



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Aislamiento y evaluación biológica de fenilespirodrimanos a  
partir de *Alfaria* sp.**

**TESIS**

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

**PRESENTA:**

**ERIKA FUENTES LOZANO**

**TUTOR DE TESIS: DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR**



Ciudad de México, noviembre de 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:** Dra. Macías Rubalcava Martha Lydia  
**VOCAL:** Dra. Rivero Cruz Isabel del Carmen  
**SECRETARIO:** Dr. Figueroa Saldívar Mario Alberto  
**1er SUPLENTE:** Dra. Fragoso Serrano Mabel Clara  
**2do SUPLENTE:** Dr. Aguayo Ortiz Rodrigo

Sitio donde se desarrolló el tema:  
Laboratorio 125, Edificio de Bioquímica y Farmacia, Conjunto E,  
Facultad de Química, UNAM

### **Sustentante:**



---

Erika Fuentes Lozano

### **Tutor:**



---

Dr. Mario A. Figueroa Saldívar  
Profesor Titular B, TC  
Facultad de Química, UNAM

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química (FQ) por contribuir a mi desarrollo profesional durante todos estos años.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT, CVU: 1193409), por el apoyo otorgado a través de la beca de Ayudante de Investigador SIN III.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA PAPIIT IN203923) y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-9145) de la FQ, por los financiamientos otorgados para la realización de este proyecto.

Al Dr. Nicholas H. Oberlies de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EEUU, por el registro de los espectros de masas de alta resolución; a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI), FQ, UNAM, por el registro de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN); al QFB Alejandro Camacho Cruz del Cepario de la FQ, UNAM, y al Dr. Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina, UNAM, por proporcionar las cepas bacterianas para la realización de los ensayos biológicos. Al investigador posdoctoral Dr. Oswaldo Pablo Martínez Rodríguez por su apoyo con los ensayos de actividad antibiopelícula; y a la Dra. María del Carmen González Villaseñor, del Instituto de Biología, UNAM, por proporcionar el organismo fúngico objeto de estudio.

A mi tutor, el Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar, mi más sincera admiración y agradecimiento por permitirme formar parte de su incomparable grupo de trabajo; por su dirección, enseñanza, comprensión, paciencia y confianza otorgadas durante la realización de este proyecto.

## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	I
LISTA DE TABLAS.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
1. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	1
1.1. Resistencia antimicrobiana: una crisis global.....	1
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i> : un patógeno de importancia médica .....	2
1.3. Quorum sensing y la formación de biopelículas.....	3
1.4. Importancia de los productos naturales para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de infecciones causadas por <i>S. aureus</i> .....	6
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivo general .....	10
2.2. Objetivos particulares.....	10
3. METODOLOGÍA.....	11
3.1. Acondicionamiento y cultivo del microorganismo a mediana escala.....	11
3.2. Preparación de los extractos orgánicos .....	11
3.3. Fraccionamiento primario del extracto orgánico.....	12
3.4. Fraccionamiento secundario de F7, F8, F10 y F11 .....	12
3.5. Separación y purificación de los compuestos presentes en las fracciones.....	13
3.6. Caracterización estructural de los metabolitos aislados.....	13
3.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos.....	14
3.8. Evaluación de la actividad antibiopelícula de los compuestos .....	15
3.9. Análisis estadístico.....	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	17
4.1. Cultivo en mediana escala y fraccionamiento primario .....	17
4.2. Fraccionamiento secundario de las fracciones F7, F8, F10 y F11 .....	18
4.3. Separación y purificación de los metabolitos presentes en las fracciones seleccionadas .....	21
4.4. Caracterización química de los compuestos aislados.....	27
4.4.1. Caracterización química de los compuestos <b>1</b> y <b>2</b> .....	27

4.4.2.	Caracterización química del compuesto <b>3</b> .....	30
4.4.3.	Caracterización química de los compuestos <b>4</b> y <b>5</b> .....	31
4.4.4.	Caracterización química de los compuestos <b>6-8</b> .....	35
4.5.	Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de los compuestos aislados.....	38
4.5.1.	Evaluación de la actividad antimicrobiana contra MRSA y MSSA para determinar su concentración mínima inhibitoria.....	38
4.5.2.	Actividad antibiopelícula sobre MRSA .....	42
5.	CONCLUSIONES .....	44
6.	REFERENCIAS .....	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Formación de la biopelícula en <i>S. aureus</i> . .....	5
<b>Figura 2.</b> Ejemplos de PN con actividad antimicrobiana.....	7
<b>Figura 3.</b> Ejemplos de productos naturales con actividad contra el QS.....	8
<b>Figura 4.</b> Cultivo en medio de arroz a mediana escala del hongo ORO3.....	17
<b>Figura 5.</b> Fraccionamiento primario del extracto de <i>Alfaria</i> sp.....	18
<b>Figura 6.</b> Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo Flash de las fracciones primarias F7 y F8 .....	19
<b>Figura 7.</b> Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo Flash de las fracciones primarias F10 y F11 .....	20
<b>Figura 8.</b> Compuestos de interés para ser aislados. ....	21
<b>Figura 9.</b> Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F4.....	22
<b>Figura 10.</b> Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F5.....	23
<b>Figura 11.</b> Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F7 <sub>5</sub> .....	24
<b>Figura 12.</b> Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de las fracciones F8 <sub>5</sub> y F8 <sub>6</sub> .....	25
<b>Figura 13.</b> Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F10 <sub>4</sub> .....	26
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F11 <sub>4</sub> .....	27
<b>Figura 15.</b> Espectros de masas en los modos ESI + y ESI – y en el UV (PDA) del compuesto 1.....	28
<b>Figura 16.</b> Estructura química de los compuestos 1 y 2 .....	28

<b>Figura 17.</b> Espectros de masas en los modos ESI + y ESI – y en el UV (PDA) del compuesto <b>3</b> .....	30
<b>Figura 18.</b> Estructura química de <b>3</b> .....	30
<b>Figura 19.</b> Espectros de masas en los modos ESI + y ESI – y en el UV (PDA) del compuesto <b>4</b> .....	32
<b>Figura 20.</b> Espectros de DC experimental y calculado del compuesto <b>4</b> .....	33
<b>Figura 21.</b> Estructura química de la myrotelactona A. ....	33
<b>Figura 22.</b> Cromatogramas del análisis por HPLC del compuesto <b>5</b> y sus productos de descomposición.....	34
<b>Figura 23.</b> Cromatogramas del análisis por HPLC del compuesto <b>5</b> y sus productos de descomposición en DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> . ....	35
<b>Figura 24.</b> Espectros de masas en los modos ESI + y ESI – y en el UV (PDA) del compuesto <b>6</b> .....	36
<b>Figura 25.</b> Estructura química de los compuestos <b>6</b> , <b>7</b> y <b>8</b> . ....	36
<b>Figura 26.</b> Resultados del ensayo de la actividad antimicrobiana contra MRSA de los compuestos <b>1-4</b> y <b>6-8</b> . ....	39
<b>Figura 27.</b> Resultados del ensayo de la actividad antimicrobiana contra MSSA de los compuestos <b>1-4</b> y <b>6-8</b> .....	40
<b>Figura 28.</b> Resultados del ensayo de la actividad antimicrobiana del compuesto <b>5</b> contra MRSA y MSSA a las concentraciones de prueba. ....	41
<b>Figura 29.</b> Resultados de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula contra MRSA de los compuestos aislados de <i>Alfaria</i> sp. ....	43



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo Flash. ....	13
<b>Tabla 2.</b> Fraccionamiento primario del extracto de <i>Alfaria</i> sp. ....	18
<b>Tabla 3.</b> Fraccionamiento secundario de las fracciones primarias F7 y F8 del hongo ORO3. ....	19
<b>Tabla 4.</b> Fraccionamiento secundario de las fracciones primarias F10 y F11 del hongo ORO3. ....	20
<b>Tabla 5.</b> Rendimiento y $UV_{\text{máx}}$ de los compuestos aislados por HPLC a nivel semi y preparativo. ....	22
<b>Tabla 6.</b> Datos de RMN de <b>1</b> y <b>2</b> en $CDCl_3$ (600 y 400 MHz para $^1H$ y 100 MHz para $^{13}C$ ). ....	29
<b>Tabla 7.</b> Datos de RMN de <b>3</b> en acetona- $d_6$ $^1H$ (600 MHz) y $^{13}C$ (150 MHz). ....	31
<b>Tabla 8.</b> Datos de RMN de <b>4</b> en $DMSO-d_6$ $^1H$ (600 MHz) y $^{13}C$ (150 MHz). ....	32
<b>Tabla 9.</b> Valores experimentales y reportados de rotación óptica para <b>4</b> y la myrotelactona A ( <b>4</b> ). ....	33
<b>Tabla 10.</b> Datos de RMN de <b>6-8</b> en $DMSO-d_6$ $^1H$ (600 MHz) y $^{13}C$ (150 MHz) ....	37
<b>Tabla 11.</b> Actividad biológica vs MRSA de los compuestos aislados de <i>Alfaria</i> sp. ....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados Celsius	<b>Gram (-)</b>	Gram negativo
<b>δ</b>	Desplazamiento químico	<b>Gram (+)</b>	Gram positivo
<b>μg</b>	Microgramo	<b>h</b>	Hora
<b>μL</b>	Microlitro	<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>μm</b>	Micrómetro	<b>HMBC</b>	Conectividad heteronuclear a enlaces múltiples
<b>Abs</b>	Absorbancia	<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
<b>Acetona-d<sub>6</sub></b>	Acetona deuterada	<b>HRESIMS</b>	Espectrometría de masas de alta resolución de ionización con electrospray
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo	<b>Hz</b>	Hertz
<b>APD</b>	Agar papa dextrosa	<b>IDH</b>	Índice de deficiencia de hidrógeno
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection	<b>kV</b>	Kilovolt
<b>CD</b>	Dicroísmo circular	<b>LB</b>	Caldo Luria Bertani
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado	<b>m</b>	Multiplete
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva media	<b>m/z</b>	Relación masa-carga
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo	<b>MeOH</b>	Metanol
<b>CH<sub>3</sub>CN</b>	Acetonitrilo	<b>mg</b>	Miligramo
<b>CMH</b>	Caldo Müeller-Hinton	<b>MHz</b>	Megahertz
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria	<b>min</b>	Minuto
<b>d</b>	Doblete	<b>mL</b>	Mililitro
<b>dd</b>	Doble de dobles	<b>mm</b>	Milímetro
<b>ddd</b>	Doble de dobles de dobles	<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido	<b>MSSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a meticilina
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	DMSO deuterado	<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densidad óptica a 600 nm	<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
<b>ECD</b>	Dicroísmo circular electrónico	<b>nm</b>	Nanómetro
<b>ELSD</b>	Detector de dispersión de luz evaporativa	<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>EPS</b>	Sustancias poliméricas extracelulares	<b>PDA</b>	Detector de arreglo de fotodiodos
<b>ESI</b>	Electrospray	<b>PN</b>	Productos naturales
<b>EtOH</b>	Etanol	<b>QS</b>	Quorum Sensing
<b>g</b>	Gramo	<b>RAM</b>	Resistencia antimicrobiana
<b>g/L</b>	Gramos por litro		

<b>RMN-<sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno	<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>RMN-<sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono 13	<b>UPLC</b>	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto	<b>UPLC-MS</b>	UPLC acoplado a espectrometría de masas
<b>s</b>	Singulete	<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>sa</b>	Singulete ancho	<b>V</b>	Volt
<b>t</b>	Triplete	<b>YESD</b>	Extracto de levadura, peptona y dextrosa
<b>td</b>	Triplete dobleteado		

# 1. ANTECEDENTES Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

## 1.1. Resistencia antimicrobiana: una crisis global

La resistencia antimicrobiana (RAM) se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) desarrollan la capacidad para evadir el efecto de los antibióticos<sup>1</sup>. Lo anterior genera que las infecciones se vuelvan difíciles, persistentes, en ocasiones imposibles de tratar y que desencadenan en la muerte de la persona infectada<sup>2</sup>.

Mucho antes de que se identificaran, sintetizaran o comercializaran los agentes antimicrobianos, la RAM ya existía en la naturaleza<sup>3</sup>. Sin embargo, su aparición y prevalencia en cepas patógenas se produjo principalmente como una respuesta evolutiva al desarrollo y al uso de agentes antimicrobianos<sup>4</sup>. Las bacterias pueden presentar dos tipos de resistencia, la intrínseca y la adquirida. La primera es un fenómeno natural independiente de la exposición a los antibióticos y se encuentra dentro del genoma de las bacterias y se debe a la ausencia o presencia de determinadas estructuras que provocan la ineficacia de los antibióticos. Por ejemplo, en las bacterias Gram (-), la falta de permeabilidad de su membrana externa evita que algunos antibióticos ingresen o se acumulen dentro de la célula, provocando así la ineficacia del agente antimicrobiano, como es el caso de la vancomicina, un glucopéptido que actúa en la pared celular y que no puede ingresar a través de la membrana externa de este tipo de bacterias<sup>3,5</sup>.

Por otro lado, la resistencia adquirida ocurre cuando una bacteria previamente sensible adquiere un mecanismo de resistencia ya sea por mutaciones o por la adquisición de material genético de una fuente exógena (transferencia horizontal de genes) por transducción, conjugación y/o transformación<sup>3</sup>.

Como se mencionó en los párrafos anteriores, si bien la RAM es un fenómeno inherente a los microorganismos, su prevalencia se ve exacerbada principalmente por las deficiencias en la prevención y el control de infecciones, así como el uso

generalizado, excesivo e imprudente de los antibióticos en humanos, la agricultura y la ganadería.<sup>1,6</sup> Además, la propagación de la RAM se ve favorecida por la existencia de múltiples reservorios ambientales contaminados (suelo, agua, desechos hospitalarios, industriales, agrícolas y nichos ecológicos)<sup>4</sup>, por lo que su erradicación o control requiere de esfuerzos multidisciplinarios<sup>3</sup>.

Actualmente, el aumento de la RAM en bacterias patógenas humanas y la escasez de nuevos fármacos antimicrobianos han convertido este problema en una grave amenaza para la salud pública a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 1.3 millones de personas mueren cada año en todo el mundo como consecuencia directa de la RAM, cifra que se prevé seguirá incrementando hasta los 10 millones de decesos por año para el año 2050, superando a la diabetes, las enfermedades cardíacas y el cáncer como la principal causa de muerte en humanos<sup>7</sup>. Ahora bien, el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos o el descubrimiento de nuevas entidades químicas con mecanismos de acción inusuales se encuentra aletargado desde hace algunas décadas. Así, de los 32 antibióticos en fase de desarrollo clínico contra la lista de la OMS de patógenos prioritarios publicada en el 2019, solo seis se clasificaron como innovadores. En este contexto, se requiere de inversiones urgentes y concertadas por parte de los gobiernos y el sector privado para acelerar la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos y ampliar la oferta de antibióticos ante el problema de la RAM<sup>8</sup>.

## **1.2. *Staphylococcus aureus*: un patógeno de importancia médica**

Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) se han convertido en una de las principales causas de infecciones comunitarias y hospitalarias<sup>9</sup>. Es uno de los patógenos oportunistas más comunes: aproximadamente entre el 20% y el 30% de las personas sanas son portadoras de *S. aureus*, formando parte de la microbiota normal de la piel y de la mucosa nasal; sin embargo, cuando las mucosas y barreras cutáneas se encuentran dañadas, *S. aureus* puede acceder a los tejidos subyacentes o al torrente sanguíneo y causar infecciones graves<sup>10</sup>. Particularmente, las personas con dispositivos médicos

invasivos (como catéteres venosos centrales y periféricos) o con un sistema inmune comprometidos son más vulnerables a las infecciones por esta bacteria<sup>11</sup>.

*Staphylococcus aureus* ha adquirido resistencia a la meticilina a través del cassette cromosómico estafilocócico *mec* (SCC *mec*), un elemento genético móvil que codifica los genes *mec A* o *mec C*, confiriéndole resistencias a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos<sup>11</sup>. Por ejemplo, el gen *mec A* codifica una proteína fijadora de penicilina (PBP2a) de baja afinidad a la meticilina y al resto de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, lo que impide el ingreso de este tipo de antibióticos al interior de la célula bacteriana para ejercer el efecto antimicrobiano<sup>12</sup>.

Además, MRSA presenta un extenso arsenal de factores de virulencia que favorecen su patogenicidad y su diseminación dentro del huésped, algunos de estos factores son la producción de proteínas superficiales que inician la adherencia bacteriana, la secreción de toxinas y enzimas extracelulares que destruyen las células y los tejidos, la formación de biopelículas que hace que MRSA tenga una mayor tolerancia a los antibióticos al dificultar la penetración de éstos<sup>10</sup>, y la evasión o inactivación del sistema inmunitario del huésped, entre otros<sup>13</sup>.

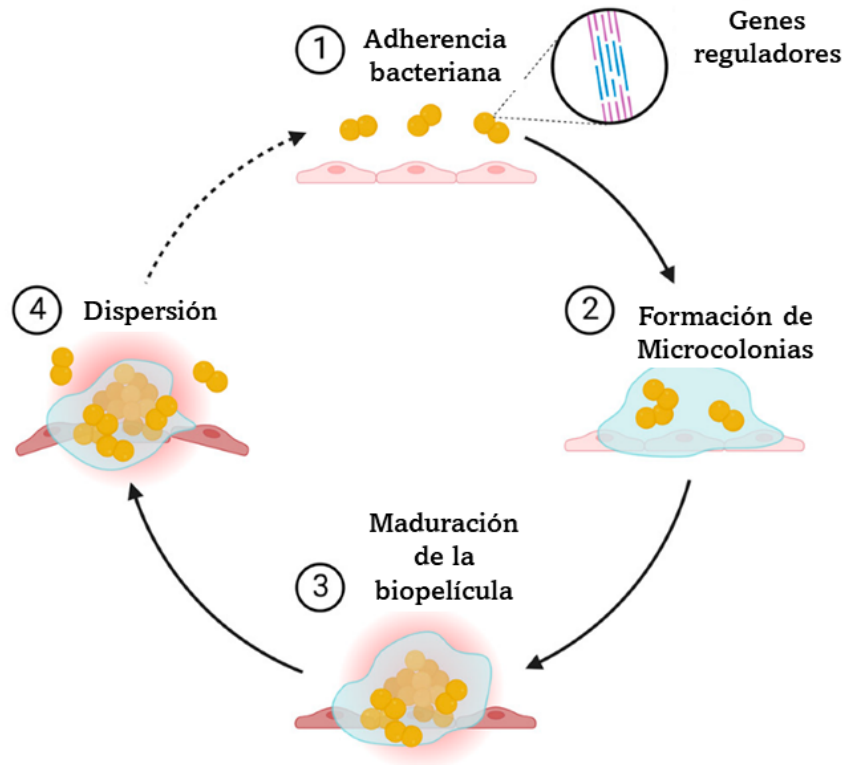
### **1.3. Quorum sensing y la formación de biopelículas**

El quorum sensing (QS) es un método de comunicación intercelular que implica la producción, detección y respuesta a moléculas de señalización llamadas autoinductores, que en concentraciones estimulantes regulan la expresión génica<sup>10</sup>. La producción de factores de virulencia por bacterias patógenas está bajo el control del QS<sup>14</sup>, y en el caso particular de MRSA, el QS es responsable de regular la producción de toxinas, la formación de biopelículas<sup>15</sup> y la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las cuales mantienen la arquitectura básica de la matriz de la biopelícula, además de formar el escudo de defensa para el patógeno dentro de la misma<sup>16</sup>. Asimismo, esta bacteria produce señales químicas con una función autoinductora que regula el sistema regulador de genes accesorios (*agr*), el cual es responsable de modular factores de virulencia como adhesinas, elastasas,

proteasas, lipasas y exotoxinas<sup>15</sup>, formación de biopelículas y resistencia a los antibióticos<sup>17</sup>.

La formación de biopelículas implica la adsorción de macro y micromoléculas a la superficie, la adhesión bacteriana a la superficie, la formación y liberación de EPS, la formación de colonias y la maduración de la biopelícula<sup>9</sup>. La formación y el desarrollo de la biopelícula incluye cuatro etapas<sup>10</sup> (**Figura 1**):

- (i) *Fijación: Staphylococcus aureus* se adhiere a una superficie biótica o abiótica utilizando diferentes mecanismos que involucran adhesinas, ácidos teicoicos, cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular bacteriana y producción de ADN extracelular.
- (ii) *Síntesis de matriz extracelular con proliferación bacteriana*: Después de la unión, las células bacterianas proliferan en la superficie formando microcolonias.
- (iii) *Estructuración de la biopelícula*: Durante la proliferación y la maduración de la biopelícula, las células bacterianas se mantienen unidas por factores adhesivos en la nueva matriz. La remodelación de la biopelícula se produce a través de factores disruptivos, que incluyen tensioactivos y nucleasas, que son esenciales para la estructura tridimensional de la biopelícula madura con sus torres y canales distintivos.
- (iv) *Desprendimiento celular*: Durante el desmontaje de la biopelícula, el desprendimiento de células es causado principalmente por una degradación de la matriz de la biopelícula impulsada por proteasas y la interrupción de la biopelícula por las modulinas solubles en fenol (PSM). Este proceso permite que las bacterias se dispersen en la superficie de otras células y así comenzar de nuevo el ciclo de la formación de biopelículas.



**Figura 1.** Formación de la biopelícula en *S. aureus*. Adaptado de Tuon F, et al.<sup>10</sup>

La formación de biopelículas por parte de MRSA en dispositivos médicos como prótesis, lentes de contacto, catéteres venosos centrales y urinarios, tubos endotraqueales y válvulas cardíacas artificiales, representan un gran desafío ya que están asociadas con infecciones crónicas. Se ha demostrado que la matriz de EPS que queda después de la muerte de las bacterias puede promover la recolonización de la superficie, ya sea por la misma u otras especies bacterianas, provocando la recurrencia de la infección y otras complicaciones<sup>10</sup>.

Cuando las bacterias se encuentran dentro de las biopelículas son hasta 1000 veces más tolerantes a los antimicrobianos y al sistema inmunitario del huésped en comparación a las células planctónicas, aparte de que en estas condiciones se ve favorecido el desarrollo de RAM a través del intercambio de genes de resistencia<sup>18</sup>.

Lo anterior, combinado con los demás factores de virulencia que presenta MRSA, hace que sea uno de los patógenos más difíciles de tratar ya que se requieren altas



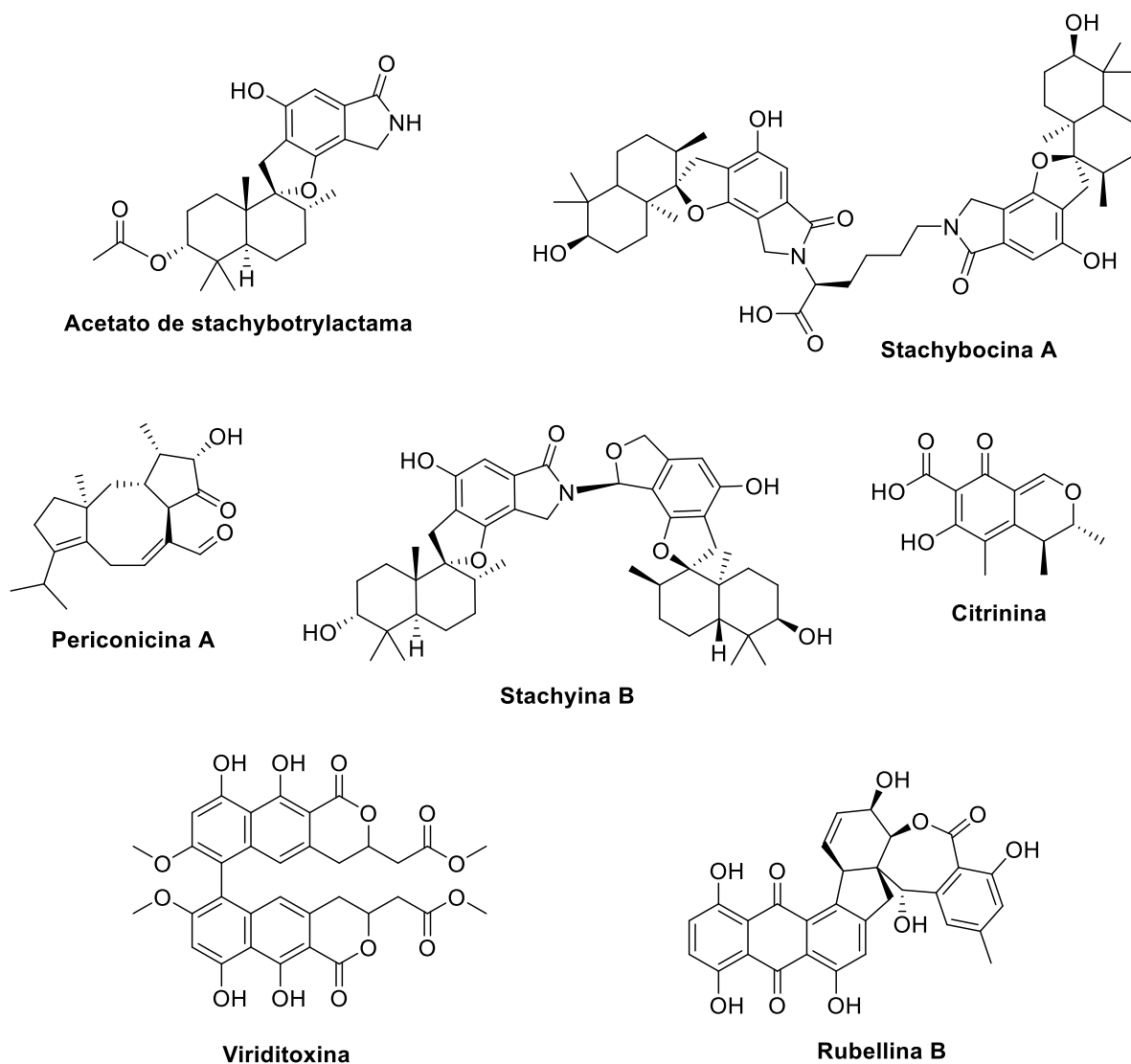
dosis del agente antimicrobiano, así como tratamientos prolongados, provocando efectos secundarios en la salud, por lo que el desarrollo de nuevas terapias en vista de la resistencia a múltiples fármacos es urgente.

#### **1.4. Importancia de los productos naturales para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus***

Los productos naturales (PN) son metabolitos secundarios presentes en animales, plantas y microorganismos<sup>19</sup>. Estas sustancias han sido históricamente muy importantes en el descubrimiento de fármacos debido a su alta diversidad molecular y sus propiedades farmacológicas novedosas<sup>20</sup>.

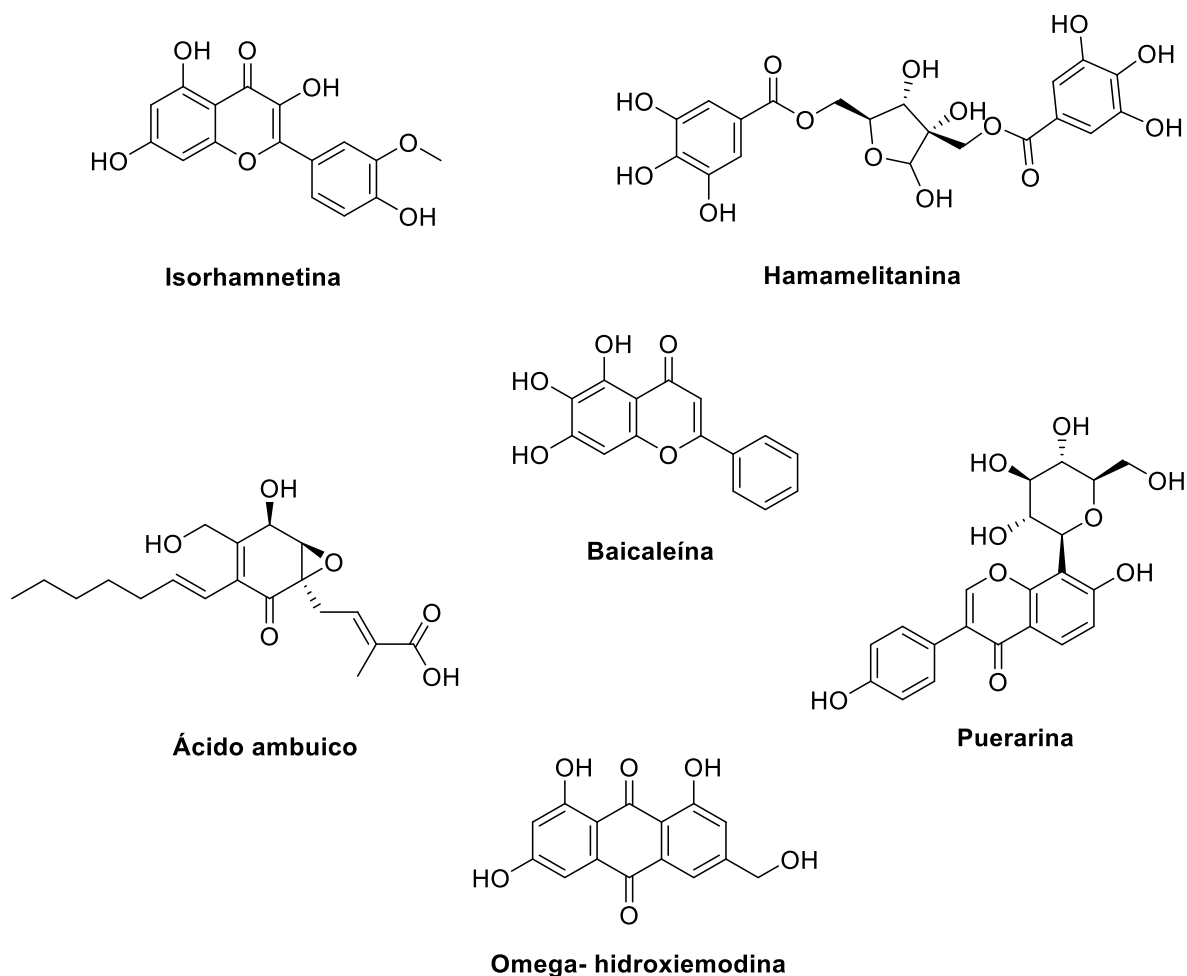
Desde la antigüedad, los PN se han utilizado para tratar enfermedades. A principios de 1900, aproximadamente el 80% de todos los medicamentos se obtenían de fuentes vegetales, sin embargo, el descubrimiento de la penicilina en 1928 marcó un cambio significativo en el estudio de microorganismos en lugar de las plantas como fuente de PN. Desde entonces, los compuestos derivados de microorganismos son los más empleados en medicina, agricultura, industria alimentaria e investigación científica<sup>21</sup>.

Haciendo énfasis en los PN con actividad antimicrobiana, se ha observado que están principalmente dirigidos a inhibir el crecimiento bacteriano al reducir su patogenicidad<sup>9</sup>. Algunos ejemplos de PN que han mostrado actividad antimicrobiana muy importante contra *S. aureus* son los fenilespirodrimanos producidos por los hongos del género *Stachybotrys* como el acetato de stachybotrylactama<sup>22</sup>, la stachyina B<sup>23</sup> y la stachybocina A<sup>24</sup>; la rubellina B aislada del hongo *Ramularia collo-cygni*; la periconicina A, la citrinina y la viriditoxina también obtenidos a partir de hongos<sup>25</sup>, entre otros (**Figura 2**).



**Figura 2.** Ejemplos de PN con actividad antimicrobiana.

Además, los PN que presentan propiedades antitoxinas y antibiopelícula a través de la interferencia con el sistema del QS son de gran relevancia ya que no afectan el crecimiento bacteriano y, por lo tanto, su uso podría reducir la RAM<sup>17</sup>. Algunos ejemplos de compuestos naturales que se dirigen al sistema *agr*-QS son la baicaleína y la hamamelitanina, ambos aislados de plantas<sup>16</sup>; la isorhamnetina, abundante en hierbas y plantas medicinales, así como en frutas; la puerarina, componente principal bioactivo de la raíz de *Pueraria lobate* Ohwi<sup>17</sup>; la omega-hidroxiemodina<sup>26</sup> aislada de *Penicillium restrictum* y el ácido ambuico<sup>27</sup> (**Figura 3**).



**Figura 3.** Ejemplos de productos naturales con actividad contra el QS.

Como se ha mencionado en los apartados anteriores, el éxito de las infecciones provocadas por MRSA es una consecuencia del extenso arsenal de factores de virulencia que presenta, entre ellos la formación de biopelículas regulada por el QS, la cual favorece la evasión inmunitaria y la persistencia en el huésped, así como la adquisición de RAM. Actualmente, los tratamientos convencionales ya no son suficientes para combatir las infecciones provocadas por esta bacteria, por lo que el desarrollo de nuevas terapias es urgente. Una de las estrategias más prometedoras, ya que su finalidad es coadyuvar y mejorar el efecto de los antibióticos actuales, es el desarrollo de agentes con actividad antibiopelícula<sup>26</sup>. Así, este proyecto busca establecer el potencial antibiopelícula *in vitro* de una serie de fenilspirodrimanos aislados a partir del hongo *Alfaria* sp. que previamente mostraron actividad

antimicrobiana significativa, además de poseer estructuras químicas novedosas que pudieran servir de base para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos<sup>28</sup>.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es obtener cantidades adicionales de una serie de fenilespirodrimanos previamente aislados en el grupo de trabajo a partir del hongo *Alfaria* sp (ORO3), con la finalidad de realizar ensayos *in vitro* destinados a establecer su posible modo de acción como antimicrobianos contra MRSA y MSSA. Cabe señalar que durante este proceso no se descarta el aislamiento de compuestos novedosos y/o que no hubiesen sido descritos previamente en el organismo de estudio o en la literatura especializada.

### 2.2. Objetivos particulares

Con la finalidad de cumplir el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Acondicionar y cultivar en mediana escala el hongo *Alfaria* sp (ORO3).
2. Preparar el extracto orgánico de dicho cultivo y realizar su fraccionamiento primario mediante cromatografía de tipo flash.
3. Analizar las fracciones obtenidas por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) y de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS) para la identificación de los compuestos de interés en las fracciones obtenidas.
4. Separar por HPLC a nivel preparativo los compuestos identificados y confirmar su identidad mediante el análisis de sus propiedades espectrométricas y espectroscópicas.
5. Establecer el potencial antimicrobiano de los compuestos aislados contra MSSA y MRSA en el ensayo de microdilución en placas de 96 pozos con MTT.
6. Evaluar el potencial antibiopelícula de los compuestos aislados contra MRSA en el ensayo de cristal violeta.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1. Acondicionamiento y cultivo del microorganismo a mediana escala**

En primer lugar, se verificó la viabilidad y pureza del hongo *Alfaria* sp. (ORO3) mediante cultivos sucesivos en cajas de Petri con medio agar papa dextrosa (APD) a partir de las cepas en conservación. Posteriormente, a partir de los cultivos axénicos, se prepararon preinóculos en 15 mL en medio líquido YESD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona de soya y 2% de dextrosa) en presencia de sales marinas artificiales (Instant Ocean Salts, 32 g/L), los cuales se mantuvieron en agitación constante por 5 días a 100 rpm y con fotoperiodos de luz-oscuridad de 12/12 horas. Posteriormente, cada uno de los preinóculos se vertieron sobre matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio de arroz estéril (30 matraces con 15 g arroz y 30 mL de agua), donde permanecieron en incubación por 21 días en condiciones estáticas, temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz-oscuridad de 12/12 horas.

#### **3.2. Preparación de los extractos orgánicos**

Al término del periodo de crecimiento del hongo, se preparó el extracto orgánico de los cultivos mediante un proceso de maceración y partición. Para ello, a cada matraz se adicionaron 60 mL de una mezcla  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1), el cultivo se fragmentó mecánicamente con la ayuda de una espátula y se dejó macerando en agitación constante (100 rpm) durante 8 horas. Pasado este tiempo, la mezcla se filtró al vacío y al filtrado se agregaron 60 mL de  $\text{CHCl}_3$  y agua hasta un volumen final de 200 mL. La fase orgánica se separó en un embudo de separación y la fase acuosa se extrajo de nuevo utilizando 60 mL de  $\text{CHCl}_3$ . Las fases orgánicas se reunieron y concentraron a sequedad a presión reducida. Finalmente, la fase orgánica se resuspendió con 60 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$ -MeOH (1:1) y se sometió a un desgrase con 60 mL de hexano en un embudo de separación. El extracto de  $\text{CH}_3\text{CN}$ -MeOH se secó

al vacío y se almacenó a temperatura ambiente. La cantidad de extracto obtenida fue de 5.6 g.

### **3.3. Fraccionamiento primario del extracto orgánico**

El fraccionamiento primario del extracto obtenido en el inciso anterior se realizó en un cromatógrafo CombiFlash Rf+ Lumen (Teledyne ISCO), equipado con los detectores de UV/visible con arreglo de fotodiodos (PDA; barrido entre 190-500 nm) y de dispersión de luz evaporativo (ELSD), una bomba binaria y un colector de fracciones. Como fase estacionaria se utilizó una columna empacada con gel de sílice (RediSep Rf Gold Si-gel) y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre Hex, CHCl<sub>3</sub>, AcOEt y MeOH. Cabe mencionar que, debido a la cantidad de extracto obtenida, se realizaron dos fraccionamientos primarios de 2.5 g cada uno con las siguientes condiciones: gel de sílice, 65 g; flujo: volumen de columna, 38.1 mL; volumen de fracción, 20 mL y tiempo de corrida, 86.7 min. Los conjuntos de fracciones se reunieron con base en los perfiles en el UV y ELSD (**Figura 5**), obteniéndose un total de 13 fracciones (**Tabla 2**). Todas las fracciones fueron analizadas en el UPLC Acquity (Waters) equipado con los detectores de PDA y ELSD, y acoplado con un espectrómetro de masas de baja resolución de ionización por electrospray (LRESIMS). A partir de los resultados de los perfiles de UV y los valores de masa obtenidos en los modos ESI + y ESI-, se identificó la presencia de los compuestos a purificar en 6 de las 13 fracciones obtenidas (F4, F5, F7, F8, F10 y F11).

### **3.4. Fraccionamiento secundario de F7, F8, F10 y F11**

Con base en la complejidad observada en el UPLC y el rendimiento obtenido de F7, F8, F10 y F11 (**Tabla 2**), se realizó un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo Flash utilizando como fase estacionaria gel de sílice (RediSep Rf Gold Si-gel) y como fase móvil un gradiente de polaridad creciente entre CHCl<sub>3</sub>, AcOEt y MeOH. Las condiciones de análisis para cada fracción se resumen en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.** Condiciones de análisis por cromatografía en columna tipo Flash.

Muestra	Peso (g)	Gel de sílice (g)	Volumen de fracción (mL)	Flujo (mL/min)	Tiempo de corrida (min)	Volúmenes por columna
F7	1.1	65	25	55	36.2	43
F8	0.57	65	25	55	21.1	43.1
F10	0.21	24	18	35	28	45
F11	0.17	24	18	35	30.2	45

### 3.5. Separación y purificación de los compuestos presentes en las fracciones

Las fracciones secundarias obtenidas de la separación indicada en el inciso anterior fueron analizadas mediante UPLC-LRESIMS. Aquellas que revelaron la presencia de los compuestos de interés, se sometieron a un proceso de optimización para establecer las condiciones de separación por HPLC a nivel analítico en un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Waters) equipado con una bomba cuaternaria, inyector automático, detectores de PDA ( $\lambda_{\text{máx}}$  190-500 nm) y de ELSD (ganancia 100, presión de N<sub>2</sub> 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y temperatura del tubo de 75±5°C) y colector de fracciones. El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizaron empleando el programa Empower 3.0 (Waters). La columna empleada fue una Gemini C<sub>18</sub> (5 µm, 250 × 4.6 mm, Phenomenex) y una fase móvil compuesta por ácido fórmico acuoso (0.1%) y CH<sub>3</sub>CN en diferentes gradientes de polaridad para cada fracción analizada. Una vez establecidas las condiciones de separación con la resolución adecuada que permitiera el aislamiento de los compuestos mayoritarios, se escaló el sistema de análisis a nivel preparativo empleando una columna Gemini C<sub>18</sub> (5 µm, 250 × 21.2 mm, Phenomenex) con un flujo de 21.24 mL/min.

### 3.6. Caracterización estructural de los metabolitos aislados

La caracterización química de los compuestos aislados se realizó mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se registraron en los equipos de



400 MHz (JEOL ECS-400, Varian VNMRS-400 o Bruker Avance III) y 600 MHz (JEOL ECA-600). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm y se emplearon los disolventes  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{DMSO-}d_6$  y acetona- $d_6$  para los registros. Por otra parte, los espectros de masas se registraron en un UPLC equipado con un detector de PDA ( $\lambda$  200-500 nm) y acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución de ionización por electrospray (HRESIMS-MS/MS; Q Exactive, ThermoFisher Scientific) en los modos ESI+ y ESI-. La muestra se introdujo al equipo utilizando una columna BEH  $\text{C}_{18}$  (1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$ 10 mm, Waters) y una fase móvil compuesta por una mezcla binaria de  $\text{CH}_3\text{CN}$  con ácido fórmico (0.1%) (A) y ácido fórmico (0.1%) (B), utilizando un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% (A) e incrementando la composición hasta 100% (A) en 8 min, luego un sistema isocrático por 1.5 min y regresando a condiciones iniciales en 0.5 min con un flujo de 0.3 mL/min. Las condiciones del HRESIMS fueron: en ESI+, temperatura del capilar, 275 °C, voltaje de la fuente 4.5 kV, voltaje del capilar 20 V y voltaje de la lente del tubo, 95 V; en ESI-, temperatura del capilar, 275 °C, voltaje de la fuente 3.5 kV, voltaje del capilar 42 V y voltaje de la lente del tubo 110 V. Como gas acarreador se empleó  $\text{N}_2$  a 25 unidades arbitrarias de flujo, el control del instrumento y el análisis de los datos se realizaron con el programa Xcalibur 2.1 (ThermoFisher Scientific). Para cada uno de los análisis se disolvió 1.0 mg de muestra en 0.5 mL de una mezcla de Dioxano-MeOH (1:1).

### **3.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos**

La actividad antimicrobiana inicial de los compuestos aislados se determinó empleando el método de microdilución con el colorante bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), en placas de 96 pozos, contra los microorganismos de prueba: *S. aureus* ATCC 25923 susceptible a meticilina (MSSA) y *S. aureus* ATCC 43300 resistente a meticilina (MRSA). La evaluación se realizó a las concentraciones de 10  $\mu\text{g/mL}$  y 100  $\mu\text{g/mL}$ <sup>28</sup>. Con base en los resultados obtenidos, en este trabajo se estableció la concentración mínima

inhibitoria (CMI) de los compuestos contra MSSA y MRSA empleando distintas concentraciones entre 1 µg/mL y 100 µg/mL.

De manera general, en las placas de 96 pozos se colocaron 50 µL de la solución de cada compuesto de prueba a las concentraciones entre 0.05 mg/mL y 0.5 mg/mL (10% de DMSO en medio de cultivo). Posteriormente, se adicionaron 100 µL de caldo Müller-Hinton (MHB) y 100 µL de la suspensión de los microorganismos a evaluar ajustadas al 0.5% del estándar de McFarland. Posteriormente, la placa se incubó por 24 horas a 37°C, y una vez transcurrido este tiempo, se adicionaron 10 µL de la solución reveladora de MTT (5 mg/mL en MeOH) a cada pozo. Finalmente, la placa se incubó nuevamente durante 30 min a 37°C y la actividad de los compuestos se determinó midiendo la absorbancia de cada pozo a una longitud de onda de 490 nm y 608 nm en un espectrofotómetro.

El % de inhibición del crecimiento se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left( 100 - \frac{Abs_{células+muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{células+DMSO \text{ al } 10\%} - Abs_{blanco}} \right) * 100$$

Como controles positivos se emplearon ampicilina y vancomicina para MSSA y MRSA, respectivamente, mientras que como controles negativos se utilizó medio MHB y medio con 2% v/v de DMSO.

### **3.8. Evaluación de la actividad antibiopelícula de los compuestos**

La inhibición de la formación de las biopelículas de MRSA de los compuestos se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Garcia-Lara et al<sup>29</sup>. Brevemente, la cepa MRSA 43300 ATCC se sembró en agar sal manitol con la técnica de estría cruzada y se incubó a 37°C por 24 h. Los precultivos se iniciaron con una unidad formadora de colonias en medio Luria Bertani (LB) y se mantuvieron a 200 rpm y a 37°C por 24 h. Posteriormente, el crecimiento se determinó midiendo la densidad

óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) de una dilución 1:10 v/v del precultivo en agua destilada estéril.

El ensayo de formación de biopelículas se realizó en microplacas de 48 pozos. En un volumen final de 1000  $\mu$ L de medio LB se sembró la cepa MRSA a una  $DO_{600}$  inicial de 0.05. Enseguida, se agregaron los compuestos de interés a 16  $\mu$ g/mL y 64  $\mu$ g/mL y los cultivos se mantuvieron en incubación por 24 h a 37°C. Al término del periodo de incubación, se midió la  $DO_{600}$  para medir el crecimiento bacteriano planctónico. Enseguida, se eliminó el sobrenadante, los pozos fueron lavados con 1 mL de agua destilada y las biopelículas fueron fijadas con 1 mL de MeOH absoluto por 20 min. Transcurrido el tiempo, el MeOH se desechó y las biopelículas se dejaron secar para ser teñidas con 1 mL solución cristal violeta al 1%, dejando en incubación por 40 min. El colorante fue eliminado y los pozos se lavaron con agua destilada. El cristal violeta fijado en las biopelículas se disolvió con 1 mL de EtOH absoluto, incubando la placa durante 20 minutos a 37°C. Finalmente, se midió la absorbancia de una alícuota 1:10 en agua a 570 nm en un lector de microplaca a 630 nm. Como control positivo se empleó diclofenaco sódico a 60  $\mu$ g/mL y como negativos se utilizaron medio LB y medio con 2% v/v de DMSO. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

### **3.9. Análisis estadístico**

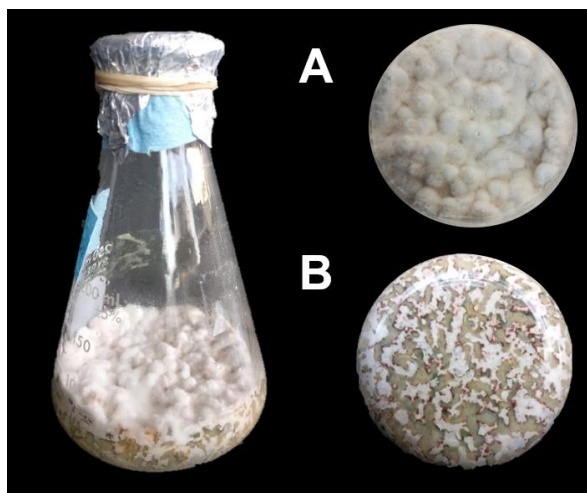
Los resultados de la actividad antimicrobiana de los compuestos fueron analizados usando un ANOVA de una vía con el programa GraphPad Prism v.9.4.1. Por otra parte, los resultados del crecimiento e inhibición de las biopelículas fueron analizados usando la prueba de comparación múltiple de medias de Dunnett con  $p \leq 0.5$  con el mismo programa estadístico.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

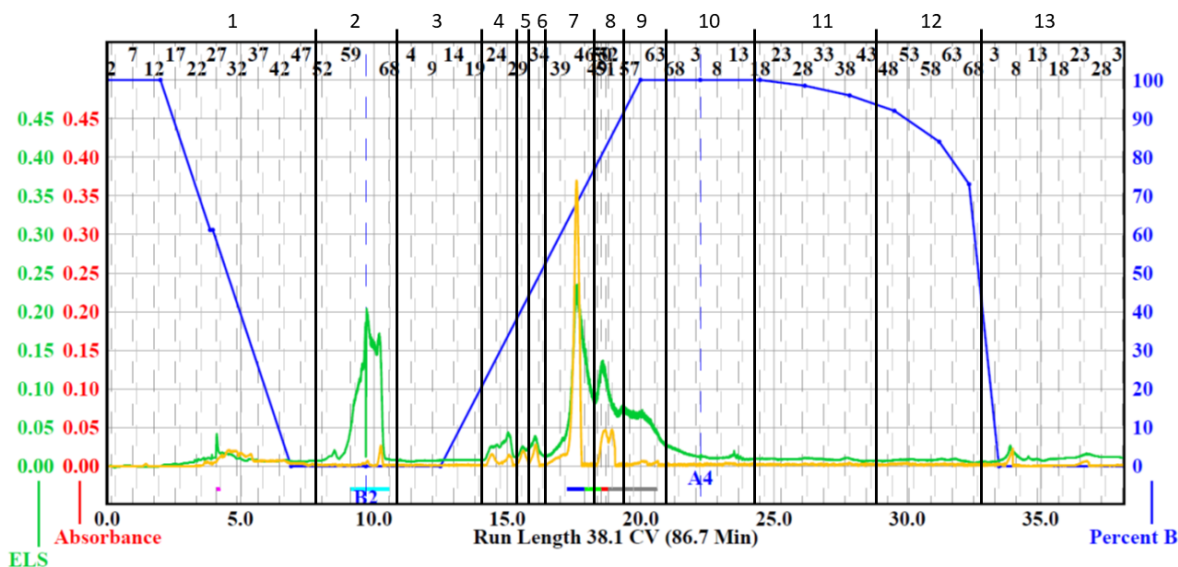
La presente investigación forma parte de un proyecto enfocado en la búsqueda y evaluación biológica del mecanismo de acción de nuevos compuestos aislados a partir de *Alfaria* sp. que presentan actividad antimicrobiana contra MSSA y MRSA. En primer lugar, se presentan los resultados obtenidos del aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios de interés, posteriormente se describe la evaluación de su potencial antimicrobiano y actividad antibiopelícula.

### 4.1. Cultivo en mediana escala y fraccionamiento primario

Una vez verificada la viabilidad del hongo se procedió a la preparación del cultivo a mediana escala. En la **Figura 4** se muestra la apariencia física del cultivo en el medio sólido. Al término del periodo de crecimiento, se preparó el correspondiente extracto orgánico siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.2 obteniéndose 5.6 g de extracto. El fraccionamiento primario se realizó mediante una cromatografía tipo Flash como se indicó en la sección experimental (inciso 4.3). Los resultados de este análisis se ilustran en la **Figura 5** y en la **Tabla 2**.



**Figura 4.** Cultivo en medio de arroz a mediana escala del hongo ORO3: reverso (A) y anverso (B).



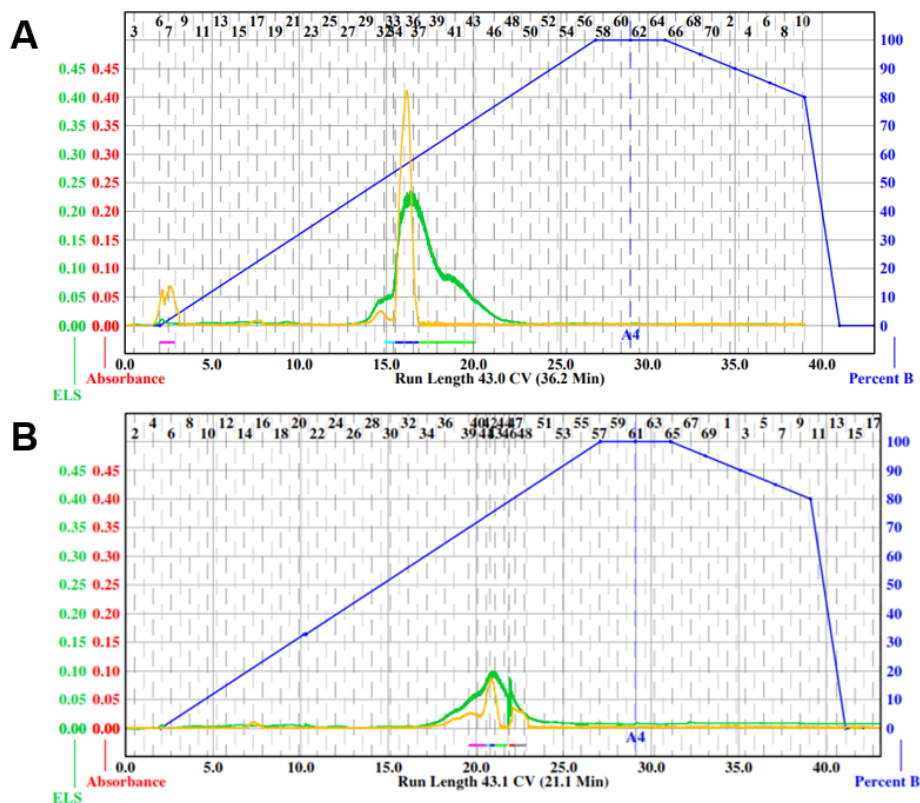
**Figura 5.** Fraccionamiento primario del extracto de *Alfaria* sp. Las líneas amarillas y verdes corresponden a las señales del detector de PDA y ELSD, respectivamente; la línea azul corresponde al gradiente de elución (Hex-CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-MeOH).

**Tabla 2.** Fraccionamiento primario del extracto de *Alfaria* sp.

Fracción	Clave	Peso (mg)	Fracción	Clave	Peso (mg)
1-50	F1	27.2	119-123	F8	637.1
51-70	F2	477.5	124-135	F9	762.0
71-90	F3	22.3	136-155	F10	245.0
91-98	F4	98.5	156-185	F11	214.5
99-101	F5	55.8	186-210	F12	176.9
102-105	F6	106.2	211-final	F13	200.9
106-118	F7	1,209.5	<b>Cantidad recuperada</b>		4,233.4
			<b>%Recuperado</b>		83.31%

#### 4.2. Fraccionamiento secundario de las fracciones F7, F8, F10 y F11

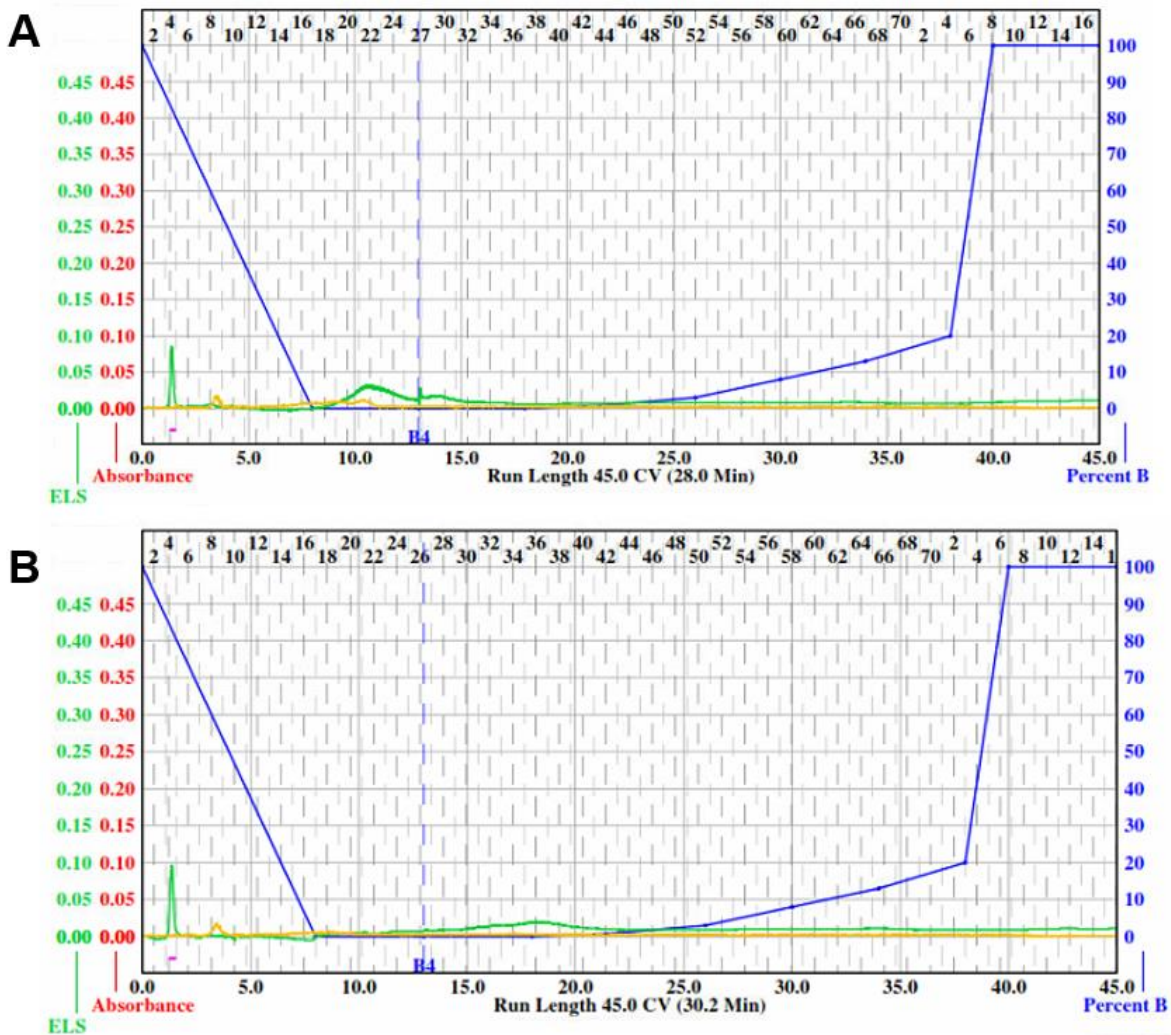
Como se mencionó anteriormente, las fracciones F7 (1,209.5 mg), F8 (637.1 mg), F10 (245.0 mg) y F11 (214.5 mg) se sometieron a un fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo Flash siguiendo la metodología descrita en 4.4. Las fracciones obtenidas de F7 y F8 se muestran en la **Figura 6** y **Tabla 3**, mientras que las de F10 y F11 en la **Figura 7** y **Tabla 4**. Todas las fracciones se reunieron con base en los perfiles en el UV y ELSD.



**Figura 6.** Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo Flash de las fracciones primarias F7 (A) y F8 (B). Las líneas amarillas y verdes corresponden a las señales del detector de PDA y ELSD, respectivamente; la línea azul corresponde al gradiente de elución (CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-MeOH).

**Tabla 3.** Fraccionamiento secundario de las fracciones primarias F7 y F8 del hongo ORO3.

Fracción F7				Fracción F8			
Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)
F7 <sub>1</sub> (1-14)	9.3	F7 <sub>5</sub> (34-36)	395.0	F8 <sub>1</sub> (1-13)	4.6	F8 <sub>5</sub> (26-40)	194.9
F7 <sub>2</sub> (15-18)	1.9	F7 <sub>6</sub> (37-39)	329.6	F8 <sub>2</sub> (14-16)	1.8	F8 <sub>6</sub> (41-43)	122.5
F7 <sub>3</sub> (19-26)	9.1	F7 <sub>7</sub> (40-51)	254.0	F8 <sub>3</sub> (17-22)	3.3	F8 <sub>7</sub> (44-54)	91.7
F7 <sub>4</sub> (27-33)	96.9	F7 <sub>8</sub> (52- final)	46.1	F8 <sub>4</sub> (23-25)	1.7	F8 <sub>8</sub> (55- final)	47.7
<b>Cantidad recuperada</b>			<b>1,141.9</b>	<b>Cantidad recuperada</b>			<b>468.2</b>
<b>Recobro</b>			<b>103</b>	<b>Recobro</b>			<b>82.5</b>



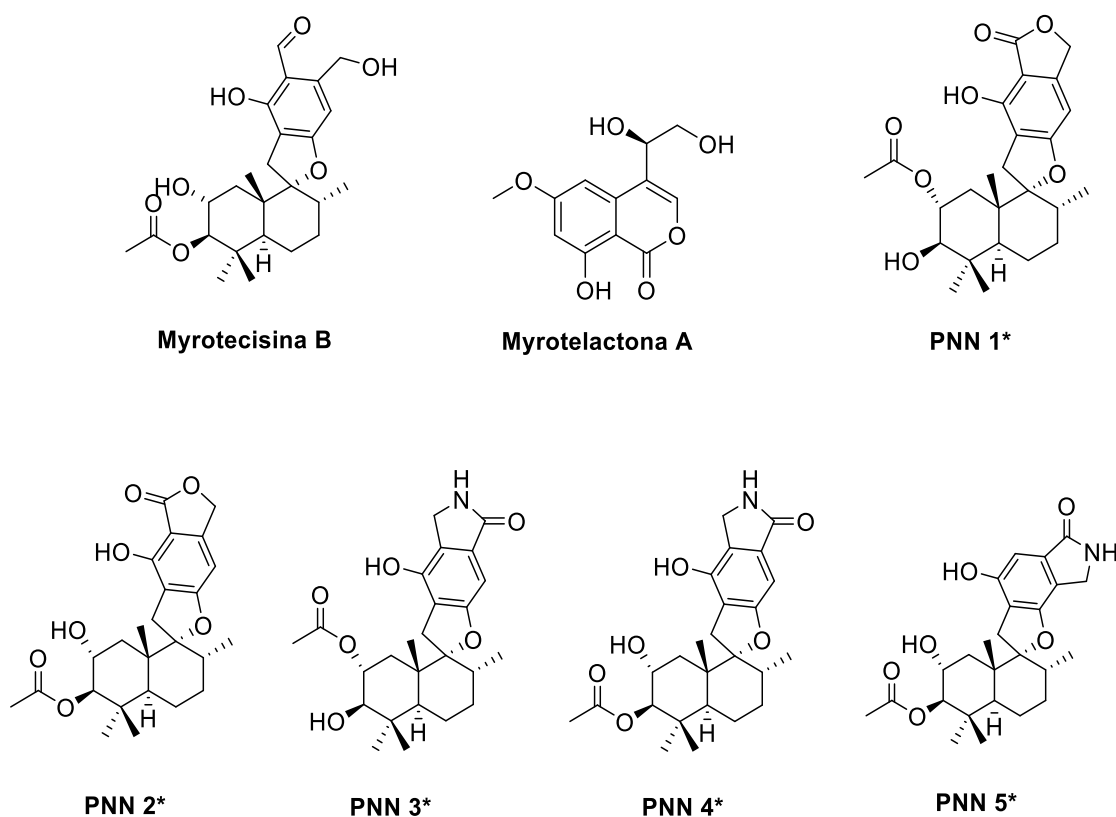
**Figura 7.** Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna tipo Flash de las fracciones primarias F10 (A) y F11 (B). Las líneas amarillas y verdes corresponden a las señales del detector de PDA y ELSD, respectivamente; la línea azul corresponde al gradiente de elución ( $\text{CHCl}_3$ -AcOEt-MeOH).

**Tabla 4.** Fraccionamiento secundario de las fracciones primarias F10 y F11 del hongo ORO3.

Fracción F10				Fracción F11			
Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)	Fracción	Peso (mg)
F10 <sub>1</sub> (1-5)	10.1	F10 <sub>4</sub> (27-32)	33.9	F11 <sub>1</sub> (1-5)	14.6	F11 <sub>6</sub> (46-61)	19.7
F10 <sub>2</sub> (6-15)	11.2	F10 <sub>5</sub> (33-final)	54.5	F11 <sub>2</sub> (6-15)	9.7	F11 <sub>7</sub> (62-69)	13.2
F10 <sub>3</sub> (16-26)	105.3			F11 <sub>3</sub> (16-26)	22.1	F11 <sub>8</sub> (70-76)	5.7
<b>Cantidad recuperada</b>			215.0	F11 <sub>4</sub> (27-34)	40.6	F11 <sub>9</sub> (77- final)	3.5
<b>Recobro</b>			103.0	F11 <sub>5</sub> (35-45)	45.7		
						<b>Cantidad recuperada</b>	174.8
						<b>Recobro</b>	103.0

### 4.3. Separación y purificación de los metabolitos presentes en las fracciones seleccionadas

Los resultados de los perfiles en el UV, tiempo de retención y los valores de masa obtenidos en los modos ESI + y ESI- del análisis por HPLC y UPLC-MS de las fracciones primarias y secundarias, y su comparación con los reportados previamente<sup>28</sup>, permitió identificar la presencia de los compuestos de interés (**Figura 8**) en las fracciones F4, F5, F7<sub>5</sub>, F8<sub>5</sub>, F8<sub>6</sub>, F10<sub>4</sub>, F11<sub>4</sub>.



**Figura 8.** Compuestos de interés para ser aislados. PNN\* (producto natural novedoso aislado y caracterizado por López, L. M.<sup>28</sup>)

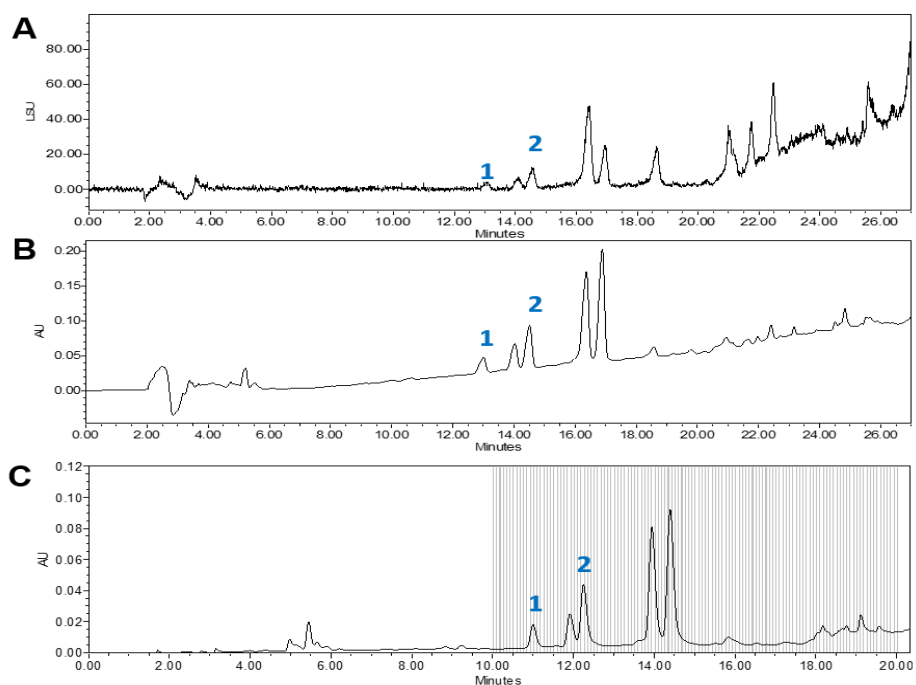
La separación y purificación de los componentes individuales se realizó mediante HPLC, siguiendo un proceso de optimización de las condiciones de separación mediante HPLC a nivel analítico, y su escalamiento a a nivel semi y/o preparativo. Así, a partir de la fracción F4 se aislaron los compuestos **1** y **2** (**Figura 9**); de la fracción F5 se obtuvieron cantidades adicionales del producto **2** (**Figura 10**); de la



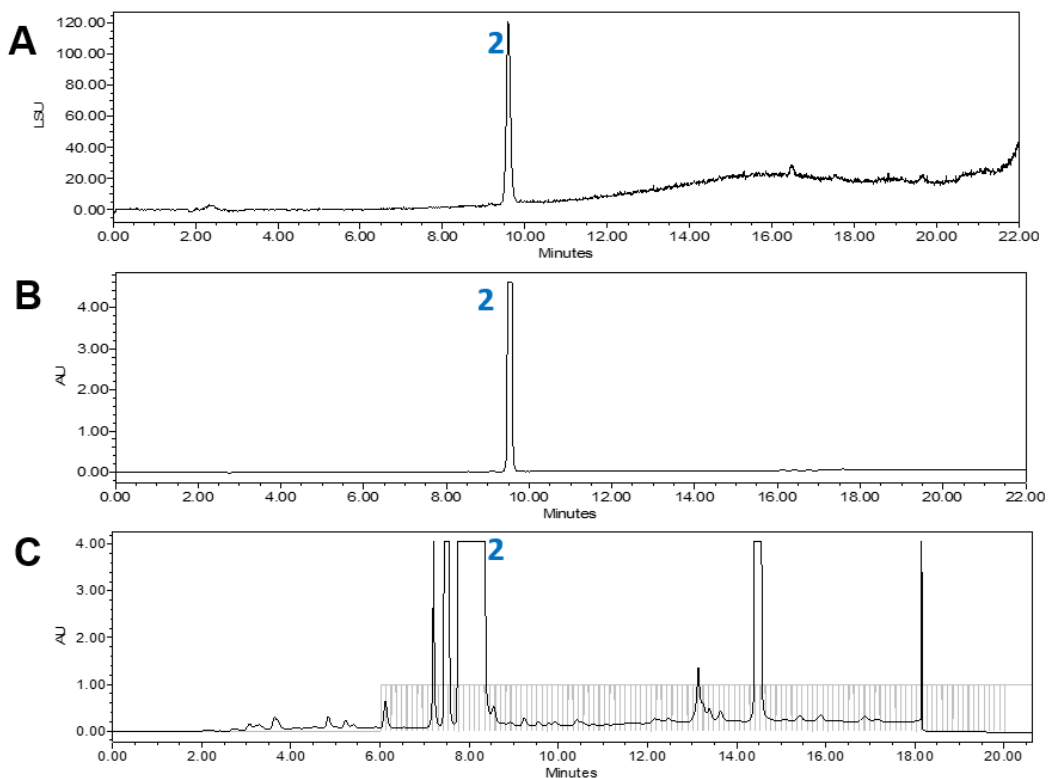
fracción F7<sub>5</sub> el compuesto **3** (**Figura 11**); de las fracciones F8<sub>5</sub> y F8<sub>6</sub> se aislaron los compuestos **4** y **5** (**Figura 12**); el producto **6** se aisló de F10<sub>4</sub> (**Figura 13**); y los compuestos **7** y **8** se aislaron de la fracción F11<sub>4</sub> (**Figura 14**). Las cantidades obtenidas de cada compuesto, así como sus tiempos de retención y máximos en el UV, se presentan en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** Rendimiento y UV<sub>máx</sub> de los compuestos aislados por HPLC a nivel semi y preparativo.

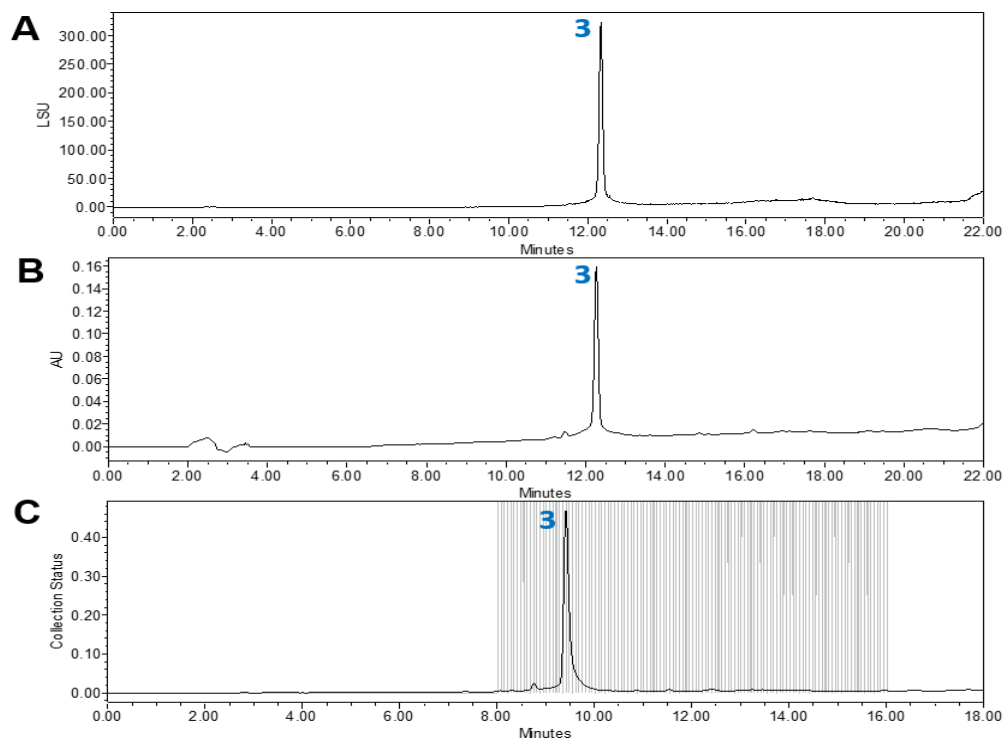
Compuesto	t <sub>R</sub> (min)	UV <sub>máx</sub>	Peso (mg)
<b>1</b>	10.4	220,266	1.5
<b>2</b>	8.0	219, 267	17.3
<b>3</b>	9.3	213, 245, 306	42.2
<b>4</b>	3.6	244, 326	12.8
<b>5</b>	22.5	212, 302	7.2
<b>6</b>	12.4	217,258, 303	4.9
<b>7</b>	14.1	217, 258, 305	14.1
<b>8</b>	15.1	218, 261, 300	7.3



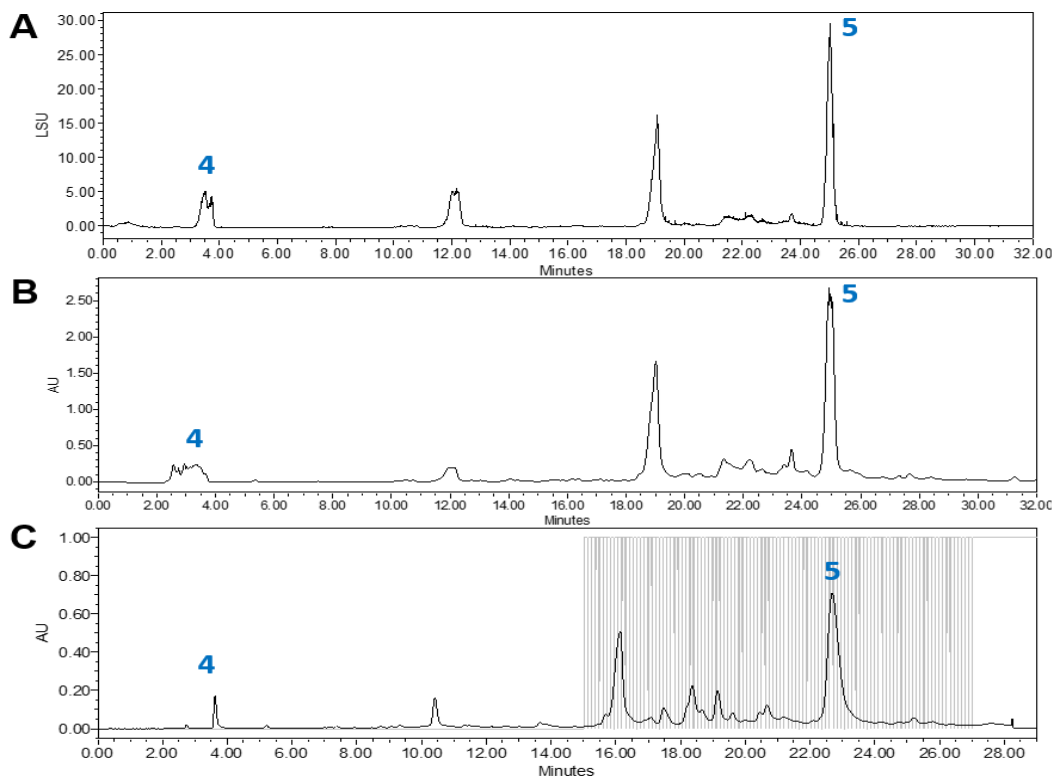
**Figura 9.** Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F4. HPLC analítico: (A) ELSD y (B) PDA  $\lambda=254$  nm. Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B). Gradiente de elución: 50 a 80% B en 15 min, 100% B por 5 min y 50% B por 7 min; tiempo de corrida 27 min; flujo 1 mL/min. (C) HPLC a nivel preparativo (PDA  $\lambda=254$  nm) bajo las mismas condiciones de gradiente, flujo de 21.24 mL/min.



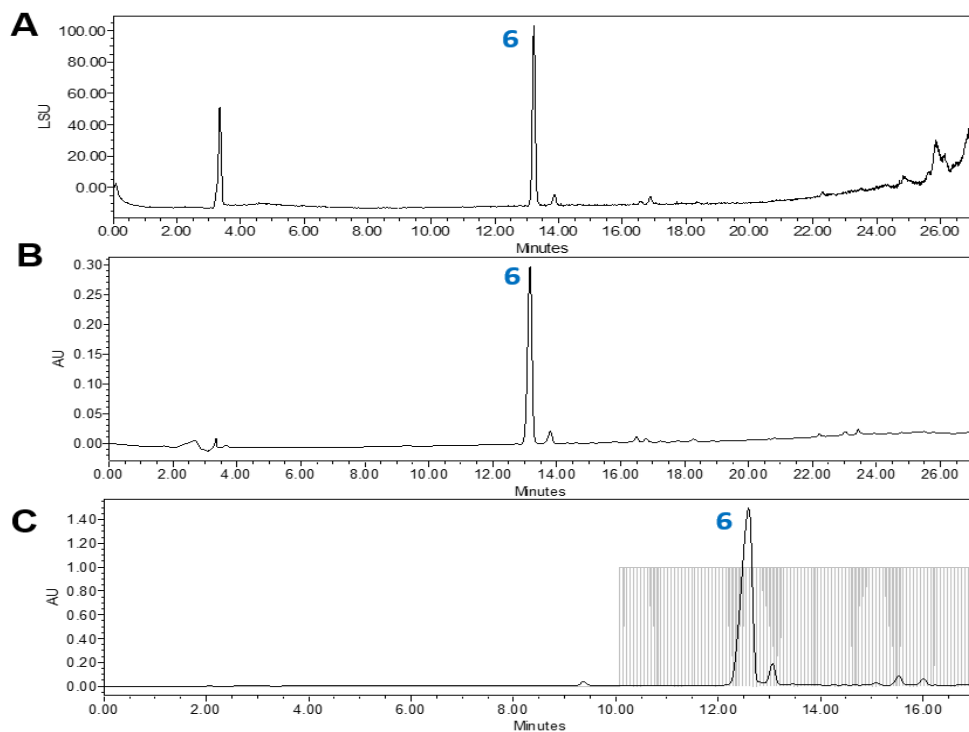
**Figura 10.** Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F5. HPLC analítico: **(A)** ELSD y **(B)** PDA  $\lambda=254$  nm. Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y  $\text{CH}_3\text{CN}$  (B). Gradiente de elución: 60 a 100% B en 10 min, 100% B por 5 min y 60% B por 7 min; tiempo de corrida 22 min; flujo 1 mL/min. **(C)** HPLC a nivel preparativo (PDA  $\lambda=254$  nm) bajo las mismas condiciones de gradiente, flujo de 21.24 mL/min.



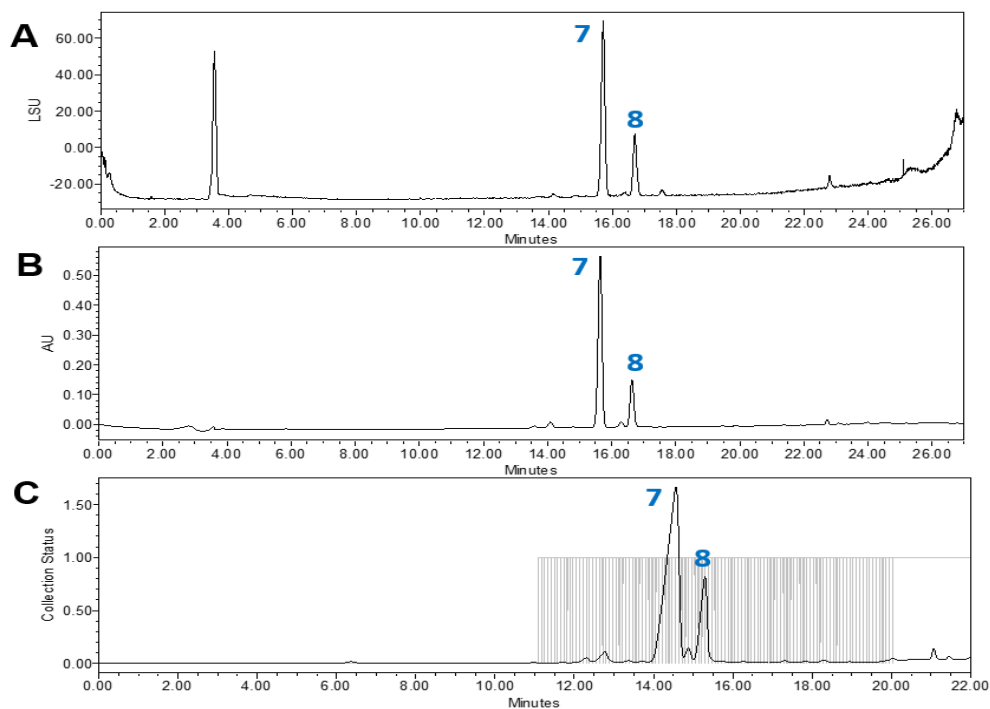
**Figura 11.** Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de la fracción F7<sub>5</sub>. HPLC analítico: **(A)** ELSD y **(B)** PDA  $\lambda=254$  nm. Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B). Gradiente de elución: 50 a 100% B en 10 min, 100% B por 5 min y 50% B por 7 min; tiempo de corrida 22 min; flujo 1 mL/min. **(C)** HPLC a nivel preparativo (PDA  $\lambda=254$  nm) bajo las mismas condiciones de gradiente, flujo de 21.24 mL/min.



**Figura 12.** Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y preparativo de las fracciones F8<sub>5</sub> y F8<sub>6</sub>. HPLC analítico: (A) ELSD y (B) PDA  $\lambda=211$  nm. Fase móvil: agua (A) y CH<sub>3</sub>CN (B). Gradiente de elución: 50 a 100% B en 20 min, 100% B por 5 min y 50% B por 7 min; tiempo de corrida 32 min; flujo 1 mL/min. (C) HPLC a nivel preparativo (PDA  $\lambda=211$  nm) bajo las mismas condiciones de gradiente, flujo de 21.24 mL/min.



**Figura 13.** Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y semipreparativo de la fracción F10<sub>4</sub>. HPLC analítico: **(A)** ELSD y **(B)** PDA  $\lambda=254$  nm. Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) **(A)** y CH<sub>3</sub>CN **(B)**. Gradiente de elución: 35 a 70% B en 15 min, 100% B por 5 min y 35% B por 7 min; tiempo de corrida 27 min; flujo 1 mL/min. **(C)** HPLC a nivel semipreparativo (PDA  $\lambda=254$  nm) bajo las mismas condiciones de gradiente, flujo de 4.72 mL/min.

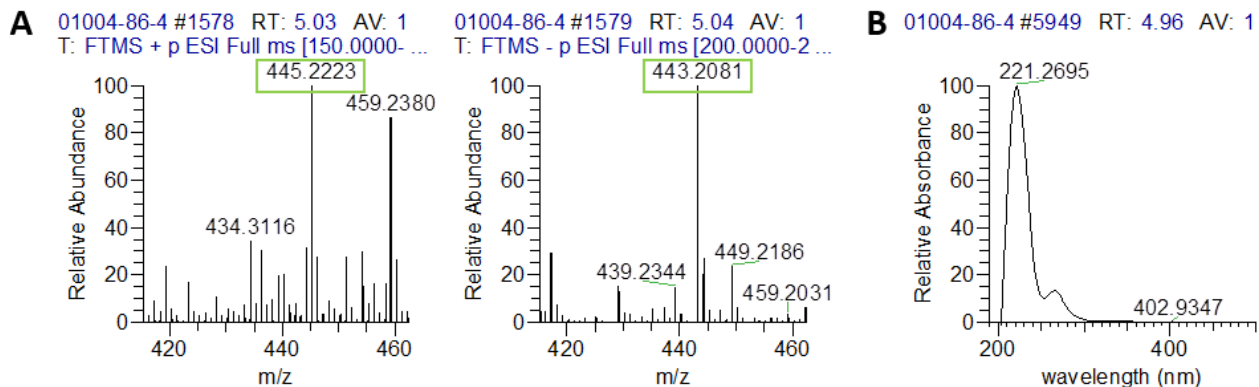


**Figura 14.** Cromatogramas por HPLC a nivel analítico y semipreparativo de la fracción F11<sub>4</sub>. HPLC analítico: (A) ELSD y (B) PDA  $\lambda=254$  nm. Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) (A) y CH<sub>3</sub>CN (B). Gradiente de elución: 35 a 70% B en 15 min, 100% B por 5 min y 35% B por 7 min; tiempo de corrida 27 min; flujo 1 mL/min. (C) HPLC a nivel semipreparativo (PDA  $\lambda=254$  F11<sub>4</sub>nm) bajo las mismas condiciones de gradiente, flujo de 4.72 mL/min.

#### 4.4. Caracterización química de los compuestos aislados

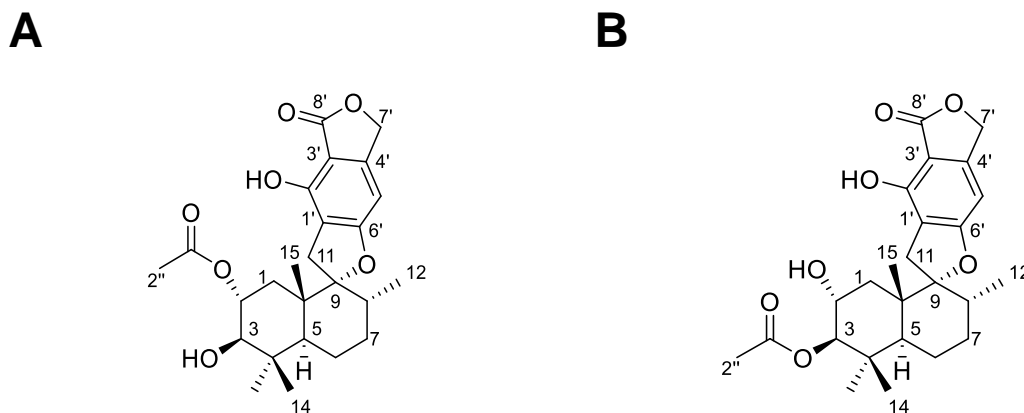
##### 4.4.1. Caracterización química de los compuestos 1 y 2

El compuesto **1** se aisló como un polvo blanco, mientras que **2** se aisló como un polvo rosado. En los espectros obtenidos mediante UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS se observaron los mismos iones moleculares para los dos productos en una relación  $m/z$  de 445.2223 [M+H]<sup>+</sup> y 443.2081 [M-H]<sup>-</sup>, permitiendo establecer su fórmula molecular como C<sub>25</sub>H<sub>32</sub>O<sub>7</sub> (IDH=10,  $\Delta=0.5$  ppm) (**Figura 15**).



**Figura 15.** Espectros de masas en los modos ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup> (**A**) y en el UV (PDA) (**B**) del compuesto **1**.

El análisis detallado de los espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (**Tabla 6**) y su comparación con los reportados previamente<sup>28</sup> permitió confirmar la identidad de **1** y **2** como los PNN1\* y PNN2\* (**Figura 16**).



**Figura 16.** Estructura química de los compuestos **1** (**A**) y **2** (**B**).

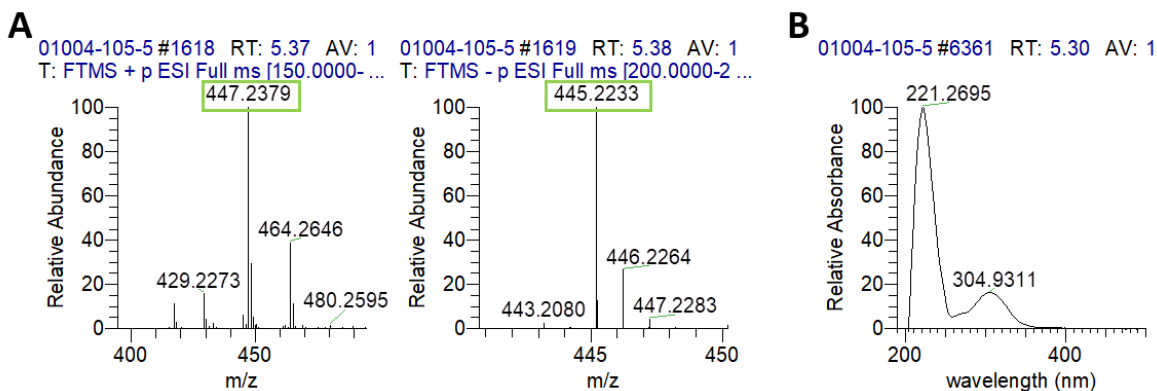
**Tabla 6.** Datos de RMN de **1** y **2** en  $\text{CDCl}_3$  (600 y 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ ).

Posición	1	PNN 1* <sup>28</sup>	2		PNN 2* <sup>28</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)
1	1.73, dd, (12.3, 4.5) 1.37, t (12.0)	1.72, dd (12.2, 4.5) 1.36, t (12.0)	39.5	1.40, t (12.1) 1.78, m	39.2	1.42, t (12.3) 1.78 m
2	4.96, ddd (11.7, 10.3, 4.4)	4.95, ddd (11.8, 10.2, 4.5)	67.8	3.82, ddd (11.7, 10.0, 4.5)	67.4	3.83, td (12.0, 4.0)
3	3.21, dd (10.1, 4.3)	3.21, d (10.1)	84.6	4.52, d (10.1)	84.3	4.53, d (10.2)
4	-	-	39.5	-	39.2	-
5	1.69, m	1.69, m	46.2	1.79, m	45.8	1.78, m
6	1.46, m	1.48, m	21.4	1.49, m	21	1.48, m
	1.68, m	1.69, m		1.64, m		1.65, m
7	1.46, m	1.49, m	31.0	1.49, m	30.8	1.48, m
	1.68, m	1.62, m		1.64, m		1.65, m
8	1.81, m	1.81, m	37.1	1.80, m	36.8	1.80, m
9	-	-	99.5	-	99.2	-
10	-	-	43.6	-	43.3	-
11	3.15, d (16.6)	3.15, d (16.6)	31.1	3.18, d (16.6)	30.6	3.19, d (16.4)
	2.85, d (16.6)	2.84, d (16.7)		2.85, d (16.6)		2.86, d (16.8)
12	0.74, d (6.5)	0.74, d (6.5)	15.7	0.75, d (6.5)	15.4	0.77, d (6.7)
13	1.11, s	1.1, s	28.9	0.94, s	28.6	0.95, s
14	0.9, s	0.9, s	18.0	0.91, s	17.7	0.92, s
15	1.12, s	1.11, s	17.5	1.06, s	17.2	1.08, s
1'	-	-	113.3	-	112.1	-
2'	-	-	153.0	-	152.5	-
3'	-	-	104.5	-	104.1	-
4'	-	-	149.4	-	149.1	-
5'	6.37, s	6.37, s	95.6	6.37, s	95.3	6.39, s
6'	-	-	169.3	-	166.9	-
7'	5.20, s	5.20, s	70.7	5.20, s	70.5	5.21, s
8'	-	-	172.8	-	172.5	-
1''	-	-	173.0	-	172.6	-
2''	2.02, s	2.02, s	21.6	2.14, s	21.3	2.15, s



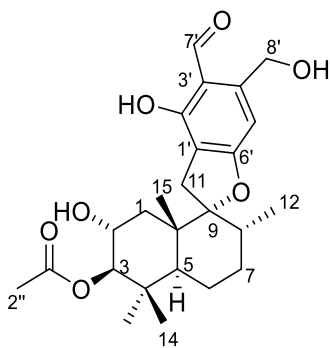
#### 4.4.2. Caracterización química del compuesto 3

El compuesto **3** se aisló como un aceite amarillo con una fórmula molecular de  $C_{25}H_{34}O_7$  (IDH=9,  $\Delta = 0.4$  ppm) la cual se estableció con base en los iones moleculares en una relación  $m/z$  de 447.2379  $[M+H]^+$  y 445.2233  $[M-H]^-$  obtenidos por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS (**Figura 17**).



**Figura 17.** Espectros de masas en los modos ESI+ y ESI- (**A**) y en el UV (PDA) del compuesto **3** (**B**).

El análisis detallado de los espectros de RMN de  $^1H$  y  $^{13}C$  (**Tabla 7**) y su comparación con las reportadas en la literatura<sup>28, 30</sup> permitió caracterizar este compuesto como la myrotecisina B (**Figura 18**).



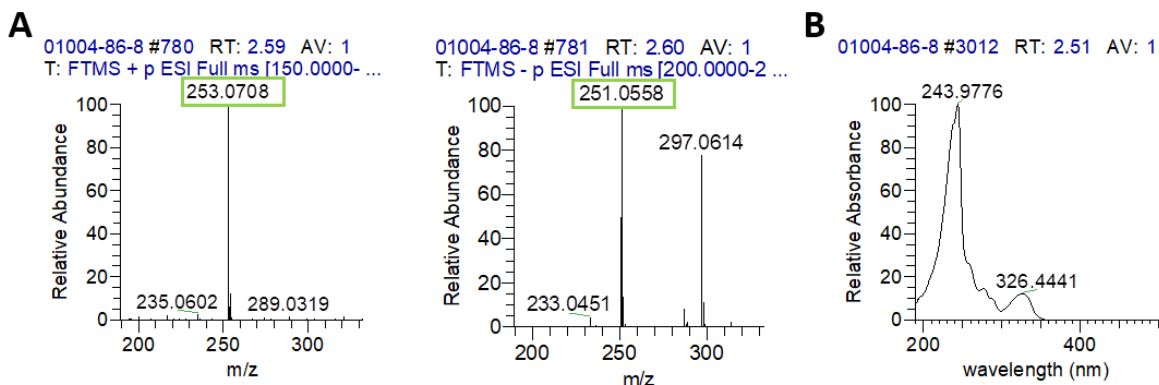
**Figura 18.** Estructura química de **3**.

**Tabla 7.** Datos de RMN de **3** en acetona- $d_6$   $^1\text{H}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz).

Posición	<b>3</b>		<b>Myrotecisina B<sup>30</sup></b>	
	$\delta_c$	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ , mult. (J en Hz)
1	39.6	1.34, t (12.1) 1.75, dd (12.7, 4.6)	38.4	1.17, m 1.57, m
2	66.3	3.82, m	64.4	3.65, m
3	84.4	4.49, d (9.8)	83.3	4.29, d (9.9)
4	39.5	-	39.0	-
5	46.8	1.78, dd (12.3, 2.7)	45.5	1.63, m
6	21.6	1.66, m 1.57, m	20.4	1.56, m 1.48, m
7	31.6	1.66, m 1.50, m	30.5	1.57, m 1.38, m
8	37.1	1.93, m	35.6	1.85, m
9	100	-	98.8	-
10	43.8	-	42.5	-
11	31.2	3.20, d (16.5) 2.87, d (16.5)	30.2	3.11, d (16.5) 2.81, d (16.5)
12	15.6	0.75, d (6.7)	15.1	0.68, d (6.3)
13	29.0	0.88, s	28.4	0.79, s
14	18.0	0.91, s	17.5	0.81, s
15	17.4	1.14, s	16.6	1.03, s
1'	112.6	-	111.2	-
2'	161.6	-	159.8	-
3'	113.3	-	112.2	-
4'	149.9	-	149.4	-
5'	102.8	6.55, s	101.6	6.61, s
6'	168.8	-	167.3	-
7'	195.0	10.17, s	193.8	10.07, s
8'	62.1	4.91, d (6.0)	60.4	4.74, s
1''	171.2	-	170.3	-
2''	21.1	2.03, s	21.0	2.02, s

#### 4.4.3. Caracterización química de los compuestos 4 y 5

El compuesto **4** se obtuvo como un sólido cristalino con una fórmula molecular  $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_6$  (IDH=7.0,  $\Delta$ = 0.5 ppm) establecida por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS (253.0708  $[\text{M}+\text{H}]^+$  y 251.0558  $[\text{M}-\text{H}]^-$ ) (**Figura 19**).



**Figura 19.** Espectros de masas en los modos ESI+ y ESI- (**A**) y en el UV (PDA) del compuesto **4** (**B**).

El análisis detallado de sus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (**Tabla 8**) permitió establecer la identidad de este como la myrotelactona A<sup>30</sup>. Además, el valor de la rotación óptica y el espectro de DC obtenidos para este compuesto fueron idénticos en signo, magnitud y forma a los reportados en la literatura<sup>30</sup> (**Tabla 9** y **Figura 20**). Con lo anterior se puede concluir que el compuesto **4** tiene una configuración *R* en C-11 (**Figura 21**).

**Tabla 8.** Datos de RMN de **4** en DMSO-*d*<sub>6</sub>  $^1\text{H}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz).

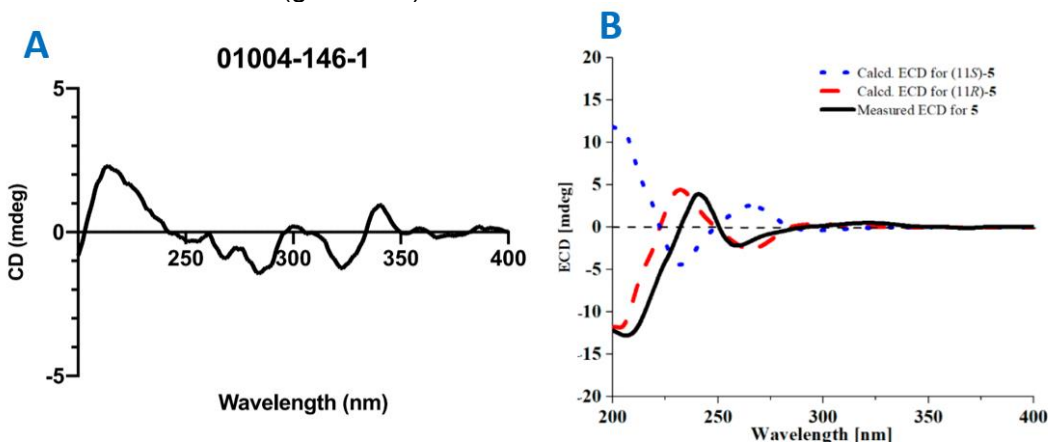
Posición	<b>4</b>		<b>Myrotelactona A<sup>30</sup></b>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. ( <i>J</i> en Hz)
1	165.4	-	165.4	-
3	143.1	7.46, s	143.1	7.45, s
4	118.5	-	118.6	-
5	100.5	6.78, d (2.5)	100.5	6.78, d (2.2)
6	166.4	-	166.4	-
7	100.4	6.64, d (2.5)	100.4	6.63, d (2.2)
8	163.3	-	163.4	-
9	99.8	-	99.9	-
10	137.5	-	137.6	-
11	68.8	4.67, t (5.5)	68.8	4.66, td (5.2, 5.2)
12	64.8	3.62, dd (11.4, 4.9) 3.51, dd (11.3, 6.2)	64.8	3.62, ddd (11.3, 5.3, 5.3) 3.51, ddd, (11.3, 5.3, 5.3)
6-OCH <sub>3</sub>	56.0	3.88, s	56.0	3.88, s
8-OH		11.38, s	-	11.37, s
11-OH		5.51, sa	-	5.50, d (4.6)
12-OH		4.81, sa	-	4.81, t (5.2)

**Tabla 9.** Valores experimentales y reportados de rotación óptica para **4** y la myrotelactona A (**4**).

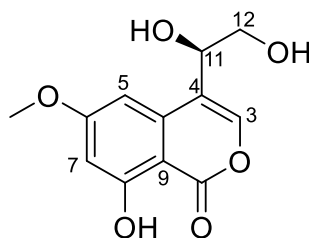
<b>4<sup>a</sup></b>	<b>Myrotelactona A<sup>b</sup></b>
$[\alpha]^{25} = -25$	$[\alpha]^{25} = -36$

<sup>a</sup>c= 0.2, MeOH; <sup>b</sup>c= 0.2, MeOH (Xu, Y., et al, 2018).

c= concentración (g/100 mL).



**Figura 20.** Espectros de DC experimental (A) y calculado (B) del compuesto **4**.

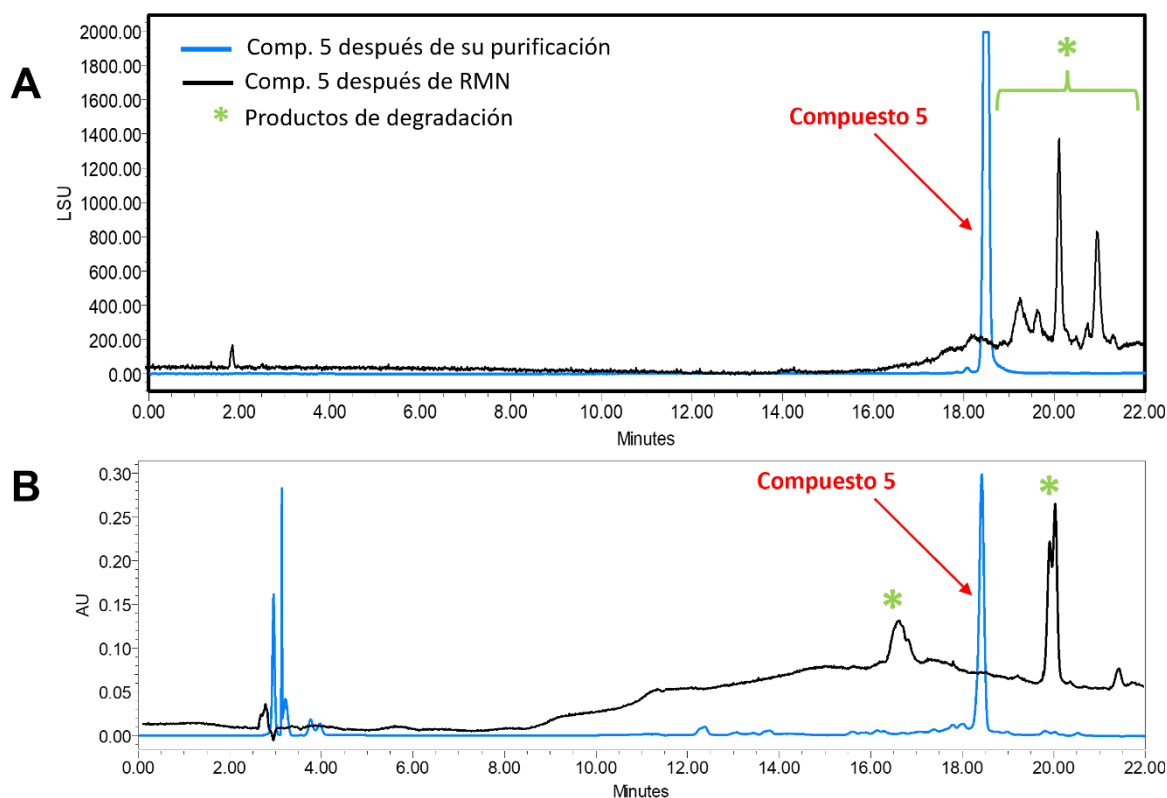


**Figura 21.** Estructura química de la myrotelactona A (**4**).

El compuesto **5** se aisló como un polvo naranja con máximos de absorción en 215 nm y 303 nm. Los espectros de masas generados por UPLC-PDA-LRESIMS-MS/MS mostraron 2 especies pseudomoleculares en una  $m/z$  de 875  $[M+H]^+$  y 873  $[M-H]^-$ , sin embargo, no se pudo establecer una fórmula molecular inequívoca ya que a la fecha no se han registrado sus espectros de masas en alta resolución.

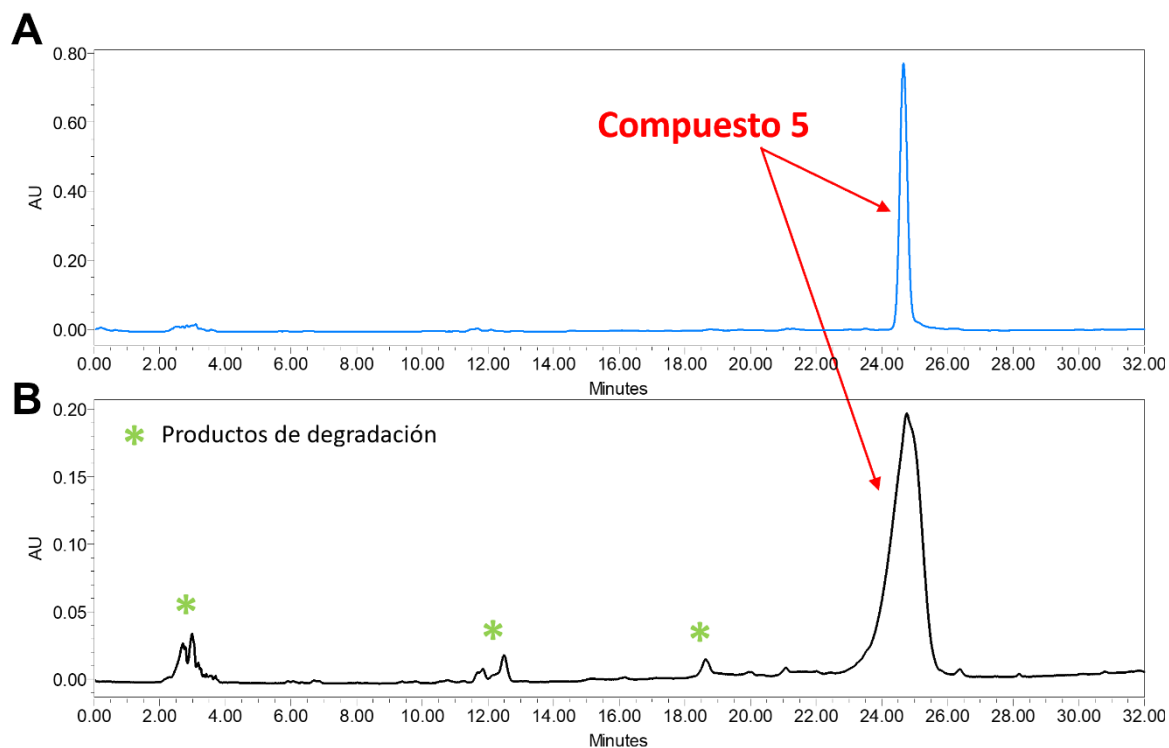
Cuando el compuesto **5** se analizó por RMN en acetona- $d_6$ , los espectros mostraron señales de numerosas impurezas a pesar de que los análisis por UPLC y HPLC revelaban que el producto estaba puro cuando se disolvía en dioxano. Al analizar la

muestra recuperada de RMN por HPLC se observó que el producto disuelto en acetona se descompone (**Figura 22**).



**Figura 22.** Cromatogramas del análisis por HPLC del compuesto **5** y sus productos de descomposición. **(A)** ELSD y **(B)** PDA  $\lambda=254$  nm. Fase móvil: ácido fórmico acuoso (0.1%) **(A)** y MeOH **(B)**. Gradiente de elución: 30 a 70% B en 10 min, 100% B por 5 min y 70% B por 7 min; tiempo de corrida 22 min; flujo 1 mL/min.

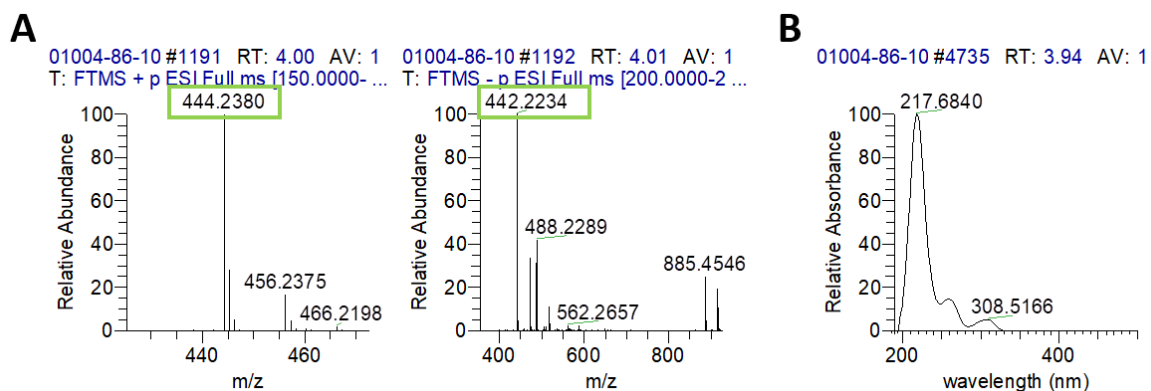
Tras la repurificación de este compuesto por HPLC y su análisis por RMN en  $\text{DMSO-}d_6$ , se lograron identificar señales características de fenilespirodrimanos. Algunas de estas señales se observaban duplicadas, y con base en el peso molecular obtenido, se infirió que dicho compuesto podría tratarse de un dímero. Lamentablemente, un segundo análisis comparativo por HPLC de **5** evidenció que el compuesto comenzaba a descomponerse (**Figura 23**), por lo que el registro de los experimentos de RMN necesarios para establecer el tipo de unión de los monómeros en la molécula no pudieron realizarse.



**Figura 23.** Cromatogramas del análisis por HPLC del compuesto **5** y sus productos de descomposición en DMSO- $d_6$ . (A) Compuesto **5** antes de RMN. (B) Compuesto **5** después de RMN en DMSO- $d_6$ . PDA  $\lambda=254$  nm.

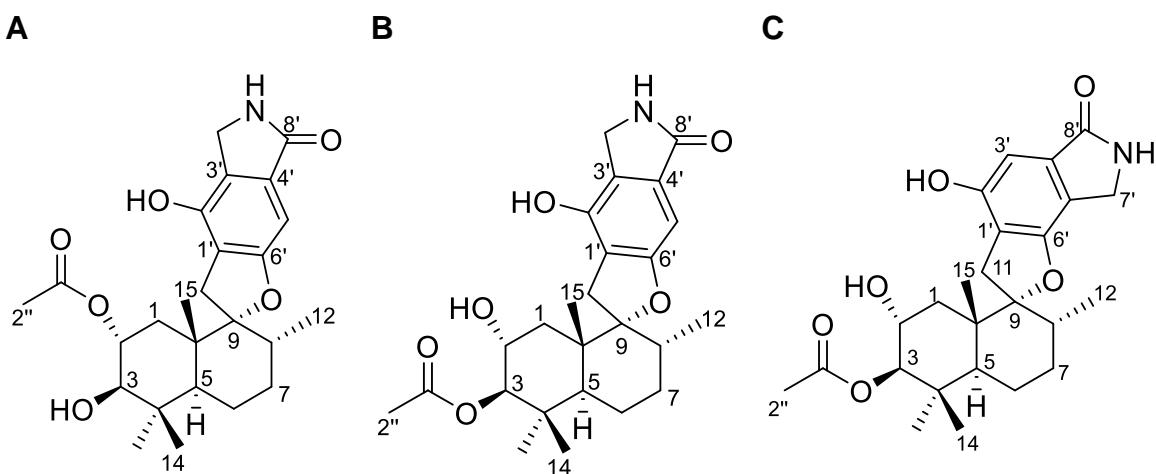
#### 4.4.4. Caracterización química de los compuestos 6-8

Los compuestos **6-8** se aislaron como polvos blancos y con una fórmula molecular de  $C_{25}H_{33}NO_6$  (IDH=10,  $\Delta=$  ppm) la cual se estableció mediante su análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS (iones moleculares en una relación  $m/z$  de 444.2380  $[M+H]^+$  y 442.2234  $[M-H]^-$  (**Figura 24**).



**Figura 24.** Espectros de masas en los modos ESI+ y ESI- (**A**) y en el UV (PDA) del compuesto **6** (**B**).

La comparación de los espectros de RMN de los productos **6-8** (**Tabla 10**) con aquellos reportados previamente<sup>28</sup>, permitió confirmar su estructura química como PNN3\*, PNN4\* y PNN5\* (**Figura 25**).



**Figura 25.** Estructura química de los compuestos **6** (**A**), **7** (**B**) y **8** (**C**).

Tabla 10. Datos de RMN de 6-8 en DMSO- $d_6$   $^1\text{H}$  (600 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (150 MHz ).

Posición	6		PNN 3*28		7		PNN 4*28		8		PNN 5*28	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ , mult. (J en Hz)
1	35.1	1.55, m 1.26, t (12.0)	35.1	1.56, m 1.27, t (12.0)	38.6	1.56, m 1.27, t (12.2)	38.6	1.56, m 1.27, t (12.2)	38.5	1.55, m 1.26, t (12.2)	39.0	1.56, m 1.26, t (12.2)
2	71.5	4.81, ddd (11.8, 9.9, 4.4)	71.5	4.81, ddd (11.8, 10.2, 4.5)	64.5	3.64, m	64.5	3.64, m	64.6	3.65, m	65.1	3.65, m
3	78.0	2.97, d (9.9)	78.0	2.98, d (9.7)	83.4	4.31, d (9.8)	83.4	4.31, d (9.9)	83.5	4.31, d (9.9)	84.0	4.31, d (9.8)
4	40.1	-	40.1	-	38.5	-	38.5	-	38.5	-	39.0	-
5	45.3	1.55, m	45.3	1.56, m	45.3	1.65, dd (12.1, 2.4)	45.3	1.65, m	45.4	1.64, dd (12.1, 2.5)	45.9	1.64, m
6	20.6	1.41, m 1.55, m	20.6	1.41, m 1.56, m	20.4	1.42, m 1.56, m	20.4	1.42, m 1.56, m	20.4	1.43, m 1.59, m	21.0	1.43, m 1.58, m
7	30.5	1.41, m 1.55, m	30.5	1.41, m 1.56, m	30.5	1.42, m 1.56, m	30.5	1.42, m 1.56, m	30.4	1.43, m 1.59, m	30.9	1.43, m 1.58, m
8	36.1	1.78, m	36.1	1.78, m	35.9	1.79, m	35.9	1.79, m	35.9	1.80, m	36.5	1.80, m
9	95.9	-	95.9	-	96.1	-	96.0	-	97.1	-	97.6	-
10	42.6	-	42.6	-	42.5	-	42.5	-	42.4	-	42.9	-
11	31.8	3.09, d (17.2) 2.81, d (17.3)	31.8	3.09, d (17.2) 2.82, d (17.2)	31.8	3.17, d (17.2) 2.83, d (17.1)	31.8	3.17, d (17.1) 2.83, d (17.2)	31.9	3.14, d(16.9) 2.79, d(17.0)	32.4	3.14, d(17.2) 2.79, d(17.0)
12	15.3	0.63, d (6.5)	15.3	0.64, d (6.5)	15.3	0.66, d (6.4)	15.3	0.66, d (6.5)	15.3	0.64, d (6.4)	15.8	0.65, d (6.4)
13	28.6	0.98, s	28.6	0.99, s	28.4	0.80, s	28.4	0.80, s	28.5	0.80, s	29.1	0.80, s
14	16.9	0.77, s	16.9	0.78, s	17.6	0.82, s	17.5	0.82, s	17.7	0.83, s	18.2	0.83, s
15	16.6	1.03, s	16.6	1.03, s	16.7	1.01, s	16.7	1.01, s	16.8	1.02, s	17.3	1.02, s
1'	116.6	-	116.6	-	116.7	-	116.7	-	116.2	-	116.7	-
2'	148.4	-	148.3	-	148.3	-	148.4	-	153.7	-	154.3	-
3'	122.9	-	122.9	-	122.8	-	122.8	-	101.0	6.57, s	101.5	6.57, s
4'	134.1	-	134.1	-	134.1	-	134.1	-	134.5	-	135	-
5'	93.3	6.43, s	93.2	6.43, s	93.4	6.47, s	93.2	6.47, s	114.3	-	114.8	-
6'	161.9	-	161.9	-	162.0	-	162.0	-	155.8	-	156.3	-
7'	42.7	4.11, s	42.7	4.11, s	42.6	4.12, s	42.6	4.12, s	41.9	4.24, d(16.7) 4.17, d(16.7)	42.4	4.23, d(16.5) 4.17, d(16.6)
8'	170.1	-	170.1	-	170.3	-	170.3	-	170.1	-	170.6	-
1''	170.1	-	170.1	-	170.1	-	170.1	-	170.4	-	170.8	-
2''	21.1	1.9, s	21.1	1.91, s	21.0	2.02, s	21.0	2.02, s	21.1	2.02, s	21.6	2.02, s
NH		8.32, s		8.33, s		8.34, s		8.34, s		8.38, s		8.37, s



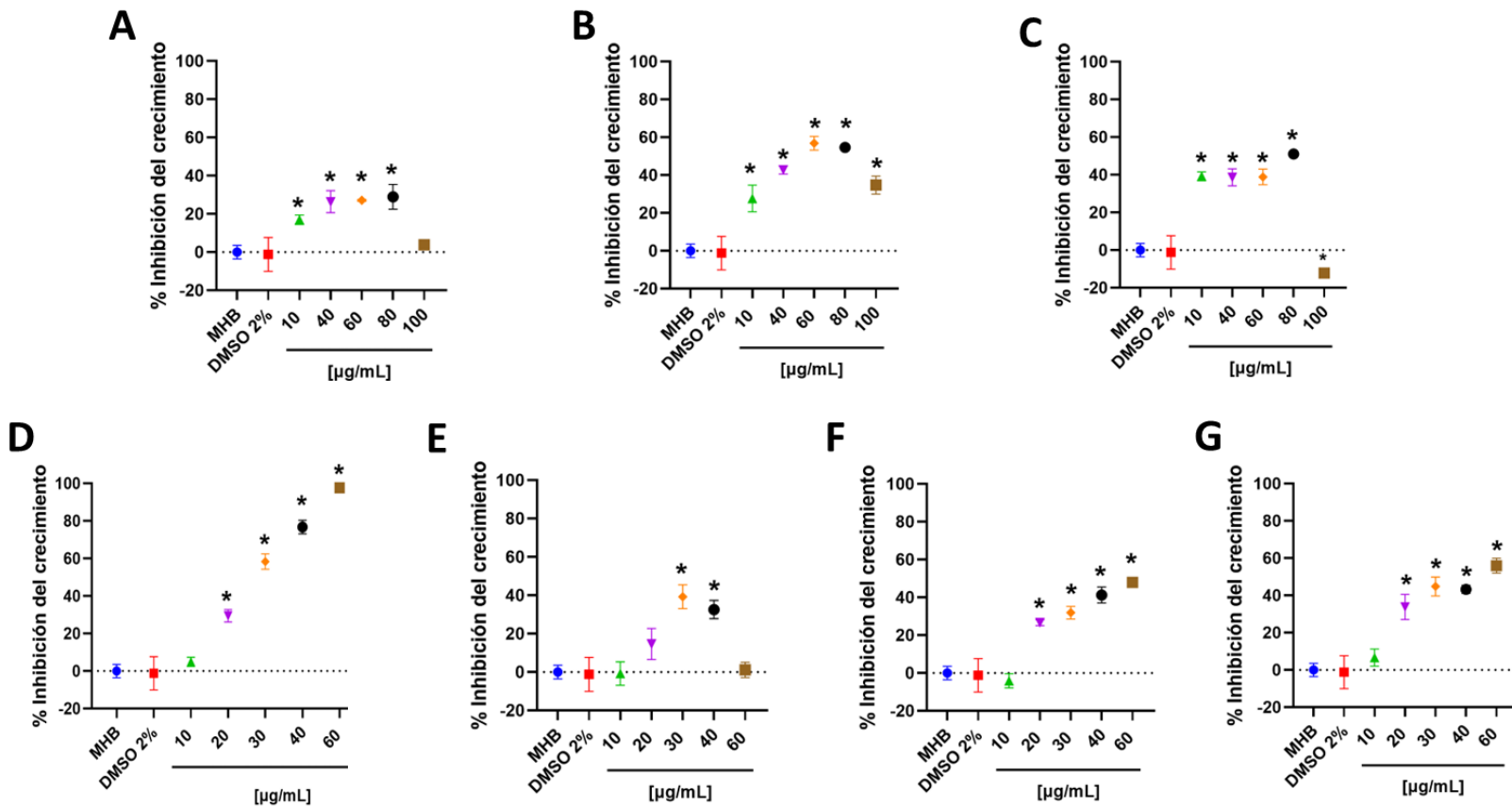
#### **4.5. Evaluación de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de los compuestos aislados.**

##### **4.5.1. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra MRSA y MSSA para determinar su concentración mínima inhibitoria.**

Los resultados de actividad antimicrobiana contra MRSA y MSSA de los compuestos aislados se muestran en las **Figuras 26** y **27**, respectivamente.

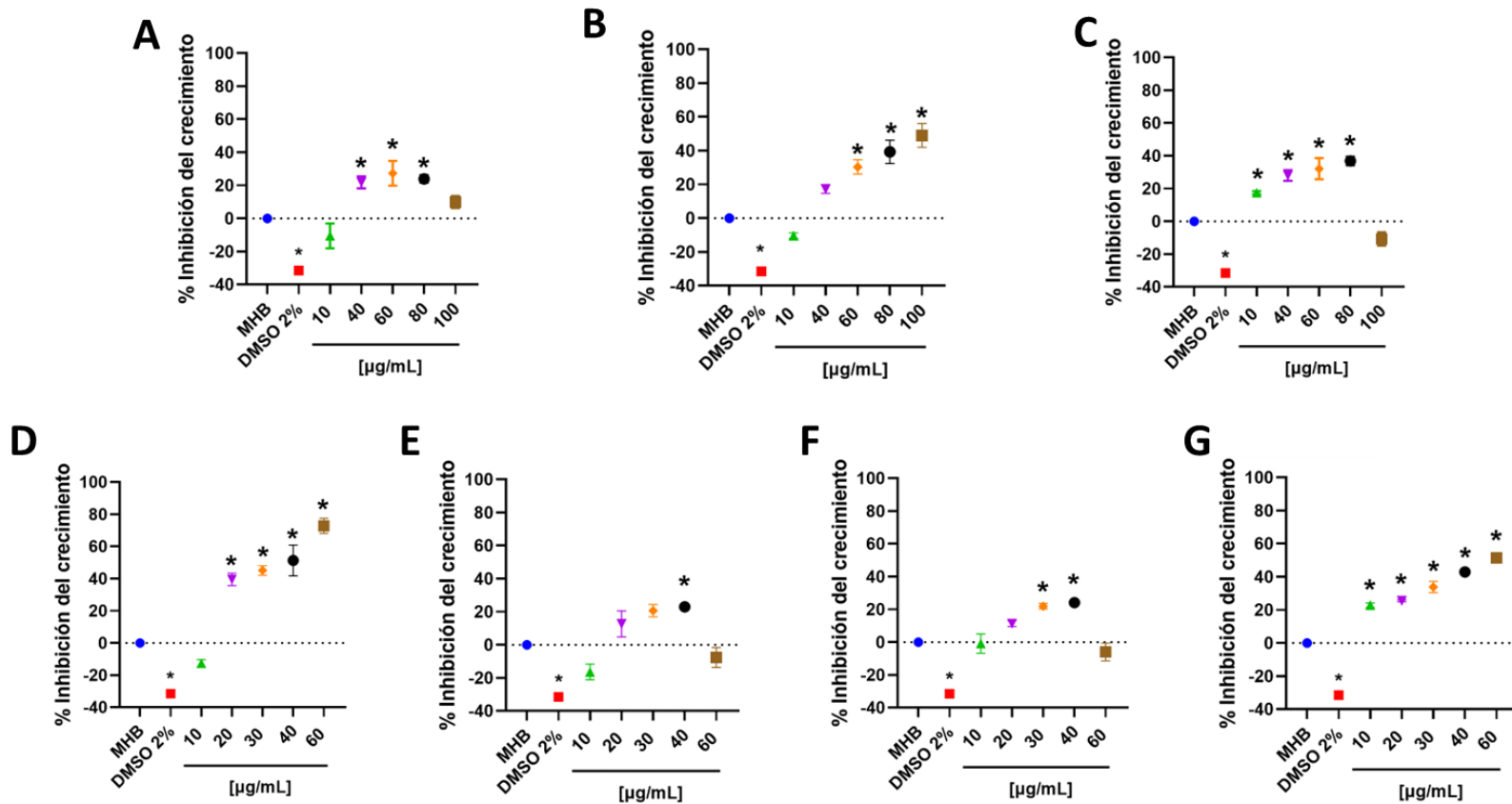
En el ensayo contra MRSA, el máximo porcentaje de inhibición de los compuestos **1**, **2** y **4** se presentó con la concentración de 80 µg/mL. En particular, **2** y **4** inhibieron >50.0% el crecimiento de MRSA. Respecto a los compuestos **3**, **7** y **8** la inhibición máxima se observó con la concentración de 60 µg/mL con un porcentaje de inhibición del 97.6%, 48.0% y 56.0%, respectivamente. El compuesto **6** presentó un porcentaje de inhibición de 39.2% a la concentración de 30 µg/mL a concentraciones mayores se observa una disminución de la actividad (**Figura 26**).

En el ensayo contra MSSA, la inhibición máxima de **1**, **3** y **8** se evidenció a la concentración de 60 µg/mL con un porcentaje de inhibición del 27.3, 72.8 y 51.4%, respectivamente. En el caso del compuesto **2** se observó un porcentaje de inhibición del 49.0% a 100 µg/mL, mientras que para **4** fue del 36.9% a 80 µg/mL. Finalmente, a la concentración de 40 µg/mL los porcentajes de inhibición fueron de 22.9 y 24.2% para los compuestos **6** y **7**, respectivamente (**Figura 27**).



\*Diferencias significativas con el control negativo (MHB), de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de medias de Dunnett  $p \leq 0.05$ ;  $n=3$

**Figura 26.** Resultados del ensayo de la actividad antimicrobiana contra MRSA de los compuestos **1** (A), **2** (B) y **4** (C) a las concentraciones de prueba (10, 40, 60, 80 y 100 μg/mL) y de los compuestos **3** (D), **6** (E), **7** (F) y **8** (G) a las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 60 μg/mL. La CMI del control positivo (vancomicina) fue de 5 μg/mL.

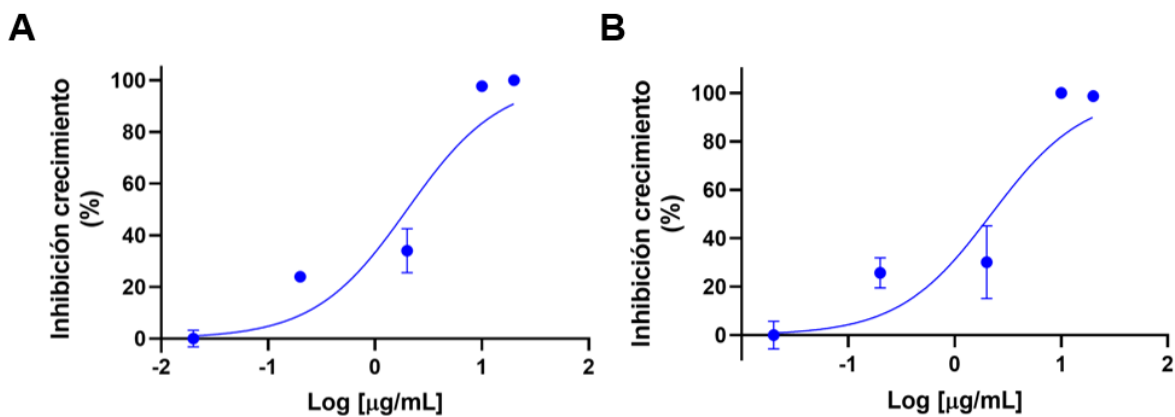


\*Diferencias significativas con el control negativo (MHB), de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de medias de Dunnett  $p \leq 0.05$ ;  $n=3$

**Figura 27.** Resultados del ensayo de la actividad antimicrobiana contra MSSA de los compuestos **1 (A)**, **2 (B)** y **4 (C)** a las concentraciones de prueba (10, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{g/mL}$ ) y de los compuestos **3 (D)**, **6 (E)**, **7 (F)** y **8 (G)** a las concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 60  $\mu\text{g/mL}$ . La CMI del control positivo (ampicilina) fue de 0.39  $\mu\text{g/mL}$ .

Por otro lado, comparando la actividad antimicrobiana de los compuestos **3**, **6**, **7** y **8** a 40  $\mu\text{g/mL}$ , se observó que **3** inhibe el crecimiento <50%, seguido de **8** que mostró una inhibición del 42.9%. Sin embargo, a pesar de que ambos compuestos presentaron una potencia similar, su eficacia fue diferente ya que **3** mostró una inhibición del 72.8% a la concentración de 60  $\mu\text{g/mL}$  mientras que **8** a la misma concentración mostró una inhibición del 51.42%.

Respecto a la actividad de **5**, es importante mencionar que las evaluaciones se realizaron antes de la descomposición del compuesto. A partir de la concentración más baja evaluada (10  $\mu\text{g/mL}$ ), se observó una inhibición del crecimiento del 100%, tanto en MRSA como en MSSA. Tras estos resultados, se decidió establecer su concentración efectiva media ( $\text{CE}_{50}$ ) siguiendo la metodología descrita en el inciso **4.7**, obteniéndose valores de 2.21  $\mu\text{g/mL}$  y 2.01  $\mu\text{g/mL}$  frente MSSA y MRSA, respectivamente, mientras que su concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 10  $\mu\text{g/mL}$  frente a ambas bacterias (**Figura 28**). Como se mencionó en el apartado **4.4.3**, a pesar de que no se finalizó la caracterización de este producto, se confirmó que dichas moléculas diméricas presentan una mayor actividad antimicrobiana que sus respectivos monómeros<sup>22</sup>.



**Figura 28.** Resultados del ensayo de la actividad antimicrobiana del compuesto **5** contra MRSA (**A**) y MSSA (**B**) a las concentraciones de prueba (0.02, 0.2, 2, 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$ ).

Ahora bien, en la mayoría de los resultados antes descritos se pudo evidenciar una relación concentración-respuesta en los compuestos ensayados, no obstante, en algunos metabolitos, a partir de la concentración de 60  $\mu\text{g/mL}$  se notó una

disminución de la actividad. Una posible causa de este comportamiento pudo ser la baja solubilidad de los compuestos a dicha concentración.

Finalmente, con los resultados obtenidos se observó que los compuestos **3** y **5** fueron los productos que presentaron una mayor actividad antimicrobiana contra MRSA y MSSA al presentar un porcentaje de inhibición del crecimiento por arriba del 80%. En particular, el compuesto **5** presentó actividad antimicrobiana a bajas concentraciones [CMI 10 µg/mL] en comparación con los demás compuestos.

#### 4.5.2. Actividad antibiopelícula sobre MRSA

Los resultados de la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de estos productos contra MRSA en el ensayo de cristal violetas se muestran en la **Tabla 11**. Cabe mencionar que debido al bajo rendimiento del compuesto **1** no se pudo determinar su actividad antibiopelícula.

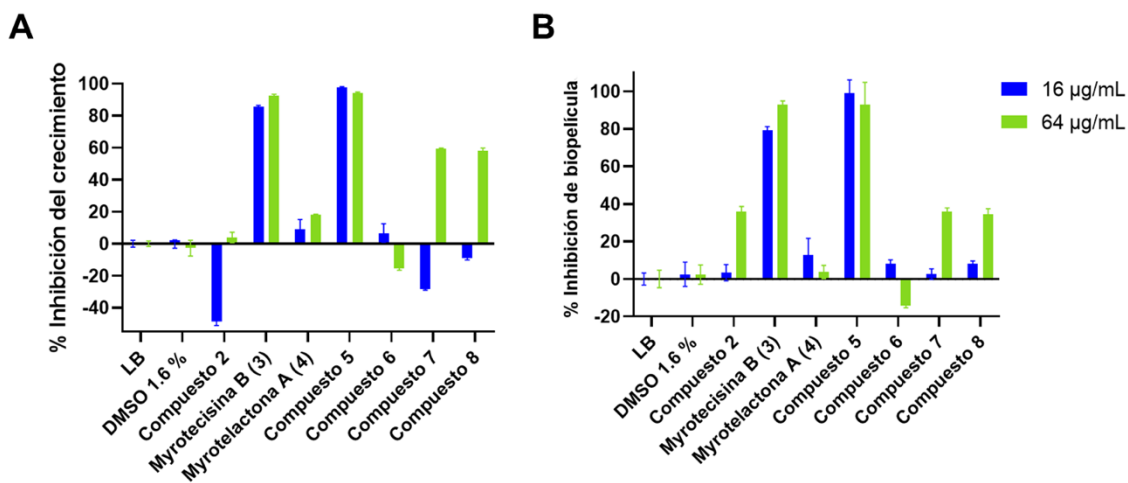
**Tabla 11.** Actividad biológica vs MRSA de los compuestos aislados de *Alfaría* sp.

Compuesto	% Inhibición del crecimiento		% Inhibición de la formación de biopelícula	
	16 µg/mL	64 µg/mL	16 µg/mL	64 µg/mL
<b>2</b>	-48	4	3	<b>36</b>
<b>3 (myrotecisina B)</b>	<b>85</b>	<b>92</b>	<b>79</b>	<b>93</b>
<b>4 (myrotelactona A)</b>	9	18	13	4
<b>5</b>	<b>97</b>	<b>95</b>	<b>99</b>	<b>93</b>
<b>6</b>	7	-15	8	-14
<b>7</b>	-28	60	3	36
<b>8</b>	-9	58	8	35

Los compuestos **2**, **4** y **6** presentaron una inhibición en el crecimiento bacteriano por debajo del 20% a la concentración de 64 µg/mL, mientras que los compuestos **7** y **8** mostraron un comportamiento similar al presentar una inhibición del 60% a la misma concentración, sin embargo, ambos productos no afectaron el crecimiento de MRSA a 16 µg/mL. En cuanto a la myrotecisina B (**3**) y **5**, la inhibición observada fue >80% tanto en el crecimiento de MRSA como en la formación de la biopelícula a las dos concentraciones de prueba (**Figura 29A**).

Respecto a la actividad antibiopelícula contra MRSA, la myrotectisina B (**3**) y los compuestos **2**, **5**, **7** y **8** mostraron una inhibición superior al 35% a 64  $\mu\text{g/mL}$ , sin embargo, la actividad antibiopelícula mostrada por **3**, **5**, **7** y **8** se atribuye a su actividad antimicrobiana, por lo que al no haber crecimiento bacteriano no se presenta la formación de biopelículas (**Figura 29 B**).

Finalmente, de los siete compuestos evaluados en este ensayo, el compuesto **2** mostró la mejor actividad antibiopelícula en MRSA al inhibir selectivamente en un 36% la formación de la biopelícula a 64  $\mu\text{g/mL}$ , sin que su actividad antimicrobiana influyera en dicho resultado. Actualmente se están realizando más ensayos para determinar el mecanismo de acción de **2** en MRSA.



**Figura 29.** Resultados de la actividad antimicrobiana (**A**) y antibiopelícula (**B**) contra MRSA de los compuestos aislados de *Alfaría* sp.

## 5. CONCLUSIONES

- Se realizó el acondicionamiento y cultivo a mediana escala del hongo *Alfaria* sp (ORO3), así como la preparación de su respectivo extracto orgánico.
- Se identificó la presencia de los compuestos a purificar en 6 de las 13 fracciones primarias mediante análisis de UPLC-MS y se aislaron 8 compuestos puros mediante HPLC. Debido a problemas de estabilidad, el compuesto **5** se encuentra en proceso de caracterización, mientras que el resto de los compuestos fueron idénticos a los previamente aislados en el grupo de trabajo.
- La evaluación de la actividad antimicrobiana mediante el ensayo de microdilución con el colorante MTT permitió identificar a la myrotecisina B (**3**) y al compuesto **5** [CMI 10 µg/mL] como los productos más activos contra MRSA y MSSA al presentar una inhibición del crecimiento para ambas bacterias por arriba del 80%.
- Los resultados de la evaluación del potencial antibiopelícula contra MRSA mediante el ensayo de cristal violeta indicaron que el compuesto **2** fue el único en presentar esta actividad al no inhibir el crecimiento de MRSA, pero si la formación de la biopelícula en un 36% a 64 µg/mL.

## 6. REFERENCIAS

1. Christaki E, Marcou M, Tofarides A. Antimicrobial resistance in bacteria: Mechanisms, evolution, and persistence. *Journal of Molecular Evolution*. **2019**; 88 (1): 26-40. doi:10.1007/S00239-019-09914-3
2. Organización Mundial de la Salud (OMS). <https://www.who.int/es/news/item/18-11-2022-quadripartite-launches-a-new-platform-to-tackle-antimicrobial-resistance-threat-to-human-and-animal-health-and-ecosystems> (Revisado el 20 de julio de 2023)
3. Morrison L, Zembower TR. Antimicrobial resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*. **2020**; 30 (4): 619-635. doi:10.1016/j.giec.2020.06.004
4. Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, et. al., Antibiotic resistance: One health one world outlook. *Frontiers in Cellular Infection Microbiology*. **2021**; 11: 771510. doi:10.3389/fcimb.2021.771510
5. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. Kudva IT, Zhang Q, eds. *Microbiology Spectrum*. **2016**; 4 (2). doi:10.1128/MICROBIOLSPEC.VMBF-0016-2015
6. Samreen, Ahmad I, Malak HA, Abulreesh HH. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: A potential threat to public health. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **2021**; 27: 101-111. doi:10.1016/J.JGAR.2021.08.001
7. Mestrovic T, Robles Aguilar G, Swetschinski LR, et al. The burden of bacterial antimicrobial resistance in the WHO European region in 2019: A cross-country systematic analysis. *Lancet Public Health*. **2022**; 7 (11): e897. doi:10.1016/S2468-2667(22)00225-0
8. Organización Mundial de la Salud (OMS). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> (Revisado el 17 de julio de 2023)
9. Maurya S, Gaur M, Yadav AB. *Staphylococcus aureus* Biofilm destabilization by tween-80 and lung surfactants to overcome biofilm-imposed drug resistance. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **2023**: 1-12. doi:10.1007/S12010-023-04650-3/FIGURES/5
10. Tuon FF, Suss PH, Telles JP, Dantas LR, Borges NH, Ribeiro VST. Antimicrobial treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antibiotics*, **2023**; 12 (1): 87. doi:10.3390/ANTIBIOTICS12010087
11. Lee AS, De Lencastre H, Garau J, et. al., Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Disease Primers*. **2018**; 4 (1): 1-23. doi:10.1038/NRDP.2018.33



12. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*. **2018**; 31 (4). doi:10.1128/CMR.00020-18
13. Ahmad-Mansour N, Loubet P, Pouget C, et al. *Staphylococcus aureus* toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins (Basel)*. **2021**; 13 (10): 677. doi:10.3390/TOXINS13100677
14. Suresh S, Alva PP, Premanath R. Modulation of quorum sensing-associated virulence in bacteria: Carbohydrate as a key factor. *Archives of Microbiology*. **2021**; 203 (5): 1881-1890. doi:10.1007/S00203-021-02235-4/FIGURES/1
15. Simonetti O, Rizzetto G, Cirioni O, et al. New insight into old and new antimicrobial molecules targeting quorum sensing for MRSA wound infection. *Future Microbiology*. **2022**; 17 (3): 177-183. doi:10.2217/FMB-2021-0120
16. Guzzo F, Scognamiglio M, Fiorentino A, Buommino E, D'abrosca B. Plant derived natural products against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*: Antibiofilm activity and molecular mechanisms. *Molecules*. **2020**; 25 (21): 5024. doi:10.3390/MOLECULES25215024
17. Kim MK. staphylococcus aureus toxins: From their pathogenic roles to anti-virulence therapy using natural products. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. **2019**; 24 (3): 424-435. doi:10.1007/s12257-019-0059-9
18. Kurmoo Y, Hook AL, Harvey D, et. al., Real time monitoring of biofilm formation on coated medical devices for the reduction and interception of bacterial infections. *Biomaterials Science*. **2020**; 8 (5): 1477. doi:10.1039/C9BM00875F
19. Abdel-Razek AS, El-Nagggar ME, Allam A, Morsy OM, Othman SI. Microbial natural products in drug discovery. *Processes*. **2020**; 8 (4): 470. doi:10.3390/PR8040470
20. Naeem A, Hu P, Yang M, et al. Natural Products as anticancer agents: Current status and future perspectives. *Molecules*. **2022**; 27 (23): 8367. doi:10.3390/MOLECULES27238367
21. Pham J V., Yilma MA, Feliz A, et al. A Review of the microbial production of bioactive natural products and biologics. *Frontiers in Microbiology*. **2019**; 10: 1404. doi:10.3389/FMICB.2019.01404
22. Mou P, Zhang Q, Peng J, et al. Antibacterial phenylspirodrimanes from the marine-derived fungus *Stachybotrys* sp. SCSIO 40434. *Fitoterapia*. **2021**; 152: 104937. doi:10.1016/J.FITOTE.2021.104937
23. Liu D, Li Y, Guo X, Ji W, Lin W. Chartarolactams Q–T, dimeric phenylspirodrimanes with antibacterial and antiviral activities. *Chemistry & Biodiversity*. **2020**; 17 (6): e2000170. doi:10.1002/CBDV.202000170

24. Wu B, Oesker V, Wiese J, Malien S, Schmaljohann R, Imhoff JF. Spirocyclic Drimanes from the marine fungus *Stachybotrys* sp. strain MF347. *Marine Drugs*. **2014**; 12 (4): 1938. doi:10.3390/MD12041924
25. Jakubczyk D, Dussart F. Selected fungal natural products with antimicrobial properties. *Molecules*. **2020**; 25 (4): 911. doi:10.3390/MOLECULES25040911
26. Wang Y, Bian Z, Wang Y. Biofilm formation and inhibition mediated by bacterial quorum sensing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2022**; 106 (19): 6365-6381. doi:10.1007/S00253-022-12150-3
27. Paguigan ND, Rivera-Chávez J, Stempin JJ, et al. Prenylated diresorcinols inhibit bacterial quorum sensing. *Journal of Natural Products*. **2019**; 82 (3): 550-558. doi: 10.1021/acs.jnatprod.8b00925
28. López, M. *Estudio químico y biológico contra bacterias resistentes a multifármacos de hongos selectos de México*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México; **2022**.
29. García-Lara B, Saucedo-Mora MA, Roldán-Sánchez JA, et al. Inhibition of quorum-sensing-dependent virulence factors and biofilm formation of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* strains by ZnO nanoparticles. *Letters in Applied Microbiology*. **2015**; 61 (3): 299-305. doi:10.1111/LAM.12456
30. Xu Y, Wang C, Liu H, et. al., Meroterpenoids and isocoumarinoids from a *Myrothecium* fungus associated with *Apocynum venetum*. *Marine Drugs* . **2018**; 16 (10): 363. doi:10.3390/MD16100363
31. Liu J, Feng J, Jia X, et. al., Bistachybotryns W-Y, three new phenylspirodrimane dimers with a 6/7 oxygen heterocycle from *Stachybotrys chartarum*. *Phytochemistry Letters*. **2020**; 35: 73-77. doi:10.1016/j.phytol.2019.11.011