

# Productos naturales en la búsqueda de compuestos antimicrobianos: estrategias actuales

## Natural products in the search for antimicrobial computers: current strategies

@ artículos

**Autores:** TIBALDI BOLLATI, María L.; RODRIGUEZ RISTAU, Eugenia; RECIO BALSELLS, Alejandro I; CONTESSI, Yamila S; CONDAT, Félix; NICOTRA, Viviana E.; CASERO, Carina N; GARCÍA, Manuela E.

**Filiación Institucional:** Departamento de Química Orgánica. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. IMBIV-CONICET. Córdoba - Argentina.

**Fecha de Recepción:** Octubre de 2023

**Fecha de Aceptación:** Noviembre de 2023

**Contacto:** casero@unc.edu.ar, manuelagarcia@unc.edu.ar

### Resumen

La resistencia a los antimicrobianos es uno de los problemas de salud más graves a nivel mundial, ya que las terapias antibacterianas disponibles se están volviendo cada vez más inefectivas en el tratamiento de patologías infecciosas. En el escenario actual, no existe ningún agente terapéutico eficaz con el potencial de revertir la resistencia a los antimicrobianos, por lo que muchos laboratorios líderes (a nivel industrial y académico) están trabajando intensamente para descubrir nuevos agentes terapéuticos. En este sentido, los compuestos naturales de origen vegetal están relativamente poco estudiados en el contexto del desarrollo de fármacos antimicrobianos.

Los productos naturales han sido de gran interés en el proceso de descubrimiento de fármacos debido a su diversidad y complejidad estructural, novedad química y bioactividad. Es así que, a la fecha, se ha descrito el aislamiento de compuestos naturales provenientes de varios organismos, incluidos bacterias, hongos, invertebrados, especies marinas y plantas. Todos ellos han contribuido enormemente al desarrollo de fármacos contra diversas enfermedades humanas. Por citar algunos ejemplos, doxorrubicina, bleomicinas, penicilinas, epotilonas, paclitaxel, camptotecina, las podofilotoxinas y los alcaloides de la vinca hoy son algunos de los principios activos más conocidos derivados de bacterias, hongos o plantas. Es por ello que en este artículo perspectiva, abordaremos la temática desde los diferentes enfoques que actualmente se utilizan para explorar el potencial terapéutico antimicrobiano de los metabolitos de origen vegetal o sus derivados.

Finalmente, luego del análisis de los bloques presentados, arribamos a la conclusión de la imperiosa necesidad de la investigación exhaustiva del potencial antimicrobiano de los metabolitos de las plantas. A su vez, estas estructuras privilegiadas biológicamente relevantes, pueden constituir nuevas entidades químicas con eficacia antimicrobiana mejorada mediante su derivatización o vehiculización. Otro punto importante por destacar es la necesidad de examinar el papel de estos compuestos junto con antibióticos usados actualmente en la práctica clínica para explorar posibles efectos sinérgicos.

## Palabras clave

Productos naturales, actividad antimicrobiana, resistencia a fármacos, semisíntesis, vehiculización.

## Abstract

Antimicrobial resistance is one of the most serious health problems worldwide, as many pathogens are rapidly developing resistance to the existing treatments. In the current scenario, there is no effective therapeutic agent with the potential to reverse antimicrobial resistance, so many leading laboratories (at industrial and academic level) are working intensively to discover new therapeutic agents. In this sense, natural compounds of plant origin are relatively less studied in the context of antimicrobial drug development.

Natural products have been of great interest in the drug discovery process due to their structural diversity and complexity, chemical novelty, and bioactivity. Thus, to date, the isolation of natural compounds from various organisms has been described, including bacteria, fungi, invertebrates, marine organism and plants. All of these have made significant contributions to the development of drugs for various human diseases. To cite some examples, doxorubicin, bleomycins, penicillins, epothilones, paclitaxel, camptothecin, podophyllotoxins and vinca alkaloids are today some of the best-known active ingredients derived from bacteria, fungi or plants. For all above, in this perspective article, we will address the topic from the different approaches that are currently used to explore the antimicrobial therapeutic potential of metabolites of plant origin or their derivatives.

Finally, after analyzing the sections presented, we arrive to the conclusion of the urgent need for exhaustive research into the antimicrobial potential of plant metabolites. Indeed, these privileged biologically relevant structures can constitute new chemical entities with improved antimicrobial efficacy through their derivatization or vehiculization. Another important point to highlight is the need to examine the role of these compounds together with antibiotics currently used in clinical practice in order to explore possible synergistic effects.

## Keywords

Natural products, antimicrobial activity, drug resistance, semisynthesis, vehicle.

## Abreviaturas (a)

<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno singlete	CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
ADMET	Absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad	CIN	Cinamaldehído
ADQCD	Amidoquelocardina	CtD	Complejidad a Diversidad
AgNPs	Nanopartículas de plata	CNTs	Nanotubos de carbono
ALE	Extracto acuoso de hojas de aloe	ECDC	Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades
BLEE	β-lactamasas de espectro extendido	EROS	Especies reactivas de oxígeno
BBR	Berberina	ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y especies de <i>Enterobacter</i>
CBM	Concentración Bactericida Mínima		
Chi	Quitosano		

Eu	Eugenol	O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
FC/FD	Farmacocinética/Farmacodinamia	O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	Anión superóxido
<i>FDA</i>	Administración de Alimentos y Medicamentos Estadounidense	OH•	Radical hidroxilo
FoR	Frecuencia de resistencia	OTC	Oxitetraciclina
FS	Fotosensibilizador	PCL	Poli(-caprolactona)
GN	Gram-negativo	<i>PKS</i>	Policétido sin tasa
GP	Gram-positivo	PN	Productos naturales
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno	<i>PLA</i>	Ácido poliláctico
HHC	Hidrato de hidracina	QCD	Quelocardina
HTS	Cribado de alto rendimiento	SAR	Relaciones estructural-actividad
<i>HZI</i>	Centro Helmholtz para la Investigación de Infecciones	SLN	Nanopartículas lipídicas sólidas
ITUc	Infecciones del tracto urinario complicadas	<i>SmChiB</i>	Quitinasa B de <i>Serratia marcescens</i>
MoR	Mecanismo de resistencia	RAM	Resistencia a antimicrobianos
<i>MRSA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	TFD	Terapia fotodinámica
<i>NCEs</i>	Nuevas entidades químicas	TFDa	Terapia fotodinámica antimicrobiana
NE	Nanoemulsión		
NP	Nanopartículas		
OMS	Organización Mundial de la Salud		
Ofx	Ofloxacino		

(a) Las abreviaturas en cursiva corresponden a siglas en inglés

## Consideraciones generales

### Farmacorresistencia: Relevancia de la problemática

Una era post-antimicrobianos, en la que las infecciones comunes y las lesiones menores pueden matar, lejos de ser una fantasía apocalíptica, es más bien una posibilidad muy real para el siglo XXI, aunque parezca una frase sacada de un tabloide, es la perspectiva de la OMS sobre el problema de la resistencia a los antimicrobianos en las bacterias, tan grave que amenaza los logros de la medicina moderna.

La resistencia bacteriana a los antibióticos se define como la capacidad de las bacterias para sobrevivir en concentraciones de antibióticos que inhiben o matan a otras de la misma especie. La presión selectiva resultante del uso extensivo de antimicrobianos durante las últimas décadas ha provocado la aparición y la diseminación de genes de resistencia entre los microorganismos patógenos. Debido a que los "más aptos" sobreviven, las estrategias para sobrellevar la muerte inducida por los antibióticos se transmiten a la siguiente generación a través de la división celular, lo que garantiza la proliferación de las ventajas evolutivas. Además, los mecanismos de resistencia también se comparten entre las bacterias a través de la transferencia horizontal de genes.<sup>(1)</sup> Los principales mecanismos por los cuales las bacterias desarrollan resistencia a los antibióticos incluyen cambios en el objetivo del fármaco, prevención de entrada a la célula, eliminación mediante bombas de eflujo o inactivación de fármacos, entre otros.<sup>(2)</sup>

La rápida evolución y diseminación de RAM en múltiples especies patógenas es un fenómeno natural que supera ampliamente la velocidad del descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos y constituye una grave amenaza para la salud pública a nivel global. En este sentido, la OMS prevé para los próximos años un desastre sanitario debido al aumento rápido y descontrolado de la resistencia al tratamiento con antibióticos y otros medicamentos que actualmente salvan vidas. De particular preocupación es la creciente resistencia de patógenos nosocomiales del grupo ESKAPE, causantes de morbilidad y mortalidad significativamente altas, principalmente en pacientes con infecciones críticas e inmunodeprimidos.<sup>(3)</sup> En la actualidad, el fenómeno de resistencia a los antibióticos representa un problema sanitario, económico y social grave, y ha sido percibido y alertado por diversos organismos a nivel mundial, incluida la Comisión Europea, el ECDC y la OMS, entre otros, convirtiendo la problemática de RAM en un tema de prioridad en los últimos años. Esto se ve reflejado en importantes informes emitidos por dichas organizaciones en la última década.<sup>(4)</sup> En este sentido, a nivel nacional, en agosto del año 2022 se sancionó la ley de Prevención y Control de la Resistencia Antimicrobiana, que tiene como uno de los objetivos fundamentales el uso responsable de los antibióticos y regula cuestiones referidas al expendio y uso de estos medicamentos, tanto en salud humana como animal.<sup>(5)</sup>

En lo que respecta al proceso de descubrimiento, desarrollo y aprobación de nuevos antibióticos, desde 1970, solo se han comercializado tres nuevas clases de antibióticos. De hecho, a pesar del creciente número de NCE disponibles, la última nueva clase de antibiótico descubierta fue la daptomicina (1986), aprobada por la FDA en 2003.<sup>(6)</sup>

Debido a que las dos causas fundamentales de aparición de resistencia bacteriana se resumen en el sobre- y mal uso de los mismos, esta problemática debe abordarse a través de diferentes acciones,<sup>(7)</sup> incluidas el estricto control mundial del uso de antibióticos, la investigación de nuevas dianas biológicas, el desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico para cepas resistentes, procesos de desarrollo y evaluación de fármacos más rápidos y adaptables para la producción de antibacterianos y la promoción de la investigación y desarrollo de nuevos compuestos con nuevos mecanismos de acción.<sup>(8) (9) (10)</sup>

### **Rol de las especies vegetales medicinales y sus extractos en la medicina humana integral**

Desde tiempos inmemoriales, las plantas medicinales y sus extractos han desempeñado un papel fundamental en una diversidad de tratamientos, incluyendo su uso como agentes antiinflamatorios, antidepresivos, estimulantes, sedantes y en la lucha contra enfermedades infecciosas.<sup>(11)</sup> En la actualidad numerosas poblaciones continúan empleando extractos de plantas para el tratamiento de enfermedades, siendo una parte integral de la medicina tradicional.

El sudeste asiático, el continente africano y los pueblos originarios de Latinoamérica poseen una rica tradición en el uso de plantas medicinales. En la Argentina, los pueblos mapuche y toba, entre otros, son los que más utilizan la medicina basada en plantas medicinales. Un ejemplo destacado es el Centro de Salud Intercultural Raguíñ Kien, inaugurado en la provincia de Neuquén en el año 2021, donde se combina la medicina tradicional mapuche y la biomedicina moderna.<sup>(12) (13)</sup>

En la actualidad, la Farmacopea Argentina, reconoce un total de 29 preparaciones medicamentosas de origen vegetal, entre los que se incluyen ajo, eucalipto, ginkgo, ginseng, hipérico, valeriana y yerba mate entre otros. Estas plantas continúan siendo fuentes valiosas de agentes terapéuticos naturales y desempeñan un papel significativo en la salud y el bienestar de la población.<sup>(14)</sup>

La medicina tradicional aborda la salud de manera holística, ya que los extractos vegetales contienen numerosas moléculas que pueden interactuar con múltiples blancos biológicos. Por otro lado, la medicina moderna a menudo adopta un enfoque reduccionista, proponiendo la utilización de un compuesto que actúa sobre un solo blanco biológico relacionado con la enfermedad en cuestión.

Ambos enfoques presentan ventajas y desventajas, lo que destaca la importancia de una integración, balance y respeto mutuo entre la medicina tradicional y moderna. Un ejemplo de esta convergencia es el creciente interés en la medicina moderna por el enfoque polifarmacológico, donde se buscan tratamientos que utilicen dos o más fármacos con actividades sinérgicas. Esto ha demostrado ser especialmente útil en la lucha contra la generación de resistencia en enfermedades infecciosas, un desafío cada vez más apremiante.

En cuanto a las ventajas de la medicina tradicional basada en plantas, es importante destacar en general su coste reducido y la accesibilidad que ofrece a las regiones rurales, que a menudo se encuentran distantes de los centros de salud convencionales. Sin embargo, esta forma de medicina también enfrenta desafíos significativos, como la falta de estandarización del material vegetal o extracto, la posibilidad de adulteraciones y la falta de ensayos clínicos que respalden su eficacia y seguridad.<sup>(15)</sup>

### Relevancia de los productos naturales como fuente de nuevos fármacos

Los (PN, o metabolitos especializados (compuestos puros aislados luego de un estudio fitoquímico exhaustivo) se han utilizado en la medicina tradicional a lo largo de la historia de la humanidad, por lo que son una fuente invaluable de inspiración en el diseño y desarrollo de medicamentos.<sup>(16)</sup> Como prueba de ello, de las 1881 NCEs aprobadas para uso como fármacos por la FDA desde 1981 a 2019, los PN o sus derivados representan casi un 50% de los fármacos existentes en la actualidad.<sup>(17)</sup> Al respecto, se destacan ejemplos ampliamente reconocidos como el fármaco anticancerígeno Taxol® de *Taxus brevifolia*, el fármaco antipalúdico artemisinina<sup>(18)</sup> aislado de *Artemisia annua*, el analgésico narcótico morfina de *Papaver somniferum* y el antibiótico penicilina de *Penicillium* ssp. Hay muchos otros ejemplos en los que la Naturaleza se comporta como una fuente potencial de compuestos activos.<sup>(19)</sup> Los PN poseen una clara ventaja de base estructural sobre la contraparte sintética, ya que son considerados estructuras privilegiadas.<sup>(20)</sup> Esto es resultado de la selección a lo largo de la evolución de las especies, que presupone una alta tridimensionalidad de las moléculas naturales junto a una amplia variedad de grupos funcionales en orientaciones espaciales únicas, lo que aumenta la posibilidad de interacciones específicas con ligandos biológicos.<sup>(21)</sup> Sin embargo, si bien el éxito clínico de los compuestos candidatos a fármacos está directamente relacionado con estos aspectos, a veces la complejidad estructural de los PN, su toxicidad y farmacocinética desfavorable pueden limitar su potencial uso clínico. Estas desventajas que, en ciertas ocasiones, comprometen la acción terapéutica de los PN, ha motivado a los químicos orgánicos, medicinales y a la comunidad biológica a explorar diferentes estrategias de modificación estructural sobre estructuras líderes. Otra alternativa posible es el abordaje de nuevas estrategias de diseño y formulación para aumentar la selectividad, la acción terapéutica, mejorar propiedades fisicoquímicas y la farmacocinética de los congéneres obtenidos;<sup>(22)</sup> donde la nanovehiculización se muestra como una herramienta de gran utilidad por su enorme potencialidad y versatilidad. La obtención de sistemas en escala nanométrica se focaliza en el cumplimiento de metas específicas, con el fin de optimizar la *performance* biológica de los PN bioactivos.<sup>(23) (24)</sup>

Respecto a la obtención de NCEs como posibles agentes terapéuticos, actualmente las plataformas de HTS constituyen una pieza fundamental para el descubrimiento de compuestos líderes.<sup>(25)</sup> Las familias de compuestos orgánicos construidas a partir de esta metodología resultan estructuralmente diferentes a los PN respecto a la complejidad del esqueleto hidrocarbonado (sistema anular), el porcentaje de carbonos con hibridización  $sp^3$ , el contenido de heteroátomos y el número de estereocentros.<sup>(26)</sup> Sin embargo, aunque muchos objetivos biológicos puedan ser modulados por este tipo de compuestos,<sup>(27)</sup> esta estrategia conduce por lo general a moléculas relativamente planas y carentes de complejidad estereoquímica.

En este sentido, para tomar ventaja de las numerosas características estructurales y biológicas distintivas de los PN y aprovechando el poder de la química orgánica aplicada a la derivatización y formulación, los esfuerzos en esta área de investigación aplicada a la búsqueda de antimicrobianos de origen natural se conjugan sinérgicamente.

## Objetivos

Por todo lo anteriormente expuesto, esta revisión tiene como objetivo ofrecer una descripción general de diferentes abordajes actuales en el uso de PN como antimicrobianos. Asimismo, revisaremos diversas estrategias para la generación de análogos de PN, citando ejemplos representativos de cada caso, como así también nuevos enfoques de nanovehiculización que pretenden mejorar las propiedades biológicas de los PN en terapia antimicrobiana. A la fecha, las siguientes estrategias constituyen los ejes de trabajo que abordamos de manera multidisciplinaria en nuestro grupo de investigación.



**Figura 1:** Principales estrategias de búsqueda y mejora de antimicrobianos de origen natural abordados en esta revisión.

A continuación, se desarrollarán las diferentes herramientas usadas como estrategias de búsqueda y de mejora de compuestos antimicrobianos. Para cada una de ellas se hará una presentación de cada abordaje y se elegirán ejemplos representativos que permitan visualizar los alcances de cada metodología.

### A) Búsqueda de nuevas entidades químicas

#### A-1) Estrategias de aislamiento de compuestos bioactivos a partir de extractos vegetales

En la actualidad, la búsqueda de compuestos de origen natural se ha intensificado debido a la creciente preocupación por la aparición de cepas microbianas resistentes a los tratamientos convencionales. Como resultado, se han realizado numerosos avances focalizados en el descubrimiento de nuevos compuestos bioactivos que puedan hacer frente a esta problemática. Además, se ha ampliado la investigación hacia fuentes naturales poco estudiadas como las plantas terrestres no vasculares denominadas briofitas.<sup>(28)</sup>

Por lo general, la selección de las especies vegetales a analizar se suele basar en varios criterios, como su uso en la medicina tradicional, la presencia de ciertas familias de compuestos, (ej. flavonoides, terpenos y alcaloides, etc.) o su distribución en regiones específicas.<sup>(29)</sup>

La búsqueda de compuestos activos a través de la exploración fitoquímica de extractos vegetales se centra en dos enfoques principales, tradicional y bioguiado (Figura 2). En el enfoque de fitoquímica tradicional, se evalúa la actividad de cada metabolito obtenido luego de distintas etapas de purificación del extracto. Por otro lado, en los estudios fitoquímicos bioguiados o fraccionamientos bioguiados, solamente se seleccionan aquellos extractos y/o fracciones que presentan actividad y se procede a su purificación hasta el aislamiento de los metabolitos puros responsables de la actividad biológica. Actualmente, los estudios de fitoquímica bioguiada son los más comunes debido a su mayor eficiencia en términos de tiempo y de recursos.<sup>(30)</sup> No obstante, como desventaja en estos enfoques, algunos metabolitos activos presentes en los extractos pueden pasar desapercibidos debido a efectos de sinergia, aditividad, antagonismo y/o variaciones en la concentración de cada metabolito en el extracto.<sup>(31) (32)</sup>

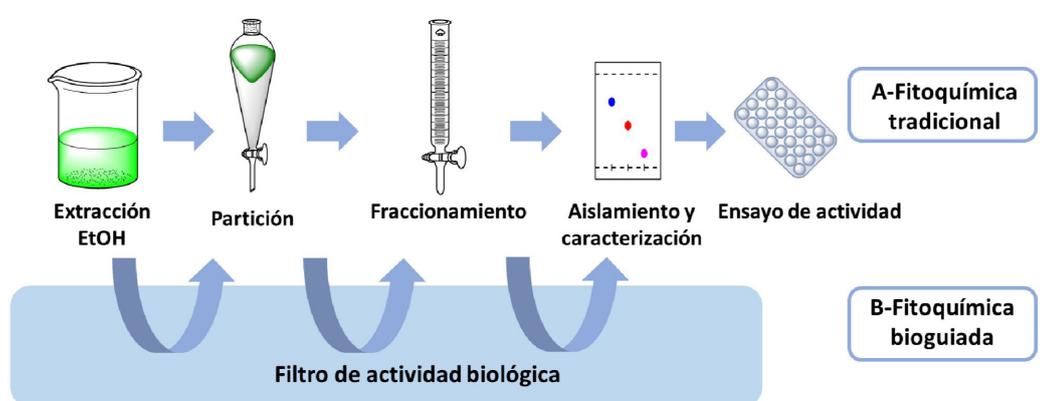
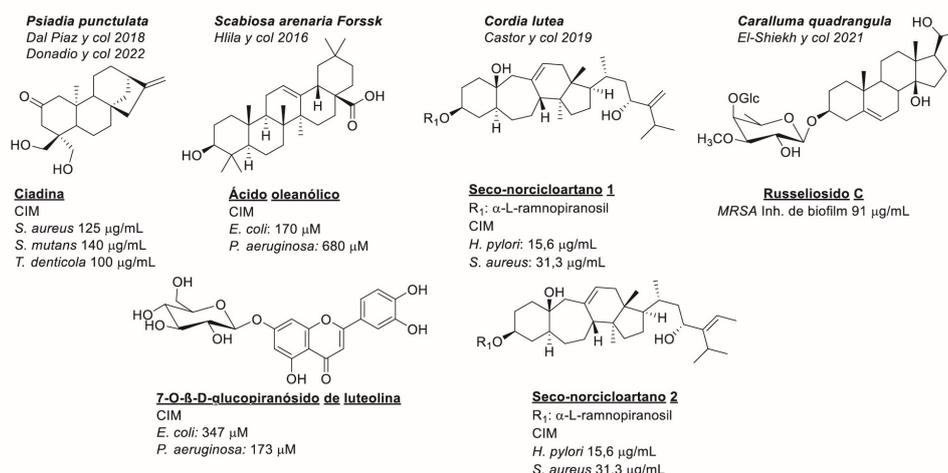


Figura 2: Enfoques de fitoquímica tradicional y de estudios bioguiados.

En la Figura 3, se muestran numerosos ejemplos de estudios bioguiados en los cuales se aislaron prometedores compuestos antibacterianos. En trabajos realizados por Dal Piaz y col. sobre la especie *Psidia punctulata*, se identificaron flavonoides y terpenos con actividad frente a *S. aureus* y *Candida albicans*.<sup>(33)</sup> A su vez Donadio y col., determinaron que un diterpenoide, denominado ciadina, posee actividad sinérgica junto con el antiséptico clorhexidina.<sup>(34)</sup>

Otro estudio llevado a cabo por Besbes Hlila y col. sobre *Scabiosa arenaria* Forssk, permitió aislar los metabolitos ácido oleanólico y 7-O-β-D-glucopiranosido de luteolina, los cuales demostraron actividad frente a cepas bacterianas GN, *E. coli* y *P. aeruginosa* y la especie fúngica *C. albicans*.<sup>(35)</sup> En otro trabajo desarrollado por Castro y col., se aislaron glucósidos de seco-norcicloartanos de las flores de *Cordia lutea* con actividad antimicrobiana y antiparasitaria.<sup>(36)</sup> A su vez El-Shiekh y col. mediante un estudio bioguiado sobre *Caralluma quadrangula* aislaron ruseliósidos con actividad anti-biofilm en MRSA siendo el ruseliósido C el de mayor actividad.<sup>(37)</sup>



**Figura 3:** Compuestos con actividad antibacteriana aislados mediante estudios bioguiados de fuentes vegetales.

En la búsqueda de compuestos activos a partir de extractos vegetales, emerge de manera sobresaliente e ingeniosa una herramienta de búsqueda y detección; la autobiografía en capa delgada aplicada a ensayos fenotípicos o de inhibición enzimática.<sup>(38) (39)</sup> Esta metodología consta de tres versiones, la autobiografía por contacto, directa y de inmersión. Un ejemplo exitoso, es el trabajo de Morel y col. en el cual se obtuvieron péptidos cíclicos del extracto metanólico de la corteza de *Condalia buxifolia* con actividad antibacteriana utilizando bioautografía directa.<sup>(40)</sup>

**Tabla 1.** Ventajas y desventajas de las diferentes estrategias de búsqueda de productos naturales bioactivos

Método	Ventajas	Desventajas
Fitoquímica tradicional	*Determinación exhaustiva de actividad de cada metabolito aislado.	*Mayor tiempo y recursos necesarios
Fitoquímica bioguiada	*Aislamiento y estudio de actividad de metabolitos presentes en extractos o fracciones que ya han demostrado su actividad. * Detección de sinergias y/o efectos aditivos valiosos.	*Es posible no detectar metabolitos bioactivos debido a efectos de antagonismo o a la baja concentración en el extracto y/o en la fracción.
Autobiografía en capa delgada	*Practicidad en la determinación de actividad de los metabolitos presentes en la placa cromatográfica.	Hasta tanto no se aislen los metabolitos presentes en la fracción, se desconoce la concentración e identidad del/los metabolitos bioactivos. *Problemas de difusión entre la placa y el medio de cultivo bacteriano

## A-2) Estrategias de búsqueda y modificación por bioingeniería

Actualmente, los métodos de obtención de antimicrobianos a nivel industrial, en términos generales, se basan en técnicas de fermentación partiendo de microorganismos. Esto resulta ventajoso respecto a la síntesis orgánica convencional; para ejemplificar, discutiremos diferentes estrategias de obtención del antibiótico tetraciclina y de un análogo estructural, quelocardina.

En 1945 se describió por primera vez el aislamiento de clortetraciclina de una muestra de suelo conteniendo un actinomiceto dorado (*Streptomyces aureofaciens*). A partir de 1948 se comenzó a producir en grandes tanques de fermentación comercializándose como Aureomicina<sup>®</sup>. La obtención de un metabolito bioactivo por fermentación puede dar altos rendimientos o no. Cuando la producción es ineficiente se avanza en su generación de manera sintética.

Así, luego de 50 años de la determinación estructural de la clortetraciclina, se planteó el desafío de su síntesis completa. Dicha síntesis se describe a continuación (Figura 4) para tomar dimensión del desafío que ello significó desde el punto de vista sintético, económico y ambiental. (41) Para su obtención, se parte del precursor D-glucosamina (1), que se convierte en un glucosilénido (2). El tratamiento posterior con borano, seguido de la oxidación estereoselectiva resulta en un alcohol, precursor de la olefina, que en un paso subsecuente formará la ciclohexanona (3). Una cicloadición [4+2] del producto deshidratado del paso anterior (4), permite arribar regio- y estereoselectivamente al biclo esperado (5). Para la construcción de los anillos restantes, es preciso generar una cetona  $\alpha$ - $\beta$  -insaturada, que luego de una reacción tándem tipo Michael-Dieckmann con la isobenzofuranona correspondiente, genera el compuesto tetracíclico esperado (6). Uno de los pasos más desafiantes de esta vía sintética es la introducción estereoselectiva del grupo hidroxilo en la posición C-12; esto se logró mediante la manipulación de los grupos protectores introducidos al inicio, capaces de generar un puente oxigenado adecuado, luego de varias reacciones de bromación y oxidación. Finalmente, la introducción de nitrógeno se lleva a cabo mediante la síntesis de un nitrilo (7), que luego será convertido en la amida final. Este compuesto es perhidroxidado fotoquímicamente y luego reducido, para dar el producto final (-)-tetraciclina. (42)

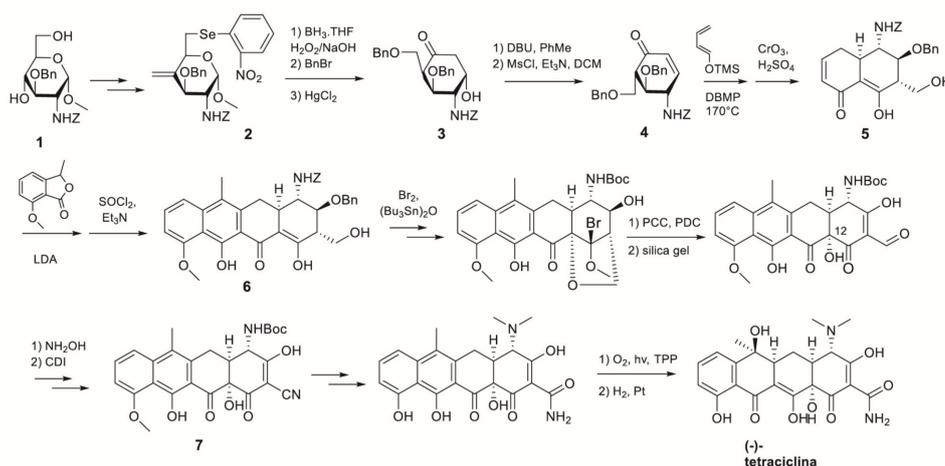


Figura 4: Síntesis de (-)-tetraciclina

Si bien la síntesis fue eficiente, (en términos del uso de catalizadores, rendimiento, solventes y sustancias contaminantes), dista de ser el método de elección para su obtención a gran escala, en el ámbito de la industria farmacéutica.

Por otra parte, y en el contexto actual de descubrimiento de antimicrobianos, el uso combinado de enfoques multidisciplinarios modernos que incluyen biología sintética, genómica, metagenómica, proteómica, transcriptómica, metabolómica y herramientas computacionales, está permitiendo avances en este campo de investigación reemergente.<sup>(43) (44)</sup> Un ejemplo representativo lo constituye la reciente revalorización del PN QCD para generar una nueva estructura líder, la 2-carboxamido-2-desacetil-quelocardina (ADQCD), mediante ingeniería biosintética racional (Figura 5).

QCD es un miembro de las tetraciclinas atípicas, aislado por primera vez en los años 60, posee un amplio espectro de actividad antibacteriana y modo de acción desconocido.

Considerando la importancia del grupo carboxamido en la bioactividad de las tetraciclinas, los genes biosintéticos *OxyD* y *OxyP* de la *PKS* de OTC de *Streptomyces rimosus* se expresaron en *Amycolatopsis sulphurea*, productor de QCD. El análogo resultante, ADQCD, se produjo con alto rendimiento (400 mg L<sup>-1</sup>) y exhibió actividad antibacteriana significativamente mejorada, incluso frente a los patógenos GN del grupo ESKAPE.<sup>(45)</sup> ADQCD ha sido generado en escala de multigramos por fermentación (cultivos discontinuos de ~100 L) en un procedimiento de rutina en el *HZI* con una pureza >95 %.

Debido a la falta de resistencia cruzada con antibióticos conocidos (actividad frente a patógenos con múltiples determinantes de resistencia a tetraciclinas), el buen rendimiento de producción y debido a que este análogo ha demostrado eficiencia de tratamiento en un pequeño estudio clínico de fase II, en la actualidad se encuentra en fase de optimización. Esto incluye enfoques adicionales de bioingeniería y química medicinal para un perfil extenso de SAR. Se realizaron estudios de ADMET, FC/FD, MoR, FoR, estudios de toxicidad y validación de la eficacia terapéutica para el tratamiento de ITUc causada por enterobacterias productoras de BLEE.<sup>(46)</sup>

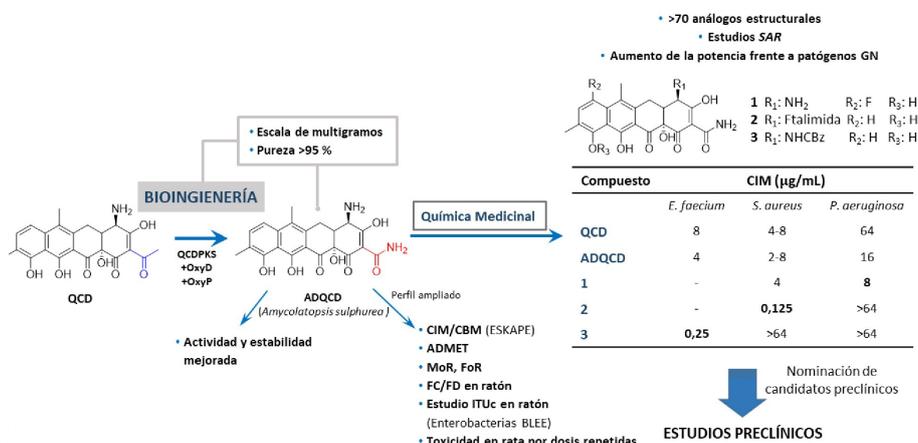


Figura 5: Bioingeniería de quelocardina en el desarrollo de análogos estructurales con propiedades biológicas mejoradas.

## B) Complejidad y diversidad

### B-1) Derivatización de compuestos puros

Debido a las altas tasas de deserción de compuestos líderes en el proceso de desarrollo de fármacos, en especial en el campo de los antibacterianos, es imprescindible la diversificación mediante generación de múltiples análogos estructurales.

Esto permite entre otras cosas, la caracterización exhaustiva de los mismos para comprender los requisitos químicos y fisicoquímicos basados en objetivos biológicos específicos, y respecto a todas las características que parecen relevantes para el uso terapéutico previsto. Estos datos son esenciales para mejorar consistentemente todos los parámetros requeridos como base para un avance continuo de las estructuras líderes hacia la selección de candidatos (pre)clínicos.

Se utilizan estudios de *SAR*, variando sistemáticamente un compuesto bioactivo, para identificar la naturaleza y disposición de los grupos funcionales esenciales dentro de una molécula para una determinada actividad o función biológica.

Si bien la modificación racional clásica de compuestos de origen natural ofrece la posibilidad de diversificación selectiva de enlaces C-H o C-heteroátomos en presencia de diferentes grupos funcionales, recientemente, se han realizado avances notables en estrategias sintéticas dentro de la química orgánica,<sup>(47)</sup> incluidos desarrollos en catalizadores selectivos de sitio, funcionalización de C-H de última generación, fotoquímica, electroquímica y biocatálisis, que han contribuido con la funcionalización directa de moléculas complejas.<sup>(48)</sup> Este abordaje selectivo brinda una gran oportunidad para la modificación rápida y tardía de diversos productos naturales.

Existe un amplio abanico de reportes bibliográficos referidos a la generación de derivados semisintéticos a partir de PN, provenientes tanto de especies vegetales como de bacterias, actinomyces y especies fúngicas. A continuación, citaremos algunos ejemplos representativos.

El metabolito de origen vegetal, BBR, es uno de los agentes naturales más interesantes y prometedores de la actualidad. Se trata de un alcaloide isoquinolínico con propiedades terapéuticas potenciales, baja toxicidad, incluso en dosis altas, y amplia gama de efectos farmacológicos relacionados con sus propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antibacterianas y antivirales. Teniendo en cuenta la versatilidad de su núcleo, diversos grupos de investigación han diseñado y sintetizado nuevos derivados con modificaciones estructurales principalmente en las posiciones C-2, C-3, C-8, C-9, C-10, C-12 y C-13 con el fin de modular sus propiedades farmacocinéticas y terapéuticas.<sup>(49)</sup> Estos estudios han permitido establecer que las sustituciones en diversas posiciones con grupos alquilo, arilo o heteroarilo desempeñaron un papel clave en el control de su capacidad para interactuar con varios objetivos biológicos clave o biomoléculas involucradas en diversas rutas bioquímicas, que amplían su espectro de actividad y convierten a la BBR en una molécula líder con elevado potencial de optimización en el desarrollo de nuevos fármacos. Por ejemplo, la sustitución con grupos heteroarilo como tiazolidinediona, imidazol y tiazol en la posición C-12 del núcleo de BBR, reveló una elevada efectividad de inhibición sobre el crecimiento de diversas especies bacterianas (GP y GN) y fúngicas (Figura 6). Análisis adicionales de la viabilidad celular realizados por Zhang,<sup>(50)</sup> Wen,<sup>(51)</sup> Sun,<sup>(52)</sup> y Gao<sup>(53)</sup> y col. revelaron menor toxicidad de algunos derivados obtenidos respecto al metabolito de partida, BBR.

Olliek y col.<sup>(54)</sup> reportaron el diseño, la síntesis y la evaluación antimicrobiana de nuevos derivados de BBR (Figura 6) modificados en la posición C-13. La evaluación antimicrobiana reveló que algunos de los derivados sintetizados exhibieron una potente actividad antibacteriana frente a un panel de cepas GP, incluidas cepas resistentes a antibióticos (valores de CIM entre 3,12 y 6,25  $\mu$ M), y se mostraron inactivos frente a las cepas GN ensayadas, excepto *Helicobacter pylori* y *Vibrio alginolyticus* (valores de CIM de 1,5 a 3,12  $\mu$ M). Estos compuestos demostraron baja toxicidad sobre células humanas normales. Además, dichos autores realizaron estudios de mecanismo de acción y racionalizaron los resultados de los estudios biológicos mediante estudios de simulación y acoplamiento molecular.

La introducción de diferentes sustituyentes en la posición C-13 de la dihidroberberina ha demostrado ser beneficiosa para generar derivados de BBR que poseen actividad mejorada frente a diferentes cepas bacterianas. Demekhin y col.<sup>(55)</sup> sintetizaron derivados de dihidroberberina con el C-13 vinílico

sustituido (Figura 6) y evaluaron su actividad antibacteriana frente a *E. coli*, *Brucella abortus*, *Vibrio cholera* (GN) y *S. aureus* (GP).

Wang y col.<sup>(56)</sup> describieron la síntesis de derivados de BBR disustituidos en las posiciones C-9 y C-13, y la evaluación de la actividad antiestafilocócica de los compuestos obtenidos. Entre los derivados sintetizados, el compuesto 8 (Figura 6) exhibió un promisorio efecto de inhibición sobre el crecimiento de *S. aureus* (CIM= 0,78 µg/mL). Además, se observó menor citotoxicidad por parte de los compuestos obtenidos y una mejor selectividad respecto de las células de mamíferos en relación con BBR.

Basado en el modo de unión de BBR dentro de la estructura cristalina resuelta del complejo *SmChiB*-BBR, Chen y col. diseñaron y sintetizaron una serie de derivados, dentro de los cuales los análogos sustituidos en la posición O-9 (9, 10, 11, Figura 6) resultaron ser inhibidores competitivos de *SmChiB* y mostraron actividades inhibitoras más altas ( $K_i = 0,15-2,36 \mu M$ ) en comparación con BBR.<sup>(57)</sup>

Inspirándose en los reportes bibliográficos previos y para aumentar la biodisponibilidad del núcleo de BBR, Ling y col.<sup>(58)</sup> describieron el diseño, la síntesis de nuevos derivados sustituidos en C-9 (Figura 6) y evaluaron su potencial antimicrobiano. Además, los estudios de acoplamiento molecular revelaron que los compuestos muestran interacciones con la topoisomerasa de tipo II y, por lo tanto, inhiben la enzima y el crecimiento de diversas especies bacterianas.

Siguiendo con la sustitución de BBR en la posición C-9, Jeyakkumar y col.<sup>(59)</sup> diseñaron y sintetizaron nuevos derivados del híbrido berberina-benzimidazol (Figura 6) y los evaluaron como posibles agentes antimicrobianos dirigidos al ADN. La mayoría de los compuestos inhibieron el crecimiento de diversas cepas bacterianas tanto GP como GN, con valores de CIM relacionados con el patrón de halogenación (particularmente Cl) sobre el motivo benzimidazol.

Por otra parte, Jia y col.<sup>(60)</sup> llevaron a cabo el diseño y la síntesis del híbrido de baicalina (un metabolito vegetal perteneciente a la familia de los flavonoides) y BBR (Figura 6). Los resultados de estudios in vitro realizados frente a cepas bacterianas (*S. aureus*, *S. hemolyticus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Bacillus thuringiensis*, *S. paratyphi B*) y una cepa de *C. albicans*, revelaron que el híbrido mostró mejores efectos inhibitorios sobre el desarrollo de todas las cepas ensayadas.

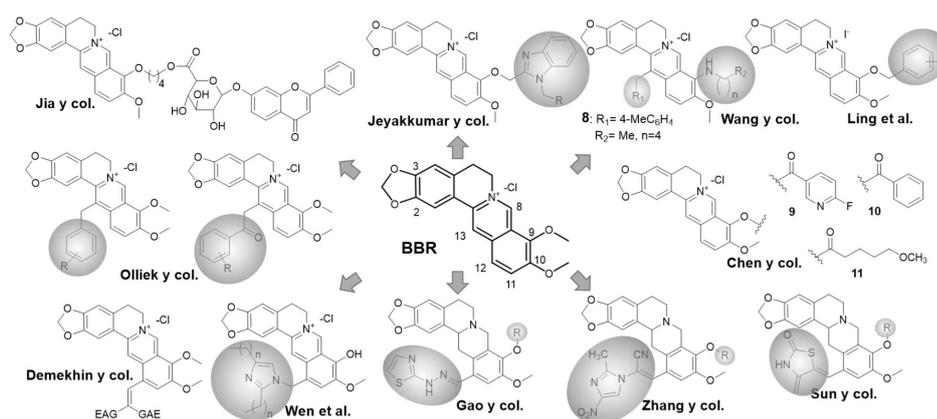


Figura 6: Derivados de berberina con promisoría actividad antimicrobiana.

A pesar de los amplios efectos beneficiosos de BBR, este compuesto presenta una biodisponibilidad escasa debido a su baja solubilidad, baja absorción y distribución en los tejidos, y rápida eliminación metabólica, lo que ha limitado su aplicación como fármaco potencial contra una amplia gama de

patologías. En la actualidad estos inconvenientes se abordan mediante el diseño y aplicación de sistemas de administración de fármacos, principalmente basados en polisacáridos naturales a nanoescala.<sup>(61)</sup> Esta temática se abordará en una sección posterior.

En el contexto actual de necesidad de nuevos antibióticos con potencial para tratar infecciones bacterianas causadas por especies GN, los productos naturales peptídicos son candidatos prometedores para satisfacer esta necesidad. En este sentido, el lipopéptido catiónico battacina (octapeptina B5) fue aislado de suelo a partir de *Paenibacillus tianmuensis* y demostró poseer una potente actividad frente a bacterias GN resistentes a antibióticos (CIM frente *E. coli* = 2-4  $\mu\text{M}$ ).<sup>(62)</sup> A diferencia de otros lipopéptidos catiónicos que alteran la membrana, como la polimixina B, battacina exhibe un perfil de nefrotoxicidad relativamente bajo. Estudios previos informaron la síntesis de battacina y análogos lipídicos, destacando la importancia del fragmento lipídico sobre la bioactividad. En particular, la potencia como antibiótico mejoró reemplazando el lípido 3-hidroxi-6-metiloctanoato con ácido 4-metilhexanoico y con la linealización de la estructura peptídica. Kihara y col.<sup>(63)</sup> confirmaron la importancia del lípido N-terminal, demostrando la tendencia de diferentes análogos de battacina “lipídica” a formar diversos estados de agregación según el lípido presente, llevando a diferencias en la actividad antibacteriana. Inspirados por este trabajo, el grupo de Brimble llevó a cabo un estudio SAR minucioso mediante la generación de una biblioteca de 12 análogos lineales con diferentes lípidos insertados mediante CLipPA S-lipidación (llevada a cabo utilizando SPPS con estrategia Fmoc) (Figura 7)<sup>(64)</sup>. La actividad antimicrobiana de los análogos se evaluó frente a cepas GN (*E. coli*, *P. aeruginosa* y *Acinetobacter calcoaceticus*) y frente a una cepa GP de *S. aureus*. En general, los análogos que portaban cadenas lipídicas más largas mostraron una mayor actividad bactericida, con el análogo de cadena más larga (20, lípido decanoato) exhibiendo un valor de CIM de 8  $\mu\text{M}$  frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Estos hallazgos fueron respaldados por simulaciones de dinámica molecular, que sugirieron que las cadenas alquílicas más largas fomentaban la inserción en la membrana. Además, se observó una correlación entre el valor de log D y la actividad bactericida, lo que respalda aún más la importancia de la hidrofobicidad para la actividad.

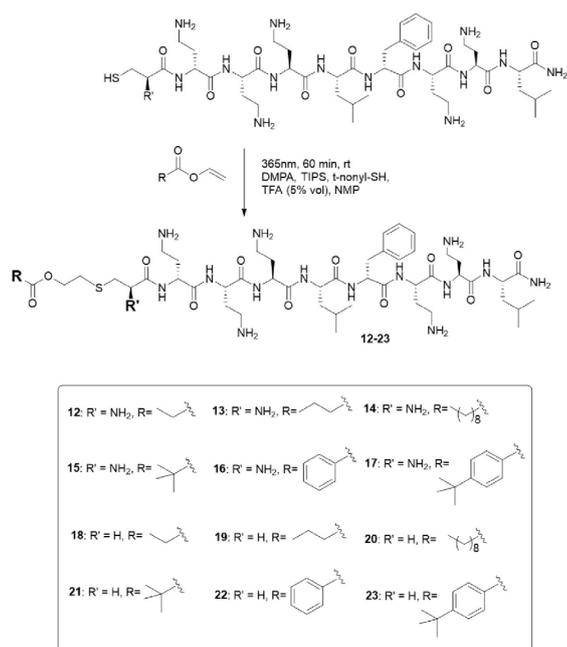


Figura 7: Esquema general de la estrategia de CLipPA para la síntesis de análogos de battacina.

## B-2) Derivatización de extractos vegetales.

Otra estrategia abordada en la búsqueda de compuestos bioactivos consiste en la modificación química de extractos vegetales mediante la introducción de funcionalidades que rara vez son producidas por el metabolismo secundario<sup>(65)</sup> <sup>(66)</sup> o la alteración del esqueleto base. De esta manera, la maquinaria biosintética de la naturaleza puede ser complementada para producir toda una gama de nuevos compuestos semisintéticos en un paso. Este abordaje implica la diversificación de extractos mediante reacciones químicas directamente sobre el extracto vegetal crudo, en contraste con el enfoque más convencional que implica llevar a cabo las reacciones sobre compuestos aislados puros.<sup>(67)</sup> Esta estrategia, que ha resultado exitosa en la generación de diversidad estructural en un paso de reacción, ha sido escasamente utilizada en la búsqueda de compuestos antibacterianos. Por ello, actualmente nuestro grupo de investigación aborda esta metodología con el objetivo de generar derivados nitrogenados a partir de extractos estratégicamente seleccionados, en la búsqueda de compuestos antimicrobianos, con especial interés frente a bacterias GN.

## C) Derivatización de PN enfocada en la actividad frente cepas GN resistentes a antimicrobianos.

### Reglas eNTRy

Ha pasado más de medio siglo desde que la *FDA* aprobó la última clase de antibióticos activos frente a las especies bacterianas GN más problemáticas, los patógenos ESKAPE,<sup>(68)</sup> <sup>(69)</sup> causantes de la mayoría de las infecciones adquiridas en hospitales, que con frecuencia “escapan” de la acción de las terapias antibacterianas tradicionales.

El principal desafío con el desarrollo de antibióticos para tratar infecciones causadas por este tipo bacteriano, no radica en la interacción con el blanco biológico, sino más bien en la incapacidad de la mayoría de las moléculas pequeñas de atravesar las membranas GN, retenerse y acumularse dentro de la célula.<sup>(70)</sup> A pesar de contar con una gran cantidad de compuestos líderes, el conocimiento limitado de las propiedades fisicoquímicas necesarias para la acumulación de compuestos (o para evitar su flujo)<sup>(71)</sup> en bacterias GN, ha obstaculizado un enfoque generalizado para desarrollar antibióticos frente a bacterias con estas características bioestructurales.<sup>(72)</sup> A pesar de los intensos esfuerzos en la derivatización y la síntesis de cientos de compuestos destinados a ampliar actividad frente a GN, se ha logrado poco o ningún progreso en la ampliación del espectro de actividad de muchos antibióticos, que siguen siendo efectivos únicamente frente a GP. En este contexto, dos premisas clave se complementan para abordar el problema de la resistencia a los antibióticos: desarrollar estructuras completamente nuevas o modificar estructuras de PN existentes para mejorar su eficacia y potenciar la actividad biológica.

Las estrategias más recientes proponen un método que posibilita obtener derivados activos frente a especies GN partiendo de compuestos que sólo son efectivos frente a GP, ampliando de esta manera su espectro de actividad antimicrobiana. Este objetivo se logra modificando las propiedades físicas y químicas mediante reacciones químicas simples de derivatización.

El grupo liderado por el Profesor Hergenrother ha delineado un conjunto de criterios fundamentales a tener en cuenta al seleccionar antibióticos candidatos, originalmente activos frente a GP, y convertirlos en versiones activas frente a bacterias GN mediante las “eNTRy-rules”.<sup>(73)</sup>

En primer lugar, se observó que es esencial que los antibióticos candidatos posean una actividad relevante en cepas GN donde la permeabilidad de la membrana o el flujo de salida se han visto comprometidos. Además, deben poseer enlaces rotables y una estructura globular que se ajuste a las reglas de eNTRy. En casos en los que se disponga de una estructura cristalina de rayos X del complejo antibiótico-objetivo biológico, esta información resultará invaluable para determinar las áreas donde realizar modificaciones. Por último, la existencia de estudios SAR significativos puede simplificar enormemente el diseño de nuevos compuestos.<sup>(74)</sup>

Para el desarrollo de esta regla se empleó una colección estructuralmente diversa de compuestos, que abarcaba tanto compuestos similares a fármacos (*drug-like*) como compuestos derivados o semejantes a PN. Estos compuestos fueron generados a través de la estrategia de *CtD* <sup>(75)</sup> que permitió un análisis sencillo de *SAR*, un análisis exhaustivo de distintos descriptores físico-químicos, así como la medición de la acumulación y la actividad antibacteriana de estos compuestos frente a *E. coli*. <sup>(73)</sup>

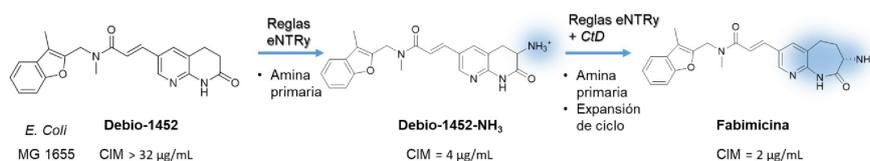
La estrategia *CtD* se utiliza para introducir modificaciones estructurales en el esqueleto de carbono de los compuestos, con el fin de obtener derivados que contienen transformaciones en sus sistemas de anillos, generando una amplia variabilidad estructural en comparación con el compuesto original. El objetivo principal de estas alteraciones es obtener bibliotecas de derivados de productos naturales e identificar nuevos farmacóforos con actividades biológicas diferentes o incluso superiores a las del precursor natural. <sup>(76)</sup>

Estos principios establecen que es probable que las moléculas pequeñas se acumulen en *E. coli* si poseen Nitrógeno ionizable, baja Tridimensionalidad (medida a través de la globularidad) y sean Rígiditas, es decir, tienen una pequeña cantidad de enlaces rotables. <sup>(77)</sup> Este hallazgo podría tener un impacto significativo en el descubrimiento y desarrollo de antibióticos dirigidos a bacterias GN que actualmente precisa de cierto dinamismo y automatización de búsqueda exploratoria. Para lograrlo, se utilizan compuestos que contienen aminas primarias, las cuales pueden convertirse en N-alquilguanidinos y piridinos, facilitando la absorción de compuestos en *E. coli*.

Utilizando este modelo, se logró ampliar el espectro de actividad para tres clases de antibióticos que involucran tres tipos diferentes de blancos biológicos. Los antibióticos originales presentaban una buena tridimensionalidad y flexibilidad. En primer lugar, se observó que el producto natural deoxinibomicina presentaba buena actividad como inhibidor de la ADN girasa en GP (*CIM S. aureus* = 0,06-1,00 µg/mL), pero no presentaba actividad frente a *E. coli* (*CIM* > 32 µg/mL). <sup>(74)</sup>

Además, cumplía con los requisitos necesarios para ser un blanco de conversión de GP a GN. Dado que este compuesto natural ya había sido objeto de estudios *SAR*, <sup>(78)</sup> el grupo Hergenrother diseñó un derivado que contenía una expansión del anillo de cinco miembros a uno de seis miembros e incorporó una amina primaria. Este derivado demostró una buena acumulación en *E. coli* y buena actividad frente a los patógenos ESKAPE (*CIM E. coli* = 0,50 µg/mL). Sin embargo, no tuvo el mismo efecto inhibitorio sobre *P. aeruginosa*. <sup>(73)</sup>

En la búsqueda para implementar las reglas “eNTRY” se evaluaron antibióticos frente a GP aprobados por la *FDA* y compuestos líderes en la etapa preclínica de desarrollo. De este estudio, surgió el compuesto Debio-1452, un inhibidor de *FabI*, como un blanco potencial para la conversión, ya que cumplía con los criterios necesarios, excepto la ausencia de una amina primaria. Se realizaron varias modificaciones como la introducción de aminas primarias, y se observó que el compuesto Debio-1452-NH<sub>3</sub> mostró mayor actividad. La actividad frente a *E. coli* del compuesto original, que tenía una *CIM* > 32 µg/mL, se redujo significativamente a una *CIM* = 4 µg/mL en el derivado. Conservó su actividad frente a *S. aureus*, y además, presentó actividad inhibitoria sobre *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y frente a cepas multirresistentes. <sup>(79)</sup>



**Figura 8:** Resumen esquemático de la optimización de una estructura líder mediante estrategias de *CtD* y aplicación de reglas eNTRY.

No obstante, Debio-1452-NH3 demostró la necesidad de ampliar su ventana terapéutica, ya que su eficacia en modelos de infección murina con patógenos GN se alcanzaba a las dosis máximas toleradas. En busca de identificar la próxima generación de inhibidores de FabI con mayor potencia frente a patógenos GN y mejor tolerabilidad *in vivo*, se realizó una extensa campaña de estudios SAR utilizando la estructura cristalina de Debio-1452 en combinación con FabI. Fabimicina, el S(-)-derivado azepanona, se destacó por su actividad sobresaliente frente a *S. aureus* y, al mismo tiempo, mostró ser más potente que Debio-1452 y el derivado Debio-1452-NH3 frente a más de 200 aislados clínicos de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii*. Fabimicina no presentó actividad sobre bacterias comensales.<sup>(80)</sup>

Por otra parte, se logró convertir Ribocil C, un inhibidor de riboswitch FMN identificado por Merck & Co mediante un proceso de cribado, en un derivado activo frente a GN, llamado Ribocil C-PA. Este nuevo derivado presentó alta acumulación y actividad antimicrobiana frente a cepas GN.<sup>(81)</sup>

En relación a la presencia de aminas primarias en los compuestos líderes, este grupo funcional representa un cambio significativo en la polaridad, al aumentar tanto el número de donores como aceptores de puente hidrógeno, lo que se traduce en un incremento en la solubilidad. No obstante, en ciertos contextos, estas aminas primarias pueden ser tóxicas. Otros grupos funcionales que contienen nitrógeno cargado positivamente, como los N-alquilguanidinos y piridinos, también pueden facilitar la absorción del compuesto por las bacterias GN.<sup>(82)</sup>

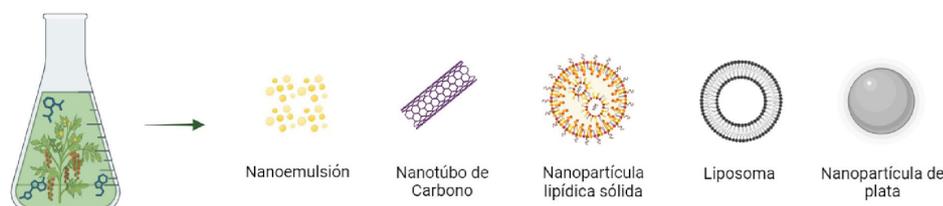
En algunos casos, se observó que la gran deslocalización de la carga positiva del grupo nitrogenado y la ausencia de donores de puente hidrógeno, como ocurre con el grupo piridinio, no resultaba beneficioso para la acumulación. Curiosamente, los niveles de acumulación de los compuestos con guanidinos son similares a los compuestos con aminas primarias, a pesar de que el primer grupo nitrogenado introduce dos enlaces rotables adicionales en el compuesto. En los casos en los que la amina primaria no logra alcanzar el objetivo, los guanidinos fueron alternativas viables que demostraron un cambio de 8 veces o menos en la actividad frente a *E. coli*. Esto se evidenció en el caso de Debio-1452 y su respectivo derivado con guanidina, así como para zantrina y su correspondiente derivado guanidinio, el cual presentó una actividad equipotente comparado con la amina primaria.<sup>(73)</sup> Si bien las reglas eNTRY se descubrieron a partir de datos de acumulación de *E. coli*, la actividad antimicrobiana observada en otros patógenos GN ESKAPE sugiere cierta superposición en las propiedades fisicoquímicas necesarias para la acumulación de compuestos en estas bacterias problemáticas, que también presentan dificultades en la permeabilidad.

#### **D) Productos naturales y nanomedicina**

Uno de los logros más destacados en el campo de la medicina, el cual marca el inicio de una nueva era en el ámbito de los tratamientos médicos, es la introducción de la nanomedicina. Ésta se puede entender como la fusión de la nanotecnología y la nanociencia con el objetivo de prevenir y tratar diversas enfermedades. Este enfoque terapéutico implica el uso de partículas con un tamaño que oscila entre 10 a 100 nanómetros, lo que le otorga una extensa área superficial específica permitiendo una interacción altamente efectiva con células y tejidos de interés.<sup>(83)</sup> Estas formulaciones también admiten frecuentemente la funcionalización de su superficie, lo que otorga la capacidad de introducir cambios favorables al sistema. Además de lo mencionado, suelen reducir los efectos secundarios no deseados y mejorar la biodisponibilidad y la farmacocinética de los medicamentos.<sup>(84)</sup>

Como se mencionó al principio de este artículo, los PN han demostrado históricamente ser beneficiosos en el tratamiento de diversas enfermedades. Por este motivo, no parece irracional considerar la posibilidad de vincularlos con la nanomedicina. Esta idea permitiría superar propiedades desfavorables, orientar tratamientos específicos, sinergizar actividades con otros compuestos, entre otras

aplicaciones potenciales.<sup>(85)</sup> Dentro de los distintos tipos de nanocarriers que pueden ser utilizados para la vehiculización de los PN podemos mencionar los de base lipídica (liposomas, emulsiones, NP lipídicas), los de base inorgánica (NP de oro, NP de plata, NP de óxido de hierro), los de base polimérica (polimerosomas, nanoesferas, micelas),<sup>(86)</sup> entre otros (ver Figura 9).



**Figura 9:** Nanovehículos vinculados a productos naturales descritos en los artículos científicos referidos en esta sección.

Se han logrado exitosos avances en la nanovehiculización de productos naturales en diversos campos. A continuación, se presentan algunos ejemplos de investigaciones recientes:

La especie vegetal *Trigonella foenum-graecum* L. conocida comúnmente como fenogreco y perteneciente a la familia Fabaceae, exhibe propiedades antimicrobianas relacionadas al aceite extraído de sus semillas. Abdulkhalik Mansuri y col.<sup>(87)</sup> llevaron a cabo la síntesis de una NE para vehiculizar este aceite con el propósito de mejorar su estabilidad, solubilidad y lograr una liberación sostenida, aumentando así su biodisponibilidad y potencia antimicrobiana. La formulación de la nanoemulsión incluyó aceite de fenogreco, agua y Tween 80 como surfactante. Para evaluar la actividad bactericida, se llevaron a cabo pruebas con varias cepas, incluyendo dos GP (*Bacillus subtilis* y *S. aureus*) y dos GN (*E. coli* y *P. aeruginosa*). Los resultados revelaron que la nanoemulsión tenía una CIM de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para las bacterias GN y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para las GP, lo que indicaba una potente actividad antibacteriana. Acompañando estos resultados, se realizó un ensayo de permeabilidad de membrana para evaluar el grado de daño inducido por la nanoemulsión, dado que estas tienden a fusionarse con la bicapa lipídica de las bacterias y desestabilizarla, lo que conduce a la lisis y muerte de los microorganismos. Como resultado se confirmó que la misma produce un incremento en la permeación de la membrana a una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Además, se llevó a cabo un importante control adicional para evaluar el efecto citotóxico de la NE en células hepáticas humanas (WRL-68) en concentraciones que oscilaron entre 100 y 800  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Estos estudios permitieron concluir que las mismas podrían ser utilizadas de manera segura en la preservación de alimentos, ya que no producen daño a las células del hígado.

Un ejemplo altamente práctico y siguiendo la idea de antimicrobianos para la conservación de alimentos mediante el uso de productos naturales, se encuentra el trabajo realizado por el equipo de Rui Cui y col.<sup>(88)</sup> En su investigación, desarrollaron un film de liberación controlada diseñado para ser utilizado en envases de alimentos, con propiedades antibacterianas. Este film se elaboró a partir de una combinación de PLA, PCL, CNTs y CIN, un compuesto de origen natural conocido por sus propiedades antimicrobianas. Para evaluar la eficacia antibacteriana del mismo, se realizaron pruebas in vitro utilizando cepas de *S. aureus* y *E. coli*. En particular, las películas PLA/CIN y PLA/CNTs/CIN demostraron una disminución sustancial en los valores de recuento bacteriano en comparación con las películas que no contenían CIN. Para *S. aureus*, las películas con CIN redujeron los valores en 6,51 y 5,65 log<sub>10</sub> CFU/mL, respectivamente. De manera similar, en el caso de *E. coli*, las películas con CIN

lograron reducir los valores en 4,05 y 3,07 log<sub>10</sub> CFU/mL. Estos resultados reflejan la eficacia del compuesto natural CIN como un agente antimicrobiano potente, y cabe destacar que las películas que contenían CNTs para vehiculizar el producto natural, también mostraron una mejora en la actividad antibacteriana. Este enfoque tiene un gran potencial en la industria de envases de alimentos, ya que podría contribuir significativamente a la conservación de alimentos y a la prevención de infecciones alimentarias.

Teniendo otra perspectiva de trabajo, Rodenak-Kladniew y col.<sup>(89)</sup> decidieron tomar un antibiótico sintético como el Ofx, el cual presenta baja solubilidad y una biodisponibilidad variable, y vehiculizarlo en *SLN*, junto a *Chi*, biopolímero catiónico con actividad antimicrobiana, y sumar Eu, producto natural que interfiere con la comunicación bacteriana por quórum, con el objetivo de obtener sinergia y mejorar los caracteres desfavorables. Las *SLN* fueron preparadas mediante la homogeneización ultrasónica, utilizando miristato de miristilo. La actividad antimicrobiana fue determinada por la medición de la CIM en *P. aeruginosa* ATCC 15442 y *S. aureus* ATCC 6538, sembrando 25 µL de las distintas preparaciones. Mientras que la CIM de Ofx libre sobre el crecimiento de *P. aeruginosa* fue de aproximadamente 1,73 µg/mL, la nanoestructuración con Eu y *Chi* (*SLN/Chi/Eu-Ofx*) dio lugar a valores de inhibición más altos, con una CIM tan baja como 0,29 µg/mL, es decir, 6 veces menor que la obtenida para el Ofx libre. Sobre *S. aureus* Ofx presentó una CIM de 0,31 µg/mL y *SLN/Chi/Eu-Ofx* 0,02 µg/mL, lo que significa una concentración 16 veces menor que la Ofx libre. Además, se realizó un estudio de citotoxicidad en células humanas (Wi-38). *SLN/Chi/Eu-Ofx* no presentó efectos tóxicos en el rango de 0,3 a 3,0 µg/mL sobre las células normales.

Es importante destacar que los productos naturales no solamente son utilizados con el objetivo de funcionalizar los nanovehículos, sino que también se pueden emplear en la biosíntesis de nanopartículas con el objetivo de reducir costos y ser respetuosos con el medioambiente, en comparación con otros métodos de obtención, ya sean químicos o físicos. Un ejemplo ilustrativo de esto son las AgNPs sintetizadas a partir de plantas medicinales, que tienen un potencial uso como agentes antibacterianos. Yongqiang Zhang y col.<sup>(90)</sup> optaron por formular AgNPs a partir de un ALE. Mientras que anteriormente se mencionó un ejemplo en el que el extracto de Aloe se encapsula en el interior de liposomas, en este estudio se propuso la síntesis directa de la nanopartícula deseada a partir del mismo extracto. Para obtener esta formulación, se partió de una mezcla de AgNO<sub>3</sub>, ALE y solución de HHC. Se variaron las proporciones de todos los componentes para identificar cuál de ellas producía las nanopartículas de menor tamaño y mayor estabilidad. Se observó que el mejor rendimiento se alcanzaba con una concentración de AgNO<sub>3</sub> 1,0 mM, 10,0 mL de ALE y 1,0 mM de solución de HHC. El motivo detrás de la elección de algunos PN en estas reacciones radica en su contenido de compuestos fenólicos, terpenos y proteínas, los cuales contienen grupos amino y carboxílicos libres que interactúan con la superficie de las nanopartículas de plata, proporcionándoles estabilidad. Además, las proteínas evitan la aglomeración, formando una capa protectora alrededor de las mismas. Es ampliamente conocido que las AgNPs suelen mostrar actividad antimicrobiana per se, por este motivo se llevó a cabo un análisis de actividad antibacteriana mediante la medición de zonas de inhibición en cultivos de *E. coli* y *S. aureus*. Como resultado se observó que, efectivamente, presentaban una actividad antiproliferativa sobre ambas cepas generando un halo de inhibición de aproximadamente 8,0 mm en ambas.

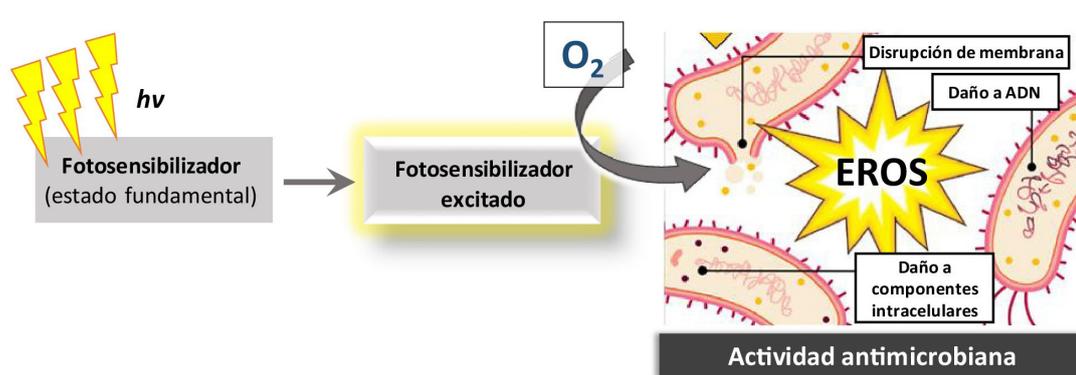
### E) Terapia Fotodinámica. Un nuevo enfoque para el tratamiento de patologías infecciosas

La medicina moderna está en constante evolución, y una de las innovaciones más recientes en el área es la TFD, un enfoque no invasivo que promete revolucionar la forma en que abordamos enfermedades crónicas y resistentes a los medicamentos. La TFD se estableció hace más de 100 años

en el campo de la microbiología; sin embargo, su aplicación se hizo más común en el campo de la oncología. El reciente aumento en el número de informes de bacterias que desarrollan fármaco-resistencia contra los antibióticos comercializados ha permitido que la TFD resurja con fuerza como una alternativa potencial para las terapias antimicrobianas convencionales, especialmente para el tratamiento de infecciones multirresistentes.

En referencia particular a la TFDa, su naturaleza multiobjetivo minimiza el riesgo de desarrollo de resistencia. Incluso después de 20 ciclos sucesivos de su aplicación con reducción parcial, seguidos de recrecimiento de cultivo, no se ha demostrado que produzca resistencia bacteriana. Además, su naturaleza de amplio espectro implica que el tratamiento puede iniciarse antes de que se hayan identificado los agentes infecciosos, lo que proporciona una ventaja sustancial sobre los antibióticos de uso convencional.<sup>(91)</sup>

**Mecanismo implicado en la fotosensibilización:** Esta técnica se basa en la interacción entre un compuesto FS, luz de una longitud de onda específica y el oxígeno. Este compuesto, ya sea aplicado localmente o administrado sistémicamente, idealmente se acumula de manera selectiva en células cancerosas, microbianas y/o tejidos patológicos estableciendo las bases para una terapia altamente dirigida. Cuando el FS absorbe luz de la longitud de onda adecuada, desencadena un proceso de activación y lleva, en una última instancia a la formación de un estado triplete excitado a través de un proceso conocido como "cruce entre sistemas". El estado triplete del FS transfiere su energía al interaccionar con el  $O_2$ , conduciendo a la formación de  $^1O_2$ , mediante una reacción conocida como un "proceso fotoquímico de Tipo II". También puede ocurrir un "proceso fotoquímico de Tipo I" por el cual el FS en estado excitado sufre reacciones de transferencia de electrones que eventualmente forman EROS como el  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\bullet}$  y  $^1O_2$  que, al interactuar con diferentes biomoléculas (proteínas, ácidos grasos insaturados, ácidos nucleicos, mono y polisacáridos), generan estrés oxidativo y citotoxicidad selectiva en las células donde se ha unido o ingresado la molécula de FS (en la figura 10, se representa el proceso de inactivación fotodinámica de células microbianas). De esta forma, se logra un alto nivel de selectividad, evitando efectos secundarios con la activación local del fármaco mediante luz. Este avance ha allanado el camino para aplicaciones terapéuticas destinadas a erradicar enfermedades desde su origen.<sup>(92)</sup>

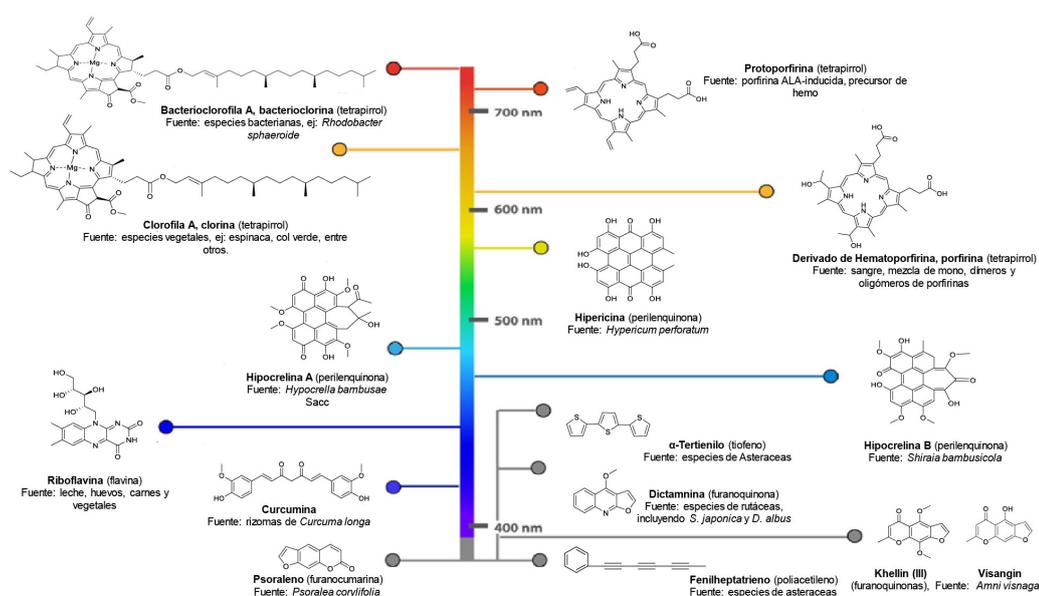


**Figura 10:** Representación esquemática del proceso de inactivación fotodinámica antimicrobiana.

**Rol de los Productos Naturales como fotosensibilizadores:** El uso terapéutico de la luz en medicina se remonta a los antiguos griegos y egipcios con el uso de la luz solar y extractos naturales seleccio-

nados para tratar trastornos específicos de la piel. En la medicina china, el extracto de *Ammi majus* L. que contiene los compuestos naturales psoralenos y furanocromonas se ha utilizado para tratar la psoriasis y el vitíligo. Las plantas utilizan la generación fotosensibilizada de EROS para protegerse contra el estrés abiótico y biótico. La importancia de los metabolitos naturales fototóxicos en la defensa de las plantas inspiró el uso de la luz solar y los FS naturales en la TFDa.

En su mayoría, los FS son moléculas orgánicas insaturadas y altamente conjugadas, lo que les confiere un alto coeficiente de absorción.<sup>(93)</sup> El campo de la TFD también ha encontrado inspiración en la naturaleza, particularmente en los metabolitos naturales. Muchos de estos compuestos funcionan como pigmentos fotoactivos, pero no todos poseen las propiedades requeridas para aplicaciones terapéuticas, es decir, no todos participan en la generación de EROS. Las principales clases de FS naturales presentes en plantas incluyen los curcuminoides, antraquinonas, perilenoquinonas, furanocumarinas, alcaloides, clorinas y flavinas (algunos ejemplos se presentan en la Figura 11). Esto amplía aún más el potencial terapéutico de las plantas en términos de compuestos FS antimicrobianos, aplicables también en la conservación de alimentos.<sup>(94)</sup>



**Figura 11:** Ejemplos de FS naturales con aplicación terapéutica. La barra de colores indica el espectro de absorción de luz de UV a IR. Los compuestos se ubican según sus rangos de longitud de onda de máxima absorción.

**TFD en el tratamiento de biofilms microbianos:** Un aspecto importante de la TFD es que puede utilizarse para combatir la formación y provocar la disrupción de biofilms microbianos.<sup>(93)</sup> Un biofilm bacteriano es un consorcio estructurado de bacterias incrustadas en una matriz de polímero de producción propia que consta de polisacárido, proteína y ADN. Los biofilms bacterianos pueden causar infecciones crónicas debido a que muestran una mayor tolerancia a los antibióticos y productos químicos desinfectantes, además de resistir la fagocitosis y otros componentes del sistema de defensa del cuerpo. La prevención de la formación de biofilms mediante profilaxis o terapia antibiótica

temprana y agresiva, y su eliminación mediante terapia de supresión crónica representa una problemática en el uso de antibióticos comerciales dados sus valores más altos de CIM y CBM, lo que puede provocar toxicidad *in vivo*.<sup>(95)</sup> En este sentido, la TFD representa una alternativa prometedora para reducir la carga microbiana en infecciones crónicas. En la actualidad, el uso de la TFD para tratamientos de biofilms se ha expandido al tratamiento de caries dental, úlceras diabéticas, fibrosis quística, sinusitis crónica, infecciones asociadas a implantes, entre otros.

**TFD y nanotecnología:** La combinación de fotosensibilizadores con nanomateriales mejora la eficiencia y reduce los efectos secundarios de la TFD. Las nanopartículas permiten una terapia dirigida, aumentando la selectividad al enfocarse en receptores específicos.

La mayoría de los fotosensibilizadores son sustancias altamente hidrofóbicas que se agregan en un ambiente acuoso. El proceso de agregación reduce la eficiencia de la terapia fotodinámica. Los fotosensibilizadores deben permanecer en forma monomérica para ser fotoactivos. Mantener esta configuración es posible gracias a la conjugación de fotosensibilizadores con nanopartículas. El uso de nanopartículas poliméricas, por ejemplo, micelas, permite el suministro dirigido de más moléculas fotosensibilizadoras a la región afectada y evita la degradación del fotosensibilizador antes de llegar al objetivo. Además, el uso de polímeros permite la unión simultánea de más ligandos a las moléculas de FS, por ejemplo, sustancias de contraste o marcadores fluorescentes que permiten la exploración de imágenes clínicas. El aumento de las propiedades hidrófilas del fotosensibilizador da como resultado una mejor selectividad y una mayor eficacia de la terapia fotodinámica. Las sustancias inorgánicas se pueden utilizar para crear conjugados fotosensibles. Una forma prometedora de aumentar la selectividad de la TFD es utilizar nanopartículas de oro como sistema de administración de fármacos.<sup>(96) (97)</sup>

## Conclusiones

Desde la antigüedad, los PN han sido fuentes importantes de moléculas líderes para el desarrollo de fármacos. El uso de extractos de plantas y compuestos puros con propiedades antimicrobianas, sin duda puede tener gran importancia en los tratamientos terapéuticos actuales. Tal como hemos puntualizado, en los últimos años se han realizado numerosos estudios en diferentes grupos de investigación a nivel mundial para demostrar dicha eficacia. De hecho, numerosos extractos de plantas y sus metabolitos son antibióticos eficaces contra bacterias resistentes y no resistentes. El hecho de que se hayan explorado menos del 20% de las especies vegetales y que el número de metabolitos aislados de plantas supera los 100.000, fomenta la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades antimicrobianas. Esta bioprospección es particularmente importante en el contexto de especies vegetales de la rica flora argentina, que han sido poco estudiadas.

Las estrategias que abordamos en nuestros trabajos de investigación (puntualizadas en esta revisión), ofrecen una alternativa a las metodologías clásicas de descubrimiento de antimicrobianos, permitiendo el acceso a un espacio químico inexplorado que, a su vez, ofrece la posibilidad de descubrir nuevos objetivos antimicrobianos. Un beneficio principal de estas estrategias es que se puede acceder a estas diversas bibliotecas de manera rápida, ya que se pueden realizar transformaciones en una serie diversa de sustratos que introducen una mayor complejidad química. Si bien todavía no se han empleado con éxito para desarrollar un antibiótico aprobado para uso en la práctica, estas estrategias ciertamente inspiran a los químicos a correr los límites de la química combinatoria y proporcionar estructuras más sólidas para investigar la actividad biológica y el mecanismo de acción de los compuestos obtenidos.

Otro punto importante a destacar es que la comprensión acabada de la relación entre la estructura de los

compuestos, los parámetros farmacocinéticos, la solubilidad y la actividad antimicrobiana, ha permitido a los químicos medicinales ajustar regularmente las características necesarias para la síntesis de derivados. Esto les permite, por ejemplo, adaptar o derivatizar estructuralmente a los compuestos para lograr su acumulación y actividad contra las bacterias GN. Además, se puede diseñar una estrategia de nanovehiculización a partir de la estructura del PN, que permita aumentar la selectividad y/o biodisponibilidad.

Respecto a la TFD, ésta se presenta como una innovación crucial en medicina, ofreciendo un tratamiento altamente selectivo para diversas enfermedades de manera efectiva. Los desafíos y oportunidades en la TFD son variados e impactantes. La selectividad lograda mediante fotosensibilizadores localizados, el desarrollo de compuestos anti-biopelículas y la combinación de terapias luminosas y nanotecnología son ejemplos de áreas en las que la investigación avanza. Su capacidad para atacar microorganismos patógenos de manera específica y su potencial para transformar el abordaje de infecciones crónicas y resistentes a medicamentos la convierten en una herramienta terapéutica excepcional. La combinación de luz y química, inspirada en la naturaleza, presentan un futuro prometedor para la medicina.

De esta manera, a lo largo de estas páginas se resume la importancia y urgencia del trabajo interdisciplinario abocado a la búsqueda de antimicrobianos para patógenos resistentes, lo cual debe ser tomado como un desafío crucial y prioritario por los distintos grupos de investigación del área.

### Agradecimientos

Nuestras tareas de investigación son financiadas por CONICET [PIP 2015-2017], ANPCyT [PICT 2020-SERIE A-02162 y PICT 2020-SERIE A-03702], SeCyT-UNC (agencias argentinas) y ONR Global (Office of Naval Research, USA, [N62909-21-1-2052]). Los autores agradecen a CONICET y Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica, por las becas otorgadas para realizar sus tesis doctorales. Un especial agradecimiento a los Dres. Gloria Barboza y Franco Chiarini (IMBIV-CONICET), por la colaboración constante a lo largo de los años en la búsqueda e identificación de especies vegetales. Dedicamos este trabajo al Prof. Juan Carlos Oberti, con mucha gratitud por las enseñanzas impartidas como miembro fundador y formador del grupo de trabajo.

### Bibliografía

1. Crofts TS, Gasparrini AJ, Dantas G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat. Rev. Microbiol.* (2017) 15: 422-434.
2. Chis AA, Rus LL, Morgovan C, Arseniu AM, Frum A, Vonica-Tincu AL, y col. Microbial Resistance to Antibiotics and Effective Antibiotherapy. *Biomedicines.* (2022) 10 (1121): 1-38.
3. Zhen X, Lundborg CS, Sun X, Hu X, Dong H. Economic burden of antibiotic resistance in ESKAPE organisms: A systematic review. *Antimicrob. Resist. Infect. Control.* (2019) 8(137): 1-23.
4. O'Neill, J. The Review on Antimicrobial Resistance, *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations.* (2015) 1-22.
5. Ministerio de Salud Argentino. Nueva Ley de Prevención y Control de la Resistencia Antimicrobiana, 10 de agosto de 2022. <https://www.argentina.gob.ar/noticias/nueva-ley-de-prevencion-y-control-de-la-resistencia-antimicrobiana>, último acceso 29/9/2023.
6. Durand GA, Raoult D, Dubourg G. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *Int. J. Antimicrob. Agents.* (2019) 53: 371-382.
7. Antibiotic resistance threats in the United States, 2019 Atlanta, Georgia. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>
8. Annunziato G. Strategies to Overcome Antimicrobial Resistance (AMR) Making Use of Non-Essential Target Inhibitors: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* (2019) 20 (5844): 1-25.
9. Rossiter SE, Fletcher M.H, Wuest WM. Natural Products as Platforms to Overcome Antibiotic Resistance. *Chem. Rev.* (2017) 117: 12415-12474.
10. Jadimurthy R, Jagadish S, Nayak SC, Kumar S, Mohan CD, Rangappa KS. Phytochemicals as Invaluable Sources of Potent Antimicrobial Agents to Combat Antibiotic Resistance. *Life* (2023) 13 (948): 1-34.

11. Dias DA, Urban S, Roessner U. A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*. (2012) 2: 303-336.
12. Toledo C, Kutschker A. Plantas Medicinales en el Parque nacional los alerces, Chubut, Patagonia argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.* (2012) 47: 461-470.
13. Estomba D, Ladio A, Lozada M. Medicinal wild plant knowledge and gathering patterns in a Mapuche community from North-western Patagonia. *J. Ethnopharmacol.* (2006) 103: 109-119.
14. Farmacopea Argentina, 2013, 7ma edición, Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de la Nación.
15. Yagüe E, Sun H, Hu Y. East Wind, West Wind: Toward the modernization of traditional Chinese medicine. *Front. Neurosci.* (2022) 16 (1057817): 1-17.
16. Li G, Lou H.X. Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Med. Res. Rev.* (2018) 38: 1255-1294.
17. Newman DJ, Cragg G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* (2020) 83: 770-803.
18. Van Der Kooy F, Sullivan S.E. The complexity of medicinal plants: The traditional *Artemisia annua* formulation, current status and future perspectives. *J. Ethnopharmacol.* (2013) 150: 1-13.
19. Majhi S, Das D. Chemical derivatization of natural products: Semisynthesis and pharmacological aspects- A decade update. *Tetrahedron.* (2021) 78 (131801): 1-22.
20. Evans B.E., Rittle K.E., Bock M.G., Dipardo R.M., Freidinger R.M., Whitter W.L., y col. Artides Methods for Drug Discovery: Development of Potent, Selective, Orally Effective Cholecystokinin Antagonist. *J. Med. Chem.* (1988) 31: 2235-2246.
21. Lovering F, Bikker J., Humblet C. Escape from flatland: Increasing saturation as an approach to improving clinical success. *J. Med. Chem.* (2009) 52: 6752-6756.
22. Camp D, Garavelas A, Campitelli M. Analysis of Physicochemical Properties for Drugs of Natural Origin. *J Nat Prod.* (2015) 78(6):1370-1382.
23. Subramanian A.P, Jaganathan S.K, Manikandan A, Pandiaraj K.N, Gomathi N, Supriyanto E. Recent trends in nano-based drug delivery systems for efficient delivery of phytochemicals in chemotherapy. *RSC Adv.* (2016) 6: 48294-48314.
24. Cadoná F.C., Machado A.K, Bodenstern D, Rossoni C, Favarin F.R., Ourique A.F, editores. Natural product-based nanomedicine: Polymeric nanoparticles as delivery cargoes of food bioactives and nutraceuticals for anticancer purposes. En: *Advances and Avenues in the Development of Novel Carriers for Bioactives and Biological Agents*. Elsevier; 2020, p. 37-67.
25. Brown D.G, Boström J. Where Do Recent Small Molecule Clinical Development Candidates Come From? *J. Med. Chem.* (2018) 61(21): 9442-9468.
26. Hill RA, Sutherland A. Hot off the press. *Nat. Prod. Rep.* (2014) 31: 1671-1675.
27. Grivas P.D, Kiaris H, Papavassiliou A.G. Tackling transcription factors: Challenges in antitumor therapy. *Trends Mol. Med.* (2011) 17: 537-538.
28. Asakawa Y, Ludwiczuk A. Chemical Constituents of Bryophytes: Structures and Biological Activity. *J. Nat. Prod.* (2018) 81: 641-660.
29. Ríos J.L., Recio M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* (2005) 100: 80-84.
30. Gertsch J. Botanical drugs, synergy, and network pharmacology: Forth and back to intelligent mixtures. *Planta Med.* (2011) 77: 1086-1098.
31. Caesar L.K, Cech N.B. Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2. *Nat. Prod. Rep.* (2019) 36: 869-888.
32. Doern C.D. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J. Clin. Microbiol.* (2014) 52: 4124-4128.
33. Dal Piaz F, Bader A, Malafronte N, D'Ambola M, Petrone A.M, Porta A, y col. Phytochemistry of compounds isolated from the leaf-surface extract of *Psiadia punctulata* (DC.) Vatke growing in Saudi Arabia. *Phytochem.* (2018) 155: 191-202.
34. Donadio G, Chini M.G, Parisi V, Mensitieri F, Malafronte N, Bifulco G, y col. Diterpenoid Constituents of *Psiadia punctulata* and Evaluation of Their Antimicrobial Activity. *J. Nat. Prod.* (2022) 85(7):1667-1680.
35. Besbes Hlila M, Mosbah H, Majouli K, Ben Nejma A, Ben Jannet H, Mastouri M, y col. Antimicrobial Activity of *Scabiosa arenaria* Forssk. Extracts and Pure Compounds Using Bioguided Fractionation. *Chem Biodivers.* (2016) 1: 1262-1272.
36. Castro I, Fabre N, Bourgeade-Delmas S, Saffon N, Gandini C, Sauvain M, y col. Structural Characterization and Anti-infective Activity of 9,10-Seco-29-norcydoartane Glycosides Isolated from the Flowers of the Peruvian Medicinal Plant *Cordia lutea*. *J. Nat. Prod.* (2019) 82(12): 3233-3341.
37. El-Shiekh R.A, Hassan M, Hashem R.A, Abdel-Sattar E. Bioguided isolation of antibiofilm and antibacterial pregnane glycosides from *Caralluma quadrangula*: Disarming multidrug-resistant pathogens. *Antibiotics.* (2021) 10(7): 1-11.
38. Ramallo I.A, Salazar M.O, Furlan R.L. Enzymatic Bioautographic Methods. En: *Targeting Enzymes for Pharmaceutical Development. Methods in Molecular Biology*, Labrou N, Editor. Nueva York (Estados Unidos): Editorial Humana, 2020, vol 2089, p. 179-189.
39. Choma I.M., Grzelak E.M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A.* (2011) 1218: 2684-2691.
40. Morel A.F, Araujo C.A, Da Silva U.F, Hoelzel S.C, Zachiazachia R, Bastos N.R. Antibacterial cyclopeptide alkaloids from the bark of *Condalia buxifolia*. *Phytochem.* (2002) 61: 561-566.
41. Tatsuta K. Total synthesis of the big four antibiotics and related antibiotics. *J. Antibiot.* (2013) 66: 107-129.
42. Tatsuta K, Yoshimoto T, Gunji H, Okado Y, Takahashi M. The First Total Synthesis of Natural (-)-Tetracycline. *Chem. Lett.* (2000) 29: 646-647.
43. Van Der Hooff J.J., Mohimani H, Bauermeister A, Dorrestein P.C., Duncan K.R., Medema M.H. Linking genomics and metabolomics to chart specialized metabolic diversity. *Chem. Soc. Rev.* (2020) 49: 3297-3314.
44. Miethke M., Pironi M., Weber T, Brönstrup M., Hammann P, Halby L, y col. Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nat. Rev. Chem.* (2021) 5: 726-749.
45. Lukežič T, Lešnik U., Podgoršek A, Horvat J., Polak T, Šala M, y col. Identification of the chelocardin biosynthetic gene cluster from *Amycolatopsis sulphurea*: a platform for producing novel tetracycline antibiotics. *Microbiology* (2013) 159: 2524-2532.

46. Granddaudon C, Birudukota N.V.S., Elgaher W.A.M., Jumde R.P., Yahiaoui S., Arisetti N., y col. Semisynthesis and biological evaluation of amidochelocardin derivatives as broad-spectrum antibiotics. *Eur. J. Med. Chem.* (2020) 188 (112005): 1-11.
47. Galloway W.R., Sidro-Lobet A., Spring D.R. Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules. *Nat. Comm.* (2010) 1: 1-13.
48. Burke M.D., Schreiber S.L. A Planning Strategy for Diversity-Oriented Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* (2004) 43: 46-58.
49. Kong, Y., Li, L., Zhao, L., Yu, P., Li, D. A patent review of berberine and its derivatives with various pharmacological activities (2016–2020). *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* (2022) 32(2): 211-223.
50. Zhang Y., Gu Y., Ren H., Wang S., Zhong H., Zhao X., y col. Gut microbiome-related effects of berberine and probiotics on type 2 diabetes (the PREMOTe study). *Nat. Commun.* (2020) 11(1): 1-12.
51. Chiou W.F., Yen M.H., Chen C.F. Mechanism of vasodilatory effect of berberine in rat mesenteric artery. *Eur. J. Pharmacol.* (1991) 201: 35-40.
52. Sun H., Ansari M.F., Battini N., Bheemanaboina R.R.Y., Zhou C.H. Novel potential artificial MRSA DNA intercalators: Synthesis and biological evaluation of berberine-derived thiazolidinediones. *Org. Chem. Front.* (2019) 6(3): 319-334.
53. Gao W.W., Gopala L., Bheemanaboina R.R.Y., Zhang G.B., Li S., Zhou C.H. Discovery of 2-aminothiazolyl berberine derivatives as effectively antibacterial agents toward clinically drug-resistant Gram-negative *Acinetobacter baumannii*. *Eur. J. Med. Chem.* (2018) 146: 15-37.
54. Oleik H., Yacoub T., Hoffer L., Gnansounou S.M., Benhaïem-Henry K., Nicoletti C., y col. Synthesis and evaluation of the antibacterial activities of 13-substituted berberine derivatives. *Antibiotics.* (2020) 9(7): 1-31.
55. Demekhin O.D., Zagrebaev A.D., Burov O.N., Kletskii M.E., Pavlovich N.V., Bereznyak E.A., y col. The first 13-vinyl derivatives of berberine: synthesis and antimicrobial activity. *Chem. Heterocycl. Compd.* (2019) 55(11):1128-1130.
56. Wang J., Yang T., Chen H., Xu Y.N., Yu L.F., Liu T., y col. The synthesis and antistaphylococcal activity of 9, 13-disubstituted berberine derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* (2017) 127: 424-433.
57. Chen L., Zhu L., Chen J., Chen W., Qian X., Yang Q. Crystal structure-guided design of berberine-based novel chitinase inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* (2020) 35(1):1937-1943.
58. Ling Y., Wu L.L., Qian L.I., Hu Q.M., Zhang S.Y., Kang L., y col. Novel berberine derivatives: Design, synthesis, antimicrobial effects, and molecular docking studies. *Chin. J. Nat. Med.* (2018) 16: 774-781.
59. Jeyakkumar P., Zhang L., Avula S.R., Zhou C.H. Design, synthesis and biological evaluation of berberine-benzimidazole hybrids as new type of potentially DNA-targeting antimicrobial agents. *Eur. J. Med. Chem.* (2016) 122: 205-215.
60. Jia D., Dou Y., Li Z., Zhou X., Gao Y., Chen K., y col. Design, synthesis and evaluation of a baicalin and berberine hybrid compound as therapeutic agent for ulcerative colitis. *Bioorg. Med. Chem.* (2020) 28(20): 115697.
61. Khan S., Hussain A., Attar F., Bloukh S.H., Edis Z., Sharifi M., y col. A review of the berberine natural polysaccharide nanostructures as potential anticancer and antibacterial agents. *Biomedicine and Pharmacotherapy.* (2022) 146: 112531.
62. Qian C-D, Wu X-C, Teng Y, Zhao W-P, Li O, Fang S-G, Huang Z-H, Gao H-C. Battacin (Octapeptin B5), a New Cyclic Lipopeptide Antibiotic from *Paenibacillus Tianmuensis* Active against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* (2012) 56: 1458-1465.
63. Kihara S., De Zoysa G. H., Shahlori R., Vadakkedath P. G., Ryan T. M., Mata, J. P., Sarojini, V., McGillivray, D. J. Solution Structure of Linear Battacin Lipopeptides – the Effect of Lengthening Fatty Acid Chain. *Soft Matter.* (2019) 15: 7501-7508.
64. Yim V., Kavianinia I., Knottenbelt M. K., Ferguson S. A., Cook G. M., Swift S., Chakraborty A., Allison J. R., Cameron A. J., Harris P. W. R., Brimble M. A. “Clip”ing on Lipids to Generate Antibacterial Lipopeptides. *Chem. Sci.* (2020) 11: 5759-5765.
65. Méndez L., Salazar M.O., Ramallo A.J., Furlan R.L. Brominated extracts as source of bioactive compounds. *ACS Comb Sci.* (2011) 13(2): 200-204.
66. López S.N., Ramallo A.J., Gonzalez Sierra M., Zaccchino S.A., Furlan R.L. Chemically engineered extracts as an alternative source of bioactive natural product-like compounds. *PNAS* (2006) 104 (2): 441-444.
67. Ramallo A.I., Salazar M.O., García P., Furlan R.L. Chemical Diversification of Natural Product Extracts. En: *Studies in Natural Products Chemistry*. Atta-ur-Rahman F.R.S, editor. Ámsterdam, (Países Bajos): Editorial Elsevier BV; 2019, vol 60, p. 371-398.
68. Hoffman P.S. Antibacterial discovery: 21st century challenges. *Antibiotics.* (2020) 9(5): 1-10.
69. Rice L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* (2008) 197: 1079-1081.
70. Zhao S., Adamiak J.W., Bonifay V., Mehla J., Zgurskaya H.I., Tan D.S. Defining new chemical space for drug penetration into Gram-negative bacteria. *Nat. Chem. Biol.* (2020) 16(12): 1293-1302.
71. Du D., Wang-Kan X., Neuberger A., van Veen H.W., Pos K.M., Pidcock L.J.V., y col. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* (2018) 16: 523-539.
72. Andrews L.D., Kane T.R., Dozzo P., Haglund C.M., Hilderbrandt D.J., Linsell M.S., y col. Optimization and Mechanistic Characterization of Pyridopyrimidine Inhibitors of Bacterial Biotin Carboxylase. *J. Med. Chem.* (2019) 62(16):7489-7505.
73. Richter M.F., Drown B.S., Riley A.P., Garcia A., Shirai T., Svec R.L., y col. Predictive compound accumulation rules yield a broad-spectrum antibiotic. *Nature* (2017) 545(7654):299-304.
74. Muñoz K.A., Hergenrother P.J. Facilitating Compound Entry as a Means to Discover Antibiotics for Gram-Negative Bacteria. *Acc. Chem. Res.* (2021) 54(6): 1322-1333.
75. Morrison K.C., Hergenrother P.J. Natural products as starting points for the synthesis of complex and diverse compounds. *Nat. Prod. Rep.* (2014) 31(1): 6-14.

76. Motika S.E., Hergenrother P.J. Re-engineering natural products to engage new biological targets. *Nat. Prod. Rep.* (2020) 37(11): 1395-1403.
77. Richter M.F., Hergenrother P.J. The challenge of converting gram-positive-only compounds into broad-spectrum antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2019) 1435: 18-38.
78. Parkinson E.I., Bair J.S., Nakamura B.A., Lee H.Y., Kuttab H.I., Southgate E.H., y col. Deoxynyromycins inhibit mutant DNA gyrase and rescue mice infected with fluoroquinolone-resistant bacteria. *Nat. Commun.* (2015) 22, 6: 6947.
79. Parker E.N., Drown B.S., Geddes E.J., Lee H.Y., Ismail N., Lau G.W., y col. Implementation of permeation rules leads to a FabI inhibitor with activity against Gram-negative pathogens. *Nature Microbiology* (2020) 5: 67-75.
80. Parker E.N., Cain B.N., Hajian B., Ulrich R.J., Geddes E.J., Barkho S., y col. An Iterative Approach Guides Discovery of the FabI Inhibitor Fabimycin, a Late-Stage Antibiotic Candidate with In Vivo Efficacy against Drug-Resistant Gram-Negative Infections. *ACS Cent. Sci.* (2022) 8(8): 1145-1158.
81. Motika S.E., Ulrich R.J., Geddes E.J., Lee H.Y., Lau G.W., Hergenrother P.J. Gram-Negative Antibiotic Active through Inhibition of an Essential Riboswitch. *J. Am. Chem. Soc.* (2020) 142(24):10856-10862.
82. Perlmutter S.J., Geddes E.J., Drown B.S., Motika S.E., Lee M.R., Hergenrother P.J. Compound Uptake into E. coli Can Be Facilitated by N-Alkyl Guanidiniums and Pyridiniums. *ACS Infect. Dis.* (2021) 7(1):162-173.
83. Zhang C., Yan L., Wang X., Zhu S., Chen C., Gu Z., y col. Progress, challenges, and future of nanomedicine. *Nano Today* (2020) 35: 101008.
84. Min Y., Caster J.M., Eblan M.J., Wang A.Z. Clinical Translation of Nanomedicine. *Chem. Rev.* (2015) 115: 11147-11190.
85. Li Z., Zhao T., Li J., Yu Q., Feng Y., Xie Y., y col. Nanomedicine Based on Natural Products: Improving Clinical Application Potential. *J. Nanomat.* (2022) 2022: 3066613.
86. Chamundeswari M., Jeslin J., Verma M.L. Nanocarriers for drug delivery applications. *Environ. Chem. Lett.* (2019) 17: 849-865.
87. Mansuri A., Chaudhari R., Nasra S., Meghani N., Ranjan S., Kumar A. Development of food-grade antimicrobials of fenugreek oil nanoemulsion—bioactivity and toxicity analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2023) 30(10): 24907-24918.
88. Cui R., Jiang K., Yuan M., Cao J., Lin L., Tang Z., y col. Antimicrobial film based on polylactic acid and carbon nanotube for controlled cinnamaldehyde release. *J. Mater. Res. Technol.* (2020) 9(5):10130-10138.
89. Rodenak-Kladniew B., Scioli Montoto S., Sbaragini M.L., Di Ianni M., Ruiz M.E., Talevi A., y col. Hybrid Ofloxacin/eugenol co-loaded solid lipid nanoparticles with enhanced and targetable antimicrobial properties. *Int. J. Pharm.* (2019) 569: 118575.
90. Zhang Y., Cheng X., Zhang Y., Xue X., Fu Y. Biosynthesis of silver nanoparticles at room temperature using aqueous aloe leaf extract and antibacterial properties. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* (2013) 423: 63-68.
91. Sabino C. P., Wainwright M., Ribeiro M. S., Sella F. P., Dos Anjos C., da Silva Baptista, M., Lincopan, N. Global priority multidrug-resistant pathogens do not resist photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* (2020) 208: 111893
92. Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko J., Kdzierska E., Knap-Czop K., y col. Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharmacother.* (2018) 106: 1098-1107.
93. Warriar A., Mazumder N., Prabhu S., Satyamoorthy K., Murali T.S. Photodynamic therapy to control microbial biofilms. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* (2021) 33: 102090.
94. Hochma E., Yarmolinsky L., Khalfin B., Nisnevitch M., Ben-Shabat S., Nakonechny F. Antimicrobial Effect of Phytochemicals from Edible Plants. *Processes.* (2021) 9: 2089.
95. Roy R., Tiwari M., Donelli G., Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence.* (2018) 9: 522-554.
96. Hong E.J., Choi D.G., Shim M.S. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. *Acta Pharm. Sin. B* (2016) 6: 297-307.
97. Xiao L., Gu L., Howell S.B., Sailor M.J. Porous silicon nanoparticle photosensitizers for singlet oxygen and their phototoxicity against cancer cells. *ACS Nano* (2011) 5(5): 3651-3659.

Para citación de este artículo: TIBALDI BOLLATI María L, RODRIGUEZ RISTAU, Eugenia, RECIO BALSELLS, Alejandro I., CONTESSI, Yamila S, CONDAT, Félix, NICOTRA, Viviana E, CASERO, Carina N, GARCÍA, Manuela E. (2023) "Productos naturales en la búsqueda de compuestos antimicrobianos: estrategias actuales" en Revista Bitácora Digital Volumen 10. N° 14 Pp 38-62 (FCQ-UNC) Córdoba, Argentina.



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento- NoComercial - 4.0 Internacional.