



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Licenciatura en Química de Alimentos

TESIS

Obtención, simulación *in silico* y evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de metabolitos secundarios de *Croton mazapensis*

Para obtener el título de:

Licenciado en Química de Alimentos

PRESENTA:

Jesús San Agustín Velasco

Director:

Dr. René Velázquez Jiménez

Pachuca de Soto, Hidalgo, México; diciembre de 2025



Mineral de la Reforma, Hgo., a 21 de noviembre de 2025

Número de control: ICBI-D/2988/2025
Asunto: Autorización de impresión.

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

Con Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio, le comunico que el Jurado asignado al egresado de la Licenciatura en Química de Alimentos **Jesús San Agustín Velasco**, quien presenta el trabajo de titulación **"Obtención, simulación *in silico* y evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de metabolitos secundarios de *Croton mazapensis*"**, ha decidido, después de revisar fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; dicho trabajo en la reunión de sinodales, **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente: Dra. Claudia Coronel Olivares

Secretario: Dr. Javier Castro Rosas

Vocal: Dr. René Velázquez Jiménez

Suplente: Dra. Gabriela Marisol Vázquez Cuevas

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

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez
Director del ICBI



GVR/YCC

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

"Amor, Orden y Progreso"



2025



uaeh.edu.mx

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mamá y a papá, porque también este logro es de ustedes, gracias a ustedes he concluido una etapa más en mi vida, sin duda ustedes han sido el motor que me ha impulsado a lograr las cosas. Gracias por estar allí cuando más lo necesitaba, por aconsejarme y apoyarme en mis proyectos, los quiero mucho.

Mamá, tú que me has visto esforzarme por hacer las cosas, sabes que a pesar de las adversidades que se me han presentado he salido adelante y tú has estado allí para abrazarme e impulsarme, gracias por enseñarme a hacer las cosas con el corazón y con buena actitud.

Papá, gracias por demostrarme que con esfuerzo y dedicación llegan las cosas, sin importar los problemas que se me presente en el camino, además de enseñarme ser humilde y agradecido con las personas que me ayudan en cada situación.

Con mucho cariño a mis hermanos José Luis, Erik, Omar y Graciela que son parte fundamental en mi vida, les dedico este logro porque sin duda ustedes también han sido parte de mí, gracias por apoyarme cuando más lo necesitaba, gracias por estar ahí, por los buenos y malos momentos, por tantos momentos de risa que hemos compartido, los quiero muchísimo.

A mis mascotas “Rambo” y “Galleta”, que me han dado mucho amor y cariño.

A todos mis amig@s que durante esta etapa universitaria me brindaron su apoyo en todos los sentidos de principio a fin, les agradezco por permitirme ser parte de su vida.

A mis compañeros de laboratorio, por compartir conocimientos y experiencias conmigo, por hacer los días de laboratorio más estresantes, tranquilos y divertidos.

A todos los Doctores que me dieron las herramientas para terminar esta carrera, por brindarme el apoyo necesario para concluir con éxito esta etapa universitaria, en especial al Dr. René por darme la confianza de trabajar con él, por compartir sus conocimientos conmigo y por darme todo el apoyo necesario para concluir este trabajo.

Índice

Resumen	1
1.Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1 Multirresistencia de bacterias a los medicamentos	4
2.2 La familia Euphorbiaceae	12
2.3 Generalidades del género <i>Croton</i>	12
2.4 Metabolismo primario y secundario de especies vegetales	15
2.5 Factores que afectan la producción de metabolitos secundarios	16
2.6 Historia sobre la aplicación de metabolitos secundarios	17
2.7 Clasificación de metabolitos secundarios	18
2.7.1 Terpenos	19
2.7.2 Diterpenos	23
2.8 Metabolitos secundarios en especies del género <i>Croton</i>	26
2.9 Actividad antimicrobiana de especies del género <i>Croton</i>	28
2.10 Técnicas de extracción, separación y purificación de compuestos a partir de extractos vegetales	29
2.10.1 Maceración	29
2.10.2 Cromatografía.....	30
2.11 Técnicas para la caracterización estructural de compuestos.....	31
2.11.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)	31
2.11.2 Difracción de rayos x	32
2.12 Estudios <i>in silico</i>	32
2.12.1 Propiedades fisicoquímicas, el perfil ADME y las actividades biológicas.....	33
2.12.2 Perfil ADME	33
2.12.3 Actividades biológicas	34

2.12.4 Acoplamiento molecular (Docking).....	34
2.13 Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos obtenidos de especies vegetales	35
2.13.1 Métodos de difusión.....	35
3. Justificación.....	37
4. Objetivos.....	38
Objetivo general.....	38
Objetivos específicos	38
5. Materiales y parte experimental	39
5.1 Materiales.....	39
5.1.1 Material biológico	39
5.1.2 Medios de cultivo	39
5.1.3 Materiales, reactivos y disolventes.....	39
5.1.4 Equipos.....	40
5.2 Colecta de las raíces de <i>Croton mazapensis</i>	40
5.3 Obtención de extracto crudo	40
5.4 Identificación de compuestos en cromatografía de capa fina	41
5.5 Extracción de compuestos puros mediante cromatografía en columna	41
5.6 Análisis de muestras de extracto, fracciones y compuestos puros mediante RMN....	41
5.7 Métodos computacionales, bioinformática: Estudios <i>in silico</i> de los compuestos	42
5.7.1 Perfil ADMET y predicciones de actividades biológicas	42
5.7.2 Acoplamiento molecular (Docking).....	43
5.8 Evaluación microbiológica de compuestos puros contra bacterias empleando el método de difusión por goteo.	43
6. Resultados y discusión.....	44

6.1 Obtención de extractos y selección de la fase móvil para el fraccionamiento del extracto metanólico de la raíz de <i>Croton mazapensis</i>	44
6.2 Purificación y caracterización de los compuestos	45
6.3 Predicción de las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas	55
6.4 Predicciones ADMET	57
6.5 Predicciones de blancos y de la actividad biológica.....	59
6.6 Acoplamiento molecular de los compuestos	61
6.7 Evaluación del efecto antibacteriano de los compuestos puros.....	65
7. Conclusiones.....	69
8. Perspectivas.....	70
9. Referencias bibliográficas.....	71

Índice de figuras

Figura 1. Planta de <i>Croton mazapensis</i> obtenido de Conabio.....	4
Figura 2. Descripción de los mecanismos de resistencia en las bacterias. Antibiótico A (disminución de absorción), Antibiótico B (Degradación enzimática), Antibiótico C (Mutación de resistencia) y Antibiótico D (Bombas de flujo) modificado de Elshobary <i>et al.</i> , 2025.	6
Figura 3. Mecanismos de resistencia en vías respiratorias de <i>P. aeruginosa</i> destacando su evolución adaptativa y mecanismos de persistencia modificado de La Rosa <i>et al.</i> , 2025.	8
Figura 4. Ejemplares de especies de plantas pertenecientes al género <i>Croton</i> a) <i>Croton arboreus</i> b) <i>Croton tiglium</i> c) <i>Croton draco</i> d) <i>Croton urucurana</i> e) <i>Croton lechleri</i> f) <i>Croton hirtus</i>	13
Figura 5. Funciones principales de los metabolitos secundarios.....	19
Figura 6. Estructura del isopreno.....	19

Figura 7. Biosíntesis de terpenoides en plantas, mostrando las etapas básicas de este proceso y los principales grupos de productos finales. CoA, coenzima A; GAP, gliceraldehído-3-fosfato modificado de Ashour <i>et al.</i> , 2010.....	20
Figura 8. Estructura de las diferentes familias de diterpenos presentes en el género <i>Croton</i>	22
Figura 9. Formación de terpenos C ₁₀ , C ₁₅ y C ₂₀ a partir de la fusión de unidades isoprenoides C ₅ modificado de Ashour <i>et al.</i> , 2010.	24
Figura 10. Representación esquemática de diterpenos del tipo labdano.	25
Figura 11. Representación esquemática de diterpenos de tipo clerodano.	26
Figura 12. Diterpenos de tipo abietano y clerodano aislados de especies de <i>Croton</i>	29
Figura 13. Metodología de estudios <i>in silico</i>	42
Figura 14. Extracto de <i>C. mazapensis</i>	45
Figura 15. Cromatografía en capa fina de extracto de raíz de <i>Croton mazapensis</i> con CH ₂ Cl ₂ y AcOEt.	45
Figura 16. Separación por CC y CCF de las fracciones obtenidas del primer fraccionamiento del extracto.	46
Figura 17. Espectro de RMN de ¹ H de la cascarillona (36) en CDCl ₃ (400MHz).	47
Figura 18. Espectro de RMN de ¹³ C de la cascarillona (36) en CDCl ₃ (100MHz).	48
Figura 19. Estructura de cascarillona (36) obtenida por difracción de rayos-X.....	48
Figura 20. Espectro de RMN de ¹ H de la velamona (37) en CDCl ₃ (400 MHz).....	49
Figura 21. Espectro de RMN de ¹³ C de la velamona (37) en CDCl ₃ (100 MHz).	50
Figura 22. Estructura de velamona (37) obtenida por difracción de rayos-X.	50
Figura 23. Espectro de RMN de ¹ H de la mazapenolido A (38) en CDCl ₃ (400 MHz).....	52
Figura 24. Espectro de RMN de ¹³ C del mazapenolido A (38) en CDCl ₃ (100 MHz).	52
Figura 25. Experimento COSY de la mazapenolido A (38) en CDCl ₃	53
Figura 26. Experimento HMBC de la mazapenolido A (38) en CDCl ₃	53
Figura 27. Estructura de mazapenolido A (38) obtenida por difracción de rayos-X.	54
Figura 28. Radares de biodisponibilidad de Cascarillona (36), Velamona (37) y Mazapenolido A (38).	57
Figura 29. Radares de biodisponibilidad de la estreptomicina como antibiótico de referencia.	57

Figura 30. Acoplamiento molecular e interacciones de los compuestos 36 (A), 37 (B), 38 (C) y cefotaxima (D) (inhibidor) con el sitio de unión de la enzima β -lactamasa.	64
Figura 31. Efecto de inhibición de 36 (C1) contra <i>Staphylococcus aureus</i> (SA).....	67
Figura 32. Efecto de inhibición del 36 (C1) contra <i>Bacillus subtilis</i> (BS).....	68
Figura 33. Efecto de Inhibición del compuesto 37 (C2) contra <i>Bacillus subtilis</i> (BS).....	68

Índice de tablas

Tabla 1. Ejemplares etnobotánicos más específicos de acuerdo con la especie y la ubicación geográfica descritos en Barrera <i>et al.</i> , 2016.....	14
Tabla 2. Clasificación de terpenos.....	22
Tabla 3. Compuestos identificados de algunas especies del género <i>Croton</i>	27
Tabla 4. Servidores utilizados para determinar las predicciones fisicoquímicas y biológicas de los compuestos 36 , 37 y 38	42
Tabla 5. Desplazamientos químicos de protón y carbono de los compuestos 36-38 en CDCl ₃ , (δ en ppm y J en Hz). ^a	55
Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos 36-38 aislados de <i>C. mazapensis</i>	56
Tabla 7. Perfil ADMET de los tres compuestos 36-38 , realizado en ADMETsar.	58
Tabla 8. Mapa de calor de la predicción de las posibles actividades biológicas.	60
Tabla 9. Mapa de calor sobre la predicción de objetivos bacterianos.	61
Tabla 10. Energía de unión de los compuestos 36-38 y cefotaxima (inhibidor) con la enzima β -lactamasa e interacciones de puentes de hidrógeno y π - π	63
Tabla 11. Ensayo del compuesto 36 contra las bacterias <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	65
Tabla 12. Ensayo del compuesto 37 contra las bacterias <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	66
Tabla 13. Ensayo del compuesto 38 contra las bacterias <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	66

Lista de abreviaturas

°C	Grados Celsius
¹³ C	Carbono 13
1D	Experimento en una dimensión
¹ H	Protón
2D	Experimento en dos dimensiones
A	Absorbancia
Å	Amstrong
AcOEt	Acetato de etilo
ADME	Adsorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ATCC	American Type Culture Collection
AN	Amikacina
BLEE	Betalactamasas de espectro extendido
CE	Cefalosporinas
FEP	Cefepima
CFP	Cefoperazona
CAZ	Ceftazidima
CP	Ciprofloxacino
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
COSY	Espectroscopía de correlación
DMAPP	Dimetilalil pirofosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
EC ₅₀	Concentración efectiva media
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacter spp</i>
FPP	Farnesil difosfato
g/mol	gramos/mol
GM	Gentamicina
GAP	Gliceraldehído-3-fosfato
GGPP	Difosfato de geranilgeranilo
GPP	Difosfato de geranil
GRA	Genes de resistencia antimicrobiana

HMBC	Correlación de enlace múltiple heteronuclear
HMQC	Correlación cuántica simple heteronuclear
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IPP	Isopentenil pirofosfato
LogP	Coeficiente de partición octanol/agua
LogS	Coeficiente de solubilidad
LPS	Lipopolisacáridos
MEP	Metileritritol fosfato
MEM	Meropenem
mg/mL	Miligramo/mililitro
MHz	Mega Hertz
MIC	Mínima concentración inhibitoria
mL	Mililitro
mm	milímetro
MTT	3-(4,5-dimentil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium
nm	nanómetro
DCI	Netilmicina
CPD	Cefalosporinasa derivada de <i>Pseudomonas</i>
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial de hidrógeno
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
PM	Peso molecular
ppm	Partes por millón
PEF	Piperacilina
PTZ	Piperacilina-Tazobactam
PSA	Polar Surface Área
Rf	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
SASM	<i>Staphylococcus aureus</i> sensible a la meticilina
Spin α	Spin alfa
Spin β	Spin beta
UFC/mL	Unidades Formadoras de colonia/ mililitro
UV	Ultravioleta
µg/mL	microgramo/mililitro
δ	Desplazamiento químico
J	Constante de acoplamiento

Resumen

El género *Croton* tiene una gran variedad de metabolitos secundarios del tipo diterpeno, en los que se destacan los labdanos y clerodanos, estudios previos de distintas especies han mostrado resultados sobre diversas actividades biológicas como anticoagulante, antiinflamatoria, antiséptica, antiparasitaria, antimicrobiana y citotóxica.

En esta investigación se recolectó la planta *Croton mazapensis* debido a que no cuenta con algún estudio químico o biológico. La planta es conocida como “Guaje de ratón”, “palo dulce” o “salvia”, un arbusto que se encuentra distribuido en México. En el presente trabajo se reporta la identificación y caracterización del extracto metanólico de la raíz de *C. mazapensis* de 2 diterpenos del tipo clerodano ya descritos como cascarillona (36) y velamona (37), y un nuevo diterpeno nombrado como mazapenolido A (38) mediante técnicas de purificación y separación como: maceración, cromatográficas (CCF y CC) y espectroscópicas (RMN de 1D y 2D y rayos X), por otro lado se realizaron pruebas computacionales con la finalidad de predecir sus propiedades fisicoquímicas y toxicológicas usando SwissADME y ADMETlab 3.0 para predicciones fisicoquímicas y farmacocinéticas, donde se obtuvieron resultados favorables dentro de los valores óptimos permitidos, además de información sobre su efecto al administrarse en el organismo mediante admetSAR, seguido de un estudio sobre las actividades biológicas como posibles blancos terapéuticos con el programa Way2drug que indica el uso como posible efecto como antineoplásico y antibacteriano. Igualmente se realizó el docking molecular sobre la interacción de los compuestos 36-38 con la enzima β -lactamasa (PDB:4KG5) el cual mostró interacción de los 3 compuestos con el sitio activo mediante puentes de hidrógeno con el grupo cetona, para realizar este estudio se usó el programa Autodock4 Tools y Discovery Studio. Finalmente, se evaluó la actividad antimicrobiana mediante la técnica de Kirby - Bauer, aplicando por goteo a distintas bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativa con la finalidad de determinar la efectividad de los compuestos purificados contra el crecimiento bacteriano, teniendo como resultado la inhibición de 2 bacterias Gram positivas. Se logró la elucidación de la estructura molecular, la predicción de las propiedades biológicas *in silico* y la evaluación antimicrobiana.

1. Introducción

Hoy en día, un problema de salud pública a nivel mundial es la multirresistencia a medicamentos, la resistencia a los medicamentos tiene un costo considerable para los países y sus sistemas de salud. En particular, la resistencia a los antibióticos hace que se prolonguen las estancias hospitalarias, incremento en los costos médicos, y aumento en la tasa de mortalidad. El creciente número de infecciones, como la neumonía, la tuberculosis, la septicemia (Camacho *et al.*, 2021) o las enfermedades de transmisión alimentaria, son cada vez más difíciles y a veces imposibles de tratar a medida que los antibióticos van perdiendo eficacia (Silva *et al.*, 2024).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recientemente ha publicado una lista de patógenos bacterianos prioritarios, géneros de bacterias resistentes a los antibióticos denominados como ESKAPE. La resistencia a los antibióticos es un problema complejo que requiere un enfoque multisectorial unificado. Por consiguiente, es imperante la búsqueda de nuevos fármacos para hacer frente a esta problemática de salud pública. En este sentido, el uso y aprovechamiento de plantas medicinales son una estrategia y fuente importante para la búsqueda de nuevos principios activos más eficientes, a través del descubrimiento de nuevas moléculas y/o sus derivados semisintéticos (WHO, 2024).

La caracterización de nuevas moléculas presentes en las plantas ha desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de tratamientos para curar distintas enfermedades que puedan afectar al organismo durante tiempos prolongados, haciendo que sea una alternativa para el desarrollo de medicamentos., por lo tanto, las especies vegetales pueden ser estudiadas a partir de sus distintos órganos como estructuras foliares, caulinares, reproductivas y subterráneas para obtener y aislar compuestos químicos con actividades farmacológicas contra las enfermedades que afectan tanto al ser humano como a otras especies (Barrera *et al.*, 2016).

Se han aislado principios bioactivos de plantas, los cuales se han denominado fármacos o drogas y la farmacología se ha encargado de estudiar algunas de sus propiedades en los seres humanos, principalmente, para darles una utilización en las enfermedades diversas que aquejan al hombre. Para obtenerlos, el metabolismo de las plantas lleva a cabo una serie de

reacciones con la finalidad de sintetizar o degradar moléculas, por ende, se llevan a cabo dos tipos de metabolismo: primario y secundario. El primero consiste en la producción de sustancias que incentiven en el crecimiento, desarrollo y reproducción como, por ejemplo: carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Sin embargo, el metabolismo secundario les permite producir compuestos químicos que juegan un papel muy importante en el estrés ambiental y en la defensa contra depredadores y patógenos. Además, el metabolismo secundario de las plantas lleva a cabo una serie de reacciones en las cuales se obtienen productos que son aprovechables para el ser humano como los metabolitos secundarios que son sustancias producidas naturalmente en las plantas, aunque pueden o no relacionarse con la actividad microbiana. Los metabolitos secundarios sirven como defensa contra hongos, bacterias, plantas, insectos y animales (Jiménez *et al.*, 2003).

El género *Croton* es muy diverso, además se han identificado varias especies, ya que son encontradas en cualquier tipo de clima. Pueden ser arbustos, árboles, hierbas y tiene su aplicación principalmente en la medicina haciendo uso de sus raíces, tallos, hojas, flores y semillas. Los metabolitos secundarios en este género comprenden principalmente terpenos de naturaleza diterpénica principalmente, como pueden ser del tipo labdano, clerodano, tiglanos, kauranos, abietanos, casbanos, halimanos, pimaranos y grayanos, por mencionar algunos (Barrera *et al.*, 2016).

En este presente trabajo se utilizó la planta *Croton mazapensis* (**Fig. 1**) para la búsqueda de metabolitos secundarios y su evaluación de características estructurales mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas. Además, se reconocieron las propiedades fisicoquímicas, el perfil ADME y las actividades biológicas haciendo uso de herramientas computacionales para identificar las probabilidades de su potencial uso como antibacteriano, por último, determinar si presenta actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas y Gram negativas patógenas para el ser humano mediante el método de Kirby - Bauer.



Figura 1. Planta de *Croton mazapensis* obtenido de Conabio.

2. Antecedentes

2.1 Multirresistencia de bacterias a los medicamentos.

La resistencia a los antibióticos es un proceso natural, complejo e influenciado por las condiciones ambientales, la densidad de la comunidad microbiana y el uso generalizado de antibióticos, incluso más en la atención médica, la agricultura y la producción de alimentos. (Yu *et al.*, 2021). La multirresistencia de las bacterias a los antibióticos, actualmente es un problema que se atribuye al uso excesivo o incontrolable en la atención médica, la atención veterinaria, la acuicultura y la agricultura, esto ha sido causa de la proliferación de bacterias que ponen a prueba para que el organismo humano pueda combatir las enfermedades (Yu *et al.*, 2021).

Los patógenos resistentes a los antibióticos propagan genes de resistencia a través de múltiples mecanismos como la transferencia horizontal de genes en donde las vesículas de membrana externa sirven como vehículos para el intercambio genético, el uso de enzimas propias de las bacterias, la poca permeabilidad de la membrana celular o el constante flujo para bombear sustancias al exterior de las células, entre otros.

La resistencia es un mecanismo natural en ciertos tipos de bacterias; (presente incluso antes del descubrimiento de los antibióticos), mutaciones genéticas en organismos, por una especie que adquiere resistencia de otra y la presión de selección por el uso de antibióticos que proporciona una ventaja competitiva para las cepas mutadas (Adedeji, 2016).

La eficacia de los fármacos disminuye debido a que las bacterias ejercen una resistencia para poder inhibirse, por lo que la búsqueda de nuevos fármacos podría ayudar a la disminución de bacterias y tener la capacidad de eliminarlos para que no puedan sobrevivir.

En la actualidad, el incremento de infecciones causadas por bacterias ha sido uno de los mayores problemas de salud, lo cual garantiza una amenaza para las personas. Aún hay muchos agentes bacterianos novedosos que han sido limitados debido a su actividad insuficiente, a la multirresistencia y al riesgo a su toxicidad. Los problemas de las resistencias pueden resolverse bloqueando el mecanismo de las bacterias, buscando nuevos fármacos con nuevos objetivos, por lo cual es importante conocer las bases bioquímicas de la resistencia a los medicamentos para diseñar estrategias que limiten su surgimiento y propagación (Velázquez *et al.*, 2023).

2.2.1 Tipos de mecanismos de resistencia bacteriana

Los mecanismos de la resistencia a los antibióticos se clasifican principalmente de 3 tipos: intrínseca, adquirida y adaptativa (Elshobary *et al.*, 2025).

Resistencia intrínseca

La resistencia intrínseca es una característica natural e inherente de las especies bacterianas, arraigada en elementos cromosómicos fundamentales. Este tipo de resistencia hace referencia a las barreras estructurales como los lipopolisacáridos (LPS) en bacterias Gram negativas, genes de resistencia antimicrobiana (GRA) inherentes y mecanismos de defensa naturales. Entre sus características se encuentran las enzimas betalactamasas, las bombas de flujo que expulsan los agentes antimicrobianos y las variaciones estructurales que impiden la penetración de los antibióticos (Elshobary *et al.*, 2025).

Resistencia adquirida

La resistencia adquirida implica la transferencia horizontal de material genético entre especies bacterianas, lo que permite una propagación dinámica de rasgos de resistencia. Este mecanismo permite que las bacterias adquieran resistencia mediante procesos como la conjugación, la transformación y la transducción (Elshobary *et al.*, 2025).

Resistencia adaptativa

La resistencia adaptativa emerge de las presiones ambientales dentro de los nichos microbianos, caracterizados por respuestas celulares dinámicas al estrés del antibiótico. Estos mecanismos adaptativos implican modificaciones en la permeabilidad celular, formación de biopelículas y adaptaciones metabólicas que permiten a las bacterias sobrevivir en ambientes desafiantes (Elshobary *et al.*, 2025).

Los mecanismos específicos que impulsan las resistencias aumentadas son multifacéticos, incluyendo la formación de biopelículas, la alteración de los sitios de unión de los antibióticos, la producción de desactivación de antibióticos basada en enzimas, permeabilidad de membrana reducida y el eflujo activo de agentes antimicrobianos (Elshobary *et al.*, 2025) (**Fig. 2**).

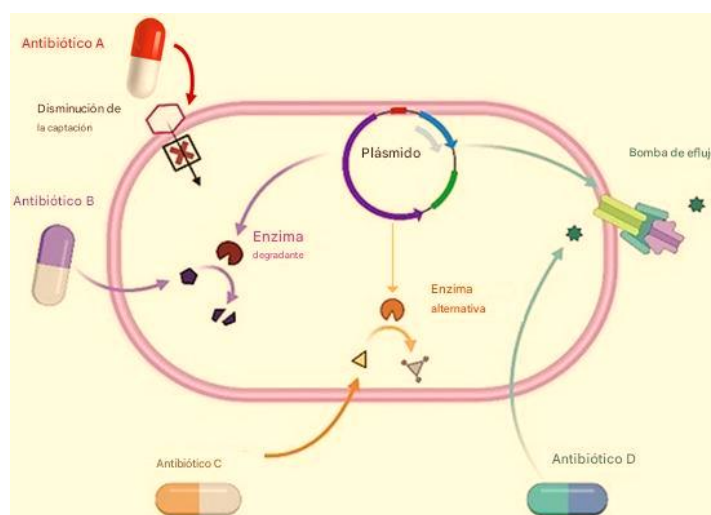


Figura 2. Descripción de los mecanismos de resistencia en las bacterias. Antibiótico A (disminución de absorción), Antibiótico B (Degradación enzimática), Antibiótico C (Mutación de resistencia) y Antibiótico D (Bombas de flujo) modificado de Elshobary *et al.*, 2025.

2.2.3 Bacterias y su resistencia a antibióticos

2.2.3.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa con forma de bacilo; se le considera oportunista ampliamente distribuida en entornos naturales y urbanos, que desempeña un papel crucial en la ecología microbiana global. Su predilección por causar infecciones en huéspedes inmunodeprimidos. Su extrema versatilidad, su resistencia a los antibióticos y su amplia gama de defensas dinámicas la convierten en un microorganismo extremadamente difícil de tratar en la medicina moderna (Oliver *et al.*, 2025). Las rutas para que *P. aeruginosa* pueda infectar al huésped pueden variar ampliamente e incluyen inhalación en infecciones de las vías respiratorias, contacto directo con membranas mucosas en infecciones de la piel y heridas por quemaduras, brechas en la piel en infecciones del sitio quirúrgico o dispositivos médicos contaminados en infecciones oculares y del tracto urinario, por lo tanto puede causar infecciones agudas y persistentes a largo plazo en personas con trastornos respiratorios como los causados por fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y discinesia ciliar primaria (La Rosa *et al.*, 2025).

P. aeruginosa tiene una permeabilidad de membrana externa naturalmente baja, expresa varias bombas de eflujo de múltiples fármacos para limitar la entrada de antibióticos, emplea tolerancia a antibióticos para superar el tratamiento antibiótico, produce biopelículas que la protegen de los antibióticos y del sistema inmunitario del huésped (**Fig. 3**). Además, emplea una variedad de enzimas y toxinas que dañan los tejidos del huésped e interfieren con las respuestas inmunitarias (La Rosa *et al.*, 2025). *P. aeruginosa* es intrínsecamente resistente a las aminopenicilinas y a la mayoría de las cefalosporinas más antiguas, debido a la producción de una β -lactamasa AmpC inducible, también conocida como cefalosporinasa derivada de *Pseudomonas* (Oliver *et al.*, 2025).

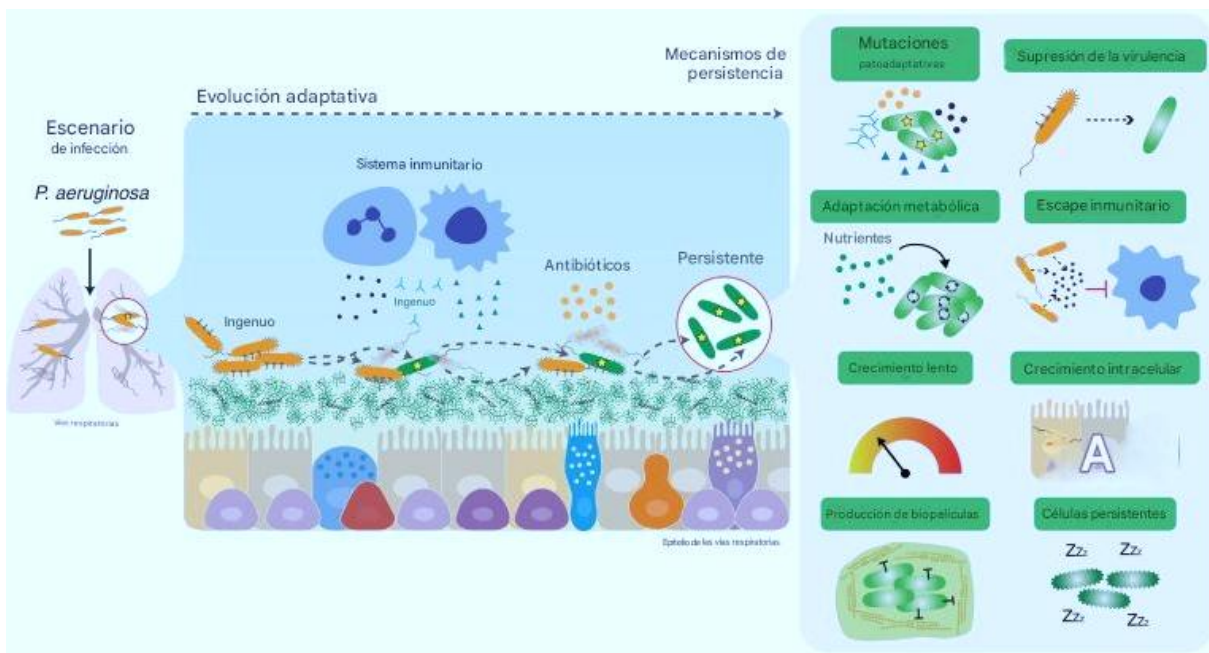


Figura 3. Mecanismos de resistencia en vías respiratorias de *P. aeruginosa* destacando su evolución adaptativa y mecanismos de persistencia modificado de La Rosa *et al.*, 2025.

2.2.3.2 *Escherichia coli*

E. coli es una bacteria Gram negativa, no esporulante, con forma de bacilo, anaerobia facultativa y coliforme. Habita comúnmente en el medio ambiente, los alimentos y el intestino delgado de animales de sangre caliente (Basavaraju y Gunashree, 2022).

Es un tipo de bacteria que habita en diversos entornos, incluyendo el sistema gastrointestinal de humanos, donde forma parte de la microbiota intestinal. Algunas cepas de *E. coli* pueden administrarse como probióticos y se sabe que tienen un efecto positivo en la salud del huésped. Sin embargo, algunas cepas pueden ser patógenas, causando infecciones intestinales y extraintestinales tanto en humanos como en animales (Basavaraju y Gunashree, 2022).

Las cepas de *E. coli* presentan diversos mecanismos de resistencia, como la producción de diferentes enzimas β -lactamasas (Nasrollahian *et al.*, 2024), la disminución de la permeabilidad de la membrana, la formación de cápsula y biopelícula, el uso de bombas de eflujo y la modificación enzimática.

De acuerdo con un análisis realizado en una planta de tratamiento de aguas residuales demostró que había bacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), Las cepas de *E. coli* mostraron expresión de la enzima BLEE, lo que indica resistencia a los antibióticos. Los patrones de resistencia incluyeron ciprofloxacino, ampicilina, cefotaxima, cefoxitina y amoxicilina-ácido clavulánico para ambas especies. *E. coli* mostró una mayor sensibilidad al cloranfenicol, trimetoprima-sulfametoxazol y gentamicina. Los resultados de la concentración mínima inhibitoria de ceftazidima mostraron una mayor resistencia de *E. coli*. El estudio destaca la presencia de cepas resistentes a los antibióticos, lo que subraya la importancia de un tratamiento eficaz de aguas residuales (Mohany *et al.*, 2025).

Actualmente, existen múltiples registros sobre la relación entre la resistencia a los antibióticos y la creación de biopelículas por cepas de *E. coli*, ya que emplea diversas estrategias para protegerse contra diferentes agentes antimicrobianos. Se han estudiado los efectos de diversos antibióticos sobre la biopelícula de *E. coli*, incluyendo amikacina (AN), cefalosporinas (CE), ceftazidima (CAZ), cefoperazona (CFP), cefepima (FEP), piperacilina (PEF), piperacilina-tazobactam (PTZ), ciprofloxacino (CP), gentamicina (GM), meropenem (MEM) y netilmicina (DCI). Estos hallazgos muestran que las poblaciones bacterianas no sobreviven en su estado de vida libre, pero sí sobreviven en la biopelícula (Nasrollahian *et al.*, 2024). Por ejemplo, la evaluación de resistencia de *E. coli* al exponerse a ciertos antibióticos, *E. coli* expuesta a ampicilina; mostró las tasas más altas de resistencia a los antibióticos, seguida de la tetraciclina, con tasas de resistencia del 74,6% y el 64,9%, respectivamente (Fuji *et al.*, 2017).

2.2.3.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria patógena Gram positiva y un factor clave en el desarrollo de infecciones de piel y tejidos blandos. Estas infecciones pueden culminar en la localización tisular, infecciones purulentas y, si no se controlan eficazmente, pueden provocar bacteriemia que frecuentemente deriva en endocarditis infecciosa, neumonía, osteomielitis, sepsis, otras enfermedades debilitantes (Speziale *et al.*, 2025), e incluso un shock séptico grave (Liu *et al.*, 2024).

S. aureus ha desarrollado diversos mecanismos de resistencia a los antibióticos. Entre los más importantes desde el punto de vista clínico está su falta de sensibilidad a los antibióticos β -lactámicos, ya que los β -lactámicos son los medicamentos de elección en el tratamiento de infecciones estafilocócicas (Jama *et al.*, 2025).

Las infecciones por *S. aureus* han mostrado resistencia a los antibióticos, y cepas como *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM) son algunas cepas que causan enfermedades. La supervivencia de SARM o SASM como patógeno depende de la producción de numerosos factores de virulencia, como la formación de biopelículas, la fabricación de péptidos y el sistema inmunitario innato (Nandhini *et al.*, 2023).

En un análisis donde se realizó el muestreo de frutas y verduras para detectar la presencia de *S. aureus* mediante un método de enriquecimiento según lo descrito por la Norma Nacional de Seguridad Alimentaria de China, a todos los aislamientos obtenidos se les realizó prueba de susceptibilidad contra 17 antibióticos. Sin embargo, los resultados mostraron resistencias mayores al 80% en trimetoprima-sulfametoxazol, oxacilina, ampicilina, penicilina, quinupristina-dalfopristina, rifampicina, gentamicina y clindamicina (Jia *et al.*, 2023).

2.2.3.4 *Salmonella* sp.

Salmonella es una bacteria Gram negativa, anaerobia facultativa que utiliza flagelos para desplazarse, estas bacterias patógenas son de suma importancia para animales y humanos. Las infecciones gastrointestinales causadas por algunas especies de *Salmonella* representan un desafío significativo para la salud pública; pueden transmitirse a través de alimentos y bebidas contaminados, lo que resulta en complicaciones de salud. Si bien los antibióticos son el tratamiento principal para estas infecciones, su uso inapropiado ha llevado a la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos (Guerrero *et al.*, 2024).

La salmonelosis causada por esta bacteria se caracteriza por una gripe estomacal (gastroenteritis). Esta enfermedad se acompaña de náuseas, vómitos, calambres abdominales y diarrea sanguinolenta. También se asocia con dolor de cabeza, condiciones febriles y mialgia (Ehuwa *et al.*, 2021).

Por ejemplo, en un estudio realizado en un periodo de 2010 a 2023 en una región de Italia, se evaluaron 680 cepas de *Salmonella* con diversos antibióticos donde se resalta que casi todas las cepas fueron resistentes a la azitromicina (99,4%) y mostraron alta resistencia a las sulfonamidas, tetraciclina, estreptomicina y ampicilina, la resistencia a la ciprofloxacina aumentó con el tiempo (Peruzy *et al.*, 2025).

La resistencia a las tetraciclinas en *Salmonella* surge mediante mecanismos como las bombas de eflujo, la modificación de la diana del RNAr y la inactivación de compuestos. La resistencia a las sulfonamidas se origina en sitios diana alterados, la sobreproducción de enzimas o las vías de derivación. De igual manera, la resistencia a los aminoglucósidos implica modificaciones enzimáticas, bombas de eflujo o la degradación de antibióticos. Estos mecanismos de resistencia multifacéticos subrayan la adaptabilidad de *Salmonella* para evadir la acción de los antibióticos (Punchihewage *et al.*, 2024).

2.2.3.5 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un patógeno intracelular, Gram positivo, no esporulado, no encapsulado, anaerobio facultativo, con forma de bacilo y psicotrofo, transmitido por los alimentos. Es el agente causal de la listeriosis, por ello, ha atraído gran atención tras los brotes, que suelen estar asociados a altas tasas de mortalidad (Manyi-Loh y Lues, 2025). Es una bacteria resistente a diversas condiciones alimentarias, como la refrigeración, la actividad acuosa reducida y el pH bajo, representa una amenaza significativa para la industria alimentaria y la salud pública (Díaz *et al.*, 2024).

De acuerdo Silva y colaboradores., 2024 se realizaron estudios en el periodo de 2014 a 2022 sobre la susceptibilidad a antibióticos y su capacidad de formación de biopelículas, de tal manera que se evaluaron muestras de alimentos que incluía carne, queso y productos lácteos. Dichas bacterias se identificaron en 13 de 227 muestras, por lo que al realizar las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos se mostró resistencia a varias clases de antibióticos, especialmente trimetoprima-sulfametoxazol y eritromicina. *L. monocytogenes* ha desarrollado resistencia natural adquirida a una amplia gama de β -lactámicos y cefalosporinas, con base en los perfiles de resistencia a los antimicrobianos observados en el presente estudio, la detección de una susceptibilidad reducida a los antibióticos de primera

línea, como la penicilina, la ampicilina y trimetoprima-sulfametoxazol, es preocupante (Silva *et al.*, 2024).

2.2 La familia Euphorbiaceae

La Euphorbiaceae es una de las familias más diversas entre las magnoliofitas. Está conformada por cinco subfamilias, 49 tribus, 317 géneros y cerca de 8100 especies, distribuidas principalmente en las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Los géneros con mayor número de especies son: *Euphorbia*, *Chamaesyce*, *Acalypha*, *Croton*, *Ricinus* y *Sinadenium* (Zegarra, 2019).

Con alrededor de 8700 especies ubicadas en 320 géneros (Webster, 1994), la familia Euphorbiaceae es una de las más grandes a nivel mundial y ocupa el sexto lugar en diversidad después de Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Rubiaceae (Steinmann, 2002).

En México la familia Euphorbiaceae está representada por 43 géneros y 782 especies, más de 32 taxa intraespecíficos: 8 subespecies y 24 variedades. Los géneros más grandes son *Euphorbia* (241 *sp.*, 31%), *Croton* (124 *sp.*, 16%), *Acalypha* (108 *sp.*, 14%), *Jatropha* (48 *sp.*, 6%) y *Phyllanthus* (41 *sp.*, 5%). Todos estos géneros representan el 72% de las especies de Euphorbiaceae conocidas de México (Steinmann, 2002).

2.3 Generalidades del género *Croton*

El género *Croton* es un grupo muy diverso de plantas que se encuentran principalmente en la región neotropical, *Croton* es el segundo género con más riqueza y abundancia dentro de la familia Euphorbiaceae, encontrándose en vegetaciones secas y húmedas, donde se han descubierto más de 1200 especies (Van *et al.*, 2011), su importancia se basa en las propiedades moleculares que puedan ser aprovechadas para diversos campos de estudio. Este género presenta mucha variedad en sus especies, desarrollándose en diferentes regiones de México, el Caribe, Centroamérica y Sudamérica, que son los lugares donde se tienen conocimiento de la existencia de estas plantas, además de Asia y África (**Fig. 4**).



Figura 4. Ejemplares de especies de plantas pertenecientes al género *Croton* a) *Croton arboreus* b) *Croton tiglium* c) *Croton draco* d) *Croton urucurana* e) *Croton lechleri* f) *Croton hirtus*.

El género *Croton* (Euphorbiaceae) tiene varias especies reportadas usadas en la medicina tradicional lo cual destacan mucho la presencia de diterpenos de tipo labdano, ciclitoles, triterpenos, esteroides, sustancias fenólicas y flavonoides, los cuales, se caracterizan porque poseen un amplio rango de actividades biológicas. La química que presenta este género ofrece una variedad de compuestos con potencial uso farmacológico, lo que justifica la importancia de su estudio en cuanto a bioprospección y utilización alternativa a la que ya poseen (Cavalcanti *et al.*, 2020).

Algunos ejemplares etnobotánicos de este grupo han presentado actividades biológicas como antimicrobianos, antiinflamatorios, anticancerígeno, antiséptico, antidiarreico, etc. En la medicina popular se utilizan dosis a partir de decocciones obtenidas de especies del género *Croton*, que son aplicadas sobre la piel o administradas vía oral. En los diferentes países donde se encuentra distribuida, resulta habitual encontrar un látex de color rojo característico en diferentes presentaciones, tanto en forma líquida, e incorporado a diversos preparados (Barrera *et al.*, 2016).

El género *Croton*, se caracteriza porque sus especies poseen una gran cantidad de usos, a

nivel etnobotánica; también, se reportan varios usos interesantes en la medicina tradicional y se destaca la presencia de metabolitos secundarios, que se caracterizan porque poseen un amplio rango de actividad biológica (**Tabla 1**).

Tabla 1. Ejemplares etnobotánicos más específicos de acuerdo con la especie y la ubicación geográfica descritos en Barrera *et al.*, 2016.

Especie	Ubicación geográfica	Uso
<i>Croton californicus</i>	Desierto de Mojave	Tratamiento de reumatismo
<i>Croton draco</i>	México y Centroamérica	Antiséptico, tratamiento de úlceras estomacales y orales.
<i>Croton tiglium</i>	China	Laxante y purgante
<i>Croton lechleri</i>	América del sur	Hemostático y cicatrizante
<i>Croton arboreus</i>	México	Antiinflamatorio
<i>Croton malambo</i>	Norte de Venezuela y Colombia	Tratamiento de diabetes, diarrea, reumatismo, úlcera gástrica y como antiinflamatorio y analgésico
<i>Croton nepetaefolius</i>	Brasil	Carminativo
<i>Croton urucurana</i>	América del sur	Antiinflamatorio y analgésico
<i>Croton zehntner</i>	Brasil	Sedante y estimulante del apetito
<i>Croton arboreus</i>	México	Antiinflamatorio

2.4 Metabolismo primario y secundario de especies vegetales

El metabolismo es un conjunto de reacciones químicas que se lleva a cabo en la célula de los seres vivos con la finalidad de transformar moléculas complejas en moléculas más simples, para poder obtener un conjunto de compuestos que desempeñan diferentes funciones en el organismo (Carril y García, 2009).

El metabolismo primario lleva a cabo una serie de reacciones, catalizadas por enzimas que ayudan a obtener los metabolitos secundarios implicados en su crecimiento, desarrollo y reproducción (Carril y García, 2009). En este proceso se fabrican los nutrientes necesarios como aminoácidos, nucleótidos, ácidos grasos y carbohidratos, estas estructuras monoméricas que dan paso a la formación de estructuras más complejas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y azúcares respectivamente (Carril y García, 2009).

Por otro lado, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (Sánchez, 2022). Los metabolitos secundarios juegan un papel muy importante en su adaptación ante el estrés ambiental y en la defensa frente a potenciales depredadores y patógenos, es decir, organismos que causan enfermedades. Las plantas producen y liberan estos metabolitos cuando se encuentran en condiciones de estrés, ocasionadas por otros organismos vivos, factores no vivos o por desastres naturales. Los metabolitos secundarios a menudo pueden crearse mediante vías sintéticas modificadas a partir del metabolito primario o compartir sustratos de origen primario (Kabera *et al.*, 2014).

Los metabolitos secundarios o productos naturales son utilizados de una manera muy específica, ya que se pudiera encontrar su función mediante evaluaciones fitoquímicas y se encuentran de una manera limitada en la naturaleza. Algunas de las condiciones que pudieran determinar la cantidad presente de estos son: el suelo, la temperatura, el sustrato, disponibilidad del sol y la interacción con su entorno (Kabera *et al.*, 2014).

2.5 Factores que afectan la producción de metabolitos secundarios

La producción de metabolitos secundarios en las plantas puede verse afectada por distintas causas lo cual podría determinar la cantidad que se pudieran obtener. En análisis de laboratorio, los factores que desencadenan alteraciones se dividen en cuatro categorías como: factores ambientales, factores morfogénéticos, factores ontogenéticos y factores genéticos (Ashraf *et al.*, 2018).

Factores ambientales: Los factores bióticos y abióticos activan respuestas defensivas y adaptativas al entorno que rodea a la planta.

- Deficiencias de nutrientes, daño mecánico ocasionado por plagas, iones metálicos, radiación ultravioleta (UV), luz, ritmo circadiano, pH, salinidad, sequía y temperatura.

Factores morfogénéticos: Se basan en la organización y formación del tejido y estructuras que determinan el almacenamiento de los metabolitos secundarios.

- Los factores celulares y bioquímicos, hojas, raíces, cortezas, flores, semillas, actividad enzimática.

Factores ontogenéticos: Se refiere a la etapa del desarrollo de la planta y de los órganos que modifican sus requerimientos metabólicos.

- Fases de vida (germinación, floración.), madurez del órgano (hojas jóvenes, frutos en maduración), variaciones estacionales, eventos reproductivos.

Factores genéticos: Son la base heredada que define qué rutas biosintéticas existen, su regulación y su capacidad de respuesta.

- Especie y genotipo, regulación génica, polimorfismos.

2.6 Historia sobre la aplicación de metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios tienen estructuras muy complejas, sintetizar estos compuestos requieren recursos significativos y rutas bioquímicas elaboradas que demandan un alto consumo de energía, incluidos recursos específicos y algunas condiciones del entorno de la planta que produce. Por lo tanto, la posesión de metabolitos secundarios está lejos de ser barata, y la ganancia de estos compuestos para la planta debe superar los costos (Ashraf *et al.*, 2018).

Los metabolitos secundarios de las plantas son compuestos importantes que aportan color, sabor y olor a las plantas y también median en las respuestas de las plantas a condiciones ambientales adversas (Ashraf *et al.*, 2018). Al principio, las plantas fueron utilizadas como alimento, no se conoce con exactitud cómo surgió la idea de usarlas como medicamentos. Probablemente el hombre empezó a probar plantas desconocidas con el fin de conocer nuevas especies que también se pudieran usar como alimento, y así, experimentar distintos efectos (Plain *et al.*, 2019).

La medicina surge de la actividad del hombre, su desarrollo, conservar la vida y aliviar dolores, al inicio se pensaba que las enfermedades eran ocasionadas por el descontento de los dioses o por los demonios. El origen de la medicina natural y tradicional está ligada a la historia del hombre y de la lucha por la supervivencia (Plain *et al.*, 2019).

El uso de plantas medicinales es tan antiguo como la humanidad. La milenrama y la manzanilla son conocidas por su uso como remedios herbales en las culturas neandertales, desde hace 60,000 años (Mafu y Zerbe, 2017). Registros escritos anteriores de Egipto, China e India revelan evidencia escrita sobre plantas medicinales que datan de hace 4,000 años. Las medicinas herbales basadas en la medicina tradicional se mantienen como atención primaria de salud en todo el mundo hasta la actualidad. Las plantas son una buena fuente de compuestos activos para fármacos y aún se estudian en otros países para descubrir nuevos compuestos con potencial terapéutico (Mafu y Zerbe, 2017).

Los extractos de plantas como agentes contra enfermedades han sido utilizados constantemente en la historia de la humanidad, ya que poseen propiedades que ayudan a

luchar contra alguna anomalía en el organismo. Debido al conocimiento que se tenían en tiempos ancestrales se optó por usarlos por sus propiedades curativas. No obstante, en la actualidad aún se encuentran agentes terapéuticos desconocidos y que quedan por investigar respecto a su potencial curativo (Mafu y Zerbe, 2017).

La ciencia contemporánea permite el desarrollo y producción de fármacos derivados de plantas de una manera más eficiente y sistemática. Entre ellos podríamos encontrar un sin fin de aplicaciones como: antivirales, antiinflamatorios, insecticidas, antiprotzoarios, antineoplásicos, antihelmínticos, antihipertensivos y aditivos alimentarios como los edulcorantes. Estos métodos ayudan a tareas complementarias en las áreas de la ciencias químicas, biológicas y tecnológicas. Para determinar la riqueza biológica de plantas medicinales es importante sistematizar estudios etnobotánicos de acuerdo con la riqueza cultural existente y luego hacer investigaciones etnofarmacológicas (Calvo, 2017).

2.7 Clasificación de metabolitos secundarios

Existen distintas clasificaciones de los metabolitos secundarios según su diversidad en estructura, función y síntesis (proceso en el que compuestos simples se convierten en otros más complejos). Los metabolitos secundarios en base a su estructura se pueden dividir en tres grandes categorías, terpenos o terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos (Eksi y Kurbanoglu, 2020) ya que muestran actividades farmacológicas que conducen al descubrimiento y desarrollo de fármacos (**Fig. 5**).

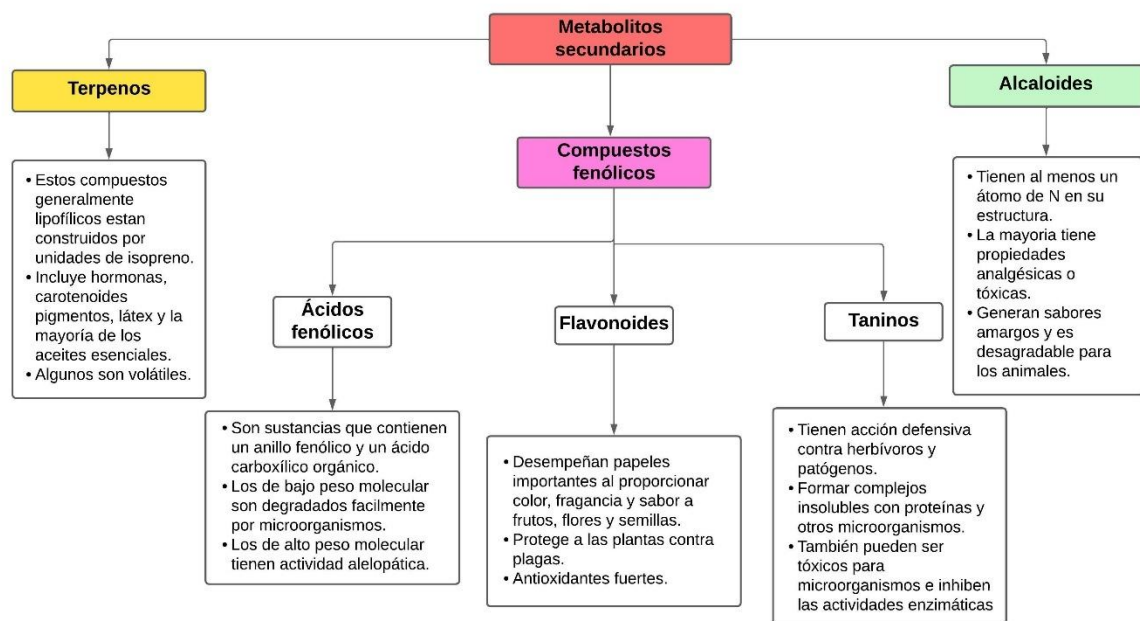


Figura 5. Funciones principales de los metabolitos secundarios.

2.7.1 Terpenos

Son un grupo de metabolitos secundarios que abarcan más de 40,000 moléculas diferentes, suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (1) (Fig. 6) (Carril y García, 2009), el cual está constituido por 5 átomos de carbono.

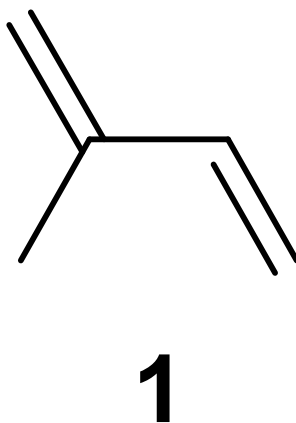


Figura 6. Estructura del isopreno.

2.7.1.1 Biosíntesis de terpenos

En plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Para su síntesis existen dos vías (**Fig. 7**), una es la ruta del mevalonato que se lleva a cabo en el citoplasma y la otra se denomina la vía del metileritritol fosfato (MEP), la cual es independiente de la del mevalonato y que se realiza en los plastidios. Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico, mientras que los monoterpenos, diterpenos, tetraterpenos y algunas quinonas preniladas se originan en los plastidios (Jiménez *et al.*, 2003).

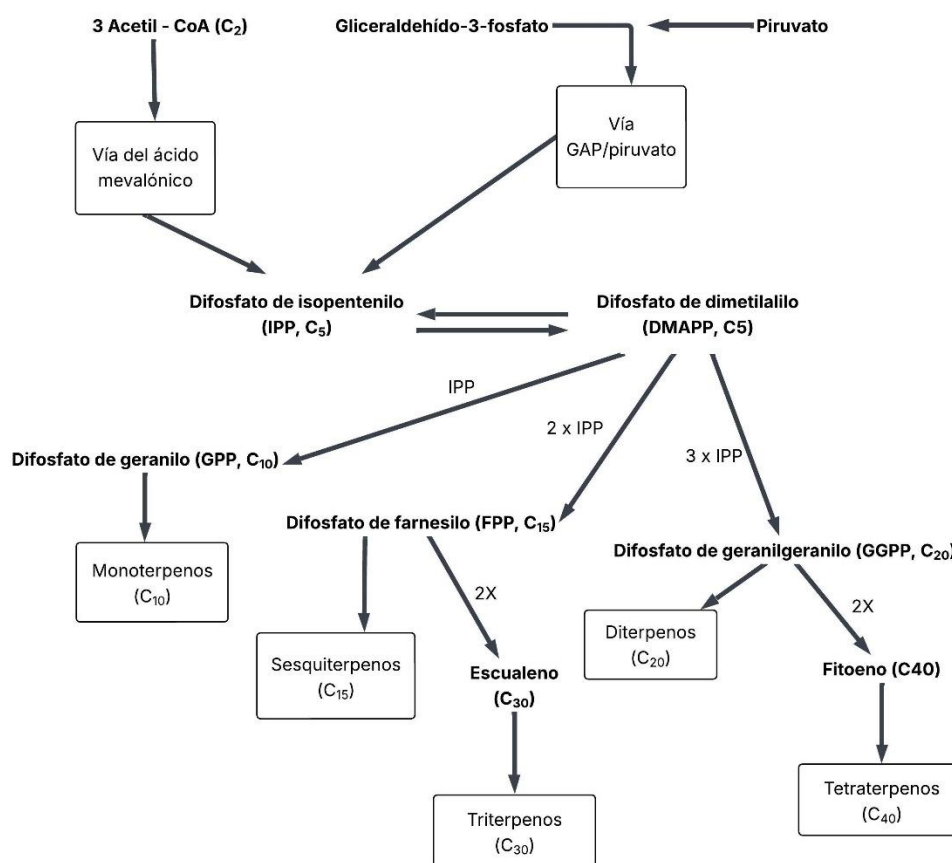


Figura 7. Biosíntesis de terpenoides en plantas, mostrando las etapas básicas de este proceso y los principales grupos de productos finales. CoA, coenzima A; GAP, gliceraldehído-3-fosfato modificado de Ashour *et al.*, 2010.

Las plantas sintetizan IPP y su isómero alílico DMAPP, mediante una de dos vías: la conocida vía del ácido mevalónico o la recién descubierta vía del MEP. En la segunda etapa, las unidades básicas C₅ se condensan para generar tres prenil difosfatos más grandes: geranil difosfato (GPP, C₁₀), farnesil difosfato (FPP, C₁₅) y geranilgeranil difosfato (GGPP, C₂₀). En la tercera etapa, los difosfatos C₁₀-C₂₀ experimentan una amplia gama de ciclizaciones y reordenamientos para producir los esqueletos carbonados progenitores de cada clase de terpeno. El GPP se convierte en monoterpenos, el FPP en sesquiterpenos y el GGPP en diterpenos. El FPP y el GGPP también pueden dimerizarse de forma directa para formar los precursores de los terpenoides C₃₀ y C₄₀, respectivamente. La cuarta y última etapa abarca diversas oxidaciones, reducciones, isomerizaciones, conjugaciones y otras transformaciones mediante las cuales los esqueletos progenitores de cada clase de terpeno se convierten en miles de metabolitos terpénicos distintos (Ashour *et al.*, 2010).

El número de unidades de isopreno de cinco carbonos determina su clasificación en (**Tabla 2**).

- Hemiterpenos (unidad única de isopreno)
- Monoterpenos (dos unidades de isopreno)
- Sesquiterpenos (tres unidades de isopreno)
- Diterpenos (cuatro unidades de isopreno)
- Sesterterpenos (cinco unidades de isopreno)
- Triterpenos (seis unidades de isopreno)
- Carotenoides (ocho unidades de isopreno)

Tabla 2. Clasificación de terpenos.

Nombre	Nº de isoprenos en la molécula	Función	Ejemplo
Monoterpenos	2	Aromas y esencias	Mentol
Sesquiterpenos	3	Intermediario en síntesis del colesterol	Farnesol
Diterpenos	4	Forman pigmentos y vitaminas	Fitol, Vitamina A
Triterpenos	6	Intermediario en síntesis del colesterol	Escualeno
Tetraterpenos	8	Pigmentos naturales	Carotenos, Xantofilas

Los terpenos son los metabolitos secundarios predominantes en el género *Croton* principalmente diterpenoides, que pueden pertenecer a los tipos esqueléticos cembreno (2), clerodano (3), abietano (4), halimano (5), isopimarano (6), kaurano (7), crotofolano (8), labdano (9), tiglano (10) y traquilobano (11) (Salatino *et al.*, 2007). Estos diterpenos presentan una variedad de actividades biológicas lo que sin duda promueve la búsqueda de nuevas sustancias activas que puedan presentar algún tipo de interés terapéutico buscándose posibles usos farmacológicos posteriores (Fig. 8)(Salatino *et al.*, 2007).

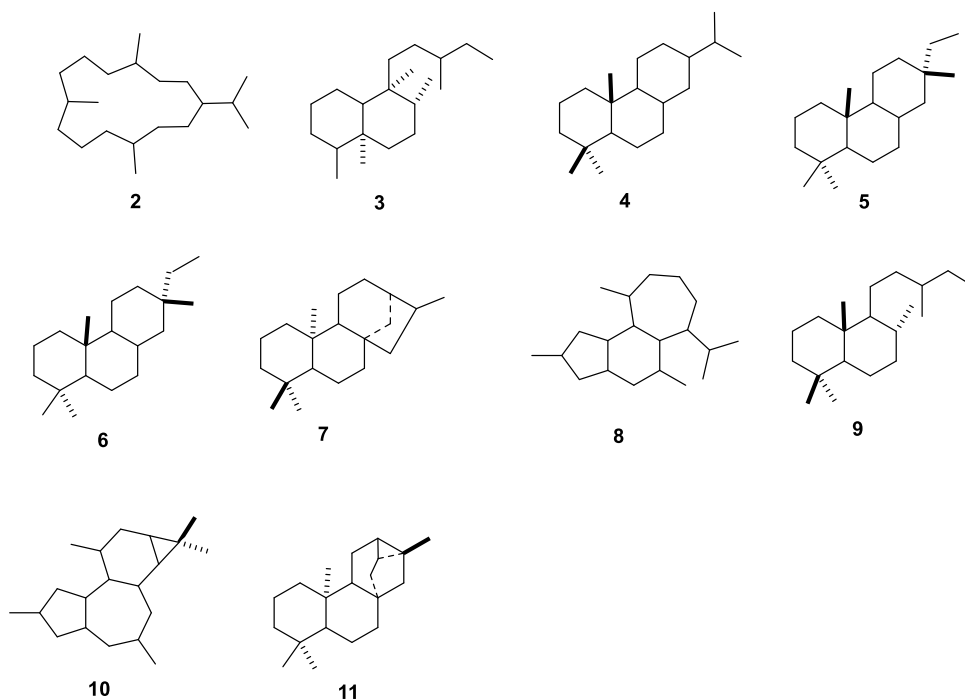


Figura 8. Estructura de las diferentes familias de diterpenos presentes en el género *Croton*.

A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial. Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, entre otros. (Carril y García, 2009).

2.7.2 Diterpenos

Los diterpenos son un grupo diverso de sustancias químicas naturales estructuralmente diversas y abundantes en la naturaleza. Estos son compuestos C_{20} que contienen cuatro unidades de isopreno (C_5H_8) que se pueden encontrar tanto en entornos terrestres como marinos en plantas, hongos, bacterias y animales. Varios diterpenos son candidatos farmacéuticos potenciales debido a su excepcional efecto farmacológico (Eksi y Kurbanoglu, 2020).

2.7.1.2.1 Biosíntesis de diterpenos

Los diterpenos se forman mediante la vía biosintética del ácido mevalónico (**Fig. 9**), ya que es bien sabido que el primer paso en la generación de terpenos comienza con la formación de isopentenil difosfato (IPP) o dimetilalil difosfato (DMAPP). La formación de diterpenos comienza por la condensación del farnesil pirofosfato (FPP), una unidad C_{15} , con isopentenil pirofosfato (IPP) para obtener geranilgeranil pirofosfato (GGPP) mediante reacciones consecutivas. Es posible obtener una amplia gama de estructuras de diterpenos a partir del GGPP mediante diferentes reacciones de ciclización (Eksi y Kurbanoglu, 2020). Se encuentran en plantas, algas, insectos y organismos marinos.

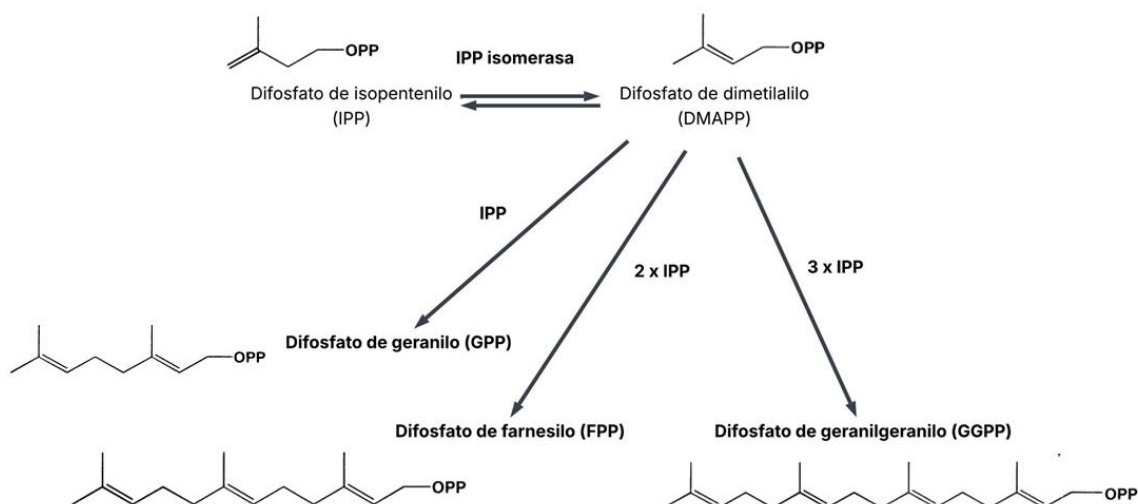


Figura 9. Formación de terpenos C₁₀, C₁₅ y C₂₀ a partir de la fusión de unidades isoprenoides C₅ modificado de Ashour *et al.*, 2010.

Las clases principales incluyen diterpenos acíclicos (fitano), diterpenos monocíclicos (retinol—vitamina A), diterpenos bicíclicos (clerodano, halimano y labdano), diterpenos tricíclicos (abietano, rosano, pimarano, podocarpano, casano, vouacapano y chinano), diterpenos tetracíclicos (kaureno, giberelano, traquilobano, escopadulano, afidicolano, atisano, estemodano, beyereno, estemarano), diterpenos macrocíclicos (policíclicos, cembreno, jatrofano, taxano, ingenano, dafnano y tigliano) y estructuras misceláneas (Eksi y Kurbanoglu, 2020).

2.7.1.2.2 Labdanos

Los diterpenoides tipo labdano (**9**) se han convertido en nuevos compuestos clave para el descubrimiento de fármacos modernos. El interés en el estudio de los labdanos se ha intensificado en las últimas décadas debido a la amplia gama de actividades biológicas asociadas a estos compuestos, como sus efectos antibacterianos, antifúngicos, antimutagénicos, citotóxicos, citostático y la modulación antiinflamatoria de las funciones de las células inmunitarias. Se han reportado varios casos de éxito con remedios tradicionales derivados de diterpenoides de labdano, entre los que destacan la andrografólida (**12**), la forskolina (**13**), el esclareol (**14**), (+) el ácido poliáltico (**15**), labdinina N (**16**) y (229) ácido ent-12,15dioxo-3,4seco-4,8,13-labdatrien-3-oico (**17**). (Tran *et al.*, 2017). Su estructura básica se puede fragmentar en dos partes: un sistema de decalina fusionado (C₁₋₁₀) y una

cadena lateral ramificada de seis carbonos (C_{11-16} , con C_{16} unido a C_{13}) en C_9 . Los cuatro carbonos restantes (C_{17-20}) están unidos a C_8 , C_4 (con C_{18} y C_{19} unidos) y C_{10} del sistema de decalina (**Fig. 10**) (Xu *et al.*, 2018; Tran *et al.*, 2017).

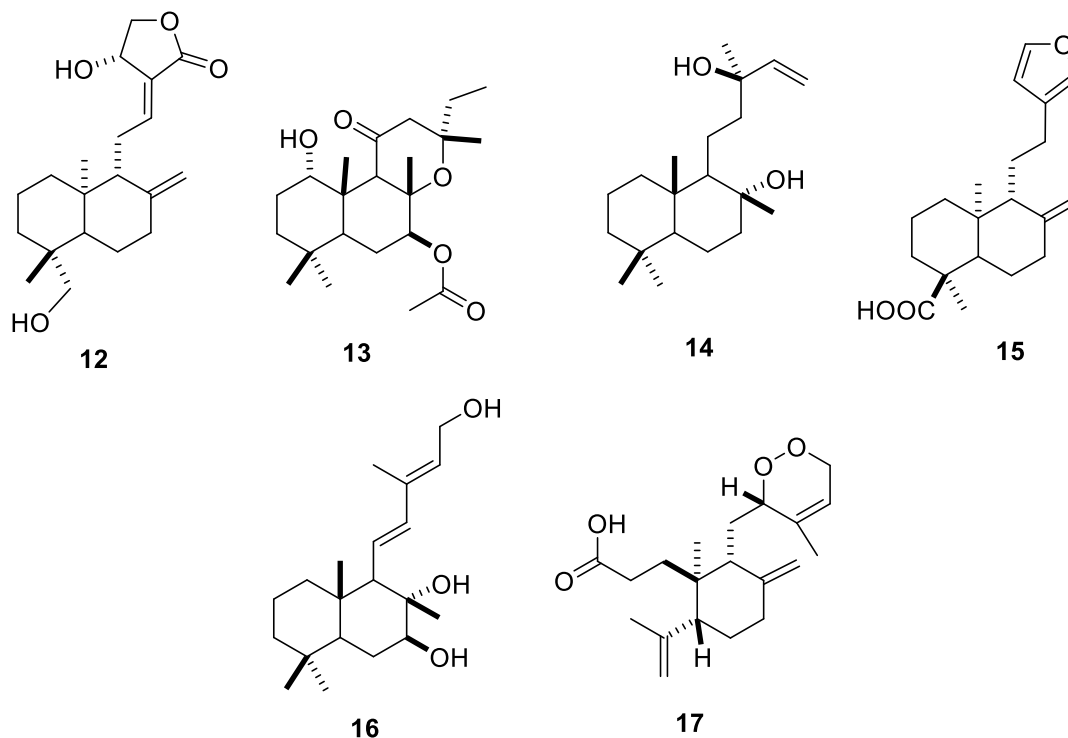


Figura 10. Representación esquemática de diterpenos del tipo labdano.

2.7.1.2.3 Clerodanos

Los diterpenos de tipo clerodano son un amplio grupo de metabolitos secundarios naturales presentes en cientos de especies vegetales de diversas familias y en organismos de otros grupos taxonómicos, como hongos, bacterias y esponjas marinas (Li *et al.*, 2016). Los clerodanos son diterpenoides bicíclicos. Su estructura básica se divide en dos fragmentos: una fracción de decalina en anillo fusionado (C_1-C_{10}) y una cadena lateral de seis carbonos en C_9 ($C_{11}-C_{16}$, con C_{16} unido en C_{13} , es decir, 3-metilpentilo). Los cuatro carbonos restantes ($C_{17}-C_{20}$) están unidos en C_8 , C_4 , C_5 y C_9 , respectivamente, en el sistema de decalina cis o trans (**18-21**), algunos ejemplos son la columbina (**22**) que se aisló por primera vez de la especie vegetal *Tinospora bakis* o la clerodina (**23**) aislado de *Ajuga bracteosa* (Li *et al.*, 2016). En el género se han encontrado principalmente cuatro tipos de estructuras básicas de clerodanos (**24-27**) (**Fig. 11**) (Palmeira Júnior *et al.*, 2006).

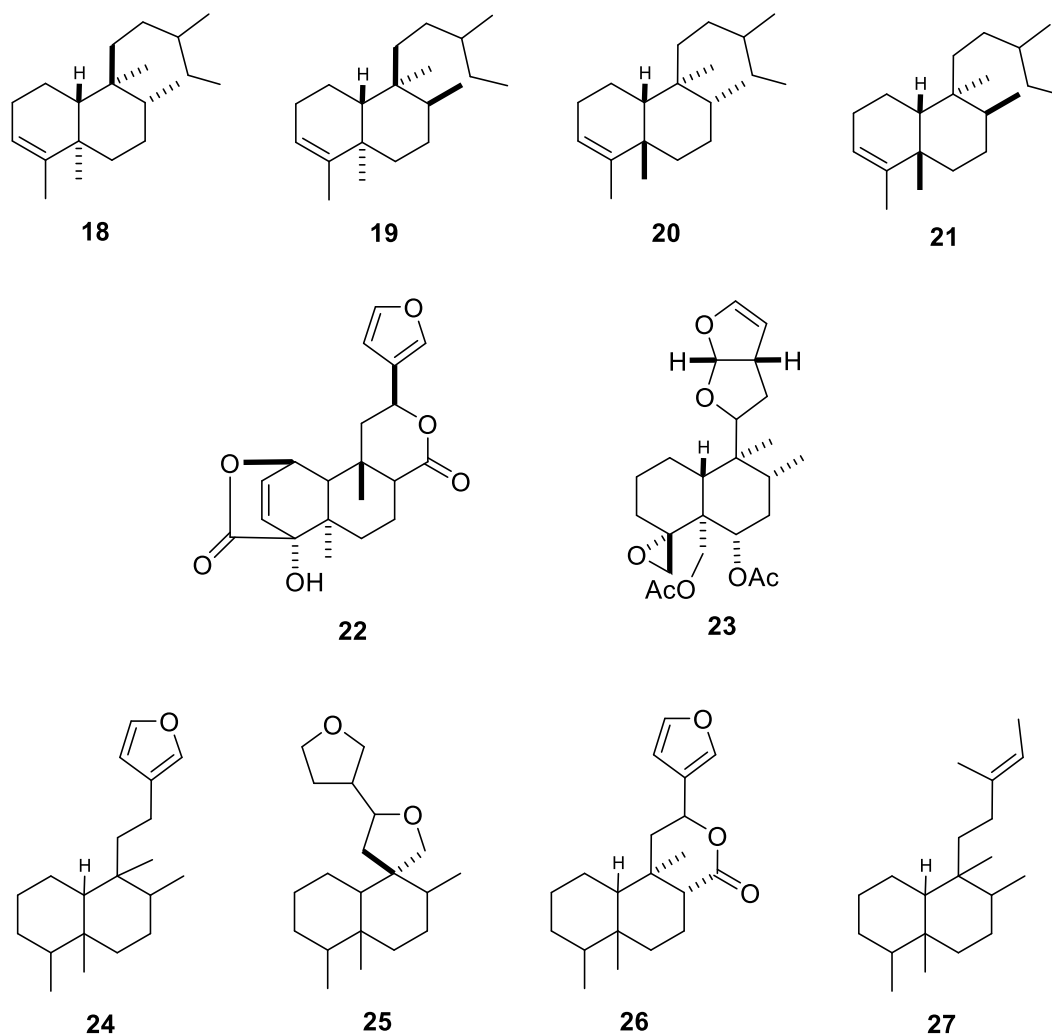


Figura 11. Representación esquemática de diterpenos de tipo clerodano.

2.8 Metabolitos secundarios en especies del género *Croton*

De este género, un gran número de especies han sido investigadas y se han aislado distintos metabolitos secundarios (**Tabla 3**), como los diterpenos, en su mayoría clerodanos, aunque también se han obtenido otros diterpenos relacionados biogenéticamente a los clerodanos, como los labdanos y kauranos (Barrera *et al.*, 2016).

Tabla 3. Compuestos identificados de algunas especies del género *Croton*.

Especie	Tipo de compuesto aislado	Compuesto	Referencia
<i>Croton gossypifolius</i>	ent-kaurano (diterpeno)	* ácido grandiflorénico * ácido ent-15 β -E-cinamoil-kaurenoico * 3,4-secoent-kaureno	(Suárez <i>et al.</i> , 2013)
<i>Croton matourensis</i>	flavanonas (compuesto fenólico)	* hesperidina * naringina	(Suárez <i>et al.</i> , 2009)
	neoclerodano (diterpeno)	* trans-dehidroCrotonina * 5-hidroxi-trans-dehidroCrotonina	
	Monoterpeno	*Vainillina	
	Triterpeno	* α -amirina	
<i>Croton hypoleucus</i>	epoxiclerodanos (diterpenos)	* Hipoleinas A-F * Crotonpenos A-B	(Velázquez-Jiménez <i>et al.</i> , 2022)
<i>Croton hirtus</i>	Terpenos	*bis-nor-dolabradanos, los *kauranos 4-7 *ciclopropakauranos * hirtusanos * ésteres de germacradieno	(Fuentes <i>et al.</i> , 2004)
<i>Croton linearis</i>	Flavona trimetoxilada (compuesto fenólico)	*5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona	(García-Díaz <i>et al.</i> , 2015)
<i>Croton tiglium</i>	Diterpeno tetracíclico	*4-desoxi-4 β -forbol diéster.	(Sinsinwar <i>et al.</i> , 2016)
<i>Croton tonkinensis</i>	Variedad de diterpenos del tipo kaurano	*ent – 18 -acetoxikaur-16-en-15-ona	(Kuo <i>et al.</i> , 2013)
<i>Croton urucurana</i> Baill. y <i>Croton floribundus</i> Spreng	Flavonoides	*quercetina, *kaempferol *isorhamnetina *3'- O -metil isorhamnetina *ramnitrina, * rutina, *quercetina 7-O -ramnósido, isoquercitrina	(Oliani <i>et al.</i> , 2020)

2.9 Actividad antimicrobiana de especies del género *Croton*

En el grupo trabajo reportado por Da S Rocha y colaboradores., 2021 se evaluaron extractos etanólicos y fracciones de hojas de las especies *C. betaceus* y *C. lundianus* contra bacterias Gram positivas y negativas, obteniendo como resultado la inhibición de *Enterococcus faecalis* con extractos obtenidos de ambas plantas. En un estudio realizado por Matara y colaboradores., 2021 sobre el extracto crudo de raíces de *Croton dichogamus*, mostraron actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas (*B. cereus* y *S. aureus*) con concentraciones menores a 250 mg/mL y un organismo fúngico, *C. albicans*. Los extractos no mostraron efecto antibacteriano sobre las cepas bacterianas Gram negativas (*P. aeruginosa* y *E. coli*) a una concentración de 250 mg/mL. Por otro lado, Rajachan y colaboradores, 2021 se realizó una evaluación fitoquímica de los tallos de *C. krabas*. donde se obtuvieron diterpenos del tipo ent clerodanos y compuestos conocidos, la actividad antibacteriana se evaluó de los compuestos contra *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Shigella sonnei* ATCC 11060, mostrando inhibición en *B. cereus* y *B. subtilis*.

Se aislaron tres diterpenoides ent-abietano, 6 β -hidroxi- ent-abieta-7,13-dien-3-ona (**28**), 2 β ,13 α ,15-trihidroxi-ent-abieta-8(14)-en-3-ona (**29**), y 2 β , 9 α ,13 β , 15-tetrahidroxi-ent-abieta-7-en-3-ona (**30**) mostrando inhibición contra bacterias Gram positivas analizadas con concentraciones inferiores a 50 μ g/mL (Wang y Dong, 2022).

Según Onocha y Odusina, 2024 se evaluó la actividad antimicrobiana de clerodanos previamente aislados de la corteza del tallo de *C. megalocarpoides*. Las pruebas antibacterianas revelaron una actividad débil contra los microorganismos estudiados, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* a la concentración máxima (200 mg/mL) de los 5 diterpenos aislados crotocorilifurano (**31**), 12-epi-zambefurano A (**32**), megalocarpodolida H (**33**), 1,2-dehidrocrotocorilifurano-2-ona (**34**) y 7,8-dehidrocrotocorilifurano (**35**) (Fig. 12).

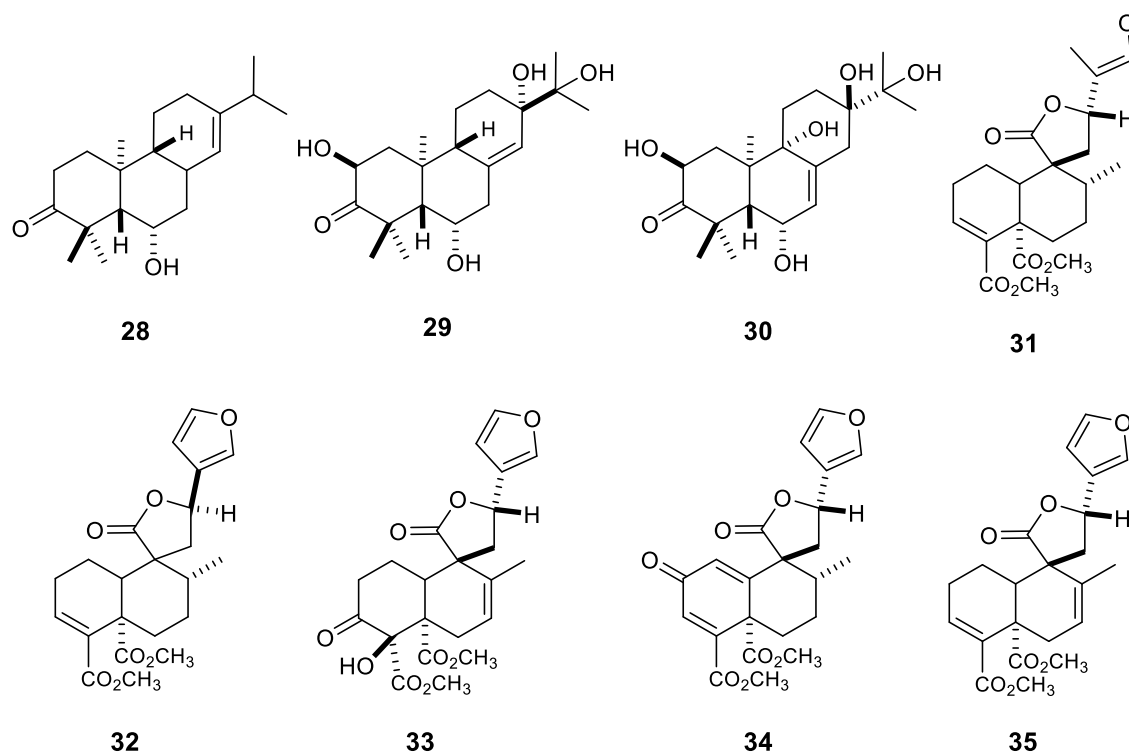


Figura 12. Diterpenos de tipo abietano y clerodano aislados de especies de *Croton*.

2.10 Técnicas de extracción, separación y purificación de compuestos a partir de extractos vegetales

Un extracto vegetal se considera como una mezcla compleja de diversas sustancias químicas conocidas o no conocidas, con el objetivo de identificar y aislar un principio activo. Para estudiar la actividad de una planta medicinal determinada, a menudo es necesario, extraer, purificar o aislar un compuesto específico (Kabera *et al.*, 2014).

2.10.1 Maceración

El proceso de maceración consiste en la extracción de los compuestos químicos de un producto en estado sólido al sumergirse en líquido durante un periodo de tiempo determinado. La extracción con disolventes se usa generalmente para la preparación de extractos de material vegetal debido a su amplia aplicabilidad, eficiencia y facilidad de uso (Sánchez *et al.*, 2005). Las técnicas convencionales de extracción sólido-líquido, como la maceración, se utilizan principalmente para obtener extractos de compuestos bioactivos a partir de material vegetal (Safdar *et al.*, 2016). Los disolventes orgánicos más comunes

utilizados para la extracción de compuestos fenólicos incluyen metanol, etanol, acetona y acetato de etilo. La extracción implica el uso de disolventes convencionales que llegan a tener ciertas limitaciones, como alta temperatura de extracción, menor eficiencia, bajo rendimiento de extracción, uso de grandes cantidades de solventes, resistencia a la transferencia de masa y riesgos para la salud (Safdar *et al.*, 2016).

2.10.2 Cromatografía

Conjunto de técnicas analíticas que se fundamentan en la separación que se produce cuando una mezcla de compuestos es arrastrada por una fase móvil a lo largo de una fase estacionaria (Sánchez *et al.*, 2005).

2.10.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

Es una adaptación especial de la cromatografía de adsorción que nos permite

- Determinar el grado de pureza de una muestra
- Comparar muestras
- Hacer el seguimiento de una reacción química
- Controlar el contenido de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna
- Determinar las condiciones más adecuadas para una cromatografía en columna

La fase estacionaria consiste en una fina capa delgada de gel de sílice o alúmina adherida a un soporte de aluminio (Sánchez *et al.*, 2005). Las sustancias que forman parte de la muestra se adhieren a la fase estacionaria o son arrastradas con la fase móvil, viajando una distancia que es inversamente proporcional a su afinidad por la fase estacionaria (Sánchez *et al.*, 2005). El R_f es la relación que existe entre el recorrido de una mancha, medido desde el origen hasta el centro de esta, y el recorrido por el disolvente (fase móvil) medido desde el origen hasta el frente. El R_f se expresa en valores que oscilan desde 0,01 hasta 0,99 y, también en porcentaje.

2.10.2.2 Cromatografía en columna (CC)

Utiliza columnas huecas verticales de vidrio cerradas en su parte inferior con una llave que permite la regulación del flujo de la fase móvil. Como fase estacionaria se emplean básicamente dos adsorbentes, gel de sílice y alúmina. La técnica consiste en rellenar la columna con el adsorbente elegido que debe sedimentar sin que se produzcan canales o grietas. En la parte superior de la columna se coloca la mezcla a separar y el eluyente empieza a descender. En la parte inferior de la columna se recogen las diferentes fracciones cromatográficas que se analizan y agrupan en función de sus características (Sánchez *et al.*, 2005)

2.11 Técnicas para la caracterización estructural de compuestos

Las técnicas de caracterización estructural de compuestos químicos son herramientas fundamentales en la química moderna, ya que permiten determinar la identidad, pureza y estructura molecular de las sustancias. Estas técnicas proporcionan información detallada sobre la disposición de los átomos dentro de una molécula, facilitando así la comprensión de sus propiedades químicas y su comportamiento en diferentes condiciones.

2.11.1 Resonancia magnética nuclear (RMN)

La técnica espectroscópica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) proporciona información relacionada a la identificación de moléculas mediante la elucidación de sus estructuras moleculares, basado en las propiedades mecánico-cuánticas, magnéticas de los núcleos atómicos e implementación de radiofrecuencias, descrita por Isidor Isaac Rabi en 1938 (Ruiz, 2020). La técnica es empleada para la obtención de imágenes en el diagnóstico de enfermedades y en química para el análisis de los núcleos que posea espín de los protones ^1H y carbono ^{13}C , siendo la base principal para la determinación y composición de las moléculas orgánicas. El uso de técnicas espectroscópicas es de gran utilidad para descifrar la estructura y dinámica molecular de un compuesto a estudiar (Ruiz., 2020).

Esta técnica emplea núcleos que se comportan como pequeños imanes, de número cuántico de spin nuclear igual a $\frac{1}{2}$ y que poseen spin nuclear distinto de cero, son sometidos a un campo magnético externo donde gira respecto a su eje, absorben radiación electromagnética

en la región de las radiofrecuencias y genera un campo magnético a su alrededor. El spin α representa un estado de menor energía y el spin β representa un estado de mayor energía. Por otro lado, la detección de la RMN es debida a la formación de varios niveles de energía de ciertos núcleos, y la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno de estos núcleos y sus orientaciones al campo magnético (Ruiz, 2020). Posteriormente, será identificada la estructura de la molécula debido a donde se encuentran estos núcleos, donde “Cada núcleo tiene su frecuencia de resonancia característica, que depende de su constante giromagnética y del campo magnético aplicado”. Dentro de los núcleos más tenidos en cuenta para la técnica están: ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F y ^{15}N , siendo RMN- ^1H la espectroscopia más empleada, seguido de RMN- ^{13}C pero este núcleo es poco abundante y sensible (Ruiz., 2020).

2.11.2 Difracción de rayos x

La técnica consiste en analizar los picos obtenidos en el difractograma para obtener la estructura y grupos funcionales que tiene un compuesto químico determinado. Esta técnica analiza la intensidad de los picos y les asigna un ángulo de rotación a cada uno de ellos para determinar las características estructurales del sólido (Salas, 2023). Este es un fenómeno de dispersión en el que cooperan un gran número de átomos, puesto que los átomos están dispuestos periódicamente en una red, los rayos están dispersados por que tiene relaciones en fases definidas (Castellanos, 1993).

2.12 Estudios *in silico*

Los modelos *in silico* permiten anticipar la magnitud de las respuestas del sistema en estudio ante variaciones de las variables intervinientes. La interrelación de las ciencias biológicas con las ciencias de la computación no produce grandes gastos y permiten progresar intelectualmente sobre el fenómeno, pensando en las variables que podrían influir sobre él (Alhawarri *et al.*, 2024). Estos modelos matemáticos computacionales o modelos *in silico* permiten simular situaciones reales, modificando los valores de las variables involucradas en un amplio rango de valores y contrastarlos con los valores reales computación y la ingeniería han permitido construir y resolver modelos matemáticos que permiten llevar a una computadora un determinado fenómeno (Sixto *et al.*, 2025).

2.12.1 Propiedades fisicoquímicas, el perfil ADME y las actividades biológicas

Las propiedades fisicoquímicas son características fundamentales que determinan el comportamiento físico y químico de una molécula, por lo que es muy importante saber si son compatibles para poderse administrar por vía oral humana, entre las cuales podemos encontrar las siguientes (Delgado *et al.*, 2000).

- Peso molecular (PM)
- LogP (coeficiente de partición octanol/agua): mide la lipofilia (capacidad para disolverse en grasas)
- Solubilidad en agua
- Número de donadores y aceptores de enlaces de hidrógeno
- pKa: indica los valores de disociación ácido-base
- Polaridad PSA: área polar accesible, relacionada con permeabilidad
- Enlaces rotables: número de enlaces libres que pueden girar, afecta flexibilidad

2.12.2 Perfil ADME

Las propiedades ADME se refieren a los procesos mediante los cuales un fármaco se absorbe en el organismo (A), se distribuye a su sitio diana (D), se metaboliza (M) y, finalmente, se excreta (E). Estas propiedades son cruciales en el desarrollo de fármacos, ya que influyen directamente en su eficacia, seguridad y farmacocinética (Aguilar y Fuentes, 2021; Alhawarri *et al.*, 2024).

- **Absorción (A):** Se refiere a cómo entra el fármaco al cuerpo, y cuál es su proceso, además se consideran algunos factores como la solubilidad y su capacidad de disolverse en fluidos corporales, permeabilidad y la capacidad de atravesar membranas biológicas, formulación, cantidades y tamaño de partícula, y por último la vía de administración.

- **Distribución (D):** Es el proceso por el cual se reparte por los tejidos y órganos, además de algunos factores que influyen entre los que destacan la unión con proteínas, el flujo sanguíneo y la penetración tisular.
- **Metabolismo (M):** Proceso por el cual un fármaco es descompuesto y cómo es transformado por enzimas. Las principales vías metabólicas implican.

Enzimas del citocromo P₄₅₀: estas enzimas son responsables de la mayor parte del metabolismo de los fármacos.

Otras enzimas metabólicas: Otras enzimas, como las UDP-glucuronosiltransferasas, también desempeñan un papel en el metabolismo de los fármacos.

- **Excreción (E):** Proceso mediante el cual un fármaco y sus metabolitos se eliminan del organismo.

2.12.3 Actividades biológicas

Describe los efectos biológicos que tiene una sustancia, tales como:

- Actividad farmacológica: agonista, antagonista, inhibidor, modulador, etc.
- Afinidad a receptores o enzimas (por ejemplo, IC₅₀, EC₅₀, K_i)
- Selectividad: preferencia por una diana sobre otras
- Eficacia y potencia
- Actividad antimicrobiana, anticancerígena, antiinflamatoria, etc.

2.12.4 Acoplamiento molecular (Docking)

El acoplamiento molecular es un método bioinformático que permite predecir y calcular computacionalmente la posición más favorable de interacción entre un ligando y un blanco usualmente proteico a partir de sus representaciones tridimensionales. Los métodos computacionales de acoplamiento molecular emplean un algoritmo de búsqueda en el cual la conformación del ligando se evalúa recursivamente hasta que se alcanza la convergencia a la energía mínima. Por último, se emplea una función de puntuación como la suma de las

energías electrostática y de Van der Waals, para calcular la afinidad del ligando en el sitio activo de la proteína objetivo. Las fuerzas motrices para estas interacciones específicas en los sistemas biológicos apuntan hacia la complementariedad entre la forma geométrica y la electrostática de las superficies del sitio de unión entre el ligando y la proteína objetivo (Pagadala *et al.*, 2017). Mientras más estable, específica y favorable sea la unión entre un ligando (fármaco) y su blanco proteico, mayor será su posible actividad biológica (fármaco más efectivo). Por tanto, este método bioinformático juega un rol importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos principios activos o fármacos (Ballón y Grados., 2019).

2.13 Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de compuestos obtenidos de especies vegetales

Hay una variedad de métodos que se consideran para ser usados en la determinación de la susceptibilidad de bacterias con agentes antimicrobianos. Aunque la actividad de estos se vea determinada por la influencia del método, las bacterias y del compuesto seleccionado, para ello se han establecido métodos estándares para realizar las pruebas biológicas. Algunos de los métodos que se pudieran usar para evaluar la actividad antimicrobiana son: métodos de difusión, de dilución y CCF. Las técnicas por emplear se tienen que analizar de acuerdo con la naturaleza de los compuestos como posibles antimicrobianos, ya que cada una es usada para determinadas características descritas a continuación (Ramirez y Marin, 2009).

2.13.1 Métodos de difusión

Se usa esta técnica ya sea en papel o pozos para estudiar compuestos polares, además de que presenta resultados que son altamente reproducibles, la técnica está basada por el método de Kirby-Bauer el cual es el más usado en la actualidad y tiene como fundamento establecer de forma cualitativa el efecto que tiene las sustancias sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. Esta técnica determina la relación entre la concentración del compuesto capaz de inhibir la cepa bacteriana y el halo de inhibición en la superficie de una placa de agar con medio de cultivo adecuado para el crecimiento de la bacteria (Ramirez y Marin, 2009).

La técnica se realiza sembrando las bacterias homogéneamente en una placa de agar,

posteriormente se colocan discos de 6 mm de diámetro considerando la distancia de estos y los compuestos a utilizar o si es el caso, se realizan pozos con ayuda de un horador, en ambas formas se impregna la cantidad de la sustancia con concentración conocida. Posterior a esto se incuba a 24 horas a una temperatura adecuada para el crecimiento de las bacterias, se mide el halo formado y se comparan los efectos de las sustancias con el antibiótico control. Algunos autores describen que se refrigeraron a 4°C las cajas para permitir una absorción de los extractos antes de la incubación (Ramirez y Marin, 2009).

2.13.1.2 Inconvenientes que se presentan en el método de difusión.

La composición del papel filtro para los sensidiscos, ya que su composición que es a base de celulosa (uniones β 1-4-glucosa) tienen grupos hidroxilos libres haciendo que la superficie sea hidrofílica e interviniendo que los compuestos catiónicos sean absorbidos y por ende impidiendo la difusión en el agar por tal motivo la técnica en pozo se realiza por su alta sensibilidad en estos procesos. La evaluación de la cantidad de sustancia a usar ya que se tienen que poner en forma equidistante para que no afecte la lectura de la medición del diámetro de los halos de inhibición (Ramirez y Marin, 2009).

2.13.1.3 Factores que afectan el resultado de la prueba.

- Medio de cultivo propuesto para realizar la prueba
- Capacidad de difusión del compuesto
- Cantidad del inóculo
- Tiempo de generación de los microorganismos
- Sensibilidad del antibiótico
- Periodo de incubación

3. Justificación

En la actualidad las infecciones bacterianas han sido un problema de salud pública de suma importancia que perjudica a la humanidad e industria alimentaria, ya que las bacterias tienden a mostrar resistencia a algunos antibióticos o agentes bactericidas debido a diferentes factores.

Por ello es importante el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos naturales que ayuden a la inhibición de microorganismos patógenos causantes de infecciones bacterianas; por lo que se ha considerado investigar plantas del género *Croton* perteneciente a la familia Euphorbiaceae debido a estudios realizados a diferentes especies mostrando una amplia gama de actividades biológicas como citotóxica, antiinflamatoria y antimicrobiana, principalmente, además la especie de *Croton mazapensis* no cuenta con estudios químicos y biológicos previamente, por lo que sería interesante poder encontrar compuestos que tengan actividad antimicrobiana con patógenos lo que sería un aporte a las investigaciones que se desarrollen posteriormente .

Debido a lo anterior se ha planteado trabajar con las raíces de la especie *C. mazapensis* para poder realizar la búsqueda de nuevos compuestos biológicamente activos, para que en un futuro pueda servir como principios activos para el desarrollo de medicamentos y agentes bactericidas en la industria farmacéutica y alimentaria más eficientes.

4. Objetivos

Objetivo general

- Aislar, caracterizar y determinar la actividad antibacteriana de nuevos metabolitos secundarios de tipo clerodanos presentes en la raíz de *Croton mazapensis*, mediante su análisis químico, computacional y biológico, con el fin de aportar nuevos conocimientos científicos sobre su estructura molecular, sus actividades biológicas y su eficacia como potenciales blancos terapéuticos.

Objetivos específicos

- Identificar taxonómicamente los individuos de la planta colectada de *C. mazapensis* mediante claves dicotómicas de floras.
- Obtener y caracterizar los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de la raíz de *C. mazapensis* mediante técnicas cromatográficas y espectroscópicas.
- Determinar las propiedades fisicoquímicas, el perfil ADME y las actividades biológicas de los compuestos aislados, con la ayuda de herramientas bioinformáticas para la identificación de su potencial terapéutico.
- Simular la unión más estable y sus interacciones en el sitio activo entre los clerodanos aislados de *C. mazapensis* y las dianas terapéuticas asociadas a bacterias Gram positiva y Gram negativas (enzimas β -lactamasas) mediante acoplamiento molecular (Docking molecular).
- Evaluar el potencial antibacteriano de los compuestos purificados, mediante ensayos por difusión en agar.

5. Materiales y parte experimental

5.1 Materiales

5.1.1 Material biológico

Raíces de *Croton mazapensis*

Cepas bacterianas:

- *Escherichia coli* (CDBB-B 1010)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145)
- *Bacillus subtilis* (CDBB-B 1009)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

5.1.2 Medios de cultivo

Agar soya tripticaseina BD Bioxon, caldo soya tripticaseina BD Bioxon.

5.1.3 Materiales, reactivos y disolventes

Placas de sílica gel, sílica gel Merck 60Å tamaño de partícula y malla 230-400, agua destilada, metanol (MEYER), cloroformo (MEYER), hexano (MEYER), acetato de etilo (MEYER), acetona (MEYER), destilados de acetona, revelador sulfato de cerio amoniacal (SIGMA-ALDRICH).

5.1.4 Equipos

Equipo	Marca
Rotavapor	Buchi
Balanza analítica	Sartorius BP 221 S
Balanza granataria	Witeg wisd WBA-3200
Bomba de vacío	MAXIMA
Espectrofotómetro	GENESYS 10vis
Equipo de resonancia magnética nuclear	Bruer Asced 400
Autoclave	Witeg Wisd
Cuenta colonias	felisa
Parrilla de calentamiento y agitación	Thermolyme Cimarec, DLAB
Agitador vórtex	GENIE 2, 600-3200RPM
Incubadora bacteriológica	Lab-Line IMPERIAL III INCUBATOR

5.2 Colecta de las raíces de *Croton mazapensis*

La colecta de la planta de *C. mazapensis* se realizó en el municipio de Alfajayucan, Hidalgo durante el mes de octubre del 2022. La parte de interés, la raíz, fue sometida a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 2 semanas.

5.3 Obtención de extracto crudo

El experimento se realizó en el laboratorio de plantas medicinales del PCyT, dónde la raíz seca se cortó en trozos de 1 cm, se pesó la cantidad obtenida y se dejó macerando en un frasco con metanol cubierto con papel aluminio, cada semana se filtraba el solvente y se llevaba a rotavapor, recuperando metanol y el extracto. Posterior a esto se vertía el metanol nuevamente al frasco con los trazos de raíz y el extracto se dejaba en otro frasco, este proceso

se realizó durante 3 semanas y ambos frascos se etiquetaban y almacenaban en un lugar oscuro.

5.4 Identificación de compuestos en cromatografía de capa fina

Para los análisis cromatográficos se usaron placas de aluminio impregnadas de sílica gel de 5 cm de largo por 2.5 de ancho, en cada extremo de 0.5 cm, aplicando en un extremo la fase estacionaria (compuesto o fracción) y dejando como punto de referencia de la fase móvil (mezcla de disolventes) el otro extremo. Cada placa se sumergió en una cámara de elución con una mezcla de disolventes cuidando de no tocar de inicio la primera línea, se tapó y se dejó eluir la fase móvil hasta el otro extremo. Posterior a esto, se retiró de la cámara, se dejó secar y se aplicó un revelador de sulfato de cerio amoniacal en toda la placa y se llevó a calentamiento a 85 °C dejando que se evaporara y se revelaron los compuestos presentes.

5.5 Extracción de compuestos puros mediante cromatografía en columna

La purificación de los compuestos se realizó por cromatografía en columna, empleando sílica gel, columnas de cromatografía de 5, 3 y 2 cm de diámetro interno. El extracto previamente se mezcló con una cantidad mínima de sílica gel, obteniendo una textura seca y granulosa, y se incorporó a la columna de vidrio de (5 cm de ancho) soportada verticalmente con sílica gel (6 pulgadas) estabilizada con hexano: acetona (9:1), con ayuda de una bomba se aceleró el flujo, se recolectaron fracciones de 50 y 100 mL y posterior a esto se realizó una CCF con las fracciones para juntar las que tuvieran manchas/compuestos similares y se dejó evaporar la mezcla de disolventes para repetir el proceso de purificación usando columnas de 3 y 2 cm de diámetro.

5.6 Análisis de muestras de extracto, fracciones y compuestos puros mediante RMN

El análisis de caracterización estructural se llevó a cabo en el laboratorio de RMN del AAQ de la UAEH, donde se pesaron entre 10-30 mg de las diferentes muestras y se disolvieron en cloroformo deuterado (CDCl_3). Posteriormente, la disolución se pasó a un tubo de RMN y se analizaron las muestras en un equipo de RMN Bruker Ascend 400 y finalmente cada uno de los archivos FID generados fueron procesados en computadora utilizando el programa MestreNova.

5.7 Métodos computacionales, bioinformática: Estudios *in silico* de los compuestos

5.7.1 Perfil ADMET y predicciones de actividades biológicas

De manera general, después de lograr la caracterización de tres compuestos (36-38) se procedió a la utilización de herramientas computacionales mediante servidores en línea, gratuitos, los cuales mostraron las predicciones pertinentes de cada molécula (**Tabla 4**). El programa ChemDraw Profesional se utilizó para dibujar y determinar el código SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification por sus siglas en inglés). Con ayuda del servidor SwissADMET (Daina *et al.*, 2017) y ADMETlab (Fu *et al.*, 2024) Se predijeron las propiedades farmacológicas y creó los radares de biodisponibilidad para cada compuesto y el antibiótico control estreptomicina. Las propiedades toxicológicas y el perfil ADMET fueron determinados gracias al servidor admetSAR (Yang *et al.*, 2019) y finalmente la plataforma Way2drug (Druzhilovskiy *et al.*, 2017) permitió conocer el puntaje de bioactividad y citotoxicidad de las moléculas de interés. La metodología explicada anteriormente puede verse resumida en el siguiente esquema (**Fig. 13**).

Tabla 4. Servidores utilizados para determinar las predicciones fisicoquímicas y biológicas de los compuestos **36**, **37** y **38**.

Servidor	URL	Licencia
ChemDraw		Gratuita
SwissADMET	http://www.swissadme.ch/index.php	Gratuita
ADMETlab 3.0	https://admetlab3.scbdd.com/	Gratuita
admetSAR 2.0	https://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1/about/	Gratuita
Way2Drug	https://www.way2drug.com/PassOnline/index.php	Gratuita

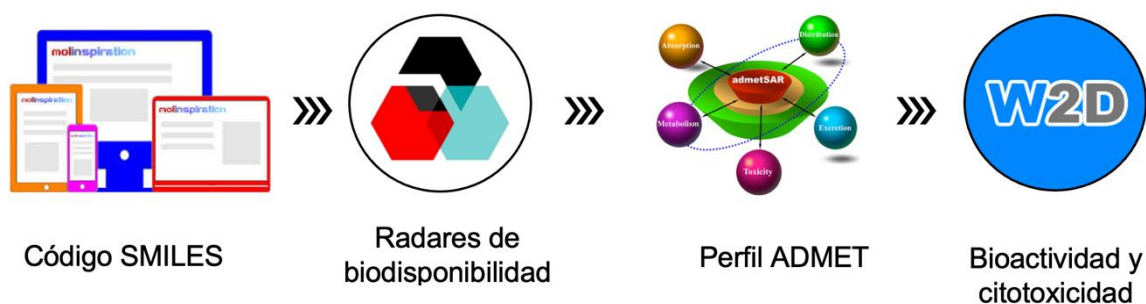


Figura 13. Metodología de estudios *in silico*.

5.7.2 Acoplamiento molecular (Docking)

Los cálculos del acoplamiento molecular se realizaron utilizando el programa de Autodock4 Tools (Sixto *et al.*, 2025). La estructura cristalina de la enzima β -lactamasa de *E. coli* con el inhibidor cefotaxima se descargó de la base de datos del Protein Data Bank (PDB:4KG5). El sitio de acoplamiento y las dimensiones de la caja se seleccionaron de acuerdo con las coordenadas del ligando (cefotaxima) presente en la estructura del cristal. Las coordenadas de la caja fueron 37.557, -7.216 y -4.851 Å en los ejes x, y y z, respectivamente, con las dimensiones de 40 x 40 x 40 Å. Los estudios de acoplamiento molecular se realizaron empleando algoritmos Genético Lamarckiano con un número de 100 repeticiones para cada compuesto. Las moléculas de agua, cofactores e inhibidor fueron retirados de la enzima, la preparación de la proteína y ligando, las coordenadas la caja y acoplamiento molecular se realizaron utilizando el programa de Autodock4. El análisis de los resultados se realizó con el programa Discovery Studio.

5.8 Evaluación microbiológica de compuestos puros contra bacterias empleando el método de difusión por goteo.

Los ensayos de actividad antimicrobiana se realizaron en el laboratorio de Biotecnología 2 del AAQ de la UAEH. Para la activación de cada cepa bacteriana, se tomó una asada y se inocularon en 3 mL de caldo soya tripticaseína dejándose incubar durante 24 horas a 37 °C, transcurrido ese tiempo se sembraron en cajas Petri con agar soya tripticaseína realizando el método de estría cruzada y nuevamente se dejó 24 horas en la incubadora a 37 °C.

Una vez comprobada la activación y axenicidad de las cepas se continuó con el ajuste de células bacterianas en el espectrofotómetro a 550 nm hasta llegar a 0.125 A. equivalente a 0.5 McFarland (1.5×10^8 UFC/mL). Posteriormente a esto se realizó el sembrado de cada cepa bacteriana en cajas Petri con agar soya tripticaseína, se tomaron 100 μ L llevando a cabo la técnica de extensión en superficie, después se dejó reposar por 30 minutos hasta formar una película seca. Se aplicaron 6 μ L de un compuesto a distintas concentraciones en una placa inoculada, 6 μ L del control positivo (estreptomicina) y 6 μ L negativo (DMSO), aplicando en una sola área y cuidando que no se expandiera a otras regiones se dejó secar 40 minutos hasta que el compuesto se absorbiera al medio, se usó DMSO para Compuestos

36 (C1) y **37** (C2), y DMSO/Tween 80 (80/20) para el compuesto **38** (C3) como controles negativos, y estreptomicina (1.6 mg/mL) como control positivo, se incubaron las placas a 37 °C por 24 horas. Finalmente, transcurrido ese tiempo se midió el diámetro de los halos de inhibición formados. Cada experimento se realizó por triplicado.

6. Resultados y discusión

6.1 Obtención de extractos y selección de la fase móvil para el fraccionamiento del extracto metanólico de la raíz de *Croton mazapensis*

Transcurrido el tiempo de recolección, se filtró y eliminó el metanol en el rotavapor y se obtuvo el extracto de consistencia viscosa y de color café (18g) (**Fig. 14**). Una alícuota del extracto se disolvió en acetona para realizar la selección de la fase móvil, misma que se utilizó para el fraccionamiento del extracto mediante CCF. Inicialmente, se utilizó una mezcla de diclorometano (CH_2Cl_2) acetato de etilo (AcOEt) (80:20 %) como fase móvil y cromatofolios impregnados de sílica gel. Se pudo observar que no hubo la separación adecuada al solo observarse una sola mancha intensa principalmente (**Fig.15-A**). Por lo tanto, se realizó otra CCF con CH_2Cl_2 -AcOEt (90:10) como fase móvil, en la cual se obtuvo una mejor separación al observar cuatro manchas separadas, misma que pudo ser utilizada para el fraccionamiento inicial del extracto (**Fig.15-B**). Finalmente, se realizó una tercera CCF utilizando CH_2Cl_2 -AcOEt (95:5) como fase móvil, en la cual se observó una mejor separación de cuatro manchas más separadas (**Fig.15-C**).



Figura 14. Extracto de *C. mazapensis*.

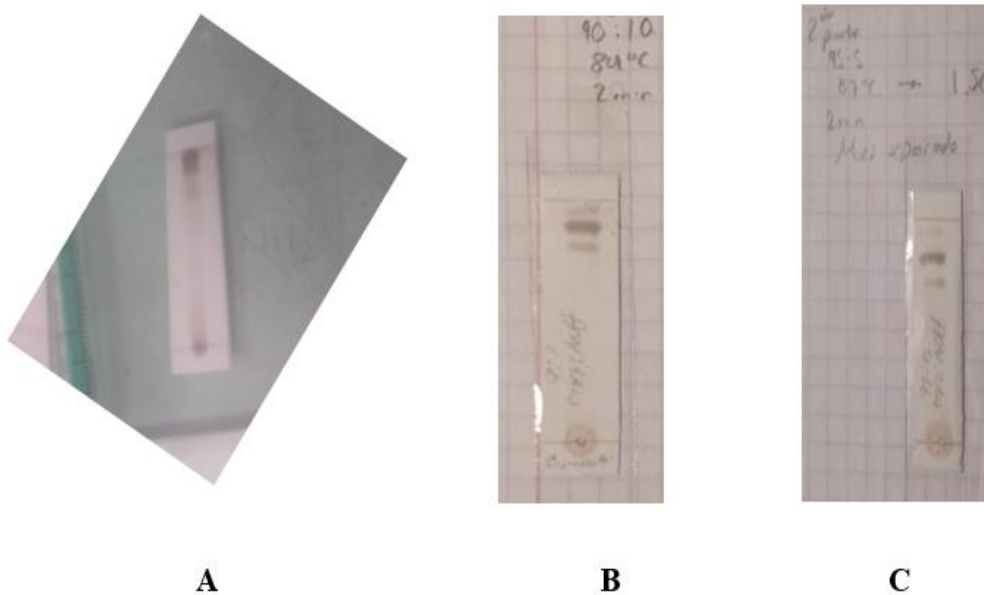


Figura 15. Cromatografía en capa fina de extracto de raíz de *Croton mazapensis* con CH_2Cl_2 y AcOEt.

6.2 Purificación y caracterización de los compuestos

Una alícuota del extracto metanólico (14.0 g) se sometió a separación mediante CC empleando sílica gel como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de disolventes

hexano-acetona (9:1; 7:3, 1:1) y acetona. Se colectaron 22 fracciones de 50 y 100 mL, se analizaron mediante CCF, que fueron agrupadas en 5 fracciones gruesas (A-E) mediante una revisión de las CCF realizadas (**Fig. 16**) y el análisis por RMN- ^1H .

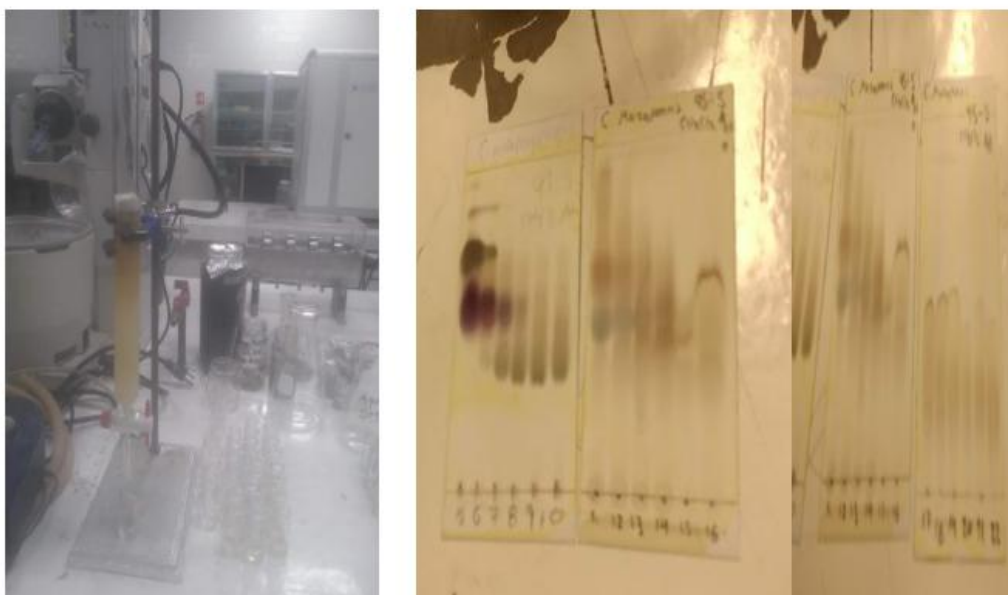


Figura 16. Separación por CC y CCF de las fracciones obtenidas del primer fraccionamiento del extracto.

La fracción B (1.12 g) se sometió a purificación por CC empleando sílica gel como fase estacionaria y mezclas de hexano: acetona (9:1) y acetona como fase móvil. El análisis por CCF de las fracciones eluidas permitió la agrupación en subfracciones B1-B4. La subfracción B2 (mg) se purificó un compuesto mediante CC, de las fracciones 10-16 se obtuvieron 644.2 mg de un sólido blanco, con un rendimiento del 4.6%. Este compuesto se caracterizó mediante sus datos físicos y espectroscópicos (**Tabla 5**), así como por la comparación de datos descritos como cascarillona (**36**) (Lio *et al.*, 1989). En el espectro de RMN de ^1H (**Fig. 17**) (**Tabla 5**) presentó entre sus señales más significativas tres señales simples anchas en δ_{H} 7.34, 7.20 y 6.25 ppm características de un anillo de furano que fueron asignadas a los protones H-15, H-16 y H-14, en δ_{H} 2.23 ppm, en δ_{H} 0.98, 0.78 ppm se observaron dos señales simples características de grupos metilos que fueron asignadas a los carbonos C-19 y C-20 y

dos señales dobles en δ_H 0.88, 0.87 ppm correspondientes los grupos metilo secundarios de C-18 y C-17, respectivamente.

En su espectro de RMN de ^{13}C de **36** (**Fig. 18**) (**Tabla 5**), presentó entre sus señales más características, una en δ_C 212.0 ppm de un carbono de carbonilo de acetona asignada a C₂, en δ_C 142.8, 138.6, 111.1 y 125.3 señales para los carbonos C₁₅, C₁₆, C₁₄ y C₁₃ del anillo de furano, a frecuencias más bajas se observaron señales para los carbonos alifáticos sp³ presentes en la estructura del compuesto.

La sustancia se cristalizó en hexano-acetona (4:1), obteniéndose cristales adecuados para su difracción de rayos-X (**Fig. 19**), lo cual permitió corroborar su estructura descrita.

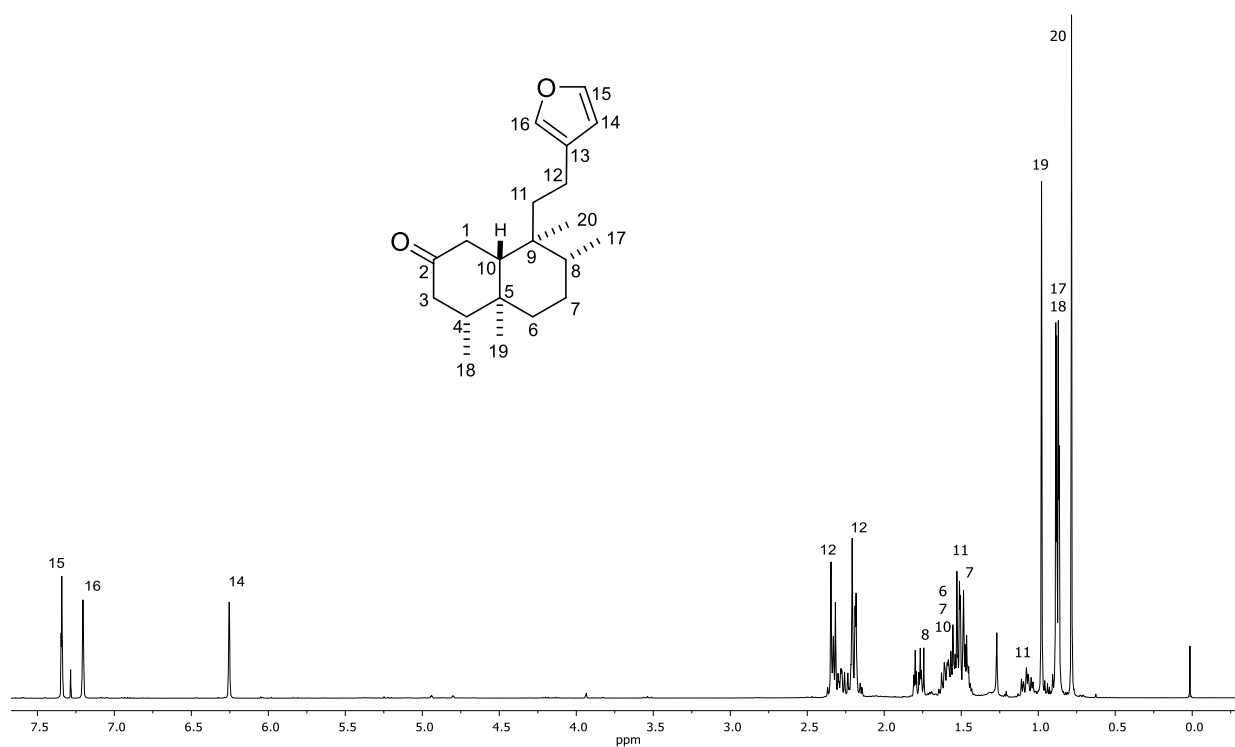


Figura 17. Espectro de RMN de 1H de la cascarillona (**36**) en $CDCl_3$ (400MHz).

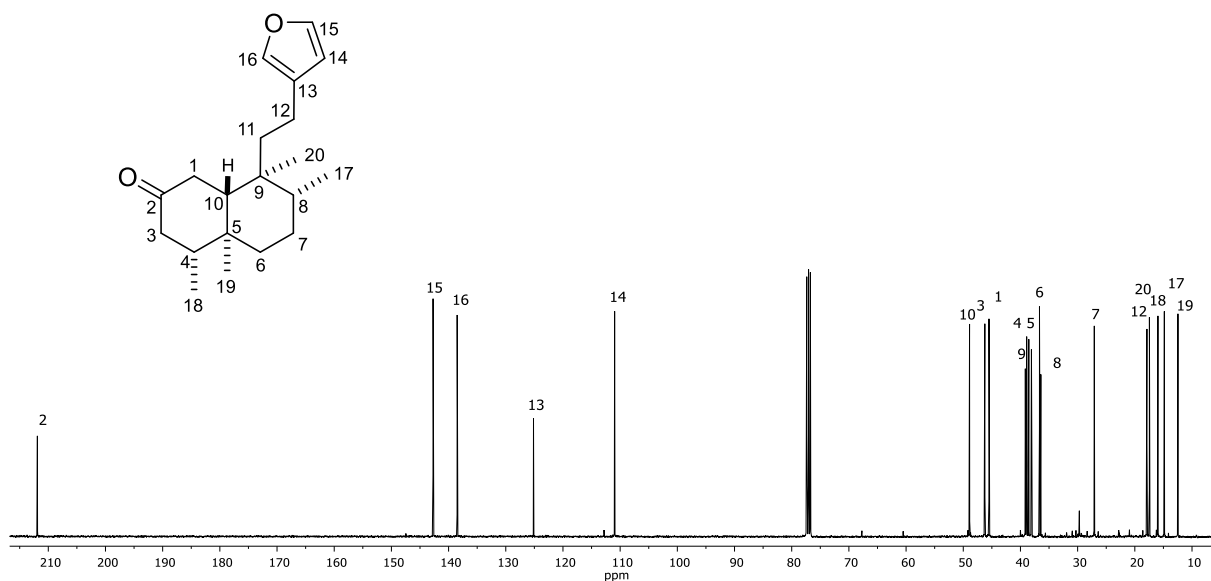


Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C de la cascarillona (**36**) en CDCl_3 (100MHz).

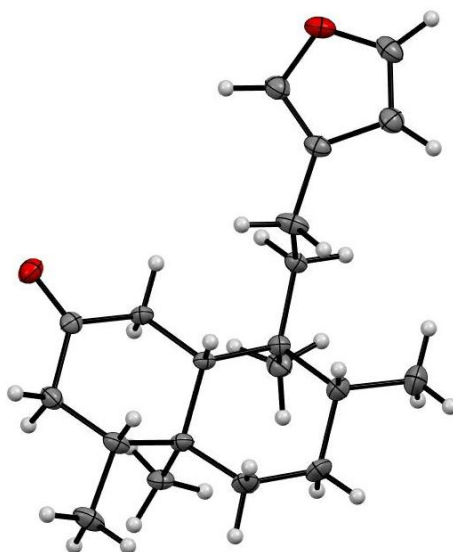


Figura 19. Estructura de cascarillona (**36**) obtenida por difracción de rayos-X.

La fracción C (991.2 mg) se sometió a purificación por CC empleando una fase móvil de hexano: acetona con una proporción de 85:15, y acetona. El análisis por CCF de las fracciones eluidas permitió la agrupación en subfracciones C-1-C-2. La subfracción C-2 (mg) se purificó un compuesto por CC, de las fracciones 10-14 se obtuvieron 335.3 mg de un sólido blanco, con un rendimiento del 2.4%. Este compuesto se caracterizó mediante sus

datos físicos y espectroscópicos (**Tabla 5**), así como por la comparación de datos descritos como velamona (**37**) (Babili *et al.*, 1998). En el espectro de RMN ^1H (**Fig. 20**) presentó entre sus señales más significativas tres de tipo simples anchas en δ_{H} 7.33, 7.18 y 6.22 ppm características de un anillo de furano que fueron asignadas a los protones H_{15} , H_{16} y H_{14} , en δ_{H} 5.73 ppm una señal simple ancha correspondiente al hidrógeno vinílico asignada a H_3 , así como una señal simple en δ_{H} 1.89 característica de un grupo metilo vinílico, 1.12 y 0.82 ppm se observaron dos señales simples características de grupos metilos que fueron asignadas a los carbonos C_{19} y C_{20} y una señal doble en δ_{H} 0.86 ppm correspondientes al grupo metilo secundario C_{17} .

En su espectro de RMN de ^{13}C de **37** (**Fig. 21**) (**Tabla 5**), presentó entre sus señales más características, una señal en δ_{C} 200.4 ppm de un carbono de carbonilo de acetona asignada a C_2 , en 125.7 y 176.2 dos señales características de un enlace doble correspondiente a la posición entre C_3 y C_4 . En δ_{C} 142.9, 138.7, 111.0 y 125.2 para los carbonos C_{15} , C_{16} , C_{14} y C_{13} del anillo de furano, a frecuencias más bajas se observaron para los carbonos alifáticos sp^3 presentes en la estructura del compuesto.

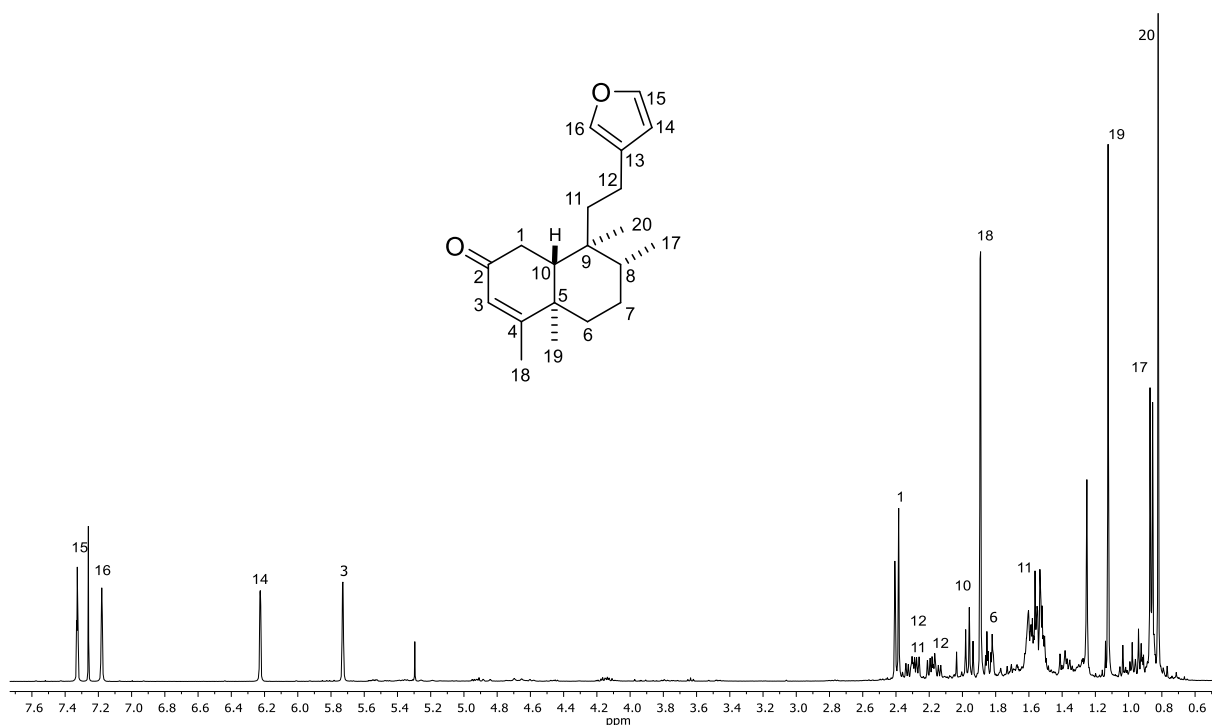


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H de la velamona (**37**) en CDCl_3 (400 MHz).

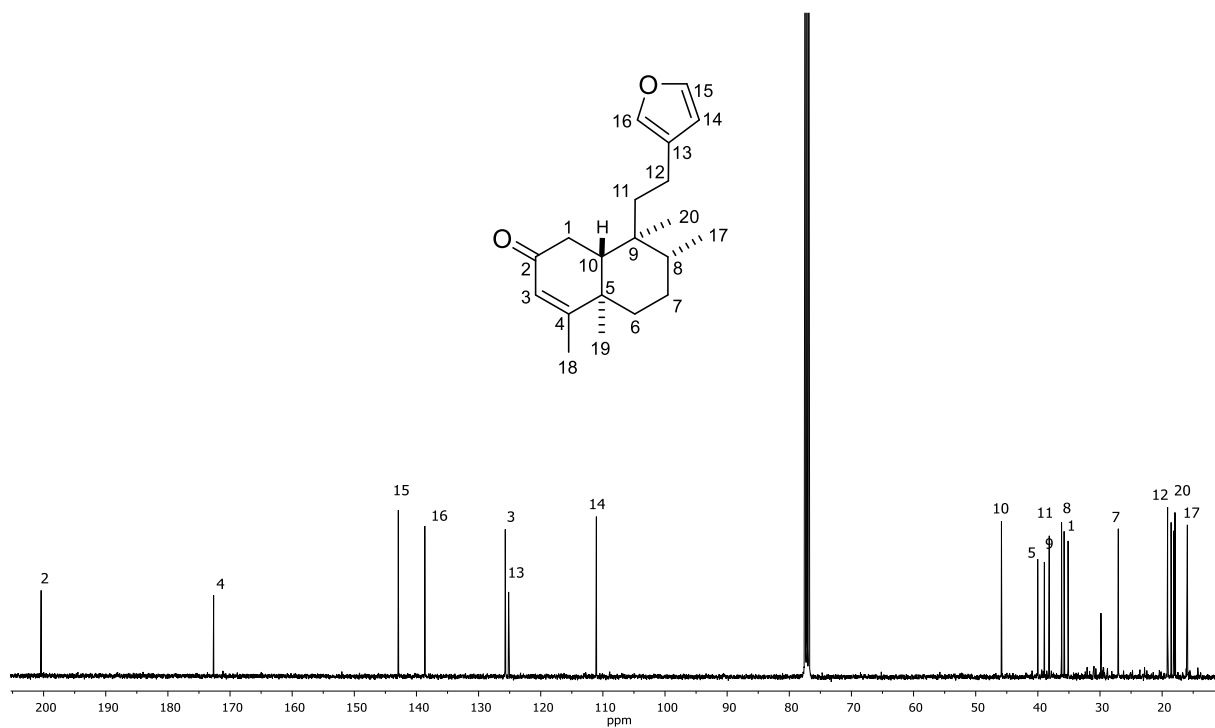


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C de la velamona (**37**) en CDCl_3 (100 MHz).

La sustancia se cristalizó en hexano-acetona, obteniéndose cristales adecuados para su difracción de rayos-X (**Fig. 22**), lo cual permitió corroborar su estructura descrita.

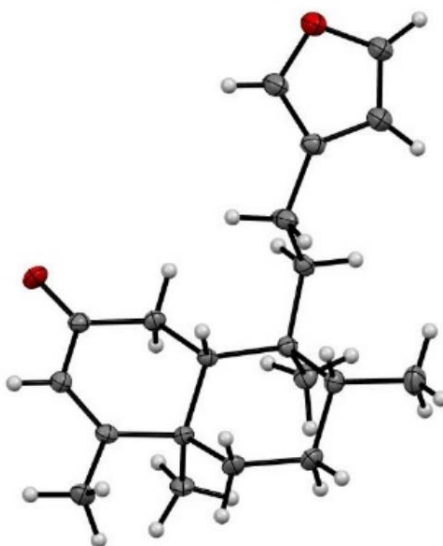


Figura 22. Estructura de velamona (**37**) obtenida por difracción de rayos-X.

El compuesto **38** se purificó de la fracción E (2.9 g) por CC empleando una fase móvil de hexano: acetona con una proporción de 7:3, se colectaron 55 fracciones de 10 y 5 mL, se analizaron mediante CCF, en las fracciones 21-25 se obtuvieron 500 mg, con un rendimiento del 3.57%. Este compuesto se caracterizó mediante sus datos físicos y espectroscópicos (**Tabla 5**). En el espectro de RMN ^1H (**Fig. 23**) presentó entre sus señales más significativas dos señales simples anchas en δ_{H} 5.82 y 4.72 ppm asignada a H_{14} y H_{16} , dos señales simples en δ_{H} 0.97 y 0.81 ppm asignadas a los grupos metilo C_{19} y C_{20} y dos dobles en δ_{H} 0.87 y 0.84 ppm correspondientes a los metilos en C_{18} y C_{17} , respectivamente.

En su espectro de RMN de ^{13}C de **38** (**Fig. 24**) (**Tabla 5**), presentó entre sus señales más características, una en δ_{C} 211.6 ppm de un carbono de carbonilo de acetona asignada a C_2 , en δ_{C} 174.0 ppm una de un carbono de carbonilo de un anillo de lactona asignada a C_{15} , en δ_{C} 115.4 y 170.4 para los carbonos del enlace doble C_{14} y C_{13} del anillo de lactona, una señal del carbono base de oxígeno C_{16} se observó δ_{C} 73.2 ppm, a frecuencias más bajas se observaron señales para los carbonos alifáticos sp^3 presentes en la estructura del compuesto.

El análisis de los experimentos en dos dimensiones (2D) permitió comprobar la estructura propuesta para el compuesto **38**. En el experimento COSY se observaron tres sistemas de correlación (**Fig. 25**). En el primero ^1H - ^1H COSY es la que se observa entre H-1/ H_{10} lo que indica la conectividad de H (10) con $\text{H}_2(1)$, H-6/ H_7 , H-3/ H_4 y H-4/ H_{18} lo que indica la conectividad de $\text{H}_2(3)$ -H(5)- $\text{H}_3(18)$ y el tercer sistema de correlación ^1H - ^1H de H-6/ H_7 , H-7/ H_8 y H-8/ H_{17} lo que indica la conectividad de $\text{H}_2(6)$ - $\text{H}_2(7)$ -H(8)- $\text{H}_3(17)$. En el espectro HMBC (**Fig. 26**) se observaron correlaciones de H-1 con C_2 , C_3 , C_{10} lo que indica la posición del carbono de carbonilo de cetona en C_2 . En adición, las correlaciones de H_{14} con C_{15} y C_{16} , así como también H_{16} con C_{13} y C_{15} , lo que indican la presencia del anillo de la γ -lactona. Por lo tanto, la estructura de **38** fue determinada como se representa, la cual corresponde a un nuevo diterpeno y nombrado como mazapenolido A (**38**).

La sustancia se cristalizó en hexano-acetona, fue adecuada para su difracción de rayos-X (**Fig. 27**), lo cual permitió corroborar su estructura descrita.

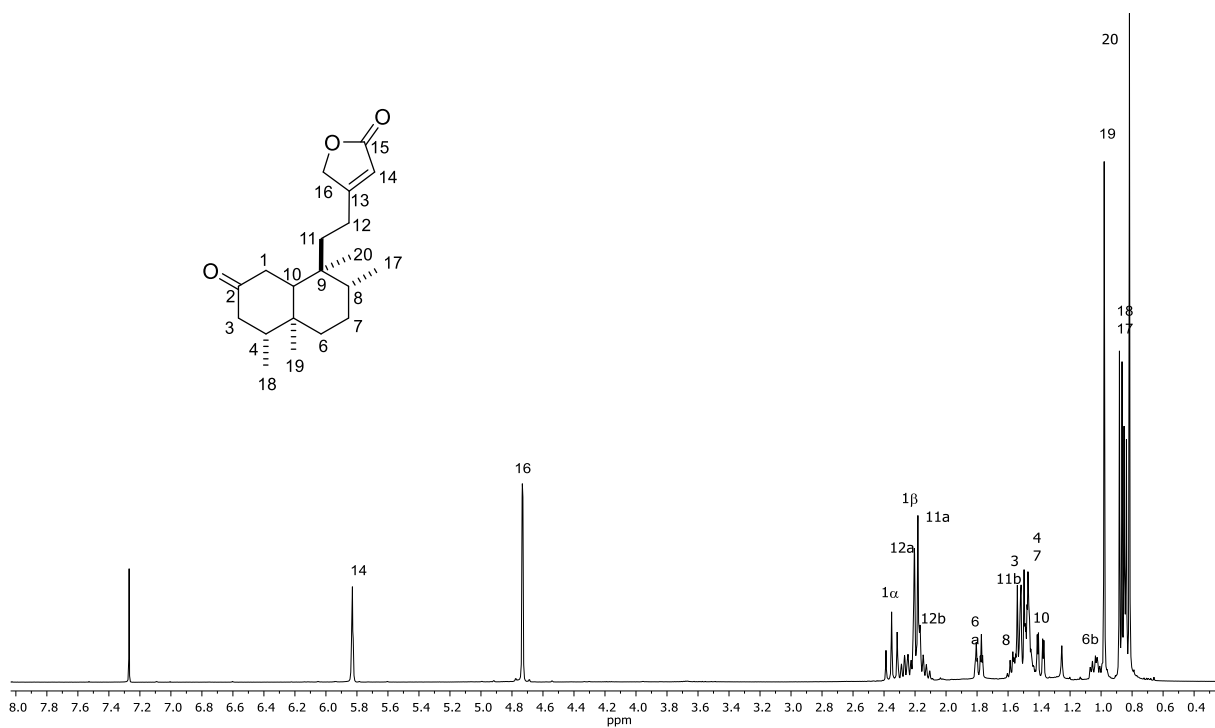


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H de la mazapenolido A (**38**) en CDCl_3 (400 MHz).

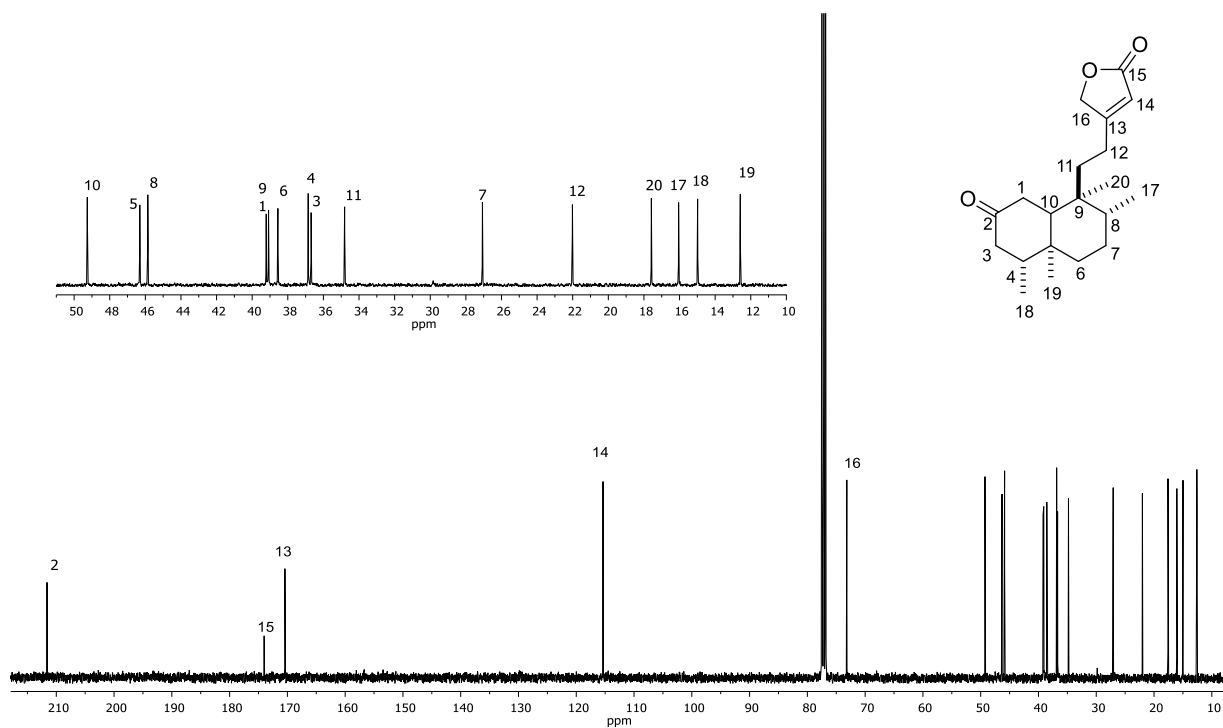


Figura 24. Espectro de RMN de ^{13}C del mazapenolido A (**38**) en CDCl_3 (100 MHz).

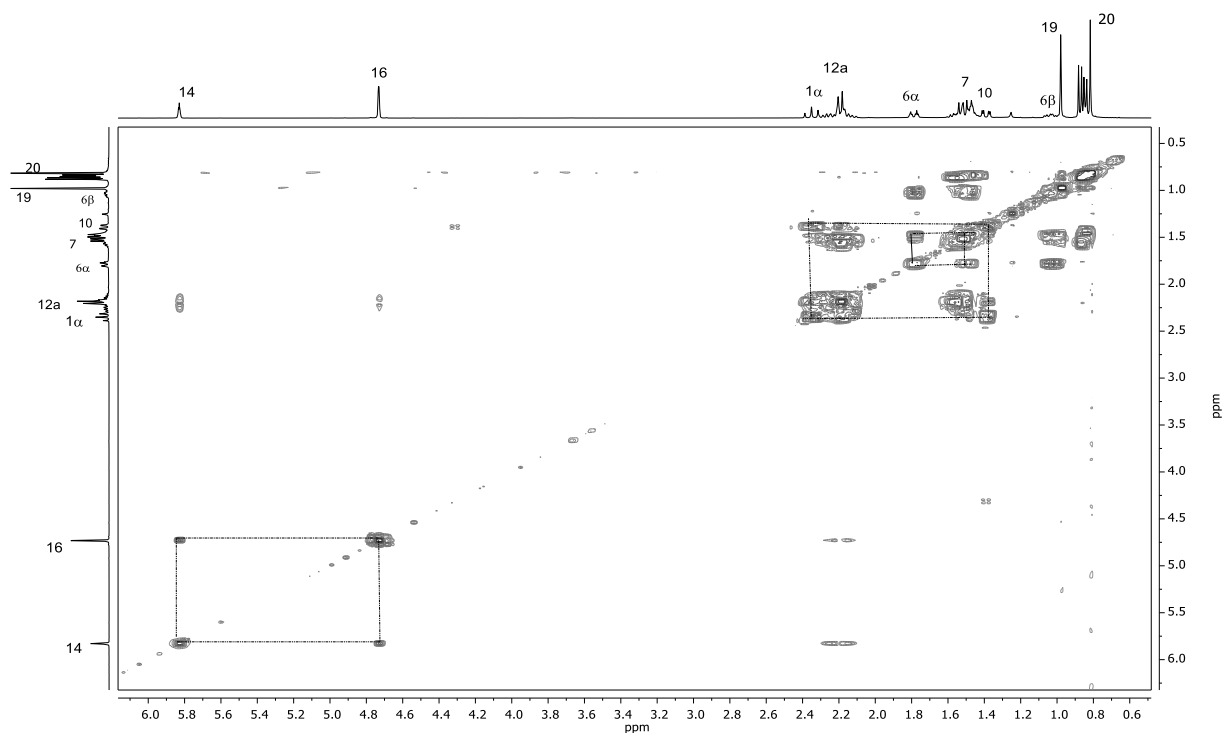


Figura 25. Experimento COSY de la mazapenolido A (**38**) en CDCl_3 .

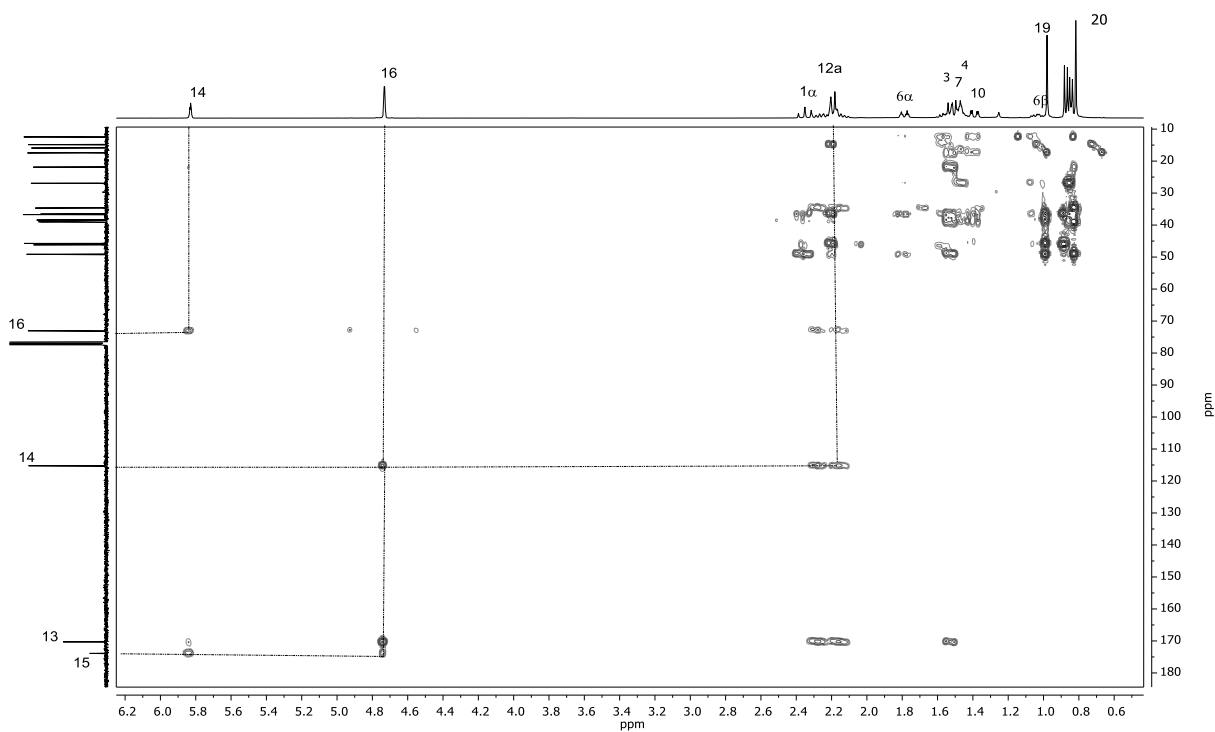


Figura 26. Experimento HMBC de la mazapenolido A (**38**) en CDCl_3 .

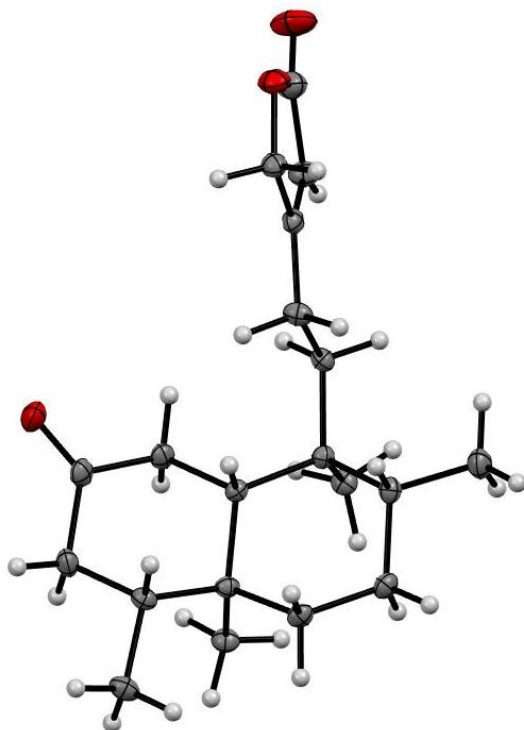


Figura 27. Estructura de mazapenolid A (**38**) obtenida por difracción de rayos-X.

Tabla 5. Desplazamientos químicos de protón y carbono de los compuestos **36-38** en CDCl₃, (δ en ppm y J en Hz).^a

Posición	Cascarillona (36)		Velamona (37)		Mazapenolido A (38)	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	a 1.60, m ^a	45.6	a 2.40, d (9.3)	35.1	α 2.34, t (14.4)	39.2
	b 1.60, m ^a		b 2.40, d (9.3)		β 2.19, m ^a	
2	–	212.0	–	200.4	–	211.6
3	2.18, m ^a	46.3	5.73, br s	125.7	α 1.47, m ^a	36.7
					β 1.47, m ^a	
4	2.32, m ^a	39.0	–	176.2	1.48, m ^a	36.9
5	–	36.5	–	40.0	–	46.3
6	1.78, dt (13.0, 3.2)	38.6	1.84, td (12.4, 2.9)	36.8	a 1.78, dt (13.2, 3.2)	38.6
	1.07, m ^a		1.37, m		b 1.03, m	
7	1.54, m ^a	27.2	1.53, m ^a	27.1	1.48, m	27.1
	1.46, m ^a		1.58, m ^a		1.53, m	
8	1.58, m ^a	38.6	1.57, m ^a	36.2	1.57, m	45.9
9	–	39.3	–	38.9	–	39.0
10	1.53, m ^a	49.0	1.96, t (8.8)	45.9	1.39 dd (14.1, 3.1)	49.3
11	1.51, m ^a	38.2	a 1.56, m ^a	38.2	a 1.52, m	34.8
			b 1.52, m ^a		b 2.20, m	
12	2.33, m	18.0	2.30, m	18.1	a 2.24, m	22.0
	2.20, m		2.17, m		b 2.15, m	
13	–	125.3	–	125.2	–	170.4
14	6.25, br s	111.1	6.22, br s	111.0	5.82, s	115.4
15	7.34, t (1.6)	142.8	7.33, t (1.6)	142.9	–	174.0
16	7.20, br s	138.6	7.18, s	138.7	4.72, br s	73.2
17	0.87, d (1.9)	14.9	0.86, d (6.2)	15.9	0.84, d (6.1)	16.0
18	0.88, d (2.2)	16.1	1.89, s	19.1	0.87, d (6.7)	15.0
19	0.98, s	12.9	1.12, s	18.6	0.97, s	12.9
20	0.78, s	17.6	0.82, s	17.9	0.81, s	17.6

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

6.3 Predicción de las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas

SwissADME es una herramienta de acceso libre utilizada para predecir las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas de compuestos basada en la similitud de fármacos. En este proyecto se evaluaron los tres compuestos (**36, 37, 38**) aislados de la raíz de *C. mazapensis*, así como es de un antibiótico. Los compuestos fueron evaluados calculando 5 propiedades fisicoquímicas principales: número de aceptores y donantes de enlaces puentes de hidrógeno,

el LogP, la superficie polar y el peso molecular (**Tabla 6**), basándose en las reglas de Veber y Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001; Udrea *et al.*, 2018). De manera general, los tres compuestos aislados de *C. mazapensis* muestran valores que se encuentran dentro de los puntajes aceptables, el coeficiente de partición (LogP) no mayor a 5, el peso molecular se encuentra entre el rango de g/mol, la superficie polar el rango está entre 20 y 120 Å, el número de pares aceptores de puentes de hidrógeno y donadores son óptimos, menos de 10 enlaces rotables y por lo tanto presentan cero violaciones basadas en las reglas de Lipinski (Lipinski, *et al.*, 2001; Vlad, *et al.*, 2020).

Tabla 6. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos **36-38** aislados de *C. mazapensis*.

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Aceptores de puentes de hidrógeno	Donadores de puentes de hidrógeno	LogP	Refractividad molar	TPSA (Å ²)	Enlaces rotables
Cascarillona	302.45	2	0	4.48	91.23	30.21	3
Velamona	300.44	2	0	4.43	90.76	30.21	3
Mazapenolido	318.45	3	0	3.93	92.40	43.37	3
A							
Estreptomicina (39)	581.57	15	12	-5.84	130.43	336.43	9

Los resultados obtenidos en la plataforma de SwissADME (**Tabla 6**) permitieron generar los radares de biodisponibilidad de los tres compuestos, con la finalidad de hacer una comparación de los resultados. En los radares de la **Figura 28** se muestran los rangos óptimos de cada propiedad y dentro de qué rango se encuentra el compuesto marcado con las líneas color rojo, dentro de estas propiedades se encuentran: lipofilicidad, peso molecular, polaridad PSA, solubilidad, insaturación y flexibilidad.

Los compuestos de *C. mazapensis* cumplen con los rangos establecidos y se encuentran dentro de los valores óptimos que revelan las propiedades fisicoquímicas compatibles con una modera farmacocinética y, por lo tanto, su probabilidad de mayor efecto y uso en estudios posteriores. Por otro lado, la evaluación del compuesto de referencia como lo es la

estreptomicina nos muestra que no cumple con la regla de Lipinski debido a que presenta violaciones, debido al alto peso molecular que posee, altos números de donadores y aceptores de enlaces hidrógeno, además de tener un valor bajo de LogP, lo que indica tener una mala absorción oral como se muestra sus radares de biodisponibilidad en la **Figura 29**.

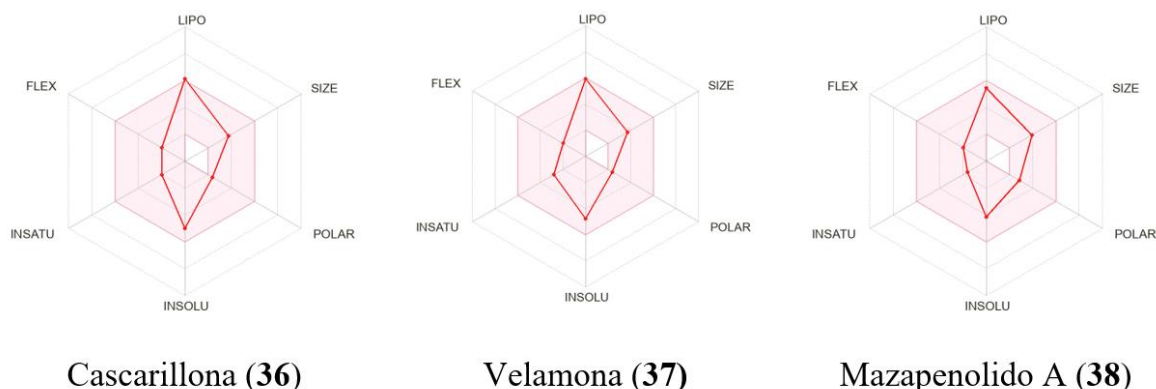


Figura 28. Radares de biodisponibilidad de Cascarillona (36), Velamona (37) y Mazapenolido A (38).

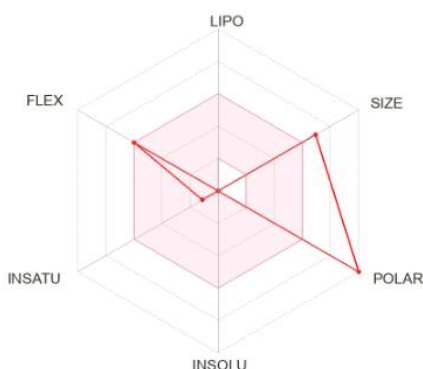


Figura 29. Radares de biodisponibilidad de la estreptomicina como antibiótico de referencia.

6.4 Predicciones ADMET

La Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad o también conocido como ADMET, nos permite conocer los aspectos farmacocinéticos para conocer como el organismo actúa frente a un fármaco administrado en un organismo (Doogue y Polasek, 2013). La utilización de programas predictores del perfil ADME como admetSAR y ADMETlab de manera general se encarga de generar información química, biológica y de las propiedades ADMET, útiles en el desarrollo de medicamentos y la evaluación de riesgos

medioambientales y humanos (Yang *et al.*, 2019).

Los parámetros farmacocinéticos están subdivididos en su mayoría en otros pequeños subgrupos: la Absorción consta de tres subgrupos (BHE, absorción intestinal y permeabilidad), seguida de la Distribución proponiendo la localización subcelular, posteriormente el Metabolismo donde se representa si existe o no inhibición de los citocromos P₄₅₀, la Excreción determina el tiempo de vida media y finalmente la Toxicidad subdividida en dos grupos (prueba AMES y carcinogénica). Analizando la **Tabla 7** podemos determinar que en el perfil de adsorción los tres compuestos tienen valores del 95-98 %, por lo que esto indica que no habrá daño alguno en la barrera hematoencefálica y que el compuesto podría fluir, además de una completa absorción intestinal y una permeabilidad regular. La distribución es localizada en la mitocondria, una baja inhibición de CYP en cascarillona y mazapenolido A, y alta en velamona lo que se muestra en el rubro del metabolismo. Por otro lado, el tiempo de vida media es baja, lo que indicaría que se necesitaría de una mayor cantidad de compuesto para tener efecto terapéutico. Por último, en el parámetro de toxicidad indica que los compuestos no presentan resultado de ser tóxico o tener algún efecto de mutación celular.

Tabla 7. Perfil ADMET de los tres compuestos **36-38**, realizado en ADMETsar.

ADMET	Parámetro	Cascarillona (36)	Velamona (37)	Mazapenolido A (38)
Absorción		98%	97%	95%
	Barrera Hematoencefálica			
	Absorción intestinal	100%	100%	100%
	Permeabilidad	79%	78%	66%
Distribución	Localización subcelular	Mitocondria	Mitocondria	Mitocondria
Metabolismo	Inhibición de CYP	Baja	Alta	Baja
Excreción	T $\frac{1}{2}$	Baja	Baja	Baja
Toxicidad	Toxicidad AMES	No tóxico	No toxico	No toxico
	Carcinógeno	No	No	No

6.5 Predicciones de blancos y de la actividad biológica

Los modelos predictivos de moléculas o metabolitos secundarios como Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad (en inglés, Quantitative Structure Relationships, QSAR) dependen principalmente de los descriptores moleculares calculados (Tetko *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2008) y a su vez los descriptores moleculares dependen de la representación molecular correcta (Fourches *et al.*, 2010). Muchos de los metabolitos secundarios que se han aislado a partir de las plantas, han sido una fuente importante en materia de búsqueda de nuevas terapias contra muchos padecimientos. Previo a esto, la mayoría de las moléculas han sido sometidas a estudios de índole *in silico*, con la única intención de tener un acercamiento al posible efecto terapéutico que estas sean capaces de poseer y de esta manera tener un antecedente de los posibles padecimientos a los que puede estar dirigida cada una de las moléculas de interés (Figueroa, 2024).

Las plataformas en línea de predicciones de la actividad biológica han tomado gran interés en los últimos años, debido en gran medida a su asertividad de probabilidad de los posibles espectros de bioactividad de un gran número de moléculas biológicas. Es por ello que en el presente estudio se investigaron las posibles actividades biológicas de los compuestos cascarillona **36**, velamona **37** y mazapenolido A **38** mediante la utilización del software de libre acceso Way2drug. Con base en los resultados que se muestran en el esquema de calor (**Tabla 8**), podemos ver que los compuestos **36-38** poseen una probabilidad relevante para ser capaces de actuar como potentes antineoplásicos, especialmente la velamona y mazapenolido A; los cuales poseen entre el 90 y 80% de probabilidad de ser activos, seguido de la cascarillona (80-70%). Aunado a esto la plataforma Way2drug (Druzhilovskiy *et al.*, 2017) arroja tres principales tipos de cáncer (pulmón, colon y colon-rectal) los cuales podrían ser los blancos idóneos para este tipo de moléculas y a los cuales es importante enfocar en un estudio futuro. Sin embargo, se puede apreciar que otra de las actividades mostradas en este análisis es la posible actividad antibacteriana, la cual también fue objeto de estudio en la presente investigación, mostrando una modera actividad que va de 50-40 % de probabilidad de que los tres compuestos puedan tener efecto antibacteriano.

Tabla 8. Mapa de calor de la predicción de las posibles actividades biológicas.

Actividad	Compuesto			Probabilidad (%)
	36	37	38	
Antineoplásico	77.2	83.7	84.0	100-90
Antibacterial	41.8	41.4	48.0	90-80
Antiprotozoario	37.3	43.0	35.9	80-70
Antimicoplasma	34.0	34.0	29.1	70-60
Inhibidor de síntesis de proteínas	17.4	20.4	23.1	60-50
Inhibidor de peptidoglucano glucosiltransferasas	28.2	26.0	30.3	
Inhibidor de la síntesis de RNA	24.2	22.9	28.7	50-40
Inhibidor de la formación de microtúbulos	20.9	19.7	24.7	40-30
Potenciador de permeabilidad de la membrana	30.5	37.8		30-20
Antifúngico	28.8	31.9	31.3	

Tabla 9. Mapa de calor sobre la predicción de objetivos bacterianos.

Bacteria	Compuesto			Probabilidad %
	36	37	38	
<i>Micrococcus luteus</i>	46.4	50.6	49.5	100-60
<i>Kocuria rhizophila</i>	45.3	41.3	37.6	60-50
<i>Bacillus subtilis</i>	29.7	32.2	21.6	50-40
<i>Lactobacillus plantarum</i>	23.4	23.2	6.1	40-30
<i>Campylobacter jejuni</i>	13.7	12.7		30-20
<i>Prevotella oralis</i>	16.5		33.1	≤ 20

Para conocer la actividad de los compuestos se usó la herramienta Way2drug antiBac-Pred y de acuerdo a la **tabla 9**, los compuestos tienen actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas y una menor actividad en bacterias Gram negativas, de las cuales podemos destacar que hay una probabilidad de 50% al 20 % de tener efecto en *Micrococcus luteus*, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus plantarum*, las dos primeras se consideran patógenos que se encuentran en una variedad de ecosistemas como por ejemplo en alimentos de origen animal. *Lactobacillus* es un género de bacteria de suma importancia en la industria para producir alimentos, por otro lado, *Bacillus* es fundamental en procesos biotecnológicos y en por lo tanto se puede deducir que los tres compuestos pueden ser considerados como un agente antibacteriano.

6.6 Acoplamiento molecular de los compuestos

Las β -lactamasas son enzimas producidas por bacterias que confieren multirresistencia a los antibióticos betalactámicos como penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y carbapenémicos. Las β -lactamasas proporcionan resistencia a los antibióticos a través de la hidrólisis del anillo β -lactámico, desactivando las propiedades antibacterianas del principio activo. Por ello, se llevó a cabo en el presente estudio el acoplamiento molecular, con la finalidad de predecir si los compuestos **36-37** pueden presentar interacciones sobre el sitio de unión de la enzima β -lactamasa e inhibir su actividad enzimática, y posteriormente validar estos resultados computacionales con el estudio *in vitro*.

En la **tabla 10** se muestran los resultados de los compuestos **36-37** a partir de la enzima β -lactamasa (PDB:4KG5), así como sus respectivas energías de unión. Mediante el estudio de acoplamiento molecular, se observó la interacción de los tres compuestos aislados del extracto con residuos de los aminoácidos del sitio de unión de la enzima **36-38** (**Fig. 30**). De los tres compuestos aislados de la raíz de *C. mazapensis*, el compuesto **36** mostró mejor afinidad con una energía de unión de -8.15 Kcal/mol (**Tabla 10**). De acuerdo con los resultados obtenidos, presentaron interacciones de tipo puente de hidrógeno con los residuos Gly 152, Lys 315, Asn 346, Arg 349 y Thr 316 del sitio activo de la enzima. Como se observa en la **figura 30** los grupos funcionales presentes correspondientes a carbonilo de cetona de los tres compuestos presentan interacciones de tipo puente de hidrógeno (**Fig. 30-A, Fig. 30-B y Fig. 30-C**).

Adicionalmente, se realizó el acoplamiento molecular con el inhibidor que la estructura cristalina de la enzima tiene como ligando la molécula de cefotaxima. El análisis del complejo enzima-inhibidor (β -lactamasa-cefotaxima) mostró una energía de unión menor que los compuestos **36** y **37** y se observaron interacciones por puentes de hidrógeno con los residuos Ser 64, Lys 67, Thr316, Ala318 y Asn 343 (**Fig. 30-D**) (Naas *et al.*, 2016). En contraste, puede notarse que los tres compuestos si presentan interacciones con residuos similares (Thr 316) o próximos (Lys 315) que conforman al sitio de unión de la enzima, y podrían tener una posible actividad antibacteriana al inhibir la enzima β -lactamasa (**Tabla 10**) como su posible mecanismo de acción. El docking molecular permitió elucidar el modo de unión y sus posibles interacciones de los compuestos **36-38** con la enzima. Estos resultados de las predicciones sugieren que los complejos enzima-compuestos (**36-38**) son favorables, por lo cual, estos resultados de acoplamiento molecular prevén una posibilidad de que los compuestos puedan mostrar actividad antibacteriana y que darán pauta para la validación de su estudio computacional. Sin embargo, los valores de unión mayores a la estreptomicina de algunos compuestos (**36** y **38**) al sitio de unión no garantiza necesariamente la inhibición efectiva de la enzima y el efecto sobre las bacterias. Esto puede deberse a varias razones, como que la unión no interrumpe la función de la enzima, o porque el compuesto es expulsado o metabolizado rápidamente por las bacterias (Salam *et al.*, 2023). En este caso ocurrió que los compuestos **36-37**, a pesar de obtener energías de unión favorables mostraron inhibición contra las bacterias de tipo Gram negativas. El compuesto **38** que mostró el puntaje

de unión intermedio, pero no mostró inhibición tanto con bacterias Gram positivas como Gram negativas, esto puede atribuirse a diferencias morfología bacteriana y las barreras específicas, como la composición de la estructura de las membranas y pared celular. El docking molecular puede predecir la unión de los compuestos con la enzima, pero no siempre garantiza la posible actividad antibacteriana, debido a esto es fundamental que los resultados se validen con experimentos biológicos o clínicos (Agu *et al.*, 2023).

Tabla 10. Energía de unión de los compuestos **36-38** y cefotaxima (inhibidor) con la enzima β -lactamasa e interacciones de puentes de hidrógeno y π - π .

Compuesto	Energía de enlace (kcal/mol)	Puentes de Hidrógeno	Interacciones π - π
Cascarillona (36)	-8.15	Gly 152, Lys315	Tyr 150
Mazapenolido (38)	-8.14	Gly 152, Asn 346, Arg 349	---
Cefotaxima (Inhibidor)	-7.75	Ser64, Lys67, Thr316, Ala318, Asn343	Tyr 221
Velamona (37)	-7.73	Gly152, Lys315, Thr316	---
β -betalactamasa	---	Ser64, Ala 318, Gly320	---

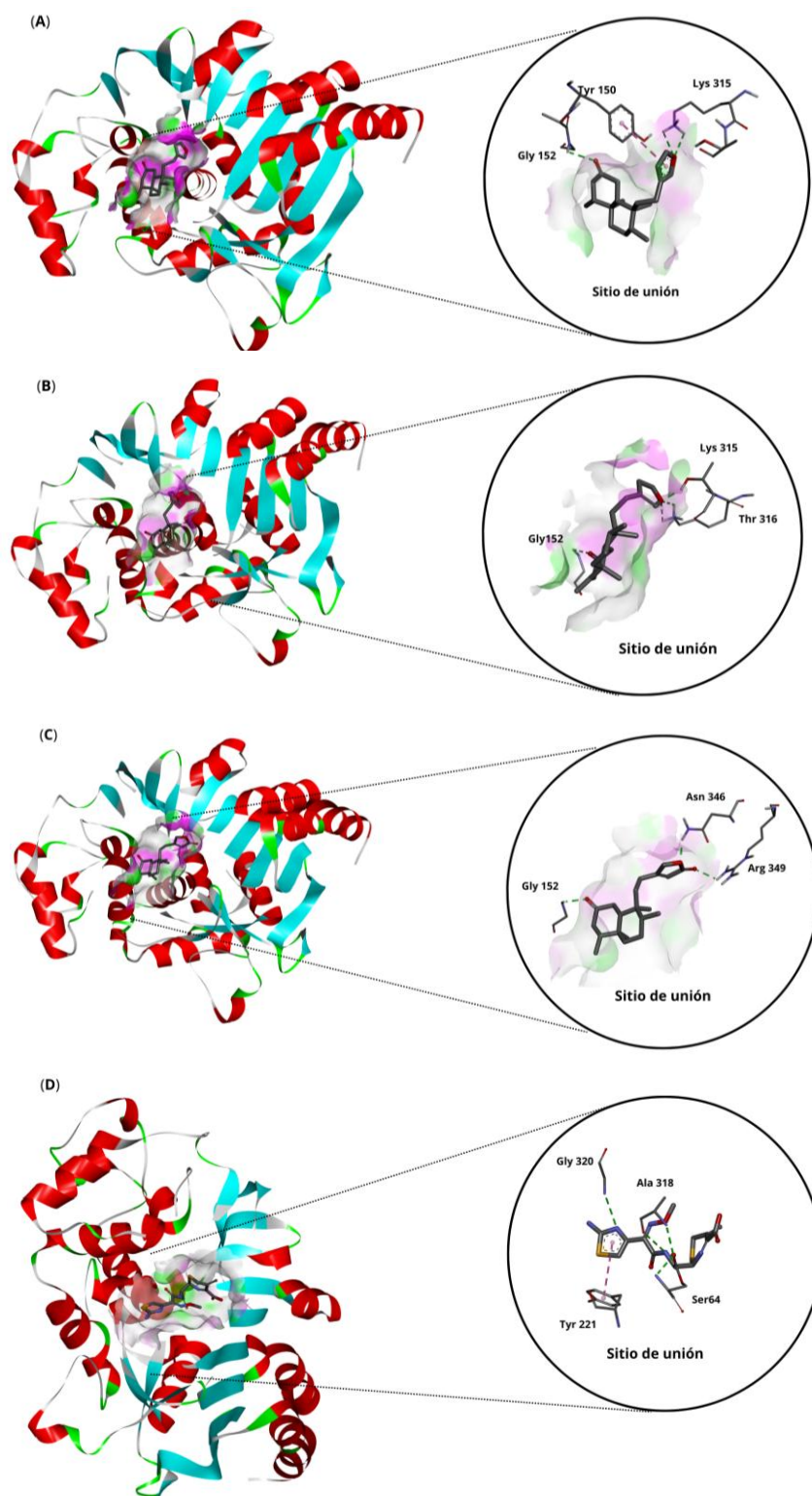


Figura 30. Acoplamiento molecular e interacciones de los compuestos **36** (A), **37** (B), **38** (C) y cefotaxima (D) (inhibidor) con el sitio de unión de la enzima β -lactamasa.

6.7 Evaluación del efecto antibacteriano de los compuestos puros.

Se realizaron pruebas de susceptibilidad antimicrobiana usando los tres compuestos **36-38** purificados del extracto de las raíces de *C. mazapensis*, para las pruebas se usaron bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con la técnica de Kirby-Bauer, suministrando el compuesto en dilución por goteo, mostrando efectos de inhibición contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* con los compuestos **36** y **37**, el compuesto **38** no mostró inhibición en ninguna de las bacterias mencionadas.

Se realizaron las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana con las cuatro bacterias mencionadas, usando distintas concentraciones de cada compuesto, además de usar como control positivo estreptomycinina y como control negativo DMSO. Compuestos **36** y **37**, y DMSO/Tween 80 (4:1) para el compuesto **38**. En la **tabla 11** se muestra el efecto que tuvo el compuesto **36** contra estas bacterias, mostrando zonas de inhibición desde 9 mm a 13 mm de diámetro con las bacterias Gram positivas, mostrando un efecto inferior comparado con el antibiótico de referencia. De igual manera, con el compuesto **37** solo se obtuvieron inhibiciones contra *B. subtilis* de 9 mm a 12 de diámetro (**Tabla 12**). Sin embargo, el compuesto **38** no mostró inhibición con ninguna de las cepas utilizadas, siendo el único con inhibición nula (**Tabla 13**).

Tabla 11. Ensayo del compuesto **36** contra las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

[C]	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
80 mg/mL	NA	NA	13 mm	9 mm
70 mg/mL	NA	NA	13 mm	9 mm
50 mg/mL	NA	NA	10 mm	NA
DMSO (-)	NA	NA	NA	NA
Estreptomycinina (+)	16 mm ± 0.2	7 mm ± 0.2	24 mm ± 0.3	17 mm ± 0.3

*Medición de halos en mm.

*NA= No presentó actividad

Tabla 12. Ensayo del compuesto **37** contra las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

[C]	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
100 mg/mL	NA	NA	12 mm	NA
80 mg/mL	NA	NA	10 mm	NA
70 mg/mL	NA	NA	9 mm	NA
DMSO (-)	NA	NA	NA	NA
Estreptomicina (+)	16 mm \pm 0.2	7 mm \pm 0.2	22.5 mm \pm 0.3	15.5 mm \pm 0.3

*Medición de halos en mm.

*NA= No presentó actividad

Tabla 13. Ensayo del compuesto **38** contra las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*.

[C]	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
125 mg/mL	NA	NA	NA	NA
DMSO/Tween 80 (-)	NA	NA	NA	NA
Estreptomicina (+)	16 mm \pm 0.2	7 mm \pm 0.2	24 mm \pm 0.3	14 mm \pm 0.3

*Medición de halos en mm.

*NA= No presentó actividad

En las **Figuras 31, 32 y 33** se muestra las imágenes de las inhibiciones que tuvieron los compuestos **36** y **37** contra las cepas de *S. aureus* y *B. subtilis* mediante la técnica de aplicación por goteo, mostrando zonas de inhibición en los medios de cultivo, por lo que el uso de los compuestos Cascarillona (**36**) y Velamona (**37**) a concentraciones altas tienen potencial para impedir el crecimiento de bacterias Gram positivas.

Las concentraciones de los compuestos que mostraron inhibición (**Tablas 10-12**) varían significativamente dependiendo de la especie bacteriana. En particular, las bacterias Gram negativas poseen una barrera externa adicional en su estructura celular, una membrana externa que actúa como un obstáculo físico, impidiendo que muchos compuestos lleguen eficazmente al sitio de unión (Mai *et al.*, 2016). Esto podría explicar la ausencia de actividad

de los compuestos contra cepas Gram negativas. Esto indica que, más allá del mecanismo de acción, factores intrínsecos en cada bacteria, como morfología, el metabolismo y la presencia de mecanismos de resistencia específicos, juegan un papel crucial en determinar la susceptibilidad a los compuestos antimicrobianos. Por lo tanto, una comprensión más específica de estas diferencias es esencial para el diseño y la selección de terapias antimicrobianas más efectivas.

El docking molecular puede predecir la unión de los compuestos con la enzima, no siempre garantiza la posible actividad antibacteriana debido a la complejidad de los sistemas bacterianos y su dinámica. Los modelos de docking molecular consideran una instantánea estática de las interacciones posibles y no pueden simular la dinámica completa de las proteínas y complejos estructurales en el tiempo. Estas limitaciones marcan la diferencia entre las predicciones computacionales y las realidades experimentales o clínicas. Por ello, es fundamental que los hallazgos de los modelos de docking molecular se validen con experimentos biológicos o clínicos (Agu *et al.*, 2023).

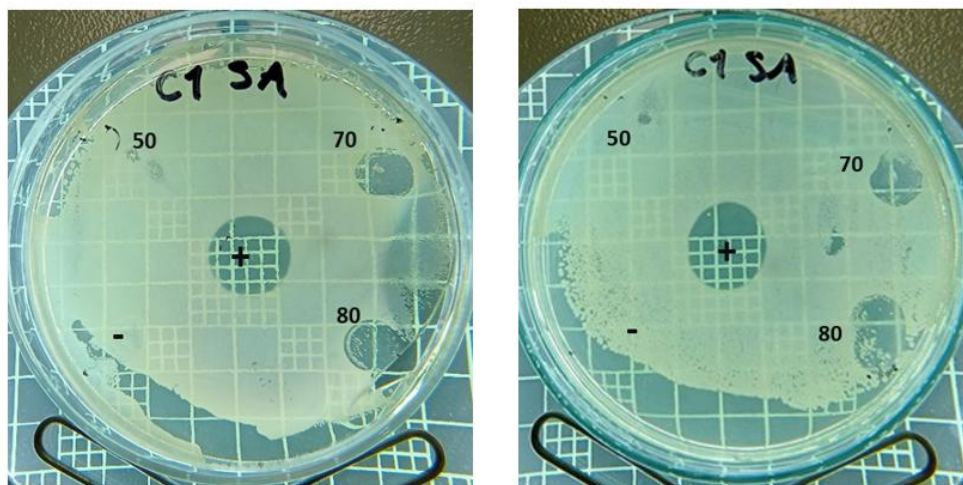


Figura 31. Efecto de inhibición de **36** (C1) contra *Staphylococcus aureus* (SA).

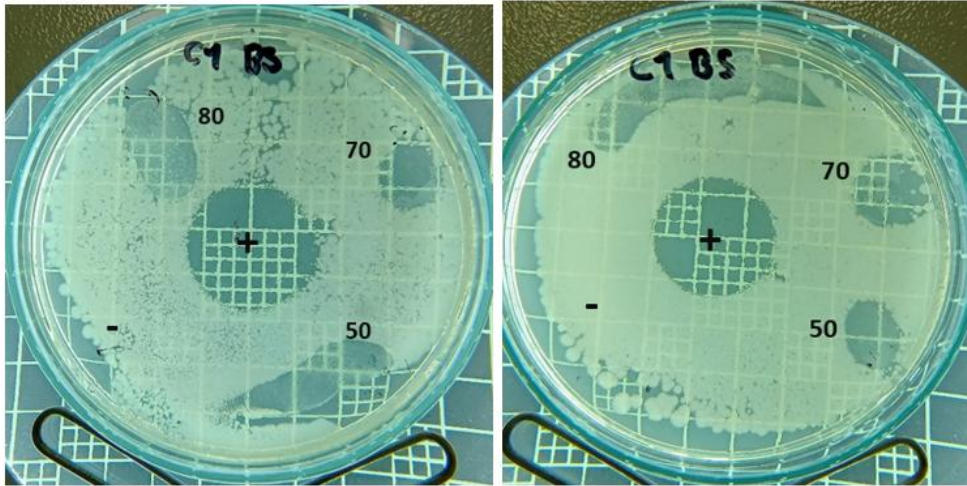


Figura 32. Efecto de inhibición del **36** (C1) contra *Bacillus subtilis* (BS).

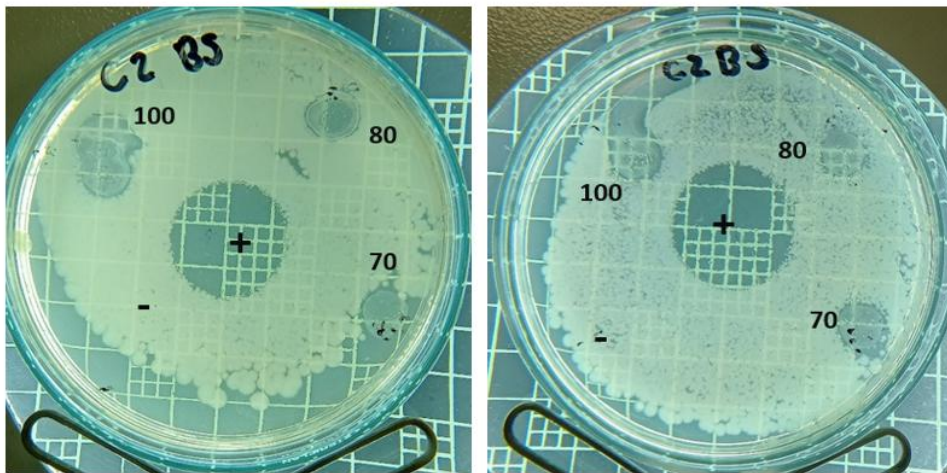


Figura 33. Efecto de Inhibición del compuesto **37**(C2) contra *Bacillus subtilis* (BS).

7. Conclusiones

- *Croton mazapensis* es una planta que no ha sido estudiada a detalle desde un punto de vista químico y biológico. Se ha logrado descubrir que se trata de una planta de importancia médica, principalmente por su uso en la medicina tradicional y por la presencia de metabolitos secundarios que han presentado actividad antibacteriana.
- Se caracterizaron dos metabolitos secundarios conocidos de naturaleza diterpénica denominados cascarillona, velamona y un nuevo denominado como mazapenolido A.
- El uso de métodos computacionales nos ayudó a predecir los compuestos (después de pasar por la etapa de purificación y caracterización) puede ser candidatos para usarse como fármaco y realizar pruebas *in vitro* e *in vivo* con mayor seguridad. Los compuestos obtenidos mostraron ser antineoplásicos principalmente y en una menor probabilidad como antibacterianos.
- El acoplamiento molecular sobre la enzima β -lactamasa bacteriana y las evaluaciones *in vitro*, **36** presentó una mayor afinidad al sitio de unión de la enzima β -lactamasa. De los tres compuestos obtenidos solo **36** y **37** mostró inhibición contra *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* con una menor eficiencia comparado con estreptomicina. El uso de estrategias computacionales son una alternativa a los métodos convencionales de identificación de fármacos, que presentan grandes ventajas, como reducción del tiempo de identificación de compuestos, la eficiencia y costos, permitiendo acelerar el proceso de que los fármacos salgan al mercado en menor tiempo.

8. Perspectivas

- Desarrollar otros métodos de separación y purificación para obtener más compuestos provenientes de *C. mazapensis*.
- Evaluar los compuestos obtenidos con otras bacterias de interés clínico y alimentario.
- Conocer o elucidar los mecanismos moleculares de los compuestos **36** y **37** que mostraron inhibición.
- Probar con otros estudios referentes a actividad biológica como antineoplásico, antiinflamatorio, antiprotozoario ya que pudieran tener probabilidades de tener un efecto activo.

9. Referencias bibliográficas

- Adedeji, W. (2016). THE TREASURE CALLED ANTIBIOTICS. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine*, 14(2), 56.
<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5354621/>
- Agu, P., Afiukwa, C., Orji, O., Ezech, E., Ofoke, I., Ogbu, C., Ugwuja, E., & Aja, P. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 13398-.
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>
- Agu, P. C., Afiukwa, C. A., Orji, O. U., Ezech, E. M., Ofoke, I. H., Ogbu, C. O., Ugwuja, E. I., & Aja, P. M. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Scientific Reports*, 13(1).
<https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>
- Aguilar, A., & Fuentes, R. (2021). *Nueva Terapia Antirretroviral Inyectable Aprobada por La FDA para Pacientes Infectados con VIH*. <https://doi.org/10.2165/11592400-000000000-00000>
- Alhawarri, M., Al-Thiabat, M., Dubey, A., Tufail, A., Fouad, D., Alrimawi, B., & Dayoob, M. (2024). ADME profiling, molecular docking, DFT, and MEP analysis reveal cissamaline, cissamanine, and cissamdine from *Cissampelos capensis* L.f. as potential anti-Alzheimer's agents. *RSC Advances*, 14(14), 9878.
<https://doi.org/10.1039/D4RA01070A>
- Ashour, M., Wink, M., & Gershenzon, J. (2010). Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes. *Wiley Online Library* M Ashour, M Wink, J Gershenzon *Annual Plant Reviews Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary*, 2010 • *Wiley Online Library*, 40, 258–303.
<https://doi.org/10.1002/9781444320503.CH5>
- Ashraf, M., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., & Arif, M. (2018). Environmental Stress and Secondary Metabolites in Plants: An Overview. *Plant Metabolites and Regulation under Environmental Stress*, 153–167.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00008-X>
- Babili, F. EL, Moulis, C., Bon, M., & Fourasti, I. (1998). Three furano-diterpenes from the bark of *Croton campestris*. In *Phytochemistry* (Vol. 48, Issue 1).

- Ballón W., & Grados R. (2019). Acomplamiento molecular:: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e identificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista CON-CIENCIA*, 7(2), 55–72.
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2310-02652019000200006&script=sci_arttext
- Barrera, C., Gómez, D., & Castiblanco, F. (2016). Importancia medicinal del género *Croton* (euphorbiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2), 234–247.
<http://scielo.sld.cu><http://scielo.sld.cu235>
- Basavaraju, M., & Gunashree, B. (2022). *Escherichia coli*: an overview of main characteristics. *IntechOpen EBooks*.
<https://doi.org/https://doi.org/10.5772/intechopen.105508>
- Calvo, M. (2017). La aplicación de los productos naturales. *Revista de Estudios Latinoamericanos*, 9(20), 47–55.
<https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/tdna/article/view/9562>
- Camacho, L., Portillo, J., Rivera, A., Sánchez, J., Franco, R., Duque, J., Velo, G., Ishida, C., Camacho, L., Portillo, J., Rivera, A., Sánchez, J., Franco, R., Duque, J., Velo, G., & Ishida, C. (2021). Multirresistencia, resistencia extendida y panresistencia a antibacterianos en el norte de México. *Cirugía y Cirujanos*, 89(4), 426–434.
<https://doi.org/10.24875/CIRU.20000304>
- Carril, E., & García, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. In *Reduca* (Vol. 2). Ana G. Moreno. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/9603/>
- Castellanos, M. (1993). Importancia de la difracción de rayos X en la Química. *Revistas.Unam.Mx*, 208–217.
<https://revistas.unam.mx/index.php/req/article/download/66800/58698>
- Cavalcanti, D. F. G., Da Silveira, D. M., & Da Silva, G. (2020). Aspectos e potencialidades biológicas do gênero *Croton* (Euphorbiaceae). *Brazilian Journal of Development*, 6(7), 45931–45946. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-280>
- Da S Rocha, A., Sousa, H., Júnior, E., De Lima, F., Costa, A., De Araújo, A., Leite, J., Martins, F., Oliveira, M., Plácido, A., Filho, F. S., & Lago, E. (2021). Extracts and fractions of *Croton* L. (Euphorbiaceae) species with antimicrobial activity and antioxidant potential. *LWT*. <https://doi.org/10.5555/20210093957>

- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1038/SREP42717>;TECHMETA=139,141;SUBJMETA=114,154,2248,2419,309,630,631;KWRD=CHEMINFORMATICS,LEAD+OPTIMIZATION,VIRTUAL+DRUG+SCREENING
- Delgado, A., Minguillón, C., & Joglar, J. (2000). *Introducción a la química terapéutica*. 536.
<https://books.google.es/books?id=4LwpfcjAhoMC&lpg=PA439&ots=dv06pbOG6Z&dq=modificaciones%0Amoleculares%0Aen%0Alas%0Acefalosporinas&hl=es&pg=PA439#v=onepage&q=modificaciones%0Acefalosporinas&f=false>
- Díaz, C., Bolívar, A., Mercanoglu, B., Kanca, N., & Pérez, F. (2024). Exploring the antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in food environments – a review. *Critical Reviews In Microbiology*, 1–24.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2024.2412007>
- Doogue, M. P., & Polasek, T. M. (2013). The ABCD of clinical pharmacokinetics. In *Therapeutic Advances in Drug Safety* (Vol. 4, Issue 1, pp. 5–7).
<https://doi.org/10.1177/2042098612469335>
- Druzhilovskiy, D., Rudik, A., Filimonov, D., Glorizova, T., Lagunin, A., Dmitriev, A., Pogodin, P., Dubovskaya, V., Ivanov, S., Tarasova, O., Bezhentsev, V., Murtazalieva, K., Semin, M., Maiorov, I., Gaur, A., Sastry, G., & Poroikov, V. (2017). Computational platform Way2Drug: from the prediction of biological activity to drug repurposing. *Russian Chemical Bulletin*, 66(10), 1832–1841.
<https://doi.org/10.1007/S11172-017-1954-X>
- Ehuwa, O., Jaiswal, A. K., & Jaiswal, S. (2021). Salmonella, Food Safety and Food Handling Practices. *Foods 2021, Vol. 10, Page 907*, 10(5), 907.
<https://doi.org/10.3390/FOODS10050907>
- Eksi, G., & Kurbanoglu, S. (2020). Analysis of diterpenes and diterpenoids. *Elsevier*, 313–345. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816455-6.00009-3>
- Elshobary, M., Badawy, N., Ashraf, Y., Zatioun, A. A., Masriya, H., Ammar, M., Mohamed, N., Mourad, S., & Assy, A. (2025). Combating antibiotic resistance:

- Mechanisms, multidrug-resistant pathogens, and novel therapeutic approaches: An updated review. *Pharmaceuticals*, 18, 402.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ph18030402>
- Figueroa, S. (2024). *Estudio in silico del potencial inhibitorio de los metabolitos secundarios de cinco especies vegetales sobre la enzima 6qcn asociada al envejecimiento y metabolismo*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
<https://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/22779>
- Fourches, D., Muratov, E., & Tropsha, A. (2010). Trust, but verify: On the importance of chemical structure curation in cheminformatics and QSAR modeling research. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 50, Issue 7, pp. 1189–1204). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/ci100176x>
- Fu, L., Shi, S., Yi, J., Wang, N., He, Y., Wu, Z., Peng, J., Deng, Y., Wang, W., Wu, C., Lyu, A., Zeng, X., Zhao, W., Hou, T., & Cao, D. (2024). ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W422. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAE236>
- Fuzi, M., Szabo, D., & Cserecsik, R. (2017). Double-serine fluoroquinolone resistance mutations advance major international clones and lineages of various multi-drug resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV), 2261.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.02261/FULL>
- Guerrero, I., González, J., Ayala, J., González, G., Ledesma, A., López, M., Morales, G., & Quihui, L. (2024). Reviewing the Potential of Natural Antimicrobials for Salmonella spp. Gastrointestinal Infections: In Vitro and In Vivo Evaluations. *SpringerI Guerrero-Encinas, JN González-González, JF Ayala-Zavala, GA González-AguilarRevista Brasileira de Farmacognosia*, 2024•Springer, 34(2), 236–249.
<https://doi.org/10.1007/S43450-023-00481-9>
- Jama, A., Mączyńska, B., Frej, M., Choroszy, I., Dudek, R., Piątek, D., Kujawa, K., & Sarowska, J. (2025). The Changes in the Antibiotic Resistance of Staphylococcus aureus, Streptococcus pneumoniae, Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in the. *Journal Of Clinical Medicine*, 14(2).
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/jcm14020332>

- Jia, K., Qin, X., Bu, X., Zhu, H., Liu, Y., Wang, X., Li, Z., & Dong, Q. (2023). Prevalence, antibiotic resistance and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat fruits and vegetables in Shanghai, China. *Elsevier Current Research in Food Science*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.crfs.2023.100669>
- Jiménez, G., Ducoing, H., & Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355–363. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf>
- Kabera, J., Semana, E., & Mussa, A. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. 7, 2, 377–392. <http://www.cqvip.com/QK/72164X/201407/666970616.html>
- La Rosa, R., Molin, S., & Johansen, H. (2025). *Pseudomonas aeruginosa*: persistence beyond antibiotic resistance. *Trends In Microbiology*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tim.2025.05.004>
- Lio, H., Matsumoto, Y., Shimokata, K., Shibata, K., & Tokoroyama, T. (1989). Cascarillone: Revised Structure and Total Synthesis. In *J. CHEM. SOC. PERKIN TRANS. I*.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development q settings. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 46). www.elsevier.com/locate/drugdeliv
- Liu, K., Wang, C., Zhou, X., Guo, X., Yang, Y., Liu, W., Zhao, R., & Song, H. (2024). Bacteriophage therapy for drug-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2024.1336821/FULL>
- Mafu, S., & Zerbe, P. (2017). Plant diterpenoid metabolism for manufacturing the biopharmaceuticals of tomorrow: prospects and challenges. *Phytochemistry Reviews*, 17(1), 113–130. <https://doi.org/10.1007/S11101-017-9513-5>
- Mai, A., Clauson, M., Hong, J., & Murphy, A. (2016). Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 38610-. <https://doi.org/10.1038/srep38610>

- Manyi, C., & Lues, R. (2025). *Listeria monocytogenes* and Listeriosis: The Global Enigma. *Foods*, 14(7). <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/foods14071266>
- Matara, D., Nguta, J., Musila, F., & Mapenay, I. (2021). Phytochemical Analysis and Investigation of the Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Croton dichogamus* Pax Crude Root Extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 9(1), 2699269. <https://doi.org/10.1155/2021/2699269>
- Mohany, M., Aslam, J., Ali, M. A., Khattak, B., Fozia, F., Ahmad, I., Khan, M. D., Al-Rejaie, S., Ziaullah, Z., & Milošević, M. (2025). Wastewater microbiology: occurrence and prevalence of antibiotic-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in the district wastewater system. *Journal of Water and Health*, 23(1), 26–42. <https://doi.org/10.2166/WH.2024.268>
- Naas, T., Dortet, L., & Iorga, B. I. (2016). Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Current Drug Targets*, 17, 1006–1028. <http://www.blddb.eu/BLDB.php?class=A>.
- Nandhini, P., Mahapatra, A., Das, A., Agarwal, S., Mickymaray, S., Alothaim, A., & Rajan, M. (2023). In-Silico molecular screening of natural compounds as a potential therapeutic inhibitor for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* inhibition. *Chemico-Biological Interactions*, 374. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110383>
- Nasrollahian, S., Graham, J., & Halaji, M. (2024). A review of the mechanisms that confer antibiotic resistance in pathotypes of *E. coli*. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2024.1387497/FULL>
- Oliver, A., Arca-Suárez, J., Gomis-Font, M. A., González-Pinto, L., & López-Causapé, C. (2025). Emerging resistance mechanisms to newer β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Microbiology And Infection*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cmi.2025.03.013>
- Pagadala, N. S., Syed, K., & Tuszyński, J. (2017). Software for molecular docking: a review. In *Biophysical Reviews* (Vol. 9, Issue 2, pp. 91–102). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0247-1>

- Palmeira Júnior, S. F., Conserva, L. M., Maria, J., & Filho, B. (2006). Clerodane Diterpenes from Croton Species: Distribution and a Compilation of their ¹³C NMR Spectral Data. In *NPC Natural Product Communications* (Vol. 1, Issue 4).
- Peruzy, M., Murru, N., Carullo, M., La Tela, I., Rippa, A., Balestrieri, A., & Proroga, Y. (2025). Antibiotic-Resistant Salmonella Circulation in the Human Population in Campania Region (2010–2023). *Antibiotics*, 14.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics14020189>
- Plain, C., Pérez, A., & Rivero, Y. (2019). La Medicina Natural y Tradicional como tratamiento alternativo de múltiples enfermedades. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 35. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=94434>
- Punchihewage, A., Ranaweera, P., & Parveen, S. (2024). Defense mechanisms of Salmonella against antibiotics: a review. *Frontiers in Antibiotics*, 3.
<https://doi.org/10.3389/FRABI.2024.1448796/FULL>
- Ramirez, L., & Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*, 15(42), 263–268. <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
- Ruiz, B. (2020). ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR. *Universidad Simon Bolivar*.
<https://bonga.unisimon.edu.co/server/api/core/bitstreams/6251b15c-c5aa-4609-8a24-89f75490c583/content>
- Safdar, M., Kausar, T., Jabbar, S., Mumtaz, A., Ahad, K., & Saddozai, A. (2016). Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (Citrus reticulata L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal Of Food And Drug Analysis*, 25(3), 488–500. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>
- Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. In *Healthcare (Switzerland)* (Vol. 11, Issue 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI).
<https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>

- Salas, V. (2023). *Difracción de rayos-X*.
<https://riunet.upv.es/entities/publication/27e69d76-49e0-449a-b55c-0dd258728157>
- Salatino, A., Salatino, M., & Negri, G. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18(1), 11–33. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>
- Sánchez, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria*, 23(2).
<https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10>
- Sánchez, M. , Méndez, J., Galván, F., & Padrón, M. (2005). Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas. *Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (ULPGC)*. <https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/436/1/494.pdf>
- Silva, A., Silva, V., Gomes, J., Coelho, A., Batista, R., Saraiva, C., Esteves, A., Martins, Â., Contente, D., Diaz-Formoso, L., Cintas, L., Igrejas, G., Borges, V., & Poeta, P. (2024). *Listeria monocytogenes* from Food Products and Food Associated Environments: Antimicrobial Resistance, Genetic Clustering and Biofilm Insights. *Antibiotics*, 13. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/antibiotics13050447>
- Sixto, Y., Mendoza, H., Landeros, B., Camacho, A., & Correa, J. (2025). Molecular dynamics, docking and quantum calculations reveal conformational changes influenced by CYP271A amino acid mutations related to cerebrotendinous xanthomatosis. *Scientific Reports 2025 15:1*, 15(1), 10229-.
<https://doi.org/10.1038/s41598-025-93966-7>
- Speziale, P., Foster, T. J., & Arciola, C. R. (2025). The endothelium at the interface between tissues and *Staphylococcus aureus* in the bloodstream. *Clinical Microbiology Reviews*, 38(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00098-24>
- Steinmann, V. (2002). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botanica Mexicana*, 61, 61–93.
<https://doi.org/https://doi.org/10.21829/abm61.2002.909>
- Tetko, I. V, Sushko, I., Pandey, A. K., Zhu, H., Tropsha, A., Papa, E., Öberg, T., Todeschini, R., Fourches, D., & Varnek, A. (2008). Critical assessment of QSAR models of environmental toxicity against *Tetrahymena pyriformis*: Focusing on

- applicability domain and overfitting by variable selection. *J. Chem Inf Model*.
<http://www.qspr.org>
- Tran, Q., Wong, W., & Chai, C. (2017). Labdane diterpenoids as potential anti-inflammatory agents. *Pharmacological Research*, 124, 43–63.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.019>
- Udrea, A. M., Puia, A., Shaposhnikov, S., & Avram, S. (2018). Computational approaches of new perspectives in the treatment of depression during pregnancy. *Farmacia*, 66(4), 680–687. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2018.4.18>
- Van, B., Riina, R., & Berry, P. (2011). A revised infrageneric classification and molecular phylogeny of New World Croton (Euphorbiaceae). *Taxon*, 60(3), 791–823.
<https://doi.org/10.1002/TAX.603013>
- Velázquez, R., González, S., Sánchez, I., Villagómez, J., & Acevedo, O. (2023). ADMET prediction, Docking, DM analysis and antibacterial screening of epoxy furan-clerodanes from Croton hypoleucus. *Journal of Molecular Structure*, 1277.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.134840>
- Wang, W., & Dong, L. (2022). Antimicrobial ent-abietane diterpenoids from the leaves of Croton cascarilloide. *Journal Of Asian Natural Products Research*, 25(1), 68–74.
<https://doi.org/10.1080/10286020.2022.2062329>
- Webster, G. (1994). Classification of the Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 81(1), 3. <https://doi.org/10.2307/2399908>
- WHO. (2024). *WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024*.
<https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/1a41ef7e-dd24-4ce6-a9a6-1573562e7f37/content>
- Xu, W., Liu, W., & Liang, Q. (2018). Chemical constituents from Croton species and their biological activities. *Molecules*, 23(9). <https://doi.org/10.5555/20183350900>
- Yang, H., Lou, C., Sun, L., Li, J., Cai, Y., Wang, Z., Li, W., Liu, G., & Tang, Y. (2019a). AdmetSAR 2.0: web-service for prediction and optimization of chemical ADMET properties. *Bioinformatics*, 35(6). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty707>
- Yang, H., Lou, C., Sun, L., Li, J., Cai, Y., Wang, Z., Li, W., Liu, G., & Tang, Y. (2019b). AdmetSAR 2.0: Web-service for prediction and optimization of chemical ADMET

- properties. *Bioinformatics*, 35(6), 1067–1069.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty707>
- Yu, H., Han, X., & Quiñones, D. (2021). La humanidad enfrenta un desastre: la resistencia antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1729-519X2021000300020&script=sci_arttext&tlng=pt
- Zegarra, R. (2019). Las especies de la familia euphorbiaceae en la provincia de Tacna: estudio biosistemático. *CIENCIA & DESARROLLO*, 19, 44–48.
<https://doi.org/https://doi.org/10.33326/26176033.2015.19.480>
- Zhu, H., Tropsha, A., Fourches, D., Varnek, A., Papa, E., Gramatica, P., Öberg, T., Dao, P., Cherkasov, A., & Tetko, I. V. (2008). Combinatorial QSAR Modeling of Chemical Toxicants Tested against *Tetrahymena pyriformis*. *J Chem Inf Mode*.