue así se realizó un promedio de las señales (**Tabla 19**)

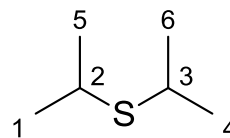
#### 4.c.1 Señales promedio del sulfuro de dietilo



**Tabla 19.** Diferencia absoluta entre los desplazamientos químicos de carbono-13 calculados mediante diferentes combinaciones funcional/conjunto base y los valores reportados en la bibliografía para el sulfuro de dietilo.

Funcional	Conjunto Base	Desplazamientos (ppm)		$ \delta C_{Teórico} - \delta C_{Experimental} $		
MPW1PWP1	6-311G(2d,p)	$\delta C_{1-4}$	Teórico	16.7	<b>2.0</b>	
			Experimental	14.8		
		$\delta C_{2-3}$	Teórico	34.6	<b>9.1</b>	
			Experimental	25.5		
	6-311G(d,p)	$\delta C_{1-4}$	Teórico	24.7	<b>10.0</b>	
			Experimental	14.8		
		$\delta C_{2-3}$	Teórico	42.0	<b>16.6</b>	
			Experimental	25.5		
	PBEPBE	6-311G(2d,p)	$\delta C_{1-4}$	Teórico	16.9	<b>2.1</b>
				Experimental	14.8	
			$\delta C_{2-3}$	Teórico	37.2	<b>11.7</b>
				Experimental	25.5	
6-311G(d,p)		$\delta C_{1-4}$	Teórico	15.7	<b>0.9</b>	
			Experimental	14.8		
		$\delta C_{2-3}$	Teórico	37.2	<b>11.7</b>	
			Experimental	25.5		
WB97XD	6-311G(2d,p)	$\delta C_{1-4}$	Teórico	16.9	<b>2.1</b>	
			Experimental	14.8		
		$\delta C_{2-3}$	Teórico	33.4	<b>7.9</b>	
			Experimental	25.5		
	6-311G(d,p)	$\delta C_{1-4}$	Teórico	17.4	<b>2.6</b>	
			Experimental	14.8		
		$\delta C_{2-3}$	Teórico	33.4	<b>7.9</b>	
			Experimental	25.5		

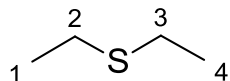
#### 4.c.2 Señales promedio del sulfuro de isopropilo



**Tabla 20.** Diferencia absoluta entre los desplazamientos químicos de carbono-13 calculados mediante diferentes combinaciones funcional/conjunto base y los valores reportados en la bibliografía para el sulfuro de *isopropilo*

Funcional	Conjunto Base	Desplazamientos (ppm)		$ \delta C_{Teórico} - \delta C_{Experimental} $	
		Teórico	Experimental		
MPW1PWP1	6-311G(2d,p)	$\delta C_{1,5,4,6}$	Teórico	25.1	<b>1.4</b>
			Experimental	23.7	
		$\delta C_{2-3}$	Teórico	42.9	<b>9.4</b>
			Experimental	33.5	
	6-311G(d,p)	$\delta C_{1,5,4,6}$	Teórico	33.2	<b>9.5</b>
			Experimental	23.7	
		$\delta C_{2-3}$	Teórico	50.4	<b>16.9</b>
			Experimental	33.5	
PBEPBE	6-311G(2d,p)	$\delta C_{1,5,4,6}$	Teórico	25.7	<b>2.0</b>
			Experimental	23.7	
		$\delta C_{2-3}$	Teórico	46.3	<b>12.8</b>
			Experimental	33.5	
	6-311G(d,p)	$\delta C_{1,5,4,6}$	Teórico	25.5	<b>1.8</b>
			Experimental	23.7	
		$\delta C_{2-3}$	Teórico	46.3	<b>12.8</b>
			Experimental	33.5	
WB97XD	6-311G(2d,p)	$\delta C_{1,5,4,6}$	Teórico	25.3	<b>1.6</b>
			Experimental	23.7	
		$\delta C_{2-3}$	Teórico	41.6	<b>8.1</b>
			Experimental	33.5	
	6-311G(d,p)	$\delta C_{1,5,4,6}$	Teórico	25.9	<b>2.2</b>
			Experimental	23.7	
		$\delta C_{2-3}$	Teórico	41.7	<b>8.21</b>
			Experimental	33.5	

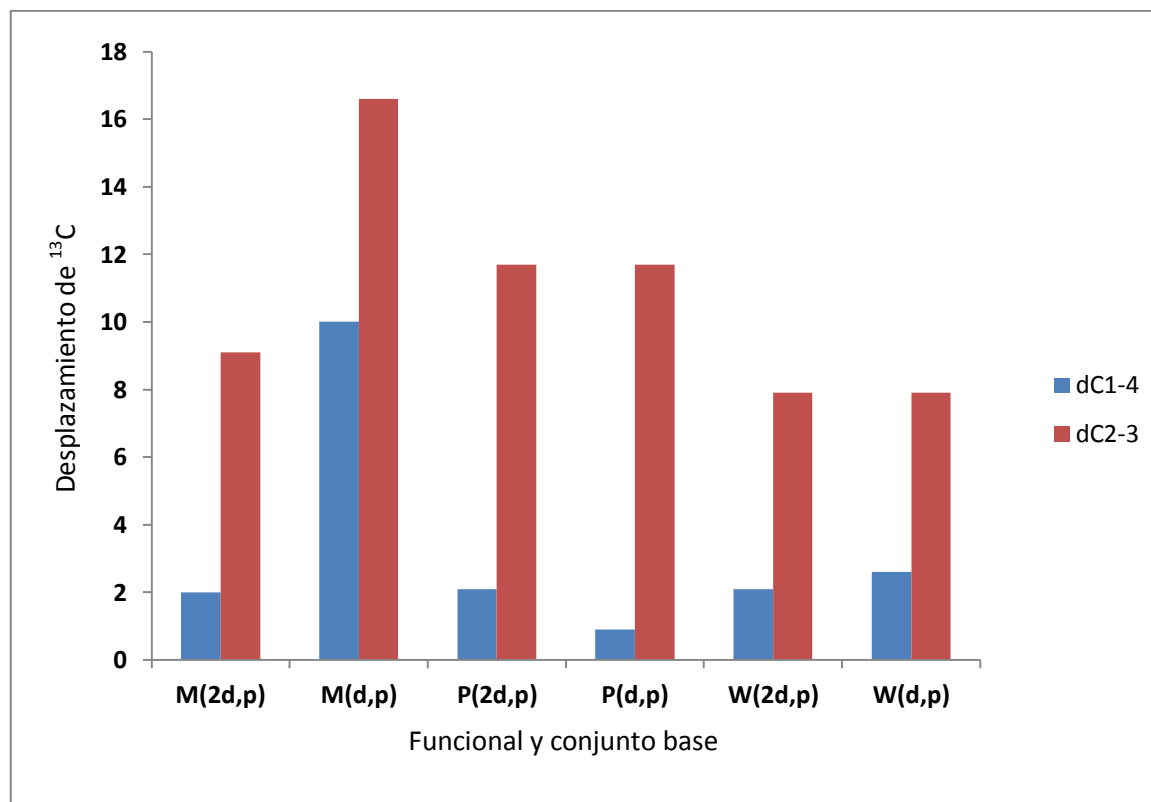
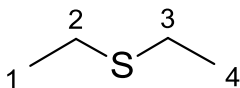
**Tabla 21.** Resumen de las diferencias de desplazamientos químicos de carbono-13 entre los valores experimentales y los calculados con diferentes combinaciones de funcionales/conjunto base para el sulfuro de dietilo.



Funcional	Conjunto base	Desplazamiento (ppm)	
		$\delta C_{1-4}$	$\delta C_{2-3}$
<b>MPW1PWP1</b>	6-311G(2d,p)	2.0	9.1
	6-311G(d,p)	10.0	16.6
<b>PBEPBE</b>	6-311G(2d,p)	2.1	11.7
	6-311G(d,p)	0.9	11.7
<b>WB97XD</b>	6-311G(2d,p)	2.1	7.9
	6-311G(d,p)	<b>2.6</b>	<b>7.9</b>

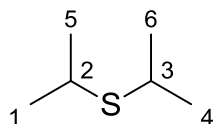
En la **Gráfica 1**, se puede apreciar que el funcional y conjunto base que dan la mejor estimación para los desplazamientos químicos en el sulfuro de etilo son WB97XD y 6-311G(d,p) respectivamente

Funcional	Conjunto base	Clave
MPW1PWP1	6-311G(2d,p)	M(2d,p)
	6-311G(d,p)	M(d,p)
PBEPBE	6-311G(2d,p)	P(2d,p)
	6-311G(d,p)	P(d,p)
WB97XD	6-311G(2d,p)	W(2d,p)
	6-311G(d,p)	W(d,p)



**Gráfica 1.** Comparación entre el desplazamiento químicos calculado mediante distintos funcionales y conjuntos base para la molécula sulfuro de dietilo

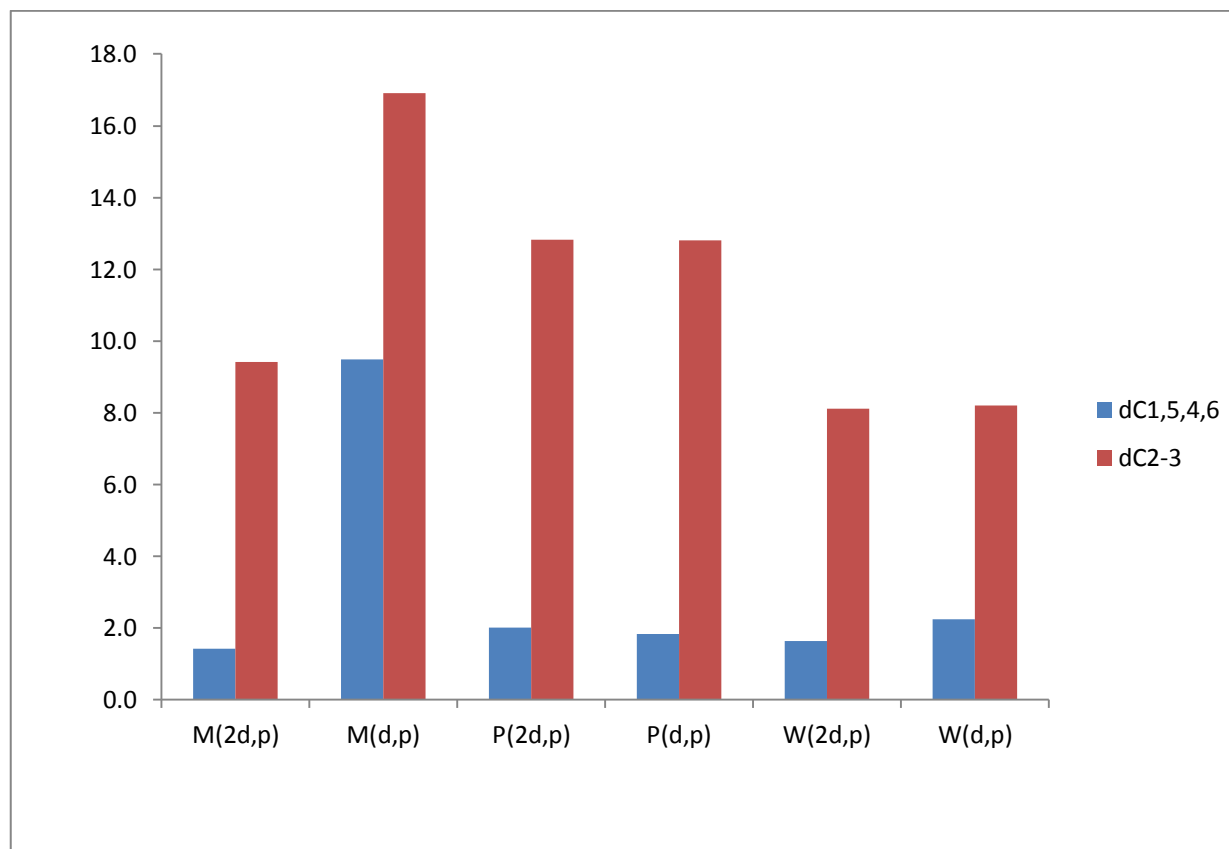
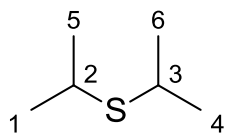
**Tabla 22.** Resumen de las diferencias de desplazamientos químicos de carbono-13 entre los valores experimentales y los calculados con diferentes combinaciones de funcionales/conjunto base para el sulfuro de *isopropilo*



Funcional	Conjunto base	Átomo	
		$\delta_{C_{1,5,4,6}}$	$\delta_{C_{2-3}}$
<b>MPW1PWP1</b>	6-311G(2d,p)	1.4	9.4
	6-311G(d,p)	9.5	16.9
<b>PBEPBE</b>	6-311G(2d,p)	2.0	12.8
	6-311G(d,p)	1.8	12.8
<b>WB97XD</b>	6-311G(2d,p)	1.6	8.1
	6-311G(d,p)	2.2	8.2

En la **Gráfica 2**, se puede apreciar nuevamente, que el funcional y conjunto base que dan la mejor estimación para los desplazamientos químicos, ahora, en el sulfuro de dietilo son WB97XD y 6-311 G(d,p) respectivamente

Funcional	Conjunto base	Clave
<b>MPW1PWP1</b>	6-311G (2d,p)	M(2d,p)
	6-311G (d,p)	M(d,p)
<b>PBEPBE</b>	6-311G (2d,p)	P(2d,p)
	6-311G (d,p)	P(d,p)
<b>WB97XD</b>	6-311G( 2d,p)	W(2d,p)
	6-311G (d,p)	W(d,p)



**Gráfica 2.** Comparación entre el desplazamiento químico calculado mediante distintos funcionales y conjuntos base para la molécula sulfuro de isopropilo



## 4. Conclusiones

La realización de este trabajo me permitió continuar con mi formación en la investigación en química de productos naturales.

La parte experimental, realizada en el laboratorio:

- Se ha logrado establecer que los sideróforos tipo vancrobactina son marcadores del género *Vibrio* toda vez que se identificó su presencia en las cepas: *V. ordali*, *V. metschnikovii*, *V. harveyi* y *V. pelagiu*
- A través de la detección del complejo piscibactina-Ga<sup>III</sup> y piscibactina-Fe<sup>III</sup>, se ha probado que mediante la inserción de los genes por conjugación se puede promover la síntesis del sideróforo piscibactina en una cepa mutante de *V. alginolyticus*, la cual era incapaz de producir sideróforos antes de ser manipulada
- Mediante la determinación de vibrioferrina en *Edwardsiella tarda*, se ha probado la validez de estudios genómicos como vía para la predicción de metabolitos secundarios en bacterias de origen marino. A demás nos lleva a pensar que existe la capacidad de transferir el cluster de genes encargado de la síntesis de este sideróforo, inicialmente aislado en la familia *Vibrionaceae*.
- Con el fin de determinar el mejor funcional y conjunto base para el cálculo de desplazamientos químicos, se ha deducido que para moléculas pequeñas con átomos de azufre utilizando métodos DFT, el funcional WB97XD junto con el conjunto base 6-311G(2d,p) dan los mejores resultados para en el cálculo teórico de espectros de RMN de <sup>13</sup>C. Este funcional será utilizado por nuestro grupo de investigación a la hora de realizar cálculos teóricos de desplazamiento químico de <sup>13</sup>C en moléculas más complejas que contengan átomos de azufre.

### Destrezas adquiridas

Habilidad de trabajo en el laboratorio, orientada a la separación, mediante el uso de cartuchos HLB, y resinas lipofílicas, e identificación, por HPLC-UV y LC-MS, de compuestos hidrosolubles en microorganismos de origen marino

Manejo del programa Xcalibur para la interpretación y análisis de LC-MS, herramienta muy útil en la identificación de compuestos en mezclas orgánicas

Utilización de técnicas computacionales, búsqueda de confórmeros usando el módulo de búsqueda GMMX, métodos semiempíricos y DFT para la minimización de estos, comparación estructural usando el módulo de comparación del ChemBio 3D 12.0, cálculo de señales de RMN

## Otras actividades formativas

Finalmente, durante esta realización de este trabajo se hicieron otras actividades académicas

Cursos:

- Scifinder Training, Universidade Da Coruña, A Coruña, mayo de 2013

Congresos:

- Balado M, Fuentes-Monteverde JC, Vences A, Osorio CR, González J, Jiménez C, Lemos. Síntesis de sideróforos de tipo Vancrobactina en diferentes especies del género *Vibrio*. XXIV Congreso de Microbiología de la Sociedad Española de Microbiología. Julio de 2013
- Juan Carlos Fuentes-Monteverde, Carlos Jiménez, Jaime Rodríguez, Amable J. Rivas, Carlos R. Osorio, Manuel L. Lemos. Piscibactin, a siderophore from *Photobacterium damsela* Subsp. *piscicida*, can be produced by *Vibrio alginolyticus* after conjugative gene transfer. XIV International Symposium on Marine Natural Products. Septiembre de 2013

## Bibliografía

Aguirre-Valderrama, A. & Dobado, J., 2006. Conformational Analysis of Thiosugars: Theoretical NMR Chemical Shifts and  $^3J_{H,H}$  Coupling Constants of 5-Thio-Pyranose Monosaccharides. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, Volume 25, p. 557–594.

Amin, S. A. et al., 2007. Boron Binding by a Siderophore Isolated from Marine Bacteria Associated with the Toxic Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. Volume 129, pp. 478-479.

Amin, S., Green, D., Kupper, F. & Carrano, C., 2009. Vibrioferrin, an unusual marine siderophore: iron binding, photochemistry and biological implications. *Inorganic Chemistry*, Volume 48, pp. 11451-11458.

Annie, G. & Lipton, A., 2012. Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from the captive-reared tropical marine ornamental blue damselfish, *Pomacentrus caeruleus* (Quoy and Gaimard, 1825). *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 41(4), pp. 348-354.

Anon., 1988. Characterization of ferrioxamine E as the principal siderophore of *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*). *Biology of Metal*, Volume 1, pp. 55-56.

Asche, F., Bjørndal, T. & Young, J., 2001. Market interactions for aquaculture products. *Aquaculture economics and management*, Volume 5, p. 303.

Balado, M., Osorio, C. & Lemus, C., 2006. A gene cluster involved in the biosynthesis of vanchrobactine, a chromosome-encoded siderophore produced by *Vibrio anguillarum*. *Microbiology*, Volume 152, pp. 3517-3528.

Bruland, K., Donat, J. & Hutchins, D., 1991. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnology and oceanography*, 8(36), pp. 1555-1577.

Cen-Pacheco, F. et al., 2013. Connecting Discrete Stereoclusters by Using DFT and NMR Spectroscopy The Case of Nivariol. *Chemistry a European Journal*, Volume 19, pp. 8525-8532.

CHARAN, R., MCKEE, T. & BOYD, M., 2004. CYTOTOXIC ALKALOIDS FROM THE MARINE SPONGE THORECTANDRA SP.. *Natural Product Research*, 18(3), p. 225–229.

Dao-Zong, X., Xin-Fen, Y., Zhuo-Ying, Z. & Zhuang-Dan, Z., 2011. Antioxidant and antibacterial activity of six edible wild plants (*Sonchus* spp.) in China. *Natural Product Research*, 25(20), p. 1893–1901.

Espada, A. et al., 2011. An approach to speed up the isolation of hydrophilic metabolites from natural sources at semipreparative level by using a hydrophilic–lipophilic balance/mixed-mode strong cation exchange–high-performance liquid chromatography/mass spectrometry system. *Journal of Chromatography A*, 1218(13), pp. 1790-1794.

Fenández-Polanco, J. & Luna, L., 2012. Factors affecting consumeres' beliefs about aquaculture. *Aquaculture Economics & Management*, Issue 16, pp. 22-39.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010. [Online] Available at: [ftp://ftp.fao.org/FI/CDrom/CD\\_yearbook\\_2009/root/aquaculture/a0a.pdf](ftp://ftp.fao.org/FI/CDrom/CD_yearbook_2009/root/aquaculture/a0a.pdf) [Accessed 08 Septiembre 2013].

Funahashi, T. et al., 2002. Identification and Characterization of *pvuA*, a Gene Encoding the Ferric Vibrioferrin Receptor Protein in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 184(4), p. 936–946.

Gärdes, A. et al., 2013. Detection of photoactive siderophore biosynthetic genes in the marine environment. *Biometals*, 6(3), pp. 507-16.

Griffiths, G., Sigel, S., Payne, S. & Neilands, J., 1984. Vibriobactin, a siderophore from *Vibrio cholerae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(1), pp. 383-385.

Hishamunda, N. & Ridler, N., 2003. Sustainable commercial aquaculture: a survey of administrative procedures and legal frameworks. *Aquaculture Economics & Management*, Volume 7, p. 167.

Jin-Ching, L. et al., 2013. Marine algal natural products with anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-cancer properties. *Cancer Cell International*, 13(55), p. 1.

Kumar, A. et al., 2013. Isolation, characterisation and antibacterial activity of new compounds from methanolic extract of seeds of *Caesalpinia crista* L. (Caesalpinaceae). *Natural Product Research*, p. 1.

- Lakshmi, V. & Kumar, R., 2009. Metabolites from *Sinularia* species. *Natural Product Research*, 23(9), p. 801–850.
- Luna Sotorrió, L., 2002. Economic analysis of finfish mariculture operations in Spain. *Aquaculture Economics & Management*, Volume 6, p. 65.
- Mainous, M. & Smith, S., 2010. Effect of Common Aquaculture Chemicals against *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda*. *Journal of Aquatic Animal Health*, Volume 22, pp. 224–228,.
- Ma, L. & Payne, S. M., 201. AhpC Is Required for Optimal Production of Enterobactin by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194(24), p. 6748–6757.
- Manning, T. et al., 2006. Impact of environmental conditions on the marine natural product bryostatin 1. *Natural Product Research*, 20(6), pp. 611-628.
- Manning, T. et al., 2008. Computational studies of Fe(III) binding to bryostatins, bryostatin analogs, siderophores and marine natural products: arguments for ferric complexes in medicinal applications. *Natural Product Research*, 22(5), pp. 399-413.
- Mansson, M., Gram, L. & Larsen, T., 2011. Production of Bioactive Secondary Metabolites by Marine Vibrionaceae. *Marine Drugs*, Volume 9, pp. 1440-1468.
- Matsuo, Y. et al., 2011. Streptobactin, a Triccatechol-Type Siderophore from Marine-Derived *Streptomyces* sp. YM5-799. *Journal of Natural Products*, Volume 74, pp. 2371-2376.
- Mokracka, J., Koczura, R. & Kaznowski, A., 2004. Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, Volume 40, pp. 51-55.
- Mosharraf, H., Kawai, K. & Oshima, S., 2009. An Inactivation Method of *Edwardsiella ictaluri* turda Vaccine for Fish. *Journal of Applied Animal Research*, Volume 35, pp. 137-142.
- Neilands, J. B., 1995. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Volume 270, pp. 26723-26726.
- Nieto, R., 2013. *Compuestos bioactivos de organismos marinos del Pacífico: briaranos de Briareum sp., bengazoles de Jaspis sp., kalihinenos de Acanthella cavernosa, thelepamida de Thelepus crispus y disidiotiazolamida de Dysidea sp.* A Coruña: Universidade Da Coruña.

- Osorio, C., Juiz-Río, S. & Lemos, M., 2006. A siderophore biosynthesis gene cluster from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is structurally and functionally related to the *Yersinia* high-pathogenicity island.. *Microbiology*, Volume 152, pp. 3327-41.
- Ping-Chung, L. et al., 1996. News & Notes: Isolation of *Vibrio harveyi* from Diseased Kuruma Prawns *Penaeus japonicus*. *Current Microbiology*, 33(2), pp. 129-132.
- Rachid, D. & Ahmed, B., 2005. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), pp. 697-702.
- Rad, F. & Köksal, G., 2000. An overview of aquaculture in Turkey: with emphasis on sea bass and sea bream. *Aquaculture Economics & Management*, Volume 4, p. 227.
- Rauter, A. et al., 2005. Bioactive Pseudo-C-nucleosides Containing Thiazole, Thiazolidinone, and Tetrazole Rings. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, Volume 24, p. 275–296.
- Ringø, E. et al., 2008. The effect of early exposure to *Vibrio pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *Journal of Applied Microbiology*, 81(2), pp. 207 - 211..
- Sadovy, Y. & Lau, P., 2002. Prospects and problems for mariculture in Hong Kong associated with wild-caught seed and feed. *aquaculture economics and management*, Volume 6, p. 177.
- Sandy, M. et al., 2010. Vanchrobactin and Anguibactin Siderophores Produced by *Vibrio* sp. DS40M4. *Journal of Natural Products*, 73(6), p. 1038–1043.
- Schiewe, M. H., Trust, T. J. & Crosa, J., 1981. *Vibrio ordalii* sp. nov.: A causative agent of vibriosis in fish. *Current Microbiology*, 6(6), pp. 343-348.
- Soengas, R. et al., 2006. Structural characterization of vanchrobactin, a new catechol siderophore produced by the fish pathogen *Vibrio anguillarum* serotype O2. *Tetrahedron Letters*, Volume 47, pp. 7113-7116.
- Soto, E. et al., 2012. *Edwardsiella ictaluri* as the Causative Agent of Mortality in Cultured Nile Tilapia. *Journal of Aquatic Animal Health*, Volume 24, p. 81–90.

Souto, A. et al., 2012. Structure and Biosynthetic Assembly of Piscibactin, a Siderophore from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, Predicted from Genome Analysis. *European Journal of Organic Chemistry*, Issue 29, p. 5693–5700.

Wan, X., Shen, H., Wang, L. & Cheng, Y., 2011. Isolation and characterization of *Vibrio metschnikovii* causing infection in farmed *Portunus trituberculatus* in China. *Aquaculture International*, 19(2), pp. 351-359.

Yamamoto, S. et al., 1994. Structure and Iron Transport Activity of Vibrioferrin, a New Siderophore of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Biochem*, 115(5), pp. 868-874.