

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA**

Estudio químico y exploración de los efectos de extractos orgánicos y compuestos mayoritarios de las partes aéreas de *Buddleja perfoliata* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, cepas resistentes a antibióticos

TESIS

**QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL
GRADO DE**

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Q.F.B. Juan Pedro Montiel Cina

DIRIGIDA POR:

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Querétaro, Qro. a noviembre de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Estudio químico y exploración de los efectos de extractos orgánicos y compuestos mayoritarios de las partes aéreas de *Buddleja perfoliata* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, cepas resistentes a antibióticos

por

Juan Pedro Montiel Cina

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-309156



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA**

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Estudio químico y exploración de los efectos de extractos orgánicos y compuestos mayoritarios de las partes aéreas de *Buddleja perfoliata* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, cepas resistentes a antibióticos

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA: Q.F.B. Juan Pedro Montiel Cina

DIRIGIDA POR: Dr. Mamadou Moustapha Bah

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Presidente

Dr. Juan Campos Guillén
Secretario

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Vocal

Dra. Mahinda Martínez Y Díaz de Salas
Suplente

Dr. José Alejandro García Arredondo.
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
Noviembre del 2023, México

Declaración de responsabilidad de estudiante

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.



Q.F.B Juan Pedro Montiel Cina

Resumen

Las infecciones bacterianas han sido una constante en la historia de la humanidad y el descubrimiento de los antibióticos en el siglo XX fue un evento histórico en la mejora de la calidad de la vida humana. La mayor parte de esos antibióticos fueron extraídos principalmente de microorganismos, o sintetizados a partir de esos compuestos naturales. Sin embargo, la resistencia a los antimicrobianos poco después del desarrollo de los antibióticos también se convirtió pronto en un problema creciente de alcance global. Los patógenos resistentes aparecen con más frecuencia y a una mayor velocidad que la del desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Ante tal escenario, la OMS recomendó incrementar la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. En esta búsqueda, los productos naturales de origen botánico ocupan un lugar importante. Entre la variedad de plantas utilizadas en los diferentes sistemas de medicina tradicional, se encuentra el género *Buddleja*, con uso antibiótico y antifúngico. *B. perfoliata* es endémica del altiplano mexicano, de la cual se reporta un uso tradicional para curar infecciones urinarias y de la piel, entre otros. Sin embargo, existen pocos reportes científicos sobre esta especie. En el presente trabajo, se determinó la actividad antimicrobiana de sus extractos preparados con diclorometano y metanol sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Bacillus cereus* ATCC 10876, ambas resistentes a antibióticos. Solo el extracto diclorometánico de flores y hojas *per se* produjo una inhibición, pero marginal, del crecimiento de las 2 bacterias, aunque su combinación con ampicilina mejoró dicha inhibición. Para los estudios químicos, se recurrió a la CG-EM para los extractos diclorometánicos, mientras que el extracto metanólico de hojas y flores se sometió a un fraccionamiento cromatográfico y purificación de sus compuestos mayoritarios. En total, se caracterizaron 21 compuestos diferentes en todos los extractos, siendo la mayoría de ellos terpenos, muchos de los cuales habían mostrado actividad antimicrobiana en diferentes estudios. Sin embargo, la actividad antimicrobiana marginal de los extractos diclorometánicos y la inactividad de los metanólicos sobre las 2 sepas utilizadas en el presente estudio no pueden constituir un soporte para el uso tradicional de esta planta para tratar infecciones bacterianas en general, ni heridas o tuberculosis.

Palabras clave: *Buddleja perfoliata*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, actividad antibacteriana, terpenoides.

SUMMARY

Bacterial infections have been constantly present, and caused enormous pandemics throughout the human history so as the discovery of the antibiotics in the 20th century represented a historical milestone in the improvement of the human life quality. Most of these antimicrobial agents originated from microorganisms, or synthesized from natural compounds. However, antibiotic resistance also soon become a global problem. Resistant pathogens appear more frequently and more quickly than new antibacterial agents are developed. To overcome this situation, the WHO recommends more efforts towards the research and development of new antibiotics. In the search for new molecules, natural compounds from botanical origin have a prominent place. Among the varied range of plants reported in different folk medicine systems, the genus *Buddleja* stands out, as its members have been reported to possess antibiotic and antifungal activities. *B. perfoliata*, a medicinal plant from the Mexican plateau, is traditionally used for the treatment of urinary and skin infections, among others. However, there are very few scientific reports on this plant. The aim of the present research was to determine the antibacterial activity of the dichloromethane and methanol extracts from leaves and flowers on one hand, and stems on other, on the antibiotic-resistant pathogens, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and *Bacillus cereus* ATCC 10876. Only the dichloromethane extract from leaves and flowers on its own inhibited, marginally however, the bacterial growth, although its combination with ampicillin improved this activity. Chemical studies of both dichloromethane extracts was performed using GC-MS, while the methanol extract from leaves and flowers was subjected to chromatographic fractionation and purification of its major secondary metabolites. Twenty one different compounds were identified in the extracts, most of which consisted of terpenoids. Many of these have already been reported with antimicrobial activity. However, the marginal activity of dichloromethane extracts and the inactivity of methanol extracts on the two bacterial strains used in this study cannot support the traditional use of this plant for the treatment of bacterial infections, including wounds or tuberculosis.

Key words: *Buddleja perfoliata*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, antibacterial activity, terpenoids,

Dedicatoria

A mi familia, padres, hermanos y a todos aquellos que me precedieron e hicieron posible que hoy esté aquí.

Agradecimientos

La persona que uno es, es el resultado de múltiples factores, la personalidad innata, la crianza en familia, las amistades, maestros y el ambiente social en el que uno se desenvuelve nos moldean para ser reflejo de la suma de todo ello. Por lo tanto, para ser justo y consecuente con ellos, es pertinente demostrar gratitud a una pequeña, pero significativa parte de todas aquellas personas por las cuales estoy donde estoy. A mis padres, Juan Montiel Olivares y Elva Nelly Cina Alcocer, por darme los valores y principios que rigen mi vida, por nunca limitarme en mis intereses, por alimentar mi curiosidad y sobre todo por darme su apoyo incondicional en las decisiones que he tomado en mi vida. Decirles gracias o cualquier otra cosa que diga o haga nunca serán suficientes para reflejar mi devoción a ellos.

A mis hermanos y hermanas que de una u otra manera me demostraron su apoyo. Enorme agradecimiento a los docentes que influyeron en dirigirme hacia la senda académica, a la Dra. Carmen Sánchez, por proporcionarme mi primer acercamiento a la investigación. Mi gratitud para la Dra. Genoveva Álvarez, por permitirme su tiempo desinteresadamente, los días bajo su ala no los olvidaré. Otra de mis invaluable formadoras, la Dra. Leticia Bautista, gracias a quien hoy me encuentro en el maravilloso mundo de la farmacognosia. A la Dra. Marisol Rosas, por darme ánimos, muchas gracias.

El proyecto aquí presente, es producto de un arduo trabajo, que con sus altos y bajos ha llegado a su conclusión. Este aporte hubiese sido imposible sin la participación de diversas personas. A mi comité tutorial, al Dr. Juan Campos, su guía fue inestimable, la Dra. Laura Berumen, a la Dra. Mahinda Martínez y al Dr. Alejandro García, sus puntos de vista y aportaciones me enriquecieron de gran manera. También es preciso agradecer a los docentes de asignatura que llevé a lo largo de la maestría.

De todas las personas que influyeron en la realización del presente trabajo, ninguno merece más reconocimiento y mi infinita gratitud que el Dr. Moustapha Bah. La paciencia y su disposición para conmigo en la dirección de este proyecto, el compartir sus conocimientos conmigo y porque no, sus llamadas de atención, han hecho de una mejor versión de mí que cuando llegué bajo su tutela. Mi más sincero e inmenso agradecimiento, los días bajo su ala los atesoraré por siempre.

Finalmente, pero sin restar importancia, mis agradecimientos de todo corazón a Diana López, cuyos consejos la hacen también responsable de la realización de este proyecto. Al Dr. Eloy Rodríguez, sus contribuciones y consejos también ayudaron a llevar a buen puerto el presente trabajo. A mi compañera de maestría, Rebeca Rodríguez, por acompañarme y apoyarme en cada paso de la realización de los experimentos, sin ella tampoco esto hubiera terminado con éxito. Por último, a aquellos que junto a los antes mencionados que hicieron mi estancia en Querétaro más amena, a Victoria Ruiz, a Allina Lozano y Héctor Basurto

Por último, a CONAHCYT, por la beca otorgada y a la Universidad Autónoma de Querétaro por la formación recibida y todas las facilidades que me ha proporcionado durante mi estancia en ella.

Índice general

Contenido	Página
Declaración de responsabilidad de estudiante	I
Resumen	II
Summary	III
Dedicatoria	IV
Agradecimientos	V
Acrónimos	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Infecciones bacterianas	2
2.2 Infecciones bacterianas más comunes	3
2.3 Agentes antimicrobianos	4
2.3.1 β -Lactámicos	7
2.3.2 Sulfonamidas	7
2.3.3 Polipéptidos	7
2.3.4 Aminoglucósidos	8
2.3.5 Tetraciclinas	8
2.3.6 Anfenicoles	9
2.3.7 Lipopéptidos	9
2.3.8 Macrólidos (o macrolactonas)	10
2.3.9 Oxazolidinonas	10
2.3.10 Glicopéptidos	10
2.3.11 Estreptograminas	11
2.3.12 Ansamicinas	11
2.3.13 Quinolonas	11
2.3.14 Lincosamidas	12
2.4 Resistencia antimicrobiana	12
2.4.1 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos	14
2.4.1.1 Modificación de la estructura química del antimicrobiano	14
2.4.1.2 Alteración del sitio blanco del antibiótico	14
2.4.1.3 Alteración en las barreras de permeabilidad	14
2.4.1.4 Bombas de eflujo	15
2.5 Productos naturales de origen botánico usados para tratar infecciones	15
2.6 Género <i>Buddleja</i>	16
2.6.1 Fitoquímica del género	17
2.6.2 <i>Buddleja perfoliata</i>	19
2.6.2.1 Descripción y taxonomía	20
2.6.2.2 Estudios efectuados sobre <i>Buddleja perfoliata</i>	21
2.7 Dos bacterias de interés	22
2.7.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
2.3.2 <i>Bacillus cereus</i>	22

3.	JUSTIFICACIÓN	24
4.	HIPÓTESIS	25
5.	OBJETIVOS	25
5.1	General	25
5.2	Específicos	25
6.	METODOLOGÍA	26
6.1	Materiales	26
6.2	Preparación de los extractos	26
6.3	Estudio químico	27
6.3.1	Cromatografía en capa fina (CCF)	27
6.3.2	Cromatografía en columna abierta (CC)	27
6.3.3	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	28
6.3.4	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)	28
6.3.5	Resonancia magnética nuclear	29
6.4	Evaluación de la actividad antimicrobiana	29
7.	RESULTADOS	30
7.1	Rendimientos de extractos	30
7.2	Evaluación antimicrobiana de los extractos	30
7.3	Estudio químico de los extractos	37
7.3.1	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (CG-EM)	37
7.3.2	Análisis de los extractos mediante HPLC-UV	43
7.3.3	Fraccionamiento del extracto metanólico	45
7.3.4	Resonancia magnética nuclear (RMN) de la muestra EGB-BP250	46
8.	DISCUSIÓN	49
8.1	Estudio farmacológico	49
8.2	Estudios químicos	51
8.2.1	Análisis de los extractos diclorometánicos mediante CG-EM	51
8.2.2	Elucidación estructural del catalpol	53
9.	CONCLUSIONES	55
10.	REFERENCIAS	56
11.	ANEXO	61

Índice de Tablas

Tabla No.	Título	Página
1	Principales microorganismos aislados en las infecciones nosocomiales de las unidades médicas del Instituto Mexicano del Seguro Social en el 2013	3
2	Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos	12
3	Agentes antimicrobianos de origen botánico	16
4	Halos de inhibición de BPDFH	31
5	Halos de inhibición producidos por el BPDF y este combinado con ampicilina	32
6	Compuestos identificados en la muestra BPJP1 mediante análisis por CG-EM	39
7	Compuestos identificados en la muestra BPJP1 mediante análisis por CG-EM	42
8	Fases móviles, fracciones y sus rendimientos	45
9	Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento del catalpol	47

Índice de Figuras

Figura No.	Título	Página
1	Estructuras de algunos de los metabolitos secundarios identificados en <i>Buddleja</i>	18
2	Salvia de bolita	20
3	Efecto del extracto metanólico de hojas y flores sobre <i>B. cereus</i>	30
4	Efecto antimicrobiano de BPMT (6), BPMFH (7) y BPDFH (9) sobre <i>B. cereus</i>	31
5	Comparación de la actividad de BPDFH sobre <i>B. cereus</i> en el medio Müller-Hinton (A) y en este adicionado con ampicilina (B)	32
6	Pruebas preliminares de la actividad antibacteriana del extracto diclorometánico con 300 µg/mL (A) y 600 µg/mL (B) de ampicilina sobre <i>B. cereus</i>	33
7	Evaluación del efecto del extracto en combinación con ampicilina en diferentes concentraciones sobre <i>B. cereus</i>	34
8	Efectos de los extractos diclorometánicos (1, 2, 3) y metanólicos (4, 5, 6) sobre <i>S. aureus</i> a 15 µL (extractos 1 y 4), 25 µL (2 y 5) y 50 µL (3 y 6)	38
9	Efectos de los extractos orgánicos sobre <i>S. aureus</i> ATCC 29213	36
10	Pruebas con ampicilina (control) y extractos en combinación con ampicilina [a) y b)] sobre <i>S. aureus</i> ATCC 29213	37
11	Cromatograma de gases de la muestra BPJP1	38
12	Espectro de masas del pico con tiempo de retención (Tr) = 9.198 min	38
13	Estructuras de los compuestos identificados en la muestra BPJP1 mediante análisis por CG-EM	39
14	Cromatograma de gases del extracto BPJP2	40
15	Espectro de masas del pico con Tr = 25.799 min	41
16	Compuestos encontrados en la muestra BPJP2 mediante análisis por CG-EM	42
17	Cromatograma HPLC del extracto metanólico de flores y hojas	43
18	Cromatograma HPLC del extracto metanólico de tallos	44
19	Comparación de los cromatogramas HPLC del extracto metanólico de flores y hojas (azul) y de los estándares fenólicos (negro)	44
20	Comparación de los cromatogramas HPLC del extracto metanólico de tallos (azul) y de los estándares fenólicos (negro)	45
21	CCF analítica (A) y preparativa (B) de la fracción F453	47
22	Estructura del catalpol	48
23	Espectro de RMN de ¹ H del catalpol	54
A1	Espectro de masas del pico con Tr = 19.478 min	61
A2	Espectro de masas del pico con Tr = 20.523 min	61
A3	Espectro de masas del pico con Tr = 21.145 min	61
A4	Espectro de masas del pico con Tr = 25.7 min	62
A5	Espectro de masas del pico con Tr = 26.222 min	62
A6	Espectro de masas del pico con Tr = 29.981 min	62

A7	Espectro de masas del pico con $T_r = 31.847$ min	63
A8	Espectro de masas del pico con $T_r = 39.563$ min	63
A9	Espectro de masas del pico con $T_r = 49.494$ min	63
A10	Espectro de masas del pico con $T_r = 49.618$ min	64
A11	Espectro de masas del pico con $T_r = 50.638$ min	64
A12	Espectro de masas del pico con $T_r = 53.550$ min	64
B1	Espectro de masas del pico con $T_r = 29.807$ min	65
B2	Espectro de masas del pico con $T_r = 35.606$ min	65
B3	Espectro de masas del pico con $T_r = 47.055$ min	65
B4	Espectro de masas del pico con $T_r = 47.876$ min	66
C	Espectro simulado mediante MestRenova para el catalpol	67

Acrónimos

- RAM: Resistencia a los antimicrobianos
SSA: Secretaría de Salud Pública
OMS: Organización Mundial de la Salud
IAAS: Infecciones Asociadas con la Atención a la Salud
ATCC: American Type Culture Collection (Colección Americana de Tipo de Cultivo)
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
CG-EM: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CONAHCYT: Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología
ESKAPE: Acrónimo formado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*,
Klebsiella pneumoniae, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y
especies de *Enterobacter*
UVEH: Unidad de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria.
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.
FDA: Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos).
CCF: cromatografía en capa fina.
CC: cromatografía en columna abierta.
HPLC: High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta
resolución)
COSY: Correlated Spectroscopy (bidimensional homonuclear ^1H - ^1H)
APT: Attached Proton Test
HMBC: Heteronuclear Multiple Bonds Correlation (bidimensional heteronuclear ^1H -
 ^{13}C a dos y más enlaces)
UFC: Unidades Formadoras de Colonias
BPMFH: *Buddleja perfoliata* Metanólico de Flores y Hojas.
BPMT: *Buddleja perfoliata* Metanólico de Tallos
BPDFH: *Buddleja perfoliata* Diclorometánico de Flores y Hojas.

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, el ser humano y muchos animales han dependido principalmente de las plantas para tratar sus enfermedades, entre ellas las infecciosas. Esto se debe a que las plantas constituyen el recurso al alcance de todos y que son laboratorios naturales donde se elaboran una gran diversidad de compuestos bioactivos, con muy variadas estructuras químicas y actividades farmacológicas. Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias, hongos, virus y protozoarios han constituido los principales problemas de salud a nivel mundial desde tiempos inmemoriales (Achtman, 2016). Se han documentado innumerables epidemias infecciosas causadas en particular por bacterias (Achtman, 2016), lo cual estimuló la búsqueda de agentes antiinfecciosos a partir de fuentes naturales y posteriormente mediante síntesis artificial, llegando la humanidad a contar con una gran variedad de antimicrobianos y en particular, de antibióticos. Las principales fuentes naturales de los antimicrobianos más prescritos han sido bacterias y hongos. Sin embargo, las plantas medicinales han mantenido su extensivo uso tradicional con esos propósitos por la mayor parte de la población mundial y muchas de ellas han salvado vidas, combatiendo los agentes infecciosos. Pero, debido al mal uso y abuso de los antibióticos, así como cuestiones evolutivas, surgió el fenómeno de resistencia tan solo pocos años después de la llamada época de oro del descubrimiento y desarrollo de numerosos antimicrobianos, la cual abarcó las décadas de 1940 y 1950 (Hutchings, 2019). Hoy en día, las infecciones más comunes y problemáticas son las llamadas nosocomiales que se originan en los centros de atención médica y las comunitarias (Arias-Flores y col., 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha identificado a 12 bacterias prioritarias de esta categoría, entre las cuales destacan las 6 del grupo llamado ESKAPE, por las iniciales de sus nombres (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies de *Enterobacter*) (OMS, 2017). Sin embargo, a pesar de esa alta prioridad, la investigación para el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibacterianos ha

ido en declive de manera sostenida (Fair y Tor, 2014; Miethke y col., 2021; OMS, 2023), debido a diversos factores, entre los cuales se encuentran el tiempo prolongado para generar nuevo conocimiento sobre nuevos agentes antibacterianos y la poca rentabilidad para las industrias farmacéuticas que buscan un rápido retorno de sus inversiones, a pesar del ofrecimiento de algunos gobiernos para facilitar los procesos de registro y comercialización de nuevos agentes antimicrobianos. En el presente proyecto, se determinó la actividad antimicrobiana de la planta medicinal *Buddleja perfoliata* sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y se caracterizaron químicamente sus principales constituyentes químicos. Dicha planta se usa, entre otros propósitos, para tratar infecciones bacterianas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Infecciones bacterianas

Las infecciones bacterianas han aquejado a la humanidad desde sus inicios. Un ejemplo de ello es *Helicobacter pylori*, presente en al menos el 50% de la población mundial con diferentes severidades. Evidencias muestran que *H. pylori* se empezó a distribuir por las diferentes poblaciones humanas alrededor de 50,000 años atrás (Achtman, 2016). Otra de las infecciones bacterianas que han asolado a la humanidad ha sido la peste negra, o también llamada peste bubónica, cuyo agente etiológico es *Yersinia pestis*, que causó la peste llamada justiniana (del tiempo del emperador Justiniano I el Grande) entre los años 541 d. C. a 767 d. C. en el Imperio Romano de Occidente, así como también azotó a la Europa medieval allá por el 1348. Se tienen evidencias de infecciones en restos humanos que datan de 3,000 a 5,000 años de antigüedad afectados por *Y. pestis*. Por último, en esta mención, uno de los más antiguos padecimientos de origen bacteriano reportados que afectan al humano a lo largo de la historia es la tuberculosis, originada por *Mycobacterium tuberculosis*, la cual fue reportada en Israel desde hace 9,000 años y sigue presente

en todos los continentes y aun hoy en día presenta un problema para la salud pública (Achtman, 2016).

2.2 Infecciones bacterianas más comunes

Las fuentes de infecciones más comunes hoy en día son aquellas contraídas en los centros de atención médica, a través de las llamadas enfermedades nosocomiales. En países como Estados Unidos, *Staphylococcus aureus* es el patógeno aislado con mayor frecuencia, seguido de *Escherichia coli*. Por otra parte, Arias Flores y col. recopilaron los diferentes datos emitidos por la Unidad de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria (UVEH) de todos los cultivos positivos de las infecciones nosocomiales detectadas en México en el 2013. De 48,377 resultados de cultivos nosocomiales, el microorganismo más frecuentemente aislado fue *Escherichia coli*, con 8,192 (16.9 %), seguido de los de *Staphylococcus* coagulasa-negativos, con 6,771 (14.0 %) y *Pseudomonas aeruginosa*, con 5,275 (10.9 %), como se observa en la **Tabla 1** (Arias-Flores y col., 2016). Sin embargo, datos más recientes muestran que *E. coli* sigue dominando entre las bacterias infecciosas prevalecientes (SSA, 2023).

Tabla 1. Principales microorganismos aislados en las infecciones nosocomiales de las unidades médicas del Instituto Mexicano del Seguro Social en el 2013 (Arias-Flores y col., 2016).

Microorganismo	Unidades médicas de primer nivel		Unidades médicas de segundo nivel		Unidades médicas de alta especialidad	
	<i>n</i> *	%	<i>n</i> *	%	<i>n</i> *	%
<i>Escherichia coli</i>	8,192	16.9	6282	17.9	1910	14.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	4725	9.8	3534	10.0	1191	9.0
<i>Staphylococcus</i> coagulasa-negativos	6771	14.0	4899	13.9	1872	14.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3122	6.5	2118	6.0	1004	7.6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	371	0.8	268	0.8	103	0.8
<i>Acinetobacter spp.</i>	1437	3.0	690	2.0	747	5.7

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5275	10.9	3721	10.6	1554	11.8
<i>Enterobacter cloacae</i>	1696	3.5	1158	3.3	538	4.1
<i>Candida albicans</i>	3115	6.4	2499	7.1	616	4.7
Otros	13673	28.3	10001	28.4	3672	27.8
Total	48377	100	35170	100	13207	100

*n = Cantidad de aislamientos.

Por mencionar algunos casos, de manera local, en el Hospital Dr. Ismael Vázquez Ortiz de Querétaro, en una revisión que comprendió los años 2015 a 2019, los microorganismos aislados responsables de infecciones asociadas con la atención a la salud (IAAS) más comunes fueron *E. coli* (24.3%), *P. aeruginosa* (11.2%) y *S. aureus* (9.8%) (Gloria-Ruiz y col., 2022). A nivel nacional, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) en el boletín informativo correspondiente al mes de enero 2023, señala a *E. coli* como el microorganismo más común responsable de infecciones intrahospitalarias, seguido en orden de frecuencia por *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y *S. aureus* (SSA, 2023).

Si bien estos datos dan un breve panorama de los agentes etiológicos más frecuentes, Rodríguez-Salgado informa que, de todas las unidades hospitalarias del sector público y privado registradas en México en el 2015, solo el 8.5% de ellas realiza reportes de infecciones contraídas en centros de atención médica. De estos reportes, las afecciones que con mayor frecuencia se presentaron fueron la bacteriemia con un 24%, la neumonía con 20.7% y las infecciones en vías urinarias con 15.7% (Rodríguez-Salgado, 2018).

2.3 Agentes antimicrobianos

Desde la introducción de los primeros antimicrobianos aprobados por la FDA en la década de los 30's del siglo XX, la tasa de mortalidad de enfermedades infecciosas como neumonía decreció notablemente, siendo superadas estas por otros padecimientos como cáncer, enfermedades cardiacas, accidentes o diabetes (Mohr, 2016).

El uso de sustancias antibióticas se ha registrado desde antes del advenimiento de la medicina moderna. Los egipcios usaban pan cubierto de hongos filamentosos para el tratamiento de heridas y quemaduras. Telas cubiertas de moho fueron usadas por griegos y chinos en la antigüedad como parte de sus tratamientos tradicionales. En el siglo XIX, Joseph Lister trató la herida de una de sus enfermeras con extractos de *Penicillium glaucum*. En 1897, Ernest Duchesne publicó en su tesis la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* por parte de *Pennisetum glaucum* (el mijo) (Mohr, 2016; Aminov, 2017).

En 1911, fue comercializado el primer antibiótico contra *Treponema pallidum*, causante de la sífilis. Dicho antimicrobiano fue la arsfenamina, comercializada con el nombre de salvarsán por el químico Paul Ehrlich. La arsfenamina fue el tratamiento más usado hasta la década de los 40's del siglo XX, cuando la penicilina, descubierta por Alexander Fleming, se empezó a prescribir contra la sífilis (Aminov, 2017).

Con el descubrimiento de la penicilina, posteriores investigaciones llevadas a cabo con diversas bacterias y hongos arrojaron una variedad de nuevos agentes antimicrobianos como la estreptomicina y la neomicina, ambas derivadas de *Streptomyces spp.* Otros fueron la fumigacina y la clavacina, obtenidas de hongos del género *Aspergillus* (Aminov, 2017; Durand y col., 2019). En efecto, durante la época de auge de los agentes antimicrobianos, la mayor fuente de estos se encontró en fuentes naturales y con diversos mecanismos de acción, por lo que se han agrupado en diferentes familias (Hutchings y col., 2019).

Sin embargo, no tardó mucho en aparecer la resistencia a los antimicrobianos (Fair y Tor, 2014; WHO, 2019), la cual sigue siendo un problema creciente de alcance global. En años recientes, Garza-González y colaboradores realizaron un estudio, donde se recopilaron datos de 47 unidades mexicanas de atención médica. Se analizaron 22,943 cepas del grupo de bacterias, llamado ESKAPE (ver punto 2.4), que son a la vez más frecuentes en hospitales y más resistentes, donde la resistencia a los carbapenémicos (antibióticos llamados carbapenemas o

carbapenems) se observó en menos del 3% de las cepas de *E. coli*, en el 12.5% de las cepas de *Klebsiella spp.* y *Enterobacter spp.*, más del 40% de las cepas de *P. aeruginosa* y el 50% en *A. baumannii*. El mismo reporte indica que el 21% de los aislamientos de *S. aureus* presentó resistencia a la meticilina (Garza-González, 2019). Pero, los mismos autores presentaron en 2020 otro monitoreo de la resistencia a los antimicrobianos que abarca el periodo de 2008 al 2018 en 22 de los 32 estados de la República Mexicana, encontrando una disminución de la resistencia de varias bacterias frente a algunos antimicrobianos. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* mostró una baja resistencia a sulfametoxazol-trimetoprima y a la eritromicina, *S. pneumoniae* a la penicilina y a la ceftriaxona, *E. faecium* frente a nitrofurantoína, mientras que esta última bacteria elevó su resistencia frente a penicilinas. En el género *Enterobacter*, la resistencia a la amikacina y a la cefepima se mantuvo baja, mientras que la misma se incrementó frente a meropenem. Para las especies de *Klebsiella*, se incrementó la resistencia a aztreonam, tobramicina, sulfametoxazol, gentamicina y cefuroxima. *Acinetobacter baumannii* aumentó su resistencia a todos los antibióticos, a excepción de tobramicina y amikacina. Finalmente, *P. aeruginosa* incrementó su resistencia frente a aztreonam (Garza-González y col., 2020). En resumen, la aparición de resistencia a los antibióticos domina sobre la disminución ocasional de la misma.

Durante la pandemia por la covid-19, la infección vírica, en conjunto con otros patógenos, causó un incremento en el uso de antibióticos y con ello un aumento de la resistencia a los antibióticos. En el caso de *S. aureus*, se ha observado un aumento del 42.8 % en la resistencia a la eritromicina. *K. pneumoniae* presentó un aumento en la resistencia a carbapenémicos, al igual que los niveles de resistencia a estos por parte de *A. baumannii* y *P. aeruginosa*. El aumento en la resistencia a la eritromicina está asociado con el uso de azitromicina como tratamiento de la covid-19 pese a la débil evidencia de mejoras clínicas por su uso (López-Jácome y col., 2021).

A continuación, se describen algunos de los antibióticos más usados en el tratamiento de infecciones por bacterias.

2.3.1 β -Lactámicos

Las penicilinas y otros agentes como las cefalosporinas, los monobactámicos y las carbapenemas se engloban en la clase de los antibióticos β -lactámicos, los cuales se caracterizan por poseer un anillo de β -lactama en su estructura química. Fueron de los primeros agentes antimicrobianos de amplio espectro de origen natural en ser usados y hoy en día son los más prescritos para combatir infecciones, lo que ha provocado una creciente aparición de cepas resistentes. Actúan inhibiendo la biosíntesis de la pared celular, por lo que son potentes agentes contra las bacterias Gram positivas, ya que las Gram negativas son impermeables a estos químicos. Con la producción de β -lactámicos sintéticos y semisintéticos, se ha logrado obtener efectos contra cepas resistentes y patógenas del grupo de Gram positivos (Mohr, 2016; Aminov, 2017).

2.3.2 Sulfonamidas

Las sulfonamidas son una familia de antibióticos de amplio espectro sintetizados por los químicos Josef Klarer y Fritz Mietzsch de la compañía Bayer a finales de la década de los 30's. La primera sulfonamida fue la sulfamidocrisoidina bajo el nombre comercial de Prontosil, que era un profármaco de cuyo metabolismo se obtiene sulfanilamida, la cual es la responsable de su efecto antimicrobiano. Las sulfonamidas son efectivas contra bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas, particularmente contra estreptococos, pero con menor capacidad contra otros cocos. Su mecanismo de acción es inhibir competitivamente la sintetasa dihidropteroato (DHPS), que es la enzima que provoca la incorporación del ácido para-aminobenzoico (PABA) para la síntesis de ácido fólico, siendo resistentes a este tipo de antibióticos las bacterias capaces de obtener su ácido fólico de fuentes externas (Mohr, 2016; Aminov, 2017).

2.3.3 Polipéptidos

Fueron extraídos por primera vez en la década de los 40's a partir de cultivos bacterianos aislados del suelo como *Bacillus brevis*. Consisten en péptidos lineales o cíclicos, elaborados por sintetetasas peptídicas no ribosomales. El primero de ellos fue la tirocidina. Otros polipéptidos son la gramicidina, la microcistina y la bacitracina (Mohr, 2016).

El mecanismo de acción de estos antimicrobianos es unirse a la membrana y actuar como canales que alteran el gradiente intracelular con el exterior, destruyendo así la membrana. Dada su toxicidad, su uso se limita a tratamientos tópicos, ya que en usos sistémicos puede causar hemólisis (Aminov, 2017).

2.3.4 Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos son un grupo de antibióticos de amplio espectro. Fueron obtenidos por Schatz a partir de cultivos del género de *Streptomyces*, donde se aisló la estreptomina. Este grupo de antimicrobianos se encuentra aún en uso, sobre todo para tratar los casos de tuberculosis "multidrogorresistentes" (Calvo y Martínez-Martínez, 2009). El mecanismo de acción es penetrar la membrana celular por su gradiente de carga eléctrica. Una vez dentro de la célula, se une a la sub unidad 30S ribosomal, formando un complejo que impide el inicio de la síntesis de proteínas. Dado que esta acción requiere el transporte activo de la célula para lo cual es necesaria la presencia de oxígeno, es poco efectivo en microorganismos anaerobios (Aminov, 2017). La gentamicina, por sus bajas propiedades farmacológicas y alta toxicidad hacen que su uso se limite a tratamiento tópico (Mohr, 2016).

2.3.5 Tetraciclinas

Las tetraciclinas fueron identificadas en los laboratorios de la American Cyanamid Company, bajo la dirección de Subbarow. Se aislaron de cultivos del género *Streptomyces* en la década de los 50's. Su mecanismo de acción es unirse a la subunidad 30S ribosomal, impidiendo el acceso a los complejos aminoacil-ARN-t a

los ribosomas, por lo cual se interrumpe la síntesis proteica. Por su efectividad contra bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, se le considera de amplio espectro. Dado su uso como potenciador de la biomasa en animales de importancia económica y como de uso como antibiótico veterinario, han aparecido múltiples cepas resistentes a estas (Mohr, 2016; Aminov, 2017).

2.3.6 Anfenicoles

Otros antibióticos obtenidos del género *Streptomyces* son los de la clase de los anfenicoles, los cuales pueden ser naturales o sintéticos. Fueron descubiertos por Gottlieb en 1947. Su mecanismo de acción es unirse a la proteína L16 de la subunidad ribosómica 50S (formada por 34 proteínas, L1 a L34), por lo que inhibe la acción de la peptidiltransferasa, bloqueando la formación de enlaces peptídicos. Esta familia de antibióticos es de amplio espectro, y por su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, son de primera elección contra meningitis bacteriana. Su uso prolongado causa neurotoxicidad y hematosupresión. La simplicidad de su molécula ayuda a sintetizar diferentes variedades de anfenicoles o la creación de antimicrobianos combinados (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Mohr, 2016; Aminov, 2017).

2.3.7 Lipopéptidos

Este grupo de antibióticos consta de un péptido cíclico de carga positiva con una cola hidrofóbica de ácidos grasos. Su mecanismo de acción es unirse a la superficie de la membrana y a los fosfolípidos de esta, generando un desorden en la permeabilidad de la membrana. Por las mayores concentraciones de fosfolípidos de las bacterias Gram negativas, estas son más sensibles. Sus efectos secundarios reportados, como la nefrotoxicidad, la neurotoxicidad y la baja acción contra microorganismos Gram positivos causan que no se les considere como tratamientos de primera elección. Son tratamientos de última línea contra cepas multidrogas resistentes de *P. aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Aminov, 2017).

2.3.8 Macrólidos (o macrolactonas)

Esta familia de antibióticos fue descubierta por James McGuire a partir de aislamientos del género *Streptomyces* en los años 50's del siglo XX. Constan de un anillo lactónico macrocíclico con diferentes sustituyentes. Su mecanismo de acción consta de la unión del antimicrobiano al dominio V de la ARNr 23S de la sub unidad ribosomal 50S, por lo que bloquea de manera estérica el crecimiento de las proteínas. Son la segunda mayor familia de antimicrobianos que se receta contra infecciones. Presentan mayor efectividad contra Gram positivas y son los más empleados en pacientes alérgicos a los beta-lactámicos (Calvo y Martínez-Martínez 2009; Mohr, 2016).

2.3.9 Oxazolidinonas

Son de los más recientes grupos de antimicrobianos de origen sintético. Dupont las patentó en 1978 y entró a la práctica clínica en el año 2000. Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis proteica por bloqueo de la formación del complejo formilmetionil-ARNt en la unidad iniciadora 70S, por lo que no se inicia la síntesis proteica. Son efectivas contra las Gram positivas, pero las Gram negativas presentan resistencia (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Mohr, 2016).

2.3.10 Glicopéptidos

Se han descubierto diferentes tipos de glicopéptidos a partir de organismos del género *Actinomycetes*. Actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular, impidiendo la elongación del peptidoglucano. Los glicopéptidos se unen al péptido terminal D-Ala-D-Ala en el extremo de las cadenas de los péptidos precursores, evitando así la transpeptidación y la transglicosilación del peptidoglucano, por lo que la pared celular no se sintetiza y causa la lisis de la célula. Los glicopéptidos son efectivos contra bacterias Gram positivas, incluyendo cepas multidrogorresistentes, por lo que no son de uso de primera línea (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Aminov, 2017).

2.3.11 Estreptograminas

Se descubrieron a partir de aislamientos de microorganismos del género *Streptomyces*. Constan de dos moléculas, estreptogramina A, que es una macrolactona insaturada, y la estreptogramina B, que es un polipéptido cíclico. Actúan en sinergia, bloqueando la acción de la peptidiltransferasa, causando la muerte de la bacteria. La estreptogramina A se une a la sub unidad 50S, lo que causa cambios tridimensionales, lo cual a su vez aumenta la afinidad de la estreptogramina B. Su uso se ha extendido a nivel veterinario, así como promotor del desarrollo de biomasa en animales de interés comercial (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Aminov, 2017).

2.3.12 Ansamicinas

Son un grupo de antibióticos obtenidos en 1957 de la bacteria Gram positiva *Amycolatopsis rifamycinica*. Su mecanismo de acción es unirse a la RNA polimerasa, impidiendo el inicio de la transcripción. Son un grupo de antibióticos que se usan contra *Mycobacterium* en combinación con otros fármacos. Dadas las reacciones espontáneas que causan en un paciente, su uso es limitado y se suministran usualmente por vía intravenosa (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Aminov, 2017).

2.3.13 Quinolonas

Fueron descubiertas de manera fortuita durante la síntesis de la cloroquina por la Sterling Drug Company en 1963. Actúan formando un complejo con la DNA girasa, lo que bloquea el proceso de replicación del cromosoma bacteriano, induciendo la muerte del microorganismo. Tienen un amplio espectro de acción, tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, siendo el tercer grupo de antibióticos, por lo que la FDA ha incentivado su uso más racional para infecciones con tratamiento difícil (Mohr, 2016; Aminov, 2017).

2.3.14 Lincosamidas

Estas fueron obtenidas a partir de *Streptomyces lincolnensis* en la década de los 50's. Actúan uniéndose a la subunidad 50S del ribosoma, inhibiendo la acción de la peptidiltransferasa, lo que impide la síntesis proteica. Las lincosamidas son un excelente tratamiento contra bacterias Gram positivas, incluyendo las multidrogosresistentes (Calvo y Martínez-Martínez 2009; Mohr, 2016).

2.4 Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antibióticos se produce en las bacterias como respuesta al uso de dichos fármacos. La aparición de bacterias cada vez más resistentes provoca que ciertos antibióticos ya no sean efectivos, lo que hace que su tratamiento sea cada vez más difícil (OMS 2020).

Ante esta problemática, la Organización Mundial de la Salud emitió una lista con los patógenos cuya resistencia merece mayor énfasis en investigación y desarrollo de nuevos tratamientos. Para la elaboración de la lista, se tomó en cuenta la letalidad de las infecciones, la cantidad de fármacos que quedan para combatirla, la facilidad de transmisión, si se requiere hospitalización para su tratamiento y con qué frecuencia se detectan cepas multidrogosresistentes. Con base en estos criterios, se dieron tres rangos de prioridad a combatir, los cuales se recopilan en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos (modificado de Rizo-Amézquita y Camargo-O, 2017).

Prioridad 1: Crítica
<ul style="list-style-type: none">- <i>Acinetobacter baumannii</i>, resistente a carbapenémicos.- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, resistente a carbapenémicos.- <i>Enterobacteriaceae</i>, resistente a los carbapenémicos, productoras de betalactamasas de espectro extendido.
Prioridad 2: Elevada

- *Enterococcus faecium*, resistente a vancomicina
- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a vancomicina
- *Helicobacter pylori*, resistente a claritromicina
- *Campylobacter spp.*, resistente a fluoroquinolonas
- *Salmonellae*, resistente a fluoroquinolonas
- *Neisseria gonorrhoeae*, resistente a cefalosporinas y resistente a fluoroquinolonas

Prioridad 3: Media

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

Entre estos microorganismos, destaca el llamado grupo ESKAPE (nombre derivado de las iniciales de las bacterias *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y especies del género *Enterobacteriaceae*) que son las causantes de infecciones nosocomiales más comunes en el mundo. Si bien cada país tiene sus características epidemiológicas particulares, estos patógenos, en una u otra proporción, están presentes en cada país del mundo. En México, la Secretaría de Salud reportó en 2011 a *Enterobacter spp.* con un 38% de aislamientos resistentes, seguido por *Staphylococcus aureus* (13%) y *Pseudomonas spp.* (13%) (SSA, 2011). Gutiérrez-Muñoz y colaboradores encontraron que alrededor del 75% de los aislamientos de *E. coli* y el 13% de *K. pneumoniae* mostraban resistencia a las cefalosporinas (Gutiérrez-Muñoz y col., 2017).

La OMS recomienda un mejor y más consciente uso de los fármacos actuales contra infecciones. También alienta el incremento de los esfuerzos en conjunto del sector público y la industria farmacéutica para la investigación y desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos (Quiñones-Pérez, 2017; Gutiérrez-Muñoz y col., 2017).

2.4.1 Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos

Desde el descubrimiento y uso de la penicilina, Alexander Fleming advirtió que su uso inadecuado podría dar origen al surgimiento de cepas resistentes. En la década de los 60's, la aparición de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina y *Pseudomonas* resistente a la gentamicina inició las alertas. La situación evolucionó al punto que se detectaron cepas resistentes a los antibióticos de última generación. La resistencia a los antimicrobianos, si bien se puede originar de manera natural, la resistencia adquirida es la causante del mayor problema, al producir cepas de patógenos resistentes a tratamientos, a los que anteriormente eran sensibles (Quiñones-Pérez, 2017; Rizo-Amézquita y Camargo-O, 2017).

2.4.1.1 Modificación de la estructura química del antimicrobiano

Consiste en la producción de enzimas que se unen al antimicrobiano y modifican su estructura, de manera que este pierde su efecto contra las bacterias. Un ejemplo más extendido es la producción de betalactamasas, que se unen al anillo betalactámico de las penicilinas, hidrolizándolas y haciendo que pierdan su efecto (Quiñones-Pérez, 2017; Rizo-Amézquita y Camargo-O, 2017).

2.4.1.2 Alteración del sitio blanco del antibiótico

Este mecanismo de resistencia ocurre cuando genes específicos que decodifican la proteína del sitio de acción mutan, por lo que generan cambios estructurales en las proteínas diana. Los más habituales son las modificaciones en las proteínas de las subunidades ribosomales 30S y 50S, siendo el ejemplo de resistencia más común de *E. coli* y *P. aeruginosa* contra las quinolonas (Quiñones-Pérez, 2017; Rizo-Amézquita y Camargo-O, 2017).

2.4.1.3 Alteración en las barreras de permeabilidad

Esta se produce por alteraciones en genes que codifican la expresión de porinas en la membrana bacteriana, reduciendo la permeabilidad de la membrana, por lo que los antibióticos ya no son capaces de atravesar la membrana bacteriana, imposibilitando así su acción antimicrobiana. Este es el principal mecanismo de

resistencia contra las carbapenemas (Quiñones-Perez, 2017; Rizo-Amézquita y Camargo-O, 2017).

2.4.1.4 Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo de fármacos son un mecanismo también de origen genético, originado por mutaciones en los cromosomas, que sobreexpresan las bombas de eflujo para expulsar del interior de la célula de manera activa los antimicrobianos. Este es un mecanismo común reportado contra β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol (Quiñones-Pérez, 2017; Rizo-Amézquita y Camargo-O, 2017).

2.5 Productos naturales de origen botánico usados para tratar infecciones

Dentro de los esfuerzos por encontrar nuevos agentes antimicrobianos, se ha puesto atención a los productos naturales de origen botánico. Los extractos crudos de plantas llegan a contener una gran variedad de metabolitos secundarios con diversos efectos, como lo pueden ser antibacterianos, antivirales o antiparasitarios con bajos efectos tóxicos. Los diferentes metabolitos que se han reportado con efectos antimicrobianos son alcaloides, ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas y terpenoides (**Tabla 3**). Sin embargo, los diversos metabolitos secundarios pueden llegar a tener mayores efectos en conjunto que por separado. Además de exterminar al microorganismo, se puede tener efectos contra otros procesos patogénicos como la generación de biopelículas (Papanephytou y col., 2020). Cabe mencionar que las biopelículas son polisacáridos extracelulares que las bacterias sintetizan y que les permiten adherirse a esta superficie. Dichas biopelículas protegen a las bacterias contra los agentes antimicrobianos y causan un serio problema de salud pública (Donlan, 2001).

Tabla 3. Agentes antimicrobianos de origen botánico (Papaneophytou y col., 2020).

Compuesto	Mecanismo de acción
Alcaloides	Forman complejo con ADN que reduce la división celular y causa la muerte celular
Compuestos fenólicos y polifenólicos	
Flavonoides	Interactúan con las proteínas de la pared celular de las bacterias, lo que provoca la alteración de la membrana celular
Quinonas	Inhiben las proteínas/enzimas unidas a la membrana y alteran los polipéptidos de la pared celular
Taninos	Inhiben las proteínas de transporte de la envoltura celular y las proteínas de adhesión microbiana
Cumarinas	Inhiben la ADN girasa
Terpenos	Rompen la membrana celular microbiana
Lectinas/polipéptidos	Inhiben la interacción entre microbios y proteínas de adhesión al receptor del huésped
Saponinas	Rompen la membrana celular bacteriana

2.6 Género *Buddleja*

El género *Buddleja* pertenece a la familia *Scrophulariaceae*. El género comprende más de 100 especies distribuidas en zonas tropicales del sudeste asiático, África y desde Norteamérica hasta Sudamérica. Suelen consistir en arbustos leñosos de no más de 3 m de altura, presentando ramas en lugar de un tronco central. Algunas de

sus especies se han distribuido como plantas de ornato a causa de las coloridas flores que presentan (Houghton y Mensah, 1999; Khan y col., 2019).

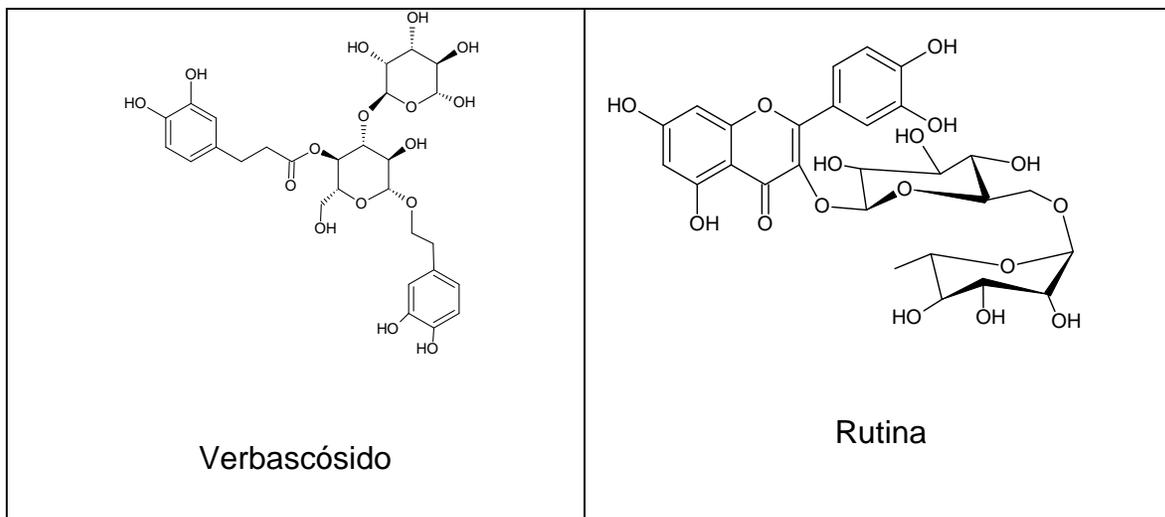
2.6.1 Fitoquímica del género

Houghton, en su compendio, documentó el uso extendido en el continente americano de diferentes partes de *B. americana* para ayudar a aliviar quemaduras e infecciones en piel, así como urinarias. Por otra parte, también registró el uso tradicional de *B. asiática* contra infecciones fúngicas en el sudeste asiático. Como es de esperar, las especies de *Buddleja* comparten las mismas características químicas en su composición. Se han logrado identificar alrededor de 150 compuestos diferentes agrupados entre flavonoides, terpenoides, lignanos y ésteres de ácidos grasos, los que se pueden apreciar en la **Figura 1** (Houghton, 1984; Houghton y Mensah, 1999; Khan y col., 2019).

En una recopilación posterior de la fitoquímica del género, Houghton y Mensah reportaron el verbascósido extraído de *B. globosa*, el cual presentó actividad inhibitoria contra *S. aureus* y la aucubina presente en los aceites esenciales, con inhibición de bacterias Gram negativas. Los sesquiterpenos presentes en la fracción de cloroformo del aceite esencial de *B. globosa* mostraron inhibición contra hongos de los géneros *Epidermophyton* y *Trichophyton*. Los iridoides glicosilados de la aucubina y el catalpol se han identificado en diversas especies, aunque no mostraron actividad propia, pero sus agliconas sí. La gama de sesquiterpenos identificados en el género *Buddleja*, conocidos como Budleínas A-E, han demostrado diversos efectos contra plagas, como molusquicidas y piscicidas. Las budleínas A y B presentan actividad inhibitoria contra hongos de interés médico. Otro efecto reportado para las budleínas A – C es el de inhibir la acción de la cicloxigenasa y la 5-lipoxigenasa, lo cual genera un efecto antiinflamatorio. Los diterpenos presentes en las especies de *Buddleja* presentan el mismo perfil de actividad que los sesquiterpenos como antifúngicos y antiinflamatorios. De los flavonoides más importantes encontrados, destaca la rutina, también conocida como vitamina P y considerada como un nutraceutico. Otro grupo de metabolitos secundarios

presentes son los lignanos, que suelen presentarse como dímeros, pero algunos reportados por Houghton y Houghton y colaboradores se conforman de trímeros, los cuales se clasifican como ligninas. Otros compuestos identificados en menor medida en extractos de especies del género *Buddleja* son esteroides, azúcares libres, alcaloides, ácidos benzoicos y ácidos grasos (Houghton, 1984; Houghton y Mensah, 1999; Houghton y col., 2003; Khan y col., 2019).

Los aceites esenciales y extractos de *B. asiática*, *B. cordata* y *B. globosa* han sido ampliamente estudiados. Extractos crudos de *B. asiática* han demostrado actividad contra *Salmonella ssp.* y *Vibrio cholerae* así como hongos dermatofitos. El extracto metanólico crudo de *B. asiática* y sus fracciones de acetato de etilo y *n*-butanol han mostrado acciones antibacterianas contra las cepas Gram (-). El verbascósido extraído de *B. cordata* mostró actividad contra *S. aureus* y el extracto obtenido por arrastre de vapor (aceite esencial) de *B. cordata* mostró actividad contra *M. Tuberculosis* (Khan y col., 2019; Said-Al y col., 2021).



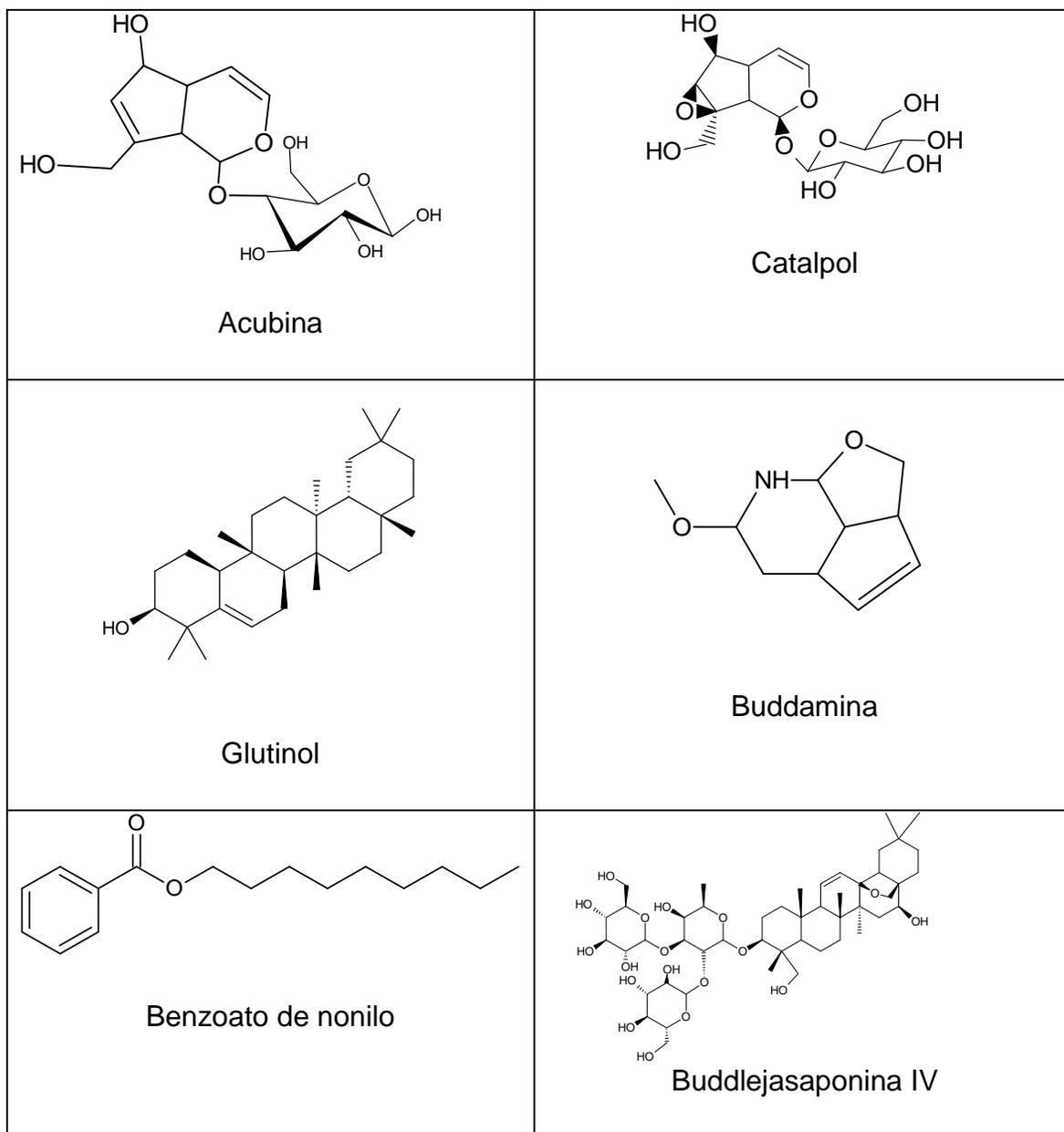


Figura 1. Estructuras de algunos de los metabolitos secundarios identificados en *Buddleja*.

2.6.2 *Buddleja perfoliata*

Conocida por su nombre común, salvia de bolita, es una planta endémica de México usada en la medicina tradicional como antiséptico de uso tópico, diurético, anti resfriado, contra la tuberculosis y dolor de cabeza. Houghton, recopiló los usos

etnobotánicos para tratar úlceras de la piel, como analgésica, antitumoral, y para alivio de quemaduras (Houghton, 1984; Juárez y col., 2016).

Martínez (1969) reportó su uso como moderador de secreciones como sudor, saliva, etc., pero principalmente contra sudoraciones, siendo útil en el tratamiento de la tuberculosis (llamada antes tisis). Ayuda a controlar el resfriado y sudoraciones por intoxicaciones por yodo o mercurio. Para estos efectos, se usa la esencia y la tintura con 3 a 5 cucharadas. Contiene aceites esenciales, ceras, resinas, ácido tánico, ácido gálico, ácido oxálico, goma, albúmina y minerales. El aceite esencial y la resina son los más utilizados, siendo extraídos de toda la planta a partir de preparaciones alcohólicas o etéreas y decolorándolos de los otros principios.

2.6.2.1 Descripción y taxonomía

B. perfoliata pertenece a la familia *Scrophulariaceae*. Es un arbusto endémico de México. Forma parte de los matorrales xerófilos del centro del País, creciendo entre los 1500 y 2700 metros sobre el nivel del mar. Es un arbusto dioico de madera grisácea altamente ramificado, con una talla que va desde los 80 cm a 2 m de altura. Presenta flores amarillas de aroma a salvia y hojas ovaladas pegadas al tallo como se puede apreciar en la **Figura 2** (NATURALISTA, 2017).

- **Reino:** *Plantae*

- **Filo:** *Tracheophyta*

- **Subfilo:** *Angiospermae*

- **Clase:** *Magnoliopsida*

- **Orden:** *Lamiales*

- **Familia:** *Scrophulariaceae*

- **Tribu:** *Buddlejeae*

- **Género:** *Buddleja*

- **Especie:** *Buddleja perfoliata*



Figura 2. Salvia de bolita (*B. perfoliata*) (muestra propia).

2.6.2.2. Estudios efectuados sobre *Buddleja perfoliata*

Pocos estudios se han realizado sobre la especie *B. perfoliata*, si bien desde 1930 se tiene registrado el uso etnobotánico. En 1983, Houghton publicó la mayoría de sus usos tradicionales; ningún estudio farmacológico fue presentado que los respalde (Houghton, 1984). Cortes y col. evaluaron la actividad antiespasmódica de extractos de *B. perfoliata* en cloroformo, concluyendo que tiene un efecto relajante del musculo liso por inhibición del flujo de iones de K^+ (Cortes y col., 2006).

Juárez y col. probaron los efectos antifúngicos, toxicológicos y antiinflamatorios de los aceites esenciales, en los cuales caracterizaron los compuestos α -camfonelal, cis-verbenol, verbenona, carveol, eremofileno, germacreno D-4-ol, óxido de cariofileno y globutol. En los ensayos que evaluaron la toxicidad de los mismos, se demostró la inocuidad de los aceites, así como su nula estimulación de la actividad inflamatoria. Durante el ensayo antifúngico, se encontró que los aceites esenciales producían actividad inhibitoria contra *Aspergillus amylovorus*, *A. flavus*, *A. nomius*,

A. ostianus, *Eurotium halophilicum*, *E. hirayamae*, *Penicillium cinnamopurpureum* y *P. viridicatum* (Juárez y col., 2016). En estudios posteriores, Juárez y col. usaron aceites esenciales con actividad antifúngica ya identificada, provenientes de diversas plantas, entre ellas *B. perfoliata*, como aditivos a la harina para retrasar el desarrollo de hongos en productos de harina durante su almacenamiento (Juárez y col., 2021).

2.7 Dos bacterias de interés

2.7.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria Gram positiva, no esporulada y ampliamente distribuida en la naturaleza y los seres humanos. Es un patógeno causante de diversas patologías como lo son endocarditis, bacteriemia, osteomielitis e infecciones de piel y tejidos blandos. En el ambiente hospitalario, también es uno de los microorganismos que más se presenta en las infecciones asociadas con centros de atención médica. Uno de los factores que hace de *S. aureus* un patógeno difícil de tratar son las diferentes resistencias que presenta. Las penicilinas clásicas son casi inefectivas, siendo la cepa *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) de la mayor importancia clínica. Otras resistencias que se han detectado son a las eritromicinas, clindamicina, tetraciclina, entre otros. La vancomicina es el antibiótico de última opción para combatir las cepas multiresistentes, aunque también han aparecido cepas resistentes a ella. Este patógeno, además de las resistencias ya mencionadas, presenta un abanico de factores de virulencia, entre las que destacan la producción de toxinas, factores de evasión del sistema inmune y enzimas que ayudan a la invasión de tejidos (Lade y Kim, 2021; Missiakas y Winstel, 2021).

2.3.2 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es un patógeno alimentario de creciente importancia, siendo uno de los principales agentes causales de intoxicaciones. Al estar presente en una variedad de entornos, su capacidad de formar esporas y producir toxinas nocivas lo hace un patógeno al que debe de prestársele atención. Las intoxicaciones por *B.*

cereus se presentan en dos formas: hemética y diarreica. La primera es producida por la presencia de la toxina cereulida [péptido cíclico termoestable de 1,2 KDa, (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)] en los alimentos, previo a su ingesta. La segunda es una intoxicoinfección y es causada por la ingesta de cepas de *B. cereus* que lograron germinar en el epitelio gastrointestinal para producir enterotoxinas en el intestino delgado (Jovanovic y col., 2021).

Aunado a su patogenicidad, son crecientes los reportes de cepas de *B. cereus* que presentan resistencia a los agentes antimicrobianos. Estas bacterias son típicamente resistentes a los betalactámicos y se ha evidenciado que la resistencia se extiende a otros antibióticos de primera línea, como el cloranfenicol, la gentamicina, el imipenem, la eritromicina, la tetraciclina y la combinación trimetoprima/sulfametoxazol (Celestino-Hernández y col., 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

El incremento a niveles alarmantes de la resistencia a los antimicrobianos hace que cada vez sea más difícil el tratamiento de infecciones bacterianas. Los fármacos de primera línea cada vez son menos eficaces e inútiles en algunos casos, por lo que se recurre cada vez más a tratamientos más agresivos y caros que suelen acarrear complicaciones como lo es el internamiento en centros de atención, la exposición a nuevas infecciones intrahospitalarias e intracomunitarias y el desarrollo de nuevas resistencias. La OMS prevé que, de continuar esta tendencia, para el año 2050, se podría llegar una era post antibióticos, donde una simple infección de vías aéreas o herida superficial será de alta peligrosidad o imposible de tratar, elevando la mortandad por infecciones a niveles anteriores al siglo XX. Para evitar llegar a esa etapa, la OMS hace un llamado para llevar a cabo la investigación y el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos. Como se ha mencionado anteriormente, los primeros antibióticos fueron aislados a partir de organismos, en particular de hongos y bacterias. Sin embargo, la mayoría de la población mundial, que es rural, recurre a las plantas medicinales de sus localidades, por lo cual estas pueden ser fuentes importantes de nuevos agentes antimicrobianos. El género *Buddleja* ha sido ampliamente identificado en diferentes sistemas tradicionales de medicina, en parte debido a su gran distribución. Se ha comprobado actividad biológica de *B. cordata* y *B. globosa*, especies presentes en el continente americano, las cuales han presentado acción antifúngica y antibacteriana, así como antiinflamatoria. En México, la planta conocida como salvia de bolita, *Buddleja perfoliata*, ha sido usada con diferentes fines en los tratamientos caseros, como lo son para heridas, quemaduras, infecciones de vías urinarias, entre otros. A pesar de ser *B. perfoliata* endémica de México, la información sobre esta especie es muy limitada, habiendo solo escasos reportes de actividad antifúngica y toxicológica. Por las diferentes actividades mostradas por el género, se espera que *B. perfoliata* sea una potencial fuente de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana sobre dos de las bacterias prioritarias resistentes (*S. aureus* ATCC 29213 y *B. cereus* ATCC 10876).

4. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos y diclorometánicos de las partes aéreas de la planta medicinal *Buddleja perfoliata* contienen metabolitos secundarios que inhiben el desarrollo de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, bacterias Gram positivas resistentes a antibióticos.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Identificar los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos diclorometánicos y metanólicos de las partes aéreas de *Buddleja perfoliata* con efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Bacillus cereus* ATCC 10876 resistentes a antibióticos beta lactámicos.

5.2 Específicos

- Determinar la actividad inhibitoria de extractos diclorometánicos y metanólicos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Bacillus cereus* ATCC 10876 y contrastar dicha actividad con la de la ampicilina, fármaco comercial.
- Aislar y/o identificar los compuestos mayoritarios.
- Determinar la actividad de los compuestos identificados sobre el crecimiento de las dos bacterias, en caso de no estar descrita.

6. METODOLOGÍA

6.1 Materiales

Las hojas de *Buddleja perfoliata* se recolectaron el 04 de enero de 2022 afuera del jardín botánico regional de Cadereyta, municipio de Cadereyta, Querétaro. La identificación fue realizada por la Dra. Mahinda Martínez, investigadora de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Una muestra de referencia (voucher Braulio Zamora Aguilar 7499) fue depositada en el Herbario Jerzy Rzedowski de dicha Facultad. La planta se desecó en una estufa diseñada *ex profeso* a la temperatura de 35 a 40 °C. Posteriormente, las flores y hojas fueron desprendidas y mezcladas, asignándole la clave BPFH, mientras que, a los tallos, se les asignó la clave BPT. Cada una de esas muestras fue procesada de manera independiente. Para la evaluación de la actividad antibacteriana, se seleccionaron dos bacterias Gram positivas, las cepas *Bacillus cereus* ATCC 10876 (Celestino-Hernández y Col., 2021) y *Staphylococcus aureus* ATCC 85175 y ATCC 29213 y dos Gram negativas que fueron *Kosakonia kowanii* y *Escherichia coli*. Las cepas fueron obtenidas del cepario del laboratorio de Biología Molecular a cargo del Dr. Juan Campos Guillén, investigador de esta Facultad de Química. Las cepas fueron almacenadas a -70 °C al 20% en glicerol. Los ensayos biológicos fueron llevados a cabo de acuerdo a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995 en sus apartados 4 y 6 para el correcto uso, manejo y eliminación de los microorganismos empleados en ese tipo de ensayos.

6.2 Preparación de los extractos

Las 2 muestras de las partes aéreas secas de la planta se sometieron a molienda manual, obteniendo 92.9 g de flores y hojas por una parte y 102.9 g de tallos por otra parte. Cada muestra se sometió a maceración en un litro de diclorometano por una semana, seguida de una segunda maceración con la misma cantidad de metanol y durante el mismo tiempo. Los extractos se llevaron a sequedad mediante rotaevaporación y se determinó el peso de cada extracto seco. Los extractos

concentrados resultantes se almacenaron en refrigeración a 4° C para estudios posteriores.

6.3 Estudio químico

6.3.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

Los extractos obtenidos se analizaron mediante cromatografía en capa fina para determinar su complejidad y buscar condiciones de separación de sus constituyentes individuales. Este análisis se realizó mediante el uso de cromatofolios de gel de sílice (sílica gel 60 GF254 Merck), de 5 x 10 cm y solventes de polaridad variable como fase móvil. Para el monitoreo de los compuestos, se utilizó una lámpara de luz ultravioleta de longitudes de onda de 254 nm y 365 nm. Para otra posterior visualización con un revelador químico, se secó el eluyente y se impregnó con una solución de sulfato cérico amoniacal y se calentó a 80 °C. Para niveles preparativos, se usaron cromatoplasmas con la misma fase estacionario indicada en los cromatofolios, pero con dimensiones de 20 × 20 cm y 1000 µm de espesor de la capa de gel de sílice.

6.3.2 Cromatografía en columna abierta (CC)

El extracto seco metanólico se sometió a fraccionamiento por medio de columna abierta, para lo cual se pesaron 5 g del extracto y se adsorbieron en gel de sílice (Kiesegel 60 Merk malla de 70-230, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm). Posteriormente, la muestra resultante se aplicó en una columna cromatográfica (CC) de 7 x 100 cm. Para el fraccionamiento, se utilizó como fase móvil un gradiente de solventes en orden progresivo de polaridad, usando diclorometano y metanol puros y mezclados en diferentes proporciones (ver Tabla 8). Las fracciones obtenidas se monitorearon mediante CCF, se concentraron mediante rotaevaporación y se agruparon según la similitud de su perfil cromatográfico y se almacenaron a temperatura ambiente para su posterior estudio químico.

6.3.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se realizó un análisis de la complejidad de los extractos de metanol. Se utilizó un equipo de la marca Waters (Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), integrado por una bomba cuaternaria de entrega automática de disolventes (fases móviles), modelo e2695 y un detector de arreglo de diodos (UV-Vis), modelo 2998. Se empleó una columna de fase reversa Zorbax XDB-C18 (4.6 x 150 mm con tamaño de poro de 5 μm) (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA). Los extractos se inyectaron en soluciones de 10 μL conteniendo 10 mg/mL, usando una fase móvil en gradiente de H_2O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1) a un flujo de 0.8 mL/min, con detección a $\lambda = 280$ nm. Se usó un panel de estándares fenólicos disponibles en el laboratorio, los que incluyeron ácido cafeico, rutina, esperetina, (+)-catequina, (-)-epicatequina y kaempferol.

6.3.4 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

Los análisis de los extractos de diclorometano de flores y hojas (BPJP1) y de tallos (BPJP2) se realizaron en el Laboratorio de Especiación Química del Aerosol Orgánico Atmosférico del Instituto de Ciencias de la Atmósfera y Cambio Climático de la Universidad Nacional Autónoma de México, con la colaboración del Candidato a Dr. Alejandro Núñez Vilchis. Estos se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases marca Agilent 7890A acoplado a un espectrómetro de masas marca Agilent modelo 5973N en modo de ionización electrónica con helio de ultra alta pureza como gas acarreador y cuadrupolo simple como analizador de masas. La separación cromatográfica se realizó en una columna DB-35MS de 60 m x 250 μm x 0.25 μm con una rampa de temperatura, con temperatura inicial de 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 min, luego un gradiente de temperatura de 50 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 110 $^{\circ}\text{C}$, de ahí hasta 303 $^{\circ}\text{C}$ a 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y finalmente, a 335 $^{\circ}\text{C}$ a 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Se inyectó 1 μL de cada muestra en modo Splitless. El módulo de inyección se mantuvo a 300 $^{\circ}\text{C}$. El flujo de helio se mantuvo constante a 1.5 mL/min. La línea de transferencia, fuente de electrones y

cuadropolo se fijaron a 300 °C, 230 °C y 150 °C respectivamente. El modo de análisis fue un SCAN completo y el intervalo de m/z monitoreado fue de 29 a 600.

6.3.5 Resonancia magnética nuclear

La elucidación de los compuestos purificados se realizó mediante el uso de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C . Los espectros que se obtuvieron fueron unidimensionales (^1H y ^{13}C), bidimensionales homonucleares (^1H - ^1H COSY) y heteronucleares (^1H - ^{13}C) en sus modalidades APT (Attached Proton Test) y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) en un equipo de resonancia magnética nuclear marca Brüker Avance III HD de 500 MHz. El registro de los espectros se realizó mediante colaboración con la Universidad de Guanajuato, donde se encuentra el Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Fisicoquímicas y Estructura Molecular (LACAPFEM) (UG-UAA-CONACyT No. 123732).

6.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó en el Laboratorio de Microbiología molecular de microorganismos de la Facultad de Química de la UAQ, usando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer. Los extractos que se sometieron a prueba contra las cepas seleccionadas se prepararon disolviendo 100 mg de extracto en 500 μL de metanol, solución de la cual muestras de 5, 10 y 15 μL se impregnaron en discos de papel filtro de 6 mm de diámetro previamente esterilizado y la mezcla se colocó dentro de una campana de flujo laminar cerca de un mechero Bünsen para que se evaporara el metanol. Las cepas previamente activadas se suspendieron a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, de la cual se tomaron 100 μL , que fueron esparcidos en medio sólido Müller-Hinton de manera uniforme. Se puso el cultivo en incubación por 24 horas y se midió el halo de inhibición

7. RESULTADOS

7.1 Rendimientos de extractos

De los 92.9 g de polvo de hojas y flores y los 102.9 g de tallos, se obtuvieron respectivamente 2.8 g (3% de material vegetal seco) y 0.9 g (0.87%) de extractos de diclorometano. De la maceración de flores y hojas con metanol, se obtuvieron 8.3 g (8.93% de extracto seco), mientras que los tallos proporcionaron 1.1 g (1%) con el mismo disolvente.

7.2 Evaluación antimicrobiana de los extractos

La **Figura 3** muestra el resultado obtenido durante la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de flores y hojas sobre la cepa de *B. cereus* con una alícuota de 5 μ L tomada de una solución preparada con 100 mg de extracto metanólico seco disueltos en 500 μ L de metanol.



Figura 3. Efecto del extracto metanólico de hojas y flores sobre *B. cereus*.

Como se puede observar, el extracto metanólico no presentó actividad contra esta bacteria, ya que no se observó ningún halo de inhibición.

Las pruebas de actividad antimicrobiana del extracto metanólico de flores y hojas, así como del extracto de diclorometano sobre *K. kowanii* y *E. coli* no presentaron ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las cepas.

Se realizó también el experimento con el extracto diclorometánico, colocando discos con 10 μL (A) y 15 μL (B) tomados igualmente de una solución preparada a la misma concentración indicada para el extracto metanólico. Como se puede observar en la **Figura 4** (aplicación 9), el extracto de flores y hojas (BPDFH) produjo un nítido halo de inhibición sobre la cepa de *B. cereus*. La **Tabla 4** resume los diámetros de los halos de inhibición obtenidos.

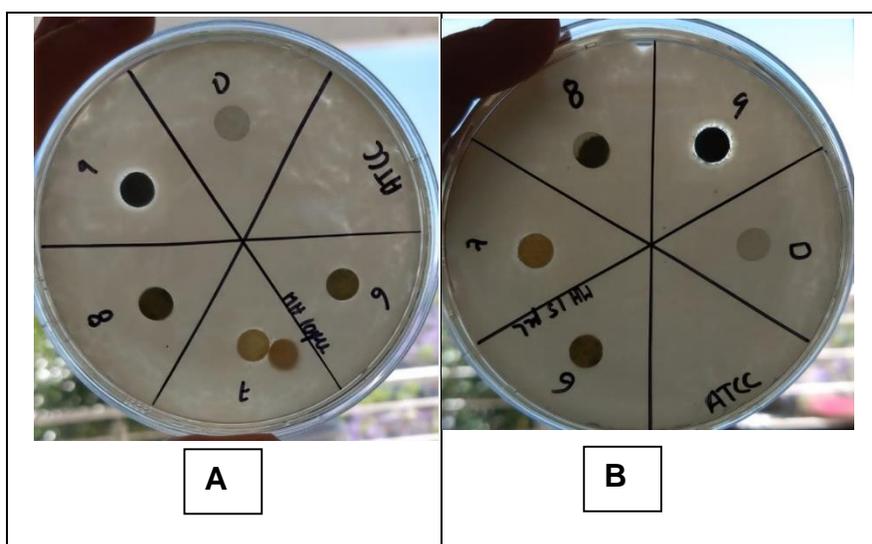


Figura 4. Efecto antimicrobiano de BPMT (6), BPMFH (7) y BPDFH (9) sobre *B. cereus*

Tabla 4. Halos de inhibición de BPDFH.

Concentración preparada	Cantidad aplicada (μL)	Halo (mm)
100 mg/500 μL	2 mg/10 μL	3
100 mg/500 μL	3 mg/15 μL	4

Se repitió el experimento anteriormente descrito por duplicado con las 2 diferentes concentraciones. En esta ocasión, en el cultivo se colocaron dos discos por muestra,

uno preparado la víspera [10 μ L (9a) y 15 μ L (9B)] y otro (910, 915) preparado el mismo día que se preparó el cultivo, con el objetivo de ver si se perdía el efecto por preparar el disco con anterioridad (**Figura 5 A**).

Se preparó otro cultivo en el que se colocaron 100 μ g/mL de ampicilina y el extracto BPDFH al medio Müller-Hinton con el fin de observar el sinergismo entre el antibiótico y el extracto BPDFH. Como se puede observar en la **Figura 5 B** (color gris claro), se notó un incremento en los halos de inhibición (**Tabla 5**), pero por la falta de uniformidad en el halo del medio con ampicilina se procedió a repetir este experimento.

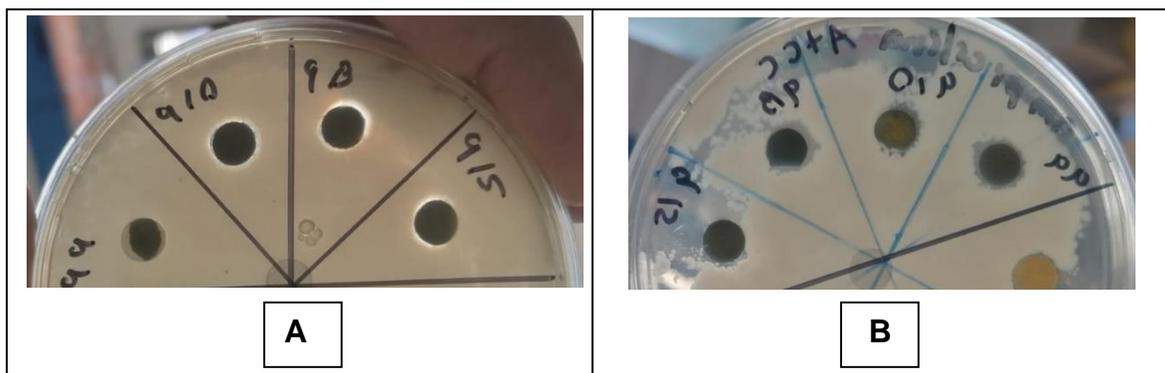


Figura 5. Comparación de la actividad de BPDFH sobre *B. cereus* en el medio Müller-Hinton (**A**) y en este adicionado con ampicilina (**B**).

Tabla 5. Halos de inhibición producidos por el BPDFH y este combinado con ampicilina.

BPDFH	Halo (mm) (A)	Extracto de BPDFH con 100 μ g de ampicilina (B)	Halo (mm)
9a	–	9a	2
910	7	910	3
9B	8	9B	3
910	7	915	3

Para explorar el efecto del aumento de la concentración de la ampicilina combinada con el extracto sobre esta bacteria, se realizaron pruebas preliminares siguiendo la metodología descrita, con la diferencia de que se aumentó la concentración del antibiótico en el medio Müller-Hinton a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**A**) y 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**B**) (**Figura 6**). Las muestras 9a, 9b y 9c indican respectivamente 5, 10 y 15 μL de la solución del extracto BPDFH (**Figura 6**). Los discos señalados con líneas y un círculo en color amarillo en las dos placas son los extractos pertenecientes de la planta *B. perfoliata* y los demás son de otra especie vegetal (fuera del tema de esta tesis), que fueron aplicados en las misma placa, solo para su optimización. En el centro del medio de cultivo, se aplicó diclorometano, el cual fue utilizado como control negativo. Con la concentración de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina mezclada con el extracto, se puede observar la tendencia de inhibición (**Figura 6A**). Sin embargo, con la concentración de 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la ausencia de crecimiento no se pudo atribuir a la acción del extracto o a la de la ampicilina (**Figura 6B**), por lo que se repitieron los experimentos con la ampicilina sin extracto para tener un control positivo.

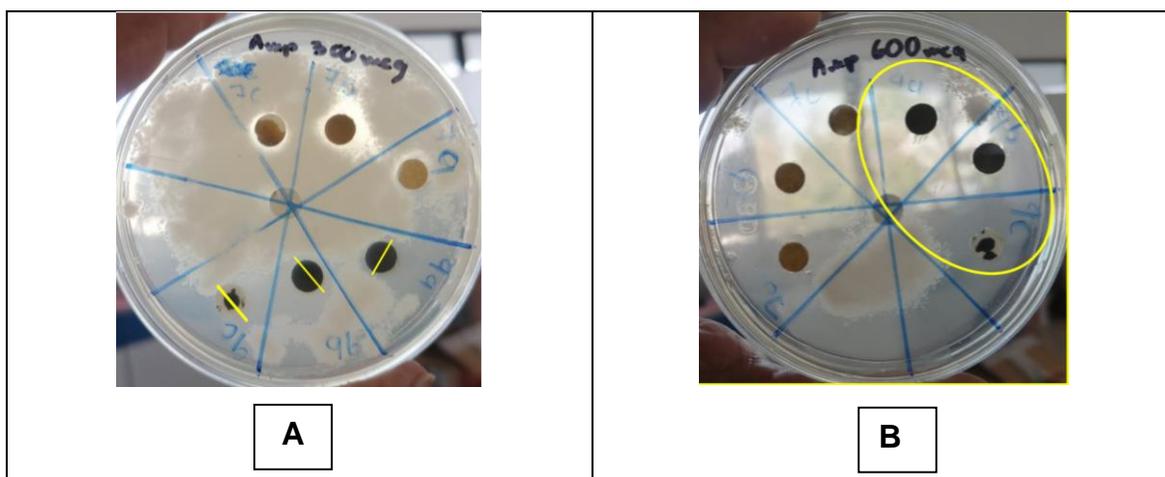


Figura 6. Pruebas preliminares de la actividad antibacteriana del extracto diclorometánico con 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**A**) y 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**B**) de ampicilina sobre *B. cereus*.

Para ese propósito, se aplicaron concentraciones escalonadas de ampicilina adicionada en el medio Müller-Hinton desde los 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta los 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la **Figura 7**, se presenta la comparación de los efectos de los cultivos control (con

ampicilina sin BPDFH) y aquellos con la combinación de ampicilina y BPDFH. En las placas donde se aplicaron ampicilina y extracto (columna derecha de la Figura 7), las muestras de *B. perfoliata* fueron sólo aplicadas del lado izquierda de la placa. En la **Figura 7 (A1)**, se observa el resultado obtenido para el medio adicionado con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina sin el extracto donde hubo un crecimiento uniforme. En la **Figura 7 (A2)**, se muestra el cultivo con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina y las diferentes concentraciones de BPDFH, donde se pudo apreciar el halo de inhibición alrededor de los discos con el extracto. Con las siguientes concentraciones de antibiótico, se observó la misma tendencia.

Ampicilina	Ampicilina + extracto	Halos de inhibición (mm)	
 <p>(A1) 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$</p>	 <p>(A2)</p>	9A (5 μL)	5
		9B (10 μL)	5
		9C (15 μL)	4
 <p>(B1) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$</p>	 <p>(B2)</p>	9A (5 μL)	3
		9B(10 μL)	5
		9C(15 μL)	No se absorbió la muestra en el disco de papel filtro
 <p>(C1) 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$</p>	 <p>(C2)</p>	9A (5 μL)	9
		9B (10 μL)	8
		No se pudo aplicar la	

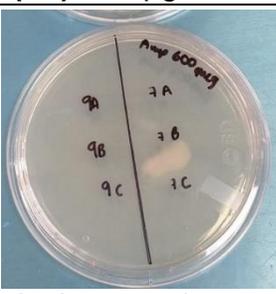
		muestra de 15 μ L por su consistencia espesa						
		<table border="1"> <tr> <td>9A (5 μL)</td> <td>7</td> </tr> <tr> <td>9B (10 μL)</td> <td>9</td> </tr> <tr> <td>9C (15 μL)</td> <td>9</td> </tr> </table>	9A (5 μ L)	7	9B (10 μ L)	9	9C (15 μ L)	9
9A (5 μ L)	7							
9B (10 μ L)	9							
9C (15 μ L)	9							
		No se pudo aplicar la muestra con 15 μ L.						
		No se distinguen los efectos de la ampicilina sola y de esta combinada con el extracto.						

Figura 7. Evaluación del efecto del extracto en combinación con ampicilina en diferentes concentraciones sobre *B. cereus*.

Continuando con la evaluación antimicrobiana de los extractos, se realizó una prueba preliminar con ambos extractos, el de diclorometano y el metanólico, sobre la cepa de *S. aureus* ATCC 85175. Las cantidades de la solución de extracto fueron elevadas a 15, 25 y 50 μ L en cada disco. La **Figura 8** presenta los discos con el extracto diclorometánico (1, 2, 3) y el metanólico (4, 5, 6). Se obtuvo un halo de 9 mm con el disco 3, correspondiente a 50 μ L de extracto de diclorometano. En los

discos 5 y 6, se presentó un área clara pero poco uniforme, que no fue posible atribuir al efecto del extracto o por mala ejecución de la técnica.

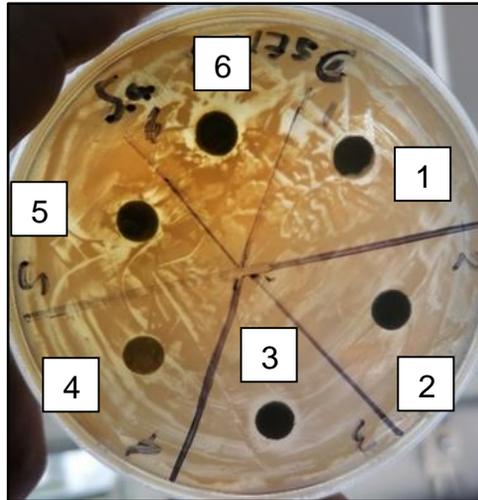


Figura 8. Efectos de los extractos diclorometánicos (1, 2, 3) y metanólicos (4, 5, 6) sobre *S. aureus* a 15 μ L (extractos 1 y 4), 25 μ L (2 y 5) y 50 μ L (3 y 6).

Como la cepa *S. aureus* ATCC 85175 no era resistente a la ampicilina, se llevaron a cabo pruebas con otra cepa resistente a betalactámicos (*S. aureus* ATCC 29213). En la **Figura 9**, se puede apreciar que la prueba realizada con 50 μ L en disco dio una inhibición de 8 mm para el caso del extracto de diclorometano (a) y una de 7.5 mm para el extracto metanólico (b).

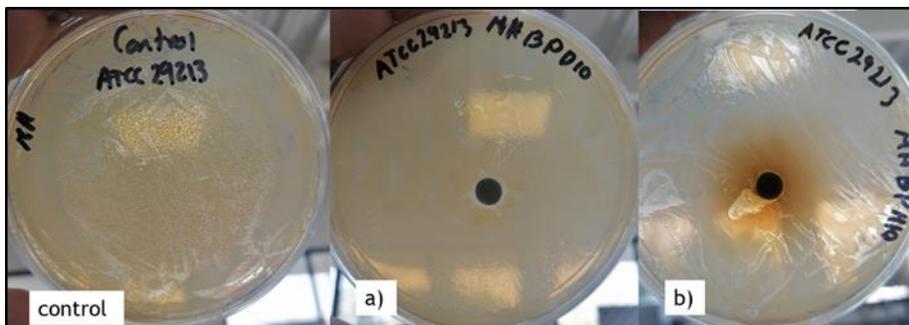


Figura 9. Efectos de los extractos orgánicos sobre *S. aureus* ATCC 29213.

En las pruebas de la actividad sobre *S. aureus* ATCC 29213 de los extractos en combinación con ampicilina, con 50 μ L de extracto en disco y 100 μ g/mL de

ampicilina en medio Müller-Hinton, el crecimiento de la cepa se vio afectado (**Figura 10**), por lo que en el caso del extracto metanólico (b) no se pudo determinar un halo de inhibición y como se logra apreciar en la **Figura 10**, en el caso del disco con extracto de diclorometano (a) se obtuvo un halo de 9 mm.

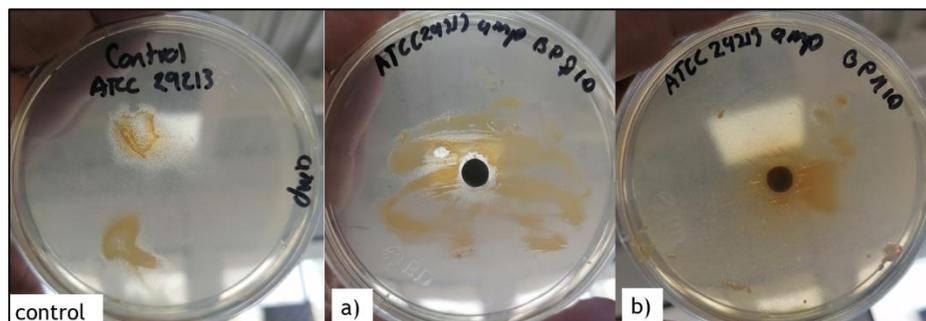


Figura 10. Pruebas con ampicilina (control) y extractos en combinación con ampicilina [a) y b)] sobre *S. aureus* ATCC 29213.

7.3 Estudio químico de los extractos

7.3.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (CG-EM)

Debido a la poca disponibilidad de muestra del extracto, se realizó un análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, aprovechando la naturaleza volátil de los compuestos que se pueden obtener por maceración en diclorometano.

En el cromatograma obtenido del extracto diclorometánico de flores y hojas (clave BPJP1) (**Figura 11**), se puede observar que se obtuvieron 152 picos. De estos, fueron seleccionados los más abundantes para realizar su identificación mediante el análisis de los espectros de masas. La **Figura 12** ejemplifica el EM del pico con el tiempo de retención (Tr) de 9.198 min. Los espectros de los demás picos mayoritarios (**Figuras A1 a A12**) se recogen en el ANEXO. Los compuestos que se lograron identificar se muestran en la **Tabla 5** y sus estructuras, en la **Figura 13**.

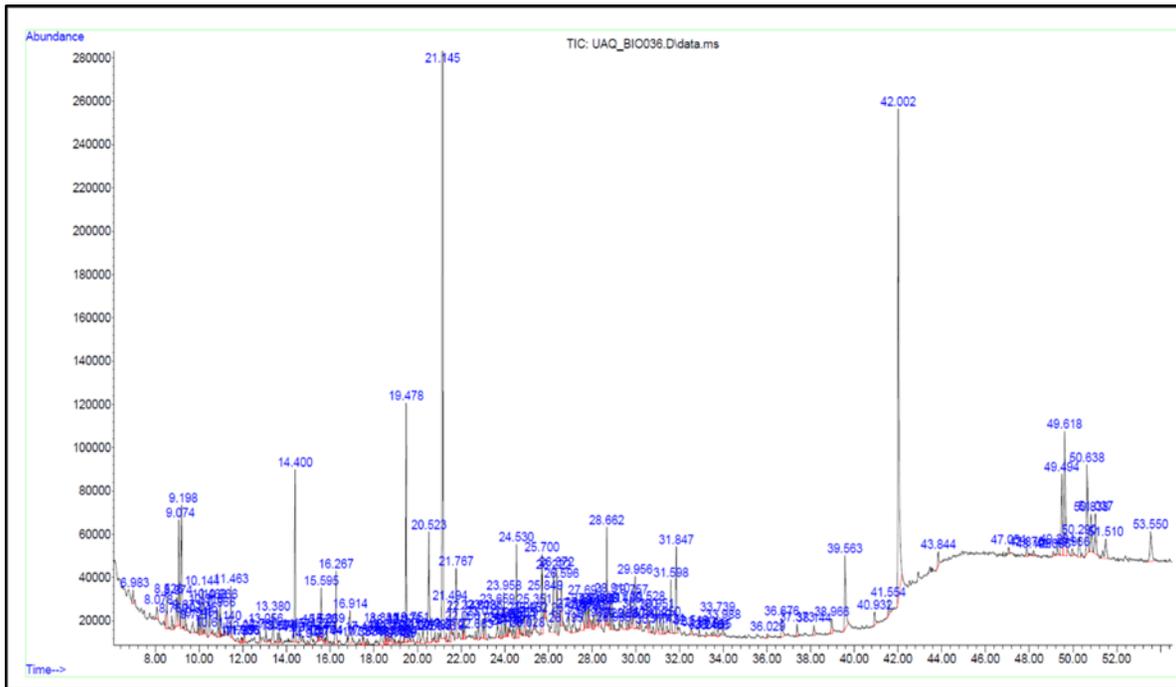


Figura 11. Cromatograma de gases de la muestra BPJP1.

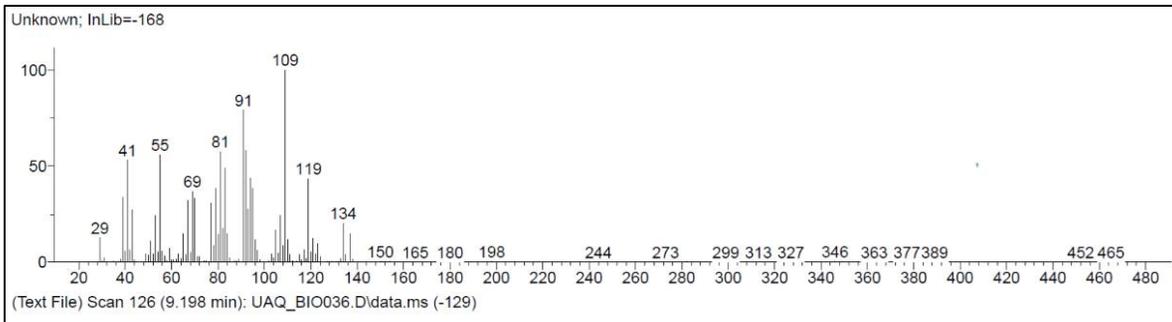


Figura 12. Espectro de masas del pico con tiempo de retención (Tr) = 9.198 min.

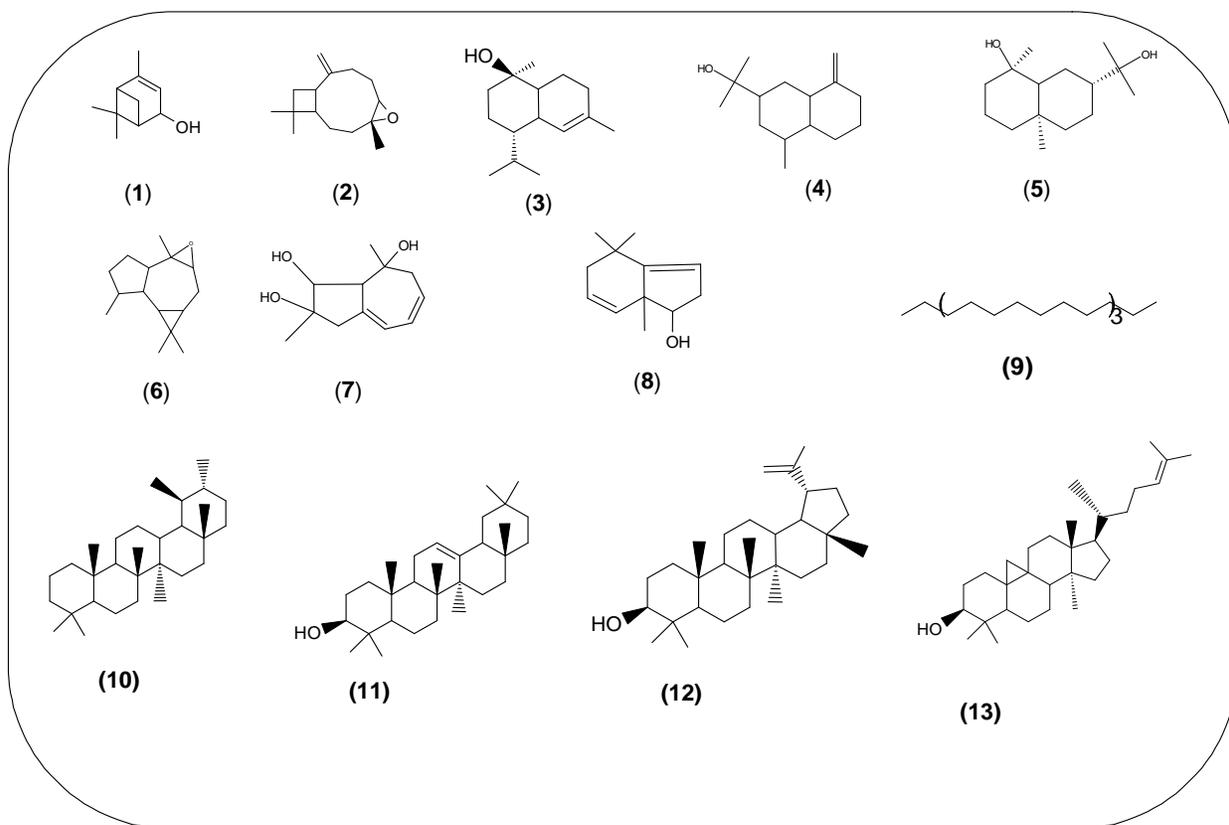


Figura 13. Estructuras de los compuestos identificados en la muestra BPJP1 mediante análisis por CG-EM.

Tabla 6. Compuestos identificados en la muestra BPJP1 mediante análisis por CG-EM.

Compuesto	TR ^a (minutos)	Fórmula molecular	Masa esperada
Verbenol (1)	9.198	C ₁₀ H ₁₆ O	152.24
Óxido de carofileno (2)	19.478	C ₁₅ H ₂₄ O	220.36
Cadinol (3)	20.523	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37
β-Eudesmol (4)	21.145	C ₁₅ H ₂₆ O	222.19
Proximadiol (5)	25.700	C ₁₅ H ₂₈ O ₂	240.21
Epóxido de Isoaromadendreno (6)	26.22	C ₁₅ H ₂₄ O	220.18
1,1,4,6-tetrametil perhidrociclopropa[e]azulen- 4,5,6-triol (7)	29.98	C ₁₅ H ₂₆ O ₃	254.19

1,4,4,7a-Trimetil-2,4,5,6,7,7a-hexahidro-1H-inden-1-ol (8)	31.85	C ₁₂ H ₂₀ O	180.15
Octacosano (9)	39.565	C ₂₈ H ₅₆	394.00
Ursano (10)	49.494	C ₃₀ H ₅₂	412.75
β-amirina (11)	49.618	C ₃₀ H ₅₀ O	426.73
Lupeol (12)	50.638	C ₃₀ H ₅₀ O	426.73
Cicloartenol (13)	53.55	C ₃₀ H ₅₀ O	426.73

^aTiempo de retención.

Por otra parte, en la **Figura 14** se muestra el cromatograma del extracto diclorometánico de tallos (clave BPJP2), donde se detectaron 117 picos. Nuevamente, se seleccionaron los más abundantes para su identificación por medio del análisis de sus espectros de masa. Los espectros de masas de los picos con Tr = 19.47, 20.52, 21.145, 39.56, 50.63 y 53.55 min coinciden con los indicados en la muestra BPJP1. En la **Figura 15**, se ejemplifica uno de los espectros de masas obtenidos y en la **Figura 16** y **Tabla 7**, se muestran respectivamente las estructuras de los compuestos identificados y sus respectivas estructuras. Los demás espectros de masas de la muestra BPJP2 se encuentran en el apartado ANEXO (**Figura B1-B4**).

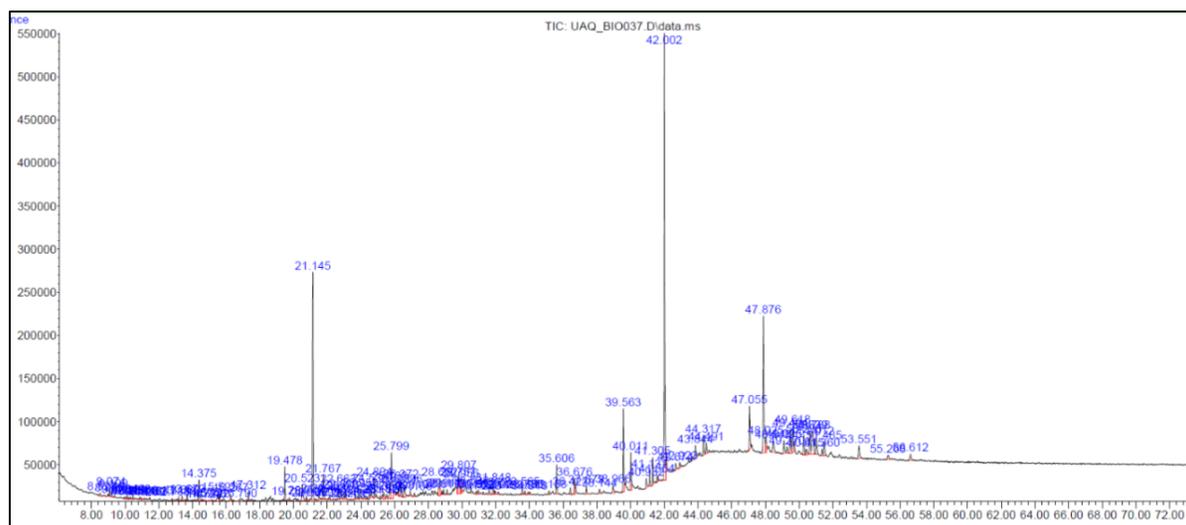


Figura 14. Cromatograma de gases del extracto BPJP2.

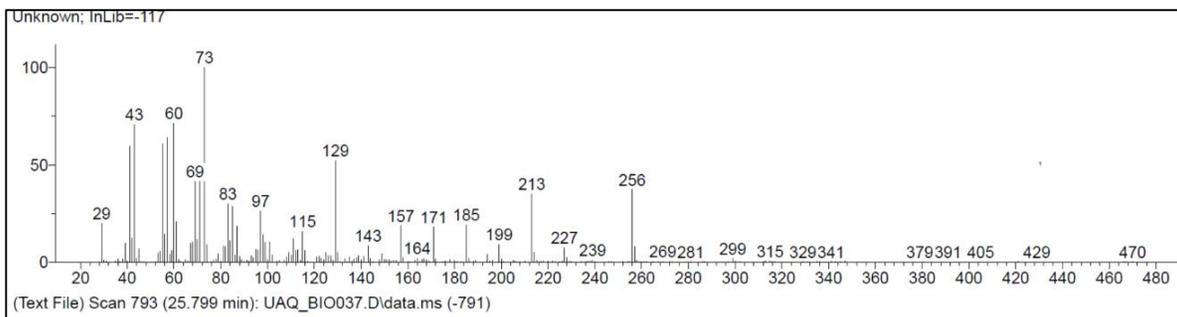


Figura 15. Espectro de masas del pico con Tr = 25.799 min.

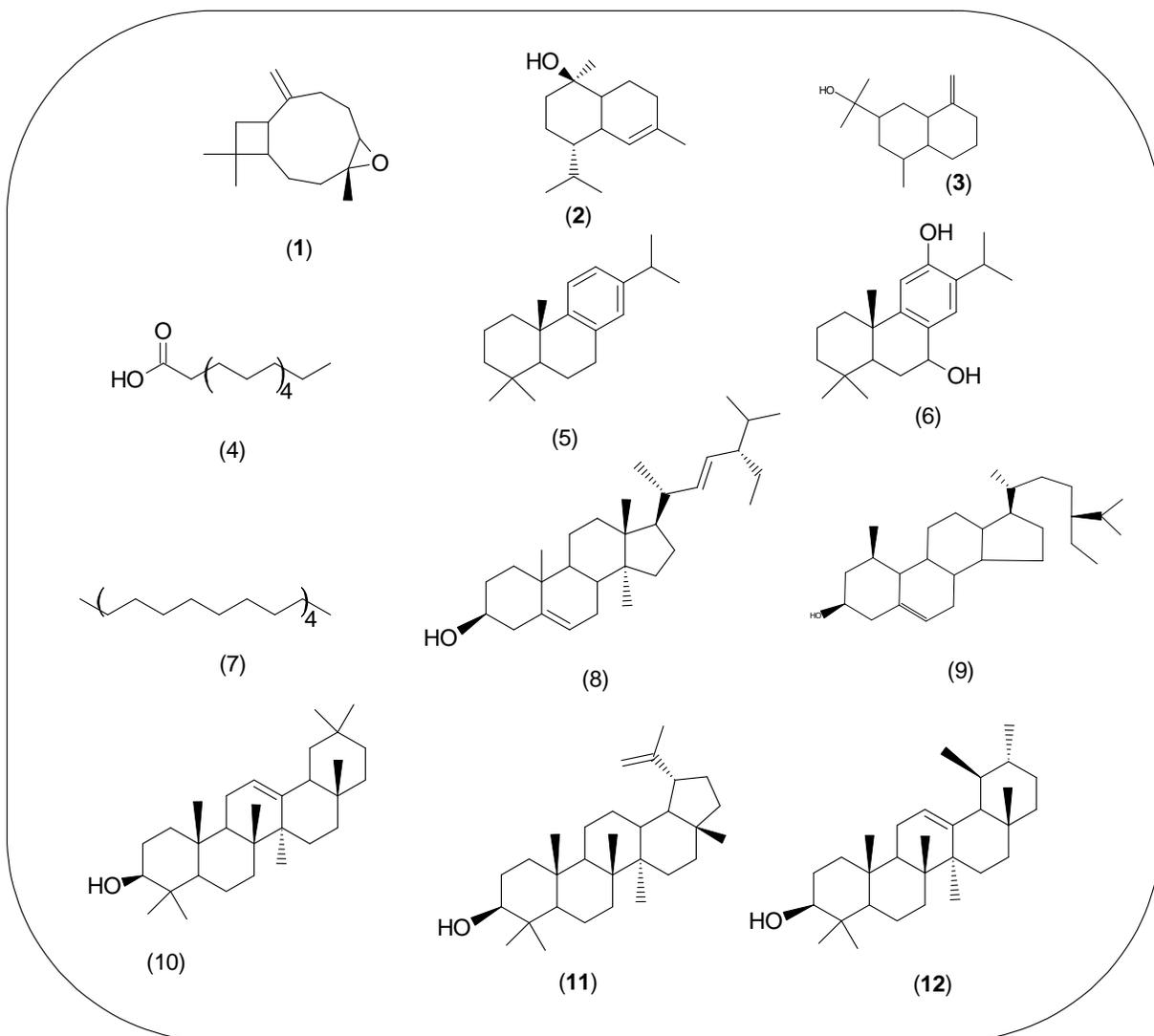


Figura 16. Compuestos encontrados en la muestra BPJP2 mediante análisis por CG-EM.

Tabla 7. Compuestos identificados en la muestra BPJP1 mediante análisis por CG-EM.

Compuesto	TR ^a (minutos)	Fórmula molecular	Masa esperada
Óxido de carofileno (1)	19.478	C ₁₅ H ₂₄ O	220.36
Cadinol (2)	20.523	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37
β-Eudesmol (3)	21.145	C ₁₅ H ₂₆ O	222.19
Ácido palmítico (4)	25.799	C ₁₆ H ₃₂ O	256.40

Abietatetraeno (5)	29.807	C ₂₀ H ₃₀	270.46
Ferruginol (6)	35.606	C ₂₀ H ₃₀ O	286.46
Octacosano (7)	39.565	C ₂₈ H ₅₆	394.00
Estigmasterol (8)	47.053	C ₂₉ H ₄₈ O	412.79
γ-sitosterol (9)	47.876	C ₂₉ H ₅₀ O	414.38
β-amirina (10)	49.618	C ₃₀ H ₅₀ O	426.73
Lupeol (11)	50.638	C ₃₀ H ₅₀ O	426.73
α-amirina (12)	53.550	C ₃₀ H ₅₀ O	426.73

^aTiempo de retención.

7.3.2 Análisis de los extractos mediante HPLC-UV

Los extractos metanólicos de hojas y flores y de tallos se analizaron de manera preliminar mediante HPLC-UV (**Figuras 17 y 18** respectivamente), comparando sus perfiles con estándares fenólicos con los que se cuentan en el laboratorio (**Figura 19 y 20**). Al no coincidir con ninguno de estos, se procedió a procesar el extracto de mayor rendimiento, el metanólico de flores y hojas (BPMFH), en una columna cromatografía abierta, con la finalidad de separar sus compuestos.

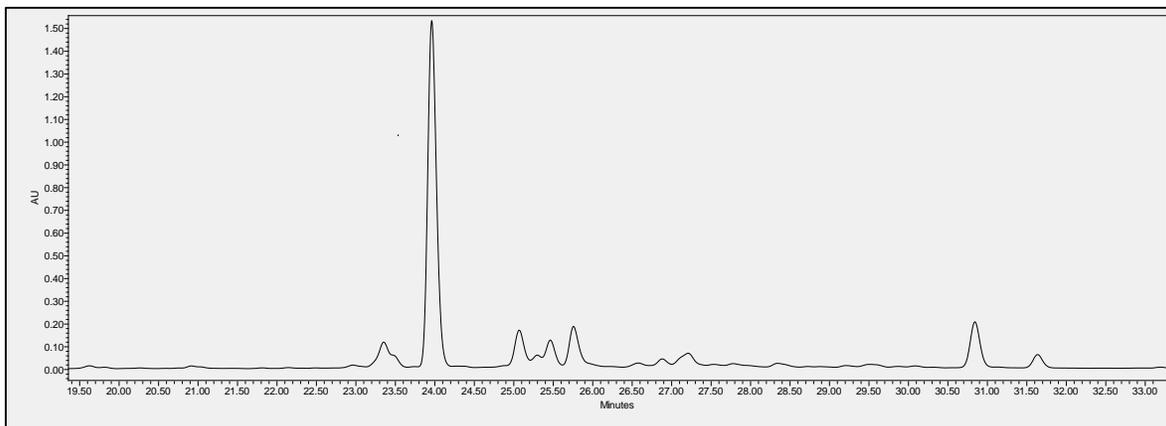


Figura 17. Cromatograma HPLC del extracto metanólico de flores y hojas.

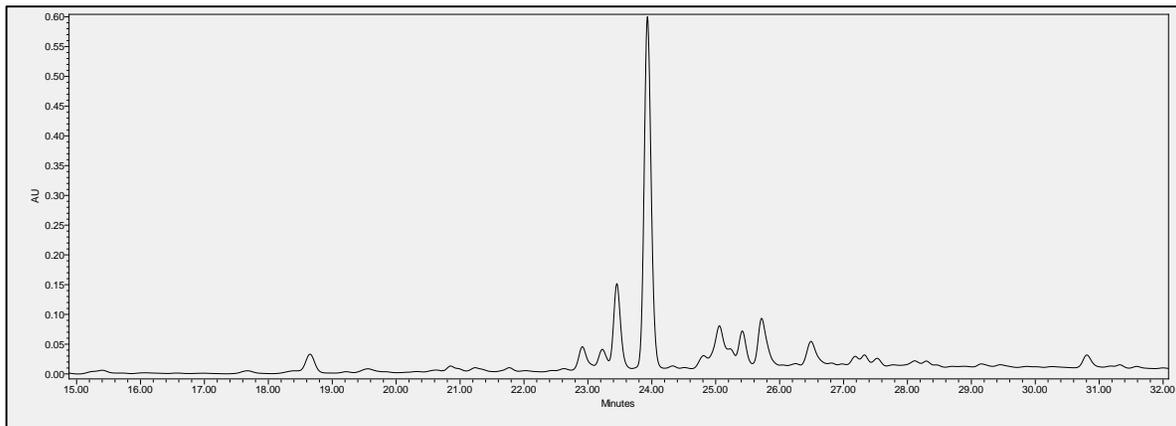


Figura 18. Cromatograma HPLC del extracto metanólico de tallos.

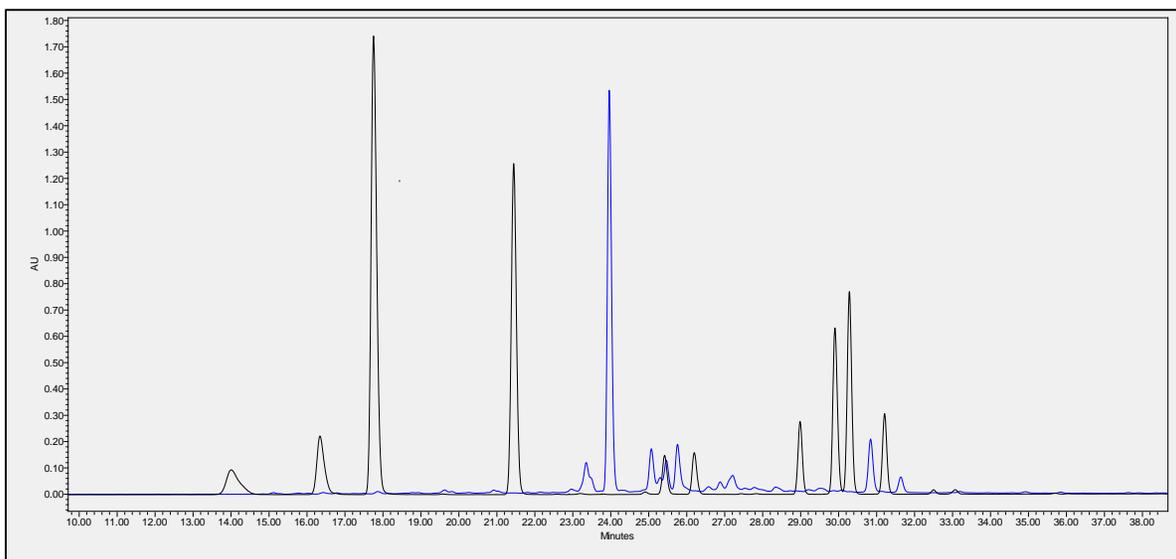


Figura 19. Comparación de los cromatogramas HPLC del extracto metanólico de flores y hojas (azul) y de los estándares fenólicos (negro).

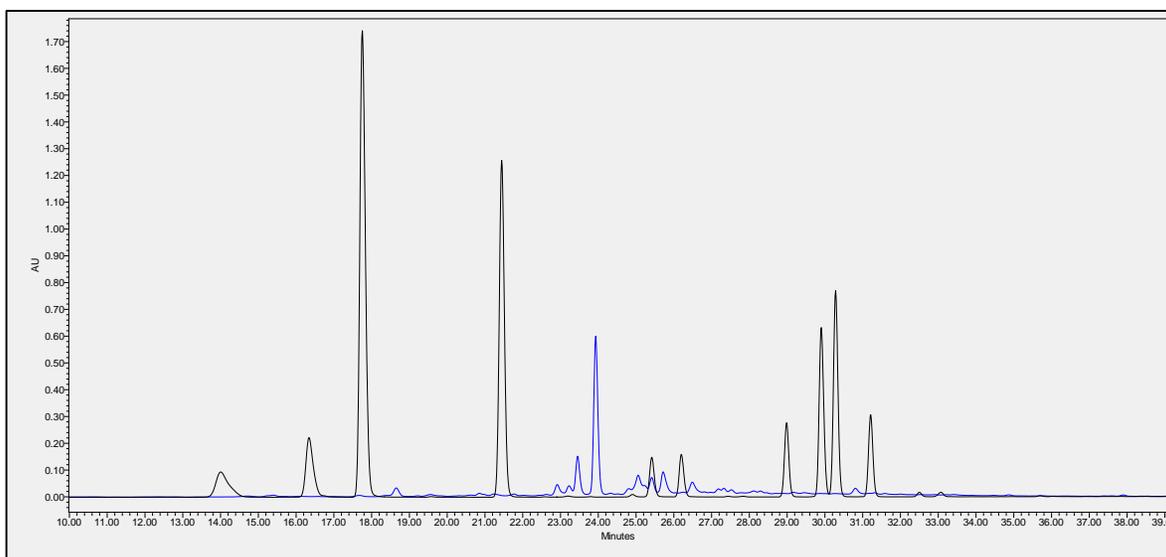


Figura 20. Comparación de los cromatogramas HPLC del extracto metanólico de tallos (azul) y de los estándares fenólicos (negro).

7.3.3 Fraccionamiento del extracto metanólico

El fraccionamiento del extracto metanólico de flores y hojas se realizó montando una columna cromatográfica abierta, la cual se eluyó con un gradiente de polaridad creciente formado por hexano, CH_2Cl_2 y metanol, colectándose 490 fracciones en total, las cuales fueron agrupadas en 15 fracciones según su similitud por cromatografía en capa fina. En la **tabla 8**, se muestran las fases móviles usadas, las fracciones obtenidas con dicha fase y las fracciones agrupadas.

Tabla 8. Fases móviles, fracciones y sus rendimientos.

Fase móvil	Proporción	Fracciones colectadas	Fracciones agrupadas	Masa (g)	Clave
Hexano	100	1-20	0-42	0.0625	
Hexano – CH_2Cl_2	80:20	21-36	43-70	0.1006	
	70:30	37-46	71-72	0.1658	
	50:50	47-80	73-77	0.4864	
	30:70	81-138	78-120	0.1082	
CH_2Cl_2	100	139-158	121-136	0.001	
CH_2Cl_2 – MeOH	90:10	159-208	137-182	0.0025	
	80:20	209-239	244-250	0.0431	F250 (Clave: EGB-BP250)

	70:30	240-260	183-320	0.8524	
	50:50	261-308	321-374	2.8124	F374a (Clave: EBG-Ed-F3249)
	30:70	309-420	375-385	0.1301	
MeOH	100	421-490	385-404	0.0243	
			405-419	0.1726	
			420-453	0.5185	
			454-490	0.0973	

De las fracciones 244-250 (F250), precipitó un sólido de color blanco (Clave: EGB-BP250), insoluble en CH₂Cl₂ y en metanol, pero sí soluble en piridina. De la fracción 321-374, al suspenderla en metanol, se obtuvo igualmente un precipitado blanco (F374a, clave: EBG-Ed-F3249). Dicho precipitado se sometió a lavado con las tres fases móviles utilizadas para la elución de la columna (**Tabla 8**). Finalmente, dicho precipitado fue soluble en piridina. Los 2 precipitados se llevaron a sequedad para su análisis mediante RMN.

Por otra parte, al llevar a sequedad las fracciones 420-453 (F453), se obtuvo un polvo soluble en metanol, el cual fue analizado mediante CCF, dando como resultado tres componentes en el sistema MeOH-CH₂Cl₂ (7:3) (**Figura 21 A**), dos de los cuales fueron posteriormente separados como polvos mediante CCF preparativa (**Figura 21 B**) y etiquetados como F454a (35 mg) y F454b (90 mg). Sus espectros de RMN se encuentran en proceso de registro.

7.3.4 Resonancia magnética nuclear (RMN) de la muestra EGB-BP250

El análisis de los espectros de RMN mono y bidimensionales de la muestra permitió la elucidación estructural del compuesto, como se describe más adelante en Discusión (**Punto 8.2.2**). En la **Tabla 9**, se reportan sus constantes espectroscópicas deducidas, las cuales coincidieron con las descritas en la literatura para el catalpol (Kahraman y col., 2018), cuya estructura se ilustra en la **Figura 23**.

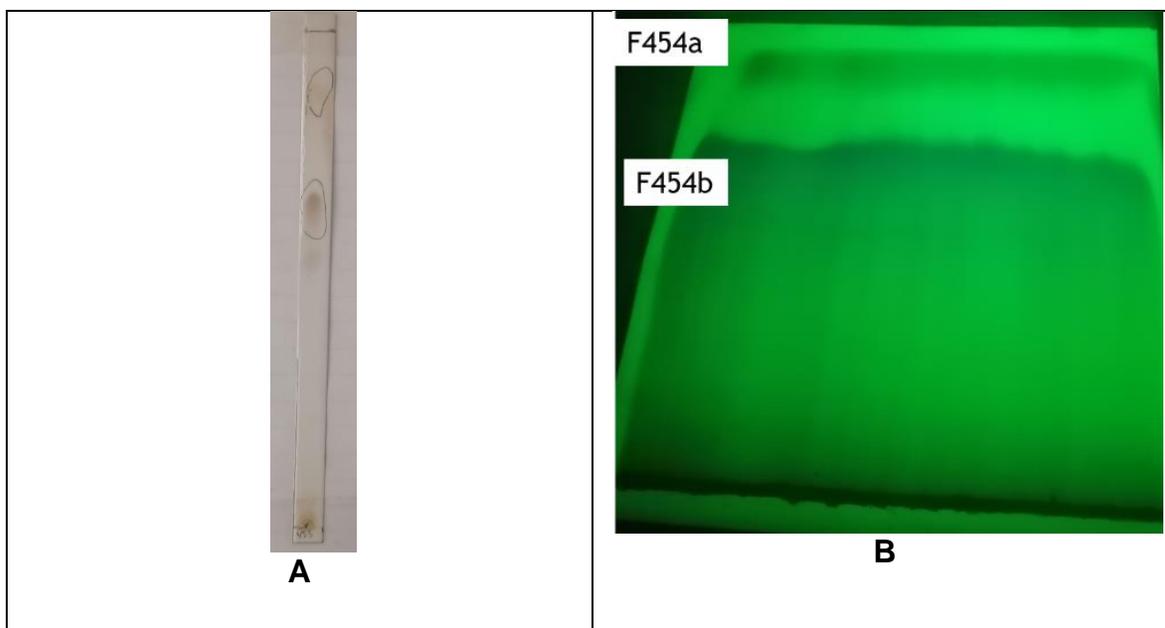


Figura 21. CCF analítica (A) y preparativa (B) de la fracción F453.

Tabla 9. Desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento del catalpol (δ C₅D₅N?).

Catalpol		
Posición	δ_C , tipo	δ_H (J en Hz)
1	95.1, CH	5.54 d (9.6)
3	141.0, CH	6.46 dd (6.0, 2.0)
4	104.1, CH	5.32 dd (5.0, 6.0)
5	39.1, CH	2.82 m
6	79.1, CH	4.16 dd (8.0, 11.0)
7	62.2, CH	4.22 m
8	66.1, CH	–
9	43.6, C	2.89 dd (7.5, 9.5)
10	60.7 CH ₂	4.56 d (13.1)
		4.46 d (13.1)
Azúcar		
1'	100.3, CH	5.56 d (7.9)
2'	75.0, CH	4.23 dd (9.5, 9.0)
3'	78.5, CH	4.16 dd (9.0, 9.0)
4'	71.6, CH	4.31 dd (9.0, 9.0)
5'	78.9, CH	4.15 dd (9.0, 9.0)
6'	62.8, CH ₂	4.5 d (13.0)

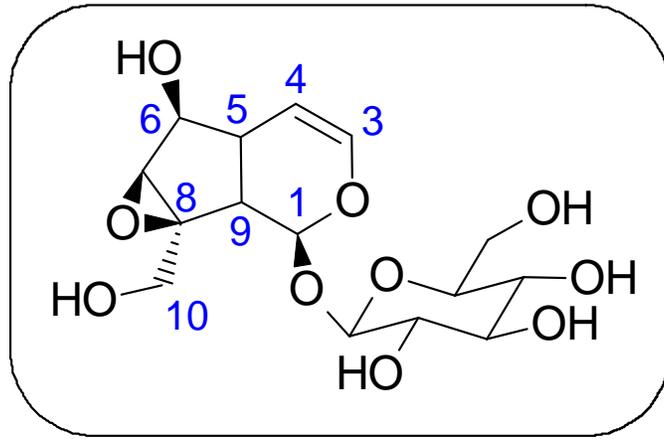


Figura 22. Estructura del catalpol.

8. DISCUSIÓN

8.1 Estudio farmacológico

En un inicio, se consideró explorar la actividad de los extractos sobre varias bacterias causantes de infecciones, las Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y dos Gram negativas: *Kosakonia kowanii* y *Escherichia coli*. Sin embargo, a la primera concentración evaluada (5 μ L de extracto), ninguno de los extractos (diclorometánico o metanólico) tuvo efecto sobre esas dos últimas bacterias, por lo cual se descartaron durante el desarrollo del proyecto. En cambio, el extracto diclorometánico de flores y hojas mostró cierta inhibición del crecimiento de *B. cereus* (**Figura 4: A9 y B9**) y *S. aureus* (**Figura 8**). A pesar de la inactividad de los extractos metanólicos (**Figura 3**), se decidió explorar su efecto a mayores concentraciones sobre estas dos bacterias. Aun así, ninguno de los dos mostró efecto sobre *B. cereus* (**Figura 4: A6, A7, B6 y B7**), pero sí sobre *S. aureus* (**Figura 8**). Con estos resultados, se llegó a la conclusión de que el efecto antimicrobiano de esos extractos solo se presenta en bacterias Gram positivas. Para la cepa *B. cereus* ATCC 10876 resistente a betalactámicos, se decidió adicionar ampicilina al medio de cultivo para ver el efecto de esta en combinación con el BPDFH sobre la bacteria. El crecimiento irregular del microorganismo que se observó se atribuyó en un inicio a un mal sembrado. Sin embargo, al realizar repeticiones, se observó la misma inhibición irregular de la cepa en presencia de ampicilina con los extractos (**Figura 5 B**). El experimento se procedió a repetir con concentraciones crecientes de ampicilina. De esta forma, con la concentración de 100 μ g/mL de ampicilina, la bacteria creció sin verse afectada [**Figura 7 (A1)**] y en el cultivo donde se adicionó el antibiótico a los discos con extracto, se observaron áreas mayores de inhibición, aunque irregulares, alrededor de los discos, comparadas con las producidas en los impregnados solo con el extracto diclorometánico de flores y hojas. Al duplicar la concentración a 200 μ g/mL de ampicilina, *B. cereus* creció nuevamente por completo en el medio de cultivo [**Figura 7 (B1)**], mientras que los halos de inhibición producidos por la combinación de esta concentración de ampicilina con el extracto

diclorometánico permanecieron similares a los obtenidos con las combinaciones anteriores. Sin embargo, con la concentración de 300 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina, se empieza a observar un menor crecimiento de *B. cereus* [**Figura 7 (C1)**], mientras que en el medio de cultivo con extracto combinado con el antibiótico, se pueden notar mayores halos de inhibición [**Figura 7 (C2)**]. Con respecto al cultivo con 400 $\mu\text{g/mL}$ del antibiótico, la concentración elevada afecta el crecimiento de la bacteria notablemente [**Figura 7 (D1)**], aunque dicha inhibición aumenta también con el antibiótico mezclado con el extracto BPDFH (**7D2**). Además, al elevar la concentración de ampicilina a 500 $\mu\text{g/mL}$ [**Figura 7 (E2)**], se observa la misma tendencia que con 400 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina sola. En el medio de cultivo con 600 $\mu\text{g/mL}$ [**Figura 7 (F2)**], no fue distinguible el efecto en los discos impregnados con la mezcla del extracto y el antibiótico y el producido por este último solo. Es importante mencionar que, en todos los casos, los halos de inhibición fueron creciendo a medida que aumentaban las concentraciones del extracto. Se aprecia además cómo el aumento en la concentración de ampicilina aumenta el área de inhibición, aunque no de una manera uniforme.

Siguiendo con la evaluación con bacterias Gram positivas, se escogió primero la cepa de *S. aureus* ATCC 85175 no resistente. En este caso, solo se evaluaron los extractos de flores y hojas con los dos solventes utilizados (**Figura 8**). En ambos casos, se observó actividad. Por lo tanto, el extracto metanólico probó que contiene compuestos que inhiben el crecimiento de *S. aureus*. Sin embargo, ambos extractos en combinación con ampicilina sobre la cepa de *S. aureus* ATCC 29213 resistente a los betalactámicos produjeron mayor inhibición, en comparación con la mostrada por el extracto por sí solo (**Figura 10**). En contraste, en un estudio anterior al presente, el extracto de las partes aéreas de *Buddleja perfoliata* preparado con cloroformo, cuyo perfil químico puede ser muy similar al de un diclorometánico, no produjo ningún efecto sobre la cepa de *S. aureus* sensible a antibióticos (*S. aureus* ATCC 85175) y tampoco sobre la cepa MRSA (Cuevas-Cianca y col., 2022). Otro resultado interesante es que las cepas resistentes se vieron más afectadas por la

combinación del extracto diclorometánico y el antibiótico. En cambio, aunque no se han encontrado referencias bibliográficas de actividad antimicrobiana alguna de *B. perfoliata* por sí sola sobre *Bacillus cereus*, en los resultados del presente trabajo, el extracto presentó actividad inhibitoria y esta se vio incrementada en presencia del antibiótico ampicilina. Los extractos de tallos de ambos solventes no mostraron efecto sobre ninguna cepa probada. Castillo-Juárez y col. (2009) reportaron una moderada actividad de los extractos acuoso y metanólico de las partes aéreas de *B. perfoliata* sobre el crecimiento de *H. pylori*. En el presente trabajo, no se observó actividad antibacteriana del extracto metanólico sobre la cepa *B. cereus* ATCC 10876. En las pruebas contra las cepas de *S. aureus* ATCC 29213 y ATCC 85175, la actividad no fue tan evidente en comparación con el extracto de diclorometano, ya que esta solo se observó con alta concentración (50 μ L equivalentes a 1 mg de extracto). Nuevamente, la combinación de este con la ampicilina mejoró la actividad.

8.2 Estudios químicos

8.2.1 Análisis de los extractos diclorometánicos mediante CG-EM

En los extractos obtenidos con diclorometano, tanto de flores y hojas como de tallos, se identificaron 25 compuestos mediante CG-EM, 6 de los cuales (óxido de cariofileno, cadinol, β -amirina, lupeol, β -eudesmol y el hidrocarburo octacosano) fueron comunes a ambos extractos. En el extracto de flores y hojas, el compuesto más abundante fue el β -eudesmol, con el tiempo de retención (Tr) de 21.145 min, compuesto ya identificado en el aceite esencial (Juárez y col., 2016) y en el extracto de cloroformo de *B. perfoliata* (Cuevas-Cianca y col., 2022) y cuya actividad antibacteriana ya ha sido demostrada (Costa y col., 2008). Ese compuesto fue el segundo mayoritario presente en el extracto diclorometánico de tallos.

En ambos extractos, el pico con el Tr = 42.002 no se logró identificar, a pesar de su alta abundancia. El compuesto es el segundo más abundante para el extracto de flores y hojas, pero el más abundante para el extracto de tallos.

Otro de los compuestos presentes mayormente en ambos extractos de diclorometano fue el óxido de cariofileno cuyo pico corresponde al $T_r = 19.198$ min. La actividad antimicrobiana del óxido de cariofileno ya ha sido comprobada con anterioridad (Schmidt y col., 2010). La β -amirina también se identificó como compuesto mayoritario en el pico correspondiente al $T_r = 49.618$ min. También es un compuesto con actividad demostrada contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* (Abdel-Raouf y col 2015). Dentro de los compuestos identificados en ambos extractos, el correspondiente al $T_r = 20.523$ min fue el τ -cadinol (o T-cadinol), otro compuesto ya identificado antes de este trabajo y cuya actividad bacteriolítica ha sido descrita por Claeson y col. (1992). El lupeol, identificado como el compuesto con el T_r de 50.638 min, también ha sido reportado con anterioridad en *B. perfoliata*. En la bibliografía consultada, el luepol ha presentado una baja actividad antibacteriana (Akwu y col., 2020; Rosandy y col., 2021).

Múltiples reportes han evidenciado que la combinación de los compuestos de origen vegetal que presentan una baja o nula actividad antibacteriana por sí solos mejoran su actividad en presencia de antibióticos. Otros compuestos, además de su actividad antibacteriana intrínseca, presentan una actividad sinérgica con antibióticos. Se ha reportado que los compuestos que mayor sinergia presentan son los polifenoles y terpenoides. Los mecanismos de acción sinérgica más reportados son la inhibición de bombas de eflujo, la inhibición de betalactamasas y la alteración de la permeabilidad de la membrana (Álvarez-Martínez y col., 2019).

Las interacciones que se pueden presentar entre los antibióticos y productos naturales se han denominado de diferentes maneras, siendo una de ellas la sinergia. La sinergia entre dos compuestos se refiere a que la actividad de la combinación es mayor que la individual de cada componente. Otra de las denominaciones de los mecanismos mediante los cuales esas combinaciones ejercen sus efectos es el aditivo, donde el efecto es la suma de las actividades individuales de cada compuesto. Las combinaciones no colaborativas son aquellas que no presentan actividad aditiva ni antagonista. Otro tipo de interacción que se

puede presentar es la antagonista, en la que la actividad de la combinación es inferior a la suma de la acción individual de los compuestos individuales. Para cuantificar el efecto producido por mezclar dos agentes antibacterianos, el método mayormente aceptado es la concentración inhibitoria fraccionada (FIC) (Cheesman y col., 2017).

Diversas investigaciones evidencian que las bacterias Gram positivas son más susceptibles a la acción de los terpenoides como bloqueadores de las bombas de eflujo. De los mecanismos propuestos, destacan la inhibición de la expresión genética o la interacción con las proteínas de la membrana, ambas asociadas con las bombas de eflujo, aunque los mecanismos moleculares de cómo se lleva a cabo dicha acción no está claramente elucidado (Dias y col., 2022).

Aunado a lo anterior, de los mecanismos de resistencia que se han documentado en *B. cereus*, la producción de diferentes tipos de betalactamasas y la expresión de bombas de eflujo son los que se destacan (Fiedler y col., 2020).

Como pudimos observar en los resultados previamente expuestos, el contenido del extracto de diclorometano de *B. perfoliata* contiene, entre algunos otros, terpenos de diferentes esqueletos como lo son mono, sesqui y triterpenos, algunos de ellos con actividades ya reportadas.

8.2.2 Elucidación estructural del catalpol

Los espectros de RMN de este compuesto que precipitó de la fracción F250 (Clave: EGB-BP250) de la CC del extracto metanólico revelaron la presencia de impurezas, a pesar de las cuales se logró establecer una discriminación entre el mayoritario y sus impurezas. De esta forma, la observación del espectro de RMN de ^1H mostró claramente la presencia de una unidad de azúcar por las señales entre 4.00 y 4.75 ppm que caracterizan los protones sobre carbonos monooxigenados (Figura 23). Por su parte, el espectro COSY permitió identificar el protón anomérico en $\delta = 5.56$ con una J de 7.0 Hz, la cual indica una configuración tipo β . Las demás constantes de acoplamiento del orden de 9.0 Hz indican claramente que se trata de la β -D-

glucosa. Una vez determinados todos los protones de dicha unidad, se identificaron también los carbonos correspondientes indicados en la **Tabla 9**.

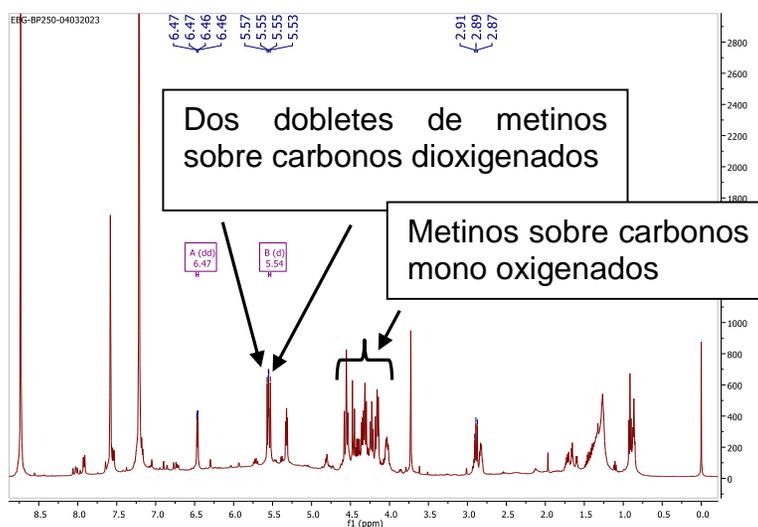


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H del catalpol.

Por otra parte, los carbonos en $\delta = 141.0$ y 104.1 correspondieron a dos carbonos vinílicos, cuyos protones se situaron en 6.46 y 5.32 ppm. Además del protón anomérico, también se detectó un segundo metino dioxigenado en 5.54 ppm que tuvo acoplamiento con otro protón en $\delta = 2.89$, con multiplicidad de dd (7.5, 9.5 Hz). El seguimiento del sistema de acoplamientos partiendo de este protón, combinado con las interacciones en el HMBC, permitió proponer la estructura del catalpol indicada en la **Figura 23**. Una posterior simulación del espectro de ^{13}C realizada en el programa MestRenova coincidió prácticamente con los datos experimentales (ANEXO, **Figura C**).

El catalpol, identificado en el extracto metanólico de flores y hojas, es un iridoide previamente descrito en el género *Buddleja*. Se han realizado múltiples estudios de su actividad biológica, incluido el antibacteriano. Kahraman y col. (2018) evaluaron la actividad antibacteriana y antifúngica del catalpol obtenido de *Verbascum mucronatum* Lam contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*,

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida krusei* y *Candida parapsilosis*, y encontraron actividad moderada (MIC 256 µg/mL) contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* y las especies de *Candida*, pero todavía menor actividad (512 µg/mL) contra *E. faecalis* y *E. coli*.

9. CONCLUSIONES

1. Aunque se emplea esta planta de manera tradicional para tratar tuberculosis, la cual es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*, enfermedad con un grado de resistencia en alza, solo los extractos obtenidos con diclorometano mostraron una actividad inhibitoria del crecimiento de las dos bacterias disponibles y que fueron utilizadas en este proyecto (*Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*), ambas también con resistencia a los antibióticos beta lactámicos.
2. Los extractos más polares (metanólicos) no mostraron inhibición significativa del crecimiento de los dos microorganismos de prueba.
3. Se identificaron 19 compuestos en los extractos diclorometánicos de los tres órganos estudiados de la planta (flores, hojas y tallos), la mayoría de los cuales fueron monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos.
4. Se ha reportado actividad antibacteriana de algunos de los terpenos identificados en esta planta sobre diversos organismos. Por lo tanto, pueden contribuir a los efectos inhibitorios moderados producidos por los extractos diclorometánicos en esas dos bacterias.
5. Como es conocido, no se descarta tampoco la posibilidad de que exista antagonismo entre los constituyentes químicos identificados o no en los extractos, lo que podría justificar la poca, o nula actividad antibacteriana de los extractos, sobre todo los metanólicos.
6. Del extracto metanólico de las hojas y flores, se purificaron 3 compuestos sólidos, uno de los cuales ha sido identificado como el catalpol, sesquiterpeno cuya actividad antibacteriana ha sido descrita anteriormente.
7. El presente estudio no puede constituir un soporte sólido para el uso tradicional de la planta para tratar heridas o tuberculosis, ni para las mismas bacterias usadas en el presente proyecto.

10. REFERENCIAS

- Abdel-Raouf, N., Al-Enazi, N. M., Al-Homaidan, A. A., Ibraheem, I. B. M., Al-Othman, M. R., Hatamleh, A. A. (2015). Antibacterial β -amyrin isolated from *Laurencia microcladia*. *Arabian Journal of Chemistry*, 8(1), 32-37.
- Achtman, M. (2016). How old are bacterial pathogens? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1836), 20160990.
- Akwu, N., Naidoo, Y., Singh, M., Thimmegowda, S. C., Nundkumar, N., Lin, J. (2020). Isolation of lupeol from *Grewia lasiocarpa* stem bark: Antibacterial, antioxidant, and cytotoxicity activities. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(12), 5684-5690.
- Álvarez-Martínez, F. J., Barraji3n-Catal3n, E., Herranz-L3pez, M., Micol, V. (2021). Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90, 153626.
- Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery: Major Classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*, 133, 4–19.
- Arias-Flores, R., Rosado-Quiab, U., Vargas-Valerio, A., Grajales-Mu3niz, C. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista M3dica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 54(1), 20-24.
- Castillo-Ju3rez, I., Gonz3lez, V., Jaime-Aguilar, H., Mart3nez, G., Linares, E., Bye, R., Romero, I. (2009). Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. *Journal of ethnopharmacology*, 122(2), 402-405.
- Calvo, J. y Mart3nez-Mart3nez, L. (2009). Mecanismos de acci3n de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiolog3a Cl3nica*, 27(1), 44-52.
- Celestino-Hern3ndez, A. G., G3mez-Ortiz, V., Arvizu-G3mez, J. L., Ramos-L3pez, M. A., Rodr3guez-Morales J. A., Flores Mac3as, A., 3lvarez-Hidalgo A., Nu3nez-Ram3rez J, Flores-Gallardo, F. J. (2021). Detection of *Bacillus cereus* sensu lato

- isolates posing potential health risks in Mexican chili powder. *Microorganisms*, 9(11), 2226.
- Cheesman, M. J., Ilanko, A., Blonk, B., Cock, I. E. (2017). Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacognosy reviews*, 11(22), 57.
- Claeson, P., Rådström, P., Sköld, O., Nilsson, Å., Höglund, S. (1992). Bactericidal effect of the sesquiterpene T-cadinol on *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*, 6(2), 94-98.
- Cortes, A. R., Delgadillo, A. J., Hurtado, M., Domínguez-Ramírez, A. M., Medina, J. R., Aoki, K. (2006). The antispasmodic activity of *Buddleja scordioides* and *Buddleja perfoliata* on isolated intestinal preparations. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(6), 1186-1190.
- Costa, E. V., Teixeira, S. D., Marques, F. A., Duarte, M. C., Delarmelina, C., Pinheiro, M. L. B., Maia, B. H. L. S. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatterioopsis* species. *Phytochemistry*, 69(9), 1895-1899.
- Cuevas-Cianca, S. I., Leal, A. C. L., Hernández, L. R., Arreola, E. S., Bach, H. (2022). Antimicrobial, toxicity, and anti-inflammatory activities of *Buddleja perfoliata* Kunth. *Phytomedicine Plus*, 2(4), 100357.
- Dias, K. J. S. D. O., Miranda, G. M., Bessa, J. R., Araújo, A. C. J. D., Freitas, P. R., Almeida, R. S. D., Ribeiro-Filho, J. y col. (2022). Terpenes as bacterial efflux pump inhibitors: A systematic review. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 953982.
- Donlan, R. M. (2001) Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 387-1392.
- Durand, G. A., Raoult, D., Dubourg, G. (2019). Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(4), 371-382.
- Fair, R. J., y Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6. 25-64.

- Fiedler, G., Schneider, C., Igbinsosa, E. O., Kabisch, J., Brinks, E., Becker, B., Franz, C. M. (2019). Antibiotics resistance and toxin profiles of *Bacillus cereus*-group isolates from fresh vegetables from German retail markets. *BMC microbiology*, 19(1), 1-13.
- Garza-González, E., Morfín-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E. Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLOS ONE*, 14(3), e0209865.
- Garza-González, E., Franco-Cendejas, R., Morfín-Otero, R., Echaniz-Aviles, G., Rojas-Larios, F., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., y col., (2020). The evolution of antimicrobial resistance in Mexico during the last decade: results from the INVIFAR group. *Microbial Drug Resistance*, 26(11), 1372-1382.
- Gloria-Ruiz, J., Juárez-Lira, A., Aguilar-Medina, J. C. D., (2022) Perfil epidemiológico de infecciones asociadas a la atención de salud en un hospital de Querétaro/Epidemiological profile of infections associated with health care in a Hospital in Querétaro. *Revista de Enfermería del Instituto Mexicano del Seguro Social*; 30(4):123-31.
- Gutiérrez-Muñoz, J., Ramírez-Corona, A. M., Martínez-Bustamante. M. E., Coria-Lorenzo, J. J., Armenta-Gallegos, L., Ayala-Franco, J. R., Bernal-Granillo, S. M., Flores-Zaleta, F.J., García-Pérez F. E., Monjardín-Rochín, J. A., Martínez-Fuentes, G., Gutiérrez-Muñoz V. H., Suárez-Cuenca, J. A., (2017). Estudio multicéntrico de resistencias bacterianas nosocomiales en México. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 30(2), 68-75.
- Houghton, P. J. (1984). Ethnopharmacology of some *Buddleja* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 11(3), 293-308.
- Houghton, P. J., y Mensah, A. Y. (1999). Biologically active compounds from *Buddleja* species. *Phytochemicals in Human Health Protection, Nutrition, and Plant Defense*, 33, 343-368.

- Houghton, P. J., Mensah, A. Y., Iessa, N., Hong, L. Y. (2003). Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemistry*, 64(2), 385-393.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80.
- Jovanovic, J., Ornelis, V. F., Madder, A., Rajkovic, A. (2021). *Bacillus cereus* food intoxication and toxicoinfection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(4), 3719-3761.
- Juárez, Z. N., Bach, H., Bárcenas-Pozos, M. E., Hernández, L. R. (2021). Impact of the Persistence of Three Essential Oils with Antifungal Activities on Stored Wheat Grains, Flour, and Baked Products. *Foods*, 10(2), 213.
- Juárez, Z. N., Bach, H., Sánchez-Arreola, E., Bach, H., Hernández, L. R. (2016). Protective antifungal activity of essential oils extracted from *Buddleja perfoliata* and *Pelargonium graveolens* against fungi isolated from stored grains. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5), 1264-1270.
- Kahraman, Ç., Tatli, I. I., Didem, K. A. R. T., Ekizoğlu, M., Akdemir, Z. Ş. (2018). Structure Elucidation and Antimicrobial Activities of Secondary Metabolites from the Flowery Parts of *Verbascum mucronatum* Lam. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(3), 231.
- Khan, S., Ullah, H., Zhang, L. (2019). Bioactive constituents from *Buddleja* species. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 32(2), 721-741.
- Lade, H., y Kim, J. S. (2021). Bacterial targets of antibiotics in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 10(4), 398.
- López-Jácome L. E., Fernández-Rodríguez D., Franco-Cendejas R., Camacho-Ortiz A., Morfin-Otero M. D. R., Rodríguez-Noriega E. y col. (2021). Increment antimicrobial resistance during the COVID-19 Pandemic: Results from the Invifar Network. *Microbial Drug Resistance*, 28(3), 338-345.
- Martínez, M. (1969). *Salvia de Bolita*, *Las Plantas Medicinales de México*. 283-284 5a edición.

- Miethke, M., Pieroni, M., Weber, T. y col. (2021). Towards the sustainable discovery and development of new antibiotics. *Nature Reviews Chemistry*, 5, 726–749.
- Missiakas, D., y Winstel, V. (2021). Selective host cell death by *Staphylococcus aureus*: A strategy for bacterial persistence. *Frontiers in Immunology*, 11, 621733.
- Mohr, K. I. (2016). History of Antibiotics Research. In: Stadler M., Dersch P. (eds) How to Overcome the Antibiotic Crisis. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 398, 237-272.
- NATURALISTA (2017) salvia de bolita (*Buddleja perfoliata*) [Consultado el 17 de noviembre de 2021]. <https://www.naturalista.mx/taxa/287036-Buddleja-perfoliata>.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [Consultado el 14 de octubre de 2021]. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2020). Resistencia a los antibióticos. [Consultado el 14 de octubre 2021]. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
- OMS. (2023). Incentivising the development of new antibacterial treatments 2023. Progress Report by the Global AMR R&D Hub & WHO. [Consultado el 09 de noviembre de 2023]. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/antimicrobial-resistance/amr-gcp-irc/incentivising-development-of-new-antibacterial-treatments-2023---progress-report.pdf?sfvrsn=72e4f738_3.
- Papaneophytou, C., Giannenas, I., y Dragomir, C. (2020). Resistance of bacteria, fungi, and parasites to antibiotics or natural substances of botanical origin. *Feed Additives Aromatic plants and herbs in animal nutrition and health*, 339-354.
- Quiñones-Pérez, D. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque “Una salud”. *Revista Cubana de medicina tropical*, 69(3), 1-17.

- Rizo-Amézquita, J. N. y Camargo-O, E. A. (2017). Patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos. *BOLETÍN CONAMED OPS*, 1–9.
- Rodríguez-Salgado, M. (2018). Frecuencia de infecciones asociadas a la atención de la salud en los principales sistemas de información de México. *BOLETÍN CONAMED OPS*, 3(17), 16-20.
- Rosandy, A. R., Ishak, S. S. O., Sabri, N. A., Ahmad, W. Y. W., Al Muqarrabun, L. M. R. (2021). Antibacterial activity of lupeol from the bark of *Dehaasia cuneate* (Lauraceae). *Current Research on Biosciences and Biotechnology*, 2(2), 145-148.
- Said-Al Ahl, H. A., y Hikal, W. M. (2021). A Review on Alternate-leaved Butterfly-bush: *Buddleja alternifolia*. *Asian Journal of Research in Biosciences*, 3(2), 57-62.
- Schmidt, E., Bail, S., Friedl, S. M., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Wanner, J., Geissler, M. (2010). Antimicrobial activities of single aroma compounds. *Natural product communications*, 5(9), 1365 – 1368.
- SSA. (2011). Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud. [Consultado el 14 de octubre 2021]. Disponible en http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dess/descargas/estudios_especiales/NOSOCOMIAL_SE.pdf.
- SSA. (2023) Panorama epidemiológico de las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS). Secretaría de Salud Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud Dirección General de Epidemiología. [Consultado el 17 de octubre del 2023]. Disponible en: [www.gob.mx › cms › attachment › file › Bol__RHoVE_2023_01](http://www.gob.mx/cms/attachment/file/Bol__RHoVE_2023_01)
- WHO. (2019). Antibiotic resistance. [Consultado el 22 de Agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>.

11. ANEXO

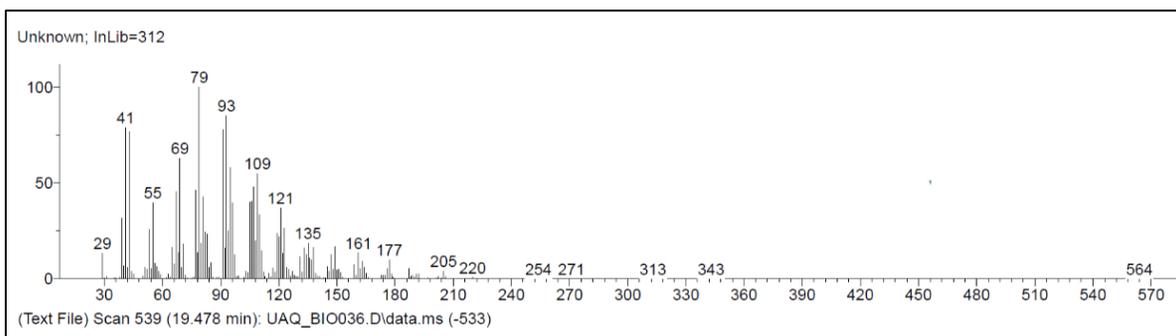


Figura A1. Espectro de masas del pico con Tr = 19.478 min.

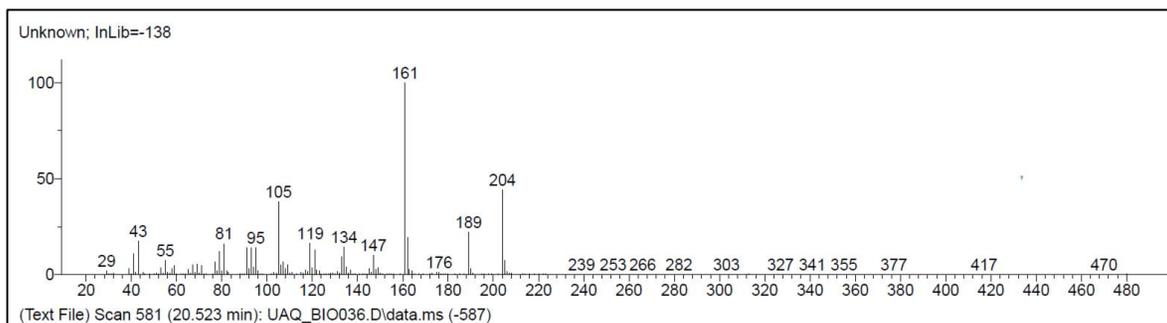


Figura A2. Espectro de masas del pico con Tr = 20.523 min.

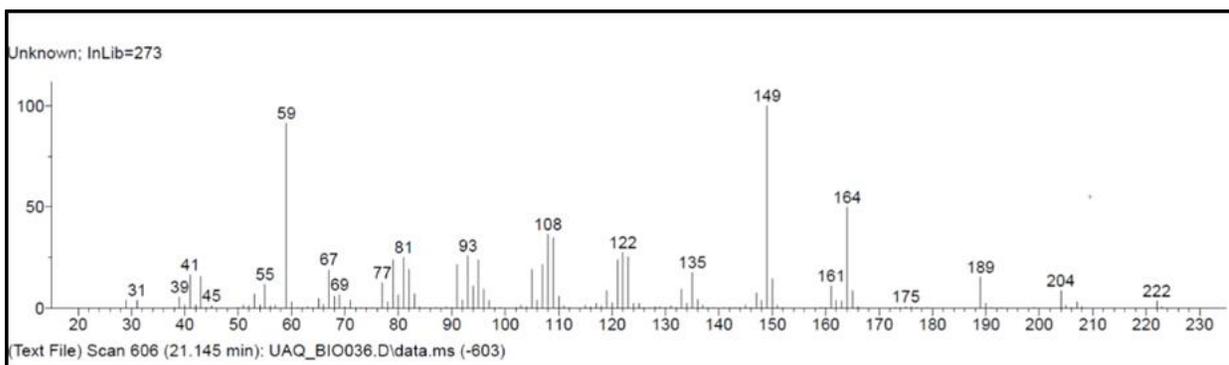


Figura A3. Espectro de masas del pico con Tr = 21.145 min.

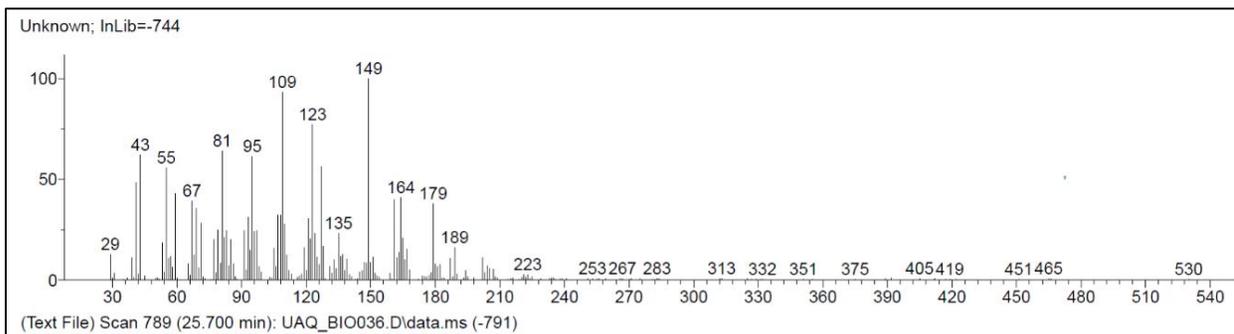


Figura A4. Espectro de masas del pico con Tr = 25.7 min.

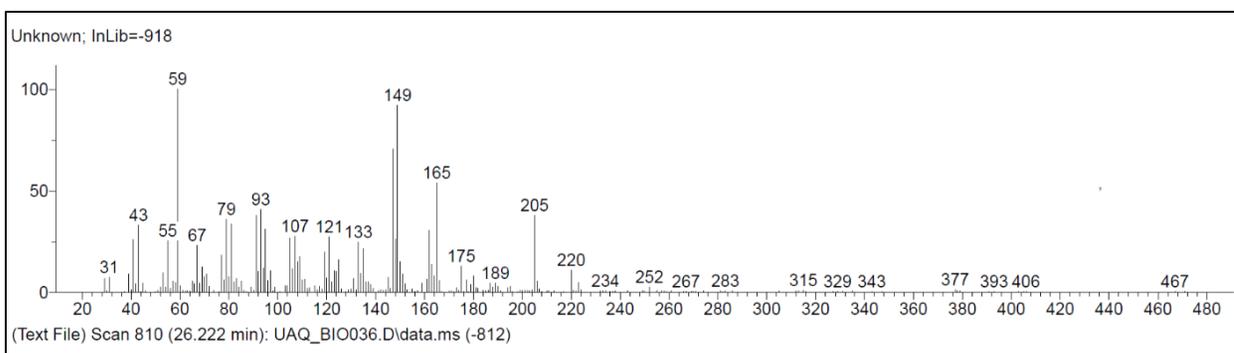


Figura A5. Espectro de masas del pico con Tr = 26.222 min

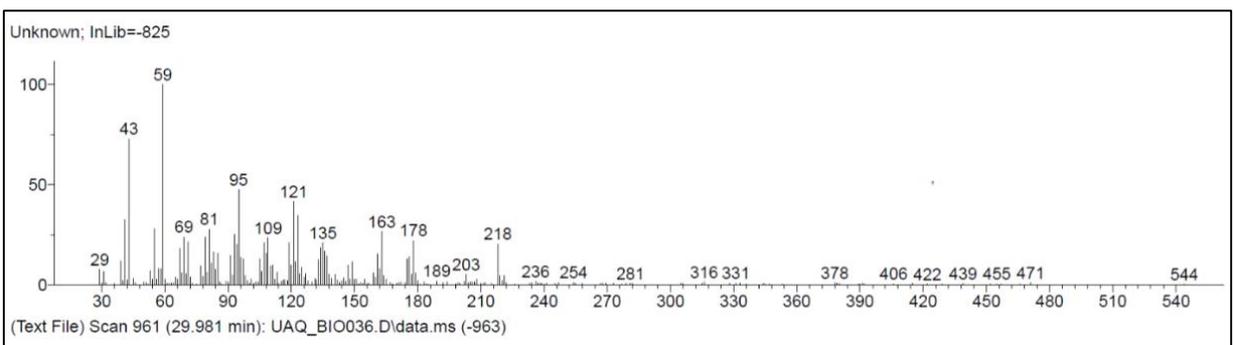


Figura A6. Espectro de masas del pico con Tr = 29.981 min

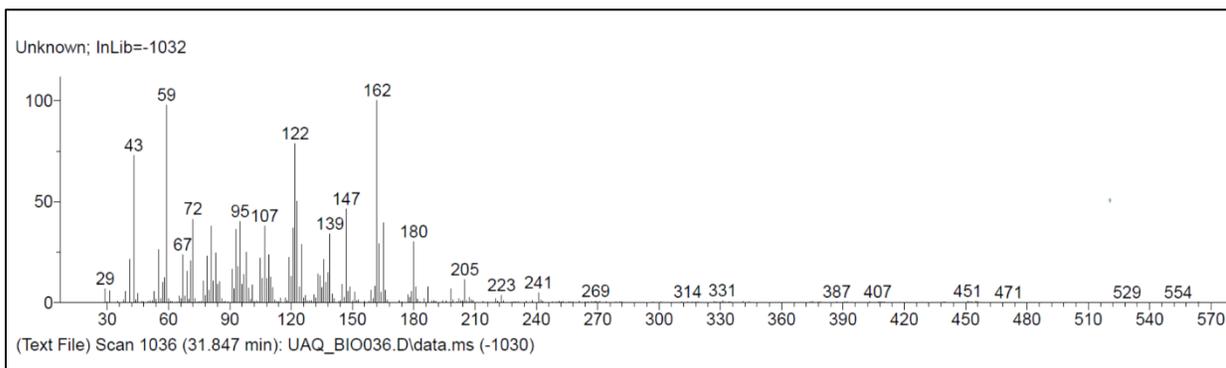


Figura A7. Espectro de masas del pico con Tr = 31.847 min

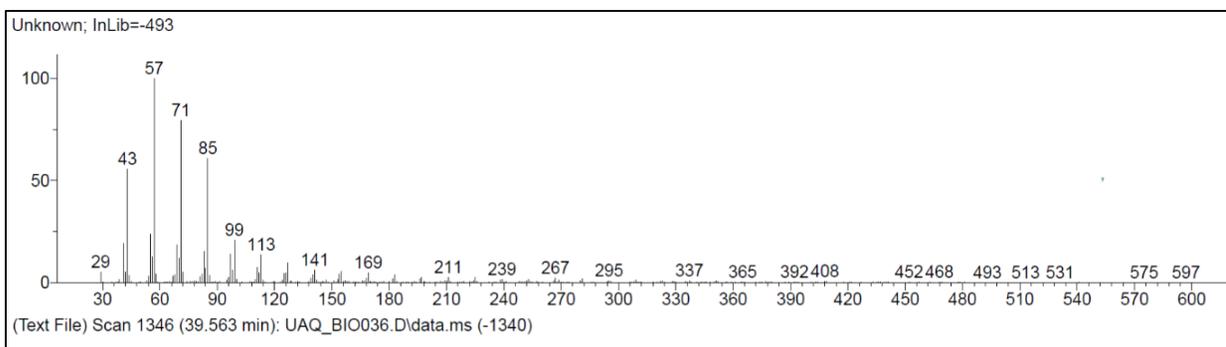


Figura A8. Espectro de masas del pico con Tr = 39.563 min

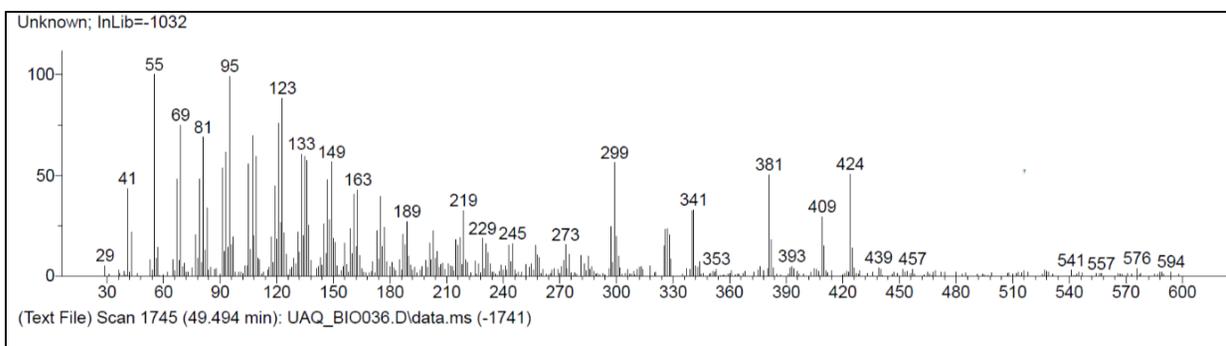


Figura A9. Espectro de masas del pico con Tr = 49.494 min

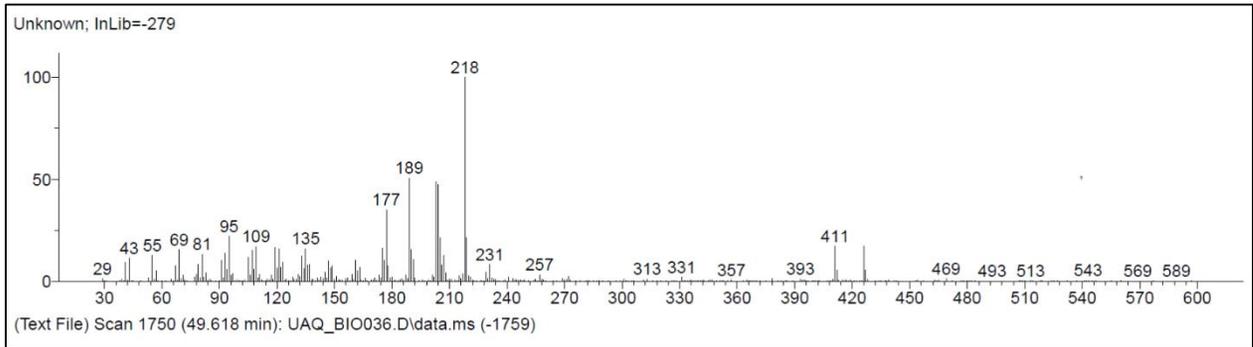


Figura A10. Espectro de masas del pico con $Tr = 49.618$ min

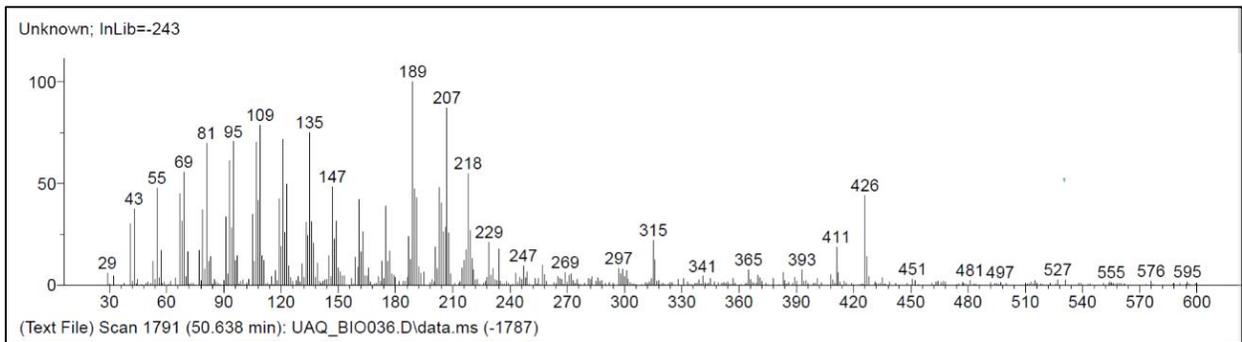


Figura A11. Espectro de masas del pico con $Tr = 50.638$ min

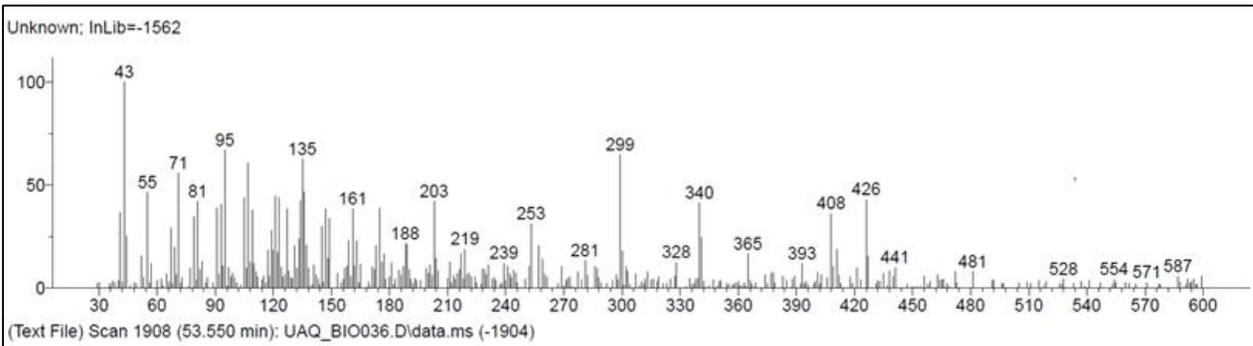


Figura A12. Espectro de masas del pico con $Tr = 53.550$ min

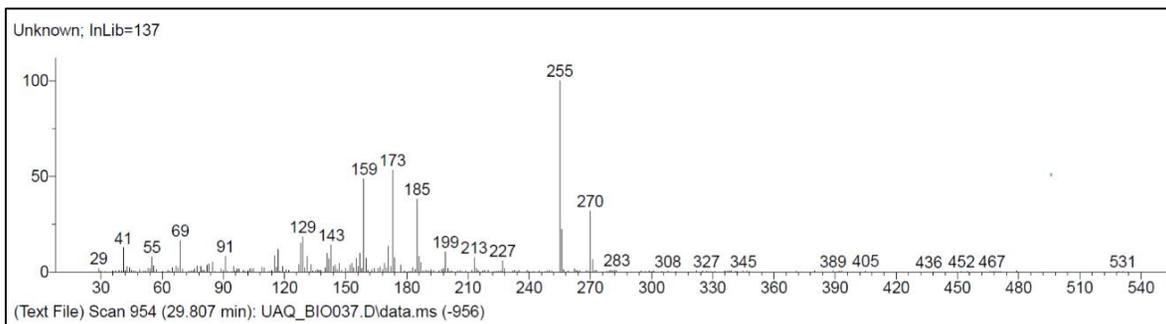


Figura B1. Espectro de masas del pico con Tr = 29.807 min

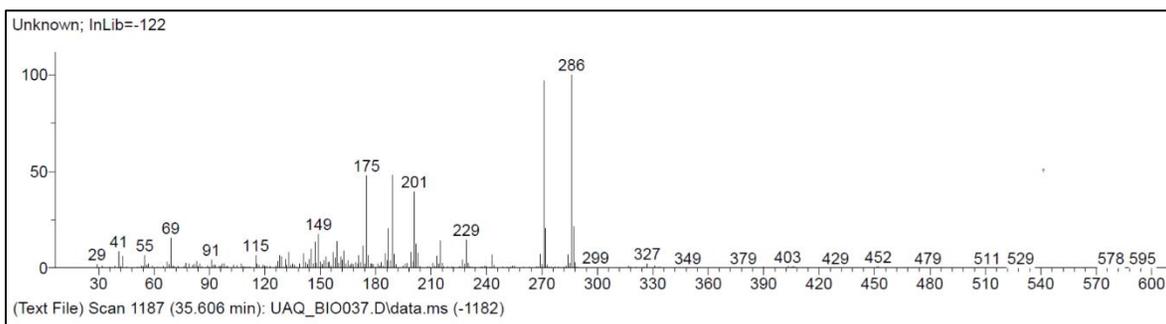


Figura B2. Espectro de masas del pico con Tr = 35.606 min

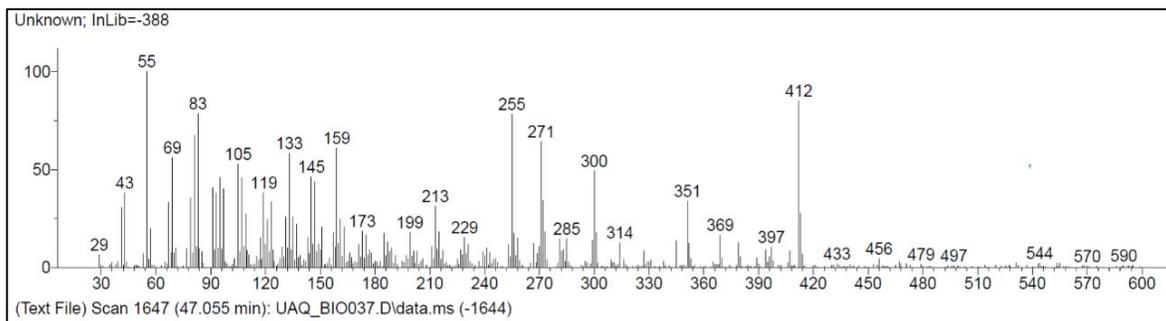


Figura B3. Espectro de masas del pico con Tr = 47.055 min

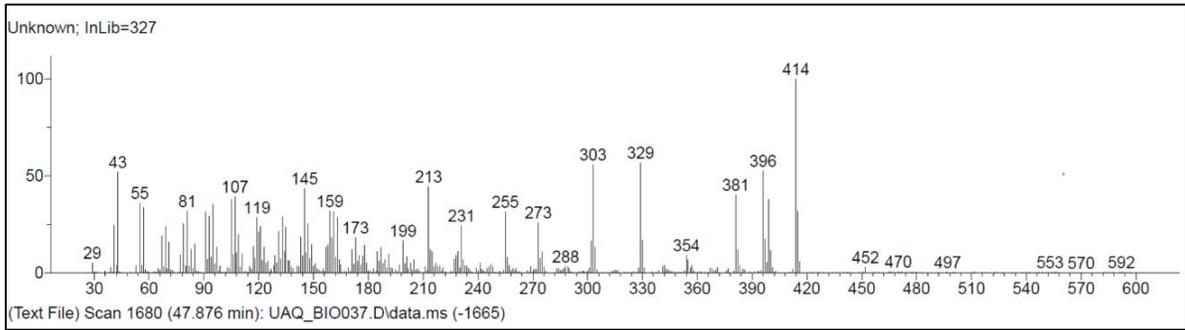


Figura B4. Espectro de masas del pico con Tr = 47.876 min

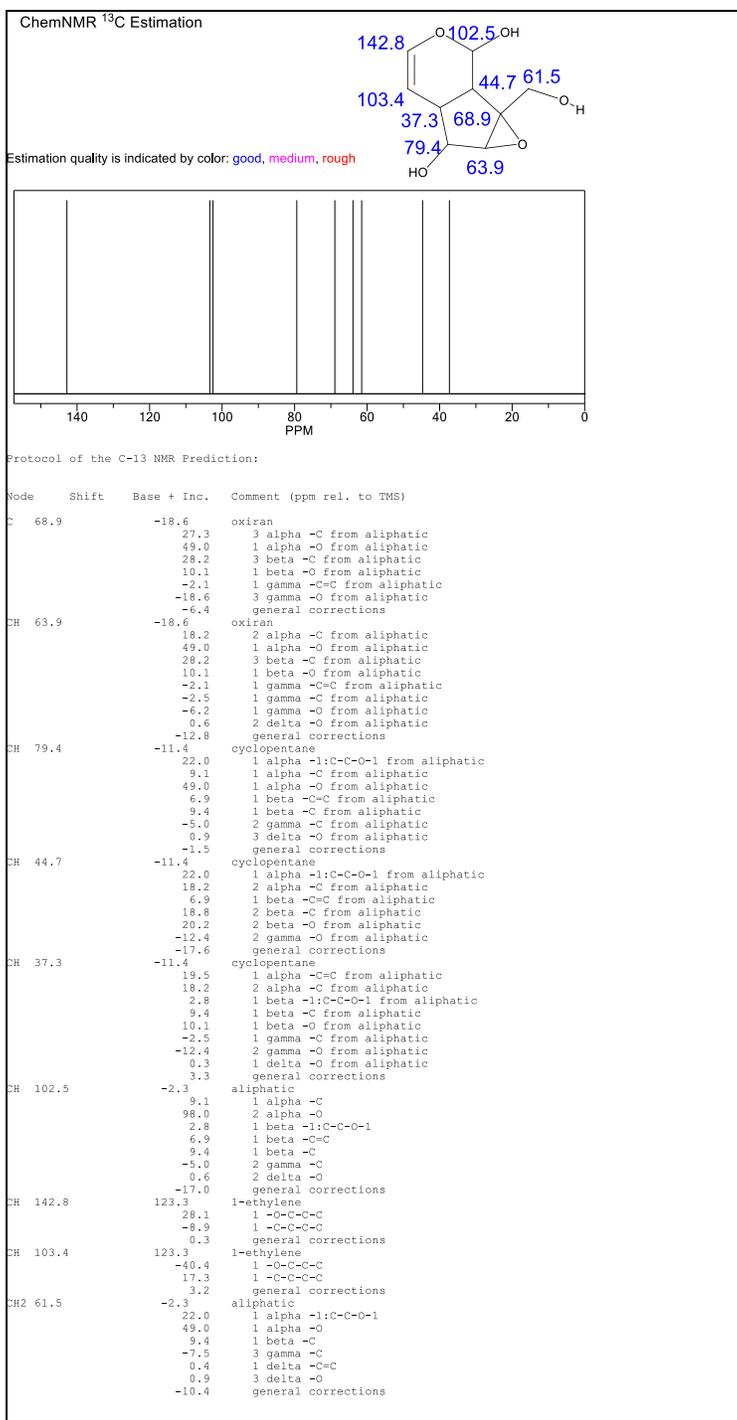


Figura C. Espectro simulado mediante MestRenova para el catalpol.