



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

LICENCIATURA EN QUÍMICA

TESIS

**ESTUDIO QUIMIOINFORMÁTICO, SEMISÍNTESIS,
Y EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA *IN VITRO*
CONTRA BACTERIAS PATÓGENAS DE
MOLÉCULAS CON ESQUELETO CLERODANO DE
*Croton morifolius***

**Para obtener el título de
Licenciado en Química**

PRESENTA

Luis Angel Vergara Ortiz

Director
Dr. René Velázquez Jiménez

Pachuca de Soto, Hgo., México, mayo 2026



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Dirección

Office of the Director

Mineral de la Reforma, Hgo., a 7 de mayo de 2026

Número de control: ICBI-D/909/2026

Asunto: Autorización de impresión.

MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Con Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio, le comunico que el Jurado asignado al egresado de la Licenciatura en Química **Luis Ángel Vergara Ortiz**, quien presenta el trabajo de titulación "**Estudio quimiinformático, semisíntesis, y evaluación farmacológica *in vitro* contra bacterias patógenas de moléculas con esqueleto clerodano de *Croton morifolius***", ha decidido, después de revisar fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; dicho trabajo en la reunión de sinodales, **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente: Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

Secretario: Dra. Claudia Coronel Olivares

Vocal: Dr. René Velázquez Jiménez

Suplente: Dr. Luis Humberto Mendoza Huizar

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Gabriel Vergara Rodríguez
Director del ICBI



GVR/MMM

"Amor, Orden y Progreso"



Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo
Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México. C.P 42184
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 40001
direccion_icbi@uaeh.edu.mx, vergara@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

DEDICATORIA

A mi madre, **Sandra Ortíz Fernández**, quien ha dedicado toda su vida al cuidado y educación de mí y de mis hermanos, además de ser el refugio tanto en momentos de alegría y júbilo, como en aquellos de tristeza e incertidumbre. Una de las mujeres más relevantes en mi vida y por quien me he convertido en quien soy.

A mi hermana **Viridiana Vergara Ortíz**, con quien comparto muchos pensamientos, secretos y me ayudó a ver el lado divertido y optimista de la vida, quien me levantó muchas veces cuando no encontraba motivaciones y quien me ayuda a superarme a mí mismo día con día, a explorar mi potencial y me motiva a ampliar mis horizontes de forma constante. Prácticamente una segunda madre para mí.

A mi hermano **Héctor Horacio Vergara Ortíz**, quien fue prácticamente un segundo padre para mí, y cuyo recuerdo mantengo fuertemente ligado a mi corazón y a mi espíritu. Él fue y es un impulso gigantesco, ejemplo de lucha y de fortaleza, aquel guerrero que me enseñó a no rendirme y a convertirme en la mejor versión de mí, un enorme apoyo emocional y moral. El hombre que me transmitió, entre muchísimas cosas más, el gusto por las ciencias exactas, y quien fue, es y será, una gran influencia que ha moldeado en gran medida quien soy hasta la fecha.

A mi abuelita **Consuelo Fernández Hernández**, con quien aprendí a tener amor por lo que hago y a ver la vida de un modo distinto, además me enseñó a aprender de los errores, a ser agradecido con la vida y a luchar por las metas y sueños propuestos.

A mi cuyita (cobaya, conejilla de indias, *Cavia porcellus*) **Manchas** quien no solamente es una mascota, sino una compañera y amiga incondicional que me ha acompañado durante una gran parte de mi formación profesional y que compartió conmigo alegrías, tristezas, logros y fracasos. Quizás no tenga raciocinio, pero su cariño y compañía definitivamente me aliviaron cuando más lo necesité y lo he necesitado.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** por permitirme concluir esta etapa tan importante en mi formación profesional y personal, además de ser mi guía en todo momento y ayudarme a tomar las mejores decisiones para llegar a este punto de mi vida.

A **mi familia** por ser un importante respaldo emocional y moral, además de formar parte de mi proceso académico en todo momento y apoyar mis decisiones de manera incondicional.

A la **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH)** por ser partícipe de la conclusión de mis estudios y ser la contribución principal en mi desarrollo como futuro Licenciado en Química.

Al **Parque Científico y Tecnológico (PCyT)** y a sus colaboradores por brindarme las herramientas y el conocimiento requeridos para la conclusión del presente trabajo, además de ayudarme a adquirir y perfeccionar habilidades dentro del laboratorio.

A mi asesor, el **Dr. René Velázquez Jiménez** por compartir sus conocimientos conmigo y guiar mi aprendizaje en la elaboración del presente trabajo, además de tener la paciencia y la destreza para corregirme y conducir mi desempeño a uno de mejor calidad.

A mis **sinodales** por guiar la adecuada culminación del presente trabajo a través de sus atentas y detalladas observaciones enfocadas a la entrega de un producto de calidad.

A mis **amigos y compañeros** del **Instituto de Ciencias Básicas e Ingenierías (ICBI)** y del **PCyT** por haber compartido conmigo la experiencia de cursar la Licenciatura en Química de manera conjunta, compartir sus conocimientos y ayudarme a desarrollar mis habilidades principalmente dentro del laboratorio.

“Sombras y Arena”

Índice

Índice de figuras	2
Índice de tablas	4
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. ANTECEDENTES/MARCO TEÓRICO.....	11
2.1 Metabolito secundario.....	11
2.2 Principio activo.....	12
2.3 Semisíntesis de productos naturales.....	12
2.4 Definición de droga.....	17
2.5 Medicamento.....	17
2.6 Producto natural	20
2.7 Importancia y usos de <i>C. morifolius</i> en la medicina tradicional.....	23
2.8 Metabolitos secundarios presentes en <i>C. morifolius</i>	23
2.9 Furano clerodanos aislados de especies de <i>Croton</i>	24
2.10 Resistencia de las bacterias a los antibióticos	27
2.11 Estudios quimioinformáticos de clerodanos de especies de <i>Croton</i>	28
2.12 Propiedades fisicoquímicas, el perfil ADMET y las actividades biológicas	36
2.13 Acoplamiento molecular (Docking).....	40
3. JUSTIFICACIÓN	44
4. OBJETIVOS.....	45
4.1 Objetivo general	45
4.2 Objetivos específicos	45
5. MATERIALES Y PARTE EXPERIMENTAL.....	45
5.1 Obtención del producto natural morifolina C (89).....	45
5.2 Reducción de morifolina C (obtención del alcohol MC-OH).....	46
5.3 Reacción de acetilación de (91).....	46
5.4 Purificación del éster MC-OAc.....	47
5.5 Reacción de epoxidación de MC-OAc (preparación del epóxido Epoxi – MC-OAc)	47
5.6 Purificación del epóxido Epoxi – MC-OAc	48
5.7 Determinación de perfiles ADMET de los compuestos	48
5.8 Determinación de posibles objetivos bacterianos de los compuestos	48

5.9 Estudios de acoplamiento molecular (Docking) contra la enzima bacteriana β -lactamasa	48
5.10 Evaluaciones farmacológicas <i>in vitro</i> contra bacterias patógenas de interés clínico	56
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
6.1 Caracterización del producto natural (89) y de los derivados (90-92)	57
6.2 Propiedades fisicoquímicas, el perfil ADMET y actividades biológicas de los compuestos derivados.....	81
6.2.1 Predicción de las propiedades fisicoquímicas.....	81
6.2.2 Predicciones ADMET.....	83
6.2.3 Predicciones de blancos farmacológicos y de actividad biológica.....	85
6.3 Acoplamiento molecular (Docking) de los compuestos con la enzima β -lactamasa	86
6.3.1 Modos de unión de los compuestos con la enzima β -lactamasa	86
6.4 Evaluación del efecto antibacteriano de los compuestos contra bacterias patógenas	88
7. CONCLUSIONES.....	93
8. REFERENCIAS	94
9. ANEXOS	99

Índice de figuras

Figura 1. Tipos de diterpenos aislados en especies de <i>Croton</i> (Euphorbiaceae).	8
Figura 2. Clerodanos aislados de dos especies de <i>Croton</i>	9
Figura 3. Planta de <i>Croton morifolius</i>	11
Figura 4. Podofilotoxina (PPT) y algunos derivados semisintéticos.....	14
Figura 5. Ejemplos de productos naturales y derivados semisintéticos utilizados para el tratamiento de diversas afecciones, principalmente algunos tipos de cáncer.....	16
Figura 6. Familias de metabolitos secundarios.....	21
Figura 7. Diversidad de metabolitos secundarios aislados de distintas especies del género <i>Croton</i> (Euphorbiaceae).....	22
Figura 8. Diterpenos del tipo furano clerodanos aislados de distintas especies del género <i>Croton</i>	26
Figura 9. Furano clerodanos aislados de la especie <i>C. guatemalensis</i>	30

Figura 10. Resultados del acoplamiento molecular de la conformación de unión con la enzima del compuesto 85 con MAL12, 3 puentes de hidrógeno formados con los residuos catalíticos Ser ¹⁵⁶ , His ²⁷⁹ y Arg ³¹² .	31
Figura 11. Los resultados del acoplamiento molecular de farmacóforo muestran la estructura minimizada de MAL12 con los compuestos activos 83-87, el grupo furano genera una interacción por puente de hidrógeno con el fragmento NH del residuo catalítico His ²⁷⁹ .	31
Figura 12. Estructura química del ácido hardwíckiico.	35
Figura 13. La ubicación del ácido hardwíckiico dentro de la cavidad de unión de <i>Ld</i> PTR1. El receptor se representa como una superficie mientras que el ácido hardwíckiico se presenta como varas.	35
Figura 14. Representaciones en 2D de la interacción proteína-ligando entre el ácido hardwíckiico y el receptor <i>Ld</i> PTR1. Los puentes de hidrógeno se denotan como líneas verdes punteadas, mientras que los arcos de espinas rojas representan interacciones hidrofóbicas.	36
Figura 15. Ruta de síntesis de los derivados a partir del producto natural (89).	58
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H del alcohol de morifolina C (90) en CDCl ₃ (400 MHz).	60
Figura 17. Espectro de RMN de ¹³ C del alcohol de morifolina C (90) en CDCl ₃ (100 MHz).	61
Figura 18. Espectro de COSY del alcohol de morifolina C (90) en CDCl ₃ .	62
Figura 19. Espectro de HMBC del alcohol de morifolina C (90) en CDCl ₃ .	63
Figura 20. Espectro de RMN de ¹ H del éster de morifolina C (91) en CDCl ₃ (400 MHz).	66
Figura 21. Espectro de RMN de ¹³ C del éster de morifolina C (91) en CDCl ₃ (100 MHz).	67
Figura 22. Espectro de COSY del éster de morifolina C (91) en CDCl ₃ .	68
Figura 23. Espectro de HMBC del éster de morifolina C (91) en CDCl ₃ .	69
Figura 24. Espectro NOESY del éster de morifolina C (91) en CDCl ₃ .	70
Figura 25. Interacciones en espacio del espectro NOESY del éster de morifolina C (91) en CDCl ₃ .	71
Figura 26. Estructura del éster de morifolina C (91) obtenida por difracción de rayos-X.	72
Figura 27. Espectro de RMN de ¹ H del epóxido de morifolina C (92) en CDCl ₃ (400 MHz).	74
Figura 28. Espectro de RMN de ¹³ C del epóxido de morifolina C (92) en CDCl ₃ (100 MHz).	75
Figura 29. Espectro COSY del epóxido del éster de morifolina C (92) en CDCl ₃ .	76
Figura 30. Espectro de HMBC del epóxido del éster de morifolina C (92) en CDCl ₃ .	77
Figura 31. Espectro NOESY del epóxido del éster de morifolina C (92) en CDCl ₃ .	78
Figura 32. Interacciones en el espacio del espectro NOESY del epóxido del éster de morifolina C (92) en CDCl ₃ .	79
Figura 33. Radares de biodisponibilidad de los compuestos.	82
Figura 34. Conformación e interacciones del compuesto 92 con el sitio de unión de la enzima β-lactamasa.	87

Figura 35. Efecto de inhibición de 89 y 92 contra <i>Salmonella typhi</i>	91
Figura 36. Efecto de inhibición de 90 contra <i>E. coli</i>	91
Figura 37. Efecto de inhibición de 89-90 contra <i>Salmonella typhimurium</i>	92
Figura 38. Efecto de inhibición de 89-92 contra <i>S. aureus</i>	92

Índice de tablas

Tabla 1. Identificación de clerodanos con la enzima α -glucosidasa y estudios de acoplamiento molecular.....	30
Tabla 2. Afinidades de enlace e interacciones proteína-ligando del HA acoplado con los seis receptores, <i>LdPTR1</i> , <i>LmPTR1</i> , <i>LdTR</i> , <i>LmTR</i> , <i>LdGCL</i> , y <i>LmGCL</i>	33
Tabla 3. Predicción de propiedades farmacocinéticas para HA haciendo uso de SwissADME.	34
Tabla 4. Desplazamientos químicos de protón y carbono de los compuestos en $CDCl_3$, (δ en ppm y J en Hz).....	80
Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos 90-92 y estreptomicina (control positivo).....	81
Tabla 6. Perfil ADMET de los compuestos, realizado en la plataforma de pkCSM.....	84
Tabla 7. Mapa de calor de la predicción de las posibles actividades biológicas de los compuestos.....	85
Tabla 8. Mapa de calor sobre la predicción de objetivos bacterianos.....	86
Tabla 9. Energía de unión de los compuestos 89-92 y cefotaxima (inhibidor) con la enzima β -lactamasa e interacciones de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (π -alquil).	87
Tabla 10. Resultados de pruebas <i>in vitro</i> del producto natural (89) y los derivados semisintéticos (90-92) contra bacterias patógenas.	88
Tabla 11. Ensayo del compuesto 90 contra las bacterias <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	88
Tabla 12. Ensayo del compuesto 91 contra las bacterias <i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>S. aureus</i>	89
Tabla 13. Ensayo del compuesto 92 contra las bacterias <i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>S. typhimurium</i> y <i>S. aureus</i>	90

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Porcentaje
δ	Desplazamiento químico
Å	Ángstrom
°C	Grados Celsius
Ac ₂ O	Anhídrido acético
ADMET	Absorción, Distribución, Metabolización, Excreción, Toxicidad
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetro
COSY	Espectroscopía de correlación (<i>Correlation spectroscopy</i>)
Cys	Cisteína
Da	Dalton
DCM	Diclorometano (CH ₂ Cl ₂)
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECD	Dicroísmo circular electrónico (<i>Electronic circular dichroism</i>)
ESOL	Solubilidad estimada (<i>Estimated solubility</i>)
g	Gramo
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
h	Hora
His	Histidina
HMBC	Conectividad de enlaces múltiples heteronuclear (<i>Heteronuclear multiple bond connectivity</i>)
HSQC	Correlación cuántica simple heteronuclear (<i>Heteronuclear single quantum coherence</i>)
Hz	Hertz
Ile	Isoleucina
in	Pulgada (<i>inch</i>)
J	Constante de acoplamiento
kcal/mol	Kilocaloría por mol
L	Litro
Leu	Leucina
Lys	Lisina
mCPBA	Ácido <i>meta</i> -cloroperbenzoico (<i>meta-Chloroperbenzoic Acid</i>)
Met	Metionina
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
min	Minuto

mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NGF	Factor de crecimiento nervioso (<i>Nerve growth factor</i>)
NOESY	Espectroscopía del efecto nuclear Overhauser (<i>Nuclear Overhauser effect spectroscopy</i>)
Phe	Fenilalanina
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina
Py	Piridina
QSAR	Relación cuantitativa estructura-actividad (<i>Quantitative structure-activity relationship</i>)
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de protón
Ser	Serina
Thr	Treonina
TLC	Cromatografía en capa fina (<i>Thin layer chromatography</i>)
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
Val	Valina
µg	Microgramo
µL	Microlitro

RESUMEN

Las plantas del género *Croton* son una fuente importante de los diferentes tipos de diterpenos. En particular, los clerodanos son los que predominan y resultan de gran interés tanto para los químicos de productos naturales y farmacólogos por su importancia biosintética, diversidad estructural y su amplia bioactividad. En el presente trabajo se aisló y se purificó el producto natural denominado morifolina C (**89**) de la planta *Croton morifolius* y posteriormente se prepararon tres derivados semisintéticos a partir de reacciones subsecuentes de reducción, acetilación y epoxidación. Cada uno de estos derivados fueron caracterizados mediante espectroscopía de RMN-¹H y RMN-¹³C y difracción de rayos X. Adicionalmente, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas, el perfil ADMET y el espectro de la actividad biológica de los compuestos utilizando las plataformas de SwissADME, Way2Drug y pkCSM. Las predicciones *in silico* de los compuestos **90-92** mostraron propiedades fisicoquímicas compatibles con un perfil farmacocinético favorable para la administración oral. En el perfil ADMET, los tres compuestos presentaron características con viabilidad farmacocinética moderada, **90** mostró riesgo de hepatotoxicidad. Con la herramienta PassOnline los compuestos muestran actividad antibacterial moderada y un efecto como agentes antineoplásicos y antifúngicos, adicionalmente, mediante el uso de AntiBac Pred se determinaron los posibles blancos bacterianos, dando como resultado a *Mycobacterium*, *Salmonella enteritidis*, *Kocuria rhizophila* y *Clostridium ramosum*. Igualmente, se realizaron estudios de acoplamiento molecular (Docking) sobre el blanco relacionado con la síntesis de pared celular bacteriana β -lactamasa. Estos estudios mostraron que el producto natural (**89**) y el epóxido (**92**) presentaron energías libres de unión de -8.50 kcal/mol y -7.94 kcal/mol, indicando una alta afinidad de unión en el sitio activo de la β -lactamasa, respectivamente. Finalmente, se llevaron a cabo pruebas biológicas *in vitro* en las que se observó que el producto natural y sus derivados presentaron inhibición contra las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*. En general, los compuestos presentaron de baja a moderada actividad antibacteriana, el compuesto **90** mostró inhibición contra tres bacterias, por lo que resulta de interés continuar evaluando su acción como agente antimicrobiano.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de productos de origen natural para el alivio de padecimientos humanos es una práctica tan antigua y universal como la medicina, además de que es común la obtención de productos naturales que provienen de plantas medicinales (Velázquez-Jiménez *et al.*, 2022). Durante siglos, gran parte de los medicamentos utilizados fueron completamente fabricados a partir de hierbas, productos animales y materiales inorgánicos (Dewick, 2009). Los primeros remedios caseros solían combinar estos ingredientes con magia, misticismo, astrología o religión, pero hay certeza de que dichos tratamientos que eran efectivos fueron subsecuentemente registrados y documentados, conduciendo de este modo a la Herbolaria temprana (Dewick, 2009). Por una parte, los microorganismos patógenos pueden representar un problema de salud pública importante en un sector considerable de la población, como lo expresan sistemas de salud privados y oficiales (Sendeku *et al.*, 2015). Por otra parte, se sabe que las plantas del género *Croton* (de la familia Euphorbiaceae) son una fuente rica en diterpenoides como del tipo clerodano (**1-4**), tiglano (**5**), kaureno (**6**), labdano (**7**), halimano (**8**), cembrano (**9**) y pimarano (**10**) (Velázquez-Jiménez *et al.*, 2022) (**Figura 1**). Los clerodanos cuentan con una gran diversidad estructural que brinda una amplia variedad de actividades biológicas como propiedades citotóxicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antiúlceras pépticas y potenciadores NGF (Velázquez-Jiménez *et al.*, 2022). Específicamente, los diterpenos del tipo clerodano son de interés tanto para los químicos de productos naturales como para los farmacólogos por su importancia biosintética, diversidad estructural y bioactividad que presentan (Velázquez-Jiménez *et al.*, 2022). Con la mejora de las técnicas químicas, se han logrado aislar sustancias activas de plantas que han sido estructuralmente caracterizadas y sintetizadas en laboratorio (Dewick, 2009).

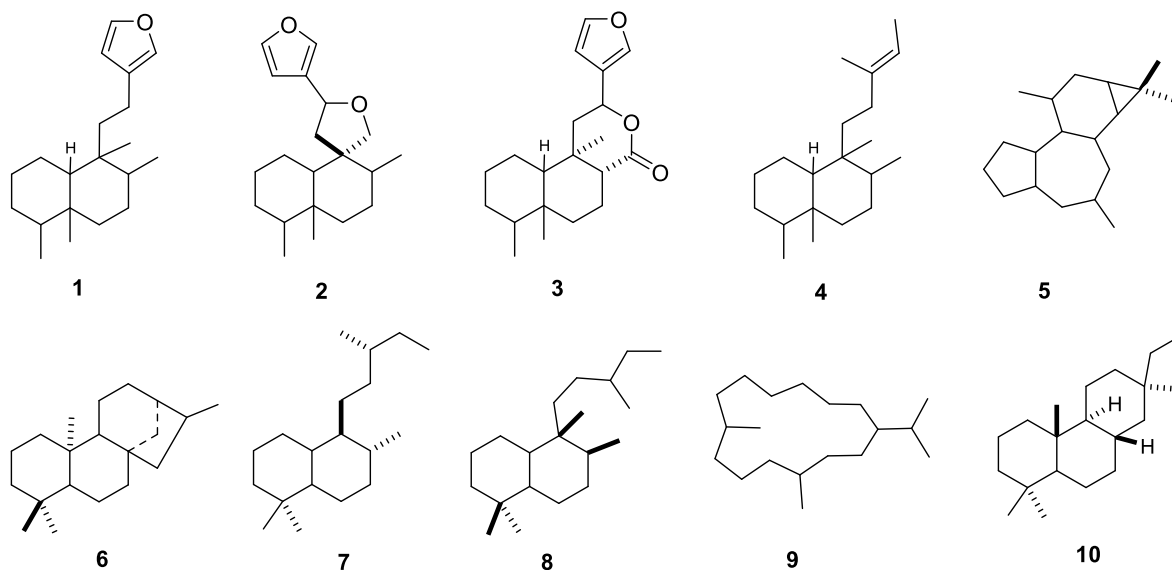


Figura 1. Tipos de diterpenos aislados en especies de *Croton* (Euphorbiaceae).

Actualmente, existen diversos estudios relacionados a especies vegetales del género *Croton*, donde se ha explorado la actividad antibacteriana de la especie *C. macrostachyus* y en los que se concluyó que los extractos crudos de la planta mostraron una inhibición efectiva del crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Sendeku *et al.*, 2015). Así mismo, se han identificado especies químicas bioactivas de *C. laui* como diterpenoides neo-clerodanos (**11-15**) (**Figura 2**) altamente oxigenados en las hojas de la planta (Li *et al.*, 2021). Las estructuras de los nuevos compuestos encontrados se determinaron por métodos espectroscópicos extensivos, y sus configuraciones absolutas fueron determinadas a través del análisis por difracción de rayos X de monocristal junto al espectro de ECD y con datos recuperados de la literatura (Li *et al.*, 2021). Aunque hay diversas investigaciones relacionadas con plantas del género *Croton*, la especie *C. morifolius* carece de estudios dedicados a las sustancias que le confieren sus propiedades medicinales. Únicamente se cuenta con un estudio formal de uno de los metabolitos secundarios que produce esta planta. Dicho estudio fue llevado a cabo por Velázquez-Jiménez y colaboradores (2022) y representó la obtención del primer diterpenoide *seco*-clerodano con un anillo de furano (**16**) (**Figura 2**) que se presenta en una especie del género *Croton*.

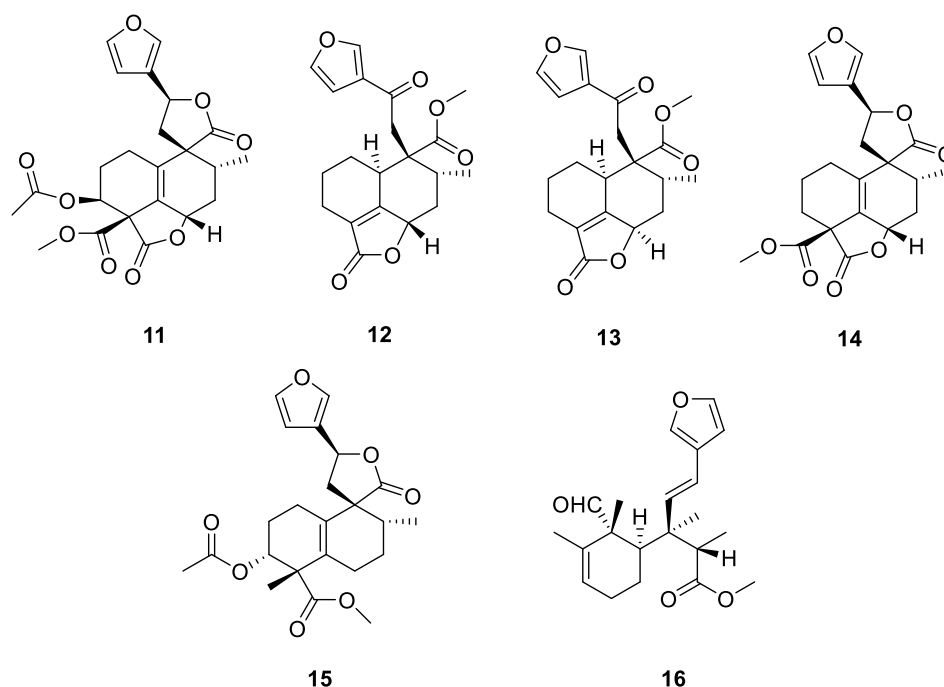


Figura 2. Clerodanos aislados de dos especies de *Croton*.

Por su parte, la quimioinformática es una disciplina relativamente reciente, la cual ha emergido a partir de disciplinas más antiguas como la química computacional, los estudios quimiométricos, QSAR, información química, etcétera (Xu y Hagler, 2002). La quimioinformática se refiere al aprovechamiento de la tecnología informática para el procesamiento de información química (Xu y Hagler, 2002). Los

primeros indicios registrados respecto a la utilización de esta herramienta fueron con el objetivo de procesamiento de documentos relacionados con temas de química (Xu y Hagler, 2002). La cantidad de información relativa a la química se consideraba tan vasta que la mejor manera de conseguir que fuese manejable y accesible para la comunidad científica es en formato electrónico (Engel, 2006). Sin embargo, la nueva disciplina que emergió a partir del resguardo, manipulación y procesamiento de información química no tenía un nombre propio, por lo que los científicos que trabajan en este campo lo denominaron, en un principio, simplemente como “información química” (Engel, 2006). La quimioinformática también se puede entender como un término genérico que engloba al diseño, creación, organización, manejo, análisis, diseminación, visualización y uso de información química (Engel, 2006). La principal diferencia entre el procesamiento de datos convencional y el de datos químicos radica en la necesidad de trabajo con estructuras químicas, lo cual requirió la posterior introducción de herramientas para representación, almacenamiento y recuperación de estructuras en sistemas computacionales (Xu y Hagler, 2002).

En el marco de la farmacología y el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad biológica, es de gran relevancia el estudio de algún metabolito secundario, en cuyo caso se lleve a cabo alguna modificación para lograr algún cambio importante en aspectos como solubilidad, actividad biológica, o su estabilidad química y térmica. Junto con la obtención e identificación de más principios bioactivos de *C. morifolius*, el proceso de derivatización y estudios quimioinformáticos e *in vitro* de las sustancias que se generan en el seno de la planta representa un avance significativo en el desarrollo de nuevos medicamentos.

En este trabajo se utilizó la planta *Croton morifolius* (**Figura 3**) para la obtención de morifolina C y la preparación de tres derivados semisintéticos, y su evaluación de características estructurales mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas además de determinar las propiedades fisicoquímicas, el perfil ADMET y las actividades biológicas haciendo uso de herramientas computacionales para determinar las probabilidades de su potencial uso como antibacteriano, y finalmente, la evaluación del efecto antibacteriano contra cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas patógenas para el ser humano.



Figura 3. Planta de *Croton morifolius*.

2. ANTECEDENTES/MARCO TEÓRICO

2.1 Metabolito secundario

Se les conoce como metabolitos secundarios a aquellas sustancias que se derivan de los metabolitos primarios y que no están involucradas directamente en los procesos vitales de un ser vivo como el crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo, es decir, no desempeñan funciones vitales. Se tratan de moléculas que pueden participar en procesos para mantenimiento y la homeostasis del organismo; pueden ayudar a modular procesos vitales como la excreción de desechos y productos tóxicos generados en el seno del organismo (Panikov, 2011). Estos metabolitos secundarios provienen, tal como lo sugiere el término, del metabolismo secundario de los organismos vivos. Su distribución es limitada y algunos de estos se encuentran solo en especies específicas. Se considera que estas sustancias están involucradas en la supervivencia de la especie. Algunos de estos metabolitos secundarios son los responsables de los colores, aromas y principios activos de una gran diversidad de seres vivos.

2.2 Principio activo

Se sabe que los principios activos son sustancias responsables de la actividad biológica atribuida a una especie, a drogas o medicamentos; estas sustancias son responsables por el efecto tóxico o benéfico cuando se evalúan en un organismo vivo (Harborne, 1998). Se puede utilizar el término para identificar moléculas naturales que presenten actividad biológica.

2.3 Semisíntesis de productos naturales

Se trata de la modificación molecular de algún principio activo de origen natural. Dicha modificación es llevada a cabo con el objetivo de generar fármacos que sean tolerados en mayor medida al momento de su aplicación (Dewick, 2009). Tanto los productos naturales como sus derivados semisintéticos son una fuente importante para la producción de nuevos fármacos. Junto con sus análogos estructurales, los productos naturales poseen características de una gran diversidad química, además de una amplia gama de especificidad bioquímica y propiedades farmacológicas que propician su uso como herramientas en el descubrimiento de nuevos fármacos y en la continuación de la producción de nuevas invenciones en medicina, química y biología (Majhi y Das, 2021).

Un ejemplo relevante respecto a la aplicación de esta herramienta fundamental para el desarrollo de nuevos fármacos es la semisíntesis de derivados provenientes de la podofilotoxina (PPT) (17) (**Figura 4**). Este producto natural es un lignano de ariltetralina que se extrae de las raíces y rizomas de la planta de la familia Berberidaceae que pertenece al género *Podophyllum*. Se trata de una sustancia antimitótica y que funge como compuesto líder en el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos potentes (Lv y Xu, 2011). Tradicionalmente se ha utilizado este compuesto para el tratamiento de verrugas genitales; sin embargo, debido a su toxicidad, no es posible aprobar su uso para el tratamiento clínico contra el cáncer (Goel y Jain, 2024). Sus derivados semisintéticos, etopósido (18) y tenipósido (19) (**Figura 4**), son en la actualidad los más frecuentemente utilizados en la quimioterapia contra el cáncer al actuar como inhibidores de la ADN Topoisomerasa II (TOPI) contra distintos tipos de cáncer, incluyendo cáncer pulmonar, carcinoma testicular, linfoma y el sarcoma de Kaposi; de igual manera, representan versiones menos tóxicas de la podofilotoxina (Lv y Xu, 2011; Goel y Jain, 2024). Para resolver el problema de la baja solubilidad en agua del etopósido e incrementar sus características farmacéuticas, se ha optado por utilizar su derivado etópofos (fosfato de etopósido) (20) (**Figura 4**), el derivado éster de fosfato del etopósido, el cual ha sido utilizado ampliamente en el tratamiento de una variedad de neoplasmas (Lv y Xu, 2011). En comparación con el compuesto parental PPT el compuesto etópofos es altamente soluble en agua y se puede formular para uso intravenoso, lo que se traduce en una mayor aplicación clínica (Lv y Xu, 2011).

La PPT y sus derivados no solamente exhiben actividad anticancerígena y antiviral, sino que también poseen actividad antioxidante, antitripanosomal, así como inhibidor de la actividad del receptor de melanocortina-4 (MC4R); por otra parte, los derivados de PPT también han reportado actividades insecticidas contra las larvas de *Mythimna separata* (oruga deshojadora) y de *Brontispa longissima* (gorgojo de la hoja del coco) (Lv y Xu, 2011).

Se han reportado principalmente dos tipos de mecanismos de acción de los derivados de la PPT como agentes anticancerígenos, ejemplo de ello es como inhibidores de polimerización de túbulos (TPI) para compuestos del tipo PPT, y las sustancias asociadas a los etopósidos fungen como inhibidores de la topoisomerasa II (TOPI) (Lv y Xu, 2011).

Para resolver el problema de la resistencia múltiple a drogas (MDR) y disminuir la toxicidad de los derivados, se ha reportado la síntesis de derivados de podofilotoxina con sustitución del tipo 4α -O- (**21**) y 4β -N-indol-3-il-glioxil (**22**) (**Figura 4**) y se evaluó su actividad biológica contra cuatro tipos de células cancerígenas (de cérvix, ovárico, leucémicas, y de leucemia resistente a adriamicina) *in vitro* (Lv y Xu, 2011). Se determinó que los derivados ésteres de la PPT (inserción de O) mostraron una actividad más potente que los correspondientes congéneres del tipo amida (inserción de N) (Lv y Xu, 2011).

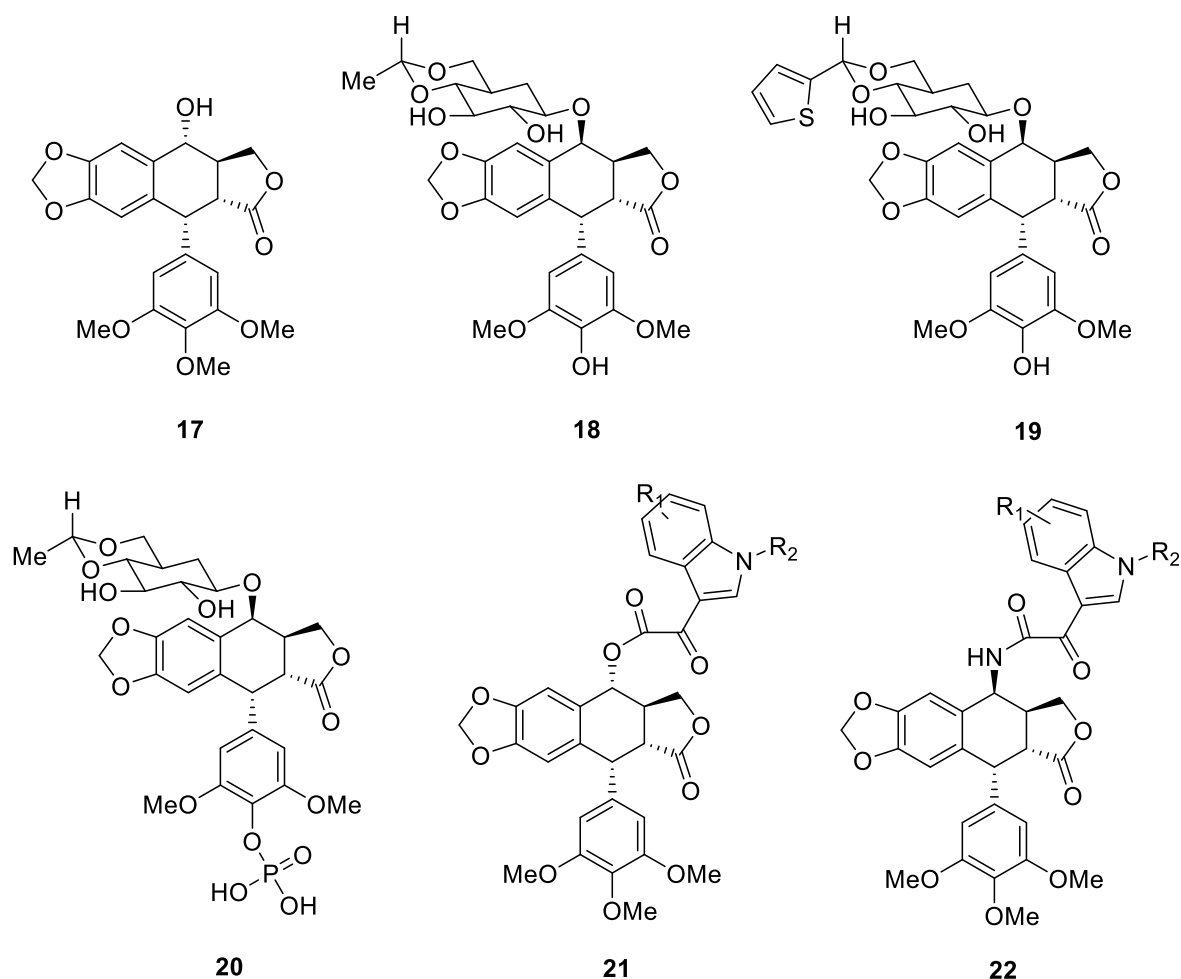


Figura 4. Podofilotoxina (PPT) y algunos derivados semisintéticos.

Es así como el concepto de semisíntesis ganó mayor importancia a mediados del siglo XX, impulsado por la necesidad de solucionar algunas limitaciones de los productos naturales (Goel y Jain, 2024). Con el aislamiento de productos naturales, ha sido posible producir fármacos con mayor actividad y que puedan ser tolerados a través de modificaciones químicas (semisíntesis), o a través de la síntesis total de análogos de principios activos (Dewick, 2009). Un ejemplo fue la semisíntesis de la droga anti-malaria quinina (**23**) a partir del alcaloide natural precursor cinchonina (**24**) (Goel y Jain, 2024). Esta técnica también es útil para resolver algunos problemas de abastecimiento de materia prima para la obtención de productos naturales bioactivos. Ejemplo de ello es el paclitaxel (**26**), el cual es considerado como uno de los descubrimientos más significativos en el campo de terapias anticancerígenas; fue aislado en 1967, pero su abastecimiento y solubilidad representaron un problema hasta que fue semisintetizado a partir de 10-deacetilbaccatina III (**25**); después de 20 años de su descubrimiento, se aprobó para el tratamiento del cáncer de ovario refractario en 1992, y posteriormente para el cáncer de mama, sarcoma de Kaposi relacionado a SIDA, además de otros tipos de cáncer (Goel y Jain, 2024; Dewick,

2009) Así mismo, otra aplicación de la semisíntesis es la obtención de la insulina humana a partir de insulina porcina, reemplazando al aminoácido terminal alanina en la cadena B por treonina mediante métodos enzimáticos (Dewick, 2009). En la **figura 5** se observan algunos compuestos obtenidos por semisíntesis.

Poco después del paclitaxel, se aprobó el docetaxel (**27**) (**Figura 5**), un derivado semisintético más potente con un mejor perfil farmacocinético, el cual fue aprobado y actualmente es utilizado para el tratamiento de distintos tipos de cáncer (Goel y Jain, 2024). Posteriormente, en el año 2010, se lanzó el derivado taxoide cabazitaxel (**28**) (**Figura 5**) que, en combinación con la prednisona, se utiliza para el tratamiento del cáncer prostático metastático de hormona refractaria (Goel y Jain, 2024; Dewick, 2009).

Otro caso relevante es el de la camptotecina (**29**) (**Figura 5**), un inhibidor de la topoisomerasa, el cual se puede aislar del tallo y la corteza de *Camptotheca acuminata*, conocido como árbol de la felicidad, perteneciente a la familia Cornacea; debido a los problemas de solubilidad en agua (impedimento para administración intravenosa) y los efectos adversos del producto natural, se han sintetizado varios derivados en busca de compuestos potentes y clínicamente activos, y es así pues que sus análogos irinotecán (**30**), topotecán (**31**) y belotecán (**32**) (**Figura 5**) han sido aprobados por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos, *Food and Drug Administration*) (Goel y Jain, 2024).

La utilidad de la derivatización de los metabolitos secundarios también radica en la disminución de la toxicidad del principio activo, ya que, si bien su mecanismo de acción puede resultar en la erradicación de una infección o el tratamiento de padecimientos como el cáncer, también pueden provocar efectos colaterales derivados de su toxicidad (Majhi y Das, 2021). Esto ocurrió con la geldanamicina (**33**) (**Figura 5**), una ansamicina que consiste en un anillo de benzoquinona, la cual fue aislada de *Streptomyces hygroscopicus*; esta sustancia es un fuerte inhibidor de la proteína HSP90, lo cual se traduce en una potente actividad anticancerígena (Goel y Jain, 2024). Sin embargo, debido a la hepatotoxicidad y la baja biodisponibilidad, este metabolito secundario representó una opción poco viable para desarrollo clínico; es aquí donde la derivatización semisintética jugó un papel muy importante en el desarrollo de fármacos (Goel y Jain, 2024). Se llevó a cabo la síntesis del compuesto 17-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG; tanespimicina) (**34**) (**Figura 5**); este compuesto posee una actividad *in vitro* mejorada y toxicidades disminuidas (Goel y Jain, 2024). Para mejorar algunas características farmacocinéticas como la solubilidad y la biodisponibilidad, se llevaron a cabo mayores cambios que condujeron a la semisíntesis del compuesto 17-DMAG (alvespimicina) (**35**) (**Figura 5**) (Goel y Jain, 2024). Si bien los productos naturales han sido empleados como excelentes puntos de partida para el diseño análogo y síntesis, en pocas ocasiones se utilizan directamente en aplicaciones clínicas; es por

ello que la modificación estructural de productos naturales es esencial en diversos casos dado que estos compuestos y sus derivados semisintéticos son fuentes valiosas de nuevos candidatos como fármacos con una gran variedad de actividades biológicas y farmacológicas (Majhi y Das, 2021).

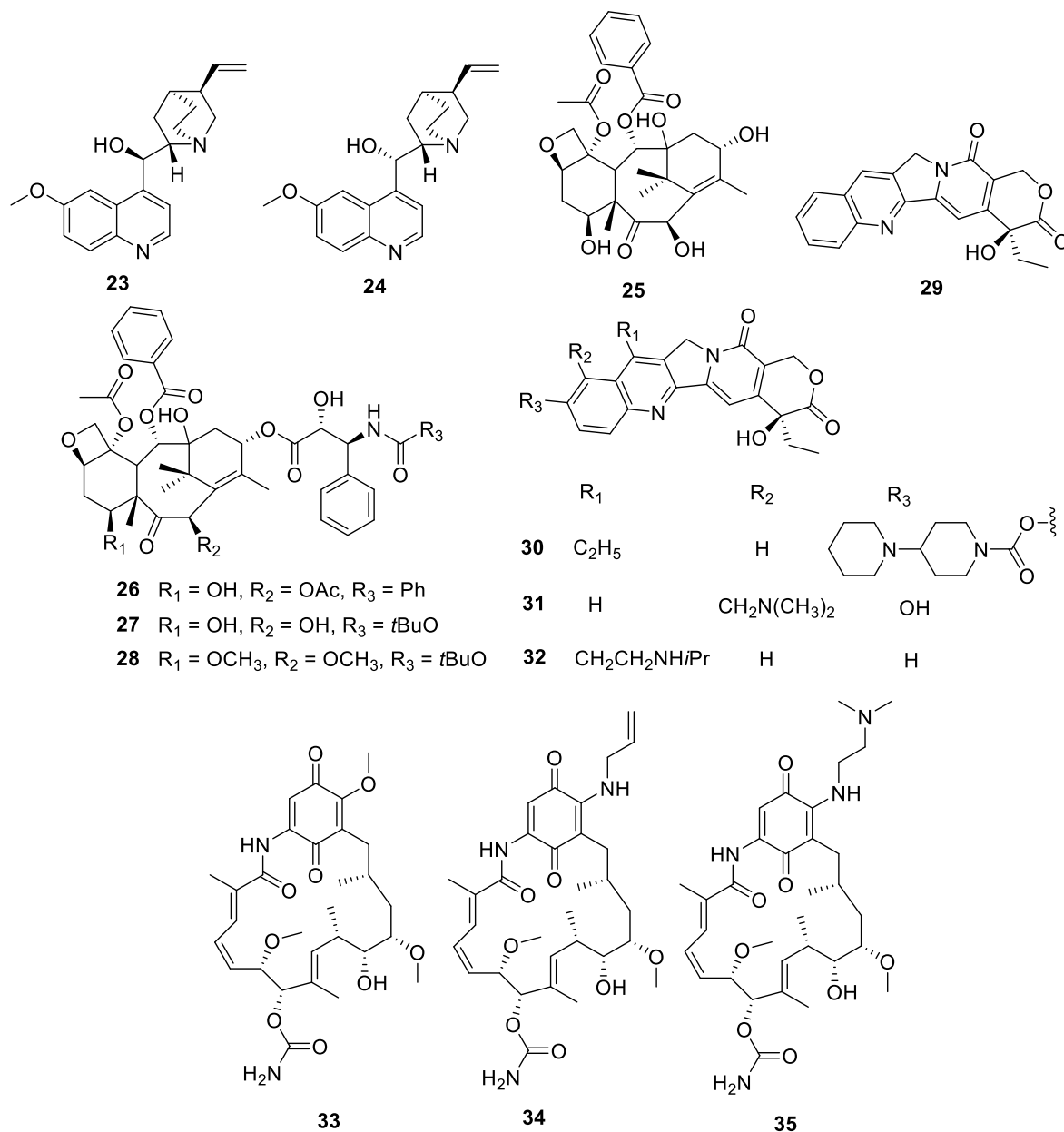


Figura 5. Ejemplos de productos naturales y derivados semisintéticos utilizados para el tratamiento de diversas afecciones, principalmente algunos tipos de cáncer.

2.4 Definición de droga

Dentro del contexto popular, este término se suele asociar con sustancias ilícitas y que representan una amenaza a la salud pública debido a la dependencia y efectos tanto a corto como a largo plazo que suelen provocar en quienes las consumen. Es, así pues, que dentro del área de la fitoquímica y de la química de productos naturales, se define a una droga como un producto de origen natural que, recolectado o separado de la naturaleza, tiene una composición y propiedades tales que constituye la forma bruta de un medicamento (Gállico, 2007; Bandoni, 2011). También es importante contemplar el término droga cruda o materia prima; hace referencia a toda droga que solamente ha experimentado el proceso de secado. (Bandoni, 2011).

2.5 Medicamento

Este término es utilizado muy frecuentemente por la cultura popular, aunque en una gran mayoría de ocasiones no se conoce su definición concreta. De esta manera, se entiende como medicamento a toda sustancia que, independientemente de su origen, composición, forma y presentación, en una determinada dosis es usada para procurar la salud ya sea de forma total o parcial, pues reestablece el equilibrio en las funciones de un organismo, o también previene enfermedades (Oscanoa, 2012). En muchos casos, un mismo producto natural puede ser considerado como materia prima, droga, y medicamento (Oscanoa, 2012; Bandoni, 2011). Algunos ejemplos que se pueden considerar dentro de esta descripción son: polvo de opio, ging-seng y corteza de quina (Bandoni, 2011).

Dentro del diseño, evaluación y aprobación de los medicamentos, es necesario contar con un esquema de clasificación de medicamentos biofarmacéuticos para correlacionar la disolución de la sustancia *in vitro* con la biodisponibilidad *in vivo*; este esquema se propone considerando que la solvatación de la droga y su permeabilidad gastrointestinal son parámetros fundamentales que controlan la velocidad y el nivel de absorción del medicamento (Amidon *et al.*, 1995). En el caso de los medicamentos que se administran de forma oral, se pueden establecer cuatro Clases de Medicamentos Biofarmacéuticos: aquellos de *Clase 1*, los cuales tienen alta solubilidad y alta permeabilidad, los de *Clase 2*, que son los que tienen baja solubilidad y alta permeabilidad, los de *Clase 3*, los cuales corresponden a medicamentos con alta solubilidad y baja permeabilidad, y finalmente los de *Clase 4*, que son sustancias que presentan baja solubilidad y una baja permeabilidad (Amidon *et al.*, 1995). Este esquema de clasificación permite hacer sugerencias para el establecimiento de criterios para evaluar una metodología de prueba para la disolución de un medicamento *in vitro* que pueda correlacionarse con el proceso *in vivo*; esta metodología debe basarse en las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas que rigen la absorción del medicamento (Amidon *et al.*, 1995). Así mismo, Amidon y colaboradores (1995) consideran que se deben tener ciertas consideraciones con los

medicamentos de *Clase 2*, ya que dentro de un entorno *in vivo* puede ocurrir agregación de partículas, además de que se debe tomar en cuenta el tamaño de partícula *efectivo*; usualmente se considera un proceso de micronización (pulverización) para incrementar la velocidad de disolución de una droga, sin embargo este proceso propicia el incremento de la energía superficial y, en consecuencia, también aumenta el potencial para la agregación de partículas, lo cual se traduce en la reprecipitación del medicamento y, por ende, una disminución de la actividad biológica tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*.

Newman y Cragg (2020) establecen que el uso de productos naturales y/o sus variantes sintéticas que utilizan estructuras novedosas, con el fin de descubrir y desarrollar una droga propiamente, es una práctica que sigue vigente a la fecha. Un ejemplo representativo se visualiza en los tratamientos anticancerígenos, dentro del periodo de 1946 a 1980, de las 75 moléculas como potenciales candidatas, 40 de ellas, es decir, 53.3%, son productos naturales o derivados semisintéticos (Newman y Cragg, 2020). De igual forma, hay productos naturales que representan moléculas líderes en la producción de medicamentos, o que son medicamentos por sí mismos; de entre estas sustancias se encuentran aquellas reportadas en microorganismos endófitos y epífitos, los cuales son fuentes de productos naturales bioactivos, por otra parte, también se tienen los medicamentos candidatos provenientes de fuentes marinas (Amidon *et al.*, 1995). En tiempos recientes se ha presentado la tendencia de cambiar el uso de amplias bibliotecas combinatorias para hacer énfasis en colecciones pequeñas pero enfocadas que contienen información vasta sobre los “aspectos estructurales” de los productos naturales (Newman y Cragg, 2020). Sin embargo, a pesar de que muchos de estos compuestos bioactivos son eficientes, la Regla de 5 de Lipinski establece que las primeras cuatro reglas no aplican a los productos naturales ni a moléculas que sean reconocidas por un sistema de transporte activo cuando se consideran entidades químicas candidatas a convertirse en medicamentos (Newman y Cragg, 2020; Lipinski *et al.*, 1997). Por ejemplo, existe un gran número de compuestos denominados “compuestos AbbeVie” que son oralmente activos pero que violan más de una regla de Lipinski; en este sentido se ha demostrado que compuestos bioactivos pueden violar significativamente las reglas de Lipinski y demostrar bioactividad oral (Newman y Cragg, 2020). Recientemente una extensión de metodologías ha logrado demostrar cómo es que bibliotecas de compuestos de algunas estructuras privilegiadas puede conducir a la obtención de compuestos que podrían haber sido marcados por los filtros PAINS (*Pan-Assay Interference Compounds*) establecidos primeramente en el año 2010 y discutidos junto con los compuestos IMP (*Invalid Metabolic Panaceas*); algunos de los compuestos recientemente identificados presentan utilidad, incluso cuando es posible que pudieran haber sido marcados por los filtros PAINS, es por ello que se debe tener cuidado en rechazar compuestos vía procesos automatizados (Newman y Cragg, 2020). La “Regla de cinco” de Lipinski representa el primer intento

cualitativo para guiar el diseño de compuestos “oralmente entregables” y se basa en los límites de propiedades (coeficiente de partición octanol-agua, peso molecular y el número de donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno) fuera de los cuales se predice que la actividad oral es pobre (Pillai *et al.*, 2001). Con base en estas reglas y los filtros PAINS e IMP, es posible determinar cuando un compuesto que puede ser un posible candidato para convertirse en un medicamento presenta falsos positivos y, en realidad, se trata de una especie química que no posee verdaderamente potencial terapéutico; de este modo, se descartan algunos candidatos que no tienen un modo de acción específico y, por ende, no lograrían posicionarse como principios bioactivos.

Oscanoa (2012) considera que la accesibilidad a los medicamentos es un problema grave que afecta a una gran parte de la población mundial, especialmente en países en desarrollo, por lo que se requieren investigaciones y la implementación de medidas de intervención adecuadas para su solución.

Si bien los medicamentos son productos orientados a procurar la salud de la población, también se debe tener en cuenta que, derivado de su mal uso, exceso, defecto o interacciones con otros medicamentos y sustancias químicas en general, es relevante contemplar que existen problemas relacionados a estos productos (Espejo Guerrero *et al.*, 2002). De esta manera, el Consenso de Granada de 1998 define al Problema Relacionado con Medicamentos como: “Un problema de salud, vinculado con la farmacoterapia y que interfiere o puede interferir con los resultados esperados de salud en el paciente” (CONSENSO, 2002). Por otra parte, el Equipo CESCA (Correlación entre las Entradas y las Salidas en la Consulta Ambulatoria) estableció su propia definición para este término: “Todo aquello que requiere o puede requerir una acción por parte de los agentes de salud” (CONSENSO, 2002). Igualmente se tiene la definición que presentaba la WONCA (*World Organization of Family Doctors*, Organización Mundial de Médicos de Familia) en el año de 1995: “Cualquier queja, observación o hecho que el paciente y/o el médico perciben como una desviación de la normalidad que ha afectado, puede afectar o afecta a la capacidad funcional del paciente” (Espejo Guerrero *et al.*, 2002). Sin embargo, una definición con mayor aceptación fue aquella adoptada en el Segundo Consenso de Granada sobre Problemas Relacionados con Medicamentos: “Problemas Relacionados con Medicamentos (PRM) son problemas de salud, entendidos como resultados clínicos negativos, derivados de la farmacoterapia que, producidos por diversas causas, conducen a la no consecución del objetivo terapéutico o a la aparición de efectos no deseados” (CONSENSO, 2002). Así mismo, fue este mismo Consenso el cual adoptó una clasificación más sólida sobre estos PRM según distintos criterios. Es, así pues, que los PRM se clasifican de la siguiente manera (CONSENSO, 2002):

- **Necesidad:**
 - PRM 1: El paciente sufre un problema de salud consecuencia de no recibir una medicación que necesita.
 - PRM 2: El paciente sufre un problema de salud consecuencia de recibir un medicamento que no necesita.
- **Efectividad:**
 - PRM 3: El paciente sufre un problema de salud consecuencia de una ineffectividad no cuantitativa de la medicación.
 - PRM 4: El paciente sufre un problema de salud consecuencia de una ineffectividad cuantitativa de la medicación.
- **Seguridad:**
 - PRM 5: El paciente sufre un problema de salud consecuencia de una inseguridad no cuantitativa de un medicamento.
 - PRM 6: El paciente sufre un problema de salud consecuencia de una inseguridad cuantitativa de un medicamento.

El Segundo Consenso de Granada sobre Problemas Relacionados con Medicamentos hace las siguientes consideraciones (CONSENSO, 2002; Espejo Guerrero *et al.*, 2002):

- Un medicamento es necesario cuando ha sido prescrito o indicado para un problema de salud concreto que presenta el paciente.
- Un medicamento es ineffectivo cuando no alcanza suficientemente los objetivos terapéuticos esperados.
- Un medicamento es inseguro cuando produce o empeora algún problema de salud.
- Un PRM se considera cuantitativo cuando depende de la magnitud del efecto.

2.6 Producto natural

Cuando se habla de un producto natural, en muchas ocasiones se puede asociar con el concepto que se tiene dentro del conocimiento popular de los remedios caseros. Sin embargo, dentro del estudio de la fitoquímica e incluso en áreas como la de la farmacología, se sabe que un producto natural es todo producto de origen orgánico o inorgánico que se encuentra en la naturaleza y que pueda ser aislado y procesado por el hombre (Dewick, 2009). Una vez que se llevan a cabo modificaciones a escala molecular de estos productos, ya no aplica el término de producto natural.

Cabe destacar que, dentro de los metabolitos secundarios que estudia la química de productos naturales, existe una gran diversidad que se pueden clasificar según su estructura molecular base y/o según las características químicas que posea. Estas familias son las de los alcaloides (36-38), terpenos (39-41), policétidos (42-44) y los shikimatos o compuestos fenólicos (45-47) (Harborne, 1998) (**Figura 6**).

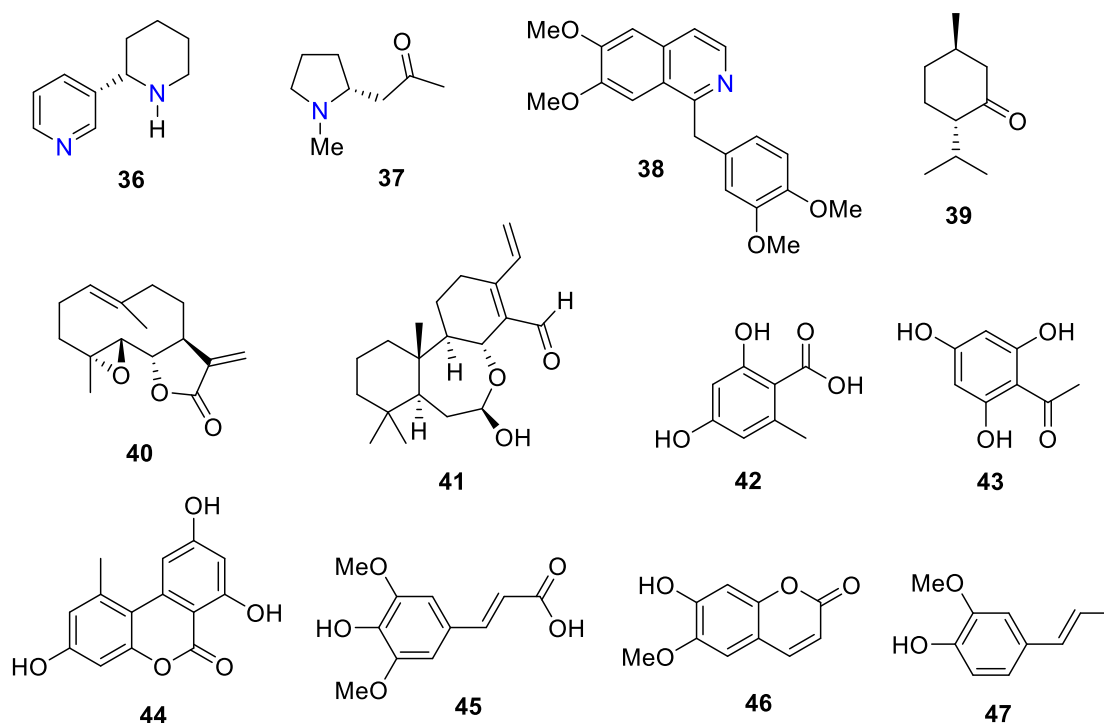


Figura 6. Familias de metabolitos secundarios.

En lo que respecta al género *Croton*, el cual pertenece a la familia Euphorbiaceae, lo componen árboles, arbustos, hierbas y lianas, además de que este género está conformado por más de 1200 especies consideradas ecológicamente prominentes alrededor de todo el mundo; se considera que Brasil, el Caribe y México son centros importantes de diversidad de las especies pertenecientes a este género, aunque también existen reportes de la presencia de algunas de estas plantas en zonas como África, India, Sudoeste Asiático y Australia (Reyes-Hernández *et al.*, 2023; Velázquez-Jiménez *et al.*, 2022). Muchas especies del género *Croton* tienen un uso muy marcado en las prácticas de medicina tradicional en todo el mundo, además de que existen diversos estudios científicos publicados que indican que este grupo de plantas lleva a cabo la biosíntesis de una gran diversidad de metabolitos secundarios, incluyendo alcaloides (48-50), flavonoides (51-53), mono-, sesquit-, di-, tri- terpenos (54-65), esteroides (66-68), lignanos (69-70), poliprenoides (71), quinonas (72) (Figura 7), entre muchos otros; dentro de esta amplia gama de compuestos, el grupo que se encuentra en mayor proporción en esta flora son los diterpenos (Reyes-Hernández *et al.*, 2023).

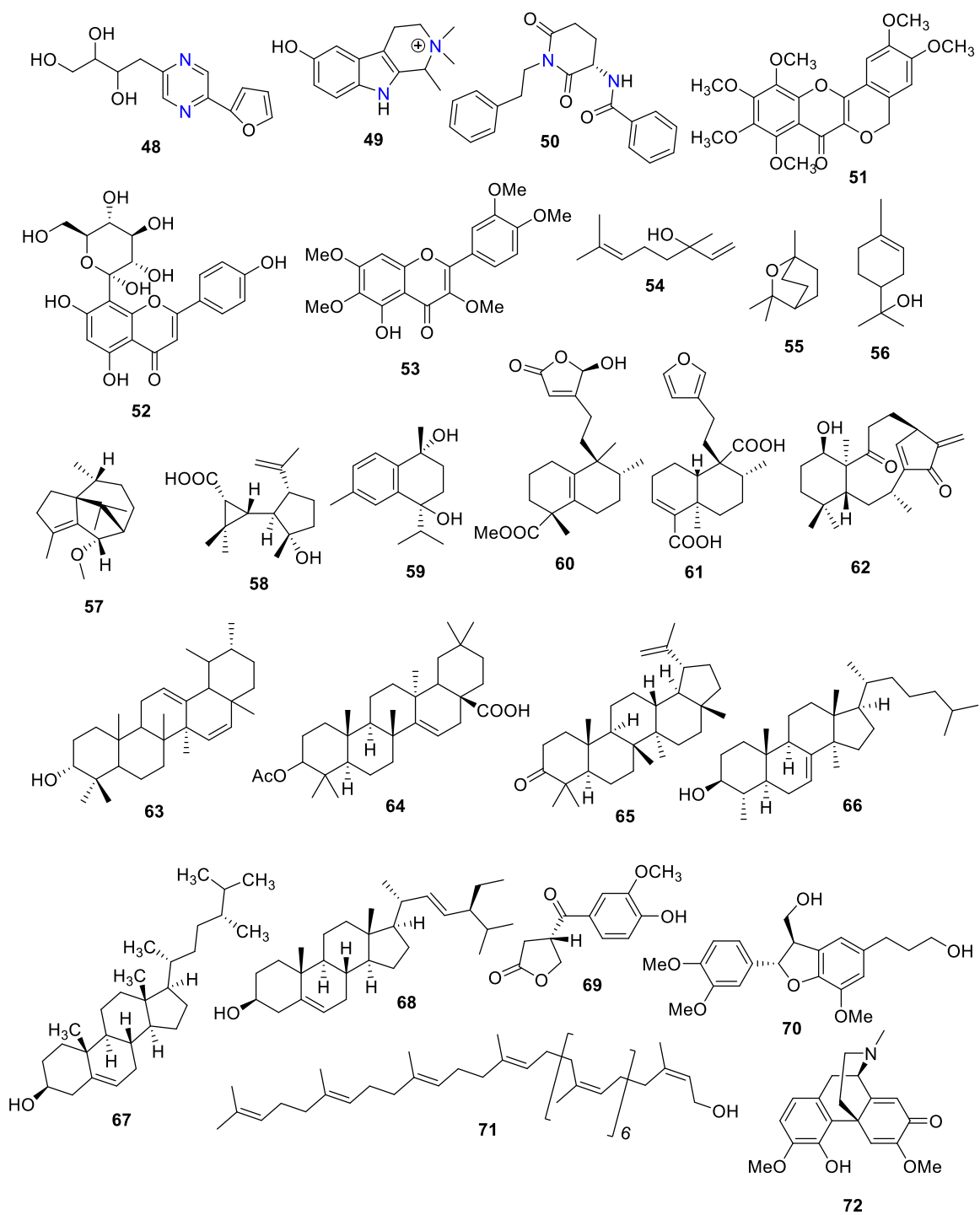


Figura 7. Diversidad de metabolitos secundarios aislados de distintas especies del género *Croton* (Euphorbiaceae).

2.7 Importancia y usos de *C. morifolius* en la medicina tradicional

La planta conocida como “palillo”, “vara blanca” o “llora sangre” y cuyo nombre científico es *C. morifolius*, es un arbusto que se distribuye ampliamente por la zona Centro-Sur de México y que ha sido ampliamente utilizado dentro de la medicina tradicional y ancestral por los habitantes locales para el tratamiento de diversas afecciones como amigdalitis, gastritis, neuralgia y cáncer estomacal a través de tratamientos empíricos (Velázquez-Jiménez *et al.*, 2022). Se tiene registro que el uso de entre dos y tres gotas del aceite contenido en las semillas puede actuar como una dosis moderada de aceite de ricino; los nativos mexicanos suelen utilizar las hojas de esta planta en forma de infusión como remedio para gastralgia y un malestar estomacal generalizado. Es sabido que es la tintura de las hojas la que tiene excelentes resultados contra la neuralgia, especialmente en la cara, ya sea que se utilice como linimento (una preparación similar a una cataplasma) o mediante una ingesta de una dosis de diez o quince gotas en agua de flor de naranjo (The Lancet, 1884). A través de una maceración, se puede obtener una pomada (uso local) que es utilizada para el tratamiento de heridas (The Lancet, 1884).

2.8 Metabolitos secundarios presentes en *C. morifolius*

Según Altamirano (2013), una descripción general de algunas sustancias químicas que se pueden encontrar en *C. morifolius* son aceites esenciales, algunas grasas, cera resinosa, materia de color amarillenta, un ácido tánico característico, glucósidos, ácidos málico, cítrico y oxálico, varias sales y materia gomosa, azucarada y albuminosa. El aceite esencial es el principio más importante; se trata de un líquido muy fluido y volátil (con un punto de ebullición de 33°C), es amarillento con un olor agradable, aromático, fuerte y muy característico, el cual puede describirse como el de una planta fresca; tiene un sabor resinoso muy picante, además de que es más ligero que el agua, en la cual es poco soluble, aunque sí es soluble en alcohol (Altamirano, 2013). En el mismo estudio se describe que esta sustancia se puede encontrar mezclada con otros aceites esenciales cuyos puntos de ebullición pueden oscilar entre los 120 y 150°C, además de que se oxida en contacto con el aire y se plantea que contenga oxígeno en su composición elemental. Por otra parte, también se plantea que el glucósido extraído de la especie es un sólido amarillento que no cristaliza, sin aroma y con sabor ligeramente amargo; mediante el tratamiento con los agentes químicos adecuados, se lograron reacciones características de los glucósidos.

Altamirano (2013) también afirmó que el principio activo de la hierba es el aceite esencial, ya que tiene actividad en el sistema nervioso, pues disminuye la excitabilidad del sistema nervioso central y periférico, además de que es purgante; tiene uso como anestesia local. Igualmente se afirma que, cuando se inhala, puede causar insensibilidad y parálisis de movimiento; cuando se ingiere, actúa como anestesia local en el estómago. Una inyección subcutánea de dos a cuatro gotas de la

esencia en una rana puede provocar efectos estupefacientes y depresión cerebral, para posteriormente generar fatiga muscular y suspensión de los movimientos respiratorios, sin afectar a los cardíacos. Los síntomas aparecen y desaparecen en lapsos de tiempo muy breves, lo que indicaría que la absorción y eliminación del medicamento ocurre con cierta rapidez. Por otro lado, según Hernández y Gally (1991), se debe tener cuidado al momento de administrar esta planta como medicamento a personas que padecen infecciones intestinales, pues es muy irritante.

2.9 Furano clerodanos aislados de especies de *Croton*

Desde el punto de vista de la investigación química relativa a los metabolitos secundarios que se encuentran en la especie *C. morifolius*, la información disponible es escasa, ya que solamente se abordan componentes muy genéricos del reino vegetal y no se tienen reportadas sustancias características de la planta. Sin embargo, existe un estudio llevado a cabo por Velázquez-Jiménez y colaboradores (2022) en donde se reportó el primer diterpenoide furano 6,7-*seco*-clerodano; este compuesto recibió el nombre de morifolina A (**16**) (**Figura 2**) y su configuración absoluta fue confirmada a través de estudios de difracción de rayos X de monocristal; para llevar a cabo esto, se colectaron raíces de *C. morifolius* y se dejaron en maceración en MeOH para luego hacer una separación mediante cromatografía en columna flash, lo cual permitió la extracción y purificación del diterpeno. Para la elucidación estructural se utilizaron diversas técnicas espectroscópicas como RMN de ^1H y de ^{13}C , donde a su vez se llevaron a cabo experimentos COSY, NOESY, HSQC y HMBC; además se realizaron espectrometrías de masas, espectroscopía infrarroja, medición del punto de fusión y determinación de la rotación óptica.

Existen más y diversos reportes de furano clerodanos aislados de especies del género *Croton*. Uno de estos estudios es el llevado a cabo por Yamale y colaboradores (2009); se estudió a la especie *C. mayumbensis*, un árbol de 34 m de altura que crece en los bosques tropicales de la República de África Central. Se trata de una planta medicinal africana cuya corteza y hojas han sido utilizadas empíricamente para el tratamiento de infecciones microbianas y enfermedades causadas por parásitos en humanos (Yamale *et al.*, 2009). Pese a los interesantes atributos asociados a *C. mayumbensis*, existe poca información respectiva a su potencial farmacológico, así como estudios fitoquímicos dedicados a explorar sus metabolitos secundarios (Yamale *et al.*, 2009). Para llevar a cabo el estudio, se colectó corteza de *C. mayumbensis* de la aldea de Boukoko en la República de África Central para, posterior al secado y pulverizado de la muestra vegetal, se llevó a cabo una extracción con una mezcla de MeOH-CH₂Cl₂ (1:1); el extracto se llevó a sequedad hasta obtener un crudo color café (Yamale *et al.*, 2009). Este extracto se sometió a CC, además de que se analizó con ayuda de HPLC/MS (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Masas); posterior al análisis realizado, se llevaron a cabo purificaciones

subsecuentes para, con ayuda de Espectrometría de Masas, RMN-¹H, RMN-¹³C, experimentos COSY y NOESY, así como la comparación con la literatura, se determinó que esta especie produce un diterpeno del tipo furano clerodano, el cual fue nombrado como centrafricina I (**73**) (**Figura 8**) (Yamale *et al.*, 2009). Finalmente, Yamale y colaboradores (2009) resaltan la importancia de *C. mayumbensis* en la medicina tradicional, por lo que se incita a aislar una mayor cantidad de componentes, así como evaluar las propiedades farmacológicas de la planta.

Por su parte, también se ha encontrado una diversidad de diterpenos furano clerodanos en la especie *C. palanostigma*; se trata de un árbol de tamaño mediano nativo de la región costera del norte de Brasil (Brasil *et al.*, 2010). Brasil y colaboradores (2010) colectaron muestras de corteza y hojas del árbol en la zona de Terra Alta, Pará, Brasil; luego se dejó secar y se pulverizó la materia vegetal para después llevar a cabo una extracción con ayuda de un aparato Soxhlet utilizando hexano, CH₂Cl₂ y MeOH. Por un lado, el extracto hexánico de la corteza precipitó un sólido compuesto principalmente por aparisthman (**74**) y cordatina (**75**) (**Figura 8**); posteriormente se sometió el crudo restante a CC y TLC para, de esta manera, obtener más aparisthman, el diterpeno denominado metil éster del ácido 12-oxohardwíckiico (**76**) (**Figura 8**), así como una mayor variedad de metabolitos secundarios característicos del árbol (Brasil *et al.*, 2010). De igual manera, se procesó el extracto de diclorometano cuyo crudo fue sometido también a CC y TLC con lo cual se obtuvo más aparisthman, así como un nuevo compuesto denominado 8-epicordatina (**77**) (**Figura 8**); para elucidar las estructuras de estos productos naturales se utilizaron técnicas espectroscópicas como experimentos de RMN-¹H, RMN-¹³C, RMN 2D, difracción de rayos X, NOESY, COSY, MS, IR, determinación del Potencial Electroestático Molecular (MEP, *Molecular Electrostatic Potential*) y algunos cálculos computacionales adicionales que refinarían algunas técnicas de predicción de desplazamientos químicos para la elucidación de la estructura química de productos naturales (Brasil *et al.*, 2010).

Otro estudio que reporta la presencia de una variedad de furano clerodanos es aquel presentado por Pudhom y Sommit (2011); en dicho estudio se exploran los metabolitos secundarios y la actividad citotóxica de la especie *C. oblongifolius*. En primer lugar, se colectaron muestras de corteza de la planta provenientes de la Provincia de Prachuabkhirikhan, Tailandia; luego, se dejó secar y se pulverizó la muestra para posteriormente llevar a cabo extracciones con MeOH, y cuyo extracto fue tratado con agua, hexano y AcOEt para la obtención de dos extractos: hexánico y de AcOEt (Pudhom y Sommit, 2011). El tratamiento de los extractos mediante CCs subsecuentes resultó en la obtención de varias especies químicas, de entre las cuales destacan 4 furano clerodanos anteriormente reportados en la literatura (**78-81**) (**Figura 8**), así como un nuevo diterpeno del cual no se tenía información previamente y que fue denominado como 3,4,15,16-diepoxi-cleroda-13(16),14-dien-

12,17-ólido (**82**) (**Figura 8**) (Pudhom y Sommit, 2011). La elucidación estructural de cada uno de estos metabolitos secundarios fue llevada a cabo, como en estudios previamente discutidos, con ayuda de técnicas espectroscópicas como MS, IR, RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , experimentos COSY, HSQC y HMBC, así como la determinación de puntos de fusión, rotación óptica y el uso de difracción de rayos X (Pudhom y Sommit, 2011). Finalmente, se hicieron ensayos de actividad citotóxica *in vitro* de cada uno de los productos naturales, mediante métodos colorimétricos, contra distintas líneas de células cancerígenas: carcinoma ductal de seno humano, carcinoma pulmonar indiferenciado, hepatoblastoma de hígado, carcinoma gástrico y adenocarcinoma de colon; el nuevo diterpeno **82** no exhibió citotoxicidad detectable contra ninguna línea de células evaluadas a una concentración inicial de 1 mg/mL; el compuesto **78** presentó únicamente actividad débil contra células del tipo carcinoma gástrico, mientras que los furano clerodanos **79-81** mostraron amplia citotoxicidad contra todas las células cancerígenas evaluadas (Pudhom y Sommit, 2011).

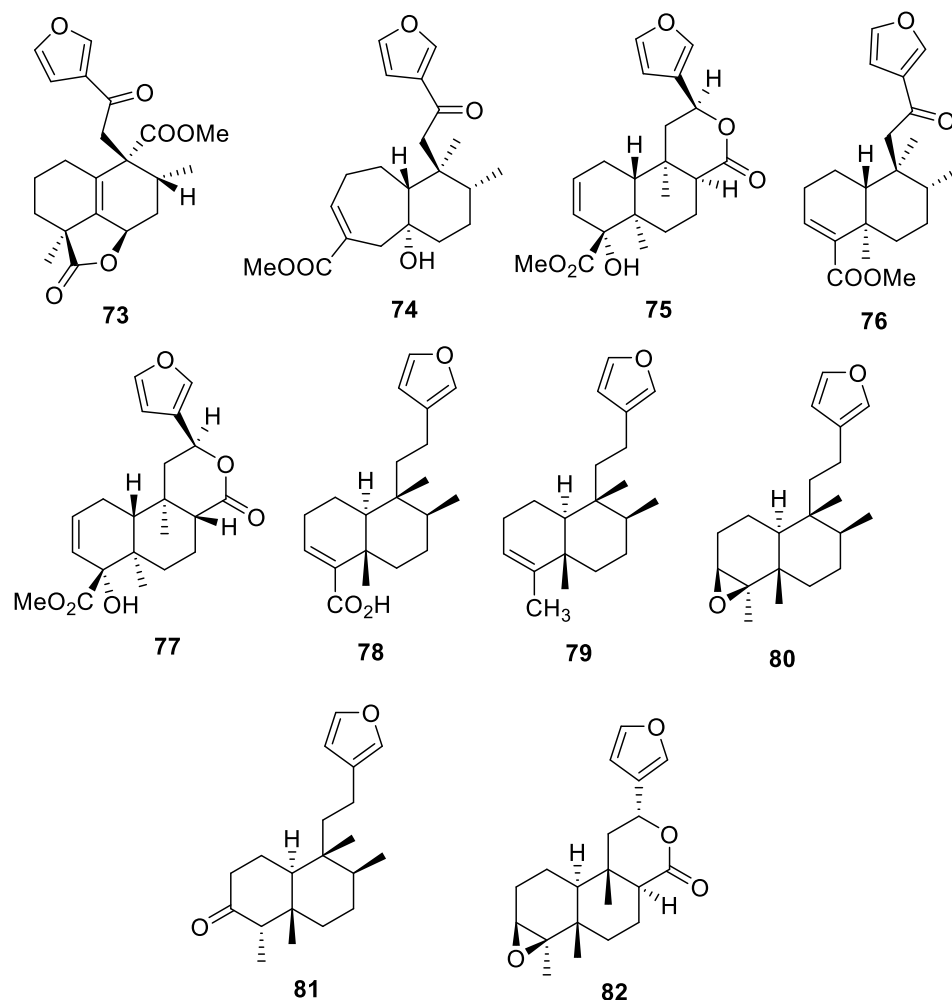


Figura 8. Diterpenos del tipo furano clerodanos aislados de distintas especies del género *Croton*.

2.10 Resistencia de las bacterias a los antibióticos

A pesar de que la quimioterapia antimicrobiana se presenta como uno de los mayores avances de la medicina en el último siglo, la eficiencia de los antibióticos se ha visto comprometida por la aparición de bacterias resistentes (Kaderabkova *et al.*, 2022). Dada su eficacia y seguridad, las β -lactamas se posicionan como los antibióticos más ampliamente utilizados; de entre estas β -lactamas, los carbapenémicos actualmente son considerados de importancia crítica, pues son activos contra una amplia gama de patógenos Gram negativos, incluyendo cepas resistentes a múltiples drogas, además de que se ha incrementado su uso para el tratamiento de infecciones severas adquiridas en hospitales (De Luca *et al.*, 2011; Kaderabkova *et al.*, 2022).

Por un lado, las β -lactamasas (las cuales hidrolizan el enlace amida del anillo de una β -lactama) desempeñan un rol importante en el desarrollo de la resistencia adquirida a las β -lactamas en muchos patógenos bacterianos (De Luca *et al.*, 2011). Por otro lado, se conocen dos familias estructural y mecanísticamente distintas de β -lactamasas: la más numerosa con enzimas activas de tipo serina (las cuales pertenecen a las clases moleculares A, C, y D) las cuales hidrolizan a sus sustratos a través de la formación de un complejo covalente acilo-enzima, y por otra parte están las metalo- β -lactamasas dependientes de zinc (clase B) (De Luca *et al.*, 2011). Las β -lactamasas de Clase D (DBLs por sus siglas en inglés) son enzimas bacterianas involucradas en la resistencia a los antibióticos β -lactámicos (Docquier *et al.*, 2009). Dada la capacidad de las DBLs para hidrolizar oximino-cefalosporinas y carbapenémicos, se han comenzado a considerar a estas enzimas como determinantes de resistencia emergente de notable relevancia clínica (Docquier *et al.*, 2009). Las β -lactamasas de Clase D Hidrolizantes de Carbapenémicos (CHDLs por sus siglas en inglés) son enzimas particulares que confieren resistencia a los carbapenémicos en la mayor parte de los patógenos Gram negativos como *Acinetobacter* spp. y Enterobacteriaceae, y que representan una amenaza considerable, ya que los carbapenémicos se encuentran entre las pocas opciones terapéuticas restantes para el tratamiento de cepas de estas especies que presentan resistencia a múltiples drogas (Docquier *et al.*, 2009).

Más de la mitad de todos los antibióticos que se encuentran disponibles y muchos otros que se encuentran en desarrollo son β -lactamas; cuentan con un amplio historial de extraordinaria eficacia y seguridad, además de que son los agentes antibacterianos más comúnmente prescritos (Nicolau, 2008). Los carbapenémicos son la clase más potente de β -lactamas y, por lo tanto, se reservan típicamente para hospitales en los que se requiere tratar a pacientes severamente enfermos (Nicolau, 2008). Su uso ha incrementado en los últimos 20 años por el incremento en la resistencia a penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas y aminoglicósidos (Nicolau, 2008). Por lo regular se recomienda el uso de carbapenémicos para el

tratamiento de una gran variedad de infecciones severas, dentro de las cuales se encuentra la neumonía nosocomial, infecciones complicadas abdominales y del tracto urinario, neutropenia febril, septicemia, infecciones de la piel, meningitis y fibrosis quística (Nicolau, 2008).

2.11 Estudios quimioinformáticos de clerodanos de especies de *Croton*

Si bien una gran variedad de los productos naturales que se han aislado de especies de *Croton* se han utilizado como agentes antibacterianos, anticancerígenos, antivirales o antifúngicos, es igualmente importante resaltar que existen usos aún más diversos y numerosos. De esta manera, se puede considerar el estudio llevado a cabo por Escandón-Rivera y colaboradores (2022) en el que se exploró el potencial como inhibidor de la α -glucosidasa (tratamiento para la diabetes) de diterpenos furano clerodanos aislados de la especie *C. guatemalensis*. Esta especie es un árbol pequeño que puede alcanzar alturas de hasta 6 m y que se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del continente americano, incluyendo México, Colombia, Ecuador, y Guatemala; también se le conoce como “copalchi” (Escandón-Rivera *et al.*, 2022). Se logró el aislamiento del ácido junceico (**83**), formosina F (**84**), ácido bartsiiifólico (**85**), y también se logró la obtención de dos furano clerodanos de los cuales no se tenía registro: el ácido 6(s)-acetoxi-15,16-diepoxi-*ent*-cleroda-3,13(16),14-trien-20-oico (Ácido crotoaguatenoico A) (**86**) y el ácido 6(s)-hidroxioxi-15,16-diepoxi-*ent*-cleroda-3,13(16),14-trien-20-oico (Ácido crotoaguatenoico B) (**87**) (Figura 9). Así mismo se identificaron flavonoides que, junto con los clerodanos, fueron elucidados con ayuda de experimentos de RMN-¹H, RMN-¹³C, experimentos en 2D (COSY, HSQC, HMBC, NOESY), espectro de masas, HPLC, espectros de UV, determinación de rotación óptica, entre otros (Escandón-Rivera *et al.*, 2022).

Para llevar a cabo los estudios de acoplamiento molecular, se utilizó el software AutoDock 4.2 con los parámetros predeterminados; el estudio se realizó con un modelo construido por homología con la α -glucosidasa de *Bacillus cereus* (PDB: IUOK) para la secuencia de aminoácidos de MAL12 de *Saccharomyces cerevisiae*, el cual fue recuperado del banco de datos de recursos de proteínas UniProt (código de acceso: P5334) con los residuos catalíticos preservados His¹¹¹, Asp²⁰⁵, Glu²⁷⁶, His³⁴⁸ y Asp³⁴⁹ (Escandón-Rivera *et al.*, 2022). Todos los archivos fueron preparados mediante la adición de átomos polares de hidrógeno y se conjuntaron los hidrógenos no polares a las estructuras de la enzima, posteriormente se configuraron cargas de Gasteiger para el modelo molecular de todos los diterpenos analizados (**83-87**); finalmente el sistema completo fue sometido a escaneo de superficie y acoplamiento molecular refinado (Escandón-Rivera *et al.*, 2022). Por otra parte, Escandón-Rivera y colaboradores (2022) implementaron el software Spartan'14 para calcular la conformación de menor energía con optimización geométrica para todos los ligandos mediante un método semiempírico; los conformeros resultantes fueron filtrados y revisados para encontrar redundancias. Los diterpenos obtenidos, junto con un

control de acarbosa, fueron construidos en modelos 3D y se realizaron estudios de Docking molecular entre los ligandos (acarbosa y los diterpenos) y la secuencia de aminoácidos de la α -glucosidasa de *S. cerevisiae* (MALI2), así como con la maltasa-glucoamilasa humana (MGAM-C) con ayuda del software AutoDock 4.2 para lograr predecir la interacción de los productos naturales con los sitios catalíticos de MALI2 y MGAM-C, los cuales fueron seleccionados como plantilla para el modelado molecular con el fin de establecer una comparación con la constante de inhibición teórica (K_i) obtenida en procedimientos *in silico* previos; para el refinamiento de resultados, las mejores conformaciones observadas en análisis preliminares fueron acoplados en un área más pequeña del dominio catalítico (Escandón-Rivera *et al.*, 2022). Se concluyó que la acarbosa encaja bien en el sitio activo de las enzimas analizadas y mostraron interacciones por puente de hidrógeno los residuos de aminoácidos His²⁷⁹ (2.08 Å), Gln³²² (2.00 Å), y Arg³¹² (2.15 Å) con MALI2, mientras que los modos de unión dentro del sitio catalítico de MGAM-C correspondían a Tyr¹²⁵¹ (1.93 Å), Gln¹³⁷² (1.75 Å), Arg¹³⁷⁷ (2.11 Å), Gln¹⁵⁶¹ (2.07 Å), y Gly¹⁵⁸⁸ (2.17 Å) (Escandón-Rivera *et al.*, 2022). Los furano clerodanos encajaron bien en el bolsillo catalítico de MALI2 y mostraron interacciones por puente de hidrógeno con los residuos His²⁷⁹ y Arg³¹², y con los residuos catalíticos preservados alrededor de Tyr¹²⁵¹ para MGAM, lo cual está involucrado con la especificidad catalítica del sustrato de esta proteína; estos resultados confirmarían que la mejor conformación para la inhibición de la enzima es aquella del compuesto **85** (Escandón-Rivera *et al.*, 2022).

Por otra parte, Escandón-Rivera y colaboradores (2022) efectuaron un estudio secundario en el sitio catalítico, se utilizó la acarbosa como control y la mejor conformación de cada compuesto **83-87** del análisis refinado, lo cual permitió conocer al farmacóforo de cada metabolito secundario; se logró determinar que el grupo furano del C-13 de todos estos compuestos forman un puente de hidrógeno con el fragmento NH del residuo catalítico His²⁷⁹, lo que provoca un mayor impedimento estérico en la superficie del bolso catalítico. A continuación, se presentan los resultados del acoplamiento molecular obtenidos por Escandón-Rivera y colaboradores (2022) (**Tabla 1 y Figuras 10 y 11**).

Tabla 1. Identificación de clerodanos con la enzima α -glucosidasa y estudios de acoplamiento molecular.

Compuesto	Fórmula ^a	MAL12		MGAM	
		Ki teórica	Puentes de Hidrógeno	Ki teórica	Puentes de hidrógeno
83	C ₂₀ H ₂₈ O ₃ (316)	7.12 μ M	His ²⁷⁹ , Arg ³¹²	3.02 μ M	Gln ¹³⁷² , Arg ¹³⁷⁷
84	C ₂₀ H ₂₆ O ₄ (330)	6.73 μ M	His ²⁷⁹ , Arg ³¹²	1.95 μ M	Gln ¹³⁷² , Arg ¹³⁷⁷
85	C ₂₀ H ₂₈ O ₄ (332)	4.14 μ M	Ser ¹⁵⁶ , His ²⁷⁹ , Arg ³¹²	2.4 μ M	Try ¹²⁵¹ , Gln ¹³⁷² , Arg ¹³⁷⁷
86	C ₂₂ H ₃₀ O ₅ (374)	17.1 μ M	His ²⁷⁹ , Arg ³¹²	6.31 μ M	Gln ¹³⁷² , Arg ¹³⁷⁷
87	C ₂₀ H ₂₈ O ₄ (332)	13 μ M	Arg ³¹²	5.09 μ M	Gln ¹³⁷² , Arg ¹³⁷⁷
Acarbosa ^b	C ₂₅ H ₄₃ NO ₁₈ (645)	51.4 nM	His ²⁷⁹ , Gln ³²² , Glu ³⁰⁴ , Arg ³¹²	35.7 nM	Gln ¹³⁷² , Arg ¹³⁷⁷ , Gln ¹⁵⁶¹ , Gly ¹⁵⁸⁸

^a Peso molecular (Da). ^b Sustancia de control positivo.

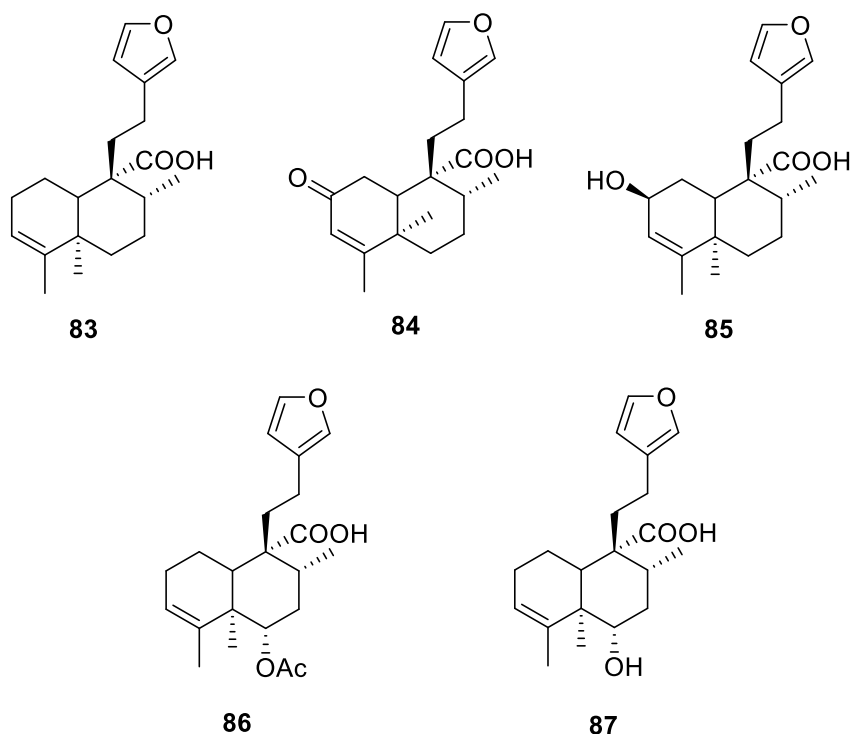


Figura 9. Furano clerodanos aislados de la especie *C. guatemalensis*.

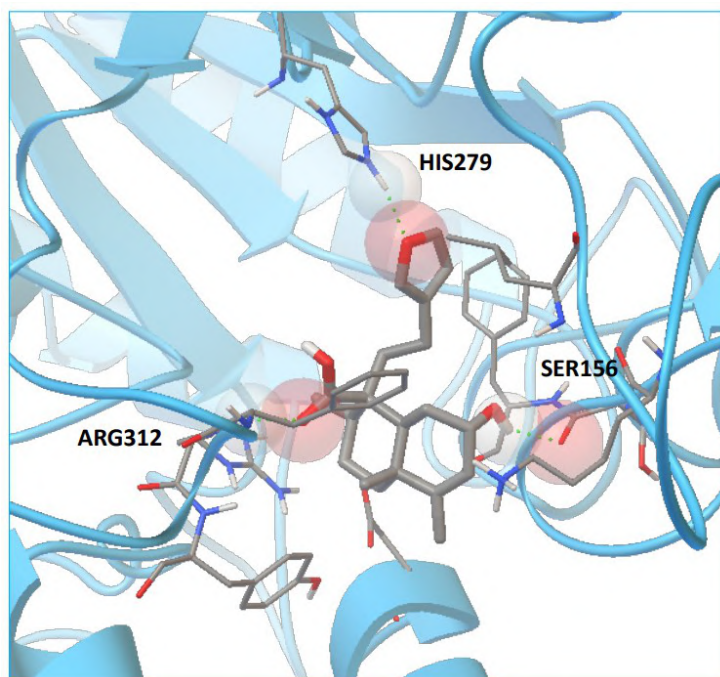


Figura 10. Resultados del acoplamiento molecular de la conformación de unión con la enzima del compuesto **85** con MALI2, 3 puentes de hidrógeno formados con los residuos catalíticos Ser¹⁵⁶, His²⁷⁹ y Arg³¹².

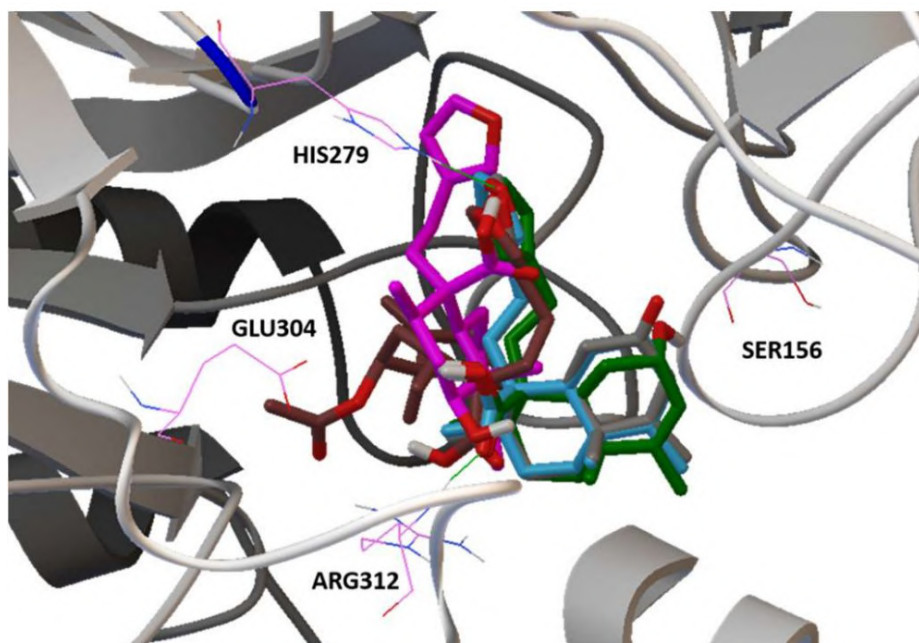


Figura 11. Los resultados del acoplamiento molecular de farmacóforo muestran la estructura minimizada de MALI2 con los compuestos activos **83-87**, el grupo furano genera una interacción por puente de hidrógeno con el fragmento NH del residuo catalítico His²⁷⁹.

Las herramientas quimiinformáticas se han utilizado para determinar perfiles fisicoquímicos y llevar a cabo predicciones de actividad biológica en una gran diversidad de metabolitos secundarios producidos por el género *Croton*. Es así, pues, que es importante considerar el trabajo realizado por Crentsil y colaboradores (2020) en el que se exploró el potencial leishmanicida del ácido hardwíckiico (HA) (**88**) aislado de *C. sylvaticus*. Los protistas del género *Leishmania* son parásitos responsables por la enfermedad tropical Leishmaniasis; aproximadamente 350 millones de personas son susceptibles de contraer el padecimiento, mientras que se reportan alrededor de 70,000 decesos anualmente en todo el mundo (Crentsil *et al.*, 2020). Por otra parte, se sabe que el ácido hardwíckiico se ha logrado aislar previamente de las especies *C. sonderianus*, *C. aromaticus* y *C. oblongifolius*, además de que es un diterpeno que presenta actividad insecticida y antimicrobiana (Crentsil *et al.*, 2020). Crentsil y colaboradores (2020) llevaron a cabo pruebas *in vitro* junto con estudios de Docking para predecir el modo de acción del clerodano con enzimas críticas para la supervivencia de los parásitos de interés; se consideraron las proteínas trypanotona reductasa (TR, *Trypanothione reductase*), pteridina reductasa 1 (PTR1, *Pteridine reductase 1*), y la glutamato-cisteína ligasa (GLC, *Glutamate cysteine ligase*) tanto de *Leishmania donovani* como de *Leishmania major*.

Para llevar a cabo el proceso se obtuvieron las estructuras cristalográficas de rayos X de PTR1 de *L. major* (*Lm*) y de *L. donovani* (*Ld*) del banco de datos de proteínas (PDB, *Protein Databank*) con IDs 2XOX y 2BFO a resoluciones de 2.5 Å y 2.6 Å, respectivamente; se removieron moléculas de agua, ligandos y otros heteroátomos, así como todas las cadenas excepto por la A, con ayuda de PyMOL (Crentsil *et al.*, 2020). Dado que no se tienen estructuras resueltas para TR y GCL de *L. donovani* al igual que de *L. major* en la base de datos RCSB PDB, las secuencias primarias de GCL de *L. donovani* y TR de *L. donovani*, además de *L. major* se obtuvieron de UniProtKB con IDs Q67BG3, C6GKV5, y Q4QJG7, respectivamente en formatos fasta; la secuencia de la supuesta gamma-glutamyl cisteína sintasa de *L. major* (cepa Friedlin) con ID correspondiente a Q4QDM2 fue recuperada de UniProtKB (Crentsil *et al.*, 2020). Se utilizó SWISS-MODEL para la búsqueda de plantillas de *LdGCL*, *LmGCL*, *LdTR* y *LmTR*, así como Modeller 9.2 para la construcción de modelos homólogos de estas enzimas y, por último, se evaluó la calidad de los modelos estructurados con ayuda del software SAVES v5.0 (Crentsil *et al.*, 2020). Los bolsillos de unión se predijeron con ayuda de CASTp y los resultados fueron visualizados con Chimera 1.12; con esta herramienta se consideraron las áreas y volúmenes de las cavidades de enlace óptimas (Crentsil *et al.*, 2020). Tras los análisis, se visualizaron los complejos generados con ayuda de LigPLOT+ v1.4.5 y los diagramas 2D de interacción de ligandos se generaron para cada complejo (Crentsil *et al.*, 2020).

El compuesto **88**, junto con miltefosina, curcumina y anfotericina B fueron sometidos a perfilamiento farmacocinético con ayuda de SwissADME; sus

estructuras canónicas fueron obtenidas de PubChem y se utilizaron para la predicción de sus propiedades farmacocinéticas; el código SMILES del diterpeno fue utilizado para la predicción de actividad biológica (Crentsil *et al.*, 2020). Los resultados de acoplamiento molecular entre el furano clerodano y las enzimas de los dos organismos del género *Leishmania* obtenidos por Crentsil y colaboradores (2020) se presentan en la **Tabla 2** y en las **Figuras 13** y **14**.

Tabla 2. Afinidades de enlace e interacciones proteína-ligando del HA acoplado con los seis receptores, *LdPTR1*, *LmPTR1*, *LdTR*, *LmTR*, *LdGCL*, y *LmGCL*.

Receptor	Energía de enlace (kcal/mol)	Número de puentes de hidrógeno	Residuos de puentes de hidrógeno	Longitud de puente de hidrógeno (Å)	Interacciones hidrofóbicas
<i>LdPTR1</i>	-7.1	4	Lys ¹⁶ , Arg ¹⁷ , Arg ¹⁷ , Ser ¹¹¹	2.8, 3.05, 3.14, 3.14	Gly ¹³ , Ala ¹⁵ , Lys ¹⁶ , His ³⁶ , His ³⁸ , Leu ⁶⁶ , Ala ¹¹⁰ , Ser ¹⁴⁶ , Ser ¹¹¹
<i>LmPTR1</i>	-7.8	3	Asn ¹⁰⁹ , Gly ²²⁵ , Ser ²²⁷	2.9, 2.78, 2.98	Arg ¹⁷ , Leu ¹⁸ , Gly ¹⁹ , Asn ¹⁰⁹ , Ser ¹¹¹ , Phe ¹¹³ , Asp ¹⁸¹ , Tyr ¹⁹⁴ , Lys ¹⁹⁸ , Pro ²²⁴ , Leu ²²⁶
<i>LdTR</i>	-7.6	0	-	-	Gly ⁶⁶ , Tyr ⁶⁹ , Met ⁷⁰ , Leu ⁸⁸ , Pro ⁹⁰ , Asn ⁹¹ , Thr ⁹⁴ , Leu ⁹⁵ , Tyr ²¹⁰
<i>LmTR</i>	-7.5	1	Met ⁷⁰	3.09	Gly ⁶⁶ , Ala ⁶⁷ , Tyr ⁶⁹ , Met ⁷⁰ , Ile ⁷³ , Pro ⁹⁰ , Asn ⁹¹ , Thr ⁹⁴ , Leu ⁹⁵ , Gly ²⁰⁹ , Tyr ²¹⁰
<i>LdGCL</i>	-7.4	4	Met ¹ , Gly ⁵¹ , Glu ⁵² , Thr ³³⁰	3.07, 3.24, 3.05, 3.01	Met ¹ , Gly ⁵¹ , Glu ⁵² , Glu ⁵³ , Thr ¹⁰¹ , Pro ¹⁰² , Asp ¹⁰³ , Pro ¹⁰⁵ , Thr ³³⁰ , Ile ⁴⁹¹ , Arg ⁴⁹⁴
<i>LmGCL</i>	-8.0	4	Phe ¹⁵¹ , Val ¹⁵² , Val ¹⁵² , Cys ¹⁵⁴	3.0, 2.99, 3.09, 2.98	Gln ¹⁴⁸ , Gly ¹⁴⁹ , Asn ¹⁵⁰ , Phe ¹⁵¹ , Val ¹⁵² , Cys ¹⁵⁴ , Ser ¹⁵⁵ , Asp ¹⁵⁶ , Ser ¹⁵⁹ , Ser ¹⁶⁴ , Leu ¹⁶⁵ , Phe ¹⁶⁶ , Val ¹⁶⁷ , Pro ¹⁶⁸ , Val ¹²⁵³ , Ser ²⁵⁶ , Ser ²⁵⁷ , Arg ²⁶¹

Algunas de las características fisicoquímicas del clerodano determinadas por Crentsil y colaboradores (2020) se presentan en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Predicción de propiedades farmacocinéticas para HA haciendo uso de SwissADME.

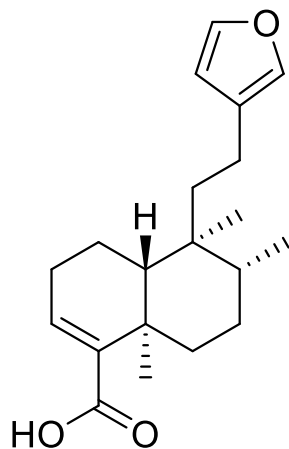
Peso molecular	316.4
ESOL logS	-5.25
Clase ESOL	Moderadamente soluble
Absorción GI	Elevada
Permeación BBB	Sí
Sustrato Pgp	No
Puntuación de biodisponibilidad	0.56

ESOL = Solubilidad estimada (*Estimated solubility*) Absorción GI = Absorción gastrointestinal Permeación BBB = Permeación de la barrera hematoencefálica (*Blood Brain Barrier*) Sustrato Pgp = Sustrato de la P-glicoproteína

De esta forma, se determinó que el HA es moderadamente soluble con un valor de ESOL logS bajo; este parámetro cuantifica la solubilidad acuosa de una molécula (Crentsil *et al.*, 2020). Por otra parte, se obtuvo que este compuesto posee una buena absorción gastrointestinal (GI, *Gastrointestinal Absortion*), lo que implica una alta probabilidad de absorción de la droga, administrada de forma oral, en el tracto intestinal y el torrente sanguíneo; la Biodisponibilidad de Abbot resultó ser de 0.56 (la más alta en comparación con los otros compuestos evaluados), lo que denota biodisponibilidad oral de al menos 10% en ratas o permeabilidad cuantificable en células Caco-2 (Crentsil *et al.*, 2020; Butina *et al.*, 2002). También se predijo que el metabolito secundario no es sustrato de la P-glicoproteína (P-gp), la cual actúa como filtro fisiológico que elimina materia no deseada incluyendo toxinas; la permeación en la barrera hematoencefálica (BBB, *blood brain barrier*) indica la efectividad de las moléculas para permear esta barrera e inicializar con la señalización después de unirse a receptores clave; además, una droga debe permear esta barrera para tener efectos farmacológicos en el parénquima cerebral (Crentsil *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2019).

Se predijo la actividad del ácido hardwíckiico mediante la comparación de características de moléculas con actividades conocidas a través del uso de un algoritmo Bayesiano; la actividad biológica se basa en la inactividad probable predicha (Pi) y la actividad probable predicha (Pa) de una molécula (Crentsil *et al.*, 2020). Se determinó que el compuesto **88** sería un estimulante de la enzima Caspasa-3 con un valor de Pa=0.757 y Pi=0.008; igual sería un estimulante de la proteína Caspasa-8 con valores de Pa=0.688 y Pi=0.004; así mismo se predijo actividad antiparasitaria (específicamente, antileishmanial) con Pa=0.434 y Pi=0.037 (Crentsil *et al.*, 2020). Se ha reportado que las infecciones por microorganismos *Leishmania* retrasan la apoptosis de la célula huésped mediante la inhibición de la actividad de la Caspasa-3; de igual manera se ha observado una disminución de la actividad de Caspasa-8 en infecciones por *L. major*, por lo que el

producto natural podría estar involucrado en mecanismos apoptóticos, así que **88** (Figura 12) representaría un candidato leishmanicida atractivo (Crentsil *et al.*, 2020).



88

Figura 12. Estructura química del ácido hardwíckiico.

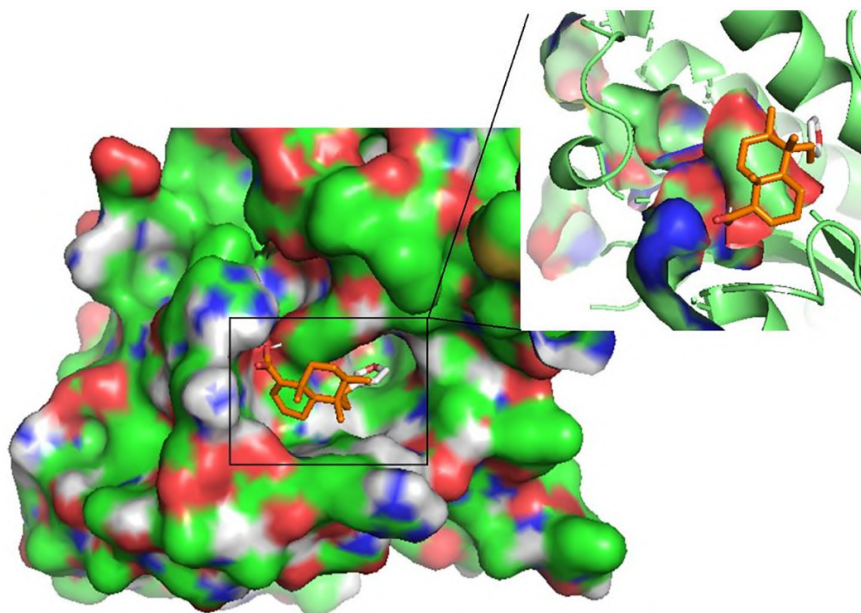


Figura 13. La ubicación del ácido hardwíckiico dentro de la cavidad de unión de *LdPTR1*. El receptor se representa como una superficie mientras que el ácido hardwíckiico se presenta como varas.

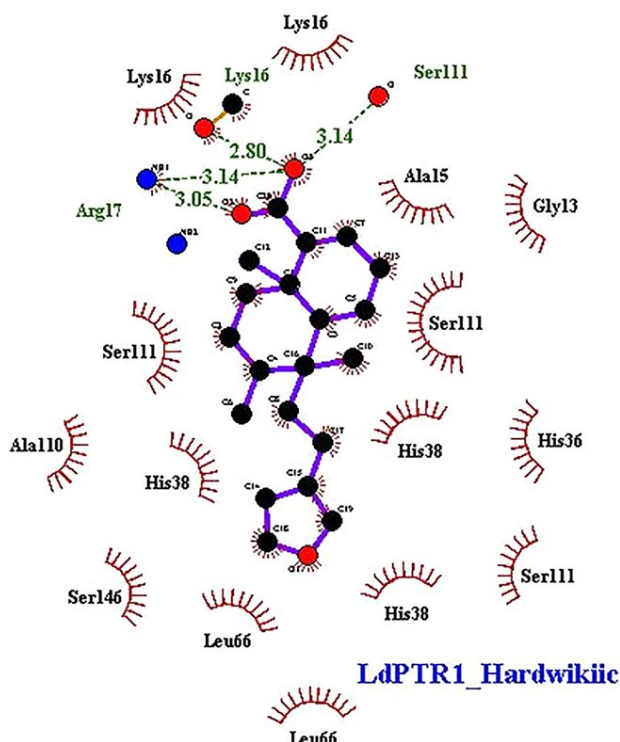


Figura 14. Representaciones en 2D de la interacción proteína-ligando entre el ácido hardwíckiico y el receptor *LdPTR1*. Los puentes de hidrógeno se denotan como líneas verdes punteadas, mientras que los arcos de espinas rojas representan interacciones hidrofóbicas.

2.12 Propiedades fisicoquímicas, el perfil ADMET y las actividades biológicas

Si bien los experimentos *in vitro* e *in vivo* brindan información valiosa cuando se trata de desarrollar nuevos fármacos, es importante contemplar que, para encontrar un nuevo principio bioactivo que cumpla con las propiedades que la caractericen como un compuesto seguro de utilizar, que cumpla su función esencial como medicamento y cuya obtención sea económicamente viable, se requiere de una gran inversión tanto de fondos monetarios como tiempo para llevar a cabo la búsqueda de estos compuestos, muchas veces por ensayo y error (Yang *et al.*, 2019).

Es de gran relevancia considerar el trabajo llevado a cabo por Lipinski y colaboradores (1997) ya que en él se considera que el balance entre la baja solubilidad y permeación es una causa de problemas de absorción; en el área de desarrollo, las aproximaciones computacionales para estimar la solubilidad deben ser revisadas de forma periódica para estar más actualizadas, así como en medidas experimentales de este mismo parámetro.

Con la llegada del cribado de alto rendimiento (HTS, *High Throughput Screening*) en el periodo entre 1989 y 1991, era mucho más viable evaluar una cantidad mayor de compuestos con ensayos *in vitro*; igual, la llegada de la química combinatoria

permitió la síntesis masiva de una gran cantidad de compuestos para ser evaluados mediante HTS, además de que se deben tomar en cuenta los avances en genética molecular y las modificaciones que se realizaron como, por ejemplo, el cambio de soluciones acuosas por el uso de DMSO para evaluaciones biológicas (Lipinski *et al.*, 1997).

Para determinar el perfil fisicoquímico de algún compuesto líder en los cribados HTS ahora no depende completamente de la solubilidad de la sustancia para la actividad *in vivo*, pero sí depende de los principios de química medicinal que relacionen la estructura con la actividad *in vitro*, la naturaleza de la evaluación HTS, el perfil fisicoquímico del compuesto a evaluar y el factor de decisión humana, lo cual propiciará la generación de puntos de partida para estudios de Relación Estructura Actividad (SAR, *Structure Activity Relationship*) en el área de química medicinal (Lipinski *et al.*, 1997).

Se asume que los fármacos de referencia poseen grupos polares que se encuentran en una posición correcta, además de que el potencial *in vitro* se puede incrementar con la correcta adición de grupos lipofílicos que ocupen bolsillos receptores en determinadas enzimas (Lipinski *et al.*, 1997). La naturaleza del cribado determina el perfil fisicoquímico de una molécula con base en los *hits* detectados; conforme mayor sea esta cantidad de *hits*, se tendrá una mayor semejanza al perfil de aquel fármaco de referencia (Lipinski *et al.*, 1997).

Para la elección de compuestos de referencias, es imprescindible escoger aquellos con buenas propiedades de absorción como aquellos utilizados en pruebas clínicas de Fase II para que logren fungir a manera de filtro (Lipinski *et al.*, 1997).

Lipinski y colaboradores (1997) consideraron al Índice Mundial de Medicamento (WDI, *World Drug Index*) que cuenta con una base de datos de alrededor de 50,000 drogas, las cuales filtraron según criterios de propiedades fisicoquímicas para consolidar una primera base para la posterior configuración de más criterios, dentro de los cuales se identificaron parámetros de absorción o permeabilidad. Por otra parte, el peso molecular es una variable para tomar en cuenta por la estrecha relación que guarda con la permeabilidad intestinal y la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, además de que la disminución del tiempo de permeación es una función del peso molecular en dos fases: una lipídica y otra acuosa; fue posible establecer una correlación entre un mayor peso molecular con una menor probabilidad de bioactividad oral (Lipinski *et al.*, 1997). Es aquí donde cobra importancia el análisis del logP, es decir, el coeficiente de partición agua/octanol para la determinación de la biodisponibilidad de un fármaco relacionado con su permeabilidad en un organismo; de manera conjunta, se tiene a la cantidad de grupos donadores de enlaces de hidrógeno, así como de los aceptores en una sustancia, lo cual computacionalmente se puede expresar en una variable

denominada parámetro solvatocrómico α y que, de esta manera, pudiera contribuir a efectos estéricos (Lipinski *et al.*, 1997).

Dado que el resultado de filtrado de cada uno de los fármacos base resultó en parámetros con valores cercanos a cinco o múltiplos de cinco, Lipinski y colaboradores (1997) optaron por establecer la “Regla de cinco”, la cual, de forma general, propone que, para que un compuesto tenga baja absorción o permeabilidad, debe poseer estas características:

- Hay más de cinco donadores de enlaces de hidrógeno (expresado como la suma de fragmentos OHs y NHs).
- El peso molecular es mayor a 500.
- El logP es mayor a 5 (o el MlogP es mayor a 4.15).
- Hay más de 10 aceptores de enlaces de hidrógeno (expresado como la suma de Ns y Os).
- Los compuestos que sean sustratos para transportadores biológicos son excepción a esta regla.

Esta base computacional para la estimación de parámetros fisicoquímicos de candidatos a nuevos fármacos también consta de la consideración de características estructurales que, según Lipinski y colaboradores (1997) son:

- UB (Unsaturated Bonds): Número de enlaces insaturados, excepto por los grupos nitro. Los compuestos aromáticos como el benceno se analizan como un sistema que alterna enlaces sencillos y dobles, entonces un anillo de esta naturaleza tiene 3 enlaces para la corrección del factor UB, el naftaleno tiene un valor de 5.
- AMP (Amphoteric Compounds): El factor de corrección para compuestos anfotéricos en estructuras de alfa aminoácidos con valores de 1.0, mientras que para cada ácido aminobenzoico y ácido piridinacarboxílico, se adicionan valores de 0.5
- RNG: Una variable que adiciona una unidad si el compuesto tiene anillos que no sean benceno o benceno condensado con otros anillos aromáticos, heteroaromáticos, o hidrocarbonados.
- QN: El número de átomos de nitrógeno cuaternarios (si el nitrógeno es parte de un N-óxido, solo se considera un valor de 0.5
- PRX: Un factor de corrección de proximidad para átomos de nitrógeno y oxígeno cercanos topológicamente.
- HB: Una variable sencilla aplicable a compuestos capaces de crear un enlace de hidrógeno interno.
- POL: Correspondiente al número de heteroátomos conectados a un anillo aromático por solo un enlace o el número de átomos de carbono unidos a dos o más átomos que también se encuentran unidos a un anillo aromático.

- ALK: Un simple parámetro cuyo valor es de 1.0 si la molécula únicamente contiene átomos de carbono e hidrógeno y no más de un doble enlace.
- NO2: El número de grupos nitro en la molécula.
- NCS: Una variable que suma 1.0 por cada grupo isotiocianato, y 0.5 por cada grupo tiocianato.
- BLM: Un parámetro sencillo que incrementa 1.0 si hay un anillo de beta lactama en la molécula.

Estos principios de determinación de potencial farmacológico con ayuda de las ciencias computacionales han brindado las bases para la generación y constante actualización de servicios de predicción de actividad biológica y de objetivos enzimáticos. La accesibilidad de bases de datos con numerosos compuestos ha cambiado paulatinamente hasta convertirse en repositorios de acceso público; para 2008 se contaban con aproximadamente 7000 drogas y 480 objetivos validados; se estima que el número de objetivos médicos oscila entre 2200 y 3000, lo cual favorece interacciones con compuestos químicos cuyo desarrollo está orientado a su postulación como un medicamento (Dunkel *et al.*, 2008).

Para clasificar a los medicamentos, el sistema de clasificación de Químicos Terapéuticos Anatómicos (ATC, *Anatomical Therapeutic Chemical*) aprobado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es el más usado. Este es un referente de estudios de usos de drogas global y que categoriza a los medicamentos según su área de aplicación, propiedades terapéuticas, químicas y farmacológicas; se plantea la clasificación de estos compuestos en un aproximado de 850 clases ATC (Dunkel *et al.*, 2008).

La relación entre la estructura de un compuesto y su actividad biológica es objeto de estudio en análisis sistemáticos; si el parámetro conocido como el coeficiente de Tanimoto presenta valores de 0.85, esto se traduce en que las dos moléculas estudiadas pueden poseer actividades similares, lo cual ayuda a predecir un perfil ADMET más adecuado y que se asemeje a un comportamiento real de la sustancia cuando se pone en contacto con un organismo (Dunkel *et al.*, 2008). Según Abu y colaboradores (2018), el perfil ADMET es esencial para que un compuesto activo pueda ser calificado como droga; estas propiedades se definen de la siguiente manera:

- Absorción: Tendencia de la droga a ser absorbida en la superficie objetivo. Si una droga no puede ser absorbida por el objetivo, entonces pierde efectividad.
- Distribución: El movimiento de una droga en un organismo huésped del sitio de inserción al sitio objetivo es definido por propiedades de distribución. Se propone que moléculas pequeñas que tienen menor masa molecular son fácilmente acarreados en el sistema del huésped y que facilita su distribución.
- Metabolismo: Para que una droga presente actividad, debe ser metabolizada propiamente. El metabolismo de las drogas se lleva a cabo en el hígado.

- Excreción: Se refiere a la remoción de la droga posterior a la actividad a través del sistema excretorio usualmente mediante la orina. Si el medicamento no es excretado con facilidad, entonces puede ocasionar efectos adversos en el cuerpo del huésped.
- Toxicidad: Es la propiedad más crucial con la cual se debe tener especial cuidado. Se define como cualquier efecto que no sea la actividad esperada en el huésped.

Para discriminar entre especies químicas que tienen potencial farmacológico de aquellas que no, es de gran importancia el uso de las distribuciones de propiedades y los descriptores fisicoquímicos para incrementar el conocimiento sobre las relaciones droga-objetivo y lograr la integración exitosa de similitudes moleculares con distribución de propiedades que permitan una mejor predicción de estructura-función (Dunkel *et al.*, 2008).

Un ejemplo de aplicación de estos fundamentos en el perfeccionamiento de los estudios *in silico* es el servidor web nombrado SuperPred creado por Dunkel y colaboradores (2008) el cual está orientado al reconocimiento de la mayor cantidad de clases posible. Para esto, se utilizaron las bases de datos SuperDrug y SuperTarget para, de este modo, identificar 3,800 compuestos adicionales que son estructuralmente similares a medicamentos y cuyos coeficientes de Tanimoto eran de al menos 0.85 y, por lo tanto, serían candidatos para tener el mismo modo de acción, unión al mismo objetivo/enzima y ser asignados dentro de la misma indicación médica que las drogas clasificadas por la OMS; para estimar el efecto del compuesto a nivel molecular, se extrajo información de proteínas objetivo a partir de la literatura y se conjuntó con la mitad de las drogas (Dunkel *et al.*, 2008).

Para llevar a cabo la predicción se recurre a la combinación del análisis de propiedades fisicoquímicas y la búsqueda de similitudes; la predicción de la clase ATC de la sustancia de prueba se determina por la asignación a la clase de la droga con mayor similitud y por su distribución de propiedades; para las propiedades fisicoquímicas se considera la Regla de cinco de Lipinski, lo cual contribuye significativamente a la asignación de la clase ATC que mejor corresponda (Dunkel *et al.*, 2008). Para calcular la similitud entre dos compuestos, se utilizan sus huellas dactilares estructurales generadas por el Kit de herramientas de Desarrollo Químico (CDK, *Chemistry Development Toolkit*); las huellas dactilares estructurales constan de codificación de vectores de bits y características topológicas de moléculas pequeñas; la similitud se calcula mediante el coeficiente de Tanimoto (Dunkel *et al.*, 2008).

2.13 Acoplamiento molecular (Docking)

Según Reyes-Hernández y colaboradores (2023) el Acoplamiento Molecular (*Molecular Docking*) es un método computacional usado para encontrar la orientación más favorable de una molécula en relación con otra cuando interaccionan para

formar un complejo con una energía global mínima; si bien este proceso ocurre a nivel celular, dentro de las disciplinas computacionales, hace referencia a la investigación de cómo es que dos o más estructuras moleculares encajan juntas. Se trata del proceso mediante el cual un software de modelado molecular intenta hacer que encaje una molécula dentro de un sitio (o varios sitios) de unión de una molécula objetivo para encontrar el mejor acomodo y complejo intermolecular formado entre dos o más moléculas constituyentes; este método explora las conformaciones que un ligando adopta dentro de los bolsillos de unión de un objetivo macromolecular, y estima la energía libre de unión ligando-receptor (Abu *et al.*, 2018).

Dentro de la gran diversidad de estudios *in silico* que es posible ejecutar en el marco de proyectos estrechamente relacionados con la química farmacéutica, se pueden contemplar dos grandes clasificaciones: los métodos de Diseño de Medicamentos con Base en la Estructura (SBDD, *Structure-based Drug Design*), los cuales hacen uso de información estructural tridimensional recuperada de objetivos biológicos y que representan un componente prominente dentro de la química medicinal moderna; y, por su parte, están los métodos de Diseño de Medicamentos con Base en el Ligando (LBDD, *Ligand-based Drug Design*) cuyo enfoque se dirige al diseño de medicamentos a través de la utilización de bibliotecas de moléculas pequeñas bioactivas, en dichas bibliotecas la diversidad química disponible se rige por el espacio ocupado por ligandos que se sabe que interactúan con un objetivo específico (Ferreira *et al.*, 2015).

Dentro de los métodos SBDD más utilizados se encuentran el Acoplamiento Molecular, el Cribado Virtual con Base en la Estructura (SBVS, *Structure-based Virtual Screening*) y la Dinámica Molecular (MD, *Molecular Dynamics*), ya que poseen un campo amplio de aplicaciones dentro del análisis de eventos de reconocimiento molecular como energías de enlace, interacciones moleculares y cambios conformacionales inducidos (Ferreira *et al.*, 2015). Por su parte, aquellos métodos LBDD más frecuentados son el Cribado Virtual con Base en el Ligando (LBVS, *Ligand-based Virtual Screening*), búsqueda de similitudes, modelado QSAR y generación de farmacóforos (Ferreira *et al.*, 2015; Reyes-Hernández *et al.*, 2023).

El Acoplamiento Molecular es uno de los métodos más frecuentemente recurridos en SBDD por predecir, con un alto grado de concordancia, la conformación de pequeñas moléculas que funcionan como ligandos dentro de un sitio de unión objetivo apropiado (Ferreira *et al.*, 2015). Este estudio se basa en la percepción de la complementariedad molecular donde dos estructuras interactúan de forma semejante a una mano dentro de un guante; la complementariedad química y fisicoquímica desempeñan un papel significativo dentro de las interacciones y enlazamiento entre dos moléculas (Abu *et al.*, 2018; Reyes-Hernández *et al.*, 2023).

Pese a las ventajas que puede representar el uso de estas herramientas quimioinformáticas, es relevante tomar en consideración algunas limitaciones de las

metodologías actuales de Acoplamiento Molecular por la complejidad en la flexibilidad de los ligandos, efectos entrópicos, solvatación/desolvatación, moléculas de agua (y iones), tautómeros, flexibilidad de la proteína, especificidad de unión, efectos farmacocinéticos, efectos alostéricos, contexto molecular, entre muchos otros parámetros (Abu *et al.*, 2018). Para la identificación de las conformaciones más probables de unión es necesario llevar a cabo dos pasos principales: primero, la exploración de un espacio conformacional amplio que represente varios modos potenciales de unión; segundo, una predicción coherente de la energía asociada con cada conformación de unión determinada; los programas de Acoplamiento Molecular realizan estas tareas mediante un proceso cíclico, en el que la conformación del ligando se evalúa según funciones de puntaje, y este proceso se repite tanto como sea necesario hasta lograr converger a una solución de mínima energía (Ferreira *et al.*, 2015).

Dentro de este proceso computacional, se modifican constantemente parámetros estructurales de los ligandos como los grados de libertad rotacionales, torsionales y traslacionales; los algoritmos de búsqueda conformacional hacen esta tarea al aplicar métodos de búsqueda sistemáticos y estocásticos (Ferreira *et al.*, 2015). Ambos métodos se incluyen ampliamente en una gran variedad de programas para llevar a cabo el Acoplamiento Molecular los cuales pueden llevar direcciones distintas para la resolución de problemas en específico (Reyes-Hernández *et al.*, 2023).

Pueden encontrarse diferentes tipos de interacciones entre dos cuerpos moleculares formando una estructura compleja, y el proceso de Acoplamiento Molecular es capaz de predecir y diferenciar estas interacciones como fuerzas electrostáticas debido a las cargas existentes en los sistemas, fuerzas electrodinámicas, interacciones de Van Der Waals, fuerzas estéricas causadas por entropía y fuerzas relacionadas al solvente como los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas causadas por cambios en el solvente (Abu *et al.*, 2018).

Dentro de los diferentes algoritmos con los que se puede trabajar al momento de realizar estudios de Acoplamiento Molecular, algunos de los más utilizados son los algoritmos genéticos (GA, *Genetic algorithms*), los cuales representan una aplicación distintiva de la búsqueda estocástica y que han sido usado en programas como AutoDock y Gold (Ferreira *et al.*, 2015). Este algoritmo busca resolver el problema del alto costo computacional asociados a métodos estocásticos al aplicar conceptos de teoría de la evolución y selección natural (Reyes-Hernández *et al.*, 2023).

Durante el estudio de Docking, se utilizan funciones de puntaje para la estimación de energías de unión teóricas para los complejos ligando-receptor; las variaciones energéticas están dadas por la constante de enlace (K_d) y la energía libre de Gibbs (ΔG_L); para la predicción de este parámetro se evalúan interacciones

intermoleculares, desolvatación y efectos entrópicos, y con ello se establece que, conforme mayor sea la cantidad de parámetros fisicoquímicos medidos, la validez de la función de puntaje también incrementará (Ferreira *et al.*, 2015). Sin embargo, el costo computacional aumenta en proporción al número de variables introducidas en la función, lo que reduce la productividad del algoritmo de acoplamiento molecular, es por ello por lo que las funciones que son eficientes deben ofrecer un balance entre coherencia y velocidad, lo cual es un aspecto crítico al trabajar con un gran grupo de ligandos (Abu *et al.*, 2018).

Las funciones de puntuación descritas anteriormente se pueden clasificar en tres grandes grupos: con base en campos de fuerza, empíricos y aquellas con base en conocimientos; la primera estima las energías de enlace a través de la suma de contribuciones de término enlazados y no enlazados, considerando para los primeros el estiramiento de enlaces, ángulos de torsión y variaciones dihedrales, mientras que para los segundos se analizan interacciones electrostáticas y de Van Der Waals para reunir todo en una función maestra (Ferreira *et al.*, 2015). Una de las desventajas que presenta el uso de esta metodología es la inexactitud para estimar contribuciones entrópicas, ya que hay una ausencia de un modelo físico concreto para describir este fenómeno, además de que el solvente no se considera de forma explícita, por lo que se omiten energías de desolvatación (Ferreira *et al.*, 2015).

Las funciones de puntuación empíricas consisten en otro método de evaluación en el que cada término de la función describe un tipo de evento físico involucrado en la formación de los complejos ligando-receptor; se incluyen puentes de hidrógeno, interacciones polares y apolares, así como efectos de desolvatación y entrópicos (Ferreira *et al.*, 2015). Como primer paso, se debe hacer uso de una serie de complejos proteína-ligando con afinidades de unión conocidas para generar un grupo de entrenamiento que ejecuta un análisis de regresión lineal múltiple, sin embargo, una desventaja que presenta es la dependencia de la exactitud en los datos utilizados para generar el modelo, aunque su simplicidad empleada en términos de energía es más rápida que las metodologías por campos de fuerza (Ferreira *et al.*, 2015).

Una tercera perspectiva es utilizar las funciones que se basan en el conocimiento, las cuales usan potenciales energéticos extraídos de complejos ligando-receptor que ya son conocidos para obtener una función general; estos potenciales se construyen considerando la frecuencia con la que dos átomos diferentes se encuentran a cierta distancia en un conjunto de datos estructurales; los distintos tipos de interacciones observadas en este conjunto de datos se clasifican y sopesan conforme a la frecuencia de ocurrencia (Ferreira *et al.*, 2015). El puntaje final está dado por la suma de estas interacciones individuales y, por su naturaleza, esta metodología presenta un buen balance entre exactitud y rapidez de estudios (Ferreira *et al.*, 2015).

Todas las metodologías, algoritmos y tipos de estudios pueden brindar resultados favorables, sin embargo, para la selección de la mejor configuración para llevar a cabo el Acoplamiento Molecular, se debe tener en cuenta el objetivo y la naturaleza de las especies bioquímicas que se desean evaluar para, de este modo, obtener los resultados más acertados y que mejor puedan predecir un comportamiento experimental *in vitro* o *in vivo* (Abu *et al.*, 2018). También es posible complementar estos estudios con la predicción de objetivos, generación de perfil ADMET, experimentos de Dinámica Molecular, entre otros (Reyes-Hernández *et al.*, 2023).

3. JUSTIFICACIÓN

La sociedad actual enfrenta una crisis de salud global derivada de diversas afecciones provocadas por organismos patógenos variados como son las bacterias, hongos, parásitos, protistas, entre otros. A la par del surgimiento de nuevas enfermedades, también existe una gran preocupación por la aparición de cepas mutadas de estos microorganismos que presentan resistencia a diversos medicamentos.

Las bacterias, por ejemplo, han generado resistencia a los antibióticos a través de una gran diversidad de mecanismos; de entre todos ellos, se pueden describir algunas enzimas que promueven la descomposición de los antibióticos mediante una hidrólisis, lo cual conlleva a la degradación del principio activo y, como resultado, hay un tratamiento menos efectivo y más complicado de la enfermedad.

Por otro lado, el uso de metabolitos secundarios de plantas medicinales, la semisíntesis de derivados semisintéticos, los experimentos *in silico* (pruebas quimiinformáticas) y los experimentos *in vitro* representan un amplio campo de investigación para encontrar nuevos posibles principios bioactivos que puedan ser utilizados como el componente principal o, en su defecto, como coadyuvante de otros antibióticos para el tratamiento de infecciones bacterianas y, al mismo tiempo, combatir el creciente problema del surgimiento de cepas resistentes a muchos medicamentos actuales.

En el presente trabajo se reportan un metabolito secundario proveniente de la planta *Croton morifolius*, y tres derivados semisintéticos, además de estudios quimiinformáticos de dichos compuestos contra la enzima β -lactamasa bacteriana y pruebas *in vitro* contra bacterias de interés clínico. Estos compuestos poseen cualidades que los coloca como candidatos para llevar a cabo pruebas más exhaustivas que les permita posicionarse como alternativas eficientes y seguras en el desarrollo de nuevos medicamentos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Obtener tres compuestos derivados de morifolina C de la planta *Croton morifolius* y evaluar la actividad biológica mediante el uso de herramientas quimioinformáticas y de experimentos *in vitro* para la determinación de la actividad antibacteriana contra bacterias patógenas.

4.2 Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar el diterpeno denominado como morifolina C y tres derivados semisintéticos a partir del extracto de las raíces de *C. morifolius* mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas.
- Identificar las propiedades fisicoquímicas, el perfil ADMET y las actividades biológicas de los compuestos derivados, con la ayuda de herramientas bioinformáticas para reconocer su potencial terapéutico.
- Determinar el modo de unión más estable y sus interacciones en el sitio activo de los derivados obtenidos y las dianas terapéuticas asociadas a bacterias Gram positivas y Gram negativas (β -lactamasa) mediante acoplamiento molecular (Docking).
- Evaluar la actividad antibacteriana de los derivados de morifolina C contra bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas mediante ensayos por difusión en agar para comprobar su efectividad.

5. MATERIALES Y PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Obtención del producto natural morifolina C (89)

Se colectaron e identificaron las raíces de la especie *C. morifolius*, en el municipio de Contepec, Michoacán, durante el mes de septiembre de 2025. Las raíces se cortaron en trozos pequeños para obtener 747 g de materia prima. Posteriormente, se hizo uso de un equipo de ultrasonido y de acetona como disolvente para preparar el extracto. De este modo, se siguió el método propuesto por Shen y colaboradores (2023) para la obtención de productos naturales a partir de materia vegetal y haciendo uso de un equipo de ultrasonido y de un solvente orgánico. Se utilizaron 4.5 L de acetona para llevar a cabo la extracción; se realizaron cuatro extracciones de 5 ciclos por 30 minutos (para sumar un total de 2.5 h por extracción) con pausas de aproximadamente 20 min entre cada ciclo. Cada uno de estos extractos iniciales se llevó a sequedad con ayuda de un rotaevaporador para obtener un extracto acetónico total de una masa final de 26.5 g.

El extracto seco (10 g), se mezcló con sílica gel hasta obtener un polvo fino; esto corresponde al pretratamiento de la muestra. Posteriormente, se montó una columna para cromatografía de 5 cm de diámetro y se utilizaron 120 g de sílica. El

extracto se sometió a la CC y con aire (CC *flash*), se inició la elución con una fase móvil con una polaridad 9:1 (hexano/acetona). Con esta fase móvil se colectaron 23 fracciones de 100 mL cada una, para luego cambiar a otra fase móvil con una polaridad de 7:3 (hexano/acetona), con la cual se colectaron otras 2 fracciones de 500 mL cada una. Posterior a esto, se volvió a cambiar la mezcla de solventes utilizada; se utilizó una fase móvil 1:1 (hexano/acetona) y se colectaron 2 fracciones más de 500 mL. Finalmente, se colectó una última fracción de 500 mL con la fase móvil de acetona, resultando la colección de 28 fracciones. Se realizó un seguimiento de la separación mediante TLC con placas de gel de sílice sobre aluminio y utilizando principalmente dos fases móviles; 9:1 (CHCl₃/AcOEt) y 9:1 (hexano/acetona). Se utilizó una solución de Ce(SO₄)₂ y H₂SO₄ como reactivo revelador.

Finalmente, se dejó evaporar el disolvente de las fracciones durante un lapso aproximado de 24 h. Pasado este tiempo, se observó la formación de cristales en las fracciones 11 – 13 (367 mg); estos cristales corresponden al diterpeno denominado morifolina C (**89**), que se confirmó la obtención de esta especie con una referencia de cristales puros del diterpeno **89** mediante TLC utilizando fases móviles de 9:1 (hexano/acetona) y 9:1 (CHCl₃/AcOEt). Este diterpeno se sometió a reacciones subsecuentes de reducción, acetilación y posterior epoxidación.

5.2 Reducción de morifolina C (obtención del alcohol MC-OH)

Para llevar a cabo la reducción, se realizó una modificación a uno de los métodos propuestos por De Souza y Vasconcelos (2006). Al producto natural **89** (204 mg) en un matraz Erlenmeyer de 125 mL provisto de una barra de agitación se adicionaron 311 mg de NaBH₄ y 45 mL de MeOH. La mezcla de reacción se dejó en agitación durante de 2 h y 15 min. Durante 1 h y 15 min, se calentó la mezcla de reacción a aproximadamente 50 °C para posteriormente elevar la temperatura a aproximadamente 125 °C; se mantuvo el sistema a esta temperatura por 1 h hasta evaporar la mayoría del solvente y observar la aparición de un sólido amarillo. El avance de la reacción se monitoreó con ayuda de TLCs utilizando una fase móvil 9:1 (hexano/acetona).

Una vez completada la reacción, se adicionaron 20 mL de agua destilada y se llevó a cabo la extracción del producto con AcOEt, realizando lavados con el disolvente (4 × 40 mL), se secó la fase orgánica con CaCl₂. Posteriormente, se llevó a rotaevaporador para evaporar el disolvente y obtener la masa del crudo de reacción (260 mg). Finalmente, se confirmó mediante CCF y experimentos de RMN que se obtuvo el producto (**90**).

5.3 Reacción de acetilación de (**91**)

En un vial de vidrio se utilizaron 260 mg de crudo de reacción del derivado (**90**), 2.6 mL de Py y 2.6 mL de Ac₂O; que fue llevado a baño María a aproximadamente 125 °C por 1 h y 10 minutos y se realizó el seguimiento de la reacción mediante TLC.

Transcurrido este tiempo se realizó la extracción, en un embudo de separación se adicionaron 75 mL de AcOEt al crudo de reacción, se hicieron 2 lavados con 30 mL cada uno de HCl al 10% (2×30 mL), posteriormente, 2 lavados con 30 mL cada uno de solución de NaHCO_3 saturada (2×30 mL), y finalmente, lavados con agua destilada (2×30 mL). La fase orgánica fue secada sobre CaCl_2 y llevada a rotaevaporador para retirar el disolvente. La masa final del crudo fue de 208 mg (rendimiento). De igual manera, se analizó si se obtuvo el producto esperado, así como su pureza, mediante experimentos de RMN- ^1H . Dados los datos obtenidos, se optó por purificar al derivado **91**.

5.4 Purificación del éster MC-OAc

El crudo de reacción de **91** (208 mg) se purificó mediante CC *flash*, se utilizó una columna de 2 cm de diámetro y 6 in de sílica. Primero se colectaron 8 fracciones de 20 mL cada una con una polaridad de 95:5 ($\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$), posteriormente se colectaron 37 fracciones de 10 mL cada una con la misma polaridad y finalmente se colectó una última fracción de 100 mL únicamente de acetona. Se hizo el seguimiento de la purificación mediante TLC y se determinó que las fracciones 4 – 42 contenían al derivado con mayor grado de pureza, por lo que se juntaron. La masa final del producto purificado fue de 192 mg (con rendimiento de 92.3 %). El compuesto **91** se caracterizó mediante experimentos de espectroscopía de RMN en 1-D y 2-D en CDCl_3 .

De manera complementaria, se tomó una pequeña muestra (7 mg) del compuesto para llevar a cabo una cristalización por difusión en un vial de 10 mL utilizando 1.4 mL de acetona y 3.5 mL de hexanos. Una vez evaporados los disolventes, se obtuvieron cristales adecuados para su análisis por difracción de rayos X.

5.5 Reacción de epoxidación de MC-OAc (preparación del epóxido Epoxi – MC-OAc)

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL provisto de una barra de agitación se emplearon 101 mg de MC-OAc purificado (**91**) en 25 mL de DCM. Una vez disuelto el éster (**91**), se adicionó de forma paulatina una mezcla sólida de 131 mg de mCPBA y 169 mg de NaHCO_3 por un intervalo de 20 min. La reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente por 3 h. Al igual que las otras reacciones, se hizo seguimiento de la epoxidación a través de TLC.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se adicionaron 5 mL de DCM y 10 mL de agua destilada a la mezcla para llevar a cabo una primera extracción del producto. Posteriormente, se hicieron dos lavados con 25 mL de DCM cada uno (2×25 mL). Una vez colectadas todas las fases orgánicas en un solo lote, se procedió a hacer dos lavados de 30 mL cada uno con una solución de NaHCO_3 saturada (2×30 mL), luego se hicieron dos lavados de 30 mL cada uno con salmuera (2×30 mL) y finalmente, un último lavado con 30 mL de agua destilada (1×30 mL). Finalmente, se secó la

fase orgánica sobre Na₂SO₄ anhidro y se llevó a rotaevaporador y obtener el crudo de reacción con una masa de 139 mg.

Por último, se llevaron a cabo experimentos de RMN para determinar si se obtuvo el producto deseado, así como su pureza. Del análisis de RMN-¹H, se optó por llevar a cabo una purificación del compuesto **92**.

5.6 Purificación del epóxido Epoxi – MC-OAc

Se utilizó todo el crudo de reacción (139 mg) obtenido para purificar al intermediario **92**. De este modo, se llevó a cabo una CC *flash* con una columna de 2 cm de diámetro, además de que se utilizaron 6 in de sílica. Se usó una fase móvil 9:1 (CHCl₃/AcOEt) con la cual se colectaron 40 fracciones de 10 mL cada una. El seguimiento de la purificación fue a través de TLCs. Se juntaron las fracciones 14 – 18, las fracciones 21 – 27, 28 – 35 y 36 – 40. En las fracciones 21-27 (29 mg) y 28-35 se obtuvo el compuesto puro (28 %) que fue caracterizado por RMN.

5.7 Determinación de perfiles ADMET de los compuestos

Una vez obtenidos el producto natural **89** y cada uno de sus derivados (**90-92**), así como haber determinado sus correctas estructuras químicas, se utilizó el software *ChemDraw* para generar dichas estructuras, las cuales fueron transformadas a código *SMILES*.

Para la determinación de los distintos perfiles ADMET de cada uno de los compuestos, se utilizó la plataforma *Way2Drug*; de esta plataforma se usó la herramienta *Pass Online* para obtener distintos parámetros farmacológicos que posteriormente serían registrados en un mapa de calor de la predicción de las posibles actividades biológicas de los compuestos. Simplemente se utilizó el código *SMILES* de cada uno de los compuestos y se procesaron con ayuda de la herramienta quimioinformática.

5.8 Determinación de posibles objetivos bacterianos de los compuestos

Además de las posibles actividades biológicas de los compuestos, la herramienta quimioinformática *Way2Drug* también cuenta con un servicio denominado *AntiBac Pred*, el cual está destinado a predecir posibles objetivos contra los cuales los compuestos sometidos puedan resultar efectivos.

Del mismo modo que para determinar las posibles actividades biológicas del producto natural y sus derivados, se sometieron cada uno de sus códigos *SMILE* para predecir algunos microorganismos contra los cuales pueden resultar efectivos.

5.9 Estudios de acoplamiento molecular (Docking) contra la enzima bacteriana β-lactamasa

Dentro de los estudios quimioinformáticos, también se buscó predecir las posibles interacciones y el posible modo de unión de los compuestos (**89-92**) con el sitio

activo de la enzima β -lactamasa (ID PDB:4KG5), la cual es una enzima responsable de conferir resistencia bacteriana contra determinados antibióticos, específicamente contra los β -lactámicos.

El acoplamiento molecular se realizó en el software *AutoDock* junto con los complementos necesarios. Inicialmente, se descargó la estructura cristalina de la enzima bacteriana que tenía una molécula de la droga cefotaxima co-cristalizada dentro de su sitio activo; dicha estructura se encuentra disponible en *Protein Data Bank* (PDB). Con ayuda del software *AutoDock*, se comenzó a procesar y a preparar la proteína para someterla a interacciones con los compuestos de interés y para lograr determinar los modos de unión más estables.

En primera instancia, se creó una carpeta de trabajo llamada “4KG5” en donde se guardarían todos los archivos de entrada y de salida derivados del proceso de acoplamiento molecular. Posteriormente, se movió el archivo PDB de la proteína descargada a esta carpeta. Finalmente, para facilitar la consulta de los archivos de entrada y de salida, se configuró la ruta de acceso a la carpeta “4KG5” dentro del apartado de “preferencias” (*preferences*).

Una vez hecho lo anterior, se importó el archivo de la proteína (4KG5.pdb) en *AutodockTools* con ayuda de la opción “leer molécula” (*read molecule*) dentro del menú “archivo” (*file*). En el panel izquierdo, debajo de la leyenda “selección actual” (*current selection*), se expandió el contenido de la proteína con ayuda del botón “+”. Se encontraron cuatro cadenas denominadas A, B, C y D. Es importante resaltar que la proteína se encontraba como un tetrámero. Sin embargo, para facilitar el proceso de acoplamiento, solamente se utilizó uno de los monómeros y, en este caso, se optó por utilizar la cadena B.

Se seleccionaron las cadenas A, C y D para, con ayuda del menú “editar” (*edit*), se escogió la opción “eliminar” (*delete*) y se eligió “eliminar los átomos seleccionados” (*delete selected atoms*). De este modo se eliminaron las cadenas A, C y D.

Luego, se procedió a remover las moléculas de agua que co-cristalizaron con la proteína de interés. Este procedimiento permite simplificar cálculos, incrementar eficiencia computacional y generar una exploración más detallada de las interacciones ligando-proteína dentro del sitio de unión. Para esto, se seleccionó el menú “editar” y se eligió la opción “eliminar agua” (*delete water*).

Después, se identificaron los heteroátomos en la cadena B de la enzima β -lactamasa. Se utilizó el panel de control izquierdo y se expandió la conformación de la cadena B de la enzima con ayuda del botón con el símbolo “+”. Se localizó al ion fosfato identificado como “PO440I”, se seleccionó y, con ayuda del menú “editar”, se usó la opción “eliminar” para después utilizar el botón de “eliminar los átomos seleccionados”.

De esta manera, se guardó al complejo proteína-ligando antes de continuar con el procesamiento de la proteína. Para ello, dentro del menú “archivo” se usó la opción “guardar” (*save*), luego se seleccionó “guardar PDB” (*write PDB*) y se le asignó el nombre de “4KG5_limpio.pdb” al archivo generado. Una vez guardado este archivo y para asegurar que el proceso de acoplamiento molecular no sufriera interferencias de ningún tipo, se optó por reiniciar el software de *AutodockTools*. Para ello, en el menú “archivo” se utilizó la opción de “salida” (*exit*).

Nuevamente se corrió el programa y se abrió el archivo “4KG5_limpio.pdb”, además de configurar nuevamente la ruta de acceso a la carpeta de trabajo como previamente se había descrito.

Se abrió nuevamente el archivo, pero esta ocasión en un bloc de notas para, de esta forma, encontrar los parámetros de los heteroátomos que corresponden, en este caso, a la estructura química y las coordenadas del ligando cefotaxima; se copiaron dichos datos y se pegaron en un archivo de Excel independiente. Por último, se ordenaron las coordenadas tridimensionales (x , y , z) de este compuesto.

Por otra parte, se eliminó al ligando cefotaxima (denotado como “CEF402”) del sitio activo. Para esto, se siguió el mismo procedimiento utilizado para eliminar a “PO440I” descrito previamente.

Posteriormente, para adicionar átomos de hidrógeno, se navegó dentro del menú “editar”, se escogió la opción de “hidrógenos (*hydrogens*)” y luego se pulsó el botón “agregar” (*add*). Dentro del cuadro de diálogo emergente, se eligió la opción de “solamente polares” (*polar only*), y finalmente se pulsó “OK”. Únicamente se agregaron átomos de hidrógeno polares durante la preparación del acoplamiento molecular para asegurar una simulación acertada de las interacciones por puente de hidrógeno y para lograr un balance entre precisión y eficiencia computacional mientras se asignan cargas atómicas parciales relevantes.

Para asignar cargas a la proteína, se navegó dentro del menú “editar” y se escogió la opción de “cargas” (*charges*), dentro de la cual se seleccionó “adicionar cargas de Kollman” (*add Kollman charges*). Seguido de esto, apareció un cuadro de diálogo en el que se indicaba la carga total agregada. Es importante resaltar que *AutoDock* utiliza campos de fuerza para estimar las interacciones moleculares. Varios campos de fuerza, incluyendo aquellos utilizados por *AutoDock*, están diseñados para trabajar con cargas integrales en los átomos. Dichas cargas integrales son más consistentes con las suposiciones y los parámetros de estos campos de fuerza, asegurando predicciones coherentes de interacciones moleculares. De este modo, para revisar las cargas no integrales en los residuos, se utilizó nuevamente el menú “editar” y se eligió “cargas”, para después seleccionar la opción “revisar totales en residuos” (*check totals on residues*).

Dado que se encontraron cargas no integrales en la proteína, se mostró una lista de residuos de este tipo en un cuadro de diálogo. Así pues, se usó la opción “esparcir déficit de carga sobre todos los átomos en el residuo” (*spread charge deficit over all atoms in residue*).

De forma independiente, se procedió con la preparación de los ligantes a evaluar, los cuales fueron en este caso la especie morifolina C (**89**) y cada uno de sus derivados (**90-92**). Para esto, se retomaron las estructuras químicas anteriormente construidas con ayuda del software *ChemDraw*. Una vez hecho esto, se trasladaron dichas estructuras al software complementario *Chem3D* con el cual se obtuvieron las estructuras tridimensionales de cada uno de los compuestos y, finalmente, se configuraron para obtener la conformación más estable. Para concluir con este paso, se guardaron los archivos generados para cada molécula con extensión *pdb* para ser utilizados posteriormente en conjunto con la proteína bacteriana preparada anteriormente en el software *AutoDock*. Es importante mencionar que se guardaron cada uno de los archivos de los compuestos del siguiente modo:

- **89:** “MC.pdb”
- **90:** “MC-OH.pdb”
- **91:** “MC-OAc.pdb”
- **92:** “Epoxi_MC-OAc.pdb”

Ya con los ligantes preparados, se abrió en primera instancia el compuesto **89** (archivo “MC.pdb”) con ayuda de *AutoDockTools*; se navegó al menú “ligando” (*ligand*), se presionó el botón de “entrada” (*input*) y luego se dio clic en el botón de “abrir” (*open*). Posteriormente apareció una ventana emergente para importar el archivo, se cambió el parámetro “tipo de archivos” (*files of type*) a “archivos PDB” (*PDB files: (*.pdb)*). El archivo “MC.pdb” fue visible, se seleccionó y se abrió. Posterior a ello, apareció un cuadro de diálogo en el que se mostraba un resumen del ligando importado, y *AutoDockTools* automáticamente le asignó cargas. Se mantuvieron los parámetros por defecto para continuar con los siguientes pasos. Cabe resaltar que este proceso se llevó a cabo igualmente con las moléculas (**90-92**) en procesos totalmente aislados e independientes uno del otro.

Es crucial escoger el número correcto de enlaces giratorios del inhibidor en *AutoDock* ya que afecta directamente la flexibilidad y los grados de libertad del ligando durante la simulación de acoplamiento molecular. El número de enlaces giratorios afecta la capacidad del ligando para adoptar diferentes conformaciones, impactando en la precisión de las predicciones del acoplamiento.

Para configurar el número de enlaces giratorios, se pulsó el botón del menú “ligando”, se escogió la opción “árbol de torsión” (*torsion tree*) y se seleccionó “escoger torsiones” (*choose torsions*). Se dio clic en el botón “terminado” (*done*) en el cuadro de diálogo emergente.

Nuevamente, en el menú “ligando”, se utilizó la opción “salida” (*output*) y se dio clic en “guardar como PDBQT” (*save as PDBQT*). Se guardó el ligando en formato *pdbqt* (“MC.pdbqt” para el caso del compuesto **89**) pulsando el botón de “guardar” (*save*). Igualmente se llevó a cabo este proceso para los demás ligandos (**90-92**).

Por otro lado, al comenzar con la configuración de celda (*grid box*) en *AutoDock*, hay que considerar que es necesario definir los confines espaciales para el acoplamiento del ligando en el sitio activo de la proteína. Para empezar, se navegó en el menú “cuadrícula” (*grid*), se seleccionó “macromolécula” (*macromolecule*) y se dio clic en “elegir” (*choose*) dado que la proteína ya se encontraba abierta. Luego, se escogió a “4KG5_limpio.pdb” para, después, oprimir el botón “seleccionar molécula” (*select molecule*). Apareció un cuadro de diálogo con un resumen de la operación y se dio clic en el botón “OK”. Se brindó la opción de guardar la proteína en formato PDBQT. Para mejor organización de los archivos, se nombró este último como “4KG5_procesado.pdbqt” y se guardó.

De nuevo en el menú “cuadrícula”, se seleccionó la opción “establecer tipos de mapa” (*set map types*) y se dio clic en “escoger ligando” (*choose ligand*). Posteriormente, se escogió al ligando correspondiente (para el caso del producto natural, el ligando fue “MC”) en el cuadro de diálogo y finalmente se dio clic en “seleccionar ligando” (*select ligand*).

Configurar una celda precisa en *AutoDock* es esencial, ya que esta define el sitio de unión del receptor, lo cual optimiza la eficiencia computacional y enfoca las simulaciones de acoplamiento en regiones biológicamente relevantes. La configuración de esta celda influye en el espacio de búsqueda, evitando cálculos innecesarios e incrementando la coherencia general del proceso de acoplamiento molecular.

De forma subsecuente, se configuró el centro de la celda a través del cálculo del centroide del inhibidor cefotaxima (hidrolizada), un antibiótico cefalosporínico de amplio espectro.

Cuando el sitio activo de una proteína es desconocido, la proteína entera puede servir como región de unión, lo cual requiere que la celda encierre a toda la proteína. Sin embargo, cuando la molécula de una droga se une específicamente al sitio activo de la enzima, insertar las coordenadas tridimensionales del centroide de la droga es suficiente para definir el centroide de la celda. Las dimensiones de esta celda y su espaciado se pueden ajustar con base en el tamaño del sitio activo. Para extraer el centroide del ligando, se retomó el archivo Excel generado con anterioridad en donde se colectaron los datos de las coordenadas de cada átomo del ligando co-cristalizado con la proteína. Se promediaron cada una de las coordenadas y se obtuvo que el centroide de ligando es 28.675, -3.504, 68.163 (*x, y, z*, respectivamente).

Posteriormente, en el menú de “cuadrícula”, se pulsó la opción “celda” (*grid box*) y se vació la información del centroide en la caja de entrada debajo de la sección “centrar celda” (*center grid box*). Así mismo, se utilizó un espaciamiento de 0.6 Å y, de forma predeterminada, 40 puntos de celda para cada coordenada tridimensional.

Se navegó en el menú de “archivo” dentro del cuadro de diálogo de “opciones de celda” (*grid options*), y se seleccionó “cerrar guardando actual” (*close saving current*). Este paso es crucial para asegurar que la información relativa a las dimensiones de la celda, el espaciado y el centro se registren correctamente. Cualquier fallo para completar este paso resultará en la ausencia de la información de celda.

Finalmente, se seleccionó el menú “cuadrícula” para seleccionar la opción de “salida” y guardar el archivo como “*grid.gpf*”.

Posterior a la instalación de *Autodock4*, se incluyen dos programas complementarios (*autogrid4.exe* y *autodock4.exe*) los cuales fueron trasladados a la carpeta de trabajo “4KG5”. Para inicializar el programa *autogrid4.exe* requerido para generar los mapas de celda necesarios para el acoplamiento molecular, se abrió el menú “correr” (*run*) y se eligió “correr AutoGrid” (*run AutoGrid*). Un cuadro de entrada apareció y en la que se tenía el parámetro “ruta de programa” (*program pathname*), se especificó, con ayuda de la opción “navegar” (*browse*), la ruta de archivo donde se encontraba el software. Una vez ubicado en la carpeta de trabajo, se ordenó “abrir” (*open*). De forma similar, en “nombre de archivo de parámetro” (*parameter filename*), se escogió al archivo *grid.gpf* generado con anterioridad. Una vez que se ha provisto la ruta de archivo de *autogrid4.exe*, el parámetro “nombre de archivo de registro” (*log filename*) se llenó automáticamente. Se dejaron las demás opciones con la configuración por defecto y se dio clic en el botón de “inicializar” (*launch*).

Los resultados de la corrida de *Autogrid* producen archivos múltiples que son esenciales para el subsecuente proceso final de acoplamiento.

Configurar parámetros para el acoplamiento final involucra primeramente definir la proteína y el ligando, posteriormente se debe seleccionar el algoritmo de búsqueda y finalmente la función de puntaje para ser utilizado en el acoplamiento molecular final.

Para designar la proteína en la configuración del acoplamiento, primero se navegó en el menú “acoplamiento” (*docking*), se seleccionó “macromolécula” (*macromolecule*), y se dio clic en “establecer nombre de archivo fijo” (*set rigid filename*). Se seleccionó la estructura de la proteína guardada en formato *pdbqt* (“4KG5_procesado.pdbqt”), y se dio clic en el botón “abrir”.

Para seleccionar el ligando para configurar los parámetros de acoplamiento, se navegó dentro del menú “acoplamiento”, se eligió la opción “ligando”, y se pulsó “elegir”. En el cuadro de diálogo emergente, se seleccionó al ligando correspondiente

(en el caso del compuesto **89**, fue el ligando MC), y se pulsó el botón “seleccionar ligando” (*select ligand*). Se llevó a cabo este mismo proceso para cada acoplamiento con cada uno de los compuestos restantes (**90-92**).

Para escoger el algoritmo de búsqueda para el acoplamiento, se indagó dentro del menú de “acoplamiento”, se eligió “buscar parámetros” (*search parameters*) y se dio clic en “algoritmo genético” (*genetic algorithm*). En el cuadro de diálogo emergente se dejaron todos los parámetros como se encontraban por defecto y se pulsó el botón “aceptar”.

Luego, nuevamente en el menú de “acoplamiento” se seleccionó “parámetros de acoplamiento” (*docking parameters*) y se pulsó el botón aceptar. Esta sección permite al usuario especificar diversas configuraciones que influyen en la simulación de acoplamiento molecular. Estos parámetros controlan el comportamiento del algoritmo genético durante la búsqueda para conformaciones óptimas del ligando. Sin embargo, para los experimentos realizados en el presente trabajo, no se llevó a cabo ninguna modificación en los parámetros.

Para guardar el archivo de parámetros de salida para el acoplamiento, dentro del menú “acoplamiento” se seleccionó la opción “salida” (*output*) y se escogió “Lamarckian GA (4.2)” del menú que se desplegó. Seguido de esto, se indicó que se debía guardar el archivo de parámetros para acoplamiento (*docking parameter file, dpf*). Se nombró al archivo como “dock.dpf” y se guardó.

Para ejecutar el acoplamiento molecular final, el programa autodock4.exe debe correrse utilizando el archivo de salida recientemente generado. Se navegó en el menú “correr” y se seleccionó “correr AutoDock” (*run AutoDock*). Un cuadro de entrada apareció en el que se ofrecían varias opciones de valores de entrada. En el recuadro de “ruta de programa”, se especificó la ruta para acceder al programa autodock.exe seleccionando “navegar” (*browse*), se escogió el archivo “autodock4.exe” y se abrió. De forma similar, en el campo de “nombre de archivo de parámetro” (*parameter filename*) se eligió al archivo “dock.dpf” generado con anterioridad. Una vez hecho esto, el parámetro de “nombre de archivo de registro” se llenó automáticamente. Se mantuvieron las demás opciones sin cambios y se pulsó “inicializar”.

Finalmente, se llevó a cabo el análisis de los resultados del acoplamiento para obtener información detallada de las interacciones proteína-ligando. Posterior a la corrida final del acoplamiento, se obtuvo un archivo DLG (*docking log*). Este archivo contiene información detallada sobre el proceso de acoplamiento, incluyendo las conformaciones de los ligandos en el sitio de unión. Cada conformación es representada por valores de energía y coordenadas atómicas. Al final del estudio se obtuvieron 4 archivos DLG por cada compuesto evaluado (**89-92**).

Para facilitar la visualización de resultados, se reinició el software *AutoDockTools*. Se navegó dentro del menú “analizar” (*analyze*), luego se eligió la opción “acoplamiento” (*dockings*) y se pulsó “abrir”. Dentro de la carpeta de trabajo, se seleccionó al archivo *dock.dlg* previamente generado. Posteriormente, se buscó nuevamente en el menú “analizar”, se escogió “macromolécula” y se pulsó el botón “abrir”. De este modo, se importó el archivo “4KG5_procesado.pdbqt” y se abrió.

Una vez más, se buscó en el menú “Analizar” y se escogió la opción “conformaciones” (*conformations*), luego se dio clic en “reproducir” (*play*). Un recuadro de control facilita el manejo del despliegue de las conformaciones de ligando. Es posible pulsar el botón de reproducción para visualizar varias conformaciones del ligando acoplado dentro del sitio activo de la proteína.

Con ayuda del botón “&” se pueden visualizar detalles adicionales. Con “mostrar información” (*show info*) es posible mostrar información con más detalle sobre la unión del ligando; con la opción “construir puentes de hidrógeno” (*build H-bonds*) se muestra información relativa a los puentes de hidrógeno. Para exportar el complejo proteína-ligando, se debe pulsar el botón “guardar complejo” (*write complex*). Para un análisis más eficaz, se exportó la conformación más estable para cada uno de los compuestos estudiados y se nombraron de la siguiente manera:

- 89: “MC_Complejo.pdbqt”.
- 90: “MC-OH_Complejo.pdbqt”.
- 91: “MC-OAc_Complejo.pdbqt”.
- 92: “Epoxi_MC-OAc_Complejo.pdbqt”.

Por otra parte, es posible guardar todas las conformaciones generadas para un ligando. Para ello, se debe considerar la opción “guardar todos” (*write all*) y las conformaciones se guardarán como archivos individuales en formato *pdbqt*.

Para analizar los resultados del acoplamiento molecular de forma esquemática, primero fue preciso correr el programa *Open Babel GUI version* para transformar los complejos en formato *pdbqt* a archivos del tipo *pdb*. Dentro de la interfaz, se localizó el panel izquierdo para modificar el tipo de formato a “*pdbqt*” debajo de “formato de entrada” (*input format*), y se eligió, por ejemplo, al archivo “MC_Complejo.pdbqt”. En el panel derecho, debajo de “formato de salida” (*output format*), se configuró el tipo de archivo a “*pdb*” y se eligió la ruta de archivo de salida. Para finalizar, se pulsó el botón “convertir” (*convert*) y, de este modo, se logró obtener el complejo en formato *pdb*. Se analizaron las conformaciones más estables para cada compuesto estudiado y, de este modo, se generó en formato *pdb* el complejo con la mejor afinidad por el sitio de unión de la β -lactamasa. Dicho complejo se logró visualizar esquemáticamente gracias al programa *Discovery Studio*. Es importante destacar que todo el proceso de simulación de acoplamiento molecular se llevó a cabo tanto con el producto natural (89) como con todos los derivados (90-92).

5.10 Evaluaciones farmacológicas *in vitro* contra bacterias patógenas de interés clínico

Inicialmente, se prepararon 200 μ L de disoluciones madre de todos los compuestos (89-92) a concentración de 100 mg/mL y, a partir de ellas, se llevaron a cabo distintas diluciones de 100 μ L para obtener diferentes concentraciones (100, 50, 30, 20 y 1 mg/mL) utilizando DMSO como disolvente.

Por otra parte, se utilizaron cuatro bacterias patógenas contras las cuales se evaluaron los compuestos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Primero, se llevó a cabo la activación de cepas de cada uno de estos microorganismos, para lo cual se utilizó Caldo EC como medio de cultivo. Se utilizaron cinco tubos de ensayo: cuatro correspondientes a la activación de las bacterias, y otro como control negativo. El caldo se preparó según las indicaciones del fabricante y se llevó a esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min. Una vez esterilizado y ya que su temperatura disminuyó, se distribuyó el medio en los cinco tubos de ensayo esterilizados. Luego, se tomó una muestra de cada una de las cepas y se inoculó en cada tubo de ensayo. Los tubos se incubaron a 30 °C durante 24 h.

Una vez que se observó un crecimiento de las bacterias en medio líquido, se preparó agar para método estándar (Bioxon), el cual, se llevó a esterilizar a 121°C durante 15 min. Se dejó enfriar y se depositó suficiente medio en cuatro cajas de Petri de forma que se obtuviera un espesor de aproximadamente 4 mm. Luego se dejaron estas cajas en reposo hasta que el medio solidificara y después se tomó un poco de muestra de cada cepa activada en el medio líquido para hacer un sembrado por estriado en cuatro cuadrantes. Las cajas se dejaron incubando durante 24 h a 30°C.

Posterior a la observación del crecimiento de colonias y haber confirmado que las cepas se encontraban puras, se llevó a cabo una resiembra en medio sólido, pero esta vez se utilizó agar Müeller Hinton (MHA). Se preparó del mismo modo que el agar para método estándar (Bioxon) y, en este caso, se utilizaron igualmente cuatro cajas de Petri. Cuando se tenía el medio de cultivo solidificado, se llevó a cabo la resiembra de las bacterias considerando las colonias mejor formadas y aisladas. Nuevamente se dejaron las cajas en incubación durante 24 h a 30°C. Se revisaron nuevamente los cultivos y se obtuvo una mayor proporción de colonias, además de nuevamente obtenerlas libres de contaminación. Para asegurar una mejor preservación de las bacterias en el MHA, se dejaron incubando, pero a una temperatura de 20°C.

De forma paralela, se prepararon 16 cajas de Petri adicionales con el medio de cultivo MHA de la misma forma que la anteriormente descrita. Estas cajas fueron etiquetadas con la información de las bacterias, compuestos y concentraciones de estos, según fuera el caso; se determinaron espacios para colocar controles tanto positivo como negativo. Además, se tenían listos varios discos hechos con ayuda de

una perforadora y papel filtro, los cuales, junto con todo el material y reactivos que fueran requeridos de ese modo, fueron igualmente esterilizados a 121 °C durante 15 minutos; bajo este mismo criterio se prepararon aproximadamente 250 mL de una solución salina (NaCl) al 0.9%. De manera independiente se generó un estándar de McFarland 0.5.

Con ayuda del estándar de McFarland, se prepararon cuatro soluciones bacterianas de cada una de las cepas a trabajar. Para esto, se adicionaron aproximadamente 50 mL de solución salina a tubos de ensayo y, después, se recolectaron suficientes colonias de cada uno de los microorganismos para que las soluciones resultantes se asemejaran al estándar de referencia.

Ya con estas soluciones preparadas, se adicionaron 100 µL a cada una de las cajas de Petri. Es importante resaltar que se consideraron cuatro cajas por cepa, ya que cada una estaría siendo evaluada contra cada uno de los compuestos obtenidos (89-92). Una vez aplicadas las soluciones, se dejaron en reposo por 2 minutos para evaporar una fracción importante de agua y evitar que los discos de papel filtro absorbieran mucha humedad que pudiera interferir con la aplicación de los compuestos.

Posteriormente, se colocaron seis discos de papel filtro distribuidos de manera uniforme en cada caja y, una vez hecho esto, se aplicaron 6 µL de cada una de las soluciones de cada uno de los compuestos a evaluar (89-92) con sus concentraciones organizadas de manera decreciente. En el último disco se aplicaron 6 µL solamente de DMSO, el cual fungió como el control negativo. Una vez aplicadas todas las soluciones para cada una de las bacterias, se colocó un último disco en el centro de la caja del control positivo estreptomicina (S10; Thermo Scientific OXOID™).

Finalmente, se cerraron las cajas y se dejaron incubando durante 18 h a 30 °C para obtener el antibiograma final y, así, determinar la susceptibilidad de los patógenos al producto natural (89) y a cada uno de sus derivados (90-92). Transcurrido el tiempo de incubación, se llevaron a cabo observaciones y se registraron los diámetros de los halos de inhibición en aquellos antibiogramas que presentaron susceptibilidad a los compuestos reportados en mm.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización del producto natural (89) y de los derivados (90-92)

El producto natural **89** que se obtuvo del extracto de acetona de la raíz de *C. morifolius*, el cual fue caracterizado mediante CCF y a través de RMN-¹H (Tabla 4), se utilizó para la preparación de sus correspondientes derivados (90-92), mediante reacciones sucesivas de reducción, esterificación y epoxidación, respectivamente (Figura 15).

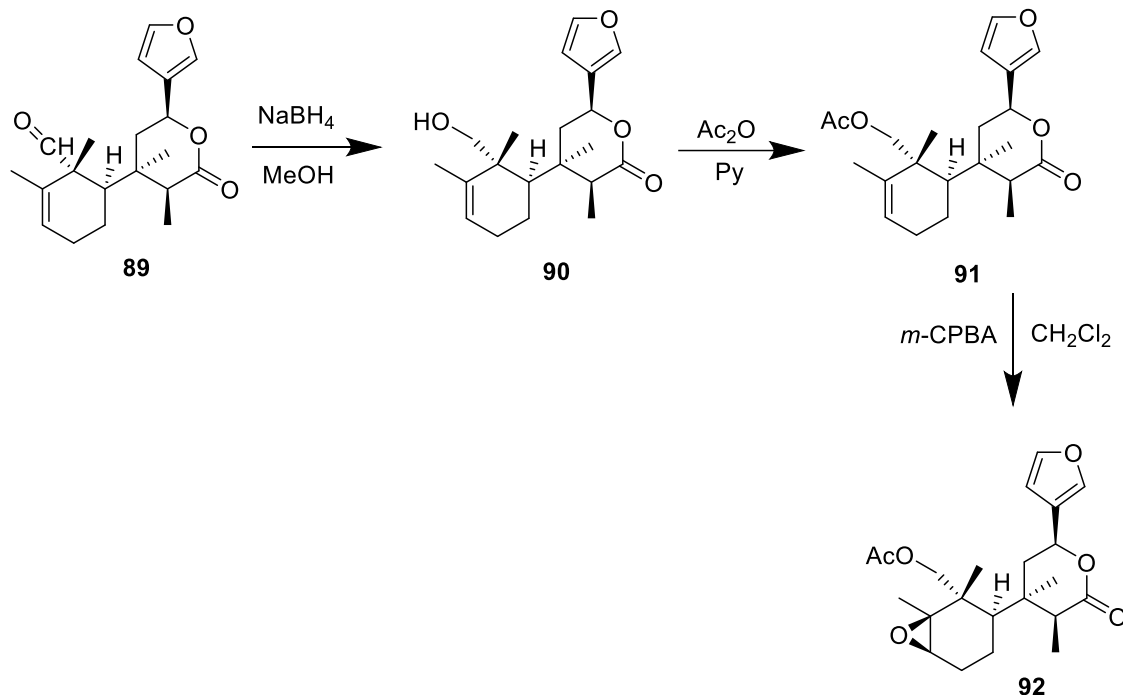


Figura 15. Ruta de síntesis de los derivados a partir del producto natural (89).

El producto natural **89** se sometió a una reacción de reducción del grupo aldehído, utilizando borohidruro de sodio (NaBH_4) y metanol. El crudo de la reacción del compuesto **90** se analizó por espectroscopía de infrarrojo y cuya estructura se elucidó mediante sus datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C , así como experimentos en 2D. El compuesto **90** se obtuvo como producto mayoritario (69%, 138.4 mg). En el espectro de IR (**Anexo I**) se observaron principalmente una banda a 3452 cm^{-1} correspondiente grupo hidroxilo esperado, en 1728 cm^{-1} para el grupo carbonilo de la lactona. Este compuesto mostró una rotación específica = $+145.0$ (c 1.63, CHCl_3). En el espectro de RMN de ^1H (**Figura 16**) (**Tabla 4**) presentó entre sus señales más significativas tres señales simples anchas en δ_{H} 7.49, 7.41 y 6.43 ppm características de un anillo de furano que fueron asignadas a los protones H-16, H-15 y H-14, en δ_{H} 5.78 una señal simple ancha asignada al protón del doble enlace H-3, una señal doble en δ_{H} 5.22 característica de un protón base de oxígeno de lactona asignada a H-12, dos señales dobles en δ_{H} 3.74 y 3.54 asignadas a los protones del metileno base de oxígeno H-6, correspondiente al grupo hidroxilo obtenido de la reacción de reducción del grupo aldehído, en δ_{H} 2.31 ppm una señal cuádruple asignada a H-8, una señal doble de dobles en δ_{H} 2.04 correspondiente a H-10, en δ_{H} 1.63, 1.52 y 0.95 ppm se observaron tres señales simples características de grupos metilos que fueron asignadas a los carbonos C-18, C-19 y C-20, y una señal doble en δ_{H} 1.24 ppm correspondiente al grupo metilo secundario de C-7, respectivamente.

En su espectro de RMN de ^{13}C de **90** (**Figura 17**) (**Tabla 4**), presentó entre sus señales más características, en δ_{C} 177.0 ppm de un carbono de carbonilo de lactona asignada a C-17, en δ_{C} 143.7 y 139.7, 124.4 y 108.7 señales para los carbonos C-16, C-15, C-14 y C-13 del anillo de furano, en δ_{C} 137.5 y 129.7 dos señales características de un enlace doble correspondiente a la posición entre C-3 y C-4, dos señales base de oxígeno en δ_{C} 69.2 y 65.9 correspondientes a la base de lactona y del alcohol en las posiciones C-12 y C-6, respectivamente. En frecuencias más bajas se observaron señales para los carbonos alifáticos sp^3 presentes en la estructura del compuesto.

El análisis de los experimentos en dos dimensiones (2-D) permitió comprobar la estructura propuesta para el compuesto **90**. En el experimento COSY (**Figura 18**) se observaron tres sistemas de correlación. En el primer sistema de correlación ^1H - ^1H COSY es la que se observa entre H-10/H₂-1/H₂-2/H-3 lo que indica la conectividad de CH(10)-CH₂(1)-CH₂(2)-CH(3), H-8/H₃-7 para CH (8), CH₃ (7), y el tercer sistema está constituido por H₂-11/H-12 para los hidrógenos de CH₂ (11) y CH (12) carbonos. En el espectro HMBC (**Figura 19**) se observaron correlaciones de H-7 y H-8 con C-17 lo que indica la posición del carbono de carbonilo de la lactona en C-17, la correlación de H-6 con los carbonos C-5, C-4 a dos y tres enlaces corroboran la posición del grupo alcohol en C-6. En adición, las correlaciones de H-14 con C-15 y C-16, así como también H-16 con C-13 y C-15, lo que indican la presencia del anillo de furano. Por lo tanto, la estructura de **90** fue determinada como se representa, la cual corresponde a un nuevo diterpeno y nombrado como morifolinol C.

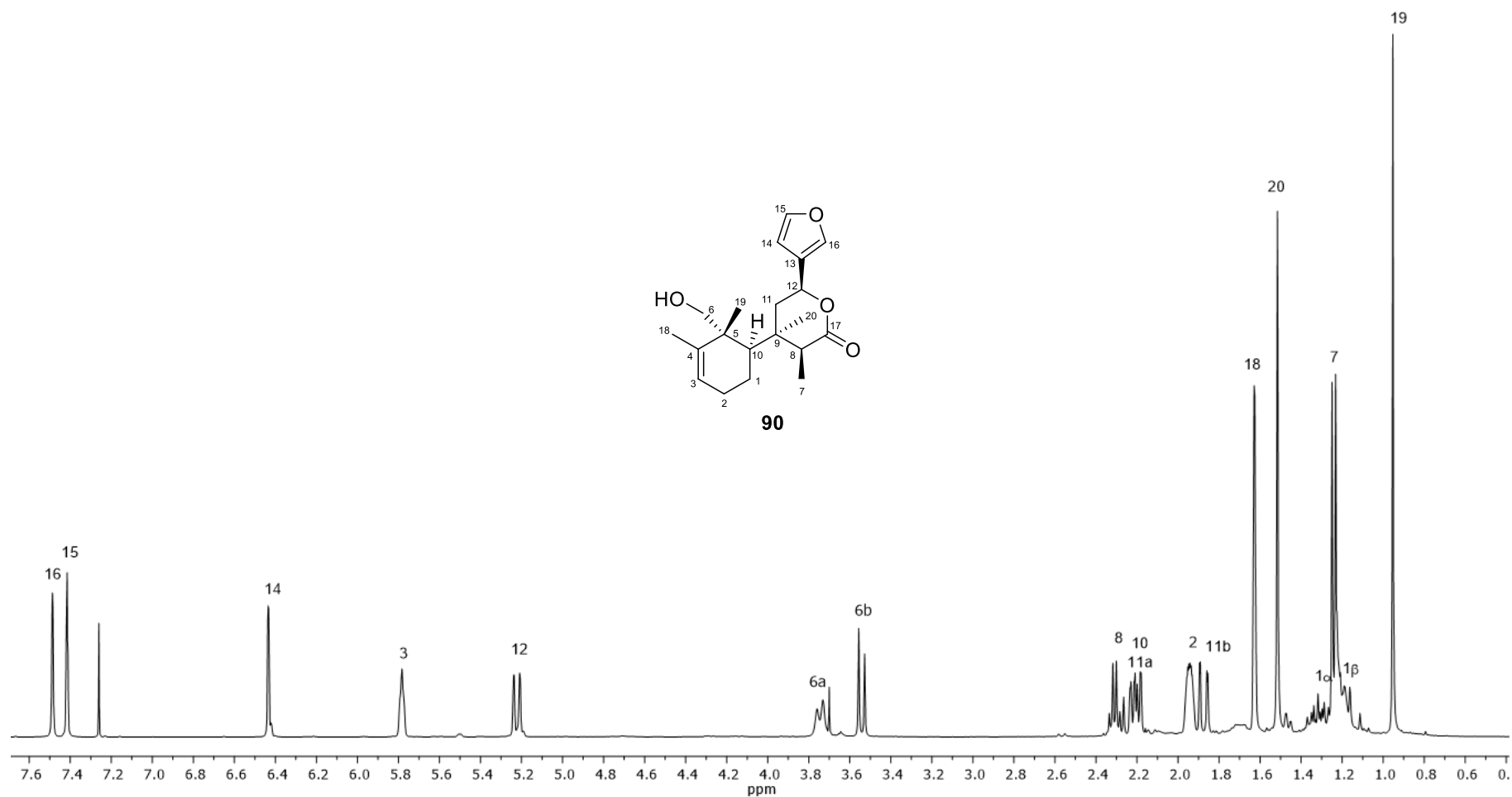


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H del alcohol de morifolina C (**90**) en CDCl_3 (400 MHz).

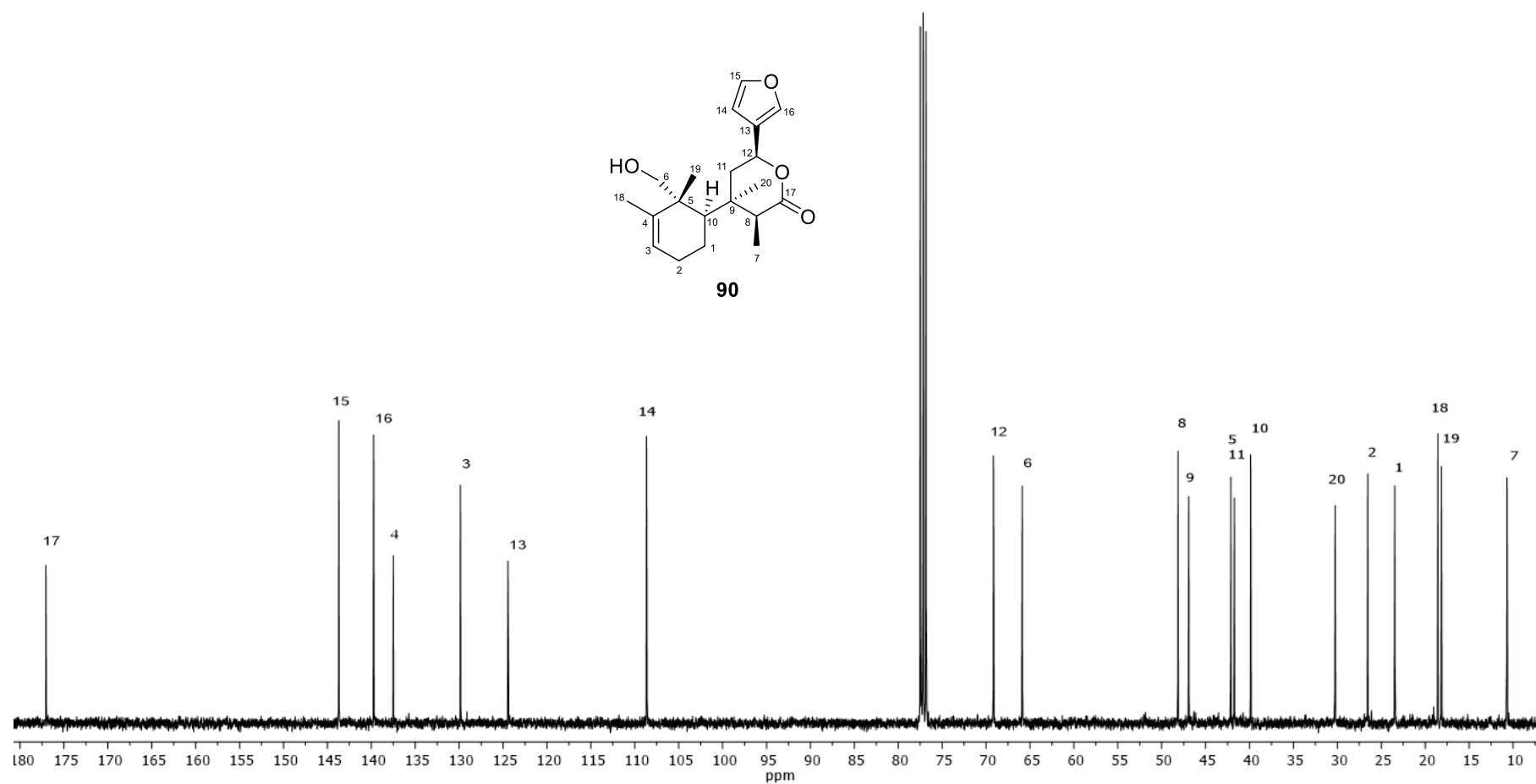


Figura 17. Espectro de RMN de ^{13}C del alcohol de morifolina C (**90**) en CDCl_3 (100 MHz).

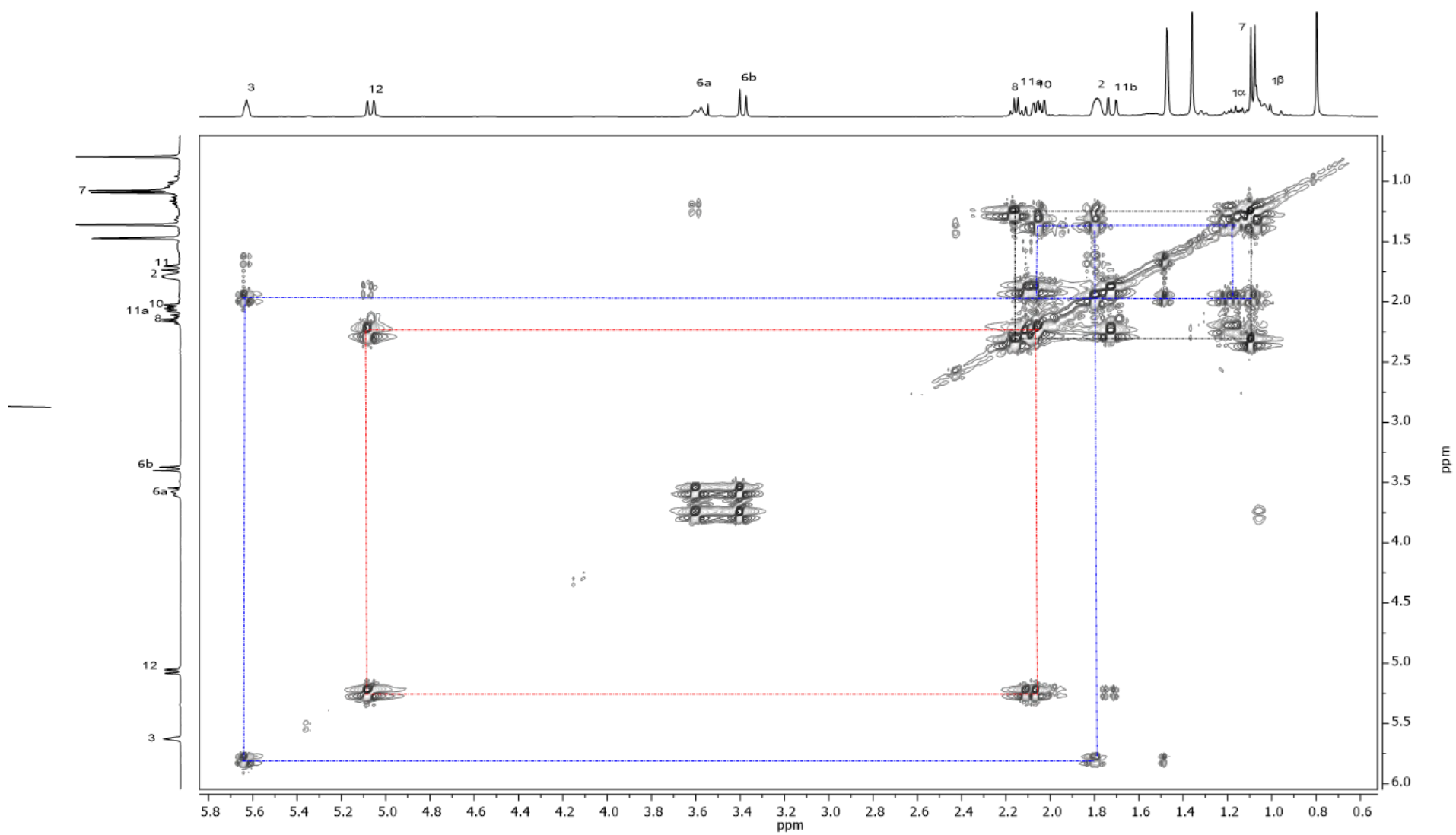


Figura 18. Espectro de COSY del alcohol de morifolina C (90) en CDCl_3 .

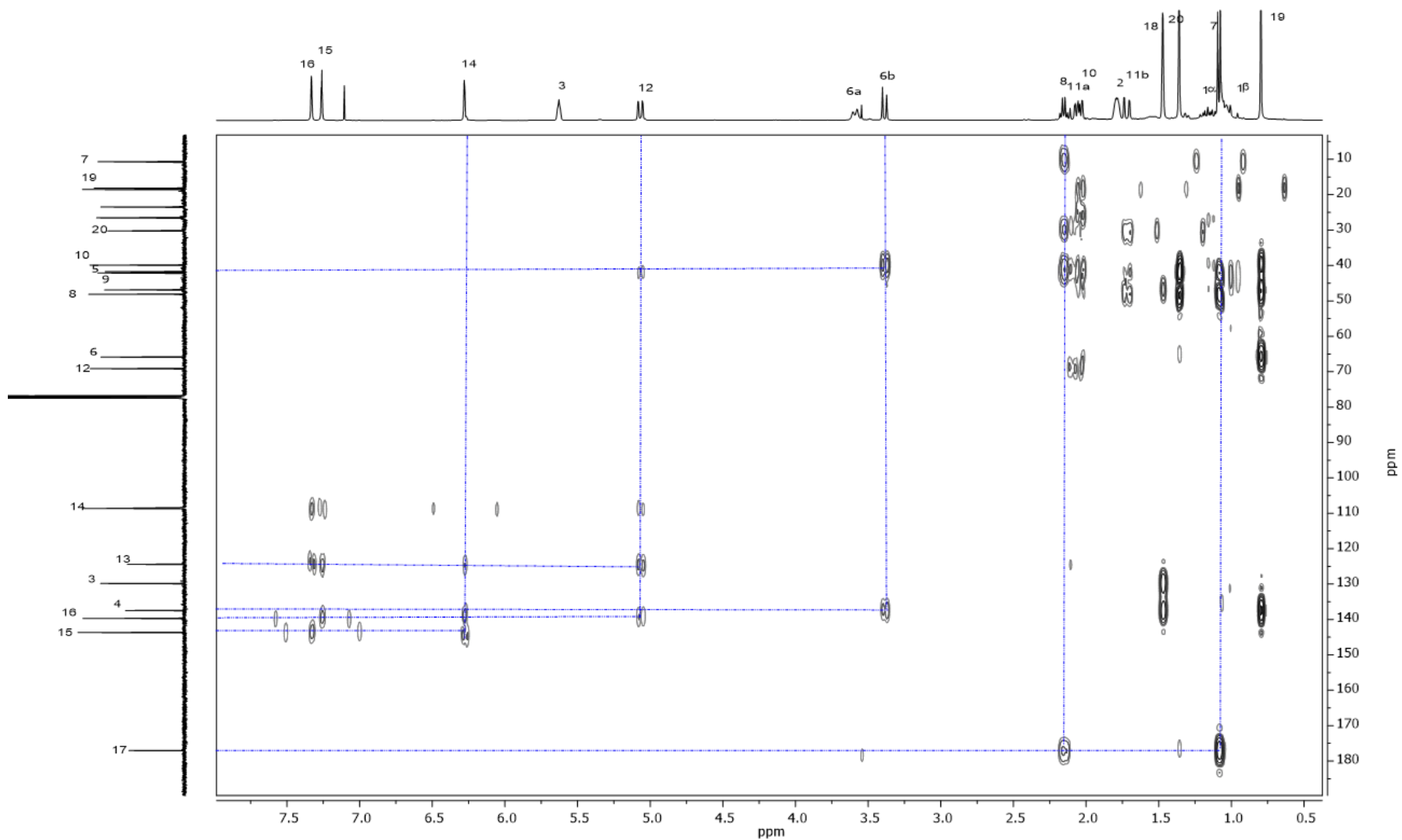


Figura 19. Espectro de HMBC del alcohol de morifolina C (90) en CDCl₃.

En cuanto al derivado **91** obtenido por la reacción de esterificación para obtener el éster correspondiente, utilizando anhídrido acético y piridina. El crudo de la reacción del compuesto **91** se purificó mediante CC para obtener el compuesto puro. El compuesto puro se analizó por espectroscopía de infrarrojo y cuya estructura se confirmó mediante sus datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C , así como experimentos en 2-D. En el espectro de IR (**Anexo II**) se observó la banda a 1728 cm^{-1} correspondiente al grupo carbonilo de la γ -lactona y al nuevo carbonilo del grupo éster. Este compuesto mostró una rotación específica = $+145.0$ (c 1.63, CHCl_3). Su espectro de RMN de ^1H de **91** (**Figura 20**) (**Tabla 4**) fue muy similar al del compuesto **90**, la diferencia que presentó entre sus señales más significativas son dos señales dobles en δ_{H} 4.30 y 4.11 a frecuencias más altas, asignadas a los protones del metileno base de oxígeno H-6, correspondiente al grupo éster obtenido de la reacción de esterificación del grupo hidroxilo presente en **90** y la señal simple en δ_{H} 2.07 correspondiente al metilo del grupo acilo.

En su espectro de RMN de ^{13}C de **91** (**Figura 21**) (**Tabla 4**), de igual forma fue muy similar al del compuesto **90**, en el cual, se pudo observar una nueva señal en δ_{C} 176.6 correspondiente al grupo carbonilo base de éster y la señal en δ_{C} 23.3 ppm para el grupo metilo de este mismo grupo.

El análisis de los experimentos en dos dimensiones (2-D) permitió comprobar la estructura propuesta para el compuesto **91**. En el experimento COSY (**Figura 22**) se observaron tres sistemas de correlación semejante al compuesto **90**. En el primer sistema de correlación ^1H - ^1H COSY se observa entre H-10/H₂-1/H₂-2/H-3 lo que indica la conectividad de CH(10)-CH₂(1)-CH₂(2)-CH(3) en el anillo A, la correlación H-8/H₃-7 para CH (8), CH₃ (7), y el tercer sistema está constituido por los hidrógenos H₂-11/H-12. En el espectro HMBC (**Figura 23**) se observaron correlaciones semejantes al compuesto **90**, entre las más significativas se destaca la correlación de H-6 con los carbonos C-5, C-4 y C-21 a dos y tres enlaces corroboran la posición del grupo acilo en C-6, de igual forma se observó que el grupo metilo en correlación a dos enlaces con el carbono de carbonilo, lo que corrobora la formación del grupo éster. En adición, las correlaciones de H-19 con C-4 y C-6, así como también H-18 con C-3 y C-4, lo que indican la posición de estos grupos metilos en C-5 y C-4 respectivamente. El espectro NOESY presentó (**Figura 24**) la interacción en el espacio entre H-3 con los protones H-2 β y H-18, H-10 con el metilo en H-7 y H-1 α , por lo que se asignó la orientación del hidrógeno como H-10 α , por lo que indica que H-10 α se encuentra antiperiplanar al metilo H-19, también la interacción de H-8 con H-12 y H-20, lo que indica que la H-12 base de lactona se encuentra α en el anillo de la γ -lactona (**Figura 25**). Por lo tanto, la estructura de **91** fue determinada como se representa, la cual corresponde al segundo derivado del diterpeno natural y nombrado como éster de morifolina C.

El compuesto puro se cristalizó en un sistema de hexano-acetona a evaporación lenta, se obtuvieron cristales en forma de placas con punto de fusión de 152.1-153.4 °C y adecuados para su difracción de rayos-X (**Figura 26**), lo cual permitió corroborar su estructura descrita.

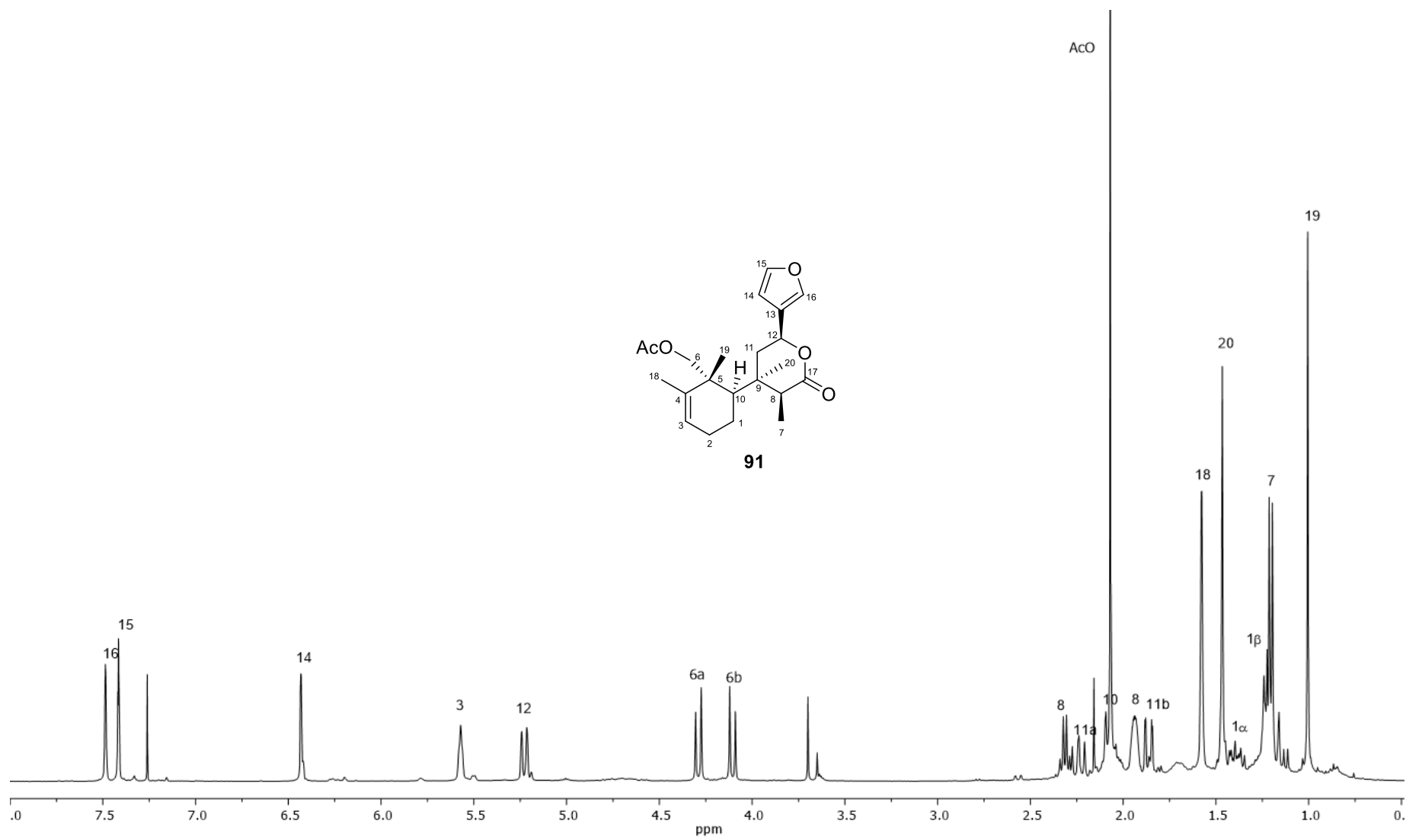


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H del éster de morifolina C (**91**) en CDCl_3 (400 MHz).

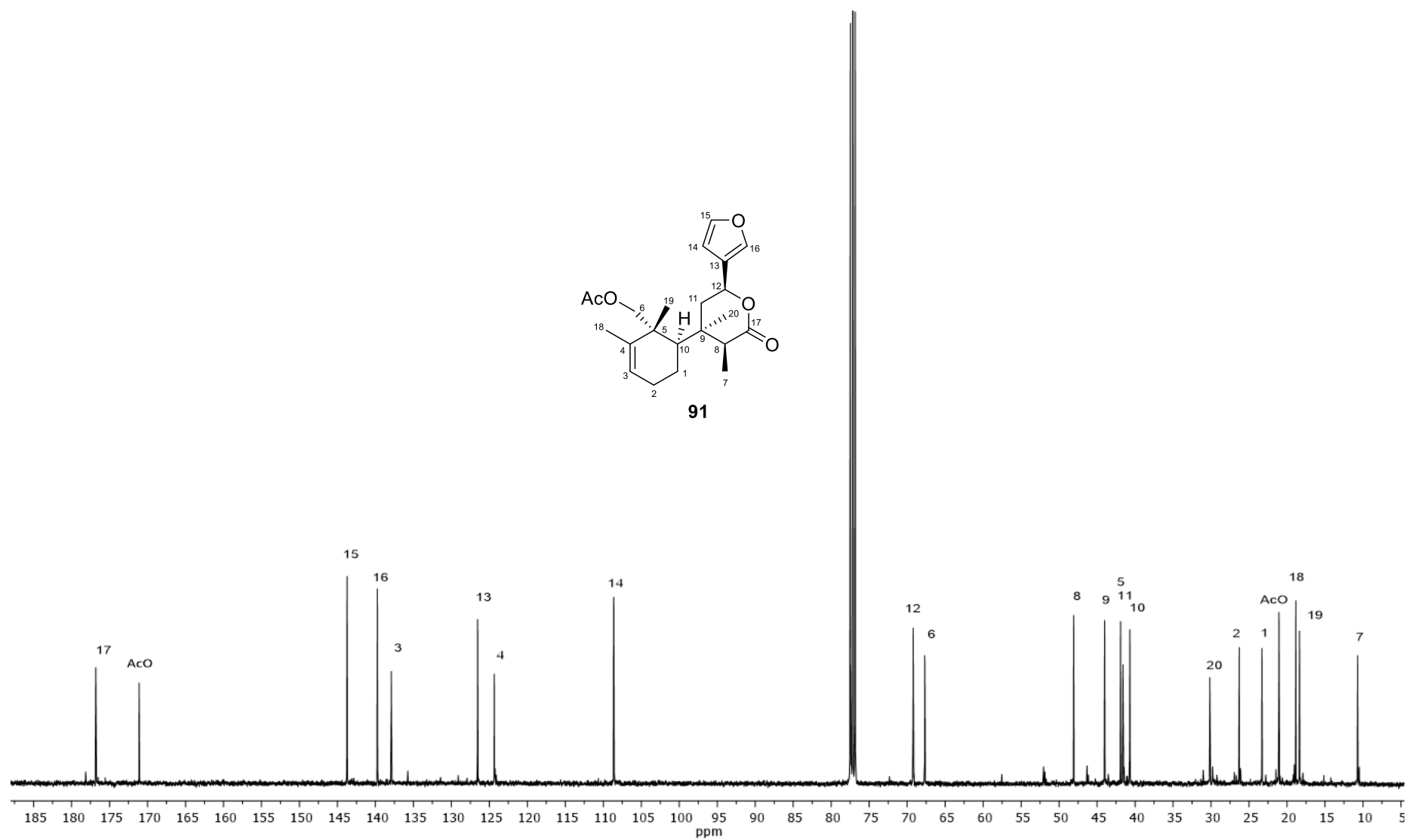


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C del éster de morifolina C (**91**) en CDCl_3 (100 MHz).

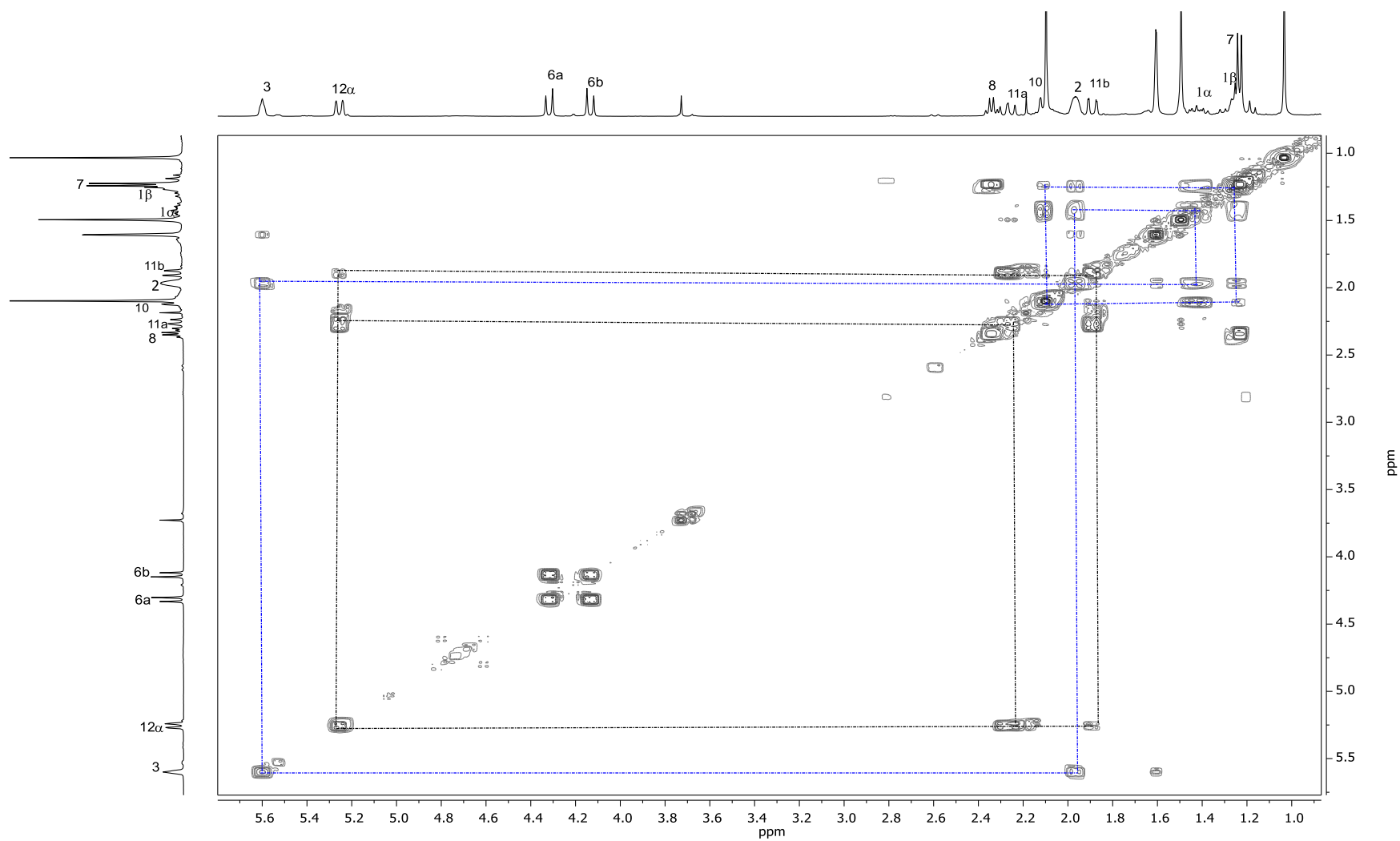


Figura 22. Espectro de COSY del éster de morfolina C (**91**) en CDCl_3 .

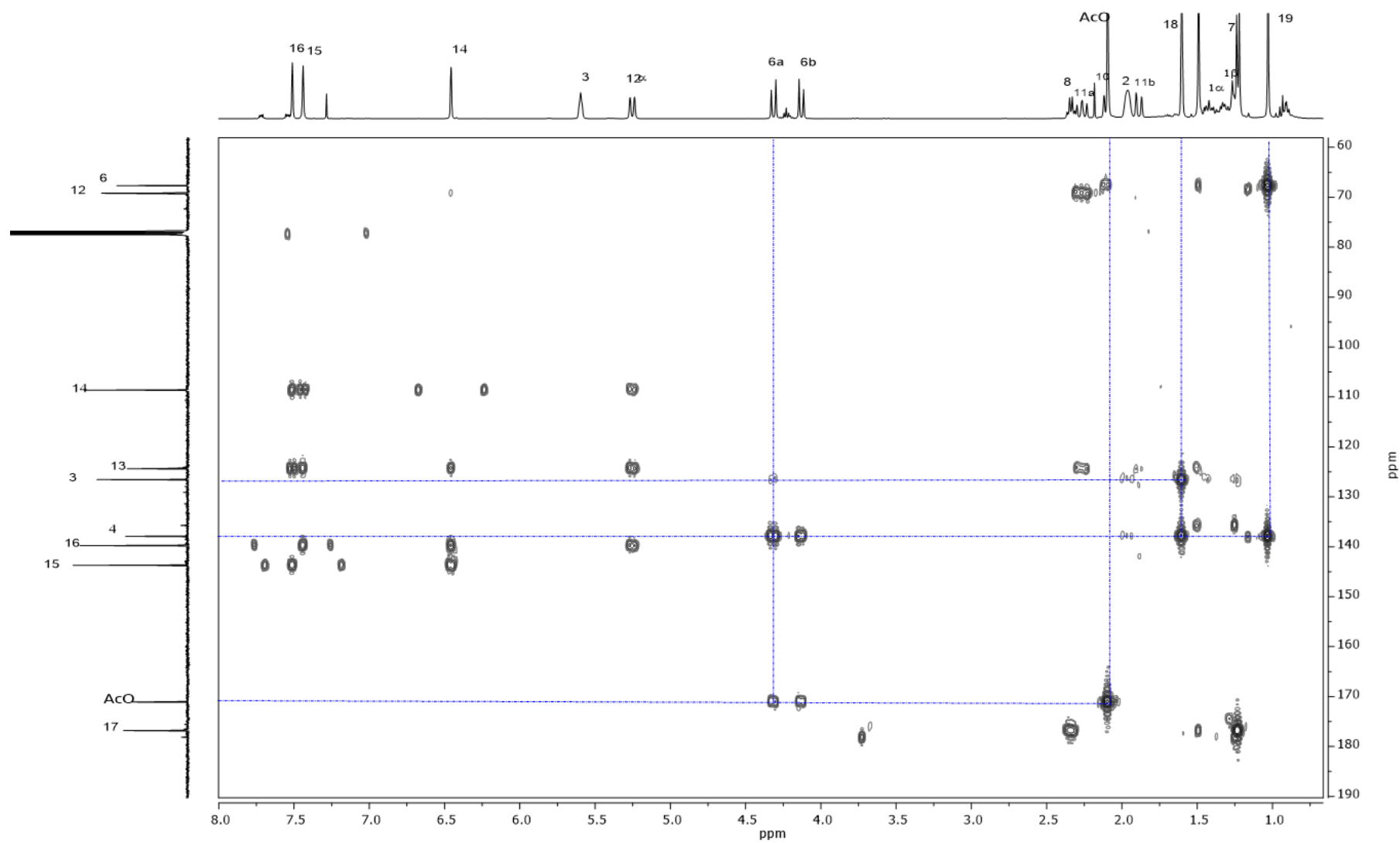


Figura 23. Espectro de HMBC del éster de morifolina C (91) en CDCl₃.

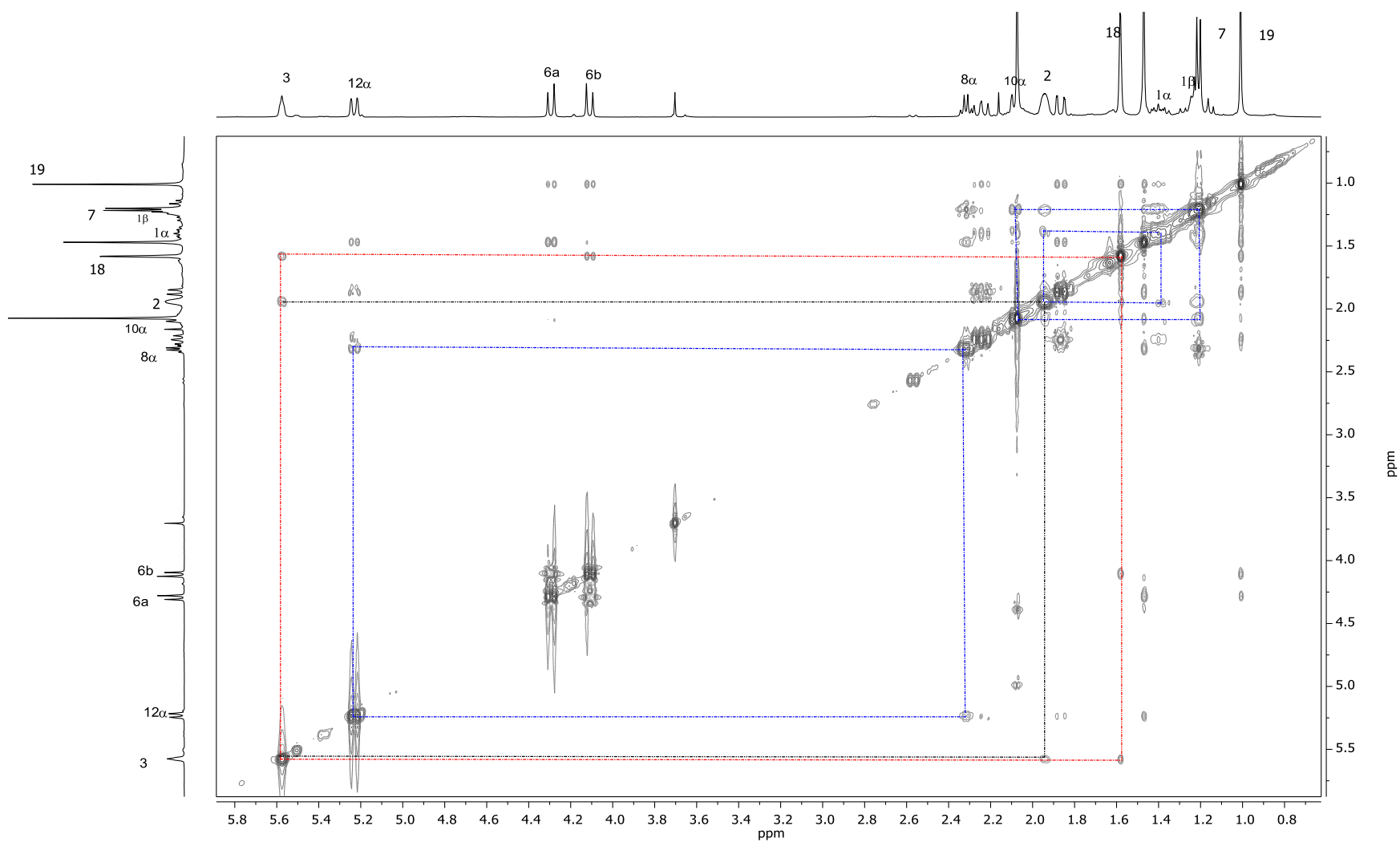


Figura 24. Espectro NOESY del éster de morifolina C (**91**) en CDCl_3 .

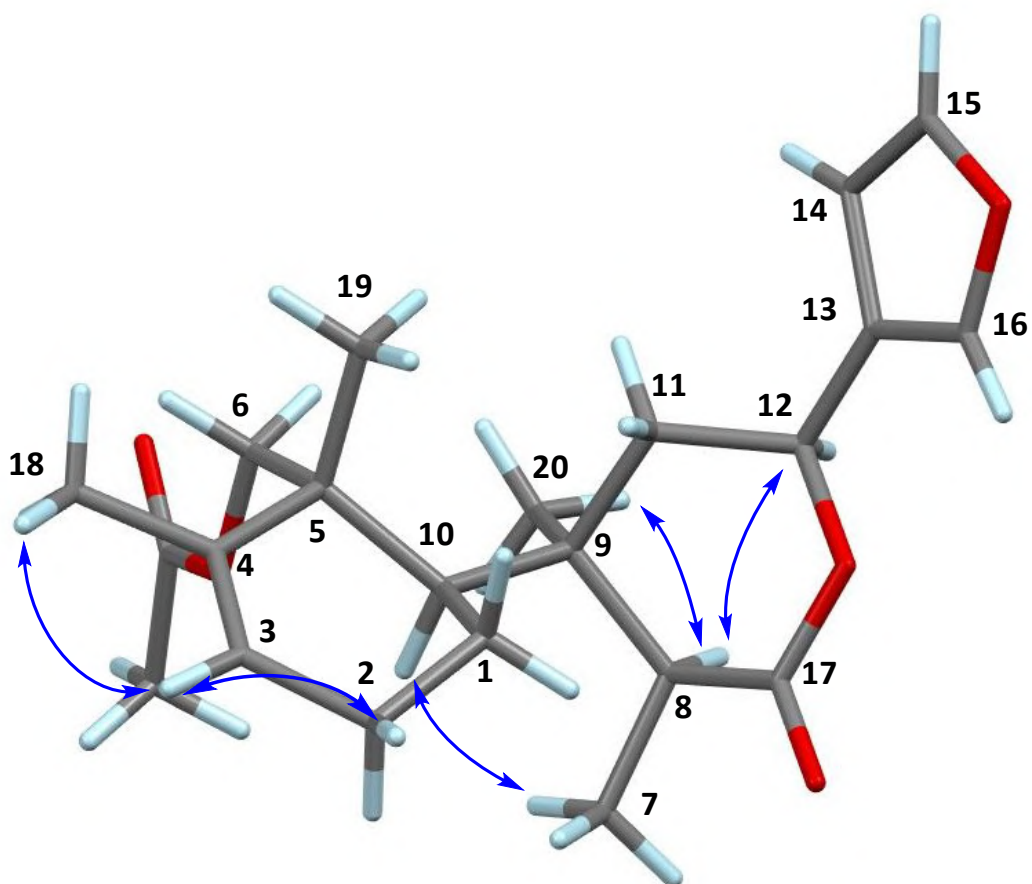


Figura 25. Interacciones en el espacio del espectro NOESY del éster de morifolina C (91) en CDCl_3 .

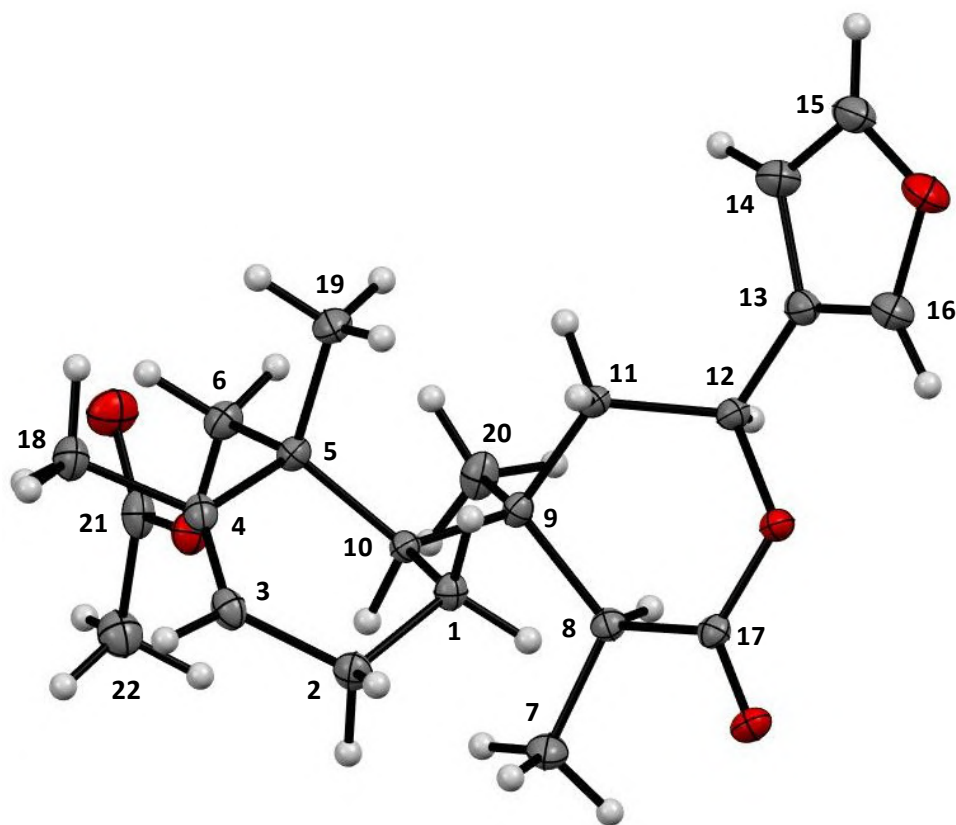


Figura 26. Estructura del éster de morifolina C (**91**) obtenida por difracción de rayos-X.

El compuesto **91** se sometió a una reacción de epoxidación para obtener el epóxido del acetato de MC (**92**), utilizando ácido meta-cloroperbenzoico y diclorometano, el crudo de la reacción del compuesto **92** se purificó mediante CC para obtener el compuesto puro. El compuesto puro se analizó por espectroscopía de infrarrojo y cuya estructura se elucidó mediante sus datos espectroscópicos de RMN de ^1H y de ^{13}C , así como experimentos en 2D. En el espectro de IR se observaron bandas a 1730 cm^{-1} para el grupo carbonilo de éster de la γ -lactona, 1216 cm^{-1} para bandas correspondientes a C-O asignadas al grupo epóxido. Este compuesto mostró una rotación específica = $+145.0$ (c 1.63, CHCl_3). En el espectro de RMN de ^1H de **92** (**Figura 27**) (**Tabla 4**) fue muy similar al del compuesto **91**, la diferencia que presentó entre sus señales más significativas es la señal doble en δ_{H} 3.02 y la ausencia de la señal del protón vinílico en C-3, dos señales dobles en δ_{H} 4.58 y 3.76 a frecuencias más altas, asignadas a los protones del metileno base de oxígeno H-6, correspondiente al grupo éster obtenido de la reacción de esterificación y a frecuencias bajas la señal simple en δ_{H} 1.43, correspondiente al metilo base del epóxido en C-4.

En su espectro de RMN de ^{13}C de **92** (**Figura 28**) (**Tabla 4**), fue muy similar al del compuesto **91**, en el cual, se pudieron observar dos señales nuevas en δ_{C} 62.9 y 61.7

correspondientes a los carbonos base de epóxido asignados a C-3 y C-4, y la ausencia de dos señales del enlace doble en esta posición, el resto de las señales no presentan cambios significativos.

El análisis de los experimentos en dos dimensiones (2-D) permitió comprobar la estructura propuesta para el compuesto **92**. En el experimento COSY (**Figura 29**) se observó la correlación ^1H - ^1H COSY entre H-10/H₂-1/H₂-2/H-3 lo que indica la conectividad de los carbonos CH(10)-CH₂(1)-CH₂(2)-CH(3). En el espectro HMBC (**Figura 30**) se observó las correlaciones de H-6 con los carbonos C-5, C-4 a dos y tres enlaces, la correlación de H-2 con C-4 y H-3 con los carbonos C-1 y C-2, lo que corrobora la posición del grupo epóxido en C-3 a C-4. En adición, las correlaciones de H-18 y H-19 con C-4, lo que indican la presencia del anillo de epóxido. El espectro NOESY presentó (**Figura 31**) la interacción en el espacio entre H-3 con el protón H-2 β , H-2 α con H-10 α , también la interacción de H-3 con el metilo en C-18, por lo que se asignó la orientación del hidrógeno base de oxígeno como H-3 α , y que indica que el anillo del epóxido (C-3 – C-4) se encuentra β (**Figura 32**). Por lo tanto, la estructura de **92** fue determinada como se representa, la cual corresponde a un nuevo derivado y nombrado como el epóxido del éster de morifolina C.

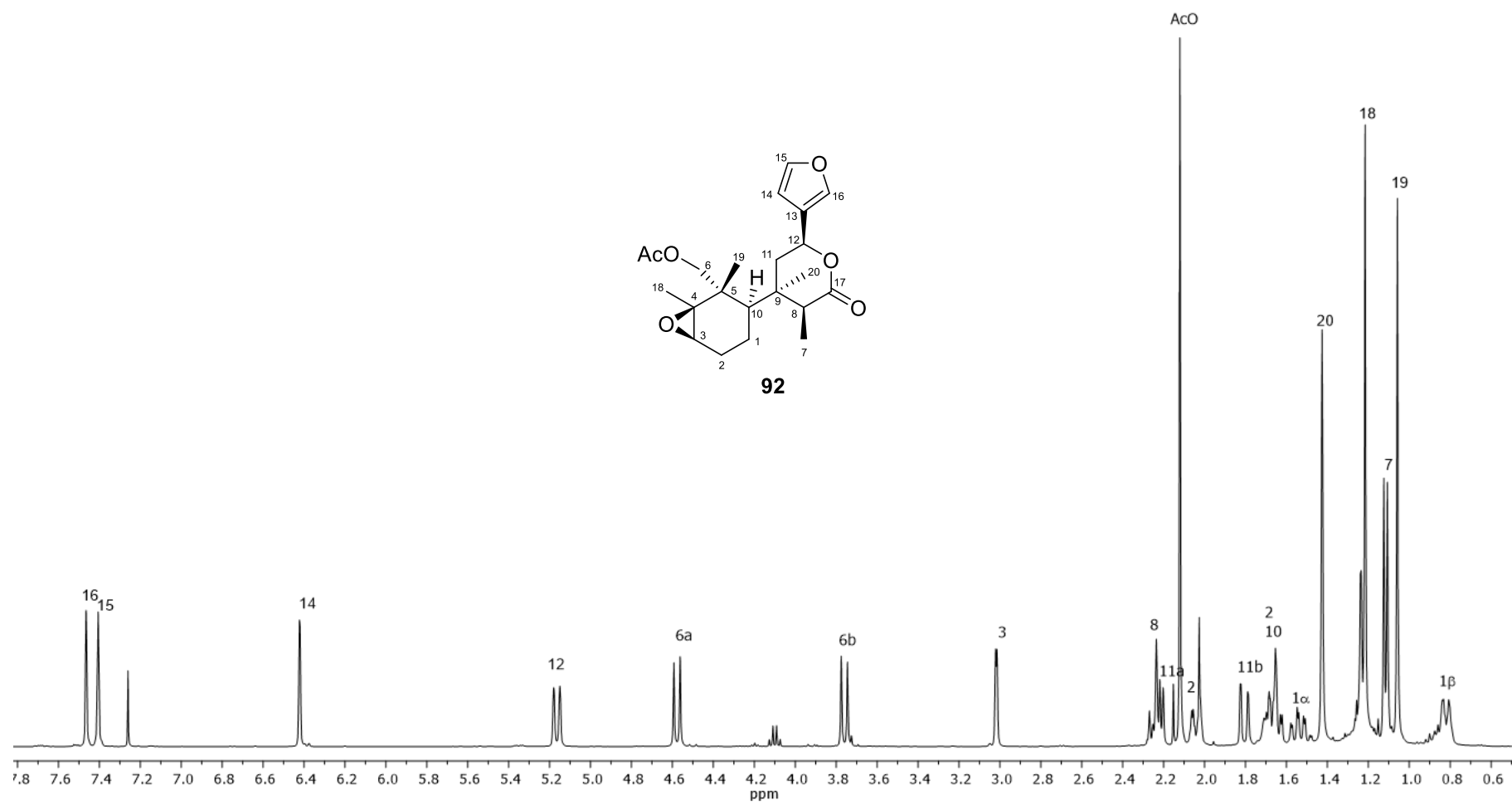


Figura 27. Espectro de RMN de ¹H del epóxido de morifolina C (**92**) en CDCl₃ (400 MHz).

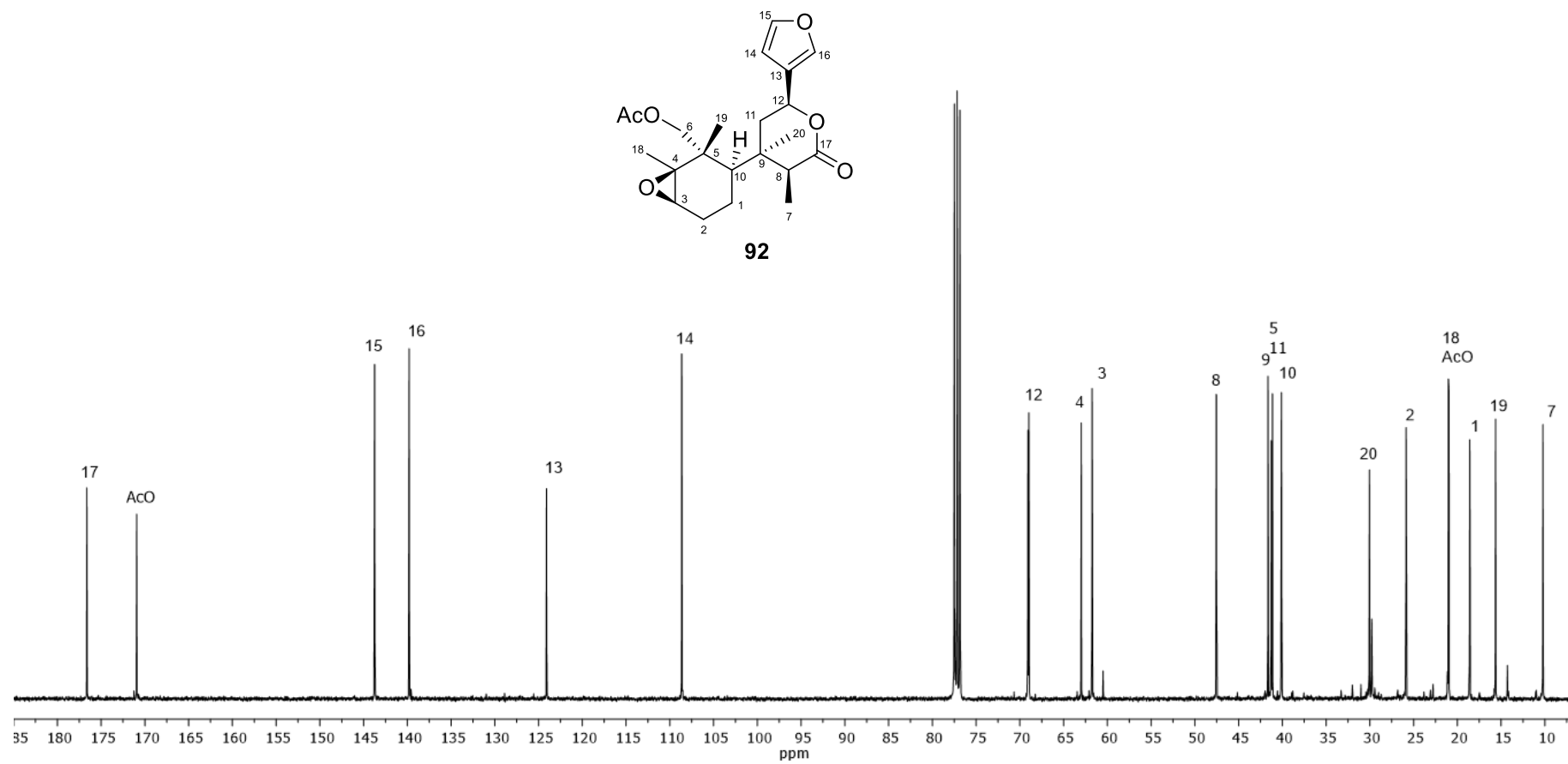


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C del epóxido de morifolina C (**92**) en CDCl_3 (100 MHz).

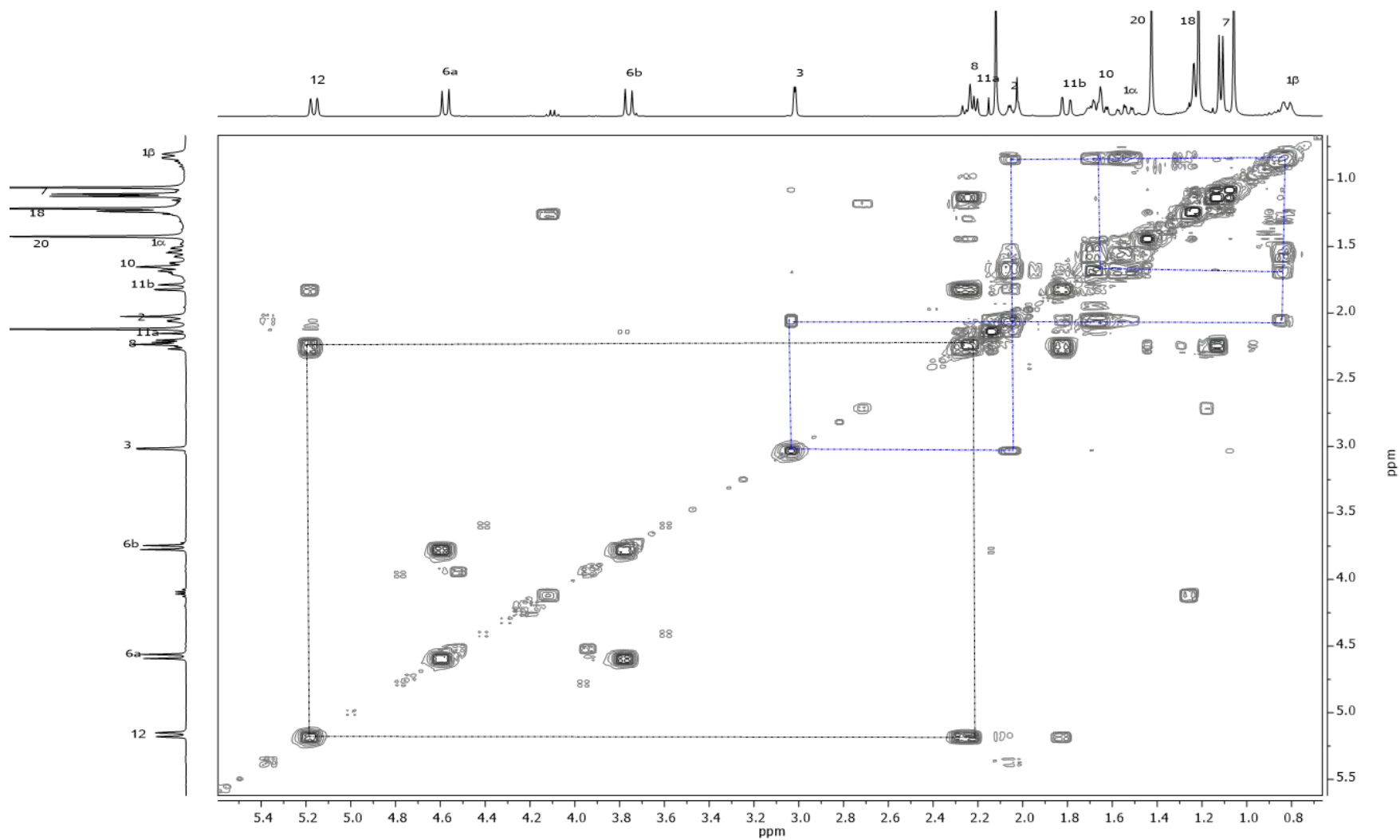


Figura 29. Espectro COSY del epóxido del éster de morfolina C (**92**) en CDCl_3 .

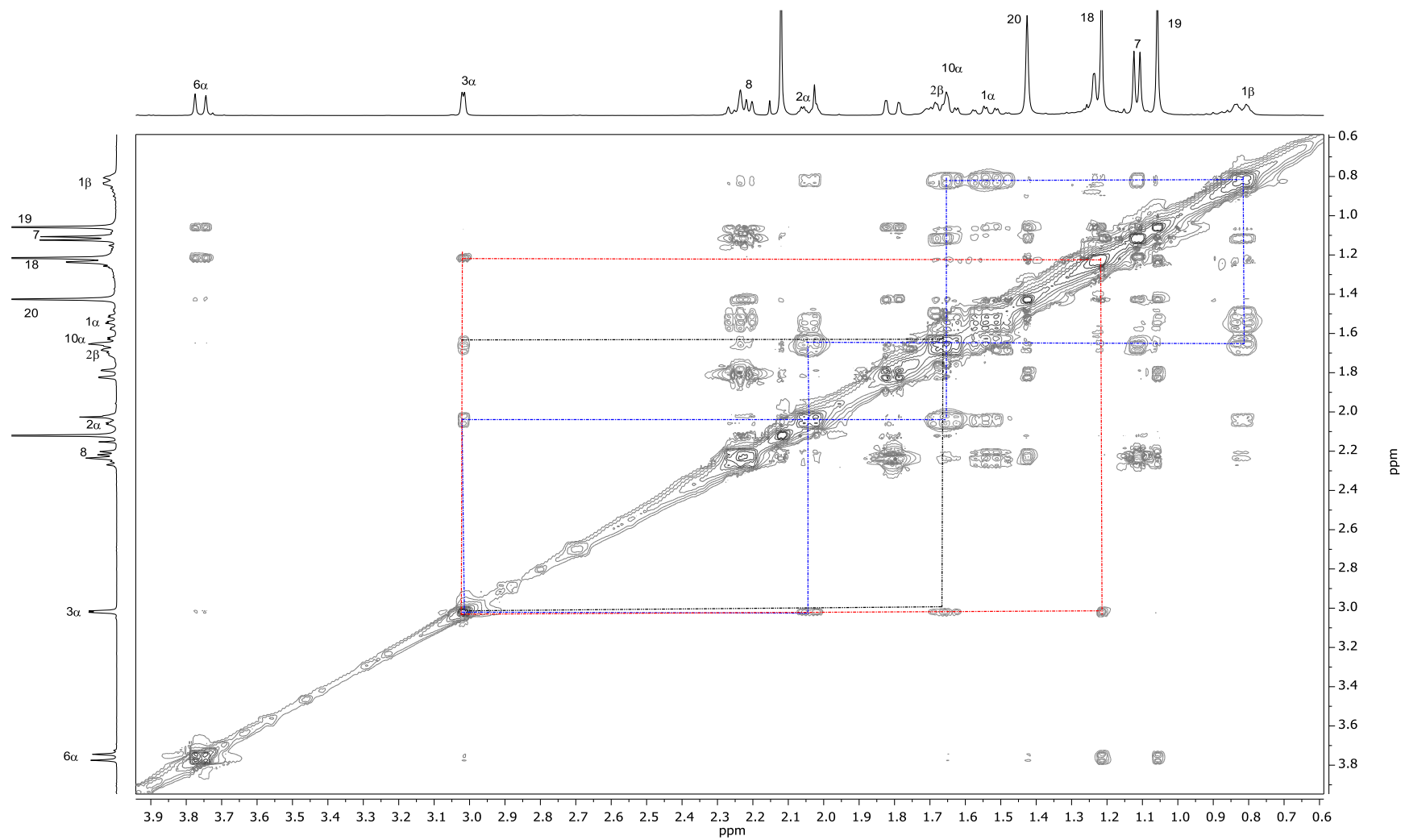


Figura 31. Espectro NOESY del epóxido del éster de morfolina C (92) en CDCl₃.

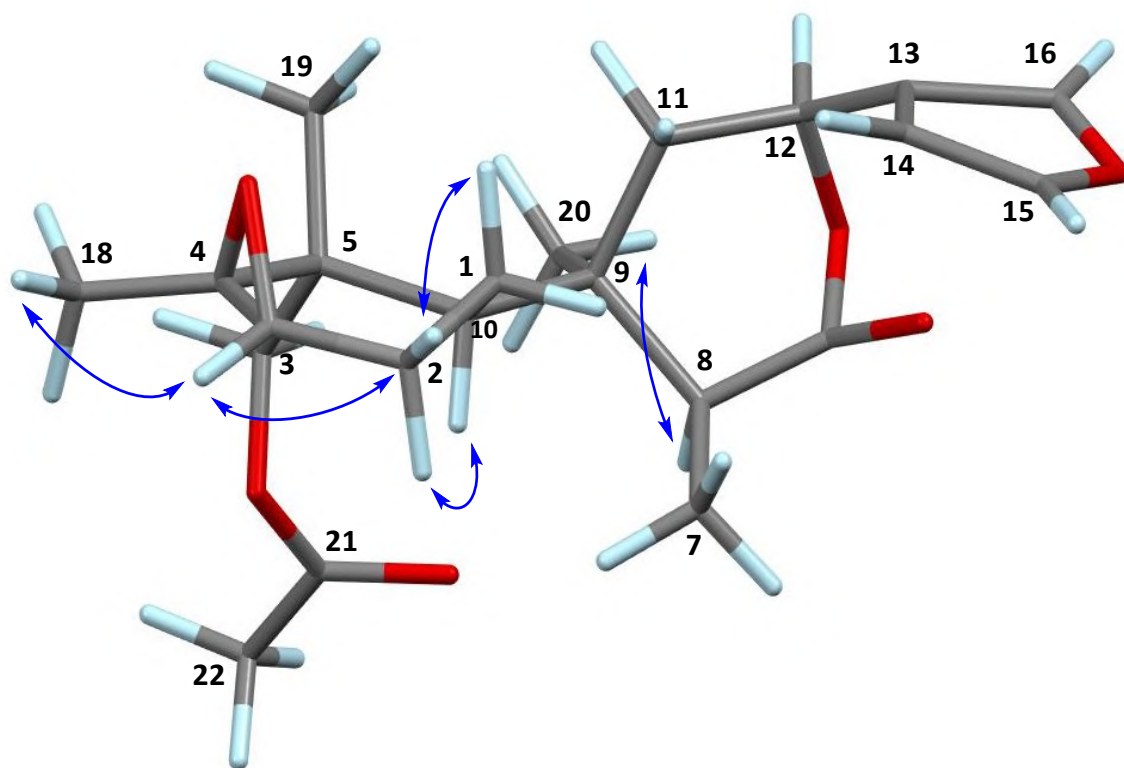


Figura 32. Interacciones en el espacio del espectro NOESY del epóxido del éster de morifolina C (92) en CDCl_3 .

Tabla 4. Desplazamientos químicos de protón y carbono de los compuestos en CDCl₃, (δ en ppm y J en Hz).

Posición	90 (OH)		91 (AcO)		92 (Epoxi)	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	α 1.31, m ^a	23.5	α 1.41, m ^a	23.3	α 1.54, dt (12.4,3.0)	18.6
2	β 1.06, m ^a	-	β 1.23, m ^a	-	β 0.82, m	
	α 1.94, m	26.5	α 1.94, m ^a	26.3	α 2.04, m	25.8
3	β 1.94, m	-	β 1.94, m ^a	-	β 1.65m	-
	5.78, br s	129.7	5.57, br s	126.5	3.02, d (2.7)	61.7
4	-	137.5	-	137.9	-	62.9
5	-	42.1	-	41.9	-	41.0
6	a 3.75, d (11.4)	65.9	a 4.30, d (12.1)	67.7	a 4.58, d (12.2)	69.1
	b 3.54, d (11.6)		b 4.11, d (12.1)		b 3.76, d (12.2)	
7	1.24, d (6.9)	10.7	1.21, d (6.9)	18.4	1.12, d (6.8)	10.2
8	2.31, q (6.9)	48.2	2.32, q (6.9)	48.1	2.23, m	47.4
9	-	46.9	-	44.0	-	41.5
10	2.19, dd (12.0, 1.8)	39.9	2.09, dd (14.5, 2.0)	40.7	1.67, m	40.0
11	a 2.23, dd (14.4, 12.0)	41.7	a 2.25, dd (14.5, 12.0)	41.6	a 2.23, m	41.2
	b 1.88, dd (14.4, 1.8)	-	b 1.87, dd (14.4, 2.0)	-	b 1.82, dd (14.4, 1.9)	-
12	5.22, d (11.4)	69.2	5.23, dd (12.0, 1.9)	69.2	5.16, d (11.6)	69.0
13	-	124.4	-	124.4	-	124.1
14	6.43, dd (2.0, 0.8)	108.7	6.44, dd (1.9, 0.9)	108.6	6.42, br s	108.6
15	7.41, t (1.6)	139.7	7.42, t (1.8)	143.7	7.41, br	143.7
16	7.49, m	143.7	7.49, br s	139.8	7.46, br s	139.8
17	-	177.0	-	176.8	-	176.6
18	1.63, s	18.6	1.59, s	18.8	1.43, s	21.0
19	0.95, s	18.2	1.01, s	18.4	1.05, s	15.6
20	1.51, s	30.3	1.47, s	30.2	1.43, s	30.0
AcO	-	-	2.07, s	171.1 21.1	2.12, s	170.9 21.0

^aLas señales se encuentran traslapadas y las multiplicidades no pueden ser descritas

6.2 Propiedades fisicoquímicas, el perfil ADMET y actividades biológicas de los compuestos derivados

6.2.1 Predicción de las propiedades fisicoquímicas

Los compuestos **90-92** obtenidos de la semisíntesis a partir de morifolina C (**89**), así como el antibiótico utilizado como control positivo fueron evaluados calculando las cinco propiedades fisicoquímicas principales: número de aceptores y donantes de enlaces puentes de hidrogeno, el LogP, la superficie polar y el peso molecular (**Tabla 5**), basándose en las reglas de Veber y Lipinski (Lipinski *et al.*, 1997; Udrea *et al.*, 2018). La plataforma de SwissADME es una herramienta de acceso libre utilizada para predecir las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de compuestos basada en la similitud de fármacos.

De manera general, los tres compuestos muestran valores que se encuentran dentro de los puntajes aceptables, el coeficiente de partición (LogP) no mayor a 5, el peso molecular se encuentra entre el rango de 330 y 400 g/mol, la superficie polar cuyo rango está entre 20 y 120 Å², el número de pares aceptores de puentes de hidrógeno y donadores son óptimos, menos de 10 enlaces rotables y por lo tanto presentan cero violaciones basadas en las reglas de Lipinski (Lipinski *et al.*, 1997; Vlad *et al.*, 2020).

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos **90-92** y estreptomicina (control positivo).

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Aceptores de puentes de Hidrógeno	de de	Donadores de puentes de Hidrógeno	LogP	Refractividad molar	TPSA (Å ²)	Enlaces rotables
Alcohol (90)	332.43	4		1	3.43	93.00	59.67	3
Acetato (91)	374.47	5		0	3.89	102.74	65.74	5
Epóxido (92)	390.47	6		0	3.36	102.22	78.27	5
Estreptomicina	581.57	15		12	-5.71	130.43	336.43	9

Con los resultados obtenidos en la plataforma de SwissADME también fue posible generar los radares de biodisponibilidad de los tres compuestos, con la finalidad de hacer una comparación de los resultados (**Figura 33**). En los radares se muestran los rangos óptimos de cada propiedad y dentro de qué rango se encuentra el compuesto marcado con las líneas color rojo, dentro de estas propiedades se encuentran: lipofilidad, logP menor a 5, peso molecular, polaridad PSA, solubilidad: LogS, y flexibilidad.

Como se muestra en la **Figura 33**, los compuestos cumplen con los rangos establecidos y se encuentran dentro de los valores óptimos que revelan las propiedades fisicoquímicas compatibles con una moderada farmacocinética y, por lo

tanto, su probabilidad de mayor efecto y uso en estudios posteriores. Por otro lado, la evaluación del compuesto de referencia como lo es la estreptomicina nos muestra que no cumple con la regla de Lipinski debido a que presenta violaciones, debido al alto peso molecular que posee, números de donadores y aceptores de enlaces hidrógeno fuera de rango, además de tener un valor bajo de LogP, lo que indica tener una mala absorción oral como se muestra sus radares de biodisponibilidad en la **Figura 33**.

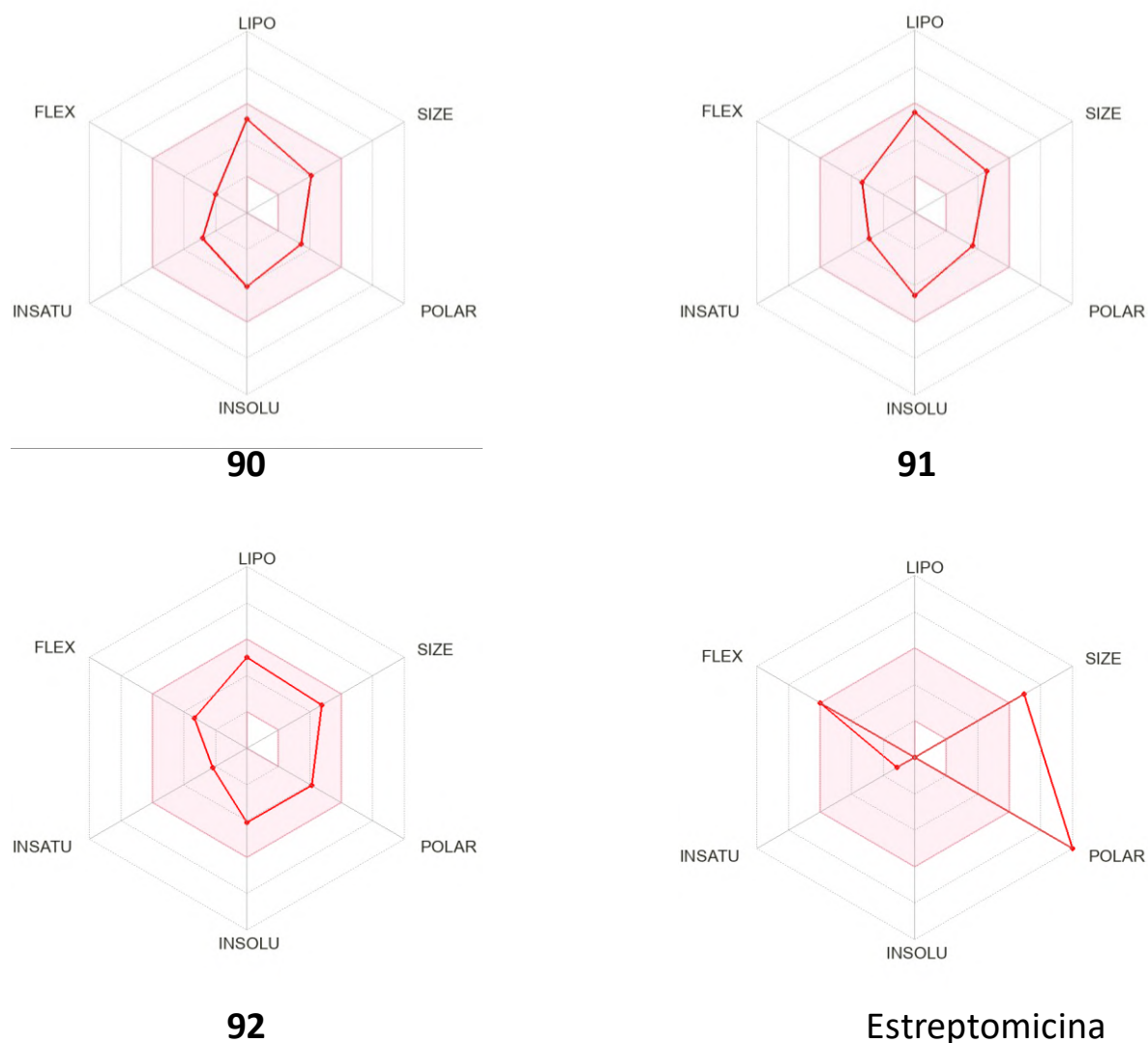


Figura 33. Radares de biodisponibilidad de los compuestos.

6.2.2 Predicciones ADMET

La absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad o también conocido como ADMET, nos permite conocer los aspectos farmacocinéticos para conocer cómo el organismo actúa frente a un fármaco administrado en un ser vivo (Doogue y Polasek, 2013). Las propiedades desfavorables ADMET se han identificado como una de las principales causas de fallo de moléculas candidatas en el desarrollo de fármacos. Por consiguiente, existe un interés creciente en la predicción temprana de las propiedades ADMET, con el objetivo de incrementar la tasa de éxito de los compuestos que alcanzan el desarrollo de medicamentos (Darko, 2002). La utilización de programas predictores del perfil ADMET como las plataformas de pkCSM y ADMETlab de manera general nos brindan información química, biológica y de las propiedades ADMET, útiles en el desarrollo de medicamentos y la evaluación de riesgos medioambientales y humanos (Pires *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2019).

Los parámetros farmacocinéticos están subdivididos en su mayoría en otros pequeños subgrupos: la absorción consta de 3 subgrupos (BHE, absorción intestinal y permeabilidad en piel), seguida de la distribución proponiendo la localización subcelular, posteriormente el metabolismo donde se representa si existe o no inhibición de los citocromos P450, excreción determina el tiempo de vida media y finalmente la toxicidad subdividida en 2 grupos (prueba AMES y carcinogénica). En el perfil ADMET mostrado (**Tabla 6**) de los compuestos podemos identificar que la absorción vía intestinal los tres compuestos mostraron valores del 94-97 % y la permeabilidad en piel son valores superiores a un criterio bajo (-2.5), por lo que estos valores indican que su administración puede ser oral o tópica moderada. En las propiedades de distribución, el volumen de distribución en estado estacionario es moderado con valores de 0.024 a 0.286, ya que valores bajos están en menores < -0.15 y altos > 0.45 y por su parte en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica muestran valores bajos. Lo que respecta a los mecanismos de metabolismo de los compuestos, pueden ser sustrato e inhibidores de diversos complejos de citocromo P450, el estado de sustrato o inhibidor son un criterio crítico de decisión en los esfuerzos de descubrimiento de fármacos del sistema nervioso central (SNC) porque la naturaleza polimórfica de estos complejos enzimáticos puede dar lugar a una seguridad del paciente y a una eficacia del fármaco variables (Butina *et al.*, 2002). Además, por ejemplo, CYP2D6 está implicado en el metabolismo de fármacos del SNC en comparación con otras clases de fármacos. Por lo tanto, identificar tendencias en las propiedades de pequeñas moléculas de compuestos penetrantes en el SNC que puedan ayudar a distinguir los posibles sustratos CYP2D6 de los no sustratos que permitiría una mayor priorización en la síntesis y evaluación biológica de nuevos candidatos terapéuticos (Chico *et al.*, 2009). Por otro lado, el tiempo de vida media es baja, lo que indica que se necesitaría de una mayor cantidad de compuesto para tener efecto terapéutico. Finalmente, en el parámetro de toxicidad confirma que los compuestos no presentan resultado de ser tóxicos, la dosis máxima

tolerada o tener algún efecto de mutación celular y solo el compuesto **90** muestra tener una posible hepatotoxicidad.

Tabla 6. Perfil ADMET de los compuestos, realizado en la plataforma de pkCSM.

Parámetro	Referencia	Compuesto			
		90	91	92	St
Absorción					
Solubilidad en agua (Log S) (mol/l.)	≤ 5	− 4.351	−5.034	−4.512	−2.948
Permeabilidad a Caco-2	> 0.9	1.352	0.804	0.849	0.08
Absorción intestinal (humano)	Bajo a < 30%	93.866	95.858	97.477	0
Permeabilidad en piel (LogKp (cm/s)	Bajo a > − 2.5	−3.359	−3.319	−3.356	−2.735
Distribución					
Volumen de distribución en estado estacionario (humano) (log l./kg)	Bajo a <−0.15, Alto a >0.45	0.286	0.146	0.024	−0.351
Fracción sin unir (humano)	−	0.202	0.141	0.207	0.543
Permeabilidad B1IE (log BB)	Bajo a <−1, Alto a >0.3	−0.104	−0.041	−0.576	−2.031
Permeabilidad CNS (log PS)	Penetra a >−2, No penetra a <−3	−2.81	−2.788	−2.887	−6.492
Metabolismo					
Sustrato CYP2D6	No	No	No	No	No
Sustrato CYP3A4	−	Sí	Sí	Sí	No
Inhibidor de CYPIA2	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP2C19	No	Sí	No	No	No
Inhibidor de CYP2C9	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP2D6	No	No	No	No	No
Inhibidor de CYP3A4	No	No	Sí	No	No
Excreción					
Depuración/excreción Total (log ml/min/kg)	−	0.95	1.037	0.602	0.005
Transportador de cationes orgánicos renal 2 (OCT2)		No	No	No	No
Toxicidad					
Toxicidad AMES	No	No	No	No	Sí
Dosis máxima tolerada (log humano)	Bajo a −0.477, Alto a >0.477	0.174	0.096	−0.131	0.569
Inhibidor de hERG I	No	No	No	No	No
Inhibidor de hERG II	No	No	No	No	Sí
Toxicidad aguda oral en ratas (DI ₅₀)	−	2.481	2.334	2.301	2.471
Toxicidad crónica en ratas (Oral)	−	1.707	0.679	0.747	4.229
Hepatotoxicidad	No	Sí	No	No	No
Sensibilización de la piel	No	No	No	No	No
Toxicidad a <i>T. pyriformis</i> (log ug/l.)	Tóxico a >−0.5	1.205	0.992	0.513	0.285
Toxicidad del pezcecillo (log mM)	Tóxico a<−0.3	0.295	0.067	0.773	11.256

6.2.3 Predicciones de blancos farmacológicos y de actividad biológica

Con la herramienta *Pass Online* de la plataforma *Way2Drug*, se determinaron sus posibles actividades biológicas (**Tabla 7**). Cada uno de los compuestos tiene una alta probabilidad de presentar actividad antineoplásica, el compuesto con el anillo de epóxido (**92**) presenta la mayor probabilidad con un 82.6 %. Así mismo, también mostraron una probabilidad elevada de actividad antifúngica (68.3 - 72.8 %), el cual podría ser otro campo de aplicación además de la actividad antibacteriana; para esta actividad, es importante mencionar que el compuesto **92** tiene la probabilidad más alta (48.6 %), lo cual indicaría que la modificación estructural del producto natural **89** representaría un incremento de actividad biológica de forma general. En cuanto a propiedades antibacterianas, los compuestos semisintetizados tienen una probabilidad de 40 % al 50 %. De igual forma, los posibles mecanismos encontrados de la actividad antibacteriana que resultan con los valores más altos fueron como inhibidores de la síntesis de proteínas, los compuestos presentan valores del 29.8 % al 36.8 %, y como inhibidores la enzima peptidoglucano glucosiltransferasas de 27.3 a 21.0 %, excepto para el compuesto **92** no se reportó ningún dato.

Tabla 7. Mapa de calor de la predicción de las posibles actividades biológicas de los compuestos.

Actividad	Compuesto				Probabilidad (%)
	89	90	91	92	
Antineoplásico	79%	74.3%	76.2%	82.6%	100-90
Antibacterial	43.6%	43.4%	40.0%	48.6%	90-80
Antibiótico	16.5%	20.5%	18.5%	25.3%	80-70
Antimicoplasmas	29.1%	29.3%	30.3%	35.5%	70-60
Inhibidor de síntesis de proteínas	29.8%	29.9%	30.9%	36.8%	60-50
Inhibidor de peptidoglucano glucosiltransferasas	22.4%	27.3%	21.0%	-	
Inhibidor de la síntesis de RNA	30.0%	37.6%	33.3%	33.7%	50-40
Inhibidor de la formación de microtúbulos	32.2%	34.5%	34.3%	42.0%	40-30
Potenciador de permeabilidad de la membrana	25.4%	25.1%	-	-	30-20
Antifúngico	68.3%	71.7%	71.6%	72.4%	≤20

Así mismo, con ayuda del servicio *AntiBac Pred* (de la misma plataforma), se lograron determinar algunos posibles objetivos bacterianos que los compuestos puedan resultar más efectivos. Para el caso del producto natural **89** y los derivados **90-92** algunas bacterias contra las cuales pueden presentar actividad antibacteriana son *Mycobacterium ulcerans*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus simulans*, *Kocuria rhizophila*, *Clostridium ramosum*, *Acinetobacter pittii*, *Prevotella oralis* y otras especies con una muy baja probabilidad (Tabla 8).

Tabla 8. Mapa de calor sobre la predicción de objetivos bacterianos.

Bacteria	Compuesto			Probabilidad %
	90	91	92	
<i>Clostridium ramosum</i>	25.6	50.4	46.6	100-80
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	40.7	36.0	37.7	80-60
<i>Prevotella oralis</i>	37.6	25.5	37.6	60-50
<i>Salmonella enteritidis</i>	35.0	30.0	13.9	50-40
<i>Kocuria rhizophila</i>	32.3	26.7	26.7	40-30
<i>Acinetobacter pittii</i>	30.6	SD	22.9	30-20
<i>Staphylococcus simulans</i>	30.1	14.9	SD	≤ 20

SD: Sin dato

6.3 Acoplamiento molecular (Docking) de los compuestos con la enzima β -lactamasa

6.3.1 Modos de unión de los compuestos con la enzima β -lactamasa

Las betalactamasas (β -lactamasas) son enzimas producidas por bacterias como mecanismo de defensa para inactivar antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos) y que confieren resistencia a estos antibióticos betalactámicos, a través de la hidrólisis del anillo β -lactámico, desactivando las propiedades antibacterianas del principio activo (Kaderabkova *et al.*, 2022). Por ello, se convierten en un blanco para la búsqueda de nuevos principios activos que las inhiban, por lo que en el presente estudio se llevó a cabo el acoplamiento molecular de los compuestos **90-92**, con la finalidad de predecir si pueden presentar interacciones o afinidad sobre el sitio de unión de la enzima β -lactamasa e inhibir su actividad enzimática, y posteriormente validar estos resultados computacionales con el estudio *in vitro*.

El estudio de acoplamiento molecular (Docking) permitió predecir la conformación óptima, la afinidad y las interacciones de los compuestos con el sitio de unión de la enzima β -lactamasa. El producto natural **89** y el derivado **92** presentaron la mejor afinidad con una energía libre de unión de -8.50 kcal/mol y -7.94 kcal/mol, respectivamente (Tabla 9, Figura 34). El compuesto **92** mostró interacciones de puentes de hidrógeno con los residuos Asn²⁸⁹, Lys³¹⁵, Thr³¹⁶ y Asn³⁴⁹, así como interacciones del tipo π -catión con Lys⁶⁷ (Figura 34). Por otro lado, los compuestos

90 y **91** presentaron energías libres de unión de -7.39 kcal/mol y -7.72 kcal/mol, respectivamente.

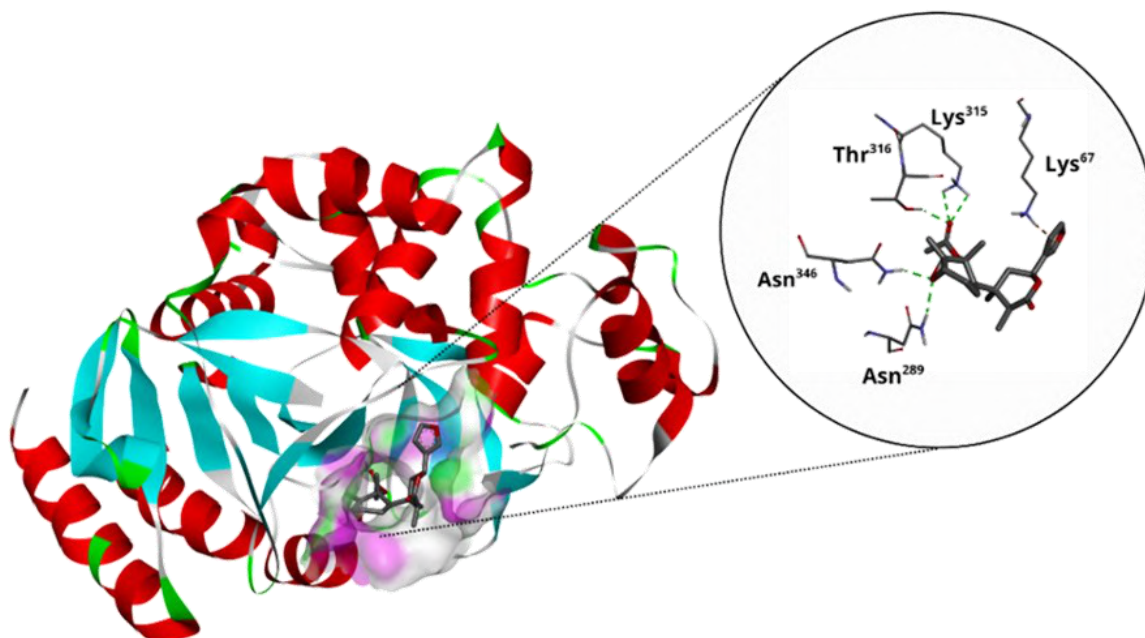


Figura 34. Conformación e interacciones del compuesto **92** con el sitio de unión de la enzima β -lactamasa.

Tabla 9. Energía de unión de los compuestos **89-92** y cefotaxima (inhibidor) con la enzima β -lactamasa e interacciones de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (π -alquil).

Compuesto	Energía de enlace (kcal/mol)	Puentes de Hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas, π -alquil
89	-8.50	Ser ⁶⁴ , Lys ⁶⁷ , Val ¹²¹	Leu ¹¹⁹ , Tyr ¹⁵⁰ , Ala ²²⁰ , Tyr ²²¹ , Leu ²⁹³ , Ala ³¹⁸
92	-7.94	Asn ²⁸⁹ , Lys ³¹⁵ , Thr ³¹⁶ y Asn ³⁴⁹	Lys ⁶⁷
91	-7.72	Ser ⁶⁴ , Lys ³¹⁵ , Thr ³¹⁶ , Gly ³²⁰	Leu ¹¹⁹ , Val ²¹¹ , Tyr ²²¹
Cefotaxima (Inhibidor)	-7.75	Ser ⁶⁴ , Lys ⁶⁷ , Thr ³¹⁶ , Ala ³¹⁸ , Asn ³⁴³	Tyr ²²¹
90	-7.39	Ser ⁶⁴ , Lys ⁶⁷ , Gln ¹²⁰	Tyr ²²¹ , Ala ³¹⁸
Cefotaxima (experimental)	---	Ser ⁶⁴ , Ala ³¹⁸ , Gly ³²⁰	---

6.4 Evaluación del efecto antibacteriano de los compuestos contra bacterias patógenas

Los compuestos fueron evaluados de acuerdo con el método por difusión en disco. A los tres compuestos obtenidos **90-92** y el compuesto natural **89** se evaluó la actividad antibacteriana contra tres cepas bacterianas Gram positivas y una Gram negativa (**Tabla 10**). El resultado obtenido en el ensayo se expresó en mm del diámetro de inhibición mostrado a las diferentes concentraciones (**Tablas 11-13**).

Los derivados **90-92** evaluados frente a *S. aureus* presentaron una inhibición moderada comparada con el control (+), aunque debe tomarse en cuenta que estos compuestos son pocos solubles en DMSO, lo que nos indica que la solubilidad puede estar interfiriendo en el efecto que pudiera presentar en la actividad. El compuesto **91** es menos soluble que **90** y **92**, lo que posiblemente explica que se necesite una mayor concentración para observar el efecto de inhibición contra bacterias Gram negativas (*E. coli*, *S. typhi* y *S. typhimurium*).

En general, los compuestos que mostraron efecto contra las diferentes bacterias presentaron halos de inhibición que van desde 7 mm a 9 mm de diámetro contra las bacterias Gram positivas y negativas, un efecto inferior comparado con el antibiótico de referencia. Sin embargo, el compuesto **91** no mostró inhibición con ninguna de las cepas utilizadas de tipo Gram negativas (**Tablas 11-13**).

En las **Figuras 35-38** se muestran las imágenes de los compuestos que presentaron inhibición contra las bacterias *E. coli*, *S. typhi*, *S. typhimurium* y *S. aureus*, se observan zonas de inhibición en los crecimientos de las cajas Petri, por lo que, los compuestos **90-92** a concentraciones altas tienen potencial para inhibir a *S. aureus* y resultaría de interés si tiene el mismo efecto contra otras bacterias Gram positivas. Es importante notar que para el caso de *S. typhi* no se presentó algún halo de inhibición para el control positivo (antibiótico comercial), lo cual sugiere la adquisición de resistencia a los antibióticos por parte de esta cepa.

Tabla 10. Resultados de pruebas *in vitro* del producto natural (**89**) y los derivados semisintéticos (**90-92**) contra bacterias patógenas.

Compuesto	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
89	✓	X	✓	✓
90	X	✓	✓	✓
91	X	X	X	✓
92	✓	X	X	✓

✓ = Presentó actividad X = No presentó actividad

Tabla 11. Ensayo del compuesto **90** contra las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*.

[C]	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>
100 mg/mL	8	NA	NA	NA
50 mg/mL	7	NA	7	8
30 mg/mL	7	NA	7	9
20 mg/mL	NA	NA	7	7.5
1 mg/mL	NA	NA	NA	NA
DMSO (-)	NA	NA	NA	NA
Estreptomicina (+) (10 µg)	12	7	12	15

*Medición de halos en mm. *NA= No presentó actividad

Tabla 12. Ensayo del compuesto **91** contra las bacterias *E. coli*, *S. typhi*, *S. typhimurium* y *S. aureus*.

[C]	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>
100 mg/mL	NA	NA	NA	8
50 mg/mL	NA	NA	NA	NA
30 mg/mL	NA	NA	NA	NA
20 mg/mL	NA	NA	NA	NA
1 mg/mL	NA	NA	NA	NA
DMSO (-)	NA	NA	NA	NA
Estreptomicina (+) (10 µg)	12	7	12	15

*Medición de halos en mm. *NA= No presentó actividad

Tabla 13. Ensayo del compuesto **92** contra las bacterias *E. coli*, *S. typhi*, *S. typhimurium* y *S. aureus*.

[C]	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>
100 mg/mL	NA	7	NA	8
50 mg/mL	NA	7	NA	7.5
30 mg/mL	NA	NA	NA	NA
20 mg/mL	NA	NA	NA	NA
1 mg/mL	NA	NA	NA	NA
DMSO (-)	NA	NA	NA	NA
Estreptomina (+) (10 µg)	12	NA	12	16

*Medición de halos en mm. *NA= No presentó actividad

Las concentraciones de los compuestos que mostraron inhibición (Tabla II-13) varían significativamente dependiendo de la especie bacteriana. En particular, las bacterias Gram negativas poseen una barrera externa adicional en su estructura celular, una membrana externa que actúa como un obstáculo físico, impidiendo que muchos compuestos lleguen eficazmente al sitio de unión (Mai-Prochnow *et al.*, 2016). Esto podría explicar la ausencia de actividad de los compuestos contra cepas Gram negativas. Esto indica que, más allá del mecanismo de acción, factores intrínsecos en cada bacteria, como morfología, el metabolismo y la presencia de mecanismos de resistencia específicos, juegan un papel crucial en determinar la susceptibilidad de compuestos como posibles antimicrobianos (Mai-Prochnow *et al.*, 2016). Por lo tanto, una comprensión más específica de estas diferencias es esencial para el diseño y la selección de terapias antimicrobianas más efectivas (Sendeku *et al.*, 2015).

Por otra parte, el Docking molecular como herramienta computacional puede ayudar a predecir la unión de los compuestos con la enzima, aunque no siempre garantiza la posible actividad antibacteriana debido a la complejidad de los sistemas bacterianos y su dinámica. Los modelos de Docking molecular consideran una instantánea estática de las interacciones posibles y no pueden simular la dinámica completa de las proteínas y complejos estructurales en el tiempo. Estas limitaciones marcan la diferencia entre las predicciones computacionales y las realidades

experimentales o clínicas. Por ello, es fundamental que los hallazgos obtenidos del Docking molecular se validen con experimentos biológicos o clínicos (Agu *et al.*, 2023).

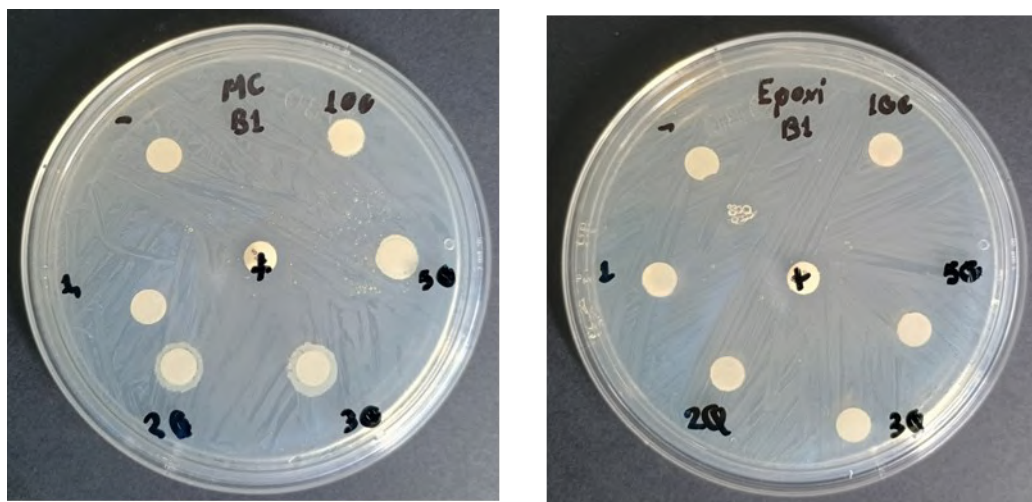


Figura 35. Efecto de inhibición de **89** (izquierda) y **92** (derecha) contra *Salmonella typhi*.

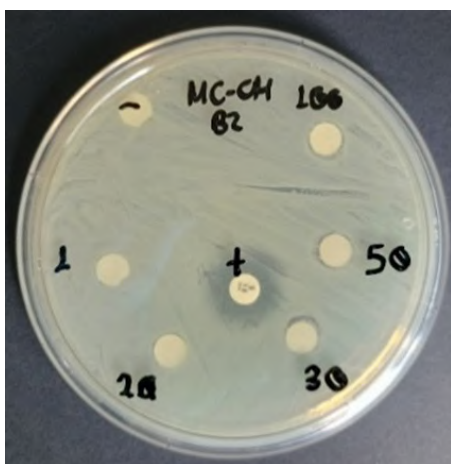


Figura 36. Efecto de inhibición de **90** contra *E. coli*.

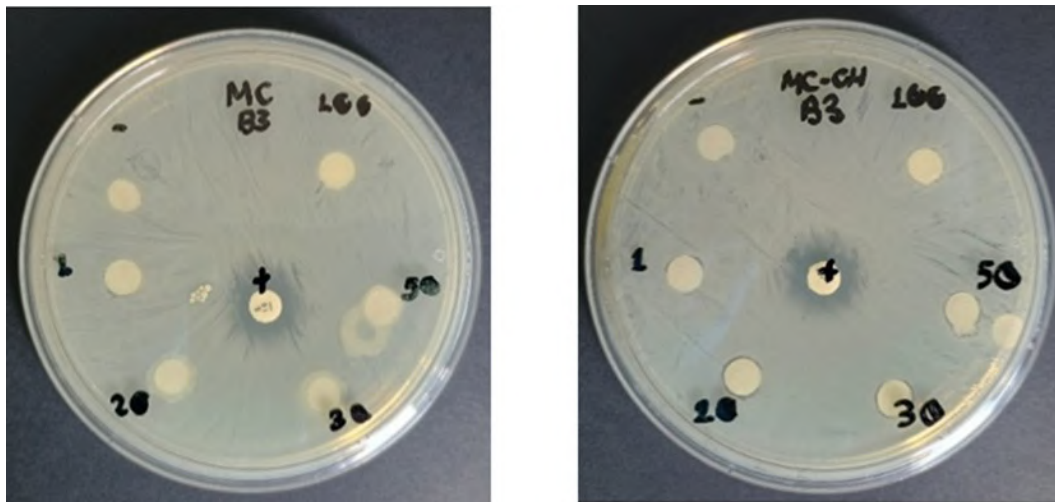


Figura 37. Efecto de inhibición de 89 (izquierda) y 90 (derecha) contra *Salmonella typhimurium*.

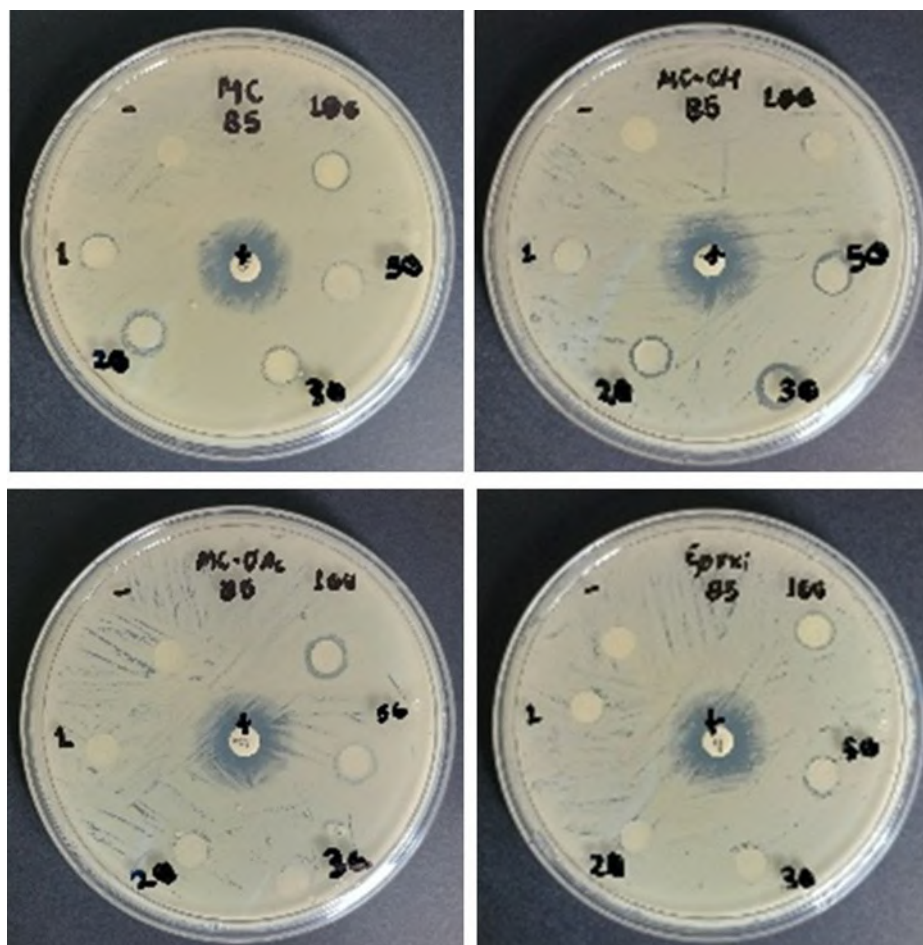


Figura 38. Efecto de inhibición de 89-92 contra *S. aureus*.

7. CONCLUSIONES

- Se sintetizaron y caracterizaron tres derivados (**90-92**) a partir del producto natural **89**, se caracterizaron a través de Resonancia Magnética Nuclear y por difracción de rayos X confirmando la configuración absoluta del compuesto **91**.
- Las propiedades fisicoquímicas, el perfil ADMET y las actividades biológicas de los compuestos derivados, muestran actividad antibacterial moderada y un efecto significativo como agentes antineoplásicos y antifúngicos. Adicionalmente, los posibles blancos bacterianos fueron contra *Mycobacterium*, *Salmonella enteritidis*, *Kocuria rhizophila* y *Clostridium ramosum*.
- El acoplamiento molecular sobre la enzima β -lactamasa del producto natural y su derivado **92** mostraron el modo de unión más eficiente en el sitio activo de la β -lactamasa, respectivamente.
- El producto natural (**89**) y los derivados (**90-92**) presentaron inhibición contra dos bacterias del género *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones.
- La fitoquímica, el uso de estrategias químicas y computacionales representan una alternativa a los métodos convencionales de identificación de fármacos, ya que presentan grandes ventajas, como reducción del tiempo de identificación de compuestos bioactivos, la eficiencia y costos, lo que permite acelerar el proceso al incrementar la posibilidad de desarrollo de una mayor cantidad y variedad de medicamentos en menor tiempo.

8. REFERENCIAS

- Abu, A., Naqvi, T., Mohammad, T., Hasan, G. M., & Hassan, M. I. (2018). Advancements in Docking and Molecular Dynamics Simulations Towards Ligand-receptor Interactions and Structure-function Relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(20), 1755–1768. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181025114157>
- Agu, P. C., Afiukwa, C. A., Orji, O. U., Ezech, E. M., Ofoke, I. H., Ogbu, C. O., Ugwuja, E. I., & Aja, P. M. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>
- Altamirano, F. (2013). *Materia Medica Mexicana - A Manual of Mexican Medicinal Herbs*. Forgotten Books (Obra original publicada en 1904).
- Amidon, G. L., Lennernäs, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3), 413–420. <https://doi.org/10.1023/A:1016212804288>
- Bandoni, A. L. (2011). Evaluación farmacopeica de la calidad de drogas vegetales y productos relacionados. Estado actual en las farmacopeas argentina y brasilera. *Dominguezia*, 27(2), 35–56. <https://ojs.dominguezia.org/index.php/Dominguezia/article/view/128>
- Brasil, D. S. B., Müller, A. H., Guilhon, G. M. S. P., Alves, C. N., Peris, G., Llusar, R., & Moliner, V. (2010). Isolation, X-ray crystal structure and theoretical calculations of the new compound 8-Epicordatin and identification of others terpenes and steroids from the bark and leaves of *Croton palanostigma* Klotzsch. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(4), 731–739. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000400021>
- Butina, D., Segall, M. D., & Frankcombe, K. (2002). Predicting ADMET properties in silico: methods and models. *Drug Discovery Today*, 7(11), S83–S88. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02288-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02288-2)
- Chico, L. K., Behanna, H. A., Hu, W., Zhong, G., Roy, S. M., & Watterson, D. M. (2009). Molecular properties and CYP2D6 substrates: Central nervous system therapeutics case study and pattern analysis of a substrate database. *Drug Metabolism and Disposition*, 37(11), 2204–2211. <https://doi.org/10.1124/dmd.109.028134>
- COMITÉ DE CONSENSO (2002). Segundo Consenso de Granada sobre Problemas Relacionados con Medicamentos. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 43(3–4), 179–187. <https://doi.org/10.30827/ARS>

- Crentsil, J. A., Yamthe, L. R. T., Anibea, B. Z., Broni, E., Kwofie, S. K., Tetteh, J. K. A., & Osei-Safo, D. (2020). Leishmanicidal Potential of Hardwickiic Acid Isolated From *Croton sylvaticus*. *Frontiers in Pharmacology*, *11*, 513332. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00753>
- Darko Butina, M. D. S. and K. F. (2002). Predicting ADMET properties in silico: methods and models. *DDT*, (7). [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02288-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02288-2)
- De Luca, F., Benvenuti, M., Carboni, F., Pozzi, C., Rossolini, G. M., Mangani, S., & Docquier, J. D. (2011). Evolution to carbapenem-hydrolyzing activity in noncarbapenemase class D β -lactamase OXA-10 by rational protein design. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(45), 18424–18429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110530108>
- De Souza, M. V. N., & Vasconcelos, T. R. A. (2006). Recent methodologies mediated by sodium borohydride in the reduction of different classes of compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, *20*(11), 798–810. <https://doi.org/10.1002/AOC.1137>; JOURNAL: JOURNAL:10990739; WGROUP: STRING: PUBLICATION
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. Wiley, A John Wiley and Sons, Ltd., Publication.
- Docquier, J. D., Calderone, V., De Luca, F., Benvenuti, M., Giuliani, F., Bellucci, L., Tafi, A., Nordmann, P., Botta, M., Rossolini, G. M., & Mangani, S. (2009). Crystal Structure of the OXA-48 β -Lactamase Reveals Mechanistic Diversity among Class D Carbapenemases. *Chemistry and Biology*, *16*(5), 540–547. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.04.010>
- Doogue, M. P., & Polasek, T. M. (2013). The ABCD of clinical pharmacokinetics. In *Therapeutic Advances in Drug Safety* (Vol. 4, Number 1, pp. 5–7). <https://doi.org/10.1177/2042098612469335>
- Dunkel, M., Günther, S., Ahmed, J., Wittig, B., & Preissner, R. (2008). SuperPred: drug classification and target prediction. *Nucleic Acids Research*, *36*(suppl_2), W55–W59. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn307>
- Engel, T. (2006). Basic Overview of Chemoinformatics. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *46*(6), 2267–2277. <https://doi.org/10.1021/CI600234Z>
- Escandón-Rivera, S. M., Andrade-Cetto, A., Rosas-Ramírez, D. G., & Arreguín-Espinosa, R. (2022). Phytochemical Screening and Isolation of New Ent-Clerodane Diterpenoids from *Croton guatemalensis* Lotsy. *Plants*, *11*(22). <https://doi.org/10.3390/plants11223159>

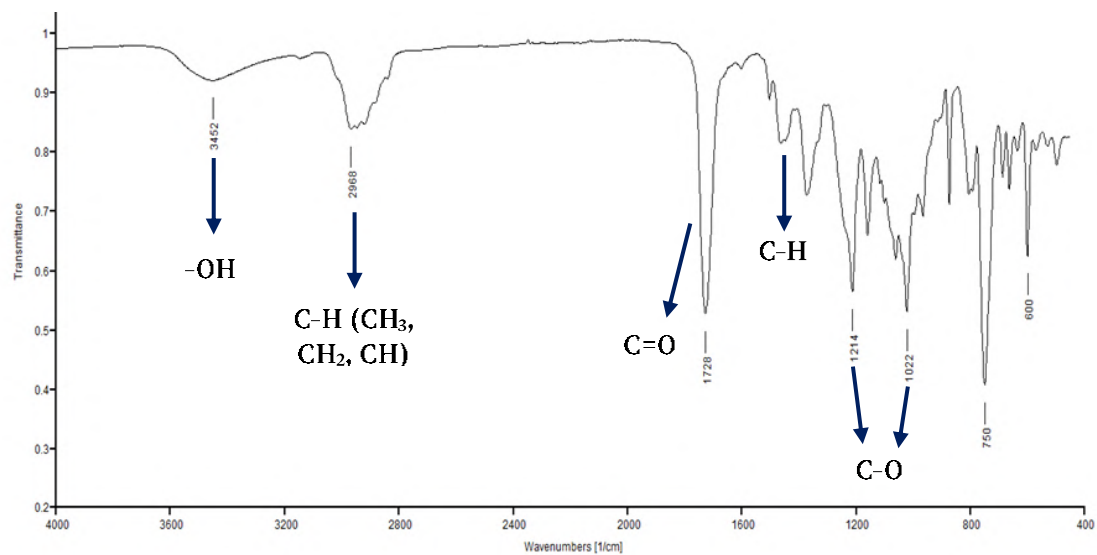
- Espejo Guerrero, J., Fernández- Llimós, F., Machuca González, M., & Faus Dader, M. J. (2002). Problemas relacionados con medicamentos: Definición y propuesta de inclusión en la Clasificación Internacional de Atención Primaria (CIAP) de la WONCA. *Pharmaceutical Care España*, 4(2), 122–127. <https://repositorio.uloysola.es/handle/20.500.12412/5857>
- Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., & Andricopulo, A. D. (2015). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*, 20(7), 13384–13421. <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>
- Gállego Calvo, F. J. (2007). Drogas: Conceptos generales, epidemiología y valoración del consumo. En F. J. Gállego Calvo (Coord.), *Manual de drogodependencias para enfermería* (pp. 11-26). Junta de Andalucía, Consejería para la Igualdad y Bienestar Social.
- Goel, B., & Jain, S. K. (2024). Semisynthesis: Bridging natural products and novel anticancer therapies. In *European Journal of Medicinal Chemistry Reports* (Vol. 12). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2024.100218>
- Harborne, J. B. (1998). *Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis*. Champan & Hall.
- Hernández M., Rafael., & Gally Jordá, Mireya. (1991). *Plantas medicinales: Uso y dosificación de las 184 plantas más usadas en América Latina*. Árbol Editorial.
- Kaderabkova, N., Bharathwaj, M., Furniss, R. C. D., Gonzalez, D., Palmer, T., & Mavridou, D. A. I. (2022). The biogenesis of β -lactamase enzymes. In *Microbiology (United Kingdom)* (Vol. 168, Number 8). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001217>
- Li, F., Zhang, D. B., Li, J. T., He, F. J., Zhu, H. L., Li, N., Xiao, X. C., Ren, L., & Zheng, W. (2021). Bioactive terpenoids from *Croton laui*. *Natural Product Research*, 35(17), 2849–2857. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1675062>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(1–3), 3–25. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(96\)00423-1](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(96)00423-1)
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 46). www.elsevier.com/locate/drugdeliv
- Lv, M., & Xu, H. (2011). Recent Advances in Semisynthesis, Biosynthesis, Biological Activities, Mode of Action, and Structure–Activity Relationship of

- Podophyllotoxins: An Update (2008-2010). *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 11, 901-909.
- Mai-Prochnow, A., Clauson, M., Hong, J., & Murphy, A. B. (2016). Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep38610>
- Majhi, S., & Das, D. (2021). Chemical derivatization of natural products: Semisynthesis and pharmacological aspects- A decade update. *Tetrahedron*, 78, 131801. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2020.131801>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Nicolau, D. P. (2008). Carbapenems: A potent class of antibiotics. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(1), 23-37. <https://doi.org/10.1517/14656566.9.1.23>
- Oscanoa, T. J. (2012). ACCESO Y USABILIDAD DE MEDICAMENTOS: PROPUESTA PARA UNA DEFINICIÓN OPERACIONAL. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 29(1), 119-145.
- Panikov, N. S. (2011). Microbial Growth Dynamics. In *Comprehensive Biotechnology, Second Edition* (Vol. 1). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00032-5>
- Pillai, O., Dhanikula, A. B., & Panchagnula, R. (2001). Drug delivery: an odyssey of 100 years. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(4), 439-446. [https://doi.org/10.1016/S1367-5931\(00\)00226-X](https://doi.org/10.1016/S1367-5931(00)00226-X)
- Pires, D. E. V., Blundell, T. L., & Ascher, D. B. (2015). pkCSM: Predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(9), 4066-4072. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>
- Pudhom, K., & Sommit, D. (2011). Clerodane diterpenoids and a trisubstituted furan from *Croton oblongifolius*. *Phytochemistry Letters*, 4(2), 147-150. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2011.02.004>
- Reyes-Hernández, I., Bravo-Pérez, P. E., Novillo, F., Ramírez-Apan, M. T., Chávez, M. I., Toscano, R. A., Rodríguez-Chávez, J. L., López-Huerta, F. A., Méndez-Cuesta, C. A., Martínez, E. M., Ramos, C. H., & Delgado, G. (2023). Unreported ent-rosane diterpenes from *Croton niveus* Jacq. (Euphorbiaceae). Cytotoxic activity and docking studies. *Fitoterapia*, 169, 105593. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2023.105593>

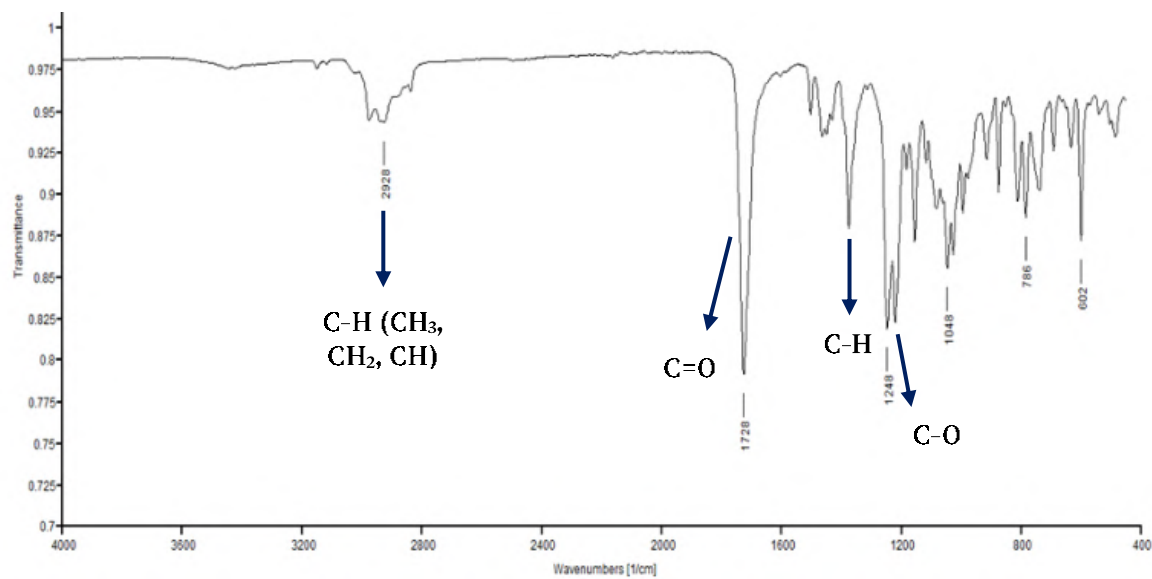
- Sendeku, W., Alefew, B., Mengiste, D., Seifu, K., Girma, S., Wondimu, E., Bekuma, G., Verma, D., & Berhane, N. (2015). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF CROTON MACROSTACHYUS AGAINST SOME SELECTED PATHOGENIC BACTERIA. *Biotechnology International*, 8(1), 11–20. www.bti.org.in
- Shen, L., Pang, S., Zhong, M., Sun, Y., Qayum, A., Liu, Y., Rashid, A., Xu, B., Liang, Q., Ma, H., & Ren, X. (2023). A comprehensive review of ultrasonic assisted extraction (UAE) for bioactive components: Principles, advantages, equipment, and combined technologies. *Ultrasonics Sonochemistry*, 101, 106646. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2023.106646>
- The Lancet. (1884). Pharmacology and Therapeutics. *The Lancet*, 124(3179), 208–209. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)13707-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)13707-X)
- Udrea, A. M., Puia, A., Shaposhnikov, S., & Avram, S. (2018). Computational approaches of new perspectives in the treatment of depression during pregnancy. *Farmacia*, 66(4), 680–687. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2018.4.18>
- Velázquez-Jiménez, R., Hernández-Sosa, A., Martínez-Otero, D., González-Montiel, S., Sánchez-Ortega, I., & González-Ramírez, C. A. (2022). First 6, 7-Seco-Clerodane Furan Diterpenoid from *Croton morifolius*. *Records of Natural Products*, 1, 106–112. <https://doi.org/10.25135/rnp.332.2204-2422>
- Vlad, I. M., Nuta, D. C., Chirita, C., Caproiu, M. T., Draghici, C., Dumitrascu, F., Bleotu, C., Avram, S., Udrea, A. M., Missir, A. V., Marutescu, L. G., & Limban, C. (2020). In Silico and In Vitro Experimental Studies of New Dibenz[b,e]oxepin-11(6H)one O-(arylcabamoyl)-oximes Designed as Potential Antimicrobial Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(2). <https://doi.org/10.3390/molecules25020321>
- Xu, J., & Hagler, A. (2002). Chemoinformatics and Drug Discovery. *Molecules* 2002, Vol. 7, Pages 566–600, 7(8), 566–600. <https://doi.org/10.3390/70800566>
- Yamale, S. C., Koudou, J., Samb, A., Heitz, A., & Teulade, J.-C. (2009). Structural elucidation of a new furoclerodane from stem barks of *Croton mayumbensis* J. Leonard extracts. *International Journal of Physical Sciences*, 4(3), 96–100. <http://www.academicjournals.org/IJPS>
- Yang, H., Lou, C., Sun, L., Li, J., Cai, Y., Wang, Z., Li, W., Liu, G., & Tang, Y. (2019). AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics*, 35(6), 1067–1069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty707>

9. ANEXOS

Anexo I. Espectro de IR de 90.



Anexo II. Espectro de IR de 91.



Anexo III. Espectro de IR de 92.

