



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efecto Antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* Resistente a Meticilina del Extracto Metanólico de un Cultivo Celular de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier elicitado con Metil Jasmonato

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

EMMA ISABEL CHÁVEZ VALDEZ

ASESORA ACADÉMICA: DRA. EN Bt. MARÍA ELENA ESTRADA ZÚÑIGA

CO-ASESOR: DR. EN Bt. AURELIO NIETO TRUJILLO

EL CERRILLO, PIEDRAS BLANCAS, 10 DE JULIO DE 2024.



Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México y al Centro de Investigación en Recursos Bióticos (CIRB) por las instalaciones y recursos brindados para el desarrollo de este proyecto.

Al CONSEJO MEXIQUENSE DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (COMECYT), por el financiamiento del proyecto de investigación "Metabólica y actividades biológicas de las fracciones resultantes de la purificación parcial de un extracto metanólico, obtenido de cultivos in vitro de plantas medicinales", clave: FICDTEM-2021-048 del programa "Financiamiento Para Investigación de Mujeres Científicas", modalidad Apoyo para Investigación Científica.

Índice

Tablas	6
Figuras	7
Abreviaturas	8
Resumen	10
Abstract	12
1. Introducción.....	14
2. Antecedentes.....	16
2.1 Metabolismo secundario en plantas	16
2.1.1 Terpenos, terpenoides o isoprenoides.....	17
2.1.2. Compuestos nitrogenados.....	19
2.1.3 Compuestos fenólicos.....	20
2.2 Género <i>Kalanchoe</i>	24
2.2.1. Distribución y usos medicinales de <i>Kalanchoe spp.</i>	24
2.2.2 Fitoquímica y bioactividad de metabolitos secundarios de <i>Kalanchoe spp.</i>	25
2.2.3 <i>Kalanchoe daigremontiana</i> y sus usos en la medicina tradicional.....	36
2.3 La resistencia a antibióticos como problema de salud pública	38
2.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> y SARM.....	40
2.3.2. Actividad antimicrobiana contra <i>S. aureus</i> y SARM reportada de MS de plantas.	44
2.4. Cultivo de células vegetales <i>in vitro</i> (CCV).....	46
2.4.2 Obtención de MS a partir de CCVs en suspensión	47
2.4.3 Elicitación, estrategia empleada para incrementar la producción de MS	48
3. Justificación	52
4. Hipótesis.....	53
5. Objetivos.....	53
5.1 General	53
5.2 Particulares.....	53
6. Materiales y métodos.....	54
6.1 Suspensión celular de <i>K. daigremontiana</i> y su elicitación con MeJa.....	54
6.2 Obtención del extracto metanólico	54
6.3 Elaboración de las soluciones Stock y controles.....	54
6.4 Preparación de discos de ensayo.....	55
6.5 Reactivación de cepas.....	55

6.6 Preparación del inóculo	56
6.7 Evaluación del efecto antibacteriano por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer)....	56
6.8 Análisis estadístico	57
7. Resultados	58
7.1 Efecto de la concentración del extracto metanólico del CCV elicitado con MeJa de <i>K. daigremontiana</i> en la inhibición de <i>S. aureus</i> sensible a antibióticos y SARM	58
7.2 Correlación entre la actividad antibacteriana y el contenido de fenoles y de flavonoides totales en los extractos metanólicos del cultivo celular de <i>K. daigremontiana</i> , elicitado con diferentes concentraciones de MeJa	67
8. Discusión.....	68
9. Conclusiones	72
10. Perspectivas.....	74
11. Referencias bibliográficas	75

Tablas

Tabla

1. Compuestos fenólicos reportados en especies de *Kalanchoe* presentes en México.
2. Terpenoides reportados en especies de *Kalanchoe* presentes en México.
3. Compuestos nitrogenados reportados en especies de *Kalanchoe* presentes en México.
4. Actividades farmacológicas de MS reportados en especies de *Kalanchoe*.
5. Mecanismos de resistencia bacteriana contra antibióticos.
6. Clasificación y tipos de elicitores.
7. Porcentajes de inhibición del crecimiento contra *S. aureus* sensible a antibióticos del extracto metanólico obtenido del CCV sometido a elicitación con MeJa (50-200 μ M) a diferentes concentraciones de extracto.
8. Porcentajes de inhibición del crecimiento contra SARM del extracto metanólico obtenido del CCV sometido a elicitación con MeJa (50-200 μ M) a diferentes concentraciones de extracto.
9. Correlación entre la actividad antibacteriana para *S. aureus* sensible a antibióticos y SARM y el CFT y CFlaT del extracto metanólico obtenido de un CCV de *K. daigremontiana* elicitado con diferentes concentraciones de MeJa (0-200 μ M).

Figuras

Figura

1. Elementos básicos del metabolismo primario y su relación con el metabolismo secundario de plantas.
2. Esqueleto de fenilbenzopirano, estructura básica de los flavonoides.
3. Ruta fenilpropanoide para la síntesis de diferentes compuestos fenólicos.
4. Distribución de *Kalanchoe spp* en territorio mexicano.
5. *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier.
6. *Staphylococcus aureus*.
7. Mecanismos moleculares de la resistencia a los antibióticos observados en SARM.
8. Prevalencia mundial de SARM.
9. Pasos generales para la obtención de un CCV en suspensión.
10. Contenido de Fenoles Totales en un CCV de *K. daigremontiana* elicitado con MeJa a diferentes concentraciones.
11. Contenido de Fenoles Totales en un CCV de *K. daigremontiana* elicitado con MeJa a diferentes concentraciones.
12. Callo friable en los bordes de los explantes de *K. daigremontiana* y su subcultivo
13. Reactivación de cepas.
14. Método de difusión en disco para *S. aureus* y SARM.
15. Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano contra *S. aureus* sensible a antibióticos con diferentes concentraciones del extracto metanólico del CCV sometido a distintos tratamientos de elicitación con MeJa.
16. Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano contra SARM con diferentes concentraciones del extracto metanólico del CCV sometido a distintos tratamientos de elicitación con MeJa.

Abreviaturas

%I	Porcentaje de inhibición
AF	Ácido Fenólico
AL	Alcaloide
AM-H	Agar Mueller-Hinton
AN	Antocianina
AST	Agar Soya Trypticaseína
BF	Bufadienólido
CCV	Cultivo de Células Vegetales
CF	Compuesto fenólico
CFT	Contenido de fenoles totales
CFlaT	Contenido de flavonoides totales
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CST	Caldo Soya Trypticaseína
DAPH	Ácido 3-deoxi-D- arabino-heptusolónico-7-fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
E-4-P	Eritrosa-4-Fosfato
ES	Esterol
FE	Fenol
FL	Flavonoide
GL	Glucosinolato
IF	Isoflavona
<i>K. daigremontiana</i>	<i>Kalanchoe daigremontiana</i> Raym.-Hamet & H. Perrier
MeJa	Metil Jasmonato
MeOH	Metanol
MPs	Metabolitos Primarios
MSs	Metabolitos Secundarios
nFL	No Flavonoide
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAL	Fenilalanina Amonio Liasa
PBP2a	Proteína de unión a la Penicilina
PEP	Fosfoenolpiruvato
QN	Quinona

SA

S. aureus

SARM

TT

Ácido salicílico

Staphylococcus aureus sensible a antibióticos

Staphylococcus aureus Resistente a Metilina

Triterpenoide

Resumen

Kalanchoe daigremontiana Raym.-Hamet & H. Perrier es una especie que ha sido utilizada en la medicina tradicional como agente antimicrobiano y para tratar infecciones en piel, producidas por bacterias como *Staphylococcus aureus* (Assis-de-Andrade et al, 2023), especie que ha generado resistencia a antibióticos como la variante resistente a meticilina (SARM) y que tiene una alta prevalencia en México (52-57%) (Vázquez-Rosas et al., 2021), por lo que la investigación de extractos de plantas medicinales tradicionales como posibles fuentes de agentes antimicrobianos se presenta como una línea importante. La actividad antibacteriana de *K. daigremontiana* está asociada a los metabolitos secundarios (MSs) que presenta, como los del tipo fenólico (incluyendo los flavonoides). Para la producción de MSs de origen vegetal con interés farmacológico se han implementado herramientas biotecnológicas como los cultivos celulares vegetales (CCVs) *in vitro*, que son apropiados para este propósito, ya que se llevan a cabo bajo condiciones controladas y, además, siendo posible la aplicación de elicitores para lograr mejores rendimientos.

Previamente, en un CCV de *K. daigremontiana* se realizaron tratamientos de elicitación con metil jasmonato (MeJa) en concentraciones de 0 (control), 50, 100, 150 y 200 μM , y se demostró que la elicitación incrementó el contenido de flavonoides totales (CFlaT) (3.18, 1.77, 3.91 y 1.96 mg equivalentes de quercetina por gramo de biomasa (mg EQ/g) respectivamente) y sólo las concentraciones de 50 y 150 μM de MeJa incrementaron el contenido de fenoles totales (CFT) (5.84 y 5.39 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de biomasa (EAG/g) respectivamente) en los extractos metanólicos (Mejía-Sánchez, 2021).

En este trabajo se llevó a cabo la evaluación del efecto antibacteriano del extracto metanólico del CCV de *K. daigremontiana* elicitado con las diferentes concentraciones de MeJa (0, 50, 100, 150 y 200 μM) sobre dos cepas de interés clínico: *Staphylococcus aureus* sensible a antibióticos (*S. aureus*) y su variante resistente a meticilina (SARM), por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer) en concentraciones de 0.5, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 μg /disco de cada extracto.

Para cada extracto metanólico del CCV de *K. daigremontiana*, elicitado en diferentes tratamientos con MeJa (50 - 200 μM), en concentraciones de 0.5 - 8.0 μg /disco se observó un mayor efecto antibacteriano en *S. aureus* y SARM comparándose con el control. En lo general, la cepa de *S. aureus* fue más sensible a los extractos metanólicos que la cepa de

SARM, ya que presentó porcentajes de inhibición más altos. Ambas cepas mostraron sensibilidad a la vancomicina (control positivo), mientras que la solución de DMSO al 3% (control negativo) no presentó actividad antibacteriana.

El tratamiento de elicitación de 150 μM con MeJa mostró diferencias significativas para los porcentajes de inhibición de *S. aureus* para todas las concentraciones de extracto probadas (0.5-8.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$) comparándose con el tratamiento sin elicitación, y siendo con las concentraciones de 4.0, 6.0 y 8.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$ los porcentajes más altos de inhibición obtenidos (29.86, 28.31 y 31.75). El tratamiento de elicitación con MeJa 100 y 150 μM causó porcentajes de inhibición contra SARM mayores comparados al extracto control (metil jasmonato 0 μM), para 100 μM en 3 concentraciones empleadas: 0.5, 4.0, y 6.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$ con porcentajes de inhibición de 15.67, 18.01 y 14.34, respectivamente; y para 150 μM en 4 concentraciones empleadas: 0.5, 2.0, 6.0 y 8.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$ con porcentajes de 15.12, 15.13, 14.77 y 16.52, respectivamente.

El CFlaT y el porcentaje de inhibición mostraron una correlación positiva baja en ambas cepas (0.1456 para *S. aureus*, 0.1925 para SARM), mientras que el CFT y el porcentaje de inhibición en SARM presentaron una correlación positiva baja (0.1167); por lo que, además de esos tipos de MSs, podría haber otros tipos de MSs presentes en los extractos obtenidos del CCV de *K. daigremontiana*, elicitado con MeJa que contribuyeron al efecto antibacteriano.

Abstract

Kalanchoe daigremontiana Raym.-Hamet & H. Perrier is a species that has been used in traditional medicine as an antimicrobial agent and to treat bacterial skin infections caused by bacteria such as *Staphylococcus aureus* (Assis-de-Andrade et al, 2023), species that has generated resistance to antibiotics such as the methicillin-resistant variant (MRSA) and has a high prevalence in Mexico (52-57%) (Vázquez-Rosas et al., 2021), therefore, the research of traditional medicinal plant extracts as possible sources of antimicrobial agents is presented as an important line. The antibacterial activity of *K. daigremontiana* is due to the secondary metabolites (MSs) that it presents, such as phenolics (including flavonoids). To produce compounds of pharmacological interest of plant origin, biotechnological tools such as *in vitro* plant cell cultures have been implemented to produce MSs with pharmacological interest of plant origin, which are appropriate for this purpose, since they are carried out under controlled conditions and, in addition, it is possible the application of elicitors to achieve better yields.

Previously, elicitation treatments with methyl jasmonate (MeJa) were performed in a CCV of *K. daigremontiana* at concentrations of 0 (control), 50, 100, 150 and 200 μM , and it was demonstrated that elicitation stimulated the total flavonoid content (CFIaT) (3.18, 1.77, 3.91 and 1.96 mg quercetin equivalents per gram of biomass (mg EQ/g) respectively) and only concentrations of 50 and 150 μM of MeJa increased the total phenol content (CFT) (5.84 and 5.39 mg gallic acid equivalents per gram of biomass (GAE/g) respectively) in methanolic extracts (Mejía-Sánchez, 2021).

In this work, the evaluation of the antibacterial effect of the methanolic extract of *K. daigremontiana* CCV elicited with different concentrations of MeJa (0, 50, 100, 150 and 200 μM) on two strains of clinical interest: *Staphylococcus aureus* sensitive to antibiotics (*S. aureus*) and its methicillin-resistant variant (MRSA), was carried out by the disk diffusion method (Kirby-Bauer) at concentrations of 0.5, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 $\mu\text{g/disk}$ of each extract.

For each *in vitro* cell culture elicited methanolic extract of *K. daigremontiana*, in different treatments with MeJa (50 - 200 μM), at concentrations of 0.5 - 8.0 $\mu\text{g/disk}$, a greater antibacterial effect on *S. aureus* and MRSA was observed compared to the control. In general, the *S. aureus* strain was more sensitive to methanolic extracts than the MRSA strain, as it showed higher inhibition percentages. Both strains showed sensitivity to

vancomycin (positive control), while the 3% DMSO solution (negative control) showed no antibacterial activity.

The 150 μM elicitation treatment with MeJa showed significant differences for the inhibition percentages of *S. aureus* for all the extract concentrations tested (0.5-8.0 $\mu\text{g}/\text{disk}$) compared to the treatment without elicitation, with the concentrations of 4.0, 6.0 and 8.0 $\mu\text{g}/\text{disk}$ being the highest inhibition percentages obtained (29.86, 28.31 and 31.75), The elicitation treatment with MeJa 100 and 150 μM caused higher inhibition percentages against MRSA compared to the control extract (0 μM methyl jasmonate), for 100 μM at 3 concentrations used: 0.5, 4.0, and 6.0 $\mu\text{g}/\text{disk}$ with inhibition percentages of 15.67, 18.01, and 14.34, respectively; and for 150 μM at 4 concentrations used: 0.5, 2.0, 6.0, and 8.0 $\mu\text{g}/\text{disk}$ with percentages of 15.12, 15.13, 14.77, and 16.52, respectively.

The CFlaT and the percentage inhibition showed a low positive correlation in both strains (0.1456 for *S. aureus*, 0.1925 for MRSA), while the CFT and the percentage inhibition in MRSA presented a low positive correlation (0.1167 therefore, in addition to those types of MSs, there could be other types of MSs present in the extracts obtained from *K. daigremontiana* CCV, elicited with MeJa that contributed to the antibacterial effect.

1. Introducción

La resistencia antimicrobiana ha sido declarada como una de las diez principales amenazas de salud pública a nivel mundial de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), siendo el uso indebido y excesivo de los antibióticos el principal factor que determina la aparición de bacterias patógenas farmacorresistentes (OMS, 2020).

En el año 2017, la OMS publicó una lista de «bacterias patógenas prioritarias» resistentes a antibióticos, con el propósito de promover la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos. En esta lista se encuentra *S. aureus* y sus variantes, con Sensibilidad Intermedia a Vancomicina (SAIV), Resistente a Vancomicina (SARV) y Resistente a Meticilina (SARM); clasificadas como Prioridad 2: Elevada (OMS, 2017).

Desde su aparición en la década de 1960, SARM se ha convertido en una de las principales causas de infecciones bacterianas invasivas con alta mortalidad adquiridas en centros de salud (Lee *et al.*, 2018), pudiendo causar infecciones de piel y tejidos blandos, bacteriemia e incluso endocarditis (Turner *et al.*, 2019). Aunque la prevalencia mundial promedio de SARM es del 40%, existen grandes diferencias en distintas ubicaciones geográficas, por ejemplo: mientras que en Europa y Estados Unidos la prevalencia informada está entre 0.9-26.8% y 23.7-45%, respectivamente, en México está entre 52-57% (Vázquez-Rosas *et al.*, 2021).

En los últimos años, como parte de la investigación para el descubrimiento de nuevos antibióticos, se ha demostrado la inhibición del crecimiento de *S. aureus*, empleando extractos de especies del género *Kalanchoe*. Esta actividad biológica se atribuye principalmente a su composición química, relacionada con una gran variedad de MSs (Manan *et al.*, 2016; Richwagen *et al.*, 2019).

K. daigremontiana es una especie ampliamente distribuida en México, en estados como Chiapas, México, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Tabasco, Tamaulipas, San Luis Potosí, Sinaloa, Veracruz y Yucatán (Golubov-Figueroa, 2012) y ha sido utilizada en la Medicina Tradicional para tratar infecciones y enfermedades de la piel (Kolodziejczyk-Czepas *et al.*, 2016; Puertas-Mejía *et al.*, 2014), presenta distintos tipos de MSs, entre los que destacan terpenos tipo bufadienólidos (Stefanowicz-Hajduk *et al.*, 2020), así como compuestos fenólicos tipo ácidos fenólicos

(*Bogucka-Kocka et al., 2016; Chernetsky et al., 2018*), flavonoides (*Stefanowicz-Hajduk et al., 2020*) y flavonas (*García-Pérez et al., 2021*).

Se ha demostrado que algunos ácidos fenólicos y flavonoides, como el ácido cafeico, galato de epigalocatequina, hidrato de catequina, kaempferol y quercetina, poseen actividad antibacteriana contra SARM asociada con su capacidad para dañar la membrana bacteriana, inhibición de factores de virulencia como enzimas y toxinas, y supresión de la formación de biopelículas bacterianas. (*Miklasińska-Majdanik et al., 2018*).

Una herramienta importante para la producción continua y controlada de MSs es el cultivo *in vitro* de plantas (*Espinosa-Leal et al., 2018*), el cual, puede ser combinado con otras estrategias como la elicitación química, con compuestos como MeJa. Previamente, se reportó que en un cultivo celular de *K. daigremontiana*, el empleo de MeJa incrementó la concentración de MSs de tipo fenólico (*Mejía-Sánchez, 2021*). En este trabajo se evaluará el efecto antibacteriano contra SARM del extracto metanólico obtenido de un cultivo celular de *K. daigremontiana*, elicitado con diferentes concentraciones de MeJa.

2. Antecedentes

2.1 Metabolismo secundario en plantas

El conjunto de reacciones bioquímicas que tienen lugar en todas las células de un organismo constituye el metabolismo, y, sus intermediarios y productos se denominan metabolitos (Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Thirumurugan et al., 2018).

Las células vegetales realizan reacciones metabólicas comunes que conducen a la formación de moléculas necesarias para su supervivencia y que participan en los procesos de crecimiento, regeneración, reproducción y mantenimiento de los tejidos. El conjunto de estos procesos constituye el metabolismo primario, y los compuestos que se derivan de las reacciones químicas se denominan metabolitos primarios (MPs) (Saad, 2017).

Algunos de los MPs más fundamentales para la célula son los carbohidratos, las proteínas, ácidos grasos y los ácidos nucleicos, los cuales son esencialmente los mismos en todos los organismos, con variaciones menores en plantas. Estos compuestos orgánicos son sintetizados a través de reacciones bioquímicas en los procesos de fotosíntesis, glucólisis ciclo de Krebs o del ácido cítrico, síntesis de aminoácidos y duplicación del material genético (Dewick, 2009).

De manera simultánea al metabolismo primario, en plantas (y también en animales) existen una serie de reacciones bioquímicas que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. A este tipo de metabolismo se le denomina secundario y sus productos son los metabolitos secundarios (MSs) (Figura.1). Las principales rutas y los componentes empleados para la biosíntesis de estos compuestos se derivan del metabolismo primario del carbono, siendo las principales vías la de acetil Coenzima A, ácido shikímico, ácido mevalónico y 1-desoxilulosa 5-fosfato (Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Kabera et al., 2014).

Los MSs se encuentran presentes en organismos o especies específicos y se sintetizan generalmente solo en células y/o tejidos específicos, entre sus principales funciones destacan, ser parte de la comunicación entre la planta y su ambiente, la protección contra la luz ultravioleta, en respuesta de defensa contra herbívoros y patógenos acumulación de pigmentos en los pétalos de las flores, atracción de polinizadores, liberación por las raíces de MSs en la rizosfera para atraer microorganismos beneficiosos del suelo, entre otras funciones (Buchanan et al., 2015; Dewick, 2009; Shitan, 2016; Thirumurugan et al., 2018).

Los MS constituyen una reserva enormemente rica de biodiversidad química, más de 200,000 diversos compuestos han sido identificados (*Buchanan et.al, 2015*) y de manera general han sido clasificados en tres grandes grupos de acuerdo con su estructura: terpenoides, compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos (*Kabera et al., 2014*).

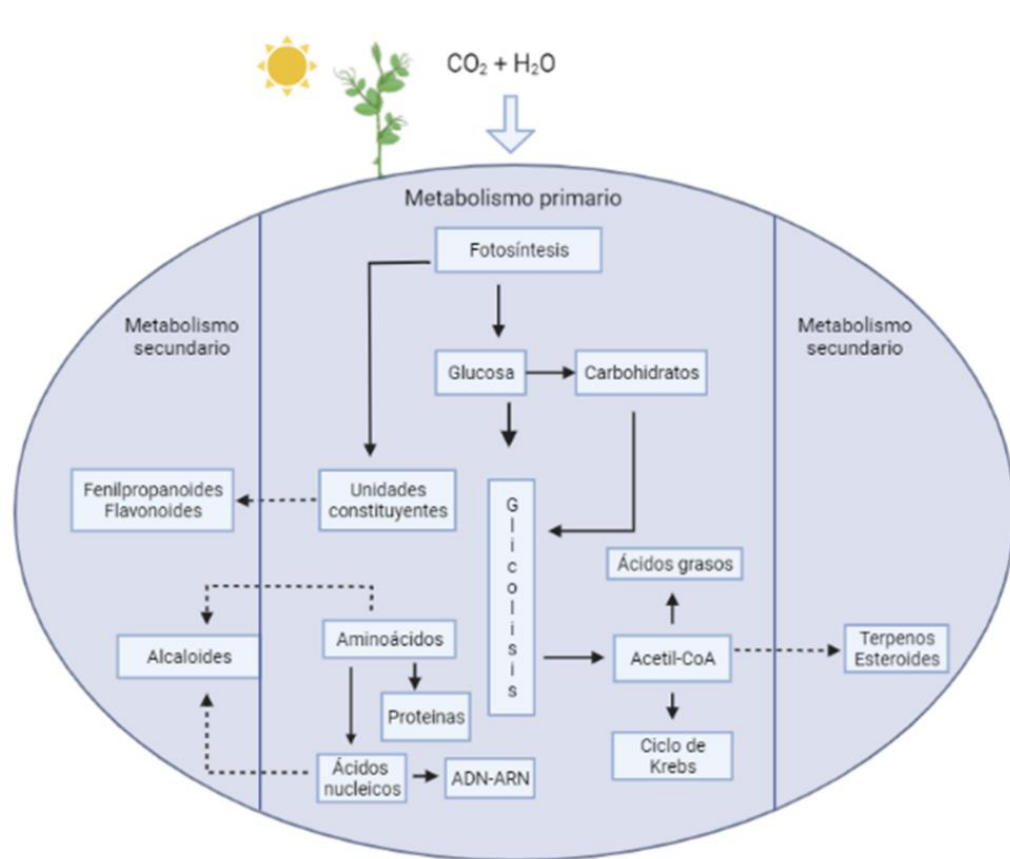


Figura 1. Elementos básicos del metabolismo primario y su relación con el metabolismo secundario de plantas (imagen adaptada de Ávalos & Pérez-Urria, 2009) (Imagen creada en Biorender.com).

2.1.1 Terpenos, terpenoides o isoprenoides

Los terpenos, son la clase más grande de MSs en plantas. Exhiben una enorme diversidad estructural, con más de 30,000 compuestos descritos hasta la fecha, pero están unidos por su origen biosintético común (*Buchanan et al., 2015*).

Todos los terpenos derivan de dos precursores comunes de cinco átomos de carbono, el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero el dimetilalil difosfato (DMAPP) (*Villavicencio-*

Contreras, 2015). En plantas, dos vías bioquímicas distintas los sintetizan: la vía 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), localizada en los plastidios y la vía del ácido mevalónico (MVA) localizada en el citosol y que parte de dos unidades de acetil coenzima A (Ac-CoA) (*Bergman et al., 2019*).

De manera general, los terpenos se clasifican por el número de unidades isopreno (moléculas de 5 carbonos) que contienen: 5 carbonos como hemiterpenos, 10 carbonos como monoterpenos, 15 carbonos como sesquiterpenos, 20 carbonos como diterpenos 30 carbonos como triterpenos, y así sucesivamente (*Ávalos & Pérez-Urria-Carril, 2009; Buchanan et al., 2015*).

Los mono y sesquiterpenos son compuestos generalmente volátiles y son los componentes principales de hierbas y especias, como la albahaca, el orégano, la menta, entre otras, proporcionando su olor y sabor característico. Estos compuestos también sirven como defensas contra mamíferos e insectos herbívoros (*Buchanan et al., 2015*).

Entre los triterpenos se encuentran los esteroides y esteroides derivados del escualeno. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, que es el caso de la mayoría de los esteroides vegetales, se denominan esteroides. Están encargados de regular el crecimiento y desarrollo de las plantas y de participar en la transducción de señales transmembrana. Los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol (*Ávalos & Pérez-Urria-Carril, 2009; Valitova et al., 2016*).

Entre esta clase de MSs, también se incluyen reguladores del crecimiento vegetal con la capacidad de controlar algunos procesos vegetales de desarrollo y crecimiento, como giberelinas y ácido abscísico, que se sintetizan por la vía MEP en los plastidios y después alcanzan su forma biológicamente activa en el citosol (*Buchanan et al., 2015*).

Los pigmentos carotenoides son otro grupo importante de terpenos vegetales con funciones bien conocidas. Estas sustancias rojas, naranjas y amarillas participan en los procesos de transferencia de energía de la fotosíntesis, protegen los tejidos fotosintéticos de la oxidación en condiciones de luz excesiva y atraen polinizadores hacia las flores y frutos para la dispersión de polen y semillas (*Buchanan et al., 2015*).

A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial (*Ávalos & Pérez-Urria-Carril, 2009*), siendo utilizados como sabores y fragancias de alimentos, bebidas, jabones, perfumes y otros

productos. Muchos terpenos también tienen importancia nutricional o farmacéutica, incluidas las vitaminas A, D, E y K, así como algunos fármacos anticancerígenos como el taxol (*Buchanan et al., 2015*).

2.1.2. Compuestos nitrogenados.

Esta familia de MSs incluye principalmente a los alcaloides, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos y se caracterizan por contener al menos un átomo de nitrógeno en su estructura (*Sepúlveda-Jiménez et al., 2003*).

Los alcaloides son un diverso grupo de compuestos con cerca de 12,000 estructuras conocidas (*Fagundes-Rosales et al., 2020*); son fisiológicamente activos en humanos y, por ende, de gran interés para la industria farmacéutica. La mayoría son moléculas heterocíclicas, pero algunas otras como la colchicina son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) (*Ávalos & Pérez-Urria, 2009; Pérez-Alonso & Jiménez, 2011*).

Se ha descubierto que la mayoría de los alcaloides se derivan de aminoácidos, como tirosina, fenilalanina, triptófano, arginina, lisina e histidina. Sin embargo, también pueden derivarse de otros precursores como las purinas como es el caso de la cafeína. Asimismo, pueden formarse a partir de policétidos derivados del acetato, en los que el nitrógeno amínico se introduce como en la cicutina o conina. (*Roberts et al., 2010*).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y/o psicológicas, usualmente como consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos (*Ávalos & Pérez-Urria, 2009*). Entre los alcaloides utilizados en la actualidad con fines farmacológicos están la atropina, morfina, codeína y vincristina (*Buchanan et al., 2015; Pérez-Alonso & Jiménez, 2011*).

Los glucósidos cianogénicos son constituyentes derivados de aminoácidos, sin embargo, a pesar de su gran diversidad estructural, se cree que casi todos derivan de solo seis aminoácidos diferentes L-valina, L-isoleucina, L-leucina, L-fenilalanina o L-tirosina y ciclopentenil-glicina (un aminoácido no proteico) (*Bolarinwa et al., 2016*).

Este tipo de MSs son considerados como los metabolitos con mayor relación en las funciones de defensa contra herbívoros, ya que se libera cianuro (CN⁻) cuando son

hidrolizados al masticarse o digerirse, provocando intoxicaciones (*Bolarinwa et al., 2016; Pérez-Alonso & Jiménez, 2011*).

Los glucosinolatos son otro tipo de MSs que están constituidos por un residuo de β -D-glucopiranososa unido a través de un átomo de azufre a un éster de (Z)-N-hidroximosulfato, más un grupo lateral definido por uno de los ocho aminoácidos de los que se derivan: leucina, valina, metionina, isoleucina y alanina (glucosinolatos alifáticos), triptófano, fenilalanina y tirosina (glucosinolatos indol y aromáticos) (*Buchanan et al., 2015; Halkier & Gershenzon, 2006; Sánchez-Pujante, 2017*).

Estos compuestos son hidrolizados por la enzima mirosinasa cuando las plantas son estresadas por factores bióticos y abióticos, juegan un papel importante en las respuestas de defensa de las plantas contra diferentes tipos de estrés. Además, estos compuestos tienen efectos beneficiosos sobre la salud humana porque son fuertes antioxidantes y tienen potentes actividades cardiovasculares, antidiabéticas, antimicrobianas y antitumorales (*Sánchez-Pujante, 2017*).

2.1.3 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos (CF) o también llamados polifenoles o fenilpropanoides, están ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal y han sido identificados alrededor de 8,000 estructuras diferentes. Son moléculas de simples a complejas y poseen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (-OH) (*Martin, 2018; Patil & Masand, 2018*). Estos compuestos aromáticos tienen papeles importantes, como pigmentos, saborizantes en frutas, complementos aromáticos en flores, para la protección contra la luz ultravioleta, antioxidantes, agentes de señalización, como mecanismos de defensa contra herbívoros y patógenos, y, para la inhibición del crecimiento de otras plantas competidoras (alelopatía) (*Buchanan et al., 2015; Heleno et al., 2015*).

Los CF se pueden clasificar en dos grupos principales: flavonoides (FL) y no flavonoides (nFL). Los flavonoides son los fenoles más abundantes, contienen un esqueleto de fenilbenzopirano: dos anillos de fenilo (A y B) unidos a través de un anillo de pirano heterocíclico (anillo C) (*Figura 2*) (*de la Rosa et al., 2019*).

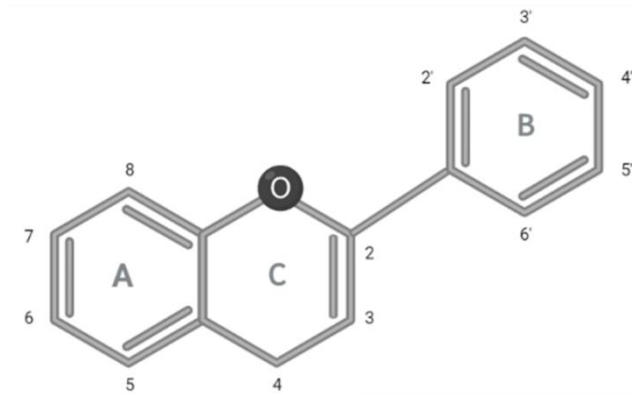


Figura 2. Esqueleto de fenilbenzopirano, estructura básica de los flavonoides (Imagen creada en Biorender.com).

Los aproximadamente 4,000 FL descritos, se pueden dividir en seis grupos o familias: antocianinas, flavonas, flavonoles, flavanoles, flavanonas e isoflavonas; según las diferencias en el anillo de pirano. En cada familia, los compuestos individuales difieren en su patrón de hidroxilación, hidrogenación, sulfonación y metilación de los anillos A y B (*de la Rosa et al., 2019; Pérez-Sabino et al., 2012*).

Los distintos FL tienen diversas funciones biológicas en la planta, entre otras, la protección contra la radiación ultravioleta (UV) y fitopatógenos, la señalización durante la nodulación, el transporte de auxinas, así como la coloración de las flores como señal visual que atrae a polinizadores (*Falcone-Ferreyra et al., 2012*).

El grupo de los nFL incluye CF con estructuras químicas muy diversas, la mayoría de ellas más pequeñas y simples que los flavonoides, pero también hay algunos compuestos con estructuras complejas y pesos moleculares elevados, como los taninos. (*de la Rosa et al., 2019*).

El grupo más importante de nFL son los ácidos fenólicos (AF), que contienen al menos un anillo aromático en el que uno o más hidrógenos está sustituido por un grupo hidroxilo (-OH). A su vez, los AF se pueden dividir en dos grupos principales, ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos (*Heleno et al., 2015*).

Una de las principales propiedades biológicas de estos compuestos es su alta capacidad antioxidante, debida a su estructura: un núcleo fenólico y una cadena lateral insaturada que les permite formar un radical fenoxilo, el cual actúa como agente secuestrador de radicales libres, por lo que están relacionados con la protección del ADN y los lípidos de la membrana celular contra las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés Reactive Oxygen Species) (Peñarrieta et al., 2014; Urias-Orona et al., 2016).

Otros compuestos no flavonoides de importancia son los lignanos, los cuales están formados por dos unidades fenilpropanoide. Están ampliamente distribuidos en frutas, semillas, verduras, cereales, etc, presentan diversas estructuras químicas, muchas de las cuales son biológicamente activas, incluidos los medicamentos anticancerígenos etopósido y tenipósido (Xu et al., 2021).

Las chalconas (con estructura C6-C3-C6), son otro tipo de compuestos nFL, son cetonas aromáticas α , β -insaturadas y se encuentran en pocos alimentos, las más comunes son la fletina y floridzina, que son características de la manzana. Cuentan con diversas propiedades biológicas como antibacteriana, antifúngica, antiinflamatoria, anticancerígena y antidepresiva, las cuales están dependientes de la sustitución en los anillos aromáticos en la estructura de la chalcona (Ramírez-Escobedo et al., 2012).

Las cumarinas son otro ejemplo de nFL y su estructura básica consiste en un anillo benceno unido a un anillo de pirona. Los miembros de la familia de las cumarinas están en muchas especies vegetales, son compuestos movilizadores de hierro que son secretados por las raíces de las plantas y ayudan a su absorción en suelos privados de este elemento. Además, las cumarinas se han estudiado ampliamente por su potencial para combatir infecciones tanto en plantas como en animales. Las actividades de las cumarinas van desde antimicrobianas y antivirales a anticoagulante y anticancerígeno (Stringlis et al., 2019).

Las rutas principales en la biosíntesis de los CF son las rutas del ácido shikímico, poliacetatos y en menor medida el mevalonato, sin embargo, la ruta del ácido shikímico es la más importante para originar este tipo de MSs, iniciando con el acoplamiento del fosfoenolpiruvato (PEP) y la eritrosa-4-fosfato (E-4-P), para obtener el ácido 3-deoxi-D-arabino-heptusolónico-7-fosfato (DAHP) (Figura 3) (Martin, 2018).

La mayoría de los CF se originan en la ruta general de los fenilpropanoide, a su vez derivada de la vía del ácido shikímico. La vía fenilpropanoide comienza con un precursor de L-fenilalanina (L-Phe), en las plantas, la biosíntesis de ese aminoácido tiene lugar en los

cloroplastos, la cual se inicia a partir de ácido prefénico que es un producto final de la ruta del ácido shikímico (El-Azaz *et al.*, 2016; Martín, 2018).

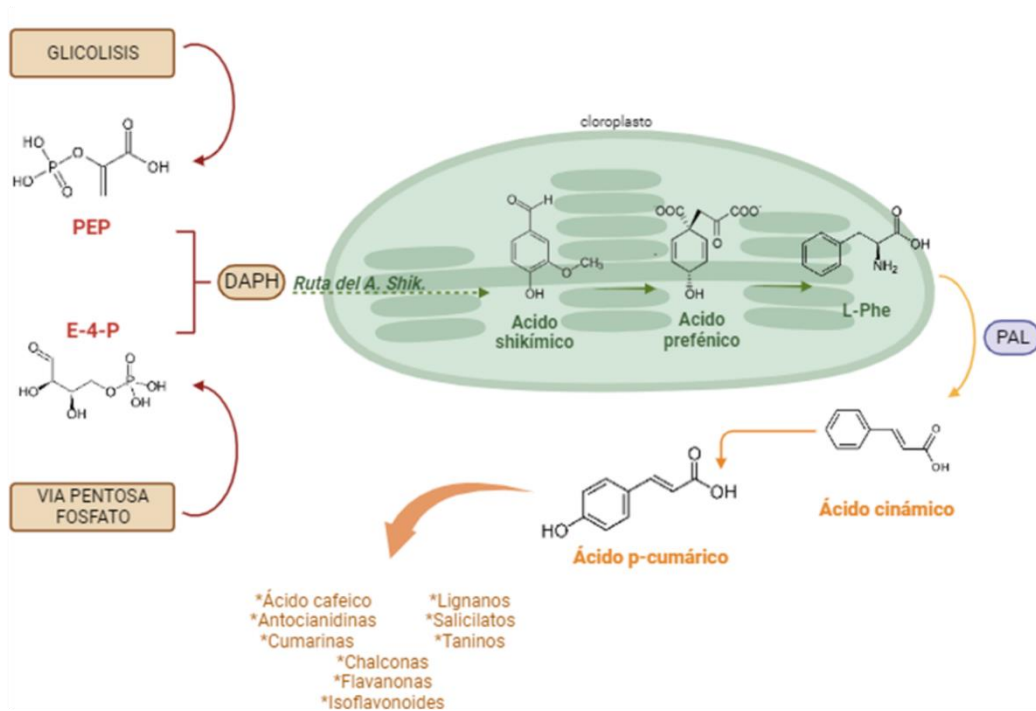


Figura 3. Ruta fenilpropanoide para la síntesis de diferentes compuestos fenólicos (Imagen creada en Biorender.com).

Posteriormente, la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de L-Phe. Las reacciones posteriores son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes, terminan con la formación de ácido *p*-cumárico, el cual es un compuesto reactivo que puede participar en reacciones posteriores que conducen a la síntesis de muchos otros compuestos fenólicos en plantas. Los ácidos cinámico y *p*-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido cafeico cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides, isoflavonoides, entre otros (Buchanan *et al.*, 2015; Ávalos & Pérez-Urria, 2009).

2.2 Género *Kalanchoe*

2.2.1. Distribución y usos medicinales de *Kalanchoe* spp.

El género *Kalanchoe* (también llamado *Bryophyllum*) pertenece a la familia Crassulaceae. Incluye a 139 especies de suculentas perennes, que llevan a cabo el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). Tienen su centro de radiación filogenética en Madagascar y Mozambique y son encontradas en pastizales abiertos y pendientes rocosas (Andrade et al., 2007; Milad et al., 2014).

En diversos países, *Kalanchoe* se considera invasor, representando una amenaza para la biodiversidad nativa. En México, ninguna especie del género es endémica, sin embargo, se encuentran naturalizadas nueve especies: *K. blossfeldiana*, *K. calcynum*, *K. daigremontiana*, *K. delagoensis*, *K. fedtschenkoi*, *K. integra*, *K. laciniata*, *K. pinnata*, *K. tubiflora*. que están ampliamente distribuidas en territorio mexicano, en estados como Chiapas, México, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Tabasco, Tamaulipas, San Luis Potosí, Sinaloa, Veracruz y Yucatán (Figura. 4) (Golubov-Figueroa, 2012). Su uso es principalmente ornamental, aunque también han sido utilizadas en medicina tradicional mexicana y de otras regiones del mundo (Costa et al, 2008).



Figura 4. Distribución de *Kalanchoe* spp en territorio mexicano (Discover Life Global Mapper, 2023).

El uso de las especies de *Kalanchoe* en la medicina tradicional mexicana ha sido principalmente para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, para tratar lesiones y heridas de la piel, reumatismo, artritis, fiebre, tos, dolor de oído, quemaduras, trastornos gástricos y menstruales, diabetes y diversas enfermedades infecciosas. Se han realizado estudios farmacológicos donde se ha comprobado su actividad antitumoral, antioxidante, antihistamínica, antiinflamatoria, antibacteriana e inmunomoduladora (Cárdenas-García, 2009; Puertas-Mejía et al., 2014).

La medicina tradicional es asociada fuertemente a las plantas medicinales, su recurso más abundante. Actualmente, la medicina tradicional es reconocida como un recurso importante para la salud de millones de seres humanos y como parte de la cosmovisión y conocimiento milenario de los pueblos indígenas (Jiménez-Silva, 2017).

2.2.2 Fitoquímica y bioactividad de metabolitos secundarios de *Kalanchoe* spp.

Los MSs no sólo tienen una gran importancia ecológica al participar en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, sino que también, son responsables del valor medicinal de las plantas aunque su distribución es muy limitada (Jamwal et al., 2018; Sepúlveda-Jiménez et al., 2003).

Entre los MSs encontrados con mayor presencia en especies de *Kalanchoe* se encuentran los compuestos fenólicos, especialmente de tipo flavonoide y ácido fenólico como quercetina, kaempferol, ácido cafeico, entre otros. Esos compuestos han sido identificados principalmente en hojas y tan solo unos cuantos, en tallos o flores (como las antocianinas) (Tabla 1).

Además, en *Kalanchoe*, se han encontrado una amplia cantidad de terpenos (Tabla 2), siendo principalmente de tipo esterol, bufadienólido y triterpeno. Algunos compuestos como bersaldegenina-1,3,5-ortoacetato, daigremontianina, briofilina, entre otros (Fernandes et al., 2019; Hermawan et al., 2010).

En la especie *K. daigremontiana* se han reportado compuestos nitrogenados como alcaloides, alcaloides oxindólicos y glucosinolatos; los cuales fueron detectados mediante pruebas fitoquímicas para detectar su presencia con los reactivos de Dragendorff, Mayer, Valser y Reinekato de Amonio aplicado en diferentes soluciones, sin embargo, solo algunos compuestos han sido identificados (Cardozo-Pinzón & Gómez-Barrera, 2018) (Tabla 3).

Este tipo de MSs han demostrado tener ciertas actividades farmacológicas, por ejemplo, en el caso de los CF, se ha reportado actividad antioxidante, antihiper glucémica, antiviral y antiparasitaria (leishmania), entre otras (*Tabla 4*).

Los compuestos nitrogenados reportados en *Kalanchoe* spp. son de principal interés farmacológico debido a su demostrada que tienen actividad anticancerígena en líneas celulares como HeLa, HL-60, MCF-7, Raji, entre otras, mediante su actividad como inhibidores o reguladores de cascadas de señalización (*García-Pérez et al., 2018; Hsieh et al., 2012; Singab et al., 2012; Supratman et al., 2001*) (*Tabla 4*).

También se ha observado actividad antimicrobiana al inhibir el crecimiento de diferentes especies de levaduras y bacterias con extractos de tipo etanólico, metanólico, y hexánico, utilizados para extraer compuestos polares como algunos CF o terpenoides (*Pérez-Nájera et al., 2013*).

Tabla 1. Compuestos fenólicos reportados en especies de *Kalanchoe* presentes en México

Clasificación	MS	Especies en las que se ha reportado	Fórmula molecular	Parte de la planta en que se reporta presencia			Referencias
				Hojas	Tallos	Flores	
AF	1-O-sinapoyl-β-D-glucosa	<i>K. daigremontiana</i>	C ₁₇ H ₂₂ O ₁₀	*			García-Pérez et al., 2021
	Ácido benzoico	<i>K. delagoensis</i>	C ₇ H ₆ O ₂	*			Casanova et al., 2020
	Ácido cafeico	<i>K. calycinum</i> , <i>K. daigremontiana</i> , <i>K. fedtschenkoi</i> , <i>K. pinnata</i>	C ₉ H ₈ O ₄	*			Al-Snafi, 2013; Bogucka-Kocka et al., 2018; Richwagen et al., 2019
	Ácido cinámico	<i>K. delagoensis</i>	C ₉ H ₈ O ₂	*			Casanova et al., 2020
	Ácido clorogénico	<i>K. daigremontiana</i>	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	*			Bogucka-Kocka et al., 2018
	Ácido ferúlico	<i>K. calycinum</i> , <i>K. daigremontiana</i> , <i>K. fedtschenkoi</i> , <i>K. pinnata</i>	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	*			Al-Snafi; Bogucka-Kocka et al., 2018; Richwagen et al., 2019
	Ácido gálico	<i>K. daigremontiana</i> , <i>K. pinnata</i>	C ₇ H ₆ O ₅	*			Bogucka-Kocka et al., 2018; Chernetsky et al., 2018
	Ácido p-cumárico	<i>K. calycinum</i> , <i>K. daigremontiana</i> , <i>K. fedtschenkoi</i>	C ₉ H ₈ O ₃	*			Al-Snafi, 2013; Bogucka-Kocka et al., 2018; Richwagen et al., 2019
	Ácido protocatecuico	<i>K. calycinum</i> , <i>K. daigremontiana</i>	C ₇ H ₆ O ₄	*			Al-Snafi, 2013; Richwagen et al., 2019
	Ácido salicílico	<i>K. daigremontiana</i>	C ₇ H ₆ O ₃	*			Chernetsky et al., 2018
Ácido siríngico	<i>K. calycinum</i> , <i>K. daigremontiana</i> ; <i>K. tubiflora</i>	C ₉ H ₁₀ O ₅	*			Al-Snafi, 2013; Chernetsky et al., 2018;	

						Huang et al., 2013
	Ácido vanílico	<i>K. daigremontiana</i> , <i>K. tubiflora</i>	$C_8H_8O_4$	*		Chernetsky et al., 2018; Huang et al., 2013
AN	Cianidina	<i>K.</i>	$C_{15}H_{11}O_6+$	*	*	Nielsen et al., 2005,
	Malvidina	<i>blossfeldiana</i> ,	$C_{17}H_{15}O_7+$		*	García-Pérez et al., 2021
	Pelargonidina	<i>K.</i>	$C_{15}H_{11}O_5+$	*	*	
	Peonidina	<i>daigremontiana</i>	$C_{16}H_{13}O_6+$	*	*	
CM	Delfinidina	<i>K.</i>	$C_{15}H_{11}ClO_7$	*		García-Pérez et al., 2021
	Bergaptol	<i>daigremontiana</i>	$C_{11}H_6O_4$	*		
FE	3,4-Dimetoxifenol	<i>K. tubiflora</i>	$C_8H_{10}O_3$	*		Huang et al., 2013
	α -Ramnoisorobina	<i>K. pinnata</i>	$C_{21}H_{20}O_{10}$	*		Milad et al., 2014
	3',4'-dimetoxi quercetina	<i>K. pinnata</i>	$C_{17}H_{14}O_7$	*		Milad et al., 2014; Akhmad-Darmawan & Fairiah, 2013
	Afzelina	<i>K. pinnata</i>	$C_{21}H_{20}O_{10}$	*		Milad et al., 2014
FL	Apigenina	<i>K. daigremontiana</i> <i>K. delagoensis</i>	$C_{15}H_{10}O_5$	*		García-Pérez et al., 2021 Casanova et al., 2020
	Baicaleína	<i>K. daigremontiana</i>	$C_{21}H_{18}O_{11}$	*		García-Pérez et al., 2021
	Crisina	<i>K. daigremontiana</i>	$C_{15}H_{10}O_4$	*		García-Pérez et al., 2021
	Isovitexina	<i>K. daigremontiana</i>	$C_{21}H_{20}O_{10}$	*		García-Pérez et al., 2021
	Kaempferitrina	<i>K. pinnata</i>	$C_{27}H_{30}O_{14}$	*		Fernandes et al., 2019
	Kaempferol	<i>K. daigremontiana</i> <i>K. delagoensis</i> , <i>K. fedtschenkoi</i> , <i>K. pinnata</i>	$C_{15}H_{10}O_6$	*		Fernandes et al., 2019; Casanova et al., 2020; Richwagen et al., 2019
	Kalambrosido A	<i>K. laciniata</i>	$C_{32}H_{36}O_{18}$	*		Fernandes et al., 2019

	Kalambrosido B	<i>K. laciniata</i>	C ₃₀ H ₃₄ O ₁₇	*		Fernandes et al., 2019
	Kapinnatosido	<i>K. pinnata</i>	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	*		Fernandes et al., 2019
	Luteolina	<i>K. pinnata</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	*		Fernandes et al., 2019
	Miricetina	<i>K. daigremontiana</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	*		Stefanowicz-Hajduk et al., 2020
	Patuletina	<i>K. laciniata</i>	C ₁₆ H ₁₂ O ₈	*	*	Fernandes et al., 2019
	Quercetina	<i>K. blossfeldiana</i> , <i>K. daigremontiana</i> , <i>K. delagoensis</i> , <i>K. fedtschenkoi</i> , <i>K. laciniata</i> , <i>K. pinnata</i> , <i>K. tubiflora</i>	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	*	*	Nor-Habibah, 2012; Nielsen et al., 2005; Bogucka-Kocka et al., 2018; Casanova et al., 2020; Richwagen et al., 2019; Fernandes et al., 2019; Huang et al., 2013
	Quercetina 3-O- alfa-L- ramnopiranosido	<i>K. blossfeldiana</i> , <i>K. pinnata</i>	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	*		Milad et al., 2014; Teixeira-Ferreira et al., 2014
	Rutina	<i>K. pinnata</i>	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	*		Fernandes et al., 2019
IF	Ononin	<i>K. daigremontiana</i>	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	*		García-Pérez et al., 2021
QN	Lawsona	<i>K. daigremontiana</i>	C ₁₀ H ₆ O ₃	*		García-Pérez et al., 2021
	Juglona	<i>K. daigremontiana</i>	C ₁₀ H ₆ O ₃	*		

Abreviaciones: AF: ácido fenólico; AN: antocianina; CM: cumarina; FE: fenol; FL: flavonoide; IF: isoflavona; QN: quinonas.

Simbología: (*): Indica presencia del MS, acorde a lo reportado en la literatura.

Tabla 2. Terpenoides reportados en especies de *Kalanchoe* presentes en México

Clasificación	MS	Especies en las que se ha reportado	Fórmula molecular	Parte de la planta en que se reporta presencia			Referencias
				Hojas	Tallos	Flores	
BF	16-Hidroxibersaldegenina acetato	<i>K. daigremontiana</i> , <i>K. pinnata</i>	$C_{26}H_{34}O_9$	*			<i>Stefanowicz-Hajduk et al., 2020</i>
	Bersaldegenina acetato-3	<i>K. pinnata</i>	$C_{26}H_{34}O_8$	*			<i>Stefanowicz-Hajduk et al., 2020</i>
	Bersaldegenina acetato-4	<i>K. pinnata</i>	$C_{26}H_{34}O_8$	*			<i>Stefanowicz-Hajduk et al., 2020</i>
	Bersaldegenina-1,3,5-ortoacetato	<i>K. daigremontiana</i> , <i>K. pinnata</i> , <i>K. tubiflora</i>	$C_{26}H_{32}O_7$	*			<i>Hermawan et al., 2010</i> ; <i>Stefanowicz-Hajduk et al., 2020</i> ; <i>Milad et al., 2014</i>
	Bersaldegenina	<i>K. pinnata</i>	$C_{24}H_{32}O_7$	*			<i>Fernandes et al., 2019</i>
	Briofilina A	<i>K. daigremontiana</i> , <i>K. pinnata</i>	$C_{26}H_{32}O_8$	*			<i>Fernandes et al., 2019</i>
	Briofilina C	<i>K. pinnata</i>	$C_{26}H_{34}O_8$	*			<i>Fernandes et al., 2019</i>
	Daigremontianina	<i>K. daigremontiana</i> , <i>K. tubiflora</i>	$C_{26}H_{30}O_9$	*			<i>Hermawan et al., 2010</i> ; <i>Milad et al., 2014</i>
	Kalantubosido A	<i>K. tubiflora</i>	$C_{32}H_{42}O_{12}$	*	*		<i>Kolodziejczyk-Czepas et al., 2017</i>
	Kalantubosido B	<i>K. tubiflora</i>		*	*		<i>Kolodziejczyk-Czepas et al., 2017</i>
ES	Campesterol	<i>K. pinnata</i>	$C_{28}H_{48}O$	*			<i>Pattewar, 2012</i>
	Clerosterol	<i>K. pinnata</i>	$C_{29}H_{48}O$	*			<i>Pattewar, 2012</i>
	Clionasterol	<i>K. pinnata</i>	$C_{29}H_{50}O$	*			<i>Pattewar, 2012</i>
	Codisterol	<i>K. pinnata</i>	$C_{28}H_{46}O$	*			<i>Pattewar, 2012</i>
	Dihidrobrasicasterol	<i>K. blossfeldiana</i>	$C_{28}H_{48}O$	*			<i>Verma et al., 2015</i>

	Espinasterol	<i>K. blossfeldiana</i>	C ₂₉ H ₄₈ O	*		<i>Verma et al., 2015</i>
	Estigmast-24-enol	<i>K. pinnata</i>	C ₂₉ H ₅₀ O	*		<i>Fernandes et al., 2019</i>
	Estigmasterol	<i>K. blossfeldiana, K. pinnata</i>	C ₂₉ H ₄₈ O	*	*	<i>Fernandes et al., 2019; Verma et al., 2015</i>
	Isofucosterol	<i>K. pinnata</i>	C ₂₉ H ₄₈ O	*		<i>Pattewar, 2012</i>
	Peposterol	<i>K. pinnata</i>	C ₂₉ H ₄₈ O	*		<i>Pattewar, 2012</i>
	Sitostenona	<i>K. blossfeldiana</i>	C ₂₉ H ₄₈ O	*		<i>Verma et al., 2015</i>
TT	α-amirinacetato	<i>K. pinnata</i>	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	*		<i>Pattewar, 2012</i>
	α-amirina	<i>K. blossfeldiana, K. pinnata</i>	C ₃₀ H ₅₀ O	*		<i>Pattewar, 2012</i>
	β-amirina	<i>K. pinnata</i>	C ₃₀ H ₅₀ O	*		<i>Pattewar, 2012</i>
	Escualeno	<i>K. blossfeldiana</i>	C ₃₀ H ₅₀	*		<i>Verma et al., 2015</i>
	Friedelin	<i>K. pinnata</i>	C ₃₀ H ₅₀ O	*		<i>Pattewar, 2012</i>
	Glutinol	<i>K. pinnata</i>	C ₃₀ H ₅₀ O	*		<i>Pattewar, 2012</i>
	Lanosterol	<i>K. blossfeldiana</i>	C ₃₀ H ₅₀ O	*		<i>Verma et al., 2015</i>
	Lupenil acetato	<i>K. blossfeldiana</i>	C ₃₂ H ₅₂ O ₂	*		<i>Verma et al., 2015</i>
	Lupeol	<i>K. blossfeldiana</i>	C ₃₀ H ₅₀ O	*		<i>Verma et al., 2015</i>
	Taraxerol	<i>K. pinnata</i>	C ₃₀ H ₅₀ O	*		<i>Pattewar, 2012</i>

Abreviaciones: BF: bufadienólido; ES: esterol; TT: triterpenoide.

Simbología: (*): Indica presencia del MS, acorde a lo reportado en la literatura.

Tabla 3. Compuestos nitrogenados reportados en especies de *Kalanchoe* presentes en México

Clasificación	MS	Especies en las que se ha reportado	Fórmula molecular	Parte de la planta en que se reporta presencia			Referencias
				Hojas	Tallos	Flores	
AL	(S)-Estilopina	<i>K. daigremontiana</i>	C ₁₉ H ₁₇ NO ₄	*			García-Pérez et al., 2021
	5α-carboxistrictosidina	<i>K. daigremontiana</i>	C ₂₈ H ₃₄ N ₂ O ₁₁	*			García-Pérez et al., 2021
	Ajmalina	<i>K. daigremontiana</i>	C ₂₀ H ₂₆ N ₂ O ₂	*			Cardozo-Pinzón et al., 2018
	Alcaloides oxindólicos	<i>K. daigremontiana</i>	-	*			Cardozo-Pinzón et al., 2018
	Brucina	<i>K. daigremontiana</i>	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	*			Cardozo-Pinzón et al., 2018
	Cafeína	<i>K. daigremontiana</i>	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	*			Cardozo-Pinzón et al., 2018
	Hemantamina	<i>K. daigremontiana</i>	C ₁₇ H ₁₉ NO ₄	*			García-Pérez et al., 2021
	Teobromina	<i>K. daigremontiana</i>	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	*			Cardozo-Pinzón et al., 2018
	Teofilina	<i>K. daigremontiana</i>	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	*			Cardozo-Pinzón et al., 2018
GL	(E)-7-(metiltsulfanil) heptanal oxima	<i>K. daigremontiana</i>	C ₈ H ₁₇ NOS	*			García-Pérez et al., 2021
	Gluconapina	<i>K. daigremontiana</i>	C ₁₁ H ₁₉ NO ₉ S ₂	*			García-Pérez et al., 2021

Abreviaciones: AL: alcaloide; GL: glucosinolato.

Simbología: (*): Indica presencia del MS, acorde a lo reportado en la literatura.

Tabla 4. Actividades farmacológicas de MS reportados en especies de *Kalanchoe*

Actividad farmacológica	Clasificación de metabolito	MS responsable	Acción	Línea celular/ organismo	DL50/ EC50/ CMI	Referencias
Anticancerígena	ES	β -sitosterol	NR	Células MCF7	22.5 μ g/mL; 17.6 μ g/mL	Singab et al., 2012
	BF	Bersaldegenina-1,3,5-ortoacetato	Inhibición de la activación del promotor de tumor inducido por virus de Epstein-Barr (EBV)	Células Raji	4 μ M	Supratman et al., 2001
			Inducción de muerte celular independiente de caspasas y detención del ciclo celular.	Células HeLa	0.55 μ g/mL	Stefanowicz-Hajduk, 2020
		Briofilina	Inhibición de la activación del promotor de tumor inducido por EBV	Células Raji	0.45 μ M	Supratman et al., 2002
		Daigremontianina			5 μ M	
	Kalabuntosido A y B	Detención del ciclo celular e inducción de apoptosis	Células de leucemia promielocítica HL-60	NR	García-Pérez et al., 2018	
	NR	NR (Fracción soluble en n-butanol de <i>K. tubiflora</i>)	Reducción de viabilidad celular al afectar la formación de la estructura adecuada del aparato mitótico.	Células HeLa	6.75 μ g/mL	Hsieh et al., 2012
FL	Miricetina	Aumento en los niveles de expresión genes relacionados con la apoptosis: Caspasas-3, 8 y 9,	Células de cáncer de mama MCF-7	0.054 μ M	Sajedi et al., 2020	
Antiinflamatoria	FL	Quercetina 3-O-alfa-L-arabinopiranosil (1 \rightarrow 2) alfa-L-ramnopiranosido	Reducción de la concentración de Factor de	<i>in vivo</i> (ratones)	760 μ g/kg	Teixeira-Ferreira et al., 2014

			Necrosis Tumoral- α en los exudados pleurales.			
	CF	NR (Extractos etanólicos de <i>K. fedtschenkoi</i>)	Inhibición de crecimiento	<i>S. aureus</i> , <i>A. baumannii</i> y <i>P. aeruginosa</i>	128000-256000 $\mu\text{g/mL}$	<i>Richwagen et al., 2019</i>
	NR	NR (Extractos acuoso-metanólico de <i>K. laciniata</i>)	Inhibición de crecimiento	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>C. albicans</i>	75000 $\mu\text{g/mL}$, 150000 $\mu\text{g/mL}$, 300000 $\mu\text{g/mL}$	<i>Manan et al., 2016</i>
	NR	NR (Extractos n-Hexano de <i>K. laciniata</i>)	Inhibición de crecimiento			
	NR	NR (Extractos metanólicos y etanólicos de <i>K. pinnata</i>)	Inhibición de crecimiento	Patógenos Gram positivos, Gram negativos y <i>C. albicans</i>	128000 $\mu\text{g/mL}$ – 512000 $\mu\text{g/mL}$	<i>Akinsulire et al., 2007</i>
	AL	Cafeína	Inhibición de crecimiento	<i>S. aureus</i> , <i>E. cloacea</i> , <i>E. aerogenes</i>	10000 $\mu\text{g/mL}$	<i>AL-Janabi, 2011</i>
Antimicrobiana						
	FL	Kaempferol	Supresión de síntesis de ácidos nucleicos, función de la membrana y el metabolismo energético	SARM	0.5–2.0 $\mu\text{g/mL}$	<i>Shamsudin et al., 2022</i>
	FL	Quercetina	Efecto bacteriostático	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i>	0.0082, 0.0072, 0.0068, 0.0085 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente	<i>Wang et al., 2018</i>
	QN	Juglona	Represión en la integridad de la membrana y fuga de proteínas	<i>S. aureus</i>	1000 $\mu\text{g/mL}$	<i>Wan et al., 2023</i>
		Ácido ferúlico				
	AF	Ácido protocatecuico	Cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado por el agente antioxidante.	<i>in vitro</i> (ensayo DPPH radical scavenging)	25 μL de extracto y 200 μL de DPPH	<i>Bogucka-Kocka et al., 2016</i>
Antioxidante						
		Quercetina 3-O-a-L-arabinopiranosil (1->2) a-L-ramnopiranosido	Cesión de un átomo de hidrógeno proporcionado	<i>in vitro</i> (ensayo DPPH radical scavenging)	(EC50) 1.41 $\mu\text{g/mL}$	<i>Nascimento et al., 2012</i>

			por el agente antioxidante.			
Antiparasitaria	FL	Quercetina	Aumento de la producción de interleucina 4 (IL-4) Ante infección por <i>Leishmania chagasi</i>	<i>in vivo</i> (ratones)	400 mg/kg (extracto)	Gomes et al., 2009
Antiviral	AF	Ácido gálico	Actividad anti Virus de Hepatitis C (VHC) después de la adsorción viral. Inhibición en el paso posterior a la entrada.	Células Huh7it-1	6.1 µg/mL	Aoki et al., 2014
	FL	Quercetina	Actividad anti VHC, tanto en los pasos de entrada como después de la entrada.		1.5 µg/mL	
Hipoglicémica	AF	Ácido cafeico	Regulación de la expresión de proteínas asociadas a la señal de insulina	Células FL83B	12500 µM	Huang & Shen, 2012
		Ácido clorogénico	Retraso de la absorción de glucosa en intestino (inhibición G-6-Pasa)	<i>in vivo</i> (ratas)	NR	Meng, 2013
	CF	NR (Extractos LAED y LAEI de <i>K. pinnata</i>)	Inhibición de la enzima α-amilasa	<i>in vitro</i>	100 µg/mL	Agüero-Hernández et al., 2020
	FL	Quercetina	Fosforilación del receptor de glucosa	<i>in vivo</i> (ratas)	NR	Shi et al., 2019
Inmuno-moduladora	FL	Quercetina	Prevención de shock anafiláctico. Inhibición de la activación de mastocitos inducida por IgE.	<i>in vivo</i> (ratones)	400 mg/kg	Cruz et al., 2008

Abreviaturas: NR: no reportado; DL50: dosis Letal 50%; EC50: concentración efectiva 50%; CMI: concentración mínima inhibitoria

2.2.3 *Kalanchoe daigremontiana* y sus usos en la medicina tradicional

La especie *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. Perrier, también conocida por sus nombres comunes como aranto, espinazo del diablo, mala madre, madre de miles, entre otros (Puertas-Mejía et al., 2014), es una planta de 40-80 cm de altura, tallos simples, erectos o decumbentes, amarronados, hojas verdes oscuro, rosa-verde a purpúreo-verde con manchas marrón-rojo, pecioladas, márgenes regularmente dentados, flores péndulas o extendidas (Figura 5) (Guillot-Ortiz et al., 2015).



Figura 5. *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. Perrier.

K. daigremontiana se cultiva principalmente como planta ornamental; sin embargo, también se le conocen propiedades medicinales (Costa et al, 2008). Los usos etnomedicinales de las preparaciones derivadas de *K. daigremontiana* se basan principalmente en la administración oral y externa de extractos crudos o jugos de la planta, y han sido utilizados como agentes anticancerígenos, antiinflamatorios, antimicrobianos, antisépticos, carminativos y cardioactivos; para tratar lesiones y heridas en la piel; para detener el

sangrado; para tratar infecciones, reumatismo, dolor de oído, quemaduras, artritis, trastornos gástricos y menstruales, tos, fiebre, disfunción cardiovascular, diabetes, cálculos renales, hasta infecciones virales y entre otros trastornos (*Assis de Andrade et al., 2023; Kolodziejczyk-Czepas & Stochmal, 2017*).

No hay datos sobre los usos tradicionales de los compuestos purificados o semipurificados de *Kalanchoe spp* (*Kolodziejczyk-Czepas & Stochmal, 2017*); sin embargo, es sabido que la eficacia de las plantas en la curación de las enfermedades se debe principalmente a los MSs que producen, como los derivados fenólicos los cuales son un grupo importante de sustancias con una variedad de actividades farmacológicas como la antibacteriana (*Chernetsky et al., 2018*).

En la literatura hay mucha evidencia referente a la actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positiva y Gram-negativa de los MSs de tipo fenólico como los flavonoides; entre los mecanismos de acción se sugieren el daño a la membrana bacteriana, la inhibición de factores de virulencia como enzimas y toxinas, y la supresión de la formación de biopelículas bacterianas (*Miklasinska-Majdanik et al., 2018*).

2.3 La resistencia a antibióticos como problema de salud pública

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar infecciones bacterianas, los cuales han salvado millones de vidas y han supuesto una revolución en la medicina al contribuir de forma significativa al progreso en campos como los trasplantes de órganos, la supervivencia de pacientes prematuros e inmunodeprimidos, la cirugía de material protésico y los catéteres vasculares, en donde las infecciones son especialmente prevalentes e importantes (Alós, 2015).

Sin embargo, desde hace años, se ha señalado la pérdida de la eficacia de estos fármacos por la resistencia bacteriana a los antibióticos (Alós, 2015). La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias generan estrategias de defensa en respuesta al uso de estos fármacos. Usualmente las bacterias farmacorresistentes pueden causar infecciones en el ser humano más difíciles de tratar que las no resistentes (OMS, 2020).

Una de las causas más importantes por las que ocurre la resistencia a los antibióticos es el uso excesivo de éstos o su prescripción incorrecta. Estudios epidemiológicos han demostrado una relación directa entre el consumo de antibióticos y la aparición y diseminación de cepas de bacterias resistentes. (Ventola, 2015).

Para sobrevivir, las bacterias pueden desarrollar distintas estrategias de defensa contra los antibióticos llamadas mecanismos de resistencia (Tabla 5) (CDC, 2022).

Los genes de resistencia encontrados en el ADN bacteriano pueden heredarse a través de elementos genéticos móviles tales como plásmidos. Esta transferencia horizontal de genes puede permitir que la resistencia a los antibióticos se transfiera entre diferentes especies de bacterias (Ventola, 2015).

La resistencia también puede ocurrir espontáneamente por mutación. Los antibióticos eliminan a los competidores sensibles a los medicamentos y dejan que las bacterias resistentes se reproduzcan como resultado de la selección natural (Ventola, 2015).

Tabla 5. Mecanismos de resistencia bacteriana contra antibióticos

Mecanismo	Descripción	Ejemplo
Restricción del acceso del antibiótico	Por cambios en las entradas o limitando el número de entradas.	Las bacterias Gram-negativas pueden utilizar su membrana para impedir selectivamente la entrada de fármacos antibióticos.
Eliminación del antibiótico	Uso de bombas en paredes celulares para eliminar los antibióticos que ingresan a la célula.	Algunas cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pueden producir bombas para deshacerse de varios antibióticos importantes como fluoroquinolonas, betalactámicos, cloranfenicol y trimetoprima.
Cambiar o destruir el antibiótico	Enzimas y/o proteínas bacterianas que descomponen o modifican el fármaco.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produce enzimas llamadas carbapenemasas, que descomponen los fármacos carbapenémicos y la mayoría de betalactámicos.
Cambiar los objetivos para el antibiótico	Muchos antibióticos están diseñados para identificar y destruir partes específicas (u objetivos) de las bacterias. Éstas cambian el objetivo del antibiótico, por lo que el medicamento ya no puede tener efecto.	<i>Escherichia coli</i> con el gen <i>mcr-1</i> puede agregar un compuesto al exterior de la pared celular para que el fármaco colistina no pueda adherirse a ella.
Evitar los efectos del antibiótico	Desarrollo de nuevos procesos celulares que evitan usar el objetivo del antibiótico.	Algunas cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> pueden eludir los efectos del fármaco trimetoprima.

En el año 2017, la OMS publicó una lista de «bacterias patógenas prioritarias» resistentes a los antibióticos, con el propósito de promover la investigación y desarrollo de nuevos fármacos. La lista es enfática especialmente en la amenaza que suponen las bacterias Gram-negativas resistentes a múltiples antibióticos, ya que tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes (OMS, 2017). La lista se divide en tres categorías respecto a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media.

Prioridad 1: Crítica

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a los carbapenémicos
- *Pseudomonas aeruginosa*, resistente a los carbapenémicos
- *Enterobacteriaceae*, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL

Prioridad 2: Elevada

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

Prioridad 3: Media

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

2.3.1. *Staphylococcus aureus* y SARM

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva, perteneciente al filo Firmicutes, tiene forma de esfera (cocoide), es inmóvil, se agrupa en racimos y produce coagulasa (*Figura 6*); forma parte de la microbiota normal de los seres humanos encontrándose principalmente en la piel, en la zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas. (*Lee et al., 2018*). Este patógeno se caracteriza por generar infecciones en piel y tejidos blandos (músculos, tendones, tejidos grasos y vasos sanguíneos) e invasión a dispositivos médicos (*Pasachova-Garzón et al., 2019*).

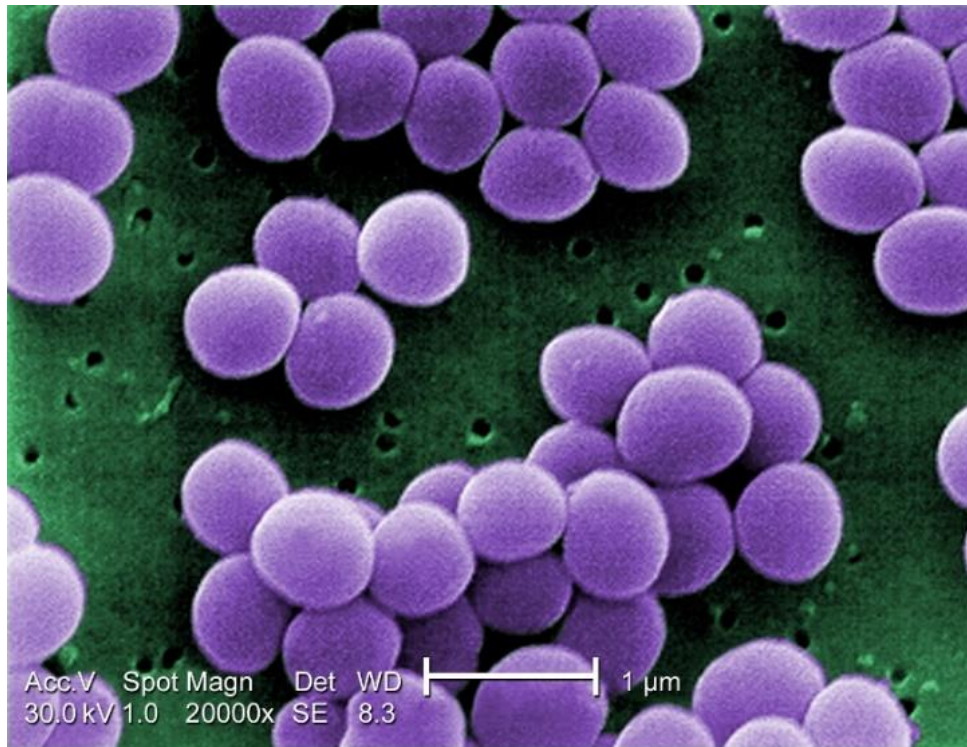


Figura 6. *Staphylococcus aureus*. Microscopía Electrónica de Barrido. CDC, 2001.

La variante SARM se describió por primera vez en Inglaterra en 1961, poco después de que se introdujera la meticilina en la práctica clínica. Inicialmente, la meticilina se usó ampliamente; sin embargo, debido a su toxicidad, actualmente ya no se comercializa para uso humano, sin embargo, el término “resistente a la meticilina” se continúa usando (Lee et al., 2018).

La resistencia es conferida por una proteína de unión a la penicilina denominada PBP2a, la cual es codificada por el gen *mecA* (Cervantes-García et al., 2014) y, no se encuentra en las cepas de *S. aureus* susceptibles a meticilina (Figura 7a). La PBP2a es una enzima transpeptidasa que cataliza la formación de puentes cruzados en el peptidoglucano de la pared celular. Asistida por el dominio transglicosilasa de la PBP2a nativa de *S. aureus*, toma el control de la función biosintética de la pared celular en presencia de antibióticos β -lactámicos, cuando normalmente las PBPs son inactivadas al ligarse a estos antibióticos. Las cepas de *S. aureus* que son resistentes a meticilina por este mecanismo, lo son también a todos los β -lactámicos, incluyendo las penicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos. (Castellano-González & Perozo-Mena, 2010). La resistencia también puede ocurrir por la producción y liberación de la enzima β -lactamasa, que escinde hidrolíticamente la estructura del anillo β -lactámico presente en la penicilina y otros

antibióticos (Figura 7b) (Murphy & Walshe, 2011). Otro mecanismo de resistencia es la activación de proteínas exportadoras de eflujo para “bombear” el antibiótico del interior de la célula bacteriana, como QacA, un exportador de múltiples fármacos que proporciona resistencia a estos compuestos a través de un mecanismo antiporte dependiente de la fuerza motriz de protones que se ajusta a la cinética clásica de Michaelis-Menten (Brown & Skurray, 2001).

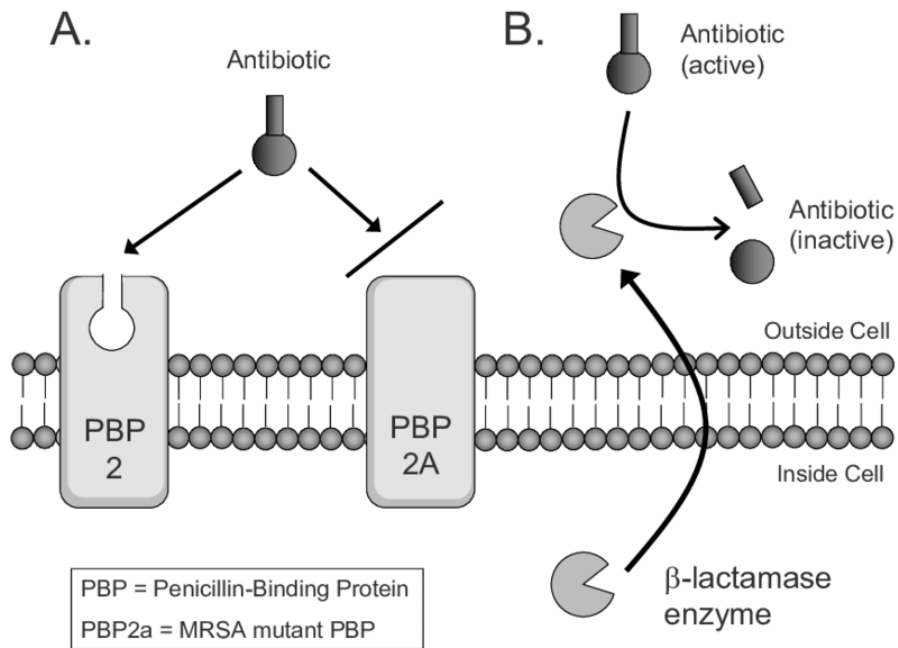


Figura 7. Mecanismos moleculares de la resistencia a los antibióticos observados en SARM. Imagen tomada de Murphy & Walshe (2011).

Desde los primeros informes en 1961 hasta la década de 1990, se creía que SARM estaba relacionado principalmente con la atención médica causando brotes en hospitales (SARM-HA) en muchas partes del mundo. Sin embargo, en la década de 1990, surgieron casos de infección por SARM en personas que no habían tenido una hospitalización previa, conocido como SARM asociado a la comunidad (SARM-CA), que afectó particularmente las poblaciones indígenas de Australia y personas sanas, incluidos los niños, en los Estados Unidos. Desde mediados de la década de 2000, también se ha asociado con la exposición del ganado (SARM-LA) (Lee et al., 2018; Turner et al., 2019).

Aunque la infección por SARM se produce en todo el mundo, no existe una única cepa pandémica. En cambio, SARM tiende a ocurrir en oleadas de infección, a menudo caracterizadas por la aparición en serie de cepas predominantes. Casi cualquier elemento

contaminado que este en contacto con la piel puede servir como fomite en la transmisión de SARM, desde batas hasta bolígrafos y teléfonos móviles (Turner et al., 2019).

Aunque la prevalencia mundial promedio de SARM es del 40%, existen grandes diferencias entre distintas ubicaciones geográficas: mientras que en Europa y Estados Unidos la prevalencia informada está entre 0.9-26.8% y 23.7-45%, respectivamente, en México, se tiene una alta frecuencia, entre 52-57% (Figura 8) (Vázquez-Rosas et al., 2021).

S. aureus puede causar infecciones leves de la piel y los tejidos blandos hasta infecciones graves, como sepsis, endocarditis, osteomielitis y bacteriemia (Vázquez-Rosas et al., 2021). La bacteriemia por SARM es observada comúnmente en pacientes de la unidad de cuidados intensivos con inserciones de vías centrales y está relacionada con una alta tasa de mortalidad, que va del 17% al 50% (Shimizu et al., 2022; Siddiqui & Koirala, 2023).

La endocarditis infecciosa asociada con bacteriemia por SARM puede causar la muerte en aproximadamente un tercio de los pacientes infectados (30-37%) (Siddiqui & Koirala, 2023).

Teniendo presente esta problemática y que uno de los principales desafíos en el tratamiento de estas infecciones es la resistencia a los antibióticos, es de gran importancia buscar nuevos compuestos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano.

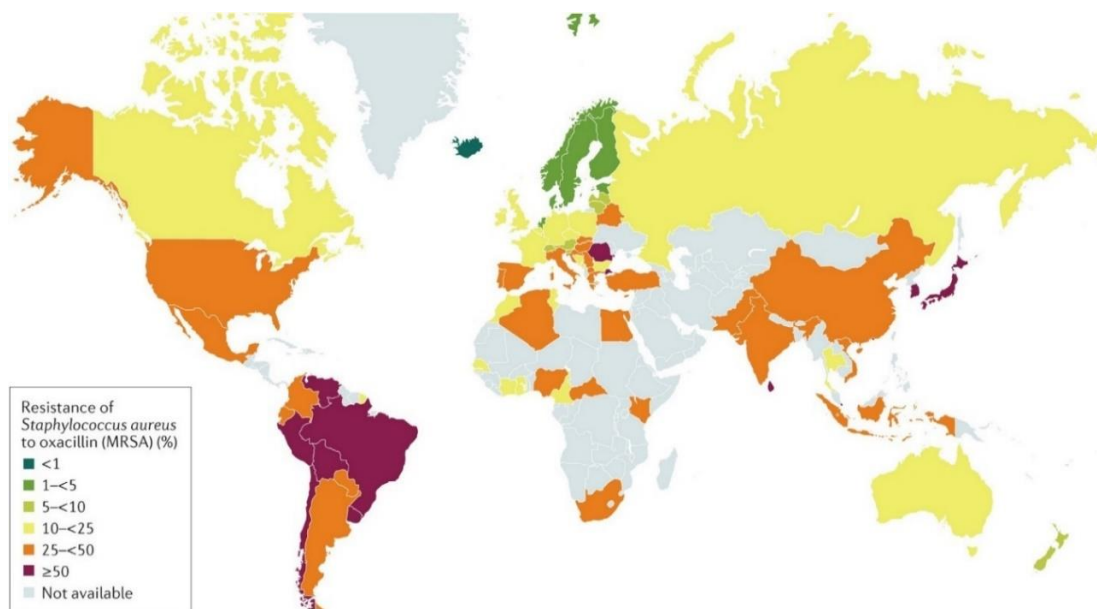


Figura 8. Prevalencia mundial de SARM. Se muestra el porcentaje de aislados de *S. aureus* que son resistentes a la oxacilina (es decir, aislados de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM)) Imagen tomada de Lee et al. (2018).

2.3.2. Actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y SARM reportada de MS de plantas.

La búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos es una importante línea de investigación debido a la resistencia que adquieren varios microorganismos patógenos; especialmente el interés por el estudio de extractos obtenidos de plantas medicinales tradicionales como potenciales fuentes de nuevos agentes antimicrobianos ha aumentado desde hace varios años, debido a la gran diversidad química de los MSs que contienen (Compean & Ynalvez, 2014; Llamas-García, 2018).

Se ha demostrado que algunos tipos de MSs como flavonoides, quinonas, lignanos, estilbenos, taninos, alcaloides, terpenos, polifenoles y cumarinas, poseen actividad antibacteriana al inhibir el crecimiento bacteriano aumentando la permeabilidad de la membrana o actuando sobre muchos objetivos bacterianos, incluido el daño de la membrana citoplasmática, la inhibición de la enzima topoisomerasa, la inhibición de la NADH-reductasa y la ATP sintasa (Keita et al., 2022).

Para los CF, especialmente del tipo flavonoide, se plantean distintos mecanismos de acción, entre los que destacan: inhibición del metabolismo energético, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos e inhibición de la función de la membrana citoplasmática: por ejemplo, se ha reportado que la actividad de la galangina radica en causar la pérdida significativa de potasio al interior de las células de *S. aureus*, lo que indica un daño directo a la membrana (Xye, et al., 2015). A su vez, los flavonoides, pueden unirse a proteínas solubles ubicadas fuera de las células y a las paredes celulares de las bacterias, promoviendo así la formación de complejos para inhibir las proteínas de la pared celular, así como el metabolismo y la síntesis de ADN (Keita et al., 2022).

Los flavonoles y los ácidos fenólicos poseen actividad antibacteriana gracias a su capacidad para inhibir los factores de virulencia bacteriana como enzimas y toxinas, suprimir la formación de biopelículas y ejercer un efecto sinérgico con los antibióticos (Miklasinska-Majdanik et al, 2018).

Algunos ejemplos son el galato de epicatequina y el galato de epigallocatequina, ambos compuestos son capaces de reducir 64 veces la concentración mínima inhibitoria (CMI) de oxacilina contra SARM, así como la baicaleína con tetraciclinas y β -lactámicos. Además, la curcumina actúa en sinergia con los β -lactámicos reduciendo la CMI de oxacilina y ampicilina 16 veces, y 25 veces la CIM de ciprofloxacino (Sanhueza et al., 2017).

Por otro lado, se ha documentado la actividad antibacteriana directa de los galatos de alquilo (ésteres derivados del ácido gálico), así como la acción indirecta, mediante la inhibición de la biosíntesis de factores de virulencia de *S. aureus*, como la coagulasa o la toxina α , y la reducción de la producción de mucosa y la formación de biopelículas (Miklasinska-Majdanik et.al, 2018).

2.4. Cultivo de células vegetales in vitro (CCV)

Debido a que los MSs cumplen un rol ecológico actuando como mediadores en la interacción de la planta con su ambiente, usualmente se encuentran en muy bajas concentraciones, por lo cual, frecuentemente es necesario utilizar gran cantidad de material vegetal para obtener cantidades significativas (*Espinosa-Leal et al., 2018*).

El cultivo de células vegetales in vitro (CCV) ha surgido como una alternativa biotecnológica para la obtención continua de metabolitos con actividad antibacteriana, utilizando medios de cultivo nutritivos y condiciones artificiales controladas, para lograr así, una producción de alta calidad de los MSs deseados, libre de patógenos en un tiempo relativamente corto (*Esparza, 2020; Espinosa-Leal et al., 2018; Motolinía-Alcántara et al., 2021*).

Los CCV se inician a partir de pequeños fragmentos vegetales, llamados explantes, que pueden ser obtenidos prácticamente de cualquier parte de una planta con resultados exitosos. Sin embargo, los meristemas apicales o axilares son quizás la fuente más popular de explantes para iniciar un cultivo (*Ahloowalia et.al., 2003*).

Cada célula vegetal cuenta con la información genética necesaria para constituir una planta completa. Esto se debe principalmente a la totipotencia de las células vegetales, es decir, a que cada célula vegetal somática tiene la capacidad de regenerarse en una planta entera (*Esparza, 2020; Fehér, 2019*).

A partir del explante, un CCV empieza con la formación de una masa de células en desdiferenciación (conversión de tejidos complejos en tejidos simples) denominadas “callos”, los cuales están en constante división celular y dependen principalmente del genotipo del explante, además de la concentración de nutrientes y/o reguladores de crecimiento vegetal adicionados al medio de cultivo (*Hernández & Díaz, 2019; Godoy-Hernández & Vázquez-Flota, 2006*).

El cultivo debe desarrollarse sobre una base nutritiva, solidificada con agar o en suspensión (medio líquido). Esta base de nutrientes contiene macronutrientes (en concentraciones superiores a 0,5 milimol por litro (mM/L)) como nitrógeno (N), potasio (K), calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg) y azufre (S); micronutrientes (concentraciones inferiores a 0,5 mM/L) como hierro (Fe), níquel (Ni), manganeso (Mn), cinc (Zn), boro (B), cobre (Cu) y molibdeno (Mo); una fuente de carbono (generalmente sacarosa, con concentraciones del 2-5%) y

varios reguladores del crecimiento de las plantas (auxinas, citoquininas, giberelinas y ácido abscísico) (Godoy-Hernández & Vázquez-Flota, 2006; Saad & Elshahed, 2012).

En el caso de los medios de cultivo sólidos, el medio Murashige y Skoog es el medio más extensamente usado para la propagación vegetativa in vitro de muchas especies de plantas, mientras que el medio B5 es empleado para el crecimiento de células desdiferenciadas de plantas (callo), por lo que se utiliza en los cultivos de suspensión celular y la producción de protoplastos (Morales-Rubio et al., 2016).

2.4.2 Obtención de MS a partir de CCVs en suspensión

Los CCVs en suspensión son importantes para la producción de MSs al ser plataformas tecnológicas bien establecidas que pueden abordar los desafíos para la síntesis de MSs con interés farmacéutico, los cuales se pueden cultivar desde recipientes con volúmenes pequeños en agitación hasta biorreactores para la producción de metabolitos a gran escala en condiciones controladas (Chavdarova, 2019; Custódio et al., 2023).

Esta estrategia requiere un del mismo proceso inicial que cualquier CCV mencionado previamente, pero cuando un número suficiente de células ha proliferado en un medio sólido de partida, estas son transferidas a un medio de cultivo líquido, con la finalidad de generar una suspensión celular fina (Figura 9) (Chavdarova, 2019; Motolinía-Alcántara et al., 2021; Sánchez-Calvo & Alvarenga-Venutolo, 2014).

El paso final comprende el mantenimiento de los cultivos, los cuales pueden volverse inestables conforme se prolongan los tiempos de cultivo, causando diferencias en la calidad y cantidad de MSs; este comportamiento se debe al consumo y menor disponibilidad de nutrientes en los medios de cultivo, además de variaciones genéticas que pueden restringir la conservación de las líneas celulares de alto rendimiento (Motolinía-Alcántara et al., 2021).

Los sistemas vegetales en suspensión son benéficos para la producción de MSs porque permiten su síntesis adecuada, sin la amenaza de contaminantes como endotoxinas o patógenos; ya que, las condiciones se controlan más fácilmente en comparación con los sistemas de plantas completas, lo que permite rendimientos más consistentes y la disminución significativa de costos de procesamiento (Wilson & Roberts, 2011).

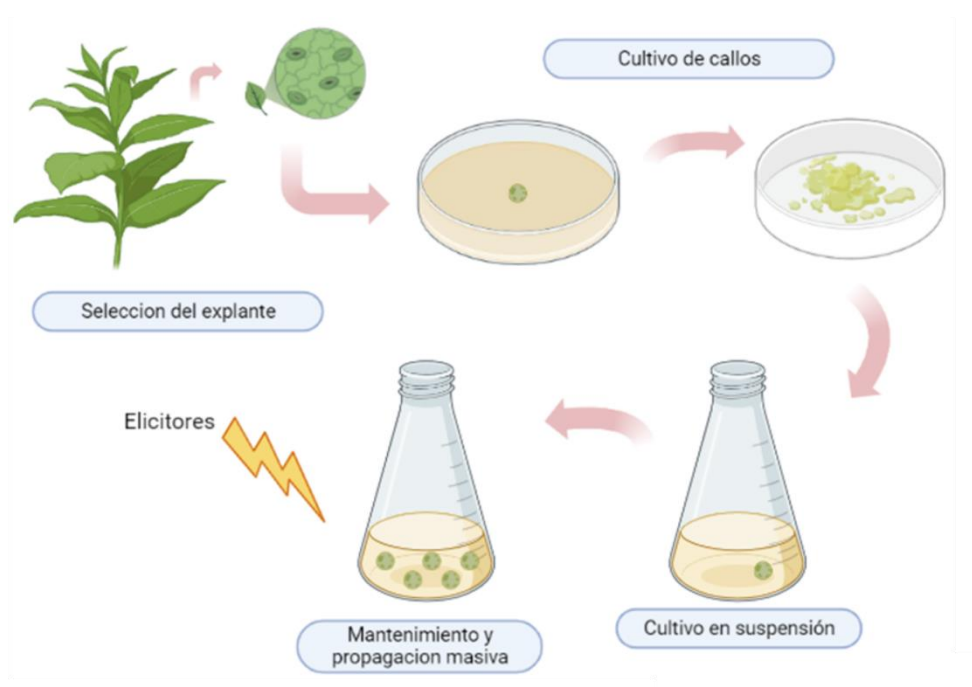


Figura 9. Pasos generales para la obtención de un CCV en suspensión (Imagen creada en Biorender.com)

Sin embargo, la producción de MSs a través de CCV está limitada usualmente por los bajos rendimientos de los productos. Además, la acumulación de metabolitos secundarios a lo largo del tiempo dentro de una sola línea celular y entre cultivos de la misma línea celular suele ser variable, relacionado con la heterogeneidad celular. A pesar de estas limitaciones, se ha reportado la producción exitosa de MSs utilizando CCVs tratados con diferentes estrategias para mejorar la producción de MSs (*Wilson & Roberts, 2011*).

2.4.3 Elicitación, estrategia empleada para incrementar la producción de MS

Una de las estrategias utilizadas para mejorar la producción de MSs en CCV, involucra el uso de elicidores que desencadenan la respuesta de defensa de las células vegetales promoviendo el metabolismo secundario a través de la introducción de estrés químico o físico (*Motolinía-Alcántara et al., 2021*).

Un elicitador puede definirse como un agente que, cuando se aplica en pequeñas cantidades a un sistema vivo, induce o mejora la biosíntesis de compuestos específicos, entonces, el proceso de elicitación consiste en inducir la biosíntesis y acumulación de MSs por exposición de los CCV a moléculas o señales capaces de causarle una situación de estrés que inducen las respuestas de defensa de las plantas (*Thakur et.al., 2018; Pérez-Alonso, 2011; Wang & Wu, 2013*).

Los elicitores se clasifican principalmente en dos clases: bióticos y abióticos. Los primeros, son sustancias de origen biológico cuyas funciones están relacionados con receptores celulares y actúan activando o inactivando una serie de enzimas o canales iónicos, por ejemplo, algunas proteínas, carbohidratos, reguladores de crecimiento vegetal (RCV), entre otros (Tabla 6) (*Thakur et.al., 2018*).

En cambio, los elicitores abióticos son las sustancias de origen no biológico, en su mayoría sales inorgánicas como iones y/o factores físicos como la temperatura, luz, entre otros (Tabla 6) (*Thakur et.al., 2018*).

Tabla 6. Clasificación y tipos de elicitores			
	Bióticos		Abióticos
Tipo	Ejemplos	Tipo	Ejemplos
Proteínas	Pectín liasa, criptogeína, oligandrina, glicoproteínas, lectinas, aglutininas.	Metales	Cd, Zn, Pb, Cr, Fe, Mn, Cu, Ag, Co, Ni.
Carbohidratos	Celulosa, oligogalacturónidos, quitina, quitosano.	Temperatura	Baja, congelante, alta, termal.
Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal	<i>Pseudomona putida</i> , <i>Azospirillum fluorescens</i> , <i>Allorhizobium</i> , <i>Azorhizobium</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Rhizobium</i>	Luz	Intensidad de luz, irradiación continua, oscuridad continua, radiación UV.
Hongos	<i>Glomus</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Protomyces</i> , <i>Mucor</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Claviceps</i>	Salinidad	Estrés osmótico, iónico, oxidativo.
Reguladores de crecimiento vegetal	Auxinas, ácido abscísico, etileno, ácido giberélico, ácido salicílico, ácido jasmónico, metil jasmonato.	Sequía	Déficit de agua, osmótico, oxidativo.

Una de las ventajas de los tratamientos de elicitación es que no se requiere la transferencia de la biomasa a un medio de producción y que generalmente generan respuestas rápidas; por otra parte, como desventaja, es que la producción, en general, no es sostenible en el tiempo, ya que existe una gran especificidad en la interacción de especie vegetal-elicitor, lo que implica que debe seleccionarse el tipo de elicitor para cada cultivo, el momento de agregarlo y la concentración para obtener la mejor respuesta. (Pérez-Alonso, 2011).

Estudios previos reportaron que tratamientos con elicitores de tipo RCV condujeron a la obtención de una amplia gama de MSs en CCV en suspensión (Thakur et al., 2018). Los elicitores RCV interactúan con los tejidos diana específicos y provocan respuestas fisiológicas en las plantas, debido a que tienen capacidad para inducir la expresión genética de diversas vías fotosintéticas. Una de las fitohormonas vegetales más utilizadas es el metil jasmonato (MeJa) (Thakur et al., 2018).

Un estudio llevado a cabo por Mejía-Sánchez (2021) demostró que el tratamiento con MeJa (50, 100, 150 y 200 μ M) en un CCV de *K. daigremontiana*, estimuló la acumulación de fenoles y flavonoides totales. Todas las concentraciones evaluadas de MeJa incrementaron significativamente el contenido de flavonoides totales (3.18, 1.77, 3.91 y 1.96 mg equivalentes de quercetina por gramo de biomasa (mg EQ/g) respectivamente) (Figura 10), al compararse con un control (MeJa 0 μ M; 0.81 mg EQ/g), mientras que solo las concentraciones de 50 y 150 μ M de MeJa incrementaron el contenido de fenoles totales (5.84 y 5.39 mg equivalentes de ácido gálico por gramo de biomasa (EAG/g) respectivamente) (Figura 11), al compararse con un control (3.4 mg EAG/g).

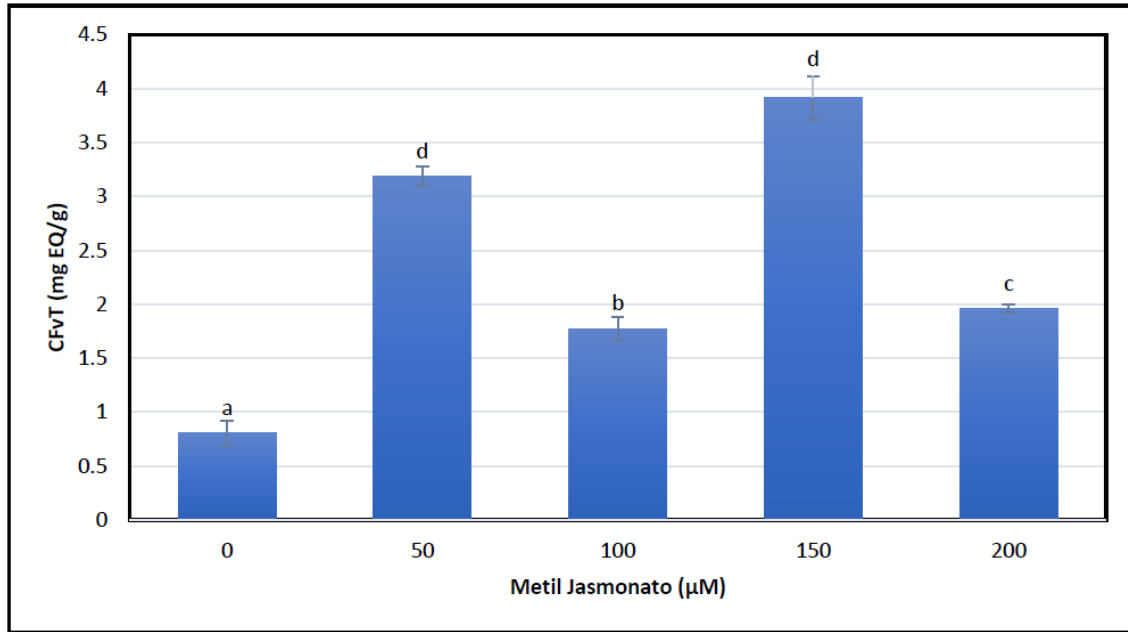


Figura 10. Contenido de Flavonoides Totales (CFvT) en un CCV de *K. daigremontiana* elicitado con MeJa a diferentes concentraciones. Imagen tomada de Mejía-Sánchez (2021).

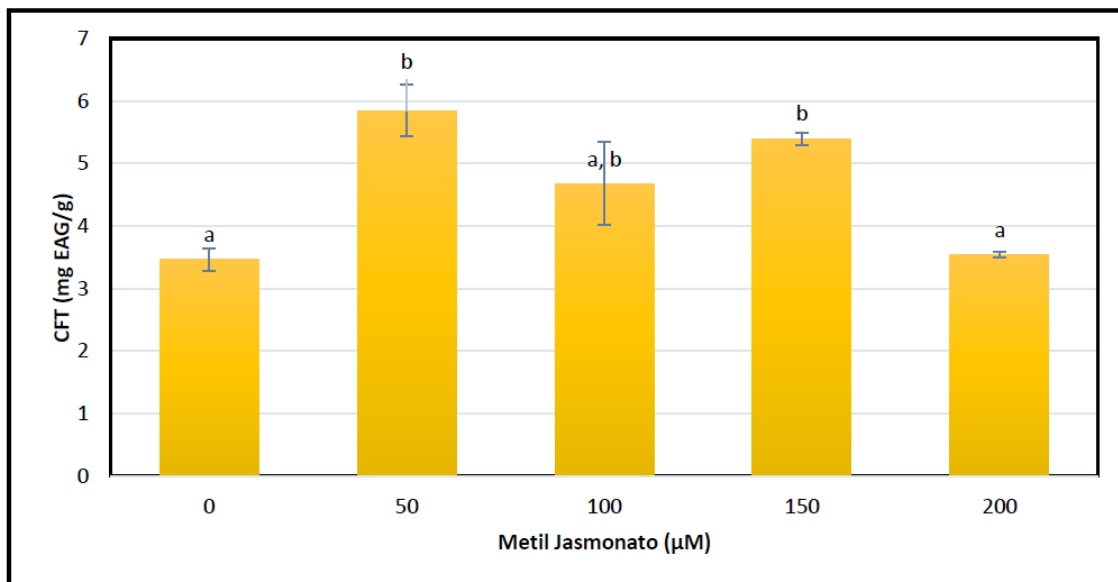


Figura 11. Contenido de Fenoles Totales en un CCV de *K. daigremontiana* elicitado con MeJa a diferentes concentraciones. Imagen tomada de Mejía-Sánchez (2021).

3. Justificación

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-negativa patógena incluida en la lista de «bacterias patógenas prioritarias» resistentes a los antibióticos publicada por la OMS, enfáticamente las cepas resistentes a la meticilina (SARM), con sensibilidad intermedia y con resistencia a la vancomicina (OMS, 2017). En México, hay una alta prevalencia de SARM, (52 -57 %) (Vázquez-Rosas et al., 2021), situación que aunada a la resistencia que desarrollan varios microorganismos patógenos como *S. aureus*, ha conducido a la necesidad de encontrar nuevos compuestos antimicrobianos contra esta cepa de alta patogenicidad para el ser humano (Lee et al., 2018). La investigación de extractos obtenidos de plantas medicinales tradicionales como posibles fuentes de ese tipo de agentes se presenta como una línea importante (Compean & Ynalvez, 2014). *K. daigremontiana* ha sido utilizada en la medicina tradicional como agente antimicrobiano y para tratar infecciones en piel, provocadas por bacterias como *S. aureus* (Assis de Andrade et al., 2023). Este efecto es atribuido a los metabolitos secundarios que presenta, especialmente los de tipo fenólico, los cuales han demostrado tener capacidad antibacteriana contra *S. aureus* (Miklasinska-Majdanik et al, 2018). Una alternativa para la obtención continua de metabolitos con actividad antibacteriana es el cultivo de células vegetales *in vitro*, que utiliza medios de cultivo nutritivos, condiciones asépticas, artificiales, controladas y que además puede incluir el uso de elicitores, para lograr así, la producción libre de patógenos en periodos de tiempo relativamente cortos (Esparza, 2020; Espinosa-Leal et al., 2018; Motolinía-Alcántara et al., 2021). Un estudio llevado a cabo por Mejía-Sánchez (2021) demostró que el tratamiento con diferentes concentraciones de MeJa (50, 100, 150 y 200 μM) en un CCV de *K. daigremontiana*, estimuló la acumulación de fenoles y flavonoides totales. En este trabajo se propone evaluar la capacidad antibacteriana del extracto metanólico obtenido de un cultivo celular de *K. daigremontiana* elicitado con metil jasmonato contra una cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a antibióticos y otra resistente a meticilina (SARM) mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer).

4. Hipótesis

Los extractos metanólicos obtenidos de un cultivo celular de *K. daigremontiana* elicitado con diferentes concentraciones de MeJa, al contener principalmente una mayor concentración de compuestos fenólicos, causarán un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de una cepa *Staphylococcus aureus* sensible a antibióticos y otra resistente a meticilina (SARM).

5. Objetivos

5.1 General

- Evaluar la actividad antibacteriana de extractos metanólicos obtenidos de un cultivo celular de *K. daigremontiana* elicitado con diferentes concentraciones de MeJa contra una cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a antibióticos y otra resistente a meticilina (SARM).

5.2 Particulares

- Comparar el efecto antibacteriano de los extractos metanólicos obtenidos de un cultivo celular de *K. daigremontiana* elicitado con diferentes concentraciones de MeJa contra una cepa de *S. aureus* sensible a antibióticos y SARM.
- Analizar la correlación entre la actividad antimicrobiana y el contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos metanólicos obtenidos de un cultivo celular de *K. daigremontiana* elicitado con diferentes concentraciones de MeJa.

6. Materiales y métodos

6.1 Suspensión celular de *K. daigremontiana* y su elicitación con MeJa

El establecimiento del CCV de *K. daigremontiana* en suspensión y su elicitación con MeJa (0, 50, 100, 150 y 200 μM), fue realizado previamente por Mejía-Sánchez (2021), en el laboratorio de en el laboratorio de Cultivo *in vitro* y Fitoquímica del Centro de Investigación en Recursos Bióticos (CIRB) de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México, como parte de su proyecto de tesis de licenciatura (Figura 12 a y b). Esta línea celular en suspensión se retomó en el presente trabajo.

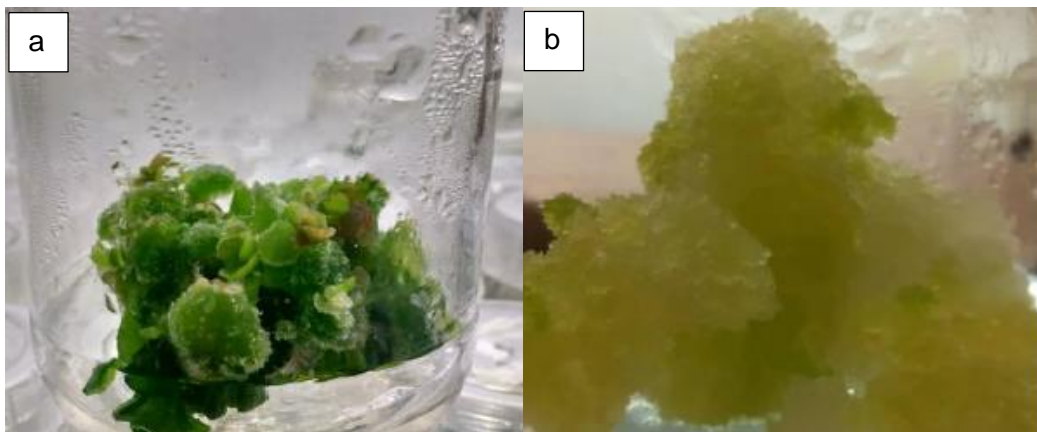


Figura 12. a) Callo friable en los bordes de los explantes de *K. daigremontiana* y b) su callo. Imagen tomada de Mejía-Sánchez (2021).

6.2 Obtención del extracto metanólico

La biomasa producida por el CCV de *K. daigremontiana* elicitado con diferentes concentraciones de MeJa se extrajo con metanol (MeOH) (100 mg de biomasa seca/100 mL de MeOH) por 20 min en un ultrasonificador (SSLA-950W). El extracto se filtró y posteriormente se concentró a un volumen final de 10 mL en un rotavapor (Buchi) acoplado a una bomba de vacío. El extracto se recuperó y se secó en una estufa a 40°C hasta la completa evaporación del solvente.

6.3 Elaboración de las soluciones Stock y controles

Se elaboraron soluciones stock de los extractos metanólicos con concentraciones de 5.0, 20.0, 40.0, 60.0 y 80.0 $\mu\text{g/mL}$ y Dimetilsulfóxido (DMSO) al 3%. Para el control positivo se

preparó una solución de vancomicina [0.1 mg/mL] a partir de una solución stock con concentración de 10mg/mL. Para el control negativo se elaboró una solución de DMSO al 3%. Posteriormente, las soluciones fueron esterilizadas mediante filtración utilizando membranas con tamaño de poro de 0.2 μm acopladas a filtros estériles de tipo pirinola. Las soluciones se almacenaron en refrigeración a 2°C en tubos estériles para su uso posterior.

6.4 Preparación de discos de ensayo

Los discos de papel de ensayo de 6 mm de diámetro se esterizaron en autoclave a 121°C y 15 lb por 20 minutos y fueron cargados en condiciones de esterilidad con 10 μl de cada una de las soluciones stock del extracto preparadas (obteniendo concentraciones de 0.5, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$) y soluciones control. Los discos se almacenaron en tubos estériles para su uso posterior.

6.5 Reactivación de cepas

Las cepas de *S. aureus* sensible a antibióticos (ATCC® 25923) y SARM (ATCC® 43300) fueron proporcionadas por la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de México, las cuales estaban en condiciones de almacenamiento a -20/-70 °C. Luego de ser descongeladas, se tomó una alícuota de 330 μL , se homogeneizó con vórtex y se inoculó en un tubo con 1.5 ml de caldo soya tripticaseína (CST); a partir de esta suspensión se tomó una alícuota 80 μL y se colocó en placas Petri con agar soya tripticaseína (AST) y se realizó una siembra por estría cruzada (Figura 13a). Se incubaron los tubos y placas a 37°C por 24 horas. Se corroboró la integridad y pureza de las cepas a través de una tinción de Gram (Figura 13b).

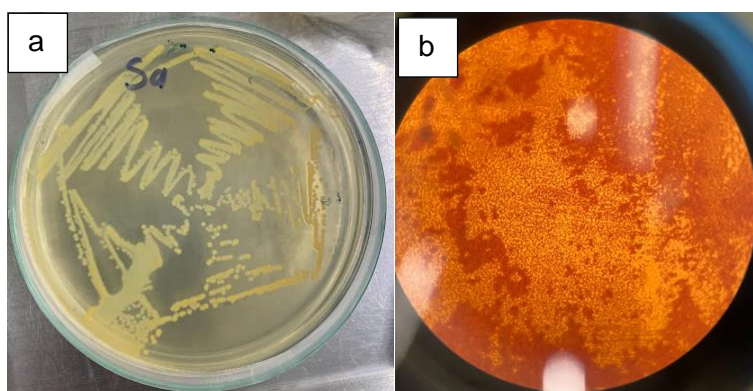


Figura 13. Reactivación de cepas. a) siembra en placa por estriado de SARM. b) tinción Gram para una colonia de SARM, ampliación 40x.

6.6 Preparación del inóculo

De cada cepa de *S. aureus* (ATCC® 25923 y ATCC® 43300), se picó una unidad formadora de colonia de los cultivos reactivados y se inoculó en un tubo con 2 mL de CST y se incubó a 37°C por 24 horas. A partir de ese cultivo líquido se preparó una suspensión en CST ajustada a 0.5 en la escala de Mc Farland (1×10^8 UFC). Para la preparación de la suspensión de trabajo (1×10^5 UFC) se tomó una alícuota de 10 μ L de la suspensión ajustada y se agregó en 9990 μ L de CST.

6.7 Evaluación del efecto antibacteriano por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer)

Para cada cepa de *S. aureus*, se inocularon 80 μ L de la suspensión de trabajo (1×10^5 UFC) a cajas Petri con agar Mueller-Hinton (AM-H) mediante extensión masiva o de césped. Se inocularon 6 cajas por concentración de extracto (0, 0.5, 2.0, 6.0 y 8.0 μ g/disco); cada caja incluyó un control positivo, un control negativo y tres discos con la misma concentración de extracto. Las cajas inoculadas, así como un blanco de medio de cultivo se incubaron a 37°C durante 24 horas (*Figura 14*). Posteriormente se midió el diámetro del halo de inhibición empleando una regla calibrada y los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano mediante la fórmula:

$$\%I = \frac{h - (c-)}{(c+) - (c-)} \times 100$$

Donde:

%I= porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano.

h: medida del diámetro del halo de inhibición (cm).

c-: medida del diámetro del control negativo (cm).

c+: medida del diámetro del halo de inhibición del control positivo (cm).

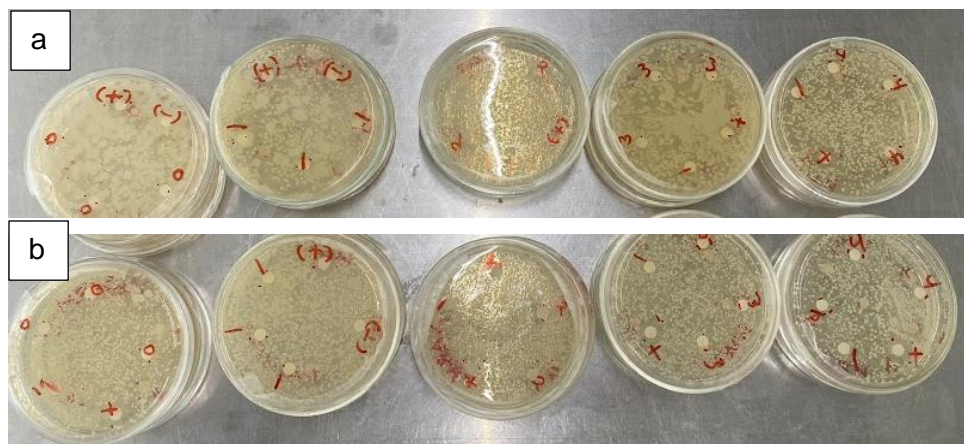


Figura 14. Método de difusión en disco para a) *S. aureus* sensible a antibióticos y b) SARM. En ambas cepas se muestra la concentración de extracto de 2 μg /disco, después de 24 horas de incubación a 37°C.

6.8 Análisis estadístico

Se empleó el software STATGRAPHICS para realizar el análisis estadístico (ANOVA) del efecto antibacteriano de cada una de las concentraciones probadas derivadas de los extractos metanólicos del CCV de *K. daigremontiana* (0.5, 2.0, 4.0 y 8.0 μg /disco) elicitados con diferentes concentraciones de MeJa. Además, se analizó la relación entre el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano (%) y las diferentes concentraciones de MeJa (0, 50, 100, 150 y 200 μM), por cada cepa. Adicionalmente se realizó un ANOVA para todos los tratamientos de elicitación y se analizaron las diferencias significativas entre las concentraciones de extracto empleadas, con un nivel de confianza del 95%. Finalmente, se llevó a cabo la prueba de correlación de Pearson para analizar la relación entre el efecto antibacteriano (porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano) y el contenido de fenoles y flavonoides totales (con datos obtenidos previamente por Mejía-Sánchez, 2021), con un nivel de confianza del 95%.

7. Resultados

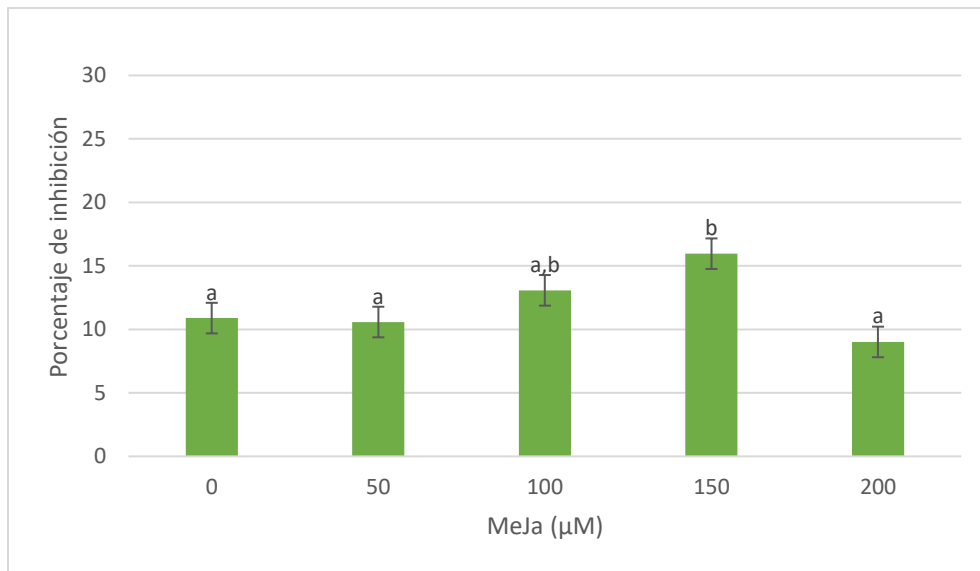
7.1 Efecto de la concentración del extracto metanólico del CCV elicitado con MeJa de *K. daigremontiana* en la inhibición de *S. aureus* sensible a antibióticos y SARM

Todos los extractos metanólicos obtenidos del CCV de *K. daigremontiana*, elicitado con diferentes concentraciones de MeJa (50, 100, 150 y 200 μM), así como el extracto control (MeJa 0 μM), en todas las concentraciones evaluadas (0.5, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$), mostraron efecto antibacteriano contra las cepas de *S. aureus* evaluadas, aunque, en lo general, la cepa de *S. aureus* sensible a antibióticos fue más sensible a los extractos metanólicos que la cepa de SARM (*Figuras 15 y 16, respectivamente*).

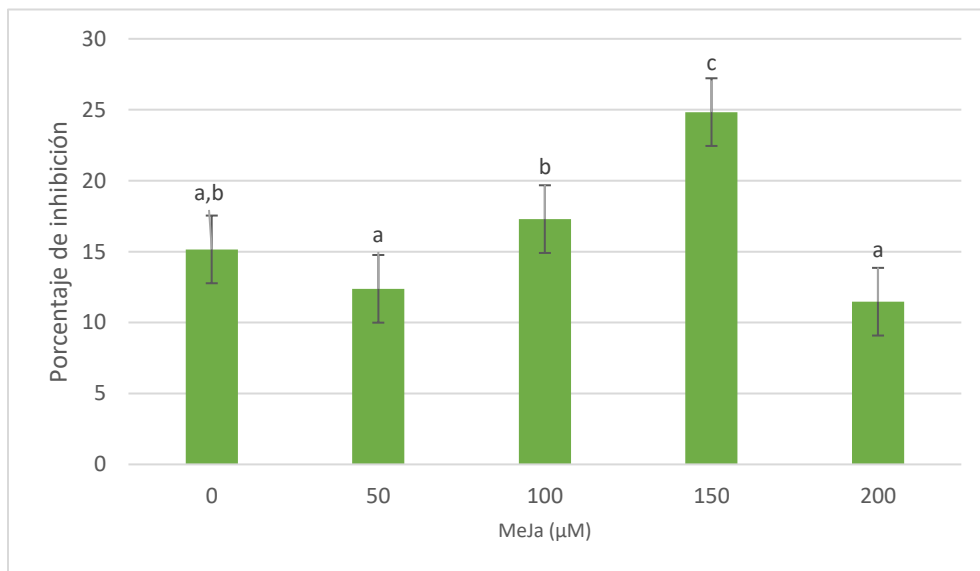
Ambas cepas mostraron sensibilidad a la vancomicina (control positivo), mientras que la solución de DMSO al 3% (control negativo) no presentó actividad antibacteriana.

En el caso de la cepa de *S. aureus* sensible a antibióticos, al comparar el efecto antibacteriano entre los diferentes extractos obtenidos de los tratamientos de MeJa (50, 100, 150 y 200 μM) respecto al extracto control (MeJa 0 μM), a la concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{disco}$, el análisis ANOVA mostró que existen diferencias significativas sólo para los extractos resultantes de la elicitación con MeJa [150 μM], donde ocurrió el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano (15.96% vs 10.88% de inhibición para MeJa [150 μM] y su control 0 μM , respectivamente) (*Figura 15a*). Dicho comportamiento también fue observado para el resto de las concentraciones evaluadas con el extracto de MeJa [150 μM], en las cuales, el porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano fue estadísticamente mayor respecto a su control correspondiente (24.83% vs 15.15% de inhibición con la concentración 2.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$; 29.86% vs 13.76% de inhibición con la concentración 4.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$; 28.31% vs 17.42% de inhibición con la concentración 6.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$; 31.75% vs 17.35% de inhibición con la concentración 8.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$) ($p < 0.05$) (*Figura 15b-e*).

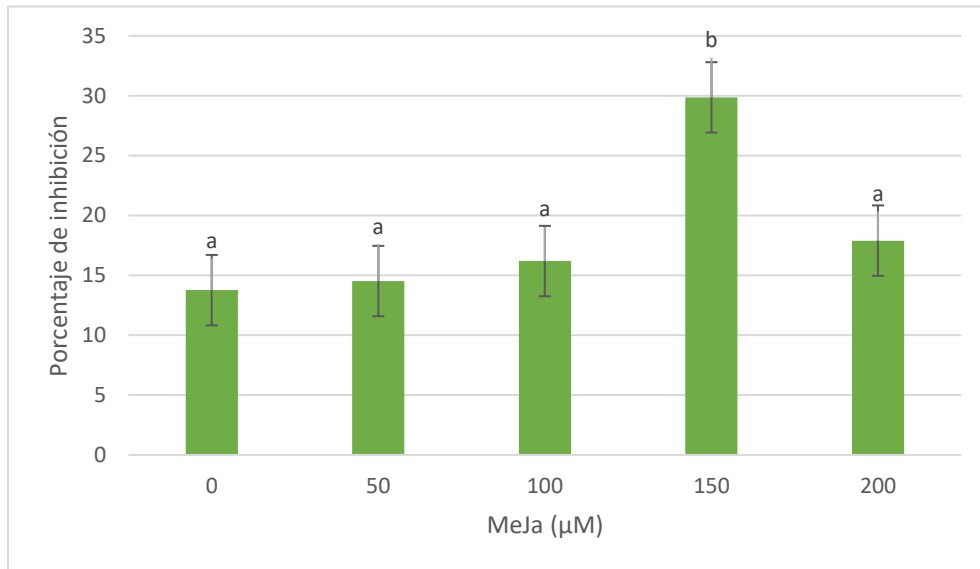
a) 0.5 µg/disco



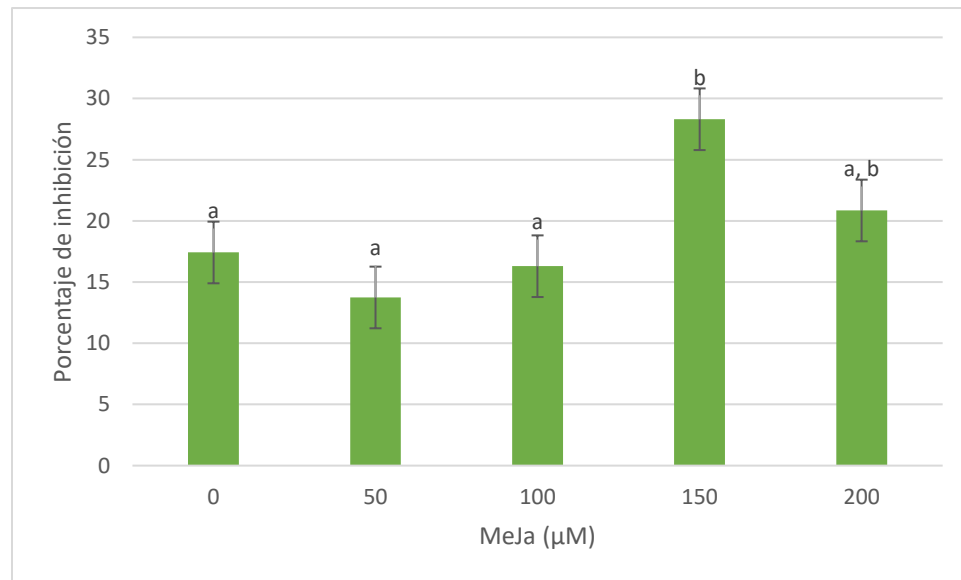
b) 2.0 µg/disco



c) 4.0 µg/disco



d) 6.0 µg/disco



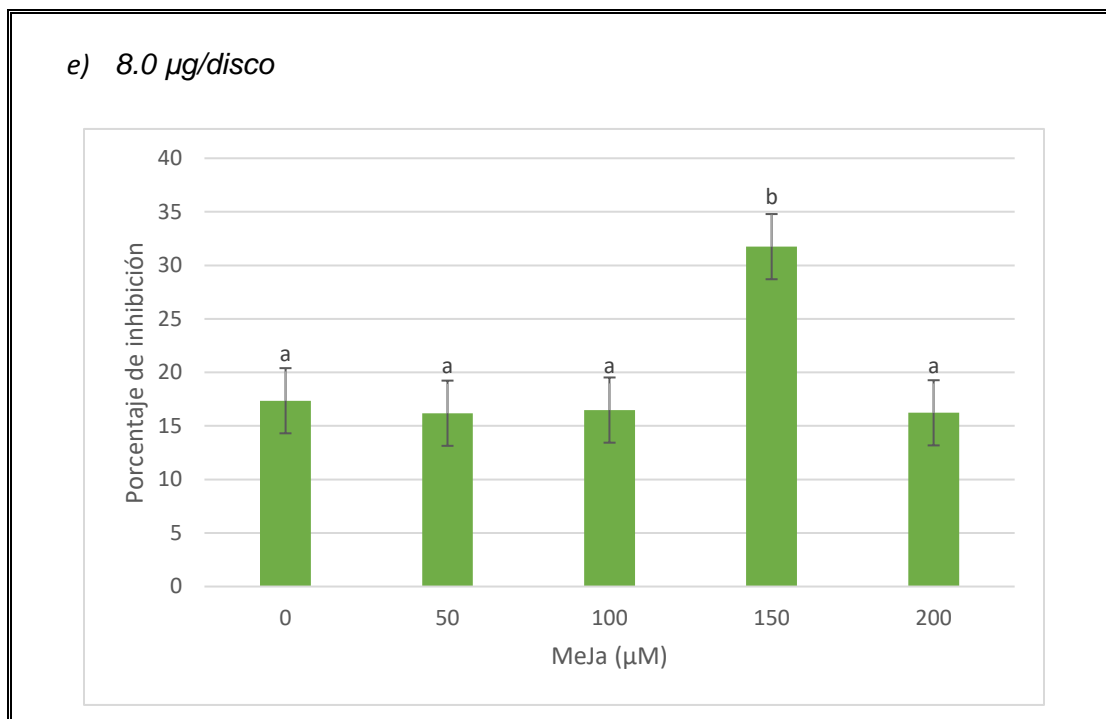


Figura 15. Porcentajes de inhibición del crecimiento contra *S. aureus* sensible a antibióticos del extracto metanólico obtenido del CCV de *K. daigremontiana* sometido a distintos tratamientos de elicitación con MeJa (0 - 200 µM), a diferentes concentraciones. a) 0.5 µg/disco, b) 2.0 µg/disco, c) 4.0 µg/disco, d) 6.0 µg/disco, e) 8.0 µg/disco. Los resultados están representados por la media ± error estándar, los grupos con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Se llevó a cabo un análisis ANOVA para todos los tratamientos de elicitación con MeJa, empleando las diferentes concentraciones de extracto probadas (0.5-8.0 µg/disco) en *S. aureus* sensible a antibióticos para evaluar su efecto sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano. Los resultados del análisis ANOVA mostraron que para el tratamiento de elicitación con MeJa [50 µM] solamente hubo diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de 0.5 y 4.0 µg/disco (10.58% y 14.52%, respectivamente) y entre 0.5 y 8.0 µg/disco (10.58% y 16.19%, respectivamente) (Tabla 7). Para el tratamiento de MeJa [100 µM] no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre todas las concentraciones de extracto evaluadas, mientras que para el tratamiento de elicitación con MeJa [150 µM], la menor concentración de extracto empleada (0.5 µg/disco), mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación con el resto de las concentraciones (15.96%, 24.83%, 29.86%, 28.31% y 31.75% de inhibición del crecimiento para 0.5, 2.0 4.0, 6.0 y 8.0 µg/disco, respectivamente), también para ese mismo

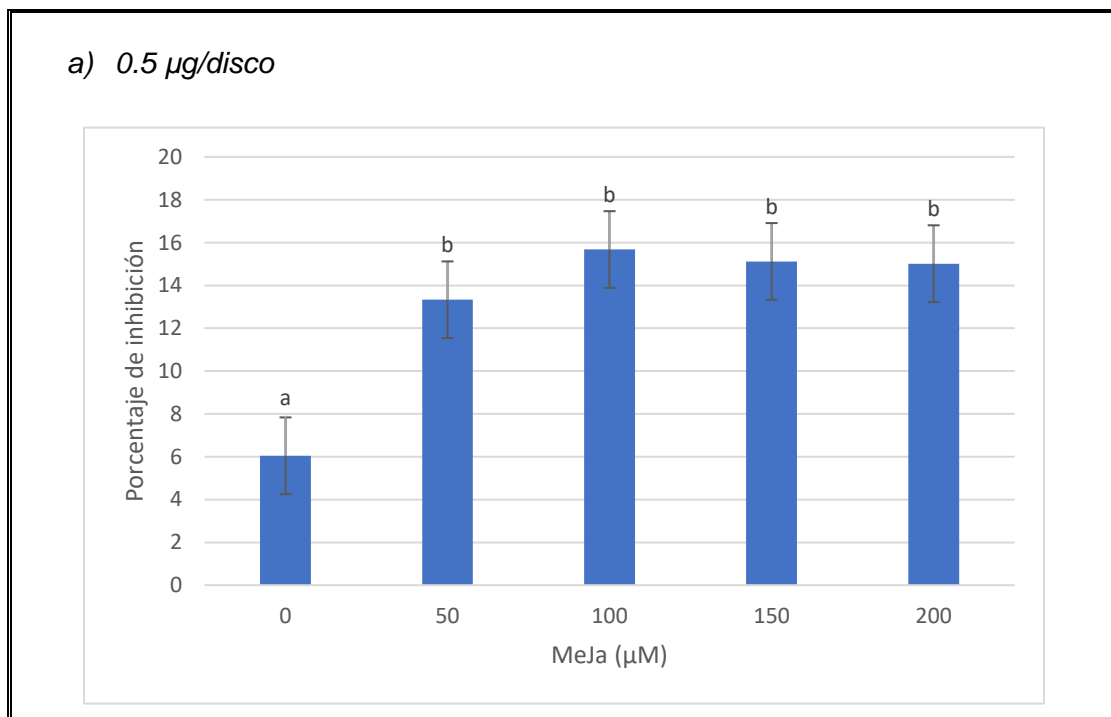
tratamiento de elicitación se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de 2.0 y 8.0 µg/disco (24.83% y 31.75%, respectivamente). Se observó que los porcentajes de inhibición de crecimiento bacteriano más altos para la cepa de *S. aureus* sensible a antibióticos ocurrieron con el tratamiento de MeJa [150 µM], en las concentraciones de 4.0, 6.0 y 8.0 µg/disco (29.86%, 28.31% y 31.75%), sin embargo, entre sí, no se mostraron diferencias significativas. Finalmente, para el tratamiento de elicitación de MeJa [200 µM], se observaron diferencias entre las concentraciones de extracto de 0.5 y 4.0, 6.0 y 8.0 (9.01% y 17.90%, 20.85% y 16.23%, respectivamente) y entre las concentraciones de 2.0 y 6.0 µg/disco (11.47 % y 16.23 %, respectivamente) ($p < 0.05$) (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes de inhibición del crecimiento contra <i>S. aureus</i> sensible a antibióticos del extracto metanólico obtenido del CCV sometido a elicitación con MeJa (50-200 µM) a diferentes concentraciones de extracto				
Concentración (µg/disco)	MeJa 50 µM	MeJa 100 µM	MeJa 150 µM	MeJa 200 µM
0.5	10.58 ± 0.95 ^a	13.08 ± 0.82 ^a	15.96 ± 2.73 ^a	9.01 ± 2.50 ^a
2.0	12.38 ± 0.34 ^{a,b}	17.29 ± 1.83 ^a	24.83 ± 2.40 ^b	11.47 ± 0.73 ^{a,b}
4.0	14.52 ± 1.49 ^b	16.19 ± 1.71 ^a	29.86 ± 2.52 ^{b,c}	17.90 ± 3.75 ^{b,c}
6.0	13.74 ± 1.20 ^{a,b}	16.30 ± 2.03 ^a	28.31 ± 1.45 ^{b,c}	20.85 ± 3.00 ^c
8.0	16.19 ± 2.20 ^b	16.48 ± 1.02 ^a	31.75 ± 2.58 ^c	16.23 ± 1.30 ^{b,c}

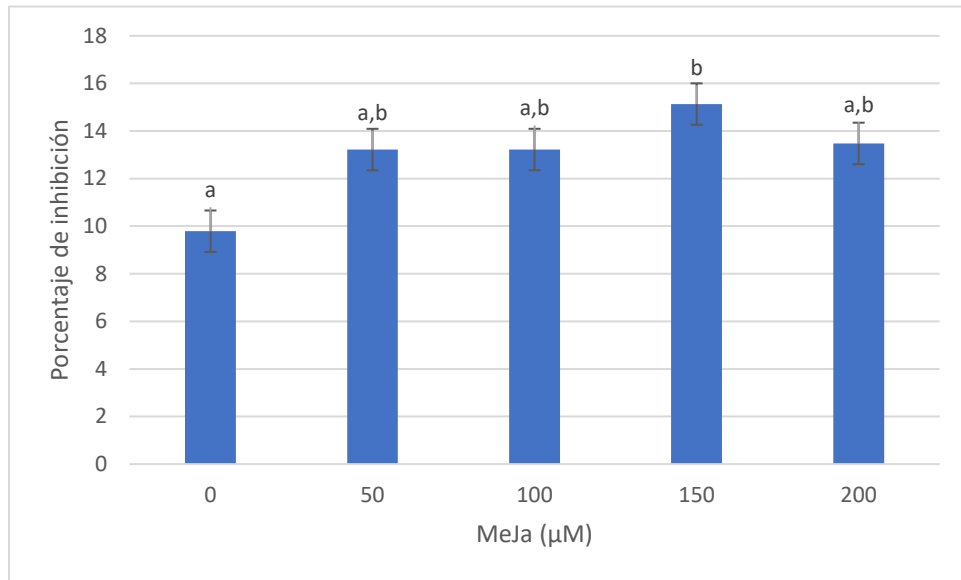
Los resultados están representados por la media ± error estándar, seguidos de letras minúsculas, donde la misma letra indica que no existen diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

Por otro lado, para el caso de la cepa SARM, al comparar el efecto antibacteriano entre los diferentes extractos evaluados obtenidos de los tratamientos con MeJa (50, 100, 150 y 200 µM) respecto al extracto control (MeJa 0 µM), a la concentración de 0.5 µg/disco, el análisis ANOVA mostró que todos los extractos obtenidos del total de las concentraciones probadas de MeJa provocaron un mayor porcentaje de inhibición respecto al extracto control, aunque entre ellos no hubo diferencias estadísticas (13.33%, 15.67%, 15.12% y 15.02% vs 6.04% de inhibición de crecimiento bacteriano para MeJa 50, 100, 150 y 200 vs 0 µM, respectivamente) (Figura 16a). Mientras que, a la concentración de 2.0 µg/disco, el único tratamiento que fue estadísticamente diferente respecto al control ocurrió con MeJa [150 µM] (15.13% vs 9.79% de porcentaje de inhibición para 150 y 0 µM, respectivamente)

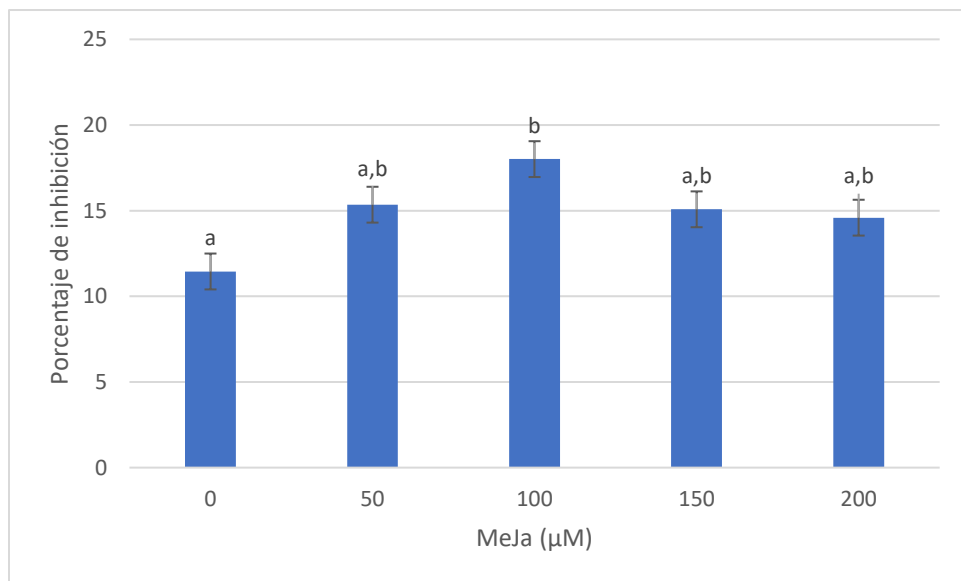
(Figura 16b). A la concentración de extracto de 4.0 µg/disco, se observaron diferencias estadísticamente significativas únicamente entre MeJa [100 µM] y el control; siendo éste el mayor el porcentaje de inhibición observado contra esta cepa (18.01% vs 11.45% de inhibición para 100 y 0 µM, respectivamente) (Figura 16c). Para la concentración de 6.0 µg/disco, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el control, y los tratamientos de MeJa [100 y 150 µM], siendo mayor el porcentaje de inhibición encontrado en estos dos últimos respecto al control, aunque entre ellos, no hubo diferencias estadísticas (14.34% y 14.77% vs 11.47%, para MeJa 100 y 150 µM vs MeJa 0 µM, respectivamente) (Figura 16d). Finalmente, para la concentración de extracto de 8.0 µg/disco solamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los tratamientos de elicitación de 150 y 200 µM, siendo mayor el porcentaje de inhibición encontrado en estos dos últimos respecto al control, aunque entre ellos, no hubo diferencias estadísticas (16.52% y 15.30%, vs 7.34%, para MeJa 150 y 200 µM vs MeJa 0 µM, respectivamente) ($p < 0.05$) (Figura 16e).



b) 2.0 µg/disco



c) 4.0 µg/disco



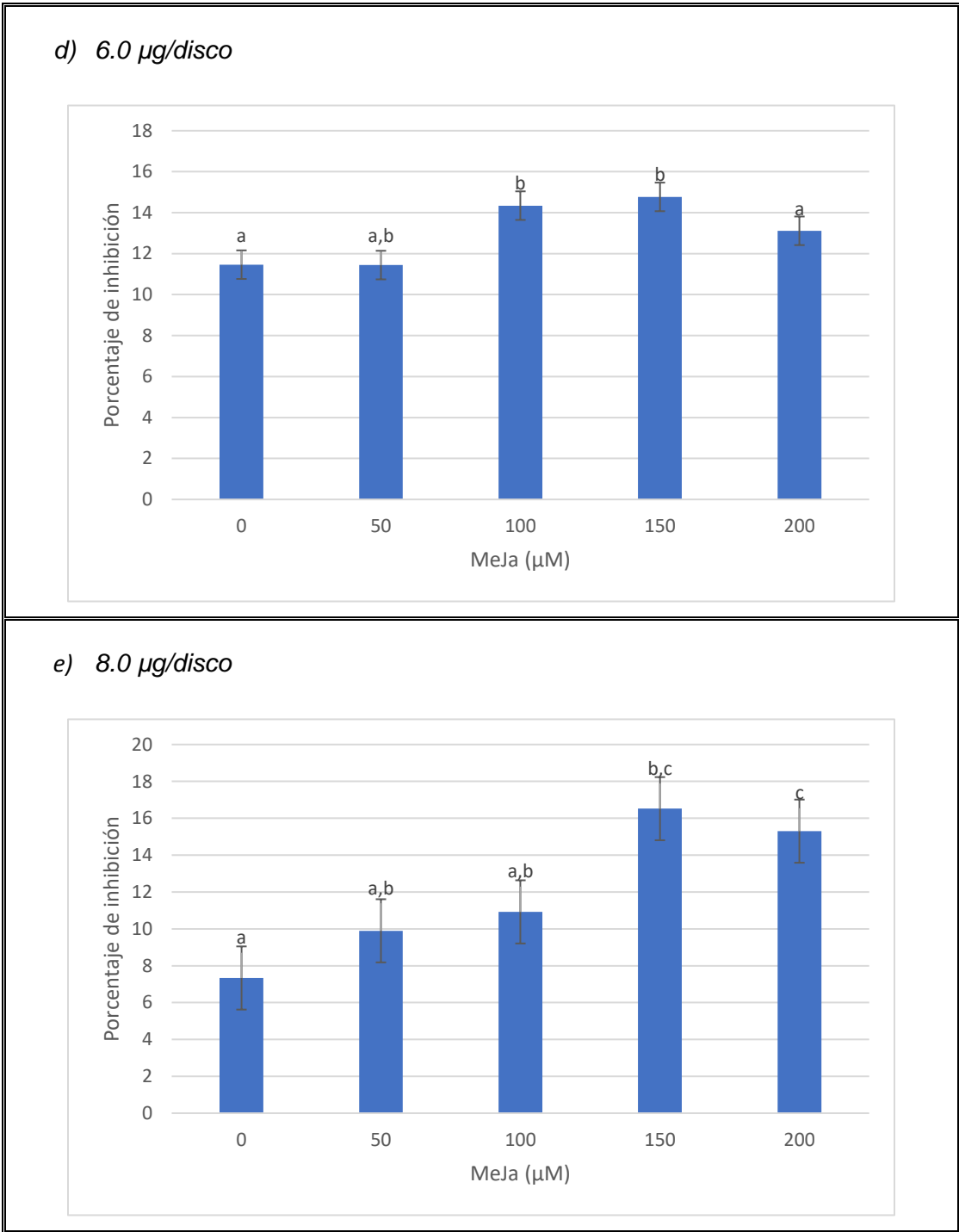


Figura 16. Porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano contra SARM con diferentes concentraciones del extracto metanólico del CCV de *K. daigremontiana* sometido a distintos tratamientos de elicitación con MeJa (0 - 200 µM), a diferentes concentraciones. a) 0.5 µg/disco, b) 2.0 µg/disco, c) 4.0 µg/disco, d) 6.0 µg/disco, e) 8.0 µg/disco. Los resultados están representados por la media ± error estándar, los grupos con la misma letra no son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

Asimismo, se llevó a cabo un análisis ANOVA para todos los tratamientos de elicitación con MeJa, empleando las diferentes concentraciones de extracto probadas (0.5-8.0 µg/disco) contra la cepa SARM para evaluar el efecto de la concentración de extracto sobre el porcentaje de inhibición. Los resultados del análisis ANOVA mostraron que para el tratamiento de elicitación con MeJa [50 µM] únicamente se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de 4.0 y 8.0 µg/disco (15.35% y 9.90%, respectivamente) ($p < 0.05$) (Tabla 8). Para el tratamiento con MeJa 100 µM se observó que existen diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de 4.0 y 8.0 µg/disco (18.01% y 10.92%, respectivamente), y fue con la última concentración empleada (8.0 µg/disco) donde se observó el porcentaje de inhibición más alto (18.01%), aunque, en realidad, éste no fue estadísticamente diferente con respecto a los valores observado para las concentraciones de 0.5 y 6.0 µg/disco (15.67% y 14.34%, respectivamente). Finalmente, para los tratamientos de elicitación con MeJa [150 y 200 µM] no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano obtenidos por efecto de las diferentes concentraciones del extracto probadas ($p < 0.05$) (Tabla 8).

Tabla 8. Porcentajes de inhibición del crecimiento contra SARM del extracto metanólico obtenido del CCV sometido a elicitación con MeJa (50-200 µM) a diferentes concentraciones de extracto

Concentración (µg/disco)	MeJa 50 µM	MeJa 100 µM	MeJa 150 µM	MeJa 200 µM
0.5	13.33 ± 2.22 ^{a,b}	15.67 ± 1.78 ^{b,c}	15.12 ± 0.73 ^a	15.02 ± 1.24 ^a
2.0	13.22 ± 2.34 ^{a,b}	13.22 ± 2.34 ^{a,b}	15.13 ± 1.48 ^a	13.48 ± 0.91 ^a
4.0	15.35 ± 0.83 ^b	18.01 ± 0.96 ^c	15.05 ± 1.72 ^a	14.59 ± 1.37 ^a
6.0	11.44 ± 1.37 ^{a,b}	14.34 ± 1.37 ^{a,b,c}	14.77 ± 1.07 ^a	13.11 ± 1.42 ^a
8.0	9.90 ± 1.54 ^a	10.92 ± 1.50 ^a	16.52 ± 2.23 ^a	15.30 ± 1.46 ^a

Los resultados están representados por la media ± error estándar, seguidos de letras minúsculas, donde la misma letra indica que no existen diferencias estadísticas ($p < 0.05$).

7.2 Correlación entre la actividad antibacteriana y el contenido de fenoles y de flavonoides totales en los extractos metanólicos del cultivo celular de *K. daigremontiana*, elicitado con diferentes concentraciones de MeJa

El análisis estadístico de la correlación de Pearson entre el contenido de fenoles totales (CFT) y el contenido de flavonoides totales (CFlaT) (Mejía-Sánchez, 2021) y el efecto antibacteriano, mostró que el efecto dependió de la cepa.

Para *S. aureus* sensible a antibióticos únicamente se observó una correlación positiva baja (0.1456) entre el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano y el CFlaT (Tabla 9).

Para la cepa SARM, se observó una correlación positiva baja de 0.1167 entre el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano y el CFT, mientras que para el CFlaT también se observó una correlación positiva baja de 0.1925 (Tabla 9).

Se observó que existe una fuerte correlación positiva entre el CFT y el CFlaT (0.7556), cuando varía la concentración de MeJa, un alto porcentaje de los MSs incrementados por la elicitación con MeJa, son los de tipo flavonoide.

Tabla 9. Correlación entre la actividad antibacteriana para *S. aureus* sensible a antibióticos y SARM y el CFT y CFlaT del extracto metanólico obtenido de un CCV de *K. daigremontiana* elicitado con diferentes concentraciones de MeJa (0- 200 μ M)

Porcentaje de inhibición de cepa bacteriana	Contenidos totales de metabolitos secundarios	Correlación de Pearson	
		Valor de <i>p</i>	Valor de R
<i>S. aureus</i> sensible a antibióticos	CFT	0.0992	--
	CFlaT	0.0020	0.1456
SARM	CFT	0.0132	0.1167
	CFlaT	0.0000	0.1925
	CFT vs CFlaT	0.0000	0.7556

($p < 0.05$).

8. Discusión

La elicitación con metil jasmonato en un cultivo celular *in vitro* de *K. daigremontiana* fue una herramienta biotecnológica útil para lograr un incremento en la producción de MSs, particularmente de aquellos tipo fenólico (Mejía-Sánchez, 2021), los cuales contribuyeron al efecto antibacteriano contra las cepas *S. aureus* sensible a antibiótico y SARM, ya que de manera general se lograron porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano más altos para todos los tratamientos de elicitación (50-200 μM de metil jasmonato) en comparación al control (0 μM) (Figuras 15a-e y 16a-e).

Los metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, principalmente del tipo flavonoide, han sido descritos en la literatura por su capacidad antibacteriana contra *S. aureus*, los cuales actúan inhibiendo el metabolismo, la síntesis de ácidos nucleicos y funciones de la membrana citoplásmica (Xye, et al., 2015).

De acuerdo con Mejía-Sánchez (2021), todos los tratamientos de elicitación con metil jasmonato (50-200 μM) incrementaron el contenido de flavonoides en los cultivos correspondientes, (3.18, 1.77, 3.91 y 1.96 mg EQ/g respectivamente) y solo las concentraciones de 50 y 150 μM de MeJa incrementaron el contenido de fenoles totales (5.84 y 5.39 mg), al compararse con un control (3.4 mg EAG/g).

La prueba de Pearson realizada para observar la correlación entre el contenido de flavonoides totales y el porcentaje de inhibición mostró valores positivos bajos para ambas cepas (0.1456 y 0.1925, para *S. aureus* sensible a antibiótico y SARM, respectivamente), y para la correlación entre el contenido de fenoles totales y el porcentaje de inhibición, solo mostró un valor positivo bajo para SARM (0.1167). Con base en lo anterior, la inhibición observada se puede atribuir a los compuestos de tipo flavonoide cuya producción aumentó por efecto de la elicitación; sin embargo, igualmente, es posible que compuestos de otras familias de metabolitos secundarios también pudieron participar en la actividad evaluada.

En un estudio de metabolómica no dirigida realizado por García-Pérez et al. (2021) utilizaron elicitores como metil jasmonato y ácido salicílico, así como la combinación de ambos elicitores, en cultivos celulares en suspensión de diferentes especies de *Kalanchoe*, incluyendo *K. daigremontiana*. Este estudio resultó en la inducción de un total de 2272 metabolitos secundarios, principalmente tres clases de metabolitos: compuestos nitrogenados como aminas, alcaloides y glucosinolatos; terpenoides como fitoalexinas y

saponinas; y, finalmente, compuestos fenólicos, destacando los flavonoides y lignanos, siendo esta clase de metabolitos los más inducidos por la elicitación.

Algunos de los compuestos fenólicos reportados por García-Pérez et al. (2021), en los cuales el proceso de elicitación produjo una mayor biosíntesis fueron los de tipo flavonoide y quinonas, como la baicalina y los glucósidos de apigenina crisina, isovitexina, kaempferol, antocianinas como las derivadas de pelargonidina y peonidina, mientras que entre las quinonas se encontraron la lawsona y la juglona. Para la biosíntesis de lignanos y cumarinas, como la cianidina, delphinidina y el bergaptol, también se reportó que su biosíntesis fue promovida.

De acuerdo con la *Tabla 1*, varios de los compuestos reportados por García-Pérez et al. (2021) en los que la elicitación promovió su biosíntesis han sido descritos en *K. daigremontiana*. Además, estos compuestos, que también han demostrado tener actividad antibacteriana, podrían estar contribuyendo a la respuesta inhibitoria en las cepas evaluadas (*Tabla 4*).

Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por Shamsudin et al. (2022) se reportó que el kaempferol, compuesto que está presente en *K. daigremontiana*, posee actividad antibacteriana contra SARM, indicando una cantidad mínima inhibitoria de 0.5–2.0 µg/mL. Dicha actividad es conferida por su estructura, la cual es clave para provocar supresión de la síntesis de ácidos nucleicos, la función de la membrana citoplasmática y el metabolismo energético.

En un estudio realizado por Wan et al. (2023), se demostró que la juglona, metabolito que también está presente en *K. daigremontiana*, posee actividad antibacteriana contra *S. aureus*, al reprimir la integridad de la membrana y provocar la fuga de proteínas, con una cantidad mínima inhibitoria de este compuesto fue de 1000 µg/mL, y en concentraciones sub inhibitorias, impidió la formación de biopelículas, la expresión de α-hemolisina y la producción de proteasas y lipasas, proteínas relacionadas con la patogenicidad de *S. aureus*.

Dong et al, (2022) demostraron que un extracto etanólico purificado con antocianinas de *Lycium ruthenicum Murr* tuvo la capacidad de actuar como inhibidor de *S. aureus*, afectando la integridad de la membrana celular y la formación de biopelículas. Al evaluar dicho extracto purificado en comparación con un extracto crudo de la misma especie, observaron mejores resultados con el purificado, con una cantidad mínima inhibitoria de 3125 µg/mL, mientras

que con el extracto crudo se utilizó cuatro veces la cantidad mínima inhibitoria del extracto purificado para observar resultados significativos en la inhibición.

Por otra parte, García-Pérez et al. (2021), mencionó que la segunda clase de metabolitos secundarios cuya biosíntesis fue promovida por efecto de la elicitación fueron los compuestos nitrogenados, de la cual, fueron los alcaloides y sus precursores, el grupo de compuestos nitrogenados más sintetizado por la elicitación solamente con metil jasmonato, además de glucosinolatos y sus precursores.

Se ha reportado que ciertos tipos de alcaloides como la cafeína, presente en *K. daigremontiana* (Tabla 3), poseen actividad antibacteriana contra *S. aureus* (AL-Janabi, 2011) (Tabla 4), por lo que, es posible que estos compuestos, junto con otros que aún no han sido identificados, hayan estado presentes en el extracto metanólico de *K. daigremontiana* elicitado con metil jasmonato y contribuido en el efecto inhibitorio observado contra las cepas *S. aureus* sensible a antibiótico y SARM.

Para abordar este desafío, se podría llevar a cabo el fraccionamiento de los extractos metanólicos elicitados para aislar los grupos de metabolitos secundarios de mayor interés. Esas fracciones podrían ser obtenidas mediante técnicas como cristalización, destilación, sublimación y/o cromatografía, con el fin de obtener compuestos con características y propiedades similares ya sean de tipo fenólico o nitrogenado (Oliva-Flores, 2012). Posteriormente, se podrían realizar pruebas con esas fracciones en las cepas de *S. aureus* para evaluar su efecto antibacteriano.

Se observó que *S. aureus* sensible a antibióticos mostró mayor sensibilidad a los extractos del cultivo celular *in vitro* de *K. daigremontiana*, elicitado con metil jasmonato que la cepa SARM, especialmente con el tratamiento de 150 μ M, ya que fue el tratamiento de elicitación que presentó los porcentajes de inhibición más altos en todas las concentraciones de extracto probadas, y fue con las concentraciones de extracto de 4.0, 6.0 y 8.0 μ g/disco, donde se observaron los mayores porcentajes de inhibición en dicha cepa (29.86%, 28.31% y 31.75%, respectivamente) (Figura 15e), sugiriendo, que los compuestos que están presentes en dicho extracto metanólico elicitado tienen la capacidad de inhibir a esa cepa, sin embargo, para estas concentraciones de extracto empleadas no se observaron diferencias significativas. Mientras que para la cepa SARM, las diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de inhibición dependieron del tratamiento de elicitación y la concentración empleada en el disco, y aunque en lo general, los mejores resultados de

inhibición bacteriana se observaron con 100 y 150 μM de metil jasmonato (*Figura 16a-e, Tabla 8*), con un efecto muy similar en los valores del porcentaje de inhibición, y en donde solo para el tratamiento de 100 μM mostró diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de extracto probadas, el valor más alto observado del porcentaje de inhibición estuvo entre 14.34% – 18.01%, los resultados indicaron que la cepa SARM mostró menor sensibilidad por los extractos evaluados que la otra cepa evaluada. La cepa de SARM empleada en este trabajo (*ATCC® 43300*), contiene un cassette cromosómico estafilocócico SCC *mec* tipo II, gracias al cual, ha desarrollado mecanismos que le confieren resistencia, como la producción de la proteína PBP2a, que es una transpeptidasa que cataliza la formación de puentes cruzados en el peptidoglucano de la pared celular (*Castellano-González & Perozo-Mena, 2010*).

Asistida por el dominio transglicosilasa de la PBP2a nativa de *S. aureus*, toma el control de la función biosintética de la pared celular en presencia de antibióticos, cuando normalmente las PBPs son inactivadas al ligarse a estos compuestos (*Castellano-González & Perozo-Mena, 2010*). Este mecanismo podría encontrarse activo, lo que explicaría porqué la cepa de SARM fue menos sensible en comparación con la cepa *S. aureus* sensible a antibióticos (*ATCC® 25923*), a los compuestos presentes en los extractos del cultivo celular de *K. daigremontiana* elicitado con metil jasmonato.

En futuras investigaciones, para optimizar el efecto antibacteriano de los extractos de *K. daigremontiana*, también valdría la pena explorar el uso de diferentes elicitores y sus combinaciones en los cultivos celulares *in vitro* para evaluar su efecto en SARM y otras cepas de interés clínico. García-Pérez et al. (2021), reportaron que la biosíntesis de compuestos como los flavonoides estuvo fuertemente estimulada con el tratamiento combinado de metil jasmonato-ácido salicílico, seguido de ácido salicílico y metil jasmonato de forma individual, sugiriendo que, el efecto observado fue provocado por el efecto sinérgico entre ambos elicitores.

La combinación de elicitores es un enfoque sobresaliente que se ha aplicado con éxito a los CCVs porque promueve ventajas, como la aparición de efectos sinérgicos que mejoran la producción de metabolitos secundarios, y un sistema más comparable a las condiciones reales, en las que las plantas deben enfrentarse, como la defensa contra patógenos (*Shitan, 2016; García-Pérez et al. 2021*).

9. Conclusiones

- El extracto metanólico obtenido del cultivo celular de *K. daigremontiana* elicitado con MeJa [50, 100, 150 y 200 μM] causó porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano estadísticamente significativos contra las cepas *Staphylococcus aureus* sensible a antibioticos (ATCC® 25923) y SARM (ATCC® 43300) en comparación con el extracto control [0 μM], Además, el efecto dependió de la concentración empleada.
- El extracto metanólico obtenido del cultivo celular de *K. daigremontiana* elicitado con MeJa [150 μM] causó valores estadísticamente significativos de porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano contra la cepa *S. aureus* sensible a antibioticos, a las concentraciones de 4.0, 6.0 y 8.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$ (29.86%, 28.31% y 31.75%), en comparación con el extracto metanólico control MeJa [0 μM].
- El extracto metanólico obtenido del cultivo celular de *K. daigremontiana* elicitado con MeJa [100 y 150 μM] causó porcentajes de inhibición estadísticamente significativos contra la cepa SARM en comparación con el extracto control MeJa [0 μM] en 3 concentraciones empleadas: 0.5, 4.0, y 6.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$ para MeJa [100 μM], con porcentajes de inhibición de 15.67%, 18.01% y 14.34%, respectivamente; y en 4 concentraciones empleadas: 0.5, 2.0, 6.0 y 8.0 $\mu\text{g}/\text{disco}$ para MeJa [150 μM], con porcentajes de inhibición de 15.12%, 15.13%, 14.77% y 16.52%, respectivamente.
- La elicitación del cultivo celular de *K. daigremontiana* con MeJa incrementó el contenido total de fenoles en un extracto metanólico (Mejía-Sánchez, 2021), siendo dicho incremento correlacionado significativamente, de manera alta y positiva con el contenido total de flavonoides (0.7556) acorde a la correlación Pearson analizada con datos obtenidos previamente.

- Ambos contenidos totales de metabolitos secundarios fueron correlacionados, de manera baja y positiva (0.1167 y 0.1925, respectivamente) acorde a la correlación Pearson, con el porcentaje de inhibición del crecimiento sobre la cepa SARM. Para la cepa *S. aureus* sensible a antibioticos, únicamente el incremento del contenido total de flavonoides fue correlacionado, de manera baja y positiva (0.1456) acorde a la correlación Pearson, con el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano.

10. Perspectivas

- Probar otros tipos de elicitores y su combinación en CCVs en suspensión de *K. daigremontiana* para obtener mayores rendimientos de metabolitos secundarios.
- Realizar fraccionamientos en el extracto de *K. daigremontiana* elicitado y evaluar las fracciones contra las cepas de *S. aureus* sensible a antibioticos y la cepa SARM.
- Evaluar el efecto antibacteriano del extracto metanólico y sus fracciones del CCV de *K. daigremontiana* elicitado sobre otras cepas de interés clínico como las mencionadas en la lista de «bacterias patógenas prioritarias» resistentes a antibióticos de la OMS (2017).

11. Referencias bibliográficas

- Agüero-Hernández, A.L., Rosales-López, C., Herrera, C., Vargas-Picado, A., Muñoz, R. & Abdelnour-Esquivel, A. (2020). Hypoglycemic Effect of *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. Leaf Extract. *Pharmacognosy Journal*, 12(3), pp. 557-561.
- Ahloowalia B.S., Prakash, J., Savangikar, V.A. & Savangikar, C. (2003) Plant tissue culture. Low cost options for tissue culture technology in developing countries. In: Proceedings of a technical meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 26–30 August 2002 (pp. 3–10).
- Akhmad-Darmawan, M. & Fajriah. S. (2013) 3',4'-Dimethoxy Quercetin, a Flavonol Compound Isolated from *Kalanchoe pinnata*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (1), pp. 88-90.
- Akinsulire, O.R., Aibinu, I., Adenipekun, T., Adelowotan, T. & Odugbemi, T. (2007). In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 4 (3), pp. 338 – 344.
- Alós, J.I. (2015). Resistencia a antibióticos, Genes de resistencia a antibióticos, Extensión de la resistencia, Uso racional de antimicrobianos, Nuevos antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), pp. 692-699.
- AL-Janabi, AS. (2011). Potential activity of the purine compounds caffeine and aminophylline on bacteria. *Journal of Global Infectious Disease*, 3(2), pp. 133-137.
- Al-Snafi, A. E. (2013). The Chemical Constituents and Pharmacological Effects of *Bryophyllum calycinum*. A review. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 4(12), pp. 171-176.
- Andrade, J. L., de la Barrera, E., Reyes-García, C., Ricalde, M. F., Vargas-Soto, G., & Crevera, J. C. (2007). The acid metabolism crassulacean: diversity, environmental physiology and productivity. *Botanical Sciences*, (81), 37 - 50.

- Aoki, C., Hartati, Sri., Santi, M.R. & et al., (2014). Isolation and identification of substances with anti-hepatitis C virus activities from *Kalanchoe pinnata*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6, pp. 211-215.
- Assis-de-Andrade, E., Machinski, I., Terso-Ventura, A.C., Barr, S.A., Pereira, A.V., Beltrame, F.L., Strangman, W.K., Williamson, R.T. (2023). A Review of the Popular Uses, Anatomical, Chemical, and Biological Aspects of *Kalanchoe* (*Crassulaceae*): A Genus of Plants Known as "Miracle Leaf". Molecules, 28(5574), pp. 1-44.
- Ávalos-García, A & Pérez-Urria Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Serie Fisiología Vegetal, 2(3), pp.119-145.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2), pp. 71–79.
- Bergman, M.E.; Davis, B.; Phillips, M.A. (2019) Medically Useful Plant Terpenoids: Biosynthesis, Occurrence, and Mechanism of Action. Molecules, 24(1), pp. 1-23.
- Bogucka-Kocka, A., Zidorn, C., Kasprzycka, M., Szymczak, G. & Szewczyk, K. (2016). Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four *Kalanchoe* species. Saudi Journal of Biological Sciences, 25(4), pp. 622-630.
- Bolarinwa, I. F., Oke, M. O., Olaniyan, S. A., & Ajala, A. S. (2016). A Review of Cyanogenic Glycosides in Edible Plants. InTech, pp.79-91.
- Brown, M.H, & Skurray, R.A. (2001). Staphylococcal multidrug efflux protein QacA. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 3(2).
- Buchanan, B.B., Grissem, W., Jones, & R.L. (2015). "Natural Products". Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 2da edición, Ed. Wiley.
- Cárdenas-García, C. (2009). *Kalanchoe spp.*: una fuente natural de nuevas sustancias bioactivas puestas de manifiesto por la Etnomedicina. Encuentros en la Biología, 2(124), 31-32.
- Cardozo-Pinzón, J. S & Gómez-Barrera, M. (2018). Contribución al estudio fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Kalanchoe daigremontiana* Raym. -Hamet & H. Perrier. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas, 30, pp. 74-83.

- Casanova, J., dos-Santos-Nascimento, L.B., Marques-Casanova, L., Leal-Costa, M.V., Soares-Costa, S. & Schwartz-Tavares, E. (2020). Differential Distribution of Flavonoids and Phenolic Acids in Leaves of *Kalanchoe delagoensis* Ecklon & Zeyher (Crassulaceae). *Microscopy and Microanalysis*, pp. 1–8.
- Castellano-González, M.J., Perozo-Mena, A.J. (2010). Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*, 38(1), pp. 18-35.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2022). How Antimicrobial Resistance Happens. [En línea] Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about/how-resistance-happens.html> [Ultimo acceso: 24 de julio de 2023].
- Cervantes-García, E., García-González, R., Salazar-Schettino, P.M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), pp. 28-40.
- Chavdarova, K. (2019). El cultivo *in vitro* como fuente de producción de metabolitos secundarios. [Trabajo de Fin de Grado]. Universidad Complutense.
- Chernetsky, M., Woźniak, A., Skalska-Kamińska, A., Żuraw, B., Blicharska, E., Rejdak, R., Donica, H., Weryszko-Chmielewska, E. (2018). Structure of leaves and phenolic acids in *Kalanchoë daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier. *Acta Scientiarum. Polonorum Hortorum Cultus*, 17(14), pp. 137-155.
- Compean, K.L. & Ynalvez, R.A. (2014). Antimicrobial Activity of Plant Secondary Metabolites: A Review. *Research Journal of Medicinal Plant*, 8(5), pp. 204-213.
- Costa, S.S., Muzitano, M. F., Camargo, L.M.M & Coutinho, A. S. (2008). Therapeutic Potential of *Kalanchoe* Species: Flavonoids and other Secondary Metabolites. *Natural Product Communications*, 3(12), pp. 2151-2164.
- Cruz, E. A., Da-Silva, S. A. G., Muzitano, M. F., Silva, P. M. R., Costa, S. S., & Rossi-Bergmann, B. (2008). Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercitrin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. *International Immunopharmacology*, 8(12), pp. 1616–1621.

- Custódio, L., Charles, G., Magné, C., Barba-Espín, G., Piqueras, A., Hernández, J.A., Ben Hamed, K., Castañeda-Loaiza, V., Fernandes, E. & Rodrigues, M.J. (2023). Application of *In Vitro* Plant Tissue Culture Techniques to Halophyte Species: A Review. *Plants*, 12(126), pp. 1-34.
- De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J., & Alvarez-Parrilla, E. (2019). Chapter 12: Phenolic Compounds. *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*, 253–271.
- Dewick, P.M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd Edition. John Wiley & Sons.
- Discover Life Global Mapper [Último acceso: 25 de mayo de 2023]. https://www.discoverlife.org/mp/20m?&act=make_map
- Dong, Y., Yang, C., Zhong, W., Shu, Y., Zhang, Y. & Yang, D. (2022) Antibacterial effect and mechanism of anthocyanin from *Lycium ruthenicum* Murr. *Frontiers in Microbiology*, 13 (974602), pp. 01-13.
- El-Azaz-Ciudad, J., Ávila-Sáez, C., Cánovas-Ramos, F.M. & De-la-Torre-Fazio, F.N. (2016). La biosíntesis de fenilalanina durante el desarrollo de las plantas. Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga. [En línea]. Disponible en: <https://riuma.uma.es/xmlui/handle/10630/11002#:~:text=En%20las%20plantas%2C%20la%20biosíntesis,de%20la%20ruta%20del%20siquimato>. [Último acceso: 23 de Julio de 2023].
- Esparza-Araiza, M.J. (2020). Introducción al cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Fundación produce Sinaloa. [En línea]. Disponible en: <https://www.fps.org.mx/portal/index.php/agrobiotecnologia/2067-introduccion-al-cultivo-in-vitro-de-tejidos-vegetales>. [Último acceso: 27 de Julio de 2023].
- Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A. & García-Lara, S. (2018). *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248(1), pp.1–18.
- Fagundes-Rosales, P., Bordin, G., Escalona, A. & Moura, S. (2020). Indole alkaloids: 2012 until now, highlighting the new chemical structures and biological activities. *Fitoterapia*, 143, pp. 104558.

- Falcone-Ferreya, M.L., Rius, S.P. & Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3(1), pp. 1-15.
- Fehér, A. (2019) Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology?. *Frontiers in Plant Science*, 10(536), pp. 1-11.
- Fernandes, J.M., Cunha, L.M., Pereira-Azevedo, E., Lourenço E.M.G., Fernandes-Pedrosa, M.F. & Zucolotto, S.M. (2019). *Kalanchoe laciniata* and *Bryophyllum pinnatum*: an updated review about ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(1), pp. 529–558.
- García-Pérez, P., Miras-Moreno, B., Lucini, L. & Gallego, P.P. (2021). The metabolomics reveals intraspecies variability of bioactive compounds in elicited suspension cell cultures of three *Bryophyllum* species. *Industrial Crops & Products*, 163(1), pp.1-15.
- Godoy-Hernández, G. & Vázquez-Flota, F.A. (2006). Growth Measurements: Estimation of Cell Division and Cell Expansion. En: *Plant Cell Culture Protocols*. Segunda Edición. pp-51-58.
- Golubov-Figueroa, J.K. (2012). Especies ornamentales invasoras: el caso de *Kalanchoe delagoensis*. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. GN047. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México D. F.
- Gomes, D.C.O., Muzitano, M.F., Costa, S.S., & Rossi-Bergmann, B. (2009). Effectiveness of the immunomodulatory extract of *Kalanchoe pinnata* against murine visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 137(04), pp. 613-618.
- Góraj-Koniarska, J. et.al. (2014). Elicitation of anthocyanin production in roots of *Kalanchoe blossfeldiana* by methyl jasmonate. *Acta Biológica Cracoviensia Series Botanica*, 57(1), pp. 41–148.
- Guillot-Ortiz, D., López-Pujol, J., Laguna-Lumbreras, E. & Puche, C. (2015). *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet & H. Perrier "Iberian Coast". *Bouteloua*, 21(1), pp. 35-48.
- Halkier, B. A. & Gershenzon, J. (2006). Biology and Biochemistry of Glucosinolates. *The Annual Review of Plant Biology*, 57(1) pp. 303–33.

- Heleno, S.A., Martins, A., Queiroz, J.R.P & Ferreira, C.F.R. (2015). Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. *Food Chemistry*, 173(15), pp. 501-513.
- Hermawan, W., Maharani, R., Fajriah, S., Hardiawan, R. & Supratman, U. (2010). Insecticidal Bufadienolides from the Leaves of *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae). *Jurnal ILMU DASAR*, 11(2), pp. 115-119.
- Hernández, A.D. & Díaz, H.B. (2019). Inducción in vitro de callo embriogénico a partir del cultivo de anteras en “papa amarilla” *Solanum goniocalyx* Juz. & Bukasov (Solanaceae). *Arnaldoa*, 26(1), pp. 277-286.
- Hsieh, YJ., Yang, MY., Leu, YL. et al. (2012). *Kalanchoe tubiflora* extract inhibits cell proliferation by affecting the mitotic apparatus. *BMC Complement Alternative Medicine*, 12(149), pp. 1-10.
- Huang, D-W & Shen, S-C. (2012). Caffeic acid and cinnamic acid ameliorate glucose metabolism via modulating glycogenesis and gluconeogenesis in insulin-resistant mouse hepatocytes. *Journal of Functional Foods*, 4(1), pp. 358-366.
- Huang, H-C., Huang, G-J. Liaw, C-C., Yang, C-S., Yang, C-P. Kuo, C-L., Tseng, Y-H., Wang, S-Y., Chang, W-T. & Kuo, Y-H. (2013). A new megastigmane from *Kalanchoe tubiflora* (Harvey) Hamet. *Phytochemistry Letters*, 6(1), pp. 379–382.
- I.M., A., & M., A. (2012). *Plant Tissue Culture Media*. InTech. pp. 29-40.
- Jamwal, K., Bhattacharya, S. & Puri, S. (2018). Plant growth regulator mediated consequences of secondary metabolites in medicinal plants. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 9(1), pp. 26-38.
- Jiménez- Silva, A.A. (2017). *Medicina tradicional*. Boletín CONAMED-OPS. Disponible en: https://www.academia.edu/40757285/Medicina_tradicional_mexicana. [Último acceso: 23 de Julio de 2023].
- Kabera, J.N., Semana, E., Mussa, A.R. & He, X. (2014). Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(7), pp. 377-392.

- Keita, K., Darkoh, C. & Okafor, F. (2022). Secondary plant metabolites as potent drug candidates against antimicrobial-resistant pathogens. *Springer Nature Applied Sciences*, 4(209).
- Kolodziejczyk-Czepas, J., Nowak, P., Wachowicz, B., Piechocka, J., Głowacki, R., Moniuszko-Szajwaj, B., & Stochmal, A. (2016). Antioxidant efficacy of *Kalanchoe daigremontiana* bufadienolide-rich fraction in blood plasma in vitro. *Pharmaceutical Biology*, 54(12), pp. 3182–3188.
- Kolodziejczyk-Czepas, J. & Stochmal, A. (2017). Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. *Phytochemistry Reviews*, 16, pp. 1155–1171.
- Lee, A.S., de-Lencastre, H., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A. & Harbarth, S. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Review Disease Primers*, 4(18033), pp. 1-23.
- Llamas-García, A. de J. (2018). Identificación de metabolitos secundarios de plantas de Baja California Sur con actividad antibacteriana en cepas de interés clínico, y su potencial uso farmacéutico. [Tesis de Maestría]. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, Baja California Sur, México.
- Martin, D.A. (2018). Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), pp. 81-104.
- Manan, M., Hussain, L., Ijaz, H. & Imran-Qadir, M. (2016). Antimicrobial activity of *Kalanchoe laciniata*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(4), pp. 1321-1324.
- Mejía-Sánchez, D. (2021). Efecto del metil jasmonato sobre la producción de compuestos fenólicos de un cultivo celular de *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet y H. Perrier. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Meng, S., Cao, J., Feng, Q., Peng, J., & Hu, Y. (2013). Roles of Chlorogenic Acid on Regulating Glucose and Lipids Metabolism: A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, pp. 1–11.

- Mikłasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R., Idzik, D., & Wąsik, T. (2018). Phenolic Compounds Diminish Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus* Clinical Strains. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), pp.1-18.
- Milad, R., El-Ahmady, S. & Nasser-Singab, A. (2014). Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): A Review of Its Ethnomedicinal, Botanical, Chemical and Pharmacological Properties. *European Journal of Medicinal Plants*, 4(1), pp.86-104.
- Morales-Rubio, M.E., Espinosa-Leal, C., & Garza-Padrón, R.A. (2016). Cultivo de tejidos vegetales y su aplicación en productos naturales. En RivasMorales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience, pp. 351-410.
- Motolinía-Alcántara, E.A., Castillo-Araiza, C.O., Rodríguez-Monroy, M., Román-Guerrero, A. & Cruz-Sosa, F. (2021). Engineering Considerations to Produce Bioactive Compounds from Plant Cell Suspension Culture in Bioreactors. *Plants*, 10(2762), pp. 1-28.
- Murphy, J.& Walshe, R. (2011). Modeling Antibiotic Resistance in Bacterial Colonies Using Agent-Based Approach. *Understanding the Dynamics of Biological Systems: Lessons Learned from Integrative Systems Biology*.
- Nascimento, L.B.S., Leal-Costa, M.V., Coutinho, M.A.S., Moreira, N. dos S., Lage, C.L.S., Barbi, N. dos S. & Tavares, E.S. (2012). Increased Antioxidant Activity and Changes in Phenolic Profile of *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae) Specimens Grown Under Supplemental Blue Light. *Photochemistry and Photobiology*, 89(2), pp. 391–399.
- Nielsen, A. H., Olsen, C.E. & Møller, B.L. (2005). Flavonoids in flowers of 16 *Kalanchoë blossfeldiana* varieties. *Phytochemistry*, 66(24), p. 2829–2835.
- Nor-Habibah, M.R (2012). Determination of Quercetin in Local *Kalanchoe Pinnata* Extract Using High Performance Liquid Chromatography. *International Annual Symposium on Sustainability Science and Management*. Terengganu, Malaysia.
- Oliva-Flores, I.C. (2012). Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fitoquímico de extractos hexánicos, de acetato de etilo y clorofórmicos de laurel: *Litsea glaucescens* HBK. y *Litsea guatemalensis* Mez. [Tesis de Grado]. Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Organización Mundial de la Salud. (2017). La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. [En línea] Disponible en: <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> [Último acceso: 27 de mayo de 2023].
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Resistencia a los antimicrobianos. [En línea] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> [Último acceso: 27 de mayo de 2023].
- Pasachova-Garzón, J., Ramírez-Martínez, S., Muñoz-Molina, L. (2019). *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. NOVA, 17(32), pp. 25-38.
- Patil, V.M. & Masand, N. (2018). Anticancer Potential of Flavonoids: Chemistry, Biological Activities, and Future Perspectives. *Studies in Natural Products Chemistry*, 59(1), pp. 401-430.
- Pattewar, S.V. (2012). *Kalanchoe pinnata*: Phytochemical and pharmacological profile. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(4), pp. 993-1000.
- Peñarrieta, J.M., Tejada, L., Mollinedo, P., Vila, J.L. & Bravo, J.A. (2014). Phenolic Compounds in Food. *Bolivian Journal of Chemistry*, 31(2), pp. 68-81.
- Pérez-Alonso, N. & Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*. 11(4), pp. 195-211.
- Pérez-Nájera V.C., Lugo-Cervantes E.C., Gutiérrez-Lomelí M. & Del-Toro-Sánchez C.L. (2013). Extracción de compuestos fenólicos de la cáscara de lima (*Citrus limetta* Risso) y determinación de su actividad antioxidante. *Biotecnia*, 15(3), pp.18-22.
- Pérez-Sabino, J.F., Farfán-Barrera, C., Oliva-Hernández, B.E., Jayes Reyes, P.G., Mérida-Reyes, M.S., Muñoz-Wug, M. (2012). Determinación de los flavonoides en seis plantas del género *Lippia* (Verbenaceae) nativas de Guatemala como posibles fuentes de nutraceuticos. [Informe Final, Proyecto], Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Puertas-Mejía, M.A., Tobón-Gallego, J. & Arango, V. (2014). *Kalanchoe daigremontiana* Raym.-Hamet. & H. y su potencial uso como fuente de antioxidantes y colorantes naturales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 19(1), pp. 61-68.
- Ramírez Escobedo, M. E., Barajas Bermúdez, L., Pérez Berumen, C., Sáenz Galindo, A., & Silva Belmares, S. Y. (2012). Síntesis y actividad biológica de chalconas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 43(4), pp. 7-14.
- Richwagen, N., Lyles, J.T., Dale, B.L.F. & Quave, C.L. (2019). Antibacterial Activity of *Kalanchoe mortagei* and *K. fedtschenkoi* against ESKAPE Pathogens. *Frontiers in Pharmacology*. 10(67), pp. 1-13.
- Roberts, M. F., Strack, D., & Wink, M. (2018). Biosynthesis of Alkaloids and Betalains. *Annual Plant Reviews*. 40(1), 20–91.
- Saad, B., Zaid, H., Shanak, S., & Kadan, S. et.al. (2017). “Herbal-Derived Anti-obesity Compounds and Their Action Mechanisms” en *Anti-diabetes and Anti-obesity Medicinal Plants and Phytochemicals*. Springer.
- Sajedi, N., Homayoun, M., Mohammadi, F. & Soleimani, M. (2020). Myricetin Exerts its Apoptotic Effects on MCF-7 Breast Cancer Cells through Evoking the BRCA1-GADD45 Pathway. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 21(12), pp. 3461-3468.
- Sánchez-Calvo, L. & Alvarenga-Venutolo, S. (2014). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha*, 28(1), pp. 105-120.
- Sánchez-Pujante, P.J., Borja-Martínez, M., Pedreño, M.A. & Almagro, L. (2017). Biosynthesis and bioactivity of glucosinolates and their production in plant *in vitro* cultures, *Planta*, 246(1), pp. 19-32.
- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L. & Wilkens, M. (2017). Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 12(2).

- Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H. & Rocha-Sosa, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3), pp. 355-363.
- Shamsudin, N.F., Ahmed, Q.U., Mahmood, S., Ali Shah, S.A., Khatib, A., Mukhtar, S., Alsharif, M.A., Parveen, H., Zakaria, Z.A. (2022). Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study: A Comparative Interpretation. *Molecules*, (27), 1149, pp. 2-43.
- Shi, G.-J., Li, Y., Cao, Q.-H., Wu, H.-X., Tang, X.-Y., Gao, X.-H., & Yang, Y. (2019). In vitro and in vivo evidence that quercetin protects against diabetes and its complications: A systematic review of the literature. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 109, pp.1085–1099.
- Shimizu, M., Mihara, T., Ohara, J., Inoue, K., Kinoshita, M. & Sawa, T. (2022). Relationship between mortality and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *PLoS ONE*, 17(7), pp. 1-13.
- Shitan, N. (2016). Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(7), pp. 1283-93.
- Siddiqui, A.H., Koirala, J. (2023). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. [en línea]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482221/> [Ultimo acceso: 24 de Julio de 2023].
- Singab, A., El-Ahmady, S., Milad, R. & Saad, S. (2012). *Kalanchoe thrysiflora* Harv. and *Kalanchoe marmorata* Baker; DNA Profiling, biological guided fractionation of different extracts; isolation and identification of cytotoxic compounds. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(8), pp. 215-220.
- Stefanowicz-Hajduk, J., Hering, A., Gucwa, M., Hałasa, R., Soluch, A., Kowalczyk, M., Stochmal, A. & Ochocka, R. (2020). Biological activities of leaf extracts from selected *Kalanchoe* species and their relationship with bufadienolides content. *Pharmaceutical Biology*, 58(1), pp. 732-740.
- Stringlis, I. A., de Jonge, R., & Pieterse, C. M. J. (2019). The Age of Coumarins in Plant–Microbe Interactions. *Plant and Cell Physiology*, 60(7), pp. 1405–1419.

- Supratman, U., Fujita, T., Akiyama, K., Hayashi, H., Murakami, A., Sakai, H., Koshimizu, K. & Ohigashi, H. (2001). Antitumor Promoting Activity of Bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* x *tubiflora*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(4), pp. 947-949.
- Teixeira-Ferreira R., Soares-Coutinho, M.A., do-Carmo-Malvar, D., Alves-Costa, E., Ferreira-Florentino, I., Soares-Costa, S. & Argollo-Vanderlinde, F. (2014). Mechanisms Underlying the Antinociceptive, Antiedematogenic, and Anti-Inflammatory Activity of the Main Flavonoid from *Kalanchoe pinnata*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, pp. 1-8.
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., & Puri, S. (2018). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12(2019), pp. 1-12.
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S. S. S., & Vijayakumar, R. (2018). An Introductory Chapter: Secondary Metabolites. *InTech*. pp.7-21.
- Turner, N. A., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P. P., Carugati, M. & Fowler, V. G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), pp. 203-218.
- Urias-Orona, V., Heredia, J.B., Muy-Rangel, D. & Niño-Medina, G. (2016). Ácidos fenólicos con actividad antioxidante en salvado de maíz y salvado de trigo. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 3(7), pp. 43-50.
- Valitova, J. N., Sulkarnayeva, A. G., & Minibayeva, F. V. (2016). Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions. *Biochemistry (Moscow)*, 81(8), pp. 819–834.
- Vázquez-Rosas, G.J., Mérida-Vieyra, J., Aparicio-Ozores, G., Lara-Hernández, A., De Colsa, A. & Aquino-Andrade, A. (2021). Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Obtained from Blood Cultures of Paediatric Patients Treated in a Tertiary Care Hospital in Mexico. *Infection and Drug Resistance*, 14(1), pp. 1545–1556.
- Ventola, C.L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277-283.

- Verma, V., Kumar, S.R., Rani K., Sehgal, N. & Prakash, O. (2015). Compound Profiling in Methanol Extract of *Kalanchoe blossfeldiana* (Flaming katy) Leaves Through GC-MS Analysis and Evaluation of its Bioactive Properties. *Global Journal of Advanced Biological Sciences*, 1, pp. 38-49.
- Villavicencio-Contreras, I.L. (2015). Regulación de la biosíntesis de isoprenoides en *Arabidopsis thaliana*: Caracterización del mutante rif35. [Tesis doctoral]. Universitat de Barcelona.
- Wan, Y.; Wang, X.; Yang, L.; Li, Q.; Zheng, X.; Bai, T.; Wang, X. (2023). Antibacterial Activity of Juglone Revealed in a Wound Model of *Staphylococcus aureus* Infection. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (3931), pp. 2-19.
- Wang, J. W., & Wu, J. Y. (2013). Effective Elicitors and Process Strategies for Enhancement of Secondary Metabolite Production in Hairy Root Cultures. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, pp. 55–89.
- Wang, S., Yao, J., Zhou, B., Yang, J., Chaudry, M. T., Wang, M., & Yin, W. (2018). Bacteriostatic Effect of Quercetin as an Antibiotic Alternative *In Vivo* and Its Antibacterial Mechanism *In Vitro*. *Journal of Food Protection*, 81(1), pp. 68–78.
- Wilson, S. A. & Roberts, S. C. (2011). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant Biotechnology Journal*, 10(3), pp. 249–268.
- Xu, X.Y., Wang, D.Y., Li, Y.P. Deyrup, S.T., Zhang, H.J. (2022). Plant-derived lignans as potential antiviral agents: a systematic review. *Phytochemistry Reviews*, 21, pp. 239–289.
- Xye, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X. & Ren, L. (2015). Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), pp. 132–149.