



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

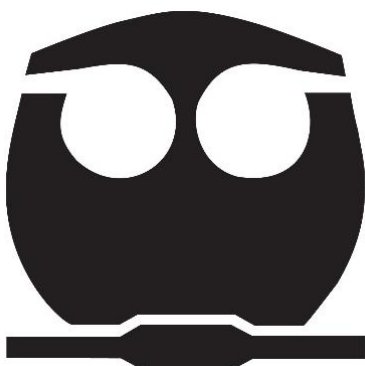
**BIOPROSPECCIÓN DE HONGOS
MICROSCÓPICOS COMO INHIBIDORES DE LA
FORMACIÓN DE LA BIOPELÍCULA BACTERIANA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MARIANA GARCÍA GUERRERO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

VOCAL: Dra. Araceli Pérez Vásquez

SECRETARIO: Dr. José Alberto Rivera Chávez

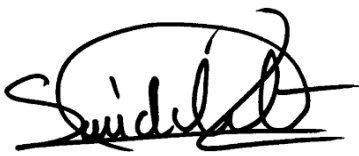
1er SUPLENTE: Dra. Silvia Graciela Davila Manzanilla

2º SUPLENTE: Dra. Itzia Azucena Rangel Castañeda

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 2-5, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:



Dr. José Alberto Rivera Chávez

SUSTENTANTE:

Mariana García Guerrero

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, que, a través de las experiencias dentro de sus instalaciones, profesores y alumnos, me brindó la oportunidad de formarme como profesional.

Al Instituto de Química, por la oportunidad de formarme dentro de sus instalaciones.

A mi asesor, el Dr. José Alberto Rivera Chávez, por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por todas las enseñanzas, apoyo, confianza, paciencia y tiempo brindado en la realización de este trabajo.

A la Dirección General de Apoyo al Personal Académico (**DGAPA**) que a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT: IA207422**) financió algunas de las actividades experimentales de investigación presentadas en este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto, a través del proyecto: **CF-2019-263977**.

Al Dr. Rodolfo García Contreras del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM, por proporcionar las cepas bacterianas empleadas en este trabajo.

A la M. en I. Maricruz López López de la Unidad de Tratamiento de Residuos Peligrosos por la disposición y tratamiento de los residuos RPBI generados en este proyecto.

A la Dra. Beatriz Quiroz García, la M. en C. Elizabeth Huerta Salazar y la Q. Ma. De los Ángeles Peña González por su apoyo en la adquisición de espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

Al M. en C. Enrique Aguilar Ramírez por su apoyo en la adquisición de análisis por espectrometría de masas.

A la Dra. Adriana Romo Pérez por su apoyo en la adquisición de datos espectroscópicos y por su asesoría y enseñanza en el ensayo de biopelícula implementado en este proyecto.

Al laboratorio de Microbiología del Instituto de Química y la Dra. Diana Corina Ceapa que permitió trabajar en sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Araceli Pérez Vásquez y al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar, miembros del jurado, por su tiempo brindado para dar lectura y revisión a este trabajo, y por sus valiosas observaciones que fueron de gran importancia para enriquecer este escrito.

Al Dr. Carlos Antonio Fajardo Hernández, por su apoyo en el procesamiento de los espectros de RMN y sus recomendaciones.

A los M. en C. Karol Carrillo Jaimes y Ángel Sahid Aguilar Colorado, por las enseñanzas, consejos, apoyo, paciencia, amistad y tiempo brindado.

A la Dra. Ingrid Yadira Martínez Aldino, por las enseñanzas, paciencia y tiempo brindado.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 2-5, pues sin ellos mi estancia en el Instituto no hubiera sido la misma, gracias por sus enseñanzas, compañía, apoyo y valiosa amistad.

A la Dra. Yolanda Caballero Arroyo por su apoyo, confianza y motivación.

A mis padres y hermano, por el gran apoyo, confianza, tiempo, compañía y amor infinito en este camino.

A mi familia, por su apoyo y cariño.

DEDICATORIAS

A mis queridos padres, quienes han sido los pilares de mis sueños, gracias por confiar y creer en mí inquebrantablemente. Su eterna aspiración hacia lo mejor para mí, sus sabios consejos, su infinita paciencia y amor incondicional han sido mi mayor bendición. Los amo profundamente.

A mi Paquito y mi Ale, mis compañeros fieles en cada etapa del camino, mis hermanos. Su complicidad, apoyo y amor incondicional son un gran tesoro. Gracias por estar siempre a mi lado. Los quiero mucho.

A los amigos personales especiales, Karol, Fernanda, Leslie, Ángeles, Isichel y Sahid, que han hecho de esta aventura un camino más llevadero. Gracias por su apoyo, consejos, confianza, pero sobre todo por su valiosa amistad.

A Mary, por ser ejemplo de perseverancia y tenacidad. Por ser más que una compañera en este camino, por ser amiga.

A mi familia, por su gran apoyo y eterno cariño.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	I
DEDICATORIAS.....	III
Lista de Tablas	VI
Lista de Figuras.....	VII
Lista de abreviaturas y símbolos.....	IX
1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Resistencia antimicrobiana	2
2.2 Mecanismos de resistencia	3
2.3 Biopelícula bacteriana	5
2.4 Inhibidores de biopelícula	6
2.5 Productos naturales de origen fúngico	8
2.6 Género <i>Trichoderma</i>	9
2.7 Bioprospección	10
3. Justificación	12
4. Hipótesis	13
5. Objetivos	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares	14
6. Desarrollo experimental.....	15
6.1 Reactivos	15
6.2 Obtención de los microorganismos fúngicos y los extractos orgánicos	15
6.3 Actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano	16
6.3.1 Preparación y estandarización del inóculo para los ensayos	16
6.3.2 Método de microdilución en placa.....	16
6.4 Inhibición en la formación de biopelícula.....	17

6.5	Determinación de control positivo.....	17
6.6	Estudio químico del hongo <i>Trichoderma</i> sp. IQ-048.....	18
6.6.1	Cultivo en mediana escala	18
6.6.2	Obtención del extracto orgánico	18
6.6.3	Fraccionamiento del extracto de <i>Trichoderma</i> sp. IQ-048 por cromatografía en fase reversa	19
6.6.4	Aislamiento y purificación del compuesto obtenido a partir del extracto primario del hongo <i>Trichoderma</i> sp. IQ-048.	20
6.6.5	Caracterización química del producto obtenido	20
7.	Resultados y Discusión	21
7.1	Ensayo de formación de biopelícula	21
7.2	Determinación de la capacidad antibacteriana e inhibitoria de la formación de biopelícula de extractos orgánicos de origen fúngico	26
7.3	Selección e identificación taxonómica del aislamiento IQ-048	27
7.4	Estudio químico de <i>Trichoderma</i> sp. IQ-048.....	28
7.5	Determinación de la actividad anti-biopelícula de la ilicicolina H (1).....	37
8.	Conclusiones	38
9.	Referencias.....	39

Lista de Tablas

Tabla 1. Lista OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos. ⁴	3
Tabla 2. Condiciones de la cromatografía tipo Flash utilizadas en el fraccionamiento del extracto de <i>Trichoderma</i> sp. IQ-048, en fase reversa.....	19
Tabla 3. Rendimiento obtenido del fraccionamiento primario del extracto de <i>Trichoderma</i> sp. IQ-048.	19
Tabla 4. Materiales, equipos y reactivos empleados para la ejecución del protocolo de formación de biopelícula.....	22
Tabla 5. Potencial anti-biopelícula antimicrobiano del ácido ursólico, la quercetina y la furanona C-30 frente a la cepa K2 de <i>K. pneumoniae</i>	25
Tabla 6. Actividad anti-biopelícula de las fracciones primarias F ₈ , F ₉ y F ₁₂ frente a <i>K. pneumoniae</i> K2.	28
Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN- ¹ H y RMN- ¹³ C de la Ilicicolina H.	31

Lista de Figuras

Figura 1. Mecanismos de resistencia intrínseca y adaptativa de las bacterias. ⁸	4
Figura 2. Etapas de desarrollo involucradas en la formación de biopelícula bacteriana. ¹²	5
Figura 3. Estructuras químicas de AML que inhiben la formación de biopelículas. ¹⁴	7
Figura 4. Moléculas evaluadas como control positivo de ensayo de inhibición de biopelícula.	8
Figura 5. Ejemplos de PN obtenidos a partir de microorganismos fúngicos.....	9
Figura 6. Moléculas obtenidas a partir del hongo <i>Trichoderma</i> sp.....	10
Figura 7. Distribución de extractos orgánicos IQ-001-IQ-080 en placa de 96 pozos.	15
Figura 8. <i>Trichoderma</i> sp. IQ-048. a) En APD; b) en cereal Cheerios ®.	18
Figura 9. Flujo de trabajo seguido para cuantificar el potencial anti-biopelícula de extractos orgánicos y moléculas puras.....	23
Figura 10. Gráfica y valor obtenido de la determinación de la CMI de la gentamicina para la cepa K2 de <i>K. pneumoniae</i>	24
Figura 11. Curvas concentración vs % de inhibición de la formación de biopelícula de la furanona C-30 frente a) <i>S. aureus</i> y b) <i>K. pneumoniae</i>	25
Figura 12. Actividad antimicrobiana de 96 extractos fúngicos frente a <i>K. pneumoniae</i> K2. Extractos evaluados a 200 ppm.....	26
Figura 13 Actividad inhibitoria de la formación de biopelícula de 80 extractos fúngicos; frente a <i>K. pneumoniae</i> K2. Extractos evaluados a 200 ppm.	27
Figura 14. Árbol filogenético del aislamiento IQ-048. El análisis de máxima similitud de la región ITS del hongo IQ-048 identificó al microorganismo como una especie del género <i>Trichoderma</i> . En este análisis se utilizó la secuencia de <i>Pestalotiopsis clavispora</i> como grupo externo. El árbol fue editado en la plataforma iTOL.	27
Figura 15. Cromatograma del fraccionamiento de la fracción F ₁₂	28
Figura 16. Espectro de UV para la molécula 1	29
Figura 17. Espectro de masas de alta resolución por DART+ [M+H] ⁺ para la molécula 1	29
Figura 18. Illicolina H (1).....	30
Figura 19. Espectro de RMN- ¹ H (700 MHz, CD ₃ OD) de illicolina H (1).....	32
Figura 20. Espectro de RMN- ¹³ C (175 MHz, CD ₃ OD) de illicolina H (1).....	32
Figura 21. Espectro bidimensional HSQC de la illicolina H (1).....	33
Figura 22. Espectro bidimensional HMBC de la illicolina H (1).....	33
Figura 23. Espectro bidimensional COSY de la illicolina H (1).....	34
Figura 24. Espectro bidimensional NOESY de la illicolina H (1).	34
Figura 25. Espectro de dicroísmo circular de la illicolina H (1).	35

Figura 26. Intermediarios sintéticos generados para la síntesis de 1	36
Figura 27. Ruta biosintética propuesta para la ilicolina H y la ilicolina J. Tomada de Lin, X. et al. ³⁸	36

Lista de abreviaturas y símbolos

°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
Abs	Absorbancia
AcOH	Ácido acético
AML	Lípidos antimicrobianos
APD	Agar papa-dextrosa
BLEES	Betalactamasas de espectro extendido
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CD ₃ CN	Acetonitrilo deuterado
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CPD	Caldo papa-dextrosa
COSY	Espectro bidimensional de correlación homonuclear
Ctrl	Control
DART	Espectrometría de masas por análisis directo en tiempo real
DC	Dicroísmo circular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
EPS	Polisacáridos extracelulares
EtOH	Etanol
g	Gramo
H ₂ O	Agua
h	Hora
HMBC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HSQC	Espectro bidimensional de correlación heteronuclear cuántica simple
Hz	Hertz

I+D	Investigación y desarrollo
ITS	Espaciador transcrito interno
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MH	Mueller Hinton
MHz	Mega Hertz
min	Minuto
mL	Mililitro
NaCl	Cloruro de sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio
ND	No determinado
nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PN	Productos naturales
ppm	Partes por millón
RAM	Resistencia antimicrobiana
RNM	Resonancia magnética nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno
TD-DFT	Teoría de Funcionales de la Densidad dependiente del tiempo
U.A	Unidades arbitrarias
UFC	Unidad formadora de colonias
λ	Longitud de onda
δ	Desplazamiento químico

1. Introducción

La resistencia antimicrobiana (RAM) y la formación de biopelícula bacteriana son dos fenómenos preocupantes en el campo de la microbiología, medicina y la salud. La RAM se define como la capacidad que tienen los microorganismos de impedir que los antibióticos actúen contra ellas y ha sido calificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una emergencia sanitaria mundial.¹ De acuerdo con la OMS, de no tomarse acciones en todo el mundo, para el 2050 el índice de mortalidad por cáncer podría ser superado por la RAM.²

Por otro lado, la biopelícula bacteriana es una comunidad microbiana compleja formada por bacterias que se adhieren a una superficie y están envueltas en una matriz extracelular de su propia producción. La formación de biopelícula bacteriana puede conducir a la cronicidad de las infecciones, ya que las bacterias que residen en ellas están altamente protegidas y son difíciles de eliminar. Estas biopelículas se asocian con infecciones recurrentes, complican la cicatrización de heridas, generan infecciones en implantes médicos y además de provocar otras enfermedades bacterianas persistentes.³

En resumen, la RAM conferida por la formación de biopelícula bacteriana es un desafío importante en el campo de la microbiología y la medicina. La lucha contra la RAM y el desarrollo de estrategias para prevenir y eliminar las biopelículas bacterianas son fundamentales para garantizar el éxito de los tratamientos médicos y proteger la salud pública.

En este trabajo se discuten los resultados obtenidos a partir de un proyecto de investigación enfocado en la búsqueda de inhibidores de formación de biopelícula para la bacteria *Klebsiella pneumoniae* multirresistente e intrahospitalaria, a partir de hongos microscópicos.

En resumen, se implementó un método para la cuantificación de formación de biopelícula bacteriana; y se cribaron 96 extractos de origen fúngico por su actividad inhibitoria de la formación de biopelícula, a fin de priorizar el estudio de aquel extracto fúngico con una actividad promisorio. Este enfoque seleccionó el extracto del hongo *Trichoderma* sp. IQ-048, para su estudio químico biodirigido, a fin de aislar y caracterizar el o los compuestos bioactivos. El compuesto **1** (ilicolina H) inhibió la formación de biopelícula de *K. pneumoniae* en un $64.9 \pm 2.0\%$ mostrando mejor actividad que el control positivo furanona C-30.

2. Antecedentes

2.1 Resistencia antimicrobiana

Un antimicrobiano es un medicamento que se utiliza para prevenir y tratar infecciones en seres humanos, animales y plantas, y estos pueden ser antibióticos, antivíricos, antifúngicos y antiparasitarios.¹

La resistencia antimicrobiana (RAM) se define como la capacidad que poseen los microorganismos para impedir que los medicamentos actúen sobre ellos. Como consecuencia de esto, algunos antimicrobianos resultan ineficaces para el tratamiento de infecciones ocasionadas por patógenos farmacoresistentes. Esta situación representa un grave problema de salud global calificado como "emergencia mundial" por la OMS, que estima que para el año 2050 la RAM podría causar hasta 10 millones de muertes por año.^{1,2}

Dos aspectos preocupantes de la RAM incluyen: el potencial inminente de las bacterias para desarrollar mecanismos de resistencia y la falta de avance en la creación de nuevos antibióticos con nuevos blancos moleculares, esto debido a que la efectividad de los actuales tratamientos se ha visto en riesgo.

En los últimos años, se ha observado un aumento en las tasas de resistencia a los antibióticos en infecciones comunes, septicemia, infecciones urinarias, infecciones de transmisión sexual y algunas formas de diarrea. Las bacterias resistentes aisladas con mayor frecuencia son: *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM), *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, entre otras, todas ellas contenidas en la lista "Patógenos prioritarios resistentes a antibióticos" (**Tabla 1**), publicada por la OMS en el año 2017, elaborada para guiar y promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos.⁴

Tabla 1. Lista OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos.⁴

Prioridad 2: Crítica	Prioridad 2: Elevada	Prioridad 3: Media
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Acinetobacter baumannii</i>, resistente a los carbapenémicos • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, resistente a los carbapenémicos • <i>Enterobacteriaceae</i>, resistentes a los carbapenémicos, productoras de betalactamasas de espectros extendido (BLEES). 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus faecium</i>, resistente a la vancomicina • <i>Staphylococcus aureus</i>, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina • <i>Helicobacter pylori</i>, resistente a la claritromicina • <i>Campylobacter</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas • <i>Salmonellae</i>, resistentes a las fluoroquinolonas • <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas. 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pneumoniae</i>, sin sensibilidad a la penicilina • <i>Haemophilus influenzae</i>, resistente a la ampicilina • <i>Shigella</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas

2.2 Mecanismos de resistencia

Existen varios factores que han contribuido al aumento de cepas bacterianas que son resistentes a múltiples antibióticos. Uno de los principales factores es el uso inadecuado de los antibióticos por parte del sector clínico, la prescripción excesiva, el incumplimiento de los tratamientos y el uso innecesario.⁵

Además, las bacterias tienen la capacidad de adquirir resistencia a través de mutaciones genéticas aleatorias o mediante la transferencia de genes de resistencia de otros organismos, o por adaptaciones metabólicas a fármacos.⁶

La resistencia bacteriana puede ser intrínseca y adaptativa (**Figura 1**):

- **Intrínseca:** Es una propiedad específica de las bacterias, y tiene la característica de ser inherente a una especie en particular. La adquisición de material genético por las bacterias susceptibles a partir de microorganismos resistentes ocurre a través de conjugación,

transformación o transducción con transposones que a menudo facilitan la incorporación de genes de resistencia múltiple al genoma o plásmido.^{6,7}

- Adaptativa: En contraste con la resistencia intrínseca que resulta de mutaciones de genes propios de la bacteria o adquiridos de manera externa, la adaptativa es sobre todo fenotípica, aunque algunos factores genéticos predisponen al microorganismo a activar este mecanismo.^{6,7} Un ejemplo de ello es la formación de biopelícula.

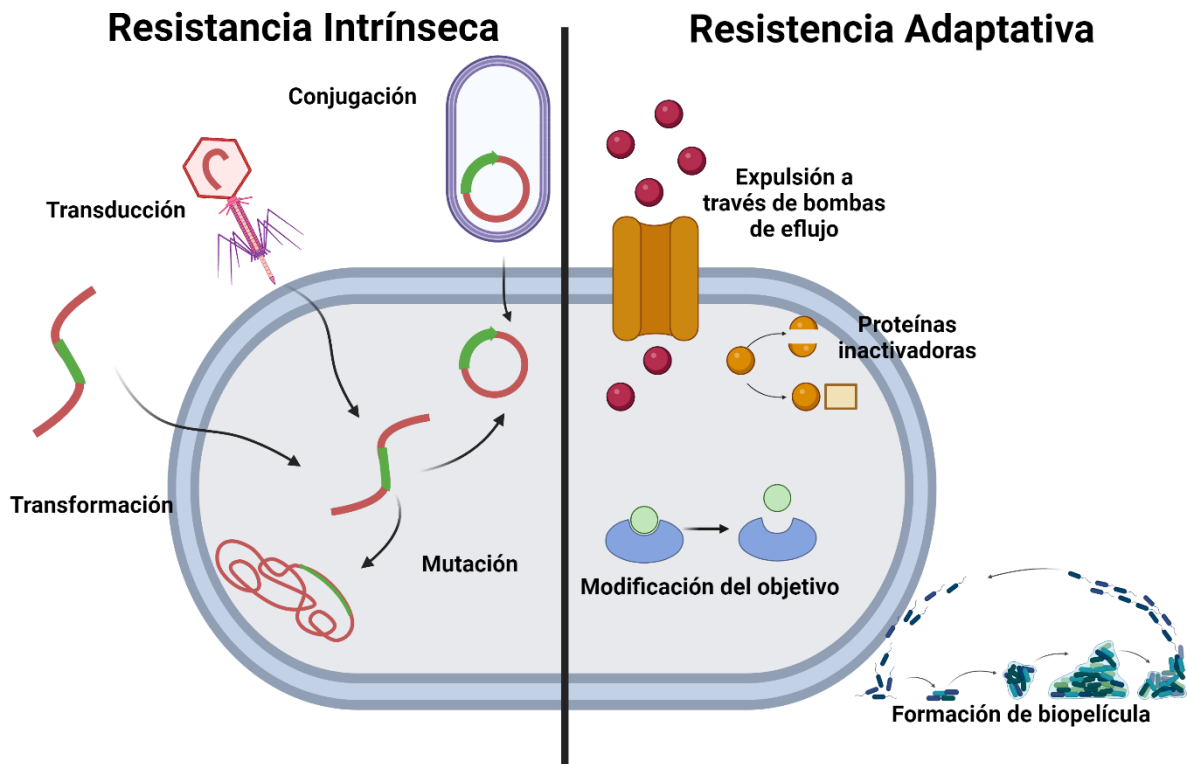


Figura 1. Mecanismos de resistencia intrínseca y adaptativa de las bacterias.⁸

Cuando la resistencia se debe a la formación de biopelícula, pueden presentarse tres diferentes escenarios que contribuyen a dicha resistencia:⁶

1. Las bacterias que se encuentran dentro de la matriz glicoprotéica son menos accesibles a la difusión de los antibióticos. La penetración del antibiótico es lenta o incompleta y no llega a entrar en contacto con la pared celular.⁶
2. No hay replicación bacteriana debido a que la biopelícula otorga una protección al microorganismo y el metabolismo bacteriano no es suficiente para el correcto funcionamiento del antibiótico.⁶

3. Los antibióticos sufren una alteración química debido al cambio de pH que hay en el microambiente creado dentro de la biopelícula.⁶

2.3 Biopelícula bacteriana

Las bacterias se encuentran en dos estados distintos: en forma de bacterias planctónicas, que flotan libremente, y formando biopelículas, que forman colonias de microorganismos inmóviles.

La biopelícula se define como una comunidad de microorganismos que crecen agregados y rodeados de un matriz extracelular que les confiere protección. Esta matriz, está conformada por proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA) extracelular y exopolisacáridos (EPS).^{9,10}

Las investigaciones sobre biopelículas son de gran relevancia, principalmente en el área médica, debido a que estas dan origen a infecciones crónicas y persistentes, su formación contribuye a la evasión de la respuesta inmune (humoral o celular) y a RAM. Bacterias como *K. pneumoniae* formadoras de biopelícula tienen la capacidad de causar infecciones nosocomiales graves como septicemia, neumonía, infecciones de tracto urinario e infecciones de tejidos blandos. Estas infecciones son adquiridas por contaminación de dispositivos médicos implantados, catéteres urinarios, marcapasos, catéteres vasculares, ventiladores para pacientes con neumonía y trasplantes de articulaciones que favorecen la adhesión y colonización de bacterias, resultando en infecciones.^{9,11}

La formación de biopelícula involucra cinco etapas: Adhesión, colonización, proliferación, maduración y dispersión, (**Figura 2**)¹²

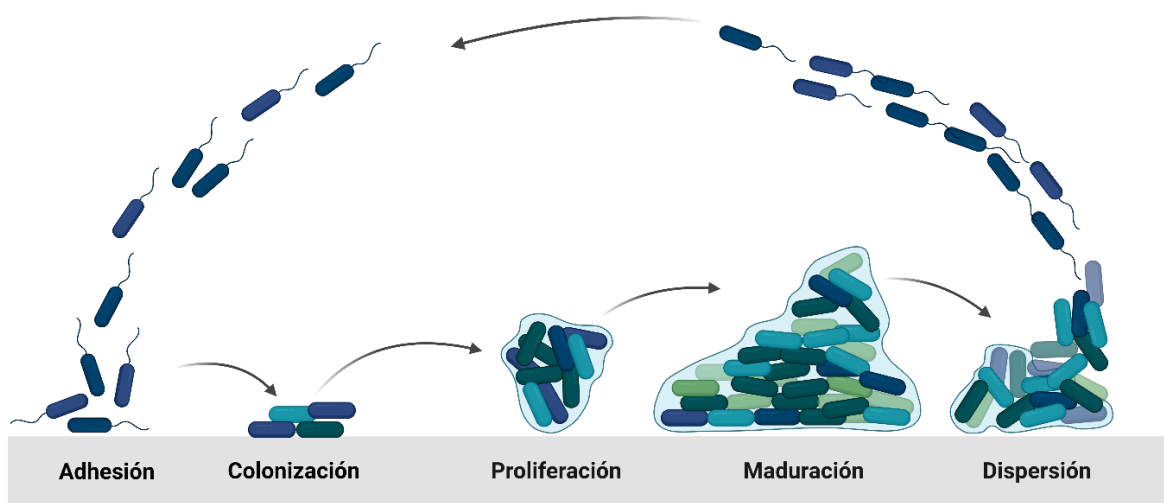


Figura 2. Etapas de desarrollo involucradas en la formación de biopelícula bacteriana.¹²

- Adhesión: Las células planctónicas se adhieren de manera reversible a las superficies mediante interacciones débiles.¹²
- Colonización: Las células se adhieren de manera irreversible a las superficies mediante interacciones más fuertes.¹²
- Proliferación: Las células bacterianas se acumulan en capas y se producen exopolisacáridos en grandes cantidades.¹²
- Maduración: Las células bacterianas desarrollan una biopelícula madura con una estructura tridimensional.¹²
- Dispersión: Una vez desarrollada la biopelícula, esta se dispersa mediante procesos mecánicos y activos.¹²

2.4 Inhibidores de biopelícula

Como se discutió anteriormente, la capacidad que presentan algunas bacterias para desarrollar biopelícula ha generado un interés en la comunidad científica debido, principalmente, a las complicaciones médicas que representa.

Por ello, la búsqueda de agentes que eviten la formación de biopelículas bacterianas es una actividad de alta importancia y relevancia. En este sentido, los productos naturales (PN) representan un excelente punto de partida, esperando que éstos interrumpen los procesos de adhesión y comunicación entre las bacterias, evitando la formación y el funcionamiento de la biopelícula. Esta estrategia brinda algunas ventajas, entre las que destaca que las bacterias no desarrollen resistencia fácilmente ante estas moléculas; debido que no están dirigidas a los mecanismos de supervivencia básicos de los microorganismos.¹³

Hasta la fecha, se han identificado muchos compuestos anti-biopelícula a partir de diversas fuentes naturales, como furanonas bromadas, ácidos corosólico y asiático y 3-indolilacetinitrilo.¹³

Se ha señalado que algunos lípidos antimicrobianos (AML), lípidos de cadena única que incluyan ácidos grasos y monoglicéridos, presentan actividad inhibitoria de formación de biopelícula. Por ejemplo, el monolaurato de glicerol inhibe la formación de biopelícula de cepas de *Listeria monocytogenes*, *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Otros AML identificados como inhibidores de biopelículas son el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) (**Figura 3**).¹²

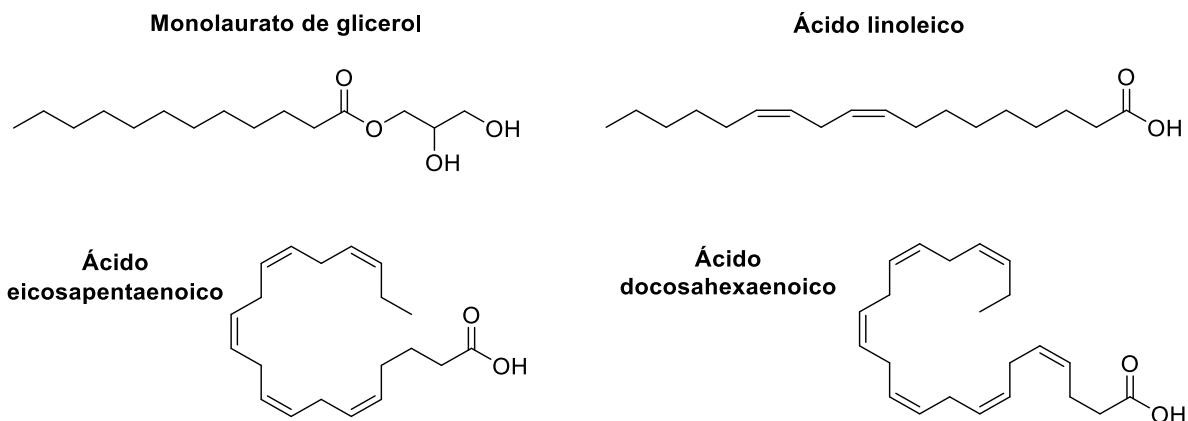


Figura 3. Estructuras químicas de AML que inhiben la formación de biopelículas.¹⁴

Otros ejemplos de moléculas con capacidad de inhibir la formación de biopelículas son el ácido ursólico, la quercetina y la furanona C-30 (**Figura 4**).

Estudios previos han demostrado que el ácido ursólico interrumpe la integridad de la membrana celular de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, mostrando fuerte inhibición de la formación de biopelículas y la expresión de genes relacionados con biopelículas, además de inactivar las células encapsuladas en las biopelículas, demostrando que podría ser una opción prometedora para combatir la formación de biopelículas de otras bacterias y potencialmente ayudar a superar su resistencia a los antibióticos.¹⁵

Por otro lado, la quercetina, una molécula de origen vegetal, también se considera un posible agente inhibidor contra la formación de biopelículas, previniendo la formación de biopelículas de *Salmonella enterica* en superficies de contacto con alimentos y piel de pollo en plantas de procesamiento y la industria alimentaria. Este tipo de contaminaciones puede causar enfermedades infecciosas en los humanos.¹⁶

La furanona C-30 mostró capacidad para inhibir la formación de biopelículas y la resistencia a los antibióticos en *P. aeruginosa*. Este compuesto puede interferir con los mecanismos de comunicación bacteriana y reducir la formación de biopelículas, contribuyendo a controlar las infecciones causadas por *P. aeruginosa*.¹⁷

La capacidad de estas moléculas para controlar la formación de biopelículas en bacterias patógenas resistentes las convierte en candidatos prometedores para el desarrollo de estrategias de tratamiento y prevención de infecciones.

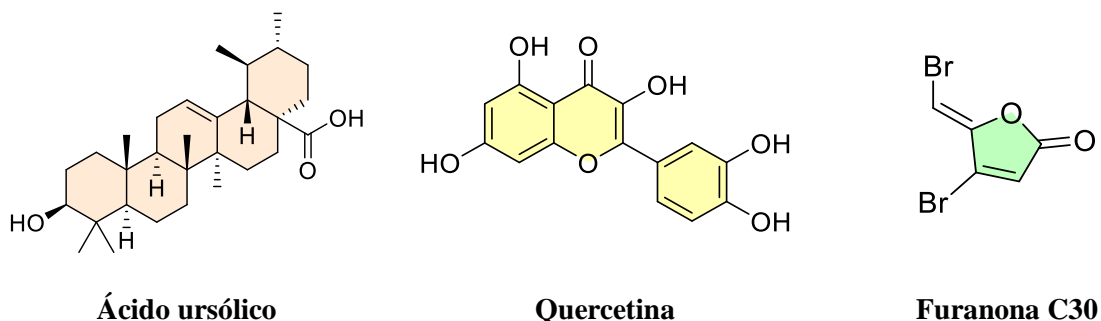


Figura 4. Moléculas evaluadas como control positivo de ensayo de inhibición de biopelícula.

2.5 Productos naturales de origen fúngico

Los PN o metabolitos especializados representan la mayor fuente de diversidad química y ha contribuido al descubrimiento de un sinnúmero de fármacos. Se denomina PN, a los metabolitos secundarios biológicamente activos derivados de fuentes naturales, ya sean plantas, animales o microorganismos.¹⁸

En un estudio realizado en 2015, se determinó que, de cerca de un millón de PN, aproximadamente el 25% presentan actividad biológica. De éstos el 60% provienen de plantas y el 40% restante proviene de microorganismos, y de este último porcentaje, el 42% son productos obtenidos de hongos.¹⁹

Los hongos microscópicos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Estos juegan un papel ecológico importante, en la investigación, en la elaboración de múltiples productos y en la síntesis de moléculas con propiedades químicas y biológicas.^{20,21}

Desde el descubrimiento de la penicilina, el primer antibiótico hallado en el microorganismo *Penicillium rubens*, se revolucionó el tratamiento de infecciones bacterianas, trayendo consigo una ola de investigaciones sobre los PN provenientes de hongos, ya que estos producen metabolitos pertenecientes a clases estructurales altamente diversas, que incluyen compuestos aromáticos, antraquinonas, macrólidos, naftalenonas, pironas, terpenos, etc. Algunos ejemplos de estos productos son la penicilina (antibiótico), la lovastatina (agente hipocolesterolemizante), la ciclosporina A (inmunosupresor) y griseofulvina (antifúngico), entre otros. En este contexto, el estudio químico de hongos representa una ventana de oportunidades para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos.^{19,22,23}

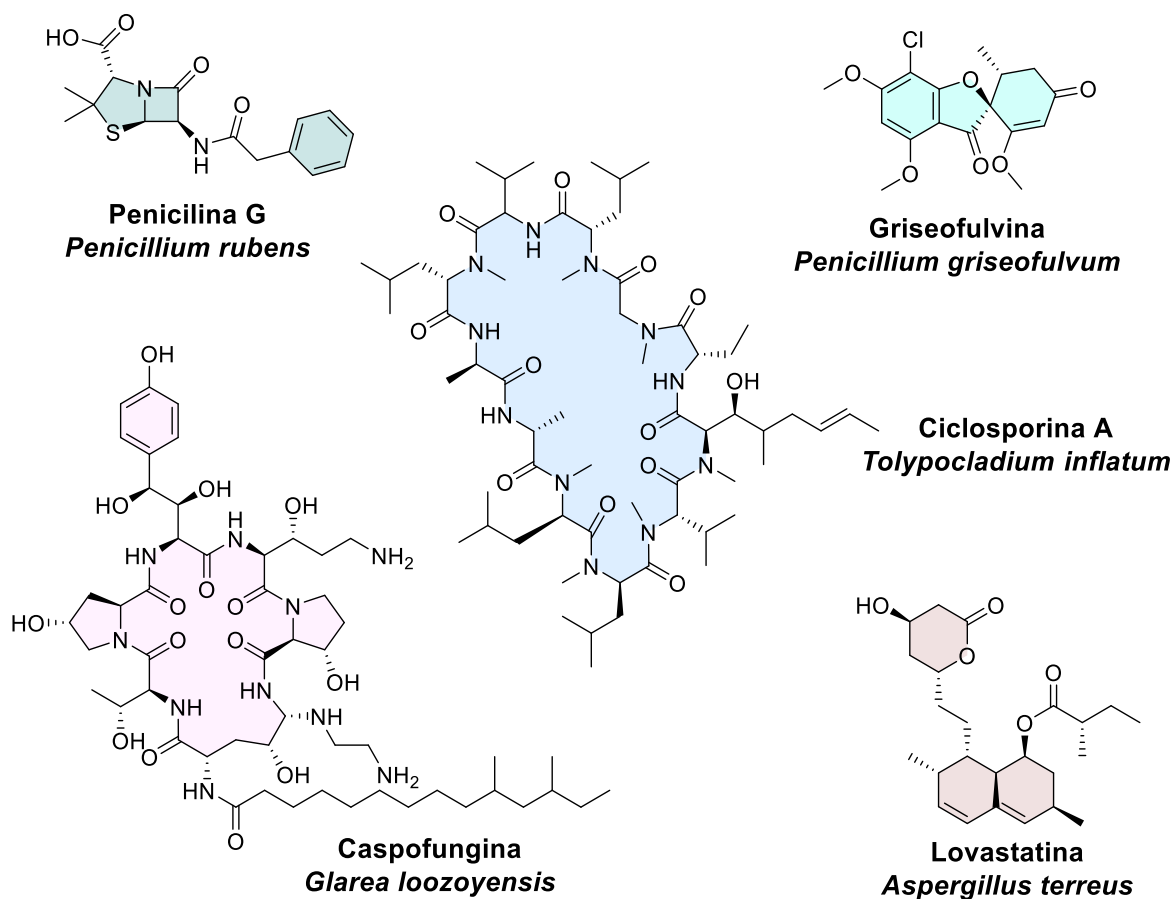


Figura 5. Ejemplos de PN obtenidos a partir de microorganismos fúngicos.

2.6 Género *Trichoderma*

El género *Trichoderma* fue descrito en 1794 por Persoon, y sus especies son saprofitas del suelo y la madera, de crecimiento rápido, y distribuidas y presentes en diferentes ambientes, principalmente aquellos que contienen materia orgánica o desechos de vegetación en descomposición. Poseen una capacidad de producir diversos metabolitos y de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos, lo que les confiere la posibilidad de ser utilizadas en la industria biotecnológica.²⁴

El género *Trichoderma* en su estado vegetativo presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupo, conidios de 3 a 5 μm de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares. Tiene la capacidad de producir clamidosporas. La luz y su espectro influyen en su desarrollo, fundamentalmente sobre la esporulación, y esto también influye en la producción de metabolitos secundarios.²⁵

Presentan una capacidad antagonista (ésta depende de la especificidad de la cepa) por ello se debe realizar una selección precisa para lo que se deseen tratar, ya sea para el control de plagas, antibiosis, competencia, micoparasitismo, etc. Éstos actúan indirectamente sobre los patógenos, ya que su acción es impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta. El estudio de los modos de acción en condiciones de campo es complejo, ya que *Trichoderma* es un hongo cuyo hábitat es el suelo y la mayoría de los procesos se efectúan en la rizosfera donde son capaces de competir con nutrimentos y espacio con otros microorganismos.²⁴

De especies de este género se han aislado moléculas con diferente actividad biológica. Algunos ejemplos son la tricondermamaida, la harzianumina (antibacteriano), el tricondermol (antifúngico), triconderona (anticancerígeno) y el tricocétido (inhibidor de PTP1B), entre otros (**Figura 6**). Además, producen compuestos volátiles como la 6-pentil- α -pirona y el 1-octen-3-ol, los cuales se han estudiados por su potencial uso en el control de patógenos de plantas. Algunas especies de *Trichoderma* producen terpenoides con propiedades antioxidantes, antitumorales, antiinflamatorias y citotóxicas, como los tricotecenos, carotenos, cadinanos y diterpenos harzianos, además de ciclopéptidos, dicetopiperazinas, alcaloides y policétidos.^{26,27}

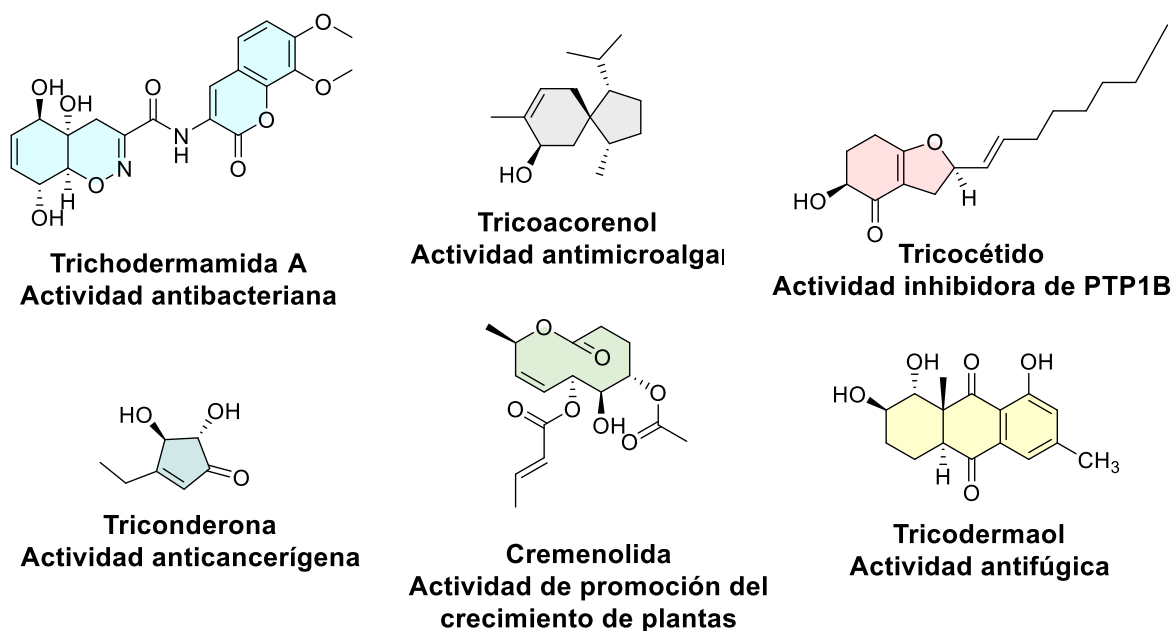


Figura 6. Moléculas obtenidas a partir del hongo *Trichoderma* sp.

2.7 Bioprospección

La bioprospección se define como la búsqueda sistemática de componentes naturales y organismos completos de la biodiversidad con el fin de otorgarles un valor para el desarrollo de productos.²⁸

La bioprospección de PN ya sea de bacterias, hongos, plantas, etc., otorga una gran riqueza, ya que de éstos se pueden obtener metabolitos con alto valor agregado. Así, muchos de los medicamentos que hoy en día se conocen, fueron productos de programas de bioprospección basados en testimonios de remedios populares.²⁹

3. Justificación

En la actualidad, el aumento de bacterias patógenas resistentes a múltiples fármacos representa una seria amenaza para la salud pública. Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias multirresistentes se han convertido en un problema de gran importancia debido a su capacidad para generar enfermedades crónicas que responden de manera deficiente a los tratamientos con antibióticos. Estos casos pueden ser resultado directo de la formación de biopelículas por parte de los microorganismos, lo cual implica una alta resistencia a los antibióticos y una mayor dificultad para eliminar por completo las infecciones.

En los últimos años, el desarrollo de nuevos antibióticos ha disminuido significativamente, lo que ha llevado a la comunidad científica a enfocar su interés en encontrar y desarrollar nuevas sustancias con potencial terapéutico. Con el objetivo de aprovechar la diversidad microbiológica del país, hemos dirigido nuestra investigación hacia un nicho poco explorado: los hongos microscópicos, en particular hongos recolectados en los humedales de Tamiahua-El Ídolo, Veracruz, México. Este enfoque nos ha permitido investigar nuevos metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, lo cual puede contribuir al desarrollo de fármacos innovadores para combatir bacterias farmacorresistentes. Es crucial abordar este problema, ya que las bacterias están evolucionando a un ritmo más rápido que el desarrollo de nuevos antibióticos, lo que ha dado lugar a infecciones cada vez más difíciles de tratar.

Por lo tanto, el presente estudio de bioprospección representa una valiosa oportunidad para identificar PN de origen fúngico con efectos antibacterianos y/o antibiopelícula. Nuestro objetivo es enfocarnos en la búsqueda de metabolitos secundarios de origen fúngico que inhiban la formación de biopelículas en patógenos como *K. pneumoniae*, que ha sido identificado por la OMS como un objetivo prioritario en la lucha contra las infecciones resistentes a los antibióticos.

Con esta investigación, aspiramos a contribuir al conocimiento científico y al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que enfrenten el desafío global de las infecciones bacterianas resistentes a los medicamentos, al aprovechar la biodiversidad fúngica de nuestro entorno.

4. Hipótesis

El cribado de actividad anti-biopelícula (inhibición de formación de biopelícula) de un conjunto de extractos orgánicos obtenidos de ascomicetos selectos, permitirá identificar los candidatos más adecuados para la obtención de moléculas capaces de inhibir la formación de biopelícula de *K. pneumoniae*.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Descubrir nuevos agentes inhibidores de la formación de biopelícula bacteriana de las cepas *K. pneumoniae*, a partir de especies fúngicas selectas, útiles como modelos estructurales para el desarrollo de fármacos coadyuvantes en el tratamiento de infecciones.

5.2 Objetivos particulares

1. Establecer un ensayo para la evaluación *in vitro* de la actividad antibiopelícula de extractos fúngicos orgánicos asociados a manglares de la zona norte de Veracruz (Tamiagua, Isla El ídolo).
2. Evaluar la actividad inhibitoria de formación de biopelícula de 96 extractos orgánicos de origen fúngico.
3. Seleccionar los microorganismos más apropiados para la obtención de moléculas con actividad anti-biopelícula y cultivarlos en mayor escala.
4. Evaluar y fraccionar el extracto orgánico de los microorganismos seleccionados.
5. Rastrear las fracciones más promisorias por medio del ensayo de inhibición.
6. Aislar el o los metabolitos bioactivos por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y caracterizarlos por métodos espectroscópicos y espectrométricos.
7. Establecer la actividad inhibitoria de la formación de biopelícula del o los compuestos aislados.

6. Desarrollo experimental

6.1 Reactivos

Todos los reactivos se adquirieron de alguno de los siguientes distribuidores: Wöhler, MCD Lab, Conda S.A, Sigma-Aldrich, Bio Basic, Cambridge Isotope Laboratories, Inc.

6.2 Obtención de los microorganismos fúngicos y los extractos orgánicos

En este estudio se empleó una colección de extractos orgánicos de origen fúngico previamente generados en el grupo de investigación. Los microorganismos se obtuvieron en cultivo axénico de muestras varias colectadas en los humedales de la Isla El ídolo, en el municipio de Tamiahua, Veracruz, México (IQ-033 a IQ-080), de acuerdo con la metodología descrita por Aguilar-Ramírez y Martínez-Aviña, 2019.³⁰

Los extractos contenidos en la colección se prepararon a una concentración de 10 mg/mL en DMSO y se organizaron en placas de 96 pozos de acuerdo con la **Figura 7**.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		IQ-001	IQ-002	IQ-003	IQ-004	IQ-005	IQ-006	IQ-007	IQ-008	IQ-009	IQ-010	
B		IQ-001	IQ-002	IQ-003	IQ-004	IQ-005	IQ-006	IQ-007	IQ-008	IQ-009	IQ-010	
C		IQ-011	IQ-012	IQ-013	IQ-014	IQ-015	IQ-016	IQ-017	IQ-018	IQ-019	IQ-020	
D		IQ-011	IQ-012	IQ-013	IQ-014	IQ-015	IQ-016	IQ-017	IQ-018	IQ-019	IQ-020	
E		IQ-021	IQ-022	IQ-023	IQ-024	IQ-025	IQ-026	IQ-027	IQ-028	IQ-029	IQ-030	
F		IQ-021	IQ-022	IQ-023	IQ-024	IQ-025	IQ-026	IQ-027	IQ-028	IQ-029	IQ-030	
G		IQ-031	IQ-032	IQ-033	IQ-034	IQ-035	IQ-036	IQ-037	IQ-038	IQ-039	IQ-040	
H		IQ-031	IQ-032	IQ-033	IQ-034	IQ-035	IQ-036	IQ-037	IQ-038	IQ-039	IQ-040	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		IQ-041	IQ-042	IQ-043	IQ-044	IQ-045	IQ-046	IQ-047	IQ-048	IQ-049	IQ-050	
B		IQ-041	IQ-042	IQ-043	IQ-044	IQ-045	IQ-046	IQ-047	IQ-048	IQ-049	IQ-050	
C		IQ-051	IQ-052	IQ-053	IQ-054	IQ-055	IQ-056	IQ-057	IQ-058	IQ-059	IQ-060	
D		IQ-051	IQ-052	IQ-053	IQ-054	IQ-055	IQ-056	IQ-057	IQ-058	IQ-059	IQ-060	
E		IQ-061	IQ-062	IQ-063	IQ-064	IQ-065	IQ-066	IQ-067	IQ-068	IQ-069	IQ-070	
F		IQ-061	IQ-062	IQ-063	IQ-064	IQ-065	IQ-066	IQ-067	IQ-068	IQ-069	IQ-070	
G		IQ-071	IQ-072	IQ-073	IQ-074	IQ-075	IQ-076	IQ-077	IQ-078	IQ-079	IQ-080	
H		IQ-071	IQ-072	IQ-073	IQ-074	IQ-075	IQ-076	IQ-077	IQ-078	IQ-079	IQ-080	

ARROZ
CHEERIOS
NO EVALUADOS
VACIOS

Figura 7. Distribución de extractos orgánicos IQ-001-IQ-080 en placa de 96 pozos.

6.3 Actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano

La actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano de la colección de extractos orgánicos y la inhibición de formación de biopelícula se determinó utilizando el método de microdilución en placa, contra los microorganismos: Gram negativo *K. pneumoniae* K2 y Gram positivo *S. aureus*, cepas proporcionadas amablemente por el Dr. Rodolfo García Contreras, investigador del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM. Se utilizó DMSO como control negativo, caldo Mueller Hinton (MH) como control de esterilidad, gentamicina como control positivo para el ensayo de actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano y furanona C-30 como control positivo para el ensayo de inhibición de formación de biopelícula.

6.3.1 Preparación y estandarización del inóculo para los ensayos

A partir de un cultivo axénico de la cepa bacteriana a evaluar, se seleccionaron de dos a tres colonias bien diferenciadas y morfológicamente similares, estas se inocularon en 15 mL de caldo MH estéril e incubaron durante 24 h a 37 °C en agitación constante.

6.3.2 Método de microdilución en placa

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos, adicionando 2.0 µL de extracto a una concentración de 10 mg/mL preparados en DMSO, posteriormente se adicionaron 88 µL de caldo MH y 10 µL de suspensión bacteriana ajustada aproximadamente a 1×10^8 UFC/mL, equivalente a 0.5 en la escala de McFarland (0.08-0.13 DO). Esta suspensión se diluyó 1:20 (0.5 mL de la suspensión ajustada en 9.5 mL del caldo MH) a fin de obtener la suspensión de trabajo. El ensayo se realizó siguiendo las directrices del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) en su protocolo M07-A10 “Métodos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana por dilución para bacterias que crecen aeróbicamente”.³¹ Enseguida se realizó una lectura de la placa a DO₆₀₀ a tiempo cero en un lector de microplacas (BioTek, Elx808) y posteriormente la placa se incubó durante 16 h a 37 °C. Tras la incubación se realizó una segunda lectura de DO₆₀₀. Los resultados se expresan como % de inhibición, calculado con el cambio en la medida entre ambas lecturas, utilizando la ecuación (1).

$$(1) \quad \% \text{ Inhibición de crecimiento bacteriano} = \left(1 - \frac{\Delta DO \text{ muestra}}{\Delta DO \text{ del control}} \right) 100$$

Donde:

$$\Delta DO \text{ muestra} = DO_{t=16h} - DO_{t=0h}$$

$$\Delta DO \text{ del control} = DO \text{ de la suspensión bacteriana}_{t=16h} - DO \text{ de la suspensión bacteriana}_{t=0h}$$

6.4 Inhibición en la formación de biopelícula

Se estableció una metodología para determinar la inhibición de la formación de biopelícula bacteriana por los extractos orgánicos y moléculas puras.^{14,32} Los detalles de este protocolo se enlistan en la sección de resultados.

El cristal violeta al 0.75% se preparó disolviendo 750 mg de cristal violeta, en una solución H₂O:EtOH 1:1 suplementada con 250 mg de NaCl y 4.8 mL de formaldehído 37%.

Para el desarrollo de este ensayo se trabajó con la bacteria *S. aureus*, posteriormente este ensayo se enfocó en la búsqueda de un inhibidor de biopelícula para la bacteria *K. pneumoniae* K2, microorganismo que presenta altas tasas de crecimiento y resistencia antibacteriana ocasionada por biopelícula en México.

Con base en los resultados obtenidos de los ensayos descritos en las secciones 6.3 y 6.4, se seleccionó el microorganismo fúngico *Trichoderma* sp. IQ-048, ya que presento actividad inhibitoria de formación de biopelícula frente a *K. pneumoniae* K2.

6.5 Determinación de control positivo

Para la determinación del control positivo para el ensayo de inhibición de formación de biopelícula se emplearon los compuestos ácido ursólico, quercetina y furanona C-30, usando las técnicas descritas en los apartados 6.3 y 6.4, utilizando los microorganismos de prueba *K. pneumoniae* K2 y *S. aureus*. (Figura 4).

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pozos, colocando en cada pozo 2 µL de concentraciones crecientes (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 y 1000 ppm) de cada compuesto por separado y siguiendo el protocolo descrito en la sección 6.3.2. Método de microdilución en placa. Una vez determinado el potencial antibacteriano de las sustancias, se siguió el procedimiento descrito en la sección 6.4 Inhibición de la formación de biopelícula.

Las curvas de inhibición de formación de biopelícula y el valor de Concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada una de las cepas bacterianas y compuestos, se obtuvieron mediante un ajuste no lineal empleando la ecuación (4) modificada de Gompertz con el programa GraphPad Prism 6.0.

$$(4) \quad N(t) = Ae^{-Be^{-Kt}}$$

Donde:

N(t) = tamaño de la población al tiempo t

A= Valor del máximo crecimiento y además determina un punto de inflexión en A/e

B= Número positivo que desplaza el modelo a la izquierda o derecha

K= Establece la tasa intrínseca de crecimiento

6.6 Estudio químico del hongo *Trichoderma* sp. IQ-048

6.6.1 Cultivo en mediana escala

El microorganismo seleccionado se inoculó en cajas de agar papa dextrosa (APD) por un periodo de cuatro días. Posteriormente se transfirió una pieza de micelio a caldo de papa dextrosa (CPD, 10 mL × 20), seguido de incubación durante 10 días a temperatura ambiente con agitación constante. El cultivo semilla se transfirió a 20 matraces Erlenmeyer de 250 mL con cereal estéril (Cheerios® con miel; 10g) y se conservó en incubación durante 28 días (**Figura 8**).



Figura 8. *Trichoderma* sp. IQ-048. a) En APD; b) en cereal Cheerios ®.

6.6.2 Obtención del extracto orgánico

Cada matraz se extrajo con 60 mL de una mezcla CH_2Cl_2 -MeOH 1:1 y se dejó en agitación durante 24 h. Posteriormente, la solución se filtró al vacío y se añadieron 90 mL de CH_2Cl_2 y 75 mL de H_2O , la mezcla se agitó durante 10 minutos y se dejó reposar en un embudo de separación. La fracción orgánica se colectó y se evaporó hasta sequedad. El extracto se desgrasó adicionando una mezcla de 500 mL de MeOH- CH_3CN 1:1 y 500 mL de hexano en un embudo de separación. La fracción polar se recuperó y se evaporó hasta sequedad a presión reducida.

6.6.3 Fraccionamiento del extracto de *Trichoderma* sp. IQ-048 por cromatografía en fase reversa

El extracto orgánico obtenido, se sometió a un fraccionamiento primario mediante cromatografía tipo flash de fase reversa, empleando una columna C18. Se empleó un flujo de 10 mL/min y se colectaron fracciones de 25 mL. Las condiciones empleadas se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Condiciones de la cromatografía tipo flash utilizadas en el fraccionamiento del extracto de *Trichoderma* sp. IQ-048, en fase reversa.

Muestra en DMSO inyectada	675 mg
Columna	C18 SNAP Ultra Biotage, 25 g, 50 mL
Flujo de la fase móvil	10 mL/min
Solvente A	CH ₃ CN
Solvente B	H ₂ O al 0.1% con ácido fórmico
Solvente C	Acetona
Solvente D	MeOH
Volumen de fracción	25 mL
Tiempo	67 min

El fraccionamiento del extracto condujo a la obtención de 18 fracciones primarias (F₁-F₁₈). El rendimiento de cada fracción se presenta en la Tabla 4.

Tabla 3. Rendimiento obtenido del fraccionamiento primario del extracto de *Trichoderma* sp. IQ-048.

Fracciones	Código	Rendimiento (mg)
2-3	F ₁	0.1
4	F ₂	0.7
5	F ₃	ND
6	F ₄	0.4
7-8	F ₅	2.8
9	F ₆	2.7
10-11	F ₇	4.2
12	F ₈	7.4
13	F ₉	8.1
14	F ₁₀	20.4
15	F ₁₁	24.0
16	F₁₂	23.4
17-18	F ₁₃	56.9
19-20	F ₁₄	42.6
21	F ₁₅	33.7
22	F ₁₆	32.5
23-25	F ₁₇	49.6
26	F ₁₈	122.2

6.6.4 Aislamiento y purificación del compuesto obtenido a partir del extracto primario del hongo *Trichoderma* sp. IQ-048.

De acuerdo con los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad inhibitoria de formación de biopelícula de las fracciones obtenidas de los fraccionamientos primarios, se seleccionó la fracción que presentó mejor actividad de inhibición de formación de biopelícula para continuar con el proceso de aislamiento y purificación.

El análisis cromatográfico de las fracciones se resolvió mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) en un cromatógrafo Waters® equipado con un detector UV de arreglo de fotodiodos (PDA-2998) acoplado a un detector de dispersión de luz tras evaporación (ELSD-2424), un automuestreador (2707) y un módulo colector de fracciones (WFCIII). El control del equipo, la adquisición y manejo de datos, se realizó con el programa *EMPOWER* versión 3.0 Waters. El análisis a nivel analítico se realizó empleando una columna Gemini NX-C₁₈ (5µm, 4.6 × 250mm). El aislamiento del compuesto se realizó utilizando una columna Gemini-NX C₁₈ (5µm, 10.0 × 250mm). Como fase móvil se usaron distintos gradientes de elución de agua acidificada (al 0.1% con ácido fórmico) con CH₃CN.

La resolución de la fracción F₁₂ (15 mg) se realizó por CLAE en modalidad semipreparativa (**Figura 9**), utilizando una columna Gemini-NX C₁₈ como fase estacionaria y un método isocrático de CH₃CN-H₂O con ácido fórmico (80:20, 10 min). Este fraccionamiento condujo al aislamiento y purificación de **1** (0.5 mg; t_R 4.8 min).

6.6.5 Caracterización química del producto obtenido

La caracterización química del compuesto se realizó mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-¹H), carbono 13 (RMN-¹³C), y bidimensionales se registraron en un equipo de *Bruker Ascend III* 700 MHz, utilizando CD₃OD como disolvente.

Los espectros de masas se obtuvieron por la técnica de análisis directo en tiempo real (DART) con un espectrómetro de masas JEOL, AccuTOF JMS-T100LC. La muestra en disolución se inyectó de forma directa. La muestra se disolvió a una concentración de 1 mg/mL en MeOH y se analizó en modo positivo.

7. Resultados y Discusión

El presente trabajo de investigación forma parte de un proyecto de mayor alcance enfocado en la búsqueda de moléculas de origen natural con actividad biológica que ayuden a contrarrestar el problema de la RAM por mecanismos de acción distintos a los convencionales, específicamente la formación de biopelícula.

Para su mejor comprensión, los resultados se presentan en dos apartados. El primero de ellos comprende el establecimiento de un método *in vitro* para el cribado de extractos orgánicos de origen fúngico como inhibidores de la formación de biopelícula en *K. pneumoniae* multirresistente. En el segundo apartado se aborda el estudio químico biodirigido de *Trichoderma* sp. IQ-048, conducente a la obtención de moléculas con actividad antibiopelícula.

7.1 Ensayo de formación de biopelícula

Las biopelículas son comunidades bacterianas adheridas a superficies y pueden ser encontradas en dispositivos médicos e industriales. Esta organización estructural les confiere a los microorganismos algunas ventajas de protección tanto mecánica como a algunos agentes químicos como los antibióticos.⁹ En este sentido, la búsqueda de inhibidores de la formación de biopelícula es una actividad esencial en aras de combatir la RAM.

En este contexto, el cribado de mezclas complejas de sustancias (extractos orgánicos de origen natural) representa un excelente punto de partida para la búsqueda de moléculas anti-biopelícula. Para ello, los ensayos en estático son una herramienta esencial para estudiar las etapas tempranas de la formación de biopelícula y han permitido identificar algunos factores clave para su formación.³²

En el laboratorio, estos ensayos se realizan en placas de 96 pozos con cepas capaces de formar biopelícula ya sea en las paredes o en el fondo del pozo. Estos ensayos son altamente versátiles para el cribado de alto rendimiento de grandes conjuntos de muestras.³²

El protocolo que se describe a continuación emplea cristal violeta para medir etapas tempranas de la formación de biopelícula de manera cualitativa o cuantitativa, y se estableció utilizando el microorganismo de prueba *S. aureus* y posteriormente, se trasladó para la búsqueda de inhibidores de la formación de biopelícula de una cepa multirresistente de *K. pneumoniae* (K2). Esta metodología consta de cuatro etapas i) Crecimiento de la biopelícula, ii) tinción de la biopelícula, iii) cuantificación de la formación de biopelícula y iv) representación de resultados.

Los materiales, equipos y reactivos empleados para la ejecución del protocolo se enlistan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Materiales, equipos y reactivos empleados para la ejecución del protocolo de formación de biopelícula.

Materiales y equipos	Reactivos
Cajas de Petri	Caldo Mueller-Hinton
Tubos cónicos de centrifuga de 50 mL	Solución de cristal violeta al 0.75% en
Espátula	Etanol al 70%
Incubadora	Solución de ácido acético al 30% en agua
Autoclave	Solución de NaClO al 0.5%
Micropipetas de 10, 100 y 1000 µL	DMSO
Placas de 96 pozos estériles	
Contenedores de plástico de 1 L	
Lector de placas	

En la **Figura 9**, se resume el protocolo establecido por etapa:

i. Crecimiento de la biopelícula (Figura A)

- 1) Preparar un cultivo fresco de la bacteria de prueba a partir de un tubo de resguardo criocongelado. Para ello, un cristal del tubo de resguardo se transfiere en 15 mL de caldo Müeller-Hinton y se incuba por 16 h a 37 °C.
- 2) En una placa de 96 pozos, se adicionan 2.0 µL de extracto preparado en DMSO, posteriormente, se adicionan 88 µL de caldo MH y 10 µL de suspensión bacteriana ajustada aproximadamente a 1×10^8 UFC/mL, equivalente a 0.5 en la escala de McFarland (0.08-0.13 DO).
- 3) Enseguida se realiza una lectura de la placa a 600 nm al tiempo cero en un lector de microplacas y posteriormente la placa se incuba durante 16 horas a 37 °C. Tras la incubación se realiza una segunda lectura de DO_{600} . Los resultados se expresan como % de inhibición, calculado con el cambio en la medida entre ambas lecturas, utilizando la ecuación (1).

$$\% \text{ Inhibición de crecimiento bacteriano} = \left(1 - \frac{\Delta DO \text{ muestra}}{\Delta DO \text{ del control}} \right) 100$$

ii. Tinción de la biopelícula (Figura B)

- 1) Después de la incubación, la placa se invierte sobre un recipiente que contiene agua: hipoclorito de sodio 5% (1:1), se realizan tres lavados con agua corriente. Se deja secar la placa durante una noche.
- 2) Subsecuentemente, se adicionan 100 µL de cristal violeta 0.75 % en cada pozo durante 15 minutos a temperatura ambiente.

- 3) El exceso de cristal violeta se elimina sobre un recipiente con agua: etanol (1:1) y se enjuaga tres veces con agua.
 - 4) La placa se deja secar a temperatura ambiente durante una noche.
- iii. **Cuantificación de la formación de biopelícula (Figura C)**
- 1) A la placa seca se le adicionan 100 μ L de una solución de ácido acético al 30 % en cada pozo y se incuba por 15 min.
 - 2) Finalmente, se cuantifica la absorbancia en cada pozo a 570 nm en un lector de placas.
- iv. **Representación de resultados (D)**

- 1) Se determina el porcentaje de formación de biopelícula, utilizando la ecuación:

$$\% \text{Formación de biopelícula} = \frac{\text{Absorbancia de la biopelícula formada en presencia del extracto}}{\text{Absorbancia de la biopelícula formada por el control negativo (DMSO)}} \times 100$$
- 2) A partir del resultado anterior se determina el porcentaje de inhibición de formación de biopelícula utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{Inhibición de formación de biopelícula} = 100 \% - \% \text{Formación de biopelícula}$$
- 3) Los resultados de % de inhibición de formación de biopelícula se grafican en función de la concentración del inhibidor y los datos se ajustan con un modelo de regresión no lineal para calcular la CI_{50} .

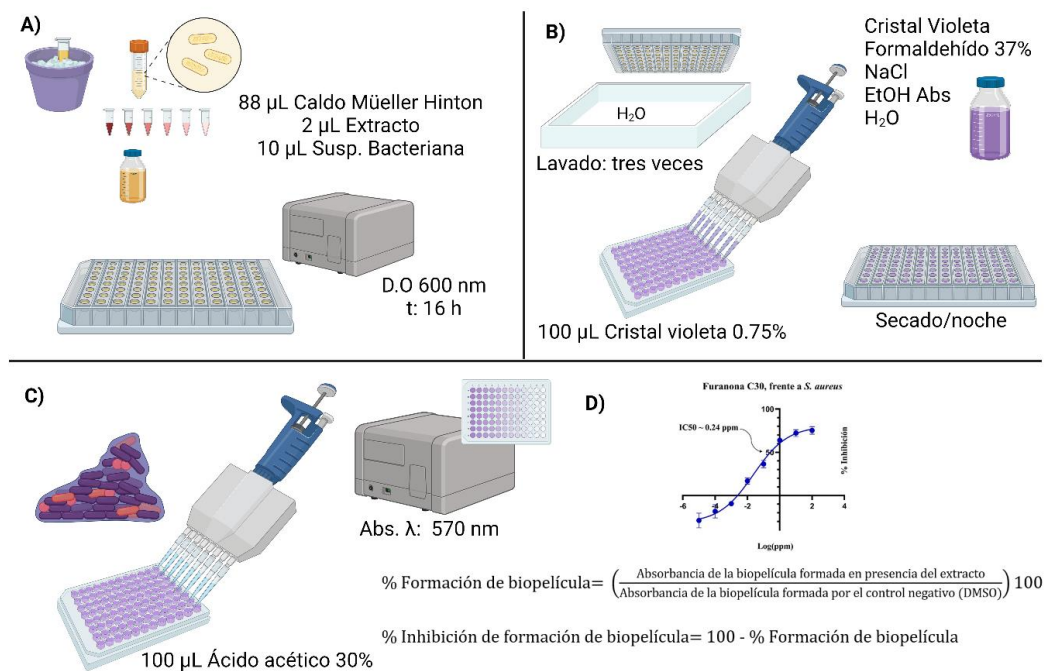


Figura 9. Flujo de trabajo seguido para cuantificar el potencial anti-biopelícula de extractos orgánicos y moléculas puras.

Una vez establecido el protocolo para cuantificar la formación de biopelícula de la bacteria de prueba y la cepa K2 de *K. pneumoniae*, se determinó el potencial de distintas moléculas previamente reportadas en la literatura como inhibidoras de biopelícula bacteriana, entre ellas, el ácido ursólico, la quercetina y la furanona C-30 (**Figura 4**). Previo a esta evaluación se determinó la concentración mínima inhibitoria de la gentamicina (usada como control positivo en el ensayo antibacteriano), un aminoglucósido de amplio espectro, cuyo mecanismo de acción involucra la inhibición de la síntesis de proteínas por unión directa a la subunidad 30S del ribosoma.³³ Los resultados de esta evaluación se muestran en la **Figura 10**. La CMI calculada para la gentamicina frente a la cepa K2 de *K. pneumoniae* fue de 0.14 ppm. Una vez determinada la CMI para el control positivo se evaluó el potencial antimicrobiano del ácido ursólico, la quercetina y la furanona C-30, sin embargo, estas moléculas no redujeron significativamente el crecimiento bacteriano de ninguna cepa a la concentración evaluada (100 ppm).

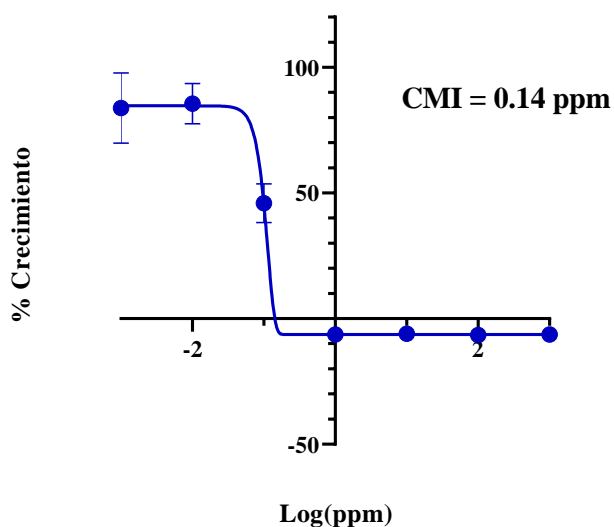


Figura 10. Gráfica y valor obtenido de la determinación de la CMI de la gentamicina para la cepa K2 de *K. pneumoniae*.

Al no presentar propiedades antimicrobianas frente a las cepas de prueba, se evaluó su actividad antibiopelícula frente a la cepa K2 de *K. pneumoniae*, utilizando el protocolo previamente establecido. Los resultados obtenidos de esta evaluación se presentan en la **Tabla 5**.

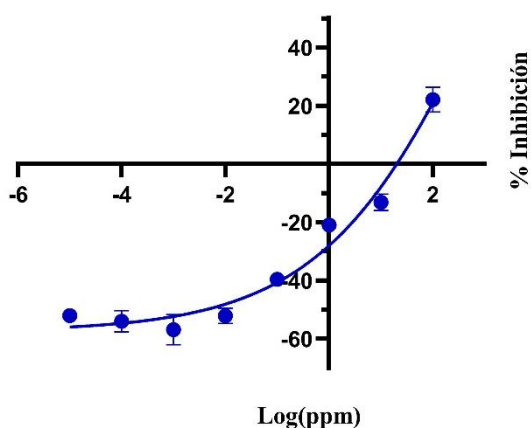
Tabla 5. Potencial antibiopelícula del ácido ursólico, la quercetina y la furanona C-30 frente a la cepa K2 de *K. pneumoniae*.

Microorganismo		
Cepa Hospitalaria	Control	CI ₅₀ (ppm)
<i>K. pneumoniae</i> K2	Ácido ursólico	Inactivo
	Quercetina	Inactiva
	Furanona C30	>100
<i>S. aureus</i>	Furanona C30	0.24

De los tres productos evaluados, únicamente la furanona C-30 mostró actividad como inhibidor de la formación de biopelícula (**Figura 11**), con valores de CI₅₀ de 0.24 y >100 ppm, frente a *S. aureus* y *K. pneumoniae*, respectivamente.

a)

Furanona C30, frente a *K. pneumoniae*



b)

Furanona C30, frente a *S. aureus*

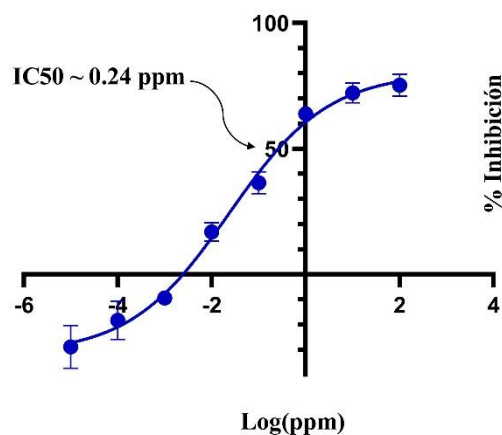


Figura 11. Curvas concentración vs % de inhibición de la formación de biopelícula de la furanona C-30 frente a) *S. aureus* y b) *K. pneumoniae*.

Se ha descrito que el ácido ursólico presenta efectos inhibidores en la formación de biopelículas y la expresión de genes relacionados con este mecanismo de resistencia en *S. aureus* y *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, sin embargo, este triterpeno de origen natural no presentó actividad frente a las cepas de estudio. Por su parte, la quercetina es un agente inhibidor de la formación de biopelículas de *S. aureus* y *Salmonella entérica*, pero no exhibió actividad frente a las cepas de estudio, mientras que la furanona C-30 inhibió la biopelícula de ambas cepas de estudio y, además, tiene la capacidad de inhibir la formación de biopelículas en *P. aeruginosa* y *E. coli* uropatógena. ¹⁵⁻

17,34-36

7.2 Determinación de la capacidad antibacteriana e inhibitoria de la formación de biopelícula de extractos orgánicos de origen fúngico

Posterior a la determinación del control positivo para el ensayo anti-biopelícula de *K. pneumoniae* K2, se determinó la capacidad antibacteriana de 96 extractos fúngicos de 48 ascomicetos asociados al humedal de Tamiahua-El Ídolo, Veracruz, México, fermentados en dos diferentes medios de cultivo, arroz y Cheerios®.

De los 96 extractos evaluados (**Figura 12**), sólo los extractos de los aislamientos IQ-051 e IQ-069 fermentados en arroz y los cultivos de los taxones IQ-057, IQ-062 e IQ-070 crecidos en Cheerios®, presentaron actividad antibacteriana por arriba de 15% pero por debajo de 30%, a una concentración de 200 ppm.

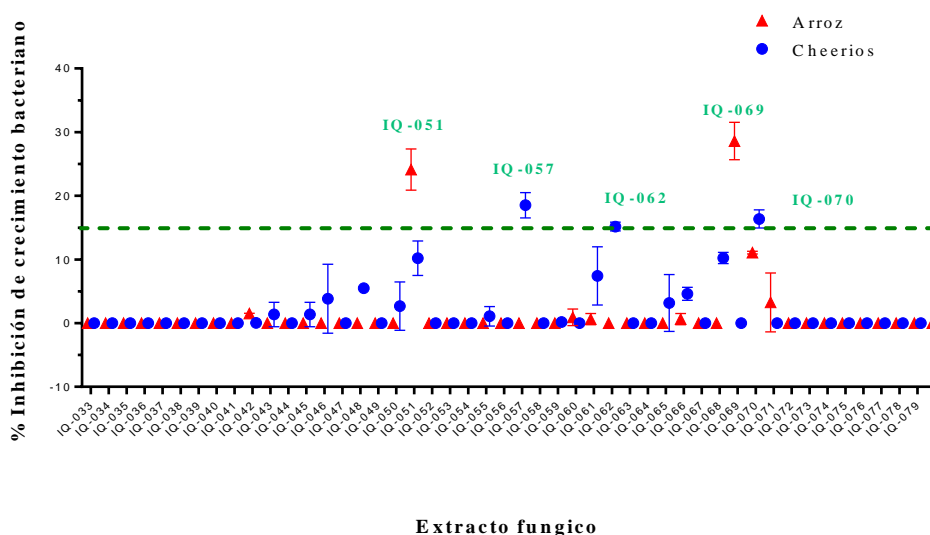


Figura 12. Actividad antimicrobiana de 96 extractos fúngicos frente a *K. pneumoniae* K2. Extractos evaluados a 200 ppm.

Considerando estos resultados, se determinó el potencial anti-biopelícula para cada muestra (**Figura 13**). De esta evaluación, destacaron los extractos de los microorganismos IQ-045 e IQ-055, fermentado en arroz y los extractos de IQ-046, IQ-048, IQ-063, IQ, 065, IQ-067, e IQ-077 cultivados en Cheerios®, como posibles candidatos para el aislamiento de moléculas con potencial anti-biopelícula.

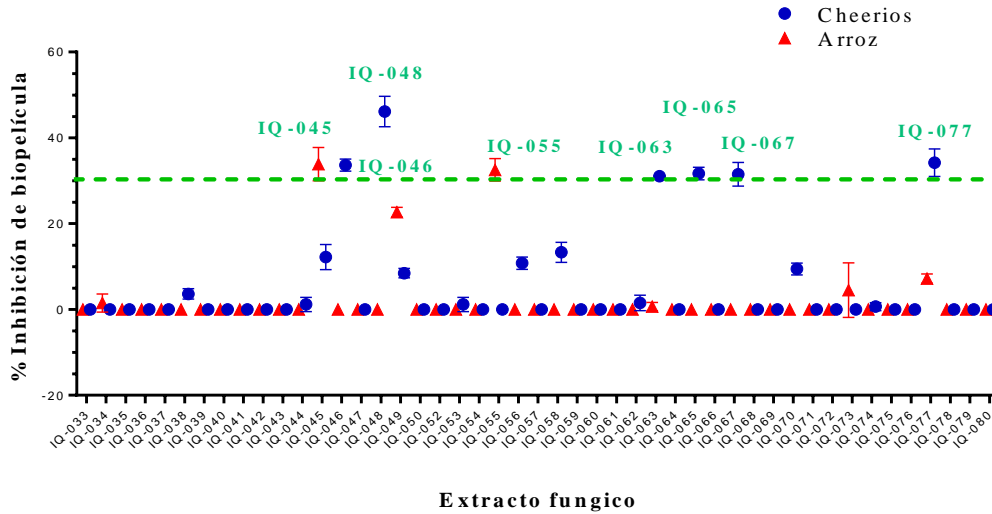


Figura 13 Actividad inhibitoria de la formación de biopelícula de 80 extractos fúngicos; frente a *K. pneumoniae* K2. Extractos evaluados a 200 ppm.

7.3 Selección e identificación taxonómica del aislamiento IQ-048

Con base en los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano y formación de biopelícula se seleccionó el aislamiento IQ-048 cultivado en Cheerios® para continuar con su estudio químico. Inicialmente, se realizó la identificación taxonómica de la cepa, empleando para ello metodologías de biología molecular y bioinformáticas. Los resultados de este análisis identificaron al aislamiento IQ-048 como una especie del género *Trichoderma* (**Figura 14**). Las especies de este género se aíslan con frecuencia de muestras de diferentes tipos de suelos, raíces, ambientes foliares, residuos vegetales, madera, etc. Este género es conocido por su adaptabilidad y capacidad de habitar en diferentes nichos ecológicos.²⁶

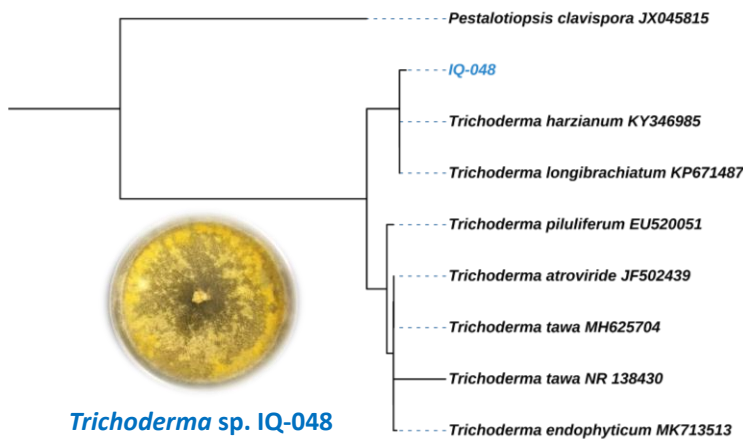


Figura 14. Árbol filogenético del aislamiento IQ-048. El análisis de máxima similitud de la región ITS del hongo IQ-048 identificó al microorganismo como una especie del género *Trichoderma*. En este análisis se utilizó la secuencia de *Pestalotiopsis clavispora* como grupo externo. El árbol fue editado en la plataforma iTOL.

7.4 Estudio químico de *Trichoderma* sp. IQ-048

El estudio químico del taxón comenzó con la fermentación del microorganismo en medio sólido (Cheerios®) por 28 días en condiciones estáticas con periodos 12/12 h de luz-oscuridad. Subsecuentemente, se obtuvo el extracto orgánico (880 mg) mediante las técnicas de maceración y reparto descritas en la parte experimental. El fraccionamiento del extracto por cromatografía tipo flash en fase reversa generó 18 fracciones (F₁-F₁₈). De éstas, se seleccionaron las fracciones F₈, F₉ y F₁₂ para su evaluación biológica en el ensayo de inhibición de la formación de biopelícula, considerando la simplicidad de su perfil cromatográfico obtenido por CLAE.

Tabla 6. Actividad anti-biopelícula de las fracciones primarias F₈, F₉ y F₁₂ frente a *K. pneumoniae* K2.

Fracción	% Inhibición de biopelícula
VIII	-29.2 ± 3.28
IX	-6.8 ± 2.82
XII	55.2 ± 1.98

Con base en estos resultados se eligió la fracción F₁₂ para continuar con el aislamiento de sus constituyentes. La resolución de la fracción por CLAE en modo semipreparativo (**Figura 15**) condujo al aislamiento de 0.5 mg del producto **1**.

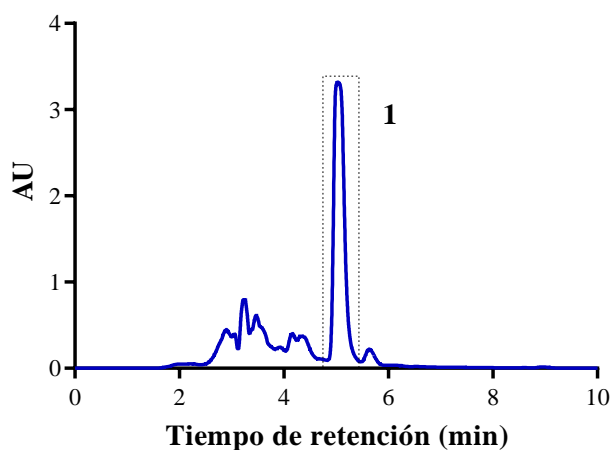


Figura 15. Cromatograma del fraccionamiento de la fracción F₁₂.

La caracterización química del producto inició con el análisis de su espectro de ultravioleta (**Figura 16**), el cual muestra máximos en λ 192.5, 246.8 y 348.0 nm, indicando la presencia de los siguientes grupos cromóforos: alquenos simples, anillos aromáticos fusionados con extensión de la conjugación, carbonilos α,β -insaturados, así como un dieno homoanular.

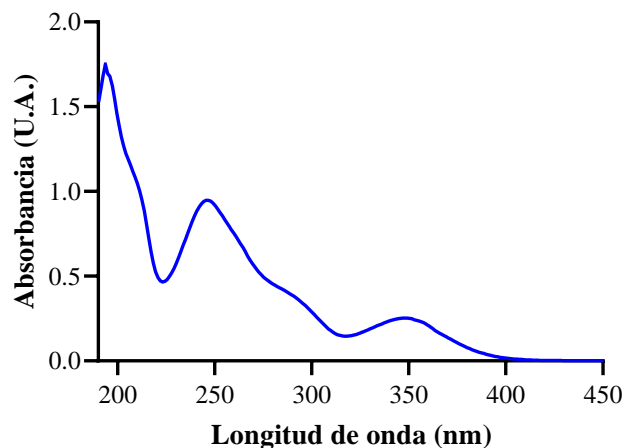


Figura 16. Espectro de UV para la molécula **1**.

Para continuar con la elucidación estructural de la molécula se registraron los espectros de RMN- ^1H , ^{13}C y RMN bidimensional, así como de espectrometría de masas de alta resolución.

La fórmula molecular de **1** se estableció como $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{NO}_4$ con base en el ion para la molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ observado en los análisis DART en una relación m/z experimental de 434.2349 unidades, con un error $\Delta = 4.1$ ppm, con respecto a la masa teórica de 434.2331 uma (**Figura 17**). Esta fórmula permite 13 grados de insaturación (Ω).

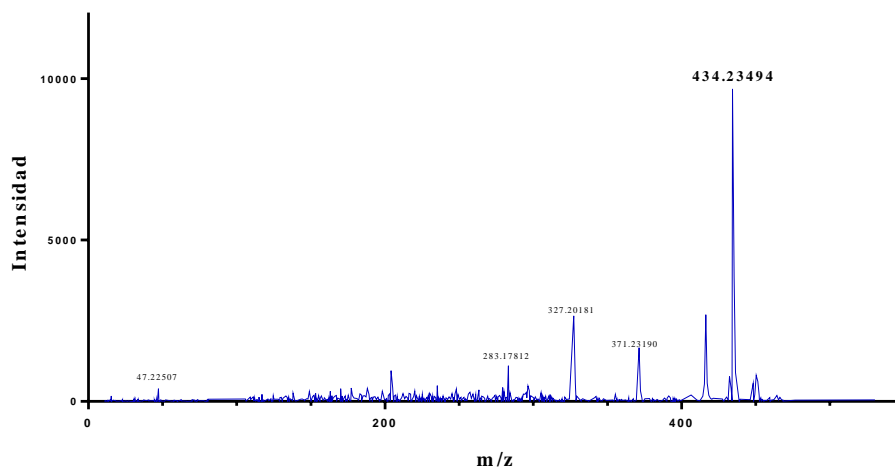


Figura 17. Espectro de masas de alta resolución por DART+ $[\text{M}+\text{H}]^+$ para la molécula **1**.

A continuación, se describen las señales más importantes observadas en los espectros de RMN:

- En primer lugar, se observa la presencia de un anillo aromático *para*-sustituido por las señales formando un sistema de cuatro espines AA'BB' en δ_{H} 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz), y 7.30 (d, $J = 8.7$

Hz). Cada una de estas señales integra para dos protones y correlacionan con los δ_C en 116.5 y 131.6, respectivamente, por lo que fueron asignadas a los cuatro metinos del anillo aromático H-3'/5' y H-2'/6'.

- También se presenta un hidrógeno desplazado a campo bajo δ_H 7.50 (s) y δ_C 140.9 asignado al hidrógeno H-6 del anillo de 4-hidroxi-piridin-2-ona. La presencia de tres hidrógenos sobre carbonos con hibridación sp^2 correspondientes a dos dobles ligaduras entre δ_H 5.00-5.50 ppm, así como señales características a un núcleo de decalina y tres metilos, dos de ellos desplazados a campo bajo δ_H 1.69 y 1.59 (d, $J=6.5$ Hz).
- Por otra parte, en el espectro de RMN ^{13}C se observa la presencia de un carbonilo de cetona en δ_C 214.9 que corresponde a C-7, una amida δ_C 164.2 asignable a C-2, seis carbonos aromáticos, dos carbonos olefínicos vecinos a un heteroátomo, uno de los cuales corresponde a un base de oxígeno (C-4) y el otro a una unión N-amida (C-6), seis carbonos de doble ligadura C-3, C-5, C-20 y C-21; C-16 y C-17, cinco metinos C-8, C-9, C-10, C-12 y C-15, tres metilenos C-11, C-13 y C-14 y tres metilos C-18, C-19 y C-22.

Los desplazamientos químicos registrados en los espectros de RMN- 1H (**Figura 19**) y RMN- ^{13}C (**Figura 20**) se muestran en la **Tabla 7** y son congruentes con los reportados en la literatura para la ilicicolina H (**1**).³⁷ La estructura del producto se corroboró por medio del análisis exhaustivo de los experimentos bidimensionales HSQC (**Figura 21**), HMBC (**Figura 22**) y COSY (**Figura 23**). Interesantemente, en los espectros de una dimensión las señales asignables al metino de la posición C-8 (δ_H/δ_C 5.02/55.0) se observaron como señales atenuadas. Su asignación fue posible por la correlación débil observada en el espectro HSQC (**Figura 21**). Esto se explica ya que H-8 es un protón ácido y al ser disuelto en un disolvente deuterado polar prótico (CD_3OD), este hidrógeno se intercambia por deuterio, reduciendo la señal en RMN- 1H . Por el contrario, cuando los espectros de RMN se adquieren en disolventes polares apróticos como CD_3CN , esta señal aparece integra.

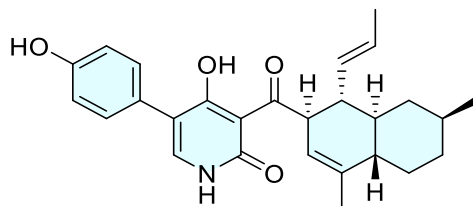


Figura 18. Ilicicolina H (**1**)

Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN-¹H y RMN-¹³C de la ilicicolina H (**1**).

Posición	δ_C en ppm		δ_H en ppm, (mult., <i>J</i> en Hz)	
1'	125.8	125.1	-	-
3' 5'	116.6	116.5	6.83 (d, 8.6)	6.85 (d, 8.7)
2' 6'	131.7	131.6	7.29 (d, 8.6)	7.30 (dd, 8.7, 2.9)
4'	157.8	158.3	-	-
4' OH			17.6 br.s	-
1 NH			9.56 br.s	-
2	162.9	164.2	-	-
3	108.1	108.3	-	-
4	178	177.0	-	-
5	114.8	115.9	-	-
6	141.4	140.9	7.40 (s)	7.50 (s)
7	211	214.9	-	-
8	54.1	55.0	4.97 (m)	5.02 (m)
9	46.2	46.9	2.48 (q, 10.4)	2.51 (q, 10.5)
10	44.5	44.8	1.23 (m)	1.28 (m)
11a	40.6	41.0	0.58 (q, 11.8)	0.60 (q, 12.1)
11b			1.77 (m)	1.86 (m)
12	33.8	34.4	1.38 (m)	1.43 (m)
13a	36.6	37	0.97 (m)	1.03 (m)
13b			1.77 (m)	1.84 (m)
14a	31	31	2.04 (m)	2.11 (m)
14b			0.99 (m)	1.33 (m)
15	45.4	45.9	1.68 (m)	1.72 (m)
16	139.5	140.7	-	-
17	120.9	120.9	5.21 (m)	5.27(m)
18	21.5	21.4	1.63 (s)	1.69 (s)
19	23.4	23.3	0.89 (d, 6.5)	0.95 (d, 6.6)
20	134.8	134.5	5.21 (m)	5.25 (m)
21	127.3	127.6	5.32 (m)	5.36 (m)
22	18.5	18.5	1.53 (d, 6.5)	1.59 (dd, 6.4)

En azul se presentan los datos espectroscópicos reportados en la literatura,³⁷ en CD₃CN y en negro los datos experimentales obtenidos en CD₃OD.

En este trabajo, se sugirió que los protones H-8, H-9 y H-10 tienen una relación trans diaxial, considerando que la señal de H-9 aparece como un cuarteto con constante de acoplamiento de 10.4 Hz. Además, el hidrógeno H-11a, también se observa como un cuarteto con *J* = 12.1 Hz, sugiriendo una relación trans diaxial entre H-10, H-11a y H-11a-H-12. Por otra parte, las correlaciones observadas en el espectro NOESY (**Figura 25**) entre el metilo CH₃-19 con H-11b y H-12, posicionaron estos hidrógenos en la misma cara de la molécula, mientras que los hidrógenos H-13a, H-14a y H-15 se encuentran en el lado opuesto. Con base en esta información y el valor de rotación óptica $[\alpha]^{23}_D -20$ (*c* = 0.05, CH₃CN) que coincide en signo y con el reportado en la literatura. Se estableció la configuración absoluta de ilicicolina H como se muestra en la estructura **1**.

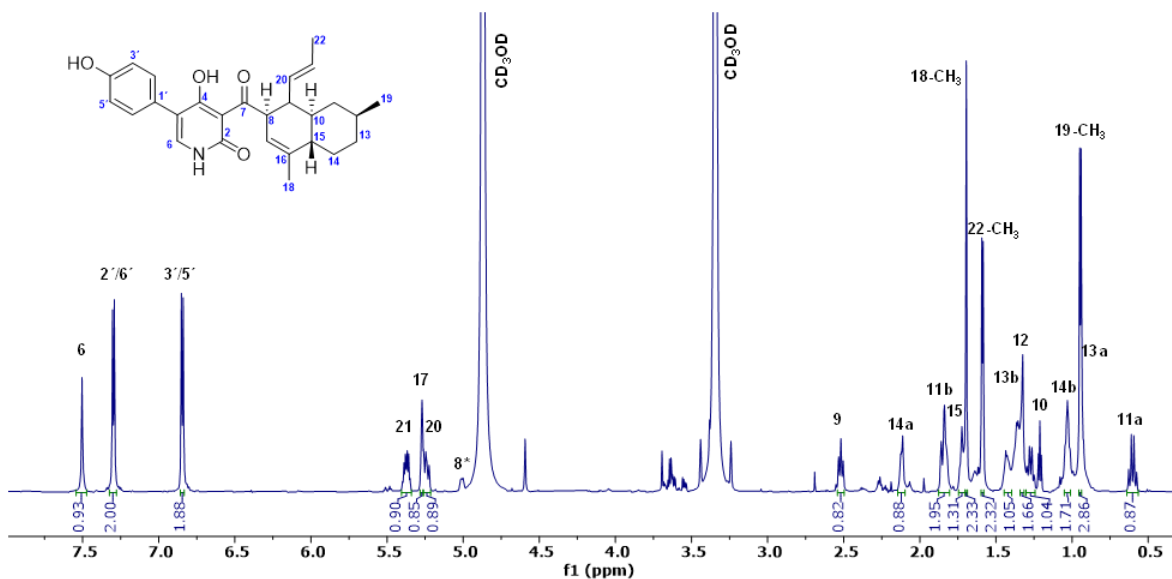


Figura 19. Espectro de RMN- ^1H (700 MHz, CD_3OD) de ilicicolina H (1).

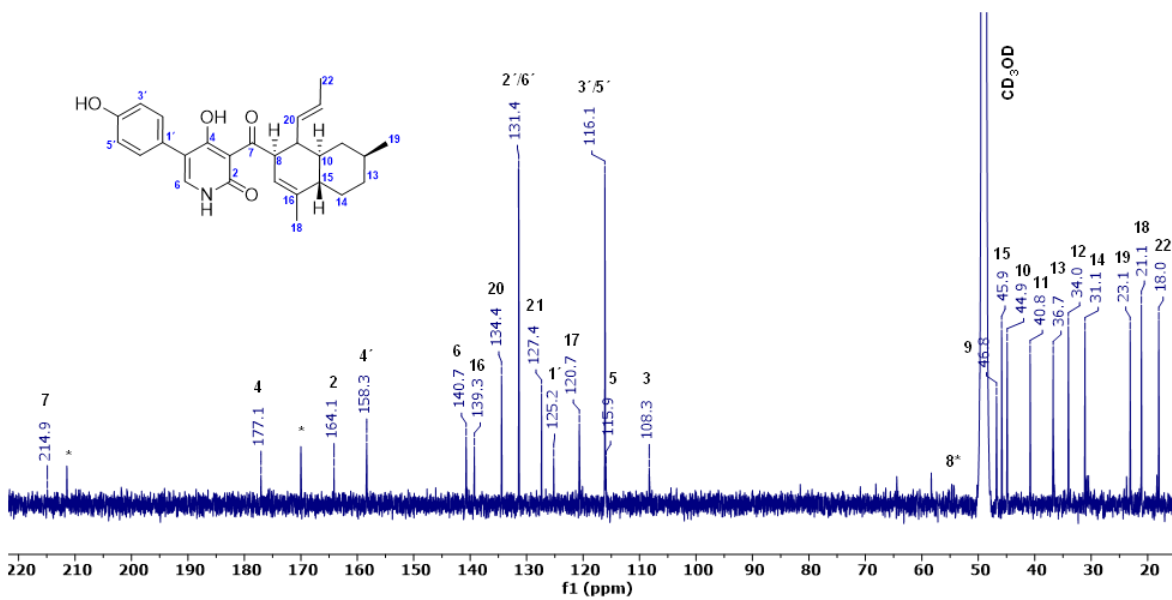


Figura 20. Espectro de RMN- ^{13}C (175 MHz, CD_3OD) de ilicicolina H (1).

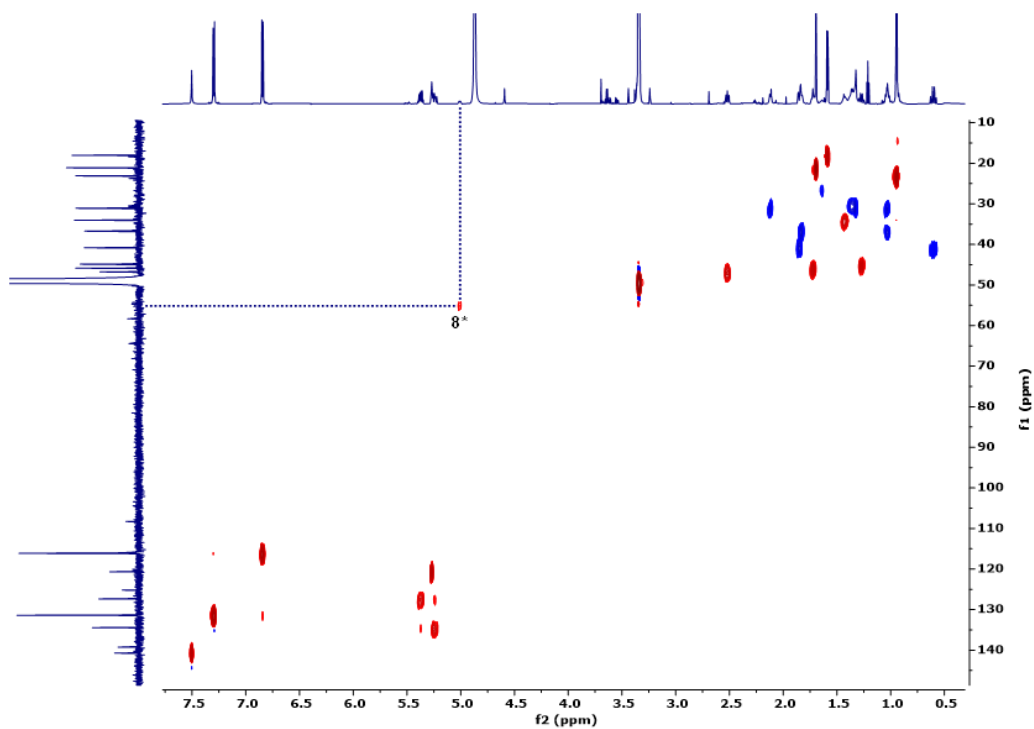


Figura 21. Espectro bidimensional HSQC de la ilicicolina H (1).

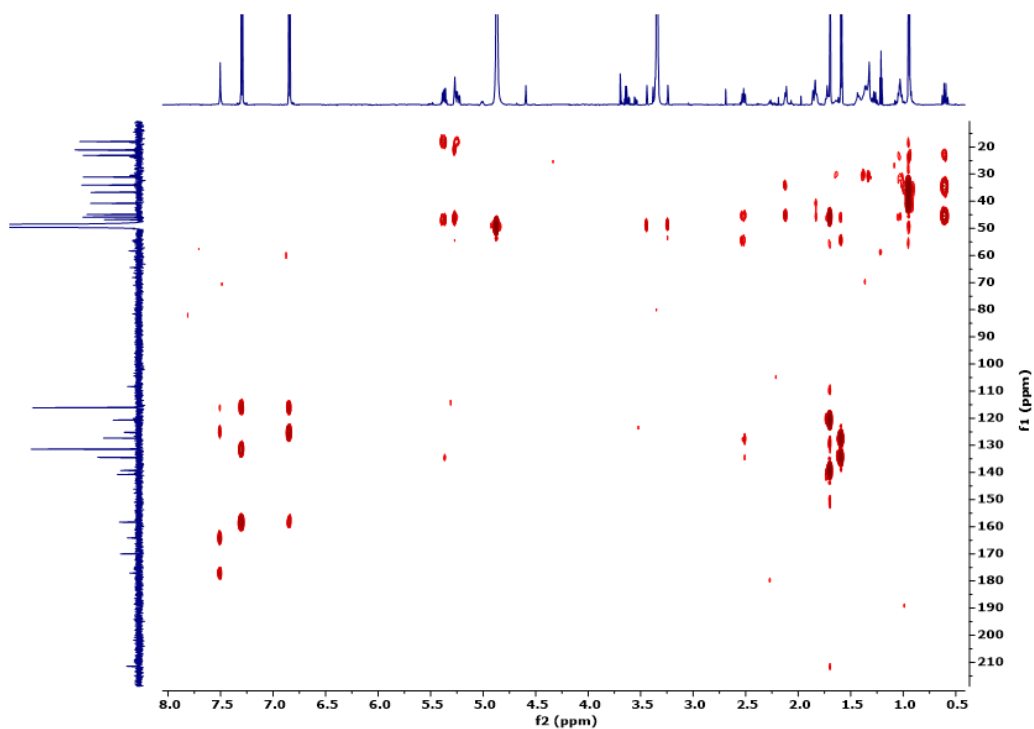


Figura 22. Espectro bidimensional HMBC de la ilicicolina H (1).

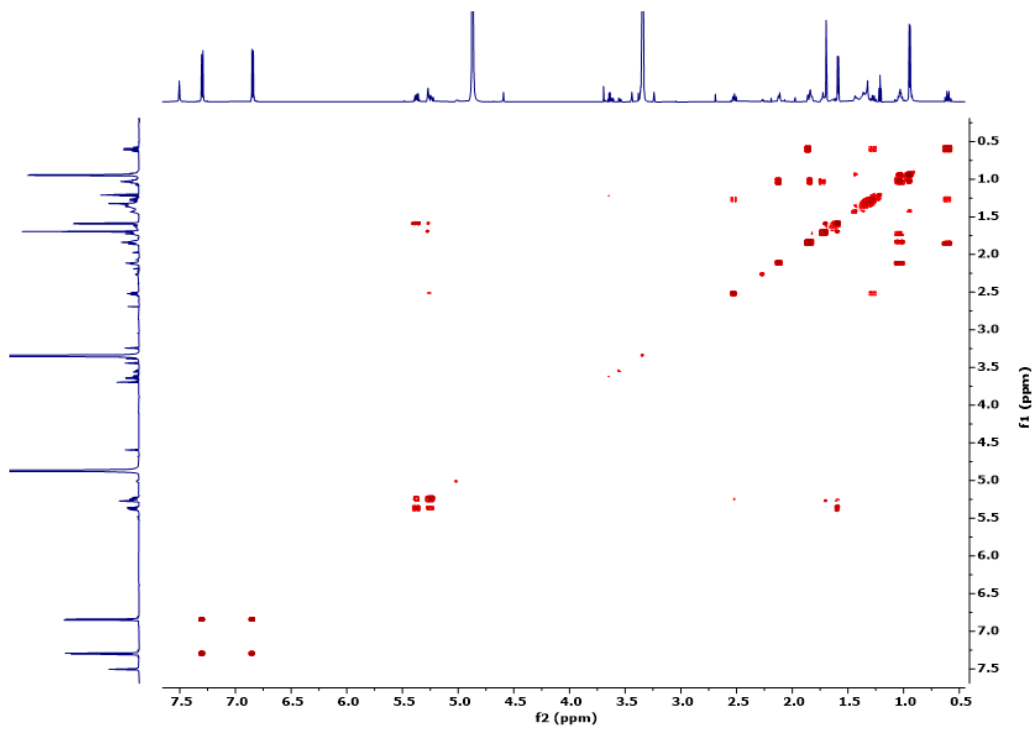


Figura 23. Espectro bidimensional COSY de la ilicicolina H (1).

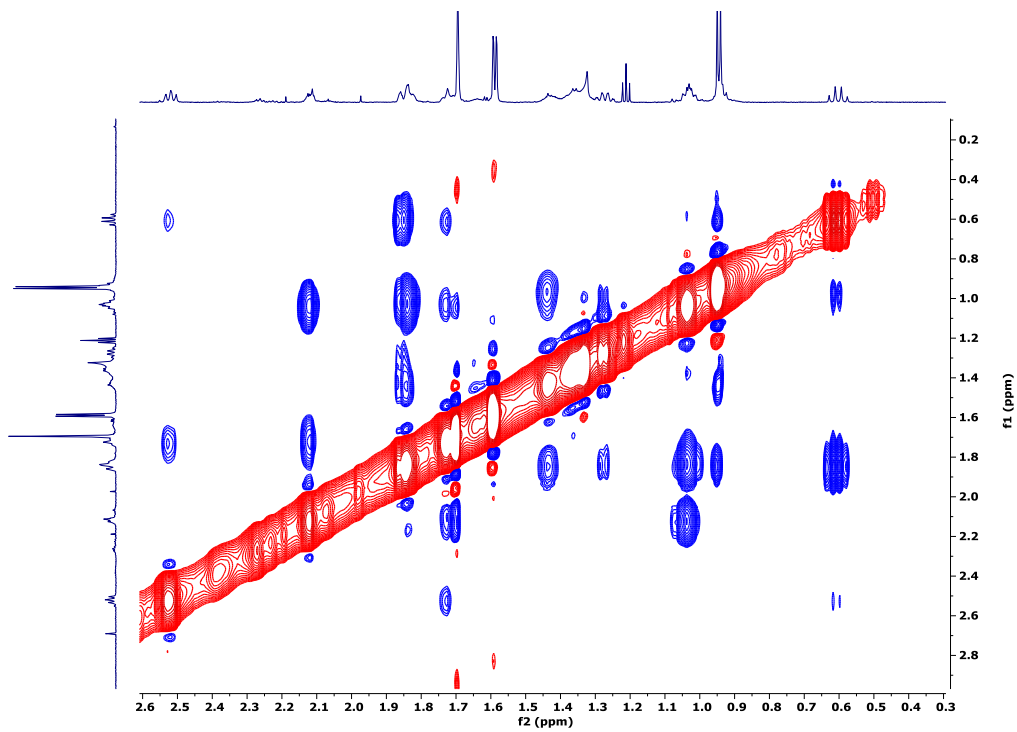


Figura 24. Espectro bidimensional NOESY de la ilicicolina H (1).

A la fecha el espectro de dicroísmo circular (DC) para el compuesto **1** no se encuentra reportado en la literatura. Por ello, en este trabajo se registró su espectro en CH₃CN (**Figura 25**), el cual muestra dos efectos Cotton negativo en λ 250 y 350 nm y dos positivos en λ 320 y 335 nm. Para corroborar que esta curva de DC representa la configuración absoluta dibujada, es necesario realizar cálculos teóricos empleando Teoría de Funcionales de la Densidad dependiente del tiempo (TD-DFT). Sin embargo, esta tarea escapa de los alcances de este trabajo.

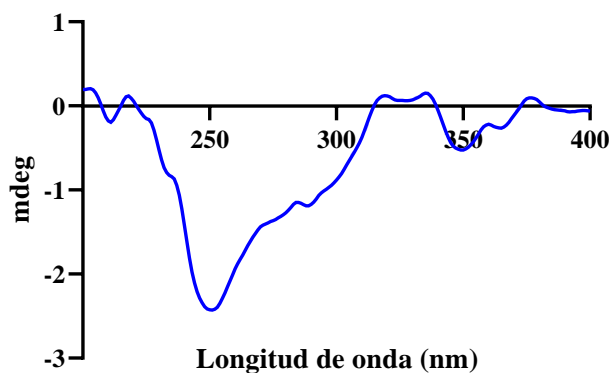


Figura 25. Espectro de dicroísmo circular de la ilicicolina H (**1**).

La ilicicolina H (**1**) se aisló por primera vez en 1971 del hongo imperfecto *Cylindrocladium iliciola*, posteriormente Matsumoto y Minato,^{37,38} establecieron la estructura y configuración absoluta del producto combinando reacciones de degradación y RMN. Años más tarde, en 1985 Ono y colaboradores reportaron la síntesis en varios pasos de la (\pm) ilicicolina H (**1**). Inicialmente, la piridona **2** se hizo reaccionar con el aldehído **3** para obtener el tetraeno **4**. Subsecuentemente, a través de una reacción de cicloadición de tipo Diels-Alder, regio y estereoselectiva en *o*-diclorobenceno a reflujo se obtuvieron las trans-decalinas **5** y **6**, demostrando la formación exclusiva de los conformeros en forma de silla con el metilo en C-12 en una disposición ecuatorial y por consecuencia su configuración absoluta.^{37,39,40}

La ilicicolina H (**1**) es un producto de biosíntesis mixta formado por un octacétido y un residuo de tirosina (**Figura 24**)^{37,38} y ha sido reportada como inhibidor del crecimiento de distintas cepas de hongos y levaduras, por ejemplo, *Aspergillus fumigatus* ATCC46645, *Candida albicans* ATCC64124, *C. parapsilosis* ATCC22019 y *C. tropicalis* ATCC750.³⁷

En otros estudios, la ilicicolina H (**1**) se aisló de los hongos *Cylindrocladium iliciola* y *Gliocadium roseum*, y se determinó que la molécula presenta actividad antifúngica de amplio espectro frente a *Candida* spp., *A. fumigatus* y *Cryptococcus* spp. También presentó una inhibición potente de la

reductasa mitocondrial del citocromo bc1 y una selectividad superior en comparación con la reductasa del citocromo del hígado de rata.^{41,42}

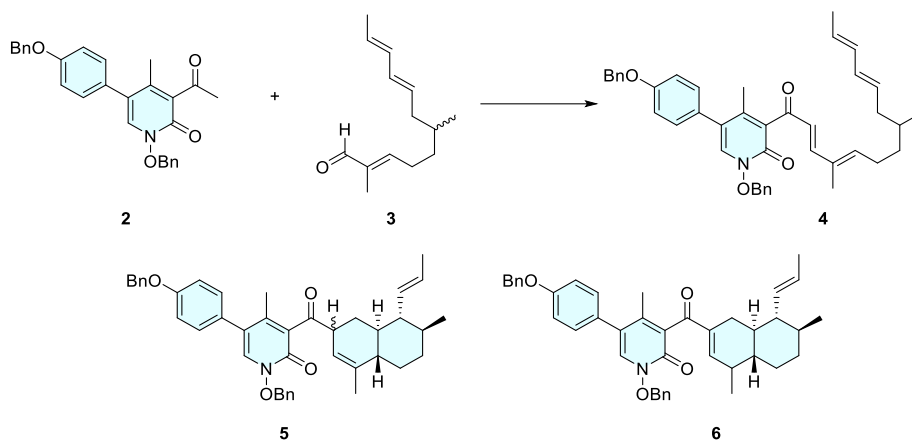


Figura 26. Intermediarios sintéticos generados para la síntesis de **1**.

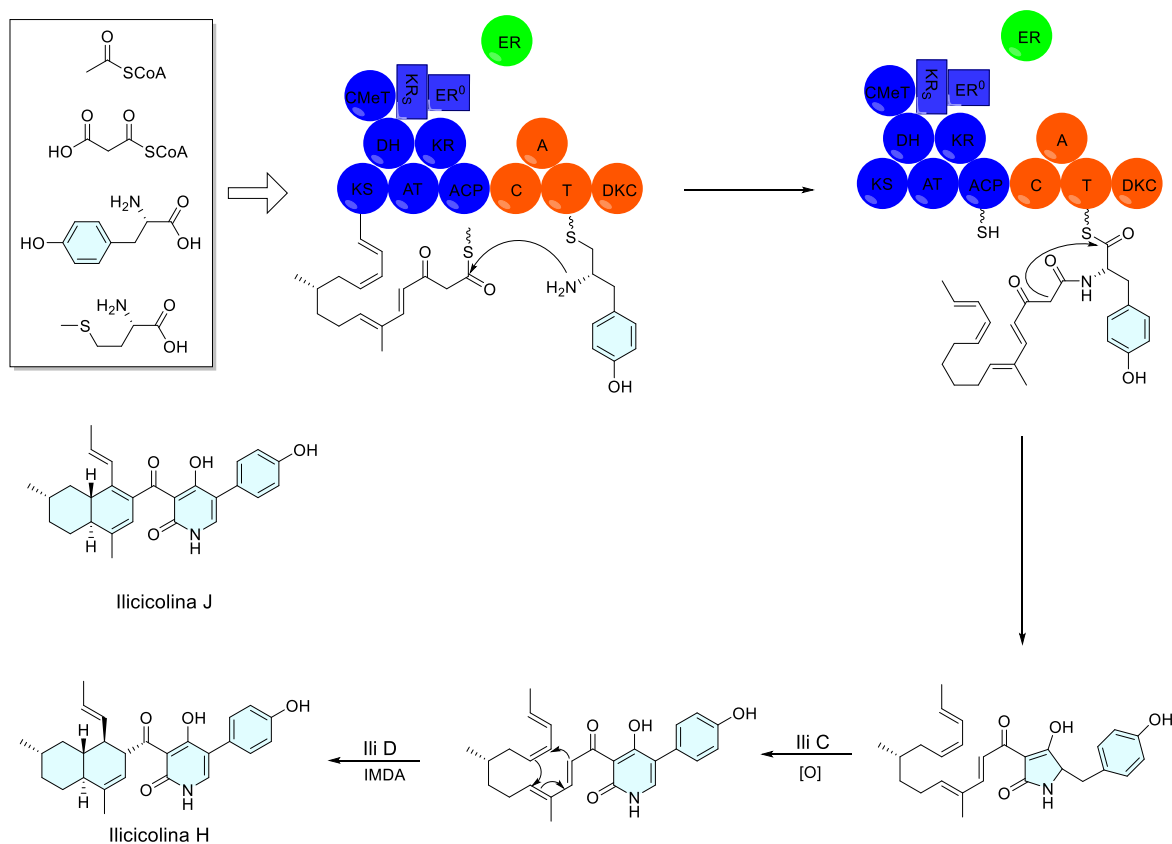


Figura 27. Ruta biosintética propuesta para la ilicicolina H y la ilicicolina J. Tomada de Lin, X. et al.³⁸

7.5 Determinación de la actividad anti-biopelícula de la ilicolina H (1)

La actividad biológica de la ilicolina H (1) se determinó en los ensayos de actividad antibacteriana e inhibición de la formación de biopelícula frente a la cepa *K. pneumoniae* K2 multirresistente e intrahospitalaria. Este compuesto presentó una inhibición de la formación de biopelícula de 64.9 ± 2.0 % a una concentración de 200 ppm, incluso mejor que la del control positivo empleado en este ensay (furanona C30). Este hallazgo es de gran relevancia, ya que es el primer reporte de esta molécula como inhibidor de la formación de biopelícula bacteriana en cepas multirresistentes como *K. pneumoniae* K2 y abre el campo de investigación para su desarrollo como prototipo estructural.

8. Conclusiones

- Este trabajo de investigación permitió implementar un protocolo *in vitro* para determinar el potencial de extractos orgánicos y moléculas puras como inhibidores de la formación de biopelícula bacteriana, utilizando la furanona C30 como control positivo.
- La evaluación de una colección de extractos orgánicos de ascomicetos selectos como posibles inhibidores de la formación de biopelícula bacteriana de *K. pneumoniae* K2, permitió la selección del aislamiento IQ-048 (*Trichoderma* sp.) como productor de moléculas potencialmente activas.
- El estudio biodirigido del extracto de *Trichoderma* sp. IQ-048, obtenido de su fermentación en medio sólido Cheerios®, condujo al aislamiento de la ilicicolina H (**1**), un metabolito secundario de biosíntesis mixta, con actividad como inhibidor de la formación de biopelícula bacteriana (64.9 ± 2.0 % a una concentración de 200 ppm). Estos hallazgos postulan al producto **1** como una alternativa para el desarrollo de moléculas que permitan contrarrestar la RAM.

9. Referencias

1. WHO. Resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
2. WHO. Un nuevo informe insta a actuar con urgencia para prevenir una crisis causada por la resistencia a los antimicrobianos. <https://www.who.int/es/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis>.
3. Lasa, I., Del Pozo, J. L., Penadés, J. R. & Leiva, J. *COLABORACIÓN ESPECIAL Biofilms bacterianos e infección Bacterial biofilms and infection. An. Sist. Sanit. Navar* vol. 28 (2005).
4. WHO. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
5. Dreser, A., Wirtz, V. J., Corbett, K. K. & Echániz, G. Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud Publica Mex* **50**, S480–S487 (2008).
6. Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M. & Hernández, I. *Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias Antimicrobial resistance mechanism in bacteria. Enfermedades Infecciosas y Microbiología* vol. 29.
7. Calderón, G. & Médico General, R. •. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXXIII (621) 757-763, 2016*.
8. Chellat, M. F., Raguž, L. & Riedl, R. Antibiotikaresistenzen gezielt überwinden. *Angewandte Chemie* **128**, 6710–6738 (2016).
9. Nazar, J. *Biofilms bacterianos Bacterial biofilms. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Rev. Otorrinolaringol. Cir. Cabeza Cuello* vol. 67 (2007).
10. Ortega-Peña, S. & Hernández-Zamora, E. Microbial biofilms and their impact on medical areas: Physiopathology, diagnosis and treatment. *Boletín Medico del Hospital Infantil de Mexico* vol. 75 79–88 Preprint at <https://doi.org/10.24875/BMHIM.M18000012> (2018).
11. Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G. & Varaldo, P. E. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens* vol. 3 743–758 Preprint at <https://doi.org/10.3390/pathogens3030743> (2014).

12. Srinivasan, R. *et al.* Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Frontiers in Microbiology* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676458> (2021).
13. Rabin, N. *et al.* Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Medicinal Chemistry* vol. 7 647–671 Preprint at <https://doi.org/10.4155/fmc.15.7> (2015).
14. Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. & Svabic-Vlahovic, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Methods Microbiological Journal of Microbiological Methods* vol. 40 www.elsevier.com/locate/jmicmeth (2000).
15. Qian, W. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activities of ursolic acid against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antibiotics* **73**, 382–391 (2020).
16. Kim, Y. K. *et al.* Antibiofilm effects of quercetin against *Salmonella enterica* biofilm formation and virulence, stress response, and quorum-sensing gene expression. *Food Control* **137**, 108964 (2022).
17. Zhao, J. *et al.* Association of furanone c-30 with biofilm formation & antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian Journal of Medical Research* **147**, 400–406 (2018).
18. Cragg, G. M. & Newman, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* vol. 1830 3670–3695 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008> (2013).
19. Hawksworth, D. L. & Lücking, R. Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiol Spectr* **5**, (2017).
20. Blackwell, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am J Bot* **98**, 426–438 (2011).
21. Wright, G. D. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Nat Prod Rep* **34**, 694–701 (2017).
22. Houbraken, J. ARTICLE Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. (2011).
23. Evidente, A. *et al.* Fungal Metabolites with Anticancer Activity.

24. Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R. & Peña-Cabriales, J. J. *EL GÉNERO FÚNGICO Trichoderma Y SU RELACIÓN CON CONTAMINANTES ORGÁNICOS E INORGÁNICOS. Rev. Int. Contam. Ambient* vol. 25 (2009).
25. Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos.
26. Zhang, J.-L. *et al.* Trichoderma: A Treasure House of Structurally Diverse Secondary Metabolites With Medicinal Importance. *Front Microbiol* **12**, 723828 (2021).
27. Mesa Vanegas, A. M., Marín Pavas, D. A. & Calle Osorno, J. Metabolitos secundarios en Trichoderma spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades Biológicas* **41**, 1–13 (2020).
28. Torres, O. D. & Velho, L. La bioprospección como un mecanismo de cooperación internacional para fortalecimiento de capacidades en ciencia y tecnología en Colombia. *Ciência da Informação* **38**, 96–110 (2009).
29. Duarte Torres, O. & Velho, L. *Bioprospecting an international cooperation mechanism for strength the capabilities in Science and Technology in Colombia.* (2009).
30. Martínez Aviña, B. D. Productos naturales de origen fúngico con actividad para el control de la diabetes mellitus tipo II. Tesis de Licenciada en Química de Alimentos. UNAM. Facultad de Química. Blanca Daniela Martínez Aviña. (2019).
31. *M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Tenth Edition.* www.clsi.org. (2015).
32. O’Toole, G. A. Microtiter dish Biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments* (2010) doi:10.3791/2437.
33. Beganovic, M. *et al.* A Review of Combination Antimicrobial Therapy for Enterococcus faecalis Bloodstream Infections and Infective Endocarditis. *Clin Infect Dis* **67**, 303–309 (2018).
34. Henly, E. L. *et al.* Impact of long-term quorum sensing inhibition on uropathogenic Escherichia coli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **76**, 909–919 (2021).

35. Carrada López, G. & Castañón Sánchez, C. A. Quercetina atenúa la virulencia de *Staphylococcus aureus* al disminuir la secreción de alfa toxina. *Rev Argent Microbiol* **50**, 131–135 (2018).
36. Shiva Jyothi, J., Putty, K., Narasimha Reddy, Y., Dhanalakshmi, K. & Hannan Umair, M. A. Antagonistic effect of ursolic acid on Staphylococcal biofilms. *Vet World* **11**, 1440–1444 (2018).
37. Kildgaard, S. *et al.* A dereplication and bioguided discovery approach to reveal new compounds from a marine-derived fungus *Stilbella fimetaria*. *Mar Drugs* **15**, (2017).
38. Lin, X. *et al.* Heterologous Expression of Ilicicolin H Biosynthetic Gene Cluster and Production of a New Potent Antifungal Reagent, Ilicicolin J. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 2267 **24**, 2267 (2019).
39. Matsumoto, M. & Minato, H. Structure of ilicocolin H, an antifungal antibiotic. *Tetrahedron Lett* **17**, 3827–3830 (1976).
40. Noboru Ono, * Tetsuya Yanai, Isami Hamamoto Akio Kamimura, Aritsune Kaji. Total Synthesis of (±)-Ilicicolin H.
41. Gutierrez-Cirlos, E. B., Merbitz-Zahradnik, T. & Trumpower, B. L. Inhibition of the Yeast Cytochrome bc1 Complex by Ilicicolin H, a Novel Inhibitor that Acts at the Qn Site of the bc1 Complex. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 8708–8714 (2004).
42. Singh, S. B. *et al.* Antifungal spectrum, in vivo efficacy, and structure-activity relationship of ilicicolin H. *ACS Med Chem Lett* **3**, 814–817 (2012).