



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA



FONDE
CYT
Fondo Financiamiento del Concytec



Aislamiento e identificación de compuestos naturales a partir de la microbiota de *Hermetia illucens* activos contra *Aeromonas hydrophila*

PROYECTO DE TESIS - DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA VIDA

DENIS H. CASTILLO PAREJA

DIRECTOR: PHD. MICHEL SAUVAIN

Introducción

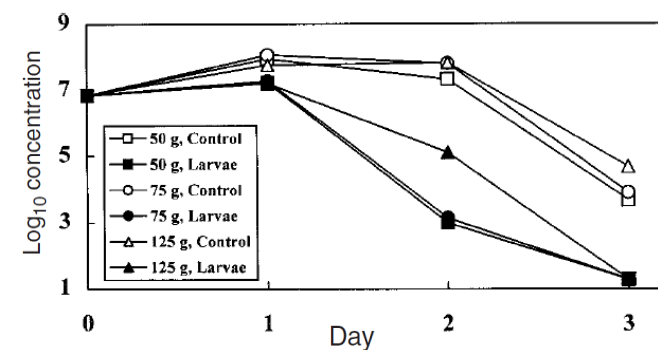
► *Hermetia illucens*



Diet or Source	% Protein	% Fat	Source
Cattle blood and wheat bran	47.6	25.3	Aniebo et al. 2009 [71]
Municipal organic waste	39.8	30.1	Mutafela 2015 [137]
Horse manure	40.9	12.9	Mutafela 2015 [137]
Fresh fruit waste	37.8	41.7	Mutafela 2015 [137]
Swine manure	43.2	28	Newton et al. 2005 [89]
Poultry manure	42.1	34.8	Newton et al. 2005 [89]
Vegetable waste	39.9	37.1	Sprangers et al. 2017b [97]
Restaurant waste (vegan)	43.1	38.6	Sprangers et al. 2017b [97]
Cow manure	-	21.42	St-Hilaire et al. 2007a [67]
50/50 Fish offal: Cow manure	-	30.44	St-Hilaire et al. 2007a [67]

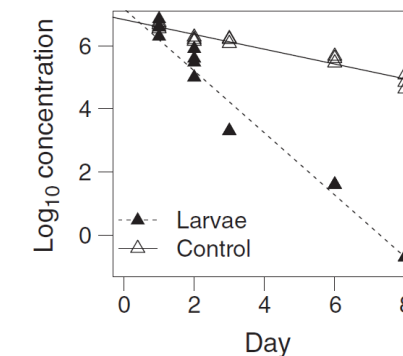
Wang et al., 2017

E. coli



Ericson et al., 2004

Salmonella spp



Lalander et al., 2013

Búsqueda de nuevas moléculas antibióticas aisladas de la diversidad microbiana del tracto digestivo de una mosca peruana saprófaga - Contrato FONDECYT 108-2015.

1146 Characterization of anti- *Helicobacter pylori* peptides present in the hemolymph of *Hermetia illucens* larvae

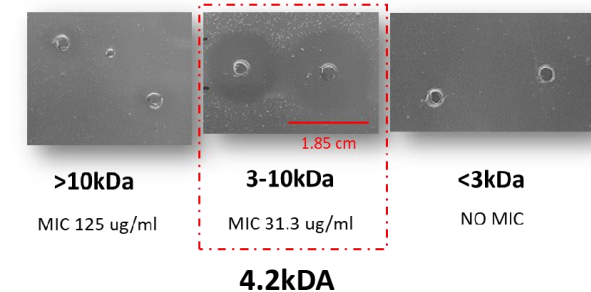
Daniela Alvarez¹, Kevin A. Wilkinson², Michel Treilhou³, Nathan Téné³, Denis Castillo Pareja¹, Michel Sauvain^{1,4}

¹Andean Amazon Laboratory of Chemistry of Life, Research and Development Laboratories, Cayetano Heredia Peruvian University, Lima, Perú. ²Antenor Orrego Private University, Trujillo, Peru. ³Centre Universitaire de Formation et de Recherche Jean-François Champollion, Albi, France, ⁴UMR 152 PHARMA-DEV, Université de Toulouse, IRD, France.



JOURNAL OF INSECT SCIENCE

Purification of low molecular weight peptides from active fraction F. 40%ACN



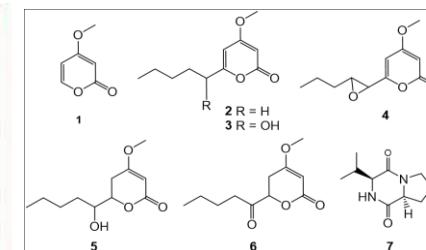
PLOS ONE

Compuestos antimicrobianos de *Chrysosporium multifidum*, un hongo aislado del tracto digestivo de la larva de *Hermetia illucens*

Yesenia Correa¹, Billy Cabanillas¹, Valérie Jullian², Daniela Álvarez¹, Denis Castillo¹, Cédric Dufloer², Beatriz Bustamante³, Elisa Roncal¹, Edgar Neyra¹, Patricia Sheen¹, Michel Sauvain^{1,2}

Código SIDISI: 64998 Fecha de aprobación de CIE: 11 de diciembre del 2015

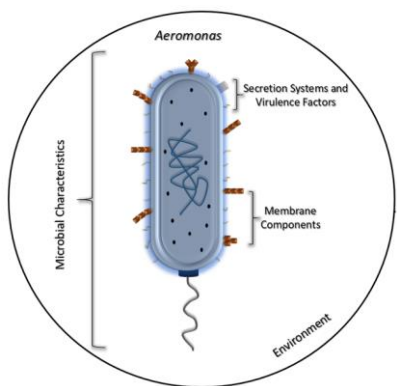
¹ Laboratorios de Investigación y Desarrollo, Facultad de Ciencias y Filosofía, UPCH, Perú; ² UMR152 PharmaDev, Université de Toulouse, IRD-UPS, France; ³ Laboratorio de micología clínica, Instituto Alexander von Humboldt, UPCH, Perú.



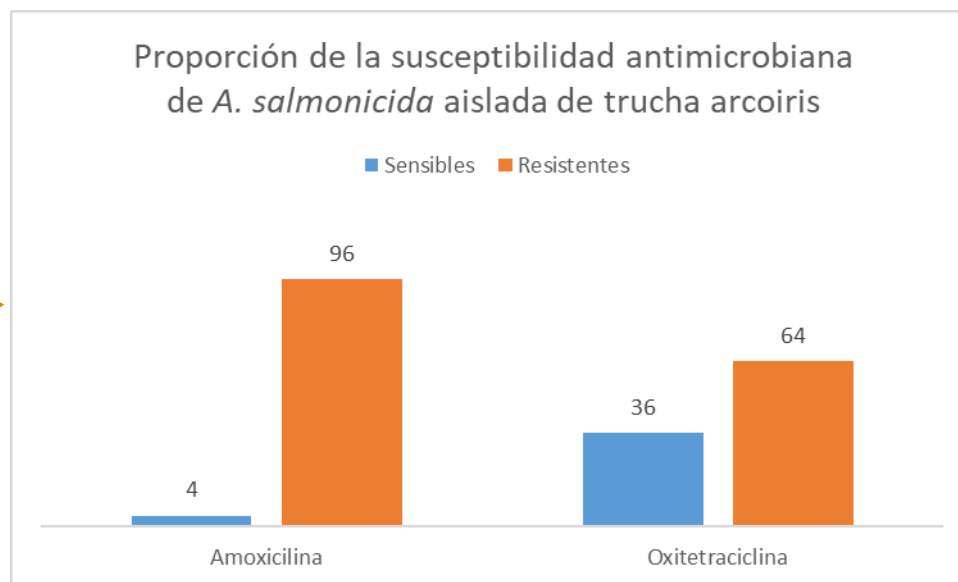
COMPUESTO	IC ₅₀ (µg/mL)	MIC (µg/mL)
4	11.4 ± 0.7	62.5
Tetracycline	0.1 ± 0.02	0.4

Fig. 2: Compuestos aislados a partir del cultivo líquido de *C. multifidum*: 4-methoxy-2H-pyran-2-one (1), 4-methoxy-6-pentyl-2H-pyran-2-one (2), 6-(1-hydroxypentyl)-4-methoxy-pyran-2-one (3), 6-[(7S,8R)-8-propyloxiran-1-yl]-4-methoxy-pyran-2-one (4), pestalotin (5), 5,6-dihydro-4-methoxy-6-(pentanoyloxy)-2H-pyran-2-one (6) y cyclo-(L-Pro-L-Phe) (7).

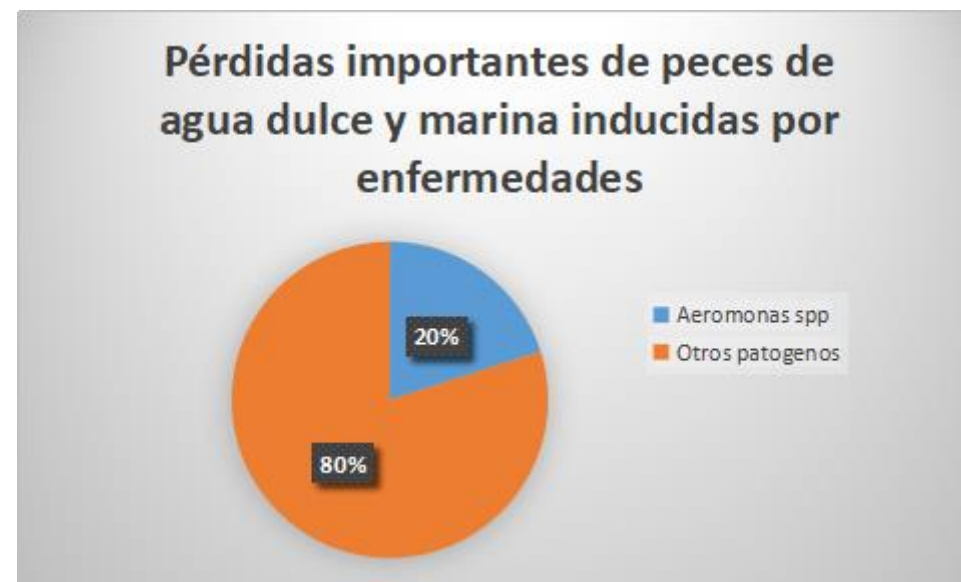
Aeromonas



Gonçalves Pessoa et al., 2019



Modificado de Hurtado Torres Carmen, Tesis de Maestría en UPCH, 2019



Modificado de Tabares-Dias M y Laterca ML. 2017



Objetivo

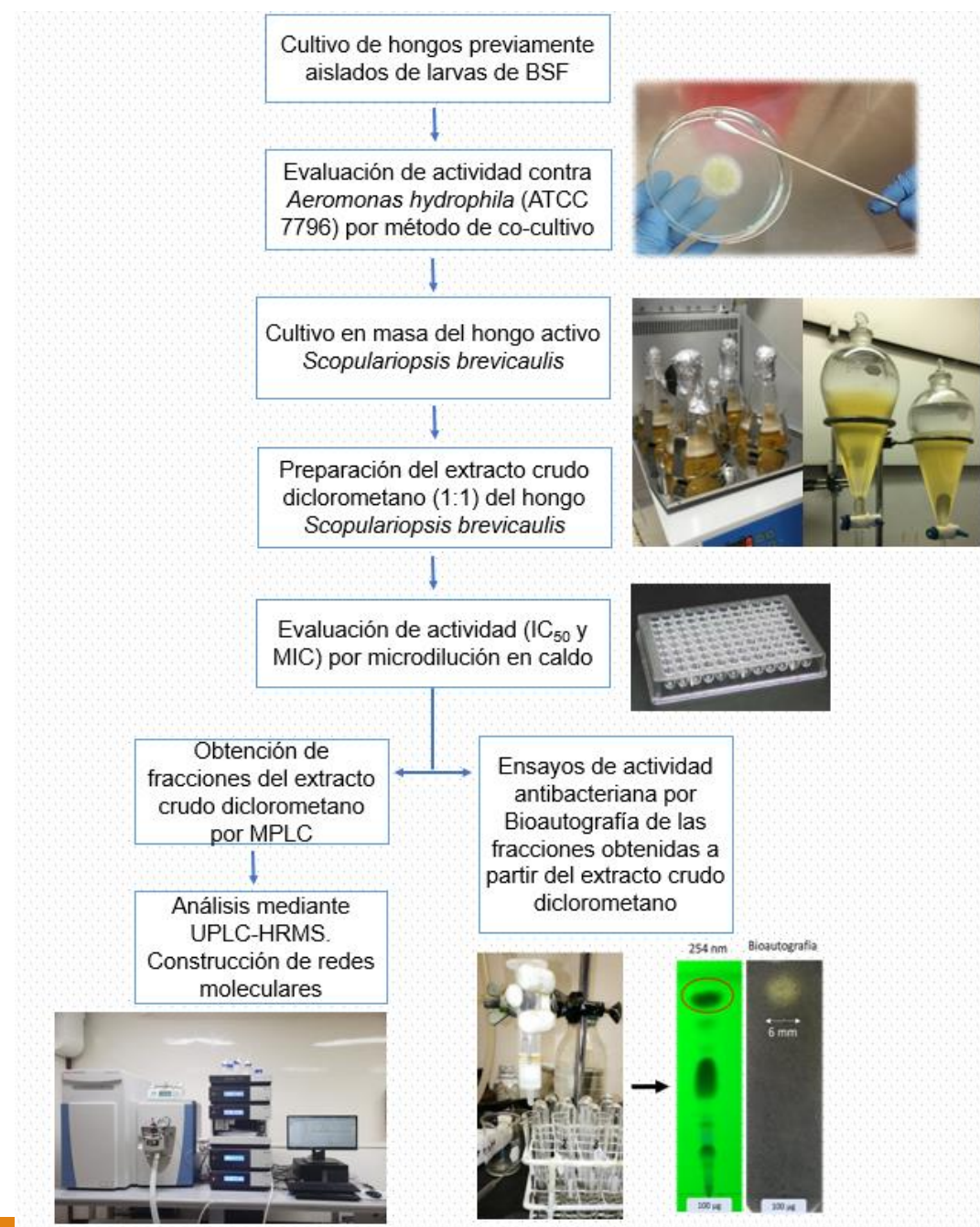
Aislar e identificar moléculas producidas por la microbiota de la mosca *Hermetia illucens* que sean activas contra la bacteria patógena para peces *Aeromonas hydrophila*

Realizar pruebas de enfrentamiento de microorganismos aislados del tracto digestivo de las larvas de *Hermetia illucens* contra la bacteria patógena *Aeromonas hydrophila* ATCC 7796.

Aislar las moléculas presentes en las zonas de inhibición de crecimiento.

Identificar las moléculas activas contra *A. hydrophila* mediante técnicas de Espectrometría de Masa acoplada a un UPLC y Resonancia Magnética Nuclear

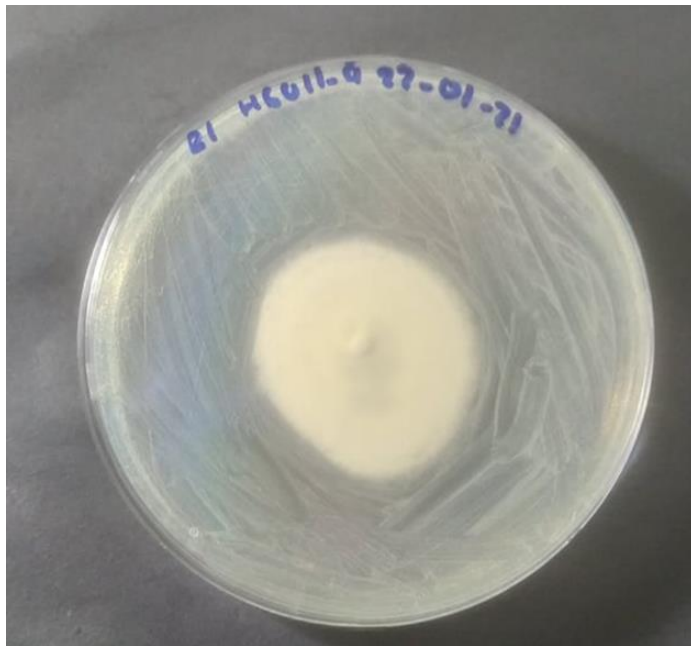
Esquema general



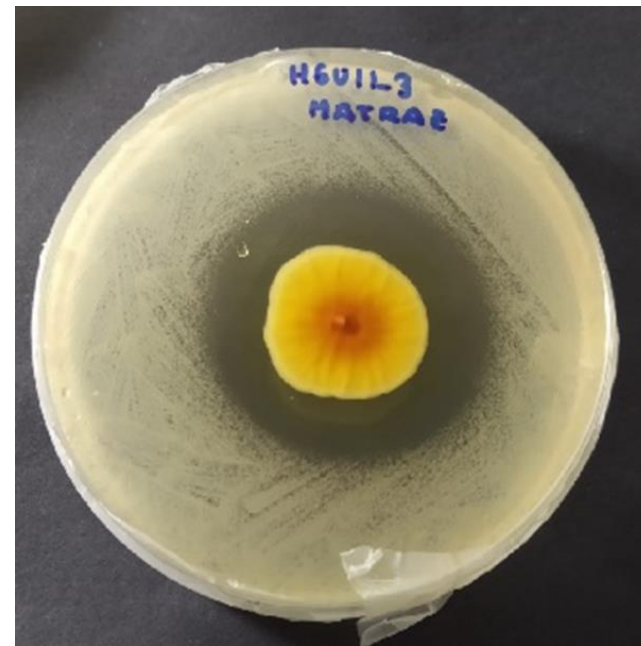
Resultados

Pruebas de enfrentamiento de hongos filamentosos (cocultivo)

SIN HALO DE INHIBICIÓN



CON HALO DE INHIBICIÓN



Cepa fúngica	Prueba de antagonismo de hongos filamentosos aislados de <i>Hermetia illucens</i> contra <i>A. hydrophila</i>			
	Diámetro del hongo (mm)	Diámetro de inhibición (mm)	Potencial antimicrobiano	Claridad del halo
HGU11_2	21.8 ± 1.7	38.6 ± 1.3	1.8 ± 0.1	(+++)
HGU11_3	21.9 ± 1.6	39.1 ± 4.0	1.8 ± 0.1	(+++)
HGU11_4	14.2 ± 1.7	20.7 ± 1.4	1.5 ± 0.2	(+++)
HGU11_5	15.6 ± 0.4	24.5 ± 1.5	1.6 ± 0.1	(+++)
HGU11_6	14.6 ± 0.9	21.0 ± 3.8	1.5 ± 0.3	(+++)
HGU11_7	15.7 ± 1.8	19.9 ± 3.6	1.3 ± 0.3	(+++)
HGU11_8	33.9 ± 2.2	41.9 ± 3.6	1.3 ± 0.2	(+++)
HGU11_9	38.2	38.2	1	(-)
HGU11_10	26.8 ± 2.1	39.9 ± 2.4	1.5 ± 0.1	(+++)
HGU11_11	22.9 ± 1.5	29.5 ± 1.4	1.3 ± 0.1	(+++)

Donde:

—, indica que no hay zona de inhibición

+++ , indica la presencia de una zona de inhibición con una claridad similar a la observada con la droga de referencia Tetraciclina (30 µg por disco de 8mm)

±, indica Desviación estandar obtenido a partir de experimentos realizados por triplicado.

Cepa fúngica	Prueba de antagonismo de hongos filamentosos aislados de <i>Hermetia illucens</i> contra <i>A. hydrophila</i>			
	Diámetro del hongo (mm)	Diámetro de inhibición (mm)	Potencial antimicrobiano	Claridad del halo
HGU11_2	21.8 ± 1.7	38.6 ± 1.3	1.8 ± 0.1	(+++)
HGU11_3	21.9 ± 1.6	39.1 ± 4.0	1.8 ± 0.1	(+++)
HGU11_4	14.2 ± 1.7	20.7 ± 1.4	1.5 ± 0.2	(+++)
HGU11_5	15.6 ± 0.4	24.5 ± 1.5	1.6 ± 0.1	(+++)
HGU11_6	14.6 ± 0.9	21.0 ± 3.8	1.5 ± 0.3	(+++)
HGU11_7	15.7 ± 1.8	19.9 ± 3.6	1.3 ± 0.3	(+++)
HGU11_8	33.9 ± 2.2	41.9 ± 3.6	1.3 ± 0.2	(+++)
HGU11_9	38.2	38.2	1	(-)
HGU11_10	26.8 ± 2.1	39.9 ± 2.4	1.5 ± 0.1	(+++)
HGU11_11	22.9 ± 1.5	29.5 ± 1.4	1.3 ± 0.1	(+++)

Donde:

—, indica que no hay zona de inhibición

+++, indica la presencia de una zona de inhibición con una claridad similar a la observada con la droga de referencia Tetraciclina (30 µg por disco de 8mm)

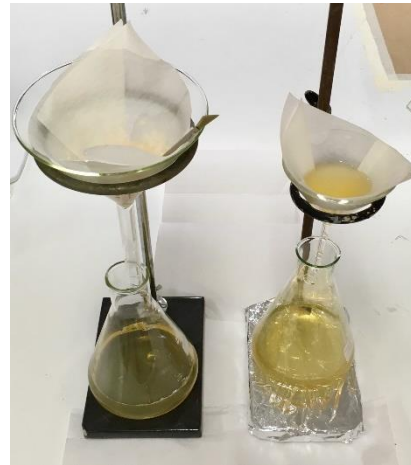
±, indica Desviación estandar obtenido a partir de experimentos realizados por triplicado.

Obtención del extracto crudo con actividad antimicrobiana

Cultivo en masa de 500ml



Filtración



Extracción con solventes



Evaporación de solventes



HGU11_3

HGU11_4

HGU11_5

HGU11_6

HGU11_8



Extracto crudo

Acetato de etilo (AE)

Diclorometano (DCM)

Metanol (MeOH)

Evaluación antimicrobiana

Cepa fúngica	EXTRACTO	IC ₅₀	MIC	MBC
HGU11_3	AE	1.6 mg/ml	2 mg/ml	>4 mg/ml
	DCM	1.8 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml
	MeOH	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
HGU11_4	AE	1.5 mg/ml	2 mg/ml	>4 mg/ml
	DCM	0,3 mg/ml	0,5 mg/ml	>1 mg/ml
	MeOH	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
HGU11_5	AE	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
	DCM	2.1 mg/ml	4 mg/ml	>4 mg/ml
	MeOH	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
HGU11_6	AE	>1 mg/ml	>1 mg/ml	NE
	DCM	0,4 mg/ml	0,5 mg/ml	>1 mg/ml
	MeOH	>1 mg/ml	>1mg/ml	NE
HGU11_8	AE	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
	DCM	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
	MeOH	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
Droga de referencia	Tetraciclina	0,3 µg/ml	0,5 µg/ml	ND

Donde:

NE / ND: No evaluado / No determinado

IC₅₀: Concentración inhibitoria media.

MIC: Concentración mínima inhibitoria.

MBC: Concentración mínima bactericida.

AE: Extracto de acetato de etilo.

DCM: Extracto de diclorometano.

MeOH: Extracto de metanol.

Evaluación antimicrobiana

Cepa fúngica	EXTRACTO	IC ₅₀	MIC	MBC
HGU11_3	AE	1.6 mg/ml	2 mg/ml	>4 mg/ml
	DCM	1.8 mg/ml	2 mg/ml	4 mg/ml
	MeOH	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
HGU11_4	AE	1.5 mg/ml	2 mg/ml	>4 mg/ml
	DCM	0,3 mg/ml	0,5 mg/ml	>1 mg/ml
	MeOH	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
HGU11_5	AE	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
	DCM	2.1 mg/ml	4 mg/ml	>4 mg/ml
	MeOH	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
HGU11_6	AE	>1 mg/ml	>1 mg/ml	NE
	DCM	0,4 mg/ml	0,5 mg/ml	>1 mg/ml
	MeOH	>1 mg/ml	>1 mg/ml	NE
HGU11_8	AE	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
	DCM	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
	MeOH	>4 mg/ml	>4 mg/ml	NE
Droga de referencia	Tetraciclina	0,3 µg/ml	0,5 µg/ml	ND

Donde:

NE / ND: No evaluado / No determinado

IC₅₀: Concentración inhibitoria media.

MIC: Concentración mínima inhibitoria.

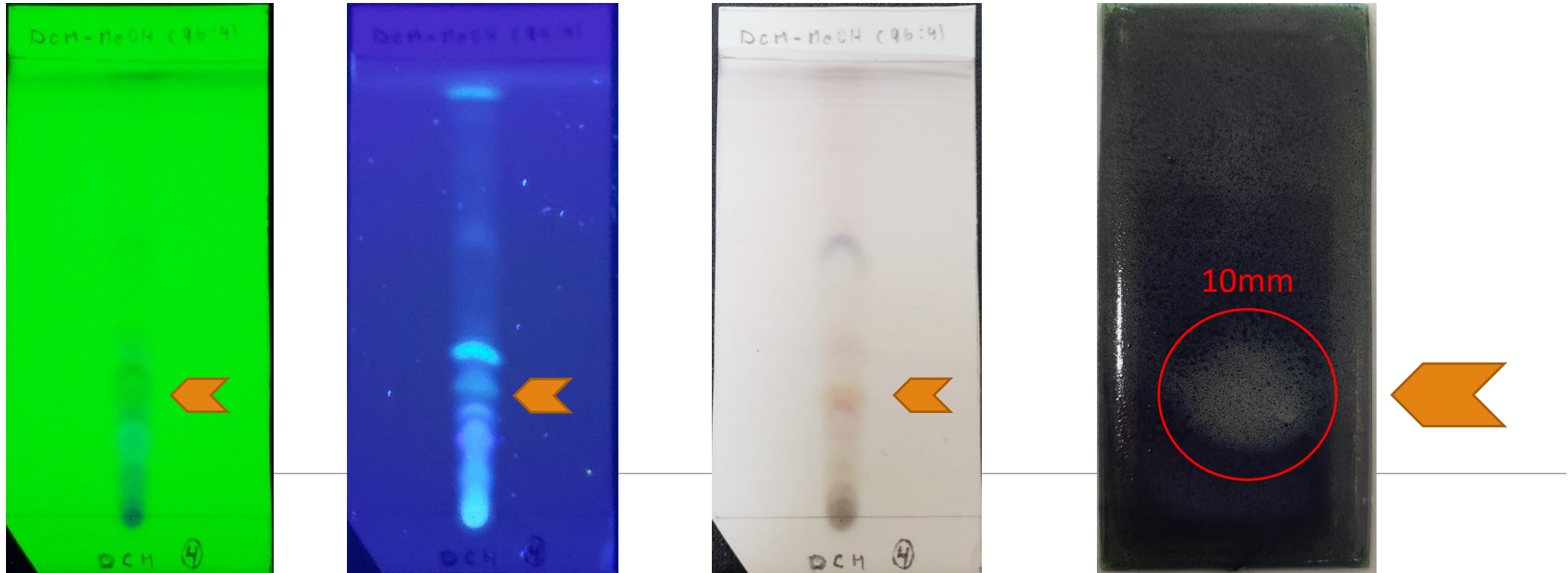
MBC: Concentración mínima bactericida.

AE: Extracto de acetato de etilo.

DCM: Extracto de diclorometano.

MeOH: Extracto de metanol.

Cromatografía en capa fina del extracto diclorometano de HGU11_4 VS *Aeromonas hydrophila* ($1 \cdot 10^6$)



UV 254 nm

UV 366 nm

Vainillina

Bioautografía

10 μ L del extracto activo diclorometano (20mg/ml)
(fase móvil DCM:MeOH – 96:4)

Producción en masa del extracto DCM de la cepa HGU11_4 activo contra *A. hydrophila*

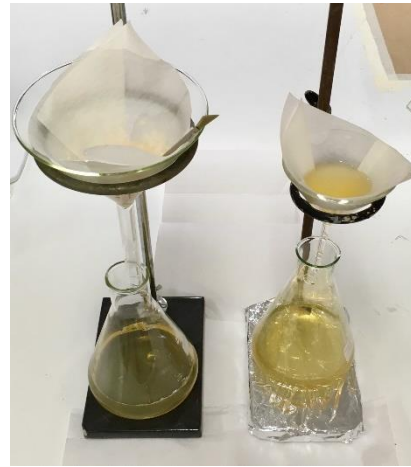
Crecimiento en masa



12 litros



Filtración



Extracción con solventes

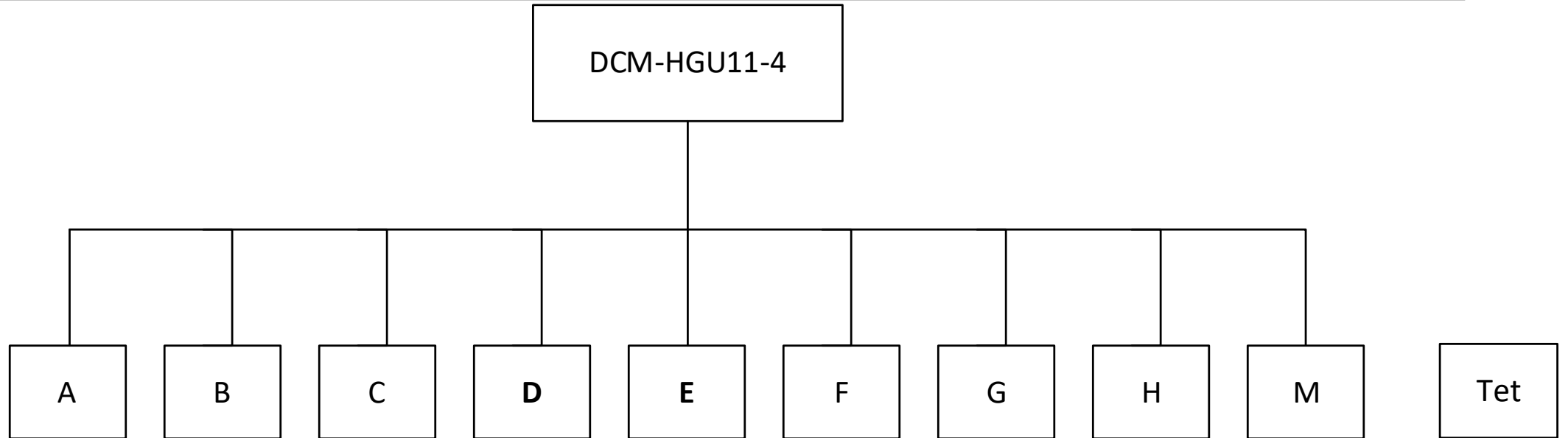


Evaporación de solventes



**1500 mg de extracto
diclorometano**

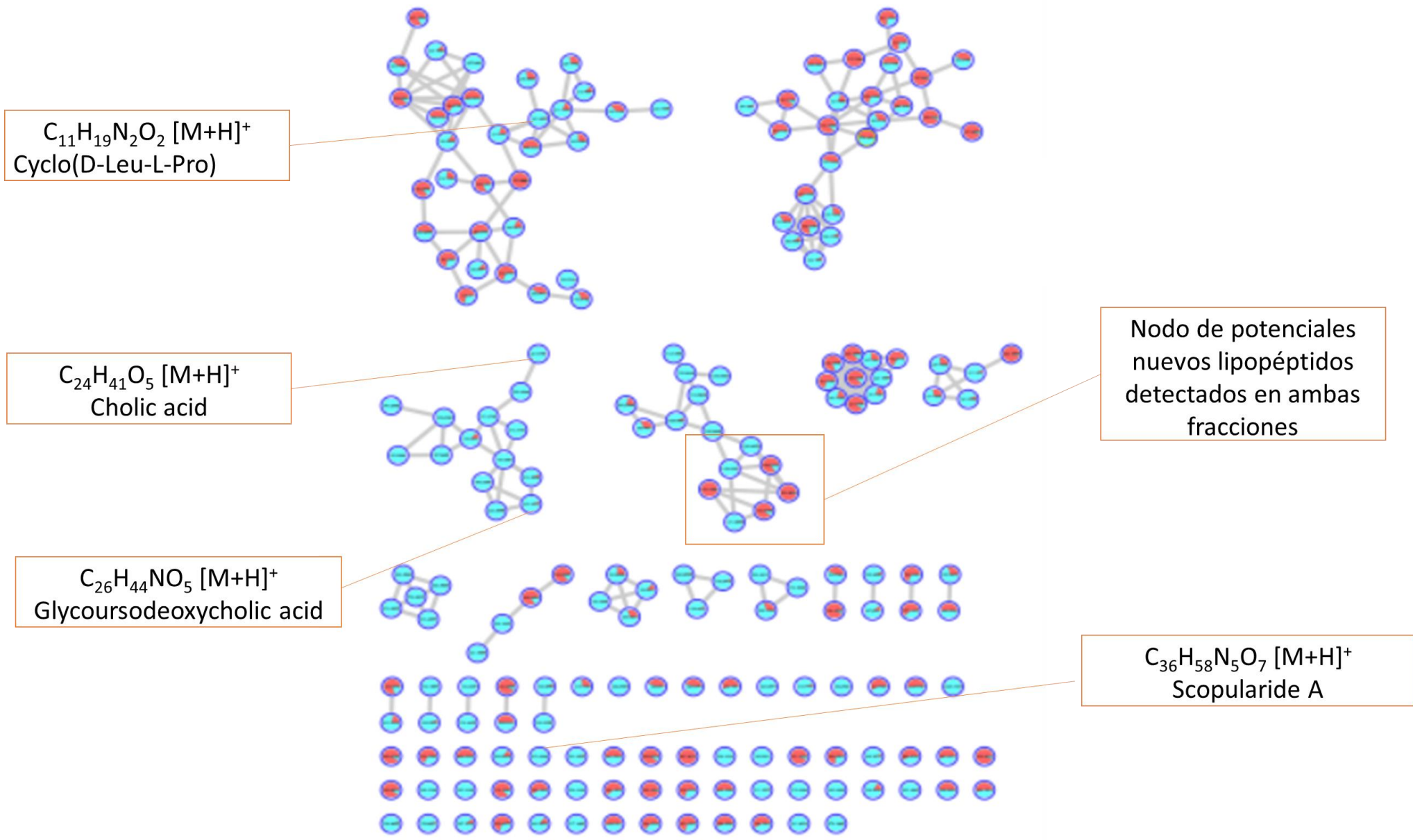
Fraccionamiento



MASA (mg)	740.3	41.3	12.5	11.7	52.9	13.7	21.6	35.3	329.0	-
DHI (mm)	0	0	0	8.3	8.7	4	0	0	5.3	15.8
Claridad	-	-	-	++	++	+	-	-	+	+++

DHI: Diámetro de inhibición del halo

REDES MOLECULARES



Fracción D (rojo)
Fracción E (celeste)

Agradecimientos

Contrato 08-2018-33-FONDECYT-BM-Programa de Doctorado en Áreas Estratégicas y Generales



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA





UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA



GRACIAS