

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

Estudio químico y evaluación de la actividad
antimicrobiana de *Mimosa albida* (vergonzosa).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. Juan Pablo Díaz Abad

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Laura Patricia Alvarez Berber

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2020



El presente proyecto fue desarrollado en el laboratorio 321 de Biomoléculas en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM) bajo la dirección de la Dra. Laura Patricia Alvarez Berber. Mediante la beca otorgada por el CONACYT para realizar los estudios de maestría durante el periodo Septiembre 2018 – Agosto 2020 con número de apoyo **713690**.

Los estudios analíticos fueron realizados en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM).



JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

Presidente: Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña (CIQ-UAEM)

Secretario: Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama (CIQ-UAEM)

Vocal: Dr. Manasés González Cortázar (CIBIS-IMSS)

Suplente: Dra. Laura Patricia Alvarez Berber (CIQ-UAEM)

Suplente: M. en C. Silvia Marquina Bahena (CIQ-UAEM)

Candidato al grado

Q.F.B. Juan Pablo Díaz Abad

Director de tesis

Dra. Laura Patricia Alvarez Berber

DR. VICTOR BARBA LÓPEZ
COORDINADOR DEL POSGRADO EN CIENCIAS
PRESENTE

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada “**Estudio químico y evaluación de la actividad antimicrobiana de *Mimosa albida* (vergonzosa)**” que presenta el alumno **Juan Pablo Díaz Abad (10019226)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

| NOMBRE | DICTAMEN | FIRMA |
|---|----------|-------|
| Dr. Hugo Albeiro Saldarriaga Noreña CIQ-UAEM | APROBADO | |
| Dra. Angélica Berenice Aguilar Guadarrama CIQ-UAEM | APROBADO | |
| Dr. Manasés González Cortázar CIBIS-IMSS | APROBADO | |
| Dra. Laura Patricia Alvarez Berber CIQ-UAEM | APROBADO | |
| M.C. Silvia Marquina Bahena CIQ-UAEM | APROBADO | |



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha:2020-06-16 15:21:34 | Firmante

adcDuWq/FIwsMsJgji9DA4HtgbcVNZQGYQOXN8/qn032Yi/ds2xaQiDB7+u+WY55jD1+5XR5Py1vBPZXIK0aKDF+W766mdXrkuRALfjsG0DqVSYHlgphmRKfT7Lwqqn5nCMfBzSaUXhj/3YMXTEvC6NxASxvleLPu0NzrgFJ+THo48jXQ6CjUDD2ENpFTjsMji/KfUKjyJcJ4s6XbrPc6PnobNgt83oZVYY84Qa/27M+XugjC1WIKMDxJE0vgbrQHnSVqk15L+eVidUf3GR9tsUPjfv+eQrTwRpeFGNptCwZcBsgF793PuYSo2297Ou7Ve998+rLrHL0Df0xA==

HUGO ALBEIRO SALDARRIAGA NOREÑA | Fecha:2020-06-16 15:24:44 | Firmante

PCHpT+6Ka3PaeTaDAbzM58fvdCQPOeGANxSg+IOixLaK7RPOsnX7KZsWb7kPtwc+tgA52NcvXd7QwofoAZe6PjhPjD6IUyCkms9RB9QCTdGCZF0KRT7z60zxfEXEiObdY0bnZsxEPwMoCgSSkjbH8iKCeOEhCE5rknPogrBOYAtqxKwaoEkuQM9C0M/67Wli5DDt0k7hOLL+EJlhq5hYNe4DT5uMFgx8PKIIQCKhIM/a8AESF77CnC7lfx4OJQ1mOUqCGxwntAEPku8CjOe+YtWcofbLNYRYGjUMCA+HJeCAhiB+DamiMcVL6hKSG3Fowl9q54wOA63+/MVyfxQ==

ANGELICA BERENICE AGUILAR GUADARRAMA | Fecha:2020-06-16 20:56:57 | Firmante

FwpfhNBQeci0hLs7y17wnXtVPth2KC/FWqDh3i7/IIICCDabEHapcC4TJhsDQoA5xUaAuiHEhjrJEL2CCMckLsmvKp8YWX7WbeKnCsuZkHjiNiXdrwuGmZc0Fmbt1VyE9++++UaAAOE5cgg7mmhZKahAqhuf06wQmo/VSE5uksb25xXJjA/32JZVAFdIFkUYZviroK57n3FpWPHhk2wMZX3fdoUfC1HjTlccF+/dOg3BL/C1Rgcb8zh9mmU4DuVjwU9+8kBi3oDKqPzf nFPUONs1YEUm28h6JlgeOeZPeMnUil/HeUVVHGCGyFM+WabNg9Pq7epQ4BDObbJ4hQOcwA==

SILVIA MARQUINA BAHENA | Fecha:2020-06-17 09:06:17 | Firmante

LEFehWVvBivXFXWvGVL4uyt1HR0LCOYtdahjCIUZ7OwCKltgU9p7jnALN5x16Mb0It2NTIvZpcjPQF30Guw8wi3NIWgqHIIQ5xgi/fri4yxV+5ic0vwKfgVI/szIKYfsKOMifdmjVrypvVmWlJvVmq63GIJ3Dd1fitpUpCsQ/widtp+khhdPtaxIUwxJmexYM9teYGxuWT0Kf96Gs8aOYI+9TvxPHxPwuVWdTEo8HpDAcUizJaXCyqf7/iC9ccUivpV4k2b4By6cqARNBc89lGCLV31CJPLOpLvCOFqQaxu5t0EASbDDzZSczuOdiCUCPEOk0AU4p/tx9VSug==

MANASÉS GONZÁLEZ CORTÁZAR | Fecha:2020-06-17 11:56:06 | Firmante

MR6LRljAg4V1RoTDtdWeaf8wktFEky8fyBi1cyWYHyGe29xHWdSNWYQFAefRoY0+cb/Nutz+ryqQLSpXoljwkUpal0XznMxyNJJPF9wNAX6Eu9i8uCx9JV0BXmbY/VUFE+MNypVLr0b9c22gpfxTgkyTLMuL08KbBDXGjRguTos79xHppSZP+ruG3HHhKD+FcdTGS3cDmj9cDU65M3DjkLqd41UEaLLRguOzGNQC1Z9amxdyO1j8qJIDUnr1f3Z25P79xl6rFpRjC9QLOACC9MttKozLMoLm1PKFEZPRakU89roNHjY4paeRmO8pD/kXise+P9w0xUCiXnk2RA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



F0Ewqç

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/lvUewCbnQ07hWVvj3jVjQrh7BiVhPTfa>



Resumen

Las infecciones urinarias afectan a hombres y mujeres de todas las edades por lo que este tipo de enfermedades son causas comunes de morbilidad y se asocian con una tasa de morbilidad significativa. Cuando la infección se disemina a las vías urinarias altas esta llega a los riñones causando su inflamación; a esta enfermedad se le denomina pielonefritis. Aunque ya se cuentan con tratamientos disponibles para tratar estas infecciones, muchos microorganismos empiezan a presentar resistencias a los fármacos de elección como lo es *Pseudomonas aeruginosa*, por lo que se requieren tratamientos más efectivos contra estas infecciones. Esto ha llevado a un interés renovado en la búsqueda de fármacos provenientes de productos naturales de plantas. Estos metabolitos pueden actuar como potenciales agentes antimicrobianos.

Dentro de este contexto, este trabajo tuvo el objetivo de encontrar los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana presentes en la planta *Mimosa albida*.

El estudio químico de la planta se llevó a cabo mediante el uso de técnicas cromatográficas convencionales. Para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos se realizó la prueba de Kirby-Bauer en la unidad especializada de Innovación en I+D+i en calidad de Alimentos y Productos Naturales de la Universidad Autónoma de Nayarit. Finalmente, la caracterización de los metabolitos presentes en extracto y fracciones se utilizaron técnicas analíticas como Resonancia Magnética Nuclear de una y dos dimensiones, así como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Del estudio fitoquímico, el fraccionamiento del extracto de hojas obtenido en acetato de etilo (MaHA) dio lugar a una fracción enriquecida con un compuesto, que al ser purificada y analizada permitió establecer la presencia de un compuesto de tipo ferulato que se identificó como ferulato de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecenilo (**50**) utilizando las técnicas de CG-EM y RMN. Por otro lado, la fracción con clave MaHHA-3-5 que pertenece al extracto hidroalcohólico de hojas de *M. albida*, se aisló un polvo amarillento el cual fue identificado como Quercetin 3-O- β -D-ramnósido (**9**). Este compuesto se reporta por primera vez para la especie de la planta en estudio. Los resultados de evaluación antimicrobiana indicaron que los extractos con claves MaTA y MaTHA presentaron actividad moderada contra *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1026 (CMI=12.5 mg/mL). Este trabajo ayuda a validar el uso etnomédico de esta planta para tratar las infecciones renales (pielonefritis).

Índice

| | |
|--|----|
| Índice de Abreviaturas..... | vi |
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Antecedentes | 4 |
| 2.1. Antimicrobianos..... | 4 |
| 2.1.1. Clasificación de los antibióticos | 4 |
| 2.1.2. Antibióticos más utilizados para el tratamiento de infecciones de vías urinarias | 5 |
| 2.2. Resistencia antimicrobiana en infecciones del tracto urinario..... | 6 |
| 2.3. Plantas medicinales utilizadas como antimicrobianos..... | 7 |
| 2.4. Género <i>Mimosa</i> | 8 |
| 2.5. Estudios fitoquímicos y farmacológicos del género <i>Mimosa</i> | 8 |
| 2.6. Distribución en México y el Estado de Morelos..... | 15 |
| 2.7. <i>Mimosa albida</i> Hurnb. & Bonpl. ex Willd. | 15 |
| 3. Justificación..... | 17 |
| 4. Hipótesis..... | 18 |
| 5. Objetivos | 19 |
| 5.1. General..... | 19 |
| 5.2. Específicos | 19 |
| 6. Parte experimental..... | 20 |
| 6.1. Obtención de material vegetal. | 20 |
| 6.2. Análisis cromatográfico | 20 |
| 6.3. Análisis espectroscópicos | 20 |
| 6.3.1. Resonancia magnética nuclear..... | 20 |
| 6.4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). | 21 |
| 6.5. Estudio fitoquímico de <i>Mimosa albida</i> | 21 |
| 6.5.1. Obtención de extractos crudos..... | 21 |
| 6.5.2. Fraccionamiento primario del extracto del extracto de acetato de etilo obtenido de hojas de <i>M. albida</i> (MaHA) (Percolación)..... | 23 |
| 6.5.2.1. Purificación de la fracción MaHA-4. | 24 |
| 6.5.2.2. Reacción de transesterificación de la fracción MaHA-4-8. | 25 |
| 6.5.2.4. Purificación de la fracción MaHA-4-11..... | 26 |
| 6.5.3. Fraccionamiento primario del extracto MaHHA..... | 27 |

| | | |
|----------|--|----|
| 6.5.3.1. | Fraccionamiento secundario de la fracción MaHHA-3..... | 27 |
| 6.5.3.2. | Aislamiento e identificación de Quercetin 3-O-β-D-ramnósido (9). | 28 |
| 6.6. | Evaluación de la actividad antimicrobiana | 28 |
| 7. | Resultados y discusión | 31 |
| 7.1. | Selección de <i>Mimosa albida</i> para su estudio. | 31 |
| 7.2. | Estudio fitoquímico de <i>Mimosa albida</i> | 31 |
| 7.2.1. | Fraccionamiento cromatográfico de MaHA. | 31 |
| 7.2.1.1. | Análisis por CG-EM de la fracción MaHA-1. | 31 |
| 7.2.1.2. | Fraccionamiento cromatográfico y análisis de MaHA-4. | 35 |
| 7.2.1.3. | Análisis por RMN y CG-EM de la fracción MaHA-4-11C. | 41 |
| 7.2.2. | Fraccionamiento cromatográfico de MaHHA | 43 |
| 7.2.2.1. | Elucidación estructural de Quercetin 3-O-β-D-ramnósido. | 43 |
| 7.3. | Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos crudos | 47 |
| 8. | Conclusiones | 50 |
| 9. | Perspectivas | 51 |
| 10. | Referencias bibliográficas | 52 |
| 11. | Anexos | 57 |

Índice de cuadros

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Compuestos selectos aislados de especies el género <i>Mimosa</i> | 9 |
| Cuadro 2. Compuestos encontrados por CG-EM de la fracción MaHA-1..... | 34 |
| Cuadro 3. Compuestos encontrados por CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A1. | 39 |
| Cuadro 4. Compuestos encontrados por CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A3. | 40 |
| Cuadro 5. Compuestos encontrados por CG-EM de MaHA-4-11C..... | 42 |
| Cuadro 6. Asignaciones de Quercetin 3-O- β -D-ramnósido (9)...... | 44 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Extractos obtenidos de la planta silvestre <i>Mimosa albida</i> | 22 |
| Tabla 2. Fraccionamiento primario de MaHA (Percolación). | 23 |
| Tabla 3. Fraccionamiento secundario de MaHA-4..... | 24 |
| Tabla 4. Fraccionamiento terciario de la fracción MaHA-4-11. | 26 |
| Tabla 5. Fraccionamiento primario de MaHHA..... | 27 |
| Tabla 6. Fraccionamiento secundario de MaHHA-3..... | 27 |
| Tabla 7. Porcentaje de efecto inhibitorio del extracto MaTH contra <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1026. | 47 |
| Tabla 8. Porcentaje de efecto inhibitorio del extracto MaTA contra <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1026. | 47 |
| Tabla 9. Porcentaje de efecto inhibitorio del extracto MaTHA contra <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1026..... | 48 |
| Tabla 10. Criterios interpretativos de medidas de halos de inhibición contra <i>S. aureus</i> | 48 |

Índice de espectros

| | |
|--|----|
| Espectro 1. Comparación del espectro de la muestra (B) con el espectro de la base de datos NIST (A)..... | 33 |
| Espectro 2. Experimento ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) de MaHA-4-8..... | 36 |
| Espectro 3. Experimento ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) de MaHA-4-8..... | 37 |
| Espectro 4. Experimento de ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) de la purificación de MaHA-4-8A1. | 38 |
| Espectro 5. Experimento de ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) de la purificación de MaHA-4-8A3. | 38 |
| Espectro 6. Experimento de ^1H -RMN (500 MHz, CDCl_3) de (50). | 59 |
| Espectro 7. Experimento de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de (50). | 59 |
| Espectro 8. Experimento de COSY (500 MHz, CDCl_3) de (50). | 60 |
| Espectro 9. Experimento de HSQC de (50). | 60 |
| Espectro 10. Experimento de HMBC de (50). | 61 |
| Espectro 11. Experimento ^1H -RMN (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CH}_3\text{OD}$) de (9). | 62 |
| Espectro 12. Experimento DEPTQ (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CH}_3\text{OD}$) de (9). | 62 |
| Espectro 13. Experimento COSY (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CH}_3\text{OD}$) de (9). | 63 |
| Espectro 14. Experimento HSQC de (9). | 63 |
| Espectro 15. Experimento HMBC de (9). | 64 |

Índice de anexos

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Cromatograma de CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A1. | 57 |
| Anexo 2. Cromatograma de CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A3. | 57 |
| Anexo 3. Cromatograma de CG-EM de MaHA-4-11C. | 58 |

Índice de esquemas

| | |
|--|----|
| Esquema 1. Reacción propuesta para la transesterificación del ferulato de alquilo (49).... | 25 |
| Esquema 2. Compuestos identificados mediante CG-EM de la fracción MaHA-1. | 34 |
| Esquema 3. Compuestos identificados mediante CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A1. | 40 |
| Esquema 4. Compuestos identificados mediante CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A3. | 40 |
| Esquema 6. Ferulato de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecenilo (50). | 42 |
| Esquema 7. Compuestos identificados mediante CG-EM de MaHA-4-11C. | 42 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Extractos de <i>Mimosa albida</i> . a) Placa cromatográfica revelada en lampara de UV a $\lambda=254$ nm. b) Placa cromatográfica revelada con un reactivo cromogénico (sulfato sérico amoniacal: $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] al 1% en H_2SO_4 2N..... | 22 |
| Figura 2. Desarrollo de la prueba de Kirby-Buaer. | 30 |
| Figura 3. Extracto de MaTH contra <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1026..... | 48 |
| Figura 4. Extracto de MaTA contra <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1026..... | 48 |
| Figura 5. Extracto de MaTHA contra <i>S. aureus</i> ATCC BAA 1026..... | 48 |

Índice de Abreviaturas

| | |
|---------------------|--|
| °C | Grados centígrados |
| ¹³ C-RMN | Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13 |
| ¹ H-RMN | Resonancia Magnética Nuclear de protón |
| AcOEt | Acetato de etilo |
| ATTC | American Type Culture Collection, en inglés |
| C.C.F. | Cromatografía en capa fina |
| CC | Cromatografía en columna |
| CD ₃ OD | Metanol deuterado |
| CDCl ₃ | Cloroformo deuterado |
| CG-EM | Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas |
| CMI | Concentración mínima inhibitoria |
| COSY | Espectroscopía de correlación homonuclear de protón |
| DCM | Diclorometano |
| DEPT | Mejora de la distorsión por transferencia de la polarización |
| DMSO-d ₆ | Dimetilsulfóxido deuterado |
| eV | Electronvoltio |
| FN | Fase normal |
| g | Gramos |
| H ₂ O | Agua |
| HMBC | Correlación heteronuclear de enlace múltiple |
| hrs. | Horas |
| HSQC | Correlación heteronuclear a un solo enlace |
| Hx | Hexano |
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento |
| L | Litro (s) |
| m | Metro (s) |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligramos |
| MHz | Megahertz |
| mL | Mililitro (s) |
| mm | Milímetros |
| ppm | Partes por millón |
| UV | Ultravioleta |
| δ | Desplazamiento químico |

1. Introducción

Las infecciones urinarias (IU) son frecuentes, afectan a hombres y mujeres de todas las edades y sus presentaciones y secuelas son muy variables. Estas enfermedades son causas comunes de morbilidad y se pueden asociar con una tasa de mortalidad significativa. De manera normal, las vías urinarias están libres de bacterias, pero si estas ascienden desde el reservorio rectal pueden ocasionar IU. Cuando la virulencia bacteriana aumenta o los mecanismos de defensa del huésped disminuyen se puede producir inoculación bacteriana, colonización e infección de las vías urinarias. Las manifestaciones clínicas pueden variar desde la colonización bacteriana asintomática de la vejiga hasta síntomas irritativos como tenesmo vesical y polaquiuria asociados con fiebre, escalofríos y dolor lumbar y bacteriemia asociada con la morbilidad grave que incluso genera sepsis y muerte. Cuando la infección se disemina a las vías urinarias altas esta puede llegar a los riñones causando su inflamación, a esta enfermedad se denomina pielonefritis la cual se clasifica en dos tipos, aguda y crónica (Lippincott y Wilkins, 2011; Campbell-Walsh, 2015).

La pielonefritis aguda es una inflamación repentina causada por bacterias y es una de las enfermedades renales más frecuentes. Por otro lado, la pielonefritis crónica es una inflamación renal persistente que puede cicatrizar los riñones pudiendo conducir a una insuficiencia renal crónica. Esta última también puede ser de origen bacteriano y es común en pacientes con predisposición a la pielonefritis aguda recurrente (Lippincott y Wilkins, 2011; Campbell-Walsh, 2015).

Las bacterias que afectan al riñón son *Escherichia coli* (*E. coli*) como el microorganismo principal (~70-85%), pero otras especies como *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* también pueden causar esta infección (~10%). Pueden crear colonias de infección dentro de las primeras 48 hrs. Los síntomas son muy parecidos a los presentados por infecciones de las vías urinarias en general, por lo que es difícil dar con un diagnóstico certero, además de que con cada episodio de pielonefritis se puede causar un daño renal significativo. La pielonefritis aguda puede eventualmente resultar en pielonefritis crónica, insuficiencia renal, formación de abscesos, signos de shock, sepsis o insuficiencia del sistema multiorgánico (Benedí y Raposo, 2005; Lippincott y Wilkins, 2011; Campbell-Walsh, 2015).

Dentro de los tratamientos para combatir a este tipo de infecciones destacan las quinolonas, aminoglucósidos, cefalosporinas, Trimetoprim/sulfametoxazol (TMP/SMX), fosfomicina-trometamol y nitrofurantoina. Sin embargo, algunos de estos microorganismos, como lo es *Pseudomonas aeruginosa* son resistentes a la mayoría de los antibióticos usados normalmente contra estas infecciones, por lo que se requieren tratamientos más específicos (Benedí y Raposo, 2005; Campbell-Walsh, 2015).

Hasta el momento no se ha encontrado el fármaco ideal para el tratamiento de las infecciones urinarias, que debería cumplir con las siguientes características: mínimo efecto sobre la flora vaginal e intestinal, bajo coste, fácil disponibilidad, alta concentración urinaria, baja concentración sérica, buen espectro antimicrobiano, índice de resistencia bajo (inferior al 10% para poder utilizarse como fármaco de primera elección en el tratamiento empírico) (Benedí y Raposo, 2005; Hermenean *et al.*, 2016).

Por otro lado, en el desarrollo de nuevos fármacos para combatir los procesos infecciosos intervienen factores como la aparición de las resistencias antibióticas, provocado por los malos hábitos de prescripción, el uso excesivo o inapropiado de antibióticos, la falta de cumplimiento por parte del paciente de los tratamientos prescritos, etc. El aumento de las resistencias bacterianas es uno de los principales problemas de la terapia antiinfecciosa, que contribuye a un mayor número de fracasos terapéuticos, generando altos costos sanitarios y farmacológicos (Benedí y Raposo, 2005; Gupta y Birdi, 2017).

Esto ha llevado a un mayor interés en el estudio y uso de plantas medicinales, se estima que entre el 25 al 50% de los productos farmacéuticos actuales se derivan de estas. Los extractos crudos de plantas medicinales podrían servir como una fuente alternativa de agentes modificadores de la resistencia debido a la amplia variedad de metabolitos secundarios. Estos metabolitos (alcaloides, taninos, polifenoles, etc.) podrían actuar como potenciales agentes antimicrobianos y modificadores de la resistencia. Por lo tanto, pueden ejercer su actividad no solo al matar el microorganismo, sino también al afectar eventos clave en el proceso patógeno, por lo tanto; las bacterias, hongos y virus pueden tener una capacidad reducida para desarrollar resistencia a los elementos botánicos (Gupta y Birdi, 2017).

En México, alrededor de 4000 especies tienen atributos medicinales, es decir; una de cada 7 especies tiene alguna propiedad curativa, sin embargo; se estima que la validación química,

farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se han llevado a cabo solo en el 5% de estas especies (Martínez, 1999; Ocegueda *et al*, 2005).

Mimosa albida es una planta utilizada dentro de la medicina popular mexicana para tratar infecciones en el riñón principalmente. Sin embargo; no hay evidencia científica que avale su uso popular, es por ello, que en el presente trabajo se realizará un estudio químico y biológico que aporte evidencia sobre el contenido químico de esta especie, así como de su eficacia farmacológica.

2. Antecedentes

2.1. Antimicrobianos.

Un antimicrobiano es cualquier sustancia de origen natural, semisintético o sintético que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos pero que causa nulos o pequeños daños al huésped. Estos se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de microorganismo que atacan, de esta clasificación derivan los antibióticos que son sustancias químicas o de origen natural que poseen acción antimicrobiana (Rodríguez y de la Garza, 1999; Fernández *et al* 2008).

El empleo de diferentes agentes antibióticos ha proporcionado resultados satisfactorios en el tratamiento y prevención de enfermedades infecciosas importantes como sífilis, tuberculosis e infecciones gastrointestinales debido a su selectiva actividad biológica contra los microorganismos y su baja toxicidad. Esos agentes ejercen su acción de forma específica sobre alguna estructura o función microbiana (referencias).

2.1.1. Clasificación de los antibióticos

Los criterios de clasificación de antibióticos son diversos por lo que se han agrupado de acuerdo con su estructura química, espectro de actividad, efecto antimicrobiano y su espectro de acción.

- A. **Por su estructura química.** Son aquellos antibióticos con propiedades generales similares, como betalactámicos, tetraciclinas, quinolonas, aminoglucósidos, glucopéptidos, macrólidos, entre otros.
- B. **Por su espectro de acción.** Pueden clasificarse como a) de amplio espectro, son moléculas que actúan sobre un amplio número de especies bacterianas, como las tetraciclinas, b) de espectro intermedio, toda aquellas que tienen acción sobre un número limitado de bacterias (macrólidos), y c) de espectro reducido que son activos en un número pequeño de especies bacterianas, por ejemplo, los glucopéptidos.
- C. **Por su efecto antimicrobiano.** Estos pueden ser a) bacteriostáticos, es decir que las concentraciones que se alcanzan en suero y tejidos impiden el desarrollo y multiplicación de las bacterias sin destruirlas. Cuando se retira el antibacteriano (por ejemplo, cloranfenicol y tetraciclinas) el microorganismo puede volver a crecer, por esta razón es

fundamental el papel que juegan los mecanismos defensivos del huésped, y b) bactericidas (por ejemplo, betalactámicos y glucopéptidos), estos producen lisis bacteriana con efectos irreversibles.

- D. **Por su mecanismo de acción:** Cada familia o grupo de antibacterianos tiene una forma característica y preferente de actuación en relación con la estructura química que posean. Pueden actuar, a) impidiendo la síntesis de la pared bacteriana como los betalactámicos; b) alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática de la bacteria como las polimixinas; c) inhibiendo la síntesis proteica como aminoglucósidos (estreptomina) y tetraciclinas; d) bloqueando la síntesis de ácidos nucleicos como las quinolonas y rifampicina; y, e) interfiriendo las vías metabólicas, como las sulfonamidas y diaminopirimidinas (Rodríguez y de la Garza, 1999; Fernández *et al* 2008).

2.1.2. Antibióticos más utilizados para el tratamiento de infecciones de vías urinarias

Las infecciones de vías urinarias son la tercera causa de muerte por infecciones en México. Cada año se diagnostican 5,589 nuevos casos que representan un gasto elevado para las instituciones públicas y privadas siendo las infecciones renales (pielonefritis) las principales manifestaciones clínicas de las infecciones de las vías urinarias altas. Por ello, el diagnóstico de una infección renal es confuso debido a que los síntomas presentados son muy parecidos a los de infecciones urinarias en general (Campbell-Walsh, 2015, Páramo-Rivas *et al*, 2015).

Para ofrecer un tratamiento eficaz contra este tipo de infecciones antes el médico debe realizar una serie de pruebas como, 1) un examen físico, que consiste en palpar el ángulo costovertebral; 2) pruebas de laboratorio, las cuales consisten en el análisis de orina y urocultivos. Generalmente, en los cultivos suele encontrarse *E. coli* que constituye un subgrupo único con factores de virulencia especiales y que es responsable de más del 80% de los casos. En pacientes con infecciones urinarias recurrentes, hospitalizados o con catéteres permanentes se debe sospechar la presencia de organismos resistentes como *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* o *Citrobacter* y de algunos microorganismos grampositivos como *S. aureus* y *E. faecalis*. Con base en las pruebas y resultados obtenidos el tratamiento de una infección renal se puede subdividir en:

- a) **No complicada, que no requiere hospitalización.** Se sugiere la administración de un solo fármaco por vía oral con una fluoroquinolona (ciprofloxacino o levofloxacino, 500 mg) que puede ser eficaz que el uso de Trimetoprim/Sulfametoxazol. Si se sospecha de la existencia de un microorganismo grampositivo se recomienda la administración de amoxicilina o amoxicilina/ácido clavulánico.

- b) **No complicada en un paciente con vía urinaria normal, pero con enfermedad muy grave que justifica la hospitalización para administrar terapia por vía parenteral.** En estos casos se recomienda la administración de una fluoroquinolona (ciprofloxacino o levofloxacino, 400 y 500 mg respectivamente) por vía parenteral, un aminoglucósido (gentamicina, 1.5 mg/kg) con o sin ampicilina o una cefalosporina de amplio espectro (ceftriaxona, 1-2 g). Si la infección se debe a cocos grampositivos se sugiere usar ampicilina/sulbactam con o sin un aminoglucósido.

- c) **Complicada, que requiere hospitalización, cateterismo o cirugía urológica o puede asociarse con anomalías de las vías urinarias.**

2.2. Resistencia antimicrobiana en infecciones del tracto urinario.

La resistencia bacteriana es un proceso adaptativo que se inició desde los orígenes de la presencia de bacterias en la tierra como una estrategia de defensa a los antimicrobianos naturales presentes en el medio ambiente. Los mecanismos de resistencia son múltiples y pueden coexistir en una misma cepa. La mayoría de estos mecanismos son mutaciones cromosómicas que otorgan una ventaja en sobrevivida bajo la presión selectiva de los antibióticos (Duran L, 2018)

En años recientes, la administración indiscriminada de antimicrobianos ha resultado en la selección de cepas resistentes que producen el fracaso a los tratamientos disponibles y complicaciones de los procesos infecciosos (Arredondo-García *et al*, 2007).

2.3. Plantas medicinales utilizadas como antimicrobianos

A lo largo de los siglos, los seres humanos han confiado en la naturaleza para satisfacer sus necesidades básicas, entre ellas, medicamentos para el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades. Por ello, en su búsqueda por la salud empezaron a utilizar las plantas como fuente medicinal para el tratamiento de sus padecimientos (Cragg y Newman, 2013). De hecho, los primeros trabajos sobre el cultivo y clasificación de plantas tienen mucho que ver con el uso y tratamiento de muchos diferentes tipos de enfermedades humanas y hasta la identificación de sus principios activos y su síntesis a escala industrial a finales del siglo XIX (Seid, 2002).

La búsqueda por nuevos fármacos antimicrobianos es una investigación a nivel mundial, debido a que los microorganismos ya presentan fenómenos de resistencia a los fármacos actuales. Una forma de vencer este inconveniente es obtener nuevas moléculas de los recursos naturales (Latha y Kannabiran, 2006). Se sabe que las plantas producen una diversa variedad de compuestos orgánicos con funciones principalmente ecológicas, conocidos como metabolitos secundarios, que no participan en las funciones principales de crecimiento y desarrollo de estas, se han aislado con la finalidad de ser utilizados como fármacos (Buchanan y Jones, 2000; Butler, 2004, Savithamma *et al*, 2011).

Desde hace algunas décadas se han estudiado y aislado varios compuestos derivados de plantas han sido catalogados como compuestos antibacterianos esto gracias a una serie de estudios sobre su actividad realizada en todo el mundo (Barbieri *et al*, 2017).

La actividad de estos compuestos se basa principalmente en sus características estructurales. Los grupos principales de compuestos con actividad antibacteriana son fenólicos, ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas terpenoides y alcaloides (Lai y Roy, 2004; Ciocan y Bara, 2007).

Por lo anterior y dado que México es uno de los países del mundo con mayor biodiversidad aún se siguen estudiando aquellas plantas de las que solo se tiene el conocimiento tradicional o etnobotánico, como lo son especies del género *mimosa*.

2.4. Género *Mimosa*.

El género *Mimosa* L. pertenece a la familia Fabaceae y subfamilia Mimosoideae. Estas son uno de seis familias de angiospermas más diversas a nivel mundial ya que cuenta con alrededor de 480-500 especies. Es un género principalmente americano, alrededor del 90% de sus especies se distribuyen en el sur de Estados Unidos hasta Argentina, mientras que el resto se encuentra en África, Australia y Asia. La gran diversidad biológica de la familia Fabaceae se refleja en la diversidad de usos de numerosas especies por diferentes culturas a nivel mundial (Camargo-Ricalde *et al*, 2001; Camargo-Ricalde, 2016).

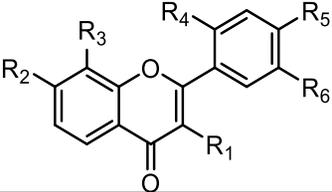
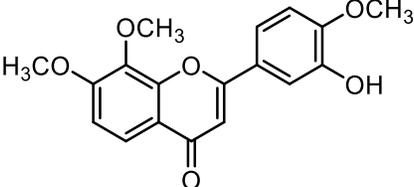
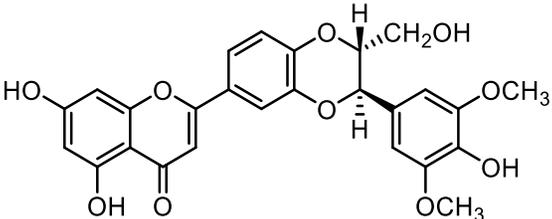
2.5. Estudios fitoquímicos y farmacológicos del género *Mimosa*.

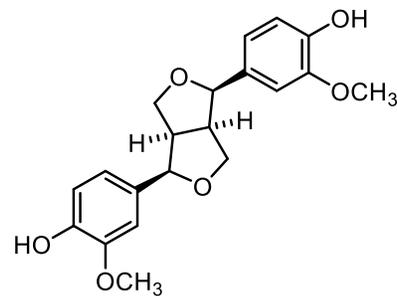
El género *Mimosa* debido a su amplio uso en la medicina tradicional ha sido objeto de estudio. Por ejemplo, en 1979 Hussain y colaboradores estudiaron las partes aéreas de *M. hamata* Willd la cual reporta uso tradicional como antibacteriano aislando de ella ácido gálico y galato de etilo. En 1989 para *M. tenuifolia* L., Domínguez y colaboradores reportaron usos tradicionales de la planta para el tratamiento de quemaduras y para prevenir la inflamación aislando de esta 2 metoxichalconas.

Así mismo, las especies de este género se han estudiado para encontrar compuestos con distintas actividades, entre ellas: antioxidantes y citotóxicos (Lin *et al*, 2011; Aguiar *et al*, 2012).

En el cuadro 1 se reportan compuesto principales de algunas especies de *Mimosa*, las cuales los autores reportan potencial actividad farmacológica para algunas de ellas.

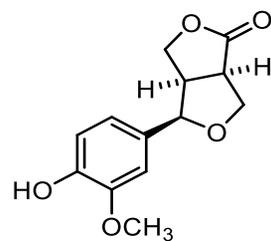
Cuadro 1. Compuestos selectos aislados de especies el género *Mimosa*.

| Especie | Estructura (s) | Actividad biológica atribuida | Referencia |
|---------------------------|--|---|-------------------------|
| |  <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px 0;"> <p>R₁ = R₂ = R₃ = R₅ = OMe, R₄ = R₆ = OH (1) R₁ = R₂ = R₃ = R₅ = OMe, R₆ = OH, R₄ = H (2) R₂ = R₅ = R₆ = OMe, R₄ = OH, R₁ = R₃ = H (3)</p> </div> <p>2',5'-dihidroxi-3,7,8,4'-tetrametoxiflavona (1) 3'-hidroxi-3,7,8,4'-tetrametoxiflavona (2) 20 -hidroxi-7,4',5'-trimetoxiflavona (3)</p> | | |
| <i>Mimosa diplotricha</i> |  <p>4-hidroxi-3,10,11-trimetoxiisocromeno- [4,3-<i>b</i>]- cromen-7(5H)-ona (4)</p> | Compuestos 2 y 5 mostraron actividad antiproliferativa. | Lin <i>et al</i> , 2011 |
| |  <p>5''-metoxihidnocarpina-D (5)</p> | | |



Salicifoliol (5)

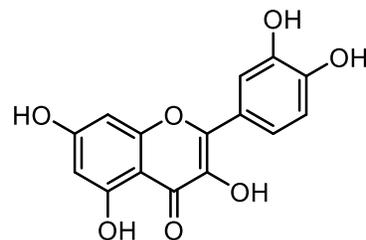
Mimosa invisa



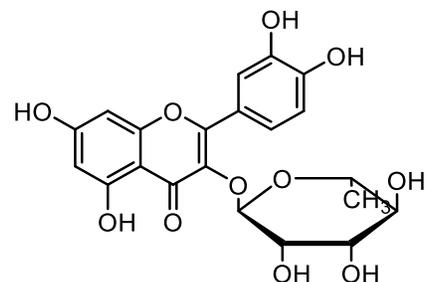
Pinoresinol (7)

Compuestos 1-5
mostraron actividad
antioxidante

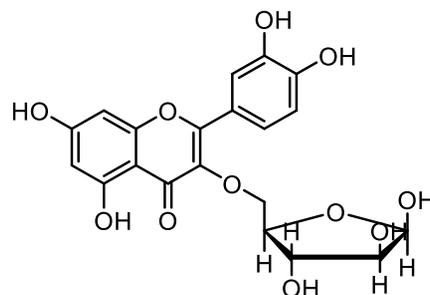
Aguiar *et al*, 2012



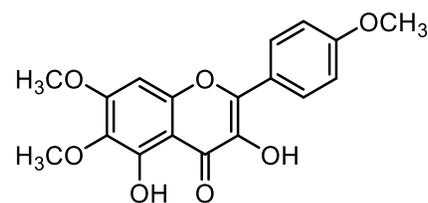
Quercetina (8)



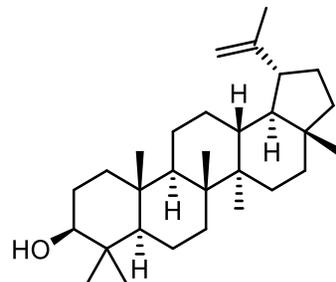
Quercetina-3-O-ramnopiranosilo (9)



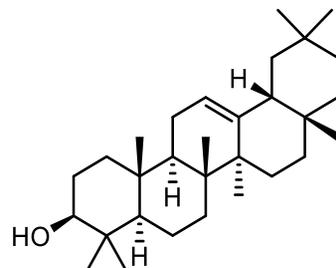
Quercetina-3-O-arabinofuranosilo (10)



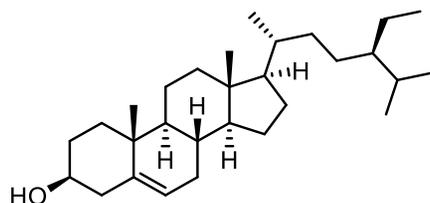
4',6,7-trimetoxi flavonol (11)



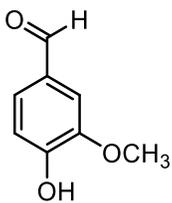
Lupeol (12)



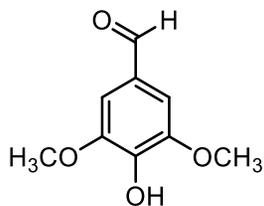
β -amirina (13)



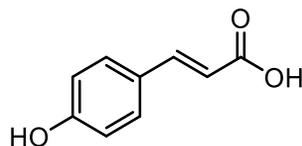
β -sitosterol (14)



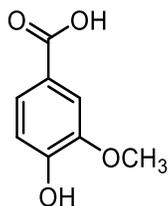
4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (Vainillina) (15)



4-Hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído (Siringaldehído)
(16)

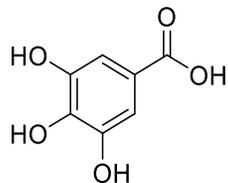


Ácido *p*-cumárico (17)



Ácido 4-hidroxi-3-metoxi benzoico (Ácido vanílico)
(18)

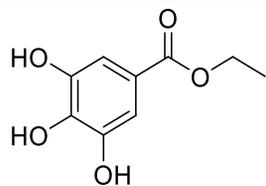
Mimosa hamata



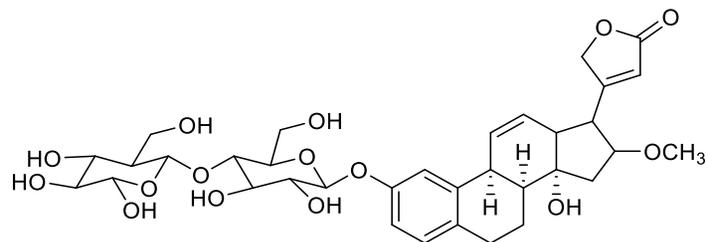
Ácido gálico (19)

Antimicrobianos

Hussain *et al*, 1979



Galato de etilo (20)

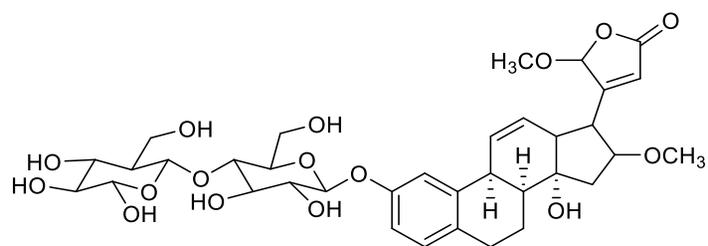


MP-11 (21)

Mimosa pudica

Antifúngico

Ahuchaogu *et al*, 2017
Chukwu *et al*, 2017



MP-19 (22)

2.6. Distribución en México y el Estado de Morelos.

En México, Mimosoideae es la subfamilia mejor representada con alrededor de 110 especies de *Mimosa*. Se ha visto que estas especies incrementan la fertilidad del suelo. Asimismo, estas especies tienen usos como recursos maderables, leña, cercas, artesanías y medicinas (Camargo-Ricalde *et al*, 2001).

En el estado de Morelos se han encontrado diversas especies de *Mimosa* como lo son: *M. affinis* B. L. Rob., *M. albida* Hurnb. & Bonpl. ex Willd., *M. benthamii* J. F. Macbr., *M. biuncifera* Benth., *M. galeottii* Benth., *M. lacerata* Rose, *M. mollis* Benth., *M. pigra* L., *M. polyantha* Benth., *M. pudica* L., *M. tricephala* Cham. & Schlttdl. (Camargo-Ricalde *et al*, 2001).

Este género por su gran diversidad ha sido objeto de estudios sistemáticos, anatómicos, ecológicos y etnobotánicos.

2.7. *Mimosa albida* Hurnb. & Bonpl. ex Willd.

Mimosa albida es una planta originaria de México y Sudamérica, se le conoce principalmente como vergonzosa pero también por varios nombres más entre ellos; dormilona, dormilona grande, espina dormilona, espinita dormilona, raíz de uña de gato, uña de gato, zarza sensitiva, zarza vergonzosa. (Martinez-Bernal, 2008).

Tiene una amplia distribución en México, se ha encontrado en Campeche, Chiapas, Colima, Distrito Federal, Estado de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Martinez-Bernal, 2008). En el estado de Morelos se ha encontrado en los municipios de Tepoztlán y Tlayacapan (Cedillo-Portugal, 1990; Hernández-Cárdenas, *et al*, 2014).

Se ha utilizado tradicionalmente contra el insomnio, para tratar la esterilidad de la mujer, para agilizar el parto y recuperación de este, enfermedades gastrointestinales como diarrea, disentería y vienteadura, así como heridas, mal de orín, afecciones en riñones y vejiga, mordedura de víbora y mal viento. (BDMTM, 2018).

A pesar de que la planta tiene una amplia variedad de usos tradicionales tiene muy pocos estudios farmacológicos.

Bussmann y colaboradores en 2011 demostraron que los extractos acuosos de *M. albida* tienen toxicidad escasa. Estos extractos muestran una potente actividad antinociceptiva, pero nula actividad ansiolítica en ratones (Bussmann *et al*, 2011; Rejón-O; *et al*, 2013).

Por lo que es de gran interés seguir estudiando a esta planta para de esta manera poder validar de manera científica los usos tradicionales que se le atribuyen.

3. Justificación

Las infecciones de riñón afectan a personas de todas las edades y no se ha encontrado una línea de diagnóstico certero para detectar dicha enfermedad por lo que su evolución puede llegar a ocasionar problemas más graves como lo son la sepsis y la muerte del paciente. Aunque se cuenta con tratamientos para tratar la infección se debe tomar en cuenta que los microorganismos se han hecho cada vez más resistentes a los antibióticos creando cepas resistentes, ello por el uso indiscriminado de antibióticos obligando a los científicos a buscar nuevas fuentes de antibióticos como lo son las plantas. Dentro de este contexto, se estudió a la planta *M. albida*, la cual tiene uso en la medicina tradicional para tratar las infecciones de riñón, para encontrar compuestos responsables de dicha actividad biológica.

4. Hipótesis

Los compuestos aislados de *M. albida* tendrán actividad antimicrobiana contra las cepas de microorganismos causantes de las infecciones de riñón.

5. Objetivos

5.1. General

Realizar un estudio fitoquímico y antimicrobiano de la planta *Mimosa albida* que aporte evidencias sobre su contenido químico y su uso popular.

5.2. Específicos

- Colectar la planta completa en su hábitat natural.
- Obtener los extractos de polaridad creciente de las partes aéreas de *Mimosa albida*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos.
- Purificar y caracterizar los compuestos mayoritarios en/los extracto(s) activo(s).
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos puros mayoritarios aislados.

6. Parte experimental

6.1. Obtención de material vegetal.

La planta completa *Mimosa albida* se colectó en la sierra de Huautla en septiembre del 2018, con ayuda del M. C. Fidel Ocampo Bautista. De manera adicional se colectó un ejemplar de referencia que se mandó al curador de herbario M. en C. Gabriel Flores Franco para su identificación e ingreso a la Colección del Herbario (HUMO) del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIByC-UAEM). La muestra vegetal se identificó como *Mimosa albida* Humb. & Bonpl. ex Willd de la familia **Fabaceae** con número de folio **35890**.

6.2. Análisis cromatográfico

Los análisis cromatográficos en columna abierta (CC) se realizaron en columnas de vidrio de longitud y diámetro variable utilizando como fase estacionaria gel de sílice 60 Merck (tamaño de partícula, 0.040-0.063 mm, 230-400 Mesh). Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron utilizando placas de aluminio recubiertas con una capa de gel de sílice de 0.25 mm de espesor (Sílica gel 60, F₂₅₄, Merck); para visualizar las placas se utilizó una lámpara de luz UV (onda corta de 254 nm y onda larga de 365 nm) y un reactivo cromogénico [sulfato cérico amoniacal (NH₄)₄Ce(SO₄)₄*2H₂O] al 1% en H₂SO₄ 2N. Los reactivos empleados fueron obtenidos con proveedores comerciales y se utilizaron sin previa purificación. Los disolventes grado industrial utilizados fueron previamente destilados y deshidratados utilizando sulfato de sodio anhidro con la finalidad de eliminar impurezas y evitar contaminaciones de los extractos vegetales preparados en el laboratorio de productos naturales.

6.3. Análisis espectroscópicos

6.3.1. Resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN), Carbono trece (¹³C-RMN) así como los bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC), fueron obtenidos en los equipos Bruker AMX 500 MHz y Varian Unity Inova de 200 MHz, utilizando disolventes deuterados (CDCl₃, CD₃OD y DMSO-d₆), los desplazamientos químicos (δ) están referidos en partes por millón (ppm), la multiplicidad de las señales (s, singulete; d, doblete; t, triplete;

m, múltiple, etc.), el número de hidrógenos (deducidos por integración), y la constante de acoplamiento J (Hz).

6.4. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una técnica que permite analizar y separar compuestos volátiles y semivolátiles. Con la meta de identificar compuestos en las fracciones de extractos menos polares, una pequeña muestra fue inyectada en un cromatógrafo de gases HP Agilent Technologies 6890 equipado con un detector de masa de cuadrupolo MSD 5973 (HP Agilent), equipado con una columna capilar HP-5MS (longitud: 30 m; diámetro interior: 0.25 mm; espesor de la película: 0.25 M). El gas portador de helio se colocó en la columna (1 ml por minuto a flujo constante). La temperatura de entrada se ajustó a 250 °C, mientras que la temperatura del horno fue inicialmente a 40 °C (se mantuvo durante 1 minuto) y se aumentó a 280 °C/minuto. El espectrómetro de masas funcionó en modo de impacto electrónico positivo con energía de ionización de 70 eV. La detección se realizó en modo de monitoreo selectivo de iones (SIM) y los picos se identificaron y cuantificaron utilizando los iones de fragmentación. La determinación de la composición metabólica se realizó por comparación de identidad eligiendo aquellos compuestos que cumplieron con un factor de coincidencia $\geq 80\%$ de acuerdo con la base de datos NIST (National Institute of Standards and Technology, siglas en inglés).

6.5. Estudio fitoquímico de *Mimosa albida*.

6.5.1. Obtención de extractos crudos

Una vez obtenido, el material vegetal se separó en hojas, tallos y raíz, que posteriormente se secaron a temperatura ambiente. Una vez seco, el material se trituró en un molino semi-industrial en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Sur (CIBIS) en Xochitepec, Morelos.

El material separado y molido se pasó a un recipiente de vidrio de 20 L, posteriormente fue extraído utilizando disolventes orgánicos en polaridad ascendente: hexano, acetato de etilo y una mezcla de metanol:agua (95:05%); en una relación masa/volumen (m/v) 1:5 para su extracción por maceración. Esta mezcla se mantuvo durante 72 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, el disolvente fue separado del material vegetal por filtración y se

concentró mediante destilación en un rotaevaporador BUCHI R-100 a presión reducida. El procedimiento se realizó por triplicado para cada disolvente. El concentrado final se colocó en un recipiente de vidrio previamente pesado y se llevó a sequedad. Por último, se determinó el peso exacto de cada extracto. En la tabla 1 se resume el proceso de extracción de las partes aéreas de *Mimosa albida* (Ma).

Tabla 1. Extractos obtenidos de la planta silvestre *Mimosa albida*.

| Parte de la planta | Material vegetal pesado (g) | Disolvente de extracción | Rendimiento | | Clave |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------|----------------|-------|
| | | | Gramos (g) | Porcentaje (%) | |
| Hoja | 594.3 | Hexano 100% | 12.2622 | 2.06 | MaHH |
| | 1,360 | AcOEt 100% | 14.10 | 1.03 | MaHA |
| | 1,360 | MeOH:H ₂ O 95:05 % | 79.10 | 5.82 | MaHHA |
| Tallo | 1163.5 | Hexano 100% | 6.0522 | 0.52 | MaTH |
| | 1,360 | AcOEt 100% | 44.6344 | 3.28 | MaTA |
| | 1,360 | MeOH:H ₂ O 95:05 % | 52.9448 | 3.89 | MaTHA |
| Raíz | 1,175 | Hexano 100% | 1.9085 | 0.16 | MaRH |
| | 1,175 | AcOEt 100% | 4.4610 | 0.37 | MaRA |
| | 1,175 | MeOH:H ₂ O 95:05 % | 73.7083 | 6.27 | MaRHA |

Una pequeña cantidad de los extractos de hexano y acetato de etilo fueron decolorados, ya que mediante el análisis en cromatografía de capa fina no se observan diferencias en cuanto el contenido metabólico de cada extracto tal como se observa en la figura 1.

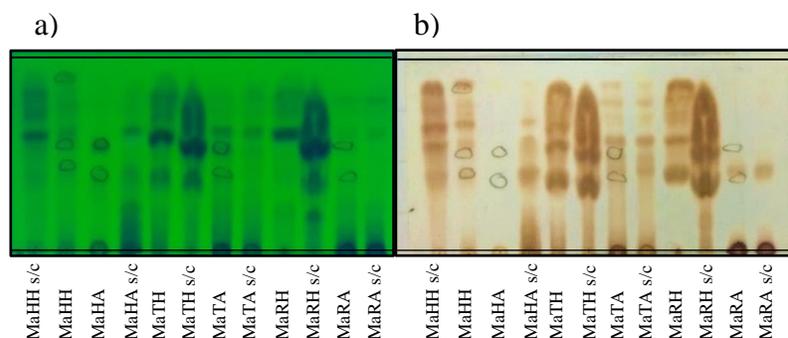


Figura 1. Extractos de *Mimosa albida*. a) Placa cromatográfica revelada en lámpara de UV a $\lambda=254$ nm. b) Placa cromatográfica revelada con un reactivo cromogénico (sulfato sérico amoniacal: $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$] al 1% en H_2SO_4 2N).

Con base en el contenido químico observado en cromatografía en capa fina y al uso popular dentro de la medicina tradicional mexicana, se decidió iniciar el trabajo fitoquímico con la purificación del extracto de acetato de etilo obtenido de las hojas de *M. albida* (MaHA).

6.5.2. Fraccionamiento primario del extracto del extracto de acetato de etilo obtenido de hojas de *M. albida* (MaHA) (Percolación).

Con la finalidad de obtener fracciones primarias y libres de color, en un embudo Büchner se colocaron 50 g de gel de sílice (SiO₂) seguido de 15 g de carbón activado, el procedimiento se repitió una segunda vez. Posteriormente se adicionaron 14 g del extracto con clave MaHA previamente adsorbidos en 21 g de SiO₂. Como fase móvil se utilizó un gradiente con polaridad ascendente de disolventes orgánicos empezando por Hexano 100%, seguido por mezclas de hexano (Hx) y acetato de etilo (AcOEt) hasta llegar a 100% de AcOEt, luego por mezclas de AcOEt y metanol (MeOH) hasta llegar a MeOH 100%.

Se obtuvieron 32 fracciones, mismas que fueron reunidas de acuerdo con la similitud presentada en el análisis por cromatografía en capa fina (C.C.F.). Finalmente se obtuvieron 5 fracciones primarias las cuales se ilustran en la tabla 2.

Tabla 2. Fraccionamiento primario de MaHA (Percolación).

| <i>Fracción</i> | <i>Sistema/Gradiente</i> | <i>Reuniones</i> | <i>Rendimiento (g)</i> | <i>Clave</i> |
|-----------------|--------------------------|------------------|------------------------|--------------|
| 1 | Hx 100 % | 1 | 0.0777 | MaHA-1 |
| 2-3 | Hx:AcOEt 90:10 % | 2-6 | 1.3249 | MaHA-2 |
| 4-5 | Hx:AcOEt 80:20 % | 7-8 | 1.7744 | MaHA-3 |
| 6-7 | Hx:AcOEt 70:30 % | 9-24 | 4.4798 | MaHA-4* |
| 8-9 | Hx:AcOEt 60:40 % | 25-32 | 0.3731 | MaHA-5 |
| 10-11 | Hx:AcOEt 50:50 % | 9-24** | 1.4282 | MaHA-6 |
| 12-13 | AcOEt 100 % | | | |
| 14-24 | AcOEt:MeOH 50:50 % | | | |
| 25-32 | MeOH 100 % | | | |

*Al término del secado se observa como un sólido aceitoso.

**Fracción obtenida de lavados con MeOH

6.5.2.1. Purificación de la fracción MaHA-4.

De la fracción primaria con clave MaHA-4 se tomaron 3 g y se adsorbieron en 4.5 g de gel de sílice fase normal, posteriormente esta fue adicionada a una columna de vidrio previamente empacada con 100 g de SiO₂ fase normal. Para el fraccionamiento se utilizaron mezclas de disolventes de polaridad ascendente como prosigue: hexano, acetato de etilo y metanol.

De este proceso cromatográfico se obtuvieron 149 fracciones de 100 mL cada una, las cuales fueron reunidas de acuerdo con el análisis en CCF y su posterior revelado con sulfato sérico amoniacal en 17 grupos de fracciones. Lo anterior se resume en la tabla 3.

Tabla 3. Fracciones obtenidas de MaHA-4.

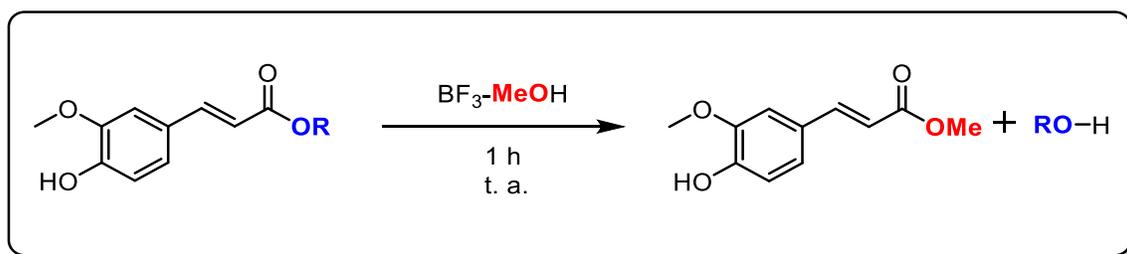
| <i>Fracción</i> | <i>Sistema/Gradiente</i> | <i>Reuniones</i> | <i>Rendimiento (mg)</i> | <i>Clave</i> |
|-----------------|--------------------------|------------------|-------------------------|--------------|
| 1 | Hx 100 % | 1-4 | 50.5 | MaHA-4-1 |
| 2 | Hx:AcOEt 98:02 % | 5-6 | 216.1 | MaHA-4-2 |
| 3 | Hx:AcOEt 96:04 % | 7 | 23.1 | MaHA-4-3 |
| 4 | Hx:AcOEt 94:06 % | 8-9 | 128.4 | MaHA-4-4 |
| 5 | Hx:AcOEt 92:08 % | 10-12 | 208.4 | MaHA-4-5 |
| 6 | Hx:AcOEt 90:10 % | 13-16 | 237.5 | MaHA-4-6 |
| 7 | Hx:AcOEt 88:12 % | 17-25 | 329.9 | MaHA-4-7 |
| 8 | Hx:AcOEt 86:14 % | 26-35 | 301.0 | MaHA-4-8 |
| 9 | Hx:AcOEt 84:16 % | 36-45 | 91.6 | MaHA-4-9 |
| 10 | Hx:AcOEt 82:18 % | 46-52 | 75.7 | MaHA-4-10 |
| 11-51 | Hx:AcOEt 80:20 % | 53-70 | 236.7 | MaHA-4-11 |
| 52-116 | Hx:AcOEt 75:25 % | 71-94 | 161.1 | MaHA-4-12 |
| 117-140 | Hx:AcOEt 70:30 % | 95-115 | 89.2 | MaHA-4-13 |
| 141-144 | AcOEt 100% | 116-140 | 130.0 | MaHA-4-14 |
| 145-146 | AcOEt:MeOH 50:50 % | 141-144 | 215.4 | MaHA-4-15 |
| 147-149 | MeOH 100 % | 145 | 220.4 | MaHA-4-16 |
| | | 146-149 | 109.5 | MaHA-4-17 |

Del grupo de fracciones identificado como MaHA-4-8 se obtuvo un aceite amarillento, en CCF mostraba una sola mancha al ser observada mediante luz ultravioleta y revelada con sulfato sérico amoniacal. Su análisis por Resonancia Magnética Nuclear indicó que se trataba de una mezcla, y que al menos uno de sus componentes era de tipo fenólico, derivado del

ácido cinámico. Estas evidencias permitieron proponer una reacción de transesterificación con la finalidad de separar este compuesto del resto de los observados en el espectro de RMN.

6.5.2.2. Reacción de transesterificación de la fracción MaHA-4-8.

En un matraz bola fondo redondo de 50 mL se pesaron 10 mg de la fracción con clave MaHA-4-8. Al matraz se adicionó 0.5 mL del reactivo $\text{BF}_3\text{-MeOH}$. La mezcla se puso en agitación constante por una hora siendo monitoreada por CCF cada media hora. Después de que se observó que la materia prima se había transformado casi por completo se detuvo la agitación de la mezcla y el producto resultante con clave MaHA-4-8A (Esquema 1) se llevó a sequedad utilizando vacío. La mezcla de producto se separó mediante cromatografía en columna utilizando SiO_2 como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de disolventes en sistema de gradiente (hexano y acetato de etilo) obteniendo los grupos de fracciones MaHA-4-8A1 y MaHA-4-8A3 mismos que se analizaron por $^1\text{H-RMN}$ de 200 MHz y CG-EM.



Esquema 1. Reacción propuesta para la transesterificación del ferulato de alquilo (**49**).

6.5.2.3. Aislamiento e identificación del compuesto **49**.

El compuesto **49** se aisló como una mezcla aceitosa ligeramente amarilla a partir del fraccionamiento secundario de la fracción MaHA-4 con la clave MaHA-4-8, mismo que, en el análisis por CCF presentó una sola mancha. Este aceite se analizó por RMN de 200 MHz de los cuales se obtuvieron los espectros ^1H y ^{13}C , los datos obtenidos se muestran a continuación.

$^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3). δ 9.81 (1H, s, OH), 7.71 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-3), 7.18 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-2'), 7.07 (2H, d $J = 8.3$ Hz, H-5' y H-6'), 6.45 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-2), 3.84 (3H, s, CH_3), 2.08, 1.72, 1.63, 1.08.

^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3). δ 171.7 (C-1), 151.6 (C-3'), 145.8 (C-4'), 142.0 (C-3), 125.1 (C-1'), 124.4 (C-6'), 123.45 (C-5'), 117.4 (C-2), 111.5 (C-2'), 56.0 (CH_3).

6.5.2.4. Purificación de la fracción MaHA-4-11.

En una columna de vidrio empacada con 7.5 g de gel de sílice como fase estacionaria se adicionaron 170 mg de la fracción etiquetada como MaHA-4-11 previamente adsorbidos en 0.5 g de SiO_2 de fase normal. La separación se efectuó utilizando una sistema isocrático de disolventes compuesto por hexano y acetona 80:20%. Al término de la separación se obtuvieron 33 eluatos los cuales por la similitud mostrada mediante el análisis en CCF, se reunieron dando 11 fracciones finales. La información se resume en la tabla 4. Por último, la fracción MaHA-4-11C se analizó por RMN de 200 MHz y CG-EM.

Tabla 4. Purificación de la fracción MaHA-4-11.

| <i>Fracción</i> | <i>Sistema/Gradiente</i> | <i>Reuniones</i> | <i>Rendimiento (mg)</i> | <i>Clave</i> |
|-----------------|--------------------------|------------------|-------------------------|--------------|
| 1-31 | Hx:Acetona 80:20 % | 1-5 | 6.4 | MaHA-4-11A |
| 32 | Acetona 100 % | 6 | 3.7 | MaHA-4-11B |
| 33 | MeOH 100 % | 7-8 | 24.1 | MaHA-4-11C |
| | | 9 | 11.4 | MaHA-4-11D |
| | | 10-11 | 24 | MaHA-4-11E |
| | | 12-13 | 17.6 | MaHA-4-11F |
| | | 14-15 | 11.9 | MaHA-4-11G |
| | | 16-23 | 42.3 | MaHA-4-11H |
| | | 24-31 | 18.3 | MaHA-4-11I |
| | | 32 | 10.2 | MaHA-4-11J |
| | | 33 | 5.8 | MaHA-4-11K |

6.5.2.5. Aislamiento e identificación del compuesto 50.

El ferulato de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecenilo (**50**) se aisló como una mezcla de compuestos aceitosa y ligeramente amarilla a partir del fraccionamiento terciario de la fracción MaHA-4-11, con la clave MaHA-4-11C, mismo que en el análisis por CCF presentó una única mancha. Una muestra representativa de esta fracción se analizó por RMN de 500 MHz.

6.5.3. Fraccionamiento primario del extracto MaHHA.

En una columna de vidrio empacada con 200 g de SiO₂ de fase normal, fueron adicionados 20 g del extracto con clave MaHHA previamente adsorbido con 30 g de SiO₂ fase normal. Para la separación se utilizaron mezclas de disolventes orgánicos en polaridad ascendente empezando con AcOEt 100% aumentando en gradientes del 10% para finalmente terminar con MeOH 100%. De esta manera se obtuvieron 32 eluatos que por similitud en CCF se reunieron en 5 fracciones finales. Lo anterior se resume en la tabla 5.

Tabla 5. Fraccionamiento primario de MaHHA.

| <i>Fracción</i> | <i>Sistema/Gradiente</i> | <i>Reuniones</i> | <i>Rendimiento (g)</i> | <i>Clave</i> |
|-----------------|--------------------------|------------------|------------------------|--------------|
| 1-11 | AcOEt 100 % | 1-2 | - | MaHHA-1 |
| 12-17 | AcOEt:MeOH 90:10 % | 3-4 | - | MaHHA-2 |
| 18-20 | AcOEt:MeOH 80:20 % | 5-20 | 2.3 | MaHHA-3 |
| 21-23 | AcOEt:MeOH 70:30 % | 21-23 | - | MaHHA-4 |
| 24-26 | AcOEt:MeOH 60:40 % | 24-32 | - | MaHHA -5 |
| 27-29 | AcOEt:MeOH 50:50 % | | | |
| 30-32 | MeOH 100 % | | | |

6.5.3.1. Fraccionamiento secundario de la fracción MaHHA-3.

Tabla 6. Fraccionamiento secundario de MaHHA-3

| <i>Fracción</i> | <i>Sistema/Gradiente</i> | <i>Reuniones</i> | <i>Rendimiento (mg)</i> | <i>Clave</i> |
|-----------------|--------------------------|------------------|-------------------------|--------------|
| 1-3 | DCM: Hx 80:20 % | 1-9 | 97.6 | MaHHA-3-1 |
| 4-6 | DCM: Hx 90:10 % | 10-16 | 181.8 | MaHHA-3-2 |
| 7-9 | DCM 100 % | 17-21 | 145.9 | MaHHA-3-3 |
| 10-15 | DCM:MeOH 90:10 % | 22-30 | - | MaHHA-3-4 |
| 16-18 | DCM:MeOH 85:15 % | 31-40 | 102 | MaHHA-3-5 |
| 19-34 | DCM:MeOH 80:20 % | 41-46 | 43 | MaHHA-3-6 |
| 35-38 | DCM:MeOH 70:30 % | | | |
| 39-46 | MeOH 100 % | | | |

6.5.3.2. Aislamiento e identificación de Quercetin 3-O-β-D-ramnósido (9).

De la fracción MaHHA-3-5 se obtuvo un polvo amarillento, el cual fue limpiado con lavados con disolventes orgánicos. El producto aislado y purificado se analizó mediante la técnica de Resonancia Magnética Nuclear de 500 MHz de 1 y 2 dimensiones (1D y 2D) de los cuales salieron los siguientes experimentos: ¹H, DEPT, COSY, HSQC y HMBC.

¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃/MeOD). δ 7.34 (1H, d, *J*= 2.1 Hz), 7.29 (1H, dd, *J*= 8.3, 2.1 Hz), 6.91 (1H, d, *J*= 8.3 Hz), 6.36 (1H, d, *J*= 2.1 Hz), 6.20 (1H, d, *J*= 2.1 Hz), 5.34 (1H, d, *J*= 1.6 Hz), 4.23 (1H, dd, *J*= 3.4, 1.7 Hz), 3.76 (1H, dd, *J*= 9.4, 3.3 Hz), 3.41 (1H, m), 3.34 (1H, m), 0.94 (3H, d, *J*= 6.1 Hz).

¹³C-DEPTQ (CDCl₃/MeOD). δ 179.3 (C-4), 165.4 (C-6), 162.8 (C-8), 159.0 (C-2), 158.2 (C-9), 149.4 (C-4'), 146.0 (C-3'), 136.0 (C-3), 122.7 (C-1'), 122.7 (C-6'), 116.8 (C-2'), 116.1 (C-5'), 105.8 (C-10), 103.2 (C-1''), 99.7 (C-7), 94.6 (C-5), 73.0 (C-4''), 71.8 (C-3''), 71.7 (C-5''), 71.5 (C-2''), 17.5 (C-6'').

6.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana

La prueba de Kirby-Bauer, descrita por Bauer *et al.*; más conocido como prueba de difusión en disco o prueba de difusión en agar es el método más utilizado para determinar la sensibilidad de antibióticos. Su fundamento se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir la cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro. Si el organismo es susceptible a un antibiótico específico, no habrá crecimiento alrededor del disco que contiene el antibiótico. Por lo tanto, se puede observar y medir una "zona de inhibición" para determinar la susceptibilidad a un antibiótico para ese organismo en particular. Esta medición se compara con los criterios establecidos por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (NCCLS, siglas en inglés). Según los criterios, el organismo puede clasificarse como Resistente (R), Intermedio (I) o Susceptible (S), tal como se muestra en la figura 2 (Bauer *et al.*, 1966; Bernal y Guzmán, 1984; Ramírez y Castaño, 2009).

Este método para determinar la sensibilidad de bacterias a extractos vegetales está aprobado

y fue realizado en la unidad especializada de Innovación en I+D+i en calidad de Alimentos y Productos Naturales de la Universidad Autónoma de Nayarit (UAN) en el estado de Nayarit mismo que se encuentra a cargo de la Dra. Gabriela María Ávila Villareal.

Las cepas empleadas para este estudio fueron:

- *Escherichia coli* ATTC 8739.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 10154.
- *Staphylococcus aureus* ATTC 1026.

Se utilizó **ciprofloxacino** como control positivo para *P. aeruginosa* y *E. coli*; y **vancomicina** para *S. aureus*.

Los extractos fueron evaluados a concentraciones que van desde 0.125 hasta 100 mg/mL

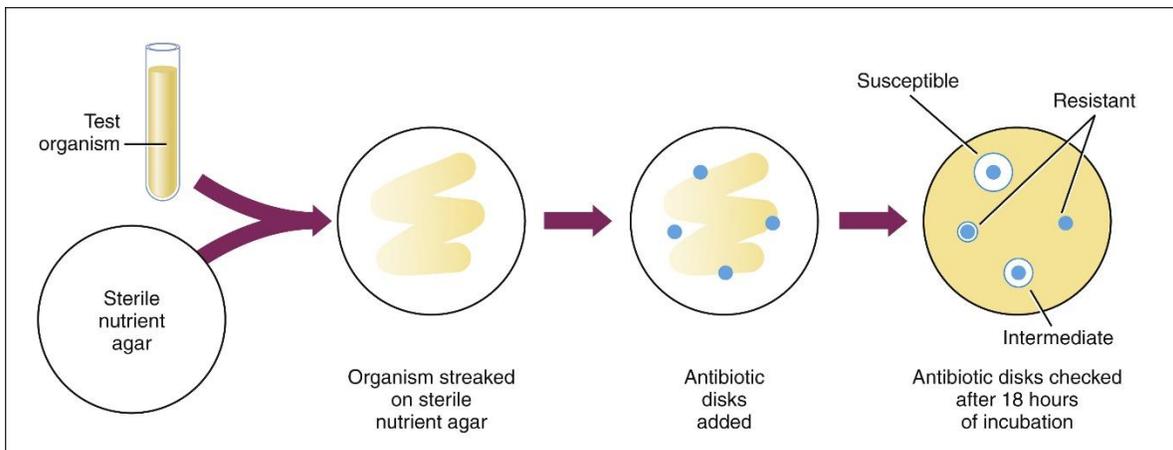


Figura 2. Desarrollo de la prueba de Kirby-Buaer.

El porcentaje de inhibición que se presentó alrededor de los discos dentro de la caja Petri se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{medida del diámetro del halo de inhibición}}{\text{diámetro del halo de inhibición control positivo}} \times 100$$

7. Resultados y discusión

7.1. Selección de *Mimosa albida* para su estudio.

Una de las estrategias de selección de plantas para su estudio es el criterio etnomédico. Este se basa en investigar las especies vegetales con el aval de uso tradicional que se le da en diferentes pueblos (Abreu y Cuellar, 2008). En este contexto, Camargo y colaboradores en 2001; y la biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana (BDMTM) de la UNAM recolectaron los distintos usos que se le dan a esta planta en diferentes partes del país (BDMTM, 2018). Otra estrategia utilizada es el criterio quimiotaxonómico, a través de este se seleccionan plantas relacionadas filogenéticamente de plantas con actividad conocida, por ejemplo, familia y subfamilias de esta. De este modo, en la sección 2.2 de este documento se reportan diferentes especies del género *Mimosa* a las cuales se les atribuyen diversas actividades farmacológicas. Por lo anterior, la planta *Mimosa albida* fue elegida basándose en una combinación de ambas estrategias de selección con la finalidad de validar su uso mediante estudios químicos y farmacológicos.

7.2. Estudio fitoquímico de *Mimosa albida*.

Como fue descrito en la sección de parte experimental (sección 6.5.1), se obtuvieron 9 extractos de las 3 partes de la planta obtenidos en 3 mezclas de disolventes orgánicos (Tabla 1). Los rendimientos son variables de acuerdo con la cantidad de material vegetal utilizado. Estos rendimientos van desde 0.16 hasta el 6.27%.

7.2.1. Fraccionamiento cromatográfico de MaHA.

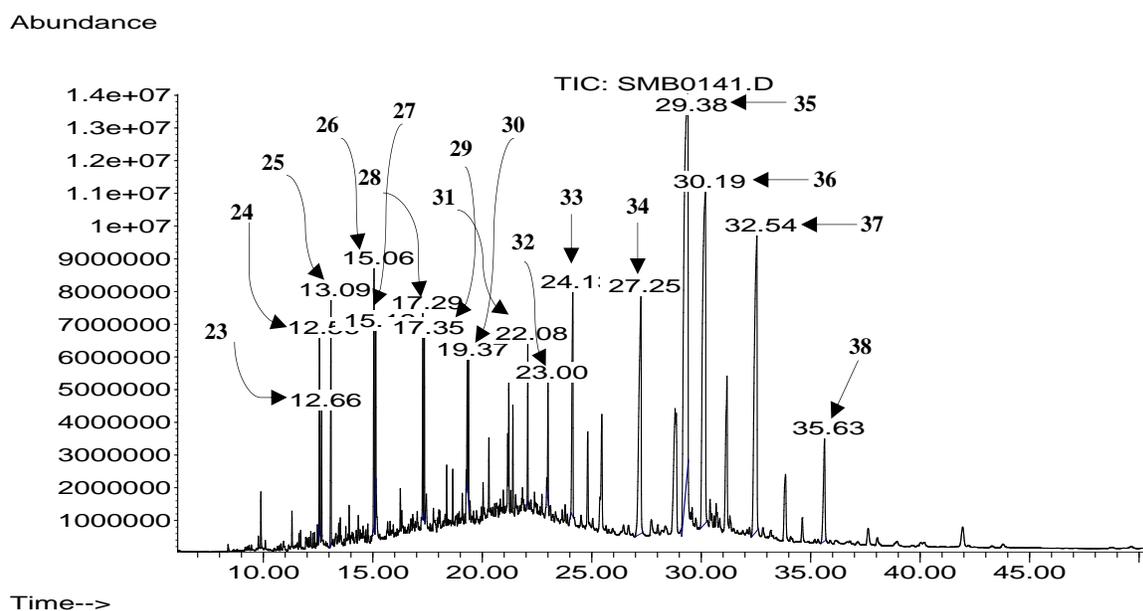
Siguiendo la metodología descrita en la sección 6.5.2, se obtuvieron 5 fracciones primarias.

7.2.1.1. Análisis por CG-EM de la fracción MaHA-1.

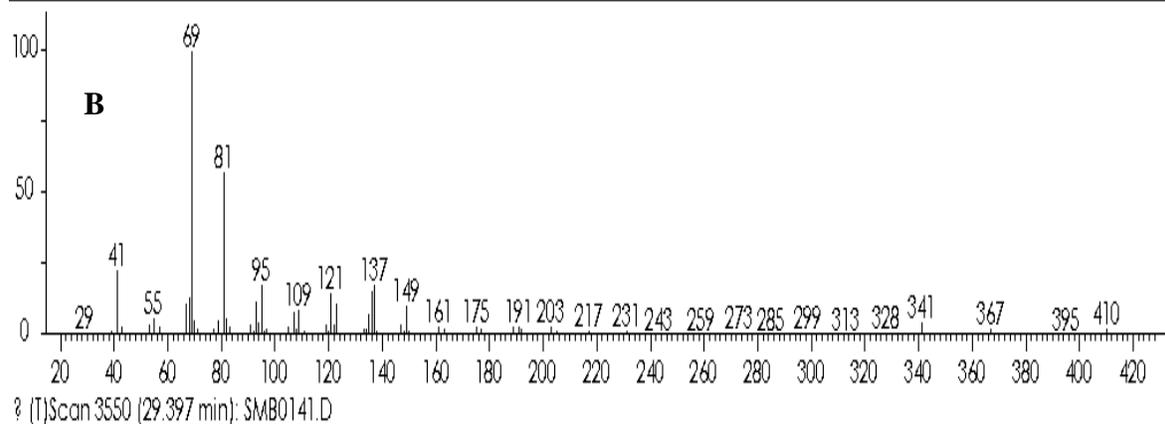
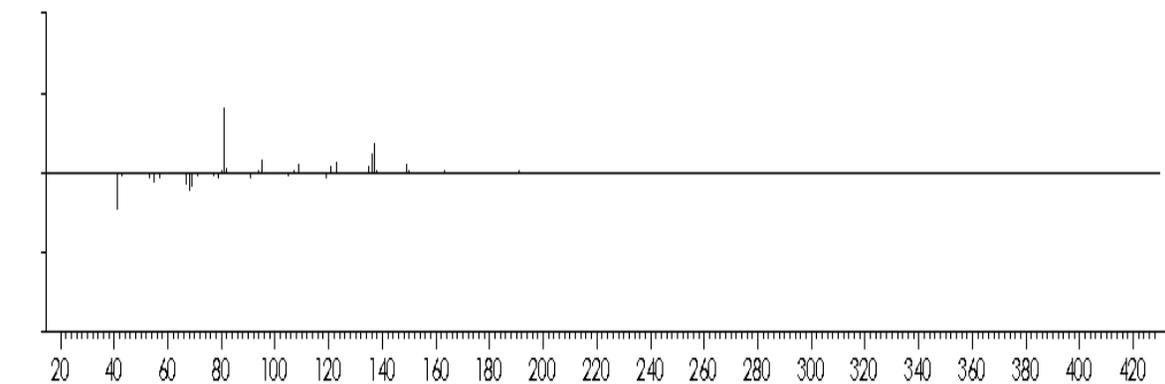
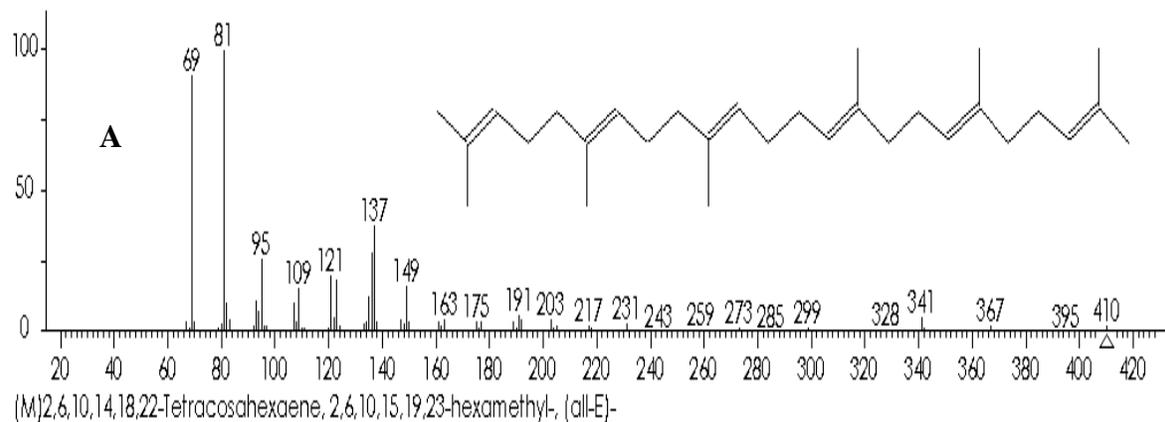
La fracción con clave MaHA-1, obtenida al eluir con hexano 100%, en el análisis por CCF mostró la presencia de compuestos de baja polaridad por lo que una pequeña cantidad de esta se analizó por CG-EM (sección 6.4). Para ello se disolvió totalmente una pequeña cantidad (2-3 mg) en 0.5 ml de diclorometano, misma que fue puesta en un vial especial para ser inyectada en el cromatógrafo de gases, una vez obtenido el cromatograma (1) se seleccionaron y marcaron aquellos picos que presentaron mayor abundancia para extraer su espectro de masas. La selección de los compuestos se realizó por la comparación de identidad

de aquellos compuestos que cumplieron con un factor de coincidencia 80% de acuerdo con la base de datos NIST.

Por este método se encontraron compuestos principalmente del tipo alcanos (**34**, TR= **27.24** min., A= **10.15** %), (**36**, TR= **30.19** min., A= **18.84** %) y (**37**, TR= **14.81** min., A= **32.54** %), así como algunos derivados terpénicos como β -cariofileno (**25**, TR= **13.08** min., A= **2.67** %) y escualeno (**35**, TR= **29.37** min., A= **28.92** %) (Cromatograma 1). Este último fue el que se encontró en mayor proporción debido a que la fracción es de muy baja polaridad y generalmente dentro de ella se encuentran compuestos de este tipo. Lo anterior se resume en el cuadro 2.



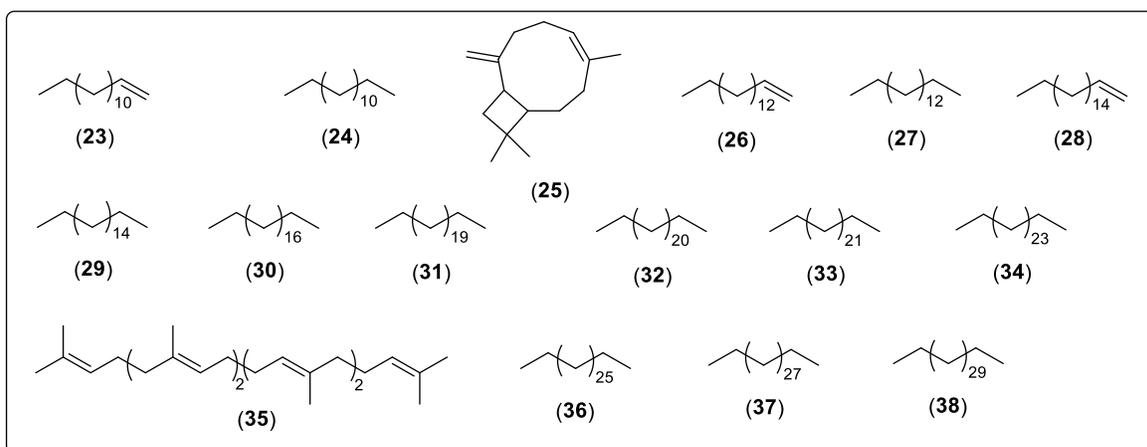
Cromatograma 1. Obtenido de la fracción MaHA-1 analizada por CG-EM.



Espectro 1. Comparación del espectro de la muestra (B) con el espectro de la base de datos NIST (A).

Cuadro 2. Compuestos encontrados por CG-EM de la fracción MaHA-1.

| Compuesto | TR (min.) | m/z (M ⁺) | Abundancia (%) |
|------------------------------------|-----------|-----------------------|----------------|
| Tetradeceno (23) | 12.56 | 196 | 1.81 |
| Tetradecano (24) | 12.66 | 198 | 1.02 |
| β -Cariofileno (25) | 13.09 | 204 | 2.67 |
| Hexadeceno (26) | 15.06 | 224 | 3.14 |
| Hexadecano (27) | 15.14 | 226 | 1.51 |
| Octadeceno (28) | 17.29 | 252 | 2.23 |
| Octadecano (29) | 17.36 | 254 | 1.69 |
| Eicosano (30) | 19.37 | 282 | 1.21 |
| Tricosano (31) | 22.08 | 324 | 1.57 |
| Tetracosano (32) | 23.00 | 338 | 1.25 |
| Pentacosano (33) | 24.14 | 352 | 4.61 |
| Heptacosano (34) | 27.25 | 380 | 10.15 |
| Escualeno (35) | 29.38 | 410 | 28.92 |
| Nonacosano (36) | 30.19 | 408 | 18.84 |
| Hentriacontano (37) | 32.54 | 436 | 14.81 |
| Tritriacontano (38) | 35.63 | 464 | 3.21 |

**Esquema 2.** Compuestos identificados mediante CG-EM de la fracción MaHA-1.

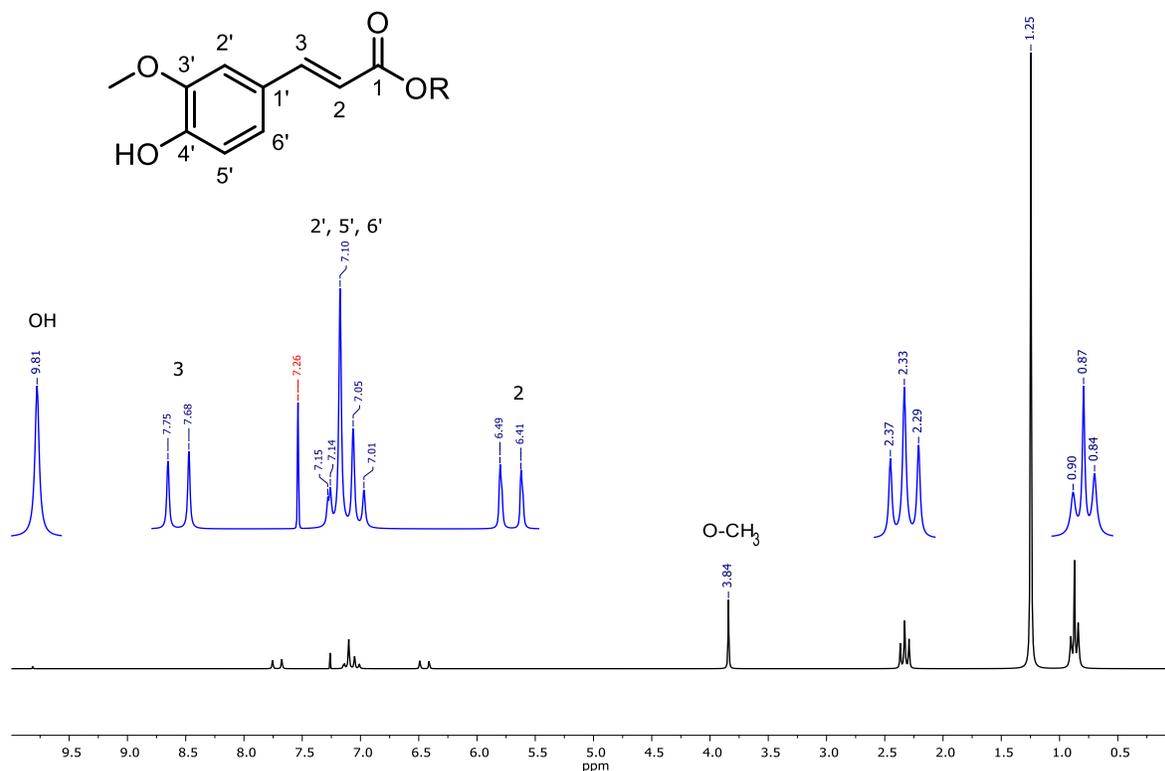
Escualeno (**35**, TR= **29.37** min., A= **28.92** %) es un intermediario triterpenoide en toda la familia de esteroides que ha demostrado tener capacidad antioxidante y protectora de la piel contra los rayos UV. Sin embargo; no se ha reportado su actividad antimicrobiana. Esto puede deberse a que, como la mayoría de los compuestos identificados son hidrocarburos no reportan algún tipo de actividad biológica (Huang *et al*, 2009). Por otro lado, β -cariofileno

(25, TR= 13.08 min., A= 2.67 %) es un compuesto de tipo sesquiterpénico, se ha encontrado en algunas especies de menta, *Humulus lupulus* y es uno de los compuestos que contribuye al aroma de la pimienta negra (*Piper nigrum*) que ha revelado tener actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivas como *P. aeruginosa*, *P. vulgaris* y *Salmonella sp.*, también contra microorganismos gram negativos como *E. coli* y *E. faecalis*, pero la baja cantidad de este presente en el extracto no le permite exhibir su actividad biológica contra las bacterias evaluadas (Jirovetz *et al*, 2002, Jirovetz *et al*, 2006; Park *et al*, 2016).

7.2.1.2. Fraccionamiento cromatográfico y análisis de MaHA-4.

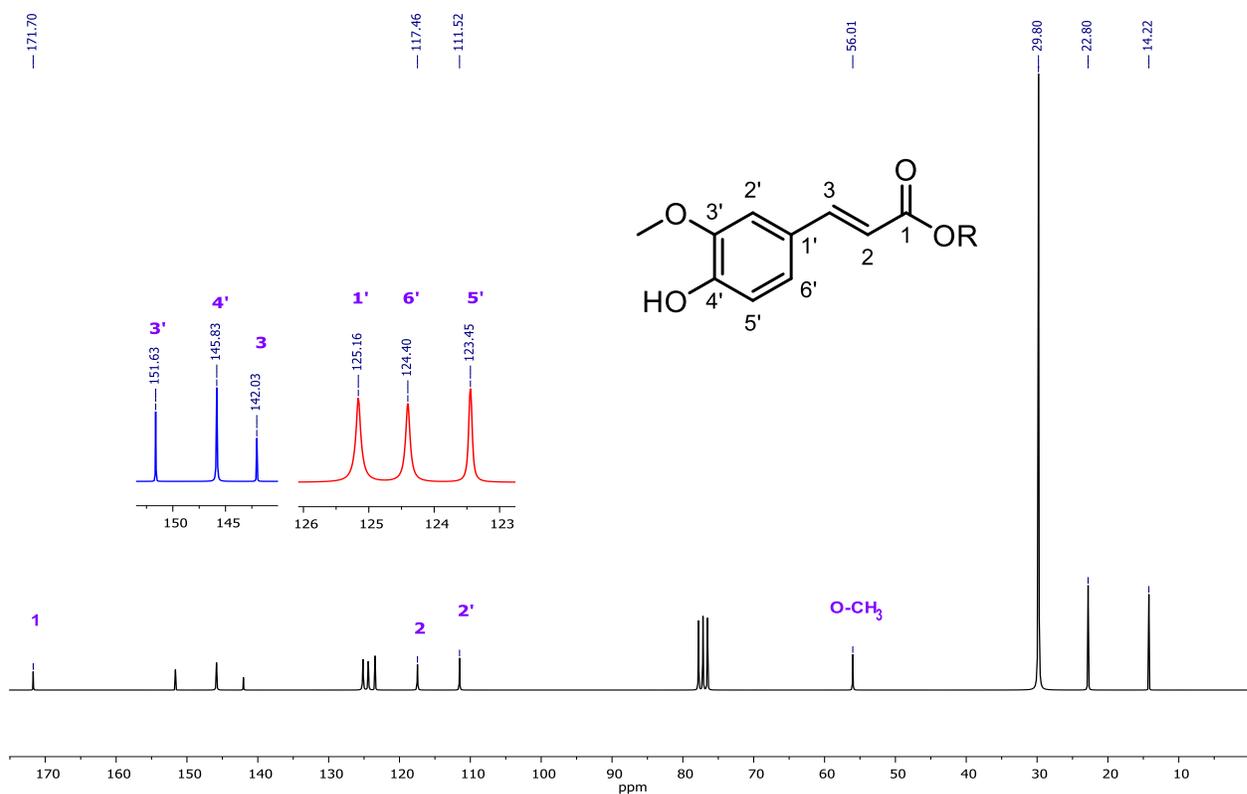
De acuerdo con los rendimientos observados en el fraccionamiento primario del extracto MaHA (Tabla 2), la fracción con clave MaHA-4 que fue obtenida al combinar fracciones eluidas con una mezcla de hexano, acetato de etilo 50:50, fue la que se obtuvo en mayor cantidad (4.4798 g). Esta fracción se aplicó a una columna cromatográfica de gel de sílice, eluyendo con un gradiente de hexano, mezclas de hexano y acetato de etilo y acetato de etilo con metanol, dando un total de 17 fracciones secundarias. La fracción MaHA-4-8 (301 mg), obtenida al eluir con 86:14 Hx:AcOEt mostró una mancha homogénea en CCF por lo que se analizó mediante ^1H -RMN y ^{13}C -RMN a 200 MHz (Espectros 2 y 3).

El espectro de ^1H RMN (Espectro 2) de este compuesto mostró señales en la región de los protones aromáticos, así como señales intensas en la región de los protones alifáticos. La expansión de la zona de δ 6.4 a 9.8 muestra un sistema AB en δ 7.71 (d, 1H, $J= 15.9$ Hz) y 6.45 (d, 1H, $J= 15.9$ Hz), con constante de acoplamiento de 15.9 Hz, lo que indica que se trata de los protones de un doble enlace con configuración *trans*. Por otro lado, en esta misma región, las señales a δ 7.18 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz) y 7.07 (d, 2H $J = 8.3$ Hz) forman parte de un sistema ABX aromático, sugiriendo la presencia de un derivado de ácido cinámico. La pequeña señal a δ 9.81 (s) corresponde al protón de un fenol, y la señal singulete a δ 3.84 y que integra para tres protones, se asigna a un metoxilo aromático. Conjuntando estas evidencias espectroscópicas, la estructura de este compuesto es la de un ácido ferúlico. La ausencia del protón del ácido carboxílico sugiere que éste se encuentra esterificado, probablemente con un alcohol alifático, como lo evidencian las señales a δ 2.08, 1.72, 1.63 y 1.29 observadas a campo alto.



Espectro 2. Experimento $^1\text{H-RMN}$ (200 MHz, CDCl_3) de MaHA-4-8.

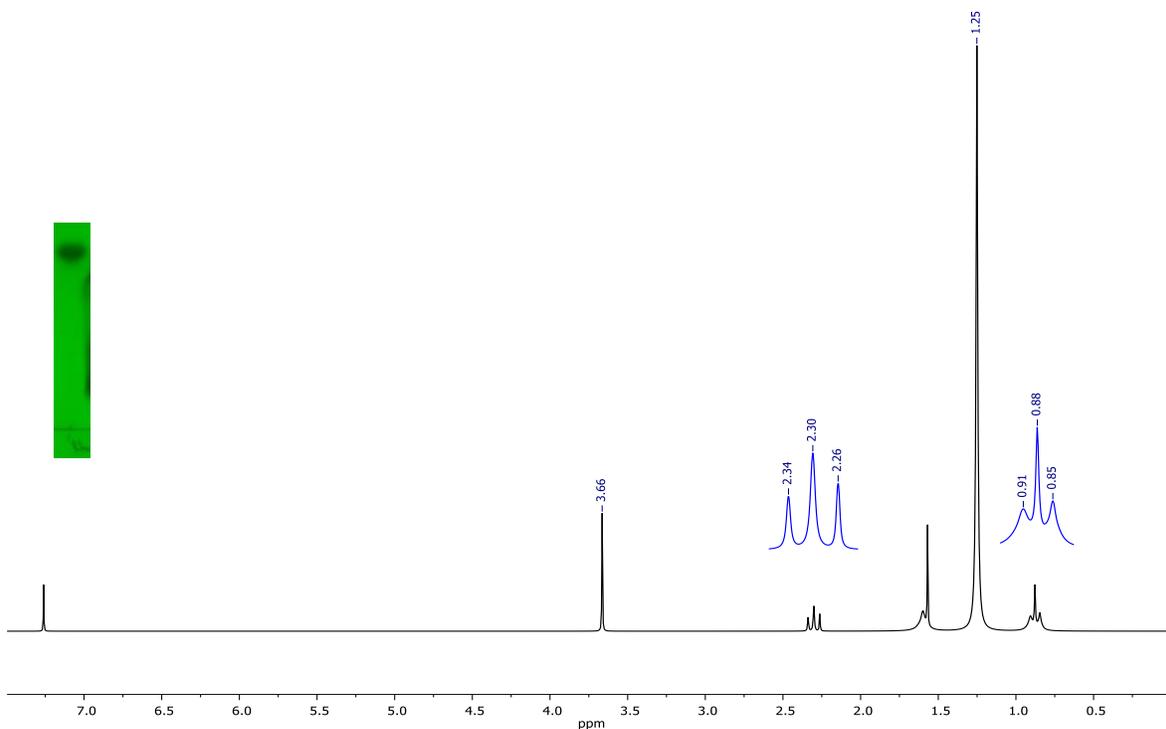
El espectro de $\text{RMN }^{13}\text{C}$ de este compuesto (Espectro 3) mostró señales características de un ácido ferúlico, sin embargo; mostró otras señales indicando que la fracción analizada puede poseer una mezcla de compuestos. En δ 171.7 se observa una señal de carbono cuaternario característica de ácidos carboxílicos, en δ 151.6 y 145.8 se pueden observar dos señales que corresponden a carbonos aromáticos cuaternarios posiblemente unidos a un átomo de oxígeno cada uno. En la región de carbonos aromáticos se observan cuatro señales distintas a δ 125.1, 124.4, 123.4 y 111.5, estas señales corresponden a carbonos de metinos, lo anterior sugiere que se trata de un benceno trisustituido. La señal a δ 125.1 corresponde a un carbono cuaternario que probablemente se encuentre unido a otro carbono. En δ 142.0 y 117.4 se observan dos señales de carbonos de metinos que confirma la presencia de un sistema AB que estén formando un doble enlace y en δ 56.0 se observa una señal de un carbono sp^3 que está unido a un átomo de oxígeno, seguramente es el carbono de CH_3 de metoxilo. Por último, en la región de carbonos de tipo alifático se observan señales con desplazamientos de δ 29.8, 22.8 y 14.2, entre otras, que corresponden a carbonos sp^3 de una cadena alifática.



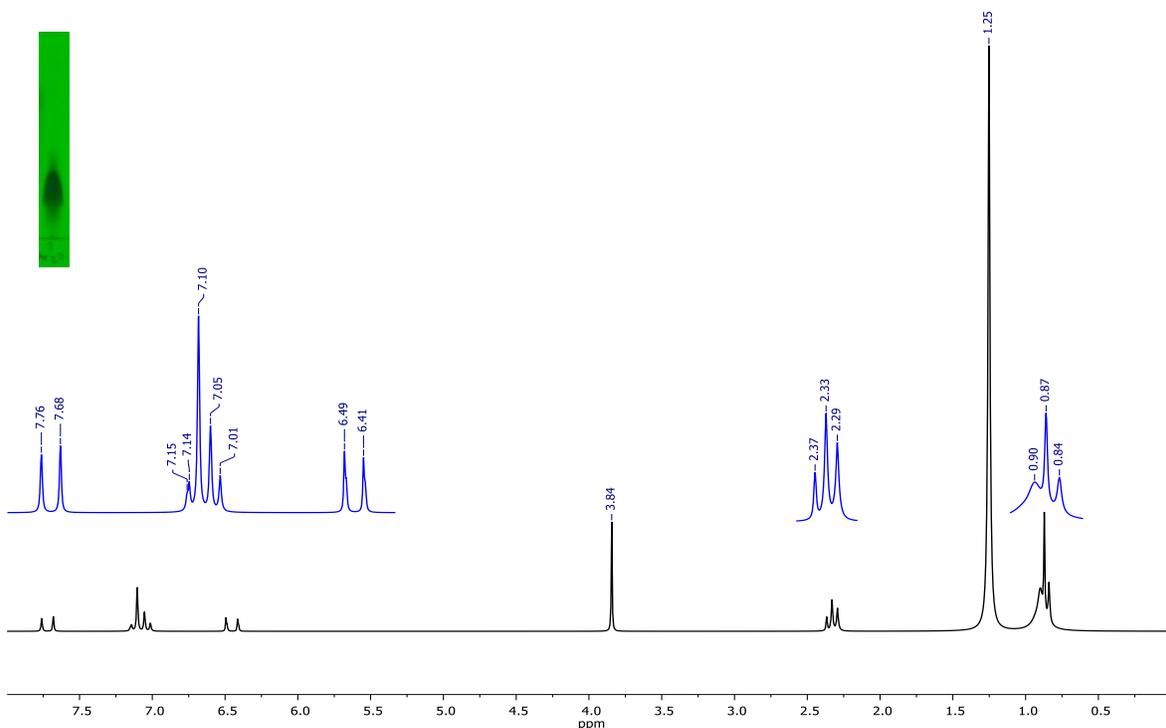
Espectro 3. Experimento ^{13}C -RMN (50 MHz, CDCl_3) de MaHA-4-8.

Las evidencias mostradas hasta el momento indican que la estructura de este compuesto está constituida, por una parte, por una unidad de ácido ferúlico, probablemente esterificada con un alcohol alifático, en la cual falta determinar la longitud de la cadena.

Para determinar la longitud de la cadena se realizó una transesterificación con $\text{BF}_3\text{-MeOH}$ como se indica en el esquema 1 de la sección 6.5.2.2. Las fracciones resultantes de la purificación cromatográfica de la mezcla de reacción fueron analizadas por ^1H -RMN a 200 MHz obteniendo los espectros 4 y 5.



Espectro 4. Experimento de ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) de la purificación de MaHA-4-8A1.



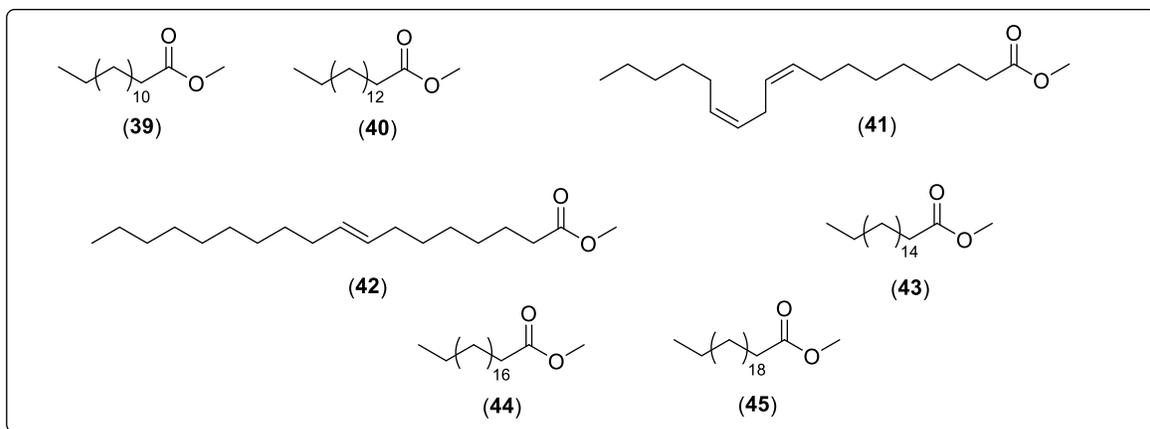
Espectro 5. Experimento de ¹H-RMN (200 MHz, CDCl₃) de la purificación de MaHA-4-8A3.

Como se observa en el espectro 4, en la fracción menos polar no se observan las señales del ferulato, pero se observan señales a frecuencia baja (1- 2.5 ppm) que indican la presencia de grupos alifáticos. En δ 0.88 se observa una señal múltiple que corresponde a un metilo terminal en una cadena alifática, en δ 1.25 se observa una señal simple e intensa que corresponde a los metilenos que conforman a la cadena alifática, en 2.30 (t, $J= 7.5$ Hz, 2H) se observa un triplete que integra para dos hidrógenos correspondiente al metileno en posición alfa a un carbonilo. Por último, en 3.66 ppm también se observa una señal simple correspondiente a un grupo metoxilo indicando que se trata de un ácido graso saturado. El análisis de RMN ^1H de la fracción de mayor polaridad (Espectro 5), indicó que se trata de la materia prima sin reaccionar.

El análisis por CG-EM (Anexos 1 y 2) de los productos obtenidos en la fracción menos polar de la reacción de transesterificación indicó la presencia de una mezcla de siete ésteres metílicos de ácidos grasos como se indica en el cuadro 3. Los ésteres más abundantes son hexadecanoato de metilo (**40**, TR= **18.75** min., A= **36.08** %), seguido de octadecanoato de metilo (**43**, TR= **20.62** min., A= **14.56** %), (Z,Z)-9-12-octadecadienoato de metilo (**41**, TR= **20.32** min., A= **6.84** %) y 8-octadecanoato de metilo (**42**, TR= **20.38** min., A= **6.65** %). El análisis de CG-EM de la fracción más polar (Cuadro 4) mostró la misma proporción de compuestos.

Cuadro 3. Compuestos encontrados por CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A1.

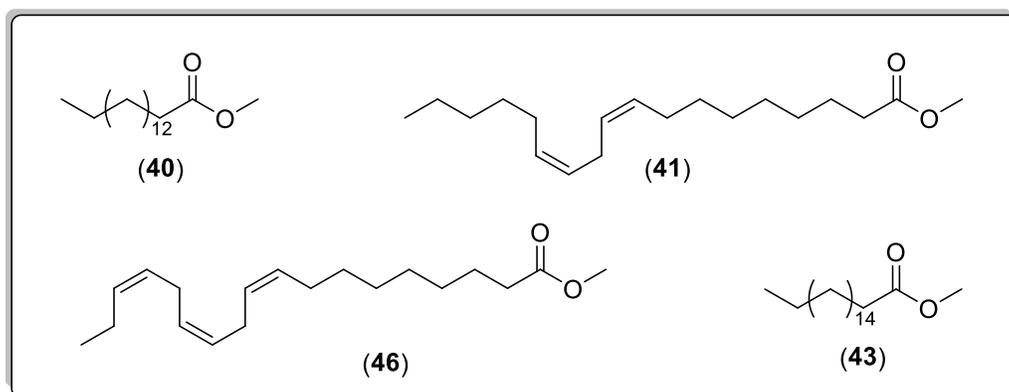
| Compuesto | TR (min.) | m/z (M⁺) | Abundancia (%) |
|---|------------------|----------------------------|-----------------------|
| Tetradecanoato de metilo (39) | 16.56 | 242 | 2.89 |
| Hexadecanoato de metilo (40) | 18.75 | 270 | 36.08 |
| (Z,Z)-9-12-octadecadienoato de metilo (41) | 20.32 | 294 | 6.84 |
| 8-octadecanoato de metilo (42) | 20.38 | 296 | 6.65 |
| Octadecanoato de metilo (43) | 20.62 | 298 | 14.56 |
| Eicosanoato de metilo (44) | 22.35 | 326 | 2.66 |
| Docosanoato de metilo (45) | 24.51 | 354 | 4.48 |



Esquema 3. Compuestos identificados mediante CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A1.

Cuadro 4. Compuestos encontrados por CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A3.

| Compuesto | TR (min.) | m/z (M ⁺) | Abundancia (%) |
|--|-----------|-----------------------|----------------|
| Hexadecanoato de metilo (40) | 18.69 | 270 | 35.55 |
| (Z,Z)-9-12-octadecadienoato de metilo (41) | 20.32 | 294 | 7.63 |
| (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoato de metilo (46) | 20.38 | 292 | 9.61 |
| Octadecanoato de metilo (43) | 20.60 | 298 | 7.15 |



Esquema 4. Compuestos identificados mediante CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A3.

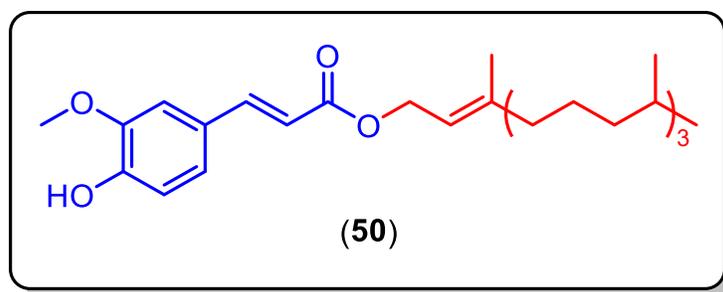
Los resultados descritos anteriormente permiten concluir que la reacción de transesterificación permitió la separación de los ésteres metílicos de ácidos grasos que se encontraban en mezcla con el ferulato de alquilo, el cual no fue transesterificado con las condiciones de reacción empleadas.

Finalmente, para establecer inequívocamente la estructura de la parte alifática de la molécula, es necesario llevar a cabo una reacción de hidrólisis.

7.2.1.3. Análisis por RMN y CG-EM de la fracción MaHA-4-11C.

La fracción con clave MaHA-4-11, mediante su análisis por CCF solo mostró 2 manchas por lo que se decidió purificar para identificar por RMN y CG-EM cada una de ellas (Tabla 4). Al observar una sola mancha en la fracción MaHA-4-11C, ésta se analizó por RMN de 500 MHz en 1D y 2D. El análisis del experimento de ¹H-RMN de esta fracción mostró señales características de un esqueleto de un derivado de ácido cinámico: mostrando que en esta fracción también se observan señales muy semejantes a las vistas en los espectros 2 y 3, las cuales corresponden al esqueleto del ácido ferúlico. Queda pendiente la asignación inequívoca de las señales a campo alto. Para ello se tomaron los datos obtenidos en CG-EM.

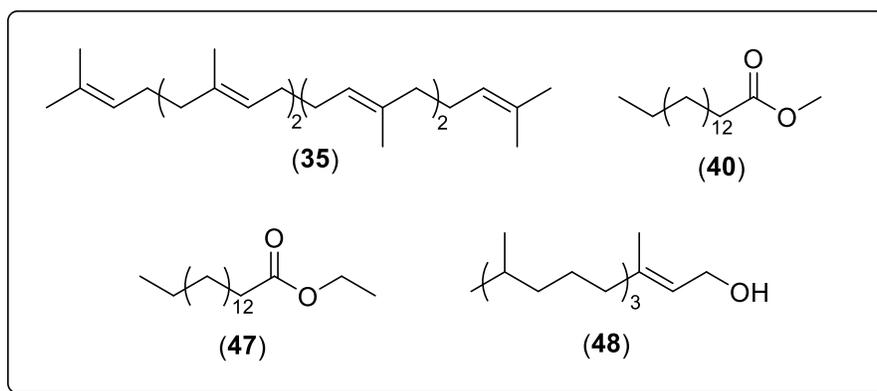
En el cromatograma (Anexo 3), se puede observar la presencia de al menos 4 compuestos mayoritarios, entre ellos destaca nuevamente la presencia de ésteres de ácidos grasos y un alcohol primario, 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (**48**, TR= **21.45** min.), el cual es el compuesto mayoritario con **27.18 %** (cuadro 5, esquema 7), por lo que muy posiblemente este alcohol se encuentre unido como éster al esqueleto de ferulato. De esta manera se propone la siguiente estructura (**50**). Sin embargo, al igual que el producto obtenido de la reacción de la fracción VIII, debe realizarse una hidrólisis con la finalidad de corroborar los 2 componentes de la estructura propuesta.



Esquema 5. Ferulato de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecenilo (**50**).

Cuadro 5. Compuestos encontrados por CG-EM de MaHA-4-11C.

| Compuesto | TR (min.) | m/z (M ⁺) | Abundancia (%) |
|---|-----------|-----------------------|----------------|
| Hexadecanoato de metilo (40) | 18.68 | 270 | 11.0 |
| Hexadecanoato de etilo (47) | 19.35 | 284 | 16.23 |
| 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol (48) | 21.45 | 278 | 27.18 |
| Escualeno (35) | 29.25 | 410 | 31.29 |



Esquema 6. Compuestos identificados mediante CG-EM de MaHA-4-11C.

Los esteres de ácido ferúlico se han encontrado en una gran variedad de plantas por ejemplo en las cícadas (*Cycas vespertilio*) entre otras gimnoespermas y algunas especies de espadañas (*Typha domingensis* y *T. latifolia*) (Kolattukudy y Espelie, 1989; He *et al*, 2015; Ragasa *et al*, 2015; Domergue y Kosma, 2017). La función principal de estos es como antioxidante (Teixeira *et al*, 2013). Así mismo se ha intentado desvelar su actividad como antimicrobianos. De esta manera, Baranowski y Nagel (1983) demostraron que el éster metílico de ácido ferúlico tuvo efecto bacteriostático al reducir el crecimiento de *P. fluorescens*. Un posible mecanismo sugiere que la inhibición de crecimiento se debió a una

inhibición de la respiración celular y al agotamiento resultante de la energía celular (ATP) y no solo a los efectos generales de la alteración de la membrana bacteriana. Por otro lado, aun no se cuenta con información sobre los efectos antimicrobianos de estos derivados de ácido cinámico de cadena larga, por lo que sería de gran interés evaluar estos en las cepas de estudio (Domergue y Kosma, 2017).

7.2.2. Fraccionamiento cromatográfico de MaHHA

Siguiendo la metodología descrita para el fraccionamiento del extracto con clave MaHHA (sección 6.4.3), se obtuvieron 5 fracciones primarias. A partir del análisis cromatográfico de la fracción MaHHA-3 se obtuvieron 6 fracciones secundarias cuyos datos se encuentran descritos en la tabla 6.

7.2.2.1. Elucidación estructural de Quercetin 3-O- β -D-ramnósido.

El compuesto Quercetin 3-O- β -D-ramnósido (**9**), fue aislado de la fracción MaHHA-3-5 como se indica en la sección 6.4.3.2. Se tomaron 10 mg para su análisis por RMN de 500 MHz en 1 y 2 dimensiones (1D y 2D) con los siguientes experimentos: ^1H , DEPTQ, COSY, HSQC y HMBC. A partir de estos experimentos se llevó a cabo la asignación de las señales de protón y carbono como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Asignaciones de Quercetin 3-O- β -D-ramnósido (9).

| Pos. | Tipo de carbono | HSQC (δ ppm) | | HMBC | COSY |
|------|-----------------|---------------------------------|-----------------|--------------------|------------|
| | | ^1H | ^{13}C | | |
| 2 | C | - | 159.0 | 7.29(3), 7.34(3) | |
| 3 | C | - | 136.0 | 5.34 | |
| 4 | C | - | 179.3 | 6.36 (4), 6.20 (4) | |
| 5 | CH | 6.36 (1H, d, $J= 2.1$ Hz) | 94.6 | 6.20(3) | |
| 6 | C | - | 165.4 | 6.20(2), 6.36(2) | |
| 7 | CH | 6.20 (1H, d, $J= 2.1$ Hz) | 99.7 | 6.36(3) | |
| 8 | C | - | 162.8 | 6.20(2) | |
| 9 | C | - | 158.2 | 6.36(2) | |
| 10 | C | - | 105.8 | 6.20(3), 6.36(3) | |
| 1' | C | - | 122.7 | - | |
| 2' | CH | 7.34 (1H, d, $J= 2.1$ Hz) | 116.8 | 7.29(3) | |
| 3' | C | - | 146.0 | 6.91 (3) | |
| 4' | C | - | 149.4 | 7.29(3), 7.34(3) | |
| 5' | CH | 6.91 (1H, d, $J= 8.3$ Hz) | 116.1 | - | 7.29 |
| 6' | CH | 7.29 (1H, dd, $J= 8.3, 2.1$ Hz) | 122.7 | 6.91(2), 7.34(3) | 6.91 |
| 1'' | CH | 5.34 (1H, d $J= 1.6$ Hz) | 103.2 | - | 4.23 |
| 2'' | CH | 4.23 (1H, dd, $J= 3.4, 1.7$ Hz) | 71.5 | - | 3.76, 5.34 |
| 3'' | CH | 3.76 (1H, dd, $J= 9.4, 3.3$ Hz) | 71.8 | 3.34(2) | 4.23, 3.34 |
| 4'' | CH | 3.34 (1H, m) | 73.0 | 3.76(2), 4.23(3) | 3.76 |
| 5'' | CH | 3.41(1H, m) | 71.7 | 5.34(3) | 0.94 |
| 6'' | CH ₃ | 0.94 (3H, d, $J= 6.1$ Hz) | 17.5 | 3.34(3) | 3.41 |

De acuerdo con el análisis del experimento DEPTQ (Espectro 12), se observaron 21 señales de carbono de las cuales, 10 pertenecen a carbonos cuaternarios, 10 pertenecen a grupos metino y una corresponde a un grupo metilo.

En la región aromática del espectro de ^1H (Espectro 11) se observan dos sistemas de espines: el primero es un sistema ABX con señales en δ 7.34 (1H, d, $J= 2.1$ Hz), 7.29 (1H, dd, $J= 8.3, 2.1$ Hz) y 6.91 (1H, d, $J= 8.3$ Hz) indicando la presencia de un anillo aromático 1,3,4 trisustituido, esto debido a las constantes de acoplamiento de tipo *orto* (8.3 Hz) y *meta* (2.1 Hz). Un segundo sistema AB se puede observar en δ 6.36 (1H, d, $J= 2.1$ Hz) y 6.20 (1H, d, $J= 2.1$ Hz) que indican la presencia de un segundo anillo aromático tetra sustituido debido a que solo se puede observar la constante de acoplamiento de tipo *meta* (2.1 Hz).

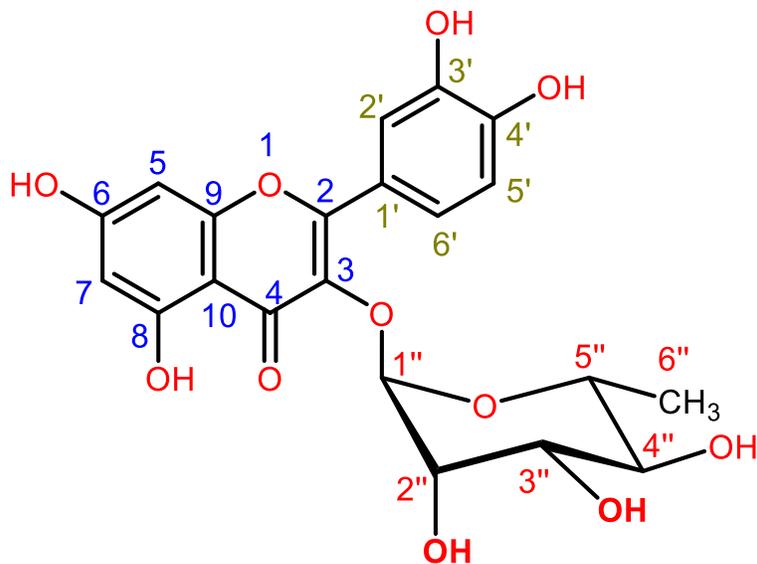
A frecuencia un poco más baja, entre 3 y 5 ppm, se observan 5 señales de hidrógenos bases de oxígeno en δ 5.34 (1H, d $J= 1.6$ Hz), 4.23 (1H, dd, $J= 3.4, 1.7$ Hz), 3.76 (1H, dd, $J= 9.4, 3.3$ Hz), 3.41(1H, m) y 3.34 (1H, m); la señal en 5.34 ppm indica la presencia de un hidrógeno

anomérico característico de una molécula de azúcar. El experimento de COSY (Espectro 13) muestra que estos hidrógenos acoplan entre sí reforzando la sugerencia de la existencia de una molécula de azúcar. Por último, en 0.94 (3H, d, $J= 6.1$ Hz) ppm se observa una señal doble que integra para tres hidrógenos indicando la presencia de un metilo, nuevamente en el espectro de COSY se observa que esta señal correlaciona con la señal en 3.41 ppm.

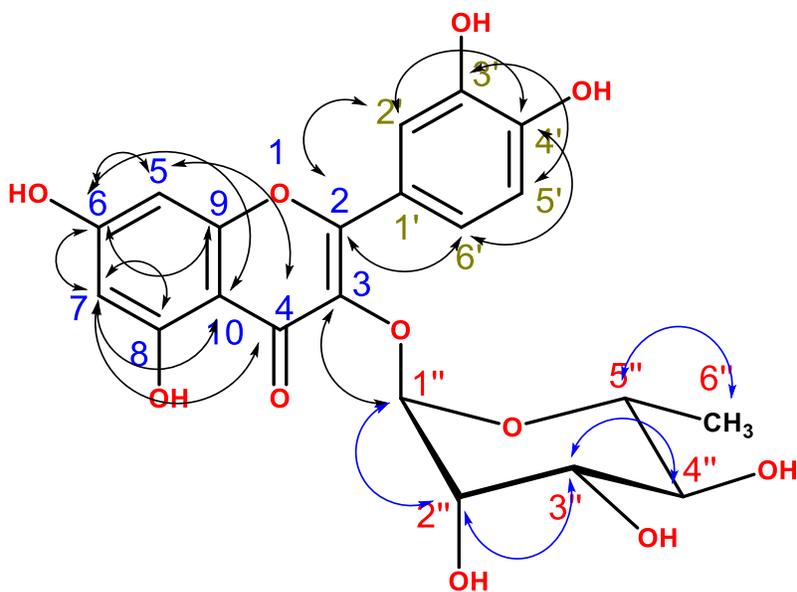
En el espectro DEPT se observa una señal a δ 179.3 ppm que se asigna a un carbono de carbonilo. En el experimento de HMBC (Espectro 15) esta señal correlaciona a 4J con los hidrógenos del segundo sistema tipo AB descrito anteriormente. Por otro lado, la señal del hidrógeno anomérico del azúcar correlaciona con un carbono cuaternario de tipo sp^2 en δ 136.0 ppm, sugiriendo que este carbono se encuentra en posición alfa al carbonilo y tiene un doble enlace con electrones deslocalizados. El análisis anterior se propone la siguiente fórmula mínima: $C_{21}H_{22}O_{10}$ que indica la presencia de un compuesto de tipo flavonoide glucosilado C6-C3-C6. Finalmente, con ayuda de los espectros de RMN 2D se logró establecer de manera inequívoca la estructura que tiene por nombre común quercitrina (Quercetin 3-*O*- β -D-ramnósido) (**9**).

Para el compuesto **9**, los datos espectroscópicos obtenidos van acorde con los datos reportados en la literatura (Waage y Hedin, 1985; Bamigboye y Oluwatoyin, 2014).

De acuerdo con Bamigboye y colaboradores (2014), el compuesto **9** reporta una débil actividad antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* NCTC 6571 y *B. subtilis* NCTC 8236. Una explicación por la cual se observa una actividad casi nula es porque el azúcar unido a la quercetina hace de este compuesto una sustancia más hidrofílica que es incapaz de atravesar las membranas celulares bacterianas. Por lo que se necesitaría administrar en conjunto con una enzima capaz de romper esa unión y así la quercetina tendría mejor actividad tal como lo demuestran Wang y colaboradores (2018).



Quercetin 3-*O*-β-D-ramnósido (9)



Principales correlaciones **COSY** y **HMBC** de 9.

7.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos crudos

A través de la prueba de Kirby-Bauer se evaluaron los 9 extractos crudos, así como 6 adicionales debido a que, una muestra representativa (100 mg) de estos extractos que presentaron color fue decolorada (Figura 1). De esta manera se pretendió que el color presente en las muestras a evaluar no interfiriera con los resultados obtenidos de actividad biológica que estos presentarían.

De los 15 extractos sometidos a evaluación, los extractos de tallos de *M. albida* obtenidos con hexano 100% (MaTH), acetato de etilo 100% (MaTA) e hidroalcohólico (95:05 MeOH:H₂O) (MaTHA) tuvieron actividad a una concentración de 12.5, 25, 50 y 100 mg/mL contra *S. aureus* ATCC BAA 1026. Se utilizó vancomicina como control negativo de crecimiento mismos que se muestran en las tablas 7 a 9.

Cabe enunciar que estas pruebas fueron realizadas por triplicado y los datos mostrados son los promedios de las tres mediciones.

Tabla 7. Porcentaje de efecto inhibitorio del extracto MaTH contra *S. aureus* ATCC BAA 1026.

| Concentración del extracto total (mg) | Promedio de diámetros (mm) |
|---------------------------------------|----------------------------|
| 12.5 | 0 |
| 25 | 11.5 |
| 50 | 11.66 |
| 100 | 12.5 |

Tabla 8. Porcentaje de efecto inhibitorio del extracto MaTA contra *S. aureus* ATCC BAA 1026.

| Concentración del extracto total (mg) | Diámetro de inhibición 1 (mm) | Diámetro de inhibición 2 (mm) | Diámetro de inhibición 3 (mm) | Promedio de diámetros (mm) | Porcentaje de efecto inhibitorio con relación al control (%) |
|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--|
| 12.5 | 10 | 8 | 8 | 8.6 | 34.85 |
| 25 | 10 | 9 | 8 | 9 | 36.49 |
| 50 | 11 | 10 | 9 | 10 | 40.55 |
| 100 | 12 | 11 | 10 | 11 | 44.60 |
| Control | 24 | 25 | 25 | 24.66 | |

Tabla 9. Porcentaje de efecto inhibitorio del extracto MaTHA contra *S. aureus* ATCC BAA 1026.

| Concentración del extracto total (mg) | Diámetro de inhibición 1 (mm) | Diámetro de inhibición 2 (mm) | Diámetro de inhibición 3 (mm) | Promedio de diámetros (mm) | Porcentaje de efecto inhibitorio con relación al control (%) |
|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--|
| 12.5 | 8 | 7 | 8 | 7.6 | 30.4 |
| 25 | 9 | 9 | 9 | 9 | 36 |
| 50 | 10 | 9 | 10 | 9.6 | 38.4 |
| 100 | 9 | 11 | 11 | 10.3 | 41.2 |
| Control | 25 | 26 | 24 | 25 | |

Control positivo (+): Vancomicina



Figura 3. Extracto de MaTH contra *S. aureus* ATCC BAA 1026.



Figura 4. Extracto de MaTA contra *S. aureus* ATCC BAA 1026.



Figura 5. Extracto de MaTHA contra *S. aureus* ATCC BAA 1026.

De las pruebas realizadas en las tres cepas de bacterias, los extractos solo inhibieron a *S. aureus* en concentraciones de 12.5 y hasta 100 mg/mL, frente a ATCC *Staphylococcus aureus* BAA 1026. En dichas tablas se observa que el porcentaje de inhibición es dependiente de la concentración aplicada en cada ensayo.

Para la interpretación de las medidas de los halos de inhibición como sensible, intermedio o resistente, se usaron los datos descritos en la siguiente tabla (Cavalieri *et al*, 2005).

Tabla 10. Criterios interpretativos de medidas de halos de inhibición contra *S. aureus*.

| Interpretación de resultados | | |
|------------------------------|----------------|--------------|
| Resistente (R) | Intermedio (I) | Sensible (S) |
| 6-16 mm | 17-21 mm | 22-34 mm |

Al comparar las medidas de los halos de inhibición proporcionadas por los extractos evaluados (Tabla 7-9 y figuras 3-5) con criterios interpretativos se observa que *S. aureus* es resistente (R) a las concentraciones de extracto evaluados por este método. Esto podría indicar una cierta resistencia del microorganismo a los componentes que los extractos pudieran contener.

S. aureus, es un microorganismo de la flora normal que está asociado con la piel, glándulas de la piel y membranas mucosas. Por lo que la capacidad de volverse un agente invasor de su huésped a través de diversos factores de virulencia y la rápida adquisición de fenómenos de resistencia a múltiples fármacos lo convierte en uno de los patógenos bacterianos más notorios en la especie humana. Debido a ello, el tratamiento de estas infecciones ha estado en constante evolución (Rodríguez y Vesga, 2005, Tadesse *et al*, 2018).

Dentro de los mecanismos en que las bacterias se vuelven resistentes a los medicamentos se sabe que la bacteria produce enzimas que destruyen al agente antimicrobiano antes de que este alcance su blanco o lo modifica para que este no sea reconocible por su diana farmacológica, por ejemplo; la producción de β -lactamasas que hidrolizan el anillo β -lactámico de las penicilinas como la metilicina y oxilicina. Otro mecanismo de resistencia se refiere a la presencia del gene *erm* que modifica la unión ribosómica de los macrólidos como eritromicina, lincosamidas y estreptograminas B. Por otro lado, en años recientes se han descrito mecanismos de resistencia a vancomicina, en parte se debe al engrosamiento de la pared celular misma que contiene precursores capaces de fugar al fármaco extracelularmente, aunque este fenómeno no está del todo claro (Cavaliere *et al*, 2005, Munita y Arias, 2016) Con base a lo anterior, alguno de estos mecanismos puede estar interviniendo en la no inhibición de estos extractos frente a esta bacteria. Sin embargo; queda aislar e identificar a los metabolitos presentes en estos extractos ya que se ha demostrado que los eventos de sinergia o antagonismo por la interacción de una o más moléculas en los extractos puede afectar la actividad antimicrobiana vista en la evaluación por el método de Kirby-Bauer.

De acuerdo con lo descrito por Avellaneda y colaboradores (2005), una cepa bacteriana es muy sensible cuando la sustancia evaluada presenta una CMI inferior a 12.5 mg/ml, de mediana sensibilidad, entre 12.5 y 50 mg/mL y de baja sensibilidad cuando la CMI está entre 50 a 100 mg/mL. Así mismo, queda pendiente la determinación de la CMI de estos extractos y compuestos puros por métodos cuantitativos como lo es el método de difusión en pozo.

8. Conclusiones

Los extractos de tallos de *M. albida* evaluados mediante la técnica de Kirby-Bauer presentaron actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* ATCC BAA 1026 en concentraciones a partir de 25 mg/mL para el extracto hexánico y 12.5 mg/mL para el extracto de acetato de etilo e hidroalcohólico. Sin embargo, los halos de inhibición obtenidos en la prueba indican cierta resistencia del microorganismo hacia los extractos evaluados.

Dentro del estudio químico, del extracto de hojas de acetato de etilo (MaTA) se aisló un compuesto el cual, mediante técnicas de RMN uni y bidimensional y CG-EM, fue identificado como mezclas de ferulatos de alquilo, entre los cuales está el ferulato de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecenilo (**50**).

Así mismo, del extracto hidroalcohólico de hojas de *M. albida* (MaTHA) se aisló un polvo amarillento de la fracción con clave MaHHA-3-5, el cual fue identificado como Quercetin 3-O- β -D-ramnósido (**9**). Estos compuestos se reportan por primera vez para la especie en estudio.

El estudio químico-farmacológico de la planta *Mimosa albida* permite contribuir a validar el uso etnomédico que se le da en la medicina tradicional mexicana.

9. Perspectivas

Determinar la CMI de los extractos de tallos de *Mimosa albida* hexánico (MaTH), de acetato de etilo (MaTA) e hidroalcohólico (MaTHA) haciendo una prueba cuantitativa como lo es el método de difusión en pozo.

Determinar de manera inequívoca la estructura de la mezcla de compuestos entre los cuales se encuentra el compuesto **49**.

Realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana por los métodos de Kirby-Bauer y difusión en pozo de ferulato de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecenilo (**50**) y Quecetin 3-O- β -D-ramnósido (**9**).

Realizar la separación y aislamiento de los compuestos presentes en los extractos activos MaHT, MaTA y MaTHA.

10. Referencias bibliográficas

Aguiar, R. M., Alves, C. Q., David, J. M., Rezende, L. C. D., Lima, L. S., David, J. P., y Queiróz, L. P. D. Antioxidant activities of isolated compounds from stems of *Mimosa invisa* Mart. ex Colla. *Química Nova*, **2012** 35(3), 567-570 pp.

Ahuchaogu, A. A.; Chukwu, O. J.; Echeme, J. O. Secondary Metabolites from *Mimosa pudica*: Isolation, Purification and NMR Characterization. *IOSR J. Appl. Chem.* **2017**, 10 (3), 15–20 pp.

Arredondo-García, J. L., Soriano-Becerril, D., Solórzano-Santos, F., Arbo-Sosa, A., Coria-Jiménez, R., & Arzate-Barbosa, P. Resistance of uropathogenic bacteria to first-line antibiotics in Mexico City: a multicenter susceptibility analysis. *Current therapeutic research*, **2007**, 68(2), 120-126.

Avellaneda, S., Rojas, N. M., Cuéllar, A., Fonseca, R. M. Actividad antibacteriana de *Diphysa minutifolia* Rose. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **2005**, 10(2), 41-47.

Baranowski, J. D., y Nagel, C. W. Properties of alkyl hydroxycinnamates and effects on *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1983**, 45(1), 218-222.

Barbieri, R., Coppo, E., Marchese, A., Daglia, M., Sobarzo-Sanchez, E., Nabavi, S. F., y Nabavi, S. M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. *Microbiological research*, **2017**, 196, 44-68.

Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., y Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J clin pathol*, **1966**, 45(4), 493-496.

Benedí, J., y Raposo, C. Infecciones urinarias: antibioterapia. *Farmacia Profesional*, **2005**, 19(4), 52-59 pp.

Bernal, R., y Guzmán, M. El antibiograma de discos. Técnica de Kirby-Bauer. *Biomédica*, **1984**, 4(3), 112-121.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana (BDMTM) <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Mimosa%20albidia&id=7792> (Consultado 20 de noviembre 2018).

Buchanan B., Grisse W. y Jones R. Natural products (secondary metabolites). En: Croteau, R., Kutchan, T. M., & Lewis, N. G. Editores. *Biochemistry and molecular biology of plants*. 2nd. ed. New Jersey: American Society of Plant Physiologists. **2000**. p. 1250-1319.

Bussmann, R.W., Malca, G., Glenn, A., Sharon, D., Nilsen, B., Parris, B., Dubose, D., Ruiz, D., Saleda, J., Martinez, M., Carillo, L., Walker, K., Kuhlman, A., Townesmith, A. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology* 137. **2011**, 121–140.

Butler, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, **2004**, 67(12), 2141-2153.

Camargo Ricalde, S. L. Modelación de la distribución real y potencial de especies de dos géneros de Mimosoideae: *Mimosa* y *Prosopis* (Leguminosae) en México. **2016**, Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. JM050**. México, D.F.

Camargo-Ricalde, S. L., Greter, R., Martínez-Bernal, A., García-García, V., y Barrios-del-Rosal, S. Useful species of the genus *Mimosa* (Fabaceae-Mimosoideae) en Mexico. *Botanical Sciences*, **2001**, (68), 33-44 pp.

Cavaliere, S. J., Harbeck, R. J., McCarter, Y. S., Ortez, J. H., Rankin, I. D., Sautter, R., Sharp, S. E. y Spiegel, C. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. en *Library of Congress Cataloging-in-Publication Data*, **2005**.

Cedillo-Portugal, E. *Las plantas útiles del Municipio de Tepoztlán, Morelos* (Doctoral dissertation, MSc. Thesis, Fac. Ciencias, UNAM, México), 1990.

Chukwu, O. J.; Ahuchaogu, A. A.; Ukaogo, P. O.; Obike, A. I.; Bull, J.; Echeme, O. Editor(s): (1) Fahmida Khan. *Orig. Res. Artic. Chukwu al* **2017**, 2 (4), 1–5 pp.

CIOCAN, I., y Bara, I. (2007). Plant products as antimicrobial agents. *Analele Științifice Ale Universității Alexandru Ioan Cuza din Iași, Secțiunea II A. Genetica și Biologie Moleculară*, **2007**, 8(2), 151-156.

Cragg, G. M., y Newman, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, **2013**, 1830(6), 3670-3695.

Domergue, F., y Kosma, D. K. Occurrence and biosynthesis of alkyl hydroxycinnamates in plant lipid barriers. *Plants*, **2017**, 6(3), 1-17.

Domínguez, X. A.; García G, S.; Williams, H. J.; Ortiz, C.; Scott, A. I.; Reibenspies, J. H. Kukulkanins A and B, New Chalcones from *Mimosa tenuifolia*. *J. Nat. Prod.*, **1989**, 52 (4), 864–867 pp.

Durán, L. Resistencia antimicrobiana e implicancias para el manejo de infecciones del tracto urinario. *Revista Médica Clínica Las Condes*, **2018**, 29(2), 213-221.

Fernández, P. L., González, A. M., Cerro, J. C. L., Hernández, I. L., y Sánchez, M. Á. M. *Velazquez: Manual de Farmacología (Spanish Edition)* (18ª ed.), Madrid, España: Editorial Médica Panamericana S.A., **2008**.

Guirado, O. A., y Cuéllar, A. C. Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **2008**, 13(3).

Gupta, P. D. y Birdi, T. J. Development of Botanicals to Combat Antibiotic Resistance. *J. Ayurveda Integr. Med.* **2017**, 8 (4), 266–275.

He, D., Simoneit, B. R., Jara, B., y Jaffé, R. 2015. Gas chromatography mass spectrometry based profiling of alkyl coumarates and ferulates in two species of cattail (*Typha domingensis* P., and *Typha latifolia* L.). *Phytochemistry Letters*, **2015**, 13, 91-98.

Hermenean, A., Smeu, C., Gharbia, S., Krizbai, I. A., y Ardelean, A. Plant-derived biomolecules and drug delivery systems in the treatment of liver and kidney diseases. *Current pharmaceutical design*, **2016**, 22(35), 5415-5441.

Hernández-Cárdenas, R. A., Cerros-Tlatilpa, R., y Flores-Morales, A. Las plantas vasculares y vegetación de la barranca Tepecapa en el municipio de Tlayacapan, Morelos, México. *Acta botánica mexicana*, **2014**, (108), 11-38 pp.

Huang, Z. R., Lin, Y. K., y Fang, J. Y. Biological and pharmacological activities of squalene and related compounds: potential uses in cosmetic dermatology. *Molecules*, **2009** 14(1), 540-554.

Hussain, N.; Modan-H, M.; S. Ghulam-S, S.; Zaidi S. A. H. Antimicrobial Principles in *Mimosa hamata*. *J. Nat. Prod.* **1979**, 42 (5), 525–527 pp.

Jiang, Y.; Haag-B., M.; Anton, R.; Massiot, G.; Lavaud, C.; Teulon, J.; Guéchet, C. Structure of a New Saponin from the Bark of *Mimosa tenuiflora*. *J. Nat. Prod.*, **1991**, 54 (5), 1247–1253 pp.

Jirovetz, L., Bail, S., Buchbauer, G., Denkova, Z., Slavchev, A., Stoyanova, A., Schmidt, E. y Geissler, M. Antimicrobial testings, gas chromatographic analysis and olfactory evaluation of an essential oil of hop cones (*Humulus lupulus* L.) from Bavaria and some of its main compounds. *Scientia Pharmaceutica*, **2006**, 74(4), 189.

Jirovetz, L., Buchbauer, G., Ngassoum, M. B., y Geissler, M., Aroma compound analysis of *Piper nigrum* and *Piper guineense* essential oils from Cameroon using solid-phase microextraction–gas chromatography, solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry and olfactometry. *Journal of Chromatography A*, **2002**, 976(1-2), 265-275.

Kolattukudy, P. E., y Espelie, K. E. Chemistry, biochemistry, and function of suberin and associated waxes. *Natural products of woody plants*, **1989**, 304-367.

Lai, P. K., y Roy, J. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current medicinal chemistry*, **2004**, 11(11), 1451-1460.

Latha, P. S., y Kannabiran, K. Antimicrobial activity and phytochemicals of *Solanum trilobatum* Linn. *African Journal of Biotechnology*, **2006**, 5(23), 2402-2404.

Lin, L. C., Chiou, C. T., y Cheng, J. J.; 5-Deoxyflavones with Cytotoxic Activity from *Mimosa diplotricha*; *Journal of natural products*; **2011**; 74(9); 2001-2004 pp.

Lippincott Williams y Wilkins. *Lippincott's Guide to Infectious Diseases*. McKinney, M. (Ed.). **2011**, 258-259 pp.

Martínez P., I. Cáncer y medicina alternativa, *Rev Cubana Oncol* **1999**;15(2): 77-80

Martínez-Bernal, A., Grether, R., y González-Amaro, R. M. Leguminosae I. Mimosoideae: *Mimosa*. **2008**, Fascículo 147; Instituto de Ecología, Flora de Veracruz, 25-33 pp.

Munita, J. M., y Arias, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 2016, 481-511.

Ocegueda, S., Moreno, E., & Koleff, P. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas*, **2005**, 62, 12-15pp.

Páramo-Rivas, F., Tovar-Serrano, A., y Rendón-Macías, M. E. Resistencia antimicrobiana en pacientes con infección de vías urinarias hospitalizados en el servicio de Medicina Interna del Nuevo Sanatorio Durango, de enero a diciembre de 2013. *Medicina Interna de Mexico*, **2015**, 31(1), 34-40.

Park, Y. J., Baskar, T. B., Yeo, S. K., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Lim, S. S., Park, S. U., Composition of volatile compounds and in vitro antimicrobial activity of nine *Mentha* spp. *SpringerPlus*, **2016**, 5(1), 1628.

Ragasa, C. Y., Ng, V. A. S., Agoos, E. M. G., y Shen, C. C. Chemical constituents of *Cycas vespertilio*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2015**, 25(5), 526-528.

Ramírez, L. S., y Castaño, D. M. Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et technica*, **2009**, 15(42), 263-268.

Rejón-O., Perdomo-S., Rejón-R., Hernández-H., García-L., López-R., Pérez-dlM. Aqueous root extracts from *Mimosa albida* Humb. & Bonpl. ex Willd display antinociceptive activity in mice. *Journal of ethnopharmacology* 149. **2013**, 522-526.

Rodríguez, C. A., y Vesga, O. *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. *Biomédica*, **2005**, 25(4), 575-587.

Rodríguez, G. J. Á., y de la Garza, P. J. J. *Compendio de microbiología médica (Spanish Edition)* (1ª ed.), Madrid, España: Elsevier, **1999**.

Savithamma, N., Rao, M. L., y Suhulatha, D. Screening of medicinal plants for secondary metabolites. *Middle-East Journal of Scientific Research*, **2011**, 8(3), 579-584.

Seidl, P. R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. *Anais da Acad. Bras. Ciências*, **2002**, 74(1), 145-150.

Tadesse, S., Alemayehu, H., Tenna, A., Tadesse, G., Tessema, T. S., Shibeshi, W., y Eguale, T. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from patients with infection at Tikur Anbessa Specialized Hospital, Addis Ababa, Ethiopia. *BMC Pharmacology and Toxicology*, **2018**, 19(1), 1-8.

Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., y Borges, F. Hydroxycinnamic acid antioxidants: an electrochemical overview. *BioMed research international*, **2013**, 2013, 1-11.

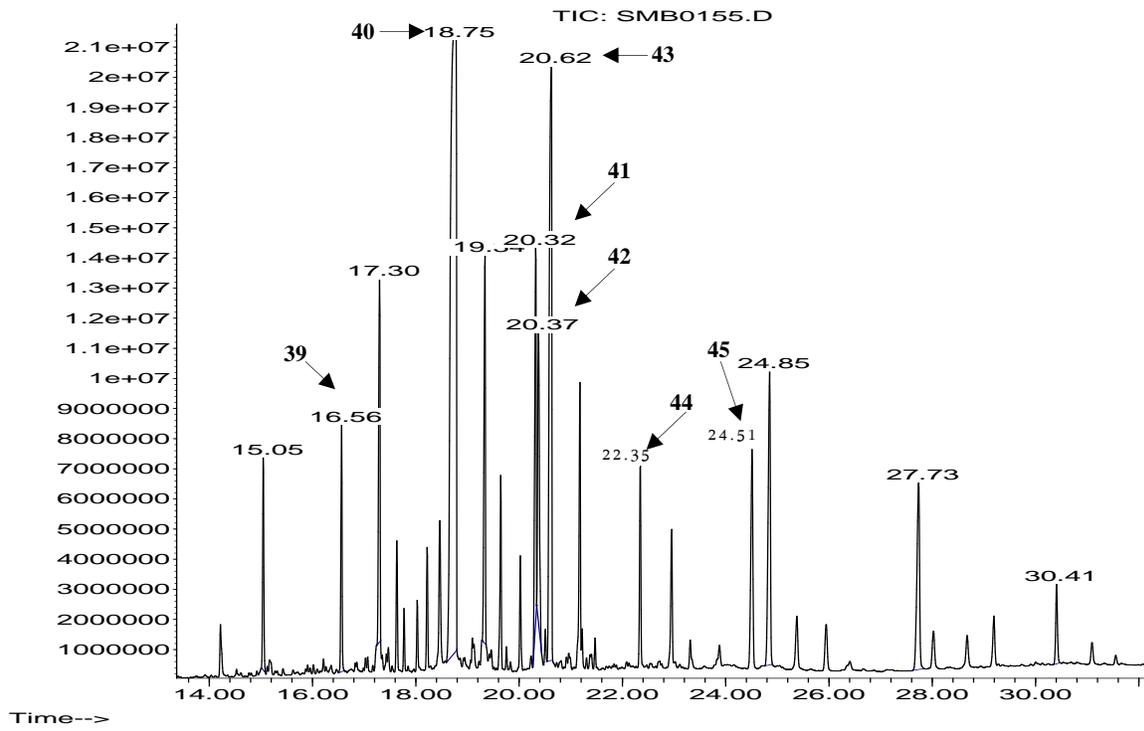
Waage, S. K., y Hedin, P. A. Quercetin 3-O-galactosyl-(1→ 6)-glucoside, a compound from narrowleaf vetch with antibacterial activity. *Phytochemistry*, **1985**, 24(2), 243-245.

Wang, S., Yao, J., Zhou, B., Yang, J., Chaudry, M. T., Wang, M., Xiao, F., Li, Y. y Yin, W. Bacteriostatic effect of quercetin as an antibiotic alternative *in vivo* and its antibacterial mechanism *in vitro*. *Journal of food protection*, **2018**, 81(1), 68-78.

Wein, A. *Campbell-Walsh Urología*, Anthony J. Schaeffer y Edward M. Schaeffer Sección 4: Infecciones e inflamación. Capítulo 10: Infecciones urinarias. Décima edición, Editorial Médica Paramericana, **2015**, 257-327 pp.

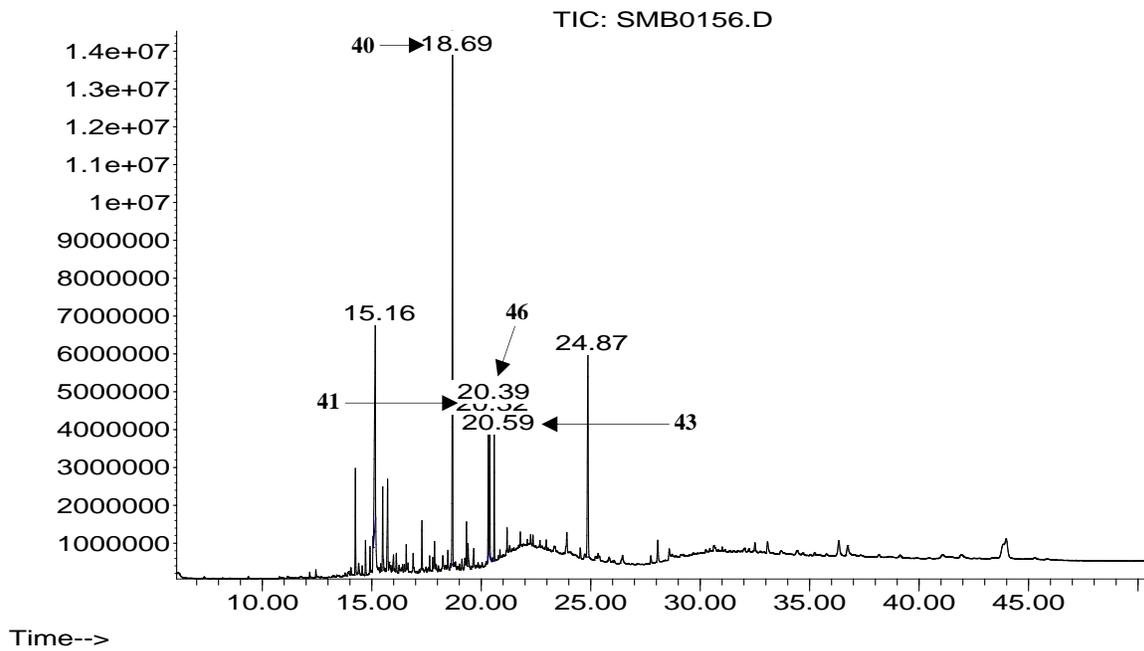
11.Anexos

Abundance

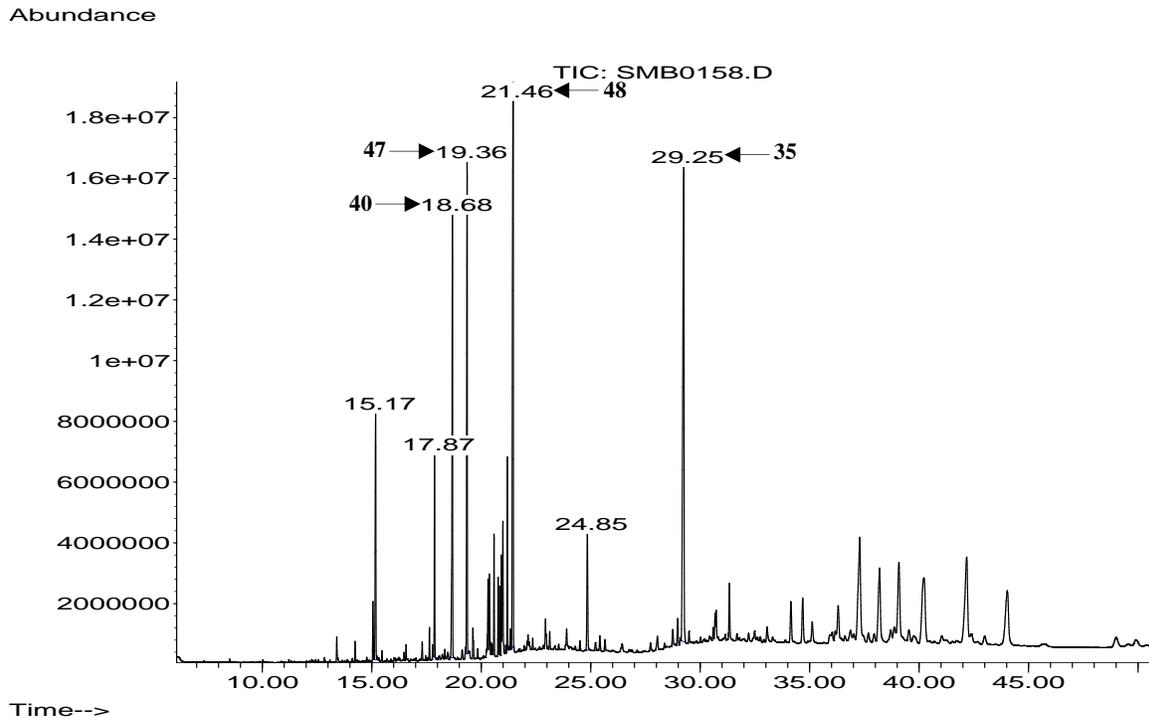


Anexo 1. Cromatograma de CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A1.

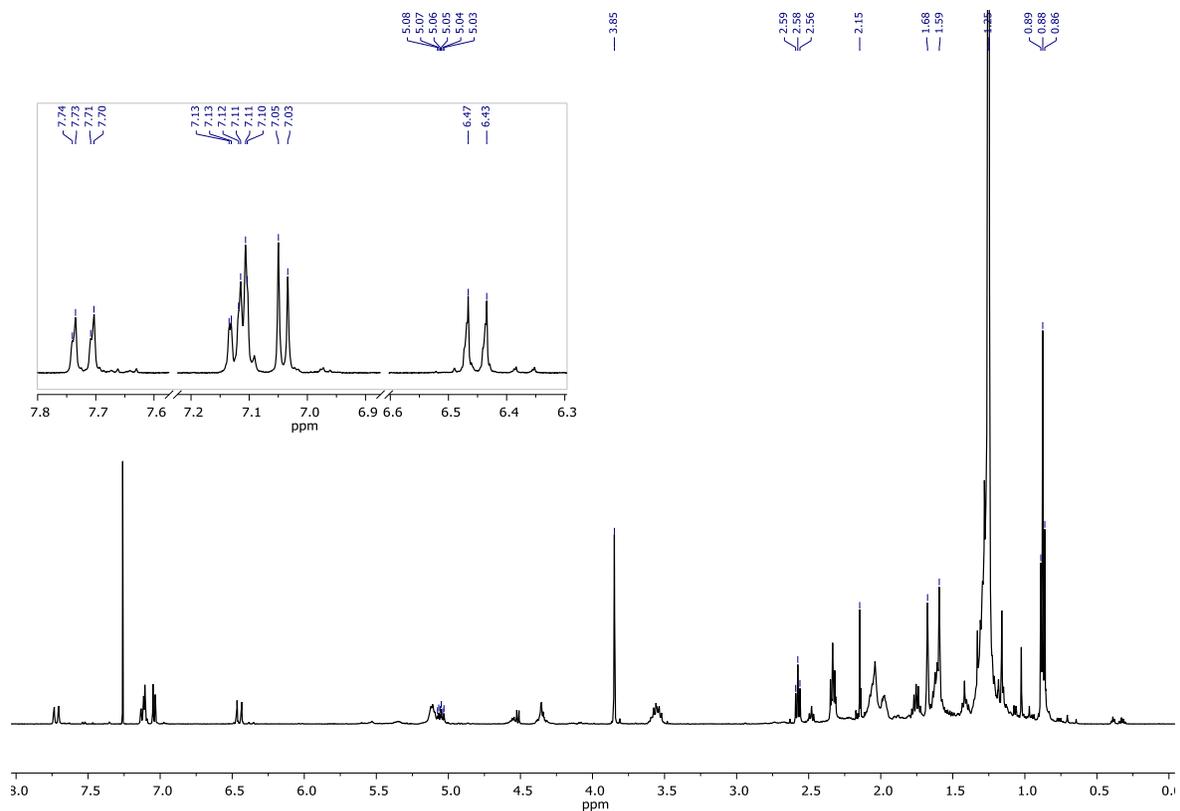
Abundance



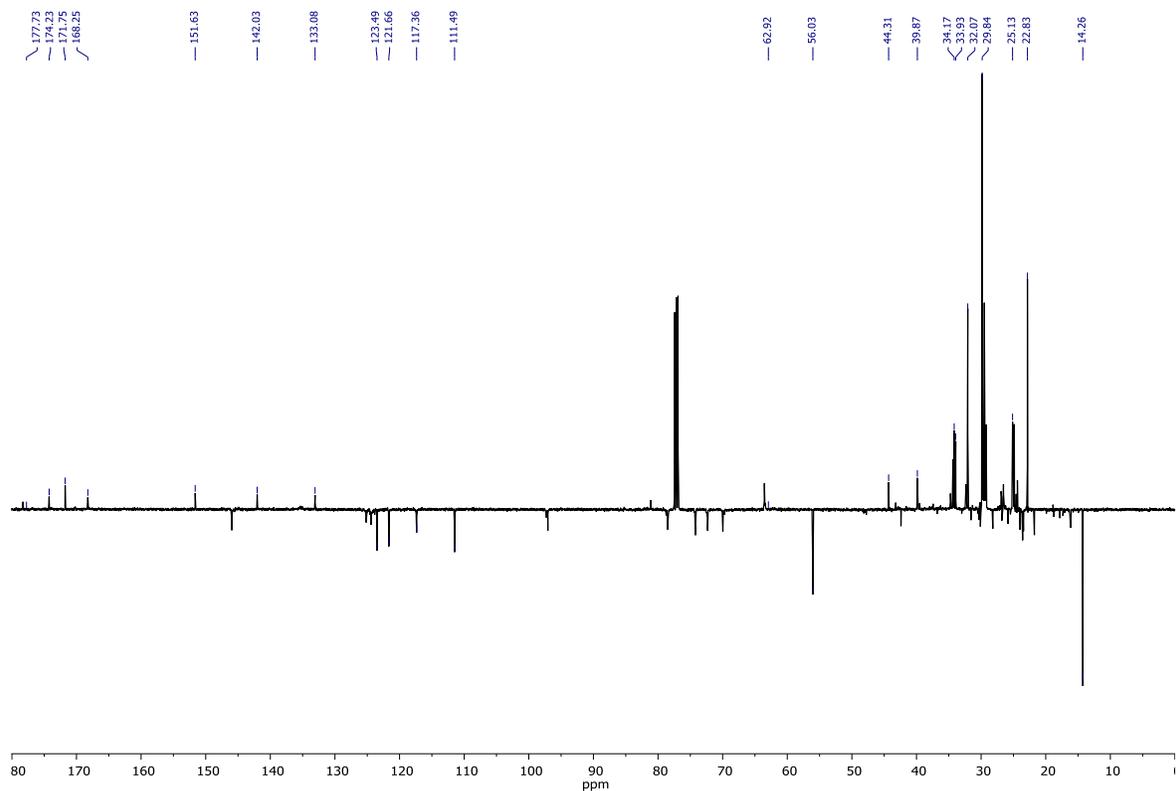
Anexo 2. Cromatograma de CG-EM de la purificación de MaHA-4-8A3.



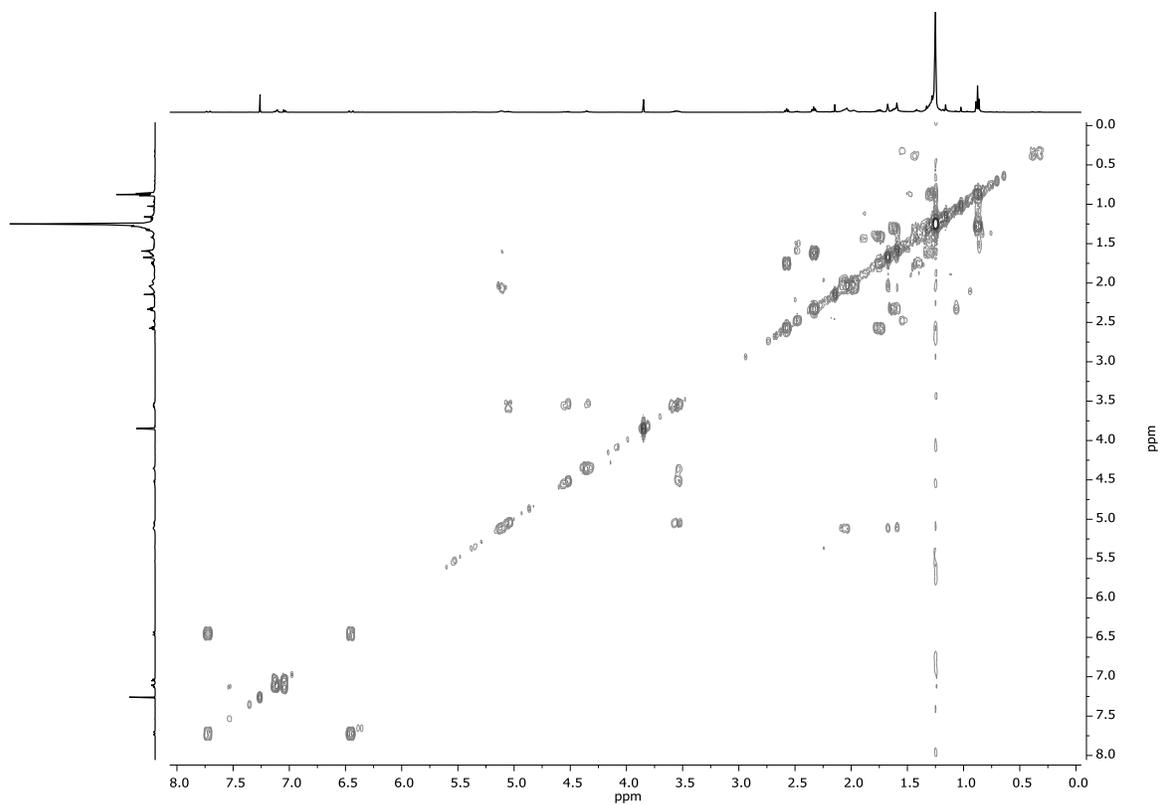
Anexo 3. Cromatograma de CG-EM de MaHA-4-11C.



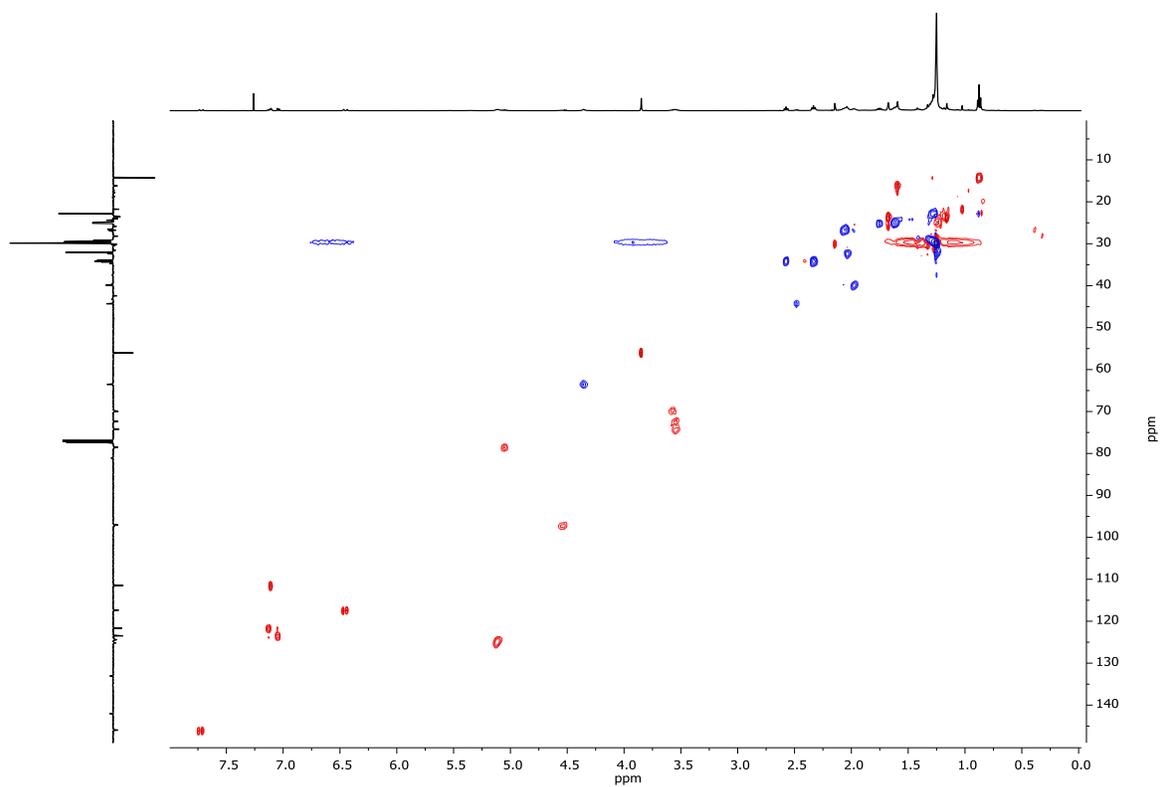
Espectro 6. Experimento de $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, CDCl_3) de (50).



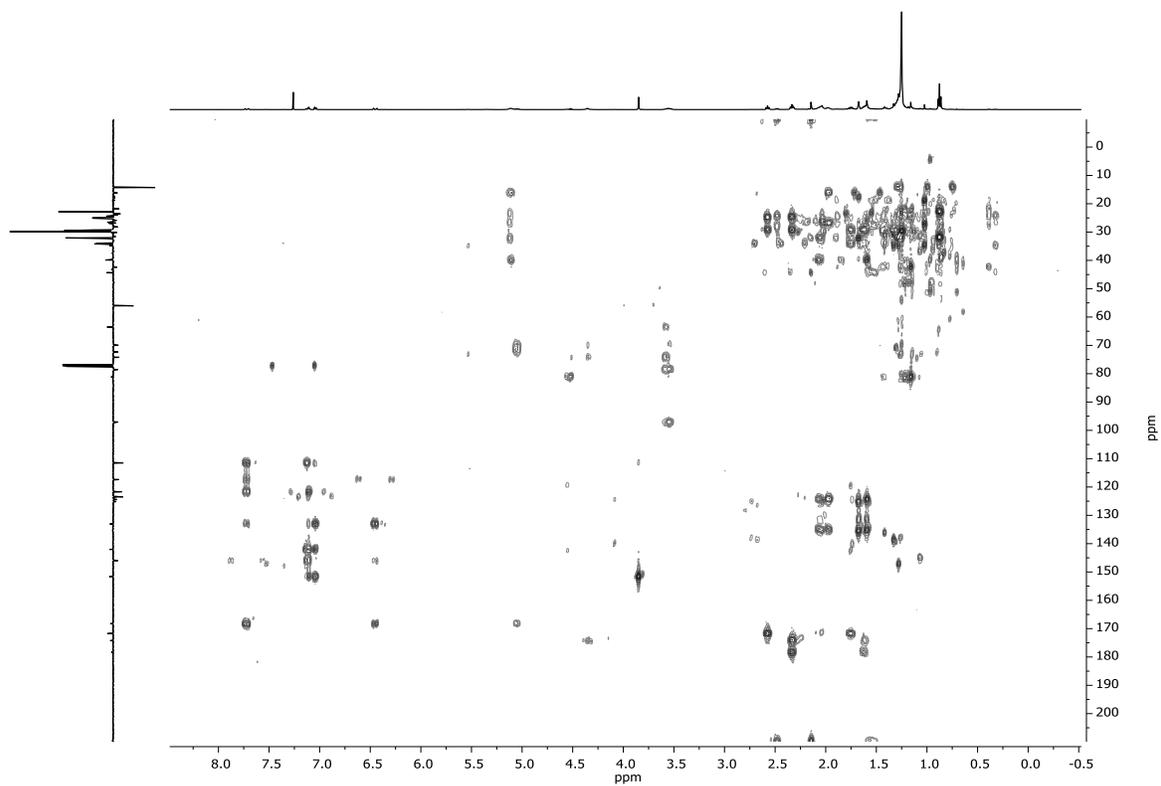
Espectro 7. Experimento de DEPTQ (125 MHz, CDCl_3) de (50).



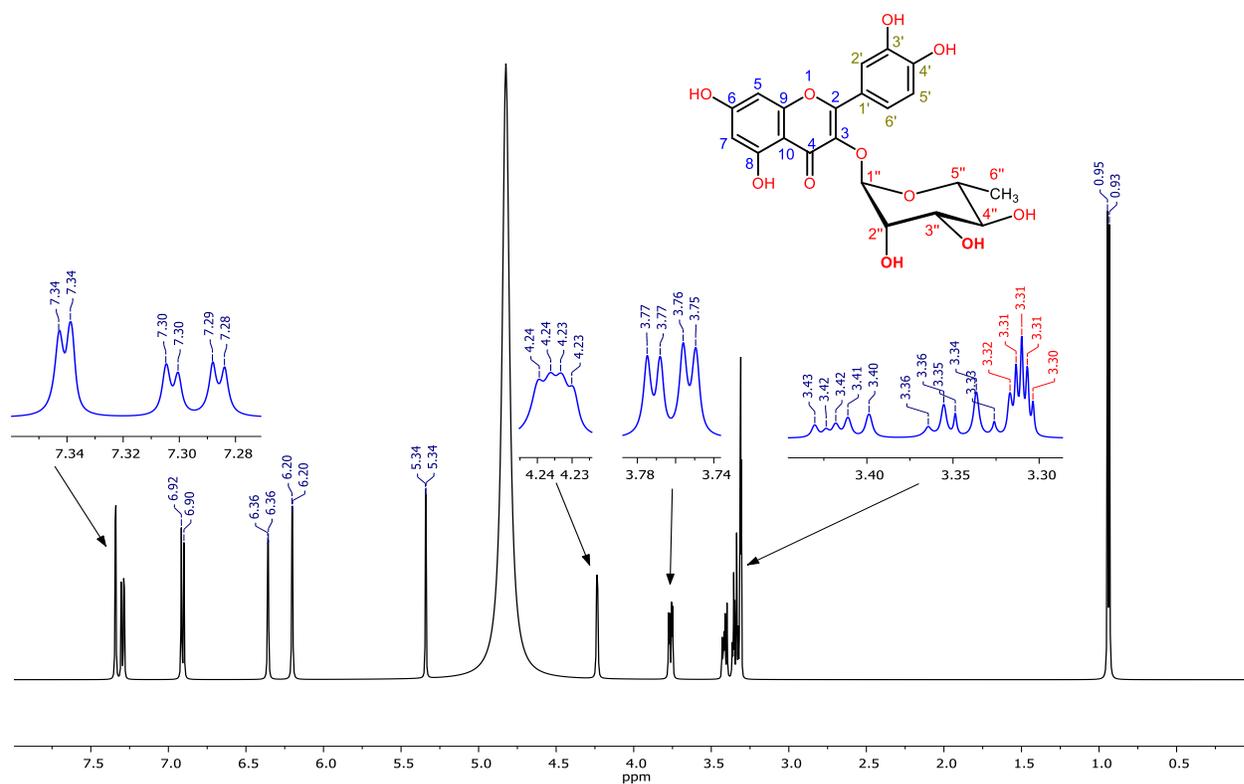
Espectro 8. Experimento de COSY (500 MHz, CDCl₃) de (50).



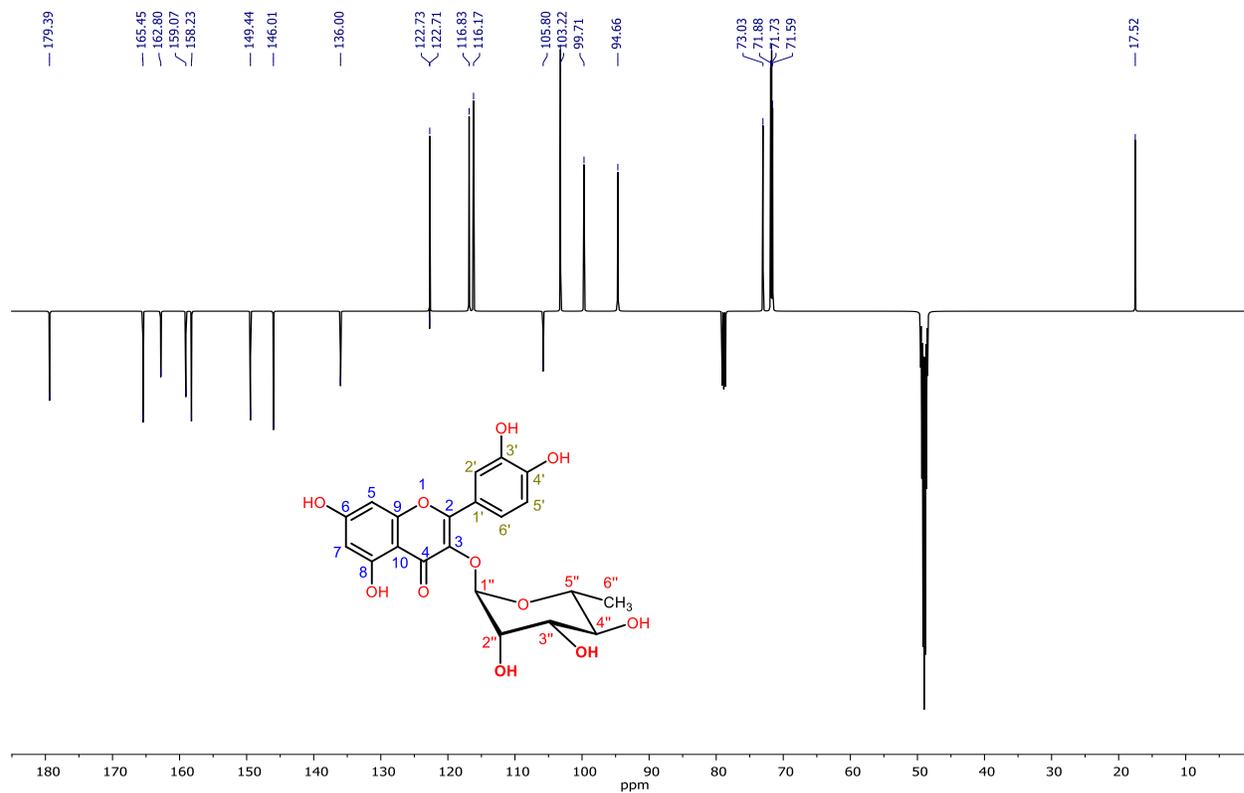
Espectro 9. Experimento de HSQC de (50).



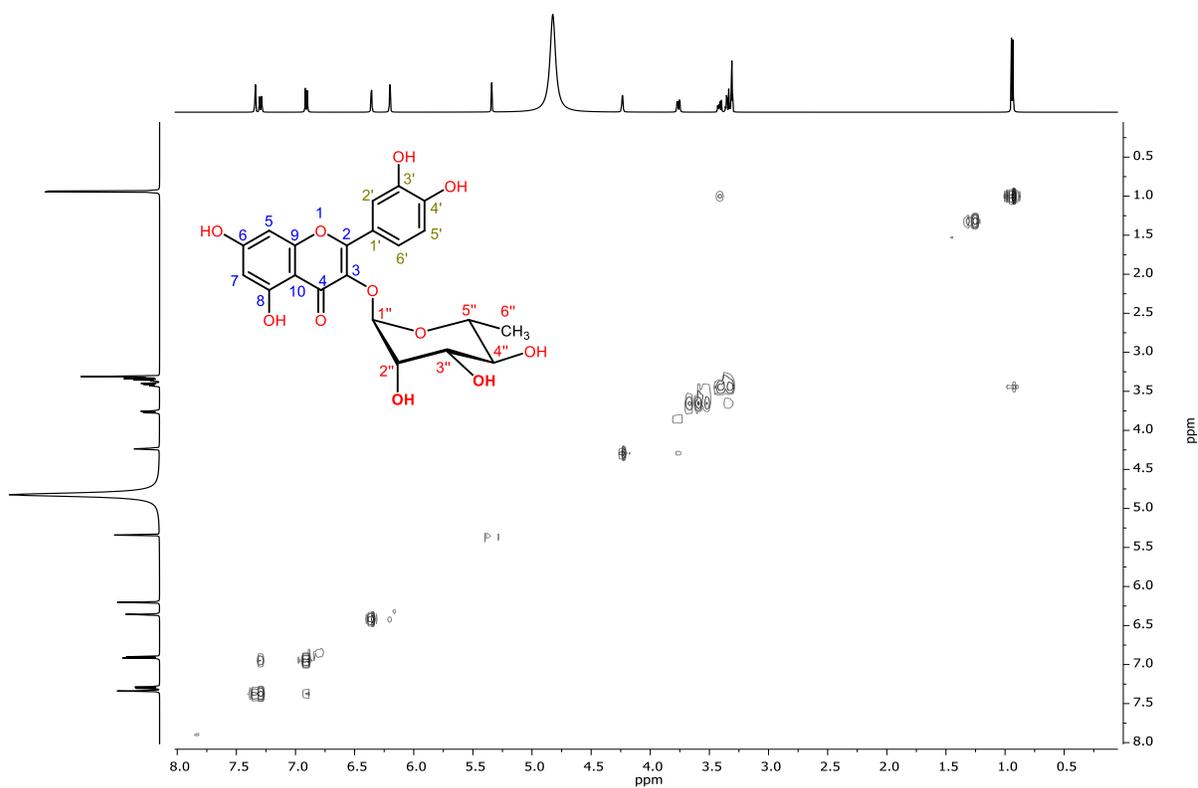
Espectro 10. Experimento de HMBC de (50).



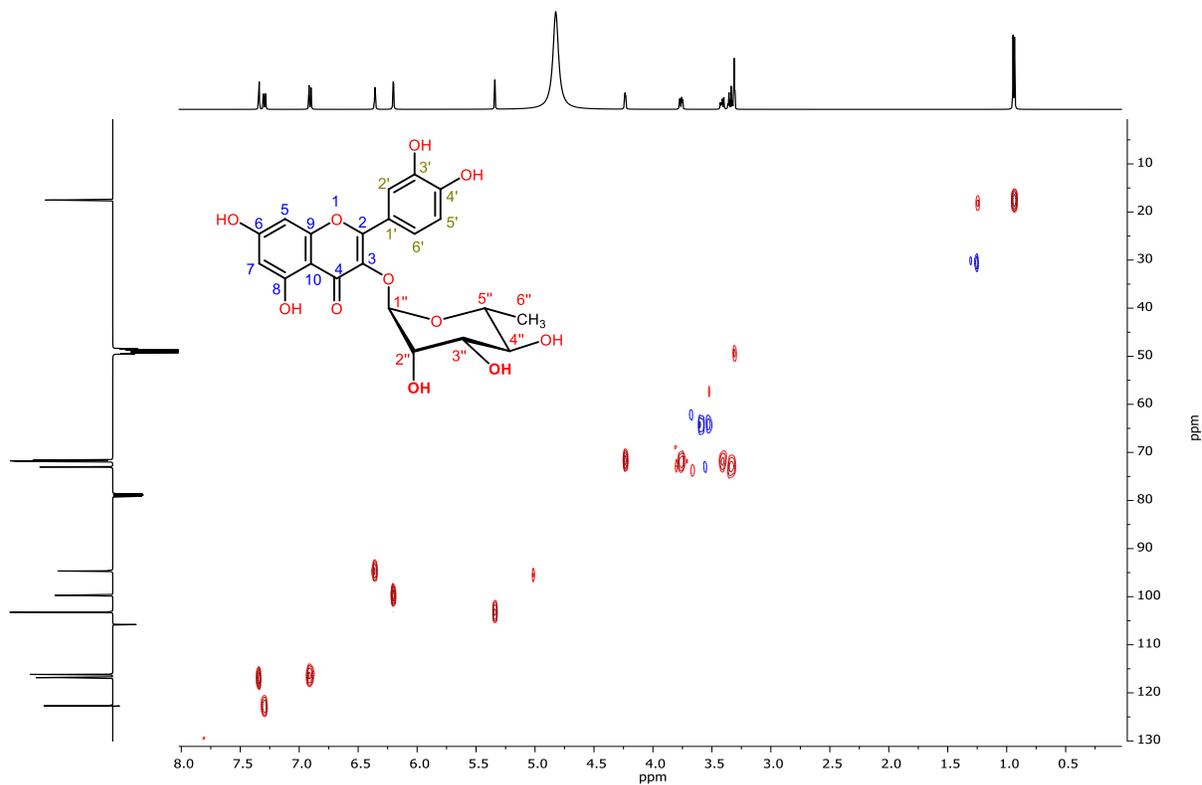
Espectro 11. Experimento $^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CH}_3\text{OD}$) de (9).



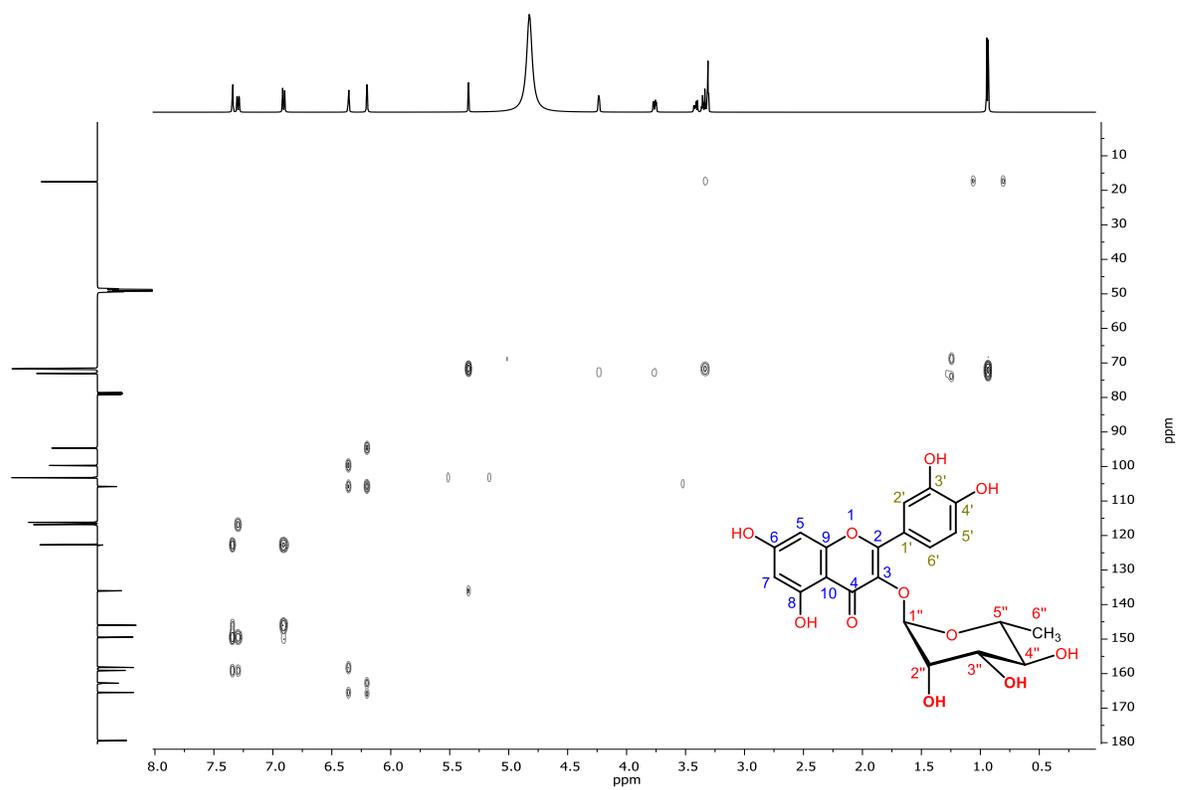
Espectro 12. Experimento DEPTQ (125 MHz, $\text{CDCl}_3/\text{CH}_3\text{OD}$) de (9).



Espectro 13. Experimento COSY (500 MHz, CDCl₃/CH₃OD) de (9).



Espectro 14. Experimento HSQC de (9).



Espectro 15. Experimento HMBC de (9).