

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Estudio químico de *Croton ciliatoglandulifer* y evaluación
de su efecto sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y
Bacillus cereus resistentes a betalactámicos**

TESIS

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

REBECA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR:

DR. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

QUERÉTARO, QRO. A SEPTIEMBRE DE 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Estudio químico de Croton ciliatoglandulifer y
evaluación de su efecto sobre el crecimiento de
Staphylococcus aureus y Bacillus cereus resistentes a
betalactámicos

por

Rebeca Rodríguez Martínez

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-212782



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

Estudio químico de *Croton ciliatoglandulifer* y evaluación de su efecto sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* resistentes a betalactámicos

TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA:

REBECA RODRÍGUEZ MARTÍNEZ

DIRIGIDA POR:

DR. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

Dr. Mamadou Moustapha Bah

Presidente

Dr. Juan Campos Guillén

Secretario

Dr. José Alejandro García Arredondo

Vocal

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Sinodal

Dra. Jesica Escobar Cabrera

Sinodal

Centro Universitario, Querétaro,
Qro. Septiembre de 2023
México

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Querétaro, por la infraestructura y formación académica.

Agradezco a CONAHCYT por el apoyo recibido cuando se me otorgó la beca.

Al 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 especial agradecimiento al M. en C. **Alejandro Núñez Vilchis** y al **Dr. Eloy Rodríguez de León**.

Al **Dr. Moustapha Bah**, por recibirme en su grupo de trabajo, por su confianza y dedicación para que continúe con mi formación académica. Por permitirme formar parte de este proyecto de investigación.

Al **Dr. Juan Campos Guillén** por el apoyo de dejarme trabajar en sus instalaciones y su asesoría en todo lo relacionado a la microbiología.

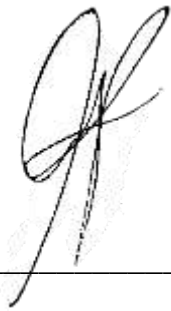
A la **M en C. Diana López** y a la **M en C. Gabriela Victoria Ruiz** por acompañarme en todo el proceso, por todos los consejos de vida y académicos, el apoyo de trabajo y emocional y por sus valiosas amistades incondicionales. A ellas que les tengo especial cariño. Nuevamente al **Dr. Eloy Rodríguez** por todas sus aportaciones al desarrollo del proyecto.

A mi querida pareja sentimental **Alejandro Medrano (mi Aleks)** por el acompañamiento en el proceso, por todo el apoyo emocional y por impulsarme a ser mejor persona y a continuar con mi formación.

A mi familia. A mis padres **Alma** y **Juan**, por su amor, su paciencia, trabajo y sacrificio. Finalmente, a mis hermanos, que los amo tanto, **Faby**, **Itzel** y **Juan** por ser siempre mi soporte. A todos ustedes por iluminar mi camino en todo momento.

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que todos 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.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large, stylized 'R' followed by a vertical line and a horizontal stroke, positioned above a horizontal line.

Q. F. B. Rebeca Rodríguez Martínez

RESUMEN

A través del tiempo, las plantas medicinales han sido el recurso principal utilizado de manera tradicional para tratar infecciones bacterianas y diversas otras enfermedades y al mismo tiempo, han jugado un papel importante para el desarrollo de nuevos fármacos. Por ejemplo, se ha documentado actividad antibacteriana de alcaloides, flavonoides y terpenoides aislados de plantas medicinales. Por otra parte, datos de la OMS indican que las infecciones por bacterias se encuentran entre las 10 causas principales de muerte en el mundo. Sin embargo, varios microorganismos han desarrollado o adquirido mecanismos de resistencia a los antibióticos disponibles, de tal suerte que la OMS ha clasificado a la resistencia microbiana como un problema de salud emergente que requiere ser atendido. *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* son bacterias Gram positivas que en la actualidad están presentando resistencia contra los antibióticos betalactámicos disponibles. Las plantas del género *Croton* poseen diversas actividades farmacológicas de gran interés, entre ellas las antibacterianas. En el presente trabajo, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de diclorometano y metanol de *Croton ciliatoglandulifer* y se caracterizaron químicamente algunos de los metabolitos del extracto con actividad antimicrobiana. Para la evaluación, se empleó el método de difusión en disco. Posteriormente, se llevó a cabo un estudio químico del extracto con mayor actividad con la finalidad de aislar y/o identificar los principales metabolitos secundarios, lo cual se llevó a cabo mediante una combinación de las cromatografías en capa fina (CCF), de líquidos en columna abierta (CC) y de Alta Resolución (HPLC), así como la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM). Los extractos diclorometánico (D) y metanólico (M) de las raíces (R) y el metanólico de las hojas (H) (DR, MR y MH) inhibieron, aunque de manera moderada, el crecimiento de la cepa *S. aureus* ATCC 29213, mientras que en el caso *B. cereus* ATCC 10876, sólo el DR fue activo. De manera adicional, la combinación del DR con ampicilina produjo un efecto sinérgico sobre esta última cepa (que es resistente a ampicilina) a partir de la proporción de 3 mg/15 µL del DR con 100 µg/mL del antibiótico comercial. El análisis químico de todos los extractos diclorometánicos por medio de CG-EM permitió identificar 43 compuestos diferentes, en su mayoría de naturaleza terpenoide y de estos, los sesquiterpenos fueron los predominantes. Por otra parte, se identificó mediante RMN un compuesto aislado de los tallos, el cual coincidió con la sacarosa. Se encuentran todavía en proceso de registro los espectros de RMN de otros dos polvos purificados. Vale mencionar que varios de los compuestos identificados hasta ahora en esta especie vegetal como el borneol, los acetatos de borneol y del *cis*-crisantenilo, así como el óxido de cariofileno, han sido reportados con actividad antimicrobiana.

Palabras clave: *Croton ciliatoglandulifer*, efecto antimicrobiano, resistencia antibacteriana, perfil químico.

ABSTRACT

Throughout time, medicinal plants have been used in traditional medicines to treat bacterial infections and many other diseases, and at the same time, have played an important role in the development of new drugs. For example, alkaloids, flavonoids and terpenoids isolated from medicinal plants have been reported to have antibacterial activity. On the other hand, WHO has included infectious diseases caused by bacteria into the top ten causes of deaths worldwide. However, microorganisms have developed or acquired mechanisms of resistance to current treatments, so as the WHO has recognized microbial resistance as an emerging problem, that deserves more attention. *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* are Gram positive bacteria that have currently turned to be resistant to the available beta-lactam antibiotics. Some medicinal plants are used traditionally to treat infectious diseases. Among these, those belonging to the *Croton* genus stand out. In this work, the antimicrobial activities of dichloromethane and methanol extracts of *Croton ciliatoglandulifer* were assessed, and some of their secondary metabolites characterized. Antimicrobial activity was conducted using Kirby-Bauer agar diffusion method. Then, the most active extract was subjected to chemical study for the identification of its main secondary metabolites using TLC, open CC, HPLC-PDA and GC-MS, combined with NMR spectroscopy. Methanol (M) and dichloromethane (D) extracts from roots (R) (MR and DR) and methanol extract from leaves (H) (MH) moderately inhibited *S. aureus* ATCC 29213 growth, meanwhile only roots dichloromethane extract (DR) inhibited *B. cereus* ATCC 10876. Additionally, combination of DR and the antibiotic ampicilline produced synergistic effect on the ampicilline resistant *B. cereus* from the ratio of 3 mg/15 μ L DR with 100 μ g/mL the commercial antibiotic. GC-MS analysis of all the dichloromethane extracts led to the identification of 43 compounds, many of which consisting of terpenoids, sesquiterpenes being the most abundant. On the other hand, a purified compound from the methanol extract of stems was identified as sucrose using NMR spectroscopy. NMR spectra recording of two other purified white powders is still in progress. It is worth mentioning that many of the identified compounds in this plant species, like borneol, as well as borneol and *cis*-cristantenil acetates, caryophyllen oxide have been reported to possess antimicrobial activity.

Keywords: *Croton ciliatoglandulifer*, antimicrobial effect, antibacterial resistance, chemical profiling

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
RESUMEN	I
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
LISTA DE ACRÓNIMOS	viii
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Actividad antimicrobiana de compuestos originados de plantas	3
2.1.1 Alcaloides	3
2.1.2 Compuestos fenólicos	3
2.1.3 Terpenos	5
2.2 Género <i>Croton</i>	7
2.2.1 Metabolitos secundarios identificados en el género <i>Croton</i>	8
2.2.1.1 <i>Croton caudatus</i> Geisel	8
2.2.1.2 <i>Croton gossypiifolius</i> Vahl	8
2.2.1.3 <i>Croton linearis</i> Jacq	8
2.2.1.4 <i>Croton urucurana</i> Baillon	9
2.2.1.5 <i>Croton echinocarpus</i> Baill	9
2.2.1.6 <i>Croton cajucara</i> Benth	9
2.2.2 Estudios farmacológicos del género <i>Croton</i>	9
2.2.2.1 Actividad antiinflamatoria	9
2.2.2.2 Actividad antibacteriana	10
2.2.2.3 Actividad antiparasitaria	11
2.2.2.4 Potencial Anti-VIH	11
2.3 <i>Croton ciliatoglandulifer</i>	11
2.3.1 Descripción	11
2.3.2 Usos tradicionales	12
2.3.3 Metabolitos secundarios identificados	12
2.4 Infecciones bacterianas	13
2.5 Tratamiento: Antimicrobianos	13
2.6 Resistencia a los antibióticos	14
2.7 Mecanismos de resistencia	16
2.7.1 Principales mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias	17
2.7.1.1 Bombas de eflujo o expulsión del antibiótico	17
2.7.1.2 Modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas	19
2.7.1.3 Bloqueo de la penetración del antibacteriano mediante modificación del sitio activo	19
2.7.1.4 Alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana	19

2.8	Microorganismos resistentes a betalactámicos	20
2.8.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.8.2	<i>Bacillus cereus</i>	21
3	JUSTIFICACIÓN	22
4	HIPÓTESIS	23
5	OBJETIVOS	23
5.1	General	23
5.2	Específicos	23
6	METODOLOGÍA	24
6.1	Obtención de extractos de las partes aéreas y raíces	24
6.2	Evaluación de los efectos antibacterianos de los extractos	24
6.2.1	Cepas bacterianas	24
6.2.2	Método para la evaluación de la actividad antibacteriana.	24
6.2.3	Combinación de los extractos con ampicilina	25
6.3	Estudio químico del extracto con mayor actividad antibacteriana	25
6.3.1	Cromatografía en columna abierta (CC)	25
6.3.2	Análisis cromatográfico en capa fina (CCF)	26
6.3.3	Identificación de compuestos purificados	26
6.4	Análisis del extracto diclorometánico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	26
6.4.1	Equipo	26
6.4.2	Preparación de muestras	27
6.4.3	Análisis de las muestras	27
6.4.4	Resultados de Análisis de muestras	27
6.5	Estudio químico de los extractos metanólicos por medio de HPLC/UV-VIS	28
6.6	Análisis estadístico	28
7	RESULTADOS	29
7.1	Rendimiento de los extractos	29
7.2	Actividad antibacteriana de los extractos de <i>C. ciliatoglandulifer</i>	29
7.2.1	Combinación del extracto DR con el antibiótico ampicilina	31
7.3	Estudios químicos	32
7.3.1	Fraccionamiento de DR	32
7.3.2	Resultados de la CG-EM de los extractos diclorometánicos	35
7.3.3	Ánalysis de los extractos metanólicos por medio de HPLC/UV-VIS	42
7.3.4	Resultados RMN de compuestos puros	44
7.3.4.1	Elucidación estructural del precipitado del extracto metanólico de los tallos de <i>C. ciliatoglandulifer</i> (PMTCC)	44
7.3.4.2	Espectros obtenidos de la RMN de PMTCC	44
8	DISCUSIÓN	49

8.1	Actividad antibacteriana de <i>Croton ciliatoglandulifer</i>	49
8.1.2	Combinación de los extractos con ampicilina	49
8.2	Estudio químico	51
8.2.1	Análisis de la CG-EM de los extractos de diclorometano de <i>C. ciliatoglandulifer</i>	51
8.2.2	Identificación del compuesto PMTCC	54
8.3	Actividades antibacterianas de los compuestos mayoritarios caracterizados en <i>C. ciliatoglandulifer</i>	55
9	CONCLUSIONES	61
10	PERSPECTIVAS	62
11	REFERENCIAS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Página
1	Estructuras de los alcaloides	4
2	Estructuras de compuestos fenólicos	5
3	Estructuras de los monoterpenos y el cinamaldehído	6
4	Alcoholes terpénicos	7
5	Fotografías de <i>Croton ciliatoglanduliferus</i> Ort	12
6	Estructuras identificadas de <i>Croton ciliatoglanduliferus</i> Ort	13
7	Mecanismos generales de resistencia a los antimicrobianos	17
8	Estructuras de las principales bombas de expulsión	18
9	Extractos de <i>C. ciliatoglandulifer</i> secos	29
10	Halos de inhibición de los extractos y sus diferentes concentraciones de <i>C. ciliatoglandulifer</i> sobre <i>S.aureus</i>	30
11	Combinación del DR con ampicilina	32
12	Cromatografía en columna abierta del DR	33
13	Fracción 375 (F-375) y fracción 382 (F-382).	35
14	Cromatograma del DR	36
15	Espectros de masas del compuesto 15	36
16	Estructuras de los compuestos mayoritarios de DR	38
17	Cromatograma del DH	38
18	Estructuras de los compuestos mayoritarios de DH	40
19	Cromatograma del DT	40
20	Estructuras de los compuestos mayoritarios de DT	42
21	Cromatogramas de los extractos metanólicos y estándares.	43
22	PMTCC. A: Determinación del punto de fusión. B y C: Polvo blanco (PMTCC)	44
23	Espectro de RMN ¹ H completo del compuesto PMTCC	45
24	Espectro de RMN ¹³ C completo del compuesto PMTCC	45
25	Espectro de RMN ATP completo del compuesto PMTCC	46
26	Espectro de RMN DEPT 90° completo del compuesto PMTCC	46
27	Espectro ¹ H- ¹ H COSY completo del compuesto PMTCC	47
28	Espectro de HSQC completo del compuesto PMTCC	47
29	Espectro de HMBC completo del compuesto PMTCC	48
30	Naturaleza de los compuestos mayoritarios identificados por CG-EM en los extractos de diclorometano de <i>C. ciliatoglandulifer</i>	52
31	Compuestos mayoritarios presentes en cada uno de los extractos diclorometánicos de <i>C. ciliatoglandulifer</i> .	53
32	Estructura de la sacarosa	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Lista de patógenos prioritarios emitida por la OMS	15
2	Gradiente de las fases móviles para el análisis por medio de HPLC/UV-Vis de extractos metanólicos	28
3	Rendimientos de los extractos de <i>C. ciliatoglandulifer</i>	29
4	Actividad antibacteriana de <i>C. ciliatoglandulifer</i> en <i>S. aureus</i>	30
5	Actividad antibacteriana de <i>C. ciliatoglandulifer</i> en <i>B. cereus</i>	30
6	Actividad antibacteriana de <i>C. ciliatoglandulifer</i> en otras bacterias	31
7	Actividad antibacteriana de <i>C. ciliatoglandulifer</i> en <i>B. cereus</i>	31
8	Combinación del DR con ampicilina sobre <i>B. cereus</i>	32
9	Fracciones colectadas y agrupadas de la cromatografía en columna del DR y sus rendimientos.	34
10	Compuestos identificados en el DR	37
11	Compuestos identificados de DH	39
12	Compuestos identificados de DT	41
13	Constantes espectroscópicas del compuesto PMTCC (sacarosa) (D ₂ O)	48
14	Compuestos mayoritarios identificados en la literatura de <i>C. ciliatoglandulifer</i> y otras especies del género	53
15	Compuestos mayoritarios de los extractos de diclorometano de <i>C. ciliatoglandulifer</i> y su actividad antibacteriana reportada	57
16	Compuestos mayoritarios de los extractos de diclorometano de <i>C. ciliatoglandulifer</i> presentes en aceites esenciales con actividad antibacteriana	60

LISTA DE ACRÓNIMOS

OMS	Organización Mundial de la Salud
WHO	The World Health Organization
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna abierta
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
EM	Espectrometría de Masas
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
DH	Extracto de diclorometano de las hojas de <i>C. ciliatoglandulifer</i>
DT	Extracto de diclorometano de los tallos de <i>C. ciliatoglandulifer</i>
DR	Extracto de diclorometano de las raíces de <i>C. ciliatoglandulifer</i>
MH	Extracto de metanol de las hojas de <i>C. ciliatoglandulifer</i>
MT	Extracto de metanol de los tallos de <i>C. ciliatoglandulifer</i>
MR	Extracto de metanol de las raíces de <i>C. ciliatoglandulifer</i>
RA	Resistencia a los antibióticos
CMI	Concentración mínima inhibitoria
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
EtOH	Etanol
ATCC	American Type Culture Collection
RT	Enzima transcriptasa inversa del VIH-1
IAAS	infecciones asociadas con la atención de la salud
ESBL	β -lactamasas de espectro extendido
PBP	proteínas de unión a penicilina
COSY	Correlated Spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
APT	Attached Proton Test
DEPT°	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
NIST	National Institute of Standards and Technology

SEM	Error estándar del promedio
MeOH	Metanol
PMTCC	Precipitado del extracto metanólico de los tallos de <i>C. ciliatoglandulifer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
D ₂ O	Agua deuterada
PRL	Piperacilina
CDZ	Ceftazidima
IPM	Imipenem
CN	Gentamicina
LEV	Levofloxacino
CC	<i>Croton ciliatoglandulifer</i>
CT	<i>Croton tetradenius</i>
CP	<i>Croton pulegido</i>

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que la resistencia a los antibióticos (RA) es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo (OMS, 2020a). La resistencia antimicrobiana se define como el mecanismo o capacidad que tiene un microorganismo para disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos (Calderón-Rojas y Aguilar-Ulate, 2016). Ante tal problemática mundial, se ha visto un descenso en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos después de su época de oro de 1945 a 1965. Es en dicha época que se desarrollaron la mayoría de los antimicrobianos (Hutchings *et al.*, 2019). Dichos fármacos se siguen utilizando, pero debido a la resistencia generada por los microorganismos, urge el descubrimiento de nuevos agentes antimicrobianos.

La fuente primaria para el desarrollo de nuevos fármacos y tratamientos para las diversas enfermedades la constituyen los productos naturales, entre ellos los provenientes de las plantas medicinales. El punto de partida para el descubrimiento de nuevos fármacos basados en plantas es la identificación de plantas candidatas mediante el uso tradicional documentado y no documentado (Katiyar *et al.*, 2012). Entre las plantas de mayor interés, se encuentran las del género *Croton* (Euphorbiaceae). Las especies de este género poseen diversos usos tradicionales, incluyendo como insecticidas, vermífugas, diuréticas, antisépticas, purgantes, analgésicas y antipiréticas, y para tratar heridas, tumores, cáncer, epilepsia, diabetes, inflamación, malaria, fiebre, diarrea, tuberculosis y para una variedad de síntomas gastrointestinales (Palmeira *et al.*, 2006). Además de los usos tradicionales, existen reportes de evaluaciones farmacológicas importantes, entre ellas y la de mayor interés para este trabajo se encuentra la actividad antimicrobiana, ya que se ha reportado que los extractos hidroalcohólicos de las especies *Croton urucurana* Baillon, *C. lechleri* y *C. draco* fueron efectivos contra la mayoría de las cepas evaluadas, entre las que se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y las del género *Salmonella* (Peres *et al.*, 1997; Corrales-Ramírez *et al.*, 2013; Morales-Ubaldo *et al.*, 2020).

El presente proyecto tuvo como objetivo contribuir al conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en las partes aéreas y raíces de *Croton ciliatoglandulifer* y si dicha planta tiene efecto antimicrobiano sobre los microorganismos seleccionados (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Kosaconia cowanii*). La evaluación de su potencial antimicrobiano y el conocimiento de su perfil en metabolitos secundarios aportaron datos útiles sobre esta especie medicinal de *Croton*, ya que actualmente, a pesar de ser considerada endémica de México (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018), poco se sabía de su composición y efectos antimicrobianos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Actividad antimicrobiana de compuestos originados de plantas

En los últimos años se han propuesto diversas estrategias para superar la resistencia a los antibióticos. Una de ellas de gran interés es la combinación de otras moléculas con los antibióticos con eficacia reducida, lo que aparentemente restaura la actividad antibacteriana deseada (Brown, 2015). Estas moléculas pueden provenir de fuentes naturales. Diversas investigaciones han demostrado que los compuestos fitoquímicos pueden actuar solos o en combinación con antibióticos para mejorar la actividad antibacteriana contra una amplia variedad de bacterias (Khameneh *et al.*, 2019).

Las clases de metabolitos secundarios que presentan mayores propiedades antimicrobianas pueden clasificarse en función de sus estructuras químicas y origen biosintético. Los grupos principales son alcaloides, compuestos fenólicos, compuestos que contienen azufre, cumarinas, terpenos, aceites esenciales, lectinas y polipéptidos (Mickymaray, 2019; Khameneh *et al.*, 2019 y Vaou *et al.*, 2021).

2.1.1. Alcaloides

Los alcaloides son estructuras químicamente muy diversas de compuestos nitrogenados generalmente heterocíclicos, que pueden tener efectos analgésicos, antiespasmódicos y antimicrobianos (Vaou *et al.*, 2021). Representan un tipo potencialmente nuevo de antibiótico natural con un amplio espectro antibacteriano, reacciones adversas raras y una baja tendencia a producir resistencia a los medicamentos. Sus principales mecanismos antibacterianos incluyen la inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, el cambio en la permeabilidad de la membrana celular, la inhibición del metabolismo bacteriano y la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas (Yan *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que la combinación de alcaloides y fármacos aumenta la eficacia de éste último. La piperina, por ejemplo, (1) (Figura 1) es un alcaloide de tipo piperidina aislado de *Piper nigrum* y *Piper longum*. Cuando se coadministró con ciprofloxacina, inhibió el crecimiento de un *S. aureus* mutante. Además, redujo notablemente los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la ciprofloxacina. La administración conjunta de piperina y gentamicina fue eficaz

contra la infección por SARM (*Staphylococcus aureus* Resistente a Metilicina). Se ha estudiado la aplicación de piperina como inhibidora de las bombas de expulsión de *S. aureus* y SARM (Khameneh *et al.*, 2019).

La berberina (2) (Figura 1) es un alcaloide de isoquinolina, que se puede encontrar en las raíces y la corteza del tallo de especies del género *Berberis*, que también es el principal ingrediente activo de *Rhizoma coptidis* y *Cortex phellodendri*. Este compuesto ha mostrado actividad contra bacterias, hongos, protozoos y virus. La intercalación del compuesto en el ADN, así como en la ARN polimerasa, la girasa y la topoisomerasa IV y, por último, la inhibición de la división celular, son los mecanismos de acción antibacteriana de la berberina (Khameneh *et al.*, 2019).

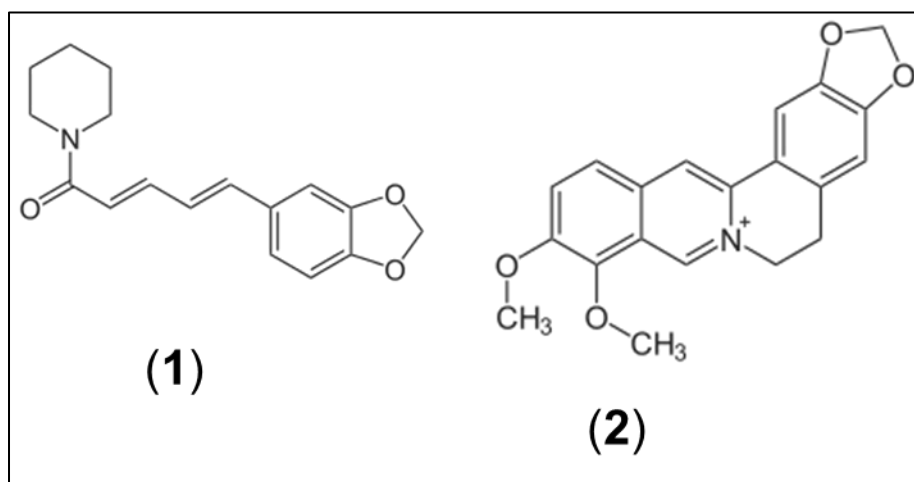


Figura 1. Estructuras de los alcaloides piperina (1) y berberina (2) (Khameneh *et al.*, 2019).

2.1.2. Compuestos fenólicos

Los polifenoles, cuya característica estructural común es que poseen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, pueden agruparse, por ejemplo, en familias según el número y disposición de los átomos de carbono en su estructura (Manso *et al.*, 2022). Estos compuestos, como moléculas bioactivas, juegan un papel importante en la mejora de la actividad antibiótica contra patógenos resistentes a través de varios mecanismos (Górniak *et al.*, 2019). Los mecanismos principales por el cual actúan los compuestos fenólicos son la inhibición de las bombas de expulsión (Khameneh *et al.*, 2019). Como ejemplo, está la baicaleína (3), que es una flavona (Figura 2) aislada de las raíces de *Thymus vulgaris*,

Scutellaria baicalensis, *S. litwinowii* y *S. lateriflora*. La baicaleína también podría restaurar notablemente la eficacia de los antibióticos β -lactámicos, la tetraciclina y la ciprofloxacina contra SARM a través de la inhibición de la bomba de expulsión NorA, debido a que se han observado efectos sinérgicos como resultado de la combinación de **3** con la primera tetraciclina descubierta, que es al mismo tiempo representante genérico del gran grupo de las tetraciclinas, contra *E. coli* (Khameneh *et al.*, 2019).

Otro compuesto fenólico es la biocanina A (**4**) (Figura 2), una isoflavona cuyo efecto antimicrobiano reside en la actividad inhibitoria del sistema de eflujo de SARM41577. Estudios indican que esta sustancia podría inhibir las bombas de expulsión de esta cepa al reducir la expresión de la proteína NorA (Zou *et al.*, 2014). Flavonoides como el kaempferol y la quercetina han mostrado inhibición de la expresión de las bombas de expulsión, mientras que, para otros compuestos fenólicos como los taninos, el ácido chebulínico y las antraquinonas, se ha reportado que su actividad antimicrobiana es debida a la capacidad de inhibir la ADN girasa. Los flavonoides también pueden interactuar con la membrana de la célula bacteriana, inhibiendo su síntesis, como es el caso de la naringenina, el eriodictiol y la taxifolina (Khameneh *et al.*, 2019).

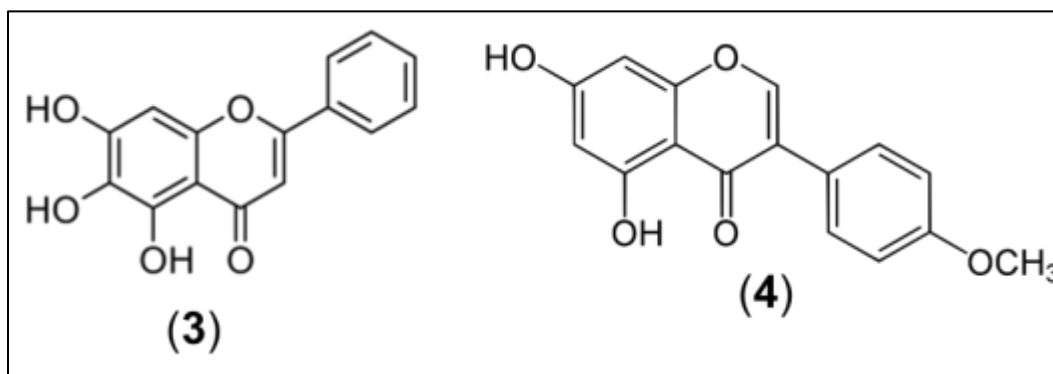


Figura 2. Estructuras de los compuestos fenólicos baicaleína (**3**) y biocanina A (**4**) (Khameneh *et al.*, 2019).

2.1.3. Terpenos

Los terpenos son compuestos naturales orgánicos que contienen unidades de dimetilalil-PP e isopentenil-PP. Su principal actividad antimicrobiana es la alteración de la membrana (Mickymaray, 2019). Se consideran la familia más diversa de productos naturales que realizan numerosas funciones que van desde la

participación en la estructura primaria de las células, hasta la contribución a las funciones celulares (Vaou *et al.*, 2021). Existen abundantemente en flores, frutas y verduras; especialmente, se pueden encontrar en alta concentración en las estructuras reproductivas y el follaje de las plantas, durante e inmediatamente después de la floración. Los terpenos son también los componentes principales de los aceites esenciales y otorgan alguna fragancia peculiar (Khameneh *et al.*, 2019 y Vaou *et al.*, 2021).

El mecanismo antimicrobiano de los terpenos está estrechamente relacionado con sus características lipofílicas (Khameneh *et al.*, 2019). Los monoterpenos impactan preferentemente en las estructuras de la membrana, aumentando su fluidez y permeabilidad, alterando la topología de sus proteínas y generando alteraciones a lo largo de la cadena de respiración (Vaou *et al.*, 2021).

Aunque la actividad antibacteriana de los terpenos sigue siendo estudiada, estos muestran una fuerte actividad, especialmente contra las bacterias Gram-positivas (Khameneh *et al.*, 2019; Vaou *et al.*, 2021). Sin embargo, algunos terpenos como el timol (**5**), el eugenol (**6**), la carvona (**7**) y el carvacrol (**8**) y el fenólico cinamaldehído (**9**) (Figura 3) desintegran la membrana externa de varias bacterias gramnegativas, liberando lipopolisacáridos y aumentando la permeabilidad de la membrana (Mickymaray, 2019).

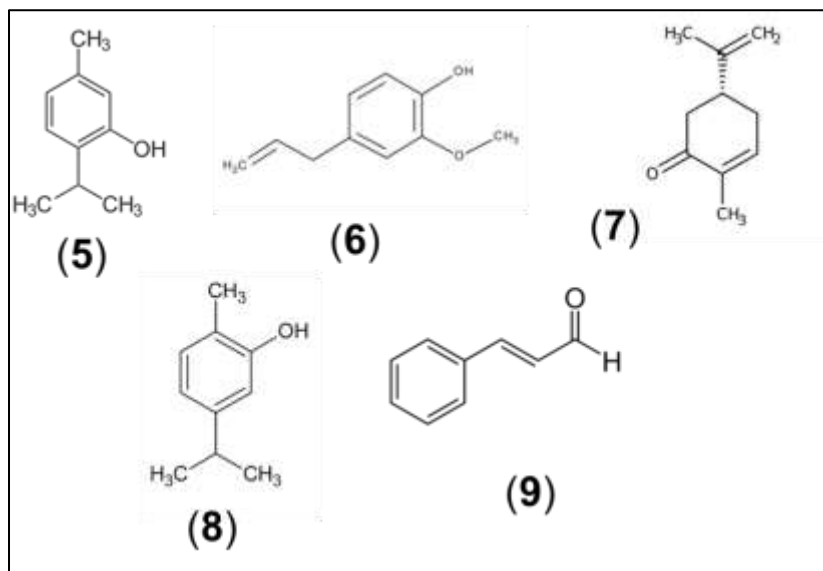


Figura 3. Estructuras de los monoterpenos timol (**5**), eugenol (**6**), carvona (**7**) y carvacrol (**8**) y el cinamaldehído (**9**) (Mickymaray, 2019).

Los alcoholes terpénicos, con diferentes cadenas de carbono alifáticas y abiertas, son estructuras que también han sido evaluadas ante patógenos. El farnesol (**10**) y el nerolidol (**11**) (Figura 4) mostraron un fuerte efecto contra *S. aerus*, con una concentración mínima bactericida (CMB) de 20 y 40 µg/mL, respectivamente. Los compuestos **10** y **11** fueron evaluados en un modelo que consistió en examinar la interacción de éstos con la membrana celular bacteriana mediante la evaluación de la fuga de iones K⁺ intracelulares. Propusieron que la fuga de K⁺ de las células refleja la potencia antibacteriana de los compuestos perturbadores de la membrana (Khameneh *et al.*, 2019).

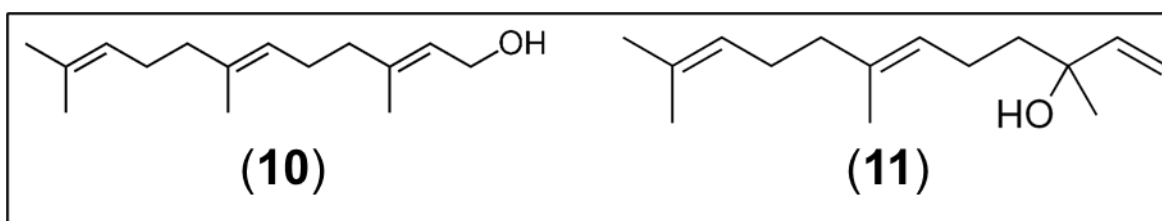


Figura 4. Alcoholes terpénicos farnesol (**10**) y nerolidol (**11**) (Khameneh *et al.*, 2019).

2.2. Género *Croton*

El género *Croton* pertenece a la familia Euphorbiaceae que contiene aproximadamente 1300 especies de árboles, arbustos y hierbas, distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Salatino *et al.*, 2007). Su distribución geográfica abarca América del Sur, del Norte y Central, así como África y Asia (Xu *et al.*, 2018).

En cuanto a la composición química del género *Croton*, se reporta que contiene diversos diterpenoides, incluidos de los tipos clerodano, tigliano, kaurano, labdano, cembrano y pimarano, con una amplia gama de actividades biológicas (Xu *et al.*, 2018). *Croton* también es rico en alcaloides activos, como la taspina o del tipo bencilisoquinolina (Salatino *et al.*, 2007).

Las especies del género tienen un uso muy extendido como medicinales, pues son muy útiles como estimulantes y tónicos, insecticidas o vermífugas, diuréticas, antisépticas, purgantes, analgésicas y antipiréticas, y para tratar heridas, tumores, cáncer, epilepsia, diabetes, inflamación, malaria, fiebre, diarrea, tuberculosis y para una variedad de síntomas gastrointestinales (Palmeira *et al.*, 2006).

En México, se han identificado las siguientes especies endémicas: *Croton arboreous* Millsp, la cual es conocida como “cascarillo” en Tabasco y Chiapas y *Croton draco* Cham. & Schltdl., que es un arbusto nativo y conocido como una de las plantas “sangre de dragón”, debido a que tienen una savia roja muy utilizada en la medicina tradicional para la tos, la gripe, la diarrea, úlceras, y tópicamente como cicatrizante de heridas para cortes, llagas abiertas, herpes, como antiséptico después de la extracción de dientes y para llagas orales (Salatino *et al.* 2007). En Oaxaca, se encuentra *Croton ciliatoglandulifer*, considerada endémica, conocida como Xunashe y que se utiliza tradicionalmente para el control biológico de varios patógenos asociados con infecciones comunes (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

2.2.1. Metabolitos secundarios identificados en el género *Croton*

2.2.1.1. *Croton caudatus* Geisel

De los tallos de *Croton caudatus Geisel*, se aisló una flavona, novedosa hasta entonces, llamada crotoncaudatina, junto con nueve análogos conocidos: 4'-heptametoxiflavona, tangeretina, nobiletina, 5,6,7,4'-tetrametoxi-flavona, sinensetina, kaempferol, tilirosida, 3-O-rutinosil kaempferol y rutina (Zou *et al.*, 2010).

2.2.1.2. *Croton gossypiifolius* Vahl

Especie que se encuentra entre las conocidas como sangre de dragón, debido también, como se ha mencionado anteriormente, a la savia roja y viscosa que exuda su corteza. Un estudio fitoquímico realizado a los extractos orgánicos obtenidos de la corteza reveló la presencia de diversos diterpenos de tipo *ent*-kaurano: ácidos *ent*-kaurenoico, grandiflorénico y *ent*-15 β -E-cinamoil-kaurenoico, además del 3,4-seco-*ent*-kaureno, conocido también como 7-desoxo-geayina, el flavonoide quercitrina y ácidos grasos donde el palmítico resultó ser el mayoritario (Suárez *et al.*, 2013).

2.2.1.3. *Croton linearis* Jacq

De esta planta, se aislaron e identificaron siete compuestos a partir de un extracto etanólico de hojas, los cuales consistieron en 2 alcoholes de cadena larga (2-metil-tetradecan-2-ol y el hexacosanol), un alcano lineal saturado (tetracosano), tres

ácidos grasos (esteárico, 5,8-dien-tetradecanóico y oleico), así como una flavona trimetoxilada (5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona) (García-Díaz *et al.*, 2015).

2.2.1.4. *Croton urucurana* Baillon

De esta especie, se han identificado (+)-galocatequina, procianidina B3, (+)-catequina, (-)-epicatequina, tembetarina, magnoflorina, taspina, 3-oxo-12-epi-barbascoato de metilo, 12-epi-barbascoato de metilo y ácido hardwíckiico (Wolff-Cordeiro *et al.*, 2016).

2.2.1.5. *Croton echinocarpus* Baill

Se estudió el extracto hidroalcohólico (70% EtOH) de hojas de *C. echinocarpus* mediante técnicas cromatográficas con las que se logró el aislamiento de dos alcaloides: coridina y norisoboldina, y sus estructuras se establecieron mediante interpretación de datos espectroscópicos (UV, IR, RMN y EM-IE) (Ravanelli *et al.*, 2015).

2.2.1.6. *Croton cajucara* Benth

Es una planta medicinal popularmente conocida en Brasil como sacaca. En un estudio a partir de una decocción de las hojas, se llevó a cabo un análisis fitoquímico completo mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas. Muchos de los compuestos fueron identificados por primera vez en la especie, tales como O-glucósidos de kaempferol y quercetina, glicósidos de otros flavonoides, taninos y derivados del ácido cinámico (Nascimento *et al.*, 2017).

2.2.2. Estudios farmacológicos del género *Croton*

2.2.2.1. Actividad antiinflamatoria

- *Croton urucurana* Baillon

La actividad antiinflamatoria se evaluó utilizando diferentes concentraciones del extracto. El estudio se basó en el edema de la pata y el reclutamiento de leucocitos en la cavidad peritoneal de ratones, ambos inducidos por carragenina. Las contorsiones abdominales causadas por el ácido acético y la duración del lamido de patas inducido por formalina fueron los modelos empleados para evaluar la actividad

antinociceptiva en la cual el extracto exhibió propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas, corroborando su uso en medicina popular. Esos efectos se relacionaron con la presencia de diterpenos, alcaloides y flavonoides, que fueron identificados en este mismo estudio (Wolff-Cordeiro *et al.*, 2016).

- *Croton cajucara* Benth

Las fracciones de diferentes polaridades de las hojas de *Croton cajucara* Benth se evaluaron mediante un modelo de edema de ratón inducido por una inyección intraplantar de carragenina. Se determinó que las fracciones exhiben propiedades antiinflamatorias (Nascimento *et al.*, 2017).

2.2.2.2. Actividad antibacteriana

- *Croton urucurana* Baillon

Se llevó a cabo un ensayo de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico (EtOH-H₂O), así como de algunas fracciones del extracto metanólico y algunos de los compuestos aislados de este último extracto, como el ácido acetil aleuritólico contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*, resultando este último compuesto con la mejor concentración inhibitoria mínima contra ambos microorganismos (Peres *et al.*, 1997).

- *Croton lechleri* Muell. Arg

Sus extractos etanólico y de éter de petróleo fueron evaluados *in vitro* frente a aislamientos bacterianos aeróbicos de pacientes [*Staphylococcus aureus* (ATCC) y *Escherichia coli* (ATCC)] con úlceras cutáneas mediante pruebas de difusión en disco, dilución en agar y difusión en pozo. En los ensayos de sensibilidad antimicrobiana *in vitro*, se evidenció que los extractos de esta especie eran efectivos frente a la mayoría de aislamientos bacterianos del estudio, siendo el extracto etanólico el de mayor potencial antibacteriano (Corrales-Ramírez *et al.*, 2013).

- *Croton draco* Cham. & Schltdl:

La actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico fue evaluada sobre bacterias de importancia sanitaria, entre ellas, cepas de *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerasuis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*. Las bacterias mostraron diferentes grados de sensibilidad. Sin embargo, se determinó una mayor actividad frente a bacterias Gram positivas como *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *B. subtilis* (Morales-Ubaldo *et al.*, 2020).

2.2.2.3. Actividad antiparasitaria

Se evaluó la actividad leishmanicida y la toxicidad aguda oral del extracto hidroalcohólico de los tallos de *Croton alnifolius* Lam, para lo cual se infectaron ratas hámster con promastigotes de *Leishmania peruviana* en la pata trasera derecha. Se encontró que el extracto posee actividad leishmanicida, comparable con la del estibogluconato sódico. La DL₅₀ estimada fue de 1396.114 mg/kg, clasificándose el extracto de esta especie vegetal como ligeramente tóxico (Inostroza *et al.*, 2011).

2.2.2.4. Potencial Anti-VIH

Los alcaloides coridina y norisoboldina aislados del extracto hidroalcohólico de *Croton echinocarpus* Baill mostraron un significativo potencial anti-VIH in vitro, inhibiendo el 40% de la actividad de la enzima transcriptasa inversa del VIH-1 (RT). La norisoboldina fue más eficiente para inhibir la actividad de la RT (Ravanelli *et al.*, 2015).

2.3. *Croton ciliatoglandulifer*

2.3.1. Descripción

C. ciliatoglanduliferus Ort. fue el primer nombre asignado a esta planta por Casimiro Gómez Ortega, pero actualmente, el nombre más adoptado para su identificación es *C. ciliatoglandulifer*, que se encuentra distribuida de manera silvestre en la región semidesértica de Tehuacán, en el estado de Puebla, México y también es considerada una planta de la etnofarmacología oaxaqueña (Huerta *et al.*, 2002 y Sánchez-Hernández *et al.*, 2018). *C. ciliatoglandulifer* es un arbusto erecto, de 1 m a 2.5 m de altura, con muchas ramas, densamente estrellado-pilosos. Las hojas son más anchas que largas; en el anverso son de color verde y casi lisas, el reverso usualmente es verde pálido y con muchos pelillos estrellados; tiene en los bordes

unas hebras. Las flores son blancas y solitarias; los frutos son unas cápsulas pequeñas. Una representación gráfica de esta especie se encuentra en la Figura 5.

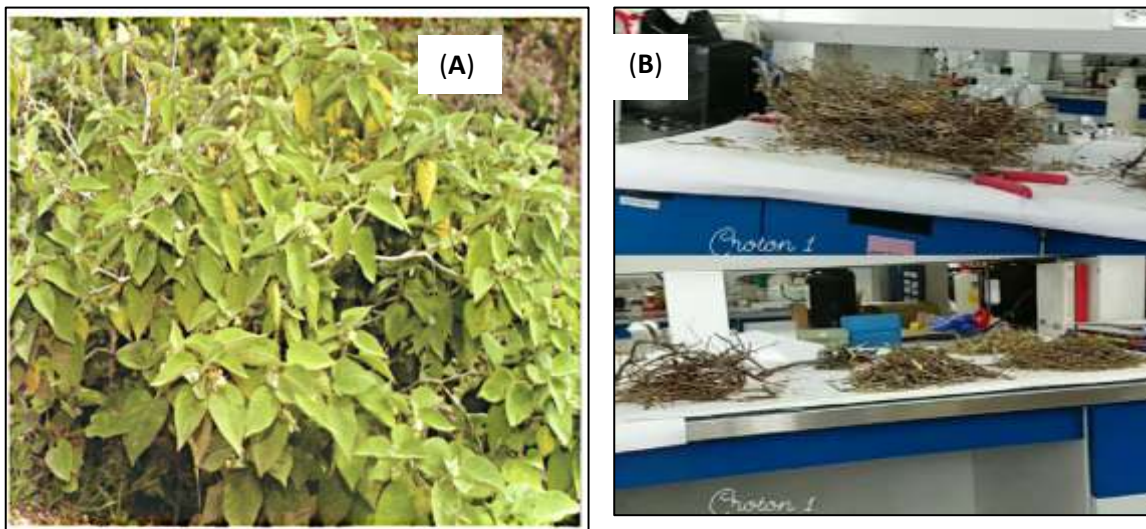


Figura 5. Fotografías de *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. (A) creciendo de manera silvestre en Tehuacán, Puebla, México (Huerta *et al.*, 2002); (B) planta propia.

2.3.2. Usos tradicionales

Se ha utilizado como repelente de insectos y como medicinal para curar algunas enfermedades (González-Vázquez *et al.*, 2006). Remedios hechos con la planta completa se prescriben para tratar el "resfriado de estómago", el empacho, las heridas (con un efecto cicatrizante), picadura de alacrán, la infección de los ojos y el paludismo. Algunos autores le atribuyen propiedades antisépticas (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

2.3.3. Metabolitos secundarios identificados

Mediante un estudio químico guiado por bioactividad del extracto de hexano de hojas de *C. ciliatoglanduliferus*, se aisló la mezcla de dos flavonoides, los cuales fueron separados por métodos cromatográficos y caracterizados por espectroscopia como retusina y paquipodol (González-Vázquez *et al.*, 2006), cuyas estructuras se muestran en la Figura 6.

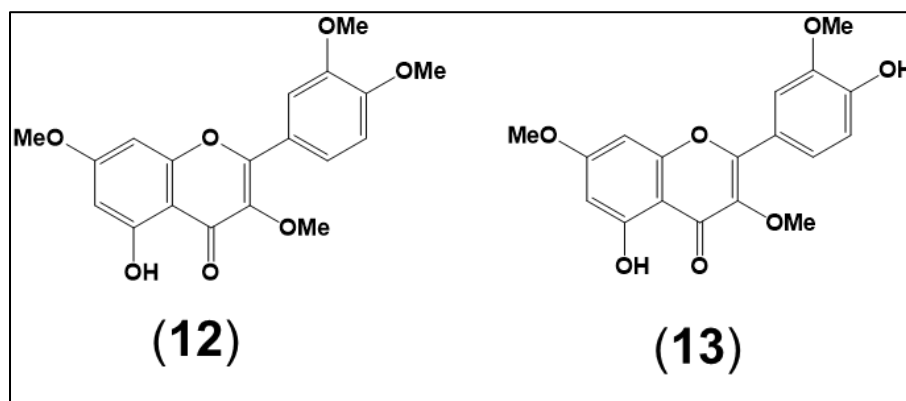


Figura 6. Estructuras de la retusina (5-hidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona) **(12)** y del paquipodol (5,4'-dihidroxi-3,7,3'-trimetoxiflavona) **(13)** (González-Vázquez *et al.*, 2006).

2.4. Infecciones bacterianas

Una infección bacteriana es causada por bacterias que a menudo pueden tratarse exitosamente con antibióticos. En la actualidad, las infecciones microbianas son consideradas un problema de salud que representa importantes costos, tanto en lo económico como en el bienestar de las personas afectadas. La importancia de la prevención y el control de las infecciones por bacterias multirresistentes es de suma importancia, ya que generan un problema de salud pública mundial (Pachay-Solórzano, 2018). Aquellas infecciones para las cuales urge actualmente la búsqueda de nuevos tratamientos son las IAAS (infecciones asociadas con la atención de la salud) anteriormente conocidas como infecciones nosocomiales, que desde hace tiempo y en los últimos años han registrado un ascenso continuo y preocupante de las infecciones, los síndromes sépticos y la resistencia bacteriana asociada con la atención de la salud. Cada vez más, las infecciones provocadas por bacterias multirresistentes son más frecuentes y graves, tanto en ambientes hospitalarios, como a nivel comunitario (Suárez-Méndez *et al.*, 2016).

2.5. Tratamiento: Antimicrobianos

Los antibióticos conocidos también como antimicrobianos son fármacos que se utilizan para tratar infecciones bacterianas. Estos acaban con los microorganismos o detienen su reproducción, facilitando su eliminación por parte de las defensas naturales del organismo (Werth *et al.*, 2020).

Los antimicrobianos pertenecen a varias clases, cada una con diferentes objetivos al dirigirse específicamente a funciones microbianas vitales. Cada clase de agentes antimicrobianos actúa de forma diferente para matar y/o inhibir a las bacterias (Abushaheen *et al.*, 2020). Se agrupan según su estructura química y pueden ser efectivos contra diferentes bacterias. Sin embargo, los antibióticos pertenecientes a cada clase concreta a menudo afectan el cuerpo de manera diferente.

Las clases de antibióticos comprenden las siguientes: aminoglucósidos, carbapenémicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, glicopéptidos y lipoglicopéptidos (como la vancomicina), macrólidos (como las eritromicinas y la azitromicina), beta-lactámicos (penicilinas, aztreonam), oxazolidinonas (como linezolid y tedizolid), polipéptidos, rifamicinas, sulfamidas, estreptograminas (como quinupristina y dalfopristina) y tetraciclinas (Werth *et al.*, 2020).

La aparición de los antibióticos en el siglo pasado no solamente contribuyó a disminuir las altas tasas de morbilidad y mortalidad que existían, sino que también se dio un gran paso para el progreso de procedimientos complejos y altamente riesgosos, tales como la profilaxis quirúrgica, quimioterapias, trasplantes de órganos y de células hematopoyéticas. Lamentablemente, este progreso alcanzado en la cura de las enfermedades infecciosas está amenazado, debido al alza importante de las tasas de resistencia de las bacterias a los antibióticos, existiendo bacterias con una creciente tasa de resistencia (Fernández-Ruiz *et al.*, 2021).

2.6. Resistencia a los antibióticos

La OMS y diversas otras organizaciones oficiales ligadas a las infecciones bacterianas sostienen que la resistencia antibacteriana (RA) es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo (Aslam *et al.*, 2018). La RA se produce, entre otros mecanismos, cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos (OMS, 2020a). Sin embargo, el fracaso persistente para desarrollar o descubrir nuevos antibióticos y principalmente el uso no juicioso de antibióticos son los factores predisponentes asociados con la aparición de resistencia a los antibióticos, así como la propagación y persistencia de bacterias multirresistentes (Aslam *et al.*, 2018). Las bacterias

multirresistentes suelen presentar una alta capacidad de diseminación epidémica, no solo intrahospitalaria sino también inter- y extrahospitalaria (Oteo *et al.*, 2016). La resistencia de las bacterias a los antimicrobianos puede ser producida por selección natural, o como producto de mutaciones ocurridas al azar, o puede inducirse mediante la aplicación de presión selectiva a una población (Calderón-Rojas y Aguilar-Ulate, 2016), o bien a la superpoblación, una mayor migración global, un mayor uso de antibióticos en las clínicas y la producción animal, la presión de selección, el saneamiento deficiente, la propagación de la vida silvestre y un sistema de alcantarillado deficiente (Aslam *et al.*, 2018).

Para el año 2017, la OMS (2020b) publicó una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos. Dicha lista se divide en tres categorías, de acuerdo con la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta y media (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de patógenos prioritarios emitida por la OMS (2020b).

Patógeno	Prioridad
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Crítica
<i>Enterobacteriaceae</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Enterococcus faecium</i>	Elevada
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Helicobacter pylori</i>	
<i>Campylobacter spp</i>	
<i>Salmonellae</i>	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Media
<i>Haemophilus influenzae</i>	
<i>Shigella spp.</i>	

La lista fue construida mediante una técnica de análisis de decisiones de múltiples criterios desarrollada por un grupo de expertos internacionales. Los criterios para elegir estos patógenos fueron los siguientes: 1) el grado de letalidad de las infecciones que provocan, 2) el tiempo de tratamiento u hospitalización, 3) la frecuencia con la que presentan resistencia a los antibióticos existentes, 4) la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas, 5) si las infecciones pueden o no prevenirse, 6) la cantidad de opciones terapéuticas que quedan y 7) si se están investigando y desarrollando nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan (OMS, 2020b).

El grupo de prioridad crítica incluye bacterias multirresistentes, especialmente peligrosas en hospitales, que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones de la corriente sanguínea y neumonías. Estas pueden residir en dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos, entre las que se incluyen: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias *enterobacteriáceas* como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia* y *Proteus*. En cuanto a los grupos de prioridad alta y media, estos incluyen a aquellas bacterias que exhiben una farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades comunes como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias por *Salmonella* (OMS, 2020b).

2.7. Mecanismos de resistencia

La resistencia antimicrobiana se refiere al mecanismo y/o capacidad que tiene un microorganismo para resistir y sobrevivir a los efectos de un antibiótico, o mediante el cual la bacteria puede disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos (Calderón-Rojas y Aguilar-Ulate, 2016). Las bacterias han adoptado diversos mecanismos para evadir la acción de los antibióticos, ya sea impidiendo el acceso de estos a los sitios blanco por reducción de permeabilidad de membranas, o incrementando la expresión de bombas de expulsión, o secretando enzimas que degradan e inactivan, o modifican las estructuras químicas de los fármacos y/o provocan cambios de los sitios objetivos de los antibióticos (Lebeaux *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2015). La resistencia a los antimicrobianos puede deberse a modificaciones estructurales y características funcionales propias del

microorganismo o características adquiridas en respuesta al estrés sufrido por una presión selectiva (Troncoso *et al.*, 2017).

Los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos se dividen en cuatro categorías principales: (1) Bombas de eflujo o expulsión del antibiótico; (2) Modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas; (3) Bloqueo de la penetración del antibacteriano mediante modificación del sitio activo; (4) Alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana (Reygaert, 2018). Los 4 mecanismos principales se ilustran a continuación en la Figura 7.

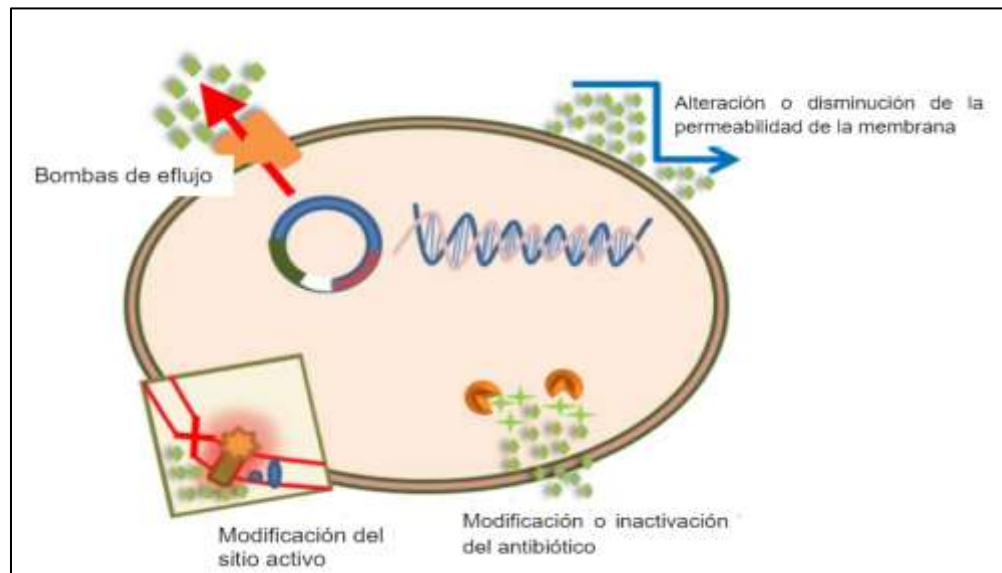


Figura 7. Mecanismos generales de resistencia a los antimicrobianos (Reygaert, 2018).

Existe una variación en los tipos de mecanismos utilizados por las bacterias Gram negativas frente a las Gram positivas. Las Gram negativas utilizan los cuatro mecanismos principales, mientras que las Gram positivas utilizan con menos frecuencia la alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana puesto que no tienen una membrana externa (Reygaert, 2018).

2.7.1. Principales mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias

2.7.1.1. Bombas de eflujo o expulsión del antibiótico

Es el mecanismo que ocurre a nivel de la envoltura celular y que permite remover antibióticos desde el compartimiento intracelular a través de bombas de expulsión, las cuales están ubicadas en la membrana citoplasmática de bacterias Gram

positivas y en el espacio intermembranal para el caso de las Gram negativas (Beceiro *et al.*, 2013).

Las bombas de expulsión o bombas de eflujo son proteínas de membrana que facilitan la salida de sustancias hacia el exterior de la célula. Estos sistemas cumplen un rol fundamental en el metabolismo y en la actividad celular de la bacteria, teniendo la propiedad de transportar hacia el exterior de la membrana una amplia variedad de sustancias, incluyendo antibióticos; esto impide obtener concentraciones óptimas para su acción, generando resistencia antibiótica (Troncoso *et al.*, 2017).

La mayoría de las bacterias poseen muchos tipos diferentes de bombas de eflujo, las cuales se clasifican en cinco familias principales representadas en la Figura 8, según su estructura y fuente de energía: 1) la familia de casetes de unión a ATP (ABC), 2) la de extrusión de compuestos tóxicos y multifármacos (MATE), 3) la de pequeñas resistencias a múltiples fármacos (SMR), 4) la principal superfamilia facilitadora (MFS) y 5) la de división celular de nodulación de resistencia (RND). La mayoría de estas familias de bombas de eflujo son de un solo componente que transporta sustratos a través de la membrana citoplasmática (Reygaert, 2018).

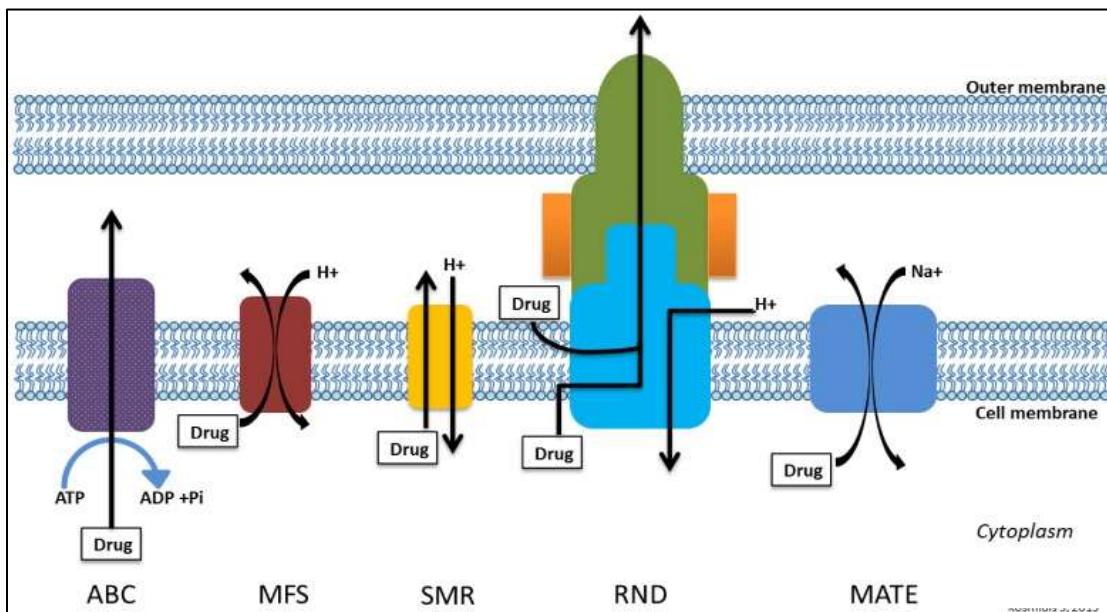


Figura 8. Estructuras de las principales bombas de expulsión (Reygaert, 2018).

2.7.1.2. Modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas

Este tipo de mecanismo se da cuando la bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico. Estas enzimas pueden ser: β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) y β -lactamasas plasmídicas de tipo AmpC, ya que muchas bacterias son capaces de producirlas (Gastelo-Acosta *et al.*, 2018). Actúan de manera que hidrolizan la unión peptídica encíclica del anillo β -lactámico. Entre los grupos de organismos que las presentan, destacan *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Proteus mirabilis* (Oteo *et al.*, 2016).

2.7.1.3. Modificación del sitio activo

Otra forma de resistencia se basa en la capacidad de las bacterias para generar sustancias metabólicas que compiten con el sitio activo del fármaco, provocando una pérdida de afinidad de este, y por ende, impidiendo la acción del antibiótico (Troncoso *et al.*, 2017).

La alteración del sitio activo se da por la modificación de un aminoácido que, como consecuencia, genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión del antibiótico. Hay dos tipos de modificación del sitio activo: a) modificación de PBP (proteínas de unión a penicilina) que es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglicano, compuesto de la pared celular principalmente en bacterias Gram positivas. Si se produce la mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los betalactámicos, estos no pueden actuar, generando así una resistencia. b) modificación ribosomal que se da cuando los genes *erm A* y *erm B* modifican el sitio activo del ribosoma mediante metilación, interfiriendo con la capacidad del fármaco para unirse al ribosoma y provocando un mecanismo importante en la resistencia, especialmente a macrólidos como en el caso de *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Calderón-Rojas y Aguilar-Ulate, 2016; Reygaert, 2018).

2.7.1.4. Alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana

La restricción del acceso de los antibióticos mediado por porinas de membrana es uno de los mecanismos de resistencia de la envoltura celular más comunes. Estos mecanismos actúan evitando el ingreso del antimicrobiano (Troncoso *et al.*, 2017). Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared celular que impiden

la entrada de ciertos antibióticos (Gastela *et al.*, 2018). La alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana se produce por cambios en el diámetro y/o número de porinas que pueden bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria. De esta manera, el antibiótico no puede penetrar la superficie bacteriana y alcanzar el núcleo celular, de modo que es la forma más frecuente de resistencia natural (Calderón-Rojas y Aguilar-Ulate, 2016).

Las porinas son estructuras proteicas que determinan la permeabilidad de la membrana externa por medio de canales abiertos al tránsito de agua, facilitando el transporte pasivo de moléculas hidrofílicas. Por medio de estos canales, se selecciona el ingreso de partículas según carga y tamaño de éstas, permitiendo la difusión de un elevado número de moléculas, incluyendo antibióticos (Troncoso *et al.*, 2017).

2.8. Microorganismos resistentes a betalactámicos

La pared celular de las bacterias, tanto las Gram positivas como las Gram negativas, están estructuralmente compuestas por peptido-glicano que se sintetiza por la transpeptidación de cadenas de disacáridos repetidos de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico formadas mediante un enlace glicosídico β -1,4 por medio de una reacción de transglicosilación; ambas reacciones se llevan a cabo por PBP. Es durante la reacción de transpeptidación que los antibióticos betalactámicos realizan su acción bactericida al funcionar como análogos de las cadenas sobre las que actúan las proteínas de unión a penicilina, inhibiendo así la biosíntesis de la pared celular (Peacock y Peaterson, 2015).

Los antibióticos betalactámicos comprenden cuatro clases: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos. El conjunto de estas moléculas, permite tratar la mayoría de infecciones bacterianas (Hamon *et al.*, 2021). Sin embargo, cada uno de los tipos de betalactámicos puede estimular un mecanismo de resistencia diferente. Uno de los primeros mecanismos de resistencia fue el relacionado con la penicilina en 1949 por parte de cepas de *Staphylococcus*, entre ellas *Staphylococcus aureus*, con resistencia debido a la presencia de β -lactamasas (Estrada-Calles *et al.*, 2022).

2.8.1. *Staphylococcus aureus*

Conocida como estafilococo dorado, es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva, considerada un patógeno oportunista común que tiene un alto riesgo de infección. Este patógeno puede causar una amplia variedad de enfermedades y complicaciones, que van desde infecciones cutáneas moderadamente graves hasta neumonía y sepsis mortales. La infección por *S. aureus* puede aumentar la tasa de mortalidad hasta en un 40% (Ding *et al.*, 2019). Las infecciones a causa de este patógeno son particularmente problemáticas debido a la frecuente resistencia a los antibióticos. Un alto porcentaje de *S. aureus* es multiresistente a fármacos inhibidores de la pared celular, como los betalactámicos (metecilina y penicilina) y glucopéptidos (vancomicina) (Vallejo-Pazmiño *et al.*, 2022), entre los cuales el MRSA es el más importante clínicamente (Gordon *et al.*, 2021).

2.8.2. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es un bacilo anaeróbico facultativo, formador de esporas y Gram positivo, que se encuentra de forma ubicua en el polvo, el suelo, las superficies de las plantas o en la rizosfera (Jessberger *et al.*, 2020). De este microorganismo, se han descrito toxinas proteicas (Nhe y Hbl y CytK), que generalmente se piensa que contribuyen al tipo de intoxicación alimentaria diarreica, que generalmente se caracteriza por dolor abdominal y diarrea acuosa (Ehling-Schulz *et al.*, 2019). Además de estas características toxigénicas, las cepas de *B. cereus* son naturalmente resistentes a la penicilina y otros antibióticos β -lactámicos debido a su contenido de β -lactamasas. Por otra parte, algunos estudios revelan que la resistencia puede extenderse a otros antibióticos de uso común, como cloranfenicol, gentamicina, imipenem, eritromicina, tetraciclina y la combinación de trimetoprima/sulfametoxazol (Celestino-Hernández *et al.*, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

La crisis de la resistencia a los antimicrobianos se ha atribuido al uso indebido de estos agentes, la falta de disponibilidad de nuevos fármacos y la aparición de numerosos mecanismos de generación de resistencia a los antibióticos (OMS, 2020b), de tal suerte que el manejo de las enfermedades infecciosas se ha vuelto un asunto complejo. El número de nuevos antibióticos aprobados en las últimas décadas ha disminuido marcadamente y algunos de los nuevos agentes, que parecían ser prometedores en cuanto a su actividad antibacteriana, han tenido que ser retirados del mercado por diversas reacciones adversas serias, algunas potencialmente letales. Además de esto, existe un fracaso persistente para desarrollar o descubrir nuevos antibióticos (Barrantes-Jiménez *et al.*, 2022; Hutchings *et al.*, 2019).

Ante esta problemática de nivel mundial, es necesario buscar tratamientos alternativos. Uno de ellos es el uso de productos naturales provenientes de las plantas medicinales, que no solo se siguen utilizando de manera tradicional, sino que, además han sido fuentes primarias de principios activos de muchos medicamentos, debido a que sus constituyentes químicos pueden tener diversas actividades farmacológicas (Khameneh *et al.*, 2019). Entre esas plantas, se encuentran las pertenecientes al género *Croton*, las cuales son ampliamente distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Salatino *et al.*, 2007). De manera tradicional, las especies de este género se emplean para tratar diversas enfermedades, asumiendo que poseen múltiples actividades farmacológicas como lo son antiparasitarias, antinociceptivas, antiinflamatorias, antivirales e incluso antibacterianas (Palmeira *et al.*, 2006), siendo esta última de mayor importancia para este trabajo. Sin embargo, son escasos los estudios científicos que han corroborado dichos usos medicinales. Una de esas plantas es *Croton ciliatoglandulifer*, de la cual existe poca información científicamente sustentada en cuanto a su actividad antibacteriana y perfil químico. El presente trabajo se enfocó a generar conocimiento básico sobre esos dos aspectos de esta especie en particular, lo cual aporta información valiosa acerca de su potencial como fuente de agentes antimicrobianos para el tratamiento de algunas de las infecciones comunes con problemas de resistencia.

4. HIPÓTESIS

La planta medicinal *Croton ciliatoglandulifer* contiene metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* resistentes a betalactámicos.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar los efectos de los extractos orgánicos y compuestos puros de *C. ciliatoglandulifer* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, bacterias resistentes a betalactámicos.

5.2 Específicos

- Evaluar el efecto de los extractos de *C. ciliatoglandulifer* sobre el crecimiento de *S. aureus* ATCC 29213 y *B. cereus* ATCC 10876.
- Identificar el extracto con mayor actividad y obtener por medio de técnicas cromatográficas (CC y CCF) algunos de los compuestos mayoritarios presentes.
- Identificar los compuestos purificados y otros mayoritarios no aislados por medio de RMN y CG-EM.
- Evaluar el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de los compuestos purificados e identificados, en caso de que no estén previamente descritos sus efectos sobre las dos cepas utilizadas.

6. METODOLOGÍA

6.1. Obtención de extractos de las partes aéreas y raíces

Se pesaron 229 g de hojas, 164.6 de raíces y 704 g de tallos desecados de *Croton ciliatoglandulifer*, los cuales se sometieron a un proceso de molienda en un molino artesanal manual. El polvo resultante se puso a macerar de manera independiente por una semana cada uno, utilizando diclorometano y siguiendo con metanol. Cada extracto se filtró y se secó a presión reducida utilizando un rotaevaporador. Los extractos secos fueron guardados en refrigeración hasta su posterior uso para procedimientos de fraccionamiento y de evaluación antimicrobiana.

6.2. Evaluación de los efectos antibacterianos de los extractos

6.2.1. Cepas bacterianas

Para la evaluación antibacteriana se utilizó la cepa *Bacillus cereus* ATCC 10876 (Celestino-Hernández *et al.*, 2021) y la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Además, se probaron sus efectos sobre dos otras bacterias: *Escherichia coli* y *Kosaconia cowanii*. Las cepas de los géneros bacterianos fueron proporcionadas por el Cepario del Laboratorio de Biología Molecular a cargo del Dr. Juan Campos Guillén, investigador de la Facultad de Química (UAQ) y almacenadas a -70 grados Celsius al 20% en glicerol. Las especificaciones del correcto uso, manejo y eliminación de los microorganismos empleados se llevaron a cabo de acuerdo con los apartados 4 y 6 de la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995.

6.2.2. Método para la evaluación de la actividad antibacteriana

La evaluación antimicrobiana se llevó a cabo con los extractos secos de diclorometano y metanólico de las diferentes partes de *C. ciliatoglandulifer* mediante el ensayo de difusión en disco de Kirby-Bauer (Balouri *et al.*, 2016) para probar la eficacia de los extractos.

En este conocido procedimiento, las placas de agar se inocularon con un inóculo estandarizado del microorganismo de prueba. Posteriormente, se utilizaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro previamente esterilizados que se impregnaron con concentraciones de 3, 5 y 10 mg/ml del solvente correspondiente a la naturaleza del extracto (diclorometano o metanol). Para asegurar la evaporación del solvente en los discos de papel filtro, se dejaron en campana de extracción en intervalos de

2 a 3 horas antes de ser colocados sobre el agar. Se colocaron sobre las placas y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Finalmente, durante este tiempo, el agente antimicrobiano se difundió en el agar para ver la inhibición de la germinación y el crecimiento del microorganismo de prueba y luego se midieron los diámetros de las zonas de inhibición en milímetros (Balouri *et al.*, 2016).

El extracto que presentó mayor actividad fue sometido a estudio químico y algunos de sus compuestos identificados. Sin embargo, para otros dos polvos purificados están bajo registro sus espectros de RMN. Para los ensayos antimicrobianos, se emplearon diferentes concentraciones del extracto.

6.2.3. Combinación de los extractos con ampicilina

Para la combinación de los extractos con la ampicilina, se siguió la metodología anterior (punto 6.2.2), con la diferencia de que se adicionó el antibiótico directamente en el agar, hasta lograr una concentración de 100 µg/mL, a una temperatura de 37 °C aproximadamente, para evitar la descomposición del antibiótico. Otras concentraciones probadas de la ampicilina fueron 200, 300, 400, 500 y 600 µg/mL. Una vez mezclado el agar con la ampicilina, las cajas se dejaron reposar hasta la solidificación del agar. Posteriormente, las cajas se inocularon con la bacteria a evaluar y se colocaron los discos con las diferentes concentraciones de los extractos. Finalmente, se incubaron a 37 °C por 24 h. A manera de control, se sembró la bacteria a evaluar en cajas con la mezcla de agar y ampicilina. Dichas cajas fueron posteriormente incubadas en las mismas condiciones.

6.3. Estudio químico del extracto con mayor actividad antibacteriana

6.3.1. Cromatografía en columna abierta (CC)

3.5 g del extracto de diclorometano de raíces se adsorbieron en 5.6 g de gel de sílice (Kieselgel 60 Merk malla de 70-230, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm). Posteriormente, la muestra adsorbida seca se aplicó en una columna de 5 cm de diámetro y 100 cm de alto, previamente rellena con 510.6 g de gel de sílice suspendida en hexano. El gradiente de elución estuvo formado por distintas proporciones de hexano, diclorometano y metanol, iniciando con 100 % de hexano y terminado con 100 % de metanol.

6.3.2. Análisis cromatográfico en capa fina (CCF)

La evolución de la elución de la CC se siguió mediante CCF de las fracciones recolectadas. También se utilizó esta técnica para analizar las complejidades de las fracciones colectadas. Se utilizaron para ese propósito cromatofolios recubiertos con gel de sílice (silica gel 60 GF254 Merck) y una lámpara ultravioleta de longitud de onda corta (254 nm) y larga (365 nm) que permitió visualizar los compuestos. Posteriormente, se realizó el revelado de las placas rociando una solución de sulfato cérico amoniacal (revelador universal), seguido de calentamiento a 80 °C. Las fracciones fueron agrupadas de acuerdo a la similitud de su perfil en CCF.

6.3.3 Identificación de compuestos purificados

La identificación de los compuestos purificados se realizó haciendo uso de la resonancia magnética nuclear (RMN). Se obtuvieron los espectros unidimensionales (^1H , ^{13}C , APT y DEPT 90°) y bidimensionales homonucleares ^1H - ^1H COSY y heteronucleares ^1H - ^{13}C en sus modalidades a un enlace HSQC (de sus siglas en inglés: Heteronuclear Single Quantum Coherence) y a múltiples enlaces HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). El registro de los espectros de RMN se realizó mediante colaboración con la Universidad de Guanajuato. Todos los espectros fueron adquiridos en un espectrómetro de la marca Brüker Avance III HD de 500 MHz del Laboratorio Nacional de Caracterización de Propiedades Físicoquímicas y Estructura Molecular (LACAPFEM) UG-UAA-CONACyT No. 123732 de la Universidad de Guanajuato. Se utilizó D_2O como disolvente y tetrametilsilicio (TMS) como estándar interno.

6.4 Análisis del extracto diclorometánico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)

Los análisis 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 M. en C. Alejandro Núñez Vilchis.

6.4.1 Equipo

Para completar el perfil químico, los extractos obtenidos utilizando diclorometano como disolvente fueron analizados 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.

6.4.2 Preparación de muestras

Se adicionaron 2 mL de diclorometano a cada extracto seco y se agitaron con vórtex durante 30 segundos. Se tomaron 10 microlitros de la disolución y se les adicionaron 990 microlitros de diclorometano; esta disolución fue filtrada con acrodisco de teflón de 13 mm con poro de 0.22 micras.

6.4.3 Análisis de muestras

Se siguió un método estandarizado que se resume a continuación.

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 °C durante 1 min, luego un gradiente de temperatura de 50 °C/min hasta 110 °C, de ahí a 303 °C a 5 °C/min y finalmente, a 335 °C a 20 °C/min. Se inyectó 1 microlitro de cada muestra en modo Splitless. El módulo de inyección se mantuvo a 300 °C. El flujo de helio se mantuvo constante a 1.5 mL/min. La línea de transferencia, fuente de electrones y cuadrupolo 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.

6.4.4 Resultados de análisis de muestras

Se integraron manualmente los picos más abundantes. Los espectros de masas de cada señal fueron comparados con la base de datos del NIST, tomando en cuenta los siguientes criterios:

- Match y R. Match mayor a 900, si no,
- Match mayor de 800 y R Match mayor de 890, si no,
- Match y R. Match mayor a 800, si no,
- Match mayor a 700 y R. Match mayor a 850, si no,
- Match mayor a 700, si no,
- Match entre 600 y 700 y R. Match mayor a 800

En todos los casos, se consideró una probabilidad de coincidencia con el espectro de la base de datos mayor al 1%.

6.5. Estudio químico de los extractos metanólicos por medio de HPLC/UV-VIS

Para el análisis de los compuestos mayoritarios de los extractos metanólicos de *C. ciliatoglandulifer*, se utilizó una columna analítica de fase reversa XDB-C18 (4.6 x 150 mm con tamaño de poro de 5-microns) (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA, USA). El equipo empleado fue un cromatógrafo de líquidos integrado por una bomba cuaternaria de entrega automática de disolventes, modelo e2695 (Waters) y un detector de arreglo de diodos (UV-Visible), modelo 2998 (Waters: Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA). Los extractos fueron analizados en las siguientes condiciones: modo gradiente con fases móviles de H₂O acidulada con ácido fosfórico (999:1) y MeOH acidulado con ácido fosfórico (999:1); flujo de 0.8 mL por min; longitud de onda (λ_{max}) de detección de 280 nm. El gradiente que se utilizó se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Gradiente de las fases móviles para el análisis por medio de HPLC/UV-Vis de extractos metanólicos.

Tiempo (min)	MeOH:H₃PO₄	H₂O: H₃PO₄
0	0%	100%
45	100%	0%
55	0%	100%
65	0%	100%

La adquisición y el procesamiento de los datos obtenidos de este sistema se llevaron a cabo utilizando el programa Empower3 (Waters).

6.6. Análisis estadístico

Los ensayos de la evaluación antimicrobiana se realizaron por triplicado y los datos obtenidos de las zonas de inhibición del crecimiento se expresaron como el promedio \pm el error estándar del promedio (SEM). Sin embargo, los datos no fueron suficientes para realizar un análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre los distintos tratamientos (extractos empleados).

7 RESULTADOS

7.1 Rendimiento de los extractos

Se pesaron cantidades diferentes de las partes secas de *C. ciliatoglandulifer* y se obtuvieron los extractos metanólicos y de diclorometanos mostrados en la Figura 9 y sus rendimientos en la Tabla 3. Los extractos de tallos proporcionaron una mayor masa (g), mientras que los de raíces una menor.



Figura 9. Extractos de *C. ciliatoglandulifer* secos.

Tabla 3. Rendimientos de los extractos de *C. ciliatoglandulifer*.

Peso seco de:		Extracto seco de CH ₂ Cl ₂		Extracto seco de MeOH	
		Peso	Clave	Peso	Clave
Hojas	229 g	12.5 g (5.45%)	DH	13.4 g (5.85%)	MH
Tallos	704 g	23.6 g (3.35%)	DT	27.7 g (3.93%)	MT
Raíces	164.6 g	6.1 g (3.70%)	DR	6.1 g (3.70%)	MR

7.2 Actividad antibacteriana de los extractos de *C. ciliatoglandulifer*

En la Figura 10, se aprecian los halos de inhibición resultantes y las Tablas 4 y 5 recogen los promedios de los halos de inhibición producidos por los extractos.

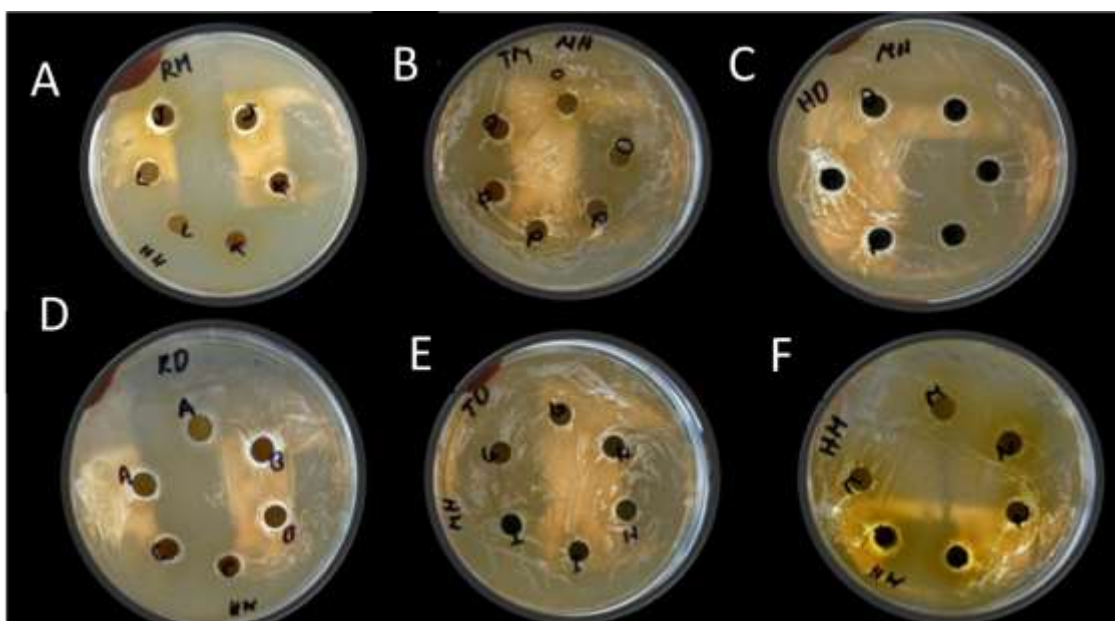


Figura 10. Halos de inhibición de los extractos de *C. ciliatoglandulifer* y sus diferentes concentraciones sobre *S. aureus*. A: MR, B: MT, C: DH, D: DR, E: DT y F: MH.

Tabla 4. Actividad antibacteriana de *C. ciliatoglandulifer* en *S. aureus*.

<i>S. aureus</i> ATCC 29213	Zona de inhibición (mm)		
	DR	MH	MR
Concentración en disco			
3 mg/15µL	8.66 ± 0.577	7.66 ± 0.577	9.33 ± 0.577
5 mg/15µL	9.66 ± 0.577	10.33 ± 0.577	10.66 ± 0.57
10 mg/15µL	10 ± 1.00	11.66 ± 0.577	7.66 ± 0.577

Tabla 5. Actividad antibacteriana de *C. ciliatoglandulifer* en *B. cereus*.

<i>B. cereus</i> ATCC 10876	Zona de inhibición (mm)		
	DR	MR	MH
Concentración en disco			
3 mg/15µL	NA*	NA	NA
5 mg/15µL	NA	NA	NA
10 mg/15µL	7.5 ± 0.50	NA	NA

*NA: No presentó actividad

En la Tabla 6, se muestra un panorama general de la actividad de los extractos de los diferentes órganos de *C. ciliatoglandulifer*, donde se correlaciona el tipo de extracto y los microorganismos que fueron evaluados. NA significa que el extracto no fue activo y A que tuvo actividad.

Tabla 6. Actividad antibacteriana de *C. ciliatoglandulifer* en otras bacterias.

Clave extracto	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>K. cowanii</i>	<i>E. coli</i>
MT	NA*	NA	NA	NA
MR	A**	NA	NA	NA
MH	A	NA	NA	NA
DT	NA	NA	NA	NA
DR	A	A	NA	NA
DH	NA	NA	NA	NA

*NA: no presentó actividad.

**A: extracto activo

7.2.1. Combinación del extracto DR con el antibiótico ampicilina

La evaluación de la actividad del DR combinado con el antibiótico arrojó los resultados que se indican en la Tabla 7. Por su parte, el aumento de la concentración de ampicilina a 200, 300, 400, 500 y 600 µg/mL y la combinación de esta con 3, 5 y 10 mg/µL del extracto DR mostró los resultados indicados en la Tabla 8. Las placas donde se aprecian los halos de inhibición obtenidos de la combinación de DR con ampicilina se muestran en la Figura 11.

Tabla 7. Actividad antibacteriana del DR combinado con ampicilina sobre *B. cereus*.

<i>B. cereus</i> ATCC 10876 + ampicilina	Zona de inhibición (mm)
Concentración en disco	DR
1 mg/15 µL	9.33 ± 0.577
3 mg/15 µL	9.66 ± 0.577
5 mg/15 µL	10 ± 1.00

Tabla 8. Resultados de la combinación del DR con ampicilina sobre *B. cereus*.

		/15 µL] Extracto DR		
		3 mg	5 mg	10 mg
[µg/mL] Ampicilina	Control (ampicilina)	Zona de inhibición (mm) de <i>Bacillus cereus</i>		
100	R	9	10	10
200	R	11	11	15
300	R	17	16	14
400	R	18	26**	16
500	S	S*	S*	S*
600	S	S*	S*	S*

R: resistente

S: sensible al antibiótico

*S: sensible al antibiótico combinado con DR

** : Posible sinergia con un extracto de otra especie vegetal (*Buddleja perfoliata*), utilizada de manera tradicional contra infecciones

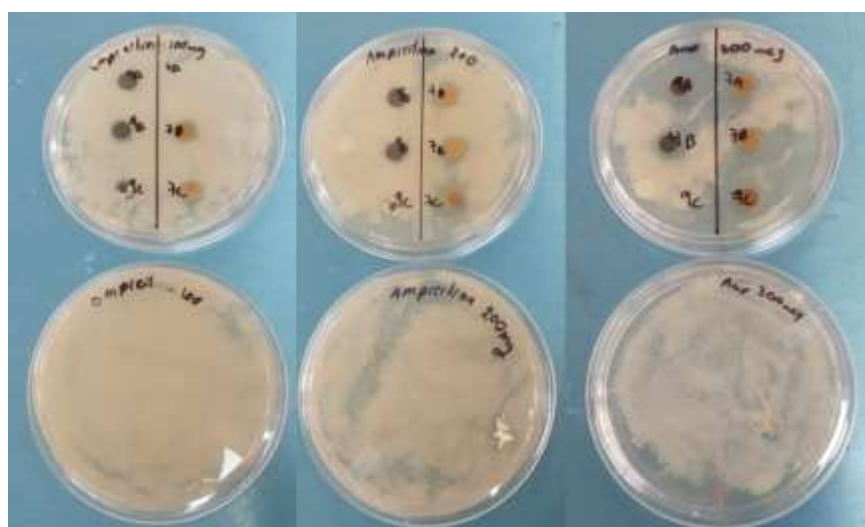


Figura 11. Efectos de la combinación del DR con ampicilina.

7.3 Estudios químicos

7.3.1 Fraccionamiento de DR

El extracto de diclorometano de las raíces de *C. ciliatoglandulifer* fue el que, por inhibir el crecimiento de ambas cepas bacterianas, se seleccionó para llevar a cabo los estudios químicos mediante las cromatografías descritas en el punto 6.3.1. De dicha CC, se obtuvieron 385 fracciones. La Figura 12 ejemplifica los perfiles químicos en CCF de las fracciones 200 a 233. Ese análisis permitió agrupar todas las fracciones colectadas en 20 fracciones principales, de acuerdo a su perfil. En la

Tabla 9, se muestran las fracciones agrupadas, sus rendimientos y los sistemas de elución empleados durante el fraccionamiento. Las fracciones **A2**, **A12-14** y **A19-20** mostradas en la Tabla 9 fueron las que dieron mayores rendimientos. De las Fracciones **F-375** y **F382** se obtuvieron dos polvos (Figura 13). El primero con apariencia de hojuelas blancas. El segundo tenía una apariencia de cristales de color naranja-rosa. Ambas fracciones se sometieron a pruebas de solubilidad, resultando solubles solo en agua. Está en curso los registros de sus espectros de RMN.

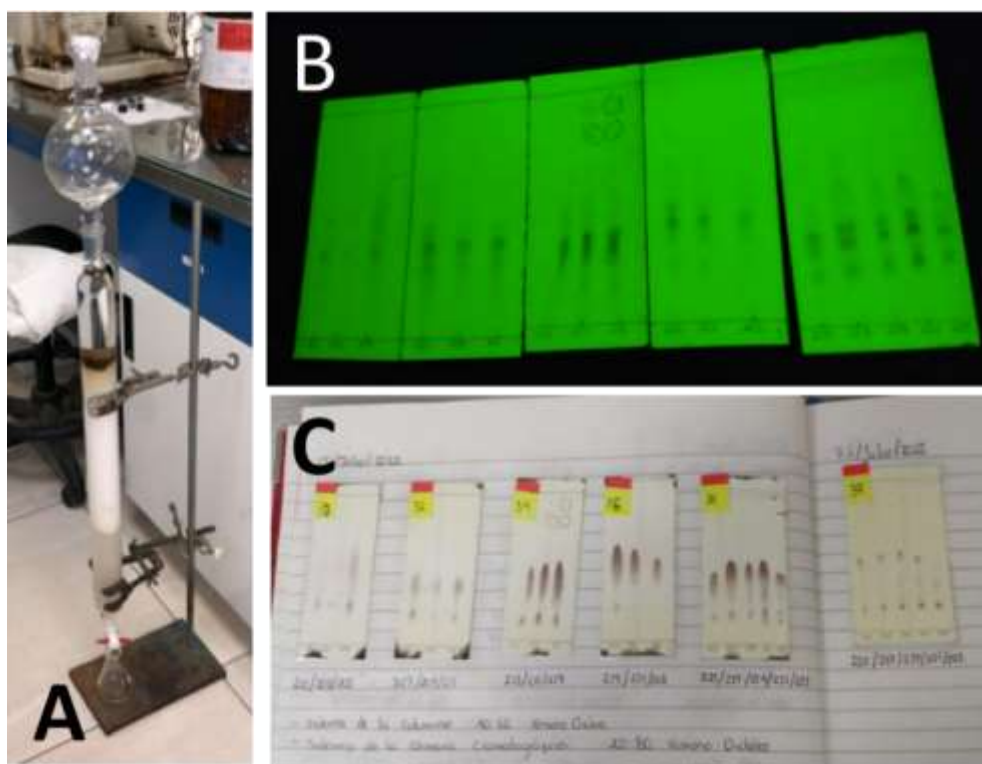


Figura 12. Cromatografía en columna abierta del DR. **A**: columna. **B**: placas cromatográficas de las fracciones 200-233 reveladas con UV y **C**: sulfato cérico amoniacal.

Tabla 9. Fracciones colectadas y agrupadas de la cromatografía en columna del DR y sus rendimientos.

FASE MÓVIL	FRACCIONES COLECTADAS	FRACCIONES AGRUPADAS	CLAVE	PESO (mg)
Hexano	1-26			
Hexano-CH ₂ Cl ₂ (95:05)	27-35			
Hexano-CH ₂ Cl ₂ (95:10)	36-45			
Hexano-CH ₂ Cl ₂ (85:15)	46-55			
		49-60	A1	
Hexano-CH ₂ Cl ₂ (80:20)	56-76			
		61-72	A2	43.30
Hexano-CH ₂ Cl ₂ (70:30)	77-110	73-80	A3	15.30
		81-96	A4	18.60
		97-110	A5	4.40
Hexano-CH ₂ Cl ₂ (60:40)	111:156	111-123	A6	6.80
		124-142	A7	5.00
		143-156	A8	3.10
Hexano-CH ₂ Cl ₂ (50:50)	157-199	157-169	A9	5.20
		170-194	A10	11.80
		195-205	A11	5.40
Hexano-CH ₂ Cl ₂ (40:60)	200-276	206-223	A12	156.00
		224-233	A13	46.70
		234-245	A14	19.70
		246-255	A15	9.50
		256-269	A16	6.90
		270-285	A17	9.70
Hexano-CH ₂ Cl ₂ (30:70)	277-301	286-307	A18	4.40
		307-319	A19	33.70
CH ₂ Cl ₂	307-365	320-365	A20	170.30
CH ₂ Cl ₂ -MeOH(50:50)	366-372			
MeOH	373-385			



Figura 13. Fracción 375 (**F-375**) y fracción 382 (**F-382**).

7.3.2 Resultados de la CG-EM de los extractos diclorometánicos

Se obtuvieron los cromatogramas de gases de cada uno de los extractos diclorometánicos así como los datos correspondientes [tiempos de retención ajustados (TR^a), abundancias y nombres sugeridos por el NIST]. También se obtuvieron los espectros de masas (EM) de los picos con los cuales fue posible identificar a los compuestos correspondientes. En la Figura 14, se muestran como ejemplo los EM para la identificación del compuesto **15**. Los cromatogramas de DR, DH y DT se indican en las Figuras 15, 17 y 19 respectivamente. Se aprecian los picos que representan a los compuestos más abundantes, los cuales están señalados con flechas rojas. Con estos datos, se construyeron las Tablas 10, 11 y 12 en las cuales se indican los nombres de los compuestos mayoritarios, sus TR^a y pesos moleculares para los extractos DR, DH y DT respectivamente. También se agruparon las estructuras de los compuestos mayoritarios por extracto. Estas se ilustran en las Figuras 16, 18 y 20 correspondientes al mismo orden dado anteriormente.

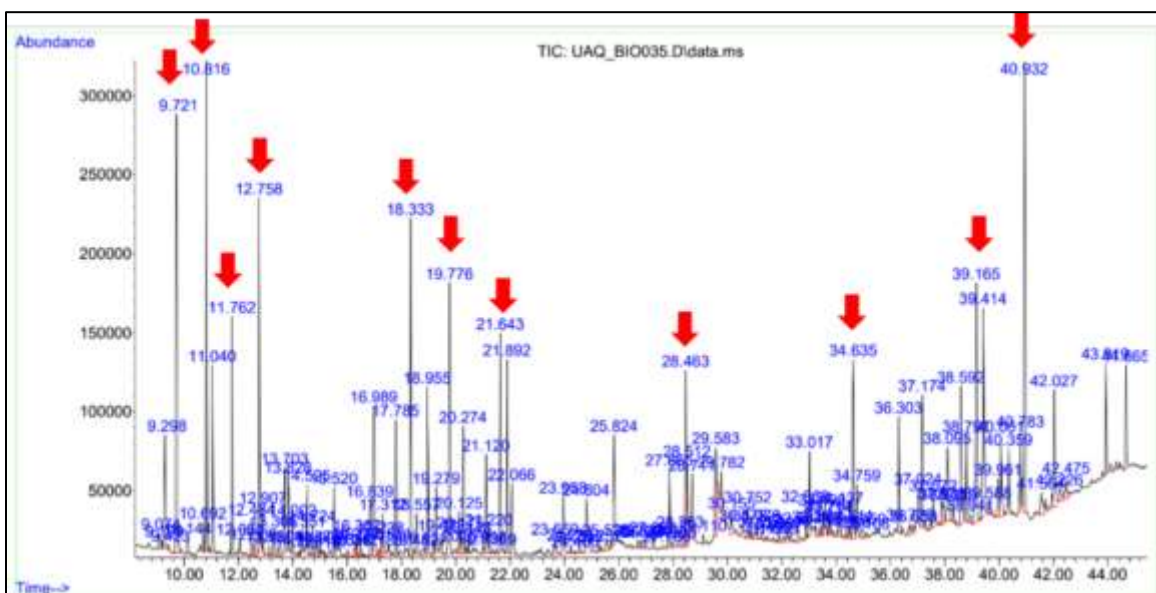


Figura 14. Cromatograma del DR. Las flechas rojas indican los compuestos mayoritarios.

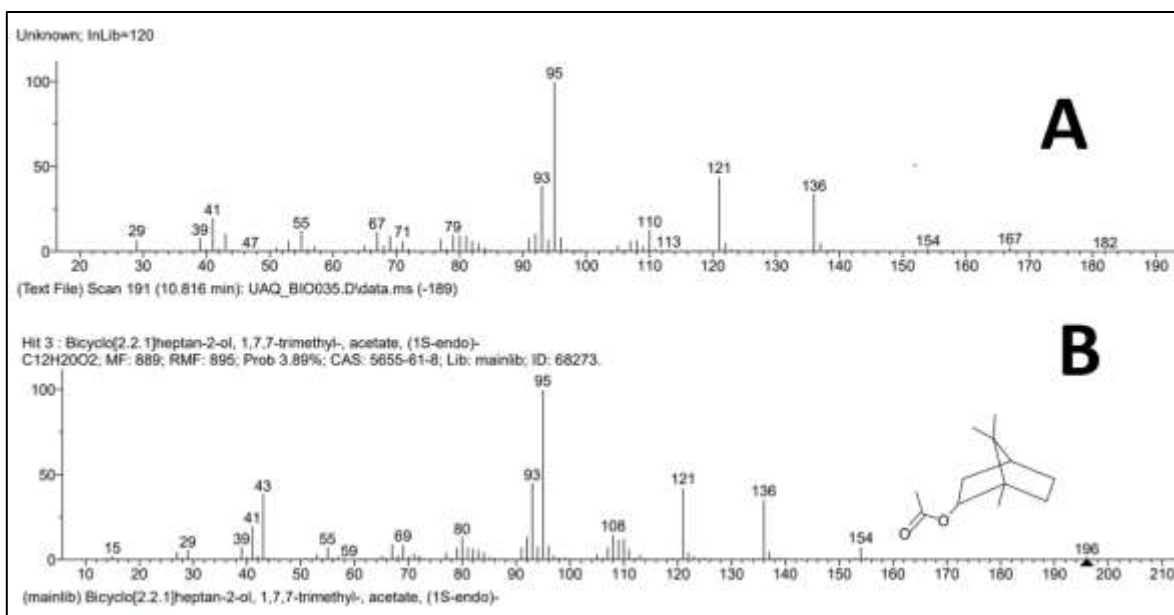


Figura 15. Espectros de masas del compuesto **15**. **A**: EM del pico que corresponde al TR^a de 10.816 min en el extracto del DR. **B**: EM que coincide con A en la base de datos de NIST.

Tabla 10. Compuestos identificados en el DR.

Compuesto	TR ^{a*} (min)	A (%)	Nombre	Fórmula	Masa (g/mol)
14	9.721	5.183	Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
15	10.816	4.458	Acetato de borneol	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196.29
16	11.04	1.812	Acetato de <i>cis</i> -crisantenilo	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	194.27
17	12.758	3.314	(+)-Ciclosativeno	C ₁₅ H ₂₄	204.35
18	16.989	1.888	Epicubenol	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37
19	17.785	1.78	Espatulénol	C ₁₅ H ₂₄ O	220.35
20	18.33	3.17	α-calacoreno	C ₁₅ H ₂₀	200.32
21	18.955	1.74	β-calacoreno	C ₁₅ H ₂₀	200.32
22	19.77	2.94	Copaborneol	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37
23	21.64	2.07	<i>trans</i> -Calamenen-10-ol	C ₁₅ H ₂₂ O	218.33
24	25.824	1.73	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.4
25	28.46	2.07	Óxido de manoilo	C ₂₀ H ₃₄ O	290.5
26	34.635	2.38	1-isopropenil-2,3,4,5-tetrametilbenceno	C ₁₃ H ₁₈	174.28
27	37.174	1.64	Ciclohexanona, 2,6-bis(2-metilpropilideno)	C ₁₄ H ₂₂ O	206.32
28	38.095	1.26	7alfa-silphiperfol-5-eno	C ₁₅ H ₂₄	204.35
29	39.165	3.33	1-(1-ciclohexen-1-il)-4-metilbenceno	C ₁₃ H ₁₆	172.27
30	39.414	3.28	2-metilbutirato de fenetilo	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.28
31	40.932	4.87	1H-2-Indenona,2,4,5,6,7,7a-hexahidro-3-(1-metiletil)-7a-metilo	C ₁₃ H ₂₀ O	192.30

*TR^a: Tiempo de retención ajustado, A: abundancia

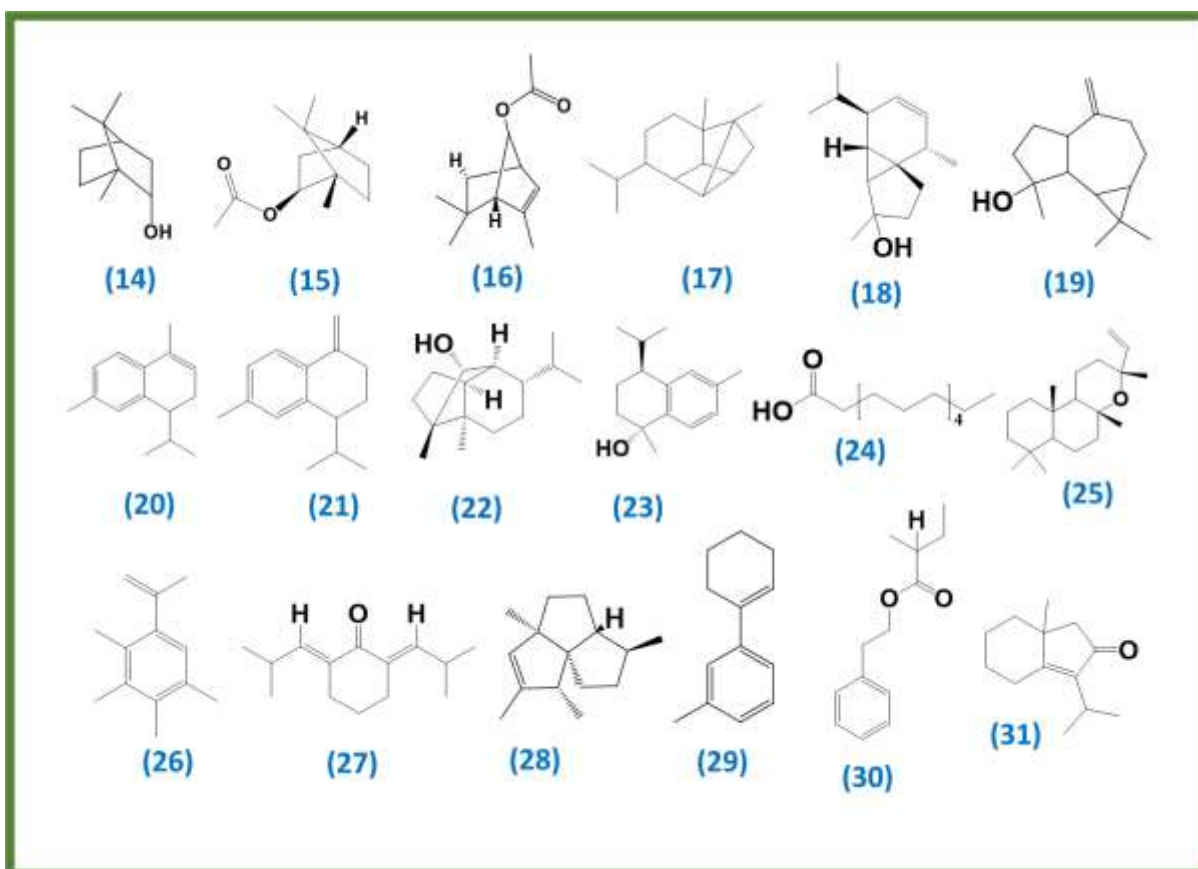


Figura 16. Estructuras de los compuestos mayoritarios de DR.

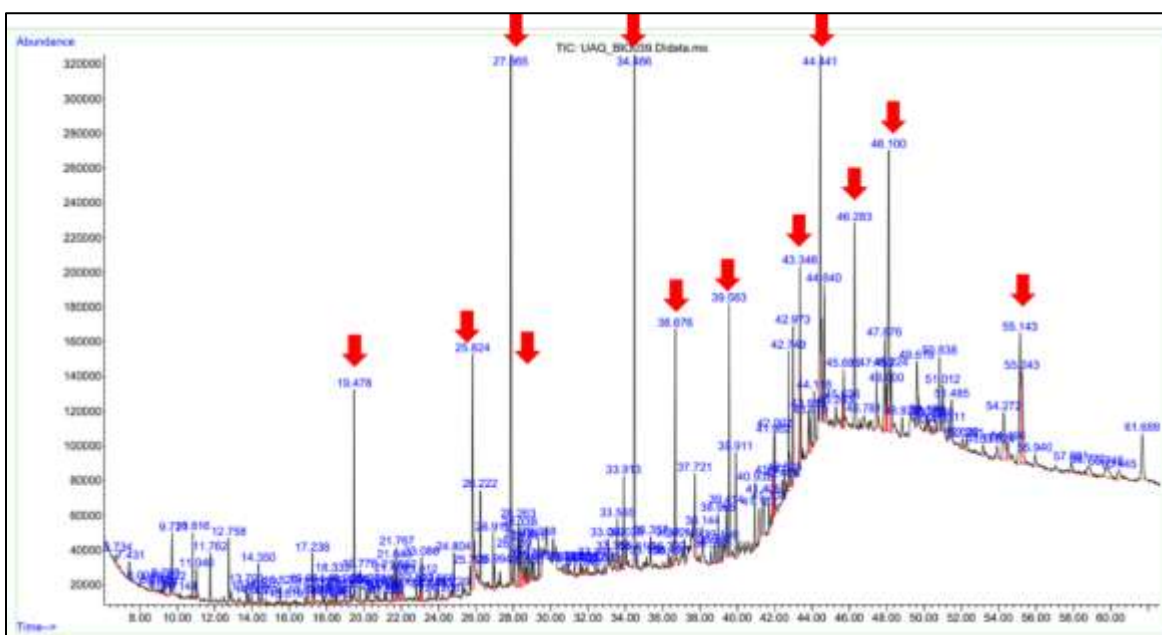


Figura 17. Cromatograma del DH. Las flechas rojas indican los compuestos mayoritarios.

Tabla 11. Compuestos identificados en el DH.

compuesto	TR ^a (min)	A (%)	Nombre	Fórmula	Masa (g/mol)
32	19.478	1.871	Óxido de cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	204.36
24	25.824	3.218	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.4
33	27.865	7.398	Esclareolóxido (Cis-B/C)	C ₁₈ H ₃₀ O	262.43
34	34.486	7.627	Epimanool	C ₂₀ H ₃₄ O	290.5
35	36.676	2.432	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	380.7
36	39.563	2.564	Nonacosane	C ₂₉ H ₆₀	408.8
37	39.911	1.396	Escualeno	C ₃₀ H ₅₀	410.39
38	42.749	1.242	16-Pentacosenoato de metilo	C ₂₆ H ₅₀ O ₂	394.7
39	42.973	1.383	7, 4'-dimetoxi-naringenina	C ₁₇ H ₁₆ O ₅	300.31
40	43.346	1.823	Ácido lignocérico	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	368.63
41	44.64	1.836	Tocoferol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430.71
42	46.283	2.314	Acetato de lupeol	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	468.8
43	47.876	1.400	β-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414.7
44	48.1	4.259	Betulina	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	442.71
45	50.838	1.362	α-Amirina	C ₃₀ H ₅₀ O	426.73
46	54.272	1.466	Lupeol	C ₃₀ H ₅₀ O	426.72
47	55.143	3.126	Oleanolato de metilo	C ₃₁ H ₅₀ O ₃	470.7

TR^a: Tiempo de retención ajustado, A: abundancia.

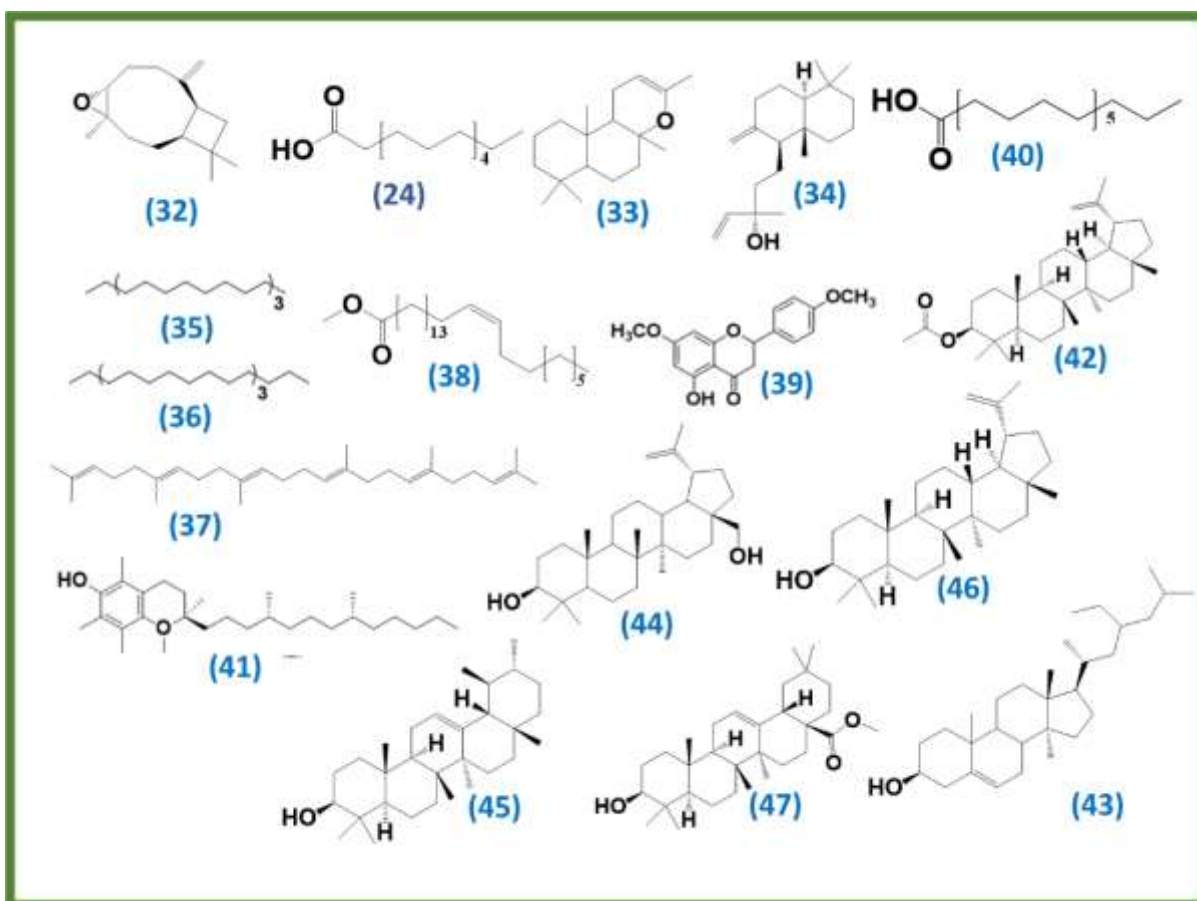


Figura 18. Estructuras de los compuestos mayoritarios del DH.

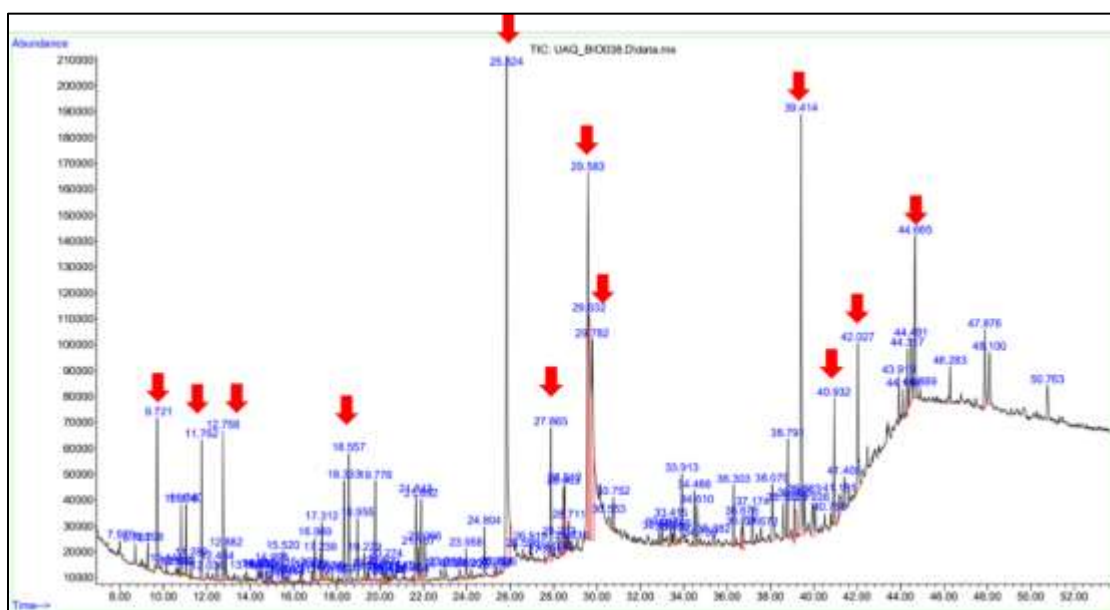


Figura 19. Cromatograma del DT. Las flechas rojas indican los compuestos mayoritarios.

Tabla 12. Compuestos identificados en el DT.

Compuesto	TR ^a (min)	A (%)	Nombre	Fórmula	Masa (g/mol)
14	9.721	2.104	Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25
15	11.762	1.435	Acetato de Borneol	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	196.29
17	12.758	1.737	(+)-Ciclosativeno	C ₁₅ H ₂₄	204.35
48	18.557	1.589	Dihidroagarofurano	C ₁₅ H ₂₆ O	222.366
22	19.776	1.389	Copaborneol	C ₁₅ H ₂₆ O	222.37
21	21.643	1.228	β-calacoreno	C ₁₅ H ₂₀	200.32
33	21.892	1.037	Esclareolóxido (Cis-B/C)	C ₁₈ H ₃₀ O	262.43
24	25.824	13.600	Ac. Palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256.4
25	27.865	1.612	Óxido de manoilo	C ₂₀ H ₃₄ O	290.5
49	28.463	1.258	Ac. Elaídico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.46
50	29.632	6.993	Ac. Oléico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282.47
51	29.782	5.266	Ac. Linoléico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280.44
52	38.791	1.309	Butirato de fenetilo	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	192.25
54	39.414	7.186	Isovalerato de fenetilo	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.28
31	40.932	1.515	1H-2-Indenona,2,4,5,6,7,7a-hexahidro-3-(1-metiletil)-7a-metilo	C ₁₃ H ₂₀ O	192.30
55	42.027	2.321	Fenantrenona	C ₁₄ H ₁₀ O	194.23
53	44.491	1.522	Éter metílico de β-Sitosterol	C ₃₀ H ₅₂ O	428.7
41	44.665	2.420	Tocoferol	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	430.71
43	47.876	1.537	β-Sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	414.7

TR^a: Tiempo de retención ajustado, A: abundancia.

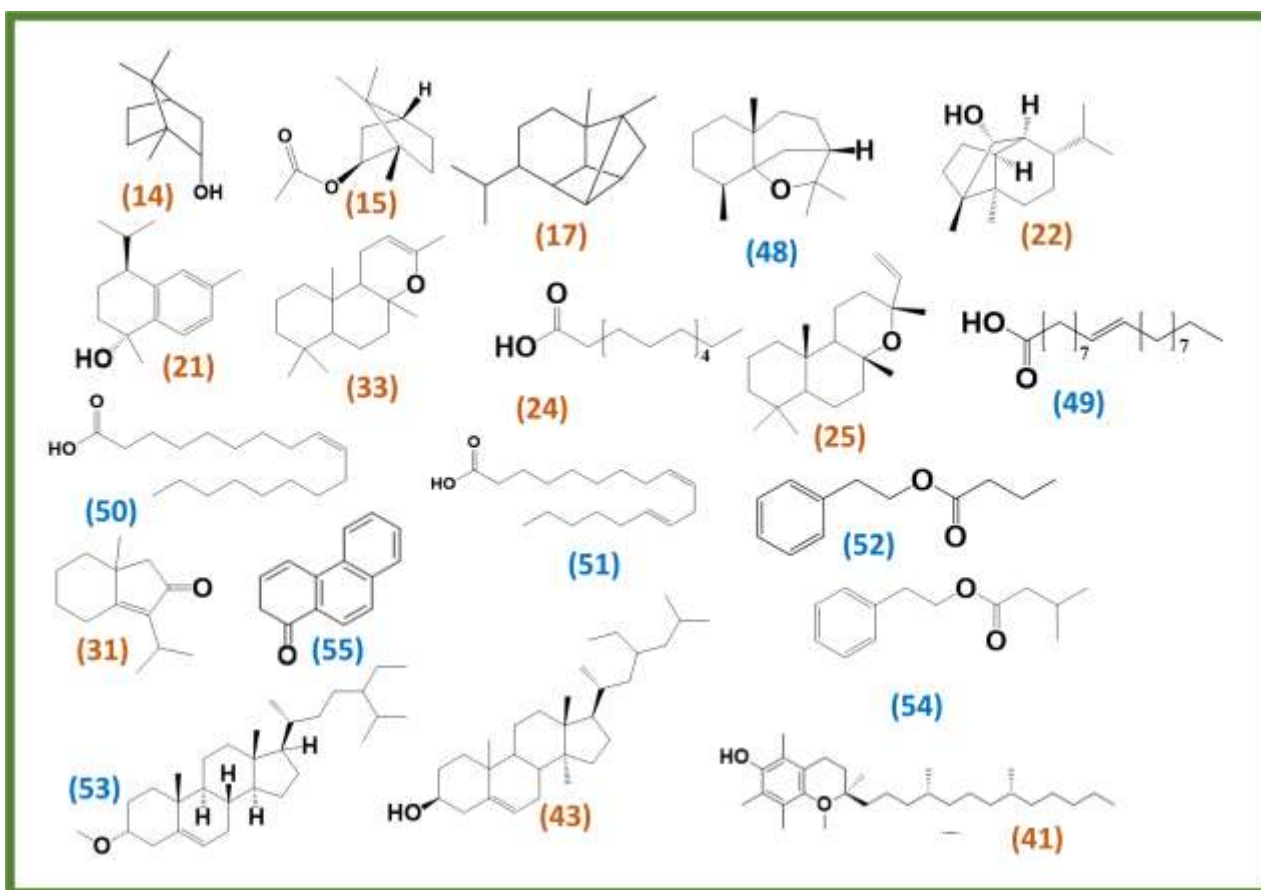


Figura 20. Estructuras de los compuestos mayoritarios de DT.

7.3.3. Análisis de los extractos metanólicos por medio de HPLC/UV-VIS

Para la identificación de algunos de los compuestos fenólicos individuales, se utilizó la coelución con estándares comunes disponibles en el laboratorio, los cuales incluyeron ácido caféico, además de los flavonoides (+)-catequina, (–)-epicatequina, kaempferol, rutina, hesperetina, genisteína, quercetina, naringina y naringenina. En la Figura 21, se muestran los cromatogramas de los estándares y los extractos MT, MH y MR. De acuerdo con el análisis, los tiempos de retención de los picos presentes en los tres extractos no coinciden con los de los estándares.

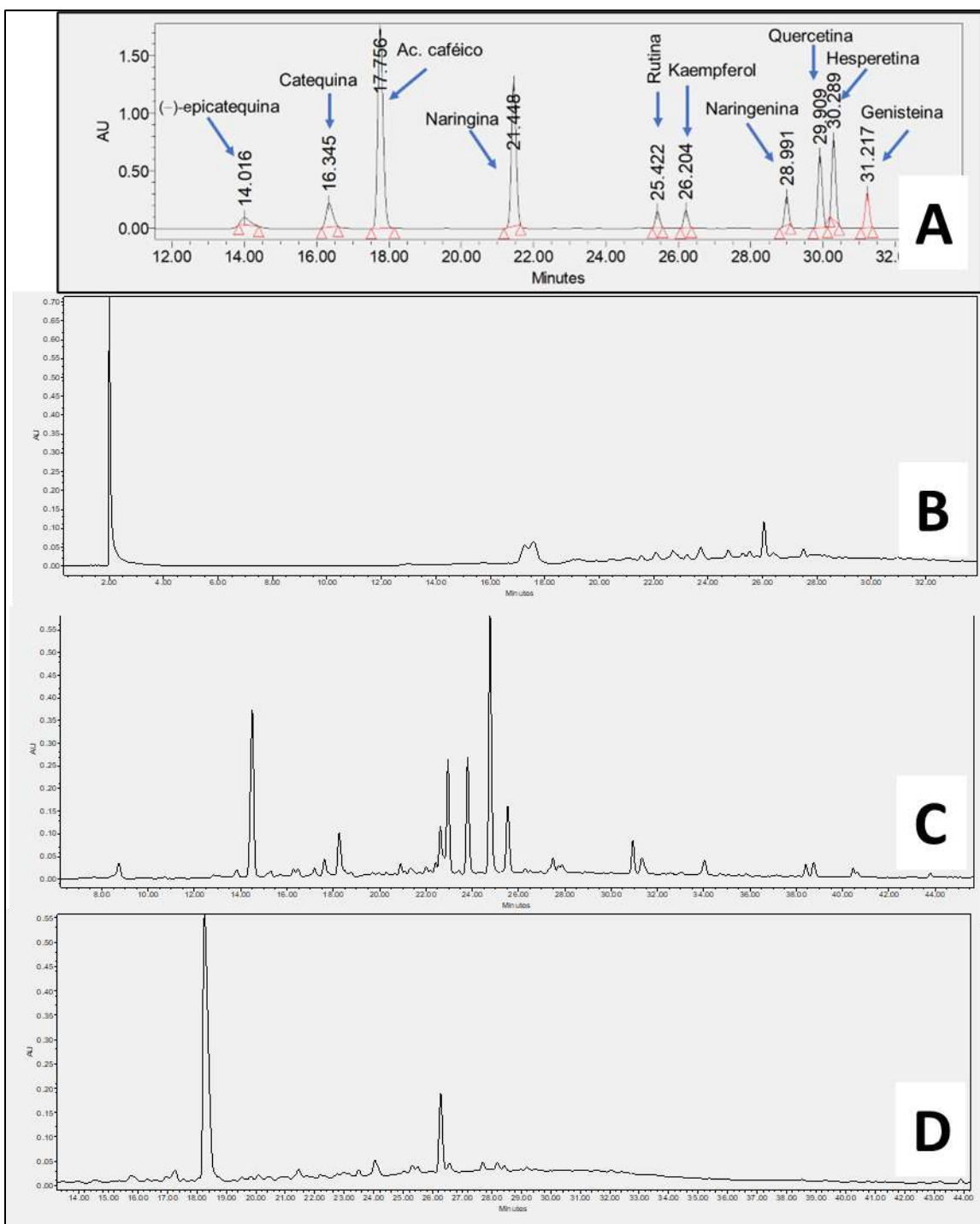


Figura 21. Cromatogramas de los estándares y extractos metanólicos. **A**: estándares, **B**: MT, **C**: MH y **D**: MR. Columna: Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5 μ); gradiente: H₂O acidulada (999:1)-MeOH acidulado (999:1) (100:0→0:100); flujo: 0.8 mL por min (280 nm).

7.3.4. Elucidación estructural de los compuestos puros

7.3.4.1. Precipitado del extracto metanólico de los tallos de *C. ciliatoglandulifer* (PMTCC)

Se obtuvieron 242.3 mg de un polvo blanco (Clave asignada: PMTCC) (Figura 22) que precipitó durante el proceso de maceración de los tallos de *C. ciliatoglandulifer* con metanol. Se le hicieron pruebas de solubilidad y resultó ser soluble solamente en agua y DMSO. El punto de fusión se midió por triplicado (182-185, 181-184 y 181-184 °C) y se obtuvo el promedio (181.3-184.3 °C). Se registraron sus espectros de RMN (punto 7.3.3.3).



Figura 22. PMTCC en el aparato de punto de fusión.

7.3.4.2. Espectros obtenidos de la RMN de PMTCC

Los espectros de RMN unidimensionales (^1H , ^{13}C , APT y DEPT 90°) de esta muestra se muestran en las Figuras 23 a 26 respectivamente. Los espectros bidimensionales homonucleares (COSY) y heteronucleares en sus modalidades a un enlace (HSQC) y a múltiples enlaces (HMBC) se ejemplifican en las Figuras 27, 28 y 29. Gracias a la interpretación de los espectros, se logró construir la Tabla 13 con las constantes espectroscópicas. La elucidación estructural de este compuesto se detalla en la sección de DISCUSIÓN.

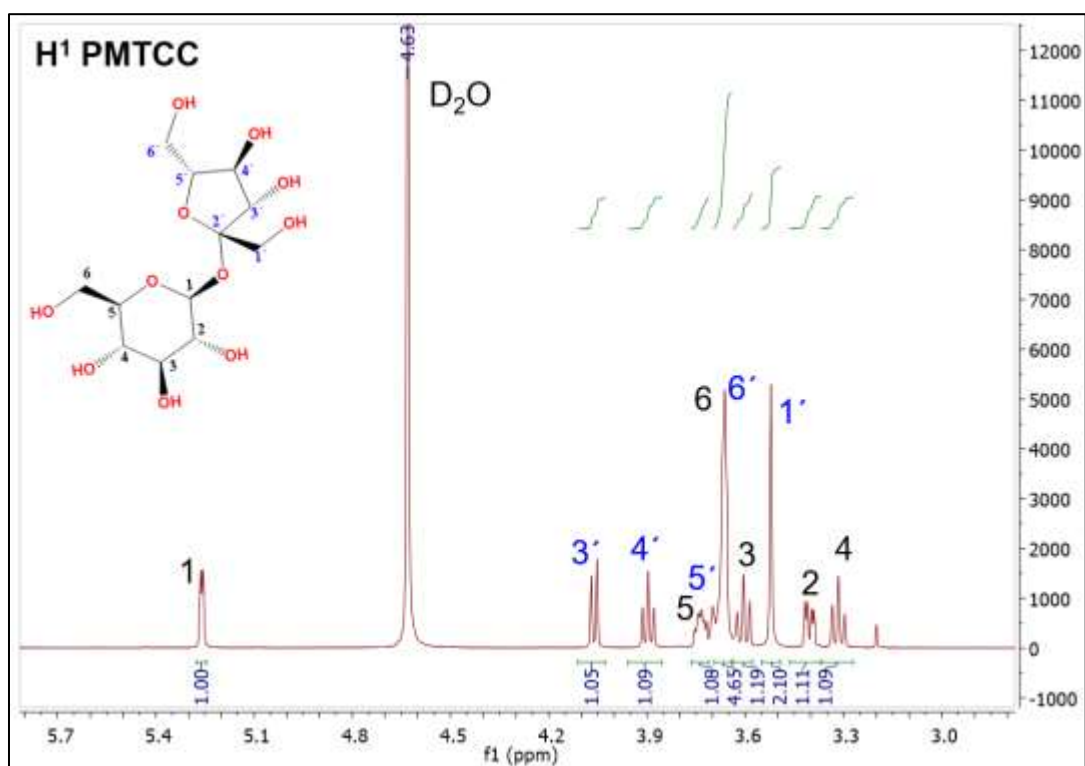


Figura 23. Espectro de RMN ¹H completo del compuesto PMTCC.

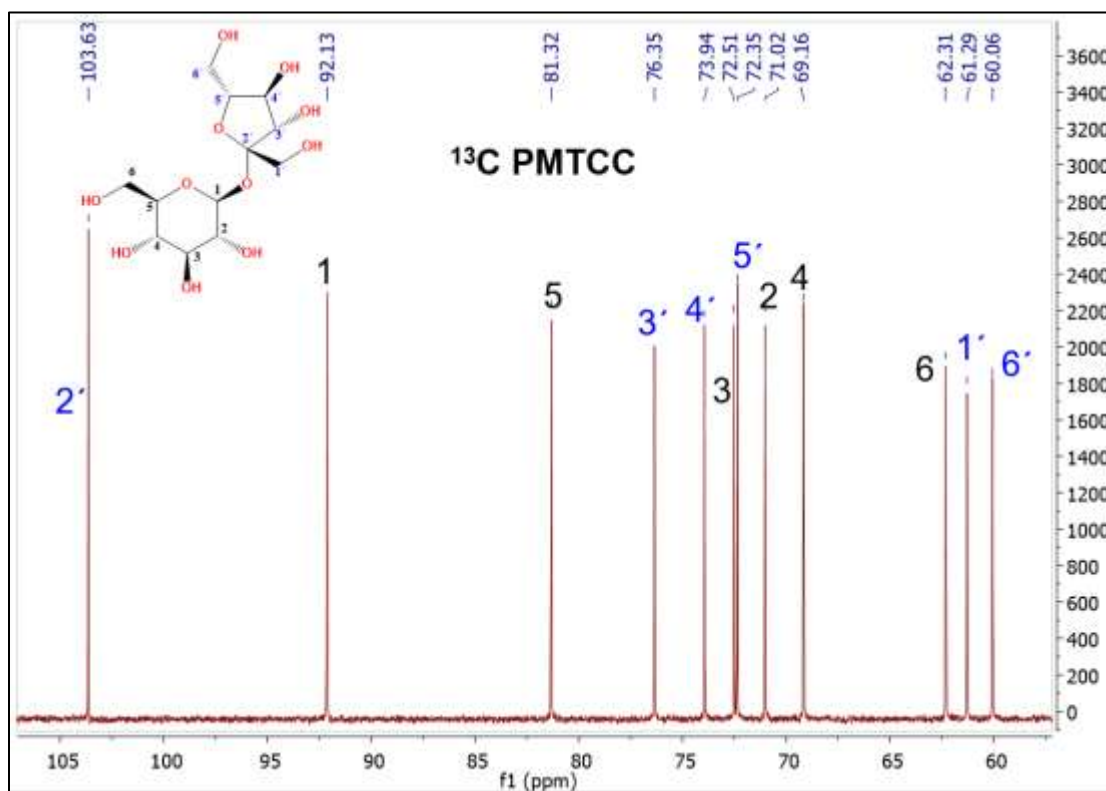


Figura 24. Espectro de RMN ¹³C completo del compuesto PMTCC.

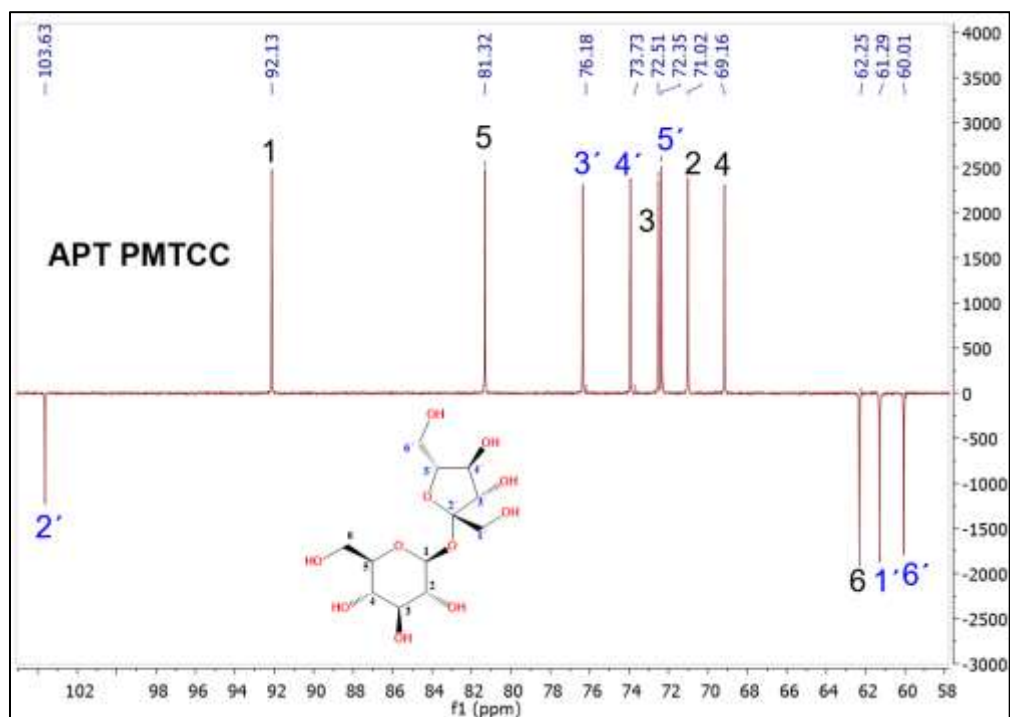


Figura 25. Espectro de RMN APT completo del compuesto PMTCC.

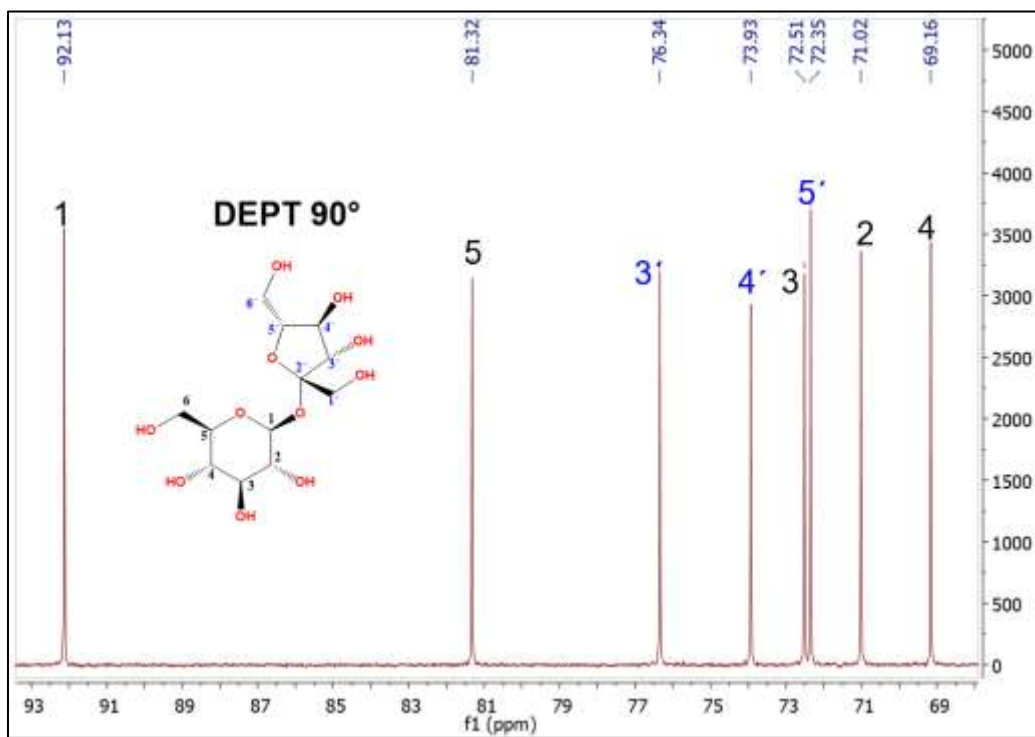


Figura 26. Espectro de RMN DEPT 90° completo del compuesto PMTCC, mostrando 8 metinos (CH).

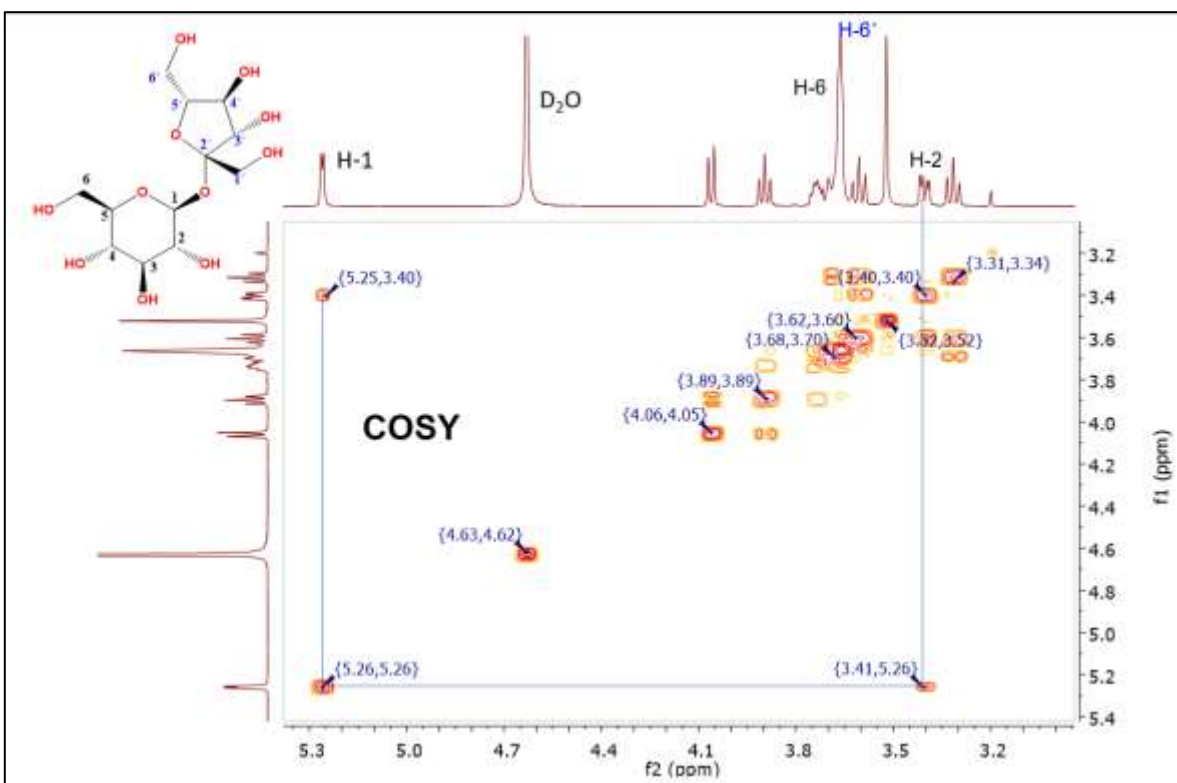


Figura 27. Especto ^1H - ^1H COSY completo del compuesto PMTCC.

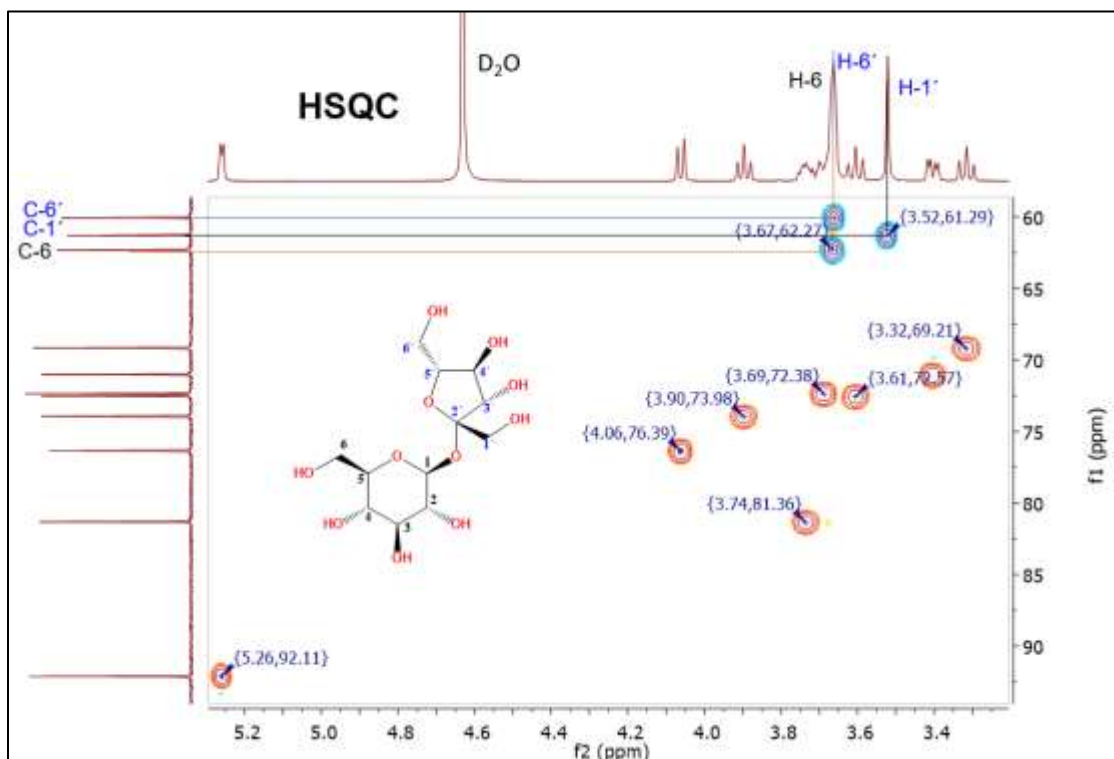


Figura 28. Especto de HSQC completo del compuesto PMTCC.

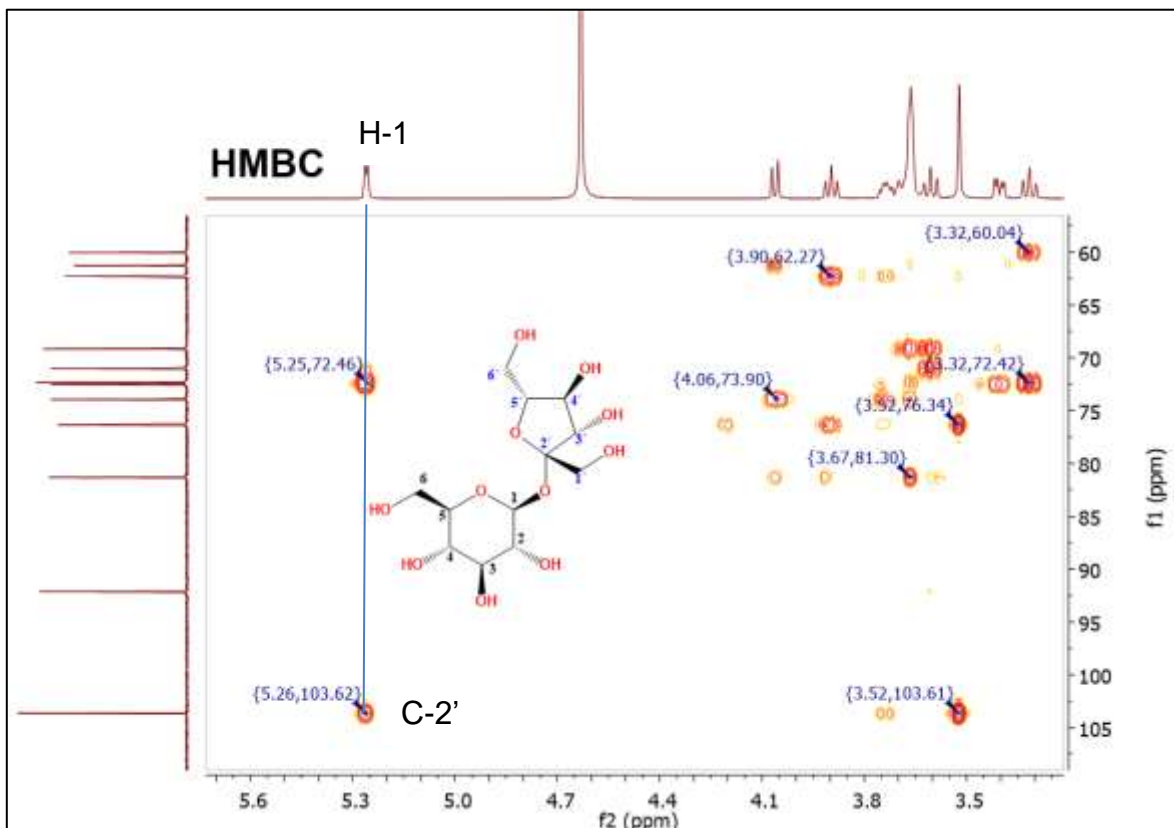


Figura 29. Espectro de HMBC completo del compuesto PMTCC.

Tabla 13. Recopilación de las constantes espectroscópicas del compuesto PMTCC (sacarosa) (D₂O).

Hexopiranosil			Fructofuranosil		
¹ H	δ (J en Hz)	δ ¹³ C (APT)	¹ H	δ (J en Hz)	δ ¹³ C (APT)
1	5.26 d (3.5)	92.1 (CH)	1'	3.51 s	61.3 (CH ₂)
2	3.40 dd (10.0, 3.5)	71.0 (CH)	2'	-	103.6 (C)
3	3.60 dd (9.5, 10.0)	72.5 (CH)	3'	4.06 d (8.77)	76.3 (CH)
4	3.31 dd (9.5, 9.5)	69.2 (CH)	4'	3.89 dd (12.0, 8.0)	73.9 (CH)
5	3.74 m	81.3 (CH)	5'	3.69 m	72.3 (CH)
6	3.66 s	62.3 (CH ₂)	6'	3.66 s	60.0 (CH ₂)

d = doblete, dd = doble de doble, m = multiplete, s = singulete

8 DISCUSIÓN

8.1. Actividad antibacteriana de *Croton ciliatoglandulifer*

Los MH, MR y el DR de *C. ciliatoglandulifer* inhibieron el crecimiento de la cepa de *S. aureus*, al presentar halos de inhibición tal como se muestra en la Figura 9. A una concentración de 10 mg/15 μ L, el MH presentó un halo de inhibición de 11.66 ± 0.577 mm (Tabla 4). Sin embargo, el MH y el MR no produjeron inhibición del crecimiento en *B. cereus* en ninguna de las concentraciones evaluadas. En cuanto a la cepa de *B. cereus*, y a pesar de que este se evaluó a 3, 5 y 10 mg/15 μ L, solo se observó halo de inhibición con la concentración de 10 mg/15 μ L en el caso del DR (Tabla 5). De tal manera que dicho extracto inhibió el crecimiento en ambas cepas. Adicionalmente, se exploró la actividad de los extractos en bacterias Gram negativas (*Kosaconia cowanii* y *Escherichia coli*). Sin embargo, no fueron activos contra estos microorganismos (Tabla 6). Por otra parte, la actividad antibacteriana de *C. ciliatoglandulifer* ha sido poco estudiada. Hasta la fecha, el único reporte de dicha actividad fue publicada en el 2018 por Sánchez-Hernández y colaboradores, quienes realizaron un estudio de la actividad contra el hongo *Candida albicans*, en donde reportaron una concentración mínima inhibitoria moderada de 0.5 ± 0.072 mg/mL del aceite esencial de las hojas de *C. ciliatoglandulifer* (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018), comparada con la del fluconazol.

8.1.2. Combinación de los extractos con ampicilina

Como se mencionó anteriormente, los extractos inactivos *per se* no pudieron tampoco inhibir el crecimiento de *B. cereus*, a pesar de su combinación con ampicilina. En cambio, el DR produjo inhibición desde una concentración más baja que las usadas con el extracto solo y esta actividad aumenta conforme aumenta la concentración del extracto y la ampicilina (Tabla 7, punto 7.2.1). Ante tal hallazgo, se decidió corroborar que el halo de inhibición es dependiente de la concentración y para ello, se probaron concentraciones más altas. Estos resultados se muestran en la Tabla 8 (punto 7.2.1).

La cepa de *B. cereus* presenta resistencia a antibióticos betalactámicos tal como lo es la ampicilina (Celestino-Hernández *et al.*, 2021). Esta resistencia se demostró en la experimentación e incluso se determinó que es resistente hasta una

concentración mayor a 400 µg/mL, pero menor a 500 µg/mL de ampicilina, ya que en esta última, si se observó total inhibición (Tabla 8).

Los métodos más comunes para combatir la resistencia a los antibióticos consisten en desarrollar nuevos medicamentos o mediante una terapia combinada (Nakazawa *et al.*, 2003). En los últimos años, se han incrementado los estudios y el interés por los efectos sinérgicos de combinar extractos naturales con antibióticos. Esta combinación puede ser más prometedora para inhibir el crecimiento bacteriano y erradicar la resistencia (Kuok *et al.*, 2017; Abu El-Wafa *et al.*, 2020). En un estudio publicado por Rhonalty-Rocha y colaboradores en el 2021, se probaron las combinaciones de los aceites esenciales de dos especies de *Croton* (*C. tetradenius* y *C. pulegido*) con antibióticos comerciales para determinar su efecto sobre *S. aureus*. Las CMI individuales de los aceites fueron de 4000 y 8000 µg/mL respectivamente. Sin embargo, con su combinación con bencilpenicilina, las CMI se redujeron hasta 2 veces la de los aceites y 128 veces la de la bencilpenicilina (Rhonalty-Rocha *et al.*, 2021). Los resultados revelaron que pueden asociarse los aceites esenciales de *Croton* con antibióticos comerciales del grupo de las penicilinas por efecto sinérgico o aditivo. Este efecto se determinó por medio de la técnica del tablero de ajedrez. Esta técnica se emplea para determinar *in vitro* las interacciones entre mezclas binarias de antimicrobianos (Rhonalty-Rocha *et al.*, 2021; De la Fuente-Salcido *et al.*, 2015). Otro ejemplo de sinergismo por combinación de antibióticos comerciales con extractos naturales es el reportado por Abu el Wafa y colaboradores en el 2020, para la erradicación de formación de biopelículas y el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. En este estudio, los extractos de romero y granada mostraron actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa*, pero se obtuvo una mejor actividad al combinar estos dos extractos. Por otra parte, la combinación de la mezcla de los extractos con piperacilina y también con levofloxacino redujo significativamente la CMI del antibiótico comercial. Con la piperacilina, se obtuvo un efecto aditivo mientras que con el levofloxacino se obtuvo un efecto de sinergismo (Abu el Wafa *et al.*, 2020).

El mecanismo de acción de los compuestos naturales no está tan detallado como los de los antibióticos comerciales. Por tanto, tampoco está muy estudiada la

interacción sinérgica con antibióticos comerciales. Otro aspecto muy importante a considerar es que los componentes de un extracto vegetal pueden actuar en diferentes dianas.

El principal mecanismo de resistencia de *B. cereus* ATCC 10876 es la producción de β -lactamasas (Celestino-Hernández *et al.*, 2021). El ácido clavulánico es un producto natural que tiene sinergia con antibióticos comerciales. Su principal función es la inhibición de las β -lactamasas (Ovais *et al.*, 2018). En este sentido, podemos inferir que los compuestos mayoritarios del DR tienen la capacidad de inhibir las β -lactamasas producidas por *B. cereus* ATCC 10876. Por esos efectos, estas enzimas no pueden inactivar a la ampicilina, lo que da como consecuencia que el antibiótico inhiba la síntesis de la pared bacteriana, llevando a la lisis del microorganismo y finalmente logrando la muerte de la bacteria.

8.2. Estudio químico

8.2.1. Análisis de los extractos de diclorometano de *C. ciliatoglandulifer* mediante CG-EM

Se identificaron 18 compuestos mayoritarios en el extracto de raíces (Tabla 10), 19 en el de tallos (Tabla 11) y 17 en el de hojas (Tabla 12). Hubo coincidencia en los perfiles químicos de los diferentes órganos de la planta, pero en total se identificaron 43 compuestos diferentes. De este total, más del 50% (28 compuestos) son de naturaleza terpenoide: 3 monoterpenos, 14 sesquiterpenos, 3 diterpenos y 8 triterpenos. El resto corresponde a 2 hidrocarburos saturados, 6 ácidos grasos, 1 flavonoide, 3 ésteres feniléticos, 2 policétidos y el tocoferol (Figura 30).

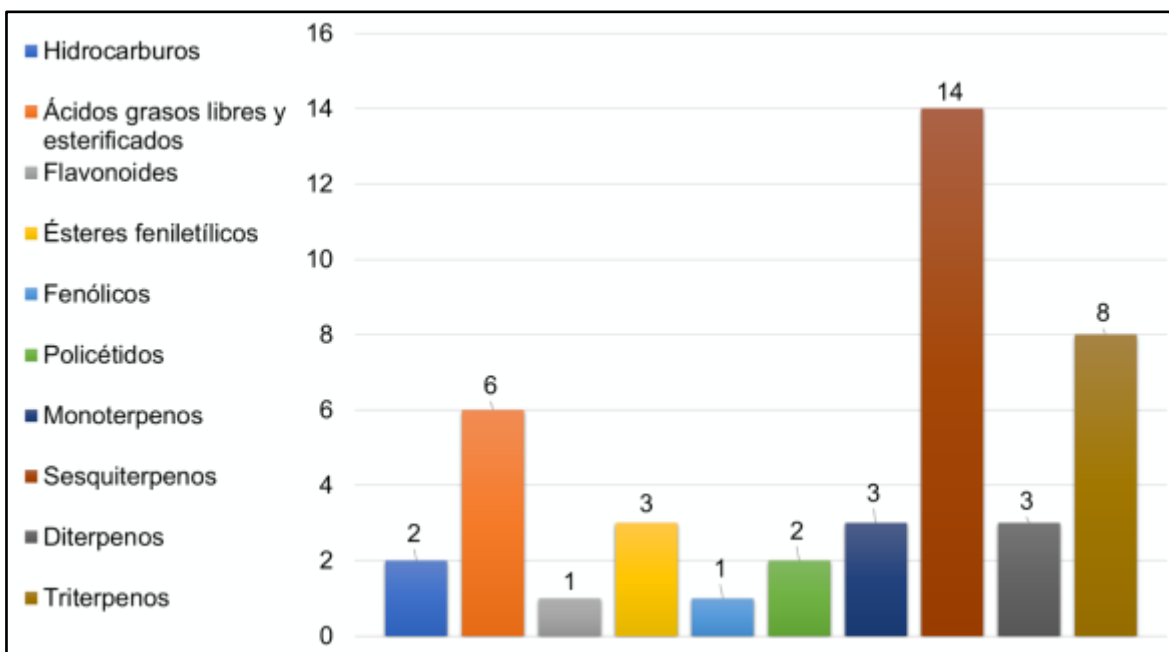


Figura 30. Naturaleza de los compuestos mayoritarios identificados por CG-EM en los extractos de diclorometano de *C. ciliatoglandulifer*.

Se realizó el mismo análisis para cada extracto. Los compuestos mayoritarios del DR son en mayor proporción sesquiterpenos; en el DH son los triterpenos y para el DT son los sesquiterpenos, además de los ácidos grasos libres y esterificados (Figura 31). Sánchez-Hernández y colaboradores reportaron un análisis del aceite esencial de las hojas de *C. ciliatoglandulifer* mediante CG-EM. Los resultados arrojaron que la composición del aceite es un 91.3 % de sesquiterpenos y 3.5 % de monoterpenos (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018). Estos resultados concuerdan con el alto contenido de sesquiterpenos de los DR, DH y DT. Al comparar los compuestos identificados en éste estudio del aceite esencial con los nuestros, confirmamos la presencia de 3 monoterpenos y 4 sesquiterpenos (Tabla 14). Lo que indica que además de las concordancias con la literatura, ahora podemos identificar en qué órgano de la planta se encuentra cada uno de esos 7 compuestos. El borneol (compuesto 14) se identificó en el aceite esencial de las hojas de acuerdo con Sánchez-Hernández y colaboradores. En el presente estudio, este compuesto se identificó en hojas, tallos y raíces. Cabe resaltar que, con los resultados obtenidos actualmente, se completa el perfil químico de la planta con nuevos compuestos identificados en la especie de *C. ciliatoglandulifer*.

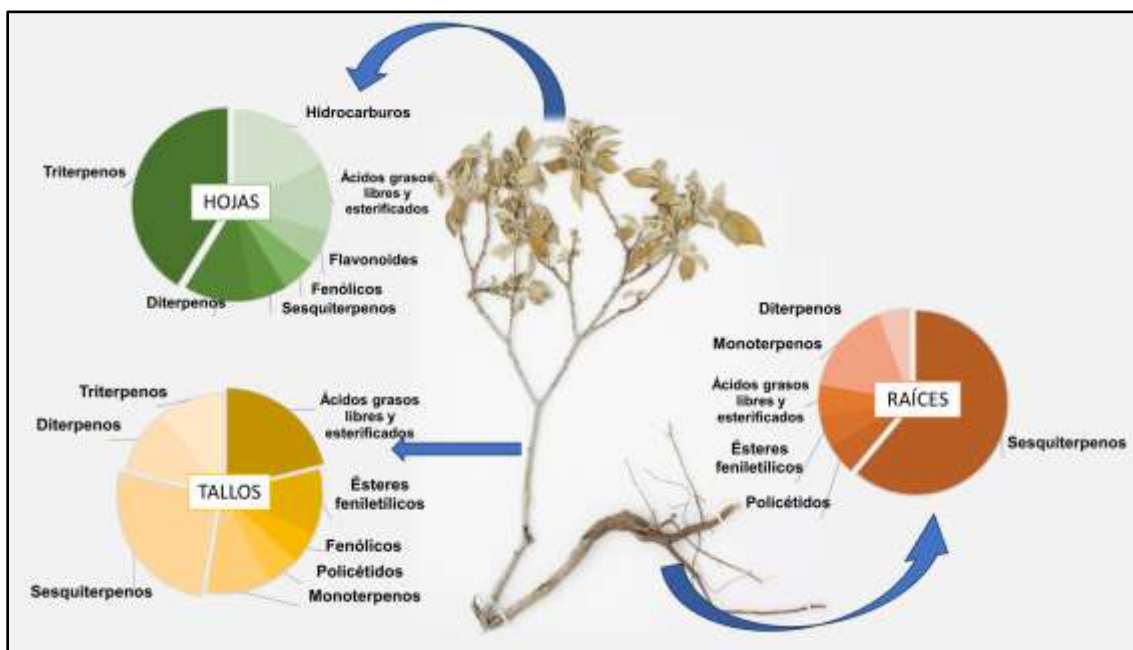


Figura 31. Compuestos mayoritarios presentes en cada uno de los extractos diclorometánicos de *C. ciliatoglandulifer*. Foto de *Croton ciliatoglandulifer* Ortega (Guzmán, 2010).

Tabla 14. Compuestos mayoritarios identificados anteriormente en *C. ciliatoglandulifer* y otras especies del género.

Tipo de compuesto	Compuesto identificado	Especie de donde se ha identificado	Referencia
MONOTERPENOS	Borneol	CC. CT. CP	(Sánchez-Hernández <i>et al.</i> , 2018) (Rhonalty-Rocha <i>et al.</i> , 2021)
	Acetato de borneol	CC. CT. CP.	
	Acetato de <i>cis</i> -crisantenilo	CT. CP.	
SESQUITERPENOS	Epicubenol	CC	(Sánchez-Hernández <i>et al.</i> , 2018)
	β -calacareno	CC	
	Óxido de cariofileno	CC	
	Dihidroagarofurano	CC	

CC: *Croton ciliatoglandulifer*. CT: *Croton tetradenius*. CP: *Croton pulegido*.

8.2.2. Identificación del compuesto PMTCC

En el espectro de ^{13}C de este compuesto, se observan 12 señales, la mayoría de estas aparecen con desplazamientos químicos pertenecientes a carbonos mono- y dioxigenados (Figura 24). En las modalidades APT y DEPT 90° , se identificaron 8 señales de metinos (CH) con valores de δ 69.16, 71.02, 62.35, 72.51, 73.94, 76.35, 81.32 y 92.12) y 4 otras señales que corresponden a 3 metilenos (CH_2) en δ 60.01, 61.29, 62.25 y 1 carbono cuaternario (103.63 ppm) (Figuras 25 y 26).

En el espectro de ^1H -RMN, se identificó un doblete en 5.26 ppm ($J = 3.5$ Hz) correspondiente a un protón anomérico en posición ecuatorial. Este protón permitió ubicar en el espectro COSY a los demás protones de esta unidad de hexopiranososa, con valores de J característicos de acoplamientos trans (Tabla 13). Estas evidencias indican la presencia de una glucopiranososa. Por lo tanto, la segunda unidad de hexosa debe de estar en forma furanósida, ya que no se detecta un protón anomérico. Sin embargo, dicha unidad cuenta con un carbono que se encuentra en 103.6 ppm sugiriendo una unidad de fructofuranosil. También se detectó en esta unidad la presencia de un hidroximetileno (CH_2OH), cuyos protones en 3.52 ppm solo se acoplan entre sí (Figura 23). Por otra parte, en el espectro HMBC del compuesto, el H-1 de la glucosa tiene interacción con el carbono en 103.6 ppm (Figura 29). Con estos datos, se estableció la estructura del compuesto PMTCC como glucopiranosil-1 \rightarrow 2'-fructofuranosa, que corresponde a la sacarosa (Figura 32). Otra evidencia adicional es el punto de fusión del compuesto que coincide con el reportado en la base de datos de PubChem, donde se reporta el valor de 185.5 $^\circ\text{C}$, siendo el experimental (181.3-184.3 $^\circ\text{C}$).

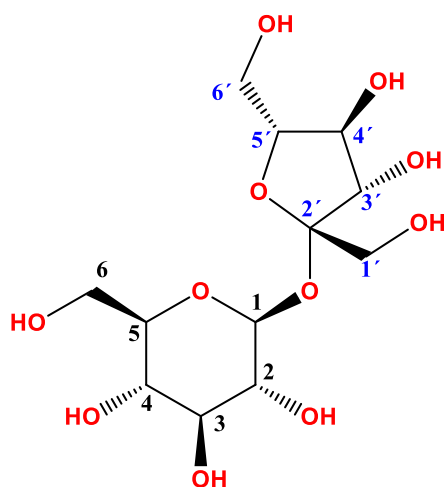


Figura 32. Estructura de la sacarosa.

8.3 Actividades antibacterianas de los compuestos mayoritarios caracterizados en *C. ciliatoglandulifer*

El extracto que mostró mejor actividad fue el DR. Por esta razón, se realizó una búsqueda de las actividades antibacterianas de sus compuestos mayoritarios. Dicha información se encuentra plasmada en las Tablas 17 y 18. En la tabla 15, se enlistan aquellos compuestos que por sí solos tuvieron actividad antibacteriana. Los compuestos **14** y **15** tienen actividad sobre las bacterias del presente trabajo (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*). De acuerdo con Guimarães y colaboradores, el compuesto **14** posee una CMI inferior a la del antibiótico control (sulfamida, con CMI de 0.06 mg/mL) contra *S. aureus*. *Bacillus cereus* presentó resistencia al antibiótico comercial sulfamida; sin embargo, el compuesto **14** logró su inhibición con una CMI de 0.12 mg/mL (Guimarães *et al.*, 2019). Por su parte, el compuesto **15**, aunque tiene una CMI < 0.5 mg/mL sobre *S. aureus*, tiene mucha menor actividad que la de la ampicilina (0.0625 mg/mL). A pesar de ello, el compuesto **15** tuvo actividad sobre *P. aeruginosa*, la cual presentó resistencia con el mismo antibiótico comercial (E Silva *et al.*, 2018). Existen reportes de la actividad antibacteriana de los compuestos **18**, **22** y **24** que de igual manera se encuentran en el DR (Tabla 15). Por otra parte, los compuestos **16**, **17** y **19** no se han evaluado de manera individual, pero se han identificado como los mayoritarios en aceites

esenciales con CMI reportadas (Tabla 16). No se encontraron las actividades de los compuestos restantes de DR (**20, 21 y 25-31**), lo que quiere decir que posiblemente no se han evaluado de manera individual y que no se descarta la posibilidad de que puedan tener actividad antibacteriana. En la Tabla 15, también se colocaron algunos de los compuestos mayoritarios de los extractos DH y DT con actividad antibacteriana. Si bien no son los mayoritarios del extracto DR, podrían contribuir a la actividad de este extracto.

Lo que nos lleva al siguiente análisis. La actividad de DR se debe a los compuestos mayoritarios, aunque no de todos, debido a que se ha corroborado en los estudios mencionados anteriormente su actividad. La inactividad de DT y DH puede deberse a la proporción de los compuestos con actividad antibacteriana y a la interacción que existe entre ellos mismos y los minoritarios, así como al posible antagonismo entre ellos. Tampoco se descarta que los extractos de *C. ciliatoglandulifer* puedan presentar actividad sobre otras bacterias, por ejemplo, las Gram negativas y aquellas con mayor interés clínico.

Tabla 15. Compuestos mayoritarios de los extractos de diclorometano de *C. ciliatoglandulifer* y su actividad antibacteriana reportada.

Compuesto	Identificado en (DR, DH o DT)	Nombre	Microorganismo	CMI (mg/mL)	Referencia
14	DR, DT, DH	Borneol	<i>Staphylococcus sanguinis</i> ATCC 49456;	<0.5	E Silva <i>et al.</i> , 2018
			<i>S. aureus</i> ATCC 25923; <i>E. coli</i> ATCC 25922; <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<0.5 <0.5 <0.5	
			<i>B. cereus</i> <i>S. typhimurium</i> <i>E. coli</i> <i>S. aureus</i>	0.12 0.12 0.25 0.03	Guimarães <i>et al.</i> , 2019
15	DR, DT, DH	Acetato de borneol	<i>S. sanguinis</i> ATCC 49456 <i>S. aureus</i> ATCC 25923 <i>E. coli</i> ATCC25922 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<0.5 <0.5 <0.5 <0.5	E Silva <i>et al.</i> , 2018
18	DR	Epicubenol	<i>S. aureus</i> (NCTC 8325-4)	0.0313	

			<i>S. aureus</i> (K1902, NAS*); <i>S. aureus</i> (K2378, NS*)	0.0652 0.125	Espinoza <i>et al.</i> , 2019
23	DR	trans-Calamenen-10-ol	<i>S. aureus</i> (NCTC 8325-4) <i>S. aureus</i> (K1902, NAS*); <i>S. aureus</i> (K2378, NS*)	0.125 0.125 0.125	
22	DR, DT	Copaborneol	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0.00484	Zhou <i>et al.</i> , 2021
24	DR, DH, DT	Ácido palmítico	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<0.5 <0.5	Xie <i>et al.</i> , 2021
32	DH	Óxido de cariofileno	<i>Candida albicans</i> ATCC90028	0.0815	Sánchez-Hernandez <i>et al.</i> , 2018
41	DH, DT	Tocoferol	<i>S. aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>E. coli</i>	>0.128 >0.128 >0.128	Ogata <i>et al.</i> , 2005
43	DH, DT	β-Sitosterol	<i>S. aureus</i>	0.00781	Anwar <i>et al.</i> , 2022
44	DH	Betulina	<i>S. aureus</i> SASM; <i>S. aureus</i> SARM <i>Enterococo faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	>0.128 >0.128 0.128 >0.128	Wang <i>et al.</i> , 2016

			<i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> <i>Salmonella entérica</i>	0.128 >0.128 >0.128	
46	DH	Lupeol	<i>S. aureus</i> SASM <i>S. aureus</i> SARM <i>Enterococo faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>B. cereus</i> <i>E. coli</i> <i>Salmonella entérica</i>	>0.128 >0.128 0.128 >0.128 0.128 >0.128 >0.128	Wang <i>et al.</i> , 2016
50	DT	Ac. Oléico	<i>M. tuberculosis</i> MR-10 <i>M. tuberculosis</i> MR-15 <i>M. tuberculosis</i> MR-26	0.100	Esquivel- Ferreño <i>et al.</i> , 2012
51	DT	Ac. Linoléico	<i>M. tuberculosis</i>	50	Choi <i>et al.</i> , 2016

SASM: *S. aureus* sensible a miticilina, SARM: *S. aureus* resistente a miticilina, **NAS***: norA ausente, **AS***: norA sobreexpresada.

Tabla 16. Compuestos mayoritarios de los extractos de diclorometano de *C. ciliatoglandulifer* presentes en aceites esenciales con actividad antibacteriana.

Compuesto	Identificado en (DR, DH o DT)	Nombre	Especie vegetal	Microorganismo	CMI mg/mL	Referencia
16	DR	Acetato de <i>cis</i> -crisantenilo	<i>Croton pulegiodoro</i>	<i>S. aureus</i>	8.0	Rhonalty-Rocha <i>et al.</i> , 2021
17	DR, DT	(+)-Ciclosativeno	<i>Croton oblongifolius</i>	<i>Propionibacterium acnés</i> ATCC 6919	0,125 %, v/v	Athikomkulchai <i>et al.</i> , 2015
19	DR	Espatulenol	<i>Filifolium sibiricum</i> (L.) Kitam	<i>S. aureus</i> <i>S. albus</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>E. coli</i>	5.20 41.63 10.41 10.41	Liang <i>et al.</i> , 2016

9. CONCLUSIONES

- Los DR, MR y MH tuvieron actividad inhibitoria del crecimiento de la cepa *S. aureus* ATCC 29213, mientras que para la cepa *B. cereus* ATCC 10876, solo el DR fue activo. En todos los casos, la actividad fue moderada.
- Ningún extracto de los tallos tuvo efecto sobre las bacterias utilizadas.
- La combinación del DR con ampicilina mostró mejores resultados ante la cepa *B. cereus* ATCC 10876, que es resistente a ampicilina. Dicha mejora puede atribuirse a un efecto sinérgico, ya que se utilizaron bajas concentraciones del extracto y el antibiótico.
- Los extractos metanólicos, que fueron obtenidos después de la extracción con diclorometano contienen principalmente compuestos polares, muchos de los cuales podrían ser extraídos con agua, el disolvente usado por los médicos tradicionales. Por lo tanto, el resultado de este estudio valida en parte el uso tradicional de esta planta para tratar infecciones bacterianas.
- Aunque se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual ocurre el sinergismo, por antecedentes previos, se puede inferir que este puede estar relacionado con la inhibición de las β -lactamasas.
- Se identificaron en total 44 compuestos, principalmente en los extractos diclorometánicos de *C. ciliatoglandulifer*. Estos compuestos fueron clasificados de acuerdo a su estructura. Los mayoritarios consistieron predominantemente en sesquiterpenos, que son característicos de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas.

10.PERSPECTIVAS

- Realizar el método de microdilución en caldo para determinar las concentraciones mínimas inhibitorias.
- Continuar con la identificación de los polvos F-375 y F-382 aislados del DR, una vez que se concluya el registro de sus espectros de RMN y evaluar su efecto inhibitorio en las cepas utilizadas.
- Seguir purificando los compuestos mayoritarios de ambos tipos de extractos y evaluar su actividad antibacteriana.
- Evaluar los extractos de *C. ciliatoglandulifer* en otras cepas bacterianas de interés clínico.
- Probar diferentes combinaciones con antibióticos comerciales, sobre todo con aquellos que se han dejado de utilizar por la alta resistencia de los microorganismos a estos.
- Determinar los mecanismos de acción lo más detallado posible.

9. REFERENCIAS

Abu El-Wafa WM, Ahmed RH y Ramadan MAH. Synergistic effects of pomegranate and rosemary extracts in combination with antibiotics against antibiotic resistance and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. Brazilian Journal of Microbiology. **2020**;51:1079–1092.

Abushaheen M, Muzahed, Fatani A, Alosaimi M, Mansy W, George M. y Jhugroo P. Antimicrobial resistance, mechanisms and its clinical significance. Journal Disease-a-Month. **2020**;66:10097.

Anwar R, Sukmasari S, Siti Aisyah L, Puspita Lestari F, Ilfani D, Febriani Yun Y, Diki Prestya P. Antimicrobial Activity of β -Sitosterol Isolated from *Kalanchoe tomentosa* Leaves Against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. Pakistan Journal of Biological Sciences. **2022**;25(7):602-607.

Aslam B, Wang W, Arshad MI, Khurshid M, Muzammil S, Rasool MH, Nisar A, Alvi RF, Aslam MA, Qamar MU, Salamat M, & Baloch Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. Infection and Drug Resistance. **2018**;11:1645–1658.

Athikomkulchai S, Tadtong S, Ruangrungrasi y Hongratanaworakit T. Chemical Composition of the Essential Oil from *Croton oblongifolius* and its Antibacterial Activity against *Propionibacterium acnes*. Natural Product Communications. **2015**;10(8):1459-60.

Balouri M, Sadiki M y Koraichi S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis. **2016**; 6(2): 71–79.

Barrantes-Jiménez K, Chacón-Jiménez L y Arias M. El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible. Población y Salud en Mesoamérica. **2022**;19(2):ISSN-1659-0201.

Beceiro A, Tomás M y Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? Clinical Microbiology Reviews. **2013**;26(2):185-230.

Brown D. Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void?. *Nature Reviews Drug Discovery*. **2015**;14(12):821–32.

Calderón-Rojas G y Aguilar-Ulate L. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXXIII*. **2016**;621:757-763.

Celestino-Hernández AG, Gómez-Ortiz V, Arvizu J, Ramos MA, Rodríguez JA, *et al.* Detection of *Bacillus cereus sensu lato* Isolates Posing Potential Health Risks in Mexican Chili Powder. *Microorganism*. **2021**;9:222

Choi WH. Evaluation of anti-tubercular activity of linolenic acid and conjugated-linoleic acid as effective inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **2016**;9(2):125-9.

Corrales-Ramírez L, Castillo A y Melo A. Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *NOVA*. **2013**;11(19):1794-2470.

Ding Q, Zhand S, Jin Z, Wang Z, Li S, *et al.* Characterization of the anti-*Staphylococcus aureus* fraction from *Penthorum chinense* Pursh stems. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **2019**;19(219):

E Silva ATM, Pereira VV, Takahashi JA, Silva RR, Duarte LP. Microwave-assisted synthesis of borneol esters and their antimicrobial activity. *Natural Product Research*. **2018**;32(14):1714-1720.

Ehling-Schulz M, Koehler T y Lereclus D. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* species with Pathogenic Potential. *Microbiology Spectrum*. **2019**;7(3): 2165-0497.

Espinoza J, Urzúa A, Sanhueza L, Walter M, Fincheira P, Muñoz P, Mendoza L, Wilkens M. Essential Oil, Extracts, and Sesquiterpenes Obtained From the Heartwood of *Pilgerodendron uviferum* Act as Potential Inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA Multidrug Efflux Pump. *Frontiers in Microbiology*. **2019**;10:337.

Esquivel-Ferriño PC, Favela-Hernández JMJ, Garza-González E, Waksman N, Ríos MY, Camacho-Corona MdR. Antimycobacterial Activity of Constituents from *Foeniculum vulgare* Var. Dulce Grown in Mexico. *Molecules*. **2012**; 17(7):8471-8482.

Estrada-Calles DM, Rodríguez MF y Velázquez EA. Resistencia a antibióticos betalactámicos: situación actual y nuevas estrategias. *RD-ICUAP*. **2022**;8(22):13-27.

Fernández-Ruiz D, Quirós M y Cuevas O. Los antibióticos y su impacto en la sociedad. *Revista Medisur*. **2021**;19(3):477-491.

García-Díaz J, Escalona J, Carvallo M, Rojas J, Machado R y de la Vega J. Isolation and characterization of metabolites from *Croton linearis* Jacq. Leaves. *Revista Cubana de Química*. **2015**;27(3):289-301.

Gastelo-Acosta R. y Maguiña C. Mecanismos de resistencia bacteriana. *Diagnóstico*. **2018**;57(2):82-86.

González-Vázquez R, King B, Aguilar M, Diego N y Lotina B. Pachypodol from *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. As Water-Splitting Enzyme Inhibitor on Thylakoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**;54:1217-1221.

Gordon Y, Cheung C, Justin S, Bae, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. **2021**;12(1):547-569.

Górniak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*. **2019**;18(1):241–72.

Guimarães AC, Meireles LM, Lemos MF, Guimarães MCC, Endringer DC, Fronza M, Scherer R. Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*. **2019**; 24(13):2471.

Guzmán MA. 2010. *Croton ciliatoglandulifer* Ortega. Red del Herbario del Noreste de México. <https://herbanwmex.net/portal/taxa/index.php?taxon=3409&clid=3812>.

Hamon A, Bastides F y Lefort A. Betalactámicos. EMC-Tratado de Medicina. **2021**;25(2):1-7.

Huerta A, López J, Aragón A, Budia F, del Estal F, Medina P y Viñuela E. Efecto de un pulverizado y un extracto acuoso de *Croton ciliatoglanduliferus* Ort. (Euphorbiaceae) incorporado a la dieta de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae). Boletín de sanidad vegetal-Plagas. **2002**;28:405-414.

Hutchings M, Truman A y Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. Current Opinion in Microbiology. **2019**;51:72-80.

Inostroza L, Castro A, Hernández E y Casanova H. Evaluación de la actividad leishmanicida y toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de los tallos de *croton alnifolius*. Revista Ciencia e Investigación. **2011**;14(2):15-21.

Jessberger N, Dietrich R, Granum E y Martbauer E. The Bacillus cereus Food Infection as Multifactorial Process. Toxins. **2020**;12(11):701.

Katiyar C, Gupta A, Kanjilal S, Katiyar S. Drug discovery from plant sources: An integrated approach. Ayu. **2012**;33(1):10-9.

Khameneh B, Iranshahy M, Soheili V y Sedigheh B. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. Antimicrobial Resistance & Infection Control. **2019**;1(118):1-28.

Kuok CF, Hoi SO, Hoi CF, Chan CH, Fong IH, Ngok CK, Meng LR, Fong P. Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant Staphylococcus aureus: A computational and experimental study. Exp Biol Med (Maywood). **2017**;242(7):731-743.

Lebeaux D, Ghigo JM y Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. **2014**;78(3):510-43.

Manso T, Lores M y de Miguel T. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Natural Polyphenolic Extracts on Clinical Isolates. Antibiotics. **2022**;11(1):2-18.

Mickymaray S. Efficacy and Mechanism of Traditional Medicinal Plants and Bioactive Compounds against Clinically Important Pathogens. *Antibiotics*. **2019**;(4)8:2-57.

Morales-Ubaldo A, Hernandez J, Valladares B, Velázquez V, Delgadillo L, Rosenfeld C, Rivero N y Zaragoza A. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico *Croton draco* sobre bacterias de importancia sanitaria. *Abanico Veterinario*. **2020**;10(1):1-10.

Nascimento A, Maria-Ferreira DT, Dal F, Kimura A, Santana P, Werner M, Iacomini M, Guilherme L, Sasaki CT, M de Souza L. Phytochemical analysis and anti-inflammatory evaluation of compounds from an aqueous extract of *Croton cajucara* Benth. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2017**;145: 821-830.

Nakazawa H, Kikuchi Y, Honda T, Isago T, Nozaki M. Enhancement of antimicrobial effects of various antibiotics against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by combination with fosfomicin. *Journal of Infection and Chemotherapy*. **2003**;9(4):304-9.

Liang S, Wei Q, Xue J, Sun Y, Chen Z, Kuang H, Wang Q. Chemical composition and biological activities of essential oil from *Filifolium sibiricum* (L.) Kitam. *Natural Product Research*. **2016**;30(24):2861-2863.

Ogata M, Tutumimoto Sato K, Kunikane T, Oka K, Seki M, Urano S, Hiramatsu K, Endo T. Antibacterial activity of dipropofol and related compounds. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **2005**;(6):1120-2.

OMS 2020a. Resistencia a los antibióticos. [consultada el 20 de Septiembre del 2021]. Consultado en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

OMS 2020b. Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [consultada el 01 de diciembre del 2021]. Consultado en: dirección web <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

Oteo J, Bou G, Chaves F y Oliver A. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. *Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. **2016**;1468.

Ovais M, Khalil AT, Islam NU, Ahmad I, Ayaz M, Saravanan M, Shinwari ZK, Mukherjee S. Role of plant phytochemicals and microbial enzymes in biosynthesis of metallic nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2018**;102(16):6799-6814.

Pachay-Solórzano J. Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico “Dr. Julio Villacreses Colmont Solca”, Portoviejo. *Universidad y Sociedad*. **2018**;10(5):219-223.

Palmeira S, Conserva L y Barbosa J. Clerodane Diterpenes from *Croton* Species: Distribution and a Compilation of their ¹³C NMR Spectral Data. *Journal Natural Product Communications*. **2006**;1(4):319-336.

Peacock SJ y Paterson GK. Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry*. **2015**;84:577–601.

Peres M, Delle M, Bella A, Pizzolatti M y Yunes R. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. **1997**;56:223-226.

Ravanelli N, Santos K, Motta L, Lago J y Furlan C. Alkaloids from *Croton echinocarpus* Baill.: Anti-HIV potential. *South African Journal of Botany*. **2015**;102:153-156.

Rhonalty-Rocha R, Carneiro Matos MN, Pérez Guerrero JA, Bastos Cavalcante RM, Soares Melo R, *et al.* Comparative study of the chemical composition, antibacterial activity and synergic effects of the essential oils of *Croton tetradenius* baill. And *C. pulegioidorus* baill. Against *Staphylococcus aureus* isolates. *Microbial Pathogenesis*. **2021**;126:104934.

Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*. 2018 ;4(3):482–501.

Salatino A, Faroa M y Negri G. Traditional uses, Chemistry and Pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). Journal Sociedade Brasileira de Química. **2007**; 18(1): 11-33.

Sánchez-Hernández G, Villa N, Rubio E, Alejo J, Cruz R y Lozoya E. Chemical constituents and anti-fungal activity of the essential oils from *Lantana hirta* AND *Croton ciliatoglandulifer*. Revista Química Latinoamerica. **2018**;46(2):17-24.

Suárez A, Chavez K, Blanco Z, Compagnone R, Tillett S y Torrico F. Estudio fitoquímico de la corteza de *Croton gossypifolius* colectada en Venezuela. Revista Química Latinoamerica. **2013**;41(3):161-170.

Suárez-Méndez B, Valdé O, Manzano R y Cruz D. Health care associated-infection in an intensive care unit. Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias. 2016; 16 (1): 1-16.

Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R y Barrientos L. Implicaciones estructurales y fisiológicas de las células bacterianas en los mecanismos de resistencia a los antibióticos. Revista Internacional de Morfología. **2017**;35(4):1214-1223.

Vallejo-Pazmiño GI, Andrade CF, Orellana PP y Ortiz JG. Resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aislados en ambientes nosocomiales. Vive Revista de Salud. **2022**;5(13), 22-34.

Vaou N, Stavropoulou E, Voidarou C, Tsigalou C y Bezirtzoglou E. Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. Microorganisms. **2021**;(10)9:1-28.

Wang CM, Chen HT, Wu ZY, Jhan YL, Shyu CL, Chou CH. Antibacterial and Synergistic Activity of Pentacyclic Triterpenoids Isolated from *Alstonia scholaris*. Molecules. **2016**; 21(2):139.

Werth BJ. Introducción a los antibióticos. PharmD, University of Washington School of Pharmacy. **2020**. Consultado en <https://www.merckmanuals.com/es->

us/hogar/infecciones/antibi%C3%B3ticos/introducci%C3%B3n-a-los-antibi%C3%B3ticos

Wolff-Cordeiro K, Lousada J, Malange K, do Pardo P, de Oliveira P, Rodríguez F, de Cassia K, Silva W y Toffoli M. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Croton urucurana* Baillon bark. *Journal of Ethnopharmacology*. **2016**;183:128-135.

Xie Y, Peng Q, Ji Y, Xie A, Yang L, Mu S, Li Z, He T, Xiao Y, Zhao J, Zhang Q. Isolation and Identification of Antibacterial Bioactive Compounds From *Bacillus megaterium* L2. *Frontiers in Microbiology*. **2021**;12:645484.

Xu W, Liu W y Liang Q. Chemical Constituents from *Croton* Species and Their Biological Activities. *Journal Molecules*. **2018**;23(9):2333.

Yan Y, Zhang C, Lv L, Gao B y Li M. Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics*. **2021**;(3)10:2-30.

Zou D, Xie K, Wang H, Chen Y, Xie M. Inhibitory effects of biochanin a on the efflux pump of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Wei Sheng Wu Xue Bao*. **2014**;54(10):1204–11.

Zou G, Su Z., Zhang H., Wang Y., Yang J. y Zou Z. Flavonoids from the Stems of *Croton caudatus* Geisel. var. *tomentosus* Hook. *Molecules*. **2010**;15(1):1097-1102.

Zhou G, Shi QS, Huang XM y Xie XB. The three bacterial lines of defense against antimicrobial agents. *International Journal of Molecular Sciences*. **2015**;16(9):21711-33.

Zhou Y, Li LY, Yin X, Zhang QY, Liang H, Tu PF. Sesquiterpenoids from *Pilea cavaleriei*. *Natural Product Research*. **2021**;35(9):1537-1543.