



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍAS
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

T E S I S

**“Evaluación *in silico* e *in vitro* de la actividad
antibacteriana de metabolitos secundarios y
subfracciones del extracto metanólico de la raíz de
Croton morifolius”**

Para obtener el título de

Licenciada en Biología

PRESENTA:

Lucero Meneses Cruz

DIRECTOR:

Dr. René Velázquez Jiménez

Pachuca de Soto, Hgo., México, junio 2026



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Dirección

Office of the Director

Mineral de la Reforma, Hgo., a 8 de junio de 2026

Número de control: ICBI-D/1020/2026

Asunto: Autorización de impresión.

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

Con Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio, le comunico que el Jurado asignado a la egresada de la Licenciatura en Biología **Lucero Meneses Cruz**, quien presenta el trabajo de titulación "**Evaluación *in silico* e *in vitro* de la actividad antibacteriana de metabolitos secundarios y subfracciones del extracto metanólico de la raíz de *Croton morifolius***", ha decidido, después de revisar fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; dicho trabajo en la reunión de sinodales, **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

Presidente: Dra. Liliana Mireya Aguilar Castro

Secretario: Dra. Claudia Coronel Olivares

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"

Dr. Gabriel Vergara Rodríguez
Director del ICBI



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

GVR/MMM
"Amor, Orden y Progreso"



uaeh.edu.mx

Dedicatorias

A Dios, quien ha estado presente en cada etapa de mi vida, iluminando mi camino, sosteniendo mi propósito y acompañándome en cada desafío y logro; quien me ha dado la fortaleza y sabiduría necesaria para culminar esta etapa académica y quien no deja de sorprenderme con la complejidad, armonía y belleza de la naturaleza que, desde mi fe, refleja la perfección y grandeza de su obra. Gracias por obsequiarme una segunda oportunidad de vivir y por tu infinito amor.

A mi mamá, Benita, por su amor sincero, incondicional y desinteresado, que lejos de ser silencioso, siempre se ha manifestado en acciones, sacrificio y apoyo constante. Gracias por tu valentía, presente en mis momentos más difíciles, por no rendirte cuando la vida exigía más de lo posible y quedarte a mi lado, cuidándome, aún cuando tu cuerpo también cargaba dolor y tu mente agotamiento.

A mis hermanos, Eric, Daniel y César, a quienes quiero con todo mi corazón y de quienes también me siento orgullosa. Gracias por su cariño constante, por sus buenos deseos y por el apoyo incondicional que siempre me han brindado.

Agradecimientos

Quiero comenzar expresando mi sincera gratitud a mi director de tesis, el Dr. René Velázquez Jiménez por haberme aceptado como su asesorada, por su constante disposición para brindarme apoyo, compartir sus conocimientos y atender mis dudas. Su experiencia, compromiso y calidad humana no sólo contribuyeron a la culminación de este trabajo, sino también a mi crecimiento profesional y personal, por lo que difícilmente podría haber encontrado un mejor mentor para acompañarme durante este proceso académico.

A la Dra. Claudia Coronel Olivares, por haberme aceptado en su laboratorio, por su constante amabilidad, por su apoyo, sus consejos valiosos y siempre mostrarse entusiasta a pesar de las dificultades.

A la Dra. Gabriela Marisol Vázquez Cuevas y a la Dra. Liliana Mireya Aguilar Castro por haber aceptado formar parte del comité evaluador y darse el tiempo de revisar esta tesis.

A la Ing. María Marivel Solís Barrera, directora del Parque Científico y Tecnológico de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por permitirme hacer uso de sus instalaciones, equipos y recursos durante el desarrollo de la parte experimental de esta investigación. Asimismo, agradezco la cordialidad con la que siempre fui recibida.

ÍNDICE

Resumen

1. Introducción.....	1
1.1 Importancia de los productos naturales en la medicina	1
1.2 Metabolismo primario y secundario en plantas	3
1.2.1 Principales compuestos químicos aislados del género <i>Croton</i>	4
1.3 Metabolitos secundarios: Terpenos	6
1.3.1 Diterpenos	9
1.3.1.1 Diterpenos del tipo clerodano.....	12
1.3.1.2 Diterpenos del tipo clerodano aislados de <i>Croton</i> y su actividad biológica.....	13
1.3.2 Diterpenos del tipo tigliano aislados de <i>Croton</i> y su actividad biológica	15
1.3.3 Diterpenos del tipo seco y furano clerodano aislados de <i>Croton</i> y su actividad biológica	16
1.4 Productos naturales y su configuración relativa y absoluta.....	17
1.4.1 Definición e importancia de la configuración relativa.....	17
1.4.2 Definición e importancia de la configuración absoluta	18
1.4.2.1 Difracción de rayos-X	19
2. Antecedentes	21
2.1 La familia Euphorbiaceae.....	21
2.1.1 Importancia biológica de especies de la familia Euphorbiaceae	23
2.1.2 La familia Euphorbiaceae en México	24
2.2 Género <i>Croton</i>	24
2.2.1 Descripción botánica del género <i>Croton</i>	26
2.2.2 Propiedades bioactivas de especies del género <i>Croton</i>	26
2.3 Generalidades de <i>Croton morifolius</i>.....	27
2.3.1 Descripción botánica de <i>Croton morifolius</i>	27
2.4 Estudios <i>in silico</i>	30
2.4.1 Propiedades fisicoquímicas y perfil ADME de las moléculas.....	30
2.4.2 Acoplamiento molecular.....	32
2.5 Estudios <i>in vitro</i>.....	33
2.5.1 Generalidades de los estudios <i>in vitro</i> empleados para evaluar la actividad antibacteriana de extractos vegetales	34
2.5.1.1 Métodos de difusión	34
2.5.1.2 Métodos de dilución	36
2.6 Impacto mundial de la resistencia a los antibióticos	36
2.7 Infecciones asociadas a la atención sanitaria	38

2.8	Reservorios y transmisión de bacterias causantes de IAAS	38
2.8.1	De la flora permanente o transitoria del paciente (infección endógena)	38
2.8.2	De la flora de otro paciente o miembro del personal y del ambiente (infección exógena)	41
2.9	Patógenos ESKAPE.....	42
2.10	Patógenos multirresistentes en la comunidad.....	43
2.11	Factores asociados con el origen y diseminación de la resistencia a los antibióticos.....	44
2.11.1	Uso desmedido y poco regulado de los antibióticos en la medicina humana.....	44
2.11.2	Uso desmedido y poco regulado de los antibióticos en la ganadería, avicultura y agricultura	45
2.12	Resistencia a los antibióticos en el ambiente.....	46
2.12.1	Resistencia a los antibióticos en el agua.....	46
2.12.2	Resistencia a los antibióticos en el suelo	47
2.12.3	Resistencia a los antibióticos en el aire	49
2.13	Vías de adquisición de genes resistentes a los antibióticos	49
2.14	Definición de antibiótico	50
2.15	Clasificación de antibióticos según su origen.....	51
2.16	Clasificación de antibióticos según su espectro de acción.....	51
2.17	Blanco de acción de los antibióticos	52
2.17.1	Inhibidores de la formación de la pared celular bacteriana	52
2.17.1.1	Fosfomicina.....	53
2.17.1.2	Cicloserina	54
2.17.1.3	Polipéptidos (bacitracina, polimixinas).....	55
2.17.1.4	Glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina).....	56
2.17.1.5	Betalactámicos (penicilina, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos)	57
2.17.2	Inhibidores de la biosíntesis proteica.....	57
2.17.2.1	Aminociclitolos (espectinomicina)	60
2.17.2.2	Aminoglucósidos (estreptomina, gentamicina, kanamicina, tobramicina, neomicina)	60
2.17.2.3	Tetraciclinas	60
2.17.2.4	Cloranfenicol.....	61
2.17.2.5	Lincosamidas (clindamicina, lincomicina)	61
2.17.2.6	Macrólidos (eritromicina)	62
2.17.3	Inhibidores de la replicación del DNA	63
2.17.3.1	Quinolonas (ácido nalidíxico, fluoroquinolonas).....	64
2.17.4	Inhibidores de la transcripción del DNA	64
2.17.4.1	Rifamicinas	65

2.17.5	Inhibidores de la síntesis del ácido fólico	65
2.17.5.1	Sulfonamidas y trimetoprima	65
2.17.6	Inhibidores de la membrana externa y citoplasmática	66
2.17.6.1	Polipéptidos (polimixina B y colistina)	66
2.18	Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos (generalidades)	67
2.18.1	Cambios en la permeabilidad y/o transporte celular	67
2.18.2	Formación de biopelículas	69
2.18.3	Modificación e inactivación del antibiótico	70
2.18.4	Modificación del sitio de unión o blanco terapéutico donde el antibiótico ejerce su mecanismo de acción	72
2.19	Bacterias (generalidades)	73
2.19.1	<i>Escherichia coli</i>	73
2.19.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	75
2.19.3	<i>Bacillus subtilis</i>	76
3.	Justificación	78
4.	Objetivos	79
4.1	Objetivo general	79
4.2	Objetivos específicos	79
5.	Materiales y métodos	80
5.1	Material vegetal	81
5.2	Preparación del extracto metanólico	82
5.3	Materiales para cromatografía en columna	82
5.4	Materiales para cromatografía en capa fina	82
5.5	Equipos y materiales para los métodos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X	83
5.6	Métodos computacionales (<i>in silico</i>)	83
5.6.1	Programas utilizados para predicciones <i>in silico</i>	84
5.6.2	Docking molecular con proteínas diana relacionadas con la supervivencia y virulencia bacteriana	85
5.6.3	Redocking/RMSD	87
5.7	Ensayos biológicos	87
5.7.1	Ajuste de bacterias al 0.5 de McFarland	87
5.7.2	Preparación de las fracciones del extracto metanólico de la raíz de <i>C. morifolius</i> en sus diferentes concentraciones	88
5.7.3	Método de difusión en agar	90
5.7.4	Método de dilución en caldo	93
6.	Resultados y discusión	96
6.1	Separación cromatográfica del extracto de la raíz de <i>C. morifolius</i>	96

6.2	Análisis estructural de los clerodanos aislados del extracto metanólico de la raíz de <i>C. morifolius</i>	97
6.3	Predicción de propiedades fisicoquímicas.....	101
6.4	Predicciones ADMET	104
6.5	Predicciones del espectro de actividad biológica	109
6.6	Docking molecular de los compuestos 29-32	112
6.6.1	Proteína diana en <i>Staphylococcus aureus</i> : DNA girasa (PDB ID: 3U2D)	112
6.6.2	Proteína diana en <i>Escherichia coli</i> : FimH (PDB ID: 1TR7)	114
6.6.3	Proteína diana en <i>Bacillus subtilis</i> : TagU (PDB ID: 6UF6)	117
6.7	Redocking/RMSD	121
6.8	Evaluación de la actividad antibacteriana	123
6.8.1	Resultados del método de difusión en agar por disco.....	123
6.8.2	Resultados del método de difusión en agar por pozo	125
6.8.3	Resultados del método de difusión en agar por gota	128
6.8.4	Resultados del método de dilución en caldo.....	134
7.	Conclusiones	135
8.	Referencias.....	137

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ARGs	Genes de Resistencia a Antibióticos
Å ²	angstroms cuadrados
b	Señal ancha
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
°C	Grados Celsius
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
d	Señal doble
dd	Señal doble de doble
DMSO	Dimetilsulfóxido
EGM	Elementos Genéticos Móviles
HMBC	Correlación de enlace múltiple heteronuclear
HSQC	Correlación cuántica simple heteronuclear
Hz	Hertz
HBD	Donadores de puentes de hidrógeno
HBA	Aceptores de puentes de hidrógeno
IAAS	Infecciones Asociadas a la Atención Sanitaria
ITU	Infección del Tracto Urinario
J	Constante de acoplamiento
LogP	Logaritmo del coeficiente de partición
MRGs	Genes de Resistencia a Metales Pesados
m	Señal múltiple
MeOH	Metanol
mL	Mililitro

mM	Milimolar
mm	Milímetro
nm	Nanómetros
nM	Nanomolar
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece
RMSD	Desviación cuadrática media
s	Señal simple
t	Señal triple
THG	Transferencia Horizontal de Genes
TPSA	Superficie polar topológica
TSA	Agar de Soya Trypticaseína
TSB	Caldo de Soya Trypticaseína
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
µg	Microgramos
µm	Micrómetro (micra)
uM	Micromolar
µL	Microlitro
δ	Desplazamiento químico

FIGURAS

Figura 1. Principales compuestos aislados del género *Croton* en porcentaje.

Figura 2. Tipos de diterpenos aislados del género *Croton* en porcentaje.

Figura 3. Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen.

Figura 4. Tipos estructurales de clerodanos aislados del género *Croton*.

Figura 5. Estructuras del tipo clerodano aisladas de especies de *Croton*.

Figura 6. Estructuras del tipo tigliano aisladas de especies de *Croton*.

Figura 7. Estructuras del tipo seco y furano clerodano aislados de *Croton*.

Figura 8. Enantiómeros de un aminoácido y su configuración absoluta R/S.

Figura 9. Reflexión de radiación por dos planos del cristal que están a una distancia d .

Figura 10. Componentes del difractómetro de rayos-X.

Figura 11. Mapa de distribución a nivel mundial del género *Croton*.

Figura 12. Frutos de *Croton morifolius*.

Figura 13. Semillas de *Croton morifolius*.

Figura 14. Raíz de *Croton morifolius* con presencia de látex rojo (sangre de grado).

Figura 15. (a) Diluciones a partir de la solución madre (35 mg/mL) de las fracciones II, III y IV frente a *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*, (b) diluciones a partir de la solución madre (20 mg/mL) de la fracción I frente a *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*, (c) diluciones a partir de la solución madre (80 mg/mL) de las fracciones I, II, III y IV frente a *S. aureus*.

Figura 16. Método de difusión por gota de las fracciones I, II, III y IV en sus diferentes concentraciones a 80, 60 y 40 mg/mL frente a *S. aureus*. El signo positivo (+) representa al antibiótico estreptomycinina y el signo negativo (-) al DMSO.

Figura 17. Método de difusión por gota de la fracción I a 20, 10 y 5 mg/mL, fracciones II, III y IV en sus diferentes concentraciones a 35, 20 y 10 mg/mL frente a *E. coli*. El signo positivo (+) representa al antibiótico estreptomycinina y el signo negativo (-) al DMSO.

Figura 18. Método de difusión por gota de la fracción I a 20, 10 y 5 mg/mL, fracciones II, III y IV en sus diferentes concentraciones a 35, 20 y 10 mg/mL frente a *B. subtilis*. El signo positivo (+) representa al antibiótico estreptomycinina y el signo negativo (-) al DMSO.

Figura 19. Método de dilución en caldo de las fracciones I, II, III y IV en sus diferentes concentraciones frente a *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*. Los signos positivos (+) representan al antibiótico estreptomicina y los signos negativos (-) al DMSO.

Figura 20. Estructuras químicas de los compuestos aislados de la raíz de *C. morifolius*.

Figura 21. Espectros de RMN-¹H de las morifolinas C (1), B (2) y A (3) a 400 MHz en CDCl₃.

Figura 22. Espectros de RMN-¹H del ácido acetil aleuritólico (30) a 400 MHz en CDCl₃.

Figura 23. Espectros de RMN-¹³C del ácido acetil aleuritólico (30) a 100 MHz en CDCl₃.

Figura 24. Radares de biodisponibilidad de los compuestos aislados de los compuestos (29, 30, 31 y 32) aislados de *C. morifolius* y del antibiótico estreptomicina (33).

Figura 25. Mapa de calor de la predicción de las posibles actividades biológicas de los compuestos (29, 30, 31 y 32) aislados de la raíz de *C. morifolius* y del antibiótico estreptomicina (33).

Figura 26. Estructura cristalizada de la proteína DNA girasa (PDB ID: 3U2D).

Figura 27. (a) Interacción ligando-receptor (3D) del compuesto 32 con la proteína 3U2D, (b) interacciones (2D) del compuesto 32 con la proteína 3U2D.

Figura 28. Estructura cristalizada de la proteína FimH (PDB ID: 1TR7).

Figura 29. (a) Interacción ligando-receptor (3D) del compuesto 32 con la proteína 1TR7, (b) interacciones (2D) del compuesto 32 con la proteína 1TR7.

Figura 30. Estructura cristalizada de la proteína TagU (PDB ID: 6UF6).

Figura 31. (a) Interacción ligando-receptor (3D) del compuesto 30 con la proteína 6UF6, (b) interacciones (2D) del compuesto 30 con la proteína 6UF6.

Figura 32. (a) Interacción ligando-receptor (3D) del compuesto 32 con la proteína 6UF6, (b) interacciones (2D) del compuesto 32 con la proteína 6UF6.

Figura 33. Superposición del ligando co-cristalizado (color morado) y la pose predicha (color anaranjado) que muestran una favorable concordancia con un RMSD de 0.263 Å para 3U2D.

Figura 34. Superposición del ligando co-cristalizado (color morado) y la pose predicha (color anaranjado) que muestran una favorable concordancia con un RMSD de 0.192 Å para 1TR7.

Figura 35. Superposición del ligando co-cristalizado (color morado) y la pose predicha (color anaranjado) que muestran una favorable concordancia con un RMSD de 1.515 Å para 6UF6.

TABLAS

Tabla 1. Terpenos y su actividad biológica.

Tabla 2. Clasificación de los diterpenos.

Tabla 3. Plataformas y programas utilizados para las pruebas *in silico* de los compuestos 29, 30, 31, 32 y del antibiótico estreptomicina.

Tabla 4. ID de los blancos terapéuticos utilizados y su función en la supervivencia y virulencia bacteriana, obtenidos de la base de datos PDB.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos aislados de *C. morifolius* y del antibiótico estreptomicina.

Tabla 6. Perfil ADME de los compuestos aislados de la raíz de *C. morifolius* (29, 30, 31 y 32) y del antibiótico estreptomicina (33).

Tabla 7. Propiedades toxicológicas de los compuestos aislados de la raíz de *C. morifolius* (29, 30, 31 y 32) y del antibiótico estreptomicina (33).

Tabla 8. Energías de unión, eficiencia y constantes de inhibición de los compuestos 29, 30, 31, 32 y del antibiótico estreptomicina dentro de la proteína DNA girasa de *S. aureus*.

Tabla 9. Energías de unión, eficiencia y constantes de inhibición de los compuestos 29, 30, 31, 32 y del antibiótico estreptomicina dentro de la proteína FimH de *E.coli*.

Tabla 10. Energías de unión, eficiencia y constantes de inhibición de los compuestos 29, 30, 31, 32 y del antibiótico estreptomicina dentro de la proteína TagU de *B. subtilis*.

Tabla 11. RMSD de los ligandos co-cristalizados de las proteínas DNA girasa, FimH y TagU.

Tabla 12. Actividad antibacteriana de los **compuestos puros** (29-32) de la raíz de *C. morifolius* frente a *E. coli*.

Tabla 13. Actividad antibacteriana de los **compuestos puros** (29-32) de la raíz de *C. morifolius* frente a *S. aureus*.

Tabla 14. Actividad antibacteriana del **compuesto 29** (morifolina A) de la raíz de *C. morifolius* frente a *E. coli*.

Tabla 15. Actividad antibacteriana del **compuesto 29** (morifolina A) de la raíz de *C. morifolius* frente a *S. aureus*.

Tabla 16. Actividad antibacteriana de las **fracciones/compuestos** de la raíz de *C. morifolius* frente a *E. coli* y *B. subtilis* expresada como diámetro del halo de inhibición (mm).

Tabla 17. Actividad antibacteriana de las **fracciones/compuestos** de la raíz de *C. morifolius* frente a *S. aureus* expresada como diámetros del halo de inhibición (mm).

Tabla 18. Actividad antibacteriana de las **fracciones/compuestos** de la raíz de *C. morifolius* frente a *Escherichia coli*.

Tabla 19. Actividad antibacteriana de las **fracciones/compuestos** de la raíz de *C. morifolius* frente a *Bacillus subtilis*.

Tabla 20. Actividad antibacteriana de las **fracciones/compuestos** de la raíz de *C. morifolius* frente a *Staphylococcus aureus*.

ESQUEMAS

Esquema 1. Metodología general del proyecto.

Esquema 2. Metodología de estudios *in silico*.

RESUMEN

Los metabolitos secundarios que predominan en el género *Croton* son los diterpenos de tipo clerodano, a los cuales se les han atribuido diversas actividades biológicas, entre ellas citotóxica, antiangiogénica y antibacteriana. *Croton morifolius* es un arbusto empleado en la medicina tradicional para el tratamiento de afecciones como gastritis y amigdalitis y padecimientos que pueden asociarse con diversos procesos infecciosos. En este trabajo se estudió las subfracciones enriquecidas y los clerodanos puros presentes en la raíz de *C. morifolius*, con el objetivo de identificar compuestos de interés químico y evaluar su potencial antibacteriano *in silico* e *in vitro*. El análisis fitoquímico, realizado mediante técnicas cromatográficas (CCF y CC) y espectroscópicas (RMN de ^1H y ^{13}C), permitió la identificación de diterpenos del tipo seco furano-clerodano reportados en esta especie, así como el triterpeno ácido acetil aleuritólico por primera vez en *C. morifolius*. Adicionalmente, se evaluaron las propiedades fisicoquímicas, toxicológicas, el perfil ADME y el espectro de actividad biológica de los compuestos. En las predicciones *in silico*, los compuestos **29**, **31** y **32** mostraron propiedades fisicoquímicas compatibles con un perfil farmacocinético favorable para administración oral, mientras que el compuesto **30** mostró alta lipofilia e insolubilidad para esta vía. En el perfil ADME, los cuatro compuestos presentaron características compatibles con la viabilidad farmacocinética, **29** mostró riesgo de hepatotoxicidad. Los estudios de acoplamiento molecular (Docking) predijeron que el compuesto **32** presenta la pose de unión más eficiente en el sitio activo de DNA girasa y FimH, además, este compuesto, al igual que el compuesto **30** exhibieron valores de energía libre de unión (ΔG) prometedores frente a TagU. Finalmente, en los ensayos *in vitro*, la actividad inhibitoria dependió del método empleado: en difusión en agar por disco y pozo no se observó inhibición por parte de los compuestos puros (**29-32**) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, en contraste, en difusión en agar por gota todas las subfracciones, en sus diferentes concentraciones, mostraron actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, por su parte, por macrodilución no se observó actividad. En general, las fracciones gruesas del extracto presentaron moderada actividad antibacteriana frente a *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis*; los compuestos **30** y **32** presentan potencial estructural y son candidatos a optimización química.

1. Introducción

1.1 Importancia de los productos naturales en la medicina

Desde su origen, el hombre ha mantenido una estrecha relación con la naturaleza donde encontró el alimento, los recursos para construir su hogar y confeccionar su vestimenta, además de ser fuente de vida para un sinfín de flora y fauna, también en ella halló la medicina para curar enfermedades y lesiones físicas (Maldonado, C. *et al.*, 2020).

Cuando el hombre a través de la observación e instinto de supervivencia utilizaba hojas, flores, frutos, semillas, corteza o raíces de alguna planta silvestre para procurar su salud, además de dar inicio a lo que se conoce como medicina tradicional, se empezó a establecer una relación empírica entre el tipo de planta y la actividad biológica atribuida a cada una (Morales, M. E. *et al.*, 2016). A partir de este conocimiento etnobotánico surge la farmacognosia, ciencia que investiga las sustancias de origen vegetal, incluyendo la identificación, aislamiento y caracterización de los compuestos químicos, así como su potencial aplicación en los campos de la terapéutica, la industria farmacéutica, de alimentos y cosmética, entre otras; sin perder de vista el legado histórico sobre el uso tradicional de las materias primas de origen natural en su contexto socio-cultural (Landa, J. *et al.*, 2020). Por otro lado, el estudio de los compuestos químicos sintetizados por el metabolismo secundario de las plantas también resulta de gran interés para la fitoquímica que estudia su estructura, biosíntesis, distribución natural y función biológica con un interés particular en su aplicación a las ciencias farmacéuticas, pero también en otros aspectos como la nutrición, ecología, biología vegetal, manejo y conservación del ambiente (Ringuelet, J. y Viña, S. 2013). Aunque ambas disciplinas tienen enfoques ligeramente diferentes, comparten el objetivo de mejorar la salud y el bienestar humano.

Se estima la existencia de 250,000 especies de plantas superiores donde solamente del 5% al 15% de estas especies han sido investigadas (Braz-Filho, 2010). En México, de las

30,000 especies de plantas registradas, se calcula que al menos el 50% se utiliza para satisfacer alguna necesidad humana y las plantas medicinales ocupan el principal porcentaje (Ghenó, N. *et al.*, 2011; Hernández, T. *et al.*, 2005). Así mismo, la validación química, farmacológica y biomédica sólo se ha llevado a cabo en 5% de estas especies (Huerta, C. 1997; Alonso, J. 2003), excluyendo una amplia variedad de plantas, las cuales poseen una abundante diversidad de compuestos químicos desconocidos hasta el momento, y que pueden constituir una valiosa fuente de materia prima para el desarrollo de nuevos fármacos.

Por otro lado, más del 25% de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años derivan directamente de las plantas, mientras que otro 25% son derivados de productos naturales, químicamente modificados (Amin, R. *et al.*, 2009). Es decir, las plantas pueden ser fuente de agentes terapéuticos directos o se pueden emplear como materia prima para la fabricación de compuestos semisintéticos más complejos o bien, las estructuras químicas derivadas de las sustancias vegetales pueden servir de modelos para nuevos productos sintéticos, tal es el caso de los nuevos fármacos de origen natural para el tratamiento del cáncer y dolencias infecciosas que destacan con el 60% y 75%, respectivamente (Newman, D. *et al.*, 2003). Aunado a esto, cerca del 25% de todas las prescripciones médicas en los Estados Unidos incluyen sustancias naturales como principio activo, obtenidas de plantas de regiones templadas y tropicales, y que corresponden al valor estimado de 900 millones de dólares en circulación comercial (Braz, R. 2010). No obstante, el impacto positivo de las plantas medicinales puede trascender el ámbito terapéutico y esto se evidencia en el país de Costa Rica que consciente de la importancia de las plantas, declaró el 25% de su territorio como reserva forestal, en virtud de un acuerdo firmado en 1991, por dos años (Gámez, R. *et al.*, 2024). Mismo acuerdo que consistió en que el instituto nacional de biodiversidad de este país suministrará plantas y otros materiales a una compañía farmacéutica quien evaluaría las posibilidades de aplicación farmacéutica y agrícola de las mismas. A cambio, la compañía farmacéutica hizo investigaciones, se encargó de los gastos iniciales y abandonó los derechos por la venta de productos que se elaboraron a partir del material suministrado. Además, una parte de los fondos para la investigación se destinó a la conservación de la biodiversidad biológica (Olayiwola, A. 1993).

Por lo anterior, el estudio de los principios bioactivos de las plantas tóxicas, medicinales y aún de las que hasta ahora no han sido utilizadas con fines terapéuticos es un hecho científico global que no solo trasciende en beneficio de la salud, sino también en el ámbito tecnológico, económico, social y como punto de partida en la protección de los ecosistemas de un país.

1.2 Metabolismo primario y secundario en plantas

El metabolismo primario es un conjunto de reacciones bioquímicas donde participan enzimas que degradan moléculas grandes en moléculas más simples (catabolismo), por ejemplo, para obtener energía o bien, en reacciones de síntesis en las que moléculas simples se unen para formar macromoléculas como proteínas, lípidos, DNA (anabolismo). Tales reacciones se llevan a cabo en rutas metabólicas específicas como la fotosíntesis, ciclo de Krebs, ciclo de las pentosas, glucólisis, o la vía del shikimato, entre otras (Ibáñez, N. 2014). Es por esta razón que el metabolismo primario resulta ser indispensable para el crecimiento, desarrollo y supervivencia de todos los seres vivos.

Las plantas, hongos y algunas bacterias, además del metabolismo primario, poseen el metabolismo secundario cuyos productos son los “metabolitos secundarios”, estos derivan de las rutas metabólicas primarias antes mencionadas pero no en el sentido estricto, sino que el metabolismo secundario usa productos del metabolismo primario o también llamados “precursores biosintéticos” (fenilalanina, Acetil-CoA, ácido shikímico) como materia prima para la síntesis de sus metabolitos secundarios. Los metabolitos secundarios no son esenciales para la vida de los organismos pero si les proporcionan ventajas adaptativas en cuanto a la interacción de estos con su entorno. Por ejemplo, si bien es cierto que las plantas pueden poseer estructuras de defensa como espinas, tricomas y pelos glandulares, también son capaces de sintetizar compuestos químicos que les proporcionan un sabor amargo, las hacen indigestas o venenosas y por ende, estas actúan como repelentes de patógenos que incluyen bacterias, virus, hongos y las protege de herbívoros (insectos y mamíferos) o nemátodos. Por otro lado, los

metabolitos secundarios proporcionan a las plantas una ventaja ante la competencia por el espacio de suelo, la luz, nutrientes u otro tipo de estrés abiótico. Muchos de los pigmentos y aromas que poseen las flores y frutos son resultado de la actividad de ciertos metabolitos secundarios, lo cual también representa una ventaja en el éxito reproductivo de las plantas cuando se trata de atraer insectos o animales polinizadores (García, A. y Carril, E. 2009). Es importante mencionar que estos metabolitos secundarios no están presentes en cualquier planta. Algunos sólo se encuentran en una especie, en un género o en una familia. Además, los metabolitos secundarios se caracterizan por su baja abundancia en la naturaleza (Lustre, H. 2022).

La diversidad estructural y funcional de los compuestos o metabolitos secundarios sintetizados por las plantas resulta de gran interés para investigadores de distintas ramas del conocimiento tales como la bioquímica, biotecnología y en mayor grado la industria farmacéutica donde además de otras aplicaciones terapéuticas, se ha visto que los metabolitos secundarios tienen el potencial de actuar contra bacterias Gram positivas y Gram negativas al alterar la estructura y función de la membrana celular e interferir en procesos moleculares indispensables para la supervivencia de estas (Kasote, D. *et al.*, 2015; Alvin, A. *et al.*, 2014; Chitemerere, T. y Mukanganyama, S. 2014).

1.2.1 Principales compuestos químicos aislados del género *Croton*

Entre los compuestos químicos característicos de *Croton* que se han aislado mediante el uso de técnicas convencionales de aislamiento, purificación y elucidación, encontramos compuestos del tipo terpeno, en especial monoterpenos y diterpenos de esqueleto tipo clerodano o tigliano (Barrera, C. *et al.*, 2016). Por otro lado, estudios de Wen-Hui *et al.* (2018), concluyeron que los diterpenos (339 diterpenoides) son los compuestos que predominan en el género *Croton*, seguidos de 24 compuestos diversos (que corresponde a flavonoides, lignanos), 21 glucósidos, 8 alcaloides y 7 sesquiterpenoides (**Figura 1**). Los diterpenos con esqueleto de clerodano, tigliano, kaurano, crotofolano y labdano se encuentran entre los diterpenos aislados más estudiados en especies de *Croton* (**Figura**

2). Artículos de Lopes, E. *et al.*, 2012; Min Wu *et al.*, 2022; Linphosan, C. *et al.*, 2023, también abordan lo previamente mencionado.

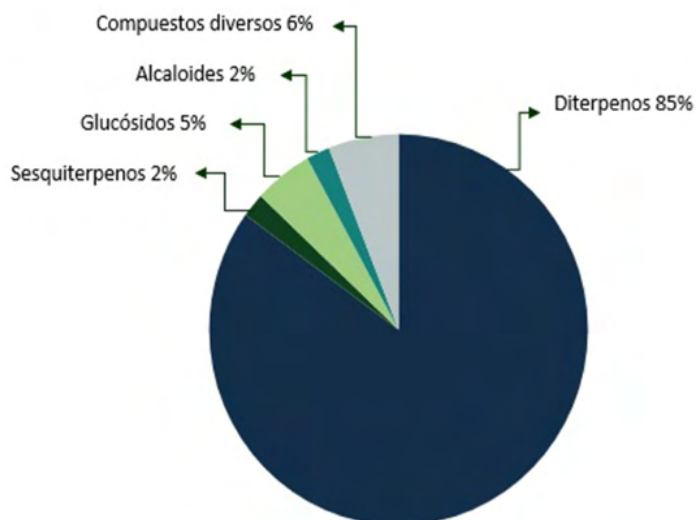


Figura 1. Principales compuestos aislados del género *Croton* en porcentaje. Tomado y modificado de Wen-Hui Xu *et al.*, 2018.

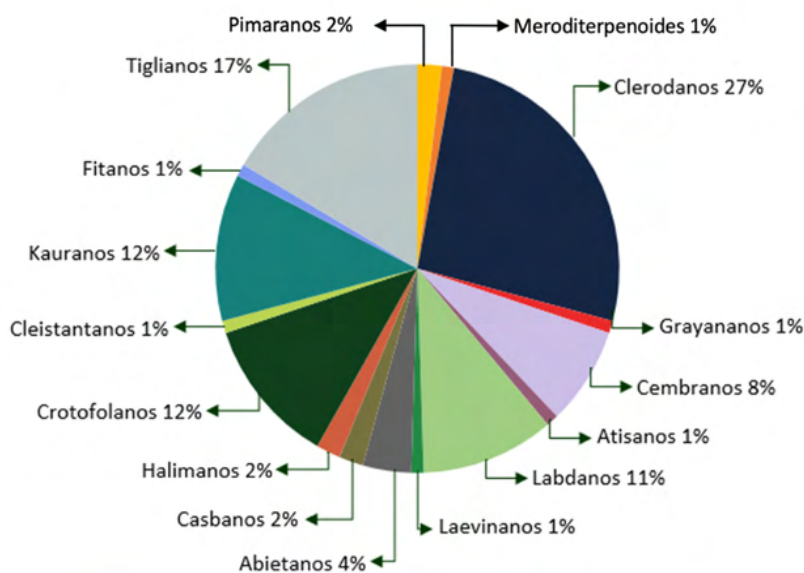


Figura 2. Tipos de diterpenos aislados del género *Croton* en porcentaje. Tomado y modificado de Wen-Hui Xu *et al.*, 2018.

1.3 Metabolitos secundarios: Terpenos

Los terpenos constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios con hasta 55,000 moléculas reportadas (Brahmkshatriya, P. y Brahmkshatriya, P. 2013); su estructura básica sigue un principio general que consiste en residuos de 2-metil-1,3-butadieno, conocidos como unidades de isopreno (C5), que son moléculas compuestas por 5 átomos de carbono; razón por la cual también son conocidos como “isoprenoides”. Se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que contienen en: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) y tetraterpenos (C40), politerpenos (más de 40 carbonos) (Ibáñez, N. 2014).

Los terpenos por lo general obedecen a la regla del isopreno, sin embargo, el descubrimiento de un gran número de compuestos con diversidad de grupos funcionales ha suscitado el uso del término “terpenoides” (Villamizar, V. *et al.*, 2010), pues además de poseer diferentes grupos funcionales, un terpenoide contiene átomos de oxígeno, mientras que un terpeno se refiere a un hidrocarburo con doble enlace entre algunos de sus átomos de carbono e hidrógeno.

En plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil difosfato (IPP) o su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP). Para su síntesis existen dos rutas diferentes que dependen del organismo y la estructura del producto final. En los animales y en las plantas superiores, los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos surgen principalmente a partir de la ruta del mevalonato, que se lleva a cabo en el citoplasma, mientras que los monoterpenos, diterpenoides y tetraterpenos se biosintetizan por la ruta del 5-fosfato desoxixilulosa (DXP) que se lleva a cabo en los plástidos (**Figura 3**) (Eisenreich, W. *et al.*, 2001). Cabe mencionar que la ruta DXP es el primer precursor de la ruta plasmídica del metileritritol 4-fosfato (MEP) de la síntesis de isoprenoides (Oya, V. 2009). En las bacterias se utilizan ambas rutas (McMurry, J. 2008).

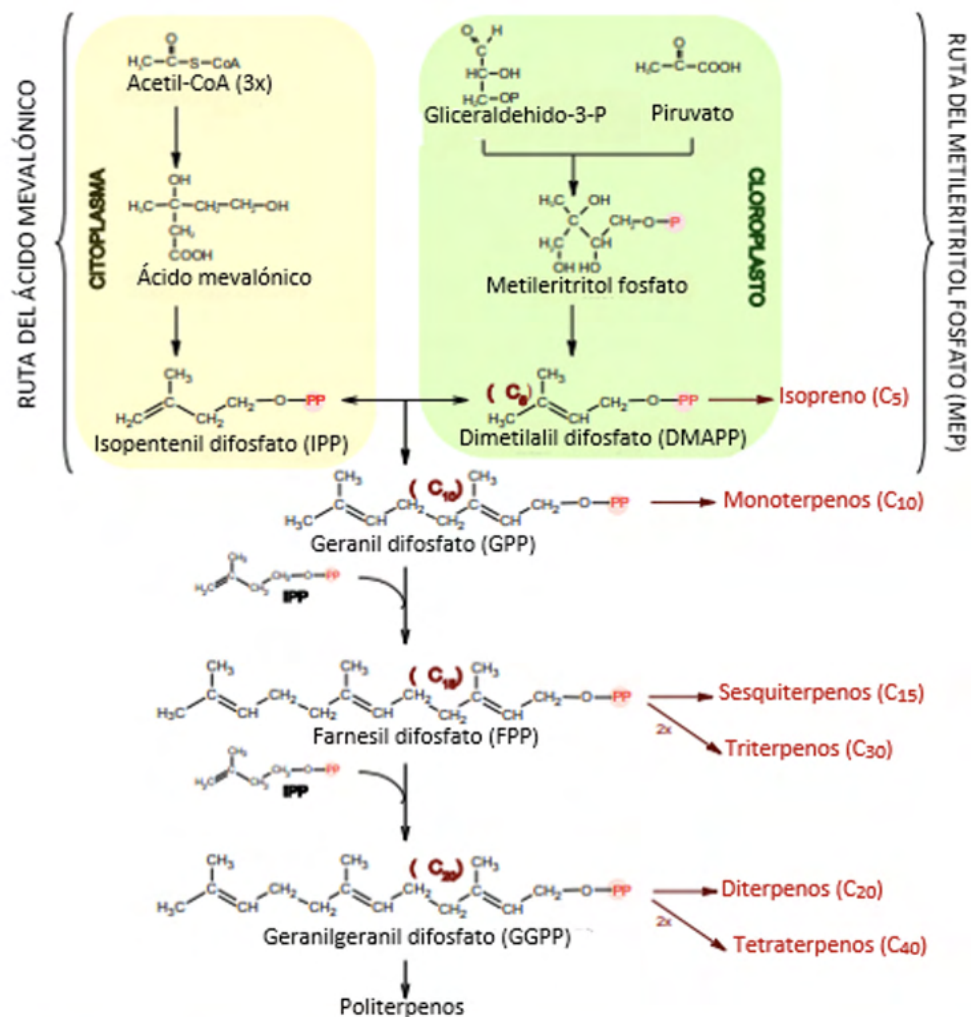


Figura 3. Síntesis de terpenos y su clasificación según las unidades de isopreno que contienen. Tomado y modificado de García, A. y Carril, E. (2009).

Los monoterpenoides y sesquiterpenoides se encuentran principalmente en plantas, bacterias y hongos, pero los terpenoides más grandes se encuentran solo en plantas (McMurry, J. 2008). Algunos ejemplos de la actividad biológica de los terpenos se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Terpenos y su actividad biológica.

Terpenos	Actividad biológica
Monoterpenos (C10)	El linalol (un terpeno con un grupo alcohol), componente de los aceites esenciales de la lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i>), es utilizado en técnicas de aromaterapia generando impactos en el estado de ánimo (Wendell, L. 2000; Poyton, C. <i>et al.</i> , 2015), además de darle el olor característico a esta planta permitiéndole atraer polinizadores.
	El limoneno y timol presentan actividad antiséptica (Gallegos, P. <i>et al.</i> , 2019; Guijarro, M. <i>et al.</i> , 2017), también actúan como defensa contra depredadores herbívoros.
Sesquiterpenos (C15)	(E)- β -cariofileno es producido por las raíces de maíz contra los ataques de herbívora de las larvas de <i>Diabrotica virgifera</i> (Zhang, Y. <i>et al.</i> , 2015).
	El farnesol es un hidrocarburo encontrado en aceites esenciales en distintas especies vegetales como la citronela y es utilizado en la industria cosmética para resaltar aromas (Bandoni, A. 2003).
Diterpenos (C20)	Las giberelinas (GAs) son fitohormonas de crecimiento diterpenoides tetracíclicos involucrados en varios procesos de desarrollo en vegetales como el crecimiento del tallo, germinación y maduración del fruto (Jordán, M. y Casaretto, J. 2006).
	Dictyol C, dictyol H y dictyodial derivados de algas pardas <i>Dictyota</i> sp. Evita que organismos marinos (anfípodos) se alimenten de estas algas (Eksi, G. <i>et al.</i> , 2020).
	Ácidos resínicos (diterpenos tipo abietano y pimarano), que se encuentran principalmente en la oleorresinas de coníferas, tienen propiedades insecticidas (Eksi, G. <i>et al.</i> , 2020).

Terpenos	Actividad biológica
Triterpenos (C30)	El ácido betulínico presenta actividad antileucémica, antiviral VIH, antimalárica, entre otras (Cano, A. 2013).
	β -caroteno, fuente de vitamina A (McMurry, J. 2008).
Tetraterpenos (C40)	Los carotenoides son tetraterpenos constituidos por unidades múltiples de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Existen dos tipos de carotenoides: los carotenoides, que no contienen oxígeno en sus anillos terminales y las xantofilas que sí los tienen (Jáuregui, M. <i>et al.</i> , 2011).

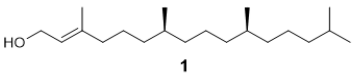
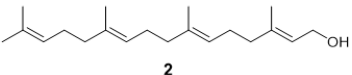
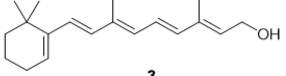
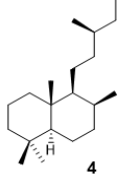
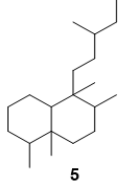
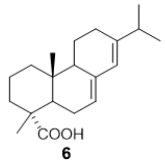
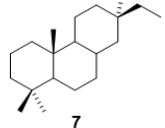
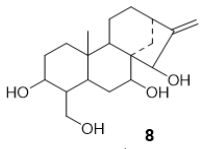
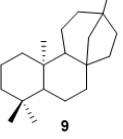
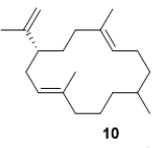
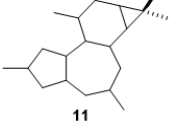
De manera general, los terpenos y terpenoides constituyen una clase heterogénea de sustancias naturales que abarca compuestos aromáticos volátiles, compuestos poliméricos, sistemas acíclicos, mono-, bi-, tri- y tetracíclicos, hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, epóxidos, éteres, ácidos carboxílicos y ésteres, compuestos heterocíclicos, insolubles o muy poco solubles en agua (Ibáñez, N. 2014) pueden encontrarse en fuentes vegetales libres o formando glucósidos (especialmente los triterpenos) en cuyo caso son llamados saponinas (Marcano, D. y Hasegawa M. 2002).

1.3.1 Diterpenos

Los diterpenos son compuestos orgánicos que constan de cuatro unidades de isopreno por lo que su estructura molecular está formada por un total de veinte átomos de carbono. Son compuestos especialmente abundantes en el reino vegetal, sin embargo, también están presentes en las algas pardas, invertebrados marinos, esponjas de mar, hongos inferiores, briofitas y en algunos insectos como las termitas como químicos de defensa (Evans, 2008; Hajnos, 2008; Sobotník *et al.*, 2010; Zi *et al.*, 2014).

Los diterpenos se clasifican principalmente según su estructura química, en términos del número de anillos que contienen; en acíclicos y cíclicos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Clasificación de diterpenos (Eksi, G. *et al.*, 2020)

Diterpeno	Tipo de esqueleto carbonado	Esqueleto tipo	Estructura química
Acíclicos	Lineal	Fitol	
		Geranilgeraniol	
	Monocíclico	Retinol-vitamina A	
Cíclicos	Bicíclicos	Labdano	
		Clerodano	
	Tricíclicos	Abietano	
		Pimarano	
	Tetracíclico	kaurano	
		Beyerano	
	Macrocíclico	Cembreno	
		Tigliano	

1.3.1.1 Diterpenos del tipo clerodano

El grupo de diterpenos de tipo clerodano incluye más de 800 compuestos, siendo *Croton* una de las principales fuentes de estos compuestos. Un número significativo demostró tener actividad antimicrobiana (Murthy, M. *et al.*, 2005) psicotrópica (Shirota, O. *et al.*, 2006), antiulcerosa (Brasil, D. *et al.*, 2008), antitumoral (Ravikumar, Y. *et al.*, 2010), anticancerígena (Jamora, C. *et al.*, 2001), gastroprotector (Hiruma, L. *et al.*, 2000) y antiinflamatoria (Benrezzouk, R. *et al.*, 1999; Soares, B. *et al.*, 2014; Tian, J. *et al.*, 2017), siendo el género *Croton* una de las principales fuentes de estos compuestos, los cuales se han aislado de diferentes partes de la planta y de los aceites esenciales de algunas especies. El esqueleto básico de los diterpenos de clerodano se divide en dos fragmentos: un anillo decalino fusionado (C1-C10) y una cadena lateral de seis carbonos en C-9 (C-11-C-16, con C-16 unido a 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 decalina (Li, R. *et al.*, 2016).

Se han aislado un total de 105 diterpenos de tipo clerodano en especies del género *Croton* los cuales se agrupan en cuatro diferentes tipos de estructuras (I-IV) según el tipo de cadena lateral unida al C-9 (Júnior, S. *et al.*, 2006; Li, R. *et al.*, 2016):

Tipo I (48 compuestos): con una cadena lateral basada en 2-etilfurano en C-9. Cuando visto de una manera simplista, se ha insertado un átomo de oxígeno entre C-15 y C-16 de una cadena lateral de 3-metilenpent-4-eno.

Tipo II (43 compuestos): llevan una cadena lateral basada en 3-etil-2-butenolida en C-9, con varios anillos que contienen átomos de oxígeno o dobles enlaces en diferentes posiciones.

Tipo III (5 compuestos): los compuestos de este grupo se caracterizan por una cadena lateral basada en 5-(3-furil)- δ -valerolactona en C-9, junto con anillos de lactona y epoxi, grupos hidroxilo y acetoxi, así como dobles enlaces. Tanto los compuestos de tipo I como los de tipo III contienen un anillo de furano en la cadena lateral C-9, pero a diferencia de

los compuestos del tipo I, los compuestos del tipo III presentan un anillo de 17,12- δ -lactona. Así mismo, la posición 17 es generalmente un grupo metilo libre en los compuestos de tipo I, mientras que en los compuestos del tipo III, la posición 17 está incorporado al anillo de δ -lactona como el grupo carbonilo.

Tipo IV (9 compuestos): se caracterizan por tener una cadena lateral acíclica en C-9.

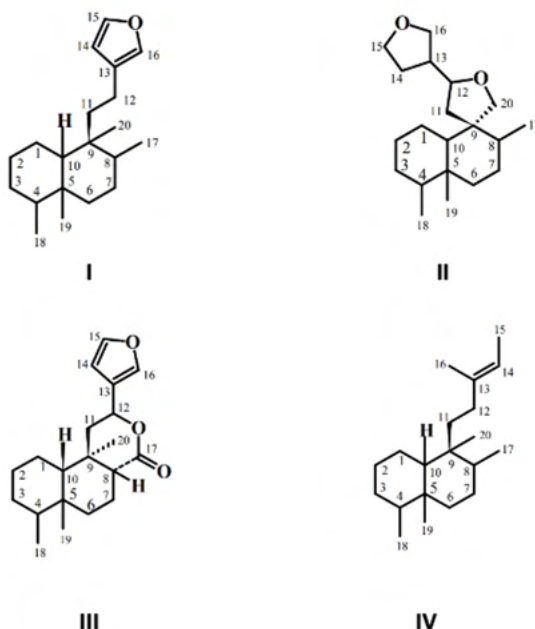


Figura 4. Tipos estructurales de clerodanos aislados del género *Croton*.

1.3.1.2 Diterpenos del tipo clerodano aislados de *Croton* y su actividad biológica

De la parte área de *Croton laui* se aislaron dos diterpenos del tipo clerodano: crotonolide A (12) (**Figura 5**) el cual mostró actividad citotóxica moderada contra las líneas celulares HL-60 (leucemia promielocítica humana) y P-388 (leucemia murina) y crotonolide G (13) (**Figura 5**) que exhibió actividad antibacteriana (Liu, C. *et al.*, 2014).

Del extracto de metanol (MeOH) de la parte aérea de *Croton yanhuii* se obtuvieron dos diterpenos de clerodano nombrados como crotonpenos A (14) y B (15) (**Figura 5**), los cuales resultaron ser potencialmente útiles para el tratamiento médico de la enfermedad de Alzheimer (Sun, Y. *et al.*, 2014).

De las raíces de *Croton crassifolius*, especie ampliamente distribuida en el sur de China, Laos, Tailandia y Vietnam, se aislaron los compuestos crassifolina A (16), B (17) y F (18) (**Figura 5**) los cuales mostraron actividad antiangiogénica (Wang, J. *et al.*, 2015). Del extracto de acetona de las raíces de esta misma especie se obtuvo el compuesto crasina H (19) (**Figura 5**) eficiente contra la línea celular humana A549 (Yuan, Q. *et al.*, 2017). Así mismo, el compuesto crassifolius A (20) (**Figura 5**) de *C. crassifolius* mostró citotoxicidad contra células tumorales del hígado humano Hep3B (Tian, J. *et al.*, 2017).

Los compuestos korberina A (21) y B (22) (**Figura 5**) aislados del extracto de metanol (MeOH) de la corteza de *Croton lechleri* mostraron inhibición detectable del crecimiento de *Bacillus subtilis* (Cai, Y. *et al.*, 1993).

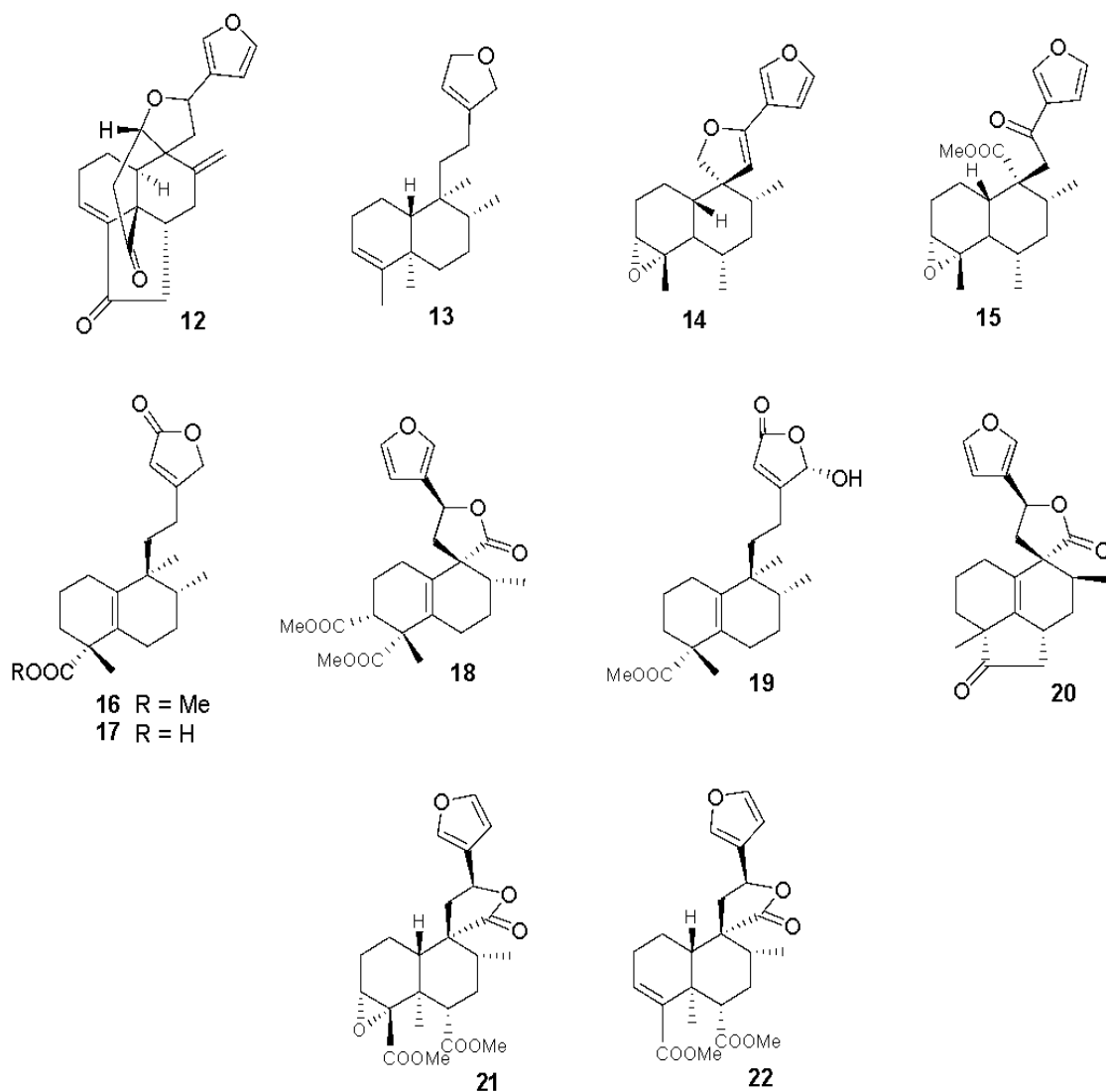


Figura 5. Estructuras del tipo clerodano aisladas de especies de *Croton*.

1.3.2 Diterpenos del tipo tigliano aislados de *Croton* y su actividad biológica

Aunque los diterpenos del tipo clerodano son los más abundantes en este género, también se han aislado diterpenos con esqueleto tigliano de algunas especies de *Croton* como el 13-O-acetilforbol-20-oleato (**23**) (**Figura 6**) aislado de las semillas de *Croton tiglium*, el

cual mostró actividad citotóxica frente a la línea celular de tumor hepático SNU387 (Zhang, X. *et al.*, 2013).

El 12-O-decanoil-7-hidroperoxi-forbol-5-eno-13-acetato (**24**) (**Figura 6**) el cual se obtuvo del extracto de acetato de etilo (EtOAc) de las hojas de *Croton mauritianus*, inhibió la muerte celular inducida por el virus chikungunya (Corlay, N. *et al.*, 2014).

A partir del extracto metanólico de ramitas y hojas de *Croton caudatus* se obtuvo un nuevo diterpeno del tipo tigliano denominado trivialmente crotusina C (**25**) (**Figura 6**), el cual mostró actividad inhibitoria significativa contra cinco líneas celulares de cáncer humano: HL-60 (mieloide), SMMC-7721 (carcinoma hepatocelular), A-549 (cáncer de pulmón), MCF-7 (cáncer de mama) y SW480 (cáncer de colon) (Chen, Y. *et al.*, 2016).

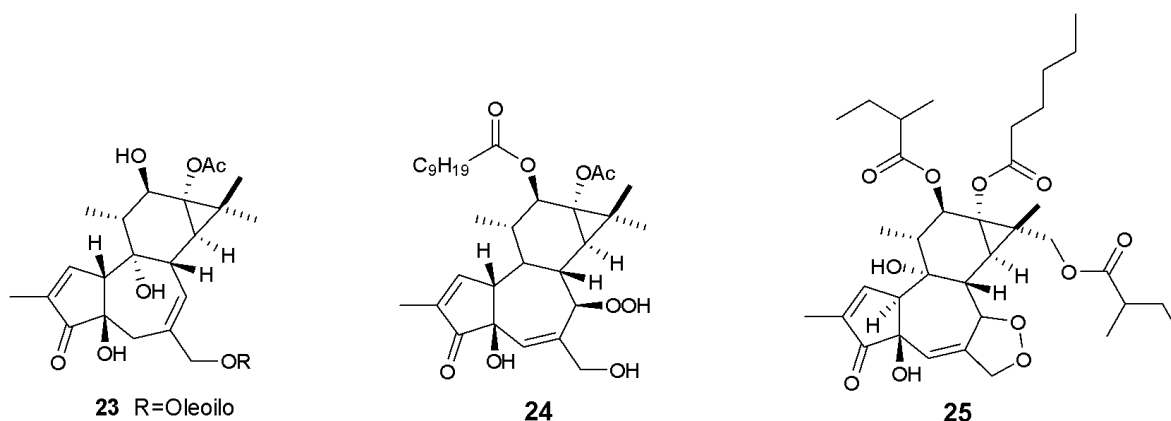


Figura 6. Estructuras de tipo tigliano aislados de especies de *Croton*.

1.3.3 Diterpenos del tipo seco y furano clerodano aislados de *Croton* y su actividad biológica

Los seco clerodanos se caracterizan por la presencia de un anillo abierto en algún punto de la estructura, lo que crea múltiples compuestos interesantes, dependiendo de que enlace se rompe y que reordenamientos adicionales están presentes (Li, R. *et al.*, 2016). Siguiendo esta línea, los números que preceden a la palabra seco en la nomenclatura utilizada para nombrar compuestos químicos, indican la posición del carbón o los carbonos donde la estructura se rompe. Aunado a esto, la palabra furano hace referencia

a un grupo funcional que consiste en un anillo pentagonal, el cual se encuentra unido a una cadena adyacente en el C-9 de la estructura. Por ejemplo, el diterpeno 6-7 seco-furanoclerodano llamado comúnmente como morifolina A (**26**) (**Figura 7**), aislada de *Croton morifolius* sería descrita como una estructura bicíclica conformada por 20 carbonos con aberturas en el C-6 y C-7 de alguno de sus anillos y que, además, posee un anillo pentagonal del tipo furano, el cual corresponde a un éter cíclico (Hernández, A. 2022).

De la corteza de *C. eluteria*, comúnmente conocida como cascarilla, se aisló un diterpeno del tipo furano-clerodano llamado cascarilladiona (**27**) (**Figura 7**), el cual favorece la secreción de ácido gástrico estimulada por la histamina (Appendino, G. *et al.*, 2003). De *Croton cajucara* Benth, se aisló un diterpeno tipo esqueleto de furano clerodano el cuál mostró actividad antiinflamatoria, analgésica, antitumoral, antiulcerosa, hipolipídémica y cardioprotector (**28**) (**Figura 7**) (Soares, B. *et al.*, 2014; Tian, J. *et al.*, 2019).

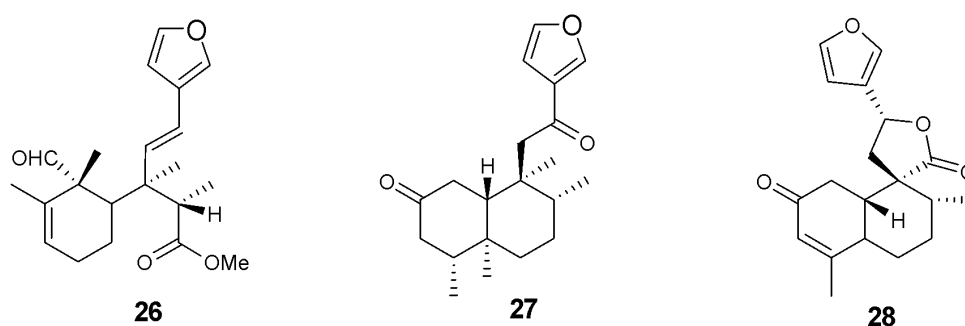


Figura 7. Estructuras del tipo seco y furano clerodano aislados de *Croton*.

1.4 Productos naturales y su configuración relativa y absoluta

1.4.1 Definición e importancia de la configuración relativa

La configuración relativa es la disposición espacial de los átomos que conforman un compuesto o sustancia química; que tipos de protones y grupos funcionales posee e

incluso, permite deducir qué conectividad existe entre un átomo respecto a otros de la misma molécula (Nath, N. *et al.*, 2020).

Aunque existen varias técnicas (dispersión rotatoria óptica, síntesis asimétrica, derivatización, etc.) que permiten determinar la estructura relativa de compuestos orgánicos, la resonancia magnética nuclear convencional (RMN ^1H y ^{13}C de una dimensión) es quizá uno de los métodos más distintivos para determinar la configuración relativa de un compuesto cuya conformación estructural es totalmente desconocida. El espectro de RMN proporciona información sobre el entorno químico de los núcleos, entorno químico que se ve influenciado por los campos magnéticos locales, acoplamientos y vecindades (Laurella, L. 2017). Por otro lado, espectros de correlación homonucleares y heteronucleares en 2D (HSQC y HMBC) suelen ser herramientas bastante útiles para reforzar la información proporcionada por el espectro de RMN y por lo tanto, mapear con mayor precisión la conectividad entre átomos (Öman, T. *et al.*, 2014). Al considerar todos estos aspectos en conjunto se puede deducir la estructura plana de la molécula en estudio, lo que resulta ser un parteaguas para su posterior elucidación estructural en 3D (tridimensional) a partir de técnicas más definitivas.

1.4.2 Definición e importancia de la configuración absoluta

La configuración absoluta describe de manera inequívoca la orientación tridimensional de los átomos de una molécula alrededor de uno o varios de sus centros quirales (típicamente un carbono, que está unido a 4 sustituyentes diferentes). Determinar la configuración absoluta de una molécula resulta ser crucial para comprender la estereoquímica de los compuestos orgánicos, especialmente en los casos en la que esta última se desconoce. Es decir, alrededor de un centro quiral sólo son posibles dos configuraciones absolutas: R o S (**Figura 8**) (Wade, L. G. 2011). Dichas configuraciones influyen directamente sobre las propiedades físicas y químicas de las moléculas como su solubilidad, punto de fusión así como también sobre su capacidad de interacción con otras moléculas mediante reacciones químicas. Dichas propiedades a su vez, determinan la actividad biológica de la molécula, es decir, si es biológicamente activa o no, o si es

beneficiosa o perjudicial dependiendo la aplicación que se le quiera dar. En cuanto a los métodos que se emplean para determinar la estructura tridimensional de una molécula, la difracción de rayos-X resulta ser uno de los métodos más definitivos.

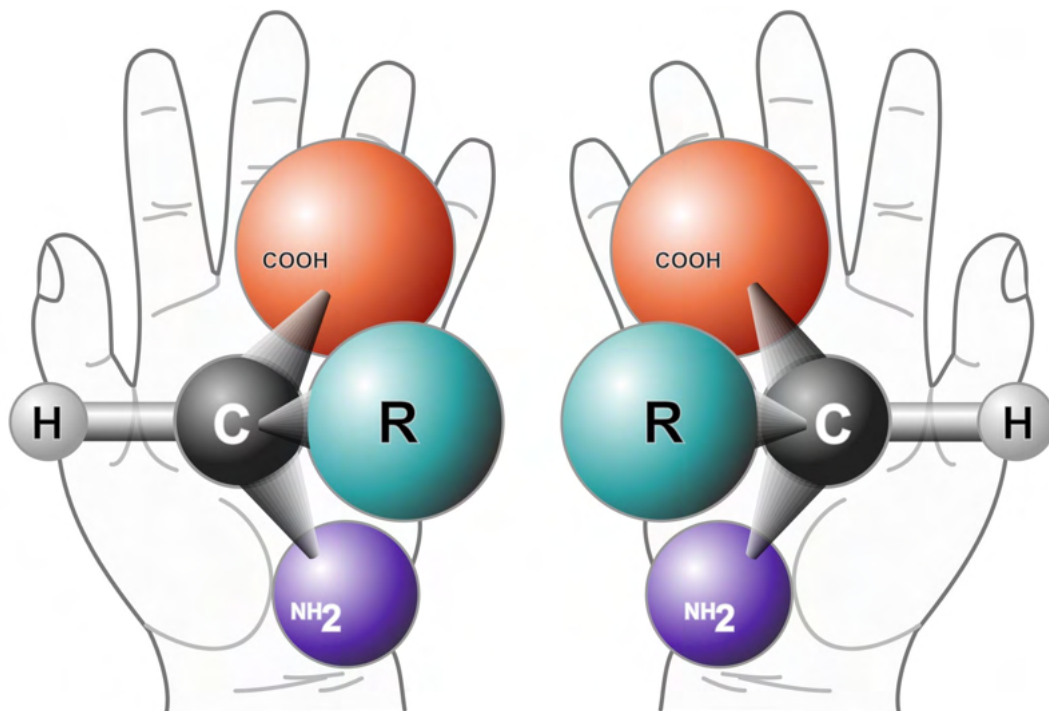


Figura 8. Enantiómeros de un aminoácido y su configuración absoluta R/S.

1.4.2.1 Difracción de rayos-X

Los rayos-X son un tipo de radiación electromagnética cuya onda es de muy alta frecuencia y de longitud mucho más corta que las ondas electromagnéticas de la luz visible, por lo que puede interaccionar a escala atómica con la materia, ya que son ondas extraordinariamente penetrantes y no destructivas (Fontal, B. 2005), razón por la cual suelen emplearse en la elucidación de compuestos orgánicos. No obstante, la difracción de rayos-X se limita a la elucidación de compuestos que cumplen con la condición de tener una estructura cristalina, esto por dos razones: la primera es porque el estudio de los cristales se puede reducir a una pequeña porción denominada celda unidad o elemental que tiene la propiedad de que su repetición en el espacio define todo el sólido. Así,

estudiando la distribución en la celda unidad de los distintos átomos que conforman la estructura, podemos resolver el cristal (Martínez, P. 2021). Lo segundo es que cuando un material no es cristalino, sus planos están desalineados y no tienen un orden específico (son amorfos). En consecuencia, el haz de rayos-X difractado por un átomo anula el haz de rayos-X difractado por otro y entonces, ocurre un desfase donde el haz difractado es cancelado. Por otro lado, un material cristalino tiene planos perfectamente alineados entre sí, además de poseer una periodicidad, es decir los átomos que se encuentran conformando un cristal están ordenados en un patrón repetitivo por lo que el ángulo y la longitud de onda que forman los rayos incidentes respecto a sus planos es igual al ángulo y longitud de onda de su haz difractado en el mismo plano (**Figura 9**). En consecuencia, las ondas de rayos-X de frecuencia idéntica o similar se superponen cumpliéndose así la ley de Bragg (Sarmiento, J. 2022) y el fenómeno de difracción.

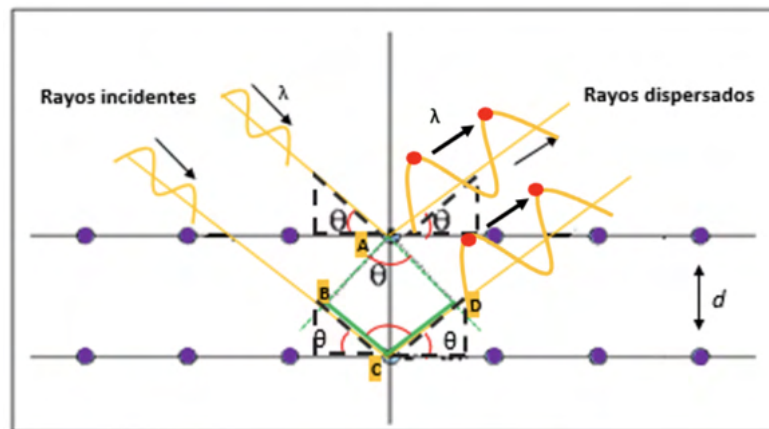


Figura 9. Reflexión de radiación por dos planos del cristal que están a una distancia d .

Tomado y modificado de Martínez, P. (2021).

Un difractómetro consiste en una fuente de radiación que emite un haz de rayos-X sobre una muestra a analizar y cada que se satisface la ley de Bragg, el haz primario se difracta desde la muestra hacia el detector (**Figura 10**), el cual captura y mide la intensidad de los rayos-X difractados por la muestra en función de sus ángulos (posiciones específicas en las que se encuentran cada uno de sus átomos) para posteriormente enviar información a

un sistema computarizado que construye un difractograma donde se pueden traducir dichas posiciones en picos de difracción; siendo que el eje “y” del difractograma representa la intensidad de los rayos-X difractados y el eje “x” el ángulo de difracción. Por último, la información proporcionada por el difractograma de la muestra se compara con patrones registrados en bases de datos computacionales y es así como se puede obtener información concreta sobre la disposición y ubicación tridimensional de los átomos que conforman una molécula cristalina.

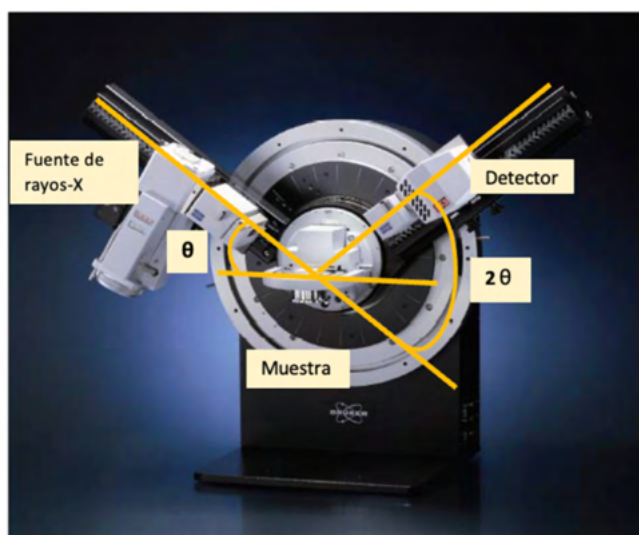


Figura 10. Componentes del difractómetro de rayos-X. Tomado y modificado de Carpenter, P. (2024).

2. Antecedentes

2.1 La familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae ocupa el sexto lugar de plantas con flores más diversas, después de las *Orchidaceae*, *Compositae*, *Leguminosae*, *Gramineae* y *Rubiaceae* (Radcliffe, A. 1987), con alrededor de 8,700 especies ubicadas en 320 géneros (Webster,

G. 1994); las cuales se encuentran distribuidas sobre todo en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, aunque varios representantes también se extienden a las zonas templadas de ambos hemisferios del planeta. Es una familia que se caracteriza por su amplia variación morfológica, que va desde árboles, hasta arbustos, hierbas y lianas (Pabón, L. y Rodríguez, P. 2012). Esta variación morfológica ha hecho difícil caracterizarla, por lo que algunos autores consideran que puede tener un origen polifilético (Martínez, M. J. 1996). Aunado a esto, la clasificación intrafamiliar de *Euphorbiaceae* ha estado sujeta a controversia pues los estudiosos de la familia han propuesto diferentes organizaciones de la misma, hasta la más reciente y mejor aceptada, formulada por Webster (1975), quien usando la clasificación de Müller (1866) trata de establecer una clasificación a nivel supragenérico que refleje las relaciones filogenéticas entre los diferentes grupos que integran la familia. Apoyándose de estudios anatómicos y particularmente en estudios sobre morfología del polen, Webster propone dividir a la familia en cinco subfamilias: Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae, Phyllanthoideae y Oldfieldioideae (todas ellas presentes en México) (Martínez, M. J. 1988). De acuerdo con esta clasificación, las primeras tres subfamilias se caracterizan por poseer un óvulo (condición apomórfica), mientras que las dos últimas tienen dos óvulos por lóculo (condición plesiomórfica) (Mwine, J. y Damme, P. 2011; Ramírez, J. *et al.*, 2002).

Entre las características más comunes de la familia *Euphorbiaceae* tenemos: tallos ocasionalmente suculentos, exudado lechoso, coloreado o ausente; indumento de pelos simples, ramificados o en forma de escamas, a veces ausente. Hojas alternas, compuestas o verticiladas, a veces en espiral; lámina de hoja simple, lobulada o compuesta; nervadura pinnada (en forma de pluma) o palmada; estípulas libres que pueden estar transformadas en espinas o glándulas. Inflorescencias en cimas, modificadas en espigas, cabezas, pseudantos o flores solitarias. Flores unisexuales, básicamente actinomorfas; por lo general cáliz 3-6-lobado o partido, en ocasiones reducido o ausente; corola con 3-6 pétalos, rara vez más numerosos, separados o unidos, en ocasiones rudimentarios o ausentes; filamentos libres o soldados insertos sobre un disco nectarífero; anteras generalmente bitecas y dehiscencia longitudinal; polen tectado o intectado, inaperturado; gineceo de ovario súpero con 3 lóculos que tienen 1 o 2 óvulos cada uno, placentación

axilar, estilos libres o connatos, estigmas enteros, bífidos o lacerados; nucela gruesa; tegumentos dos; perianto generalmente de 5 piezas, simples, sepaloides y en otros casos el perianto está totalmente ausente. Frutos típicamente esquizocárpicos capsulares, a veces una drupa; columela persistente. Semillas 1-2 por lóculo o reducida a 1; endospermo presente; embrión recto; cotiledones usualmente más amplios que la radícula, plano o rara vez doblado (Ramírez, J. *et al.*, 2002).

2.1.1 Importancia biológica de especies de la familia Euphorbiaceae

La familia es sumamente importante, ya que muchos de sus miembros se cultivan para su uso medicinal, industrial, alimenticio y ornamental. Por ejemplo, *Euphorbia antisiphilitica* Zucc., la “candelilla” que se utiliza para la obtención de su cera, la cual presenta cualidades deseables para múltiples aplicaciones industriales, principalmente en el área de alimentos y cosméticos (García, I. *et al.*, 2022). Plantaciones de *Hevea brasiliensis* Mull. Arg., se observan esporádicamente en la región de los bosques tropicales del sur de México como fuente de hule natural para la manufactura de guantes industriales, quirúrgicos, mangueras, calzado, adhesivos (Tamara, A. *et al.*, 2014). Se siembra ampliamente a *Ricinus communis* como ornamental y de las semillas se extrae el llamado “aceite de ricino”, que tiene usos tanto medicinales como industriales (Sánchez, M. *et al.*, 2016). *Euphorbia pulcherrima*, la famosa “noche buena” también es parte de esta familia y se propaga como ornamental a través del mundo.

Aunque las Euforbiáceas son bien conocidas en diferentes partes del mundo como tóxicas (De Lima, S. *et al.*, 2010; Puentes, M. 2017), también hay dos especies que han sido registradas como comestibles: las hojas de *Euphorbia delicatula* Boiss., que se usa como especia, y los tubérculos de *Euphorbia macropus* Boiss., que se mastican como chicle (Steinmann, V. 2002).

2.1.2 La familia Euphorbiaceae en México

En México, las euphorbiaceas están representadas por 50 géneros y 826 especies; de éstas, 55.52% son endémicas. Estos números ubican a Euphorbiaceae como la sexta familia en importancia nacional, atendiendo al número de especies y la cuarta en porcentaje de endemismos. Los géneros con mayor número de especies son *Euphorbia* (138 spp., 31%), *Croton* (126 spp., 16%), *Chamaesyce* (103 spp.), *Acalypha* (126 spp., 14%), *Jatropha* (48 spp., 6%) y *Phyllanthus* (41 spp., 5%) (Gordillo, M. *et al.*, 2002). La familia se encuentra ampliamente distribuida a través de la República desde el nivel de mar hasta más de 3,000 m de altitud y está representada en los diez tipos de vegetación reconocidos por Rzedowski (1978) en México, con una mayor concentración de especies en bosques tropicales caducifolios y matorrales. Cabe mencionar que, aunque existe una sola monografía completa de la familia Euphorbiaceae publicada en el Prodrum de De Candolle por Boissier (1862, 1866) y Muller (1866), existen pocas revisiones de los géneros *Croton*, *Euphorbia* y *Phyllanthus* (Steinmann, V. 2002).

2.2 Género *Croton*

La palabra *Croton* viene del griego *Kroton*, que significa garrapata y que fue dado a este género por el parecido de su semilla con el arácnido. El nombre le fue dado por Linneo, sustituyendo así el nombre de *Ricinoides* con el que fue nombrado por Tournefort, debido a la semejanza de sus semillas con las del género *Ricinus* (Webster, 1967).

De acuerdo a la clasificación de Webster (1975), el género *Croton* pertenece a la subfamilia *Crotonoideae* y a la tribu *Crotonae*. Considerado el segundo género más grande y diverso de la familia Euphorbiaceae con alrededor de 1300 especies que se distribuyen ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (**Figura 11**) (Wen-Hui *et al.*, 2018); con una mayor riqueza de especies en América Latina seguida de África, dentro de las zonas áridas y semiáridas de dichas regiones (Cervantes, A. *et al.*, 2002). En México hay alrededor de 130 especies del género *Croton*, donde

aproximadamente el 53% de las mismas son endémicas y se encuentran distribuidas en todos los tipos de vegetación del país (Gordillo, M. y Durán, R. 2002).

La mayoría de las especies del género *Croton* son arbustos; los árboles son menos frecuentes y se desarrollan en zonas relativamente conservadas. Las hierbas anuales son pocas, los subarbustos y las hierbas perennes son un poco más comunes que las anteriores. Las lianas son raras; sólo se conocen *Croton adscendens* y *Croton pullei* de la selva del Amazonas (Secco, R. y Rosa, N. 1992; Martínez, M. J. 1996). Por otro lado, muchas especies se desarrollan a la orilla de carreteras, ríos y claros de bosques. Estas y otras características ecológicas, como la producción masiva de flores y frutos durante la mayor parte del año, convierten a los miembros de este género en candidatos ideales para la restauración de bosques degradados (Lopes, E. *et al.*, 2012). Tal es el caso de *Croton urucurana* Spreng., un árbol cultivado al sur de Brasil con el propósito de reforestar sus bosques (Carrenho, R. *et al.*, 1997).



Figura 11. Mapa de distribución a nivel mundial del género *Croton*. Tomado y modificado de GBIF (2023).

2.2.1 Descripción botánica del género *Croton*

De manera general, la mayoría de las especies presentan tricomas estrellados o lepidotas que protegen a la planta de factores ambientales como la radiación solar y el viento (Gordillo *et al.*, 2005). Es común que los tricomas del haz y del envés de las hojas sean diferentes entre sí. Las hojas generalmente son simples, enteras, simétricas, alternas y pecioladas. La presencia de glándulas de diferentes formas y tamaños en el margen de la misma y en unión con el pecíolo, ya sean adaxiales, marginales, o abaxiales, son importantes para separar a algunos grupos. Es poco común encontrar glándulas en el haz de la hoja. Las inflorescencias suelen ser racimos bisexuales, terminales. Las brácteas son típicas en el género y pueden ser unifloras o multifloras. Las flores pueden ser estaminadas (generalmente de 5 sépalos, 5 pétalos y de 6 hasta 150 estambres) o pistiladas de 4 a 10 sépalos, con un perianto que varía en cuanto al número, simetría y desarrollo de sus partes; el desarrollo de los pétalos de esta flor varía mucho: pueden estar totalmente desarrollados, reducidos en diferente grado o completamente ausentes en algunas secciones. El fruto es generalmente una cápsula que tiene seis líneas de dehiscencia y que al abrirse presentan una columela más o menos persistente. La forma puede ser esférica, ligeramente cilíndrica, en ocasiones con tres lóbulos bien definidos y el tamaño de la cápsula va de 0.5 cm a 2 cm (Martínez, M. J. 1996). Respecto al polen, este es grande con excrecencias arregladas hexagonalmente (Webster, G. 1967).

2.2.2 Propiedades bioactivas de especies del género *Croton*

Varias especies del género son empleadas en la medicina tradicional de África, Asia y América del Sur (Salatino, A. *et al.*, 2007). Sus beneficios terapéuticos incluyen enfermedades como el cáncer, artritis, dolor de estómago (Huang, W. *et al.*, 2015); problemas digestivos, dolores corporales y fiebre (Poopath, M. *et al.* 2018), poseen valor potencial como agentes antimaláricos (Medinilla, B. E. 1993; Milliken, W. 1997), también resalta su potencial antioxidante (Jaramillo, B. *et al.*, 2010), antibacteriano (Liu, C. *et al.*, 2014), citotóxico (Pérez, A. R. 2021), antiinflamatorio (Ríos, M. Y Aguilar, A.

2006; Kuo, P. *et al.*, 2013), cicatrizante (Verdesoto, D. *et al.*, 2016). Así mismo, se ha descrito la actividad insecticida del extracto o aceite esencial de varias especies del género *Croton* contra especies patógenas de las plantas (Silva, C. *et al.*, 2008). Además, el género es el más representativo en cuanto a especies productoras de sangre de grado, siendo *Croton lechleri*, la especie más utilizada y estudiada (Risco, E. *et al.*, 2005). El látex o “sangre de grado” es usada de forma tradicional desde tiempos muy antiguos y en la actualidad se han demostrado sus propiedades medicinales, como antiviral (Meza, E. 1999; Gilbert, B. *et al.*, 1993), antiinflamatorio (Perdue, G. *et al.*, 1979; Cai, I. *et al.*, 1993) anticancerígeno (Pieters, L. *et al.*, 1992) y cicatrizante (Obando, L. 2015; Chen, Z. *et al.*, 1994; Pieters, L. *et al.*, 1995).

2.3 Generalidades de *Croton morifolius*

Croton morifolius, también conocido como “palillo” o “vara blanca”, es un arbusto perteneciente a la familia *Euphorbiaceae* que se distribuye desde las vertientes costeras del océano pacífico y el golfo de México (Chihuahua, Sonora, Sinaloa, Zacatecas, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Colima, Veracruz, Guanajuato, Guerrero, Oaxaca, Chiapas) hasta el norte de Colombia y Venezuela (Webster, G. L. 2001). Es una especie principalmente de tierras bajas que habita en matorrales xerófilos y climas semiáridos. En lo que respecta a los servicios ambientales de esta especie, contribuye a la retención de suelo erosionado y percolación de agua (CONABIO, 2017). Por otro lado, *C. morifolius* es empleada en la medicina tradicional como anticatarral, catártico y analgésico, para tratar la amigdalitis, gastritis, neuralgia. Las hojas y ramas con flores se preparan en infusión teiforme para tratar el dolor en caso de cáncer en el estómago. Sin embargo, también puede causar parálisis (Díaz, J. L. 1976) y el aceite de las semillas es purgante según la CONABIO (2017).

2.3.1 Descripción botánica de *Croton morifolius*

Se trata de un arbusto de 1.0-1.6 m de alto, monoico. Tallos estrellado-tomentosos, amarillentos. Hojas membranáceas; estípulas 1.5-2.0 mm de largo, generalmente densamente tomentosas, subuladas, pubescentes y decíduas; pedicelo 1.1-1.4 cm de largo, estrellado-tomentosos con dos glándulas esféricas al ápice, pequeñas; láminas 4.0-7.0 cm de largo, 2.2-5.5 cm de ancho, ampliamente ovadas, base cordada, margen entero, ápice acuminado, apiculado, venación actinódroma con 5 nervios basales, haz glabrescente, envés tomentoso. Inflorescencias terminales en un racimo, 5.2-6.1 cm de largo, bractéolas masculinas 1 mm de largo, oblongas. Flor femenina cortamente pedicelada; sépalos 5, linear-lanceolados, glabros en el haz, envés pubescente; ovario esférico, hirsuto; estilos 3, bifurcados una vez, pubescentes. Flor masculina pedicelada, pedicelo 2-2.5 mm de largo; sépalos 5, 2 mm de largo, ovado-lanceolados, haz glabro, envés pubescente; pétalos 5, 2 mm de largo, glabros en ambas caras, receptáculo pubescente; estambres 16, 2.5-2.7 mm de largo, glabros. Florece en julio (Gordillo, M. M. 1995). Frutos pequeños capsulares de 7-7.5 mm de largo, trivalvados, velutinos de color verde-amarillento, completamente cubiertos por tricomas estrellados, dorados (**Figura 12**), (CONABIO, 2017); semillas escaraboideas, oblongas, lisas de 0.5-0.6 mm de largo, carúncula amarillenta (**Figura 13**) (CONABIO, 2014). Además de esto, los tallos y raíz de *C. morifolius* segregan un tipo de látex de color rojo al ser cortados (**Figura 14**).



Figura 12. Frutos de *Croton morifolius*.



Figura 13. Semillas de *Croton morifolius*.



Figura 14. Raíz de *Croton morifolius* con presencia de látex rojo (sangre de grado).

2.4 Estudios *in silico*

Los estudios *in silico* son modelos experimentales con un enfoque bioinformático que permiten visualizar la estructura bidimensional de numerosos compuestos vegetales, químicos y semisintéticos con potencial farmacológico así como su comportamiento dentro del cuerpo humano desde su perfil ADMET y la forma en que interactúa con su blanco terapéutico (Aguilar, A. y Condori, R. 2021; Scior, T. *et al.*, 2007).

Muchos de los programas bioinformáticos que se emplean para realizar estudios *in silico*, suelen ser gratuitos y fáciles de usar, además, muestran comportamientos y resultados que quizá llevaría décadas obtener mediante la observación o experimentación; ayudan a evaluar la eficacia y posible toxicidad de las sustancias antes de pasar a estudios *in vitro* o *in vivo*, lo cual, a su vez, reduce los costos y el tiempo que conlleva el realizar dichos estudios.

Al igual que los estudios *in vitro*, los estudios *in silico* ofrecen beneficios en cuestiones bioéticas, sin embargo, también comparten la desventaja de poseer cierto margen de error respecto al sistema biológico natural dado que los estudios *in silico* tratan con las representaciones digitales de estructuras químicas, no con productos reales. Es por ello que, los estudios *in silico* deben complementarse con los estudios *in vitro* e *in vivo* con la finalidad de acercarnos experimentalmente a la situación clínica real (Aguilar, A. y Condori, R. 2021; Fina, B. *et al.*, 2013).

2.4.1 Propiedades fisicoquímicas y perfil ADME de las moléculas

Cada compuesto químico a evaluar posee ciertas propiedades fisicoquímicas que pueden ser similares o completamente diferentes a los fármacos ya registrados en los distintos programas y bases de datos; es por ello que para determinar cuáles son las principales propiedades fisicoquímicas que se deben considerar al momento de evaluar a los diferentes compuestos químicos como posibles candidatos a fármacos, utilizamos las reglas de Lipinski quien menciona que el peso molecular debe ser menor o igual a 500

daltons (Da), lipofilicidad (LogP) no menor de 1 ni mayor a 5, número de donantes de enlaces de hidrógeno (HBD) menor a 5, número de aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA) menor a 10 (Lipinski, C. *et al.*, 2001); la regla de Veber menciona que el área de superficie polar topológica (TPSA) debe ser igual o menor a 140 Å² (angstroms cuadrados) y debe poseer 10 o menos enlaces rotables (Veber, D. *et al.*, 2002); asimismo, la regla de Ghose considera la refractividad molar (MR), la cual debe ser mayor a 40 y menor a 130 cm³/mol. Dichos parámetros suelen considerarse más como directrices que como valores de corte absoluto y son importantes porque determinan la eficiencia de absorción y permeabilidad de un compuesto por vía oral, lo cuál a su vez está estrechamente relacionado con el perfil ADME del mismo (Waterbeemd, H. y Gifford, E. 2003).

ADME es un acrónimo que se refiere a la absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco a través de su paso por el organismo. El análisis de las propiedades ADME de una molécula nos permite evaluar su eficacia, viabilidad y seguridad como posible candidato terapéutico y decidir en qué forma y a través de qué vía será administrado. Para ello, es importante revisar en qué consiste cada una de las etapas del perfil ADME (Verstuyft, C. *et al.*, 2022).

La absorción es el proceso por el cual un fármaco pasa desde su sitio de administración (oral, intravenosa, intramuscular) a la circulación sistémica (la sangre). Se dice que la absorción es un proceso porque para que la fracción bioactiva del fármaco llegue al torrente sanguíneo debe pasar primero por la desintegración de su forma farmacéutica (tabletas, cápsulas, soluciones, etc.) para posteriormente poder disolverse en el medio en el que se encuentra (líquidos del tracto gastrointestinal) y finalmente pueda moverse a través de las membranas celulares (por ejemplo del intestino delgado) por difusión pasiva, facilitada, transporte activo, endocitosis y/o exocitosis hacia el torrente sanguíneo (Ruiz, D. *et al.*, 2012). Hay diferentes condiciones que pueden afectar la absorción del fármaco a través de las membranas celulares, por ejemplo, su solubilidad y permeabilidad (Hidalgo, I. 2001).

La distribución es el proceso mediante el cual un fármaco se dispersa por los diferentes tejidos y fluidos del cuerpo después de haber sido absorbido; este paso puede verse

afectado por la perfusión sanguínea, es decir, el fármaco llegará primero a aquellos órganos con alta perfusión sanguínea, como el corazón, hígado, riñones y cerebro, mientras que tardará en llegar a aquellos con menor perfusión, como los músculos y la grasa. Por otro lado, la unión del fármaco a proteínas como la albúmina puede limitar su distribución y duración de acción (Buxton, I. 2006).

El metabolismo, también conocido como biotransformación, es el proceso mediante el cual el cuerpo utiliza enzimas, principalmente del hígado, pero también de otros órganos para modificar la estructura química del fármaco (por reacciones como la oxidación, reducción e hidrólisis) en formas más hidrosolubles y, por lo tanto, más fáciles de excretar (Verstuyft, C. *et al.*, 2022).

La última etapa es la excreción y esta consiste en la eliminación del fármaco y sus metabolitos del cuerpo, principalmente a través de los riñones, pero también participan el hígado, los pulmones (gases anestésicos y otros compuestos volátiles) así como fluidos corporales como el sudor, la saliva, la leche materna y el líquido cefalorraquídeo. Aunque la excreción a través de fluidos corporales es poco común, pueden ser importantes en procesos como la lactancia. El metabolismo y excreción son etapas esenciales para evitar la acumulación del fármaco en el organismo y sus posibles efectos tóxicos (Londoño, R. 2024).

2.4.2 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular o Docking Molecular es un método bioinformático cuyo objetivo es predecir y calcular la “pose” de unión (comúnmente denominada “conformación”) más efectiva entre un ligando (hormonas, neurotransmisores, fármacos o compuestos vegetales, químicos y semisintéticos) y una proteína o receptor (DNA, RNA, enzimas) cuya estructura tridimensional es conocida (Paucara, W. G. y Torrez, R. E. 2019). Para llegar a este objetivo, es necesario que el algoritmo de búsqueda del programa computacional que se esté utilizando realice dos pasos indispensables en el proceso de acoplamiento molecular; el primero consiste en buscar diferentes arreglos

conformacionales del ligando dentro del sitio activo de la proteína, esto con base a la capacidad rotatoria y grados de libertad del ligando. Lo segundo consiste en evaluar la afinidad de unión de cada una de las conformaciones anteriormente encontradas en el paso uno mediante una función de puntuación, donde aquella conformación que demande menor energía corresponde a la unión más favorable entre ligando-proteína, ya que entre más negativo sea el resultado, mayor es la fuerza de unión (Agu, P. *et al.*, 2023).

La calidad de interacción y reconocimiento entre un complejo ligando-proteína nos brinda información sobre la probabilidad que existe de que nuestro compuesto inhibe o no a dicha proteína que se sabe está asociada, por ejemplo, con la expresión del cáncer, diabetes o que es responsable de inhibir el efecto terapéutico de cierto antibiótico. Sin embargo, es importante considerar que, si bien es cierto que el método de Docking Molecular nos permite ahorrar tiempo y recursos, también es cierto que no considera la naturaleza dinámica de la proteína receptora si no que la estudia como un ente rígido, es por ello que cuando se trata de métodos computacionales siempre se habla de probabilidad, ya que existe cierto margen de error (Muñoz, F. *et al.*, 2025; Zhu, H. *et al.*, 2022).

2.5 Estudios *in vitro*

Los estudios *in vitro* son experimentos científicos que se realizan fuera de un organismo vivo, comúnmente bajo ambientes y parámetros controlados en el laboratorio donde además, se hace uso de equipos como la autoclave, campana de flujo laminar, incubadora y materiales como cajas Petri, tubos de ensayo, etc., Así como de células, tejidos o moléculas provenientes de animales y/o humanos. Todo lo anterior con la finalidad de desarrollar un modelo experimental estandarizado que permita que los resultados sean reproducibles en cualquier otro laboratorio del mundo; además, son experimentos que brindan información en un corto lapso de tiempo, ayudan a evaluar la eficacia de sustancias antes de pasar a estudios en animales o humanos, reducen los costos y ofrecen beneficios en cuestiones éticas si consideramos que no se requiere disponer del organismo vivo como tal. No obstante, los estudios *in vitro* suelen tener ciertas

desventajas, una de ellas es la artificialidad del entorno en que se llevan a cabo, que no refleja completamente la complejidad de la fisiología del organismo *in vivo*, es decir, el cuerpo humano es un ambiente dinámico y complejo, con un sinnúmero de variables, muchas de las cuales no conocemos, o más aún, que ni sospechamos su presencia por lo que es complicado extrapolar dichas condiciones a estudios *in vitro*; esta limitante nos lleva a la incertidumbre de conocer el tipo de interacción entre la forma farmacéutica administrada y el organismo, su posible toxicidad u otros efectos secundarios (Fina, B. *et al.*, 2013; Lorian, V. 1988), es por ello que los estudios *in vitro* suelen utilizarse en paralelo con los estudios *in silico* y/o *in vivo* para fortalecer la calidad y confiabilidad de los resultados.

2.5.1 Generalidades de los estudios *in vitro* empleados para evaluar la actividad antibacteriana de extractos vegetales

Según la OMS, existen principalmente dos métodos de supervisión de resistencia: *in vivo* (fracasos terapéuticos) o *in vitro*. Dentro de los métodos *in vitro*, están los fenotípicos (Kirby-Bauer o concentración mínima inhibitoria) y los moleculares cuando se hacen pruebas genéticas (Mosquito, S. *et al.*, 2011). Para fines de este estudio, nos centraremos en los métodos fenotípicos.

Kirby-Bauer es la técnica originalmente descrita para el método de difusión en agar, sin embargo, esta puede presentar ciertas modificaciones de acuerdo a las necesidades del proyecto de investigación. Generalmente, la modificación radica en cambiar los discos de papel por pozos o por gotas colocadas directamente sobre la superficie del agar (Hulankova, R. 2024).

2.5.1.1 Métodos de difusión

El método de difusión en disco (Kirby-Bauer) o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. Por su parte, el método de difusión por gota no es tan común como

los métodos estandarizados por la NCCLS, pero si es empleado en entornos de investigación (Gavin, J. 1956; Hili, P. *et al.*, 1997; Savadogo, A. *et al.*, 2004). El objetivo de los tres métodos es evaluar cuantitativamente la sensibilidad o resistencia, principalmente de cepas bacterianas ante la presencia de sustancias antimicrobianas, por ejemplo, extractos, aceites o compuestos vegetales. Kirby-Bauer consiste en colocar un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnado con una cantidad y concentración conocida de la sustancia antimicrobiana sobre la superficie del agar previamente inoculado homogéneamente con el cultivo bacteriano. Posteriormente, se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas, luego se mide el halo de inhibición (si es que lo hay) y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre los microorganismos estudiados, con el control positivo (Ramirez, S. y Marin, D. 2009). El procedimiento y lectura de los resultados del método de difusión en pozo son lo mismos que se emplean en el método de difusión en disco, la única diferencia es que, en lugar de utilizar discos, se hacen perforaciones (pozos) en el agar con ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro. Lo mismo aplica para el método de difusión por gota, el cual consiste en colocar una gota del antimicrobiano directamente sobre la superficie del agar. Es importante mencionar que los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Müeller Hinton y agar soya tripticaseína (TSA), ya que gracias a sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y permiten una mayor difusión de las sustancias a evaluar (EUCAST, 2000); por otro lado, hay algunas consideraciones que se deben tomar en cuenta al momento de elegir y ejecutar alguno de los métodos antes descritos: en caso de evaluar sustancias con diferentes concentraciones, los discos de papel filtro, los pozos o gotas deben colocarse en forma equidistante sobre el agar de una placa de Petri, el tamaño de la zona de inhibición puede estar influenciada por el grosor del agar, de manera que, una capa delgada de agar producirá una zona de inhibición más grande que una capa más gruesa; la velocidad de difusión del antimicrobiano a través del agar depende de sus propiedades de difusión, solubilidad y peso molecular (Ramirez, S. y Marin, D. 2009; Hudzicki, J. 2009).

2.5.1.2 Métodos de dilución

El método de dilución en caldo es un procedimiento utilizado para determinar la concentración mínima (en $\mu\text{g/mL}$) que se requiere de una sustancia para inhibir el crecimiento visible de un microorganismo tras 18-24 horas de incubación. Dicho método puede realizarse mediante tubos (macrodilución) o microplacas (microdilución), los cuales contienen caldo, los microorganismos en estudio y el extracto vegetal en concentraciones crecientes, así como sus respectivos controles negativos y positivos. A diferencia de la macrodilución, la microdilución se realiza en placas de 96 pocillos (12 mm x 8 mm), lo cual representa un beneficio cuando se trabaja con varios productos naturales y a diferentes concentraciones, mismos que se emplean en cantidades pequeñas. En macro y microdilución, tras la incubación, se determina por turbidez el crecimiento o no del microorganismo, sin embargo, en microdilución se puede agregar a los diferentes pocillos bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), lo cual refleja otro de sus beneficios, pues con la adición de este reactivo se pueden diferenciar bacterias metabólicamente inactivas (color amarillo) de bacterias metabólicamente activas (cambio de color a púrpura) (Ramirez, S. y Marin, D. 2009).

2.6 Impacto mundial de la resistencia a los antibióticos

El descubrimiento de los antibióticos no solo supuso un beneficio directo al curar y prevenir infecciones bacterianas que antes podían ser mortales como la neumonía y la tuberculosis, sino que también desempeñó un papel crucial en el progreso de la medicina moderna al prevenir infecciones durante intervenciones quirúrgicas complejas, trasplantes y tratamientos de quimioterapia. Sin antibióticos eficaces, la seguridad de estos procedimientos estaría seriamente comprometida (Oteo Iglesias J, 2016; OPS, s.f). Sin embargo, existe una contraparte en el uso de los antibióticos: la aparición de resistencia a los mismos. Esta situación es un problema de alcance global dado que los microorganismos y genes resistentes trascienden fronteras geográficas y ecológicas, propagándose mediante alimentos, agua, suelo, animales y/o personas por la migración y

comercio internacional. Un ejemplo de ello lo constituye la diseminación rápida del gen New Delhi Metallo-beta-lactamasa-1 (NDM-1) (gen que hace que las bacterias sean resistentes a varios antibióticos), cuyas variantes actualmente se encuentran diseminadas en diversos ambientes naturales, como cuerpos de agua y suelos, incluyendo regiones geográficamente remotas y con mínima intervención humana (Avershina, A. *et al.*, 2021).

En 2016 se publicó un informe internacional bajo la dirección de Jim O'Neill, donde se dió a conocer que cada año más de 700 mil personas mueren a causa de infecciones por microorganismos resistentes a los antimicrobianos, una cifra inferior a los 1,5 millones de muertes por diabetes y 8,2 millones por cáncer. No obstante, si la evolución de microorganismos resistentes a los antimicrobianos continúa en aumento como en los últimos años, se estima que para 2050 la mortalidad anual asociada con estas infecciones podría alcanzar los 10 millones, convirtiéndose en la primera causa de muerte a nivel mundial, seguida del cáncer y diabetes (Sosa, Hernández, O. *et al.*, 2019; Bassetti, M. 2017; OMS 2017; O'Neill, J. 2016).

Por otro lado, la BBC (2022), emitió una nota donde decía que en el año 2019 más de 1,2 millones de personas murieron en todo el mundo por infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos, cifra que equivale a un promedio de casi 3,500 fallecimientos al día.

Con todo, el panorama se torna aún más crítico cuando llega la pandemia por COVID-19 pues según Urtaza, S. y Giambra, T. (2022), al comienzo de la misma la gran mayoría de personas hospitalizadas por COVID fueron tratadas con antibióticos. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que aproximadamente en el 90% de los casos no existía co-infección bacteriana (Langford, B. *et al.*, 2020) y que por lo tanto en la mayoría de los casos los antibióticos fueron utilizados innecesariamente, contribuyendo así al aumento de bacterias resistentes a los mismos. Además, esto último se respalda con cifras más recientes publicadas por Naddaf, M. (2024) quien establece que para el 2050 la mortalidad anual asociada con estas infecciones podría ascender a los 40 millones. Derivado de lo anterior, la Organización Mundial de la Salud (OMS) destaca la necesidad urgente de desarrollar nuevos antibióticos frente a las principales bacterias patógenas (Meza, M. E. *et al.*, 2022).

2.7 Infecciones asociadas a la atención sanitaria

Según la OMS, las infecciones asociadas a la atención sanitaria (IAAS), antiguamente denominadas infecciones nosocomiales; corresponden a todo proceso infeccioso general o localizado que ocurre como evento adverso, no intencional de la atención médica y que no estaba presente, ni incubándose al momento del ingreso del paciente a un hospital o a algún otro centro de atención médica (Pabón, D. *et al.*, 2024).

Las IAAS son causadas por una variedad de organismos, incluidas bacterias, hongos, virus y parásitos. En cuanto a su origen, estas pueden estar relacionadas con fuentes endógenas (microbiota del paciente) o exógenas, e incluso como resultado del uso frecuente y poco regulado de los antibióticos. Así mismo, los pacientes con alguna enfermedad crónica, como cáncer, leucemia, diabetes mellitus, insuficiencia renal o síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), tienen una mayor vulnerabilidad a las infecciones por agentes patógenos oportunistas (Instituto Nacional de Salud [INS], 2021).

Entre las IAAS más habituales se consideran las heridas quirúrgicas, las del tracto urinario y las del tracto respiratorio. Según la OMS, la mayor incidencia de infecciones nosocomiales se da en la Unidades de Cuidado Intensivo (UCI), área de cirugía y ortopedia de urgencia (Flores, M. M. 2023).

2.8 Reservorios y transmisión de bacterias causantes de IAAS

2.8.1 De la flora permanente o transitoria del paciente (infección endógena)

El cuerpo humano presenta una gran variedad de micronichos, principalmente en: la piel, boca, ojos, vías respiratorias, intestino, vías urinarias y genitales. Cada uno de estos sitios posee una microbiota específica con características y funciones muy diversas pero que en general está conformada en su mayoría por bacterias y en menor medida, por hongos,

arqueas y virus (Uzcátegui, O. 2016; Cervantes, R. M. y Sánchez, G. 2017), de manera que la relación entre las células que conforman nuestro microbioma y las células que forman nuestro cuerpo es de 10:1, es decir, que por cada célula de nuestro cuerpo, contamos con 10 células microbianas (Costello, E. K. *et al.*, 2009).

En condiciones óptimas, la microbiota se encuentra en equilibrio constante ofreciendo beneficios al huésped a través de una serie de funciones fisiológicas como la fermentación de carbohidratos complejos en ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el butirato que aporta energía a las células de nuestro intestino y además tienen propiedades antiinflamatorias; contribuyen a la síntesis de vitaminas K, B₁₂, (que intervienen en la coagulación de la sangre), biotina, ácido fólico y pantoténico, además de la síntesis de aminoácidos a partir de amoníaco o urea (Guillot, C. 2018). Al igual que la microbiota intestinal, la microbiota de la piel también desempeña funciones importantes; algunos microorganismos han evolucionado para comer piel muerta, otros transforman los aceites que producen las células de la piel en una crema hidratante natural (Trivedi, B. 2012). Las bacterias metilotróficas forman parte de la flora bucal normal y estas son capaces de consumir compuestos metilo responsables del mal aliento y que son producto de la degradación natural de aminoácidos sulfurados en la boca (Marcano, D. 2008). En general, las bacterias comensales que son los microorganismos que más predominan en la microbiota, colaboran con nuestro sistema inmune, no sólo compitiendo con especies exógenas con potencial patógeno por las superficies a colonizar o por los nutrientes (Calderón, X. y Guerrero, A. 2019; Cervantes, R. M. y Sánchez, G. 2017), sino también mediante la producción de bacteriocinas que actúan de forma específica contra bacterias patógenas (Gallo, R. L. y Nakatsuji, T. 2011; Guillot, C. 2018). En el estricto sentido, la microbiota intestinal es esencial para el desarrollo adecuado del sistema inmunológico (Bouskra, D. *et al.*, 2008). Sin embargo, al igual que en cualquier ecosistema, la influencia de múltiples factores puede modificar la población de alguno de estos organismos y ocasionar un desequilibrio en la microbiota (disbiosis) teniendo un impacto negativo en el cuerpo humano. Por ejemplo, cuando se requiere de una terapia antibiótica frente a un problema de acné, se debe considerar que ésta eliminará también nuestros comensales, alterando el equilibrio en las comunidades microbianas de la piel y en consecuencia, aumentando el riesgo de colonización y sobrepoblación de bacterias

indeseables como *Staphylococcus aureus* (Villarreal, J. 2013; Puma, J. P. *et al.*, 2019), responsable de enfermedades como el acné, dermatitis atópica y psoriasis (Trivedi, B. 2012). Lo mismo puede ocurrir en el intestino, donde un desbalance en la microbiota se vincula con trastornos intestinales (Frank, D. *et al.*, 2007), alteraciones metabólicas, enfermedades autoinmunes, alergias y la susceptibilidad a la infección y la eficacia de tratamientos farmacológicos (Pascual, I. *et al.*, 2022), e incluso con la obesidad (Cox, A. *et al.*, 2015).

Otros factores que permiten que microorganismos normalmente inofensivos o incluso beneficiosos se conviertan en agentes causantes de enfermedades, es la presencia de dispositivos médicos o heridas quirúrgicas que pueden servir como puntos de entrada para bacterias de la piel. Un ejemplo de ello, es *Staphylococcus epidermis*, una especie de bacteria Gram positiva que forma parte de la microbiota normal de la piel y mucosas en los seres humanos, sin embargo, su capacidad para formar biopelículas en superficies abióticas, como las que se encuentran en los dispositivos médicos implantables (válvulas cardíacas, catéteres venosos centrales, prótesis ortopédicas) y viajar a través del torrente sanguíneo, le confieren la capacidad de causar infecciones en otros órganos. Una vez que *S. epidermidis* ha ingresado al interior del huésped, es capaz de adherirse a células epiteliales y resistir a la respuesta inmunitaria, así como a la actividad de los antibióticos (Clínica Universidad de Navarra, 2003; Zimmerli, W. y Moser, C. 2012).

Lo mismo ocurre con *S. aureus*, una bacteria que está presente en la nariz y piel de forma transitoria o temporal y que a menudo causa infecciones oportunistas en la piel, pero también pueden provocar neumonía, infecciones de las válvulas cardíacas e infecciones óseas en virtud de la misma facultad que posee *S. epidermis* de formar biopelículas y acumularse en el material sanitario implementado en el organismo (Bush, L. 2023). Asimismo, *Pseudomonas aeruginosa* causa varias infecciones oportunistas en la piel y en tejido blando en pacientes con quemaduras, y neumonía en individuos con fibrosis quística (Becerra, G. *et al.*, 2009).

Lo anterior se relaciona con la capacidad de ciertos microorganismos de la microbiota para colonizar otros órganos, adaptarse y multiplicarse, dando lugar a infecciones. *Escherichia coli* no es la excepción de esta situación, esta es una bacteria Gram negativa

residente del tracto digestivo de las personas sanas, la cual puede invadir el sistema urinario y multiplicarse desde la uretra hasta el riñón causando más del 95% de las infecciones urinarias (Alejo, A. 2014). Por otro lado, *Streptococcus pneumoniae* puede formar parte de la flora comensal de las vías respiratorias superiores, a partir de esta localización y cuando las barreras defensivas naturales se alteran, el neumococo es capaz de producir enfermedad como la sinusitis y cuando alcanza el parénquima pulmonar da origen a la neumonía (Llor, C. *et al.*, 1996).

Citando otro ejemplo respecto a condiciones fisiológicas que pueden causar un desequilibrio en la microbiota tenemos que en la edad fértil, los estrógenos aumentan la producción de glucógeno en las células de la mucosa vaginal, lo que propicia energía a los lactobacilos y estos a su vez producen ácido láctico, que mantiene el pH vaginal en un rango óptimo (entre 4 y 5), controlando el crecimiento de bacterias oportunistas y patógenas. Durante la menopausia, los niveles de estrógenos son más bajos, lo que reduce la cantidad de lactobacilos y eleva el pH vaginal (Agüero, S. 2019). El aumento de pH por la menstruación, también dificulta el crecimiento de lactobacilos mientras que el sangrado menstrual proporciona nutrientes a bacterias como *Gardnerella vaginalis* o *Prevotella*, que cuando se convierten en dominantes pueden inducir alteraciones como la vaginosis (Martín, R. *et al.*, 2008). Complementariamente, tanto los dispositivos intrauterinos así como los espermicidas inhiben el desarrollo de los lactobacilos, favoreciendo así la aparición subsiguiente de vaginosis y vaginitis (Wilson, J. 2004).

2.8.2 De la flora de otro paciente o miembro del personal y del ambiente (infección exógena)

Las bacterias se pueden transferir de un paciente a otro por medio de gotitas de saliva generadas al toser o al hablar (las bacterias de menos de 10 µm de diámetro permanecen en el aire por varias horas de la misma manera que el polvo fino). Tal es el caso de *Corynebacterium diphtheria*, un bacilo Gram positivo que da lugar a la difteria; enfermedad que afecta la garganta y las vías respiratorias superiores. Esta enfermedad se transmite por contacto físico o por inhalar las secreciones aerosolizadas por tos o

estornudos de individuos infectados (OPS, s.f.). También, la propagación de bacterias puede ser por contacto directo o indirecto a través del personal sanitario que eventualmente transfiere bacterias a otros pacientes durante la atención médica; objetos contaminados (incluso el equipo médico); los visitantes u otros focos de infección ambientales (agua o alimentos). Microorganismos Gram negativos como *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp. a menudo se aíslan del agua, zonas húmedas e incluso de productos estériles o desinfectados (OMS, 2003). Un caso particular de lo citado anteriormente es *P. aeruginosa* que ha mostrado resistencia a desinfectantes usados para el tratamiento del agua, como el cloro, las cloraminas, el ozono y el yodo (González, M, I. *et al.*, 2014; INSST, 2022).

Siguiendo con el tema de los reservorios ambientales, *Clostridium tetani*, bacteria responsable del tétanos y productora de esporas, es un comensal transitorio de la microbiota intestinal ya que se ha aislado ocasionalmente de heces humanas y de animales (Armijo, J. *et al.*, 2012), aunque también se puede encontrar en el suelo contaminado con materia orgánica, en la superficie de la piel y de herramientas oxidadas como clavos, agujas, etc. (OMS, 2024). Sin embargo, la enfermedad ocurre cuando las esporas ingresan al organismo a través de una herida abierta o quemadura liberando una toxina llamada tetanospasmina que ocasiona espasmos musculares intensos e intermitentes y rigidez generalizada (Manrique, G. *et al.*, 2021).

2.9 Patógenos ESKAPE

Por otro lado, la OMS (OMS, 2017, 2024), ha creado una lista de bacterias prioritarias dentro de las infecciones nosocomiales con alta morbilidad y mortalidad que incluye a los “patógenos ESKAPE”. ESKAPE es un acrónimo que deriva de la primera letra del nombre científico de cada una de las siguientes bacterias: *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (VRE), *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y vancomicina (MRSA/VRSA), *Klebsiella pneumoniae* resistente a las cefalosporinas, *Acinetobacter baumannii* resistente a los carbapenémicos, *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos y especies de *Enterobacter* resistentes a las

cefalosporinas de tercera generación y carbapenémicos. Estas bacterias se caracterizan no solo por dar lugar a la mayor parte de infecciones nosocomiales, sino también porque representan paradigmas de patogénesis, transmisión y resistencia a una gran cantidad de antibióticos (Rise, L. 2008).

En México, las principales bacterias del grupo ESKAPE asociadas a infecciones nosocomiales son *Klebsiella spp.* resistentes a múltiples fármacos (MDR) y productoras de betalactamasa de espectro extendido (BLEE), *Enterobacter spp.* productoras de BLEE, *A. baumannii* y *P. aeruginosa* MDR (incluso resistente a los carbapenémicos), *S. aureus* resistente a la meticilina y *E. faecium* resistente a vancomicina (Cerezo, S. *et al.*, 2020).

2.10 Patógenos multirresistentes en la comunidad

La mayoría de infecciones causadas por bacterias multirresistentes son de origen nosocomial (Matta, R. *et al.*, 2018), sin embargo, los países en desarrollo se enfrentan además al desafío de los patógenos multirresistentes en la comunidad, como *Mycobacterium tuberculosis*, neumococos, *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) o *Salmonella* (Amabile, C. 2010). Por lo general, los brotes en la comunidad son el resultado de la mala higiene y transmisión de fomites (teléfonos, bolígrafos, monedas y billetes, etc) entre individuos o por exposición al ambiente, aunque también existen otras características que se abordarán más adelante que son propias de entornos vulnerables y pueden crear condiciones ideales para la selección, mutación y transferencia de genes responsables de la resistencia antibacteriana.

Amabile (2010) tras un análisis de resultados de encuestas representativas sobre la susceptibilidad a patógenos adquiridos en la comunidad, señala que México (donde las enfermedades respiratorias son la principal causa de consulta médica y el patógeno bacteriano más común es *Streptococcus pneumoniae*), es citado a menudo como el país latinoamericano con la prevalencia más alta de neumococos no sensibles a la penicilina con un 57% en el año 2007. Por otro lado, *Salmonella* y *Shigella* son causas comunes de

enfermedades en los países en desarrollo. En México (2001-2002), *Salmonella* presentó altos niveles de resistencia a la tetraciclina (82%), cotrimoxazol (66%) y ampicilina (66%). Las cepas de *Shigella* tuvieron tendencias similares en 2001-2002, con 100% de resistencia a la tetraciclina y 81% a cotrimoxazol y ampicilina. Respecto a *E. coli* uropatógena, esta presenta una alta prevalencia de resistencia hacia tres fármacos de “primera elección”; ampicilina (74%), cotrimoxazol (60,1%) y ciprofloxacina (32,6%). Por último, el autor menciona que la tuberculosis es una “enfermedad de pobres”, lo que coincide con el informe de la OMS (OMS, 2016), donde se reporta que más del 95% de los casos y muertes por tuberculosis se producen en países en vías de desarrollo. México no es la excepción a lo antes mencionado, pues en 2022 la tasa de incidencia por tuberculosis en este país fue de 28 mil casos por cada 100,000 habitantes y la mayor concentración de casos se presentó al norte del país donde los flujos migratorios son elevados según un reporte de la Secretaría de Salud (2023).

2.11 Factores asociados con el origen y diseminación de la resistencia a los antibióticos

2.11.1 Uso desmedido y poco regulado de los antibióticos en la medicina humana

El uso inapropiado de los antibióticos se considera la primera causa de selección y proliferación de bacterias resistentes. Este fenómeno se ve favorecido por tratamientos deficientes donde los medicamentos genéricos, los cuales suelen ser más económicos, tienen una actividad antibiótica significativamente menor que su contraparte “original” (Lambert, P. y Conway, B. 2003). Además, la automedicación que se puede ver influenciada por una dosis insuficiente del antibiótico, así como un tratamiento incompleto, permiten que las bacterias que han estado expuestas al antibiótico pero que son intrínsecamente resistentes sobrevivan (Ventola, C. 2015). Cuando el antibiótico no se restringe a infecciones bacterianas sino que se emplean para infecciones virales (como el resfriado común o la gripe), esto también contribuye a la selección de bacterias resistentes de entre nuestras bacterias comensales. De igual manera, el uso de antibióticos

de amplio espectro para combatir infecciones menos graves, aunado a la prescripción sin identificar previamente el microorganismo específico o realizar antibiogramas, puede reducir posteriormente la eficacia del tratamiento frente a infecciones más virulentas y eliminar a la población susceptible, dejando espacio para que bacterias intrínsecamente resistentes se multipliquen (Sánchez, C. 2006).

2.11.2 Uso desmedido y poco regulado de los antibióticos en la ganadería, avicultura y agricultura

Por otra parte, el uso indiscriminado de antibióticos en la ganadería y avicultura como estimuladores del crecimiento, profilácticos y para el tratamiento de infecciones, con cifras de consumo que doblan las de uso humano (Errecalde, J. 2004; Luyt, C. *et al.*, 2014) ha dado lugar a la aparición de patógenos resistentes a antibióticos en la producción alimentaria. A esto se suma el uso de antibióticos en la agricultura, donde muchas enfermedades que afectan a los cultivos son de origen bacteriano. Sin embargo, los inconvenientes son similares a los ya mencionados, con el agravante de que los antibióticos, además de incorporarse a la cadena alimenticia, permanecen en el suelo y pueden alcanzar las capas freáticas. Por ello, National Health and Medical Research Council (2005) han recomendado tomar algunas precauciones como el uso de antibacterianos que se degraden rápidamente en el medio ambiente ya sea química o microbiológicamente y no usarlos en casos innecesarios o cuando hay otras alternativas (Sánchez, C. 2006). En este sentido, los genes de resistencia a antibióticos (ARGs) son prevalentes en las bacterias transmitidas por los alimentos, tales como los vegetales (Perry, J. *et al.*, 2014). Aunque, el mero hecho de que las plantas puedan adquirir ARGs es un riesgo en sí mismo. En ambos casos, los ARGs pueden llegar hasta los seres humanos a través de la alimentación y transferirse a las bacterias de la microbiota que reside en nuestro sistema digestivo (Han, B. *et al.*, 2022).

2.12 Resistencia a los antibióticos en el ambiente

El papel que cumplen los ecosistemas acuáticos, terrestres y la atmósfera en la presencia, diseminación y aumento de la resistencia bacteriana puede ser estudiado a partir de dos ámbitos diferentes: la biodiversidad microbiana presente en estos ambientes y el impacto de las actividades antropogénicas sobre estos ecosistemas.

El ambiente acuático y terrestre son el hábitat natural de un gran número de seres vivos, incluyendo bacterias. Las bacterias presentes en estos ecosistemas interactúan constantemente con antibióticos no metabolizados y/o bacterias resistentes así como con ARGs y elementos genéticos móviles (EGM) provenientes del estiércol que se utiliza para añadir nutrientes a los suelos (Bengoetxea, A. *et al.*, 2023; Marshall, B.M. y Levy, S. B. 2011); de aguas residuales domésticas; industriales (Marti, E. *et al.*, 2014); de granjas y hospitales, estas últimas contribuyen en gran medida a su diseminación en el medio ambiente, incluso después del tratamiento (Buelow *et al.*, 2020). De manera que, los residuos de antibióticos provenientes de las aguas residuales de hospitales ejercen una presión selectiva sobre la población de microorganismos intrínsecamente resistentes y reducen la población susceptible. Por otro lado, la presencia de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones, integrones) en aguas residuales favorece la transferencia horizontal de ARGs a poblaciones bacterianas presentes en el ambiente en virtud de que los EGM pueden permanecer en el ambiente durante cierto tiempo dependiendo de las condiciones aún cuando las bacterias que los contienen se lisan y mueren (Aslam *et al.*, 2021).

2.12.1 Resistencia a los antibióticos en el agua

Los peces y otros animales acuáticos poseen una microbiota que cumple un papel fundamental relacionado con el metabolismo e inmunidad de estos animales, sin embargo, esta microbiota también se ve expuesta constantemente a los antibióticos y a la interacción con bacterias ambientales; lo que aumenta la probabilidad de transferencia de

material genético asociado a resistencia antibiótica (Kümmerer, K. 2009). En peces y otros animales han sido detectadas un sinnúmero de bacterias resistentes a los antibióticos, y un gran número de ellas están asociadas a enfermedades en el hombre; por ejemplo, en muestras de branquias e intestino de peces se han identificado bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* con alta frecuencia de resistencia a la ampicilina, estreptomicina y tetraciclina (Miranda, C. D y Zemelman, R. 2001). Así mismo, se han detectado en heces fecales de pingüinos la presencia de bacterias resistentes a varios antibióticos (Miller, R. V. *et al.*, 2009; Meza, K. 2013). El ambiente terrestre no está exento de bacterias resistentes a los antibióticos, sino que estas se han aislado de una variedad de animales, incluidos mamíferos como jabalíes (Poeta, P. *et al.*, 2007) y roedores (Gilliver, M.A. *et al.*, 1999), aves (Radhouani, H. *et al.*, 2009) e insectos (Kadavy, D. R. *et al.*, 2000); los animales adquieren estas bacterias al hurgar en residuos domésticos, desechos orgánicos y/o superficies contaminadas o bien, pueden formar parte de la flora comensal normal de estos como lo demuestran estudios metagenómicos del DNA microbiano intestinal de la polilla gitana donde se identificaron varios genes de resistencia a los antibióticos (Allen, H. K. 2009).

2.12.2 Resistencia a los antibióticos en el suelo

De manera general podemos decir que un suelo con pH neutro y alta humedad es rico en nutrientes (Han *et al.*, 2022), especialmente si hablamos de la rizosfera donde los compuestos orgánicos exudados por las plantas son utilizados por las bacterias como fuente de carbono (Berg, G. *et al.*, 2005), condiciones que favorecen la densidad y actividad microbiana. Esto a su vez, intensifica la competencia entre microorganismos por los recursos disponibles, un aspecto importante si consideramos que muchas bacterias del suelo producen antibióticos de manera natural (Reinoso, Y. *et al.*, 2006) como mecanismo de defensa, por lo que esta dinámica puede convertirse en un problema, ya que la presión selectiva puede favorecer que otros microorganismos adquieran o desarrollen mecanismos de resistencia a los antibióticos que producen estas bacterias, mismos mecanismos que pueden ser transferidos a aquellas con potencial de causar

enfermedades al hombre tanto patógenas como oportunistas, pues los ambientes ricos en nutrientes y las altas temperaturas derivadas del calentamiento global, además, aumentan la actividad metabólica de las bacterias, lo que incrementa la probabilidad de transferencia horizontal de genes (THG) (Rahbe, *et al.*, 2023). Por ejemplo, mecanismos de resistencia antimicrobiana detectados en patógenos de entornos clínicos tales como las quinasas modificadoras de aminoglucósidos, probablemente tienen su origen a partir de bacterias que viven en el suelo (Davies, J. 1994). Aunado a esto, varias bacterias estrechamente relacionadas con importantes patógenos nosocomiales como *P. aeruginosa* son colonizadores de la rizosfera muy prominentes. Además, la rizosfera alberga especies bacterianas que se ha informado que causan infecciones en la piel y heridas (*Bacillus cereus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas* spp.) e infecciones del tracto urinario (*P. vulgaris*, *B. cepacia*) (Berg, G. *et al.*, 2005). Por otro lado, la presencia de metales pesados se relaciona positivamente con la presencia de ARGs, dado que en muchas ocasiones los ARGs y los genes de resistencia a metales pesados (MRGs) se encuentran ubicados en el mismo fragmento de DNA (Peng, S. *et al.*, 2021). Como hemos visto, las especies de bacterias que existen en el suelo, interactúan con una multitud de compuestos químicos producidos por otros microorganismos, plantas, animales, así como las derivadas de procesos abióticos como son lluvia, temperatura, pH, humedad y de las actividades antropogénicas; por ejemplo calentamiento global, la presencia de metales pesados, contaminantes, aguas residuales. Frente a esta exposición a lo largo del tiempo, no es sorprendente que las bacterias hayan desarrollado maquinarias complejas para detectar, responder y metabolizar diversas moléculas con actividad antimicrobiana, promoviendo así la adquisición o evolución de elementos de resistencia altamente específicos (Wright, G. 2010). Por lo anterior, se considera que el suelo actúa como “caldo de cultivo” de sustancias antimicrobianas, razón por la cual es considerado como la principal fuente potencial para la obtención de nuevos antibióticos, precisamente por la amplia diversidad de microorganismos que habitan en sus estratos (Arranz, A. 2017). El problema es que son bacterias no cultivables, es decir, que no pueden crecer en condiciones de laboratorio, sino que únicamente pueden hacerlo en su medio (Ling, L. *et al.*, 2015).

2.12.3 Resistencia a los antibióticos en el aire

La contaminación química, una característica propia de los países en desarrollo debido a la falta de regulación o corrupción, puede desempeñar un papel en la selección de bacterias resistentes. El ozono, por ejemplo, es un contaminante de aire común en las grandes ciudades mexicanas, derivado de las reacciones fotoquímicas de los gases de escape de los automóviles y el gas propano doméstico, y se ha demostrado que selecciona bacterias con mecanismos de respuesta oxidativa que también confieren un fenotipo multirresistente (Jiménez, G. *et al.*, 2001). Además, la contaminación del aire causada por materia particulada (PM_{2.5}), la cual contienen bacterias multirresistentes y ARGs, se relaciona con un aumento de permeabilidad en las membranas fomentando así la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles que contengan estos genes, lo que se vuelve una vía de exposición a genes de resistencia para los seres humanos mediante su inhalación (Zhou, Z *et al.*, 2018).

A lo anterior se suma la falta de infraestructura adecuada, los animales callejeros y la gestión inadecuada de aguas residuales y de la basura, que en conjunto aumentan los niveles de contaminación cruzada.

2.13 Vías de adquisición de genes resistentes a los antibióticos

Existen tres principales vías de adquisición de genes resistentes a los antibióticos, cada una con sus propias particularidades.

La primera vía de resistencia se considera intrínseca, ya que, gracias a las técnicas de secuenciación masiva de miles de bacterias se ha corroborado que todos los microorganismos analizados presentan cierto grado de resistencia natural (intrínseca) a los antibacterianos, ya sea por la presencia de genes que codifican mecanismos de resistencia o porque carecen de la diana de acción donde deben actuar algunos antibióticos (Martínez, L. 2016). Bajo esta circunstancia, se lleva a cabo la transferencia vertical de genes por reproducción asexual (fisión binaria), donde los genes se transfieren

de generación en generación. De manera que, todas las bacterias de la misma especie son resistentes a ciertas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y sobrevivir en caso de que se emplee ese antibiótico (Pérez, D. 2017).

Por otro lado, las bacterias tienen la capacidad de incorporar DNA foráneo de bacterias resistentes de la misma o diferente especie a su genoma y sin necesidad de la reproducción asexual, lo que da lugar a la resistencia adquirida. La incorporación de DNA foráneo ocurre a través de la “transferencia horizontal de genes (THG)” (Rodríguez, R. E. *et al.*, 2020) y este proceso a su vez puede llevarse a cabo mediante tres vías diferentes: la conjugación (asociada a ciertos tipos de plásmidos), transducción (dependiente de bacteriófagos) o transformación (captura de DNA foráneo que se encuentra principalmente en el medio ambiente) (Martínez, L. 2016; Rodríguez, R. E. *et al.*, 2020). A través de la THG una bacteria puede adquirir resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Pérez, D. 2017). Un ejemplo de ello es la vancomicina, un antibiótico que en su momento fue eficaz para tratar infecciones estafilocócicas resistentes a la meticilina, *Clostridium difficile* y enterococos. Sin embargo, eventualmente aparecieron cepas resistentes a la vancomicina, resistencia que se atribuye al gen *vanA*, adquirido por conjugación de *Enterococcus faecalis* (Becerra, G. *et al.*, 2009). Por último, la adquisición de genes resistentes incluye también mutaciones en genes cromosómicos o plasmídicos (Musser, M. *et al.*, 2020).

De lo anterior, podemos concluir que las bacterias resistentes (mutantes) surgen independientemente de la presencia o ausencia del antibiótico en el entorno, más bien es el resultado de las alteraciones en el material genético que pueden ocurrir de manera natural durante el proceso de replicación del DNA. El antibiótico, por su parte, actúa como elemento que lleva a cabo el proceso de selección, favoreciendo a las bacterias resistentes y eliminando las bacterias sensibles (Martínez, L. 2017).

2.14 Definición de antibiótico

Los antibióticos son moléculas naturales (producidas por plantas, bacterias, hongos, actinobacterias), sintéticas o semisintéticas, capaces de inhibir el crecimiento o inducir la muerte bacteriana (Jackson, L. *et al.*, 1998) tras ejercer una acción específica sobre algunas estructura o función de los microorganismos.

De manera general, los antibióticos se pueden clasificar en tres grandes grupos de acuerdo a su acción bacteriostática, bacteriolítica o bactericida. Los primeros inhiben el crecimiento bacteriano (efecto reversible), los segundos inducen la muerte celular bacteriana por lisis y los últimos también inducen la muerte celular, pero sin lisis (Blair, J. *et al.*, 2015; Sánchez, M. A. *et al.*, 2019). Sin embargo, algunos antibióticos pueden presentar diferente efecto sobre las bacterias dependiendo del microorganismo en el que se empleen, por ejemplo, la penicilina G suele ser bactericida para cocos Gram positivos, pero sólo es bacteriostático contra *S. faecalis* (Jackson, L. *et al.*, 1998).

2.15 Clasificación de antibióticos según su origen

Naturales o biológicos: Sustancias químicas obtenidas de organismos vivos como plantas, hongos y bacterias. Un ejemplo de ello es la penicilina G, compuesto descubierto por Alexander Fleming, a partir de una cepa de *Penicillium notatum* (Vigliarolo, L. 2020).

Semisintéticos: Compuesto que derivan de moléculas naturales pero que son modificados químicamente en el laboratorio para mejorar su efectividad. Por ejemplo, la meticilina, antibiótico activo frente a *S. aureus* productor de beta-lactamasas. (Vigliarolo, L. 2020).

Sintéticos: Compuestos creados totalmente bajo condiciones de laboratorio. Por ejemplo, las sulfamidas, antibiótico bacteriostático, activo sobre Gram positivos y negativos (Lopardo, H. A. 2020).

2.16 Clasificación de antibióticos según su espectro de acción

Amplio: Aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes (Seija, V. y Vignoli, R. 2006).

Reducido: Antibióticos activos sobre un grupo reducido de especies (Seija, V. y Vignoli, R. 2006).

2.17 Blanco de acción de los antibióticos

2.17.1 Inhibidores de la formación de la pared celular bacteriana

Las bacterias son microorganismos hiperosmolares (alta concentración de sales, azúcares, aminoácidos y proteínas) con respecto a los tejidos y el fluido intersticial de los mamíferos, por lo tanto, para mantener su integridad cuando infectan al hombre, necesitan una pared celular rígida (Jackson, L. *et al.*, 1998). En bacterias Gram positivas, la pared celular se encuentra inmediatamente accesible y constituye un blanco ideal. Esto no ocurre en bacterias Gram negativas, donde la pared celular es más delgada y además se encuentra rodeada por una membrana externa que actúa como barrera protectora impidiendo o dificultando el paso del antibiótico, especialmente a aquellos que no pueden atravesar la membrana externa o que requieren canales específicos para acceder al blanco (Sánchez, C. 2006).

En esta sección no consideraremos la membrana externa, ya que para entender cómo actúan los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular, basta con comprender cada una de las 5 etapas de síntesis del principal componente de la pared celular: el peptidoglicano.

Primer etapa: En el citoplasma bacteriano, se sintetizan por separado los diferentes elementos (UTP, PEP y NADPH) que darán lugar a los precursores del peptidoglicano: el N-acetil-glucosamina-1-fosfato (NAG) y el ácido N-acetil-murámico (NAM). Cabe mencionar que NAM es un derivado de NAG. De manera que el azúcar N-acetilglucosamina-1-fosfato “ataca” a uridintrifosfato (UTP), y desplaza el pirofostato, el cual se une al C1 de N-acetil-glucosamina-1-fosfato para ahora convertirse en UDP-N-

acetil-glucosamina (UDP-NAG). A partir de aquí, algunos de los UDP-NAG se usan como precursores de la N-acetil-glucosamina (que ya puede entrar a la segunda etapa de la síntesis de la pared bacteriana), mientras que otros se convierten en ácido UDP-N-acetil-murámico (UDP-NAM). UDP-NAG se convierte en UDP-NAM añadiendo un grupo lactilo. Durante esta reacción, la enzima enolpiruvato transferasa desplaza un fosfato del carbono α del fosfoenolpiruvato (PEP) para que el derivado de enol (enolpiruvato) resultante se añade al grupo hidroxilo del C3 del UDP-NAG, formando el UDP-N-acetilglucosamina-3-enolpiruvatoéter. Después, el derivado de enol se reduce a una porción de lactilo mediante el NADPH, en una reacción llevada a cabo por la enzima UDP-N-acetilglucosaminicenol-piruvato reductasa para formar el ácido UDP-NAM (Peralta, C. 2025).

2.17.1.1 Fosfomicina

Antibiótico bactericida de origen natural, actualmente producido por síntesis química, de bajo peso molecular, hidrosoluble y de amplio espectro que incluye bacilos Gram negativos y Gram positivos y *Staphylococcus* spp. (excepto *S. saprophyticus* y *S. capitis*) (Lopardo, H.A. 2020). Este antibiótico actúa bloqueando la primera etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana al inhibir la enzima enolpiruvato transferasa, enzima encargada de la adición del derivado de enol a la molécula de UDP-NAG. Esta reacción se inhibe porque la fosfomicina al ser un análogo estructural del fosfoenol piruvato, se une covalentemente con la enzima. La fosfomicina atraviesa la membrana externa mediante las porinas; debido a su pequeño tamaño pasa la barrera de peptidoglicano sin dificultad y finalmente atraviesa la membrana citoplasmática a través de sistemas de transporte activo del D-glucosa-6-fosfato, inducible. Por ello, a los medios o discos para estudiar la sensibilidad de las bacterias a fosfomicina debe añadirse glucosa-6-fosfato (Calvo, J. y Martínez, L. 2009).

Segunda etapa: Al C3 del ácido UDP-NAM se le van uniendo aminoácidos secuencialmente (frecuentemente 5) hasta formar una cadena de pentapéptidos en la que se alternan las formas Levo (L) y Dextro (D), y en la que los dos últimos aminoácidos

conforman el dipéptido dextro (D)-alanin-(D)-alanina (Pírez, M. y Mota, M. 2006). Cabe destacar que los dos últimos aminoácidos de la cadena pentapéptidica se encuentran en su forma Levo (L)-alanina antes de unirse a la cadena, por lo que para unirse adecuadamente, la enzima racemasa transforma la L-alanina en D-alanina. Esto es importante porque la configuración Dextro (D) hace más resistente a la cadena pentapéptida ante la desactivación por las proteasas. Posteriormente, la enzima D-alanina-sintetasa forma dímeros de D-alanina, lo que facilita su unión a la cadena peptídica del monosacárido (Calvo, J. y Martínez, L. 2009) y el avance a la siguiente etapa de la síntesis de la pared celular.

2.17.1.2 Cicloserina

Antibiótico análogo a la base estructural de la D-alanina, por lo que actúa inhibiendo competitivamente la actividad de la L-alanina-racemasa y de la D-alanina sintetasa (Calvo, J. y Martínez, L. 2009).

Tercer etapa: El NAG y el pentapéptido UDP- NAM deben ser movilizados del citoplasma hacia el exterior de la membrana citoplasmática (MC), para ello, la MC posee un transportador lipídico que permite el transporte y ensamblaje de sustancias que, como los azúcares, son hidrofílicas, y no podría pasar por sí mismas la barrera hidrofóbica de la membrana: el bactoprenol (undecaprenil-fosfato o lípido P/Lip P) (Láñez, E. 2006)

Ambos azúcares se mueven por difusión a la superficie citoplasmática de la membrana y ahí, ocurren tres cosas:

1. El bactoprenol desfosforila al C1 de UDP-NAM pentapéptido, liberando UMP al citoplasma para posteriormente formar un enlace pirofosfato con el C1 del ahora UMP-NAM pentapéptido. Esta reacción da como resultado Lip-P-P-NAM (pentapéptido).
2. NAG se une a NAM (que ya se encuentra unido al bactoprenol) cuando el C4 hidroxilo de NAM se une al C1 de NAG mediante un enlace B(1-4), propiciando la liberación de UDP de NAG al citoplasma por lo que NAG queda libre de UDP pero ahora

se encuentra unido a Lip-P-P-NAM (pentapéptido) formando el disacárido Lip-P-P-NAM (pentapéptido)-NAG, precursor del PG.

3. Una vez unidos los monosacáridos al bactoprenol, este se da la “vuelta” desde la capa interna hasta la externa de la MC (en una especie de flip-flop), de modo que el disacárido Lip-P-P-NAM(pentapéptido)-NAG quede expuesto hacia el exterior de la MC donde hay una cadena preexistente que a su vez está unida a otra molécula de Lip-P-P.

Cuarta etapa (transglucosidación): Consiste en la unión del C4 hidroxilo de NAG de cada unidad disacárida en formación (con su pentapéptido) unida a su respectivo Lip-P-P (undecaprenil), con el C1 de NAM de la cadena preexistente que a su vez está unida a otra molécula de Lip-P-P (undecaprenil), reacción que libera al Lip-P-P (undecaprenil en forma pirofosforilada) del C1 de NAM de la cadena preexistente. Esta reacción es catalizada por una transglucosilasa ligada a la membrana (PBP-1a y PBP-1b) para que posteriormente una fosfatasa elimine el fosfato terminal del Lip-P-P liberado, regenerándose el undecaprenil-fosfato.

No obstante, la cadena en formación sigue anclada a la membrana por el undecaprenil (Lip-P-P), por lo que una pirofosfatasa ligada a la membrana, hidroliza el lípido-P-P liberando un fosfato y dando fin a la transglucosilación, dado que con la liberación del fosfato se vuelve a formar el Lip-P (bactoprenol), el cual queda disponible para transportar nuevos precursores de PG al exterior de la membrana (Láñez, E. 2006; Peralta, C. 2025).

2.17.1.3 Polipéptidos (bacitracina, polimixinas)

Estos antibióticos son activos principalmente en bacterias Gram positivas, pues tiene dificultades de permeabilidad en las bacterias Gram negativas (Martínez, D. 1982). Actúan uniéndose al bactoprenol pirofosforilado, e impide su desfosforilación por la fosfatasa, evitando así, que pueda utilizarse de nuevo en el transporte del disacárido-pentapéptido a través de la MC, hasta la pared en formación (Calvo, J. y Martínez, L. 2009).

Quinta etapa (transpeptidación): Consiste en la unión entre las cadenas pentapéptidas adyacentes del glicano en formación con el glicano aceptor (cadena paralela a la cadena en formación). De manera que el aminoácido (D-alanina) en la posición 4 del glicano en formación se une con una L-lisina (*S. aureus*) o ácido diaminopimélico (DAP) en la posición 3 del glicano aceptor. Cuando ocurre dicha unión entre las dos cadenas pentapéptidas el aminoácido en la posición 5 (D-alanina) del glicano en formación se ve desplazado (hidrolización). Además, la hidrólisis del enlace peptídico entre las dos L-alaninas terminales suministra la energía necesaria para que se puedan unir las dos cadenas adyacentes. Por lo que en cada reacción de transpeptidación es necesaria la liberación de la D-alanina terminal (5). Este proceso está mediado por transpeptidasas (PBP-1a y PBP-1b). La D-alanina terminal (5) del glicano aceptor que no participa en dicha unión también se elimina, pero este proceso lo lleva a cabo la carboxipeptidasa D-alanina (PBP-4, PBP-5 Y PBP-6) por lo que al final, se pasa de tener cadenas pentapéptidas a cadenas tetrapéptidas (Láñez, E. 2006; Peralta, C. 2025). Es decir, en cada reacción de transpeptidación se libera una D-alanina en la posición 5 y además, la hidrólisis del enlace peptídico entre las dos L-alaninas terminales suministra la energía necesaria para que se puedan unir las dos cadenas adyacentes. Este proceso está mediado por transpeptidasas también denominadas penicillin binding proteins (PBP-1a y PBP-1b). La D-alanina terminal (5) del glicano aceptor que no participa en estas uniones también se elimina, pero este proceso lo lleva a cabo la carboxipeptidasa D-alanina (PBP-4, PBP-5 Y PBP-6) por lo que al final, se pasa de una cadena pentapéptida a una cadena tetrapéptida (Láñez, E. 2006; Peralta, C. 2025).

2.17.1.4 Glicopéptidos (vancomicina, teicoplanina)

La vancomicina es un antibiótico bactericida que actúa sobre bacterias Gram positivas, actúa contra *Staphylococcus* meticilinoresistente de perfil hospitalario (SAMAR), *staphylococcus* coagulasa negativos meticilinoresistentes, *Corynebacterium JK* (multirresistente) y *Enterococcus* resistente a los betalactámicos y aminoglucósidos. La teicoplanina tiene una estructura similar a la vancomicina y un perfil de actividad similar.

Los glicopéptidos son activos además sobre *Streptococcus*, corinebacterias, *Bacillus* spp., algunas actinobacterias y *Clostridium* spp., incluido *Clostridium difficile* (Seija, V. y Vignoli, R. 2006). Su mecanismo de acción consiste en unirse al dipéptido de D-alanina mediante puentes de hidrógeno, bloqueando la hidrólisis del enlace peptídico entre las dos D-alaninas terminales por las transpeptidasas así como la liberación de energía que se requiere para la unión de las cadenas adyacentes y en consecuencia evitan la elongación del peptidoglicano (Calvo, J. y Martínez, L. 2009).

2.17.1.5 Betalactámicos (penicilina, cefalosporinas, monobactámicos, carbapenémicos)

Corresponden a un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico (Seija, V. y Vignoli, R. 2006; Gómez, J. *et al.* 2015). Además, constituyen la familia de antibióticos más utilizados en la práctica clínica, correspondiendo al 50% de todas las recetas médicas antibióticas en todo el mundo (Pérez, D. 2017). Son activos sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas y espiroquetas (Seija, V. y Vignoli, R. 2006). Recapitulando lo que pasa en la cuarta y quinta etapa de la síntesis de la pared celular (PG), las enzimas PBP tienen actividad transpeptidasa, transglucosidasa y carboxipeptidasa, por lo que pueden entrelazar los componentes del peptidoglicano. Los β -lactámicos bloquean estas enzimas porque el anillo β -lactámico tiene una estructura espacial similar a la del residuo acil-D-alanin-D-alanina de las cadenas adyacentes del peptidoglicano, que es el sustrato natural de las PBP (Calvo, J. y Martínez, L. 2009).

2.17.2 Inhibidores de la biosíntesis proteica

El mecanismo de biosíntesis de proteínas, también denominado traducción es un proceso que tiene lugar en los ribosomas por lo que no es de extrañarse que estos representen uno de los principales blancos de acción de los antibióticos. El ribosoma bacteriano se

compone de 3 moléculas de RNA ribosomal (RNAr), organizadas en una subunidad mayor (50S) y en otra menor (30S) (Lopardo, H. A. 2020).

La subunidad 30S contiene una molécula única de RNAr, denominada RNAr 16S que verifica la correcta “lectura” del código genético encriptado en el RNAm, por parte del RNAt. Mientras que la subunidad 50S está formada por una molécula de 23S RNAr, responsable de la catálisis de la formación de enlaces peptídicos. También, forma parte de la subunidad mayor una molécula 5S RNAr que tiene un papel estructural y estabilizador, ayudando a mantener la integridad de dicha subunidad (Laursen, B. *et al.*, 2005; Carbon, J. 1964).

Cada subunidad ribosomal tiene 3 sitios de unión para el RNAt, nombrados sitio A (aminoacil), que acepta el nuevo RNAt aminoacilado; el sitio P (peptidil), que sostiene el RNAt con la cadena polipeptídica en crecimiento y el sitio E (salida), que sostiene el RNAt deacilado antes de que abandone el ribosoma.

La traducción se divide en cuatro etapas diferentes:

Iniciación: La iniciación de una cadena polipeptídica en procariontes precisa de: (1) la subunidad ribosomal 30s; (2) el RNAm que mantiene fielmente las características de la información genética para el polipéptido que ha de sintetizarse; (3) el RNA de transferencia (RNAt) inicial (formilmetionil RNAt); (4) los factores de iniciación 1 (IF1), 2 (IF2), 3 (IF3); y (5) GTP (Gualerzi, C. y Pon, C.1990).

El proceso comienza en la subunidad 30S que se mantiene separada de la subunidad 50S mediante la acción de factor IF3 (Simonetti, A. *et al.*, 2008).

La subunidad 30s, específicamente la región complementaria de su RNA ribosómico 16S reconoce y se une a la secuencia Shine-Dalgarno que se encuentra justo antes del codón de inicio (generalmente AUG) del RNAm (William, J. *et al.*, 1987). Dicha unión permite la formación del complejo de iniciación 30s (30SIC). El factor IF2 cataliza la unión del RNAt inicial (formilmetionil RNAt) al complejo 30SIC y su correcto posicionamiento en el sitio P, una vez ahí el anticodón del RNAt inicial interactúa físicamente con el codón de inicio del RNAm (AUG). A su vez, el factor IF1 bloquea el sitio de unión del RNAt en A para que el RNAt inicial se posicione correctamente en el sitio P. Por lo que se

podría decir que el factor IF1 e IF2 cooperan entre sí para asegurarse de que el RNAt inicial sea el que ocupe el sitio P. Posteriormente, el factor IF2 estimula la unión de la subunidad 50s al complejo 30SIC. Dicho ensamblaje dispara la hidrólisis de la molécula de GTP unida a IF2. Finalmente, los factores de iniciación se desamblan del complejo 30SIC y la maquinaria continúa hacia elongación (Vallejo, P. 2010).

Elongación: Al final de la etapa de iniciación, un RNAt inicial cargado con N-formilmetionil se encuentra unido al codón inicial (AUG) del RNAm en el sitio P del ribosoma 70S y el sitio A se encuentra desocupado. Un nuevo RNAt cargado con un triplete específico de bases nitrogenadas (aminoacil-RNAt) es conducido al sitio A del ribosoma con ayuda del factor de elongación Tu (EF-Tu) y una molécula de GTP. En el sitio A, el anticodón (triplete de bases nitrogenadas) del RNAt nuevo se empareja con el codón del RNAm, sin embargo, el extremo aceptor del RNAt del sitio A se encuentra aún unido a EF-Tu (Moazed, D. y Noller, H. 1989) . Durante este proceso de codificación, el ribosoma monitorea la correcta lectura del codón del RNAm por parte del RNAt nuevo, para asegurar que solo se acomode el RNAt cargado con el triplete de bases nitrogenadas correcto que a su vez está unido a un aminoácido específico mientras que los RNAt con anticodones incorrectos se rechaza y se reemplaza por uno nuevo que también será revisado.

Una vez verificada la interacción, EF-Tu cataliza la hidrólisis de GTP y se libera el complejo binario EF-Tu-GDP del RNAt nuevo en el sitio A (Dell, V. A. *et al.*, 1990)

Tras la liberación de EF-Tu-GDP, el RNAt nuevo puede mover su extremo libre aceptor (CCA) hacia la peptidil-transferasa en la subunidad 50S, para posteriormente formar un enlace peptídico entre el grupo amino del aminoácido que posee y el grupo N-formilmetionilo del RNAt inicial que se encuentra en el sitio P (Vallejo, P. 2010). Al mismo tiempo, el ribosoma se mueve un triplete hacia delante del RNAm y por consiguiente, el RNAt inicial “vacío” (sin su grupo N-formilmetionilo) se encuentra ahora en el sitio E y el segundo RNAt (ahora unido covalentemente a un dipéptido) se desplaza al sitio P, por lo que el sitio A queda desocupado. A este proceso se le conoce como translocación y es facilitado por el factor EF-G (Spirin, A. S. 1968). Cuando el sitio A está desocupado puede recibir otro RNAt aminoacilado, comenzando así otro ciclo de

elongación de la cadena. La repetición del ciclo de enlogación descrito adiciona un aminoácido cada vez al extremo terminal de la cadena polipéptida que se está sintetizando conforme a la secuencia del RNAm hasta que se encuentra en esta secuencia con un codón de terminación (Vallejo, P. 2010).

2.17.2.1 Aminociclitoles (espectinomicina)

Antibiótico natural obtenido de *Streptomyces spectabilis*. Se trata de una molécula cuya estructura química consta de un anillo aminociclitol, sin enlaces glucosídicos ni cadenas de aminoazúcares (Elorza, E. 2002). Actúa contra un amplio rango de bacterias Gram negativas. Su actividad es bacteriostática y su mecanismo de acción consiste en impedir la unión de la subunidad 30S ribosomal con el RNAm (Brugueras, M. y García, M. 1998).

2.17.2.2 Aminoglucósidos (estreptomicina, gentamicina, kanamicina, tobramicina, neomicina)

Son antibióticos que presentan dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol (Seija, V. y Vignoli, R. 2006). Son activos frente a gran parte de los bacilos Gram negativos aerobios (García, J. A. et al., 1997). Su mecanismo de acción consiste en unirse a la subunidad 30S del ribosoma, específicamente al factor de elongación EF-Tu para inhibir la provisión del aminoacil-RNAt al sitio A con el consiguiente bloqueo de la síntesis proteica de la bacteria (Lopardo, H. A. 2020).

2.17.2.3 Tetraciclinas

Corresponden a un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético derivados de diferentes especies de *Streptomyces* spp. Se caracterizan por poseer en su estructura 4 anillos bencénicos fusionados. Son antibióticos de amplio espectro, bacteriostáticos, eficaces contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos, aerobios y

anaerobios (Patiño, N. y Sepúlveda, A. 2008). Acceden al interior celular por difusión pasiva y transporte activo. Al igual que la estreptomicina, actúa inhibiendo la entrada del aminoacil-RNAt, incluyendo el de iniciación, al sitio receptor de la subunidad 30S (sitio A), provocando el bloqueo de la iniciación de la cadena polipeptídica (García, M. *et al.*, 2003).

2.17.2.4 Cloranfenicol

Es un antibiótico de origen natural producido por diversas especies del género bacteriano *Streptomyces*. Hoy día se sintetiza químicamente para su producción comercial a gran escala (Controulis, J. *et al.*, 1949) y ha sido modificado en múltiples ocasiones para la obtención de moléculas análogas con mejor actividad antimicrobiana (Mateus, C. R. y Coelho, F. (2005) Su estructura química corresponde a un grupo nitrobencono unido a un grupo propanol que le confiere actividad antiinfecciosa, así como un grupo amino conectado a un derivado del ácido dicloroacético (Powell, D. A. y Nahata, M. C. 1982). Actúa sobre la subunidad 50S al inhibir la formación del enlace peptídico entre los aminoacil-RNAt (Lopardo, H. A. 2020; Martínez, L. O. 2006; Morales, Y. E. *et al.*, 2007).

2.17.2.5 Lincosamidas (clindamicina, lincomicina)

Son antibióticos de origen natural obtenidos por purificación a partir de un actinobacterias. Son activos contra cocos Gram positivos y algunos anaerobios (*Bacteroides*, *Clostridium*, excepto *Clostridium difficile*, *Peptostreptococcus* y *Propionibacterium acnes*). Clindamicina, lincomicina presentan actividad bacteriostática al inhibir la transpeptidación necesaria para la síntesis proteica bacteriana (Stahl, J. P. 2017).

2.17.2.6 Macrólidos (eritromicina)

Los macrólidos son un grupo de antibióticos semisintéticos derivados de la eritromicina producida por *Streptomyces erythraeus* (Seija, V. y Vignoli, R. 2006). La familia se caracteriza por poseer como núcleo molecular un anillo lactona macrocíclica al cual se unen desoxiazúcares aminorados (Prescott, J. F. 2002). La diferencia entre los compuestos de esta familia está dada por el número de carbonos que componen la molécula. Por ejemplo, la eritromicina está constituida por 14 átomos (Piñera, J. *et al.*, 1998). Su mecanismo de acción consiste en unirse al sitio P del componente 23S de la subunidad 50S para inhibir la translocación en la cual el ribosoma avanza a lo largo del RNAm permitiendo la adición de un nuevo aminoácido a la cadena polipeptídica (Lucas, M. F. *et al.*, 2007).

Terminación: El codón de terminación en la secuencia de RNAm está dada por alguno de los siguientes tripletes: UAA, UAG y UGA, los cuales no codifican para ningún aminoácido y se encuentran situados inmediatamente después del codón que especifica para el último aminoácido de la cadena, es decir, en el sitio A. Estos codones de terminación son reconocidos por los factores de liberación RF1 y RF2 que catalizan la hidrólisis y liberación del polipéptido unido al RNAt en el sitio P hacia el citoplasma (Kisseley *et al.*, 2003; Laurberg *et al.*, 2008). Después de que los factores de liberación (RF1 y RF2) hayan reconocido el codón de terminación para la posterior liberación de la cadena polipeptídica, el factor de liberación RF3 con función GTPasa favorece la posterior disociación de RF1 y RF2 (Vallejo, P. 2010).

Reciclaje: El ribosoma 70S se disocia de sus subunidades gracias a la acción de una proteína denominada factor de reciclaje (RRF) que trabaja junto con EF-G (Peske *et al.*, 2005) para separar la subunidad mayor de la menor. Después, el factor de iniciación IF3 desagrega al RNAm y un RNAt deacilado en el sitio P de la subunidad 30s (Vallejo, P. 2010). De este modo la subunidad 30S queda libre para iniciar un nuevo ciclo de traducción.

2.17.3 Inhibidores de la replicación del DNA

El cromosoma bacteriano está constituido por una doble cadena circular de DNA que es cientos de veces mayor al volumen de la propia bacteria. Lo anterior es posible gracias a que la molécula de DNA se encuentra plegada sobre sí misma en una forma superenrollada (Calvo, J. y Martínez, L. 2009). En procariontes, las topoisomerasas del tipo II, es decir, la topoisomerasa II o DNA girasa y la topoisomerasa IV, son las enzimas encargadas de ajustar el nivel de superenrollamiento del DNA en estado estacionario para facilitar las interacciones de las proteínas con el DNA y prevenir un superenrollamiento excesivo, que es perjudicial (Champoux, J. 2001), todo ello necesario para una correcta replicación y transcripción del DNA.

La DNA girasa y topoisomerasa IV son enzimas tetraméricas, compuestas por dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas respectivamente por los genes *gyrA* y *gyrB* en el caso de la DNA girasa y *parC* y *parE* en el caso de la topoisomerasa IV (Kevan, L. y Wang, J. 1980; Kato, J. *et al.*, 1990). Ambas enzimas funcionan de diferente manera como veremos a continuación:

Durante la replicación, una vez que las cadenas de la molécula de DNA son separadas por las helicasas mediante la ruptura de los puentes de hidrógeno, se forma una horquilla de replicación lo que genera tensión y sobreenrollamiento positivo, es decir, la doble hélice de DNA que se encuentra por delante de la horquilla de replicación, se enrolla en la misma dirección que la hélice, aumentando la torsión y por lo tanto volviéndose más “apretada”. De manera que, el DNA girasa avanza delante de la horquilla de replicación removiendo el sobreenrollamiento positivo (Caetano, J. A. 2020), lo cual facilita el desenrollamiento de la doble hélice y reduce la torsión para que pueda llevarse a cabo la replicación y transcripción del DNA. Por otro lado, la topoisomerasa IV avanza detrás de la horquilla de replicación introduciendo superenrollamientos positivos (Caetano, J. A. 2020), además, es la encargada de separar la parte replicada del DNA (Brugueras, M. *et al.*, 2005).

Las quinolonas más hidrofílicas ejercen su acción tras penetrar la membrana externa mediante un mecanismo de difusión pasiva a través de las porinas mientras que las más

hidrofóbicas lo hacen por difusión simple a través de las membranas (Nikaido, H. y Thanassi, D. G. 1993) Una vez en el citoplasma, actúan por mecanismos complejos y no del todo conocidos, aunque se sabe que su mecanismo de acción consiste en inhibir la DNA girasa en las bacterias Gram negativas y la topoisomerasa IV en bacterias Gram positivas (Drlica, K. y Zhao, X. 1997; Hooper, D. C. 1995), formando un complejo ternario entre quinolona, enzima y DNA y por ende, actúan inhibiendo el proceso de replicación y transcripción.

2.17.3.1 Quinolonas (ácido nalidíxico, fluoroquinolonas)

Se trata de un grupo de antibióticos que derivan de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo que contiene un nitrógeno en la posición 1, un grupo carbonilo en la posición 4 y un grupo carboxilo unido al carbono de la posición 3 del primer anillo. Las quinolonas se clasifican en generaciones (Seija, V. y Vignoli, R. 2006), atendiendo a su espectro de actividad, de manera que, las quinolonas de primera generación (ácido nalidíxico y ácido pipemídico) son activas frente a bacterias Gram negativas como *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella* y *Shigella* (King, D. *et al.*, 2000). Las quinolonas de segunda generación (norfloxacinó y ciprofloxacino) son activas frente a bacterias Gram negativas pero, además, actúan contra *Pseudomonas* spp. y presentan moderada actividad sobre bacterias Gram positivas como *S. aureus*, *S. epidermis*, *Moraxella catarrhalis*, micobacterias y algunos gérmenes atípicos (Davis, R. 1996). Las de tercera (levofloxacino, gatifloxacino) y cuarta (moxifloxacino, trovafloxacino) generación actúan contra bacterias Gram negativos y micobacterias, pero presentan mejor actividad frente a Gram positivos (*Streptococcus pyogenes* y neumococo penicilina sensible y penicilina resistente), anaerobios y patógenos atípicos (Dalhoff, A. y Schmitz, F. 2003).

2.17.4 Inhibidores de la transcripción del DNA

2.17.4.1 Rifamicinas

Son un grupo de antibióticos aislados de *Streptomyces mediterranei*. Pertenecen a la familia ansamicina, la cual se caracteriza por poseer en su estructura una cadena alifática que conecta los dos extremos de un núcleo naftoquinona. Presentan actividad bactericida frente a *Mycobacterium tuberculosis*, *S. aureus*, estafilococos coagulasa negativos, *S. pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *C. difficile* y *Listeria monocytogenes*, frente a Gram negativos su espectro es más limitado, actuando sobre *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* y *Helicobacter pylori* (Lopardo, H. 2020). Su mecanismo de acción consiste en unirse a la subunidad beta de la RNA polimerasa dependiente del DNA bacteriano, cerca del área en donde ocurre la extensión del RNA mensajero naciente. Al unirse a la subunidad lact de la RNA polimerasa, las rifamicinas inhiben la transcripción por oclusión estérica, después de que la RNA polimerasa ha catalizado el enlace fosfodiéster del tercer nucleótido (Campbell, E. *et al.*, 2001).

2.17.5 Inhibidores de la síntesis del ácido fólico

2.17.5.1 Sulfonamidas y trimetoprima

Las sulfonamidas y trimetoprima son antibióticos sintéticos, bacteriostáticos, de amplio espectro. Por su parte, la trimetoprima es una 2,4-diaminopirimidina, antimetabolito de la síntesis de ácido fólico. Su mecanismo de acción consiste en inhibir la dihidrofolato-reductasa de bacterias y protistas, con una sensibilidad 50,000-100,000 veces superior que la enzima de células humanas. De este modo interfiere en la transformación de dihidrofolato a tetrahidrofolato, y, secuencialmente, en la síntesis de ácido desoxitimidílico, resultando en la inhibición de la síntesis de DNA y proteínas bacterianas (Azanza, J. R. *et al.*, 2020). Mientras que las sulfonamidas se caracterizan por poseer un núcleo benceno con un grupo amino (NH₂) y otro amido (SO₂NH₂). Para mantener su actividad antibacteriana es esencial que el grupo amino unido al carbono cuatro del anillo bencénico quede libre, en cambio, las sustituciones en el radical sulfónido (SO₂), unido

al carbono uno no modifica la actividad bacteriostática sino que modifican las características farmacológicas, las cuales condicionan en gran medida su uso (Trallero, E. e Iglesias, L. 2003). Las sulfamidas son estructuralmente similares al ácido para-aminobenzoico (PABA), un precursor de la síntesis del ácido fólico que es una sustancia imprescindible en la biosíntesis de los ácidos nucleicos bacterianos, por lo que el mecanismo de acción de las sulfonamidas consiste en inhibir competitivamente la incorporación de PABA a la pteridina para formar el ácido tetrahidropteroico, aunque la sulfamida también puede competir con PABA por la enzima dihidropteroato sintetasa que interviene en el metabolismo del ácido fólico (Vicente, D. y Trallero, E. 2010; Azanza, J. R. *et al.*, 2020).

2.17.6 Inhibidores de la membrana externa y citoplasmática

La membrana celular bacteriana consiste en una bicapa lipídica formada por fosfolípidos y proteínas. Se trata de una barrera altamente selectiva y semipermeable que interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo de solutos hacia el interior y exterior de la célula. Además, la membrana citoplasmática juega un papel importante en la comunicación entre bacterias permitiéndoles actuar frente a cambios ambientales de manera colectiva (Loera, A. *et al.*, 2019).

2.17.6.1 Polipéptidos (polimixina B y colistina)

Son antibióticos que presentan en su estructura una parte hidrofílica (el polipéptido catiónico) unida a una cadena lateral de ácido graso (parte lipofílico) y se comportan como detergentes catiónicos. En la membrana citoplasmática, la parte hidrofílica con alta carga positiva se une a la superficie de la membrana, cuya carga es negativa por atracción electrostática. Por otro lado, el extremo lipofílico se une a los fosfolípidos de la membrana mediante interacciones hidrofóbicas (Calvo, J. y Martínez, L. 2009).

En la membrana externa, la interacción electrostática entre la parte hidrofílica del antibiótico y el lipopolisacárido aniónico (LPS) de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, da lugar, primero; al desplazamiento del magnesio (Mg^{+2}) y calcio (Ca^{+2}), que normalmente estabilizan las moléculas de LPS y segundo, al bloqueo de la mayor parte de los efectos biológicos del lípido A (Caetano, J. A. 2020; Lorenzo, J. *et al.*, 2011).

En ambos casos, las polimixinas actúan aumentando la permeabilidad de la envoltura celular, fuga del contenido, y subsecuentemente, la muerte celular (Li, J., *et al.*, 2006).

2.18 Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos (generalidades)

Las bacterias disponen de múltiples mecanismos que les permiten disminuir o inactivar la acción bacteriostática, bacteriolítica o bactericida de los antibióticos. Este problema se hace aún mayor cuando las bacterias presentan más de un mecanismo de resistencia y tiene la capacidad de transmitirlo no sólo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especie a través de la transferencia horizontal de genes (THG) (Valenzuela, M. T. *et al.*, 2003). Los mecanismos de resistencia a los antibióticos pueden clasificarse en 4 grupos:

2.18.1 Cambios en la permeabilidad y/o transporte celular

Las bacterias tienen la capacidad de cambiar la conformación de sus membranas celulares y de formar estructuras como las bombas de e-flujo (BE) con el fin de impedir la llegada del antibiótico a su sitio blanco o bien, disminuir la concentración intracelular del mismo. El cambio en la permeabilidad es evidente en bacterias Gram negativas, cuya membrana externa posee proteínas especializadas llamadas porinas. Estas proteínas actúan como canales que facilitan el transporte pasivo de moléculas hidrofílicas según su carga y tamaño tales como mono y disacáridos, nucleósidos, aminoácidos (Monge, K. M. 2013),

e incluso de antibióticos como los β -lactámicos y fluoroquinolonas (Pages, J. M. *et al.*, 2008; Findlay, J. *et al.*, 2012), por lo que, la disminución en la permeabilidad del antibiótico hacia el espacio intracelular está dada por cambios en el diámetro, número y/o inactivación de porinas. Por ejemplo, la pérdida de la actividad de porinas OmpC en bacterias Gram negativas, impiden el ingreso de antibióticos β -lactámicos, favoreciendo la resistencia antibiótica, con el consiguiente cambio en el transporte de moléculas hacia el interior de la célula e incluso activando bombas de expulsión (Pages, J. M. *et al.*, 2008).

Las bombas de expulsión o también llamadas BE son proteínas de membrana que pueden ser codificadas tanto dentro del cromosoma bacteriano como en el DNA plasmídico y son capaces de transportar hacia el exterior una amplia variedad de compuestos tóxicos para la célula bacteriana, tales como metabolitos, detergentes, disolventes orgánicos y antibióticos (Monge, K. M. 2013). En bacterias Gram positivas se encuentran ubicadas en la membrana citoplasmática y en bacterias Gram negativas se encuentran en el espacio intermembranal (Beceiro, A. *et al.*, 2013).

Según la fuente de energía que utilicen para su funcionamiento, se pueden clasificar en dos grupos; el primero incluye a la familia ABC (ATP Binding Cassete) que utiliza la energía del ATP y expulsión por hidrólisis, mientras que el segundo grupo utiliza un mecanismo de contra-transporte iónico como sustrato de energía, este grupo incluye a la familia MATE (Multidrug and Toxic-Compound Extrusion), a la superfamilia MFS (Major Facilitator Superfamily), la familia RND (Resistance Nodulation Division), la familia SMR (Small Multidrug Resistance) y la familia MET (Multidrug Endosomal Transporter). Todas estas familias de BE se encuentran presentes en bacterias Gram positivas y Gram negativas, excepto la familia RND exclusiva de Gram negativos (Zhou, G. *et al.*, 2015; Li, X. Z. *et al.*, 2015) mientras que las comunes para Gram positivas son las MFS (Becerra, G. *et al.*, 2009).

En *P. aeruginosa* las bombas de e-flujo MexAB-OprM y MexCD-OprJ, pertenecientes a la familia RND, son responsables de la resistencia a al menos tres familias de antibióticos: los carbapenémicos, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Santajit, S. e Indrawattana, N. 2016). Por otro lado, en *S. aureus*, la sobreexpresión de BE NorA, perteneciente a la familia MFS, le confiere resistencia a cloranfenicol y fluoroquinolonas. De hecho, las BE

se consideran un mecanismo de sospecha de la resistencia a los antibióticos cuando se incrementa la concentración mínima inhibitoria (CMI) de tres o más antibióticos para una bacteria en particular, en comparación con la CMI de estos antibióticos frente a la cepa nativa (Becerra, G. *et al.*, 2009), esto es por que las BE funcionan expulsando el antibiótico de la célula bacteriana a una velocidad elevada, lo que significa que las concentraciones del mismo nunca son lo suficientemente altas como para provocar un efecto antibacteriano, sin embargo, la baja concentración del antibiótico que logra llegar al espacio periplásmico o al citosol ejerce una presión selectiva que da lugar a cepas con fenotipos y/o genotipos de resistencia (Santajit, S. e Indrawattana, N. 2016).

2.18.2 Formación de biopelículas

Las biopelículas (biofilm) son comunidades microbianas de una o múltiples especies (bacterias, hongos y protistas) organizadas dentro de una matriz extracelular producidas por ellas mismas (Betancourth, M. *et al.*, 2004), a excepción de los protistas que si bien no forman biopelículas, pueden estar asociados a ellas. La heterogeneidad en microorganismos dentro de esta organización da lugar a diferentes microambientes de pH, tensión de oxígeno, concentraciones de iones, carbono y nitrógeno. Está compuesta principalmente de agua entre 85 y 95% y de otros componentes en menor proporción como polisacáridos, proteínas, DNA extracelular, lípidos, minerales, ácidos nucleicos y ácidos teicoicos (Chmielewski, R. y Frank, J. 2003). Dentro de sus características encontramos que, permite a los microorganismos adherirse a superficies bióticas y abióticas tales como tejidos vivos o muertos de animales o plantas, polímeros sintéticos, cerámicas, aleaciones de metales (Navia, D. P. *et al.*, 2010), instrumentos médicos, como catéteres o articulaciones artificiales, dando lugar al desgaste de metales, taponamiento de tuberías, fallas en equipos, malos olores; las biopelículas formadas por bacterias sulfato reductoras (BSR) producen grandes cantidades de ácido sulfhídrico y hace que el petróleo en crudo sea un producto de menor rendimiento. Por otro lado, la formación de biopelículas también repercute en la salud humana al ocasionar caries dental, la enfermedad periodontal, infecciones músculo-esqueléticas, infecciones del tracto biliar,

endocarditis bacteriana y neumonía en pacientes con fibrosis quística (Betancourth, M. *et al.*, 2004). Sin embargo, la formación de biopelículas es un mecanismo que se ha implementado en temas de bioremediación de los suelos (Moreno, C. *et al.*, 2004; Silva, R. M. *et al.*, 2008) o aguas (Jaramillo, G. E. *et al.*, 2010) contaminadas por hidrocarburos como el petróleo, en el tratamiento de aguas residuales (Sandoval, E. *et al.*, 2023; Fernández, A. *et al.*, 2023) y como medida para evitar la contaminación del aire por compuestos orgánicos volátiles provenientes de empresas químicas y de las estaciones depuradoras de aguas residuales (Betancourth, M. *et al.*, 2004).

Citando otra de sus características, las biopelículas actúan como un escudo mecánico y bioquímico que proporciona las condiciones necesarias para atenuar la actividad de los antibióticos, agresores antimicrobianos e incluso a la respuesta del hospedero (anticuerpos, células del sistema inmune) (Santajit, S. e Indrawattana, N. 2016). La primera condición es su propia naturaleza química, que repele o disminuye la difusión del antibiótico a través de la misma, por lo que el antibiótico llega a las células bacterianas en concentraciones subinhibitorias (Peña, S. y Cendejas, R. 2014). Además, se ha observado en estudios de microscopía láser confocal que dentro de la matriz extracelular existen poblaciones bacterianas con diferente actividad metabólica (Allison, K. *et al.*, 2011). Generalmente, las células bacterianas que se encuentran en la parte más externa son metabólicamente más activas, mientras que las que están en la parte más interna presentan un metabolismo más lento o completamente inactivo por lo que solo los microorganismos más superficiales se ven afectados por los antibióticos (Peña, S. y Cendejas, R. 2014). Esto bajo la premisa de que las bacterias que no se dividen y/o no tienen suficientes nutrientes para un metabolismo activo, son parcial o completamente resistentes a los antibióticos que actúan a nivel de la síntesis de la pared bacteriana o producción de proteínas (Becerra, G. *et al.*, 2009).

2.18.3 Modificación e inactivación del antibiótico

Las bacterias son capaces de producir enzimas que hidrolizan o modifican la estructura del antibiótico provocando que pierda su funcionalidad y por consiguiente no pueda

llegar de forma activa a su diana de acción. Los mecanismos enzimáticos de resistencia a los antibióticos incluyen los procesos de hidrólisis, la transferencia y/o modificación de grupos funcionales y los procesos redox (Kumar, S. y Varela, M. F. 2013).

El mecanismo enzimático por hidrólisis se puede explicar usando como ejemplo las betalactamasas, enzimas bien caracterizadas que actúan hidrolizando la unión peptídica del anillo β -lactámico (Viswanatha, T. *et al.*, 2008), estructura característica de los antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos) y gracias al cual, dicha familia puede competir con el sustrato natural de las enzimas PBP (Proteínas de unión a la penicilina), responsables de la síntesis de la pared celular (peptidoglicano) (Sánchez, C. 2006).

Los genes que codifican a las betalactamasas pueden encontrarse como parte constitutiva del cromosoma de algunas especies bacterianas o en el DNA plasmídico. En este último caso, el gen de resistencia puede transferirse entre distintas especies. Además, las cepas que poseen alguno de los diferentes tipos de betalactamasas (penicilinasas, cefalosporinas y carbapenemasas) presentan resistencia a otras familias de antibióticos como aminoglucósidos, cloranfenicol, tetraciclinas y macrólidos (Treviño, N. y Molina, B. 2022; Daza, R. M. 1998; Santajit, S. e Indrawattana, N. 2016).

La inactivación de antibióticos por la transferencia de grupos funcionales está dada por enzimas como N-acetiltransferasas (AME), las O-adeniltransferasas (ANT) y las O-fosfotransferasas (APG) que modifican varios grupos hidroxilo o amino de los aminoglucósidos, lo que resulta en su incapacidad para unirse a sus dianas ribosomales 30S (Tsodikova, S. y Labby, K. 2016). De manera similar, en bacterias Gram negativas, una ADP-ribosiltransferasa (Arr-2) codificadas por plásmidos es comúnmente responsable de la resistencia a la rifampicina (Baysarowich, J. *et al.*, 2008).

Por último, la enzima monooxigenasa denominada Tet(X), dependiente de oxígeno y FAD (flavina adenina dinucleótido), provoca la inactivación del antibiótico tetraciclina mediante un proceso redox, en el que la tetraciclina se oxida perdiendo electrones y por lo tanto se vuelve ineficaz contra la célula bacteriana (Markley, J. y Wencewicz, T. 2018).

2.18.4 Modificación del sitio de unión o blanco terapéutico donde el antibiótico ejerce su mecanismo de acción

Los blancos terapéuticos (estructura bacteriana o vía metabólica) desempeñan un papel vital en el desarrollo y supervivencia bacteriana, lo que los hace el objetivo ideal para mitigar la infección. Además, estos blancos terapéuticos difieren o están completamente ausentes en los seres humanos o en la especie animal que se esté tratando, por lo que el antibiótico ejerce su mecanismo de acción de manera selectiva (Varela, M. *et al.*, 2021). Un ejemplo de ello es el peptidoglicano de la pared celular, ausente en la célula eucariota. Por otro lado, las subunidades ribosomales 30S y 50S presentes en bacterias difieren de las subunidades 40S y 60S propias de los seres humanos.

La modificación del blanco terapéutico puede estar dada por el incremento de la concentración de una sustancia competitiva o por modificación de las diferentes estructuras bacterianas (Neu, H. 1992), lo que disminuye la afinidad de unión del antibiótico a este y por ende, no haya acción bacteriostática, bacteriolítica o bactericida sobre las bacterias.

En condiciones normales los betalactámicos actúan uniéndose a su blanco terapéutico: las PBP, proteínas que participan en el ensamblaje y control de las últimas etapas de la construcción de la pared celular (peptidoglicano). Las mutaciones en estas proteínas o la adquisición de genes que codifiquen PBP diferentes, darán lugar a la resistencia a estos antibióticos (Pieras, M. 2019). Por ejemplo, *S. aureus* adquiere un gen productor de PBP2 que actúa como sustituto de los PBP, es decir, que su función dentro de la célula bacteriana no se ve afectada sino que además, le confiere resistencia al disminuir su afinidad por los betalactámicos, incluida la meticilina (Santajit, S. e Indrawattana, N. 2016; Monge, K. M. 2013).

Los genes *erm A* y *erm B* dan lugar a la modificación del sitio activo del ribosoma mediante la metilación de un residuo de adenina en el dominio V del RNAr 23S. Este

mecanismo confiere resistencia a macrólidos (eritromicina) en *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* (Cabrera, C. E. *et al.*, 2007; Moreno, C. *et al.*, 2009).

2.19 Bacterias (generalidades)

2.19.1 *Escherichia coli*

E. coli es un bacilo Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae que mide 2 µm (micras) de largo y 0.5 µm de ancho (Cachón, A. *et al.*, 2024), móvil con flagelos peritricos o inmóvil, mesófilo y no formador de esporas, capaz de realizar procesos fermentativos, catalasa positivo y oxidasa negativo. Crece a una temperatura óptima de 37 °C en una amplia gama de medios de cultivo simples (agar de soya tripticaseína y agar sangre) (Sánchez, T. y Denis, A. 2023). En medios sólidos, las colonias no están pigmentadas y suelen ser circulares, lisas o rugosas con un borde entero; algunas cepas, en particular las aisladas de pacientes con fibrosis quística, producen colonias mucoides (Sussman, M. 1997).

En condiciones normales, *E. coli* es el principal anaerobio facultativo (puede vivir tanto en presencia como en ausencia de oxígeno) de la flora microbiana del colon humano donde coexiste en beneficio mutuo con su huésped (Manning, S. 2005). De hecho, *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los recién nacidos unas pocas horas después del nacimiento (Nataro, J. P. y Kaper, J. B. 1998). Sin embargo, cuando el huésped se encuentra inmunocomprometido o se han roto las barreras gastrointestinales normales, esta bacteria puede pasar de ser comensal a oportunista causando enfermedades asociadas a al menos ocho categorías o patotipos de *E. coli* que pueden producir una gran variedad de factores de virulencia como enterotoxinas (LT), toxinas Shiga-Like (Stx-1, Stx-2, o ambas), adhesinas (fimbrias de adherencia agregativa I y II, pili tipo 1), de igual forma, tiene la capacidad de generar biopelículas para adherirse al epitelio del intestino delgado, inducción de citosinas y adhesinas unidas a manosas (FimH) (López, L. 2021). Tales factores de virulencia le confieren a *E. coli* una mayor capacidad para adaptarse a nuevos

nichos del cuerpo humano y causar un amplio espectro de enfermedades incluyendo diarrea, septicemia, meningitis, bacteriemia, neumonía, infección del tracto urinario, de la herida quirúrgica e infección de la piel (Cunningham M, W. y Fujinami, R. S. 2000; Sligl, W. *et al.*, 2006).

Dichos patotipos se clasifican dentro de dos grupos: *E. coli* diarreogénica (EPEC) y *E. coli* extraintestinal (ExPEC). En el primer grupo se encuentra *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) que colonizan el intestino delgado y causan diarrea; *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) que colonizan el intestino grueso y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) que puede colonizar tanto el intestino delgado como el grueso. En el segundo grupo encontramos a *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC) (Croxen, M. y Finlay, B. 2010).

De manera general el mecanismo de patogénesis de los ocho patotipos se puede dividir en tres estadios importantes: a) adherencia inicial, b) transducción de señales y c) sintomatología.

Las cepas patógenas de *E. coli* (excepto EIEC) se adhieren a las células huésped de sitios que *E. coli* no suele habitar, como el intestino delgado y la uretra mediante factores de adherencia (adhesinas/fimbrias) (Kaper, J. *et al.*, 2004). Los factores de adherencia suelen variar entre cepas, por ejemplo, EPEC produce fimbrias de haces (BFP), ETEC posee el antígeno del factor de colonización (CFA), EAEC posee fibrillas pequeñas que median la adherencia bacteriana a las proteínas de la matriz extracelular (fibronectina, laminina y colágeno) mientras que proteínas de la membrana externa como la intimina codificada por cromosomas de EPEC y EHEC también participa en la adhesión de la célula bacteriana a la célula huésped (Mainil, J. 2013).

Tras la fijación, *E. coli* induce una serie de señales intracelulares que son promovidas por un grupo de proteínas, las cuales alteran los procesos fisiológicos normales de la célula huésped para posteriormente invadir coordinadamente las células huésped, ocultarse en el interior de estas o dentro de las biopelículas que conforman para así evadir la respuesta inmunitaria del huésped y finalmente causar la sintomatología de la enfermedad (Croxen, M. y Finlay, B. 2010).

Particularmente, la cepa de *E. coli* uropatógena (UPEC) es responsable de aproximadamente el 80% de las infecciones urinarias adquiridas en la comunidad y el 30% de las infecciones nosocomiales (Makvana, S. y Krilov, L. 2015). Se estima que al año más de 150 millones de personas adquieren una infección del tracto urinario (ITU) en todo el mundo. Estas infecciones afectan a toda la población, sin embargo, las mujeres son el grupo de mayor riesgo, debido a la anatomía del tracto urinario femenino, donde la uretra es relativamente corta, lo que reduce la distancia para la entrada de bacterias (Czajkowski, K. *et al.*, 2021). La UPEC puede residir en el colon y luego colonizar el área periuretral donde utilizan diversos factores de virulencia para ascender a la vejiga, causar cistitis y, si no se trata, poder ascender a los riñones para causar pielonefritis (Croxen, M. y Finlay, B. 2010).

2.19.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es un coco Gram positivo anaerobio facultativo (aunque crece mejor en condiciones aerobias), que pertenece a la familia Micrococcaceae. Tiene un tamaño de 0.8 a 1.5 μm de diámetro (Jasso, L. y Hentschel, N. 2019), inmóvil, no formador de esporas, catalasa y coagulasa positivo; pueden agruparse como células únicas, en pares, en cadenas cortas o en racimos (Martínez, J. *et al.*, 2006). Crece a una temperatura óptima de 37 °C (Murray, P. *et al.*, 2009) en agar sangre (Martínez, J. *et al.*, 2006) y si no hay sospecha de contaminación con otros microorganismos, se pueden sembrar en agar de soya tripticaseína (Foster, T. 2002). *S. aureus* forma colonias que miden de 1 a 3 mm, brillantes, lisas, enteras, elevadas y translúcidas que producen un típico pigmento amarillodorado debido a la presencia de carotenoides (Foster, T. 2002; Martínez, J. *et al.*, 2006).

En el humano, el hábitat habitual de *S. aureus* es la porción anterior de las fosas nasales, aunque también se puede aislar de la piel, el perineo, la faringe, y con menor frecuencia del tracto gastrointestinal, la vagina y las axilas (Wertheim, H. *et al.*, 2005). Desde estos sitios, *S. aureus* puede colonizar otras regiones del cuerpo o membranas mucosas provocando múltiples enfermedades, tales como bacteriemias que se presentan en los

hospitales con relación al uso de catéteres y heridas quirúrgicas; bacteriemias de la comunidad que tienen su origen en infecciones de la piel (vesículas pustulosas, mastitis, paroniquia y síndrome de la piel escaldada; infecciones del sistema nervioso central, el síndrome de choque tóxico (al liberar superantígenos en el torrente sanguíneo), osteomielitis, infecciones de prótesis articulares (artritis séptica y de bursitis). Las infecciones del tracto urinario y neumonías por *S. aureus* son poco frecuentes, se sugiere que tienen su origen por diseminación hematógena, sin embargo, la neumonía también se puede producir por aspiración de secreciones orales o en pacientes con ventilación mecánica (Diekema, D. *et al.*, 2001; García, E. *et al.*, 2014).

S. aureus posee diferentes mecanismos de virulencia, los cuales le ayudan a adherirse a la célula huésped (proteínas de unión a fibronectina, colágeno y coagulasa); aquellos que están involucrados en evadir las defensas del huésped (enterotoxinas estafilocócicas, TSST-1, PVL, proteína A, lipasas) y los involucrados en la invasión de la célula huésped y penetración de los tejidos (toxina α , hemolisinas β , γ y δ) (Martínez, J. *et al.*, 2006).

Considerando que *S. aureus* puede sobrevivir durante meses en cualquier tipo de superficie, las manos son el principal vector de transmisión desde las superficies hasta las fosas nasales. *S. aureus* también puede llegar directamente a la nariz a través del aire, aunque con menor frecuencia (Wertheim, H. *et al.*, 2005). Además, la descamación de células epiteliales de individuos que son colonizados por *S. aureus* representa una fuente de infección para otras personas (Martínez, J. P. 2007). Los alimentos también representan un vía de transmisión cuando *S. aureus* libera sus enterotoxinas a estos y su consumo puede causar gastroenteritis, vómitos, dolor abdominal, cólicos y diarrea (Martínez, J. *et al.*, 2006; Crossley, B. *et al.*, 2009).

2.19.3 *Bacillus subtilis*

B. subtilis es una bacteria aerobia (en ocasiones anaerobio facultativo), Gram positiva con forma de bacilo que suele medir de 2 a 6 μm de largo y poco menos de 1 μm de diámetro; es catalasa positiva, capaz de realizar procesos fermentativos (Errington, J. y

Aart, L. 2020) y presenta un amplio rango de temperatura de crecimiento que va de 20 a 55 °C, sin embargo, su rango óptimo de crecimiento es de 30 a 45 °C (Kovács, Á. 2019).

Está ampliamente distribuida en la naturaleza, desde el suelo; en asociación con la rizosfera de plantas, en la cual *B. subtilis* puede promover el crecimiento y salud de las mismas, hasta hábitats acuáticos o de forma transitoria en el tracto gastrointestinal, piel y heces de varias especies animales, donde se ha demostrado que puede tener un efecto probiótico (Earl, A. M. *et al.*, 2008). *B. subtilis* no se considera un patógeno humano, de hecho, es considerado generalmente como un microorganismo modelo y seguro en el procesamiento de alimentos por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA por sus siglas en inglés) (Shafi *et al.*, 2017) ya que posee una excelente capacidad de secreción de proteínas y metabolismo altamente adaptable, lo que la convierte en una herramienta importante de la biotecnología para la producción de proteínas medicinales como antibióticos, vitaminas y el desarrollo de vacunas, así como por la industria láctea, panadera, de piensos, como potenciadores del sabor, edulcorantes, textil y detergentes domésticos (Ayora, S. *et al.*, 2011; Kidane, D. *et al.*, 2009).

No obstante, bajo condiciones de estrés, *B. subtilis* es capaz de iniciar diferentes mecanismos de supervivencia, como la motilidad (natación), la captación de DNA exógeno, resistencia a estrés oxidativo, la formación de biopelículas y la esporulación, uno de los tipos celulares más resistentes de la naturaleza que puede sobrevivir en condiciones controladas de laboratorio durante varias décadas, e incluso más tiempo en el medio ambiente (Tan, I. y Ramamurthi, K. 2015); estos dos últimos mecanismos pueden causar el deterioro de productos y pérdida de pureza en producción farmacéutica o alimentaria (Su, Y. *et al.*, 2020), particularmente, los biofilms de *B. subtilis* pueden interferir en tuberías industriales, sistema de agua y superficies biomédicas (Kesel, S. *et al.*, 2014), además, la formación de esporas hace que su eliminación pueda ser complicada.

Si bien es cierto que *B. subtilis* es considerada una bacteria inocua ampliamente distribuida en el ambiente, también es cierto que ocasionalmente produce bacteriemia y sepsis en pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos, pacientes hospitalizados, con catéteres (Oggioni, M. *et al.*, 1998), e incluso, algunas cepas han sido

asociadas con intoxicación alimentaria, lo que da lugar a afecciones asociadas a diarrea, náuseas, vómito y dolor abdominal (Ishikawa, K. *et al.*, 2024).

3. Justificación

Dentro de los patógenos ESKAPE encontramos a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, bacterias responsables de un gran número de infecciones nosocomiales que afectan principalmente al sistema respiratorio, gastrointestinal, urinario y la piel de pacientes (generalmente) con sistemas inmunológicos comprometidos y regiones cuyas condiciones socioeconómicas, de saneamiento y el acceso a servicios de salud son desfavorables. A pesar de que en la actualidad se cuenta con diversos fármacos para el control de dichos padecimientos, sigue siendo un problema el creciente número de patógenos resistentes a estos, lo que resulta en altas tasas de mortalidad, morbilidad, tratamientos costosos e incertidumbre diagnóstica. Aunado a esto, se ha visto que en los últimos años ha existido una tendencia restrictiva en cuanto al número de nuevas moléculas de antibiótico aprobadas por la FDA, que le puedan hacer frente a este problema. Es por ello que resulta de gran interés el desarrollo de nuevos antibióticos o estrategias terapéuticas alternativas para el tratamiento de *S. aureus* y *E. coli*. Por otro lado, aunque *B. subtilis* no suele representar una amenaza para el humano y en realidad es una bacteria beneficiosa en muchos aspectos, la inhibición de su crecimiento puede resultar importante en aplicaciones industriales y médicas donde se requiere controlar el crecimiento de esta bacteria.

Basados en los antecedentes del género *Croton*, así como en estudios previos de la raíz de *Croton morifolius*, es muy probable que compuestos del tipo terpénicos sean aislados. Este tipo de estructuras exhibe un amplio rango de actividades biológicas, incluida la actividad antibacteriana. Por tal motivo, se considera que, la continuación del estudio de esta especie puede contribuir al descubrimiento de compuestos químicos con potencial antibacteriano.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

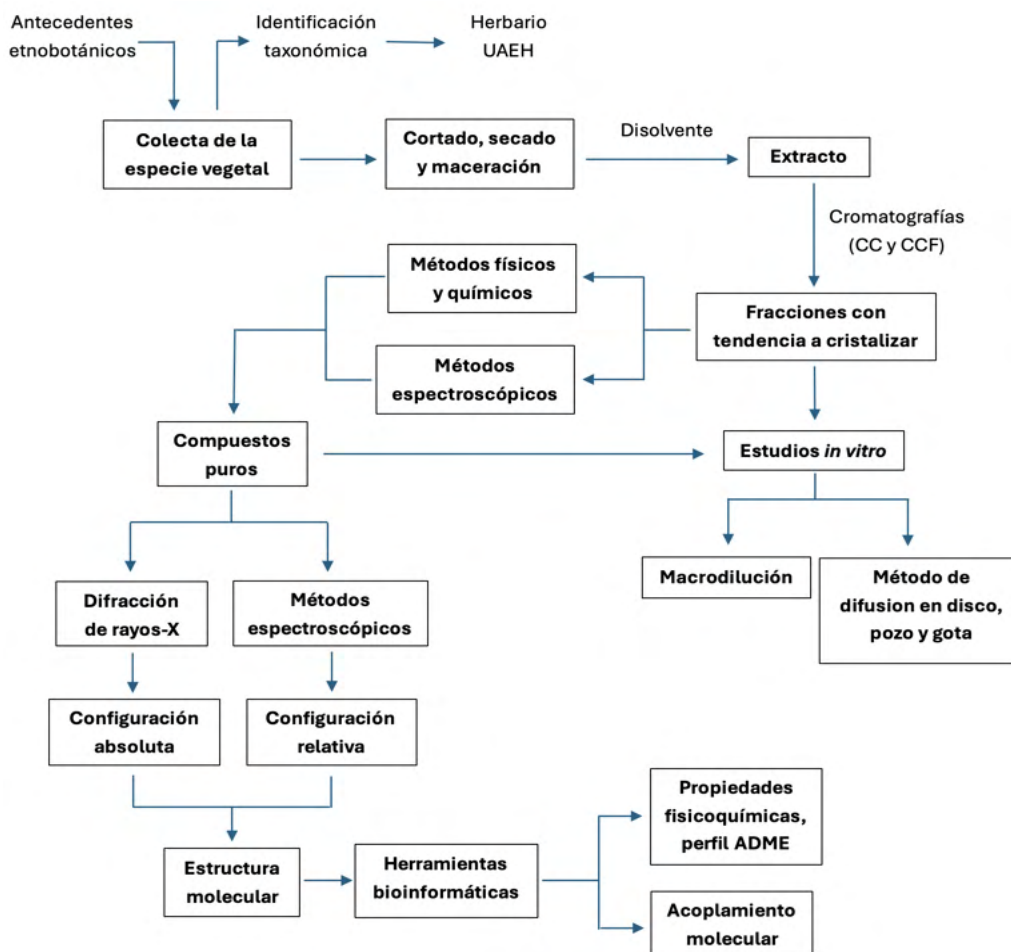
Evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios y de las subfracciones enriquecidas de compuestos del extracto metanólico de la raíz de *Croton morifolius* mediante técnicas cromatográficas, espectroscópicas, computacionales y biológicas para su posible aplicación como agentes antimicrobianos.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar los metabolitos secundarios mayoritarios en cada una de las subfracciones obtenidas del extracto metanólico, mediante técnicas de cromatografía en columna y en capa fina.
- Determinar la estructura molecular de los compuestos aislados del extracto de *C. morifolius* por resonancia magnética nuclear (^1H y ^{13}C).
- Determinar las propiedades fisicoquímicas, biológicas y perfil ADMET de los compuestos aislados del extracto de la raíz de *C. morifolius* mediante el uso de programas bioinformáticos y computacionales.
- Predecir la conformación más estable y efectiva entre los compuestos aislados de *C. morifolius* y enzimas importantes de *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis* mediante el análisis de acoplamiento molecular (Docking).
- Evaluar el potencial de actividad antibacteriana de los compuestos puros y de las subfracciones obtenidas a partir del extracto de la raíz de *C. morifolius* por el método de difusión en agar y el método de macrodilución en caldo frente a *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis*.

5. Materiales y métodos

La metodología empleada para alcanzar el objetivo de esta tesis se muestra en el **Esquema 1**, la cual consistió de manera general en la colecta e identificación taxonómica de *C. morifolius* para posteriormente someter la raíz al método de extracción por maceración. Los extractos se separaron mediante cromatografías de diferente polaridad, lo cual permitió obtener fracciones que presentaban compuestos con tendencia a cristalizar. Para la purificación de los compuestos se realizaron métodos físicos (CC y CCF) con alternancia a métodos espectroscópicos (RMN ^1H) y en el caso de morifolina A, además, se empleó un método químico (recristalización). Una vez obtenidos los compuestos puros, se realizó la caracterización y elucidación estructural de cada uno de estos mediante métodos espectroscópicos (RMN ^1H ^{13}C) y difracción de rayos X para la posterior evaluación de sus propiedades fisicoquímicas, perfil ADMET y actividad biológica mediante herramientas bioinformáticas. Para la evaluación *in vitro*, se emplearon los compuestos puros y subfracciones enriquecidas de compuestos del extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius*.



Esquema 1. Metodología general del proyecto.

5.1 Material vegetal

Los ejemplares de *C. morifolius* fueron colectados en el municipio de Contepec (Michoacán, México) durante el mes de octubre de 2022, y fueron taxonómicamente identificados por el M. en C. Manuel González Ledesma. Un ejemplar ya ha sido depositado en el Herbario del Centro de Investigaciones biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México (HGOM), bajo el vouchér de espécimen R. Velázquez Jiménez 10.

5.2 Preparación del extracto metanólico

El material vegetal recolectado se separó en parte aérea y raíz. Posteriormente, se procedió a su secado durante un periodo de dos semanas en un cuarto oscuro y a temperatura ambiente. Luego, la raíz fue molida en trozos de 3-5 mm. La cantidad resultante de raíz (500 g) se agregó a un recipiente ámbar al que se le añadió metanol (MeOH), lo cual se sometió al proceso de maceración durante tres semanas. Transcurrido este tiempo se filtró y eliminó el MeOH en el rotavapor y se obtuvo el extracto de consistencia viscosa y de color café (18 g).

5.3 Materiales para cromatografía en columna

La purificación de los compuestos se realizó por cromatografía en columna, empleando gel de sílice 60 F254 (Aldrich, 230-400 mesh ASTM) como fase estacionaria, y disolventes (hexano-acetona, CH_2Cl_2 -AcOEt) de distinta polaridad como fase móvil, así como columnas de vidrio de 5, 3 y 2 cm de diámetro interno.

5.4 Materiales para cromatografía en capa fina

Las fracciones de la CC se monitorearon mediante cromatofolios de gel de sílice soportada en aluminio Merck 60 F254 (fase estacionaria) y disolventes de distinta polaridad (hexano-acetona, CH_2Cl_2 -AcOEt) como fase móvil, así mismo, se hizo uso de sulfato cérico amoniacal y ácido sulfúrico como revelador.

5.5 Equipos y materiales para los métodos espectroscópicos, espectrométricos y de difracción de rayos X

Los espectros de IR se determinaron en CHCl_3 en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 2000 FT-IR, los espectros de RMN de ^1H (400 MHz) y de ^{13}C (100 MHz), incluyendo los experimentos, HSQC, HMBC se determinaron en un equipo Bruker Ascend 400, usando como disolvente CDCl_3 y Tetrametilsilano como referencia interna. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro MS JEOL GC por medio de impacto electrónico a 70 eV. Las rotaciones ópticas se determinaron en CHCl_3 en un polarímetro Perkin-Elmer 341 y los puntos de fusión se midieron en un equipo Büchi B-540. En este caso, se aislaron e identificaron compuestos conocidos por lo que los datos espectroscópicos obtenidos se compararon con los ya reportados en la literatura (Hernández 2022; Velázquez *et al.*, 2022).

5.6 Métodos computacionales (*in silico*)

Tras el aislamiento y elucidación estructural de los compuestos, se utilizaron herramientas bioinformáticas de consulta y descarga gratuita para predecir sus diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas. Con ayuda del servidor online pkCSM (que considera las reglas de Lipinski, Veber y Ghose), fue posible determinar las propiedades fisicoquímicas de cada uno de los compuestos y a partir de esto, evaluar si son candidatos o no a ser administrados por vía oral; admetSAR también es un servidor online gratuito que brindó información sobre el perfil ADME y las propiedades toxicológicas de cada compuesto; para revisar el espectro de actividad biológica de cada uno de estos se hizo uso del portal en línea Way2Drug, particularmente del software Pass online (incorporado a Way2Drug). Posteriormente, se realizó el docking molecular utilizando el programa AutoDock 4 donde fue posible analizar la afinidad de unión de los compuestos (ligandos) en los sitios activos de las proteínas diana relacionadas con la supervivencia y virulencia bacteriana para finalmente visualizar dichas interacciones a nivel molecular mediante el

programa Discovery Studio. Lo previamente descrito puede verse resumido en el **Esquema 2**.



Esquema 2. Metodología de estudios *in silico*.

5.6.1 Programas utilizados para predicciones *in silico*

Los programas y plataformas utilizados para la obtención de información respecto a las propiedades fisicoquímicas, perfil ADMET, actividad biológica y acoplamiento molecular de cada uno de los compuestos aislados de la raíz de *C. morifolius* se muestran en la **Tabla 3**. Cabe señalar que primero, fue necesario generar el código smile de cada compuesto, pues las plataformas facilitan el proceso al permitir colocar dicho código en su buscador. Para obtener el código smile de cada compuesto se hizo uso del programa ChemDraw. La información proporcionada por las plataformas online se obtiene, de manera general, a partir de actividades biológicas y de similitudes estructurales con la de medicamentos ya registrados e integrados en sus bases de datos.

Tabla 3. Plataformas y programas utilizados para las pruebas *in silico* de los compuestos 29, 30, 31, 32 y del antibiótico estreptomicina.

Nombre	URL de descarga o consulta	Licencia
ChemDraw 8.0	https://chemistrydocs.com/chemdraw-pro-8-0/	Descarga gratuita
SwissADME	https://www.swissadme.ch	Consulta gratuita
pkCSM	https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsmprediction	Consulta gratuita
Way2Drug	https://way2drug.com/PassOnline/	Consulta gratuita
AutoDock 4	https://autodock.scripps.edu/	Descarga gratuita
RCSB PDB	https://www.rcsb.org	Consulta gratuita
Discovery Studio	https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download	Descarga gratuita

5.6.2 Docking molecular con proteínas diana relacionadas con la supervivencia y virulencia bacteriana

Se hizo una búsqueda exhaustiva de artículos científicos relacionados con proteínas diana cuya inhibición repercute en la prevención de infecciones bacterianas; lo que resultó en el hallazgo de tres blancos terapéuticos: DNA girasa en *S. aureus*, FimH en *E. coli* y TagU en *B. subtilis*. Dichas proteínas están registradas en el banco de datos de proteínas (PDB) por lo que sus ID, así como su función en la supervivencia y virulencia bacteriana se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. ID de los blancos terapéuticos utilizados y su función en la supervivencia y virulencia bacteriana, obtenidos de la base de datos PDB.

Nombre	ID en el PDB	Función	DOI del artículo de consulta
DNA girasa	3U2D Resolución: 1.85 Å	Enzima que participa en los cambios topológicos de la estructura del DNA bacteriano.	https://doi.org/10.1128/AAC.05485-11
FimH	1TR7 Resolución: 2.10 Å	Proteína responsable de la capacidad de <i>E. coli</i> para adherirse específicamente a residuos de manosa en las glicoproteínas y glicolípidos de las células eucariontes.	https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04415.x
TagU	6UF6 Resolución: 2.20 Å	Enzima que participa en la transferencia de ácidos teicoicos del citoplasma a la pared celular bacteriana. También está implicada en la formación y ensamblaje de biopelículas y polisacáridos capsulares.	https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011469

Tras investigar y elegir a los blancos terapéuticos antes descritos, se procedió a realizar el acoplamiento molecular mediante el programa AutoDock 4; primero, se prepararon las proteínas quitándoles las moléculas de agua, añadiendo átomos de hidrógeno polares, así como las cargas de Kollman y después, al ligando se le agregaron todos los átomos de hidrógeno y las cargas de Gasteiger. Posteriormente, los compuestos se acoplaron al sitio de unión de la proteína diana de *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*. El sitio de unión se definió mediante una caja o “Grid box”, la cual se modificó de manera que abarcara el sitio activo conocido de las proteínas diana en *S. aureus* y *E. coli*, mientras que para *B. subtilis* el tamaño de la caja abarcó toda la proteína (126x126x126), así, al guardar las dimensiones de las diferentes cajas, se generaba un archivo de acoplamiento con la extensión gpf. Posteriormente, en la opción de parámetros del algoritmo genético (GA), se modificó el número de ejecuciones del GA a 10 y el population size a 150; bajo estos parámetros se guardó un segundo archivo de acoplamiento con la extensión dpf. Con ambos archivos (gpf y dpf) fue posible realizar el acoplamiento de cada uno de los compuestos con su respectiva proteína. Los valores del acoplamiento (energía de unión, eficiencia del ligando y constante de inhibición) y sitios de unión de cada compuesto fueron analizados mediante AutoDock Tools (ADT) para después guardar la conformación más eficiente y estable entre ligando-proteína en extensión pdbqt, abrir dicha conformación en Discovery

Studio y visualizar aquí los tipos de interacciones intermoleculares (enlaces convencionales de hidrógeno, hidrofóbicas y electrostáticas) entre ligando-proteína.

5.6.3 Redocking/RMSD

Para validar los protocolos de acoplamiento molecular se realizaron experimentos de redocking en los que se intentó reproducir la conformación conocida experimentalmente entre los complejos proteína-ligando obtenidos del PDB (3U2D, 1TR7, 6UF6).

Para ello fue necesario separar el ligando co-cristalizado de la proteína y guardar ambas moléculas en archivos PDB separados para después seguir un procedimiento estándar en el método de acoplamiento molecular: eliminar moléculas de agua, añadir átomos de hidrógeno polares, así como cargas de Kollman y Gasteiger. Luego de realizar el acoplamiento molecular se procedió a evaluar la similitud entre la conformación predicha y la conformación experimental cristalográfica mediante la desviación cuadrática media (RMSD). Esta última se calculó utilizando el programa PyMOL.

Se consideró que valores de RMSD menores a 2 Å indican una reproducción satisfactoria de la conformación experimental y por lo tanto, el protocolo de acoplamiento molecular empleado es confiable (Bell, E. y Zhang, Y. 2019; Devaurs, D. *et al.*, 2019).

5.7 Ensayos biológicos

5.7.1 Ajuste de bacterias al 0.5 de McFarland

Las cepas bacterianas certificadas que fueron empleadas para evaluar la actividad inhibidora de las fracciones del extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius* fueron: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (CDBB-B 1010) y *Bacillus subtilis* (CDBB-B 1009); dichas cepas fueron donadas por el laboratorio de biotecnología 2 del área académica de química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Primero, se seleccionaron colonias aisladas de un cultivo en agar Müller Hinton de la cepa a evaluar; con ayuda de un asa de siembra dichas colonias se suspendieron en un vial con 6 mL de agua destilada y estéril. Se agitó la suspensión con un vórtex para homogeneizar. Después, se midió la absorbancia de la suspensión bacteriana con ayuda de un espectrofotómetro calibrado a 550 nanómetros (nm). El ajuste a 0.125 nm se realizó añadiendo agua destilada estéril, o en su defecto, agregando más cultivo bacteriano hasta obtener la concentración óptima de bacterias en suspensión. Todo lo anterior se hizo para cada una de las cepas empleadas en este estudio.

5.7.2 Preparación de las fracciones del extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius* en sus diferentes concentraciones

Para preparar la solución madre de los compuestos puros (29, 31 y 32), a 30 mg de cada compuesto se le agregaron 1.5 mL de DMSO para obtener una concentración final de 20 mg/mL. A partir de aquí, se implementó la fórmula de dilución: $C_1V_1=C_2V_2$, donde:

C_1 = Concentración de la solución madre

V_1 = Volumen de la solución madre que se toma

C_2 = Concentración deseada de la solución diluida

V_2 = Volumen final de la solución diluida

Por lo que para la segunda concentración de los compuestos puros (29, 31 y 32) a 15 mg/mL, se tomaron 1,125 μ L de la solución madre y se agregaron 375 μ L de DMSO. Para la tercera concentración de 10 mg/mL, se tomaron 1,000 μ L de la segunda concentración y se añadieron 500 μ L de DMSO. Lo anterior aplica también para el compuesto 30, sin embargo, en la prueba de difusión en agar por disco se utilizó Tween 80 en lugar de DMSO. Dicha fórmula de dilución fue aplicada en cada uno de los métodos de difusión en agar aquí empleados pues a partir de ella se obtiene el volumen y las concentraciones deseadas para cada método, incluyendo el método de macrodilución; esto puede verse resumido en la **Figura 15**.

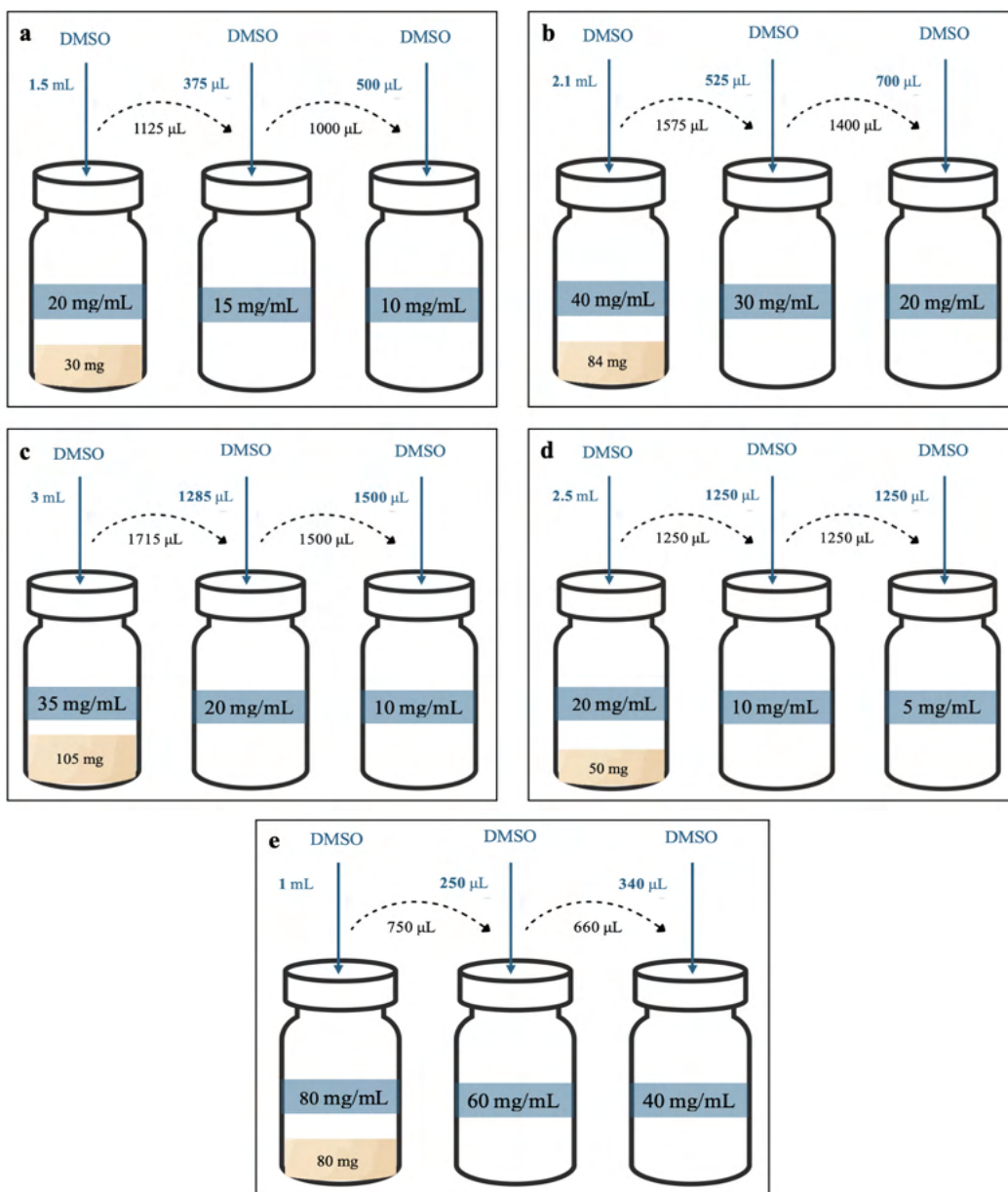


Figura 15. (a) diluciones a partir de la solución madre (20 mg/mL) de los compuestos puros (29-32) frente a *S. aureus* y *E. coli*, (b) diluciones a partir de la solución madre (40 mg/mL) del compuesto 29 (morifolina A) frente a *S. aureus* y *E. coli*, (c) diluciones a partir de la solución madre (35 mg/mL) de las fracciones III, V y VII frente a *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*, (d) diluciones a partir de la solución madre (20 mg/mL) de la fracción II frente a *S. aureus*, *E. coli* y *B. subtilis*, (e) diluciones a partir de la solución madre (80 mg/mL) de las fracciones II, III, V y VII frente a *S. aureus*.

5.7.3 Método de difusión en agar

Se preparó agar de Soya Trypticaseína (TSA; DIBICO) siguiendo el protocolo estándar del fabricante, posteriormente, se puso en autoclave junto con cajas de Petri y puntas de diferente capacidad volumétrica a 121 °C, 15 libras de presión durante 16 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se retiró el material de la autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente; en condiciones estériles y cuando el agar estaba lo suficientemente tibio, se prosiguió a verter el agar en cajas de Petri y así se pudo evitar la condensación. Después de unos minutos, cuando el agar solidificó formando un gel, se sembraron por extensión 100 µL de cada una de las cepas bacterianas previamente ajustadas a la escala 0.5 de McFarland (bioMérieux). Lo anterior se llevó a cabo de forma idéntica en los tres métodos de difusión en agar aquí empleados (en disco, pozo y gota). A partir de este punto, cada método presenta particularidades específicas:

En el método de difusión en agar por disco, una vez que las cepas bacterianas fueron sembradas, se colocaron discos de papel previamente esterilizados sobre la superficie del agar y de forma equidistante. Posteriormente, a cada disco se le aplicó 6 µL de cada uno de los compuestos puros en sus diferentes concentraciones (20, 15 y 10 mg/mL). Dichos compuestos fueron previamente solubilizados en dimetilsulfóxido (DMSO), a excepción del compuesto 30, el cuál fue solubilizado en Tween 80 debido a sus características físico-químicas (no tiende a cristalizar como las morifolinas), sin embargo, al momento de aplicar los 6 µL de este compuesto sobre el disco de papel correspondiente, el Tween 80 no permitía una adecuada difusión del compuesto sobre el disco por lo que se optó por aplicar los 6 µL de este compuesto directamente sobre la superficie del agar. El DMSO y el Tween 80 fueron utilizados como control negativo, mientras que la estreptomicina (S10; BD BBL™) se empleó como control positivo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, transcurrido este tiempo, se prosiguió a observar la presencia o ausencia de los halos de inhibición.

El método de difusión en agar por pozo se hizo como prueba preliminar utilizando solo al compuesto 29 (morifolina A) cuyas características físico-químicas son similares a las de los otros compuestos (poca solubilidad en medios acuosos). Para esta prueba se

decidió aumentar la concentración a 40, 30 y 20 mg/mL por lo que después de haber sembrado las diferentes cepas bacterianas, se hicieron pozos de forma equidistante sobre el agar para posteriormente aplicar 6 µL de morifolina A previamente solubilizada en DMSO al interior de cada pozo. Al igual que en la prueba anterior, el DMSO fue utilizado como control negativo, mientras que la estreptomicina (1.67 mg/mL; BD BBL™) se empleó como control positivo. Dicho experimento se realizó por triplicado. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, transcurrido este tiempo, se prosiguió a observar la presencia o ausencia de los halos de inhibición.

En el método de difusión en agar por gota, una vez que las cepas bacterianas fueron sembradas, se dejó secar la superficie de las cajas de Petri a temperatura ambiente durante 30 minutos para evitar que más adelante, cuando se pusieran las gotas de las fracciones/compuestos del extracto de *C. morifolius*, estas se desplazaran por gravedad. A continuación, se colocaron 6 µL de las fracciones del extracto a evaluar a concentraciones de 20, 10 y 5 mg/mL (fracción IIIb); 35, 20 y 10 mg/mL (fracciones IIIa, V y VII); 80, 60 y 40 mg/mL (fracciones III a VII), directamente sobre la superficie del agar y de forma equidistante. Dichas fracciones fueron previamente solubilizadas en DMSO, por lo que se utilizó como control negativo, mientras que la estreptomicina (1.67 mg/mL; BD BBL™) se empleó como control positivo (**Figura 16-18**). Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 24 horas, transcurrido este tiempo, se midieron los halos de inhibición.

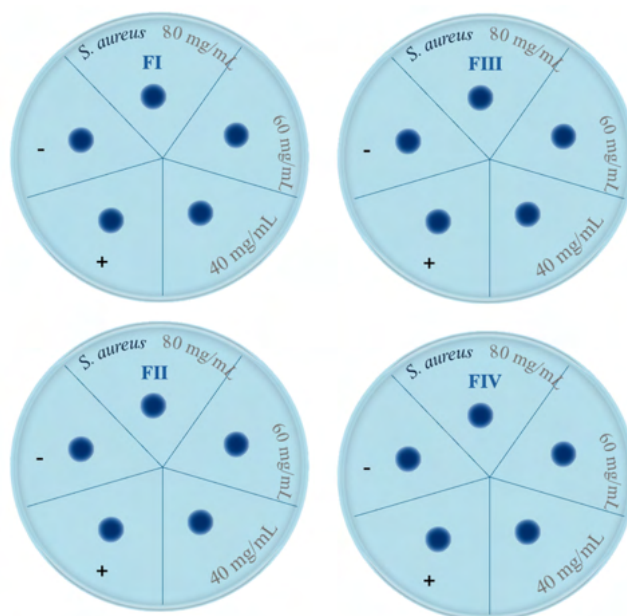


Figura 16. Método de difusión por gota de las fracciones I, II, III y IV en sus diferentes concentraciones a 80, 60 y 40 mg/mL frente a *S. aureus*. El signo positivo (+) representa al antibiótico estreptomicina y el signo negativo (-) al DMSO.

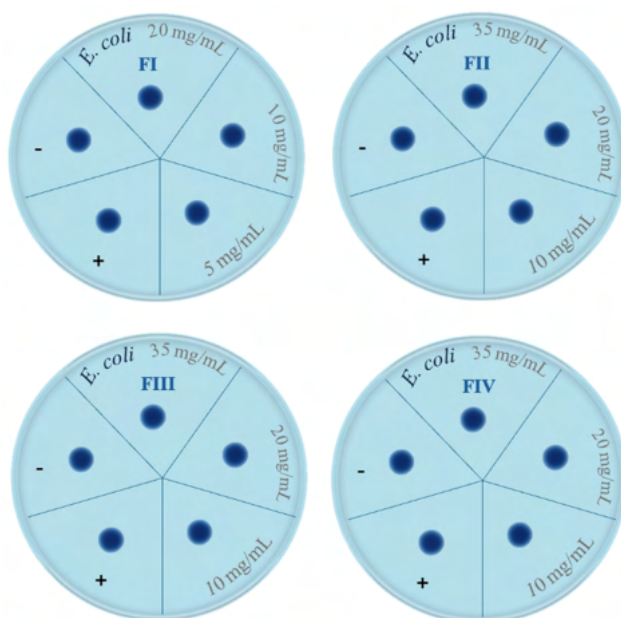


Figura 17. Método de difusión por gota de la fracción I a 20, 10 y 5 mg/mL, fracciones II, III y IV en sus diferentes concentraciones a 35, 20 y 10 mg/mL frente a *E. coli*. El signo positivo (+) representa al antibiótico estreptomicina y el signo negativo (-) al DMSO.

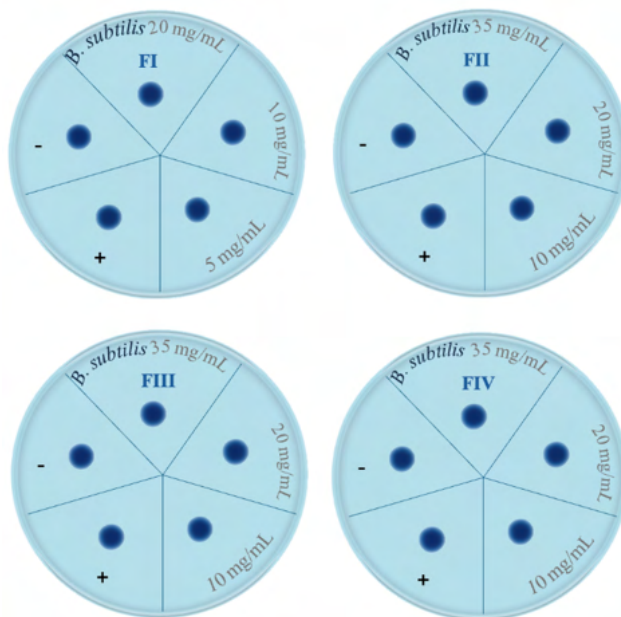


Figura 18. Método de difusión por gota de la fracción I a 20, 10 y 5 mg/mL, fracciones II, III y IV en sus diferentes concentraciones a 35, 20 y 10 mg/mL frente a *B. subtilis*. El signo positivo (+) representa al antibiótico estreptomicina y el signo negativo (-) al DMSO.

5.7.4 Método de dilución en caldo

Se preparó caldo de Soya Tripticaseína (TSB; MCD LAB) siguiendo el protocolo estándar del fabricante. Posteriormente, se vertieron 2.4 mL de caldo en cada tubo de ensayo con ayuda de un dosificador. Los tubos previamente dosificados y semisellados fueron colocados en la autoclave a 121 °C, 15 libras de presión por 16 minutos. Al finalizar el proceso de esterilización, se procedió a retirar el material de la autoclave y a sellar completamente cada tubo de ensayo para dejarlos enfriar a temperatura ambiente.

Al igual que en los métodos de difusión en agar en disco, pozo y gota, cada ensayo de macrodilución se evaluó en un rango de 20, 15 y 10 mg/mL para los compuestos puros (29-32) y 40, 30 y 20 mg/mL para el compuesto 29 (morifolina A) frente a las cepas certificadas de *E. coli* y *S. aureus*. Para evaluar las fracciones/compuestos se utilizaron

las siguientes concentraciones: 35, 20 y 10 mg/mL para las fracciones IIIa (29), V (31), VII (32) frente a *E. coli* y *B. subtilis*; 20, 10 y 5 mg/mL para la fracción IIIb (30) frente a *E. coli* y *B. subtilis* y 80, 60 y 40 mg/mL para las fracciones III (29, 30), V (31) y VII (32) frente a *S. aureus*.

En cada tubo de ensayo se adicionaron 2.4 mL de caldo de Soya Trypticaseína (TSB), 50 µL de cada microorganismo ajustado al estándar 0.5 de McFarland y 50 µL de las fracciones a evaluar en cada una de sus concentraciones. Para el control negativo se agregaron 50 µL de cada microorganismo ajustado al estándar 0.5 de McFarland y 50 µL de DMSO o bien, de Tween 80; para el control positivo se realizaron los mismos pasos, sustituyendo el DMSO (o en su defecto al Tween 80) por 50 µL del antibiótico estreptomicina (S10; BD BBL™), como se muestra en la **Figura 19**. Es importante mencionar que, al agregar todos los componentes, cada tubo fue homogeneizado con ayuda de un vórtex. Cada ensayo se realizó por triplicado y los resultados se obtuvieron mediante determinación visual de la presencia o ausencia de turbidez después de haber incubado los tubos durante 24 horas a 37 °C.

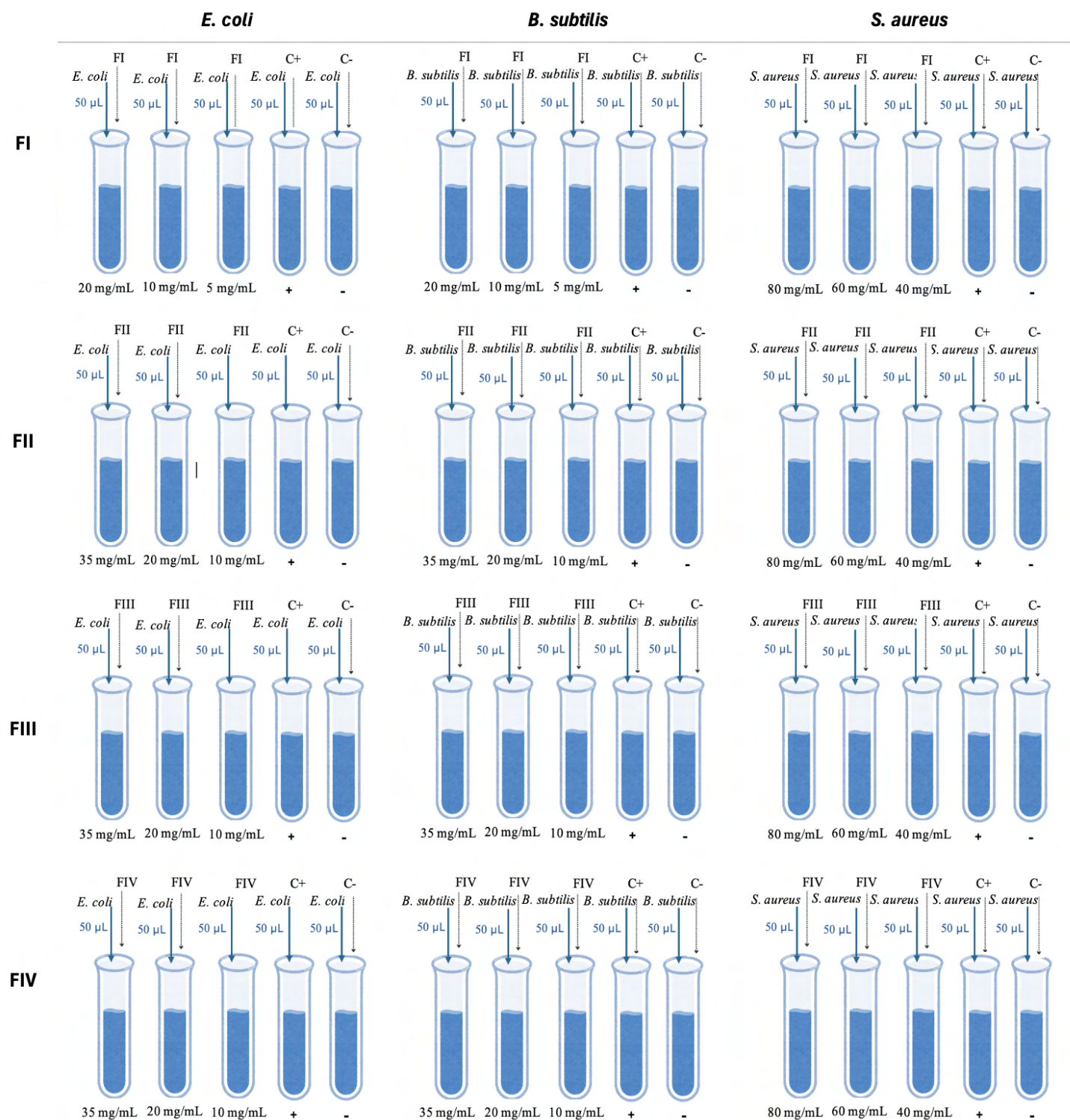


Figura 19. Método de dilución en caldo de las fracciones I, II, III y IV en sus diferentes concentraciones frente a *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*. Los signos positivos (+) representan al antibiótico estreptomicina y los signos negativos (-) al DMSO.

6. Resultados y discusión

6.1 Separación cromatográfica del extracto de la raíz de *C. morifolius*

Se realizó la CC a partir del extracto de metanol (15 g), utilizando gel de sílice (230-400 mesh ASTM) y mezclas de hexano-acetona (9:1 300 mL, 7:3 200 mL, 1:1 500 mL), y acetona (500 mL) como eluyentes. Se colectaron fracciones de 100 mL, las cuales se analizaron mediante CCF y RMN de ^1H para su agrupación en fracciones etiquetadas como FI-XIII. En la fracción IIIa se obtuvieron cristales, los cuales fueron separados y recrystalizados en un sistema de CH_2Cl_2 a evaporación lenta, el compuesto fue caracterizado como morifolina A (**29**) (25 mg). La parte viscosa se sometió a purificación por CC empleando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de CH_2Cl_2 -AcOEt (95:5 200 mL) y acetona (500 mL) como fase móvil. El análisis de las fracciones 16-18 por CCF permitió la identificación de otro compuesto puro que fue caracterizado como ácido acetil aleuritólico (**30**), fracción IIIb. En la fracción V se obtuvieron cristales (0.183 g) mismos que fueron caracterizados mediante RMN de ^1H como morifolina C (**31**). La fracción VII se sometió a separación cromatográfica mediante CC, empleando gel de sílice como fase estacionaria y mezclas de CH_2Cl_2 -AcOEt (95:5 200 mL) y acetona (500 mL) como fase móvil, el análisis de una subfracción por RMN de ^1H permitió la caracterización como morifolina B (**32**) (**Figura 20**).

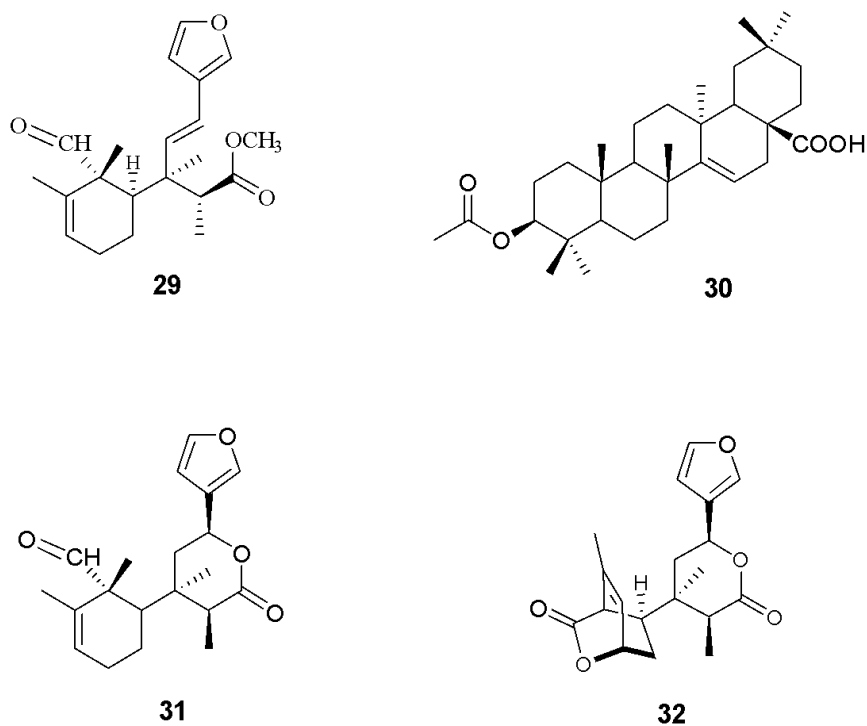


Figura 20. Estructuras químicas de los compuestos aislados de la raíz de *C. morifolius*.

6.2 Análisis estructural de los clerodanos aislados del extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius*

Los espectros de RMN de los compuestos puros (**29**, **31-32**) fueron obtenidos y comparados con los espectros reportados en el trabajo de Hernández y Velázquez, 2022 y Melo *et al*, 2014, con la finalidad de caracterizar y determinar el grado de pureza de cada uno de los metabolitos aislados, y de esta manera se aseguró la presencia del número y tipo de señales correspondiente para cada uno de los hidrógenos y sus desplazamientos químicos en ppm a los cuales se encuentran cada uno de los hidrógenos de los diferentes grupos funcionales que conforman las estructuras químicas de cada uno de los compuestos (**Figuras 21-23**).

El análisis de los espectros de RMN de ^1H (**Figura 21**), mostraron entre las señales más representativas para las estructuras de los compuestos **29**, **31** y **32**, son las asignadas a los H-15, H-16 y el H-14 (δ_{H} 7.48 ppm [simple], 7.42 ppm [triple] y 6.42 ppm [doble de

dobles] que corresponden a los hidrógenos de anillos de furano. Una señal simple muy característica y compartida por la morifolina A y morifolina C, asignada al H-6 a un δ_H de 9.28 ppm, la cual es característica de un hidrógeno del grupo aldehído, otra señal en δ_H 5.20 ppm compartida entre morifolina B y morifolina C corresponde a una señal doble asignada a H-12, la cual está asignada a un hidrógeno base de oxígeno de un anillo de la δ -lactona.

Adicionalmente, con la finalidad de destacar las más señales específicas y propias de cada una de las morifolinas encontramos a: dos protones olefinicos característicos de los grupos alqueno disustituido a δ_H de 5.82 y 6.14 ppm correspondientes a H-11 e H-12 y una señal de un grupo metoxilo a δ_H 3.70 ppm, es importante destacar que estos grupos funcionales y señales corresponden a la morifolina A (**29**). La señal característica diferente para la morifolina B es una señal doble a un δ_H de 6.25 ppm, la cual corresponde a un hidrógeno oleofínico asignado a H-3, y para el H-2 una señal triple en δ_H de 5.00 ppm asignada a el hidrógeno base de oxígeno del anillo de la δ -lactona, correspondiente en la estructura de la morifolina B. La morifolina C presenta dos señales dobles asignadas a los H-11 [a-b], en δ_H de 2.14 y 1.86 ppm respectivamente, las cuales son características de un sistema AB. Finalmente, tres señales de tipo simple que pertenecen a los metilos terciarios asignados como H-18, H-19 y H-20 y una señal doble asignada a H-17 (**Figura 21**).

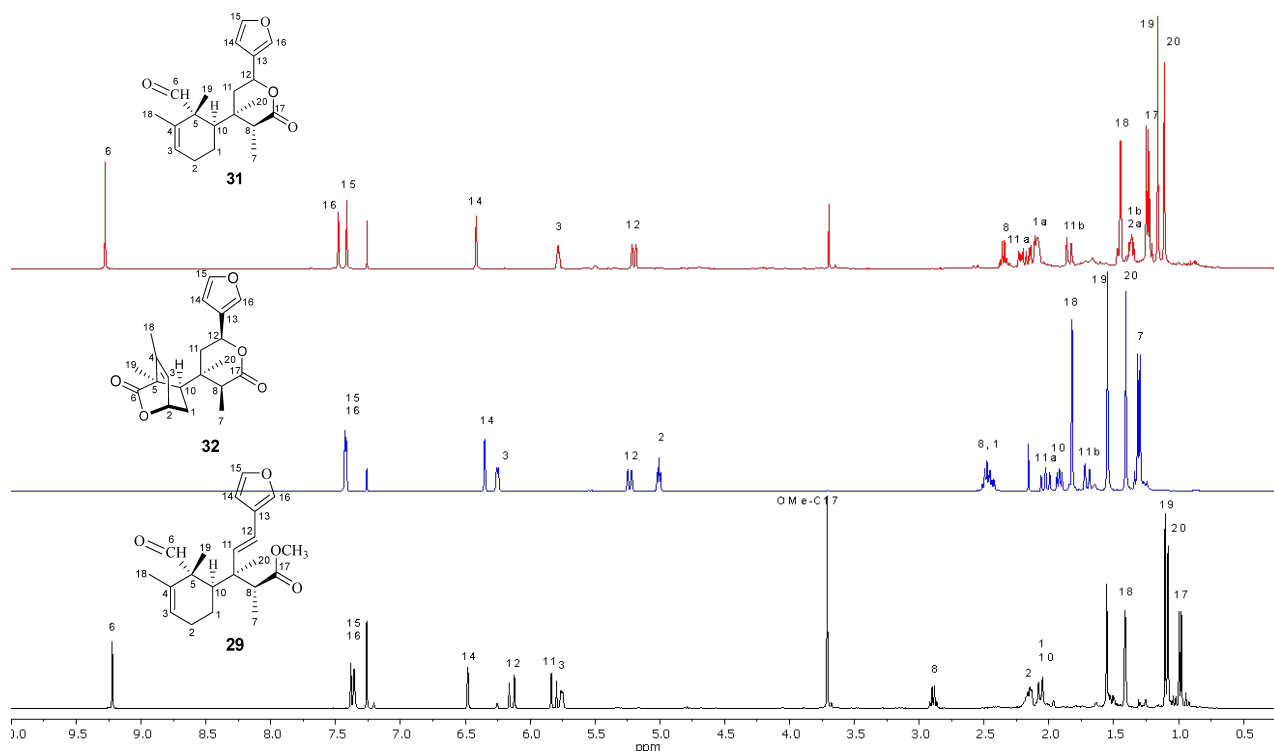


Figura 21. Espectros de RMN-¹H de las morifolinas A (29), B (32) y C (31) a 400 MHz en CDCl₃.

De la subfracción IIIb (1.53 g) también se purificó otro compuesto de tipo triterpeno, se obtuvieron 15.3 mg de un sólido blanco, con un rendimiento del 0.1%. Este compuesto se caracterizó mediante sus datos físicos y espectroscópicos, así como por la comparación de datos descritos como ácido acetil aleuritólico (30) (Melo *et al.*, 2014). En el espectro de RMN ¹H (Figura 22) presentó entre sus señales más significativas, una señal doble de dobles en δ_H 5.25 ppm asignada al hidrógeno del doble enlace, en δ_H 4.42 ppm una señal doble de dobles correspondiente al hidrógeno base del grupo acetato H-3, así como una señal doble de dobles en δ_H 2.37 ppm característica de un grupo metilo vinílico, una señal simple en 2.02 y 0.82 ppm característica de grupo metilo de un grupo éster C₃ y a frecuencias más bajas se observaron 7 señales simples correspondientes a los grupos metilo.

En su espectro de RMN de ¹³C de 30 (Figura 23), presentó entre sus señales más características, una señal en δ_C 184.3 ppm de un carbono de carbonilo de un grupo

carboxílico. En δ_C 171.2 una señal correspondiente al C-31 del carbonilo del grupo éster, en 160.70 y 117.70 se observaron las señales correspondientes al enlace doble de C14-C15, una señal en 81.03 del C-3 base de oxígeno, y a frecuencias más bajas se observaron señales para los carbonos alifáticos sp^3 presentes en la estructura del compuesto.

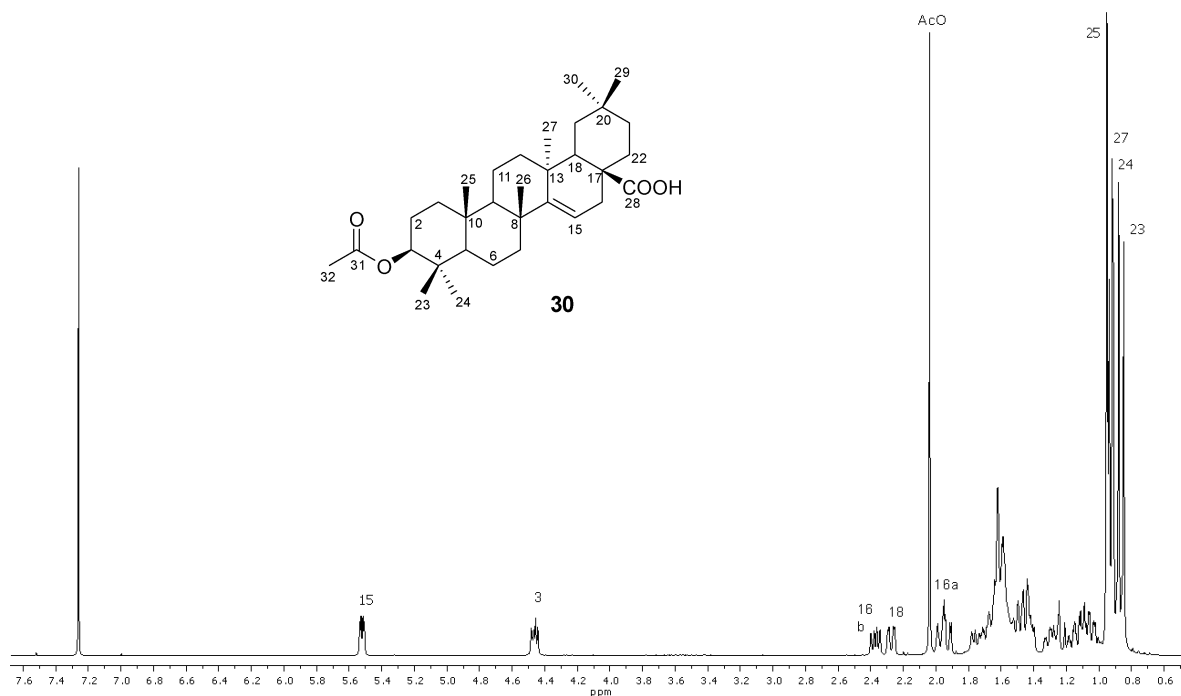


Figura 22. Espectros de RMN- 1H del ácido acetil aleuritólico (30) a 400 MHz en $CDCl_3$.

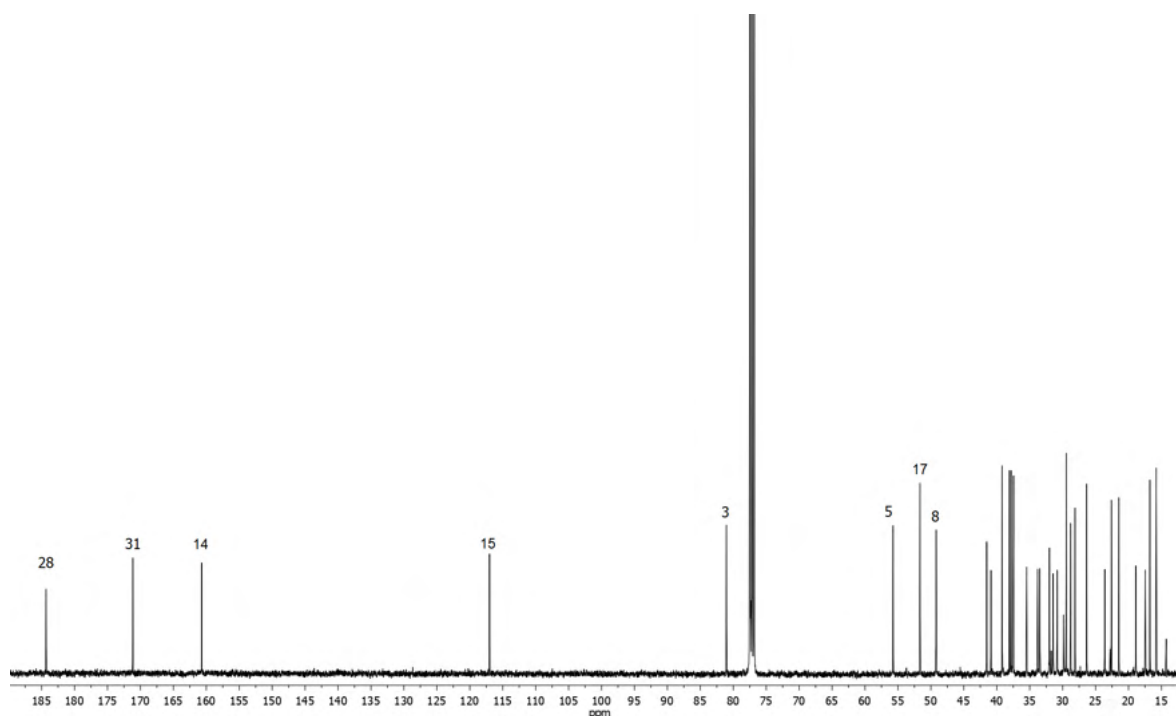


Figura 23. Espectros de RMN- ^{13}C del ácido acetil aleuritólico (**30**) a 100 MHz en CDCl_3 .

6.3 Predicción de propiedades fisicoquímicas

La predicción de la eficacia del proceso farmacocinético (ADME) de los compuestos (**29-32**) aislados de la raíz de *C. morifolius* como posibles medicamentos de administración oral se valoraron a partir de sus diferentes propiedades fisicoquímicas dadas por el programa SwissADME, una herramienta gratuita que permite el cálculo de dichas propiedades a partir de similitudes o disimilitudes de la estructura molecular de los compuestos con la de fármacos ya registrados en su base de datos. También se determinaron las propiedades fisicoquímicas de la estreptomina (**33**), un antibiótico que actúa inhibiendo la síntesis proteica en las bacterias; aunque se administra por vía intramuscular y en algunos casos por vía intravenosa, su actividad biológica la convierte en un referente útil para evaluar el grado de biodisponibilidad oral de nuevos compuestos.

Para ello, se consideraron las reglas de Lipinski, Veber y Ghose que contemplan las siete principales propiedades fisicoquímicas compatibles con un buen proceso

farmacocinético: peso molecular (MW), número de aceptores y donantes de puentes de hidrógeno, LogP, la superficie polar topológica (TPSA), el número de enlaces rotativos (flexibilidad) y refractividad molar (MR).

A partir de los datos obtenidos mediante el programa SwissADME, se observó que los compuestos **29**, **31** y **32** se encuentran dentro de los parámetros establecidos por las tres reglas: peso molecular (MW) menor a 500 g/mol, número de aceptores de puentes de hidrógeno (HBA) menor a 10, número de donadores de puentes de hidrógeno (HBD) menor a 5, coeficiente de partición (LogP) no menor de 1 ni mayor a 5, superficie polar (PSA) menor a 140 Å², número de enlaces rotativos menor a 10 y refractividad molar entre 40 y 130 cm³/mol, lo cual los hace compuestos candidatos a fármacos de administración oral. Por otro lado, el compuesto **30** presenta dos transgresiones: coeficiente de partición (LogP) mayor a 5 y refractividad molar mayor a 130 cm³/mol. Por su parte, la estreptomicina presenta un número significativo de violaciones entre las que se encuentran su peso molecular mayor a 500 g/mol, número de aceptores de puentes de hidrógeno mayor a 10, número de donadores de puentes de hidrógeno mayor a 5, coeficiente de partición (LogP) menor a 1, superficie polar (PSA) mayor a 140 Å² y refractividad molar ligeramente por encima de los 130 cm³/mol (**Tabla 5**). De lo anterior, se manifiesta que el compuesto **30** y la estreptomicina (**33**) exhiben problemas de solubilidad, absorbancia, distribución y en general de biodisponibilidad oral.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos aislados de la raíz de *C. morifolius* y del antibiótico estreptomicina.

Compuesto	Peso molecular (g/mol)	Aceptores de puentes de H (HBA)	Donadores de puentes de H (HBD)	Coefficiente de partición (LogP)	PSA (Å²)	Número de enlaces rotativos	Refractividad molar (cm³/mol)
29	344.44	4	0	3.89	56.51	7	99.28
30	498.74	4	1	6.6	63.6	3	146.39
31	330.42	4	0	3.39	56.51	3	92.04
32	344.4	5	0	3.04	65.74	2	91.01
33	581.57	15	12	-5.71	336.43	9	130.43

El programa SwissADME también ofrece una evaluación rápida e ilustrativa de los resultados referidos en la **Tabla 5** (lipofilia menor a 5, peso molecular entre 150 y 500 g/mol, polaridad de 20 a 130 Å² y menos de 9 enlaces rotativos) además de la solubilidad (menor a 6) y saturación (no inferior a 0,25) de cada compuesto mediante radares de biodisponibilidad. Cada eje del radar de biodisponibilidad representa una propiedad fisicoquímica específica y de color rosa el rango óptimo de cada una de ellas por lo que si el gráfico de la molécula (líneas color rojo) cae por completo dentro del área rosa, entonces, el compuesto presenta buena biodisponibilidad oral.

Bajo esta premisa, los compuestos **29**, **31** y **32** aislados de la raíz de *C. morifolius* cumplen con los rangos establecidos por los radares de biodisponibilidad y sus propiedades fisicoquímicas se encuentran dentro de los valores óptimos (**Figura 19**). Además, los radares de biodisponibilidad son una prueba confirmatoria de lo previamente señalado en la Tabla 3 donde se establece que los compuestos **29**, **31** y **32** presentan propiedades fisicoquímicas compatibles con un buen proceso farmacocinético lo que los convierte en candidatos a fármacos administrados por vía oral. Por otro lado, el compuesto **30** es demasiado lipofílico e insoluble mientras que la estreptomicina (**33**) es demasiado polar y sobrepasa el peso molecular óptimo para presentar un buen perfil farmacocinético de administración oral (**Figura 24**).

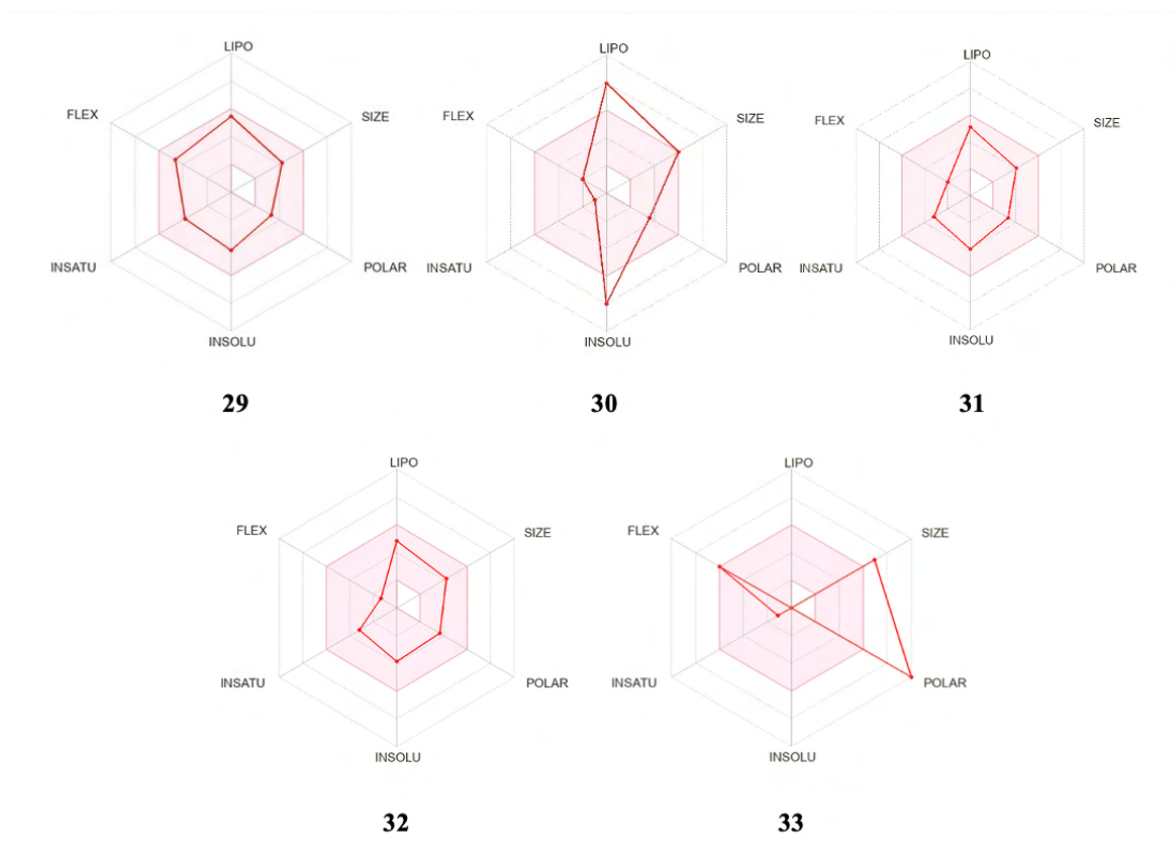


Figura 24. Radares de biodisponibilidad de los compuestos (29, 30, 31 y 32) aislados de *C. morifolius* y del antibiótico estreptomicina (33).

6.4 Predicciones ADMET

Como prueba complementaria de lo descrito anteriormente, se empleó el servidor web Pharmacokinetic-Chemical Space Modeling (pkCSM), que con base en el análisis teórico de las propiedades ADMET de los compuestos candidatos a fármacos, predice la eficacia, seguridad y viabilidad de estos durante su paso por el organismo, desde su entrada hasta su eliminación, y su toxicidad.

La herramienta pkCSM determina entre otras características, la absorción intestinal humana (HIA), solubilidad en agua, permeabilidad de las células Caco-2, fracción no unida a proteínas plasmáticas (FU), volumen de distribución (Vd), la promiscuidad inhibitoria de CYP450 y si el compuesto es sustrato de OCT2; cada uno de estos parámetros se encuentra asociado (respectivamente) a la eficaz y segura absorción (A), distribución (D), metabolismo (M) y excreción (E) de un buen fármaco.

En la **Tabla 6** se muestran los resultados obtenidos para los compuestos (**29**, **30**, **31** y **32**) aislados de la raíz de *C. morifolius* y el antibiótico estreptomicina (**33**) a partir de las predicciones con la herramienta pkCSM. De igual manera, se presenta a continuación la interpretación de estos resultados con base en Pires, D. *et al.*, (s.f).

La absorción intestinal humana se refiere al porcentaje del fármaco o compuesto administrado por vía oral que es absorbido a través del intestino delgado y, por lo tanto, estará disponible para llegar al torrente sanguíneo. Los cuatro compuestos aquí evaluados presentaron altos porcentajes de absorción intestinal que van de entre el 95 y 100%, lo cual sugiere que la mayor parte de estos estará disponible para alcanzar su sitio de acción y producir el efecto terapéutico deseado. Por otro lado, la absorción intestinal de la estreptomicina (**33**) es nula.

La solubilidad en agua (logS) también es una propiedad importante si consideramos que el agua es el principal disolvente biológico en el cuerpo, además, esta propiedad influye directamente en la formulación y vía de administración del fármaco. Los compuestos **29** (-4.501), **30** (-4.498), **31** (-4.694) y **32** (-4.415) presentaron una solubilidad moderada (log mol/L) mientras que la estreptomicina (-2.891) resultó ser muy soluble. Una solubilidad moderada es considerada ideal para una buena absorción.

Las células Caco-2 son un modelo *in vitro* ampliamente utilizado para predecir la permeabilidad intestinal de los compuestos. Los compuestos **29**, **30**, **31** y **32** exhibieron valores mayores a 0.90 (log Papp en 10⁻⁶ cm/s), lo que se traduce a una alta permeabilidad de las células Caco-2, mientras que la estreptomicina (**33**) presentó un valor menor a 0.90 (log Papp en 10⁻⁶ cm/s), lo que indica que presenta baja o casi nula capacidad de permeabilidad de estas células.

Una vez que cierto porcentaje del compuesto ha llegado al torrente sanguíneo, aquí este puede encontrarse en forma libre o bien, unido a proteínas del plasma sanguíneo; en el primer escenario, el compuesto puede difundirse hacia los tejidos y células con facilidad para posteriormente unirse a su diana terapéutica y ejercer su efecto, mientras que en el segundo escenario, la unión del compuesto a proteínas plasmáticas dificulta su difusión a través de las membranas capilares hacia los tejidos y reduce la cantidad del compuesto libre y disponible para unirse a su diana terapéutica. Los valores dados por pk_{CSM} indican la fracción del compuesto libre en el plasma. Considerando lo anterior, para los compuestos **29** (0.144), **31** (0.182) y **32** (0.215) se predice una unión moderada a proteínas plasmáticas, lo cual es conveniente ya que hay un equilibrio entre acción y duración. Por otro lado, el compuesto **30**, en su totalidad está unido a proteínas plasmáticas y esto da lugar a una difusión más limitada hacia los tejidos así como una eliminación más lenta. La estreptomicina (0.543) exhibió una baja unión a proteínas lo que puede producir efectos rápidos, sin embargo, esto también representa un mayor riesgo de toxicidad.

El volumen de distribución (V_d) indica la uniformidad en que se distribuye el compuesto por el cuerpo. Un volumen de distribución alto ($V_d > 0.45$ L/kg) indica que el compuesto se distribuye ampliamente en los tejidos, mientras que un volumen de distribución bajo ($V_d < -0.15$ L/kg) sugiere que el compuesto tiende a permanecer en el torrente sanguíneo. Los compuestos **29** (0.144) y **31** (0.166) se distribuyen y predominan en el plasma, sin embargo, puede que alcancen de manera limitada el líquido intersticial pero no los tejidos. Por su parte, el compuesto **32** (0.206) puede distribuirse más allá del plasma, atravesando moderadamente las células de los tejidos, lo que sugiere que no habría acumulación excesiva de este compuesto en tejidos específicos; el compuesto **30** (-0.921) y la estreptomicina (-0.351) se distribuyen de manera limitada en el plasma.

El citocromo P450 (CYP-450) es una familia de enzimas que actúan como el mayor agente detoxificador del cuerpo por lo que desempeñan un papel fundamental en el metabolismo de fármacos (Orellana, M. y Guajardo, V. 2004). Los compuestos **29**, **30**, **31**, **32** y la estreptomicina (**33**) exhibieron una promiscuidad inhibitoria baja de estas enzimas, por lo que hay baja probabilidad de que en un futuro existan efectos adversos

como el aumento en los niveles plasmáticos y toxicidad de medicamentos que también son metabolizados por estas enzimas.

El transportador catiónico orgánico 2 (OCT2) es una proteína que participa en la captación y eliminación renal de fármacos. Es importante evaluar si un fármaco es sustrato de OCT2 no solo para obtener información sobre su vía de eliminación sino también sobre posibles contradicciones como la deficiente eliminación y aumento de concentración de estos compuestos en dado caso de que se coadministren fármacos que sean inhibidores de OCT2. Todos los compuestos resultaron no ser sustratos de OCT2 por lo que tienen menos probabilidad de causar toxicidad renal y de presentar variaciones en su farmacocinética.

Tabla 6. Perfil ADME de los compuestos aislados de la raíz de *C. morifolius* (29, 30, 31 y 32) y del antibiótico estreptomycin (33).

Compuesto/perfil ADME	A			D		M	E
	HIA (% absorbido)	Solubilidad en agua (logS)	Caco-2 (log Papp en 10 ⁻⁶ cm/s)	FU	Vd (log L/kg)	Promiscuidad inhibitoria de CYP450	Sustrato de OCT2 (sí/no)
29	96.75%	-4.501	1.394	0.144	0.144	Promiscuidad inhibitoria baja	No
30	100%	-4.498	0.969	0	-0.921	Promiscuidad inhibitoria baja	No
31	96.22%	-4.694	1.46	0.182	0.166	Promiscuidad inhibitoria baja	No
32	98.30%	-4.415	1.093	0.215	0.206	Promiscuidad inhibitoria baja	No
33	0%	-2.891	0.08	0.543	-0.351	Promiscuidad inhibitoria baja	No

A= Absorción; D= Distribución; M= Metabolismo; E= Excreción

Parámetros asociados a un eficaz y seguro perfil ADME: absorción intestinal humana (HIA); permeabilidad de las células Caco-2; Fracción no unida a proteínas plasmáticas (FU); volumen de distribución (Vd); metabolismo por enzimas CYP450 y sustrato del transportador catiónico orgánico 2 (OCT2).

En cuanto al perfil toxicológico de cada uno de los compuestos aquí evaluados y del antibiótico estreptomicina, se consideraron los valores de toxicidad AMES, hepatotoxicidad, inhibición de hERG I, II y la toxicidad aguda en ratas; dados también por el servidor web pkCSM (**Tabla 7**).

Los cuatro compuestos resultaron ser negativos a la prueba AMES, es decir, son compuestos que no muestran potencial para causar mutaciones en el DNA y por lo tanto no podrían actuar como cancerígenos, sin embargo, la estreptomicina sí exhibió potencial cancerígeno. Por otro lado, los compuestos **30**, **31** y **32** no fueron asociados con eventos patológicos o fisiológicos que alteren la función normal del hígado, pero el compuesto **29** y la estreptomicina sí muestran hepatotoxicidad.

hERG I y II (gen humano ether-a-go-go) son genes que codifican para proteínas que forman canales de potasio en las células del músculo cardíaco. Si un fármaco inhibe estos canales, puede dar lugar al síndrome de QT largo adquirido (que conduce a una arritmia ventricular fatal). pkCSM determinó que ninguno de los compuestos son inhibidores de hERG I y tampoco de hERG II, sin embargo, estreptomicina resultó ser inhibidor de hERG II.

Los valores de dosis letal (DL₅₀) representan la cantidad de un compuesto que causa la muerte del 50% de un grupo de animales de prueba tras una sola administración. Todos los compuestos exhibieron valores que indican una baja o nula toxicidad aguda en ratas, sin embargo, podrían causar efectos adversos en humanos a dosis relativamente bajas (0.193, -0.046, -0.304 y 1.086 mg/kg/día).

Tabla 7. Propiedades toxicológicas de los compuestos aislados de la raíz de *C. morifolius* (**29**, **30**, **31** y **32**) y del antibiótico estreptomicina (**33**).

Compuesto	Toxicidad AMES	Hepatotoxicidad	Inhibidor de hERG I y II	Toxicidad aguda en ratas DL ₅₀ , mol/kg	Dosis máxima tolerada en humanos, log mg/kg/día
29	No tóxico	Sí	No inhibidor	2,489	0.193
30	No tóxico	No	No inhibidor	2.915	1.086
31	No tóxico	No	No inhibidor	2.357	-0.046
32	No tóxico	No	No inhibidor	2.526	-0.304
33	Si tóxico	No	Si inhibidor de hERG II pero no de hERG I	2.471	0.569

6.5 Predicciones del espectro de actividad biológica

Tras identificar las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas (ADMET) de los compuestos (**29**, **30**, **31** y **32**) aislados, fue necesario predecir el espectro de actividad biológica de los mismos así como del antibiótico estreptomicina (**33**), para ello se hizo uso del portal en línea Way2Drug, particularmente de la plataforma Pass online (incorporado a Way2Drug) que se encarga de predecir dichas propiedades a partir de actividades biológicas descritas experimentalmente en su base de datos. Esto último bajo la premisa de que compuestos estructuralmente similares causan efectos fisiológicos semejantes. Pass online se rige bajo dos categorías “activo” (Pa) o “inactivo” (Pi) y dichas categorías van de 0 a 1. Cuanto más cerca esté Pa de 1, mayor es la probabilidad de que el compuesto sea activo para la actividad biológica predicha, por otro lado, cuanto más cerca esté Pi de 1, mayor es la probabilidad de que el compuesto sea inactivo para la actividad biológica dada.

A partir de los datos recopilados y plasmados en el mapa de calor (**Figura 25**), se puede observar que el compuesto **30** presentó la más alta probabilidad de actuar como un

antibiótico (0.950), mientras que para estreptomicina (**33**) el porcentaje más alto (99.8) corresponde a la inhibición de la CDP-glicerol glicerofosfotransferasa, enzima que participa en la síntesis de los ácidos teicoicos, componente importante de la pared celular de bacterias Gram positivas como *S. aureus* (Badurina, D. 2002) y *B. subtilis* (Pooley, H. *et al.*, 1992).

Con moderada probabilidad de inhibir la síntesis de peptidoglicano encontramos a los compuestos **29** (0.524) y **31** (0.575).

Por otro lado, los compuestos **29** (0.180), **30** (0.246), **31** (0.436) y **32** (0.478) son candidatos a presentar un posible efecto antibacteriano pero con un alto grado de incertidumbre.

Lo anterior también aplica para los compuestos **29** (0.267) y **31** (0.291) y su actividad antimicoplasmal; la inhibición de la síntesis de proteínas por los compuestos **31** (0.080), **32** (0.101) y estreptomicina (0.122) que al parecer podrían actuar sobre la subunidad 50S del ribosoma bacteriano; la inhibición de la ATPasa de dos sectores que transporta H^+ (ATPasa F_0F_1) por los compuestos **29** (0.276), **31** (0.431), **32** (0.336) y estreptomicina (0.312) lo que resulta de gran interés porque la ATPasa F_0F_1 es la enzima implicada en la producción de ATP tanto en bacterias con cadena respiratoria como en mitocondrias y cloroplastos, sin embargo, la ATPasa es estructuralmente diferente entre cada organismo, lo que hacen de ella un blanco terapéutico atractivo (Galiano, A. 2003); la posible inhibición de la histidina quinasa por los compuestos **31** (0.412) y **32** (0.457) lo que también resulta de interés dado que las histidina quinasas regulan la expresión de genes que codifican para ciertos mecanismos de virulencia tales como factores de adhesión, toxinas o proteínas que evaden la respuesta inmune del huésped e incluso pueden influir en la capacidad de las bacterias para sobrevivir en presencia de antibióticos (Stephenson, K. y Hoch, J. 2002). Asimismo, Matsushita, M. y Janda, K. (2002) señalan que la transducción de señales en mamíferos ocurre por un mecanismo diferente al de las bacterias, por lo que la inhibición de las quinasas de histidina podría ser un objetivo potencial para nuevos agentes antimicrobianos; la inhibición de la GDP-manosa 6-deshidrogenasa por el compuesto **32** (0.135) y estreptomicina (0.442) que pudiera ser prometedor ya que la GDP-manosa 6-deshidrogenasa ha sido identificado como un

blanco terapéutico en *P. aeruginosa* para combatir la resistencia a los antibióticos en cepas mucoides de esta bacteria (Hulen, C. 2023) puesto que esta enzima participa en la biosíntesis de polisacáridos como el alginato, los cuales, a su vez, contribuyen a la formación de biopelículas y a la resistencia bacteriana (Berbis, A. *et al.*, 2015). Además, la GDP-manosa 6-deshidrogenasa no forma parte del repertorio enzimático de los mamíferos, incluyendo a los humanos (Gurvan, M. *et al.*, 2010) lo que la convierte en un blanco selectivo para los antibióticos.

Por último, Pass online reveló que el compuesto **32** (0.190) y la estreptomicina (0.250) podrían tener un efecto parecido al del antibiótico macrólido y actuar sobre el componente 23S de la subunidad 50S para inhibir la translocación de la cadena polipeptídica y por ende, la síntesis proteica.

Actividad	Compuesto					Probabilidad (Pa)
	29	30	31	32	33	
Antibacteriano	0.180	0.246	0.436	0.478	0.781	Alta
Antibiótico	-	0.950	0.165	0.223	0.613	
Antimicoplasmas	0.267	-	0.291	0.320	0.392	
Inhibidor de peptidoglicano (CDP-glicerol glicerofosfotransferasa)	0.524	-	0.575	-	0.998	Moderada
Inhibidor de síntesis proteica (50S)	-	-	0.080	0.101	0.122	
Inhibidor de la ATPasa de dos sectores	0.276	-	0.431	0.336	0.312	
Inhibidor de la histidina quinasa	-	-	0.412	0.457	-	Exploratoria
Inhibición de factores de virulencia (GDP-manosa 6-deshidrogenasa)	-	-	-	0.135	0.442	
Antibiótico similar a macrólido	-	-	-	0.190	0.250	
						No predicho

Figura 25. Mapa de calor de la predicción de las posibles actividades biológicas de los compuestos (**29**, **30**, **31** y **32**) aislados de la raíz de *C. morifolius* y del antibiótico estreptomicina (**33**).

6.6 Docking molecular de los compuestos 29-32

6.6.1 Proteína diana en *Staphylococcus aureus*: DNA girasa (PDB ID: 3U2D)

La DNA girasa (**Figura 26**) es miembro de la familia tipo II de topoisomerasas y es una enzima que provoca cambios drásticos en la topología de la estructura del DNA en las células bacterianas (Caetano, J. A. 2020), lo cual es de suma importancia para que posteriormente se pueda llevar a cabo una correcta replicación y transcripción del mismo. Está formada por dos subunidades: GyrA y GyrB. La subunidad GyrB es la responsable de la hidrólisis de ATP, que suministra la energía necesaria para modificar la topología del DNA. Además, se sabe que el sitio activo de la subunidad GyrB de la DNA girasa está conformado por los aminoácidos: Asp 81, Arg 84, Arg144 y Thr 173 (Eakin, A. *et al.*, 2012). De lo anterior surge el interés por evaluar la afinidad de unión entre los compuestos (29-32) aislados de la raíz de *C. morifolius* y el sitio activo de la DNA girasa, siendo los resultados un parteaguas para proceder o no a estudios *in vitro*. Asimismo, docking molecular resulta ser una herramienta complementaria para priorizar compuestos antes de iniciar con ensayos *in vitro*.

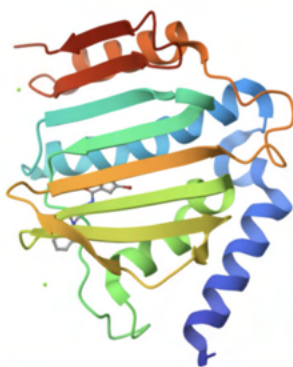


Figura 26. Estructura cristalizada de la proteína DNA girasa (PDB ID: 3U2D).

Dado que a menor energía de unión corresponde una mayor afinidad y estabilidad de interacción entre ligando-proteína, los resultados sintetizados en la **Tabla 8** indican que el compuesto **32** exhibió los valores más representativos en cuanto a su energía de unión (-6.54 kcal/mol), eficiencia de unión (-0.26) y constante de inhibición de 15.97 uM (micromolar) en comparación con los compuestos 29, 30 y 31; no obstante, estos valores se mantienen dentro de un rango correspondiente a una afinidad moderada dentro del sitio activo de la DNA girasa.

Tabla 8. Energías de unión, eficiencia y constantes de inhibición de los compuestos **29**, **30**, **31**, **32** y del antibiótico estreptomicina dentro de la proteína DNA girasa de *S. aureus*.

Proteína diana en <i>S. aureus</i>	Ligando	Energía de unión (Kcal/mol)	Eficiencia del ligando	Constante de inhibición (uM)
DNA girasa (3U2D)	Estreptomicina	-6.66	-0.17	13.03 uM
	29	-6.18	-0.25	29.41 uM
	30	-4.42	-0.12	578.14 uM
	31	-5.84	-0.24	52.77 uM
	32	-6.54	-0.26	15.97 uM

Como ya vimos, la predicción de acoplamiento molecular que se realizó por medio de Autodock tools permite conocer la conformación más favorable y estable entre ligando-proteína. Sin embargo, aún no se conoce el tipo de interacción que existe entre ambos (hidrofóbica, enlaces de hidrógeno, π -catión, etc.). Es por ello que se hizo uso de la herramienta Discovery Studio que con base a la geometría y distancia de la interacción, determina qué tipo de interacción existe entre el ligando y la proteína.

En la **Figura 27** podemos observar que el compuesto **32** presenta interacciones hidrofóbicas de tipo alquilo e interacciones de van der Waals. Ambas interacciones son

consideradas débiles individualmente pero juntas contribuyen significativamente a la estabilidad de unión entre ligando y proteína (González, F. 2017); este tipo de interacciones se dan particularmente entre la zona hidrofóbica de la proteína (al interior de esta) y los grupos funcionales hidrofóbicos del ligando como resultado del desplazamiento del solvente o partículas de agua en la zona donde existe afinidad polar entre ambas estructuras, lo que a su vez genera una mayor estabilidad del complejo proteína-ligando (Xiao, F. *et al.*, 2020).

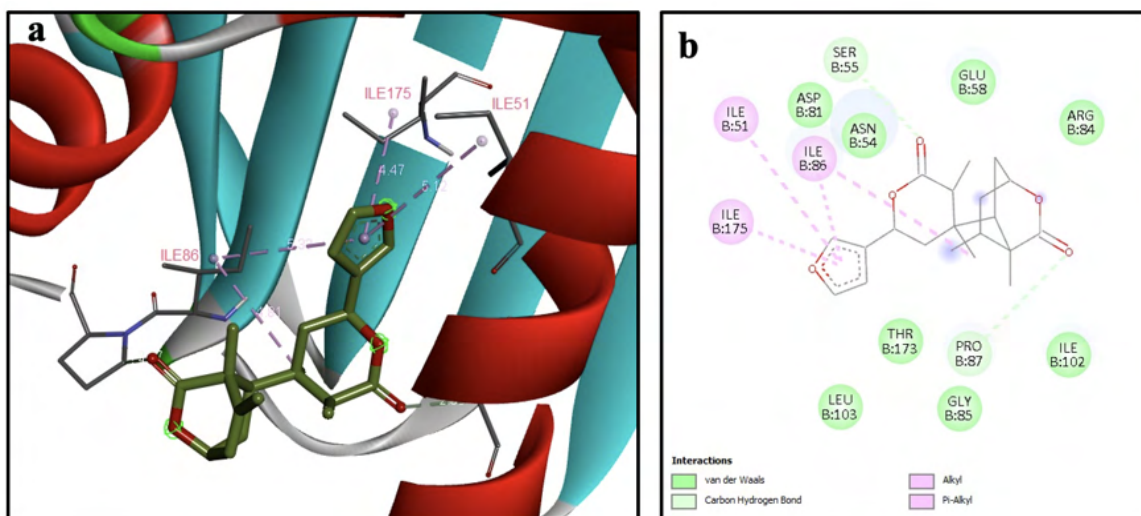


Figura 27. (a) Interacción ligando-receptor (3D) del compuesto **32** con la proteína **3U2D**, **(b)** interacciones (2D) del compuesto **32** con la proteína **3U2D**. Las líneas discontinuas rosas representan las interacciones hidrofóbicas de tipo alquilo.

6.6.2 Proteína diana en *Escherichia coli*: FimH (PDB ID: 1TR7)

FimH (**Figura 28**) es una proteína que se expresa en las puntas de las fimbrias tipo 1 (estructuras filamentosas en la superficie bacteriana) y es la responsable de la capacidad de *E. coli* para adherirse, específicamente a residuos de manosa en las glicoproteínas y glicolípidos de las células eucariotas. La adhesión mediada por FimH es crucial para la virulencia de *E. coli*, especialmente en infecciones del tracto urinario (ITU). Al unirse al epitelio de la vejiga, *E. coli* puede causar cistitis y, si no se trata, la infección puede

ascender a los riñones causando pielonefritis. El sitio activo de FimH es el responsable de reconocer y unirse a residuos de manosa que se encuentran en las células huésped; este dominio está conformado por Asp 54, Gln 133, Asn 135, Asp 140, Asp 47, Gly 14 y Asn 138 (Bouckaert, J. *et al.*, 2004). De lo anterior, surge el interés por bloquear el sitio activo de FimH, lo cual puede impedir la adhesión bacteriana e infección.

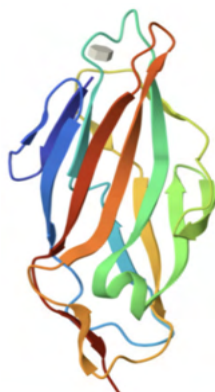


Figura 28. Estructura cristalizada de la proteína FimH (PDB ID: 1TR7).

Con base en los resultados obtenidos a partir del acoplamiento molecular para los compuestos aislados de *C. morifolius* y el antibiótico estreptomicina dentro del sitio activo de la proteína FimH (**Tabla 9**), se puede destacar que el compuesto **32** presenta los valores más representativos en cuanto a su energía de unión (-7.57 kcal/mol), eficiencia de unión (-0.3) y constante de inhibición de 2.85 uM en comparación con los compuestos 29, 30 y 31; sin embargo, estos valores se mantienen dentro de un rango correspondiente a una afinidad moderada con Phe 1 y Gln 133, residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo de FimH.

Tabla 9. Energías de unión, eficiencia y constantes de inhibición de los compuestos **29**, **30**, **31**, **32** y del antibiótico estreptomicina dentro de la proteína FimH de *E.coli*.

Proteína diana en <i>E. coli</i>	Ligando	Energía de unión (Kcal/mol)	Eficiencia del ligando	Constante de inhibición (uM/mM)
FimH (1TR7)	Estreptomicina	-4.1	-0.1	991.53 uM
	29	-5.61	-0.22	77.47 uM
	30	-1.73	-0.05	54.21 mM
	31	-7.02	-0.29	7.13 uM
	32	-7.57	-0.3	2.85 uM

El compuesto **32** (**Figura 29**) presenta una interacción puente de hidrógeno con el residuo Gln 133 (aminoácido componente del sitio activo de FmiH) a una distancia de enlace de 2.15 Å; dicha interacción se debe a que el nitrógeno del grupo amida del residuo Gln 133 puede donar hidrógenos, mientras que el grupo carbonilo del compuesto **32** está actuando como aceptor del enlace de hidrógeno. También se puede observar que el centro del anillo de furano está interactuando con el centro del anillo aromático de Tyr 48 mediante una interacción del tipo π - π Stacked.

Aunado a lo anterior, el compuesto **32** presenta interacciones hidrofóbicas de tipo alquilo con Tyr 48, Tyr 137, Ile 52 e Ile 13 así como interacciones de van der Waals.

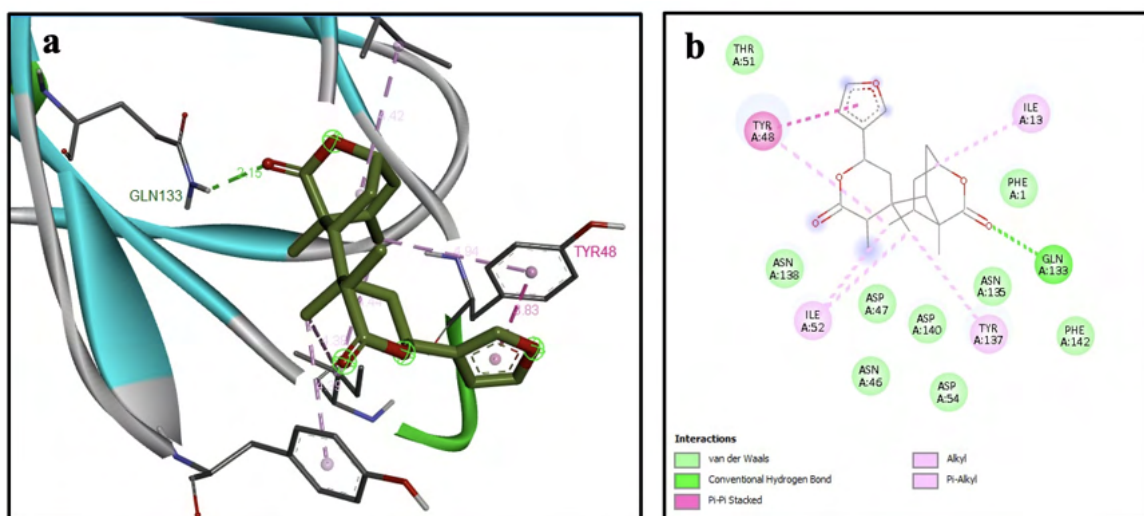


Figura 29. (a) Interacción ligando-receptor (3D) del compuesto **32** con la proteína **1TR7**, **(b)** interacciones (2D) del compuesto **32** con la proteína **1TR7**. La línea discontinua verde indica un enlaces de hidrógeno, la línea discontinua fucsia indica la presencia de una interacción π - π Stacked y las líneas discontinuas rosas representan las interacciones hidrofóbicas de tipo alquilo.

6.6.3 Proteína diana en *Bacillus subtilis*: TagU (PDB ID: 6UF6)

TagU (**Figura 30**) es una enzima LytR-CpsA-Psr (LCP) que participa en la transferencia de ácidos teicoicos (WTA) del citoplasma a la pared celular bacteriana y se ha demostrado que la inhibición de esta enzima es letal debido a la consecuente acumulación de WTA unidos a lípidos no funcionales y al agotamiento del grupo de portadores de lípidos necesarios para la síntesis de peptidoglicano (PG). También se ha visto que TagU está implicada en la formación de biopelículas y en el ensamblaje de algunos polímeros de pared celular bacteriana, tales como el polisacárido capsular de especies de estreptococos y el arabinogalactano de especies micobacterianas. Es importante señalar que TagU es exclusiva de bacterias Gram positivas, lo que la vuelve un objetivo farmacológico atractivo (Li, F. *et al.*, 2020).

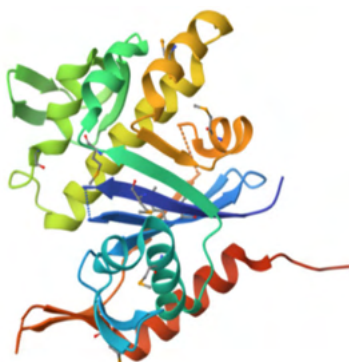


Figura 30. Estructura cristalizada de la proteína TagU (PDB ID: 6UF6).

A partir de los datos referidos en la **Tabla 10**, se puede observar que el compuesto **30** posee la conformación proteína-ligando más estable (-9.27 kcal/mol) y una constante de inhibición (159.02 nM) baja y representativa en comparación con la constante de inhibición de los otros compuestos aquí evaluados. Sin embargo, el compuesto **32** también parece prometedor al poseer una energía de unión de -8.93 kcal/mol y una constante de inhibición de 283.13 que al igual que en el compuesto 30, es una cifra dada en nanomolar (nM) e incluso, posee una eficiencia de ligando aún más alta que la que presenta el compuesto 30, lo que indica su alta capacidad de interactuar con la enzima TagU.

Tabla 10. Energías de unión, eficiencia y constantes de inhibición de los compuestos **29**, **30**, **31**, **32** y del antibiótico estreptomycin dentro de la proteína TagU de *B. subtilis*.

Proteína diana en <i>B. subtilis</i>	Ligando	Energía de unión (Kcal/mol)	Eficiencia del ligando	Constante de inhibición (mM/uM/nM)
TagU (6UF6)	Estreptomycin	-3.78	-0.09	1.69 mM
	29	-7.61	-0.3	2.66 uM
	30	-9.27	-0.26	159.02 nM
	31	-7.39	-0.31	3.82 uM
	32	-8.93	-0.36	283.13 nM

El compuesto **30** (**Figura 31**) mostró interacciones hidrofóbicas de tipo alquilo con Phe 238, Phe 234, Phe 251, Met 254, Val 241, Val 245 e Ile 221 así como interacciones de van der Waals.

Por su parte, el compuesto **32** (**Figura 32**) presentó un enlace convencional de hidrógeno entre uno de sus oxígenos exteriores y el hidrógeno electronegativo de Thr 247 a una distancia de 2.74 Å. También presenta dos interacciones electrostáticas (en “T”) entre el centro del anillo de furano del ligando y los anillos aromáticos de Phe 234 y Phe 251; un enlace π -Sulfuro entre el centro del anillo de furano (rico en electrones) y el átomo de azufre de Met 254; un enlace π -Sigma entre el carbono alifático del compuesto y la nube electrónica π del anillo aromático de PHE 238; interacciones hidrofóbicas de tipo alquilo con Met 254, Val 245, Val 241 y Leu 163, así como interacciones de van der Waals.

Las interacciones π - π (T-shaped y stacked), son interacciones que tienen lugar debido a la superposición de las nubes electrónicas π , lo que da lugar a una interacción de tipo apilamiento, mientras que el número de interacciones π -Sigma y π -Sulfuro (que conllevan en gran medida a la transferencia de carga) promueven una fuerte y estable interacción entre el ligando y el sitio de unión a la proteína (Abdullahi, S. H. *et al.*, 2022).

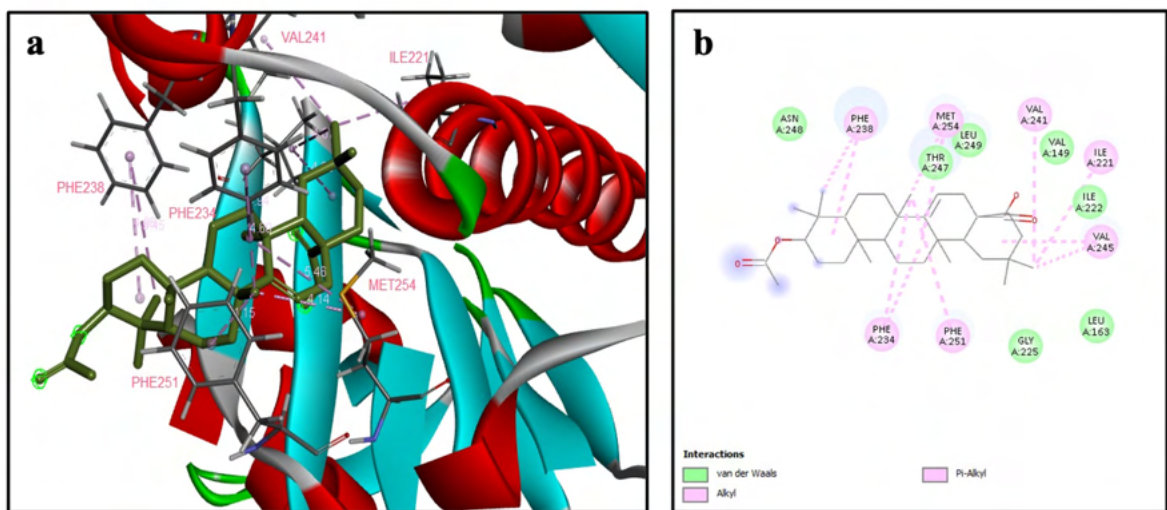


Figura 31. (a) Interacción ligando-receptor (3D) del compuesto **30** con la proteína **6UF6**, **(b)** interacciones (2D) del compuesto **30** con la proteína **6UF6**. Las líneas discontinuas rosas representan interacciones hidrofóbicas de tipo alquilo.

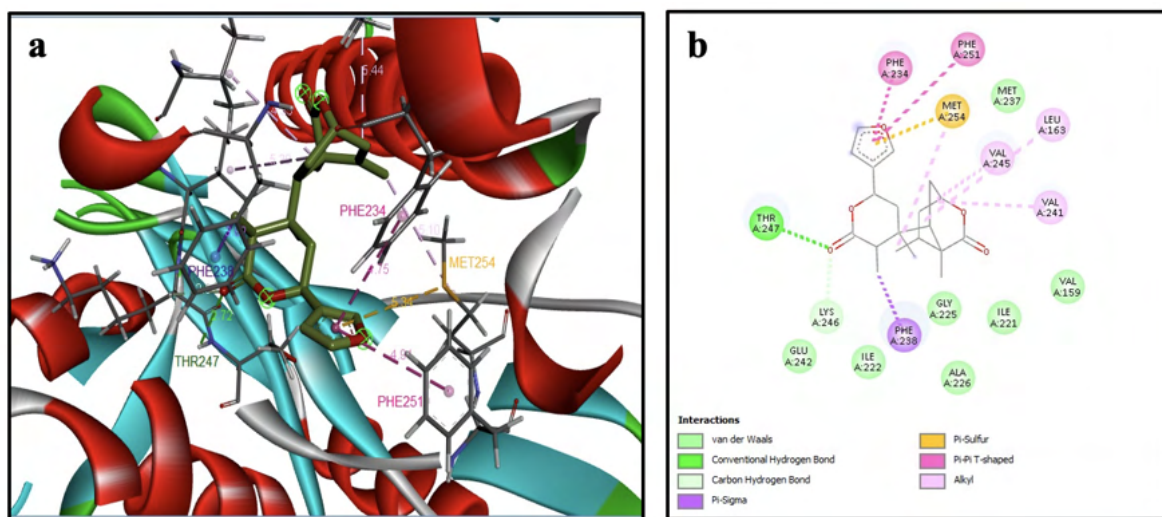


Figura 32. (a) Interacción ligando-receptor (3D) del compuesto **32** con la proteína **6UF6**, **(b)** interacciones (2D) del compuesto **32** con la proteína **6UF6**. La línea discontinua verde indica enlace de hidrógeno, la línea discontinua morada indica la presencia de un enlace π -Sigma, las líneas discontinuas fucsia indican la presencia de interacciones π - π . en T, la

línea discontinua amarilla corresponde a una interacción π -Sulfuro y las líneas discontinuas rosas representan interacciones hidrofóbicas de tipo alquilo.

Cabe mencionar que las interacciones intermoleculares del tipo π - π , junto con otras fuerzas como las de π -Sigma, interacciones hidrofóbicas del tipo alquilo y de van der Waals son débiles individualmente, pero juntas contribuyen significativamente a la afinidad y estabilidad de ligandos energéticamente favorecidos (González, F. 2017).

6.7 Redocking/RMSD

En la **Tabla 11** se muestran los resultados de RMSD entre las conformaciones predichas y las conformaciones experimentales de los diferentes ligandos acopladas a sus respectivas estructuras proteicas. Para cada uno de los complejos proteína-ligando evaluados se obtuvieron valores de RMSD menores a 2 Å, lo que indica reproducción confiable de la pose de unión experimental. Asimismo, las **Figuras 33 a 35** complementan la información antes descrita.

Tabla 11. RMSD de los ligandos co-cristalizados de las proteínas DNA girasa, FimH y TagU.

Nombre	ID en el PDB	ligando co-cristalizado	RMSD (Å)	Tamaño del grid
DNA-girasa	3U2D	4-bromo-5-metil-N-[1-(3-nitropiridin-2-il)piperidin-4-il]-1H-pirrol-2-carboxamida (08B)	0.263	48x44x44
FimH	1TR7	Butil α -D-manopiranosido (DEG)	0.192	46x44x44
TagU	6UF6	Glicerol (GOL)	1.515	126x126x126



Figura 33. Superposición del ligando co-cristalizado (color morado) y la pose predicha (color anaranjado) que muestran una favorable concordancia con un RMSD de 0.263 Å para 3U2D.

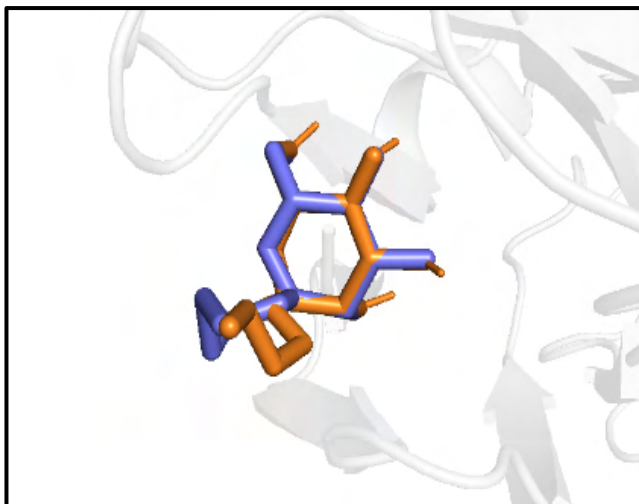


Figura 34. Superposición del ligando co-cristalizado (color morado) y la pose predicha (color anaranjado) que muestran una favorable concordancia con un RMSD de 0.192 Å para 1TR7.

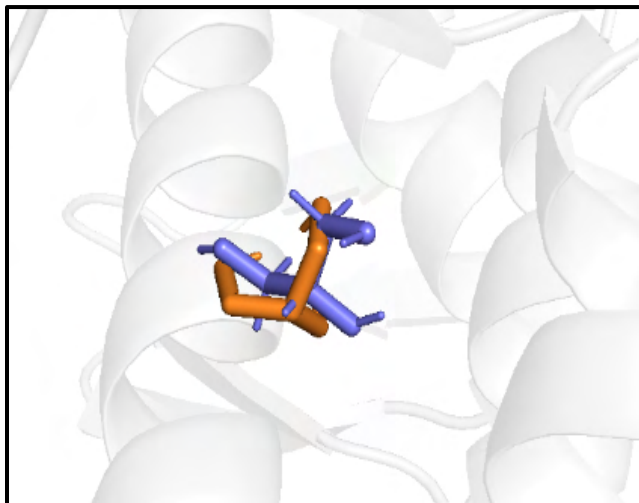


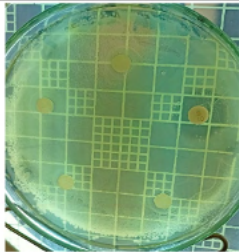
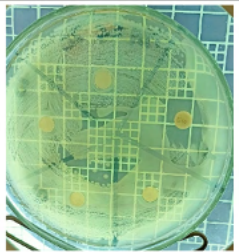
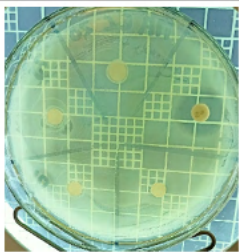
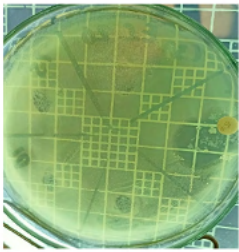
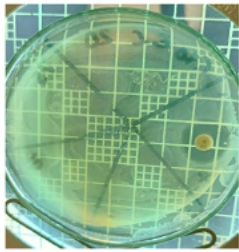
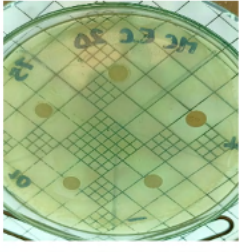
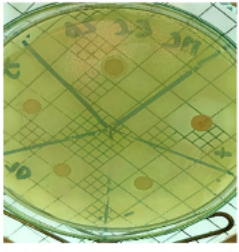
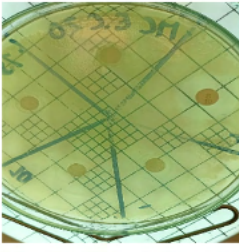
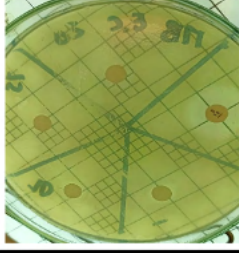
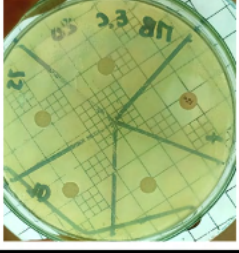
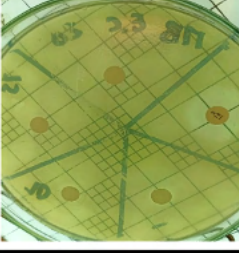
Figura 35. Superposición del ligando co-cristalizado (color morado) y la pose predicha (color anaranjado) que muestran una favorable concordancia con un RMSD de 1.515 Å para 6UF6.

6.8 Evaluación de la actividad antibacteriana

6.8.1 Resultados del método de difusión en agar por disco

La actividad inhibitoria de los compuestos puros (**29-32**) del extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius* frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus* fue nula (**Tablas 12 y 13**). En todos los casos se observó que el compuesto puro permanecía concentrado en el disco sin evidenciar una difusión significativa.

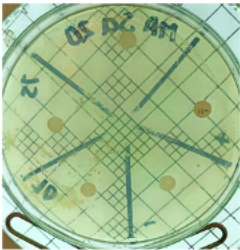
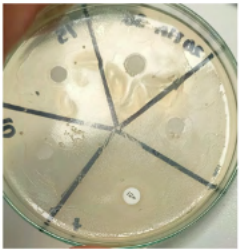
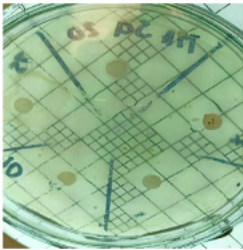
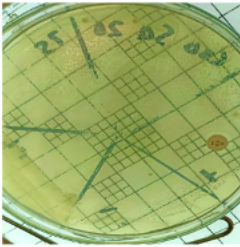
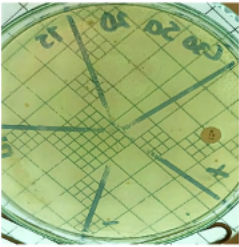
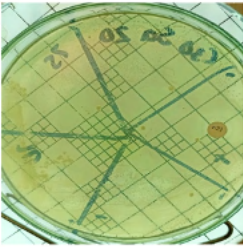
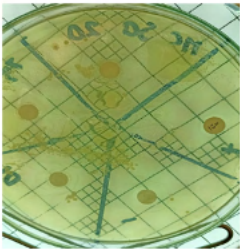
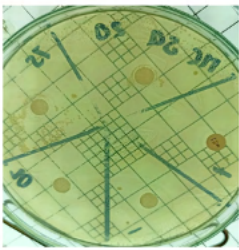
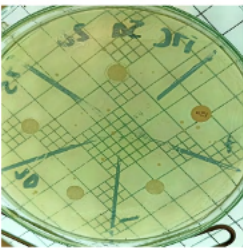
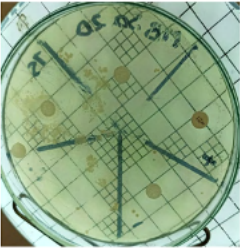
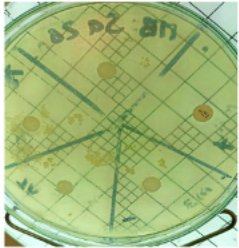
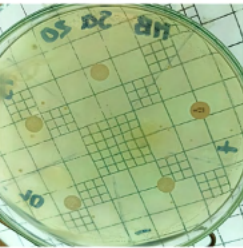
Tabla 12. Actividad antibacteriana de los **compuestos puros** (29-32) de la raíz de *C. morifolius* frente a *E. coli*.

<i>Escherichia coli</i>				
Extracto	Concentración mg/mL	1	2	3
29	20, 15 y 10			
				
				
32	20, 15 y 10			

S10 (control +).

1, 2 y 3 indican la primera, segunda y tercera réplica del experimento (ensayo por triplicado).

Tabla 13. Actividad antibacteriana de los **compuestos puros** (29-32) de la raíz de *C. morifolius* frente a *S. aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Extracto	Concentración mg/mL	1	2	3
29	20, 15 y 10			
30	20, 15 y 10			
31	20, 15 y 10			
32	20, 15 y 10			

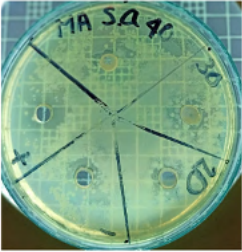
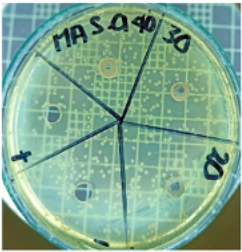
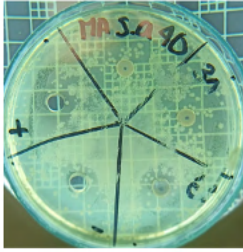
S10 (control +).

1, 2 y 3 indican la primera, segunda y tercera réplica del experimento (ensayo por triplicado).

6.8.2 Resultados del método de difusión en agar por pozo

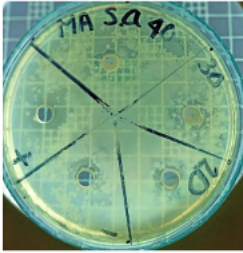
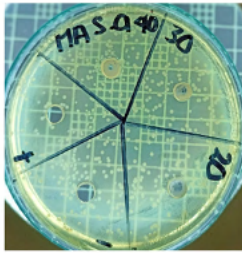
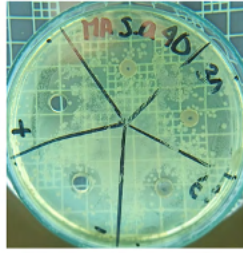
La actividad inhibitoria del compuesto **29** (morifolina A) del extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius* frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus* fue nula. Al igual que en el método de difusión en agar por disco, se observó que el compuesto permaneció concentrado en el fondo del pozo, sin evidencia de difusión hacia el medio circundante (Tabla 14 y 15).

Tabla 14. Actividad antibacteriana del **compuesto 29** (morifolina A) de la raíz de *C. morifolius* frente a *E. coli*.

<i>Escherichia coli</i>				
Extracto	Concentración mg/mL	1	2	3
29	40, 30 y 20			

1, 2 y 3 indican la primera, segunda y tercera réplica del experimento (ensayo por triplicado).
 Estreptomicina (control +) 1.67 mg/mL.

Tabla 15. Actividad antibacteriana del **compuesto 29** (morifolina A) de la raíz de *C. morifolius* frente a *S. aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Extracto	Concentración mg/mL	1	2	3
29	40, 30 y 20			

1, 2 y 3 indican la primera, segunda y tercera réplica del experimento (ensayo por triplicado).
 Estreptomicina (control +) 1.67 mg/mL.

En el método de difusión en agar, al colocar una gota de un compuesto altamente soluble en agua sobre un disco o pozo, lo ideal es que se forme un gradiente de concentración desde el disco/pozo hacia el agar (Nguyen, H. T. *et al.*, 2022), un gel altamente acuoso. Sin embargo, cuando un compuesto soluble en DMSO pero insoluble en medios acuosos se aplica sobre el disco o en pozo, el DMSO se diluye rápidamente en el medio circundante mientras que el compuesto ya no permanece disuelto sino que este se concentra en el disco o al fondo del pozo formando cristales blancos. Al precipitar, deja de difundirse dando falsos negativos (Elshikh, M. *et al.*, 2016).

La ausencia de inhibición observada también podría explicarse al considerar que las bacterias presentan mecanismos, características fisiológicas y estructurales propias (intrínsecas) de cada especie que podrían estar limitando la acción de compuestos con potencial antibacteriano (Martínez, L. 2016). Entre ellos destacan:

la baja permeabilidad de membranas, que restringe el acceso de moléculas a su blanco terapéutico cuando por ejemplo, proteínas de la membrana externa de bacterias Gram negativas llamadas porinas modulan la difusión pasiva de moléculas relativamente hidrofílicas hacia el espacio intracelular según su carga, tamaño molecular, polaridad y lipofilia (Monge, K. M. 2013); en este caso, una molécula demasiado lipofílica puede tener problemas para atravesar dichas proteínas y si es demasiado polar (hidrofílica) podría atravesar la membrana externa pero no la membrana citoplasmática (Nikaido, H. 1994; Lee, Y. y Choi, S. 2019). En contraste, en bacterias Gram positivas, la lipofilia adquiere mayor relevancia al determinar la capacidad de la molécula para atravesar la bicapa lipídica de su membrana citoplasmática. No obstante, la polaridad, carga y tamaño de la molécula sigue influyendo en ambos tipos bacterianos (Lambert, P. 2002).

Es importante destacar que debe existir un balance óptimo entre hidrofilia y lipofilia en ambos casos para que las moléculas no queden atrapadas en las porinas o en las membrana citoplasmática y puedan alcanzar el espacio intracelular en concentraciones inhibitorias (Lee, Y. y Choi, S. 2019).

Por otro lado, en *E. coli* (Elkins, C. y Nikaido, H. 2002), *S. aureus* (Price, C. *et al.*, 2002) y *B. subtilis* (Steinfels, E. *et al.*, 2004) se ha identificado la presencia de BE que son proteínas de membrana codificadas naturalmente en sus cromosomas, capaces de

transportar hacia el exterior a una velocidad elevada una amplia variedad de compuestos tóxicos para la célula bacteriana, tales como metabolitos, detergentes, disolventes orgánicos y antibióticos (Monge, K. M. 2013), lo que significa que la concentración intracelular del compuesto nunca será lo suficientemente alta como para provocar un efecto antibacteriano.

También es posible que la conformación estructural de la diana terapéutica propia de cada especie no sea completamente compatible con el compuesto, lo que reduce la afinidad de interacción. No obstante, con base en los resultados obtenidos a partir del docking molecular se puede apreciar que el compuesto 32 presenta afinidad moderada dentro del sitio activo de la DNA girasa y FimH mientras que este mismo compuesto al igual que el compuesto 30 presentan alta afinidad dentro del sitio activo de TagU. A diferencia de lo aquí predicho, en las pruebas *in vitro* no se observó actividad antibacteriana. Dichos resultados sugieren que la falta de actividad antibacteriana observable no necesariamente implica ausencia de interacción entre los compuestos puros y el blanco terapéutico, sino que podría deberse a que los compuestos no están alcanzando concentraciones intracelulares efectivas derivado de los mecanismos intrínsecos antes mencionados (baja permeabilidad celular, BE) y de las propiedades fisicoquímicas de cada compuesto (solubilidad, polaridad, lipofilia, tamaño, carga).

6.8.3 Resultados del método de difusión en agar por gota

Con base en los datos que se muestran en la **Tabla 16**, podemos determinar que las fracciones (IIIa, IIIb, V, VII) del extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius* mostraron una inhibición moderada frente a cepas certificadas de *E. coli* y *B. subtilis* en comparación con el antibiótico. Por otra parte, al ser inciertos los resultados frente a *S. aureus*, se decidió hacer una segunda prueba aumentando la concentración de los extractos a 80, 60 y 40 mg/mL (de las fracciones IIIa, IIIb, V y VII) (**Tabla 17**).

Tabla 16. Actividad antibacteriana de las **fracciones/compuestos** de la raíz de *C. morifolius* frente a *E. coli* y *B. subtilis* expresada como diámetro del halo de inhibición (mm).

Extractos	29					30					31					32				
Microorganismos/ Concentración (mg/mL)	35	20	10	+	DMSO	20	10	5	+	DMSO	35	20	10	+	DMSO	35	20	10	+	DMSO
<i>E. coli</i>	9	9	7	18	-	9	9	6	18	-	9	8	8	17	-	8	7	6	20	-
	9	9	7	18	-	10	7	7	20	-	9	8	6	18	-	9	8	7	20	-
	9	7	7	17	-	11	8	6	19	-	9	8	5	18	-	9	8	5	15	-
<i>B. subtilis</i>	28	20	18	21	-	34	25	19	26	-	9	8	8	17	-	8	7	6	20	-
	24	23	15	22	-	10	9	9	25	-	9	8	6	18	-	9	8	7	20	-
	27	22	10	30	-	33	28	19	24	-	9	9	5	18	-	9	8	5	15	-

(-)= ausencia de inhibición.

(+)= control positivo (estreptomicina 1.67 mg/mL).

Tabla 17. Actividad antibacteriana de las **fracciones/compuestos** de la raíz de *C. morifolius* frente a *S. aureus* expresada como diámetros del halo de inhibición (mm).

Extractos	29					30					31					32				
Microorganismos/ Concentración (mg/mL)	80	60	40	+	DMSO	80	60	40	+	DMSO	80	60	40	+	DMSO	80	60	40	+	DMSO
<i>S. aureus</i>	8	6	5	18	-	10	7	6	17	-	9	9	8	20	-	8	6	5	20	-
	9	7	5	17	-	9	8	7	21	-	8	7	6	17	-	9	6	5	18	-
	8	7	6	20	-	9	6	5	16	-	8	6	6	21	-	9	6	5	17	-

(-)= ausencia de inhibición.

(+)= control positivo (estreptomicina 1.67 mg/mL).

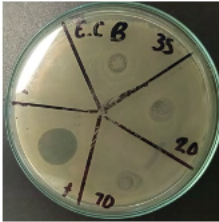
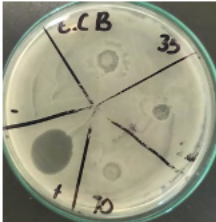
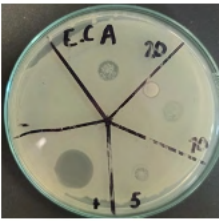
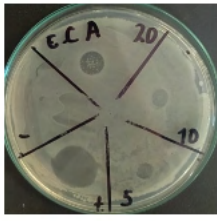
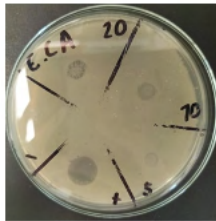
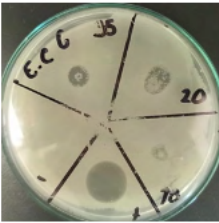
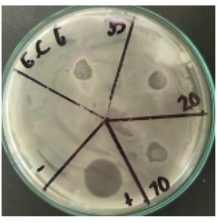
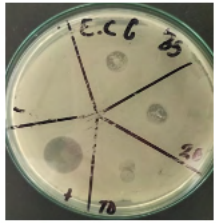
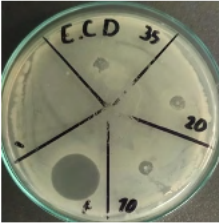
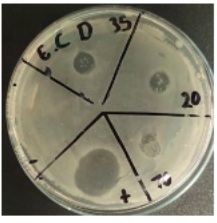
Derivado de los resultados anteriores, se evidencia que la fracción que contiene principalmente al compuesto **30** en sus concentraciones de 20 y 80 mg/mL respectivamente, fue la que presentó la mayor actividad inhibitoria frente a *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus* (Tabla 18-20).

Los resultados obtenidos indican que, a diferencia de los compuestos puros, las subfracciones sí presentan actividad antibacteriana. Este comportamiento ha sido reportado previamente en otros estudios (Bobbio, F. *et al.*, 2002; Pereira, E. *et al.*, 2014; Abd, N. *et al.*, 2015) donde se sugiere que las interacciones entre múltiples compuestos presentes en los extractos o, en este caso, en las subfracciones del extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius* podrían estar desempeñando un papel crucial en la actividad observada.

Otros estudios señalan que los compuestos puros pueden oxidarse y degradarse al perder cofactores naturales presentes en el extracto que funcionan como antioxidantes (Frankel, E. y German, B. 2001; Zhang, H. *et al.*, 2022), contribuyen a su estabilidad y evitan su degradación (Bobbio, F. *et al.*, 2002; Gafner, S. y Bergeron, C. 2005). Por otro lado, Wagner, H. y Merzenich, G. (2009), establecen que los compuestos de un extracto interactúan entre sí para mejorar la solubilidad y, por lo tanto, mejorar la biodisponibilidad de una o varias sustancias del mismo.

Lo anterior se relaciona particularmente con los resultados observados para el compuesto 30 el cual presentó un rendimiento del 0.1%, lo que sugiere entre otras cosas, que puede ser un compuesto susceptible a la degradación durante el proceso de aislamiento y purificación (Tsay, F. *et al.*, 2024) frente a la exposición prolongada al aire, luz, altas temperaturas, pH del gel de sílice, etc (Jain, D. *et al.*, 2013). Por lo que la disminución de estabilidad observada para este compuesto podría explicarse por la ausencia de los compuestos presentes en el extracto original, los cuales posiblemente contribuyen a su estabilidad y a la conservación de su actividad biológica.

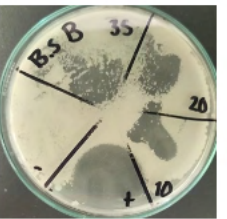
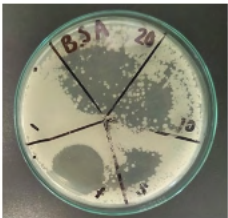
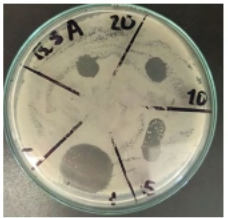
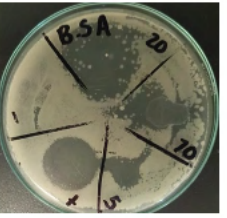
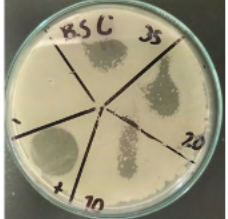
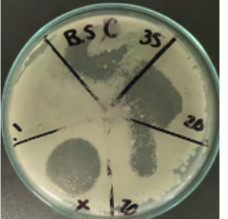
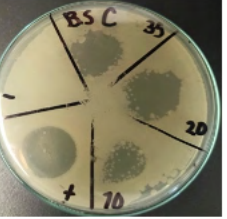
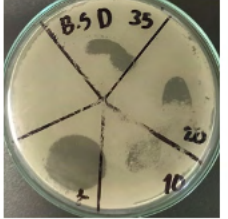
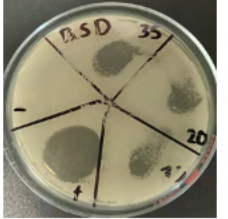
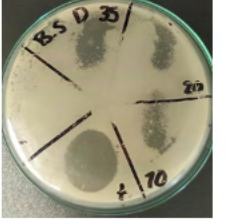
Tabla 18. Actividad antibacteriana de las **fracciones/compuestos** de la raíz de *C. morifolius* frente a *Escherichia coli*.

<i>Escherichia coli</i>				
Extracto	Concentración mg/mL	1	2	3
29	35, 20 y 10			
30	20, 10 y 5			
31	35, 20 y 10			
32	35, 20 y 10			

1, 2 y 3 indican la primera, segunda y tercera réplica del experimento (ensayo por triplicado).

Estreptomicina (control +) 1.67 mg/mL.

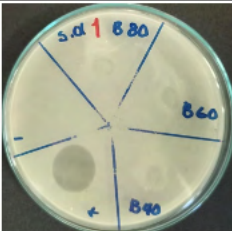
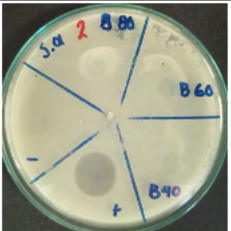
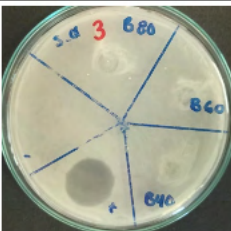
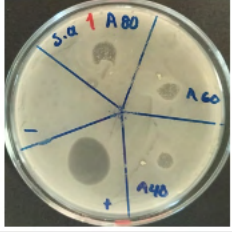
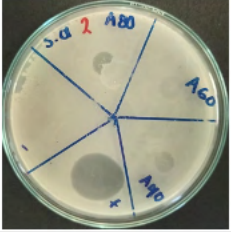
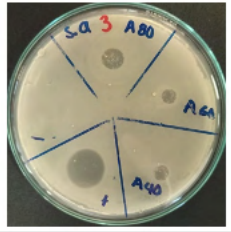
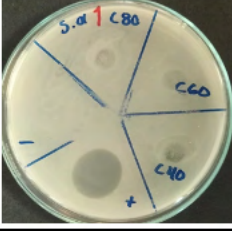
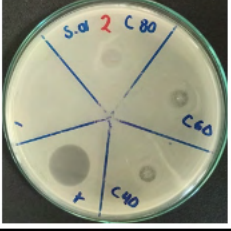
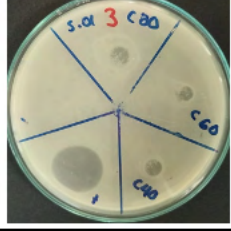
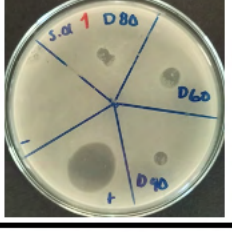
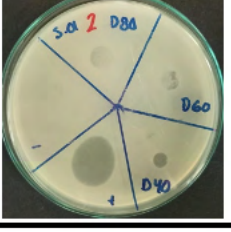
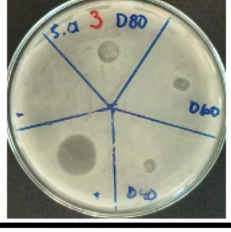
Tabla 19. Actividad antibacteriana de las **fracciones/compuestos** de la raíz de *C. morifolius* frente a *Bacillus subtilis*.

<i>Bacillus subtilis</i>				
Extracto	Concentración mg/mL	1	2	3
29	35, 20 y 10			
30	20, 10 y 5			
31	35, 20 y 10			
32	35, 20 y 10			

1, 2 y 3 indican la primera, segunda y tercera réplica del experimento (ensayo por triplicado).

Estreptomicina (control +) 1.67 mg/mL.

Tabla 20. Actividad antibacteriana de las fracciones/compuestos de la raíz de *C. morifolius* frente a *Staphylococcus aureus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>				
Extracto	Concentración mg/mL	1	2	3
29	80, 60 y 40			
				
				
32	80, 60 y 40			

1, 2 y 3 indican la primera, segunda y tercera réplica del experimento (ensayo por triplicado).

Estreptomicina (control +) 1.67 mg/mL.

6.8.4 Resultados del método de dilución en caldo

La actividad antibacteriana de los compuestos puros (29-32) del extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius* frente a *E. coli* y *S. aureus* por el método de dilución en caldo fue nula. Por su parte, los resultados de los análisis de actividad antibacteriana de las fracciones/compuestos del extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius*, mostraron diferencias según el método utilizado. La evaluación por el método de difusión en agar por gota presentó inhibición para todos los microorganismos, en tanto que la inhibición por el método de dilución en caldo fue nula. Es posible que los resultados negativos obtenidos con el método de macrodilución se deban a que, de acuerdo con las pruebas *in silico* que se realizaron con anterioridad, los compuestos mayoritarios contenidos en cada fracción presentan moderada solubilidad en medios acuosos. Según Fernández y colaboradores (2012), entre menos soluble sea un compuesto, es más difícil que alcance la concentración necesaria para interactuar con las bacterias e inhibir su crecimiento. Los resultados también podrían verse influenciados por el mecanismo de acción de los compuestos; es decir, los compuestos podrían presentar un modo de acción bactericida o bacteriostático. El primero causa la muerte celular pero sin lisis, mientras que el segundo no causa muerte celular pero sí detiene el crecimiento bacteriano. En ambos casos la densidad óptica se mantiene constante (Sánchez, M. A. *et al.*, 2019) y por ende, no es posible apreciar visualmente la capacidad inhibitoria de los extractos.

Por otro lado, de manera similar a lo planteado en la discusión de los resultados obtenidos a partir del método de difusión en agar, los resultados derivados del método de dilución en caldo también pudieron verse influenciados por los mecanismos intrínsecos de las bacterias y por las propiedades fisicoquímicas de cada compuesto.

7. Conclusiones

- La purificación del extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius* permitió el aislamiento y la elucidación estructural de los compuestos que predominan en cada fracción utilizada para evaluar la actividad antibacteriana *in vitro*.
- Los compuestos **29**, **31** y **32** ya habían sido aislados y reportados de la raíz de *C. morifolius*, mientras que el compuesto **30** se reporta por primera vez para esta especie; sin embargo, este último ya ha sido identificado de la corteza de *Croton urucurana* y *Aleurites moluccana*.
- Los compuestos **29**, **31** y **32** exhibieron propiedades fisicoquímicas compatibles con un buen perfil farmacocinético para su administración oral, sin embargo, el compuesto **30** resultó ser demasiado lipofílico e insoluble para esta vía de administración. En el perfil ADMET, los cuatro compuestos resultaron ser eficaces y viables durante su paso por el organismo, no obstante, el compuesto **29** resultó con riesgo de causar hepatotoxicidad. Por otra parte, los cuatro compuestos mostraron potencial antibacteriano moderado a limitado, a excepción del compuesto **30** que presentó una alta probabilidad de actuar como un antibiótico según Pass online.
- El acoplamiento molecular entre los compuestos **29-32** y proteínas/enzimas relacionadas con la supervivencia y virulencia bacteriana, evidenció que el compuesto **32** presentó la pose de unión más eficiente dentro del sitio activo de la enzima DNA girasa y FimH; no obstante, estos valores se mantienen dentro de un rango correspondiente a una afinidad moderada, además, este compuesto, al igual que el compuesto **30** exhibieron valores de acoplamiento prometedores frente a TagU.
- Los resultados de los ensayos *in vitro* presentaron diferencias en relación con los métodos utilizados (difusión en agar por disco, pozo, gota y macrodilución). El método de difusión en agar por disco y pozo no presentó actividad inhibitoria por

parte de los compuestos puros (**29-32**) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; mientras que por el método de difusión en agar por gota, todas las subfracciones enriquecidas de los compuestos en sus diferentes concentraciones presentaron actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, y por el contrario, en macrodilución la actividad también fue nula.

8. Referencias

- Alvin, A., Miller, K. y Neilan, B. (2014). Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiol. Res.*, 169(7-8):483-495. DOI: 10.1016/j.micres.2013.12.009
- Alonso, J. (2003). “Bosques y selvas tropicales como fuente de medicamentos”. *Bol. Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 2(2): 16-21.
- Amin, R., Kucuk, O., Khuri, F. y Shin, D. (2009). Perspectives for Cancer Prevention with Natural Compounds. *Journal of clinical oncology*, 27(16): 2712-2725. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2690394/pdf/zlj2712.pdf>
- Appendino, G., Borrelli, F., Capasso, R., Campagnuolo, C., Fattorusso, E., Petrucci, F. y Scafati, O. (2003). Minor Diterpenoids from Cascarilla (*Croton eluteria* Bennet) and Evaluation of the Cascarilla Extract and Cascarillin Effects on Gastric Acid Secretion. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 6970-6974.
- Aguilar, A. y Condori, R. (2021). Estudios *in silico*, Simulando Vida en un Entorno Virtual. *Gac. Med. Bol.*, 44(2): 278-279 . <https://doi.org/10.47993/gmb.v44i2.263>
- Agu, P., Afiukwa, C., Orji, O., Ezech, E., Ofoke, I., Ogbu, C., Ugwuja, E. y Aja, P. (2023). Molecular docking as a tool for the discovery of molecular targets of nutraceuticals in diseases management. *Sci. Rep.*, 13: 13398. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40160-2>
- Avershina, A., Shapovalova, V. y Shipulin, G. (2021). Fighting Antibiotic Resistance in Hospital-Acquired Infections: Current State and Emerging Technologies in Disease Prevention, Diagnostics and Therapy. *Front. Microbiol.* 12: 707330. DOI: 10.3389/fmicb.2021.707330
- Agüero, S. (2019). Microbiota y disbiosis vaginal. *Revista Médica Sinergia*, 4(1):3-13. DOI: <https://doi.org/10.31434/rms.v4i1.165>
- Armijo, J., Aguilar, F. y Brito, C. (2012). Tétanos generalizado: caso clínico y revisión del tema. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 50(4), 229-233. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-92272012000400004>
- Amabile, C. (2010). Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *J Infect Dev Ctries.* 4(3):126-131. DOI: 10.3855/jidc.427
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzamil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Baloch, Z. (2021). Antibiotic resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11: 1-20. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Arranz, A. (2017). Antibióticos en el suelo. Tesis de licenciatura. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia. <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/2e1f1ea4-2111-45e3-9f89-1857bef16ab9/content>
- Allen, H. K., Cloud, K. A., Wolinski, J. M., Guan, C., Greene, S., Lu, S., Boeyink, M., Broderick, N. A., Raffa, K. F. y Handelsman, J. Resident microbiota of the gypsy moth midgut harbors antibiotic resistance determinants. *DNA cell Biol*, 28: 109-117.

- Azanza, J. R., Sádaba, B. y Mediavilla, A. (2000). Quinolonas, Sulfamidas. Trimetoprima. Cotrimoxazol. Nitrofurantoina. Farmacología Humana. 1145-1157 . <https://www.academia.edu/download/51813679/DOC-20161124-WA0001.pdf>
- Allison, K., Brynildsen, M. y Collins, J. (2011). Heterogeneous bacterial persisters and engineering approaches to eliminate them. *Curr Opin Microbiol.*, 14(5): 593-598 . DOI: 10.1016/j.mib.2011.09.002
- Ayora, S. Carrasco, B., Cardenas, P., César, C., Cañas, C., Yadav, T., Marchisone, C. y Alonso, J. (2011). Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews.* 35(6): 1055-1081. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00272.x>
- Abdullahi, S. H., Uzairu, A., Shallangwa, G. A., Uba, S. y Umar, A. B. (2022). In-silico activity prediction, structure-based rug design, molecular docking and pharmacokinetic studies of selected quinazoline derivatives for their antiproliferative activity against triple negative breast cancer (MDA-MB231) cell line. *Bulletin of the National Research Centre*, 46(1). <https://doi.org/10.1186/s42269-021-00690-z>
- Abd, N., Nor, Z., Mansor, M., Azhar, F., Hasan, M. y Kassim, M. (2015). Antioxidant, antibacterial activity, and phytochemical characterization of *Melaleuca cajuputi* extract. *Complement Altern Med.*, 24(15): 385. DOI: 10.1186/s12906-015-0914-y
- Braz, R. (2010). Contribuição da Fitoquímica para o desenvolvimento de un país emergente. *Química Nova*, 33 (1): 229-231. <https://www.scielo.br/pdf/qn/v33n1/40.pdf>
- Barrera, C., Gómez. D. y Castiblanco, F. (2016). Importancia medicinal del género *Croton* (euphorbiaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 21(2):234-247. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2016/cpm162k.pdf>
- Brahmkshatriya, P. y Brahmkshatriya, P. (2013). Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications. *Natural Products*. https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/978-3-642-22144-6_120
- Bandoni, A. (2003). Las plantas aromáticas. En A. Bandoni (Ed.), *Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica* (pp 11-24). https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/38725277/Bandoni_LOS_RECURSOS_VEGETALES_AROMATICOS_EN_LATINOAMERICA-libre.pdf?1441888748
- Brasil, D., Alves, C., Guilhaon, G., Muller, A., Secco, R., Peris, G. y Llusar, R. (2008). Crystal structure and theoretical study of IR and ^1H and ^{13}C NMR spectra of cordatin, a natural product with antiulcerogenic activity. *Int. J. Quan. Chem*, 108, 2564-2575.
- Benrezzouk, R., Terencio, M. C., Ferrandiz, M. L., San Feliciano, A., Gordaliza, M., del Corral, J. M. M., de la Puente, M. L. y Alcaraz, M. J. (1999). Inhibition of sPLA2 and 5-lipoxygenase activities by two neo-clerodane diterpenoids. *Life Sci.* (63): 205-211.
- Buxton, I. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics, the dynamics of drug absorption, distribution, action, and elimination En Brunton, L., Lazo, J. y Parker, K. (Eds.), Goodman y Gilman's the pharmacological basis of therapeutics (11th ed., pp. 1-40). McGraw-Hill.
- Bouskra, D., Brézillon, C., Bérard, M., Werts, C., Varona, R., Boneca, I. y Eberl, G. (2008). Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature*, 456(7221): 507-510. DOI: 10.1038/nature07450

- Bush, L. (2023). Infecciones por *Staphylococcus aureus*. <https://www.msmanuals.com/es/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-grampositivas/infecciones-por-staphylococcus-aureus>
- Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M. y Hernández, I. (2009). <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2009/ei092e.pdf>
- Bassetti, M., Poulakou, G., Ruppe, E., Bouza, E., Van Hal, S.J. y Brink, A. (2017). Antimicrobial resistance in the next 30 years, humankind, bugs and drugs: a visionary approach. *Intensive Care Med.* 43 (10): 1464-1475.
- Berg, G., Eberl, L. y Hartmann, A. (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental microbiology*, 7(11): 1673-1685. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x>
- Bengoetxea, A., Urtaza, S. y Andrés, L. (2023). La resistencia a los antibióticos en los suelos, una grave amenaza para la salud de los ecosistemas. *Biomimesis*, (6): 7-17. https://redinternacionalbiomimesis.org/wp-content/uploads/2024/09/Revista-Biomimesis_N_06-comprimido.pdf#page=15
- Buelow, E., Rico, A., Gaschet, M., Lourenco, J., Kennedy, S. P. Wiest, L., Ploy, M. y Dagot, C. (2020). Hospital discharges in urban sanitation systems: Long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. *Water Res X*, 4: 7: 100045 pp. DOI: 10.1016/j.wroa.2020.100045
- Blair, J., Webber, M., Baylay, A., Ogbolu, D. y Piddock, L. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 13: 42-51.
- Brugueras, M. y García, M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica: Parte II. Otros grupos de antibióticos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4): 362-373. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0864-21251998000400009&script=sci_arttext
- Brugueras, M., García, M. y Díaz, R. (2005). Actualidad de las quinolonas. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(1): 1 pg. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000100011
- BBC NEWS MUNDO. (2022). "Pandemia silenciosa": las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos matan más personas que la malaria y el sida. Disponible en: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-60073805>
- Beceiro, A., Tomás, M. y Bou, G. (2013). Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin. Microbiol. Rev.*, (26)(2): 185-230.
- Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M. y Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enf. Inf. Microbiol.*, 29(2): 70-76.
- Betancourth, M., Botero, J. E. y Rivera, S. P. (2004). Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica*, 35(3): 34-39. <https://www.redalyc.org/pdf/283/28335907.pdf>
- Baysarowich, J., Koteva, K., Hughes, D., Ejim, L., Griffiths, E., Zhang, K., Junop, M. y Wright, G. (2008). Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105(12): 4886-4891 . DOI: 10.1073/pnas.0711939105
- Badurina, D. (2002). The Study of Ctp: Glycerol 3-Phosphate Cytidylyltransferase (Tard) From *Staphylococcus aureus*. McMaster University. <http://hdl.handle.net/11375/22714>

- Berbis, A., Sanchez, M., Canada, F. y Jimenez, B. (2015). Structure and Function of Prokaryotic UDP-Glucose Pyrophosphorylase, A Drug Target Candidate. *Bentham Science Publishers*, 22(14): 1687-1697.
- Bouckaert, J., Berglund, J., Schembri, M., De Genst, E., Cools, L., Wuhrer, M., Hung, C., Pinkner, J., Slättegård, R., Zavialov, A., Choudhury, D., Langermann, S., Hultgren, S., Wyns, L., Klemm, P., Oscarson, S., Knight, S. y Greve, H. (2004). Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. *Molecular Microbiology*, 55(2): 441-455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04415.x>
- Bobbio, F., Bobbio, P., Oliveira, P. y Fadelli, S. (2002). Stability and stabilization of the anthocyanins from *Euterpe oleracea* mart. *Acta alimentaria*, 31(4): 371-377.
- Bell, E. y Zhang, Y. (2019). DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. *J Cheminform* 11, 40. <https://doi.org/10.1186/s13321-019-0362-7>
- Chitemerere, T. y Mukanganyama, S. (2014). Evaluation of cell membrane integrity as a potential antimicrobial target for plant products. *BMC Complement. Altern. Med.*, 14:278. DOI: 10.1186/1472-6882-14-278
- Cano, A. (2013). Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(2): 7-16. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000200002&lng=es
- Cai, Y., Chen, Z. P. y Phillipson, J. D. (1993). Clerodane diterpenoids from *Croton lechleri*. *Phytochemistry*, 34(1): 265-268. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)90816-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90816-1)
- Corlay, N., Delang, L., Valenciennes, E., Neyts, J., Clerc, P., Smadja, J., Guéritte, F., Leyssen, P. y Litaudon, M. (2014). Tiglane diterpenes from *Croton mauritianus* as inhibitors of chikungunya virus replication. *Fitoterapia*, 97:87-91. DOI: 10.1016/j.fitote.2014.05.015
- Chen, Y., Yang, K., Yang, X., Khan, A., Liu, L., Wang, B., Zhao, Y., Liu, Y., Li, Y. y Luo, X. (2016). New Cytotoxic Tiglane Diterpenoids from *Croton caudatus*. *Planta Med.* 82(8):729-33. DOI: 10.1055/s-0042-102539
- Carpenter, P. (2024). Earth and Planetary Sciences X-ray Diffraction Laboratory. Washington University. <https://xraysrv.wustl.edu/web/xrd/brukerd8.html>
- Cervantes, A., Martínez, G. M. Mejía, H. R. Cruz, D. R., García, R., Jiménez Ramírez, J. y Juárez, A. E. (2002). Los generos de la familia Euphorbiaceae en México. *Anuales del Instituto de Biología. Serie Botánica*, 73(2): 197-219.
- Carrenho, R., Bononi, V., Barbosa, L. (1997). Glomales em areas de recomposicao de mata ciliar de Moji-Guacu, SP, Brasil. *Revista Hoehnea*, 24(1):107-113. <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/1997/01/glomales-em-areas-de-recomposicao-de-mata-ciliar-de-moji-guacu-sp-brasil/>
- Cai, I., Chen, Z.P. Y Phillipson, J. (1993). Diterpenes from *Croton Lechleri*. *Phytochemistry* 32(3): 755-760.
- Chen, Z., Cai, Y., Phillipson, J.D., (1994). Studies on the anti-tumor, antibacterial, and wound-healing properties of Dragon's blood. *Planta Medica* 60:541–545.

- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). (2017). Guía ilustrada de la flora del valle de Querétaro (1ª ed.). Querétaro, Qro., México: publicado independientemente.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) (2014). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. En R. Medina Lemos (Ed.), (1ª ed.). Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM. México, D. F. <https://archive.org/details/FloradelvalledefascAT/page/56/mode/1up?view=theater>
- Cervantes, R. M. y Sánchez, G. (2017). La microbiota del humano. *Ciencia*, 68(2):60-66. https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/68_2/PDF/Microbiotadelhumano.pdf
- Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. y Knight, R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326(5960):1694-1697. DOI: 10.1126/science.1177486
- Calderón, X. y Guerrero, A. (2019). Generalidades en microbiota intestinal. *Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas*, 22(1): 27-34. http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ACSVBE/article/view/18807/144814485201
- Cox, A., West, N. y Cripps, A. (2015). Obesity, inflammation, and the gut microbiota. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3(3): 207-215. DOI: 10.1016/S2213-8587(14)70134-2
- Clínica Universidad de Navarra. (2023). *Staphylococcus epidermis*. <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/staphylococcus-epidermidis>
- Cerezo, S., Preciado, J., Otero, M., López, F. y Curiel, M. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta médica de México*, 156(2), 172-180. <https://doi.org/10.24875/gmm.20005624>
- Calvo, J. y Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. 27(1): 44-52. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.11.001
- Carbon, J. (1964). The amino acid recognition and ribosome combining sites of E. coli transfer RNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 15(1): 1-7.
- Cicente, D. y Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. 28(2): 122-130.
- Champoux, J. (2001). DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*. 70: 369-413. DOI: 10.1146/annurev.biochem.70.1.369
- Caetano, J. A. (2020). Polimixinas. En H. A. Lopardo. (Ed.), *Antibióticos, clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia* (pp. 145-153). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/103061>
- Caetano, J. A. (2020). Quinolonas. En H. A. Lopardo. (Ed.), *Antibióticos, clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia* (pp. 145-153). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/103061>
- Controulis, J., Rebstock, M. C. y Crooks, H. M. (1949). Chloramphenicol (Chloromycetin). V. Synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 71(7):2463-2468.

- Chmielewski, R. y Frank, J. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Compr Rev Food Sci Food Saf.*, 2(1): 22-32. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F. y Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2): 149-158. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S1657-95342007000200008&script=sci_arttext#60
- Cachón, A., Salinas, G., Beh, A. y Baak, H. (2024). *Escherichia coli*: amiga y enemiga en nuestro cuerpo. *Revista Digital Universitaria (RDU)*, 25(1): 4-9. <http://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2024.25.1.4>
- Croxen, M. y Finlay, B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.*, 8(1): 26-38. DOI: 10.1038/nrmicro2265
- Cunningham, M. W. y Fujinami, R. S. (2000). Effects of microbes on the immune system. Philadelphia Lippincott Williams y Wilkins.
- Czajkowski, K., Bros, M. y Czajkowska, T. (2021). Urinary tract infection in women. *Przegląd Menopauzalny*, 20(1): 40-47. <https://doi.org/10.5114/pm.2021.105382>.
- Crossley, B., Jefferson, K., Archer, G. y Foulter, G. (2009). *Staphylococci in human disease*. 2nd Edition. Wiley-Blackwell.
- De Lima, S., Citó, A., Lopes, J., Neto, J., Chaves, M. Y Silveira, E. (2010). Fixed and volatile constituents of genus *Croton* plants: *C. adenocalyx* Baill – Euphorbiaceae. *Rev. Latinoamer. Quím.*, 38(3): 133-144. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rlq/v38n3/v38n3a1.pdf>
- Díaz, J.L. (Ed.) (1976). Usos de las plantas medicinales de México, Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A. C. (Monografías Científicas II), Editorial Libros de México, 345. <https://www.joseluisdiaz.org/portfolio/usos-de-las-plantas-medicinales-de-mexico>
- Dell, V. A., Miller, D. L. y Johnson, A. E. (1990). Effects of nucleotide- and aurodox-induced changes in elongator factor Tu conformation upon its interactions with aminoacyl transfer RNA. A fluorescence study. *Biochemistry*, 29(7): 1757-1763.
- Davis, R. (1996). Ciprofloxacin: an updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs*. 51:1019-1034.
- Davies, J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264(5157): p. 375-382. DOI: 10.1126/science.8153624
- Dalhoff, A. y Schmitz, F. (2003). *In vitro* antibacterial activity and pharmacodynamics of new quinolones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 22(4): 203-221.
- Drlica, K. y Zhao, X. (1997). DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61: 377-392.
- Daza, R. M. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud*, 22(3): 57-67. <https://www.sanidad.gob.es/eu/biblioPublic/publicaciones/docs/bacterias.pdf>

- Diekema, D., Pfaller, M. y Schmitz, F. (2001). Survey of infection due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in United States, Canadá, Latinoamérica and the Western Pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program 1997-1999. *Clinical infectious diseases*. 32(12): S114-S132.
- Devaurs, D., Antunes, D., Swan, S., Mitchell, N., Moll, M., Lizée, G. y Kavraki, L. (2019). Using parallelized incremental meta-docking can solve the conformational sampling issue when docking large ligands to proteins. *BMC Mol and Cell Biol*, 20, 42. <https://doi.org/10.1186/s12860-019-0218-z>
- Eisenreich, W., Rohdich, F., y Bacher, A. (2001). Deoxy xylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6(2): 78-84. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01812-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01812-4)
- Eksi, G., Kurbanoglu, S. y Erdem, S. A. (2020). Analysis of diterpenes and diterpenoids. *Recent Advances in Natural Products Analysis*.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2000). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *Clinical Microbiology and infection*, 6(9): 509.
- Errecalde, J. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. (Consultado el 21 de enero del 2025).* <https://www.fao.org/4/y5468s/y5468s00.htm>
- Elorza, E. (2002). Tetraciclinas, fenicoles, lincosamidas, polimixinas, espectinomicina, fosfomicina. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*. 8(70): 3763-3769. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(02\)70698-7](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(02)70698-7)
- Errington, J. y Aart, L. (2020). Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology*, 166:425-427. DOI: 10.1099/mic.0.000922
- Earl, A. M., Losick, R. y Kolter, R. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis* (2008). *Trends Microbiol.* 16: 269-275. https://riuma.uma.es/xmlui/bitstream/handle/10630/19863/TD_CAMARA_ALMIRON_Jesus.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Eakin, A., Green, O., Hales, N., Walkup, G., Bist, S., Singh, A. y Mullen, G. (2012). Pyrrolamide DNA Gyrase Inhibitors: Fragment-Based Nuclear Magnetic Resonance Screening To Identify Antibacterial Agents. *Antimicrob Agents Chemother* 56. <https://doi.org/10.1128/aac.05485-11>
- Elshikh, M. Ahmed, S., Funston, S. *et al.* Resazurin – based 96 – well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett* 38, 1015-1019 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2079-2>
- Elkins, C. y Nikaido, H. (2002). Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J. Bacteriol.*, 184(23): 6490-8. DOI: 10.1128/JB.184.23.6490-6499.2002

- Fontal, B. (Ed.). (2005). El Espectro Electromagnético y sus Aplicaciones. Escuela Venezolana para la Enseñanza de la Química. Mérida. <https://www.researchgate.net/profile/Bernardo-Fontal/publication/228871821>
- Fina, B., Rigalli, A. y Lombarte, M. (2013). Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico?. Actualizaciones en Osteología, 9(3): 239-240. <https://www.researchgate.net/publication/259969993>
- Fina, B., Lombarte, M. y Rigalli, A. (2013). Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, in vitro o in silico?. 9(3): 239-240. <http://www.osteologia.org.ar>
- Flores, M. M. (2023). Cuidados de enfermería relacionados con infecciones asociadas a la asistencia sanitaria (IAAS). Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento. 7(4): 112-122. <https://recimundo.com/index.php/es/article/view/2127>
- Frank, D., Amand, A., Feldman, R., Boedeker, E., Harpaz, N. y Pace, N. (2007). Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. Proc Natl Acad Sci U S A, 104(34): 13780-13785. DOI: 10.1073/pnas.0706625104
- Findlay, J., Hamouda, A., Dancer, S. J. y Amyes, S. G. (2012). Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of Klebsiella pneumoniae arising during meropenem therapy. Clin. Microbiol. Infect., 18(2): 140-146 .
- Fernández, A., Arrieta, D. y Martínez, N. (2023). Biorremediación en Aguas Residuales Acuícolas: Una Revisión. Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, 7(4): 8538-8568. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i4.7577
- Foster, T. (2002). Staphylococcus aureus. Molecular medical microbiology, 839-888. DOI: 10.1006/bkml.2001.0039
- Frankel, E. y German, B. (2001). Antioxidants in foods and health: Problems and fallacies in the field. Journal of the science of food and agriculture, 86(13):1999-2001.
- Fernández, T., Arango, C. L., Salamanca, C. y Flórez, M. C. (2012). Actividad del (2E)-3-(2, 3-dimetoxifenil)-1-(4-metilfenil) prop-2-en-1-ona en presencia del poli(ácido maleico-co-2-vinil-pirrolidona) sobre un aislamiento clínico de Staphylococcus aureus productor de β -lactamasas. Latreia, 25(1): 12-19. <https://revistas.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/view/11069/10185>
- Gámez, R., Obando, V. y Zamora, N. (2024). El INBio: su labor innovadora en el conocimiento y el uso sostenible de la biodiversidad en Costa Rica. Revista de Ciencias Ambientales, 58(2), 19990. <http://dx.doi.org/10.15359/rca.58-2.7>
- García, A. y Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 119-145. <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/26b94db5-92de-4aaf-8822-8f063c180904/content>
- Gheno, Y., Nava, G., Martínez, A., y Sánchez, E. (2011). Las plantas medicinales de la organización de Parteras y Médicos indígenas tradicionales de Ixhuatlancillo, Veracruz, México y su significancia cultural. Polibotánica, 31: 191-251. México, DF.
- Gallegos, P., Valenzuela, R., Delgadillo, L., López, C. y Cháirez, F. (2019). Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -

- terpineno y timol. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22(2): 241-248. <https://www.researchgate.net/profile/Francisco-Chairez/publication/334263317>
- Guijarro, M., Bonilla, F., Bonilla, D., García, M., Terán, S. y Vega, A. (2017). Efecto antimicrobiano del cinamaldehído, timol, eugenol y quitosano sobre cepas de *Streptococcus mutans*. *Rev Cubana Estomatología*, 54(4):1-9. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072017000400005&lng=es&nrm=iso
- García, I., Ávila, G., Martínez, A., Rojas, R. Y Quiñones, M. (2022). Candelilla: Recurso vegetal endémico con potencial para su uso integral. *Revista Agraria*, 19(3), 57 pp. DOI: <https://doi.org/10.59741/agraria.v19i3.10>
- Gordillo, M., Ramírez, J., Durán, R., Arriaga, E., García, R., Cervantes, A. y Hernández R. (2002). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica*, 73(2): 155-281. <https://revistas.unam.mx/index.php/bot/article/download/1947/1509/1905>
- Gordillo, M. y Durán, R. (2002). Especie nueva del género *Croton* (Euphorbiaceae) del bosque mesófilo de montaña del estado de Puebla, México. *Anales del Instituto de Biología. Serie botánica*, 73(2): 137-140.
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF). (2023). *Croton* L. <https://www.gbif.org/species/3057454>
- Gilbert, B., Wyde, P., Wilson, P. Y Meyerson, L. (1993). SP-303 small particle aerosol treatment of influenza A virus infection in mice and respiratory syncytial virus infection in cotton rats. *Antiviral Research* 21: 37-45.
- Gordillo, M. M. (1995). Contribución al conocimiento del género *Croton* (Euphorbiaceae), en el estado de Guerrero, México. Coordinación de Servicios Editoriales, Facultad de Ciencias, UNAM. https://books.google.com.mx/books?redir_esc=y&hl=es&id=bVL6EqjP7TwC&q=morifolius#v=onepage&q=morifolius&f=false
- Gavin, J. (1956). Microbiological Process Report. *Analytical Microbiology: II. The diffusion methods. Applied Microbiology*, 5(1): 25-33. <https://journals.asm.org/doi/pdf/10.1128/am.5.1.25-33.1957>
- Guillot, C. (2018). Microbiota intestinal y salud infantil. *Revista Cubana de Pediatría*, 90(1): 94-110. <http://scielo.sld.cu/pdf/ped/v90n1/ped10118.pdf>
- Gallo, R. L. y Nakatsuji, T. (2011). Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. *J Invest Dermatol*, 131(10): 1974-1980. DOI: 10.1038/jid.2011.182
- González, M. I., Melián, M. y Alonso, M. (2014). Importancia sanitaria de *Pseudomonas aeruginosa* en agua de hemodiálisis y su desinfección. *Revista Cubana de Salud Pública*, 40(2), 198-211 http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662014000200005&lng=es&tlng=es
- Gomes, F., Teixeira, P., Ceri, H. y Oliveira, R. (2012). Evaluation of antimicrobial activity of certain combinations of antibiotics against *in vitro* *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Indian J Med Res*. 135(4):542-547. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3385241/>

- Gilliver M. A., Bennett, M., Begon, M., Hazel, S. M. y Hart, C. A. (1999). Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature*, 401: 233-234.
- Gualerzi, C. y Pon, C. (1990). Initiation of mRNA translation in prokaryotes. *Biochemistry*, 29(25): 5881-5889.
- Gómez, J., Vázquez, E. y Torres, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev. Esp. Quimioter.* 28(1): 1-9. <https://seq.es/wp-content/uploads/2015/02/gomez.pdf>
- García, J. A., y García, E. Resistencias bacterianas y antibioterapia. Eficacia in vivo Eficacia *in vitro*. Madrid-Barcelona: ed Doyma, S.A. 39-50.
- García, M., Díaz, R. y Bruguera, M. (2003) Actualización en tetraciclinas. *Revista Cubana de Farmacia*, 37(3): 1 pg. http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75152003000300008&script=sci_arttext&tlng=en
- García, C., Castañeda, A., Osuna, I. y Bernal, R. (2021). Caracterización de cepas de *Escherichia coli* uropatógena aisladas del tracto urinario de mujeres durante el embarazo. *Biociencias*, 8: e1123. DOI: <https://doi.org/10.15741/revbio.08.e1123>
- García, E., González, R. y Schettino, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev. Latinoam. Patol. Clín. Med. Lab.*, 61(1): 28-40. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Galiano, A. (2003). Caracterización genética de la ATPasa F₀F₁ de “*Streptococcus pneumoniae*”: blanco de acción de antimicrobianos. [Tesis para optar por el grado de Doctor]. Universidad Complutense de Madrid.
- Gurvan, M., Thierry, T., Delphine, S., Mark, C. y Kloareg, B. (2010). The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *New Phytologist*, 188(1): 82-97. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03374.x>
- González, F. (2017). Ciclodextrinas: hospedadores moleculares para el mundo contemporáneo. Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada.
- Gafner, S. y Bergeron, C. (2005). The challenges of chemical stability testing of herbal extracts in finished products using state-of-the-art analytical methodologies. *Current pharmaceutical analysis*, 1(2): 203-215. DOI: 10.2174/1573412054022734
- Hernández, T., Canales, J., Caballero, A. y Lira, R. (2005). “Análisis cuantitativo del conocimiento tradicional sobre plantas gastrointestinales en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México”. *Interciencia*, 30(9): 529-535.
- Huerta, C., 1997. “La herbolaria: mito o realidad”. *CONABIO. Biodiversitas*, 12: 1-7.
- Hiruma, L., C. A., Gracioso, J., Toma, W., Paula, A., Almeida, A., Brasil, D., Muller, A. y Brito, A. (2000). Evaluation of the gastroprotective activity of cordatin, a diterpene isolated from *Aparisthmium cordatum* (Euphorbiaceae). *Biol. Pharm. Bull.*, (12): 1465-1469. DOI: 10.1248/bpb.23.1465
- Hernández, A. (2022). Aislamiento, caracterización y evaluación citotóxica *in silico* e *in vitro* de metabolitos secundarios de la raíz de *Croton morifolius* (Euphorbiaceae). [Tesis de licenciatura no publicada], Universidad Autónoma de Hidalgo.

- Huang, W., Wang, J., Liang, Y., Ge, W., Wang, G. Y Li, Y. (2015). Potent anti-angiogenic component in *Croton crassifolius* and its mechanism of action. *J Ethnopharmacol*, (4)175:185-91. DOI: 10.1016/j.jep.2015.09.021
- Hili, P., Evans, C. y Veness, R. (1997). Antimicrobial action of essential oils: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. *Letters in Applied Microbiology*, 24(4): 269-275. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00073.x>
- Hidalgo, I. (2001). Assessing the absorption of new pharmaceuticals. *Curr. Top. Med. Chem.*, 1(5): 385-401. DOI: 10.2174/1568026013395010
- Hulankova, R. (2024). Methods for Determination of Antimicrobial Activity of Essential Oils *In Vitro. Plants*, 13(19): 2784. <https://doi.org/10.3390/plants13192784>
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology, 23. <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol-pdf.pdf>
- Han, B., Ma, L., Yu, Q., Yang, J., Su, W., Hilal, M, G.,...Li, H. (2022). The source, fate and prospect of antibiotic resistance genes in soil: A review. *Frontiers in Microbiology*, 13: 1-14 pp. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.976657>
- Hooper, D. C. (1995). Quinolone mode of action. *Drugs*, 49 (Suppl. 2): 10-15.
- Hulen, C. (2023). The GDP-Mannose Dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa*: An Old and New Target to Fight against Antibiotics Resistance of Mucoïd Strains. *Antibiotics*, 12(12): 1649. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12121649>
- Ibáñez, N. (2014). Metabolismo secundario. Universidad Central de Venezuela. <http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/7966/1/6.%20METABOLISMO%20SECUNDARIO%202013-2014.pdf>
- Instituto Nacional de Salud (INS), Bogotá, Colombia. (2021). Informe de evento, Brotes de infecciones Asociadas a la Atención en Salud.
- Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INSST). 2022. *Pseudomonas aeruginosa*. <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/pseudomonas-aeruginosa>
- Ishikawa, K., Hasegawa, R., Furukawa, K., Kawai, F., Uehara, Y., Ohkusu, K. y Mori, N. (2024). Recurrent *Bacillus subtilis* Var. Natto Bacteremia and Review of the Literature on *Bacillus subtilis*: The First Case Report. *American Journal of Case Reports*. 9(25): e942553-1-e942553-11. DOI: 10.12659/AJCR.942553
- Jordán, M. y Casaretto, J. (2006). Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. En F. A. Squeo y L. Cardemil (Eds.), *Fisiología Vegetal* (1-24 pp). Ediciones Universidad de La Serena. <https://dlwqtxts1xzle7.cloudfront.net/31848275/Auxinasgiberelinasycitocininas-libre.pdf?1391490889>
- Jáuregui, M., Carrillo, M. y Romo, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *ALAN*, 61(3):233-241. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222011000300001
- Jamora, C., Theodoraki, M. A., Malhotra, V. y Theodorakis, E. A. (2001). Investigation of the biological mode of action of clerocidin using whole cell assays. *Bioorg. Med. Chem.*, (9): 1365-1370. DOI: 10.1016/s0968-0896(01)00051-7

- Júnior, S., Conserva, L. y Filho, J. (2006). Clerodane Diterpenes from Croton Species: Distribution and a Compilation of their ¹³C NMR Spectral Data. *Natural Product Communications*, 1(4): 319-344. https://www.researchgate.net/profile/Jose-Barbosa-Filho/publication/286374347_Clerodane_Diterpenes_from_Croton_Species_Distribution_and_a_Compilation_of_their_13_C_NMR_Spectral_Data/links/5862823d08ae8fce49098414/Clerodane-Diterpenes-from-Croton-Species-Distribution-and-a-Compilation-of-their-13-C-NMR-Spectral-Data.pdf
- Jaramillo, B., Duarte, E., Muñoz, K., y Stashenko, E. (2010). Composición química volátil del aceite esencial de Croton malambo H. Karst. colombiano y determinación de su actividad antioxidante. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 15(3), 133-142.
- Jiménez, G., Léautaud, V. y Amabile, C. F. (2001). Regulatory locus soxRS partially protects Escherichia coli against ozone. *FEMS Microbiol Letters*, 195: 175-177.
- Jackson, L., Reyes, L. y Cordiés, M. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. 8(1):13-27. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/06/20291/principios-generales-de-la-terapeutica.pdf>
- Jaramillo, G. E., Paba, G. y Ospino, M. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. *Revista NOVA*, 8(13): 76-86. <https://doi.org/10.22490/24629448.441>
- Jasso, L. y Hentschel, N. (2019). Propiedades antimicrobianas de Nanopartículas de ZnO para aplicaciones antisépticas. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. DOI: 10.13140/RG.2.2.28385.45920
- Jain, D. y Basniwal, P. (2013). Forced degradation and impurity profiling: recent trends in analytical perspectives. *Pharmaceutical and biomedical analysis*, 86: 11-35. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.07.013
- Kasote, D., Katyare, S., Hegde, M. y Bae, H. (2015). Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *Int. J. Biol. Sci.*, 11(8): 982-991. DOI: 10.7150/ijbs.12096
- Kuo, P., Yang, L., Hwang, L., Lai, Y., Li, C., Thang, D. Y Wu, S. (2013). Anti-inflammatory diterpenoids from Croton tonkinensis. *Journal of Natural Products*, 76(2): 230-236. DOI: <https://doi.org/10.1021/np300699f>
- Kümmerer, K. (2009). Antibiotics in the aquatic environment-a review-part II. *Chemosphere*, 75(4): 435-441. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.12.006>
- Kadavy, D. R., Hornby, J. M., Haverkost, T. y Nickerson, K. W. (2000). Natural antibiotic resistance of bacteria insulated from larvae of the oil fly, *Helaeomyia petrolei*. *Appl Environ Microbiol*, 66: 4615-4619.
- King, D., Malone, R. y Lilley, S. (2000). New classification and update on the quinolone antibiotics. *Am Fam Physician*, 61(9): 2741-2748. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10821154/>
- Kato, J., Nishimura, Y., Imamura, R., Niki, H., Higara, S., Suzuki, H. (1990). New topoisomerase essential for chromosome segregation in E. coli. 63:393-404.

- Kevan, L., Wang, J. (1980). Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base-pairs of deoxyribonucleic acid and $\alpha 2\beta 2$ protein core. *Biochemistry*, 19:5229-5234.
- Kumar, S. y Varela, M. F. (2013). Molecular mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. In *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*; Méndez- Vilas, A., Ed.; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 522-534.
- Kaper, J., Nataro, J. y Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2(2): 123-140. DOI: 10.1038/nrmicro818
- Kovács, Á. (2019). *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 27(8): 724-725. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>
- Kidane, D., Carrasco, B., Manfredi, C., Rothmaier, K., Ayora, S., Tadesse, S., Alonso, J. y Graumann, P. (2009). Evidence for different pathways during horizontal gene transfer in competent *Bacillus subtilis* cells. *PLoS Genetics*, 5(9): e1000630. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000630
- Kesel, S., Mader, A., Seeberger, P., Lieleg, O. y Opitz, M. (2014). Carbohydrate coating Reduces Adhesion of Biofilm-Forming *Bacillus subtilis* to Gold Surfaces. *Appl Environ Microbiol* 80.
- Lustre, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria*. 23(2). <http://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10>
- Landa, J. F., Lozano, M. y Ventura, L. M. (2020). Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia. Universidad veracruzana.
- Li, R., Natschke, S. L. y Lee, K. (2016). Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. *Natural Product Reports*, 33: 1166-1226. <https://scihub.se/https://doi.org/10.1039/C5NP00137D>
- Liu, C., Xu, J., Zhao, J., Xu, C., Dong, L., Ding, J. y Yue, J. Diterpenoids from *Croton laui* and their cytotoxic and antimicrobial activities. (2014). *J. Nat. Prod.*, 77(4): 1013–1020. DOI: 10.1021/np500042c
- Laurella, L. (2017). Resonancia magnética nuclear. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). Disponible en el repositorio institucional de la UNLP: <https://doi.org/10.35537/10915/62803>
- Lopes, E., Neto, M., Silveira, E., Pessoa, O. Y Filho, R. (2012). Flavonoids and sesquiterpenes of *Croton pedicellatus* Kunth. *Quim. Nova*, (35)11: 2169-2172. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100012>
- Linhosan, C., Uk-at, S., Setsuwan, P., Srisupattanakul, P., Boonyarat, C., Poopasit, K. Y Limtragool, O. (2023). A New Clerodane from the Leaves of *Croton krabas* and Its Cholinesterase Inhibitory Activities. *Chemistry and Biodiversity*, (20)12: 1-5. DOI: 10.1002/cbdv.202301309
- Liu, C., Xu, J., Zhao, J., Xu, C., Dong, L., Ding, J. y Yue, J. (2014). Diterpenoids from *Croton laui* and their cytotoxic and antimicrobial activities. *J Nat Prod*, 77: 1013 -1020.

- Londoño, R. (2024). Farmacocinética, generalidades. https://www.researchgate.net/publication/382527571_
- Lipinski, C., Lombardo, F., Dominy, B. y Feeney, P. (2001). Experimental and computacional approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 46(1-3): 3-26. DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0
- Lorian, V. (1988). Differences between *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob. Agents Chemother*, 32(10): 1600-1601. DOI: 10.1128/AAC.32.10.1600
- Llor, C., Solanellas, J. y Satué, E. (1996). Implicaciones terapéuticas de la resistencia de los neumococos a la penicilina. *Elsevier*, 18(3): 136-146. <https://www.elsevier.es/es-revista-atencion-primaria-27-articulo-implicaciones-terapeuticas-resistencia-los-neumococos-14319>
- Lambert, P. y Conway, B. (2003). Pharmaceutical quality of ceftriaxone generic drug products compared with Rocephin. *J. Chemother* 15: 357-368.
- Luyt, C., Bréchet, N., Trouillet, J. y Chastre, J. (2014). Antibiotic stewardship in the intensive care unit. *Crit Care*. 18(5): 480 p. DOI: 10.1186/s13054-014-0480-6
- Ling, L., Schneider, T., Peoples, A., Spoering, A., Conlon, B., Mueller, A., Schäberle, T., Hughes, D., Epstein, S., Jones, M., Lazarides, L., Steadman, V., Cohen, D., Felix, C., Fetterman, K., Millett, W., Nitti, A., Zullo, A., Chen, C. y Lewis, K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517: 455-459. DOI: 10.1038/nature14098
- Lopardo, H. A. (2020). Sulfamidas. En H. A. Lopardo. (Ed.), *Antibióticos, clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia* (pp. 165-169). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/103061>
- Lopardo, H. A. (2020). Fosfomicina. En H. A. Lopardo. (Ed.), *Antibióticos, clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia* (pp. 55-60). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/103061>
- Lopardo, H. A. (2020). Rifamicinas. En H. A. Lopardo. (Ed.), *Antibióticos, clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia* (pp. 139-142). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/103061>
- Láñez, E. (15 de febrero de 2006). Síntesis peptidoglucano. *Microbiología general*. https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/05paredbios.htm#_Toc54100993
- Lopardo, H. A. (2020). Inhibidores de la biosíntesis de proteínas. En H. A. Lopardo. (Ed.), *Antibióticos, clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia* (pp. 75-80). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/103061>
- Laursen, B., Sorensen, H., Mortensen, K. y Sperling, H. (2005). Initiation of protein synthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 69(1): 101-123.
- Lucas, M. F., Mestorino, N. y Errecalde, J. O. (2007). Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. *Analecta veterinaria*, 27(1): 36-45. https://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11200/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Loera, A., Barraza, A. y Caamal, M. G. (2019). Diálogo entre bacterias ¿cómo se comunican las bacterias? *Recursos Naturales y Sociedad*, 5(1): 24-39. <https://doi.org/10.18846/renaysoc.2019.05.05.01.0003>
- Lorenzo, J., Ramírez, A. y Muñoz, Y. (2011). Polimixinas en la era de la multidrogorresistencia. 25(98): 66-70. <https://www.academia.edu/download/87414232/eip114i.pdf>
- Li, J., Nation, R., Turnidge, J., Milne, R., Coulthard, K. y Rayner, C. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis.* 6(9): 589-601. [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(06\)70580-1/fulltext?code=lanet-site&pubType=related](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(06)70580-1/fulltext?code=lanet-site&pubType=related)
- Langford, B., So, M., Raybardhan, S., MacFadden, D., Soucy, J. y Daneman, N. (2020). Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(12): 1622-1629.
- Li, X. Z., Plésiat, P. y Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.*, 28(2): 337-418.
- Liming, B., Zhenxing, L., Weidong, Z. y Tianshu, S. (2017). Investigación sobre la síntesis, caracterización y efecto antibacteriano de la sal de amonio cuaternario de ácido heteroaurio de fosfotungsteno de tipo keggins. A: 0258-3283. <https://www.chinareagent.com.cn/rdjj/8404.jhtml>
- Li, F., Rosell, F., Gale, R., Simorre, J., Brown, E. y Strynadka, N. (2020). Crystallographic analysis of *Staphylococcus aureus* LcpA, the primary wall teichoic acid ligase. *Protein Structure and Folding*, 295(9): 2629-2639. Doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011469>
- Lee, Y. y Choi, S. (2019). Quantitative analysis for lipophilic drug transport through a model lipid membrane with membrane retention. *Eur J Pharm Sci.*, 134: 176-184. DOI: 10.1016/j.ejps.2019.04.020
- Lambert, P. (2002). Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol.*, 46S-54S.
- Maldonado, C., Zambrana, N., Bussmann, R. W., Ruiz, F. S. y Fuentes, A. F. (2020). La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19). *Ecología en Bolivia*, 55(1): 1-5. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1605-25282020000100001
- Morales, M. E., Padrón, R. A. y Leal, C. A. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. *OmniaScience*. DOI: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.313>
- McMurry, J. (2008). Biomoléculas: lípidos. En J. McMurry (Ed.), *Química orgánica* (pp 1070-1078). *Cengage Learning*. <https://fcen.uncuyo.edu.ar/catedras/john-mcmurry-quimica-organica-2008-cengage-learning.pdf>
- Marcano, D. y Hasegawa M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela. Consejo de desarrollo Científico y Humanístico. 237-373.
- Murthy, M., Subramanyam, M., Bindu, M. y Annapurna, J. (2005). Antimicrobial activity of clerodane diterpenoids from *Polyalthia longifolia* seeds. *Fitoterapia*, 76(3-4): 336-339.

- Martínez, P. (2021). Difracción de rayos x: Resolución de estructuras cristalinas y problema de las fases. (Tesis de licenciatura). Universidad de Sevilla. 46 pp. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/133504/LLAMAS%20MARTINEZ%2C%20P AULA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Martínez, M. J. (1996). El género crotón (Euphorbiaceae) en Mesoamérica. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM. Repositorio Institucional de la UNAM: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3447040>
- Martínez, M. J. (1988). Contribución al conocimiento del género croton (euphorbiaceae) en el Estado de Guerrero. (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Repositorio Institucional de la UNAM: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/246249>
- Mwine, J. Y Damme, P. (2011). Why do Euphorbiaceae tick as medicinal Plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(5): 652-662. https://www.researchgate.net/publication/228478254_Why_do_Euphorbiaceae_tick_as_medicinal_Plants_A_review_of_Euphorbiaceae_family_and_its_medicinal_features
- Min Wu, Kai-Long Ji, Peng Sun, Jian-Mei Lu, Jia-Rui Yue, Dong-Hua Cao, Chun-Fen Xiao y You-Kai Xu. (2022). Croargoids A–G, Eudesmane Sesquiterpenes from the Bark of *Croton argyratus*. *Molecules*, 27(19): 1-9. <https://doi.org/10.3390/molecules27196397>
- Medinilla, B. E. (1993). Evaluación farmacológica y toxicológica "in vitro" de algunas plantas comúnmente empleadas en Guatemala contra la malaria. (9)1: 7-10. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5179432>
- Milliken W. (1997). Malaria and antimalarial plants in Roraima, Brazil. *Tropical Doctor* (Suppl. 1), 20-25.
- Meza, E. (Ed.). (1999). Desarrollando Nuestra Diversidad Biocultural: “Sangre de Grado” y el Reto de su Producción Sustentable en el Perú Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Muñoz, F., Menke, J., Cruz, N. y Koch, O. (2025). Efficient decoy selection to improve virtual screening using machine learning models. *Journal of cheminformatics*, 17(165). <https://doi.org/10.1186/s13321-025-01107-z>
- Marcano, D. (2008). El lado positivo de las bacterias. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 39(2): 63-65 . https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-04772008000200009&script=sci_arttext
- Martín, R., Soberón, N., Vázquez, F. y Suárez, J. (2008). La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 26(3): 160-167 pp. DOI: 10.1157/13116753
- Manrique, G. et al., (2021). Tétanos generalizado: Una amenaza persistente, reporte de tres casos y revisión de la literatura. *Acta Neurológica Collombiana*, 37(4), 210-218. <https://doi.org/10.22379/24224022390>

- Meza, M. E., López, M., Quiróz, B. y Aranda, C. M. (2022). Antimicrobial resistance: One Health approach. *Vet World*. 15(3): 743-749. DOI: 10.14202/vetworld.2022.743-749
- Matta, R., Hallit, S., Hallit, R., Bawab, W., Rogues, A. M., and Salameh, P. (2018). Epidemiology and microbiological profile comparison between community and hospital acquired infections: a multicenter retrospective study in Lebanon. *J. Infect. Public Health* 11: 405–411. DOI: 10.1016/j.jiph.2017.09.005
- Martinez, J. (2009). Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental pollution*. 157(11): 2893-2902. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>
- Marti, E., Variatza, E., Balcazar, J. (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. *Trends in microbiology*, 22(1): 36-41. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.11.001>
- Marshall, B.M. y Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin Microbial Rev*. 24(4): 718-733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
- Meza, K. (2013). Aislamiento de cepas de *Salmonella enterica* desde pingüinos de Magallanes (*Spheniscus*) de la Región de Magallanes y Antártica Chilena y determinación de resistencia a antibióticos. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131625>
- Miranda, C. D. y Zemelman, R. (2001). Antibiotic resistant bacteria in fish from the Concepcion Bay, Chile. *Marine Pollution Bulletin*, 42(11): 1096-1102. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00093-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00093-5)
- Miller, R. V., Gammon, K., Day, M. J. Antibiotic resistance among bacteria isolated from seawater and penguin fecal samples collected near Palmer Station, Antarctica. *Canadian journal of microbiology*, 55(1): 37-45. <https://doi.org/10.1139/W08-119>
- Martínez, L. (2016). Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. *Revista Médica Valdecilla*. 1(1): 7-16. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8436497>
- Martínez, L. (2016). Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. *Revista Médica Valdecilla*. 1(1): 7-16. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8436497>
- Musser, M., Beres, B., Zhu, L., Randall, J., Vuopio, J., Hyyryläinen, H., Hannuksela, K., Kristinsson, K., Darenberg, J., Normark, B., Hoffmann, S., Caugant, D., Smith, A., Lindsay, D., Boragine, D. y Palzkill, T. (2020). Reduced *in vitro* Susceptibility of *Streptococcus pyogenes* to β -Lactam Antibiotics Associated with Mutations in the *pbp2x* Gene Is Geographically Widespread. *J. Clin. Microbiol*. 58(4): e01993-19. DOI: 10.1128/JCM.01993-19
- Martínez, D. (1982). Modo de acción, selectividad y especificidad de los antibióticos. <https://rac.es/ficheros/doc/62a16b20a0dc71bf.pdf>
- Moazed, D. y Noller, H. (1989). Interaction of tRNA with 23S rRNA in the ribosomal A, P. and E sites. *Cell* 57(4), 585-597.
- Mateus, C. R. y Coelho, F. (2005). An alternative approach to aminodiols from Baylis-Hillman adducts. Stereoselective synthesis of chloramphenicol, fluoramphenicol and thiamphenicol. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(3a):386-396.
- Martínez, L. O. (2006). Cloranfenicol: un aliado olvidado, revisión bibliográfica. *Rev. Med*. 11(3): 237-243. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=9549228>

- Morales, Y. E., Herrera, M. C. y Muñoz, J. (2007). Cloranfenicol, un antibiótico clásico como alternativa en el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 38(1): 58-69. <https://www.redalyc.org/pdf/579/57938108.pdf>
- Monge, K. M. (2013). Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista médica de Costa Rica y Centro America*. 70(608): 599-605. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=47783>
- Moreno, C., Becerra, A. y Santos, M. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev. Iberoam. Micol.*, 21: 103-120. https://www.academia.edu/download/36857444/tratamiento_biologico_de_suelo_martin_moreno.pdf
- Markley, J. y Wencewicz, T. (2018). Tetracycline-Inactivating Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 9:1058. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01058
- Moreno, C., González, R. y Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello*, 69(2): 185-192. https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-48162009000200014&script=sci_arttext
- Manning, S. (2005). *Escherichia coli Infections*. Chelsea House Publishers.
- Mainil, J. (2013). *Escherichia coli virulence factors*. *Veterinary Immunology and immunopathology*. 152: 2-12. DOI: 10.1016/j.vetimm.2012.09.032
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L. y Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Publica*, 28(4):648-656.
- Martínez, J. P. (2007). Detección de *Staphylococcus aureus* y su resistencia antibacteriana en niños portadores asintomáticos de Pachuca, Hidalgo. Trabajo de Investigación para obtener el título de Médico Cirujano. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/jspui/bitstream/231104/627/1/Deteccion%20de%20staphylococcus%20aureus.pdf>
- Martínez, J., Partida, A. y Cárdenas, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Rev. Biomed.*, 17(4): 287-305.
- Murray, P., Rosenthal, K. y Pfäuer, M. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona: Panamericana. <https://diagnosticodontofacial.com.mx/assets/pdf/libros/PMurrayMicrobiologiaMedica.pdf>
- Matsushita, M. y Janda, K. (2002). Histidine kinases as targets for new antimicrobial agents. *Bioorganic y Medicinal Chemistry*, 10(4): 855-867. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(01\)00355-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(01)00355-8)
- Maciel, M. A. Pinto, C. A. Brabo, S. N. Da Silva, M. N. (1998). Terpenoids from *Croton cajucara*. *Phytochemistry*, 19, 823-828.
- Melo, I. R. S., Teixeira, A.M.R., Sena Junior, D.M., Santos, H.S., Albuquerque, M.R.J.R., Bandeira, P.N., Rodrigues, A.S., Braz-Filho, R., Gusmão, G.O.M. J.H. Silva, Faria, J.L.B., Bento, R.R.F. FT-Raman and FTIR-ATR spectroscopies and DFT calculations of triterpene acetyl aleuritolic acid. *Journal of Molecular Structure*, 1058 (2014) 221-227.

- Newman, D., Cragg, G. y Snader, K. (2003). Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66: 1022-1037. <https://doi.org/10.1021/np030096l>
- Nath, N., Monteverde, J. C., Puch, D., Rodríguez, J. Jiménez, C. Noll, M., Kreiter, A., Reggelin, M., Vázquez, A. y Griesinger, C. (2020). Relative configuration of natural compounds using proton residual chemical shift anisotropy. *Nature Communications*, 11: 4372. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18093-5>
- Nikaido, H. y Thanassi, D. G. (1993). Penetration of lipophilic agents with multiple protonation sites into bacterial cells: Tetracyclines and fluoroquinolones as examples. *Antimicrobial Agents Chemoter*, 37: 1393-1399.
- Naddaf, M. (2024). 40 million deaths by 2050: toll of drug-resistant infections to rise by 70%. *Nature*, 633, 747-748. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-024-03033-w>
- Navia, D. P., Villada, H. S. y Mosquera, S. A. (2010). Las biopelículas en la industria de alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(2): 118-128. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-35612010000200015&lng=en&tlng=es.
- Neu, H. (1992). General therapeutic in infectious disease. En: Gorbach SL, Bartlett JG, Blackloun NR, eds, *Infectious diseases*. Philadelphia: WB Saunders, 123-60.
- Nataro, J. P. y Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.*, 11: 142-201.
- Nguyen, H. T., Pham, T. N., Le, A.-T., Thuy, N. T., Huy, T. Q., Nguyen, T. T. T. (2022). Antibacterial activity of a berberine nanoformulation, *Beilstein J. Nanotechnol*, 13, 641–652. <https://doi.org/10.3762/bjnano.13.56>
- Nikaido, H. (1994). Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 269(6):3905-8.
- Olayiwola, A. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro mundial de la salud* 1993; 14 (4) : 390-395.
- Obando, L. (2015). Estudio de los alcaloides de *Croton draconoides* “sangre de grado”, su actividad cicatrizante y el diseño de una forma farmacéutica. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Repositorio institucional de la UNMSM. Perú. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/>
- Öman, T. Tessem, M., Bathen, T., Bertilsson, H., Angelsen, A., Hedenströ, M. y Andreassen, T. (2014). Identification of metabolites from 2D 1H-13C HSQC NMR using peak correlation plots. *BMC Bioinformatics*, 15:413. DOI: 10.1186/s12859-014-0413-z
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2003). Prevención de las infecciones nosocomiales. Organización Mundial de la Salud. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/67877/WHO_CDS_CSR_EPH_2002.12_spa.pdf?sequence=1
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). S.f. Difteria. <https://www.paho.org/es/temas/difteria>.

- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2021). La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial. <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2024). Tétanos. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tetanus>
- Otto, M. (2012). Molecular basis of Staphylococcus epidermidis infections. Semin Immunopathol. 34(2):201-14. DOI: 10.1007/s00281-011-0296-2
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Lista mundial de prioridades de bacterias resistentes a los antibióticos para orientar la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- Organización Mundial de la salud (OMS). (2024). La OMS pone al día la lista de bacterias farmacorresistentes más peligrosas para la salud humana. <https://www.who.int/es/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Global tuberculosis report 2016. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250441/1/9789241565394-eng.pdf>
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations. The review antimicrobial resistance.
- Oggioni, M., Pozzi, G., Valensin, P., Galieni, P. y Bigazzi, C. (1998). Recurrent Septicemia in an Immunocompromised Patient Due to Probiotic Strains of *Bacillus subtilis*. J Clin Microbiol 36.
- Orellana, M. y Guajardo, V. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. Revista médica de Chile, 132(1): 85-94. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872004000100014>
- Poyton, C., Manchadi, M., Cheesman, M. y Lavidis, N. (2015). Effects of Lavender and Linalool on Neurotransmission and Contraction of Smooth Muscle. Pharmacognosy Communications, 5(3): 217-225. <https://www.researchgate.net/profile/Mary-Louise-Roy/publication/279517587>
- Pabón, L. Y Rodríguez, P. (2012). Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 17(2): 194-209. <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2012/cpm122h.pdf>
- Puentes, M. (2017). Identificación de áreas prioritarias para la conservación de la flora de la Sierra Madre Occidental mediante análisis biogeográficos del género *Euphorbia* L. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Durango. Repositorio digital IPN: <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/24135/1/TESIS%20PULID%20PUENTES%20PILAR.pdf>
- Poopath, M., Karaket, P., Kammomgkol, K. Y Jirakorn, S. (2018). Pa Boong Toong Pa Tarm, Office of the Forest Herbarium, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Bangkok, Thailand. 200 pp.

- Perdue, G., Blomster, R.N., Blake, D.A. y Farnsworth, N.R. (1979). South American plants II: taspine isolation and anti-inflammatory activity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 68:124–125.
- Pieters, L., De Bruyne, G. Mei, G. Lemiere, D. Vanden Berghe y Vlietinck. A.(1992). *In vitro* and in vivo biological activity of South American Dragon's Blood and its constituents. *Planta Med.* 58 (Supl. 1): A582-A583.
- Peng, S., Zheng, H., Fresno, A., Olsen, J., Dalsgaard, A. y Ding, Z. (2021). Co-occurrence of antimicrobial and metal resistance genes in pig feces and agricultural fields fertilized with slurry. *Science of the total environment*, 792: 148259.
- Pieters, L., De Bruyne, T., Van Poel, B., Vingerhoets, Totte, J., Vanden Berghe, D., Vlietinck, A. (1995). In vivo wound healing activity of Dragon's blood (*Croton spp.*), a traditional South American drug, and its constituents. *Phytomedicine* 2:17–22.
- Paucara, W. G. y Torrez, R. E. (2019). Acoplamiento molecular: criterios prácticos para la selección de ligandos biológicamente activos e indentificación de nuevos blancos terapéuticos. *Revista Con-Ciencia*, 7(2): 55-72. http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652019000200006
- Pabón, D. R, Moreno, I. A., Gelvez, S, D. y Vásquez, Y. (2024). Impacto de las enfermedades nosocomiales en la estadía hospitalaria. Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Ciencias de la Salud, Enfermería, Bucaramanga. <https://repository.ucc.edu.co/entities/publication/9cf6e593-aff7-4b67-8842-a726e501e53e>
- Puma, J. P., Madariaga, E. S., Benique, Z. N. y Silva, J. E. (2019). *Dermatología Perú*, 29(3): 176-183. https://www.dermatolperu.org/assets/uploads/revista_Pisd_03_Inmunology_hoy_29-3.pdf
- Pascual, I., Martínez, A. y Moral, S. (2022). Interacciones entre microbiota y huésped. *Elservies*, 13(49): 2843-2852 . <https://doi.org/10.1016/j.med.2022.02.010>
- Perry, J., Westman, E. y Wright, G. (2014). The antibiotic resistome: what's new?. *Current opinion in microbiology*, 21:45-50. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.09.002>
- Poeta, P., Costa, D., Igrejas, G., Rojo, B., Saenz, Y., Zarazaga, M., Ruiz, F., Rodrigues, J. y Torres, C. (2007). Caracterización of vanA-containing *Enterococcus faecium* isolates carrying Tn5297-like and Tn916/Tn1545-like transposons in wild boars. (*Sus Scrofa*). *Microb Drug Resist*, 13: 151-156.
- Pérez, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque “Una salud”. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3): 1-17. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300009
- Peralta, C. (2025). El peptidoglicano: qué es, estructura y síntesis. *Microbiología*. <https://microbiologia.net/bacterias/peptidoglicano/>
- Pírez, M. y Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de bacteriología médica*. 3: 23-32. <https://www.academia.edu/download/39779542/MorfologiayEstructuraBacteriana-1.pdf>

- Powell, D. A. y Nahata, M. C. (1982). Chloramphenicol: new perspectives on an old drug. *Drug Intelligence and Clinical Pharmacy*, 16(4):295-30. DOI: 10.1177/106002808201600404
- Piñera, J., Penié, J., Rodríguez, M. A., Alfonso, P. y Alonso, N. (1998). Macrólidos. *Acta Médica*, 8(1): 71-4.
- Prescott, J. F. (2002). Lincosamidas, macrólidos y pleuromutilinas. En: Prescott, J. F., Baggot, J. D. y Walter, R. D. (eds): *Terapéutica Antimicrobiana en Medicina Veterinaria* (3ª Ed) Argentina, Ed. Intermédica, p. 204-232.
- Patiño, N. y Sepúlveda, A. (2008). Tetraciclinas. *Rev Fac Med UNAM*, 51(1): 29-32. <https://www.medigraphic.com/pdfs/facmed/un-2008/un081g.pdf>
- Pérez, A. R. (2021). Revisión bibliográfica sobre la actividad antitumoral y citotóxica de las plantas del género *Croton*. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/handle/123456789/26349>
- Pages, J. M., James, C. E. y Winterhalte, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6(12): 893-903.
- Peña, S. y Cendejas, R. (2014). Importancia médica del biofilm de *Staphylococcus epidermidis* en las Infecciones de prótesis articular. *Investigación en Discapacidad*. 3(3): 106-113. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=52851>
- Pieras, M. (2019). Mecanismos moleculares en el desarrollo de resistencia a antimicrobianos: alternativas al uso de antibióticos. [Tesis para optar por el grado en medicina]. Universidad de Cantabria, Santander. Repositorio institucional de la Universidad de Cantabria: <https://repositorio.unican.es/xmlui/handle/10902/16683>
- Pires, D.E.V., Blundell, T. L. y Ascher, D. B. (s.f.). pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic properties using graph-based signatures.
- Pooley, H., Abellan, F. y Karamata, D. (1992). CDP glicerol: poli(glicerofosfato) glicerofosfotransferasa, que está involucrado en la síntesis del ácido teicoico de la pared principal en *Bacillus subtilis* 168, está codificado por tagF (rodC). *J Bacteriol* 174.
- Price, C., Kaatz, G. y Gustafson, J. (2002). The multidrug efflux pump NorA is not required for salicylate-induced reduction in drug accumulation by *Staphylococcus aureus*. Elsevier, 20(3): 206-213. DOI: 10.1016/S0924-8579(02)00162-0
- Pereira, E., Barros, L., Calhelha, R., Dueñas, M., Carvalho, A. Buelga, C. y Ferreira, I. (2014). Bioactivity and phytochemical characterization of *Arenaria montana* L. *Food Funct.*, 5(8): 1848-55. DOI: 10.1039/c4fo00210e
- Ringuelet, J. y Viña, S. (2013). Introducción a los productos naturales vegetales. En *Productos naturales vegetales*, J. Ringuelet y S. Viña (Coords.), p. 8-9. Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/27885>
- Ravikumar, Y. S., Mahadevan, K. M., Manjunatha, H. y Satyanarayana, N. D. (2010). Antiproliferative, apoptotic and antimutagenic activity of isolated compounds from *Polyalthia cerasoides* seeds. *Phytomedicine*, 17(7):513-518.
- Radcliffe, A. (1987). *Flora of Tropical Africa*. Royal Botanic Gardens, Kew.

- Ramírez, J., Gordillo, M., Durán, R., Arriaga, E., García, R., Cervantes, A. Y Hernández, R. (2002). Los generos de la familia Euphorbiaceae en México. Universidad Nacional Autónoma de México, *Serie Botánica*, 73(2): 155-281. <http://revistas.unam.mx/index.php/bot/article/view/1947Rzedowski>, J. (1978). Vegetación de México. Editorial Limusa. México, D.F. 432 pp.
- Risco, E., Vila, R., Henriques, A. y Cañigual, S. (2005). Bases químicas y farmacológicas de la utilización de la sangre de grado. *Revista de Fitoterapia*. 5(2): 101-114.
- Ríos, M. y Aguilar, A. (2006). Nitrogen-containing phorbol esters from *Croton ciliatoglandulifer* and their effects on cyclooxygenases-1 and -2. *J Nat Prod*, 69: 887 – 890.
- Ruiz, D., Baltazar, E., Espinosa, L., Martínez, I., Torres, A. y Alejo, J. M. (2012). Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(1): 18-32.
- Ramirez, S. y Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42): 263-268. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>
- Riley, K., Williams, J., Owen, L., Shen, J., Davies, A., y Laird, K. (2017). The effect of low-temperature laundering and detergents on the survival of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on textiles used in healthcare uniforms. *J. Appl. Microbiol.* 123, 280–286 . DOI: 10.1111/jam.13485
- Rise, L. (2008). *Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. J Infect Dis.* 197(8):1079-1081. DOI: 10.1086/533452
- Reinoso, Y., Casadesús, L., García, A., Gutiérrez, J. y Álvarez, V. (2006). Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*, 10(3): 187-191. <https://www.redalyc.org/pdf/2091/209116108001.pdf>
- Radhouani, H., Poeta, P., Igrejas, G., Goncalves, A., Vinue, L. y Torres, C. (2009). Antimicrobial resistance and phylogenetic groups in isolates of *Escherichia coli* from seagulls at the Berlengas nature reserve. *Vet Rec*, 165: 138-142.
- Rodriguez, R. E., Anillo, H., Turcios, C., Garcia, L., Hernandez, M. y Abdellah, E. (2020). Resistencia antibiótica: el papel del hombre, los animales y el medio ambiente. *Revista Salud Uninorte*, 36(1): 298-324. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522020000100298
- Rodríguez, A. (2017). Biorremediación de aguas contaminadas con hidrocarburos mediante sistemas bioabsorbentes. Universidad de Granada. Instituto de Investigación del Agua. <http://hdl.handle.net/10481/48759>
- Shirota, O., Nagamatsu, K. y Sekita, S. (2006). Neo-clerodane diterpenes from the hallucinogenic sage *Salvia divinorum*. *J. Nat. Prod.*, 69(12): 1782-1786.
- Soares, B., FirmeI, C., Maciel, M. A., Kaiser, C., Schilling, E. y BortoluzziI, A. (2014). Experimental and NMR Theoretical Methodology Applied to Geometric Analysis of the Bioactive Clerodane trans-Dehydrocrotonin. *J. Braz. Chem. Soc.*, 25(4): 629-638. <https://www.scielo.br/j/jbchs/a/dcMWCf7xFg4bj67wLmD5rYf/?lang=en>

- Sun, Y., Wang, M., Ren, Q., Li, S., Xu, J., Ohizumi, Y., Xie, C., Jin, D.Q. y Guo, Y. (2014). Two novel clerodane diterpenes with NGF-potentiating activities from the twigs of *Croton yanhuii*. *Fitoterapia*, 95: 229–233. DOI: 10.1016/j.fitote.2014.03.012
- Sarmiento, J. (2022). Técnicas de caracterización de polímeros: difracción de rayos x. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 8 pp. <https://www.researchgate.net/publication/359538727>
- Sánchez, M., Castañeda, R. Y Castañeda, M. (2016). Usos y potencialidad de la Higuierilla (*Ricinus communis*) en sistemas agroforestales en Colombia. *PUBVET*, 10(6): 507-512. <https://pdfs.semanticscholar.org/bf6d/9e28fb7799938552031b95f596959e94a6fb.pdf>
- Steinmann, V. (2002). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*, 61: 61-93 pp. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm61.2002.909>
- Secco, R. Y Rosa, N. A. (1992). *Croton ascendens* (Euphorbiaceae), a New Liana from Eastern Amazonia. *Novon*, (2)3: 252-254. <https://www.biodiversitylibrary.org/partpdf/2524>
- Salatino, A., Salatino, M. L. Y Negri, G. (2007). Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). *J. Braz. Chem. Soc.*, 18(1). <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100002>
- Silva, C., Zago, H., Júnior, H., Da Camara, C., De Oliveira, J., Barros, R., Schwartz, M. y Lucena, M. (2008). Composition and Insecticidal Activity of the Essential Oil of *Croton grewoides* Baill. against Mexican Bean Weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman). *J. Essent. Oil Res.* 20 (2): 179-182.
- Scior, T., Morales, E. y Stefanón, E. (2007). Los modelos *in silico*, una herramienta para el conocimiento farmacológico. *Elementos: Ciencia y Cultura*, 14(68): 45-48 . <https://www.redalyc.org/pdf/294/29406806.pdf>
- Savadogo, A., Ouattara, C., Bassole, I. y Traore, A. (2004). Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains isolated from Burkina Faso Fermented Milk. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3(3): 174-179. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=898d0c21724ce67051ae1718e3ea75e8e5cbebc0>
- Secretaría de Marina Armada de México (SEMAR). (s.f.). ¿Sabes qué son las infecciones nosocomiales?. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/981/infecciones_nosocomiales.pdf
- Sosa, O., Matías, B., González, J., Juárez, R., Estrada, A., Sánchez, P. y Cureño, A. (2019). Infecciones asociadas a la atención de la salud por bacterias del grupo ESKAPE en un hospital de la Ciudad de México 2013-2017. *Enf Inf Microbiol.* 39(2): 59-64. <https://www.medigraphic.com/pdfs/micro/ei-2019/ei192d.pdf>
- Secretaría de Salud. (2023). 079. En 2022 se registraron más de 28 mil casos de tuberculosis en México. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/salud/prensa/079-en-2022-se-registran-mas-de-28-mil-casos-de-tuberculosis-en-mexico>
- Sánchez, C. (2006). ¿Antibióticos, ayer, hoy y mañana...?. *Química Viva*. 5(2): 63-77. <https://www.redalyc.org/pdf/863/86350203.pdf>
- Sánchez, M. A., Salgado, M., San Miguel, A., Pachón, J., Rodríguez, E., Pastor, M. y Cabrero, P. (2019). Nisina (N 234), aditivo utilizado como conservante en alimentos. *Gac. Med.*

- Bilbao., 116(3): 166-173.
<https://gacetamedicabilbao.eus/index.php/gacetamedicabilbao/article/view/718/726>
- Seija, V. y Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. Temas de bacteriología y virología médica, (2): 631-634 .
<https://www.academia.edu/download/55015597/Antibioticos.pdf>
- Simonetti, A., Marzi, S., Myasnikov, A., Fabbreti, A., Yusupov, M., Gualerzi, C. y Klaholz, B. (2008). Structure of the 30S translation initiation complex. *Nature*, 455: 416-420.
- Spirin, A. S. (1968). How does the ribosome work? *Curr. Mod. Biol.* 2(3): 115-127.
- Stahl, J. P. (2017). Lincosamidas. *EMC-Tratado de medicina*, 21(4): 1-4. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(17\)86925-7](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(17)86925-7)
- Santajit, S. e Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed. Res. Int.*, 1-8. DOI: 10.1155/2016/2475067
- Silva, R. M., Pozo, M., Oca, J. M, Viñas, A. y Moreno, D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 39(1): .
https://www.researchgate.net/publication/237027084_Aislamiento_y_seleccion_de_una_cep_bacteriana_degradadora_de_hidrocarburos_a_partir_de_suelos_contaminados_con_petroleo
- Sandoval, E., Benimeli, C. S. y Cuozzo, S. A. (2023). Explorando los biofilm en actinobacterias: descubriendo su potencial para la biorremediación en la industria alimentaria; XVI Jornadas de Investigación, Docencia y Extensión en Ciencias Naturales; San Miguel de Tucumán; Argentina, 150-150. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/220238>
- Sánchez, T. y Denis, A. (2023). *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido aisladas en urocultivos de pacientes del Hospital Provincial de Casas- La libertad-2021. Universidad Nacional de Trujillo.
- Sussman, M. (1997). *Escherichia coli: Mechanisms of Virulence*. University of Cambridge.
- Sligl, W., Taylor, G. y Brindley, P. (2006). Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. *Int. J. Infect. Dis.*, 10(4): 320-325. DOI: 10.1016/j.ijid.2005.07.003
- Shafi, J., Tian, H. y Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: A review. *Biotechnology y Biotechnological Equipment*, 31(3): 446-459.
<https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Su, Y., Liu, C., Fang, H. y Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microb Cell Fact* 19, 173.
<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
- Spellberg, B., Powers, J., Brass, E., Miller, L. y Edwards, J. (2004). Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. *Clin. Infect. Dis.*, 38: 1279-1286.
- Stephenson, K. y Hoch, J. (2002). Histidine Kinase-mediated Signal Transduction Systems of Pathogenic Microorganisms as Targets for Therapeutic Intervention. *Current Drug Targets*, 2(3): 235-246. DOI: <https://doi.org/10.2174/1568005023342443>

- Steinfels, E., Orelle, C., Fantino, J., Dalmas, O., Rigaudd, J., Denizot, F., Pietro, A. y Jault, J. (2004). Characterization of YvcC (BmrA), a multidrug ABC transporter constitutively expressed in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 43(23): 7491-502. DOI: 10.1021/bi0362018
- Tian, J., Yao, G., Wang, Y., Gao, P., Wang, D., Li, L., Lin, B., Huang, X. y Song, S. (2017). Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Croton crassifolius*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(5):1237-1242. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.01.055
- Tian, J., Shu, C., Zhang, Y., Cui, H., Xie, X., Ran, x., Chen, T., Zang, Z., Liu, J. y Li, B. (2019). A “Green” Homogenate Extraction Coupled with UHPLC-MS for the Rapid Determination of Diterpenoids in *Croton Crassifolius*. *Molecules*, 24(4): 694 pp. DOI: 10.3390/molecules24040694
- Tamara, A., Pineda, H. Y Bohórquez, A. (2014). Análisis y caracterización fisicoquímica del látex de caucho especie *Hevea brasiliensis*. *RevistaTumbaga*, 1(9): 83-97. <https://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/648/505>
- Trivedi, B. (2012). Microbiome: The surface brigade. *Nature*, 492: 60-61. <https://www.nature.com/articles/492S60a>
- Tano, E. y Melhus, A. (2014). Level of decontamination after washing textiles at 60 degrees C or 70 degrees C followed by tumble drying. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 4: 24314. DOI: 10.3402/iee.v4.24314
- Trallero, E. e Iglesias, L. (2003). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21(9): 520-529.
- Treviño, N. y Molina, B. (2022). Antibióticos: mecanismos de acción y resistencia bacteriana. *Microbiología y Parasitología*. <https://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/136280>
- Tsodikova, S. y Labby, K. (2016). Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *Med. Chem. Comm.*, 7(1): 11-27 pp. DOI: 10.1039/C5MD00344J
- Tan, I. y Ramamurthi, K. (2015). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environ Microbiol Rep.* 6(3): 212-225. DOI: 10.1111/1758-2229.12130
- Tsay, F., Henderson, D., Aldine, F., Stoll, D. y Ahmad, I. (2024). Chromatographic isolation of sensitive compounds: challenges and solutions. *LCGC international*, 1(7): 6-10.
- Uzcátegui, O. (2016). Microbioma humano. *Revista de Obstetricida y Ginecología de Venezuela*, 76(1): 1-3. https://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0048-77322016000100001&script=sci_arttext
- Urtaza, S. y Giambra, T. (2022). Utilización sostenible de recursos naturales. *One Health. Ecodes*. https://ecodes.org/images/que-hacemos/MITERD_2021/Informes/INFORME_ECOCODES_FINAL_Resistencia_a_los_antibioticos_desde_el_enfoque_One_Health.pdf
- Villamizar, V., Caballero, J. y Gómez, H. (2010). Terpenos con actividad biológica anti-VIH. *Duazary*, 7(2): 257-273. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=512156323008>
- Verdesoto, D., Jaramillo, C. y Rubio, O. (2016). composición química, actividad cicatrizante y toxicidad del látex de *Croton lechleri*. *Revista Científica*, 2(26): 95-103.

- Veber, D., Johnson, S., Cheng, H., Smith, B., Ward, K. y Kopple, K. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.*, 45(12): 2615-2623. DOI: 10.1021/jm020017n
- Verstuyft, C., Becquemont, L y Mouly, S. (2022). Farmacocinética de los medicamentos. *EMC-Tratado de Medicina*, 26(1): 1-9. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(22\)46044-2](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(22)46044-2)
- Villarreal, J. (2013). El estudio de nuestro microcosmos: las comunidades microbianas asociadas al cuerpo humano. *Bol. Micol.* 28(2): 71-77. <https://synt.uv.cl/index.php/Bolmicol/article/view/878/855>.%20Lo
- Vigliarolo, L. (2020). Penicilinas. En H. A. Lopardo. (Ed.), *Antibióticos, clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia* (pp. 12-20). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <https://doi.org/10.35537/10915/103061>
- Vallejo, P. (2010). Caracterización estructural de complejos ribosomales de iniciación y de pre-translocación mediante microscopía electrónica. Tesis doctoral, Universidad del País Vasco.
- Valenzuela, M. T., Prat, M. S., Santolaya, M. E., Sakurada, A., García, P., González, P., Pérez, C., Prado, V., Triantafilo, V. y Trucco, O. (2003). Implementación de una red nacional para la vigilancia de resistencia de agentes patógenos a antimicrobianos según síndromes clínicos. *Revista chilena de infectología*, 20(2): 119-125. https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003000200006
- Viswanatha, T., Marrone, L., Goodfellow, V. y Dmitrienko. G. L. (2008). Assays for beta-lactamase activity and Inhibition. *Methods Mol. Med.*, 142: 239-260.
- Varela, M., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L., Hernandez, A., Parvathi, A. y Kumar, S. (2021). Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics*, 10(5): 1-22. DOI: 10.3390/antibiotics10050593
- Varma, A. K., Patil, R., Das, S., Stanley, A., Yadav, L. y Sudhakar, A. (2020). Optimized hydrophobic interactions and hydrogen bonding at the target-ligand interface leads the pathways of Drug-Designing. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012029>
- Velázquez-Jiménez, R., Hernández-Sosa, A., Martínez-Otero, D., González-Montiel, S., Sánchez-Ortega, I. Y González-Ramírez, C. A. (2022). First 6, 7-Seco-Clerodane Furan Diterpenoid from *Croton morifolius*. *Records of Natural Product*, 10(10) : 1-7 pp.
- Wendell, L. (2000). Alternative Therapies: Lavender. Feature. 6-7. https://naturalingredient.org/wp/wp-content/uploads/Lavender_Alternative_Therapy.pdf
- Wang, J., Chung, H., Zhang, Y., Li, G., Li, Y. y Huang, W. (2015). Diterpenoids from the roots of *Croton crassifolius* and their anti-angiogenic activity. *Phytochemistry*, 30: 1-6. DOI: 10.1016/j.phytochem.2015.12.011
- Wade, L. G. (2011). Química orgánica. (Séptima edición., Vol. 1). Pearson Educación, México. <https://biblioteca.ucuenca.edu.ec/digital/files/original/0a2be86292f31c30f17398530908e75d32e0857d.pdf>
- Webster, G. (1994). Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 81: 33-144. DOI: <https://doi.org/10.2307/2399909>

- Webster, G. L. (1975). Conspectus of a new classification of the Euphorbiaceae. *Taxon* 24: 593-601. DOI: <https://doi.org/10.2307/1220725>
- Webster, G. L. (1967). The genera of Euphorbiaceae in the southeastern United States. *J. Arnold Arbor*, 48: 303-430. DOI: <https://doi.org/10.5962/p.185727>
- Webster, G. L. (2001). Synopsis of *Croton* and *Phyllanthus* (Euphorbiaceae) in western tropical Mexico. *Contr. Univ. Michigan Herb.* 23: 353-388.
- Wen-Hui Xu, Wei-Yi Liu Y Qian Liang. (2018). Chemical Constituents from *Croton* Species and Their Biological Activities. *Molecules*, 23(2333): 38 pp. DOI: 10.3390/molecules23092333
- Waterbeemd, H. y Gifford, E. (2003). ADMET *in silico* modelling: towards prediction paradise. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 2(3): 192-204. DOI: 10.1038/nrd1032
- Wilson, J. (2004). Managing recurrent bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect.* 80(1):8-11. DOI: 10.1136/sti.2002.002733
- Wright, G. (2010). Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic?. *Current opinion in microbiology*, 13(5): 589-594. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.08.005>
- William, J., Santer, M. y Dahlberg, A. (1987). A single base change in the Shine-Dalgarno region of 16S rRNA of *Escherichia coli* affects translation of many proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (14):4757-4761.
- Wertheim, H., Melles, D., Vos, M., Leeuwen, W., Belkum, A., Verbrugh, H. y Nouwen, J. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet. Infect. Dis.*, 5: 751-762. <https://dacemirror.sci-hub.se/journal-article/570e31a0a383e9a6c6c7d42f9197aca9/wertheim2005.pdf?download=true>
- Wagner, H. y Merzenich, G. (2009). Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, 16(2-3): 97-110. 10.1016/j.phymed.2008.12.018
- Xiao, F., Chen, Z., Wei, Z. y Tian, L. (2020). Hydrophobic Interaction: A promising Driving Force for the Biomedical Applications of Nucleic Acids. *Advanced Science*, 7(16). <https://doi.org/10.1002/advs.202001048>
- Yuan, Q., Tang, S., Song, W., Wang, W., Huang, M. y Xuan, L. (2017). Crassins A-H, diterpenoids from the roots of *Croton crassifolius*. *J. Nat. Prod.* 80(2): 254–260. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00425
- Zhu, H., Zhang, Y., Li, W. y Huang, N. (2022). A comprehensive Survey of Prospective Structure-Based Virtual Screening for Early Drug Discovery in the Past Fifteen Years. *Int. J. Mol. Sci.* 23(24): 15961. <https://doi.org/10.3390/ijms232415961>
- Zhang, Y., Ruyter, C. y Bouwmeester, H. (2015). Engineering the plant rhizosphere. *Current Opinion in Biotechnology*. 32: 136-142.
- Zhang, X., Wang, L., Li, F., Yu, K. y Wang, M. K. (2013). Cytotoxic phorbol esters of *Croton tiglium*. *J. Nat. Prod.* 76(5):858-64. DOI: 10.1021/np300832n

- Zimmerli, W. y Moser, C. (2012). Pathogenesis and treatment concepts of orthopaedic biofilm infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 65(2):158-168. DOI: 10.1111/j.1574-695X.2012.00938.x
- Zhou, Z., Shuai, X., Lin, Z., Yu, X., Ba, X., Holmes, M. A., Yonghong, X., Baojing, G. y Hong, C. (2023). Association between particulate matter (PM) 2.5 air pollution and clinical antibiotic resistance: a global analysis. *Lancet Planet Health*, 7(8): e649-e659. DOI: 10.1016/S2542-5196(23)00135-3
- Zhou, G., Shi, Q. S., Huang, X. M. y Xie, X. B. (2015). The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. *Int. J. Mol. Sci.*, 16(9): 21711-21733.
- Zhang, H., Wang, M. y Xiao, J. (2022), Chapter one-stability of polyphenols in food processing. *Advances in food and nutrition research*, (102): 1-45. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2022.04.006>