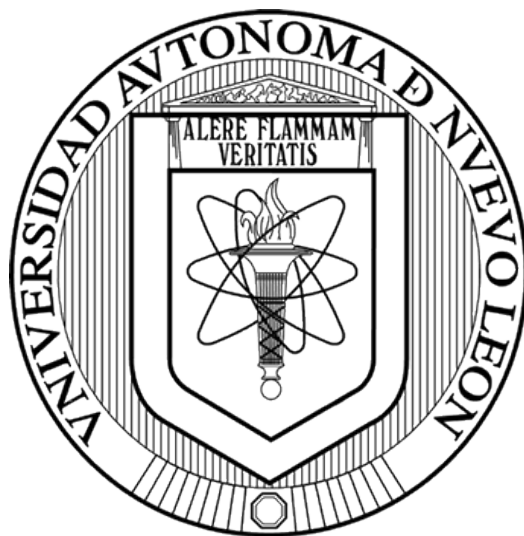


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA *in vitro* DE BASES DE MANNICH FENÓLICAS DERIVADAS
DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAJARÉTICO**

Por

Q.F.B. HÉCTOR ANDRÉS GUEVARA GARZA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN FARMACIA.**

MAYO 2026

**SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro*
DE BASES DE MANNICH FENÓLICAS DERIVADAS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAJARÉTICO**

Aprobación de la Tesis:

Dr. Edgar Abraham García Zepeda
Presidente

Dra. Patricia González Barranco
Secretaria

Dr. Omar González Santiago
Vocal

Dr. Javier Rivera De la Rosa
Subdirector de Estudios de Posgrado

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DE BASES DE MANNICH FENÓLICAS DERIVADAS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAJARÉTICO

Revisión de la Tesis:
Comité Tutorial

Dr. Francisco Guadalupe Ávalos Alanís

Dra. Patricia González Barranco

Dra. Omar González Santiago

Dr. Javier Rivera De la Rosa
Subdirector de Estudios de Posgrado

RESUMEN

Q.F.B. Héctor Andrés Guevara Garza.
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Fecha de Graduación:
Diciembre de 2025

SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DE BASES DE MANNICH FENÓLICAS DERIVADAS DEL ÁCIDO *meso*-DIHIDROGUAIARÉTICO

Número de páginas:

Candidato para el Grado de Maestro en
Ciencias con Orientación en Farmacia

Área de Estudio: Química y Farmacología de Productos Naturales y Sintéticos.

Propósito y Método del Estudio: El propósito del presente estudio fue semisintetizar y evaluar nuevos derivados antibacterianos a partir del ácido *meso*-dihidroguaiarético (*meso*-DGA), un lignano fenólico de origen natural que ha mostrado actividad antibacteriana. Se realizó la obtención de nuevas bases de Mannich fenólicas con el objetivo de identificar compuestos con actividad frente a bacterias Grampositivas y Gramnegativas resistentes a antibióticos.

Para ello, el *meso*-DGA fue aislado y purificado a partir del extracto orgánico de *Larrea tridentata* mediante diversas técnicas cromatográficas y de cristalización. Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis de diez bases de Mannich fenólicas mediante la reacción clásica de Mannich, utilizando diferentes aminas alifáticas y heterocíclicas. La elucidación estructural de los productos obtenidos se realizó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C y espectrometría de masas de alta y baja resolución.

La actividad antibacteriana de los compuestos semisintéticos fue evaluada frente a seis aislados clínicos de bacterias Grampositivas (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina) y Gramnegativas (*Escherichia coli* productora de betalactamasas de amplio espectro, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*) resistentes a antibióticos por medio de un ensayo de microdilución para la determinación de la concentración mínima inhibitoria. Adicionalmente, se realizó un análisis *in silico* de descriptores moleculares a través del software QikProp 4.4 (Schrödinger®) con el fin de correlacionar propiedades fisicoquímicas con la actividad biológica observada. Finalmente, los derivados con actividad antibacteriana relevante fueron sometidos a ensayos de citotoxicidad en la línea celular humana HaCaT, con el propósito de evaluar preliminarmente su perfil de seguridad.

Contribuciones y conclusiones: Se sintetizaron, purificaron y elucidaron estructuralmente 10 nuevos derivados de *meso*-DGA de tipo Mannich permitiendo la incorporación de diferentes aminas alifáticas y heterocíclicas sobre el núcleo lignano natural con rendimientos que oscilaron entre 52 y 90%. Seis análogos mostraron actividad antibacteriana moderada (MIC 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre cepas Gramnegativas y Grampositivas resistentes a antibiótico: (*Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos y *Enterococcus faecium*

resistente a vancomicina) demostrando que las modificaciones mostraron actividad antibacteriana. El análisis *in silico* de descriptores moleculares permitió establecer la influencia de propiedades fisicoquímicas, como la lipofilidad, polaridad e ionización, en la actividad observada. La evaluación de citotoxicidad en la línea celular HaCaT aportó información relevante sobre el perfil de seguridad preliminar de los compuestos activos, contribuyendo a su posible consideración como moléculas líderes para estudios posteriores de optimización.

Dr. Edgar Abraham García Zepeda

Director de Tesis

Dra. María Del Rayo Camacho Corona

Codirectora de Tesis

AGRADECIMIENTOS



**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas
Laboratorio de Química Farmacéutica**

Por proveer la infraestructura, equipos e insumos utilizados en el proyecto de tesis.



**Facultad de medicina UANL,
Laboratorio de infectología**

Por la infraestructura y el material para realizar los ensayos de actividad antibacteriana.



Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación.

Por la beca económica provista durante este proyecto de investigación.



**Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de química**

Por el apoyo para realizar mi estancia de investigación en tema de síntesis de las bases de Mannich fenólicas en el Laboratorio de Síntesis Orgánica 1-2 y la evaluación de citotoxicidad.

El camino de la ciencia se forja a través de dudas e interrogantes. La curiosidad ha sido mi mayor aliada a lo largo de este viaje, en el que camino tras los pasos de quienes me precedieron y en el que, con mi andar, espero también guiar a quienes vendrán después de mí. Para recorrer este camino se requiere coraje, incluso para continuar cuando las dudas se apoderan de la mente.

Quisiera dedicar este trabajo al niño que jamás dejó de hacer preguntas, que encontraba fascinación en la complejidad del infinito, así como en lo improbable y bello que resulta el hecho de existir. A ese niño que llegó a sentirse acomplejado por un sistema que constantemente le hizo creer que no era suficiente. Es en esos momentos de oscuridad cuando aparecen personas que, muchas veces sin saberlo, se convierten en una luz que muestra el camino y ayuda a mantenerse firme. Aunque algunas de ellas solo forman parte de una etapa del viaje, sus palabras y su apoyo permanecen en la mente como escalones que permitieron llegar a donde uno se encuentra ahora.

Por ello, deseo dedicar este espacio para agradecer a todos aquellos que fueron una luz en los senderos más oscuros de este camino, comenzando por mi madre, **Patricia Garza Loera**, una mujer que con su ejemplo me enseñó a superar cada obstáculo. A mi profesora de preparatoria, **Evangelina Tapia Arreaga**, cuya manera de impartir clases forjó mi decisión de ingresar a las ciencias químicas.

A **Sao Leija Flores**, la mejor amistad que me ha regalado la ciencia y la persona que más ha estado presente como una guía y mentor en mi formación como científico. A **Mónica Reynals Muñoz**, por haber creído siempre en mí, por haber sido mi lugar seguro y un hogar durante toda mi carrera.

A la **Dra. Patricia Gonzales Barranco**, por su apoyo a lo largo de la licenciatura y en mi decisión de ingresar al posgrado, y especialmente por la enseñanza de una de las ramas de la química que más me apasiona: la farmacia. Agradezco de manera especial a mi asesor, el **Dr. Edgar Abraham García Zepeda**, a quien admiro profundamente por su conocimiento y por todo lo que me ha transmitido; ha sido un honor trabajar con él en este proyecto. Asimismo, a la **Dra. María del Rayo Camacho Corona**, por todo el apoyo brindado, por escucharme en momentos difíciles y por las valiosas contribuciones realizadas a este trabajo.

A mis compañeros del Instituto de Química de la UNAM: **Carlos Escalante, Denisse Torres, Mario Castañón, Diego Alemán y Fernando Aguayo**, no solo por el conocimiento técnico compartido, sino por su apoyo y compañía durante mi primera experiencia lejos de mi hogar, mi familia y mis amigos. A mis compañeros del Laboratorio de Química Farmacéutica: **Karen Reyes, Gustavo Saucedo, Isabella Betancourt, Regina Mireles, Efrén Saracho, Christian Pérez, Leonardo Núñez y Brayán Yatzael**. Por último, a mis compañeros de Maestría, **Juan Manuel Rodríguez Véliz y Luis Jacob Romero Chávez**, con quienes he compartido esta etapa de formación académica y personal.

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	14
II. ANTECEDENTES.....	15
2.1. Infecciones bacterianas	15
2.2. Epidemiología	16
2.3. Tratamiento farmacológico.....	17
2.3.1. Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana.....	17
2.3.1.1. Biosíntesis de los precursores de la pared celular bacteriana.....	18
2.3.1.2. Transporte de membrana.....	18
2.3.1.3. Polimerización de los disacáridos.....	18
2.3.1.4. Transpeptidación.....	19
2.3.2. Sustancias que alteran la función de membrana.....	19
2.3.3. Inhibidores de la síntesis de proteínas.....	19
2.3.4. Fármacos que interfieren con ácidos nucleicos.....	20
2.3.5. Antimetabolitos.....	21
2.4. Resistencia bacteriana.....	21
2.4.1 La resistencia a los antibióticos.....	21
2.5. Mecanismos de resistencia bacteriana.....	23
2.5.1. Mecanismo de resistencia en Grampositivas.....	23
2.5.2. Mecanismo de resistencia en Gramnegativas.....	24
2.6. Estrategias para combatir la resistencia bacteriana.....	25
2.7. Lignanós como nuevo grupo antibiótico.....	26
2.7.1. Lignanós fenólicos con potencial antibacterial.....	27
2.7.1.1. Potencial antimicrobiano del ácido <i>meso</i> -dihidroguaiarético.....	27
2.7.1.2. Potencial antibacterial del ácido nordihidroguaiarético.....	28
2.8 Bases de Mannich fenólicas antibacterianas.....	29
2.8.1. Generalidades.....	29
2.8.2. Derivados de la apigenina.....	31
2.8.3. Derivados de bencilimidazoliltetrahidroprotoberberinas.....	32
2.8.4. Actividad antibacterial de <i>orto</i> -aminometilfenoles con grupo indolina.....	33
2.9. Estrategias para desarrollar bases de Mannich fenólicas.....	34
2.9.1. La reacción clásica de Mannich.....	35

2.9.2. La reacción de Betti.	36
2.9.3. Formación de sales de amonio cuaternario fenólicas.....	37
2.9.4. Aminometilación de fenoles catalizada por rutenio.	38
2.9.5. Aminometilación de fenoles a partir de <i>N</i> -óxidos catalizada por vanadio.	39
2.9.6. Aminometilación de fenoles con trifluoroboratos de alquilaminas	40
2.9.7. Aminometilación catalizada por cobre.....	41
2.9.8. Acoplamiento deshidrogenativo cruzado.	42
III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	44
3.1. Aportación científica.....	44
3.2. Hipótesis.	44
3.3. Objetivo general.	44
3.4. Objetivos específicos.	44
IV. PARTE EXPERIMENTAL	45
4.1. Materiales y métodos.....	45
4.1.1. Aislamiento y purificación por técnicas cromatográficas.	45
4.1.2. Síntesis de bases de Mannich fenólicas.	45
4.1.3. Elucidación estructural de los productos naturales y sus derivados semisintéticos.	46
4.2. Aislamiento y purificación del ácido <i>meso</i> -dihidroguaiarético.	46
4.3. Procedimiento para la obtención de bases de Mannich fenólicas.	47
4.3.1. Datos espectroscópicos de bases de Mannich fenólicas	47
4.4. Obtención de los descriptores moleculares de los derivados de <i>meso</i> -DGA <i>in silico</i>	52
4.5. Ensayos biológicos.....	53
4.5.1. Determinación de la actividad antibacteriana.	53
4.6. Disposición de residuos	56
V. Resultados y discusiones	57
5.1 Obtención del ácido <i>meso</i> -dihidroguaiarético	57
5.1.1 Elucidación estructural del ácido <i>meso</i> -dihidroguaiarético.....	57
5.2. Síntesis de bases de Mannich fenólicas.	58
5.2.1. Elucidación estructural de bases de Mannich fenólicas.....	60
5.2.1.1. Elucidación estructural de MWAJ1.....	60
5.2.1.2. Elucidación estructural de MWAJ3.....	61

5.2.1.3. Elucidación estructural de MWAJ18 en sus formas neutra y forma de sal de amonio.....	62
5.2.1.4. Elucidación estructural de MWAJ20.....	64
5.2.1.5. Elucidación estructural de MWAJ22.....	65
5.2.1.6. Elucidación estructural de MWAJ24.....	66
5.2.1.7. Elucidación estructural de MWAJ25.....	67
5.2.1.8. Elucidación estructural de MWAJ26.....	68
5.2.1.9. Elucidación estructural de MWAJ27.....	69
5.2.1.10. Elucidación estructural de MWAJ28.	70
5.3 Análisis <i>in silico</i>	71
5.4. Actividad antibacteriana de los derivados de <i>meso</i> -DGA	73
5.5. Citotoxicidad.....	78
VI. Conclusiones.....	80
VII. Referencias	81
VIII. Anexos	88

Lista de figuras

Figura 1. Muertes causadas por resistencia a los antimicrobianos y correlación con los patrones de resistencia entre algunos medicamentos.	16
Figura 2. Moléculas resultantes de la investigación de nuevas estrategias para combatir la resistencia bacteriana.	26
Figura 3. Lignanos naturales y semisintéticos con actividad antibacteriana.	27
Figura 4. Compuestos fenólicos <i>orto</i> -aminometilados con actividad antibacterial.	30
Figura 5. Estructura cristalográfica por difracción de rayos X del compuesto 20 en complejo con la fracción de 24 kDa de la ADN girasa.	31
Figura 6. Mecanismo de la reacción de Mannich a través del intermediario iminio.	35
Figura 7. Estructura molecular de la base de Betti.	36
Figura 8. Esquema de síntesis de la reacción de Betti.	36
Figura 9. Propuesta del mecanismo de reacción para la formación de sales de amonio cuaternario fenólicas.	37
Figura 10. Esquema de reacción de la aminometilación de fenoles catalizada por rutenio.	38
Figura 11. Propuesta del mecanismo de reacción de la aminometilación de fenoles catalizada por rutenio.	38
Figura 12. Esquema de reacción catalizada por vanadio.	39
Figura 13. Esquema de reacción de fenoles con trifluoroborato de alquilaminas.	40
Figura 14. Esquema de reacción catalizada por cobre.	41
Figura 15. Propuesta del mecanismo de reacción de acoplamiento deshidrogenativo catalizado por cobre.	41
Figura 16. Propuesta del mecanismo de reacción de acoplamiento deshidrogenativo y acoplamiento de activación de carbono.	42
Figura 17. Reacción general para la obtención de los derivados del <i>meso</i> -DGA.	44
Figura 18. RMN ¹ H de ácido meso-dihidroguaiarético (CDCl ₃ , 400 MHz).	58
Figura 19. RMN ¹ H de MWAJ1 (CDCl ₃ , 400 MHz).	61
Figura 20. RMN ¹ H de MWAJ3 (CDCl ₃ , 400 MHz).	62
Figura 21. RMN ¹ H de MWAJ18n (CD ₃ OD, 400 MHz).	63
Figura 22. RMN ¹ H de MWAJ18s (CD ₃ OD, 400 MHz).	64
Figura 23. RMN ¹ H de MWAJ20 (CDCl ₃ , 400 MHz).	65
Figura 24. RMN ¹ H de MWAJ22 (CDCl ₃ , 400 MHz).	66
Figura 25. RMN ¹ H de MWAJ24 (CD ₃ OD, 700 MHz).	67
Figura 26. RMN ¹ H de MWAJ25 (CDCl ₃ , 400 MHz).	68
Figura 27. RMN ¹ H de MWAJ26 (CDCl ₃ , 400 MHz).	69
Figura 28. RMN ¹ H de MWAJ27 (CDCl ₃ , 400 MHz).	70
Figura 29. RMN ¹ H de MWAJ28 (CDCl ₃ , 400 MHz).	71
Figura 30. Descriptores moleculares de <i>meso</i> -DGA y derivados.	71
Figura 31. Compuestos con actividad contra <i>A. baumannii</i> resistente a carbapenémicos.	75
Figura 32. Compuestos que tuvieron actividad contra <i>E. faecium</i> resistente a vancomicina.	76
Figura 33. Compuestos que tuvieron actividad contra <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos.	77

Lista de tablas

Tabla 1. Derivados de la apigenina con actividad antibacterial.	32
Tabla 2. Actividad antibacterial de un derivado de las bencilimidazoliltetrahidroprotoberberinas.	33
Tabla 3. Actividad antibacterial de un <i>orto</i> -aminometilfenol con un grupo indolina.	34
Tabla 4. Bacterias resistentes a diferentes fármacos.	51
Tabla 5. Disposición de residuos de acuerdo con el reglamento de la Facultad de Ciencias Químicas.	56
Tabla 6. Rendimientos y características físicas de los derivados de <i>meso</i> -DGA.	59
Tabla 7. Actividad antibacteriana de los derivados del <i>meso</i> -DGA.	70
Tabla 8. Citotoxicidad, actividad antibacteriana e índice de selectividad de derivados de <i>meso</i> -DGA.	78

Nomenclatura

Meso-DGA Ácido *meso*-dihidroguaiarético

RAM Resistencia a los antimicrobianos

OMS Organización Mundial de la Salud

CDC Centros para el Control y Prevención de Enfermedades

MDR Multifarmacoresistente

UDP Uridindifosfato

ARN Ácido ribonucleico

ADN Ácido desoxirribonucleico

SARM *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

EFRV *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina

BLEE Betalactamasas de espectro extendido

MNEC Concentración máxima sin efecto

ColS Colaboradores

SiO₂ Gel de sílice

Hex Hexano

AcOEt Acetato de etilo

DCM Diclorometano

MetOH Metanol

CDCl₃ Cloroformo deuterado

CD₃OD Metanol deuterado

RMN Resonancia magnética nuclear

TMS tetrametilsilano

δ Desplazamiento químico

ppm partes por millón

s singulete

d doblete

t triplete

c cuarteto

m multiplete

s_a singulete ancho

dd doble de dobletes

st pseudotriplete

SASA superficie accesible al solvente

PSA Área polar superficial

LogP coeficiente de partición

LogS Solubilidad

QPPCaco Permeabilidad celular en células Caco

QBlogBB Permeabilidad en barrera hematoencefálica

UFC unidades formadoras de colonia

IC50 Concentración de inhibición media

CMI Concentración mínima inhibitoria

IS índice de selectividad

DMSO Dimetilsulfóxido

MH Mueller-Hilton

Å Ångstrom

µL Microlitro

mg miligramos

Hz Hertz

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas se encuentran entre las principales causas de muerte a nivel mundial, provocadas por microorganismos con la capacidad de invadir y multiplicarse dentro del cuerpo. A lo largo de la historia se han buscado métodos para combatir las infecciones y el paso más grande de la humanidad fue el descubrimiento de la penicilina, una sustancia capaz de inhibir el crecimiento bacteriano, dando origen a los antibióticos. Con el tiempo se observó que las bacterias eran menos susceptibles a la acción de los antibióticos, lo que resultó en un serio problema de salud pública a nivel mundial [1]. La resistencia bacteriana se intentó combatir con el desarrollo de nuevos antibióticos mediante las modificaciones estructurales sobre la base farmacofórica o núcleo estructural base de las moléculas antimicrobianas. Sin embargo, la similitud estructural de los nuevos antibióticos con los conocidos brindaba ventajas a las bacterias para adaptarse y desarrollar resistencia. Por ello, las investigaciones están dirigidas al desarrollo de nuevos agentes antibacterianos que posean diferentes núcleos estructurales o farmacofóricos, distintas dianas biomoleculares y nuevos mecanismos de acción, aunado a nuevos compuestos que inhiban las rutas involucradas en la formación de bacterias persistentes o biopelículas [2].

Los lignanos han surgido como compuestos prometedores para la creación de nuevos antibióticos. Por ejemplo, pycnanthuligneno A, pycnanthuligneno C y (+)-lioniresinol-3 α -O- β -D-glucopiranosido han demostrado una notable actividad antimicrobiana contra varios aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (SARM) y *Escherichia coli* (*E. coli*) resistentes a antibióticos [3, 4]. Del mismo modo, ácido meso-dihidroguaiarético (*meso*-DGA), 3'-desmetoxi-6-O-desmetilisoguaiacina y algunos de sus derivados semisintéticos han exhibido una actividad antibacteriana potente contra varias cepas y aislados clínicos de SARM y *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) resistentes a antibióticos [5, 6]. Las bases de Mannich fenólicas son candidatos atractivos para desarrollar nuevos agentes antimicrobianos porque la incorporación de un grupo amina en un fenol bioactivo modifica de manera favorable sus propiedades fisicoquímicas. Además, estudios recientes han demostrado que agregar un nitrógeno ionizable puede transformar compuestos originalmente activos solo contra bacterias Grampositivas en moléculas capaces de entrar y acumularse en bacterias Gramnegativas, ampliando su espectro. Un ejemplo destacado es la conversión de DP-63, activo únicamente contra Grampositivos, en DP-326, que tras la adición de una amina primaria logra actividad mejorada contra Gramnegativos sin perder completamente su

potencia original, por lo que la adición estratégica de un nitrógeno puede ser decisiva para obtener actividad de amplio espectro [7,8].

En este proyecto de investigación, se realizó la semisíntesis de nuevos lignanos que contienen fragmentos estructurales de tipo *orto*-aminometilfenol y su posterior evaluación frente a aislados clínicos de bacterias Grampositivas y Gramnegativas resistentes a antibióticos, con el objetivo de contribuir al desarrollo de nuevos fármacos que aborden la creciente amenaza de las infecciones bacterianas resistentes a las terapias convencionales.

II. ANTECEDENTES

2.1. Infecciones bacterianas

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se define como la ineficacia de los medicamentos dedicados a tratar infecciones en humanos, animales y plantas, como consecuencia del cambio evolutivo de virus, parásitos, hongos y bacterias, que incrementan la propagación de enfermedades y el riesgo de muerte [9]. En la actualidad la resistencia bacteriana a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud mundial y se genera por la mutación de las bacterias en respuesta al uso de estos fármacos [10].

La resistencia a los antibióticos, manifestada por las bacterias resistentes a múltiples fármacos (MDR), constituye un desafío global de considerable envergadura. Esta resistencia, que implica la capacidad de las bacterias para enfrentar tres o más clases de antibióticos, ha generado una preocupación creciente. En respuesta a esta crisis, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en febrero de 2017 una lista de patógenos que requieren con urgencia el desarrollo de nuevos antibióticos. Esta lista, crucial para la salud pública, identifica las doce familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. [10, 11].

Dentro de esta lista encontramos a las bacterias ESKAPE que es un acrónimo que agrupa a un conjunto de bacterias patógenas, entre las que se incluyen *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y especies del género *Enterobacter* (*Enterobacter* spp), acuñado por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América

(IDSA) para referenciar al grupo de patógenos nosocomiales que se caracterizan por sus mecanismos de resistencia a los medicamentos [12].

2.2. Epidemiología

La resistencia a los antimicrobianos representa una amenaza global para la salud, siendo directamente responsable de la muerte de al menos 1.27 millones de personas y asociada a casi 5 millones de fallecimientos a nivel mundial, de acuerdo con un estudio en The Lancet publicado en el 2019 [13].

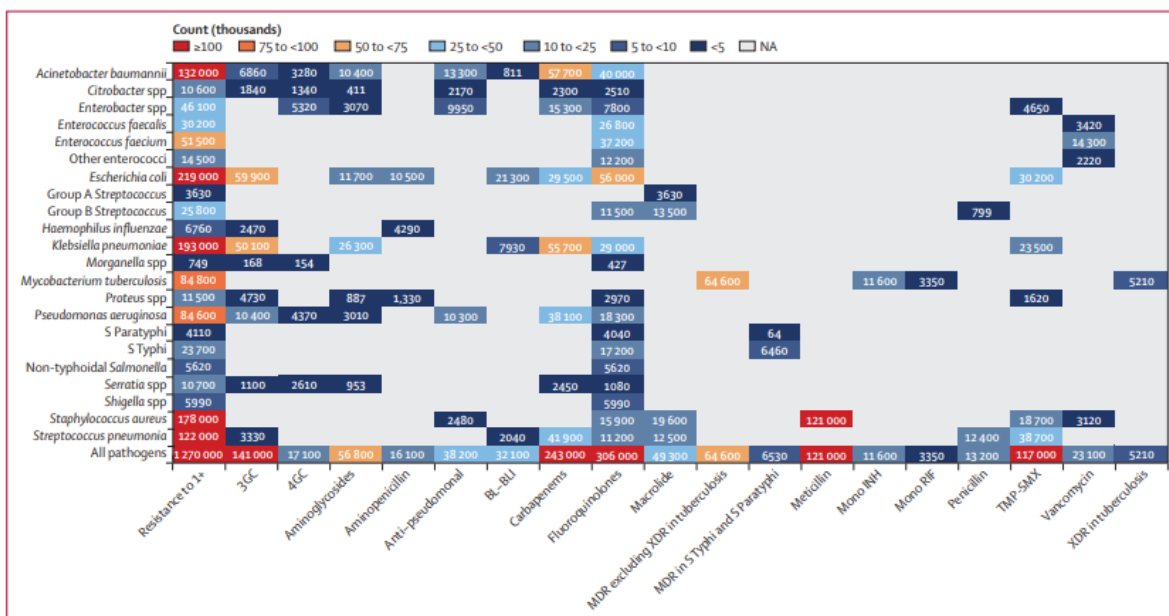


Figura 1. Muertes causadas por resistencia a los antimicrobianos y correlación con los patrones de resistencia entre algunos medicamentos. 3GC: Cefalosporinas de tercera generación. 4GC: Cefalosporinas de cuarta generación. Antipseudomonal: Penicilinas antipseudomonas o inhibidores de las betalactamasas. BL-BLI: β -lactámicos o inhibidores de β -lactamasas. MDR: Multifármaco resistencia. Mono INH: Monoresistencia a isoniacida. Mono RIF: Monoresistencia a rifampicina. N/A: Not applicable. TMP-SMX: Trimetoprim-sulfametoxazol. XDR: Farmacorresistencia extendida. Tomada de [13].

Solo en Estados Unidos, se registran anualmente más de 2.8 millones de infecciones por agentes resistentes, resultando en más de 35,000 muertes, según el Informe sobre Amenazas de Resistencia a los Antibióticos de 2019 de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) [14].

Un estudio realizado en 2019 reveló que las infecciones hospitalarias en México son predominantemente causadas por bacterias del grupo ESKAPE, conocidas por su alta resistencia a

los antibióticos comúnmente utilizados. Entre estas bacterias se encuentran *Klebsiella* spp., resistentes a múltiples fármacos (MDR) y productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE), *Enterobacter* spp. BLEE, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* MDR, SARM y *E. faecium* resistente a la vancomicina. Basándose en los patrones de resistencia identificados, el estudio además sugiere protocolos de tratamiento para infecciones por *Helicobacter pylori*, una bacteria vinculada al desarrollo de cáncer con una prevalencia estimada entre el 60 y el 70 % en la población adulta de Latinoamérica [15].

En 2022, la tuberculosis se mantuvo como una de las principales causas de muerte a nivel mundial, con 1.3 millones de fallecimientos. Además, se reportaron 10.6 millones de nuevos casos en todo el mundo, afectando a personas de todas las edades. Aunque esta enfermedad es tratable y evitable, la farmacoresistencia, derivada del uso inapropiado de medicamentos antituberculosos, representa un desafío significativo. La disponibilidad limitada de opciones de tratamiento ha convertido este problema en una preocupación de salud pública. Se estima que se destinan hasta 13,000 millones de dólares anuales para actividades de prevención, diagnóstico y tratamiento relacionadas con la tuberculosis [16].

2.3. Tratamiento farmacológico.

Los antibióticos son fármacos que suprimen el crecimiento de los microorganismos, los cuales se dividen en bacteriostáticos y bactericidas. Se clasifican en función de su estructura y su mecanismo de acción. Se obtienen de manera natural de otros organismos o de manera sintética [17, 18].

2.3.1. Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana.

La pared celular bacteriana se compone de peptidoglicano que se caracteriza por la unión de subunidades de ácido *N*-acetilmurámico (NAM) y la *N*-acetilglucosamina (NAG). Tiene la función de proporcionar estabilidad mecánica y rigidez a la bacteria, así como protegerla del medio extracelular, por ello, los fármacos que actúan inhibiendo la pared celular van a tener un efecto bactericida [17, 18].

La biosíntesis de la pared celular se lleva al cabo en cuatro fases: Síntesis de los precursores, transporte, polimerización y transpeptidación. Por lo que cada etapa nos ofrece diferentes dianas para los antibióticos [17,18].

2.3.1.1. Biosíntesis de los precursores de la pared celular bacteriana.

El primer paso es la síntesis de UDP-*N*-acetilglucosamina (UDP-NAG) y UDP-*N*-acetilmurámico (UDP-NAM). Comienza con la síntesis de uridindifosfato (UDP) que reacciona con *N*-acetilglucosamina-1-fosfato para producir UDP-NAG. El UDP-NAM se genera al agregar *L*-alanina al UDP-NAG por acción de la enzima MurA. Esta enzima es una enolpiruvil transferasa que es inhibida por la fosfomicina [17, 18].

Ahora se formará un pentapéptido adicionando distintos aminoácidos que varían entre las diferentes especies bacterianas, sin embargo, en todos los casos se utiliza dos unidades de *D*-alanina producto de la enzima alanina racemasa y *L*-alanina como sustrato. La cicloserina es un fármaco análogo estructural de la alanina, que tiene el potencial de inhibir a la enzima racemasa [17, 18].

2.3.1.2. Transporte de membrana.

Después de obtener el UDP-NAM-pentapéptido, debido a su naturaleza hidrofílica, se necesita un transportador de membrana para atravesar el medio hidrofóbico. Para lograr esto, se une al transportador undecaprenil-fosfato (lípidio-P, Lip-P) mediante un pirofosfato, seguido de una reacción de transglucosidación con NAG. Esto produce un disacárido mediante un enlace glucosídico β -(1,4) resultando en la formación del complejo Lip-PP-NAM/pentapéptido-NAG, el cual será llevado fuera de la célula para continuar con la biosíntesis de peptidoglicano. La bacitracina puede interferir con la entrada del transportador Lip-PP, y más adelante se explicará este mecanismo [17, 18].

2.3.1.3. Polimerización de los disacáridos.

Una vez atravesada la membrana ocurre una segunda reacción de transglucosidación entre el disacárido unido a su transportador Lip-PP y el extremo reductor terminal de una cadena ya existente liberando al Lip-PP. La reacción es llevada a cabo por una transglucosidasa. La vancomicina y los antibióticos glicopeptídicos actúan inhibiendo esta enzima mediante la unión a las unidades terminales *D*-alanina-*D*-alanina de nuestro precursor [17 - 19].

Una vez libre el Lip-PP es necesario una desfosforilación enzimática del pirofosfato del transportador para su regeneración y por lo tanto de la síntesis cíclica de la pared celular bacteriana. La bacitracina actúa formando un complejo con iones metálicos y la Lip-PP evitando que ocurra la reacción de desfosforilación, impidiendo la biosíntesis de la pared celular y ocasionando la muerte bacteriana [17 - 19].

2.3.1.4. Transpeptidación.

Como resultado tendremos un polímero lineal con su pentapéptido que participará en la reacción de transpeptidación donde las enzimas PBP (proteína de unión a penicilina) actúan uniendo el grupo carbonilo (amida) del aminoácido número 4 (*D*-ala) con grupo R-NH₂ libre del aminoácido número 3 de una cadena de peptidoglicano ya existente, terminando así con el proceso de biosíntesis de la pared celular bacteriana. Este último paso es bloqueado por los betalactámicos que inhiben a las PBP evitando la transpeptidación. [17, 18]

2.3.2. Sustancias que alteran la función de membrana.

Las polimixinas son un grupo de antimicrobianos que ejercen su efecto mediante la interacción con los fosfolípidos de la membrana celular bacteriana y debido a su naturaleza química, estos componentes se comportan como detergentes catiónicos que alteran la membrana y comprometen su integración [18, 20].

2.3.3. Inhibidores de la síntesis de proteínas.

La síntesis de proteínas es un proceso esencial para el correcto funcionamiento de la célula, por lo que su inhibición por antimicrobianos nos ofrece una acción bacteriostática que inhibe el crecimiento bacteriano. El efecto se logra gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. Las bacterias contienen ribosomas que se dividen en subunidades (30S y 50S) que se conforman por ácido ribonucleico (ARN) ribosómico y diversas proteínas llamadas S (pequeñas) en la subunidad 30S y L (grandes) en la subunidad 50S [18, 20].

Para la realización de la síntesis proteica se requiere una cadena ARN mensajero (ARNm) seguido de 3 fases: iniciación, elongación y terminación [18, 20].

Para la fase de iniciación primero debe concretarse una unión entre la subunidad pequeña del ribosoma con el ARN de transferencia (ARNt) y el factor IF-3, este complejo reconoce el codón de inicio de traducción o codón AUG (Adenina-uracilo-guanina) del ARNm. En adición, la subunidad grande del ribosoma se une al complejo iniciador para que después el aminoácido formilmetionina (fMet) complete la unión al codón de inicio AUG en el sitio peptídico del ribosoma. Las oxazolidinonas actúan uniéndose al sitio P de la subunidad ribosómica 50S impidiendo la formación del complejo iniciador ribosoma-fMet-ARNt [18, 20].

En la fase de elongación se lleva a cabo la unión del ARNt con su aminoácido correspondiente, se une al codón siguiente en el sitio aceptor (A) del ribosoma y a continuación se forma un enlace peptídico con el aminoácido en el sitio P a través de una transpeptidación catalizada por una enzima peptidiltransferasa. Este proceso se repite extendiendo la cadena hasta su terminación. Los grupos de antibióticos que actúan en esta fase son las tetraciclinas que se unen de forma reversible a la subunidad 30S del ribosoma evitando la entrada del aminoacil-ARNt al sitio A del complejo. Por otra parte, los anfenicoles se unen a la subunidad 50S en el sitio donde se lleva a cabo la transpeptidación inhibiendo este proceso. Muy cerca de este sitio de unión actúan también los macrólidos que impiden el desplazamiento de los ribosomas a lo largo del ARNm interrumpiendo la síntesis y bloqueando la formación de cadenas polipeptídicas. Del mismo modo actúan las lincosaminas y las estreptograminas y aunque los grupos no están relacionados estructuralmente, actúan en lugares muy cercanos [18, 20].

Al llegar a la fase de terminación, es esencial reconocer un codón de terminación en el sitio A del ribosoma. Estos codones de terminación no tienen un ARNt correspondiente; en su lugar, ingresan factores de liberación que rompen el enlace entre el polipéptido y el último ARNt presente. La etapa final implica la disociación del ribosoma en sus subunidades individuales para liberar la cadena polipeptídica completa. [18, 20].

Los aminoglucósidos tienen diferentes mecanismos en la síntesis de proteínas que dependen de la etapa en la que se encuentre este proceso, por ejemplo, en la fase de iniciación se unen reversiblemente a la subunidad 30S impidiendo el inicio de la síntesis de proteínas. En la fase de elongación, la unión de estas moléculas con la subunidad pequeña provoca una lectura errónea del ARNm y posteriormente la terminación prematura de la traducción, obteniéndose una proteína parcial no funcional. Por último, pueden actuar incorporando aminoácidos incorrectos resultando en una producción de proteínas anormales o no funcionales [18, 20].

2.3.4. Fármacos que interfieren con ácidos nucleicos.

El ARNm utilizado para la síntesis de proteínas es proveniente del genoma de la bacteria a partir de un molde de ácido desoxirribonucleico (ADN) y para su obtención es necesario un desdoblamiento temporal de la doble hélice, seguido de la síntesis del ARNm por medio de la enzima ARN

polimerasa. Las rifamicinas actúan mediante la unión de la subunidad beta de la ARN polimerasa para formar un complejo fármaco-enzima que inhibe la síntesis de ARN [18, 20].

Otro grupo de fármacos son las fluoroquinolonas cuya acción se ejerce mediante el bloqueo de las enzimas topoisomerasa II, también llamada ADN-girasa, y topoisomerasa IV que se encarga del superenrollamiento y desenrollamiento del ADN, así como el corte, unión y separación de hebras [18, 20].

2.3.5. Antimetabolitos.

Las sulfamidas son estructuralmente similares al ácido *para*-aminobenzoico, un precursor para la biosíntesis del ácido fólico, por lo tanto, pueden actuar como inhibidores competitivos de la dihidropteroato sintetasa. De este modo la bacteria no puede terminar la síntesis de ácido fólico quedando sin precursor para la biosíntesis de purinas y pirimidinas [18, 20].

2.4. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana se debe a mutaciones genéticas entre cepas debido a la exposición con el antibiótico. Principalmente se creía que la resistencia era resultado de selección natural donde las bacterias pasarían los genes de resistencia a futuras generaciones. No fue hasta finales de la década de 1950 cuando un grupo de investigadores japoneses notificaron que también podría adquirirse de una bacteria a otra, este proceso se conoce como transferencia horizontal de genes [21].

2.4.1 La resistencia a los antibióticos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha desempeñado un papel crucial al identificar y abordar las amenazas más urgentes para la eficacia de los tratamientos antimicrobianos. Una de las herramientas clave en este esfuerzo es la "Lista de Patógenos Prioritarios Resistentes a los Antibióticos", una compilación de las bacterias que representan un riesgo significativo para la salud pública debido a su capacidad de resistir múltiples clases de antibióticos

La lista de la OMS se organiza en tres niveles según la urgencia de la necesidad de nuevos antibióticos: crítica, alta y media. En la categoría de prioridad crítica se encuentran las bacterias multirresistentes, las cuales representan un riesgo particularmente alto en entornos hospitalarios, residencias de ancianos y entre pacientes que requieren dispositivos médicos como ventiladores y catéteres intravenosos. Por otro lado, los niveles segundo y tercero de la lista, categorizados como

alta y media prioridad respectivamente, incluyen otras bacterias que están desarrollando resistencia a los fármacos y causan enfermedades comunes [22].

Lista OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos

Prioridad 1: Crítica

- *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos
- *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenémicos
- *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenémicos

Prioridad 2: Elevada

- *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina
- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina o vancomicina
- *Helicobacter pylori* resistente a claritromicina
- *Campylobacter* spp. resistente a fluoroquinolonas
- *Salmonellae* resistentes a fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae* resistente a cefalosporinas de tercera generación

Prioridad 3: Media

- *Streptococcus pneumoniae* sin sensibilidad a penicilina
- *Haemophilus influenzae* resistente a ampicilina
- *Shigella* spp., resistente a fluoroquinolonas.

Prioridad Adicional

- *Mycobacterium tuberculosis* resistente a isoniazida o rifampicina o ambos

2.5. Mecanismos de resistencia bacteriana.

Existen tres mecanismos de transferencia horizontal genética:

Conjugación: Intercambio directo de material genético entre células adyacentes a través de un puente de conjugación temporal conformado por estructuras llamadas “pili” [23].

Transformación: en este proceso la bacteria incorpora ADN exógeno del medio que se obtiene de la muerte de otra bacteria [23].

Transducción: transferencia de material genético por medio de virus bacteriófagos [23].

Los genes de resistencia pueden expresarse en diferentes maneras para reducir la eficacia del antibiótico, los mecanismos más destacables son:

Bloqueo de entrada de antibióticos: Modificación de proteínas de entrada para reducir o bloquear la entrada de sustancias.

Modificación enzimática del antibiótico: Tiene lugar cuando las bacterias desarrollan enzimas capaces de cambiar o destruir el antibiótico.

Expulsión del antibiótico : Las bacterias pueden desarrollar bombas de eflujo para expeler el antibiótico que ingrese dentro de ellas.

Modificación del sitio de unión: Alteración en el sitio diana del fármaco para evitar la unión y por ende no cumpla con su función.

Producción de vías alternas: Consiste en buscar síntesis o procesos celulares alternos que no son afectados por el antibiótico [24].

2.5.1. Mecanismo de resistencia en Grampositivas.

El género *Staphylococcus* forma parte de los microorganismos Grampositivos de mayor trascendencia clínica, por lo que la detección de sus mecanismos de resistencia tanto a nivel fenotípico como genotípico puede resultar relevante tanto a nivel clínico como epidemiológico. Son capaces de producir betalactamasas de Clase A de Ambler que hidrolizan las penicilinas, aunque no son muy efectivas con las penicilinas semisintéticas, son sensibles a inhibidores de betalactamasas como el ácido clavulánico, tazobactam y sulbactam. Existe una preocupación clínica significativa con la especie SARM, esto implica resistencia a todos los betalactámicos incluyendo combinaciones de

penicilinas con su inhibidor de betalactamasas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. Este fenómeno se debe a la expresión del gen *mecA* que codifica la proteína fijadora de penicilina PBP2A [25].

Otras cepas relevantes de *S. aureus* son las que presentan sensibilidad disminuida a los glucopéptidos. Actualmente se define como VISA (*S. aureus* resistente a vancomicina) cuando presenta una resistencia parcial a la vancomicina y GISA (*S. aureus* de resistencia intermedia a glucopéptidos) cuando presentan sensibilidad disminuida a la teicoplanina. Las cepas que poseen este fenotipo expresan un engrosamiento de pared bacteriana que desemboca en un secuestro del glucopéptido antes de poder llegar a su sitio diana [25].

El género *Enterococcus* puede presentar resistencia intrínseca y resistencia adquirida a diferentes grupos de antibióticos, el tipo de resistencia depende de la especie, en el caso de *E. faecium* se destacan las cepas resistentes a la vancomicina como de alto riesgo, se han descrito seis fenotipos diferentes (Van A, Van B, Van D, Van E, Van G y Van L) que se obtienen por medio de resistencia adquirida. Los más relevantes para *E. faecium* son VanA y VanB, el primero se caracteriza por presentar niveles elevados de resistencia a la vancomicina y a la teicoplanina, el resultado de la expresión de genes *vanA* que dan lugar a la formación de un precursor modificado del peptidoglicano de la pared celular (*D*-Alanina-*D*-Lactato) al que la vancomicina tiene baja afinidad. El segundo posee un mecanismo similar dando como resultado una modificación diferente en el precursor de peptidoglicano (*D*-Alanina-*D*-Serina) [25].

2.5.2. Mecanismo de resistencia en Gramnegativas.

Los microorganismos Gramnegativos conforman un gran grupo de especies que comparten muchos mecanismos de resistencia en común. Para efectos de esta tesis se destaca la resistencia a los antimicrobianos más comunes [26].

Las Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) derivan de penicilinasas como las enzimas temoneira (TEM) y sulfhidrilo variable (SHV) con mutaciones que ampliaron su espectro a las cefalosporinas. En segundo lugar, están las betalactamasas resistentes a los inhibidores (IRT) que de igual manera derivan de TEM y SHV. Además, se describen las enzimas oxacilinasas (OXA) que son las más frecuentes en enterobacterias y su fenotipo es muy similar a las resistentes a los inhibidores. Después tenemos las betalactamasas de clase molecular C de Ambler (AmpC) con la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas y cefamicinas. Por último, tenemos las carbapenemasas que

degradan carbapenémicos, considerados de alto espectro y resistentes a otras betalactamasas por lo que son antibióticos de último recurso para tratar infecciones por bacterias resistentes, por este motivo es que las bacterias que las poseen están en un nivel de prioridad crítica en la lista de la OMS [26].

Las fluoroquinolonas son, además de los betalactámicos, antibióticos de mayor uso, por lo que es importante considerar sus mecanismos de resistencia, que son el resultado de mutaciones en los genes de las topoisomerasas principalmente *gyrA* y *parC*, como resultado nos da una topoisomerasa con baja afinidad a este grupo de medicamentos. Además, algunas especies como *A. baumannii* o *P. aeruginosa* poseen una resistencia natural a las fluoroquinolonas debido a que tienen una menor permeabilidad de su membrana y en adición, presentan mayor cantidad de bombas de eflujo [26].

La resistencia a los aminoglucósidos ocurre principalmente por inactivación enzimática, esta mediada por diferentes tipos de enzimas adjudicando importancia a aminoglucósido acetiltransferasas (AAC), aminoglucósido fosfotransferasas (APH) y aminoglucósido nucleotidiltransferasas (ANT), este fenómeno se suma a mutaciones que afectan la permeabilidad de la membrana bacteriana externa y sus transportadores teniendo como resultado un bloqueo de la entrada del antibiótico [26].

2.6. Estrategias para combatir la resistencia bacteriana

La investigación actual se centra en la creación de nuevos antibióticos a través de la alteración de las estructuras farmacofóricas fundamentales o los núcleos estructurales de los grupos de antibióticos ya conocidos. Esto implica la búsqueda de agentes antibacterianos innovadores que se distingan por tener estructuras o bases farmacofóricas únicas, objetivos biomoleculares variados y mecanismos de acción inéditos. Una técnica prometedora es la hibridación, es decir, la combinación química de dos moléculas con actividad antibacteriana, lo que podría llevar al descubrimiento de nuevas moléculas con una mayor eficacia contra bacterias tanto sensibles como resistentes (1) [27]. Además, se está avanzando en el desarrollo de compuestos que puedan bloquear las vías relacionadas con la creación de biopelículas (4) [28]. Entre las estrategias destacadas se encuentra la combinación de un antibiótico con un compuesto que inhiba su resistencia (2), o la combinación de un antibiótico con un bloqueador de las proteínas responsables del bombeo de antibióticos fuera de las bacterias (3) especialmente en aquellas que producen estas proteínas en exceso [29].

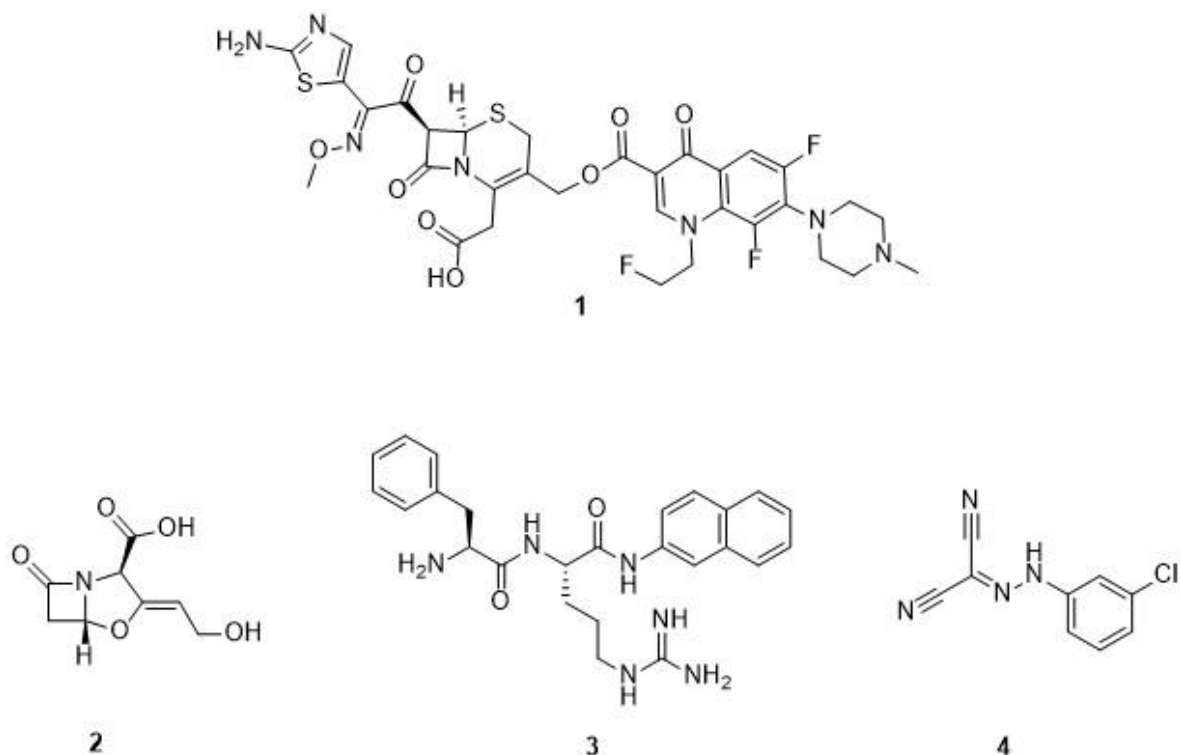


Figura 2. Moléculas resultantes de la investigación de nuevas estrategias para combatir la resistencia bacteriana. RO 239424: Híbrido molecular entre una cefalosporina y una fluoroquinolona (1), Ácido clavulánico (2), fármaco inhibidor de las betalactamasas, PaβN (3), inhibidor de bombas de eflujo, CCCP (4), inhibidor de la biopelícula bacteriana.

2.7. Lignanos como nuevo grupo antibiótico

Los lignanos se pueden clasificar según sus características estructurales en 9 clases de lignanos: arilnaftaleno, ariltetralina, dibencilbutirolactona, dibencilbutileno, tetrahidrofuranoides y tetrahidrofurofuranoides, benzofurano, neolignanos, dibencilciclooctadieno y homolignanos, norlignanos y otros lignoides [30]. Las relaciones estructura-actividad proporcionan una referencia importante para el diseño de fármacos basado en la estructura [31].

Se han identificado algunos lignanos, específicamente de los tipos dibencilbutano, ariltetralina, arilnaftaleno y tetrahidrofurano, como moléculas precursoras prometedoras para el desarrollo de nuevos antibióticos. Entre estos, destacan la ariltetralina (+)-lioniresinol-3 α -O- β -D-glucopiranosido (5) y los arilnaftalenos (6 y 7) [4, 32], así como los lignanos conocidos como pycnanthuligenos (8 y 9) y los derivados de tetrahidrofurano (10 y 11) [3, 33].

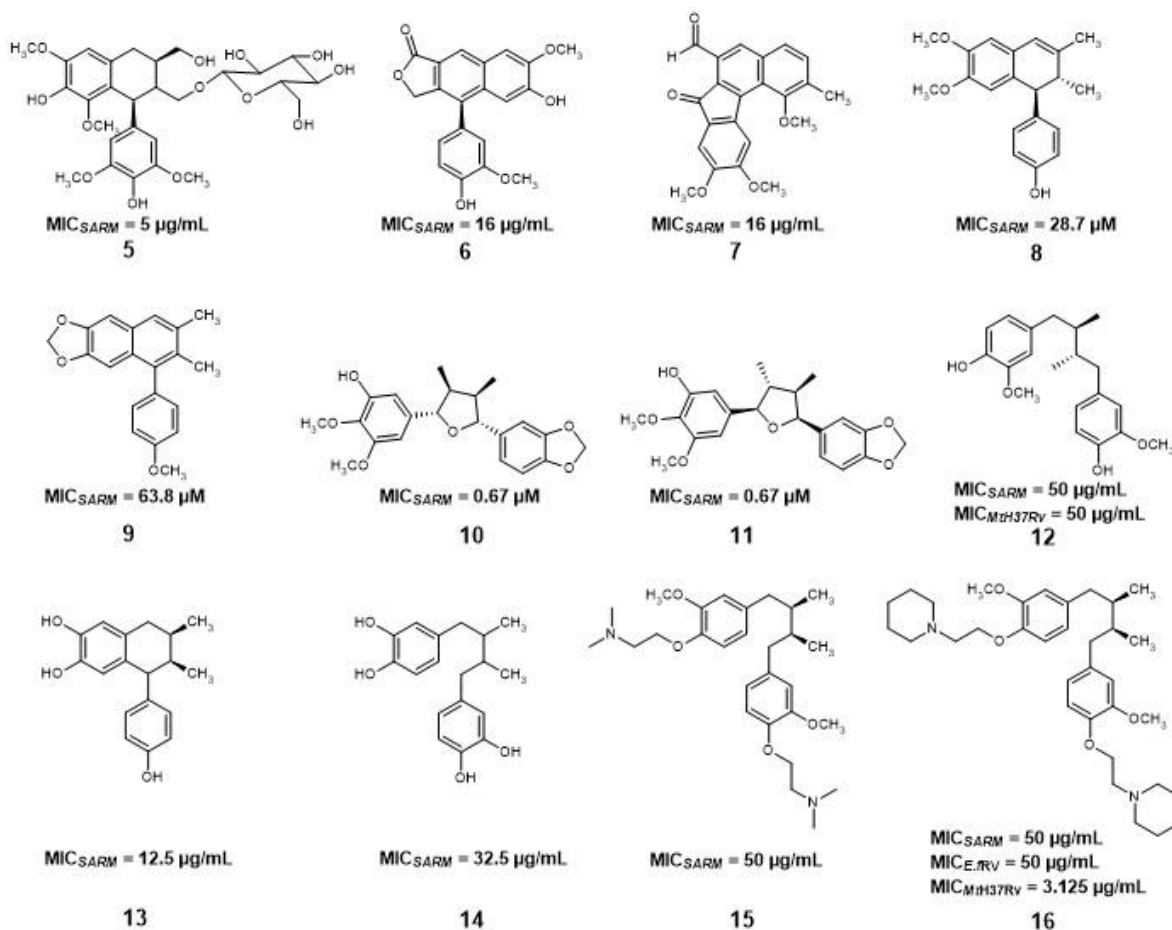


Figura 3. Lignanos naturales y semisintéticos con actividad antibacteriana. SARM: *S. aureus* resistente a meticilina. **Mth37Rv:** *Micobacterium tuberculosis* sensible a todos los fármacos de primera línea. **Efrv:** *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina.

Recientes investigaciones farmacológicas han revelado la existencia de lignanos naturales, tales como el ácido *meso*-DGA (**12**), el 3'-desmetoxi-6-*O*-desmetilisoguaiacina (**13**), y el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) (**14**). Además de lignanos semisintéticos (**15** y **16**) que demuestran una poderosa acción antibacteriana contra diversas cepas bacterianas y aislamientos clínicos [5, 6].

2.7.1. Lignanos fenólicos con potencial antibacterial.

2.7.1.1. Potencial antimicrobiano del ácido *meso*-dihidroguaiarético.

El ácido *meso*-DGA (**12**) es un compuesto fenólico simétrico que se caracteriza por tener una estructura que contiene un núcleo de 2,3-dimetilbutano sustituido por grupos 2-metoxifenol en las posiciones 1 y 4, respectivamente [34]. Se extrae de la planta *Larrea tridentata* (*L. tridentata*)

utilizada en la medicina tradicional mexicana. Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal como metabolitos secundarios y han despertado interés en el ámbito farmacéutico debido a que presentan diversas actividades biológicas, entre ellas actividad antibacteriana [35, 36]. Aunque es necesario realizar estudios específicos debido a las complejidades estructurales, se comprenden algunos mecanismos de acción antibacterial de estos compuestos como lo son: la alteración de la membrana, inhibición enzimática y la generación de especies reactivas de oxígeno[37].

Se ha demostrado a través de la tecnología de microarreglos que el *meso*-DGA actúa inhibiendo la enzima coenzima A transferasa de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) H37Rv. Lo que lleva a la acumulación de compuestos como geraniol y 1-2-metilnaftaleno dentro de la bacteria. Esta acumulación provoca la desestabilización de la membrana bacteriana, lo que a su vez puede interferir con funciones celulares vitales y eventualmente llevar a la muerte de la bacteria. [38]

Se ha evaluado la actividad antibacteriana y antimicobacteriana de derivados del *meso*-DGA donde a través de eterificaciones en el grupo -OH fenólico de la molécula que permitió hacer un análisis en relación con su estructura y actividad biológica dando como resultado compuestos prometedores para el desarrollo de agentes antibacterianos más efectivos contra cepas resistentes. Los cambios en la estructura del *meso*-DGA (**15** y **16**) pueden mejorar sus propiedades mediante el aumento de la lipofilidad y la adición de grupos donantes y/o aceptores de puentes de hidrógeno [5].

2.7.1.2. Potencial antibacterial del ácido nordihidroguaiarético.

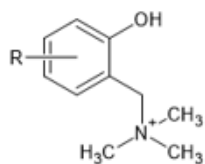
El NDGA (**14**) y *meso*-DGA (**12**) pertenecen a la familia de los lignanos tipo diarilbutano, caracterizados por compartir un mismo núcleo central de dimetilbutano. Ambos compuestos presentan naturaleza fenólica, lo que les confiere propiedades fisicoquímicas y biológicas similares asociadas a la presencia de grupos hidroxilo aromáticos. Sin embargo, difieren en uno de los sustituyentes de los anillos aromáticos: el NDGA posee sistemas catecólicos (grupos *orto*-dihidroxifenilo), mientras que el *meso*-DGA presenta un grupo *orto*-metoxifenol.

Se ha demostrado que el NDGA ejerce efectos antibacterianos mediante mecanismos distintos a los de los antibióticos convencionales, asociados principalmente a la alteración de la integridad de la membrana bacteriana. Cunningham-Oakes & cols reportaron que el NDGA induce un aumento significativo en la permeabilidad de la membrana bacteriana, evidenciado por la liberación de ATP al medio extracelular. Su detección fuera de la célula constituye un indicador indirecto de daño o desorganización de la bicapa lipídica. Este fenómeno sugiere que el NDGA se inserta en la membrana bacteriana y altera el empaquetamiento de los lípidos, favoreciendo la formación de defectos transitorios que permiten la fuga de metabolitos intracelulares sin provocar una lisis celular inmediata [39].

2.8 Bases de Mannich fenólicas antibacterianas

2.8.1. Generalidades

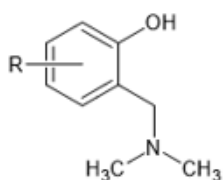
En el estudio de Kudryavtseva et al., la actividad frente a *S. aureus* se evaluó como un efecto bacteriostático mediante el método de diluciones seriadas en medio líquido, reportando la concentración mínima inhibitoria en molaridad. A partir de este análisis, los autores demostraron una fuerte correlación entre la actividad antibacteriana y la hidrofobicidad de los sustituyentes aromáticos, así como con parámetros fisicoquímicos como el momento dipolar y las constantes de disociación ácido–base de los *orto*-aminometilfenoles sintetizados. Estos resultados permitieron establecer una relación cuantitativa entre la estructura molecular y la efectividad biológica de los compuestos fenólicos *orto*-aminometilados, evidenciando que la naturaleza hidrofóbica de los grupos unidos al núcleo aromático y la polaridad de las bases de Mannich influyen de manera determinante en su actividad. En conjunto, la similitud de los perfiles de inhibición observados frente a *S. aureus* y *Candida albicans* sugiere un mecanismo de acción inespecífico, probablemente asociado a la capacidad de estos compuestos para penetrar e interactuar con la membrana celular, provocando alteraciones en su permeabilidad o desorganización estructural [7].



I

Donde R=

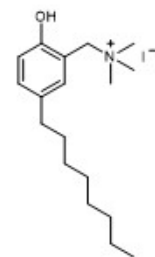
Ia: H, Ib: 4-Cl, Ic: 4-F, Id: 4-Br, Ie: 4-NO₂, Ig: 4-CH₃,
Ih: 4-n-C₄H₉, Ii: 4-t-C₄H₉, Ij: 4-n-C₈H₁₇, Ik: 2-CH₃; II:
2,3-(CH₃)₂



II

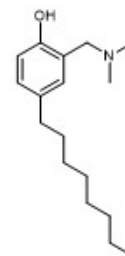
Donde R=

IIa: H, IIb: 4-Cl, IIc: 4-F, IId: 4-Br, IIe: 4-NO₂, IIf: 4-
CH₃, IIg: 4-C₂H₅, IIh: 4-n-C₄H₉, IIi: 4-t-C₄H₉, IIj: 4-n-
C₈H₁₇, IIk: 2-CH₃; III: 2,3-(CH₃)₂, IIIm: 2,3,4-(CH₃)₃,
IIIn: 4-CH₃O, IIIo: 2,4-(Br)₂, IIIp: 3,5-(Cl)₂



MIC_{S. aureus} = 0.0012 M

17



MIC_{S. aureus} = 0.0019 M

18

Figura 4. Compuestos fenólicos *ortho*-aminometilados con actividad antibacterial [7].

Hans-Joachim & cols. realizaron un cribado selectivo de compuestos con el objetivo de identificar bases estructurales capaces de inhibir la ADN girasa, una enzima que constituye el blanco terapéutico de las fluoroquinolonas. El enfoque del estudio se fundamentó en la identificación de grupos funcionales capaces de establecer interacciones específicas dentro del sitio de unión al ATP, particularmente entre un grupo donador y un grupo aceptor de hidrógeno con el residuo de aspartato en la posición 73, así como con una molécula de agua estructural (Wat45) presente en el sitio activo.

Dentro de la biblioteca de compuestos evaluados se incluyó el compuesto **19** (figura 5a), correspondiente a una base de Mannich fenólica, el cual fue analizado experimentalmente mediante ensayos bioquímicos de inhibición de la ADN girasa. La actividad de **19** se determinó a través del ensayo de superenrollamiento, reportándose su efecto como inhibidor débil mediante el parámetro MNEC (por sus siglas en inglés Maximal Noneffective Concentration). Aunque el estudio no muestra un mecanismo de unión al sitio activo de la enzima, se sustenta que cumple con el

farmacóforo propuesto, caracterizado por la presencia simultánea de grupos donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno, considerados esenciales para el reconocimiento molecular.

La figura 5b muestra una conformación estructural del modelo de interacción propuesto. En esta estructura se observa claramente la participación de grupos donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno en la estabilización del complejo proteína–ligando, validando la relevancia de este tipo de interacciones dentro del sitio de unión al ATP y apoyando el enfoque estructural empleado para la identificación de compuestos tipo “aguja” [40].

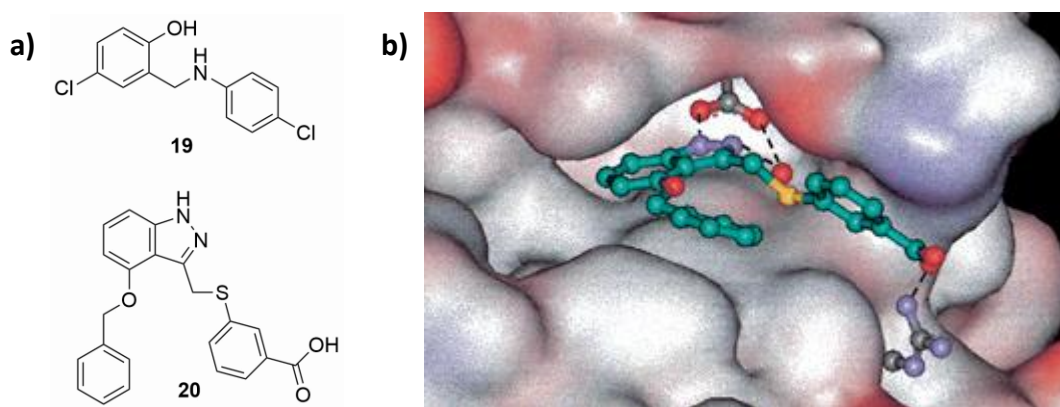
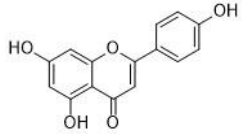
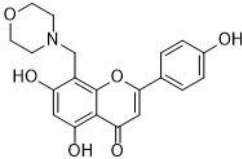
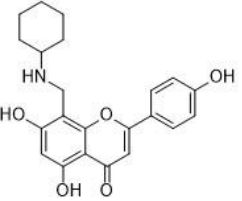


Figura 5. a): Compuestos evaluados para inhibir la ADN girasa. b): Estructura cristalográfica por difracción de rayos X del compuesto **20** en complejo con la fracción de 24 kDa de la ADN girasa. Tomada de [40].

2.8.2. Derivados de la apigenina.

La aminometilación de la apigenina (**21**) dió como resultado la producción de compuestos de Mannich con distintos niveles de actividad antimicrobiana. Notablemente, los compuestos más efectivos fueron aquellos derivados de la morfolina (**22**) y ciclohexilamina (**23**), demostrando un aumento en su actividad contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Los hallazgos indican que las modificaciones de la apigenina mediante la reacción de Mannich podrían mejorar sus características antimicrobianas y posiblemente extender su aplicación en la cura de enfermedades bacterianas [41].

Tabla 1. Derivados de la apigenina con actividad antibacterial. Adaptada de [41].

Compuesto	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			% Rendimiento
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
 <p>21</p>	31.25	62.5	62.5	NC
 <p>22</p>	1.95	15.6	15.63	43.4
 <p>23</p>	3.91	15.63	15.63	41.8
Tetraciclina	1.95	3.91	3.91	NC

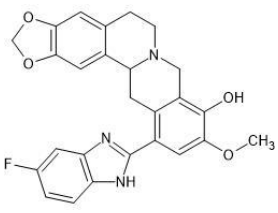
CMI: Concentración mínima inhibitoria, **NC:** No calculado.

2.8.3. Derivados de bencilimidazoliltetrahidroprotoberberinas

Jeyakkumar & cols analizaron la efectividad antimicrobiana de bencilimidazoliltetrahidroprotoberberinas, destacando especialmente el compuesto que incorpora un grupo 5-fluorobenzimidazolilo, ha demostrado ser excepcionalmente efectivo contra una

variedad de bacterias y hongos, mostrando mejores resultados que medicamentos de referencia como Norfloxacin y el Fluconazol. Notablemente, **24** no causó desarrollo de resistencia en SARM incluso tras 15 ciclos de cultivo. Estudios más detallados indicaron que la molécula **24** puede unirse a la enzima Topo IA a través de enlaces de hidrógeno, intercalarse en el ADN bovino y fragmentar el ADN pBR322, sugiriendo mecanismos posibles detrás de su marcada actividad antimicrobiana [42].

Tabla 2. Actividad antibacterial de un derivado de las bencilimidazoliltetrahydroprotoberberinas. Adaptada de [42].

Compuesto	CMI (uM)			
	SARM	<i>E. coli</i> JM109	<i>E. coli</i> DH52	<i>P. aeruginosa</i>
 <p style="text-align: center;">24</p>	17.4	8.7	23.2	11.6
Norfloxacin	25.1	50.1	50.1	41.8

SARM: *S. aureus* resistente a meticilina, **CMI:** Concentración mínima inhibitoria.

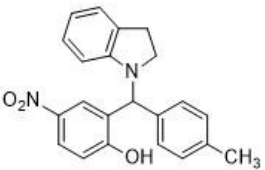
2.8.4. Actividad antibacterial de *orto*-aminometilfenoles con grupo indolina.

El estudio de Neto & cols resalta la síntesis de *orto*-aminometilfenoles a través de la reacción de Petasis (también referida como Petasis borono-Mannich o ácido borónico-Mannich), subrayando su potencial como agentes antibacterianos. Los compuestos resultantes de este método exhibieron una notable actividad antibacteriana, evidenciada por concentraciones inhibitorias mínimas menores a 1.4 mm frente a ciertos microorganismos resistentes, indicando que los compuestos con

un grupo indolina, son particularmente eficaces en la inhibición bacteriana llegando a mostrar mayor actividad que el control positivo utilizado, la vancomicina [43].

Tabla 3. Actividad antibacteriana de un *orto*-aminometilfenol con un grupo indolina.

Adaptada de [43].

Compuesto	CMI (uM)			
	SASM ATCC25923	SARM CIP106760	<i>E. faecalis</i> ATCC51299	<i>M. smegmatis</i> ATCC607
 <p>25</p>	< 1.36	< 1.36	2.72	< 1.36
Vancomicina	5.4	2.70	2.70	-

SASM: *S. aureus* sensible a meticilina, **SARM:** *S. aureus* resistente a meticilina. **CMI:** Concentración Mínima inhibitoria.

2.9. Estrategias para desarrollar bases de Mannich fenólicas.

La reacción de Mannich, que recibe su nombre por el químico alemán Carl Mannich, ha resultado ser de gran utilidad para la síntesis de moléculas complejas y biológicamente activas desde su publicación en 1912 [44].

Entre los sustratos principales para la reacción se encuentran los grupos alquil cetona, fenoles, derivados de ácidos carboxílicos, compuestos heterociclos y alquinos. Considerando la versatilidad de productos que se pueden obtener, en los últimos años se han desarrollado nuevos métodos para obtener las bases de Mannich que conforman una pieza fundamental en el diseño de fármacos [40, 45].

2.9.1. La reacción clásica de Mannich.

Los reactivos que se requieren para la reacción de Mannich son el formaldehído, el cual se utiliza con mayor frecuencia; mientras que la amina debe ser primaria o secundaria y se debe encontrar como base libre o como hidrocloreuro [46].

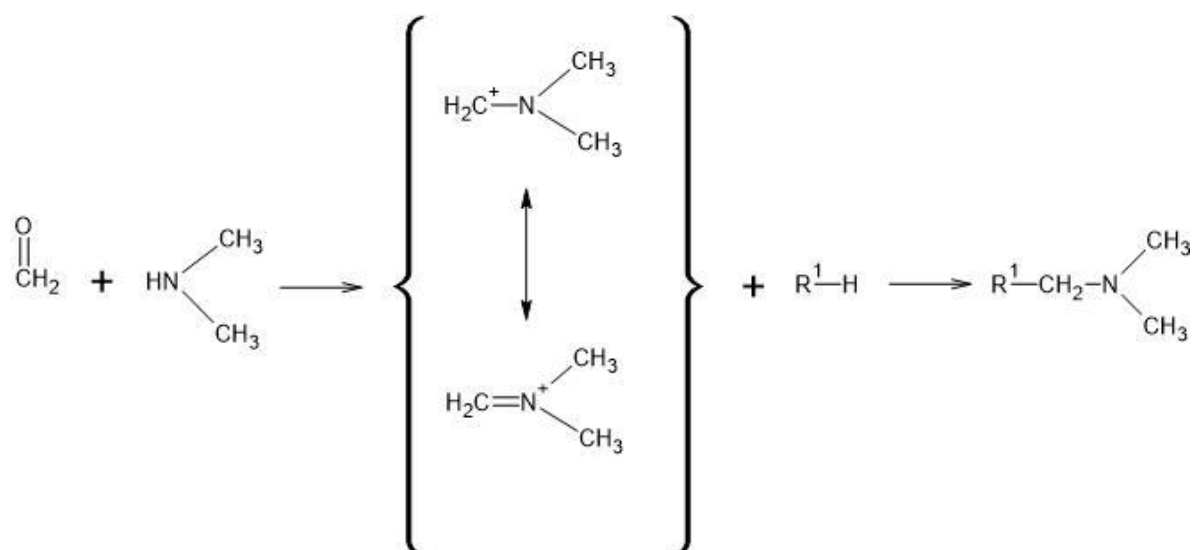


Figura 6. Mecanismo de la reacción de Mannich a través del intermediario iminio. Adaptada de [44].

La reacción de condensación ocurre en dos pasos: Primero la amina reacciona con el formaldehído mediante una adición nucleofílica para generar el producto de condensación conocido como ion iminio (especie reactiva en medio ácido). Posteriormente, el ion iminio reacciona mediante adición electrofílica con la forma enólica del sustrato carbonílico para generar un compuesto 2-aminocarbonílico. Los disolventes más utilizados son solventes alcohólicos como el metanol, etanol e isopropanol, aunque es difícil establecer reglas generales sobre la elección de solventes y las condiciones de reacción [47].

La manera tradicional de sintetizar bases de Mannich requiere que los reactivos se sometan a reflujo en solventes alcohólicos por varias horas, no obstante, existen diversos métodos más modernos como irradiación de microondas, sonicación y procesos sintéticos libres de solventes y catalizadores [41].

2.9.2. La reacción de Betti.

La reacción de Betti, que recibe su nombre por el senador italiano Mario Betti, es una reacción multicomponente que implica la condensación de β -naftol, un grupo aldehído y una amina primaria o secundaria en presencia de un ácido y una base. Del mismo modo que la reacción de Mannich, la reacción de Betti también se basa en una aminoalquilación del sustrato principal β -naftol, sin embargo, no requiere la formación del ion iminio [46].

El primer paso es condensar los tres componentes en un solvente alcohólico siendo el etanol el más utilizado, el producto de la condensación son dos formas diferentes de la molécula que existen en equilibrio. Posteriormente se adiciona ácido para formar una sal de amonio. Finalmente, se requiere la presencia de una base en solución para obtener el producto de la reacción, un aminobencilnaftol, que puede ser utilizado como precursor para la síntesis de una amplia variedad de compuestos orgánicos entre las que se incluyen la síntesis de compuestos orgánicos complejos, la síntesis de ligandos quirales y auxiliares quirales, y la síntesis de compuestos con actividad biológica [47].

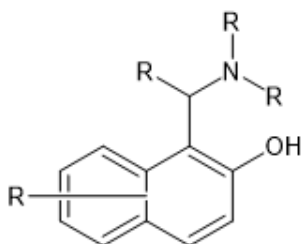


Figura 7. Estructura molecular de la base de Betti.

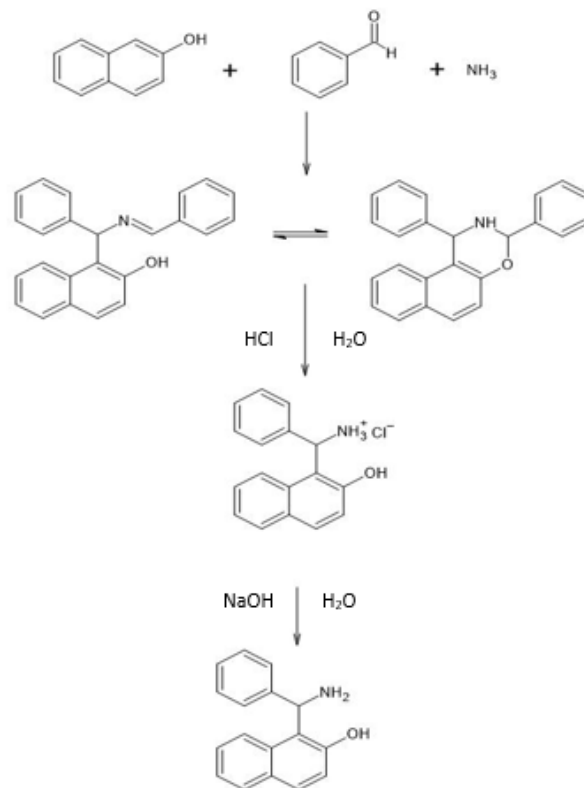


Figura 8. Esquema de síntesis de la reacción de Betti. Adaptada de [47].

2.9.3. Formación de sales de amonio cuaternario fenólicas

Otra manera de obtener moléculas de interés biológico es modificando la reacción de Mannich para obtener una sal de amonio cuaternario como producto final. Lixia y cols sintetizaron quinazolinas con actividad biológica a partir de sales de amonio cuaternario fenólicas. Para la introducción del grupo de amonio cuaternario primero se realizó una condensación de Mannich seguida de la alquilación de la amina terciaria intermedia con yodometano [48].

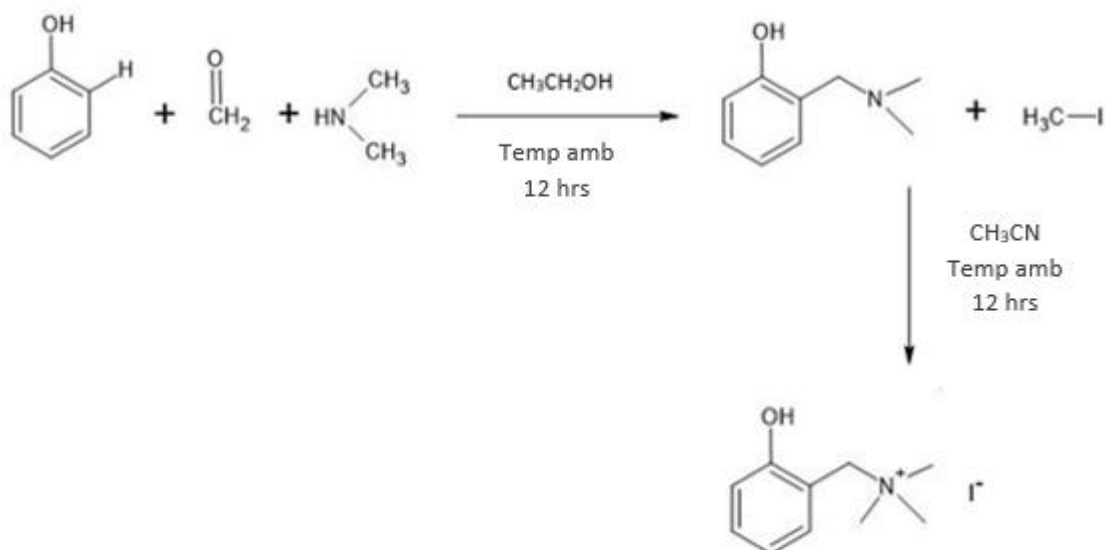


Figura 9. Propuesta del mecanismo de reacción para la formación de sales de amonio cuaternario fenólicas.

Adaptada de [48].

2.9.4. Aminometilación de fenoles catalizada por rutenio.

En 2016 Hong y cols reportaron la funcionalización selectiva en posición *orto* al grupo fenol. La técnica emplea un catalizador de rutenio y metanol como fuente de carbono para llevar a cabo la aminometilación [49].

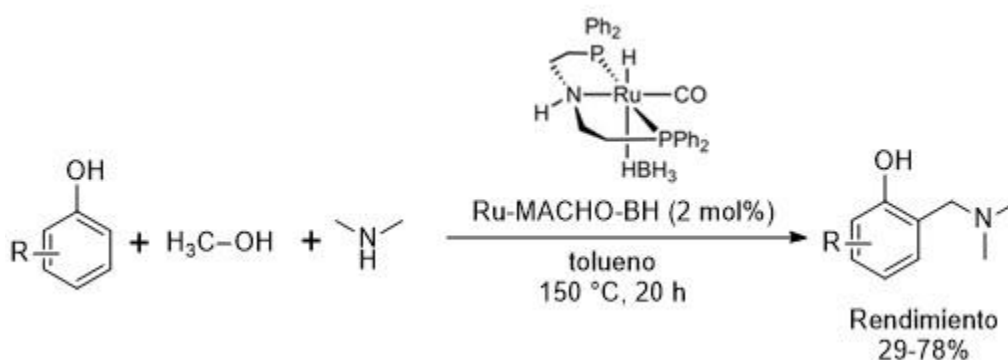


Figura 10. Esquema de reacción de la aminometilación de fenoles catalizada por rutenio [49].

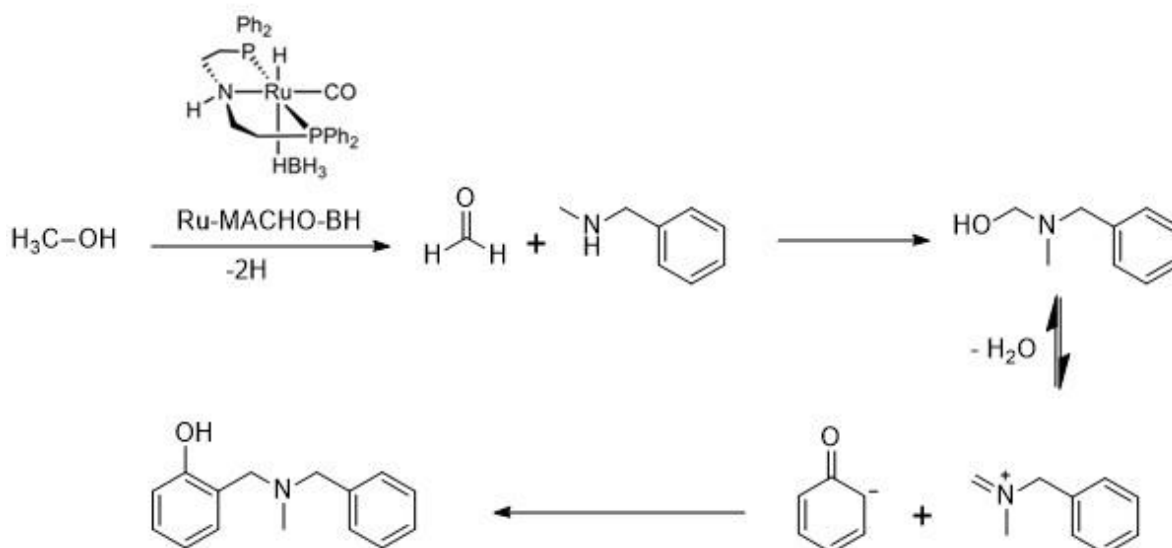


Figura 11. Propuesta del mecanismo de reacción de la aminometilación de fenoles catalizada por rutenio.

Adaptada de [49].

El mecanismo propuesto para la reacción ocurre mediante la deshidrogenación del metanol por rutenio para generar formaldehído el cual es atacado por la N -metilbencilamina. El alcohol obtenido es posteriormente deshidratado para formar el ion iminio, el cual es atacado por el anión fenolato generando el compuesto o -aminometilfenólico [49].

La principal ventaja es el uso de metanol como fuente de carbono renovable y potencialmente sostenible, además de la selectividad de la reacción para formar compuestos fenólicos funcionalizados utilizando un catalizador de rutenio que es menos tóxico que otros catalizadores comúnmente utilizados. Sin embargo, la reacción requiere la utilización de catalizadores de rutenio, que pueden ser costosos y difíciles de obtener y adicionalmente se requiere trabajar con condiciones de temperaturas específicas por un tiempo considerable para obtener un rendimiento óptimo [49].

2.9.5. Aminometilación de fenoles a partir de N -óxidos catalizada por vanadio.

En 2002, Hwang & Uang proporcionaron una descripción detallada de la generación *in situ* de iones iminio a partir de N -óxidos de trialkilaminas en presencia de vanadilacetilacetato ($\text{VO}(\text{acac})_2$) como catalizador y su participación en una reacción modificada de tipo Mannich. La reacción implica la eliminación intramolecular de una molécula de agua del 2-naftol y el N -óxido de amina para

formar un imino-óxido, que luego se descompone en un ion iminio y una molécula de óxido de amina [50].

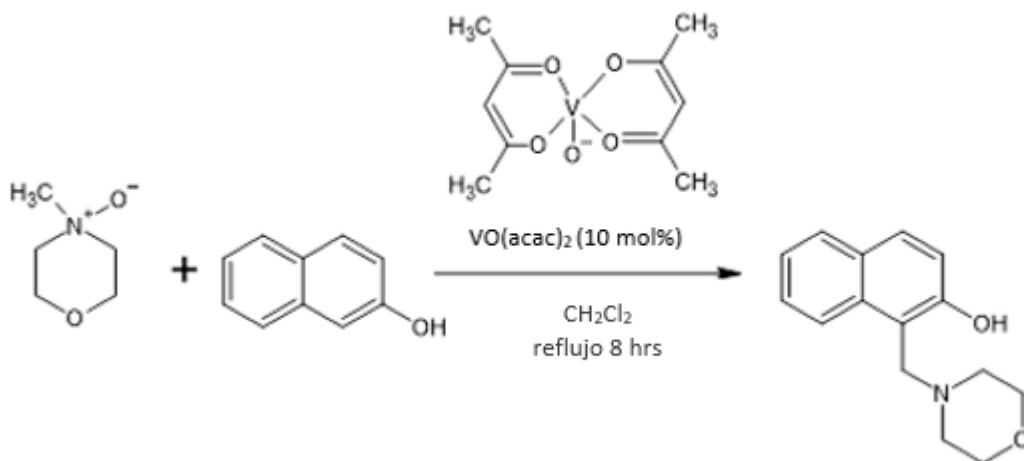
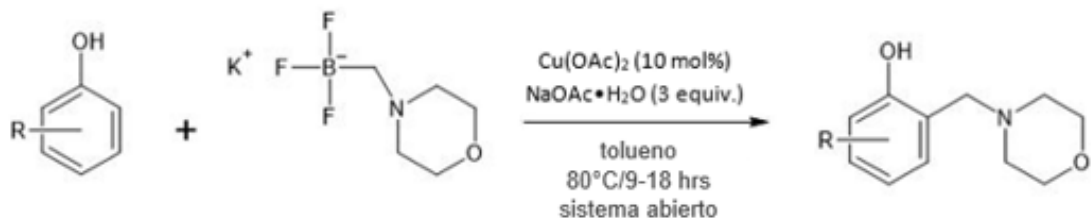


Figura 12. Esquema de reacción catalizada por vanadio. Adaptada de [50].

2.9.6. Aminometilación de fenoles con trifluoroboratos de alquilaminas

Asimismo, Dai y cols utilizaron un catalizador de cobre para la producción regioselectiva de fenoles *o*-aminometilados partiendo de aminas trifluoroboradas. El mecanismo propuesto para la alta selectividad *orto* en la aminometilación de fenoles catalizada por Cu(II) implica una transferencia de electrón radicalaria de un trifluoroborato a Cu(II) para generar radicales alquilo. El oxígeno actúa como oxidante terminal para la regeneración del Cu(II) catalíticamente activo. La formación exclusiva de enlaces C-C en la posición *orto* sugiere un estado de transición cíclico de seis miembros a través de la coordinación simultánea del fenol y el trifluoroborato a Cu(II). Podemos resaltar entre las ventajas la sencillez del método para la obtención de moléculas bioactivas de interés farmacéutico [51].

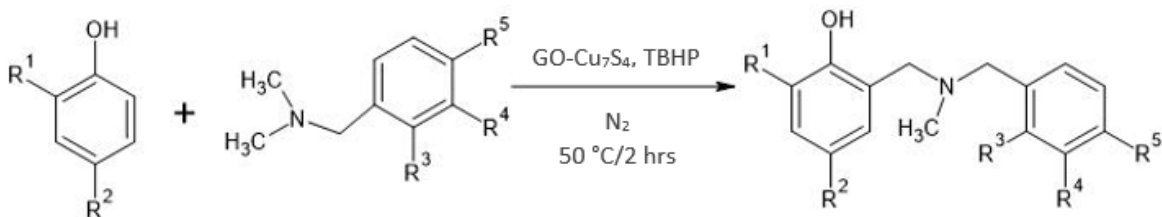


Donde R = H, 4-OMe, 2- OMe, 4-Me, 2-Me, 3-Me, 4-Et, 4-Ph, 4-OCF₃, 4-Cl, 4-F, 4-Br, 2-Cl, 2-Br, 4-CO₂Et, 4-NO₂, 4-CN, 4COMe, 4-CHO

Figura 13. Esquema de reacción de fenoles con trifluoroborato de alquilaminas. Adaptada de [51].

2.9.7. Aminometilación catalizada por cobre.

Gupta y cols dieron a conocer una metodología para la formación de fenoles aminometilados catalizada por nanopartículas de calcogenuro de cobre (Cu₇S₄) soportado sobre óxido de grafeno (GO). Lo destacable de su experimento fue que lograron sintetizar un compuesto a partir del fenol con una amina terciaria en condición libre de solventes, dando un producto con un alto rendimiento, por lo que el desarrollo de esta técnica proporciona un acceso económico y regioselectivo para la obtención de fenoles aminometilados [52].



$\text{R}^1 = \text{H, Cl}$
 $\text{R}^2 = \text{H, CHO, CHOCH}_3, \text{COPh, COOC}_2\text{H}_5, \text{Br, F, Cl}$
 $\text{R}^3 = \text{H, Cl}$
 $\text{R}^4 = \text{H, Cl}$
 $\text{R}^5 = \text{H, Cl, CN}$

Figura 14. Esquema de reacción catalizada por cobre. Adaptada de [52].

2.9.8. Acoplamiento deshidrogenativo cruzado.

Yu & Patureau propusieron una síntesis por acoplamiento deshidrogenativo cruzado (CDC), que este método permite la construcción selectiva de productos de acoplamiento C(sp²) a C(sp³) en condiciones suaves y con un amplio alcance de sustratos. Primero se requiere de un catalizador de Cu (II) que dona un electrón a *tert*-butil peróxido (DTBP) para generar una especie de cobre de bajo valencia (I) y el radical *tert*-butoxi, el cual abstrae un radical hidrógeno del fenol para formar un radical fenóxido o realiza lo mismo a partir de la trialquilamina para formar un radical metilamino. Los radicales se combinan para formar un producto de acoplamiento C(sp²) a C(sp³). Un factor importante es mantener una temperatura entre los 80 y 88 °C, debido a que la elevación de la temperatura puede dar una doble *o*-aminometilación del fenol que compite con la reacción CDC [53].

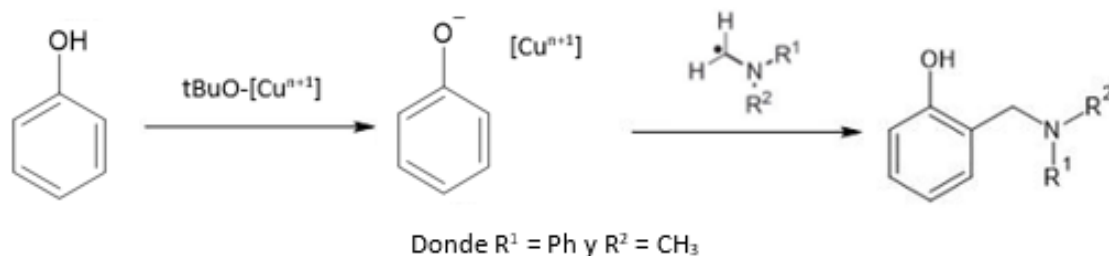


Figura 15. Propuesta del mecanismo de reacción de acoplamiento deshidrogenativo catalizado por cobre.

Adaptada de [53].

Por otro lado, Sun y Cols desarrollaron una técnica en presencia de un catalizador de oro para la aminometilación de fenoles, la técnica implica la generación de especies radicales a través de la iniciación por el bromotriclorometano (BrCCl₃). El BrCCl₃ remueve un electrón del átomo de nitrógeno de la trimetilamina para formar el catión radical. Luego, se producen dos vías competitivas: la formación de iminios por la ruptura de enlaces C-C que conlleva a un acoplamiento mediante activación de carbono (CAC) o la formación de iminios por la ruptura de enlaces C-H, ocasionando un producto CDC. El catalizador de oro (HAuCl₄) acelera los últimos pasos de la reacción [53].

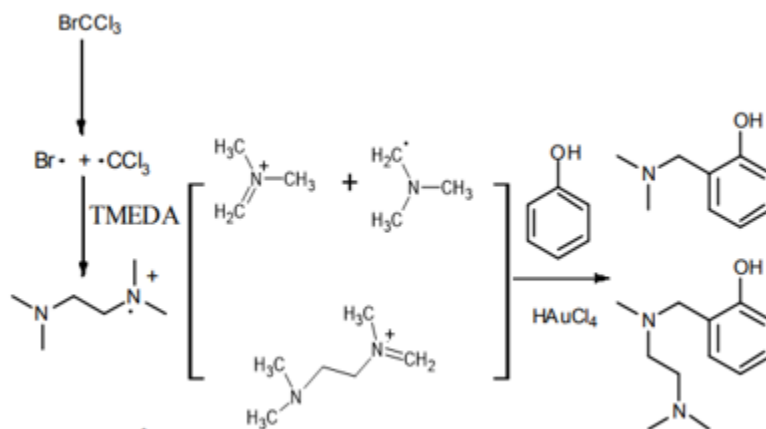


Figura 16. Propuesta del mecanismo de reacción de acoplamiento deshidrogenativo y acoplamiento de activación de carbono. Adaptada de [54].

En general, las ventajas de las reacciones de acoplamiento como CAC y CDC son que permiten la formación de enlaces carbono-carbono de manera eficiente y selectiva, no obstante, incluyen la necesidad de condiciones específicas y a menudo reactivos y catalizadores costosos, lo que puede limitar su utilidad en la síntesis a gran escala, además, estas reacciones pueden ser difíciles de controlar y pueden producir subproductos no deseados [54].

III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Aportación científica.

Preparar nuevas bases de Mannich fenólicas con una estructura base de tipo lignano, las cuales sean capaces de inhibir el crecimiento de aislados clínicos de bacterias Grampositivas y Gramnegativas resistentes a antibióticos para que sirvan como moléculas líderes en el desarrollo de nuevos antibióticos.

3.2. Hipótesis.

Las modificaciones estructurales del ácido *meso*-dihidroguaiarético como la adición de sustituyentes hidrofóbicos, grupos ionizables y donadores/aceptores enlaces de hidrógeno pueden potenciar la actividad antibacteriana contra bacterias resistentes a antibióticos.

3.3. Objetivo general.

Semisintetizar nuevas bases de Mannich fenólicas a partir del ácido *meso*-dihidroguaiarético, caracterizar sus estructuras moleculares y determinar sus propiedades antibacterianas contra aislados clínicos de bacterias Grampositivas y Gramnegativas resistentes a antibióticos.

3.4. Objetivos específicos.

1. Purificar el ácido *meso*-dihidroguaiarético a partir del extracto orgánico de las partes aéreas de *Larrea tridentata*.
2. Preparar diez bases de Mannich fenólicas a partir del ácido *meso*-dihidroguaiarético.
3. Determinar descriptores fisicoquímicos moleculares *in silico*.
4. Evaluar la actividad antibacteriana de las bases de Mannich fenólicas contra aislados clínicos de bacterias Grampositivas y Gramnegativas resistentes a antibióticos.
5. Evaluar la actividad citotóxica de las bases de Mannich fenólicas que exhiban actividad antibacteriana similar a los controles positivos.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Aislamiento y purificación por técnicas cromatográficas.

La cromatografía en columna se realizó utilizando gel de sílice (SiO_2) como fase estacionaria. Los solventes utilizados fueron hexano (Hex), acetato de etilo (AcOEt) y diclorometano (DCM). Se emplearon cromatografías en capa fina utilizando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice, de la marca Merck, que contienen un indicador fluorescente para 254 nm. Como reveladores, se utilizaron una lámpara UV (con longitudes de onda de 254 nm y 365 nm) y una solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico, molibdato de cerio y amonio en ácido sulfúrico.

4.1.2. Síntesis de bases de Mannich fenólicas.

Las reacciones de *orto*-aminometilación fenólica se realizaron en medio etanólico empleando paraformaldehído como agente metilénico y malla molecular de 3-4 Å como agente secante. Las aminas secundarias utilizadas para la obtención de derivados del *meso*-DGA fueron: dimetilamina, dietilamina, trimetiletilendiamina, pirrolidina, piperidina, morfolina, tiomorfolina, *N*-metilpiperazina, 4-hidroxipiperidina, 1-(2-hidroxietil)piperazina.

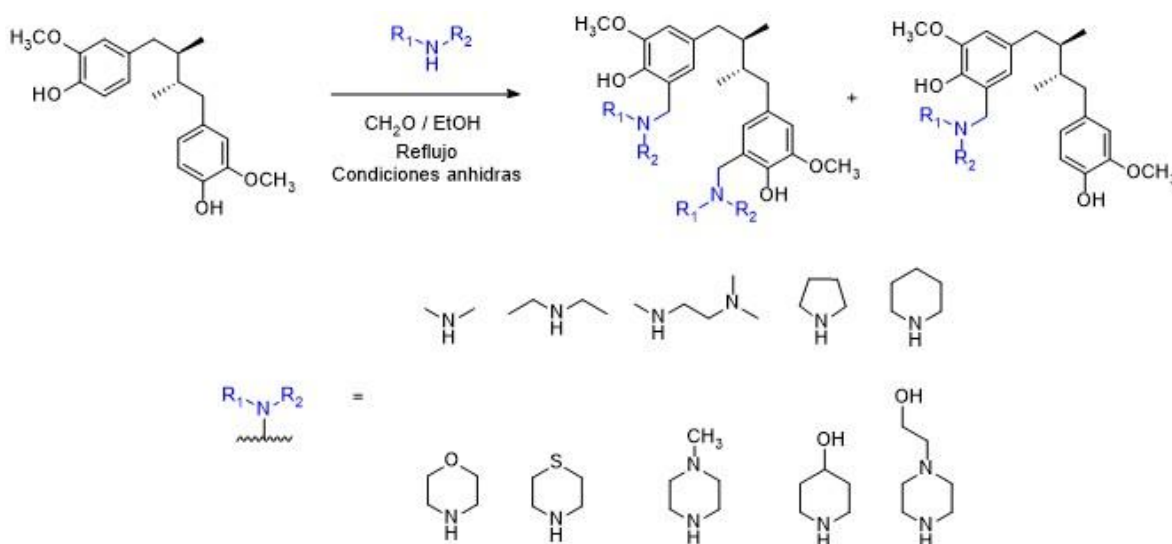


Figura 17. Reacción general para la obtención de los derivados del *meso*-DGA.

4.1.3. Elucidación estructural de los productos naturales y sus derivados semisintéticos.

Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Fisher Johns. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H (RMN ^1H) de los compuestos se obtuvieron en los instrumentos Bruker AVANCE (300 MHz) y JEOL JNM-ECZL (400 MHz) y usando cloroformo deuterado (CDCl_3) y metanol deuterado (CD_3OD) como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Los desplazamientos químicos (δ) se reportaron en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) se reportaron en Hertz (Hz). La multiplicidad de señales fue descrita como singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuarteto (c), multiplete (m), singulete ancho (s_a), doblete de dobletes (dd) y pseudotriplete (s_t).

4.2. Aislamiento y purificación del ácido *meso*-dihidroguaiarético.

El extracto orgánico de *L. tridentata* fue proporcionado por la Dra. María del Rayo Camacho en el Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL.

El extracto orgánico se sometió a una cromatografía en columna usando SiO_2 como fase estacionaria y como fase móvil Hex con un gradiente de AcOEt. Las fracciones se analizaron por cromatografía en capa fina usando *meso*-DGA como referencia y se revelaron bajo luz ultravioleta y sulfato cérico, se reunieron las fracciones con igual factor de retención (RF por sus siglas en inglés) que el compuesto de referencia para posteriormente realizar una purificación adicional.

La purificación se realizó por cromatografía en columna utilizando SiO_2 como fase estacionaria y la fase móvil Hex con un gradiente de DCM. Se realizó una cromatografía en capa fina usando *meso*-DGA como referencia y se juntaron las fracciones con el mismo RF obteniéndose un sólido color blanco.

4.2.1. Datos espectroscópicos del *meso*-DGA

El *meso*-DGA fue obtenido como un sólido blanco con un punto de fusión de 88°C .

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 6.82 (d, $J = 8.00$ Hz, 2 H, H-5 y H-5'), 6.65 (dd, $J = 8.04$ Hz y 1.96 Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.61 (d, $J = 1.96$, 2H, H-2 y H-2'), 5.44 (s, 2H, OH-4), 3.85 (s, 6H, OCH_3 -C3 y OCH_3 -C3'), 2.72 (dd, $J = 13.44$ Hz, 5.00 Hz, 2H, H-7b y H-7b'), 2.28 (dd, $J = 13.48$ Hz y 9.24 Hz, 2H, H-7a y H-7a'), 1.68 (m, 2H, H-8 y H-8'), 0.84 (d, $J = 6.64$ Hz, 6H, H_3 -9 y H_3 -9'). **RMN ^{13}C** (100 MHz, CDCl_3), δ

(ppm): 146.37 (C4 y C4'), 143.62 (C3 y C3'), 133.88 (C1 y C1'), 121.78 (C6 y C6'), 114.01 (C5 y C-5'), 111.48 (C2 y C2'), 55.92 (OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 39.26 (C7 y C7'), 38.96 (C8 y C8'), 16.30 (C9 y C9').

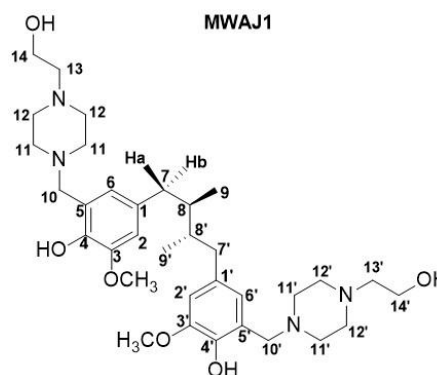
4.3. Procedimiento para la obtención de bases de Mannich fenólicas.

En un matraz redondo de 25 mL, se agregó *meso*-DGA (30 mg, 0.091 mmol), paraformaldehído (16.38 mg, 0.546 mmol), amina (0.0546 mmol) y 3 mL de etanol anhidro. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a reflujo por 72 horas. Posteriormente la mezcla de reacción fue concentrada en un rotaevaporador dando una resina color café que fue fraccionada por cromatografía en columna adicionada con aire para generar una presión positiva utilizando acetato de etilo como fase móvil principal y un gradiente de una solución preparada con metanol e hidróxido de amonio concentrado en proporción 9:1 (v/v).

4.3.1. Datos espectroscópicos de bases de Mannich fenólicas

4,4'-((2R,3S)-2,3-dimetilbutan-1,4,diil)bis(2-((4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il)metil)-6-metoxifenol) (**MWAJ1**). Este compuesto fue obtenido como un sólido blanco que se funde a 144°C.

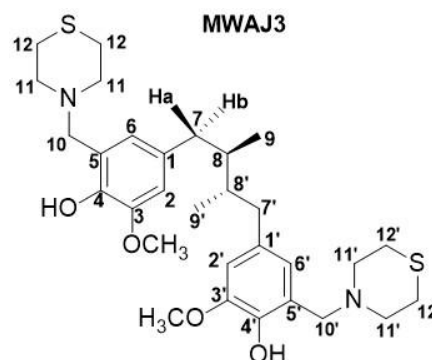
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.58 (d, *J* = 2.40 Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.37 (d, *J* = 2.56 Hz, 2H, H-2 y H-2'), 3.84 (s, 6H, OCH₃-C3 y OCH₃-C3') 3.69 (s, 4H, H₂-10 y H₂-10') 3.64 (t, *J* = 6.84 Hz, 4H, H₂-14 y H₂-14'), 2.69 (dd, *J* = 17.72 y 6.52 Hz, H-7b y H-7b') 2.59 (t, *J* = 6.96 Hz, H₂-13 y H₂-13'), 2.74-2.35 (s_a, H₂-11, H₂-11', H₂-12 y H₂-12) 2.22 (dd, *J* = 17.92 Hz y 12.40 Hz, 2H, H-7a y H-7a') 1.75 (m, 2H, H-8 y H-8') 0.81 (d, *J* = 8.64 Hz, 6H, H₃-9 y H₃-9'). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 147.60



(C4 y C4'), 144.72 (C3 y C3'), 132.46 (C1 y C1'), 121.04 (C6 y C6'), 120.74 (C5 y C5'), 112.11 (C2 y C2'), 61.20 (C10 y C10'), 59.43 (C14 y C14'), 57.87 (C13 y C13'), 55.96 (OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 52.84 (C11 y C11'), 52.40 (C12, C12') 39.24 (C7 y C7'), 38.89 (C8 y C8'), 16.28 (C9 y C9'). **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para C₃₄H₅₅N₄O₆: 615.41216; observado: 615.41045.

4,4'-((2R,3S)-2,3-dimetilbutan-1,4-dil)bis(2-metoxi-6-(tiomorfolinometil)fenol). (**MWAJ3**). Este compuesto fue obtenido como un sólido blanco que se funde a 148°C.

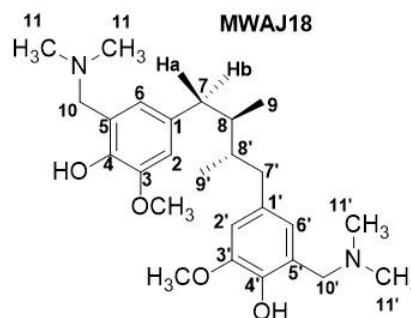
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.58 (s, 2H, H-6 y H-6'), 6.36 (s, 2H, H-2 y H-2'), 3.85 (s, 6H, OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 3.68 (s, 4H, H₂-10 y H₂-10'), 2.82 (m, *J* = 4.52 Hz, 8H, H₂-12, H₂-12'), 2.73 (m, *J* = 5.20 Hz, 8H, H₂-11, H₂-11'), 2.72 (dd, *J* = 4.04 Hz, 2H, H-7b y H-7b'), 2.21 (st, *J* = 11.92 Hz y 11.04 Hz, 2H, H-7a y H-7a'), 1.72 (m, 2H, H-8 y H-8'), 0.82 (d, *J* = 6.44 Hz, 6H, H₃-9 y H₃-9'). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 147.78 (C4 y C4'),



144.83 (C3 y C3'), 132.67 (C1 y C1'), 121.24 (C6 y C6'), 120.62 (C5 y C5'), 112.24 (C2 y C2'), 62.33 (C10 y C10'), 56.08 (OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 54.63 (C11, C11'), 39.58 (C7 y C7'), 39.11 (C8 y C8'), 28.15 (C12 y C12'), 16.34 (C9 y C9'). **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para **C₃₀H₄₅N₂O₄S₂**: 561.28207; observado: 561.28316.

4,4'-((2R,3S)-2,3-dimetilbutan-1,4-dil)bis(2-((dimetilamino)metil)-6-metoxifenol), **MWAJ 18 forma neutra (MWAJ18n)**. Este compuesto fue obtenido como una resina verdosa.

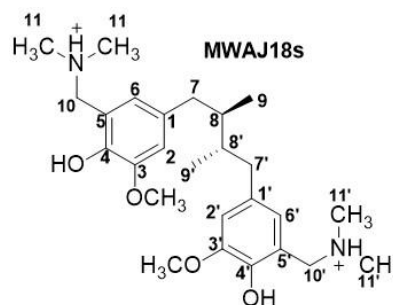
RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 6.66 (d, *J* = 2.00 Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.51 (d, *J* = 1.88 Hz, 2H, H-2 y H-2'), 3.80 (s, 6H, OCH₃-C3 y OCH₃-C3') 3.67 (d, *J* = 2.00 Hz, 4H, H₂-10 y H₂-10') 2.71 (dd, *J* = 13.48 Hz y 5.16 Hz, 2H, H-7b y H-7b'), 2.35 (s, 12H, H₃-11, H₃-11'), 2.27 (dd, *J* = 13.36 Hz y 8.33 Hz, 2H, H-7a y H-7a'), 1.75 (m, 2H, H-8 y H-8'), 0.83 (d, *J* = 6.60 Hz 6H, H₃-9 y H₃-9'). **RMN ¹³C** (100 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 147.40 (C4 y C4'), 144.16 (C3 y C3'),



132.57 (C1 y C1'), 121.98 (C6 y C6'), 121.29 (C5 y C-5'), 112.18 (C2 y C2'), 59.95 (C10 y C10'), 55.23 (OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 43.23 (C11, C11'), 39.02 (C7 y C7'), 38.41 (C8 y C8'), 15.33 (C9 y C9'). **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para **C₂₆H₄₁N₂O₄**: 445.30663; observado: 445.30726.

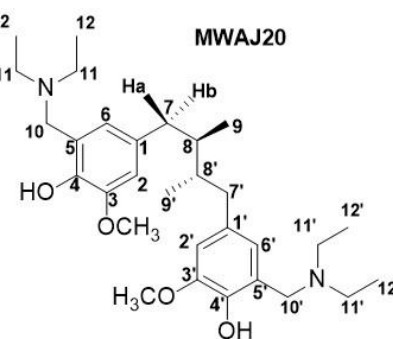
MWAJ18 forma de sal (MWAJ18s)

RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 6.86 (d, *J* = 1.88 Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.51 (d, *J* = 1.84 Hz, 2H, H-2 y H-2'), 4.31 (s, *J* = 13.04 Hz, 4H, H₂-10 y H₂-10'), 3.87 (s, 6H, OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 2.85 (s, 12H, H₃-11, H₃-11'), 2.83 (dd, *J* = 13.28 Hz, 2H, H-7b y H-7b'), 2.34 (dd, *J* = 13.40 Hz y 9.72 Hz, 2H, H-7a y H-7a'), 1.82 (m, 2H, H-8 y H-8'), 0.86 (d, *J* = 6.52 Hz, 6H, H₃-9 y H₃-9')



4,4'-((2R,3S)-2,3-dimetilbutan-1,4-dil)bis(2-((dietilamino)metil)-6-metoxifenol), (**MWAJ20**). Este compuesto fue obtenido como un sólido blanco que se funde a 138°C.

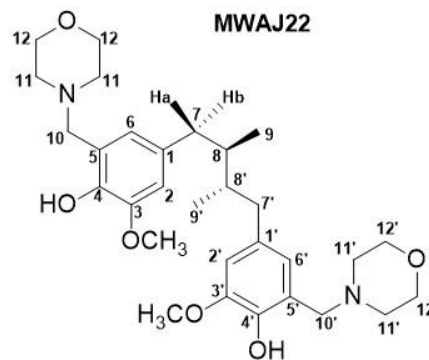
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.56 (d, *J* = 1.92 Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.36 (d, *J* = 1.92 Hz, 2H, H-2 y H-2'), 3.84 (s, 6H, OCH₃-C3 y OCH₃-C3') 3.72 (s, 4H, H₂-10 y H₂-10') 2.6 (dd *J* = 13.44 Hz y 4.8 Hz, 2H, H-7b y H-7b'), 2.61 (c, *J* = 7.20 Hz 8H, H₂-11, H₂-11'), 2.22 (dd, *J* = 13.52 Hz y 9.36 Hz, 2H, H-7a y H-7a'), 1.72 (m, 2H, H-8 y H-8'), 1.10 (t, *J* = 7.20 Hz, 12H, H₃-12, H₃-12'), 0.82 (d, *J* = 6.56 Hz, 6H, H₃-9 y H₃-9'). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃), δ



(ppm): 147.74 (C4 y C4'), 145.52 (C3 y C3'), 132.07 (C1 y C1'), 121.80 (C5 y C5'), 120.85 (C6 y C-6'), 111.84 (C2 y C2'), 57.12 (C10 y C10'), 56.07 (OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 46.55 (C11 y C11), 39.47 (C7 y C7'), 39.09 (C8 y C8'), 16.37 (C9 y C9'), 11.47 (C12 y C12'). **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para C₃₀H₄₉N₂O₄: 501.36923; observado: 501.36677.

4,4'-((2R,3S)-2,3-dimetilbutan-1,4,dil)bis(2-metoxi,6-(morfolinometil)fenol) (**MWAJ22**). Este compuesto fue obtenido como un sólido blanco que se funde a 160°C.

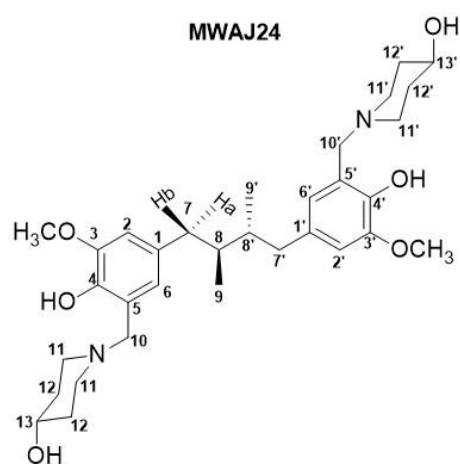
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.57 (d, *J* = 1.96 Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.38 (d, *J* = 1.92 Hz, 2H, H-2 y H-2'), 3.84 (s, 6H, OCH₃-C3 y OCH₃-C3') 3.73, (s, *J* = 4.56 Hz, 8H, H₂-12 y H₂-12), 3.67 (s, 4H, H₂-10 y H₂-10') 2.69 (dd *J* = 13.44 Hz y 4.64 Hz, 2H, H-7b y H-7b'), 2.56 (s_a, 8H, H₂-11, H₂-11'), 2.21 (dd, *J* = 13.52 Hz y 9.48 Hz, 2H, H-7a y H-7a'), 1.71 (m, 2H, H-8 y H-8') 0.81 (d, *J* = 6.56 Hz, 6H, H₃-9 y H₃-9'). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm):



147.67 (C4 y C4'), 144.61 (C3 y C3'), 132.62 (C1 y C1'), 121.21(C6 y C6'), 120.39 (C5 y C5'), 112.17 (C2 y C2'), 66.86 (C12, C12'), 61.71 (C10 y C10'), 55.99 (OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 52.96 (C11 y C11'), 39.52 (C7 y C7'), 39.05 (C8 y C8'), 16.27 (C9 y C9'). **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para **C₃₂H₄₉N₂O₄**: 525.36923; observado: 525.36706.

1,1'-((((2R,3S)-2,3-dimetilbutan-1,4-dil)bis(6-hidroxi-5-metoxi-3,1-fenil))bis(metilen))bis(piperidin-4-ol) (**MWAJ24**). Este compuesto fue obtenido como un sólido blanco que se funde a 162°C.

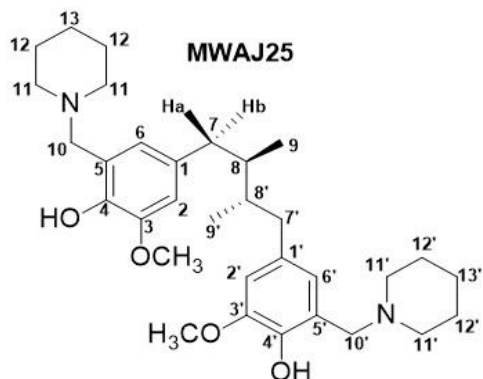
RMN ¹H (700 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 6.64 (d, *J* = 1.96 Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.47 (d, *J* = 1.96 Hz, 2H, H-2 y H-2'), 3.79 (s, 6H, OCH₃-C3 y OCH₃-C3') 3.67 (s, 6H, H₂-10, H₂-10', H-13 y H-13'), 2.85 (m, 4H, H-11ec y H-11ec'), 2.71 (dd *J* = 13.51 Hz y 5.32 Hz, 2H, H-7b y H-7b'), 2.30 (s_a, 4H, H-11ax y H-11ax'), 2.26 (dd, *J* = 13.51 Hz y 9.03 Hz, H-7a y H-7a'), 1.89 (m, 4H, H-12ec y H-12ec') 1.75 (m, 2H, H-8 y H-8'), 1.58 (m, 4H, H-12ax y H-12ax'), 0.84 (d, *J* = 6.65 Hz, 6H, H₃-9 y H₃-9'). **RMN ¹³C** (175 MHz, CD₃OD), δ (ppm): 148.71 (C4 y C4'), 145.63



(C3 y C3'), 133.87 (C1 y C1'), 122.89 (C5 y C5'), 122.86 (C6 y C6'), 113.39 (C2 y C2'), 67.84 (C13 y C13'), 60.97 (C10 y C10') 56.54 (OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 40.20 (C7 y C7'), 39.68 (C8 y C8') 35.02 (C12 y C12'), 16.32 (C9 y C9'). **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para **C₃₂H₄₉N₂O₆**: 557.35906; observado: 557.35829.

4,4'-(((2R,3S)-2,3-dimetilbutan-1,4-diil)bis(2-metoxi-6-(piperidin-1-il-metil)fenol) (**MWAJ25**). Este compuesto fue obtenido como un sólido blanco que se funde a 124°C.

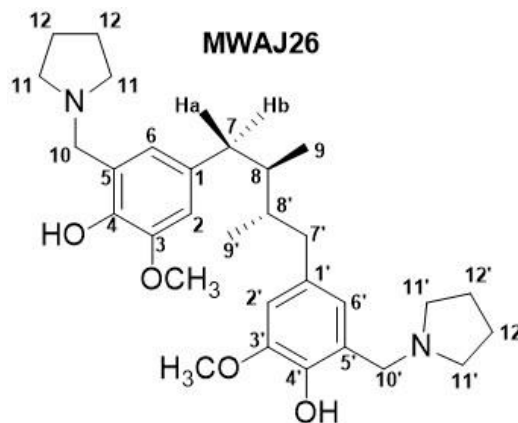
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.56 (d, *J* = 2Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.35 (d, *J* = 2 Hz, 2H, H-2 y H-2'), 3.84 (s, 6H, OCH₃-C3 y OCH₃-C3') 3.62 (s, 4H, H₂-10 y H₂-10') 2.68 (dd *J* = 13 Hz y 5 Hz, 2H, H-7b y H-7b'), 2.49 (s_a, 8H, H₂-11, H₂-11'), 2.21 (dd, *J* = 13 Hz y 9 Hz, 2H, H-7a y H-7a'), 1.71 (m, 2H, H-8 y H-8'), 1.62 (m, 8H, H₂-12, H₂-12'), 1.47 (m, 4H, H₂-13 y H₂-13') 0.81 (d, 6H, H₃-9 y H₃-9'). **RMN ¹³C** (100



MHz, CDCl₃), δ (ppm): 147.63 (C4 y C4'), 145.24 (C3 y C3'), 132.06 (C1 y C1'), 121.27 (C5 y C5'), 120.89(C6 y C6'), 111.83 (C2 y C2'), 62.17 (C11 y C11'), 55.98 (C10 y C10') 54.00 (OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 39.35 (C7 y C7'), 38.98 (C8 y C8'), 25.93 (C12 y C12) 24.10 (C13 y C13'), 16.32 (C9 y C9'). **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para **C₃₂H₄₉N₂O₄**: 525.36923; observado: 525.36706.

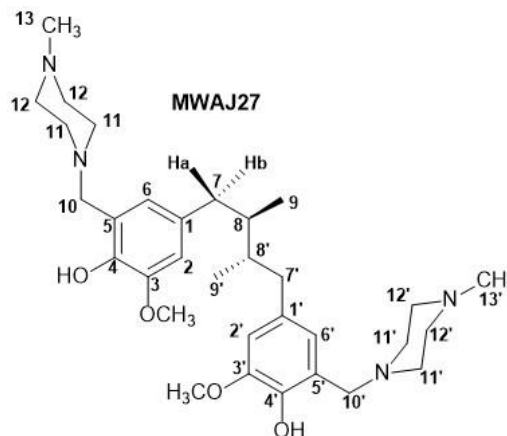
4,4'-((2R,3S)-2,3-dimetilbutan-1,4-diil)bis(2-metoxi-6-(pirrolidin-1-il-metil)fenol (**MWAJ26**). Este compuesto fue obtenido como cristales amarillos que se funden a 118°C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.57 (d, *J* = 1.92 Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.42 (d, *J* = 1.88 Hz, 2H, H-2 y H-2'), 3.81 (s, 4H, CH₂-10 y CH₂-10') 2.69 (dd, *J* = 13.28 Hz y 4.76 Hz, H-7b y H-7b') 2.67 (m, H₂-11 y H₂-11'), 2.22 (dd, *J* = 13.48 Hz y 9.36 Hz, 2H, H-7a y H-7a'), 1.85 (m, 8H, CH₂-12, CH₂-12'), 1.73 (m, 2H, H-8 y H-8'), 0.83 (d, *J* = 6.64 Hz, 6H, CH₃-9 y CH₃-9'). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 147.60 (C4 y C4'), 145.05 (C3 y C3'), 132.30 (C1 y C1'), 121.76 (C5 y C5'), 120.76 (C6 y C6'), 111.49 (C2 y C2'), 58.22 (C11 y C11'), 56.07 (C10 y C10'), 53.55 (OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 39.47 (C7 y C7'), 39.09 (C8 y C8'), 23.74(C12 y C12') 16.30 (C9 y C9'). **EMAR** (ESI), [M+1]⁺ calculado para **C₃₀H₄₅N₂O₄**: 497.33793; observado: 497.33563.



4,4'-((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil)bis(2-metoxi-6-((4-metilpiperazin-1-il)metil)fenol) (**MWAJ27**). Este compuesto fue obtenido como un sólido blanco que se funde a 120°C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.57 (d, *J* = 1.88 Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.38 (d, *J* = 1.88 Hz, 2H, H-2 y H-2'), 3.84 (s, 6H, OCH₃-C3 y OCH₃-C3') 3.68 (s, 4H, H₂-10, H₂-10') 2.69 (dd, *J* = 13.28 Hz y 4.68 Hz, 2H, H-7b y H-7b'), 2.72-2.33 (s_a, 16 H, H₂-11, H₂-11', H₂-12 y H₂-12') 2.31 (s, 6H, H₃-13 y H₃-13'), 2.20 (dd, *J* = 13.24 Hz y 9.48 Hz, 2H, H-7a y H-7a'), 1.73 (m, 2H, H-8 y H-8'), 0.81 (d, *J* = 6.56 Hz, 6H, H₃-9 y H₃-9'). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃),



δ (ppm): 147.72 (C4 y C4'), 144.86 (C3 y C3'), 132.55 (C1 y C1'), 121.16 (C6 y C6'), 120.86 (C5 y C5'), 112.13 (C2 y C2'), 61.28 (C10 y C10') 56.05 (C11, C11'), 54.98 (OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 52.38 (C12, C12'), 45.86 (C13 y C13'). 39.35 (C7 y C7'), 38.98 (C8 y C8'), 16.32 (C9 y C9'). **EMAR** (ESI), [M+]⁺ calculado para **C₃₂H₅₁N₄O₄**: 555.39103; observado: 555.38902.

4,4'-((2R,3S)-2,3-dimetilbutano-1,4-diil)bis(2-(((2-(dimetilamino)etil)(metil)amino)metil)-6-metoxifenol), (**MWAJ28**). Este compuesto fue obtenido como un sólido blanco que se funde a 89°C.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 6.57 (d, J = 1.92

Hz, 2H, H-6 y H-6'), 6.38 (d, J = 1.92 Hz, 2H, H-2 y H-

2'), 3.84 (s, 6H, OCH₃-C3 y OCH₃-C3') 3.58 (d J = 3.16

Hz, 4H, H₂-10 y H₂-10'), 2.68 (dd J = 13.36 Hz y 4.68

Hz, 2H, H-7b y H-7b'), 2.63-2.53 (m, 8H, H₂-12, H₂-

12', H₂-13 y H₂-13'), 2.28 (s, 12H, H₃-14 y H₃-14'),

2.24 (s, 6H, H₃-11, H₃-11'), 2.23 (dd, J = 13.52 Hz y

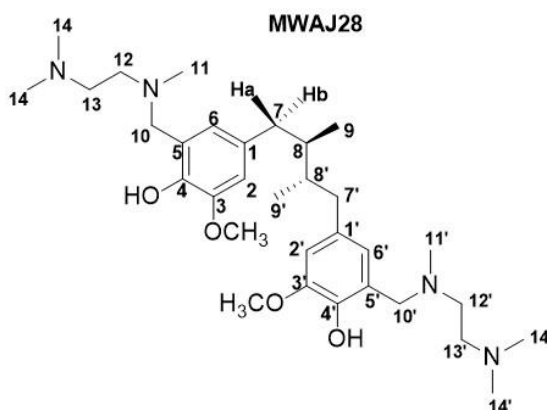
9.52 Hz, 2H, H-7a y H-7a'), 1.72 (m, 2H, H-8 y H-8'),

0.81 (d, J = 6.56 Hz, 6H, CH₃-9 y CH₃-9'). **RMN ¹³C** (100 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 147.89 (C4 y C4'), 144.85

(C3 y C3'), 132.11 (C1 y C1'), 122.45 (C5 y C5'), 121.60 (C6 y C-6'), 112.03 (C2 y C2'), 59.70 (C10 y

C10'), 56.58 (C12 y C12') 56.03 (OCH₃-C3 y OCH₃-C3'), 54.30 (C13 y C13'), 45.26 (C14 y C14'), 42.27

(C11 y C11') 39.58 (C7 y C7'), 39.08 (C8 y C8'), 16.34 (C9 y C9').



4.4. Obtención de los descriptores moleculares de los derivados de *meso*-DGA *in silico*.

Los descriptores fisicoquímicos y farmacocinéticos de los compuestos sintetizados se obtuvieron mediante el software QikProp 4.4 (Schrödinger®), herramienta empleada para la predicción computacional de propiedades relacionadas con absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). Este módulo permite evaluar el potencial como fármaco (“drug-like”) de cada molécula y comparar sus valores con los rangos característicos del 95 % de los fármacos aprobados.

Para este análisis, cada estructura molecular fue construida y optimizada con Maestro v13.9 2024-1 a partir de los datos cristalográficos reportados para *meso*-DGA y posteriormente sometida al cálculo en QikProp utilizando el modo estándar. El programa generó un conjunto de más de cuarenta descriptores relevantes, entre los que se incluyen: peso molecular, momento dipolar,

superficie accesible al solvente (SASA) y sus componentes hidrofóbica e hidrofílica, área polar superficial (PSA), volumen molecular, número de enlaces rotables, número de donadores y aceptores de puentes de hidrógeno, coeficiente de partición (logP) teórico, solubilidad (logS), permeabilidad celular estimada (QPPCaco y QPlogBB), entre otros [58].

4.5. Ensayos biológicos

4.5.1. Determinación de la actividad antibacteriana.

Para la actividad antibacteriana se llevó a cabo en colaboración con el departamento de infectología de la facultad de medicina de la UANL a cargo de la Dra. Elvira Garza González. Se utilizaron las siguientes cepas de aislados clínicos resistentes a diferentes fármacos brindadas también por el departamento de infectología.

Tabla 4. Bacterias resistentes a diferentes fármacos.

Grampositivas	Gramnegativas
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina (14-2095).	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos (13-1391).
	<i>Escherichia coli</i> productora de BLEE (14-2081).
<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina (10-984).	<i>Klebsiella pneumoniae</i> NDM-1 + resistente a carbapenémicos, cefalosporinas de amplio espectro (14-3335).
	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos (12-666)

BLEE: Betalactamasas de espectro extendido, **NDM-1 +:** New Delhi metalo-β-lactamasa-1.

Las cepas se sembraron en placas con agar sangre al 5 % y se incubaron durante 24 h. Para la preparación del inóculo, se tomaron entre tres y cinco colonias aisladas de cada cultivo, se suspendieron en solución salina estéril y la turbidez se ajustó al estándar 0.5 de McFarland ($\approx 1.5 \times 10^8$ unidades formadoras de colonia (UFC) / mL). Posteriormente, se tomaron 10 µL de esta suspensión y se diluyeron en 11 mL de caldo Mueller–Hinton para obtener una concentración final aproximada de 5×10^5 UFC/mL.

4.5.1.1. Preparación de las soluciones de trabajo.

Los compuestos se disolvieron en DMSO tomando en cuenta que debido a su toxicidad en bacterias, la solución final de DMSO no debe ser mayor al 2%. Se disolvió 1 mg en 500 μ L de DMSO para obtener una solución stock de 2000 μ g/mL. A partir de ésta, se prepararon soluciones 4X en caldo Mueller–Hinton (MH) tomando 18 μ L de la solución stock adicionando caldo MH hasta obtener un volumen de 360 μ L para permitir alcanzar concentraciones finales entre 50 y 0.78 μ g/mL mediante diluciones seriadas 1:2 dentro de la microplaca. Para el control positivo se empleó levofloxacina.

4.5.1.2. Montaje de la placa control.

El montaje de la placa control, así como el ensayo de microdilución fue realizado por el L.Q.I. Efrén Barajas Saracho.

Se montó una placa control para corregir la absorbancia atribuida a coloración o turbidez de los compuestos. Se utilizaron microplacas estériles de 96 pozos donde en cada pocillo se colocaron 100 μ L de caldo Mueller Hilton (MH). A continuación, se colocaron 100 μ L de la solución de trabajo a concentración 4X en los primeros dos pozos de la fila A, (por duplicado). Tras mezclar el contenido, se tomaron 100 μ L de esta preparación y se transfirieron a los pozos correspondientes de la fila B para efectuar una dilución 1:2. El mismo procedimiento se repitió sucesivamente hasta la fila G, descartando finalmente los últimos 100 μ L obtenidos. Finalmente se adicionaron 100 μ L de caldo MH estéril a cada pocillo obteniendo un volumen final de 200 μ L en cada uno. La Fila H se utilizó como control adicionando 200 μ L de caldo MH estéril.

4.5.1.3. Ensayo de microdilución

Se siguió el mismo tratamiento que la placa control, pero ahora se tomaron tres pocillos por cada concentración. (por triplicado). Después de realizar las mismas diluciones se añadió 100 μ L de la suspensión bacteriana previamente estandarizada. Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se realizó la lectura de densidad óptica (D.O.) a 600 nm mediante un lector de microplacas BioTek Cytation™. Los valores de absorbancia obtenidos en la placa control se restaron de los valores correspondientes en la placa con bacteria para eliminar interferencias. La fila H se utilizó como control. Los primeros seis pozos se destinaron como blanco, consistiendo en 200 μ L de caldo Mueller–Hinton estéril. Los últimos seis pozos correspondieron al control negativo preparados con 100 μ L de caldo Mueller–Hinton y 100 μ L de la suspensión bacteriana, con el propósito de

representar el crecimiento bacteriano máximo en ausencia de compuestos. Se utilizó levofloxacin como control positivo.

El porcentaje de crecimiento se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Crecimiento} = 100 - \left(\frac{D.O. \text{ medio con bacteria} - D.O. \text{ extracto con bacteria}}{D.O. \text{ medio con bacteria}} \times 100 \right)$$

4.5.2. Ensayo de citotoxicidad.

La citotoxicidad de los compuestos estuvo a cargo de la Dra. Adriana Romo Pérez en el Instituto de Química de la UNAM. Se evaluó empleando la línea celular humana HaCaT (queratinocitos inmortalizados), utilizada como modelo de células normales. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de cristal violeta, el cual permite cuantificar indirectamente la supervivencia de células adherentes con base en su capacidad para permanecer unidas a la superficie de cultivo, de acuerdo con el método descrito por Feoktistova *et al* [59].

Las células HaCaT se cultivaron en medio de cultivo apropiado y se sembraron en placas de 96 pozos, asegurando un volumen mínimo de 100 µL por pozo, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂ durante 18–24 h, con el fin de permitir la adecuada adhesión celular. Posteriormente, el medio fue retirado cuidadosamente y reemplazado por medio fresco adicionado con los compuestos de interés.

Los compuestos se evaluaron mediante curvas dosis–respuesta en un rango de concentraciones de 50.0 a 3.125 µM. Las células se incubaron con los tratamientos durante un periodo de 48 h bajo las mismas condiciones de cultivo. El disolvente dimetilsulfóxido (DMSO) se utilizó como control negativo. Cada condición experimental se realizó por triplicado.

Finalizado el tiempo de tratamiento, el medio de cultivo fue aspirado y las células se lavaron suavemente con agua para eliminar células no adheridas y restos de medio. Posteriormente, se adicionaron 50 µL de una solución de cristal violeta al 0.5 % a cada pozo y se incubó a temperatura

ambiente durante 20 min, permitiendo la unión del colorante a proteínas y ácidos nucleicos de las células adheridas. El exceso de colorante se eliminó mediante lavados sucesivos con agua y las placas se dejaron secar al aire.

Una vez secas, el colorante retenido por las células viables se solubilizó mediante la adición de metanol, seguido de una incubación a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas. Los pozos sin células, procesados de manera idéntica, se utilizaron para corregir el fondo de la técnica.

La viabilidad celular se expresó como porcentaje respecto al control sin tratamiento, el cual se consideró como 100 % de viabilidad. Los resultados se reportan como el promedio \pm desviación estándar de muestras por triplicado y son representativos de al menos tres experimentos independientes. La concentración inhibitoria media (IC₅₀) se determinó a partir de las curvas dosis–respuestas obtenidas para cada compuesto evaluado en la línea celular HaCaT.

4.6. Disposición de residuos

La disposición de los residuos generados en la síntesis de derivados de Mannich y la purificación de *meso*-DGA y se llevó a cabo bajo los lineamientos establecidos por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL (Tabla 1), y por la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

Tabla 5. Disposición de residuos de acuerdo con el reglamento de la Facultad de Ciencias Químicas.

Residuo generado	Contenedor
Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases inorgánicos	Colector A
Sólidos inorgánicos	Colector B
Tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos no halogenado	Colector C
Tóxicos e inflamables, aminas, solventes orgánicos halogenados	Colector D
Muy tóxico, cancerígeno, orgánico	Colector E orgánico
Muy tóxico, cancerígeno, inorgánico	Colector E inorgánico
Reciclo de sales de metales preciosos	Colector F
Combinaciones orgánicas sólidas	Colector G
Oxidantes	Colector H
Vidrio Impregnado con Sustancias Peligrosas	
Plástico Impregnado con Sustancias Peligrosas	
Arena, sanitas, papel impregnado con residuos peligrosos. Guantes de plástico y látex	Basura Industrial

V. Resultados y discusiones

5.1 Obtención del ácido *meso*-dihidroguaiarético

A partir de 40 gramos de extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Larrea Tridentata* se purificaron 512 mg del lignano caracterizado como ácido *meso*-dihidroguaiarético de acuerdo con sus datos espectroscópicos.

5.1.1 Elucidación estructural del ácido *meso*-dihidroguaiarético

El espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) muestra un total de nueve señales, lo cual es consistente con la presencia de un eje de simetría en la molécula. En consecuencia, únicamente se observan señales correspondientes a la mitad de los protones, por lo que las integrales fueron normalizadas al doble del valor registrado. En la región de aromáticos se observan 3 tipos de señales: un doblete (d, 2H) con un desplazamiento (δ) de 6.82 ppm y una constante de acoplamiento (J) de 8.00 Hz, un doble de doble en δ 6.65 ppm ($J = 1.96$ Hz y 8.00 Hz, 2H) y δ 6.61 ppm (d, $J = 1.96$, 2H), que corresponden a los protones 5,5', 6,6' y 2,2' respectivamente del anillo de benceno trisustituido en las posiciones 1, 3 y 4 por el tipo de acoplamiento que exhibe. Además, se observan un singulete (s) ancho en δ 5.44 ppm que integra para dos protones (2H) que corresponde a los grupos hidroxilo en posición *para* 4,4' y otra señal en δ 3.85 ppm (s, 6H) que se atribuye a los grupos metoxilo en posición *meta* al fragmento de dimetilbutilo. Finalmente restan las señales de la cadena alifática comenzando con las señales 2.73 ppm (dd, $J = 13.48$ Hz y 5.00 Hz, 2H) y 2.28 ppm (dd, $J = 13.4$ Hz y 9.24 Hz, 2H) que pertenecen a los protones 7a, 7a' y 7b, 7b' que se acoplan de manera geminal entre ellos y con los protones vecinales adyacentes 8,8' los cuales, muestran un multiplete en 1.74 ppm (m, 2H) debido al acoplamiento con los protones 9,9' y 7,7'. Finalmente tenemos la señal de 0.84 ppm (d, $J = 6.64$ Hz 6H) que corresponde los protones del metilo de la posición 9,9', los cuales se acoplan de manera vecinal con los protones adyacentes en las posiciones 8 y 8'.

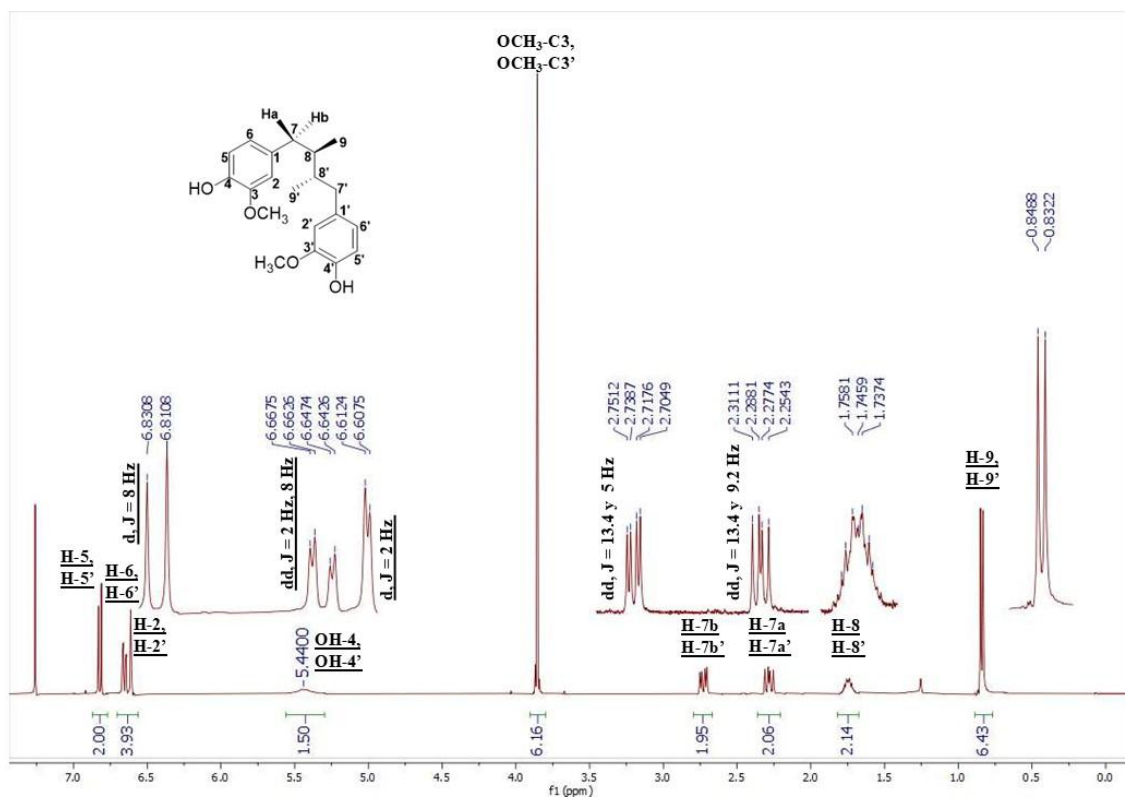


Figura 18. RMN ^1H de *meso*-DGA (CDCl_3 , 400 MHz).

5.2. Síntesis de bases de Mannich fenólicas.

Después de la purificación del lignano *meso*-DGA a partir del extracto clorofórmico de *L. tridentata*, se realizó una condensación de Mannich entre *meso*-DGA, paraformaldehído y diferentes aminas secundarias. Considerando que la reacción libera moléculas de agua como producto secundario, se optó por utilizar malla molecular de 3-4 Å para aumentar el rendimiento.

Durante la síntesis de las bases de Mannich fenólicas, la metodología empleada sugiere el uso de dos equivalentes de reactivos por cada grupo funcional reaccionante. Sin embargo, los resultados obtenidos mostraron rendimientos bajos ($\approx 58\%$), lo cual puede atribuirse a la presencia de dos sitios reactivos en la molécula de partida. Como consecuencia, se generó una mezcla de derivados mono-sustituídos y di-sustituídos, reduciendo la eficiencia global del proceso.

Con el fin de optimizar la reacción, se incrementó la proporción de formaldehído y de la amina correspondiente a tres equivalentes por cada grupo reaccionante, lo que permitió mejorar el rendimiento hasta un 81%, del producto disustituído. Para la purificación de los productos se utilizó hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH) en una cantidad menor al 1% (V/V) del volumen total de la fase móvil con el fin de favorecer la elución de los derivados.

Tabla 6. Rendimientos y características físicas de los derivados de *meso*-DGA

Derivado	Rendimiento	Aspecto	Punto de fusión (°C)	Solubilidad
MWAJ1	73.50%	Sólido blanco	144°C	Metanol
MWAJ3	77.28%	Sólido blanco	148°C	Acetato de Etilo
MWAJ18	52.06%	Resina verdosa	No se determinó	Metanol
MWAJ20	90.07%	Sólido blanco	138°C	Metanol
MWAJ22	77.28%	Sólido blanco	160°C	Acetato de etilo
MWAJ24	71.09%	Sólido blanco	162°C	Metanol
MWAJ25	67.67%	Sólido blanco	124°C	Acetato de etilo
MWAJ26	79.36%	Cristales amarillos	118°C	Acetato de etilo
MWAJ27	88.59%	Sólido blanco	120°C	Acetato de etilo
MWAJ28	89.16%	Sólido blanco	89°C	Acetato de etilo

La metodología general fue similar para la obtención del resto de los derivados, manteniendo agitación constante durante 72 horas a una temperatura de 70 °C. Una excepción fue el derivado MWAJ18, para el cual se empleó la sal de Eschenmoser como precursor. En este caso el compuesto se aisló tanto en su forma neutra (base libre) como en su forma protonada (sal de amonio), donde para obtener la sal se utilizó una fase móvil trifásica que no requiera NH_4OH para eluir el compuesto. Ambos productos se obtuvieron como compuestos de color verdoso, sin embargo, presentaron diferencias en su estado físico: la forma neutra se aisló como una resina verdosa higroscópica, mientras que la forma protonada se obtuvo como un sólido verdoso. A diferencia de otros derivados

Mannich, el compuesto sustituido con dimetilamina forma su sal protonada con mayor facilidad debido a la mayor basicidad del grupo amina, al efecto inductivo donador de los grupos metilo que estabiliza la forma protonada, y a la menor obstrucción estérica alrededor del nitrógeno, esto favorece la protonación espontánea y la estabilización de la correspondiente sal de amonio. La confirmación de la presencia de la sal de amonio se realizó mediante RMN de ^1H , observándose un desplazamiento a campo más bajo tanto de la señal correspondiente al metileno puente entre el sustituyente de dimetilamina y el anillo aromático de metoxifenol, como de las señales asignadas a los metilos de la dimetilamina, en comparación con la forma neutra. Este comportamiento es consistente con la protonación del átomo de nitrógeno, la cual incrementa el efecto desprotector sobre los protones adyacentes.

5.2.1. Elucidación estructural de bases de Mannich fenólicas.

Los derivados parten de la misma plataforma de lignano *meso*-DGA por lo que sus espectros de RMN ^1H exhiben un patrón de señales provenientes del *meso*-DGA, además de la presencia de señales clave que indican que la *orto*-aminometilación en las posiciones C-5 y C-5' se realizaron con éxito. Lo anterior quedó evidenciado por los dos dobletes que se observan en la región aromática (6.66-6.51 ppm) y que corresponden, por sus constantes de acoplamiento aproximadas a 2.0 Hz, a hidrógenos aromáticos en posición *orto* (H-2 y H-6). Por otro lado, la ausencia de la señal del H-5 y H-5' indica que la sustitución se dio en ambas partes de la molécula conservando su simetría C₂. Adicionalmente, se observa una señal simple en la región de 3.82-3.58 ppm que se atribuye a los hidrógenos del grupo metileno unido a nitrógeno y benceno (H-10).

5.2.1.1. Elucidación estructural de MWAJ1.

El producto MWAJ1 se obtuvo con un rendimiento del 73.50% como un sólido blanco que fundió a 144°C. En el espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) la señal correspondiente al metileno puente entre el anillo aromático y el sustituyente amina (H₂-10, H₂-10') se observa como un singulete a 3.69 ppm que integra para cuatro hidrógenos. La porción de hidroxietilpiperazina exhibe un grupo de tres señales, dos de ellas se muestran como tripletes a 3.64 ppm ($J = 6.84$ Hz) y 2.59 ppm ($J = 6.84$ Hz) cada uno con una integral para cuatro hidrógenos, los cuales se asignan a los metilenos de la fracción etanol como (H₂-14, H₂-14') y (H₂-13, H₂-13') respectivamente. Por último la fracción de piperazina aparece como un singulete ancho a 2.35 ppm consecuencia del solapamiento de las señales por libertad conformacional del anillo y la falta de resolución (H₂-11, H₂-11', H₂-12 y H₂-12').

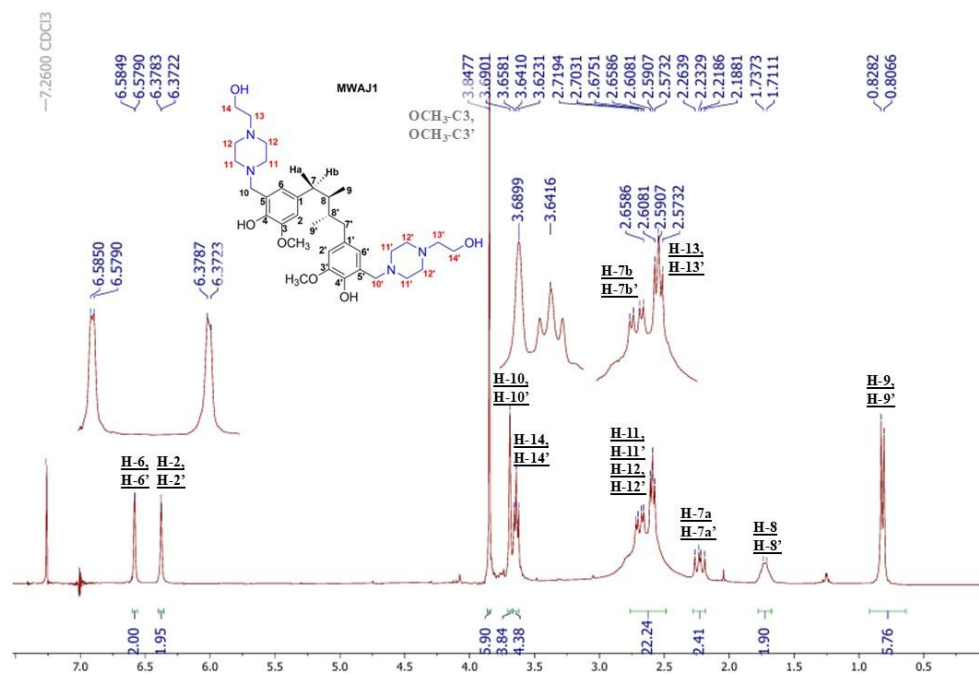


Figura 19. RMN ^1H de MWAJ1 (CDCl_3 , 400 MHz).

5.2.1.2. Elucidación estructural de MWAJ3.

El producto MWAJ3 se obtuvo como un sólido blanco que fundió a 148°C . En el espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz) la porción de tiomorfolina se muestra con dos multipletes que integran para ocho hidrógenos cada uno a 2.82 ppm ($J = 4.52$ Hz) para los metilenos vecinos al azufre ($\text{H}_2\text{-12}$, $\text{H}_2\text{-12}'$) y 2.73 ppm ($J = 5.20$ Hz) vecinos al nitrógeno que corresponden a ($\text{H}_2\text{-11}$, $\text{CH}_2\text{-11}'$). Por último, tenemos la señal del metileno puente ($\text{H}_2\text{-10}$, $\text{H}_2\text{-10}'$) como un singlete a 3.67 ppm que integra para cuatro hidrógenos.

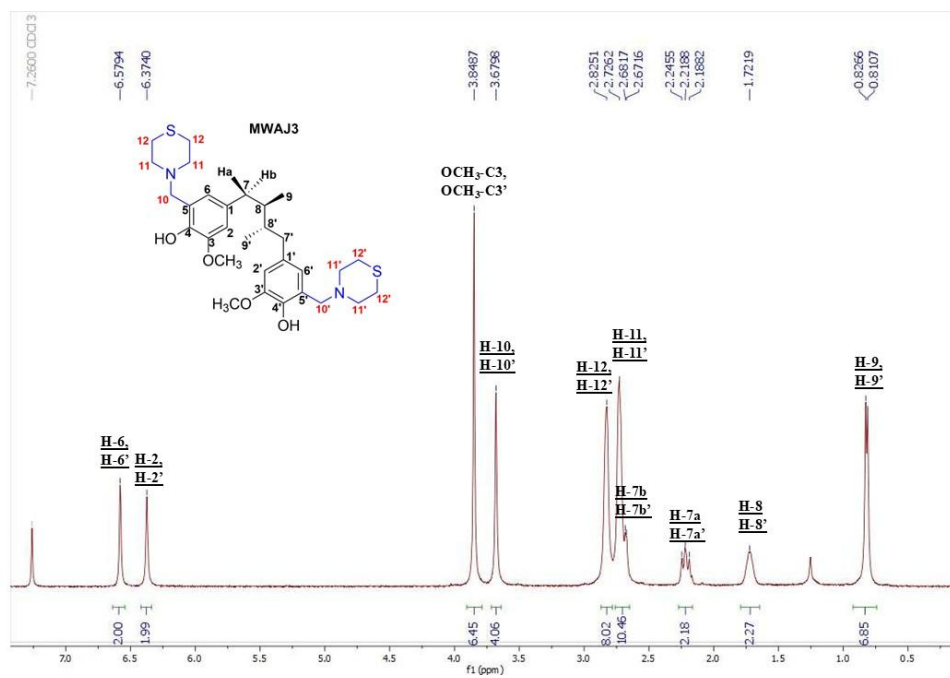


Figura 20. RMN ^1H de MWAJ3 (CDCl_3 , 400 MHz).

5.2.1.3. Elucidación estructural de MWAJ18 en sus formas neutra y forma de sal de amonio.

El producto MWAJ18n se obtuvo como una resina verdosa. En el espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) la señal del metileno puente (H_2-10 , H_2-10') aparece como un doblete a 3.67 ppm ($J = 2.0$ Hz) que podría explicarse como un acoplamiento a larga distancia con el hidrógeno del fenol ($\text{OH}-4$, $\text{OH}-4'$) que se solapa con la señal del H_2O presente en el CD_3OD y en consecuencia resuena como un posible doblete. La señal a 2.35 ppm, integra para doce hidrógenos y es atribuida a los grupos metilo unidos al nitrógeno de la dimetilamina (H_3-11 , H_3-11').

En el espectro aparecen señales de contaminación con acetato de etilo proveniente de la purificación, las señales del solvente se identifican como: cuarteto a 4.10 ppm, singulete a 2.05 ppm y triplete a 1.25 ppm.

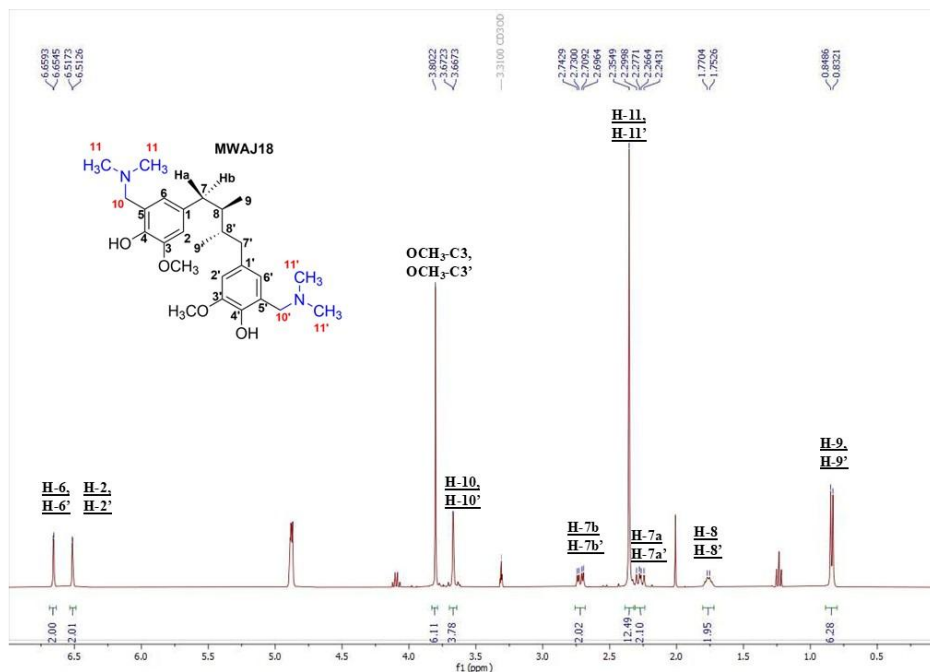


Figura 21. RMN ^1H de MWAJ18n (CD_3OD , 400 MHz)

El producto MWAJ18s se obtuvo con un rendimiento de 52% como un sólido verdoso. En el espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) muestra un desplazamiento a campo más bajo del metileno puente ($\text{H}_2\text{-10}$, $\text{H}_2\text{-10}'$) consistente con el efecto desprotector generado por la protonación del átomo de nitrógeno, en consecuencia, exhibe un singulete a 4.31 ppm ($J = 13.04$ Hz). De manera similar, las señales correspondientes a los metilos de la dimetilamina ($\text{H}_3\text{-11}$, $\text{H}_3\text{-11}'$) se desplazan también hacia campo más bajo y aparecen como un singulete a 2.86 ppm. Por último, estos cambios espectroscópicos respaldan la formación de la sal de amonio y confirman la diferencia electrónica entre ambas especies.

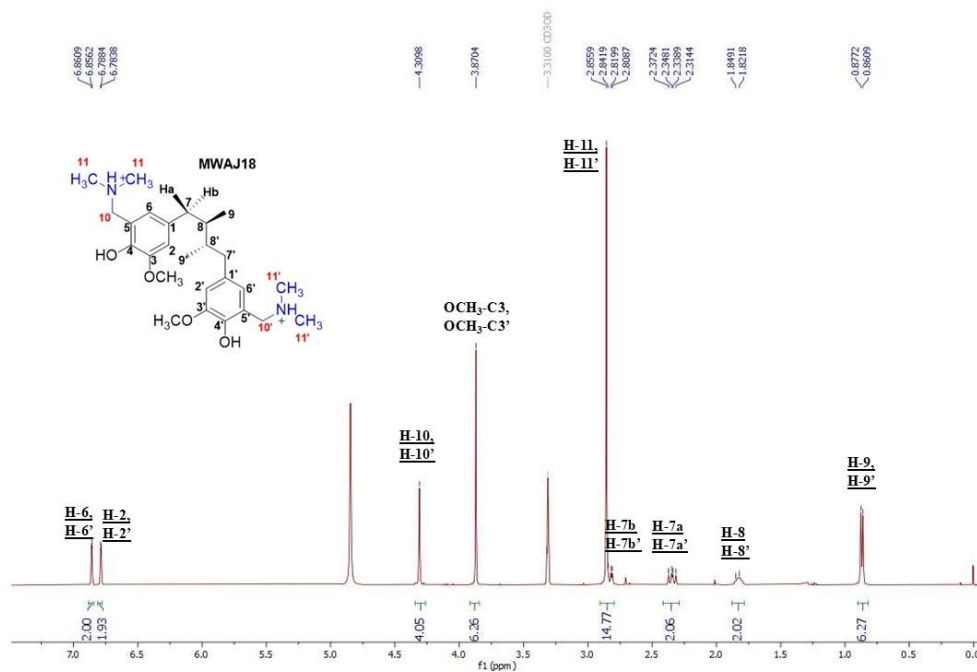


Figura 22. RMN ^1H de MWAJ18s (CD_3OD , 400 MHz).

5.2.1.4. Elucidación estructural de MWAJ20.

El producto MWAJ20 se obtuvo con un rendimiento del 90.07% como un sólido blanco que funde a $138\text{ }^\circ\text{C}$. En el espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) del compuesto se identificaron claramente las señales correspondientes al fragmento dimetilamino. Se observó un cuatriplete a 2.61 ppm ($J = 7.20$ Hz) con una integración correspondiente a cuatro hidrógenos, el cual, por su desplazamiento químico se atribuyó a los grupos metileno adyacentes al átomo de nitrógeno ($\text{H}_2\text{-11}$, $\text{H}_2\text{-11}'$). Asimismo, se detectó un triplete con una integración para seis hidrógenos a 1.10 ppm, asignado a los grupos metilo terminales del fragmento dimetilamino ($\text{H}_3\text{-12}$, $\text{H}_3\text{-12}'$). La señal del metileno puente ($\text{H}_2\text{-10}$, $\text{H}_2\text{-10}'$) se muestra como un singulete a 3.72 ppm con una integral para cuatro hidrógenos.

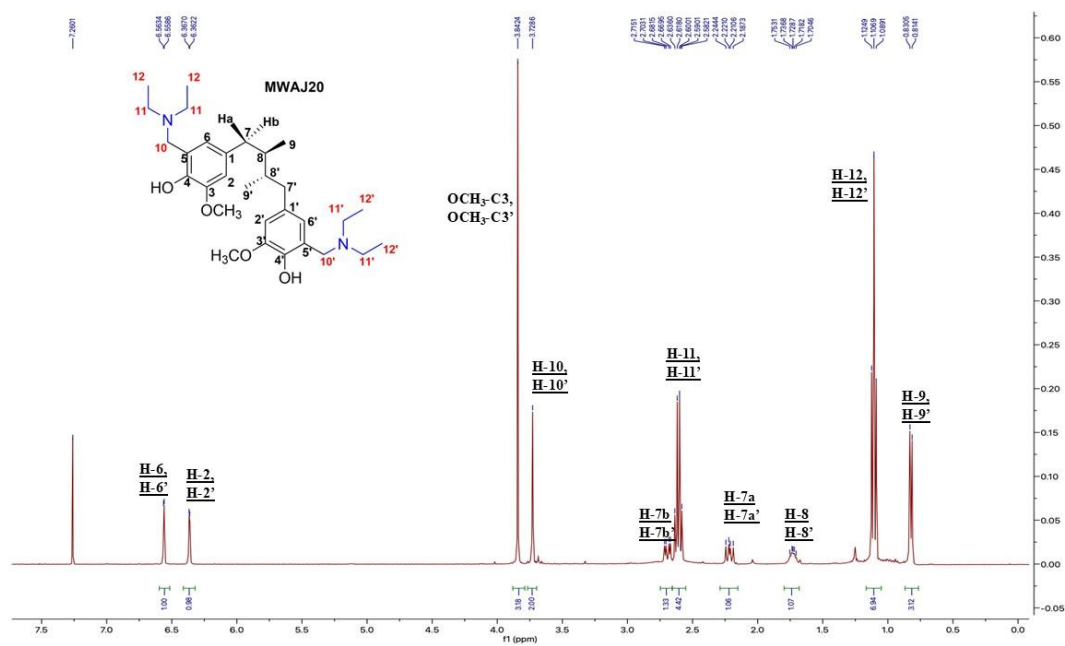


Figura 23. RMN ¹H de MWAJ20 (CDCl₃, 400 MHz).

5.2.1.5. Elucidación estructural de MWAJ22.

El compuesto MWAJ22 se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 77.28% y un punto de fusión de 160 °C. En el espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) se exhibe una señal singlete a 3.67 integrada para cuatro hidrógenos que corresponde al metileno puente (H₂-10, H₂-10') y dos señales correspondientes al fragmento de morfolina. Se observa un triplete, integrada para ocho hidrógenos a 3.73 ppm ($J = 4.56$ Hz), que, por su desplazamiento, corresponde a los grupos metileno

adyacentes al átomo de oxígeno (H₂-12, H₂-12'), y un singlete ancho que integra para ocho hidrógenos a 2.56 ppm, correspondiente a los metilenos vecinos al nitrógeno (H₂-11, H₂-11').

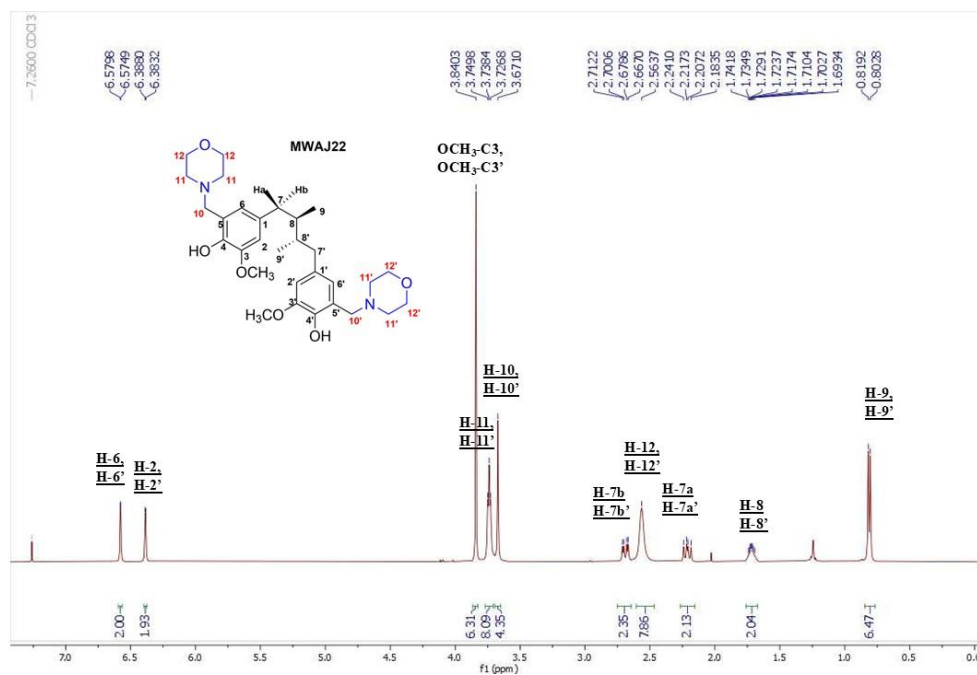


Figura 24. RMN ¹H de MWAJ22 (CDCl₃, 400 MHz).

5.2.1.6. Elucidación estructural de MWAJ24.

El derivado MWAJ24 se obtuvo como un sólido blanco con un rendimiento del 71.09%. En el espectro de ¹H-RMN (700 MHz, CD₃OD) se observa una señal singlete a 3.67 ppm, que integra para seis protones. Esta corresponde a la porción de 4-hidroxipiperidina, resultado del solapamiento entre las señales de los protones del metileno puente (H₂-10, H₂-10'), la falta de resolución en consecuencia con la libertad conformacional del anillo y el protón adyacente al grupo hidroxilo de la unidad de piperidina (H-13, H-13').

Las señales de los protones de los metilenos de la piperidina se desdoblaron en dos señales cada una consecuencia de los diferentes ambientes químicos generados por las orientaciones axiales y ecuatoriales en la conformación de silla del heterociclo de piperidina, la señal de los protones metilénicos adyacentes al nitrógeno se presentan como dos singletes anchos que integran para cuatro hidrógenos cada uno, centrados en 2.85 y 2.30 ppm, los cuales corresponden a (H-11_{ec}, H-11_{ec'}) y (H-11_{ax}, H-11_{ax'}) respectivamente.

De manera similar se muestran señales de multiplete a 1.89 y 1.58 ppm, con una integral para cuatro hidrógenos cada uno, correspondientes a (H-12ec, H-12ec') y (H-12ax, H-12ax') respectivamente, reflejando el mismo efecto conformacional y la no equivalencia magnética entre los protones geminales en la estructura.

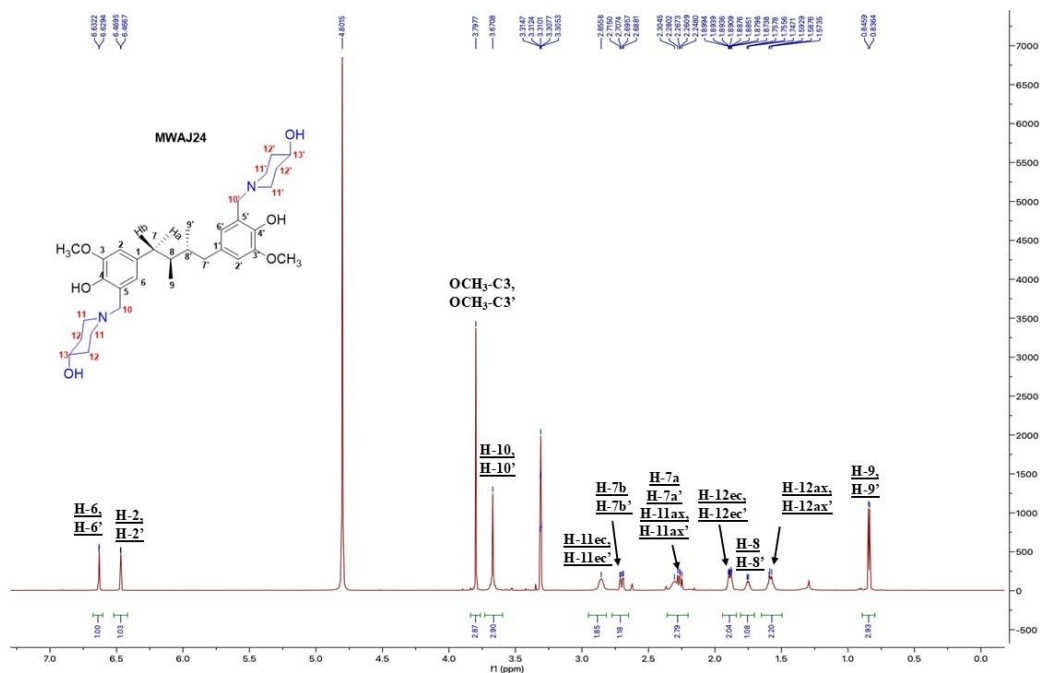


Figura 25. RMN ^1H de MWAJ24 (CD_3OD , 700 MHz).

5.2.1.7. Elucidación estructural de MWAJ25.

El producto MWAJ25 se obtuvo con un rendimiento del 67.6% como un sólido blanco que fundió a 124°C . En el espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) se observa la porción de piperidina como tres señales anchas, la primera como un singlete ancho a 2.49 ppm que por su desplazamiento e integral para ocho hidrógenos, se atribuye a los protones vecinos al nitrógeno de la piperidina (H_2 -11, H_2 -11'). La segunda señal se muestra como un multiplete a 1.62 ppm con una integral para ocho hidrógenos que corresponden a las posiciones (H_2 -12, H_2 -12'). Y finalmente, a campo más alto tenemos un multiplete en 1.47 ppm con una integral para cuatro hidrógenos asignados a (H_2 -13, H_2 -13').

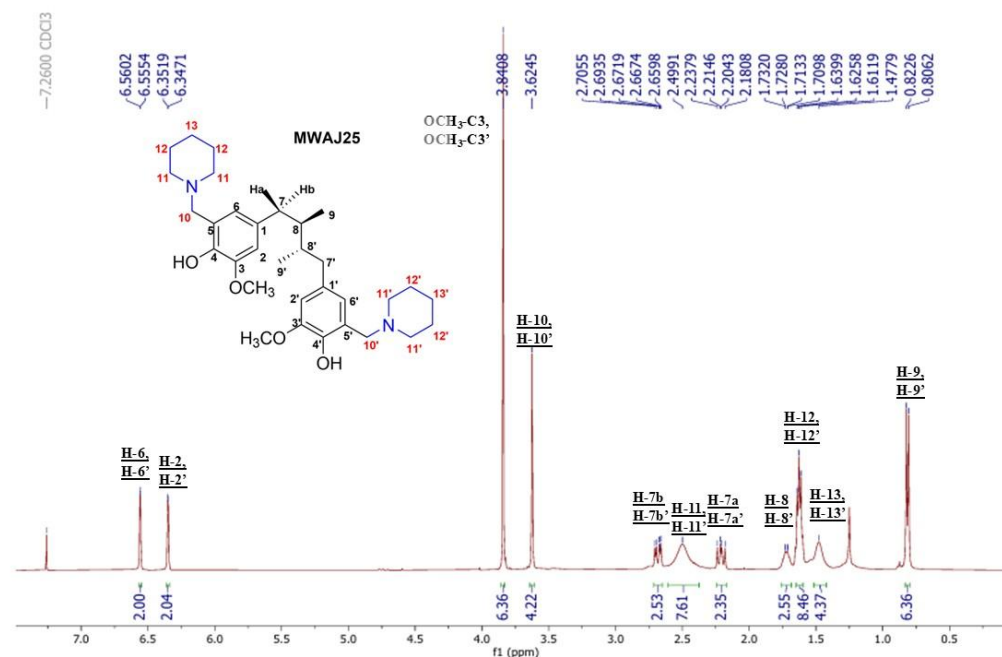


Figura 26. RMN ^1H de MWAJ25 (CDCl_3 , 400 MHz).

5.2.1.8. Elucidación estructural de MWAJ26.

El producto MWAJ26 se obtuvo con un rendimiento del 79.36% como cristales amarillos que fundieron a 118°C . En el espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) se identifican señales características correspondientes a la porción de pirrolidina incorporada en la base de Mannich. En particular, se observa un singulete ancho en el rango de 2.72 a 2.33 ppm donde se muestra la señal del protón diastereotópico (H-7b, H-7b') como un doble de doblete ($J = 13.28$ Hz y 4.76 Hz) parcialmente solapado con los protones metilénicos adyacentes al átomo de nitrógeno de la pirrolidina (H₂-11, H₂-11'). Adicionalmente, se registra un segundo multiplete ancho en 1.85 ppm, con una integral correspondiente a ocho protones, asignado a los metilenos restantes del anillo heterocíclico (H₂-12, H₂-12'), confirmando la presencia y correcta incorporación de la amina cíclica en la estructura del derivado.

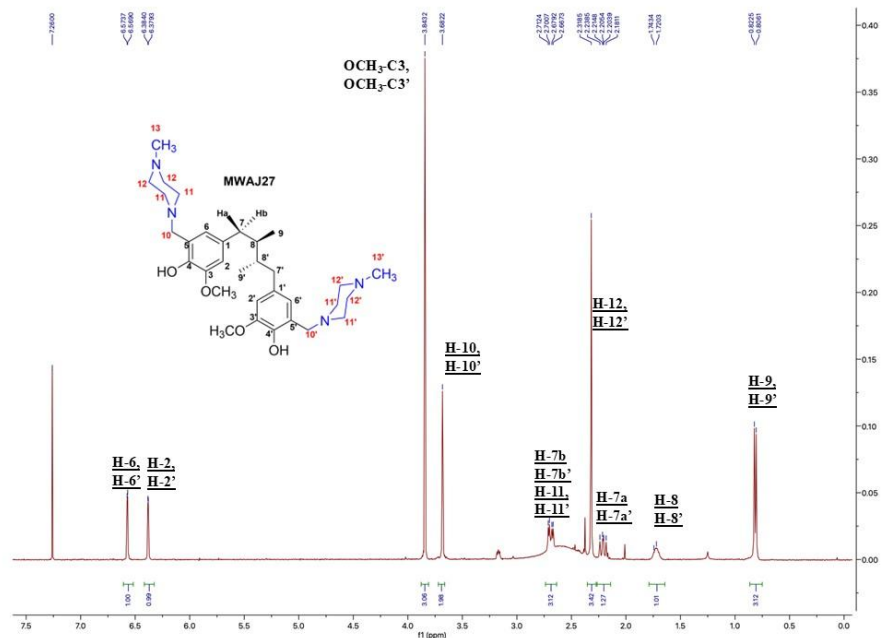


Figura 28. RMN ^1H de MWAJ27 (CDCl_3 , 400 MHz)

5.2.1.10. Elucidación estructural de MWAJ28.

El producto MWAJ28 se obtuvo con un rendimiento del 89.16% como un sólido blanco que fundió a 89°C . En el espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) se muestra la señal del metileno puente ($\text{H}_2\text{-10}$, $\text{H}_2\text{-10}'$) como un doblete a 3.58 ppm ($J = 3.16$ Hz) consecuencia de un acoplamiento a larga distancia con el protón del fenol (OH-4 , $\text{OH-4}'$) que forma un puente de hidrógeno con el primer nitrógeno. Además, se observa un multiplete complejo en el rango de 2.63 – 2.53 ppm que integran para cuatro hidrógenos que corresponde a los protones del sistema A_2B_2 ($\text{H}_2\text{-12}$, $\text{H}_2\text{-12}'$, $\text{H}_2\text{-13}$, $\text{H}_2\text{-13}'$) del fragmento etilendiamina también se acoplan a larga distancia con el OH que forma puente de hidrógeno con ambos nitrógenos. Finalmente, se observan dos singuletes a 2.28 ppm con una integral para doce hidrógenos y 2.24 ppm con una integral de seis hidrógenos correspondientes a los metilos adyacentes al nitrógeno ($\text{H}_3\text{-14}$, $\text{H}_3\text{-14}'$) y ($\text{H}_3\text{-11}$, $\text{H}_3\text{-11}'$) respectivamente.

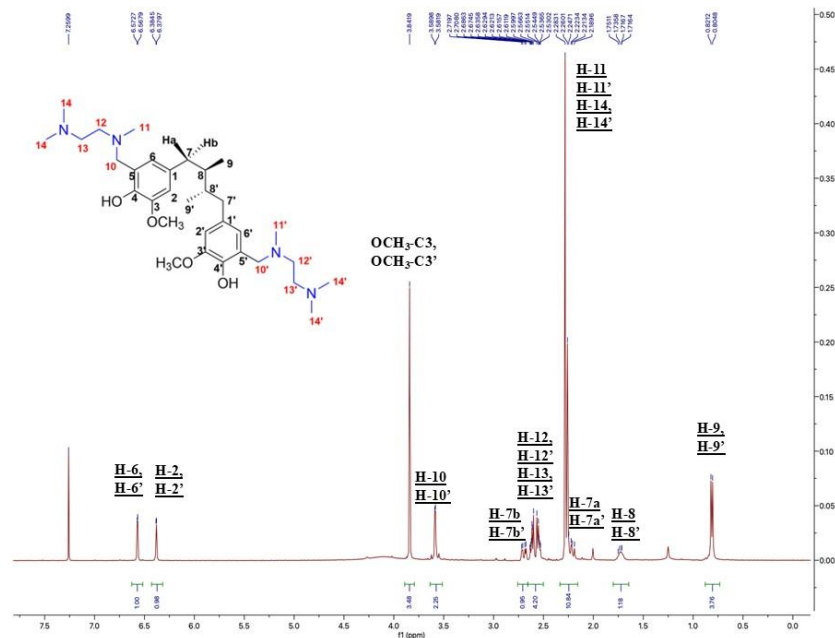


Figura 29. RMN ^1H de MWAJ28 (CDCl_3 , 400 MHz).

5.3 Análisis *in silico*.

El análisis *in silico* de los descriptores moleculares de los derivados tipo Mannich del *meso*-DGA permitió identificar tendencias claras entre las propiedades fisicoquímicas, los parámetros ADME y el comportamiento biológico observado *in vitro*. En comparación con el *meso*-DGA original, todos los derivados presentan un aumento considerable en la masa molecular y en la complejidad estructural, lo cual tiene un impacto directo sobre su permeabilidad, absorción y distribución.

Moléculas	Descriptores moleculares										
	Propiedades fisicoquímicas					Propiedades ADME					
	mol_MW	QPlogPo/w	PSA	DonorHB	AcceptHB	QPPCaco	HOA (%)	QPlogKhsa	#metab	QPlogBB	
<i>meso</i> -DGA	330.423	4.38	59.326	2	3	944.037	100	0.638	6	-1.033	
MWAJ1	614.824	2.04	121.405	4	14	1.867	30.78	0.255	14	-2.379	
MWAJ3	560.81	5.83	63	2	8	130.85	73.043	1.236	10	-0.009	
MWAJ18	444.613	4.338	65.213	2	7	103.157	88.385	0.817	10	-0.339	
MWAJ20	500.720	5.748	64.592	2	7	117.594	71.743	1.226	10	-0.565	
MWAJ22	528.687	3.995	82.043	2	10	131.157	75.283	0.564	12	-0.221	
MWAJ24	556.741	3.621	106.221	4	10	13.782	55.578	0.659	12	-1.602	
MWAJ25	524.742	5.947	62.868	2	7	137.524	74.124	1.455	10	-0.259	
MWAJ26	496.689	5.232	65.384	2	7	99.428	80.375	1.195	10	-0.412	
MWAJ27	554.771	3.362	74.825	2	11	17.252	55.808	0.808	12	-0.606	
MWAJ28	558.803	3.974	71.072	2	11	18.725	60.028	0.797	12	-0.974	

Figura 30. Descriptores moleculares de *meso*-DGA y derivados.

La mayoría de los derivados presentan valores de $Q\log P$ (≈ 3.3 – 5.9) que indican un carácter marcadamente lipofílico que favorece interacciones con bicapas lipídicas, lo que es consistente con la hipótesis de un mecanismo de acción basado en la perturbación de membranas, tanto bacterianas como eucariotas. Sin embargo, la ausencia de una correlación directa entre $Q\log P$ y actividad antibacteriana o citotoxicidad sugiere que la lipofilidad por sí sola no es determinante, sino que debe considerarse en conjunto con otros parámetros como la polaridad y la capacidad de ionización.

En este sentido, los valores de área de superficie polar (PSA) resultan particularmente relevantes. Mientras que el *meso*-DGA presenta un PSA moderado (59.33 \AA^2), algunos derivados como MWAJ1 y MWAJ24 exhiben valores elevados ($>100 \text{ \AA}^2$), lo que se asocia con una disminución marcada en la permeabilidad pasiva. Esto se refleja claramente en los valores de QPPCaco, donde compuestos con PSA alto muestran permeabilidades muy bajas (≈ 1 – 20 nm/s), en contraste con derivados con PSA intermedio (≈ 60 – 80 \AA^2), que conservan permeabilidades moderadas. Esta reducción en permeabilidad puede explicar por qué algunos derivados, a pesar de ser lipofílicos, no muestran una mejora sustancial en la actividad antibacteriana.

Los parámetros ADME predicen una absorción oral humana (HOA) moderada a alta para la mayoría de los derivados, aunque inferior a la del *meso*-DGA (100%). Esta disminución es esperable debido al aumento en masa molecular y número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno, lo cual limita la difusión pasiva. No obstante, la capacidad de estos compuestos para existir parcialmente en forma protonada, debido a la presencia de aminas terciarias, podría favorecer interacciones electrostáticas con membranas bacterianas cargadas negativamente, compensando parcialmente su menor permeabilidad pasiva.

Otro aspecto relevante es la unión a proteínas plasmáticas, reflejada por los valores positivos de $Q\log K_{hsa}$. La mayoría de los derivados muestran afinidad moderada a alta por albúmina sérica, lo que sugiere una fracción libre reducida en sistemas biológicos. Este fenómeno podría contribuir a la necesidad de concentraciones relativamente altas para observar actividad antibacteriana, y también influir en la citotoxicidad observada *in vitro*, donde la ausencia de proteínas séricas puede amplificar los efectos sobre membranas celulares.

Los valores de #metab indican el número de sitios susceptibles a biotransformación, el *meso*-DGA presentó #metab = 6, debido a que posee un eje de simetría integrando grupos susceptibles al efecto

de primer paso hepático como los dos fenoles (Ar-OH) y los dos metoxilos del anillo aromático (Ar-OCH₃). Chung J. y cols demostraron que el *meso*-DGA se metaboliza rápidamente, principalmente por *O*-desmetilación mediada por CYP y posterior glucuronidación de los fenoles por UGT [60]. En los derivados de Mannich, el incremento de #metab (≥ 10) posiblemente por la incorporación de la amina, la cual introduce nuevos puntos reales de biotransformación como la *N*-desalquilación oxidativa, oxidación α al nitrógeno y formación de *N*-óxidos, todas mediadas principalmente por CYP. En conjunto, estos cambios sugieren que, aunque los derivados mostraron mayor actividad biológica asociada a la protonación de las aminas, también podrían ser más susceptibles a metabolismo de Fase I que el *meso*-DGA original [61].

Finalmente, los valores negativos de QlogBB indican una baja probabilidad de penetración al sistema nervioso central, lo cual es favorable desde el punto de vista de seguridad y sugiere que los efectos citotóxicos observados no estarían asociados a una distribución preferencial en tejidos altamente protegidos, sino a interacciones inespecíficas con membranas celulares.

En conjunto, los resultados *in silico* apoyan la hipótesis de que los derivados tipo Mannich del *meso*-DGA actúan principalmente mediante interacciones fisicoquímicas con membranas, moduladas por un balance delicado entre lipofilia, polaridad y estado de ionización. Estas propiedades explican tanto la actividad antibacteriana parcial como la citotoxicidad observada, y sugieren que futuras optimizaciones estructurales deberán enfocarse en reducir la afinidad por membranas eucariotas sin perder la capacidad de interacción con membranas bacterianas, con el objetivo de mejorar la selectividad biológica.

5.4. Actividad antibacteriana de los derivados de *meso*-DGA

Se evaluó la actividad antibacteriana de diez derivados del *meso*-DGA frente a seis bacterias resistentes a antibióticos, previamente descritas en la sección de Materiales y Métodos (sección 4.1). De acuerdo con los resultados presentados en la Tabla 7, uno de los diez derivados tipo Mannich MWAJ18 (Figura 30) mostró actividad antibacteriana frente a una cepa gramnegativa resistente: *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos.

Tabla 6. Actividad antibacteriana (CMI mg/mL) de los derivados del *meso*-DGA.

DERIVADO	SARM	<i>EfrV</i>	<i>E. coli</i> BLEE	<i>K. pneumoniae</i> NDM-1 +	<i>A. baumannii</i> RC	<i>P. aeruginosa</i> RC
MWAJ1	>50	>50	>50	>50	>50	>50
MWAJ3	>50	>50	>50	>50	>50	>50
MWAJ18	>50	>50	>50	>50	25	>50
MWAJ20	>50	>50	>50	>50	>50	>50
MWAJ22	>50	>50	>50	>50	>50	>50
MWAJ24	>50	>50	>50	>50	>50	>50
MWAJ25	>50	>50	>50	>50	>50	>50
MWAJ26	>50	>50	>50	>50	>50	>50
MWAJ27	>50	>50	>50	>50	>50	>50
MWAJ28	>50	>50	>50	>50	>50	>50
Levofloxacino	3.125	>50	6.25	50	1.5625	0.390625

EfrV: Resistente a vancomicina, **BLEE**: Betalactamasas de espectro extendido, **NDM-1 +**: New Delhi metallo- β -lactamasa-1, **RC**: resistente a carbapenémicos.

El derivado MWAJ18 presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 25 μ g/mL, en este sentido se ha demostrado que el *meso*-DGA puede inducir alteraciones en la membrana bacteriana, este comportamiento es consistente con lo reportado para NDGA (14), un compuesto

estructuralmente relacionado, cuyo mecanismo de acción se ha vinculado con la perturbación de la bicapa lipídica y el aumento de la permeabilidad de la membrana, evidenciado por la fuga de ATP, lo que sugiere que la actividad antibacteriana de los derivados podría estar relacionada con la capacidad de interactuar con la membrana. Este mecanismo resulta plausible considerando la composición de la envoltura celular de *A. baumannii*, cuya membrana externa presenta una alta densidad de carga negativa debido a la abundancia de lipopolisacáridos y fosfolípidos aniónicos.

Los derivados tipo Mannich del *meso*-DGA poseen un carácter anfifílico y pueden existir como especies protonadas o como pares iónicos intramoleculares, lo que favorece interacciones electrostáticas con superficies bacterianas cargadas negativamente. En este contexto, la forma protonada del derivado activo podría facilitar el anclaje inicial a la membrana externa de *A. baumannii*, promoviendo alteraciones en la permeabilidad y permitiendo la acumulación intracelular del compuesto. Este mecanismo ha sido descrito previamente para compuestos catiónicos no clásicos, cuya actividad no depende de un blanco molecular específico, sino de la perturbación de la integridad de la membrana [63].

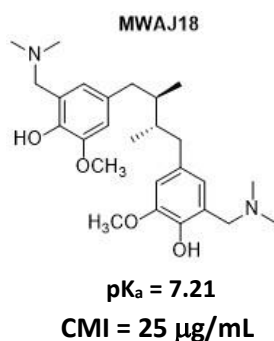


Figura 31. Compuestos con actividad contra *A. baumannii* resistente a carbapenémicos. El valor de pK_a se obtuvo en ChemDraw Professional v. 17.0.0.206.

Aunque el resto de las moléculas presentaron una CMI mayor a 50 µg/mL, los derivados de la figura 32 mostraron inhibición parcial del crecimiento frente a *E. faecium* resistente a vancomicina, con valores de IC₅₀ cercanos a 50 µg/mL. A diferencia de las bacterias Gramnegativas, *E. faecium* carece de membrana externa, pero su pared celular es rica en ácidos teicoicos y lipoteicoicos, los cuales confieren una carga negativa significativa [62].

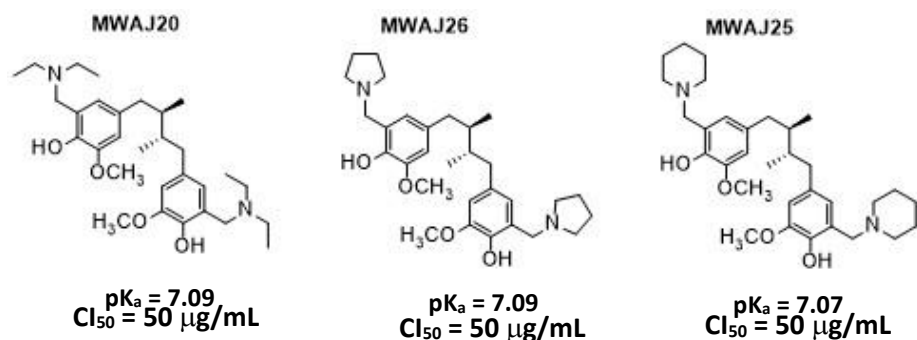


Figura 32. Compuestos que tuvieron actividad contra *E. faecium* resistente a vancomicina. Los valores de pK_a se obtuvieron en ChemDraw Professional v. 17.0.0.206.

Esta característica facilita la interacción con compuestos catiónicos o parcialmente protonados, como los derivados del *meso*-DGA. Sin embargo, la ausencia de una CMI definida sugiere que, aunque los compuestos pueden asociarse a la pared celular e interferir con procesos asociados a la membrana, esta interacción no es suficiente para provocar un efecto bactericida o bacteriostático completo en las condiciones evaluadas.

En el caso de *P. aeruginosa*, cinco derivados mostraron inhibición parcial del crecimiento bacteriano (figura 33), aunque no se alcanzó una CMI definida en el rango de concentraciones evaluado, este microorganismo es conocido por su alta resistencia intrínseca, asociada a una membrana externa poco permeable, la presencia de bombas de eflujo y la baja expresión de porinas inespecíficas.

La inhibición parcial observada sugiere que los derivados del *meso*-DGA logran interactuar con la membrana externa, posiblemente mediante interacciones electrostáticas con el lipopolisacárido, pero que los mecanismos de resistencia propios de esta bacteria limitan la acumulación del compuesto a niveles suficientes para una inhibición completa del crecimiento [64].

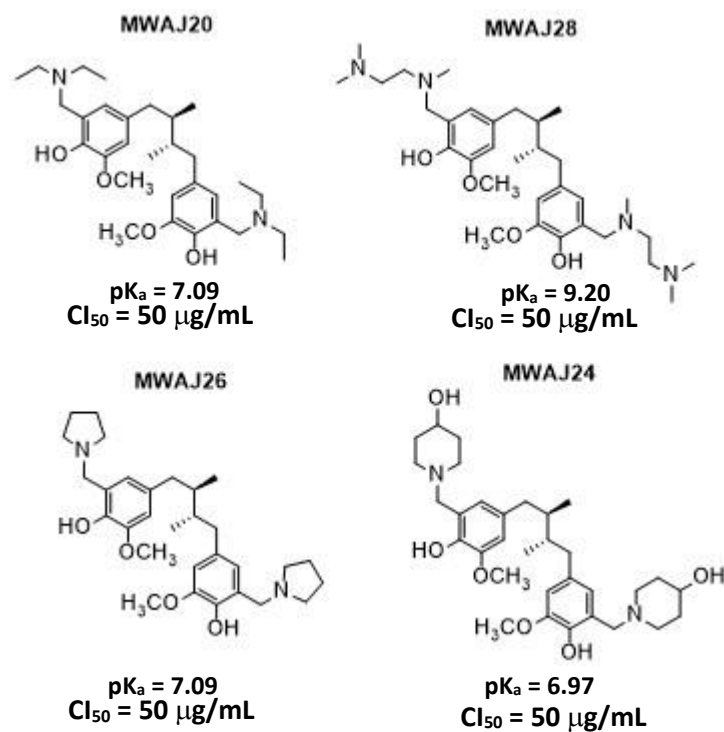


Figura 33. Compuestos que tuvieron actividad contra *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos: Los valores de pK_a se obtuvieron en ChemDraw Professional v. 17.0.0.206.

En este estudio se observó que los compuestos con mayor capacidad de protonarse mostraron una tendencia general hacia una mayor actividad antibacteriana parcial, lo que sugiere un papel relevante de las interacciones electrostáticas con la superficie bacteriana. No obstante, el compuesto MWAJ24 constituye una excepción a este patrón estructural, la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 4 del sustituyente piperidina incrementa significativamente la polaridad y el área de superficie polar del compuesto. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, cuya membrana externa presenta una elevada organización estructural y mecanismos restrictivos de permeabilidad, este aumento en polaridad puede favorecer interacciones [65].

La ausencia de actividad frente a SARM, *E. coli* y *K. pneumoniae* puede explicarse por diferencias estructurales en la envoltura celular. En SARM, la modificación de los ácidos teicoicos mediante D-alanilación reduce la carga negativa superficial, disminuyendo la afinidad por compuestos catiónicos [66]. En *E. coli*, la organización del lipopolisacárido y la selectividad de las porinas limitan el paso de moléculas anfífilas [67], mientras que *K. pneumoniae* presenta una cápsula polisacárida que actúa como una barrera física y electrostática adicional [68]

5.5. Citotoxicidad

La citotoxicidad de los derivados tipo Mannich de *meso*-DGA fue evaluada en la línea celular HaCaT con el fin de estimar su perfil de seguridad y analizar su relación con la actividad antibacteriana observada. Los resultados muestran una amplia variabilidad en los valores de IC₅₀, que oscilaron entre 3.01 y 30.23 µg/mL (Tabla 7), lo que evidencia que la naturaleza del sustituyente amínico influye de manera significativa en la interacción de estos compuestos con células eucariotas.

Tabla 8. Citotoxicidad, actividad antibacteriana e índice de selectividad (CI₅₀ mg/mL) de derivados de *meso*-DGA.

DERIVADO	<i>EfRV</i>	<i>A. baumani</i> RC	<i>P. aeruginosa</i> RC	CI ₅₀ HaCaT	IS (CI ₅₀ HaCaT/CI ₅₀ Bacteria)
MWAJ1	>50	>50	>50	30.23	NC
MWAJ3	>50	>50	>50	29.61	NC
MWAJ18	>50	>12.5	>50	NE	NC
MWAJ20	50	>50	>50	17.34	0.35
MWAJ22	>50	>50	>50	NE	NC
MWAJ24	>50	>50	50	12.01	0.24
MWAJ25	50	>50	>50	NE	NC
MWAJ26	50	>50	50	15.61	0.31
MWAJ27	>50	>50	>50	10.59	NC
MWAJ28	>50	50	50	3.01	0.06
Levofloxacino	>50	1.5625	0.390625	NE	NC
Etopósido	NE	NE	NE	11.30	NC

EfRV: *E. faecium* resistente a vancomicina, **RC**: resistente a carbapenémicos, **IS**: Índice de Selectividad, **NE**: No evaluado, **NC**: No calculado.

En particular, los derivados con actividad antibacteriana presentaron muy poca selectividad (IS 0.35-0.06). Esta relación sugiere que los compuestos no discriminan entre bacterias y células humanas, por lo que es probable que el mecanismo responsable de la citotoxicidad y del efecto antibacteriano podría compartir una base común, probablemente asociada a la alteración de la integridad de la membrana celular, más que a la interacción con un blanco molecular específico [69].

En este contexto, el *meso*-DGA conservaría el efecto de alteración de membrana del núcleo lignano, mientras que la introducción de grupos básicos podría modular la afinidad por membranas cargadas negativamente, tanto bacterianas como eucariotas. Estos resultados enfatizan la importancia de optimizar la naturaleza del sustituyente amina para mejorar la selectividad bacteriana, reduciendo la citotoxicidad hacia células humanas. Estrategias como la modulación de la basicidad, la incorporación de grupos polares adicionales o el control del estado de protonación podrían permitir conservar el efecto permeabilizante sobre bacterias, minimizando al mismo tiempo el daño a membranas eucariotas.

VI. Conclusiones

1. En el presente trabajo se logró el aislamiento y purificación de *meso*-DGA (517 mg) a partir del extracto orgánico de *Larrea tridentata* por métodos convencionales con un rendimiento de 1.29% a partir del extracto, cuya estructura fue confirmada mediante técnicas espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C .
2. A partir del *meso*-DGA se obtuvieron diez derivados *orto*-aminometilfenólicos semisintéticos, empleando la reacción clásica de Mannich en medio etanólico. Los productos obtenidos incluyeron derivados con aminas alifáticas y heterocíclicas, lo que permitió introducir diversidad estructural sobre el núcleo de tipo lignano original. Todas las estructuras fueron confirmadas mediante RMN ^1H y ^{13}C y espectrometría de masas de baja y alta resolución.
3. Seis de los diez derivados presentaron actividad antibacteriana (MWAJ18, MWA20, MWAJ24, MWAJ25, MWAJ26 Y MWAJ28) inhibiendo alrededor del 50% de crecimiento bacteriano contra una cepa grampositiva y dos cepas gramnegativas resistentes a antibióticos a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo MWAJ18 el más activo contra *A. baumannii* resistente a carbapenémicos alcanzando un valor de MIC de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.
4. La evaluación de citotoxicidad en la línea celular HaCaT mostró que los compuestos activos presentan, en general, un perfil de citotoxicidad moderado, lo que sugiere una ventana terapéutica preliminar y respalda su potencial para estudios posteriores de optimización estructural y selectividad bacteriana.
5. El análisis *in silico* de descriptores moleculares permitió correlacionar la actividad antibacteriana con propiedades fisicoquímicas como la lipofilicidad, el volumen molecular y la presencia de centros ionizables.
6. Los resultados obtenidos indican que la naturaleza de la amina introducida influye de manera importante en la actividad biológica, observándose una relación entre la actividad en derivados con aminas con su pK_a , lo cual puede atribuirse a un mejor balance entre lipofilicidad, polaridad e ionización, favoreciendo la interacción con la envoltura bacteriana.

VII. Referencias

1. Freire, N. Penicilina: cómo se descubrió, cómo actúa y por qué aumenta la resistencia bacteriana. *www.nationalgeographic.com.es*. September 27, 2023. https://www.nationalgeographic.com.es/ciencia/penicilina-pasado-y-futuro-lucha-bacteriana_20765.
2. Miethke, M.; Pieroni, M.; Weber, T.; Brönstrup, M.; Hammann, P.; Halby, L.; Arimondo, P. B.; Glaser, P.; Aigle, B.; Bode, H. B.; Moreira, R.; Li, Y.; Luzhetskyy, A.; Medema, M. H.; Pernodet, J.; Stadler, M.; Tormo, J. R.; Genilloud, O.; Truman, A. W.; Weissman, K. J.; Takano, E.; Sabatini, S.; Stegmann, E.; Brötz-Oesterheld, H.; Wohlleben, W.; Seemann, M.; Empting, M.; Hirsch, A. K. H.; Loretz, B.; Lehr, C. M.; Titz, A.; Herrmann, J.; Jaeger, T.; Alt, S.; Hesterkamp, T.; Winterhalter, M.; Schiefer, A.; Pfarr, K.; Hoerauf, A.; Graz, H.; Graz, M.; Lindvall, M. K.; Ramurthy, S.; Karlén, A.; Van Dongen, M.; Petković, H.; Keller, A.; Peyrane, F.; Donadio, S.; Fraisse, L.; Pidcock, L. J. V.; Gilbert, I. H.; Moser, H.; Müller, R. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nat. Rev. Chem* **2021**, 5 (10), 726–749. <https://doi.org/10.1038/s41570-021-00313-1>.
3. Nono, E. C. N.; Mkounga, P.; Kuete, V.; Marat, K.; Hultin, P. G.; Nkengfack, A. E. Pycnanthulignenes A-D, Antimicrobial Cycloignene Derivatives from the Roots of *Pycnanthus Angolensis*. *J Nat Prod* **2010**, 73 (2), 213–216. <https://doi.org/10.1021/np9007393>.
4. Lee, D. G.; Jung, H. J.; Woo, E.-R. *Antimicrobial Property of (+)-Lyoniresinol-3-O-D-Glucopyra-Noside Isolated From the Root Bark of Lycium Chinense Miller Against Human Pathogenic Microorganisms*; 2005; Vol. 28. <http://apr.psk.or.kr>.
5. Reyes-Melo, K.; García, A.; Romo-Mancillas, A.; Garza-González, E.; Rivas-Galindo, V. M.; Miranda, L. D.; Vargas-Villarreal, J.; Favela-Hernández, J. M. J.; Camacho-Corona, M. del R. Meso-Dihydroguaiaretic Acid Derivatives with Antibacterial and Antimycobacterial Activity. *Bioorg Med Chem* **2017**, 25 (20), 5247–5259. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.07.047>.
6. Favela-Hernández, J. M. J.; García, A.; Garza-González, E.; Rivas-Galindo, V. M.; Camacho-Corona, M. R. Antibacterial and Antimycobacterial Lignans and Flavonoids from *Larrea Tridentata*. *Phytother. Res.* **2012**, 26 (12), 1957–1960. <https://doi.org/10.1002/ptr.4660>.
7. Kudryavtseva, L. A.; Mirgorodskaya, A. B.; Molodykh, Z. V.; Gorbunov, S. M.; Shagidullina, R. A.; Yakubov, S. M. QUANTITATIVE STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS OF ORTHO-AMINOMETHYLPHENOLS AND THEIR DERIVATIVES. *Pharm Chem J.* **1993**, 27, 566-570. <https://doi.org/10.1007/BF00779917>.
8. Richter, M. F.; Hergenrother, P. J. THE CHALLENGE OF CONVERTING GRAM-POSITIVE-ONLY COMPOUNDS INTO BROAD-SPECTRUM ANTIBIOTICS. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 8718–8727. <https://doi.org/10.1002/anie.201800915>.

9. World Health Organization: WHO. *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=Datos%20y%20cifras%201%20La%20resistencia%20a%20los,determina%20la%20aparici%C3%B3n%20de%20pat%C3%B3genos%20farmacorresistentes.%20M%C3%A1s%20elementos>.
10. World Health Organization: WHO. *Resistencia a los antibióticos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.
11. De Oliveira, D. M. P.; Forde, B. M.; Kidd, T. J.; Harris, P. N. A.; Schembri, M. A.; Beatson, S. A.; Paterson, D. L.; Walker, M. J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **2020**. <https://doi.org/10.1128/CMR>.
12. Santajit, S.; Indrawattana, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed. Res. Int.* Hindawi Limited 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>.
13. Murray, C. J.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; Johnson, S. C.; Browne, A. J.; Chipeta, M. G.; Fell, F.; Hackett, S.; Haines-Woodhouse, G.; Kashef Hamadani, B. H.; Kumaran, E. A. P.; McManigal, B.; Agarwal, R.; Akech, S.; Albertson, S.; Amuasi, J.; Andrews, J.; Aravkin, A.; Ashley, E.; Bailey, F.; Baker, S.; Basnyat, B.; Bekker, A.; Bender, R.; Bethou, A.; Bielicki, J.; Boonkasidecha, S.; Bukosia, J.; Carvalheiro, C.; Castañeda-Orjuela, C.; Chansamouth, V.; Chaurasia, S.; Chiurchiù, S.; Chowdhury, F.; Cook, A. J.; Cooper, B.; Cressey, T. R.; Criollo-Mora, E.; Cunningham, M.; Darboe, S.; Day, N. P. J.; De Luca, M.; Dokova, K.; Dramowski, A.; Dunachie, S. J.; Eckmanns, T.; Eibach, D.; Emami, A.; Feasey, N.; Fisher-Pearson, N.; Forrest, K.; Garrett, D.; Gastmeier, P.; Giref, A. Z.; Greer, R. C.; Gupta, V.; Haller, S.; Haselbeck, A.; Hay, S. I.; Holm, M.; Hopkins, S.; Iregbu, K. C.; Jacobs, J.; Jarovsky, D.; Javanmardi, F.; Khorana, M.; Kisson, N.; Kobeissi, E.; Kostyanev, T.; Krapp, F.; Krumkamp, R.; Kumar, A.; Kyu, H. H.; Lim, C.; Limmathurotsakul, D.; Loftus, M. J.; Lunn, M.; Ma, J.; Mturi, N.; Munera-Huertas, T.; Musicha, P.; Mussi-Pinhata, M. M.; Nakamura, T.; Nanavati, R.; Nangia, S.; Newton, P.; Ngoun, C.; Novotney, A.; Nwakanma, D.; Obiero, C. W.; Olivas-Martinez, A.; Olliaro, P.; Ooko, E.; Ortiz-Brizuela, E.; Peleg, A. Y.; Perrone, C.; Plakkal, N.; Ponce-de-Leon, A.; Raad, M.; Ramdin, T.; Riddell, A.; Roberts, T.; Robotham, J. V.; Roca, A.; Rudd, K. E.; Russell, N.; Schnall, J.; Scott, J. A. G.; Shivamallappa, M.; Sifuentes-Osornio, J.; Steenkeste, N.; Stewardson, A. J.; Stoeva, T.; Tasak, N.; Thaiprakong, A.; Thwaites, G.; Turner, C.; Turner, P.; van Doorn, H. R.; Velaphi, S.; Vongpradith, A.; Vu, H.; Walsh, T.; Waner, S.; Wangrangsimaikul, T.; Wozniak, T.; Zheng, P.; Sartorius, B.; Lopez, A. D.; Stergachis, A.; Moore, C.; Dolecek, C.; Naghavi, M. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *The Lancet* **2022**, 399 (10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
14. *National Infection & Death Estimates for AR*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/drugresistance/national-estimates.html>.
15. Giono-Cerezo, S.; Santos-Preciado, J. I.; Morfín-Otero, M. del R.; Torres-López, F. J.; Alcántar-Curiel, M. D. Resistencia Antimicrobiana. Importancia y Esfuerzos Por Contenerla. *Gac Med Mex* **2020**, 156 (2). <https://doi.org/10.24875/GMM.20005624>.
16. World Health Organization: WHO; World Health Organization: WHO. *Tuberculosis*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>.

17. *Biosíntesis y crecimiento de la pared celular*.
http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/micro-ianez/06_micro.htm.
18. Brunton, L.L.; Hilal-Dandan, R.; Knollmann, B.C. Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 13ª ed.; McGraw-Hill Education: México, **2018**.
19. Stone, K. J.; Stromingert, J. L. *Mechanism of Action of Bacitracin: Complexation with Metal Ion and C55-Isoprenyl Pyrophosphate (Molecular Model/Chelating Agents/Ternary Complex/Cell Wall Synthesis/Peptidoglycan)*; **1971**; Vol. 68
20. Calvo, J.; Martínez-Martínez, L. Mecanismos de Acción de Los Antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2009**, 27 (1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>.
21. Davies, J.; Davies, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, 74 (3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/mubr.00016-10>.
22. World Health Organization: WHO. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. *World Health Organization*. febrero 27, 2017. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accedido 2024-03-01).
23. Ramirez, A.M.; *Resistencia a antimicrobianos en cepas aisladas de hortalizas*; Tesis de Maestría; Universidad de Jaén; **2019**.
24. Díaz, G.; Alberto, J.; Rojas, M.; Padilla, V.; Eduardo, D.; Díaz, M.; Palomares, M.; Rikimatsu, I.; Alberto Guevara Díaz, J. *Resistencia Bacteriana: Organismos Del Grupo ESKAPE*; **2021**; Vol. 41.
25. Ardanuy, C.; María, E. C.; Morosini, I.; Torres, C. “Detección Fenotípica de Mecanismos de Resistencia en Gram Positivos”. En *Procedimientos En Microbiología Clínica Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* Editado por Emilia Cercenado y Rafael Cantón, SEIMC, España, **2011**.
26. Calvo, J.; Cantón, R.; Cuenca, F. F.; Mirelis, B.; Navarro, F. “Detección Fenotípica de Mecanismos de Resistencia en Gram Negativos”. *Procedimientos En Microbiología Clínica Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Editado por Emilia Cercenado y Rafael Cantón, SEIMC, España, **2011**.
27. Barbachyn, M. R. Recent advances in the discovery of hybrid antibacterial agents. *Annu. Rep. Med. Chem.* **2008**, 43, 281–290. [https://doi.org/10.1016/S0065-7743\(08\)00017-1](https://doi.org/10.1016/S0065-7743(08)00017-1)
28. Adukwu, E. C.; Allen, S. C. H.; Phillips, C. A. The Anti-Biofilm Activity of Lemongrass (*Cymbopogon Flexuosus*) and Grapefruit (*Citrus Paradisi*) Essential Oils against Five Strains of *Staphylococcus Aureus*. *J Appl Microbiol* **2012**, 113 (5), 1217–1227.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05418.x>.
29. Calvo, J.; Martínez-Martínez, L. Mecanismos de Acción de Los Antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2009**, 27 (1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>.
30. Xu, X. Y.; Wang, D. Y.; Li, Y. P.; Deyrup, S. T.; Zhang, H. J. Plant-Derived Lignans as Potential Antiviral Agents: A Systematic Review. *Phytochem. Rev.* **2022**, 21, 239–289.
<https://doi.org/10.1007/s11101-021-09758-0>.
31. Wang, L.-X.; Wang, H.-L.; Huang, J.; Chu, T.-Z.; Peng, C.; Zhang, H.; Chen, H.-L.; Xiong, Y.-A.; Tan, Y.-Z. Review of Lignans from 2019 to 2021: Newly Reported Compounds, Diverse Activities, Structure-Activity Relationships and Clinical Applications. *Phytochem. Rev.* **2022**, 202, 113326. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2022.113326>.

32. Kawazoe, K.; Yutani, A.; Tamemoto, K.; Yuasa, S.; Shibata, H.; Higuti, T.; Takaishi, Y. Phenylanthracene Compounds from the Subterranean Part of *Vitex Rotundifolia* and Their Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *J Nat Prod* **2001**, *64* (5), 588–591. <https://doi.org/10.1021/np000307b>.
33. Ding, J. Y.; Yuan, C. M.; Cao, M. M.; Liu, W. W.; Yu, C.; Zhang, H. Y.; Zhang, Y.; Di, Y. T.; He, H. P.; Li, S. L.; Hao, X. J. Antimicrobial Constituents of the Mature Carpels of *Manglietiastrum Sinicum*. *J Nat Prod* **2014**, *77* (8), 1800–1805. <https://doi.org/10.1021/np500187c>.
34. PubChem. *Dihydroguaiaretic acid, meso-*. PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dihydroguaiaretic-acid_-meso#section=Structures.
35. Lin, D.; Xiao, M.; Zhao, J.; Li, Z.; Xing, B.; Li, X.; Kong, M.; Li, L.; Zhang, Q.; Liu, Y.; Chen, H.; Qin, W.; Wu, H.; Chen, S. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. *Molecules* **2016**, *21* (10), 1374. <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>.
36. Abarca-Vargas, R.; Petricevich, V. L. Importancia Biológica de Los Compuestos Fenólicos. *Inventio* **2018**, *14* (34), 33–38. <https://doi.org/10.30973/inventio/2018.14.34/4>.
37. Rempe, C. S.; Burris, K. P.; Lenaghan, S. C.; Stewart, C. N. The potential of systems biology to discover antibacterial mechanisms of plant phenolics. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00422>.
38. Clemente-Soto, A. F.; Balderas-Rentería, I.; Rivera, G.; Segura-Cabrera, A.; Garza-González, E.; Del Rayo Camacho-Corona, M. Potential Mechanism of Action of meso-Dihydroguaiaretic Acid on *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Molecules* **2014**, *19* (12), 20170–20182. <https://doi.org/10.3390/molecules191220170>.
39. Cunningham-Oakes, E.; Soren, O.; Moussa, C. *et al.* Nordihydroguaiaretic Acid Enhances the Activities of Aminoglycosides Against Methicillin-Sensitive and Resistant *Staphylococcus aureus* *in vitro* and *in vivo*. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1195. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01195>
40. Boehm, H.-J.; Boehringer, M.; Bur, D.; Gmuender, H.; Huber, W.; Klaus, W.; Kostrewa, D.; Kuehne, H.; Luebbers, T.; Meunier-Keller, N.; Mueller, F. Novel inhibitors of DNA gyrase: 3D structure based biased needle screening, HIT validation by biophysical methods, and 3D guided optimization. a promising alternative to random screening. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (14), 2664–2674. <https://doi.org/10.1021/jm000017s>.
41. Roman, G. Mannich Bases in Medicinal Chemistry and Drug Design. *Eur. J. Med. Chem.* Elsevier Masson SAS, **2015**, pp 743–816. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.10.076>.
42. Jeyakkumar, P.; Liu, H. B.; Gopala, L.; Cheng, Y.; Peng, X. M.; Geng, R. X.; Zhou, C. H. Novel Benzimidazolyl Tetrahydroprotoberberines: Design, Synthesis, Antimicrobial Evaluation

and Multi-Targeting Exploration. *Bioorg Med Chem Lett* **2017**, *27* (8), 1737–1743.
<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.02.071>.

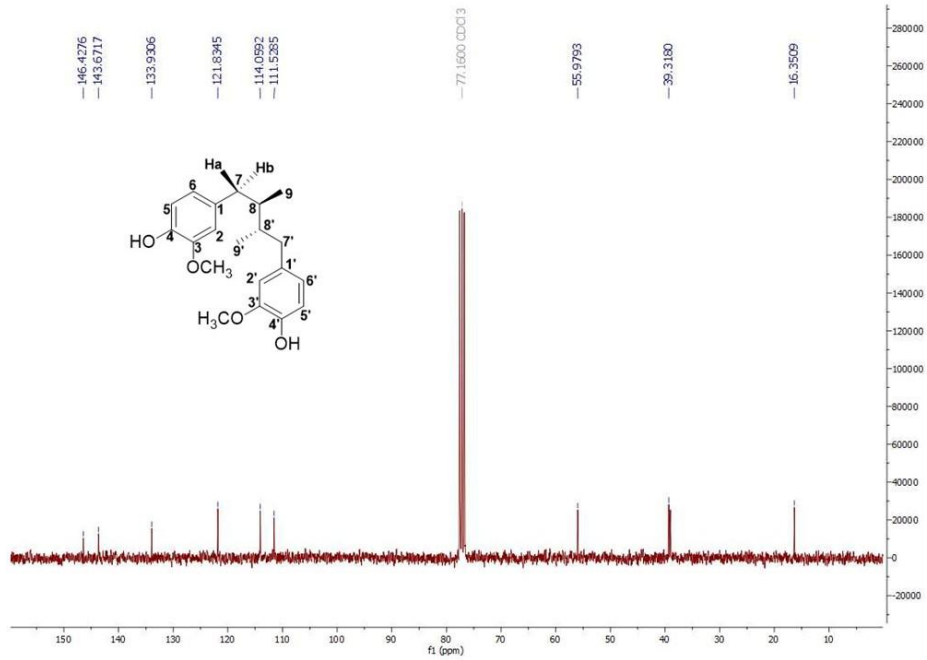
43. Neto, Í.; Andrade, J.; Fernandes, A. S.; Pinto Reis, C.; Salunke, J. K.; Priimagi, A.; Candeias, N. R.; Rijo, P. Multicomponent Petasis-Borono Mannich Preparation of Alkylaminophenols and Antimicrobial Activity Studies. *ChemMedChem* **2016**, 2015–2023.
<https://doi.org/10.1002/cmdc.201600244>.
44. Mannich, C.; Krösche, W. Ueber Ein Kondensationsprodukt Aus Formaldehyd, Ammoniak Und Antipyrin. *Arch Pharm (Weinheim)* **1912**, *250* (1), 647–667.
<https://doi.org/10.1002/ardp.19122500151>.
45. TRAMONTINI, M. Advances in the Chemistry of Mannich Bases. *Synthesis (Stuttg)* **1973**, *1973* (12), 703–775. <https://doi.org/10.1055/s-1973-22294>.
46. Cardellicchio, C.; Ciccarella, G.; Naso, F.; Schingaro, E.; Scordari, F. *The Betti Base: Absolute Configuration and Routes to a Family of Related Chiral Nonracemic Bases*; **1998**; 9.
47. Cardellicchio, C.; Capozzi, M. A. M.; Naso, F. The Betti Base: The Awakening of a Sleeping Beauty. *Tetrahedron Asymmetry*. March 30, **2010**, *21*, 507–517.
48. Zhang, L.; Ren, L.; Bai, M.; Weng, L.; Huang, J.; Wu, L.; Deng, M.; Zhou, X. Synthesis and Biological Activities of Quinazoline Derivatives with Ortho-Phenol-Quaternary Ammonium Salt Groups. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (22), 6920–6926.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.07.053>.
49. Kim, S.; Hong, S. H. Ruthenium-Catalyzed Aminomethylation and Methylation of Phenol Derivatives Utilizing Methanol as the C1 Source *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359* (5), 798–810.
<https://doi.org/10.1002/adsc.201601117>.
50. Hwang, D. R.; Uang, B. J. A Modified Mannich-Type Reaction Catalyzed by VO(Acac)₂. *Org. Lett.* **2002**, *4* (3), 463–466. <https://doi.org/10.1021/ol017229j>
51. Dai, J. L.; Shao, N. Q.; Zhang, J.; Jia, R. P.; Wang, D. H. Cu(II)-Catalyzed Ortho-Selective Aminomethylation of Phenols. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139* (36), 12390–12393.
<https://doi.org/10.1021/jacs.7b06785>.
52. Gupta, S.; Chandna, N.; Dubey, P.; Singh, A. K.; Jain, N. GO-Cu₇S₄ Catalyzed: Ortho - Aminomethylation of Phenol Derivatives with N, N -Dimethylbenzylamines: Site-Selective Oxidative CDC. *Chem. Commun.* **2018**, *54* (54), 7511–7514.
<https://doi.org/10.1039/c8cc03396j>.
53. Yu, C.; Patureau, F. W. Kupfer-katalysierte dehydrierende ortho -Aminomethylierung von Phenolen. *Angew. Chem.* **2018**, *130* (36), 11981–11985.
<https://doi.org/10.1002/ange.201804829>.
54. Sun, W.; Lin, H.; Zhou, W.; Li, Z. Oxidative Ortho-Amino-Methylation of Phenols via C-H and C-C Bond Cleavage. *RSC Adv.* **2014**, *4* (15), 7491–7494.
<https://doi.org/10.1039/c3ra46373g>.
55. Zgoda, J. R.; Porter, J. R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. *Pharm. Biol.* **2001**, *39* (3), 221–225.
<https://doi.org/10.1076/phbi.39.3.221.5934>.
56. Franzblau, S. G.; Witzig, R.; McLaughlin, J. C.; Torres, P.; Madico, G.; Hernández, A. M.; Degan, M. T.; Cook, M. B.; Quenzer, V. K.; Ferguson, R. M.; Gilman, R. H. Rapid, Low-Technology MIC Determination with Clinical Mycobacterium tuberculosis Isolates by Using

- the Microplate Alamar Blue Assay. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36* (2), 362–366.
<https://doi.org/10.1128/jcm.36.2.362-366.1998>.
57. Monks, A.; Scudiero, D. A.; Skehan, P.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Vistica, D. T.; Hose, C.; Langley, J. D.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H. D.; Mayo, J. G.; Boyd, M. R. Feasibility of a High-Flux Anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83* (11), 757–766.
<https://doi.org/10.1093/jnci/83.11.757>.
58. Schrödinger, LLC. *QikProp, Version 6.0; User Manual*; Schrödinger, LLC: New York, NY, USA, 2021.
59. Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protoc.* **2016**, pdb.prot087379.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
60. Chung, J. Y.; et al. Metabolic characterization of meso-dihydroguaiaretic acid in liver microsomes and in mice. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *76*, 94–102.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.12.007>
61. EH-Haj, B. M. Metabolic N-dealkylation and N-oxidation as elucidators of the role of alkylamino moieties in drugs acting at various receptors. *Molecules* **2021**, *26* (7), 1917.
<https://doi.org/10.3390/molecules26071917>
62. Weidenmaier, C.; Peschel, A. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 276–287.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1861>
63. Simpson, B. W.; Nieckarz, M.; Pinedo, V.; McLean, A. B.; Cava, F.; Trent, M. S. *Acinetobacter baumannii* can survive with an outer membrane lacking lipooligosaccharide due to structural support from elongasome peptidoglycan synthesis. *mBio* **2021**, *12* (6), e0309921. <https://doi.org/10.1128/mBio.0309921>
64. Yu, F.; et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, host interaction, and emerging therapeutics. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7*, 276. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01056-1>
65. Yuan, J.; Wang, J.; Li, X.; Zhang, Y.; Xian, J.; Wang, C.; Zhang, J.; Wu, C. Amphiphilic small-molecule antimicrobials: From cationic antimicrobial peptides to mechanism-related, structurally diverse antimicrobials. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *262*, 115896.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115896>
66. Brogden, K. A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3* (3), 238–250. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
67. Choi, U.; Lee, C. R. Distinct roles of outer membrane porins in antibiotic resistance and membrane integrity in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 953.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00953>
68. Fleeman, R. M.; Macias, L. A.; Brodbelt, J. S.; Davies, B. W. Defining principles that influence antimicrobial peptide activity against capsulated *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2020**, *117* (44), 27620–27626.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2007036117>

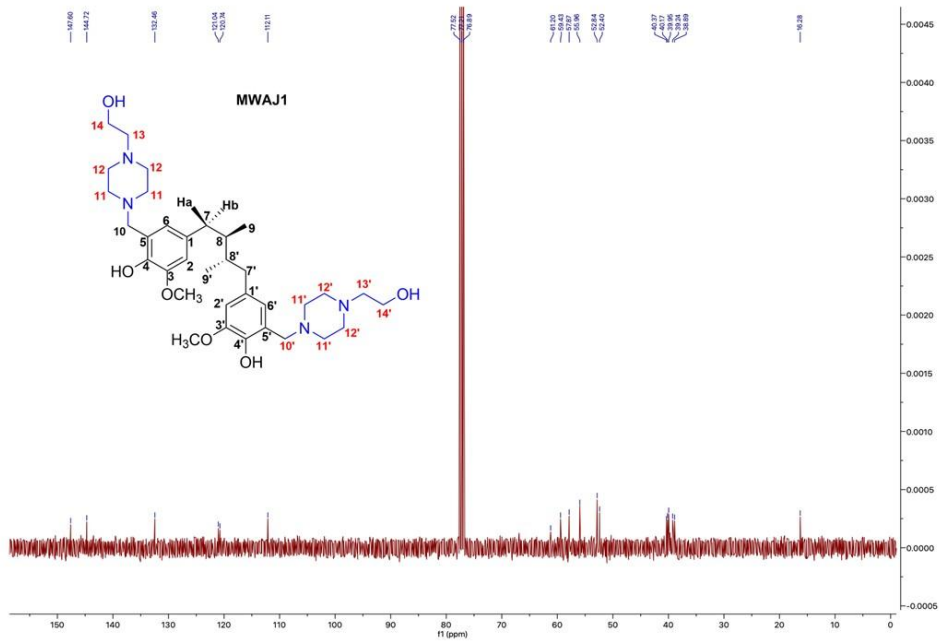
69. Domínguez-Chavarría, J. A.; García, A.; Romo-Mancillas, A.; Reyes-Melo, K. Y.; Chávez-Villarreal, K. G.; Vázquez-Ramírez, A. L.; Ávalos-Alanís, F. G.; Cabral-Romero, C.; Hernández-Delgadillo, R.; García-Cuellar, C. M.; Camacho-Corona, M. D. R. Cytotoxicity activity of some meso-dihydroguaiaretic acid derivatives and mode of action of the most active compound. *Chem. Biodivers.* **2024**, *21* (2), e202301930.
<https://doi.org/10.1002/cbdv.202301930>

VIII. Anexos

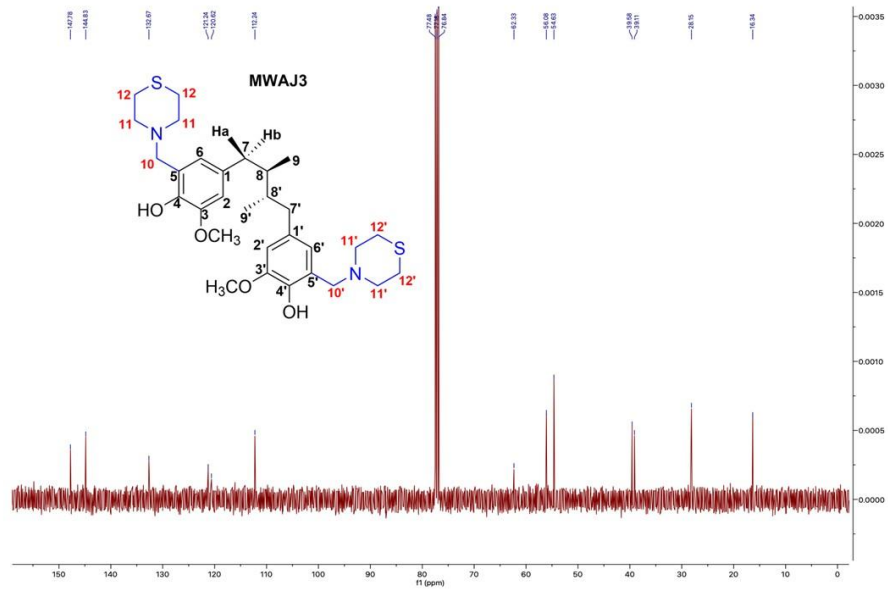
Espectros de RMN ^{13}C de *meso*-DGA y sus derivados.



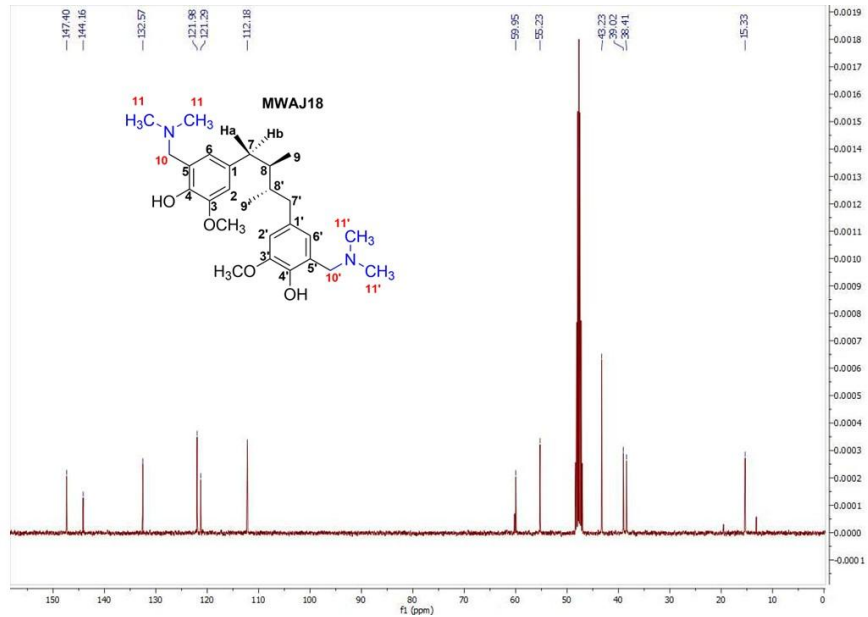
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) de *meso*-DGA.



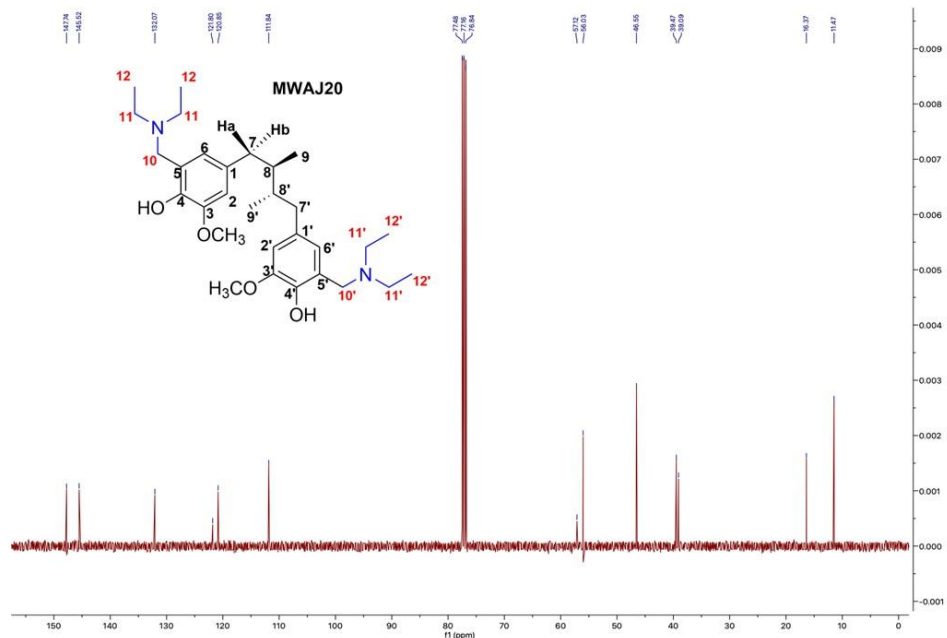
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) del compuesto MWAJ1.



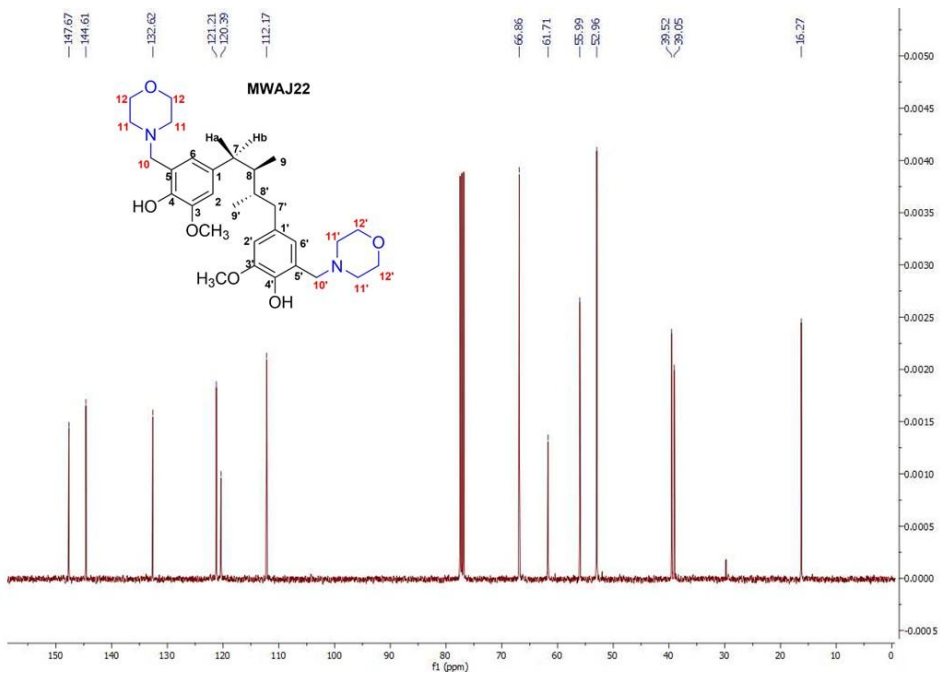
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **MWAJ3**.



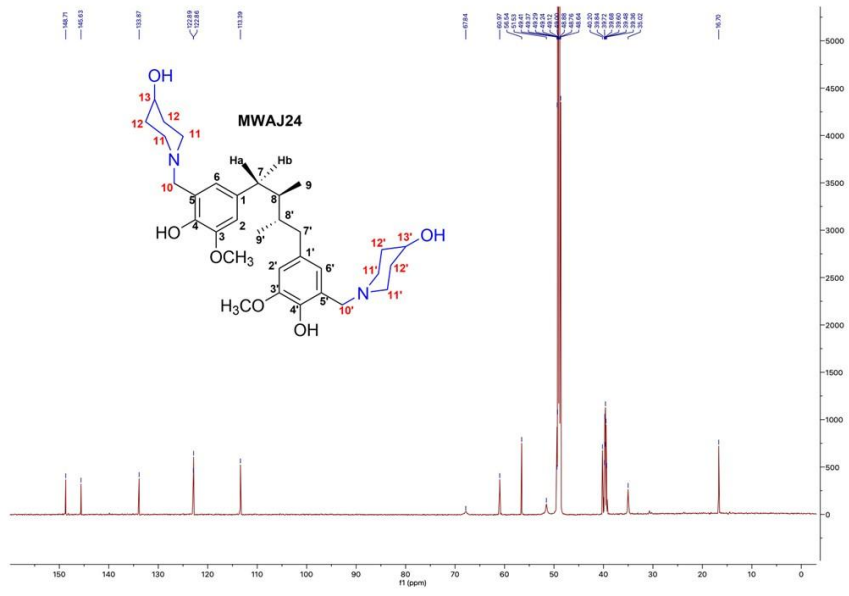
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) del compuesto **MWAJ18**



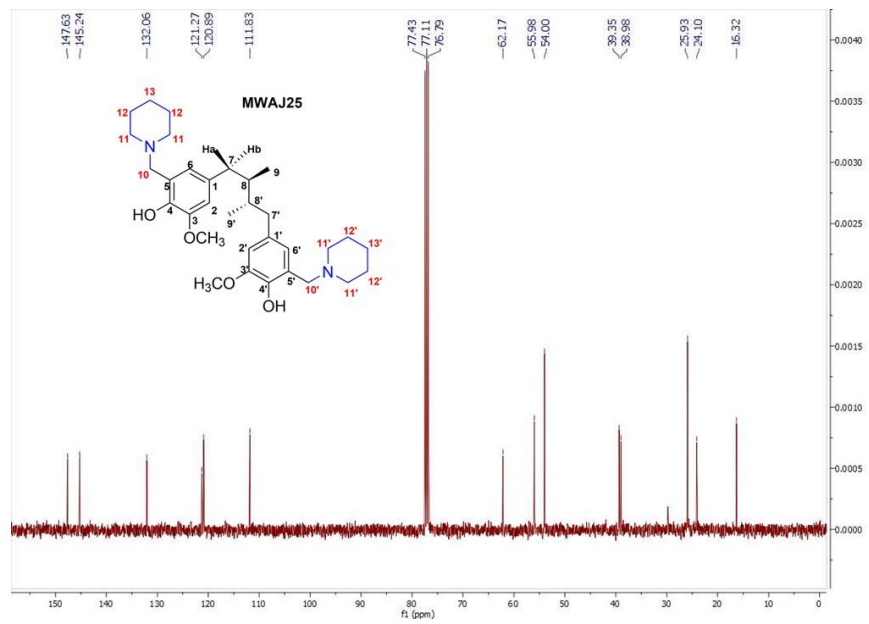
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **MWAJ20**.



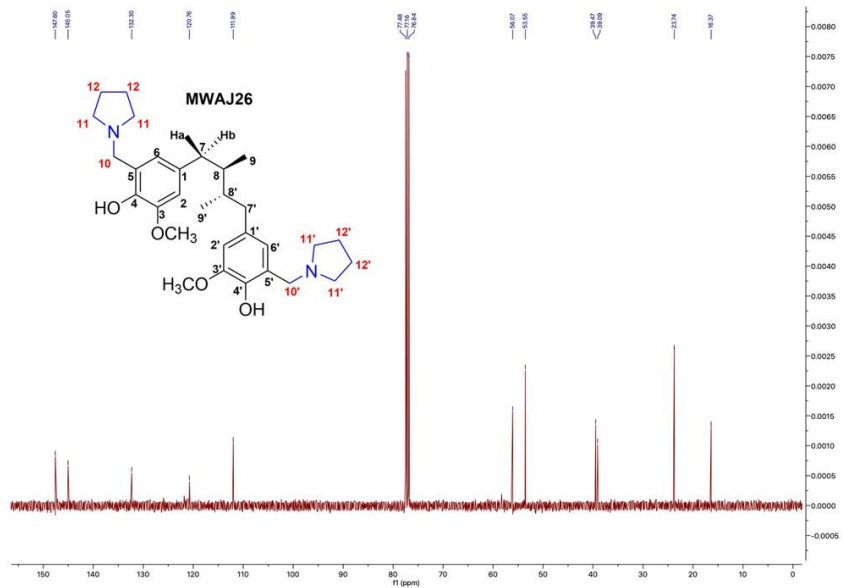
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **MWAJ22**.



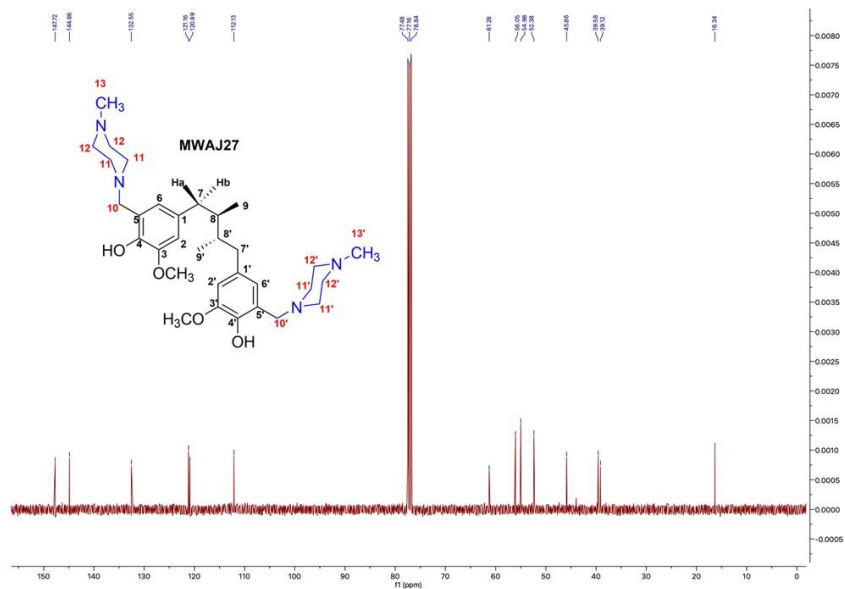
Spectro de RMN ¹³C (175 MHz, CD₃OD) del compuesto **MWAJ24**.



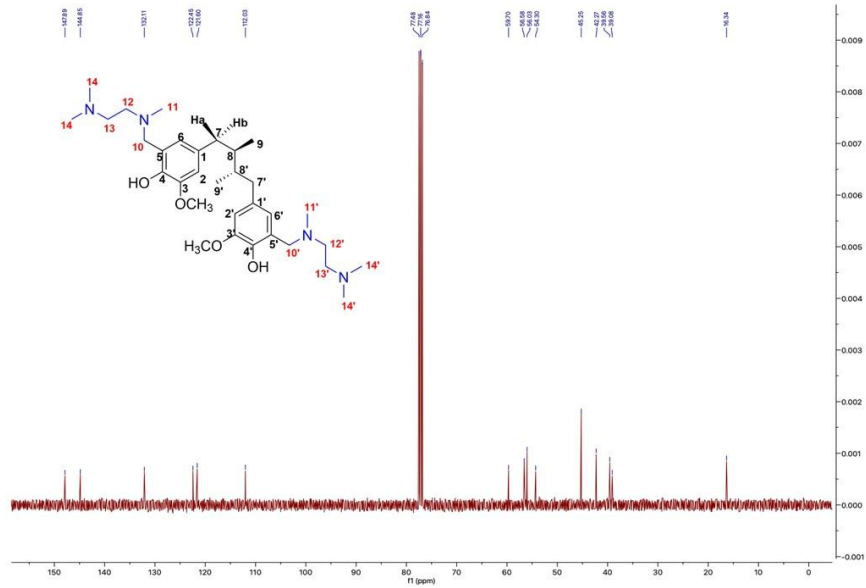
Spectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) del compuesto **MWAJ25**.



Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **MWAJ26**



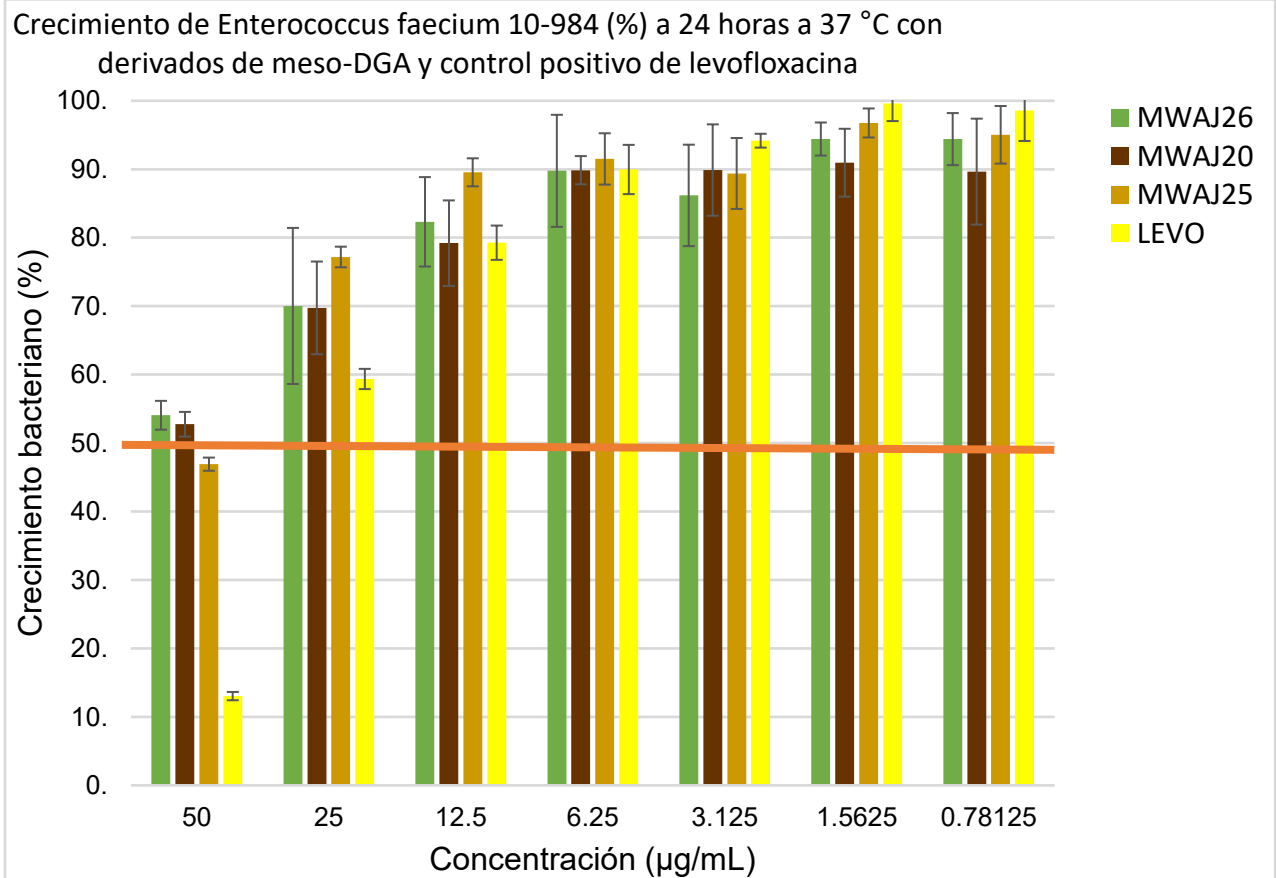
Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **MWAJ27**.



Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del compuesto **MWAJ28**.

Resultados de la actividad antibacterial expresado en porcentaje de crecimiento bacteriano.

Gráfica de porcentaje de crecimiento de *E. faecium* resistente a vancomicina.



Gráfica de porcentaje de crecimiento de *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos.

