



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad de Ciencias
Químicas e Ingeniería

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**Estudio fitoquímico y evaluación antibacteriana de partes aéreas
de *Ludwigia octovalvis*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIATURA EN QUÍMICA INDUSTRIAL

PRESENTA

CARLOS DANIEL OCAMPO RIVERA

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. SILVIA MARQUINA BAHENA.

Cuernavaca, Morelos

Julio, 2023



El presente proyecto titulado “Estudio fitoquímico y evaluación antibacteriana de partes aéreas de *Ludwigia octovalvis*”, realizado por el C. Carlos Daniel Ocampo Rivera fue desarrollado en el laboratorio 307 de Biomoléculas en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIQ-UAEM) bajo la dirección de la M. en C. Silvia Marquina Bahena.

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



Índice

Índice de abreviaturas	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Antimicrobianos	5
2.2 Infecciones en vías urinarias en México	5
2.3 Antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones en vías urinarias	6
2.4 Resistencia bacteriana	8
2.5 Uso de plantas medicinales	8
2.6 <i>Ludwigia octovalvis</i>	9
2.7 Distribución en México y Morelos	10
2.8 Botánica	10
2.9 Usos etnomédicos	12
2.10 Antecedentes fitoquímicos	12
2.11 Antecedentes farmacológicos de <i>Ludwigia octovalvis</i>	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	17
5.1 Objetivo general	17
5.2 Objetivos específicos	17
6. PARTE EXPERIMENTAL	18
6.1 Equipos y reactivos	18
6.1.1 Cromatografía en columna (C.C.)	18
6.1.2 Cromatografía en capa fina (C.C.F)	18
6.1.3 Resonancia Magnética Nuclear	18
6.1.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y espectrometría de masas de alta resolución	18
6.1.5 Infrarrojo	19
6.2 Material vegetal	19
6.3 Preparación de extractos	20
6.4 Fraccionamiento cromatográfico del extracto hidroalcohólico de <i>L. octovalvis</i>	20
6.4.1 Purificación de la fracción LoHA-3	22
6.4.2 Purificación de la fracción LoHA-4	23

6.4.3	Purificación de la fracción LoHA-5	24
6.4.4	Purificación de la fracción LoHA-9	26
6.5	Fraccionamiento primario del extracto de Diclorometano: metanol (LoDM)	27
6.5.1	Reacción de acetilación de LoDM-3	28
6.5.2	Purificación de la fracción LoDM-3Ac-2	29
6.6	Evaluación de la actividad antimicrobiana	32
6.6.1	Microdilución en caldo	33
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
7.1	Estudio fitoquímico de <i>Ludwigia octovalvis</i>	36
7.1.1	Análisis de CG-EM de LoHA-2	36
7.1.2	Análisis del contenido químico de la fracción LoHA-3	38
7.1.3	Análisis de la Subfracción LoHA-3-2.....	38
7.1.4	Análisis de la Subfracción LoHA-3-3.....	39
7.1.5	Análisis del contenido químico de la fracción LoHA-4	45
7.1.6	Análisis del contenido químico de la fracción LoHA-5	46
7.1.7	Análisis del contenido químico de la fracción LoHA-9	47
7.2	Resultados obtenidos del extracto de Diclorometano: metanol (LoDM).....	48
7.2.1	Purificación de la fracción LoDM-3Ac-2	49
7.2.2	Análisis de la fracción LoDM-3Ac-6.....	51
7.2.3	Purificación de la fracción LoDM-3Ac-8	54
7.3	Evaluación de actividad antimicrobiana	60
8.	Conclusiones	63
9.	Perspectivas	64
10.	Referencias	65
11.	Anexos.....	I

Índice de tablas

Tabla 1. Estudios farmacológicos in vitro de diferentes extractos de <i>L. octovalvis</i>	15
Tabla 2. Extractos obtenidos de la planta silvestre <i>Ludwigia octovalvis</i>	20
Tabla 3. Fracciones obtenidas del extracto hidroalcohólico (LoHA).....	21
Tabla 4. Fracciones obtenidas del grupo LoHA-3.....	22
Tabla 5. Fraccionamiento primario del extracto diclorometano: metanol (LoDM)	27
Tabla 6. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción LoDM-3Ac.....	29
Tabla 7. Purificación de la fracción LoDM-3Ac-2	30
Tabla 8. fracciones obtenida de LoDM-3Ac-8.....	31
Tabla 9. Compuestos identificados por CG-EM en la fracción LoHA-2	37
Tabla 10. Compuestos identificados en la subfracción LoHA-3-3.....	40
Tabla 11. Compuestos identificados en la fracción LoHA-3-3 analizada	42
Tabla 12. Compuestos identificados en la fracción LoHA-3-5 analizada por CG-EM.....	44
Tabla 13. Compuesto identificado en la subfracción LoDM3-Ac-2A analizada por CG-EM.....	50
Tabla 14. Compuesto identificado en la subfracción LoDM-3Ac-2B analizada por CG-EM.....	51
Tabla 15. Compuestos identificados en la fracción LoDM-3Ac-6 analizada por CG-EM.....	53
Tabla 16. Compuestos identificados en la fracción LoDM-3Ac-8B analizada por CG-EM	57
Tabla 17. Cepas bacterianas utilizadas, extracto y fracciones evaluadas.....	61

Índice de figuras

Figura 1. Clasificación taxonómica de <i>Ludwigia octovalvis</i> ^{53, 54}	10
Figura 2. <i>Ludwigia octovalvis</i> (Jacq.) P.H.Raven, imágenes tomadas de la biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana UNAM, CONABIO.	11
Figura 3. A) y B) muestran el perfil químico de los grupos LoHA-1 a LoHA-8 al ser revelados con sulfato cerico amoniaco y C) y D) muestra su perfil químico al ser visualizadas al irradiar luz ultravioleta a 234 nm.	22
Figura 4. <i>Cromatoplasmas de las subfracciones LoHA-3-2, LoHA-3-3, LoHA-3-4 y LoHA-3-5, reveladas con luz ultravioleta a 234 nm. (A, C y F) y Sulfato cérico amoniaco (B, D y E).</i>	23
Figura 5. Sólido amorfo obtenido del grupo de fracciones LoHA-4.....	24
Figura 6. Sólidos obtenidos del grupo de fracciones LoHA-5-1 y LoHA-5-2.....	25
Figura 7. Fracciones obtenidas del fraccionamiento del grupo LoHA-9	27
Figura 8. Cromatografía de fase reversa: LoDM-3 (1), LoDM-4 (2), LoDM-5 (3) y LoDM-6 (6).....	28
Figura 9. Contenido químico en las fracciones LoDM-3Ac-2A y LoDM-3Ac-2B.	30
Figura 10. Contenido químico de la fracción LoDM-3Ac-6	31
Figura 11. CCF de las subfracciones LoDM-3Ac-8A, LoDM-3Ac-8B y LoDM-3Ac-8C. A) Luz UV onda larga (366 nm); B) Luz UV onda corta (234 nm) y C) Revelador sulfato cérico amoniaco	32
Figura 12. Desarrollo de la prueba de microdilución en caldo	34
Figura 13. Compuestos identificados en la fracción LoHA-2.	38
Figura 14. Estructura de los compuestos identificados en la subfracción LoHA-3-3.....	41
Figura 15. Compuestos identificados en la subfracción LoHA-3-4.	43
Figura 16. Estructuras de los compuestos identificados en la subfracción LoHA-3-5	45
Figura 17. Señales de RMN de ¹ H, ¹³ C (200 y 50 MHz, CDCl ₃) del compuesto (34).....	46
Figura 18. Señales de RMN de ¹ H, ¹³ C (500 y 125 MHz, CDCl ₃ :CD ₃ OD) del compuesto (35).....	47

Figura 19. Espectro HSQC (500 MHz, CD ₃ OD) de la subfracción LoHA-9-2.....	48
Figura 20. Cromatograma obtenido para la subfracción LoDM3Ac-2 ^a	49
Figura 21. Cromatograma obtenido para la subfracción LoDM3Ac-2B.....	51
Figura 22. Espectros de RMN de ¹ H y ¹³ C de la fracción LoDM-3Ac-6.....	52
Figura 23. Compuestos identificados en la fracción LoDM-3Ac-6.....	54
Figura 24. RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) del 5-metil-2H-pirano[3,2-c] piridin-2-ona (43).....	56
Figura 25. espectrometría de masas-masas FAB + y alta resolución del compuesto (43).....	56
Figura 26. Cromatograma obtenido para la subfracción LoDM3Ac-8B.....	57
Figura 27. Compuestos identificados en la subfracción LoDM3Ac-8B.....	58
Figura 28. RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) de la subfracción LoDM-3Ac-8B.....	59
Figura 29. espectrometría de Masas-Masas FAB + y alta resolución del compuesto (45).....	60
Figura 30. Compuestos identificados en la fracción LoDM-3.....	62

Índice Cromatogramas

Cromatograma 1. Contenido químico de la fracción LoHA-2.....	37
Cromatograma 2. Componente principal identificado en la subfracción LoHA-3-2.....	39
Cromatograma 3. Obtenido de la fracción LoHA-3-2 analizada por CG-EM.....	40
Cromatograma 4. Obtenido para la subfracción LoHA-3-4.....	42
Cromatograma 5. Obtenido para la fracción LoHA-3-5 analizada por CG-EM.....	44
Cromatograma 6. Cromatograma de la fracción LoDM-3Ac-6.....	53

Índice de espectros

Espectro 1. RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) del compuesto (36).....	I
Espectro 2 RMN de ¹³ C y.....	II
Espectro 3 DEPT (125 MHz, CDCl ₃) del compuesto (36).....	II
Espectro 4. HSQC (500 MHz, CDCl ₃) del compuesto (36).....	III
Espectro 5. RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de la mezcla de compuestos (36) y (37).....	IV
Espectro 6. RMN de ¹³ C y.....	V
Espectro 7. DEPT (125 MHz, CDCl ₃) de los compuestos (36) y (37).....	V
Espectro 8. HSQC (500 MHz, CDCl ₃) de los compuestos (36) y (37).....	VI
Espectro 9. RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) del compuesto (43).....	VII
Espectro 10. RMN de ¹³ C (150 MHz, CDCl ₃) del compuesto (43).....	VIII
Espectro 11. HSQC (600 MHz, CDCl ₃) del compuesto (43).....	IX
Espectro 12. HMBC (600 MHz, CDCl ₃) del compuesto (43).....	X
Espectro 13. RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) del compuesto (45).....	XI
Espectro 14. HSQC (600 MHz, CDCl ₃) del compuesto (43).....	XII

Índice Espectros IR

Espectro Infrarrojo 1. Compuesto (36).....	XIII
Espectro Infrarrojo 2. Compuesto (43).....	XIV
Espectro Infrarrojo 3. Compuesto (45).....	XV

Índice de abreviaturas

C.C	Cromatografía en columna
C.C.F	Cromatografía en capa fina
F.N.	Fase normal
F.R	Fase reversa
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas
AcOEt	Acetato de etilo
Hx	<i>n</i> -Hexano
MeOH	Metanol
DMC	Diclorometano
ACN	Acetonitrilo
H ₂ O	Agua
g	Gramos
L	Litros
ml	Mililitros
mg	Miligramos
ppm	Partes por millón
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DEPT	(Distortionless Enhancement by Polarization Transfer) Mejora de la distorsión por transferencia de la polarización
HMBC	(Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) Correlación heteronuclear de enlace múltiple

HSQC	(Heteronuclear Single Quantum Coherence)Correlación heteronuclear a un solo enlace
MHz	Megahertz
J	Constante de acoplamiento
δ	Desplazamiento químico
ATCC	American Type Culture Collection, en ingles
UV	Ultravioleta
IR	Infrarrojo
μg	Microgramos
RT	Tiempo de retención

1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las plantas medicinales es milenario y ha trascendido por generaciones gracias a la tradición. Se considera que nuestros antepasados obtuvieron el conocimiento de estas especies después de distinguir entre las que servían para comer y aquellas que tenían algún efecto en su organismo, por lo que a partir de esto empezaron a diferenciarlas y seleccionarlas. Para que una planta sea considerada medicinal, debe tener propiedades curativas o preventivas para algún padecimiento. Sin embargo, no necesariamente toda la planta tiene que cumplir con estas características, pues algunas veces sólo es utilizada una parte de ella como las hojas, el fruto, la raíz o la corteza. La acción terapéutica (alivio o mejora), se debe a sustancias químicas llamadas principios activos que son considerados sustancias que ejercen sobre el organismo vivo una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial.¹ Si bien, el uso de especies vegetales con fines terapéuticos es muy antigua, el uso tradicional de plantas medicinales aún persiste, especialmente en sociedades poco industrializadas con dificultades de acceso a medicamentos. Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) coordina una red para incentivar el uso seguro y racional de la medicina tradicional, debido a que, en su mayoría, no toda la planta medicinal suele ser benéfica al organismo, o simplemente el principio activo debe de ser dosificado minuciosamente.²

Actualmente, en México, la importancia de las plantas medicinales no sólo radica en su riqueza como parte de la cultura, sino también en el conocimiento científico que se genera a partir de su estudio y del análisis que se realiza de cuestiones ecológicas, geográficas, culturales, farmacológicas y químicas. El proceso de verificación científico no solo ayuda a encontrar que tipo de moléculas se encuentran en las diversas especies vegetales usadas tradicionalmente como plantas medicinales, sino que también ayudan a explicar su participación en ciertas propiedades terapéuticas de estas, aunado a esto, también permite descubrir compuestos que pueden servir como base para el desarrollo de nuevos medicamentos para distintas aplicaciones.

La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) menciona el registro del Instituto Mexicano del Seguro Social de 3,000 especies de plantas con atributos medicinales, de las 4,500 que se calcula que existen en México, y que representan el 15% del total de la flora mexicana. Precisa que sólo se ha hecho análisis farmacológico del 5% del total de esas plantas. De ese universo, 250 se comercializan de manera cotidiana, el 85% son extraídas del medio silvestre sin planes de manejo sustentable, y el 80% de la población mexicana ha hecho uso de ella.³ En años recientes, diversos grupos de investigación realizan esfuerzos para identificar compuestos con actividad biológica en un intento de aportar mayor conocimiento a este campo, sin embargo, la caracterización química exhaustiva de varias especies utilizadas en la medicina tradicional está muy lejos de completarse. Para lograr lo anterior, se requiere de la colaboración multidisciplinaria en ciencias, es decir, de la participación de botánicos, farmacólogos, químicos, toxicólogos, entre otros profesionistas. Existen varias estrategias empleadas en la búsqueda de compuestos bioactivos a partir de especies vegetales, de las cuales las aproximaciones etnobotánicas son las que han proporcionado los hallazgos más notables en el descubrimiento de compuestos de interés terapéutico.⁴ En ese contexto, el resveratrol es un potente antioxidante producido por más de 70 especies de plantas está presente en varios frutos que forman parte de la dieta humana, tales como los arándanos (*Vaccinium spp.*), la grosella (*Vaccinum spp.*), uvas (*Vitaceae*), las moras (*Morus spp.*) y los cacahuetes (*Arachis hypogaea*),⁵ la artemisinina aislada de *Artemisia annua* y quien es responsable de sus propiedades antimaláricas,⁶ debido a las cualidades de estas plantas, por mencionar algunas, se han convertido en un factor importante en la industria farmacéutica para la búsqueda de nuevos medicamentos donde se han investigado una diversidad de plantas, y de ellas se han aislado una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividad farmacológica importante; no obstante, existen aún muchas especies no estudiadas que pudieran contener compuestos activos para infinidad de enfermedades, entre las que se encuentran las infecciones en vías urinarias, las cuales son frecuentes y afectan tanto a hombre como mujeres.

Las infecciones urinarias (IU) figuran entre las afecciones más importantes, si bien afectan con mayor frecuencia a mujeres, 30 veces más que en varones, debido principalmente, a factores anatómicos.⁷ Las infecciones urinarias representan uno de los riesgos más serios y radica en el mecanismo de infección “ascendente”, donde el patógeno es arrastrado desde la uretra hasta la vejiga y de ahí por los uréteres puede llegar hasta los riñones,⁸ lo cual puede provocar pielonefritis aguda u crónica, la pielonefritis aguda es una inflamación repentina causada por bacterias y es una de las enfermedades renales más frecuentes, llega a ser más severa debido a que causa daños en el riñón que pueden llegar a causar una insuficiencia renal, comprometiendo la vida del enfermo. El incremento de las bacterias que producen infecciones multirresistentes de la vía urinaria ha sido alarmante como lo es *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *P. aeruginosa* que tiene capacidad de ser multirresistente, y *E. coli*, con resistencia a la mayoría de los antibióticos usados para estas afecciones.^{9,10} Esto contribuye a la prevalencia en las infecciones en vías urinarias generando un alto costo en las terapias de estas. Debido a estas circunstancias el estudio de plantas medicinales ha tenido un mayor interés en el uso y búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos, donde los extractos crudos de plantas medicinales podrían servir como una fuente alternativa viable, ya que cuentan con una gran variedad de metabolitos secundarios como lo son los alcaloides, taninos, glucósidos, polifenoles, flavonoides, saponinas, entre otros, y podrían actuar como potenciales agentes antimicrobianos y modificadores de la resistencia, por lo tanto, estos compuestos pueden tener un efecto clave en las afecciones patógenas.⁹ Teniendo en cuenta esta problemática, es de vital importancia la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos como potenciales fármacos para el combate contra bacterias resistentes.

Ludwigia octovalvis es una planta que se ha localizado en el Estado de Morelos y dentro de los usos medicinales que se le atribuyen se encuentran; para curar las infecciones de la piel, se aplican las hojas previamente calentadas y remojadas en alcohol, diabetes, en casos de roña, se prepara una pomada con la planta macerada que se mezcla con manteca y azufre; ésta se unta cada 24 h, además se menciona que esta planta puede ser empleada para aliviar afecciones renales. Sin embargo, aún no se cuenta con estudios y evidencia científica

suficientes que puedan sustentar el uso correcto de esta planta, por lo que en el presente trabajo se realizará un estudio químico y biológico que pueda aportar información sobre el contenido químico de esta especie y determinar su actividad antibacteriana.

2. ANTECEDENTES

2.1 Antimicrobianos

Un antimicrobiano se define como una sustancia que tiene la capacidad de destruir, impedir o retardar el crecimiento de un microorganismo,¹¹ estos se utilizan para prevenir o tratar infecciones.¹² Los antimicrobianos pueden ser de origen natural o sintético, dentro de esta clasificación se encuentran los antibióticos que tienen ciertas características como toxicidad selectiva, no afectan o poseen baja toxicidad para el huésped.¹³⁻¹⁵ El tratamiento y prevención de infecciones mediante el uso de agentes antimicrobianos ha obtenido grandes resultados debido a su actividad biológica frente a los microorganismos causantes de enfermedades tales como la meningitis, tuberculosis, sífilis, infecciones gastrointestinales e infecciones en vías urinarias, así mismo, disminuyendo la morbilidad y mortalidad de las personas.¹⁶

2.2 Infecciones en vías urinarias en México

Las infecciones en vías urinarias son una de los principales problemas de salud pública en México, ocupando el tercer lugar de morbilidad,¹⁷⁻¹⁹ datos obtenidos en el 2017 muestran 4,474,599 nuevos casos de infecciones urinarias reportados,²⁰⁻²¹ mostrando mayor prevalencia de los casos en mujeres (>70 %),²² sin embargo, hay otros factores que influyen en la recurrencia, prevalencia y complicaciones de las IVU, entre los cuales se encuentran la edad, tipo de sexo, diabetes, embarazo, enfermedades crónicas y anomalías genéticas, entre otras,²³⁻²⁷ las cuales provocan que dicho padecimiento pueda presentar un riesgo aún mayor por lo cual es requerido un correcto diagnóstico y tratamiento que sea efectivo. En las infecciones en vías urinarias se puede o no presentar manifestaciones clínicas, se pueden clasificar como infecciones en vías altas o bajas, crónicas o agudas, recurrente o nosocomial (asociada a sonda vesical). Entre los riesgos de IVU se encuentra cuando se disemina a vías altas desde la vejiga por vía ascendente o exógena llegando a los riñones causando pielonefritis la cual es una inflamación destructiva, tanto del parénquima como de la pelvis renales, puede cursar en forma aguda, que se caracteriza por ser causada por una infección bacteriana repentina y es una de las infecciones más frecuentes, la

pielonefritis crónica es una inflamación renal que puede formar cicatrices, lo cual puede llevar al fallo parcial o total del órgano,²⁸ y es muy común en personas con predisposición a infecciones recurrentes, reinfección o recaídas, como es el caso de personas que padecen de diabetes.²⁴

En mujeres embarazadas es de gran importancia y atención el correcto diagnóstico y tratamiento debido a los partos pretérminos. Las IVU son muy comunes y recurrentes debido a los cambios anatómicos y funcionales presentes en el embarazo, donde la cistitis y la pielonefritis presentan un riesgo para la madre y el feto, siendo causantes de morbilidad perinatal y maternal.²⁹⁻³⁰

Entre los microorganismos que con mayor frecuencia son causantes de IVU son *Escherichia coli* (E. coli) con el 85%, también se encuentran otros agentes patógenos como *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, y aunque estos son menos frecuentes pueden llegar a ser más agresivos como *Staphylococcus saprophyticus*.³¹ Es muy común que los patógenos causantes de IVU asintomática también sean responsables de las infecciones sintomáticas. En general, se puede presentar una serie de síntomas como disuria, ardor con la micción, fiebre, dolor lumbar, entre otros, por lo que se requiere de un correcto y certero diagnóstico del agente causante para dar un eficaz tratamiento debido a que los síntomas que se presentan pueden llegar a ser variados y a las complicaciones que pueden presentarse.

2.3 Antibióticos utilizados para el tratamiento de infecciones en vías urinarias

Debido a que las infecciones en vías urinarias representan un problema en México siendo la tercera causa de morbilidad en el país, representando un alto gasto en las instituciones de salud debido a las complicaciones y sintomatología presentada, siendo una de las principales causas las infecciones en vías altas con pielonefritis. Debido a esto, es necesario que se realice un adecuado diagnóstico ya que las sintomatologías clínicas de los patógenos causantes de las infecciones en vías urinarias llegan a presentar una variabilidad entre signos y síntomas lo cual dificulta tener un certero diagnóstico.

Para que se pueda dar un tratamiento eficaz, primero el médico debe realizar una serie de análisis entre los cuales en primera instancia se encuentra un examen físico exploratorio, en segundo lugar, son necesarios los análisis de laboratorio, un examen general de orina con urocultivo y antibiograma, en el cual es muy probable que se encuentre *E. coli* debido a que es el responsable de aproximadamente el 80% de los casos, y además es importante buscar cepas multirresistentes como *S. aureus*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* o *Citrobacter*, debido a que estos representan un mayor riesgo para las personas que están predisuestas (presentan sondas o catéteres) o que presentan reincidencia. Con base a estos análisis y los resultados obtenidos el tratamiento que se puede suministrar se puede dividir en:

- a) **No complicada**, se considera con síntomas leves o moderados sin condiciones de morbilidad, y que el paciente pueda soportar el tratamiento oral y no presentan criterios para el ingreso hospitalario, en el cual se puede suministrar nitrofurantoína, ciprofloxacino, Trimetoprim/Sulfametoxazol, también pueden ser utilizadas quinolonas cuando se presenta resistencia o si la persona no tolera el TMP-SMX. Para tratar infecciones causadas por microorganismos gram positivo se recomienda el uso de amoxicilina/ ácido clavulánico.
- b) **No Complicada**, se considera a un paciente incapaz de soportar el tratamiento oral optando un tratamiento vía parental, con criterio de ingreso, tomando en cuenta enfermedades que presentan riesgo, y debido que *E. coli* actualmente presenta resistencia a ampicilina, amoxicilina y cefalosporinas, se recomienda el uso de fluoroquinolonas como el ciprofloxacino u levofloxacino, también se puede suministrar gentamicina.
- c) **Complicada**, requiere ingreso hospitalario e intervención quirúrgica, catéter o asociado a anomalías genéticas
- d) **Asintomática**, normalmente se trata de mujeres embarazadas, se recomienda el suministro de amoxicilina, nitrofurantoína, cefalexina y se evitar el uso de fluoroquinolonas y tetraciclinas. ²⁸⁻³²

2.4 Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana es un proceso de adaptación de los microorganismos como estrategia que emplean para la defensa contra los agentes antimicrobianos presentes en la naturaleza. La resistencia bacteriana es la facultad de adaptación de las bacterias a las agresiones al medio en que se encuentran³³. Desde que inicio el uso de antibióticos para tratar enfermedades infecciosas ha ido en aumento la resistencia a antimicrobianos, aunque la mayoría de los mecanismos son mutaciones cromosomales que otorgan una ventaja en sobrevivida bajo presión selectiva de antibióticos.³³⁻³⁹

Durante los últimos años ha ido en aumento el número de bacterias que son resistentes a antibióticos, lo cual es alarmante debido a que llega a disminuir la posibilidad de erradicar al agente causante, lo que genera una prolongación en la estancia hospitalaria, un mayor gasto sanitario, un incremento en el costo de tratamiento, además de un aumento en morbilidad y mortalidad.

2.5 Uso de plantas medicinales

Las plantas medicinales se han utilizado por años para tratar diversas enfermedades y padecimientos, y esos conocimientos se han ido transmitiendo de generación en generación hasta la actualidad, donde aún se sigue utilizando, aunque no se sabe con exactitud el uso de plantas medicinales a nivel global, la OMS ha estimado que más del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos.^{40,41}

El uso de plantas medicinales como tratamiento alternativo ha ido en aumento estos últimos años, se utilizan con fines preventivos o curativos, también se llegan a utilizar para tratar enfermedades crónicas como la diabetes, hipertensión, entre otros.^{42,44} La búsqueda de nuevos fármacos antibacterianos es una investigación a nivel mundial debido a los microorganismos que ya presentan resistencia a gran variedad de fármacos empleados en

la actualidad, una alternativa para enfrentar esta problemática es la búsqueda de nuevas moléculas en recursos naturales, en la actualidad se sabe gracias a las investigaciones científicas sobre la diversidad de los compuestos químicos contenidos en algunas plantas llamados metabolitos secundarios, los cuales no participan en el crecimiento y desarrollo de la planta,⁴³ estas moléculas se pueden emplear como materia prima para la fabricación de compuestos, o derivados de estos,⁴¹ y que pueden servir como modelos para nuevos compuestos. Los grupos principales que se reportan con actividad antimicrobiana son los compuestos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, terpenos, cumarinas, aceites esenciales y alcaloides, debido a sus características estructurales.⁴⁵⁻⁵⁰

Debido a lo anterior, la búsqueda de nuevos agentes efectivos con bajos o nulos efectos secundarios continua, y dado que México es uno de los países que cuenta con una amplia biodiversidad en el mundo, es importante seguir estudiando aquellas plantas que solo cuentan con la información del uso en la medicina tradicional o etnobotánica, como lo son especies de la familia *Onagraceae*.

2.6 *Ludwigia octovalvis*

Ludwigia octovalvis (Jacq.) P.H. Raven, pertenece a la familia *Onagraceae*, es comúnmente conocida en el estado de Morelos como clavillo, es una planta acuática, muy común en lugares de siembra, canales de riego y ríos (figura 1), tiene como particularidad un rápido crecimiento, su alta producción de semillas que esta planta sea considerada como una amenaza para los cultivos como el arroz.⁵¹⁻⁵²

Reino: Plantae

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares)

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas)

División: Magnoliophyta (plantas con flor)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Rosidae

Orden: Myrtales

Familia: Onagraceae

Género: Ludwigia

Especie: *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P.H. Raven



Figura 1. Clasificación taxonómica de *Ludwigia octovalvis*^{53, 54}

2.7 Distribución en México y Morelos

Las fuentes consultadas no tienen registros sobre de donde es originaria la especie, aunque en México la familia Onagraceae se encuentra ampliamente distribuida, en el cual la especie de *Ludwigia octovalvis* tiene reportes de presencia en varios estados como Morelos, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Veracruz, Yucatán,^{55, 54} además de que la familia *Onagraceae* en el estado de Morelos cuenta con especies que tienen usos ornamentales y medicinales.⁵⁵ Aunque la especie *Ludwigia octovalvis* también cuenta con reportes de presencia como en Malasia, India, África, Estados Unidos, y países de América central.^{51, 53}

2.8 Botánica

Ludwigia octovalvis es una planta comúnmente conocida como clavillo, es una hierba erecta de entre 60 cm a 1.60 m de altura, presenta un tallo (a) ramificado cilíndrico, glabrescente hasta variadamente piloso en las ramas jóvenes (Figura 2), las hojas (b) son oblongo-lanceoladas de hasta 14.5 cm de largo, subsésiles, ligeramente pilosas, alternas, angostas,

membranáceas, sobre pecíolos cortos, inflorescencias en las axilas de las hojas superiores, flores (c) solitarias, axilares. El cáliz es un tubo (éste es propiamente un hipantio) largo y acostillado, en cuyo ápice se encuentran 4 sépalos carnosos, triangulares (persistentes en el fruto); tiene 4 pétalos amarillos, angostados en la base, con los nervios evidentes, caedizos; estambres, con un nectario en la base de algunos de los filamentos; el estigma globoso. El fruto (d) es una cápsula cilíndrica (con los 4 sépalos persistentes en el ápice), claviforme de paredes delgadas, con semillas numerosas pluriseriadas en cada lóculo.^{53, 54-}

58



Figura 2. *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) P.H.Raven, imágenes tomadas de la biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana UNAM, CONABIO.

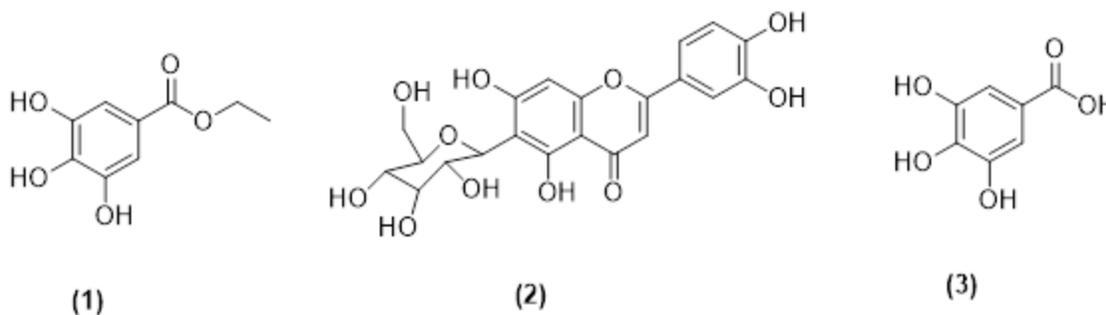
2.9 Usos etnomédicos

Los usos medicinales que se le atribuyen en México, en los estados de Morelos, Oaxaca y Veracruz se le atribuyen propiedades son para tratar infecciones en la piel, utilizando las hojas de la planta, de las cuales se hace una extracción con alcohol, para tratar la roña (infección parasitaria común en mascotas domesticas) se prepara una pomada con la planta macerada que se mezcla con manteca y azufre; ésta se unta cada 24 horas. Además, se menciona que esta planta puede ser empleada como diurético.⁵⁸ Además, es utilizada en el estado de Morelos, en los municipios de Xochitepec, Jojutla, y Zacatepec por sanadores para tratar la diabetes.⁵⁹ También tiene reportes de su uso para el tratamiento de infecciones gastrointestinales (diarrea y disentería), de acuerdo con otras fuentes se utiliza para tratar edema, nefritis, hipertensión.⁶⁰

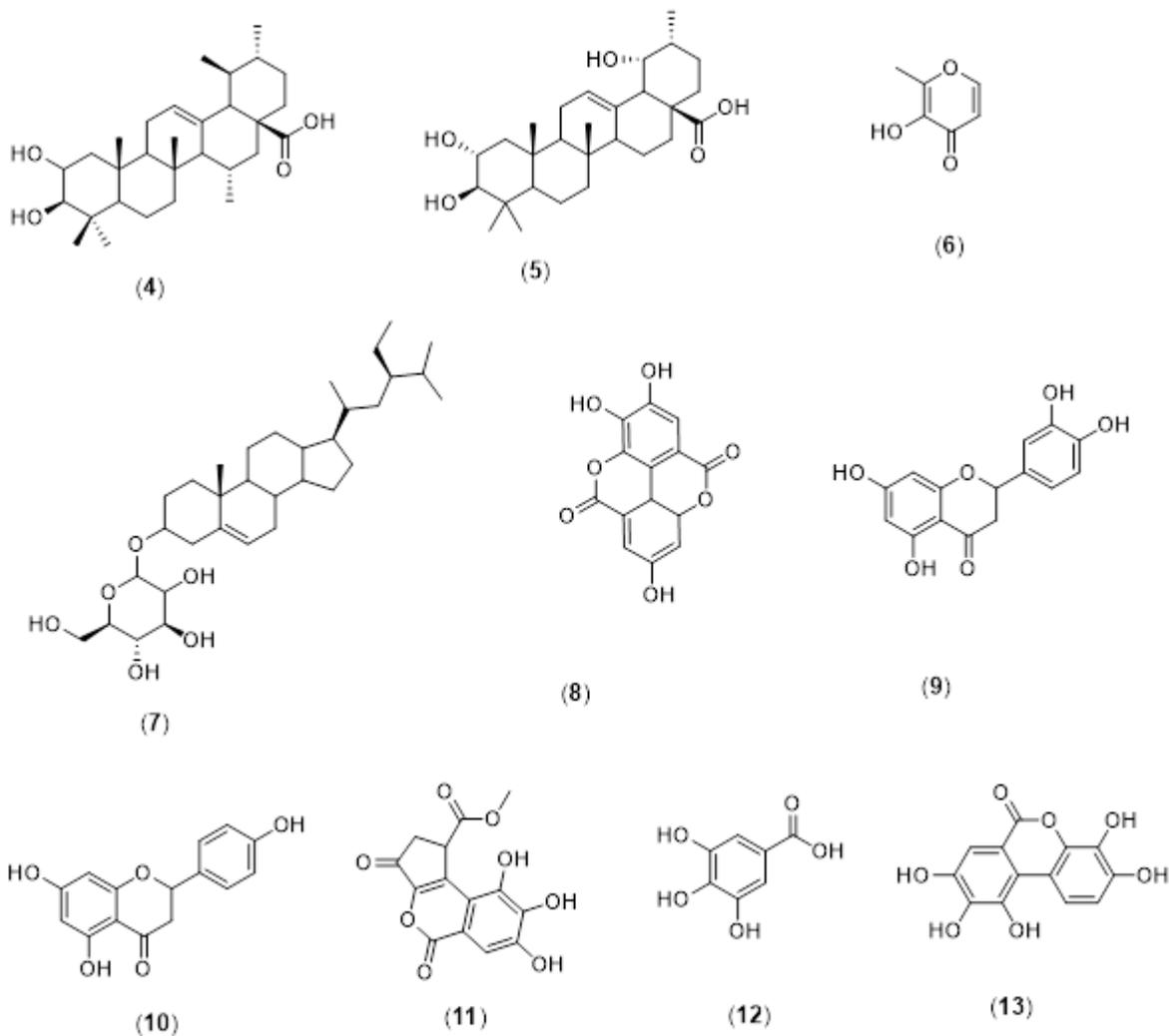
2.10 Antecedentes fitoquímicos

La planta *Ludwigia octovalvis* debido a su amplio uso en la medicina tradicional ha sido objeto de estudio, sin embargo, son pocos los estudios fitoquímicos y biológicos reportados para esta especie, de estos, solo se encuentra uno realizado a la planta que crece en México, específicamente en el Estado de Morelos, y está relacionado con Diabetes, en este trabajo nos hemos interesado principalmente en su actividad antibacteriana.

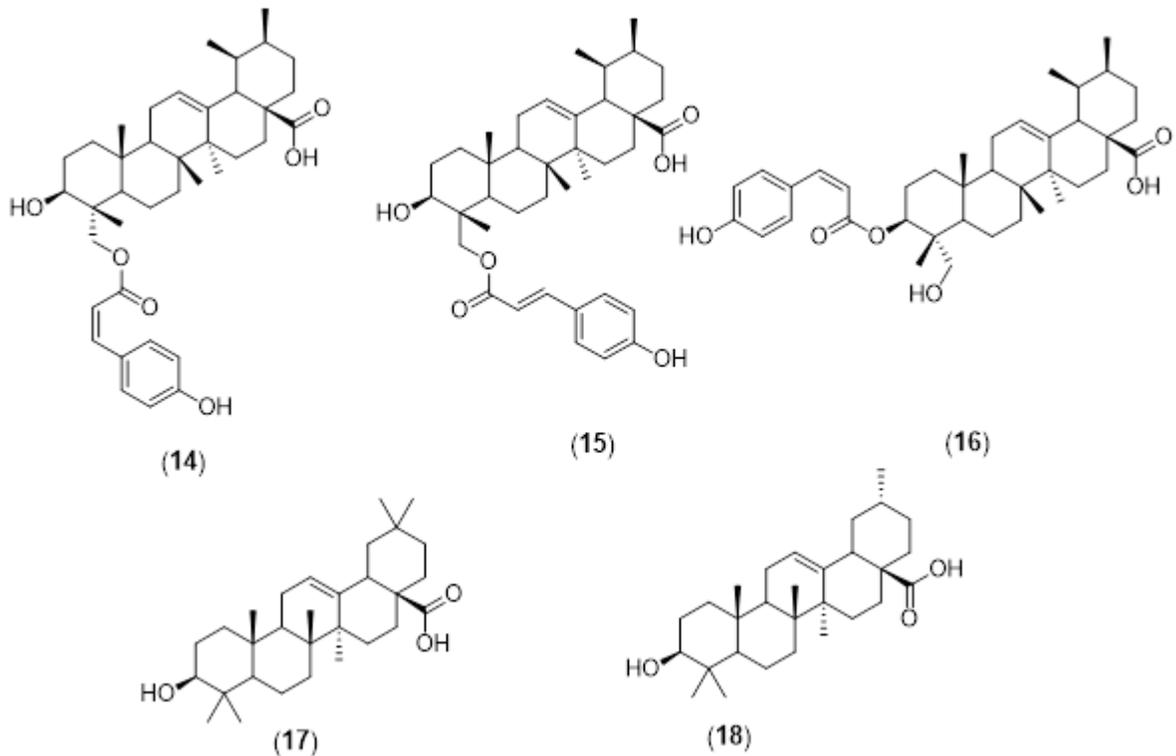
El reporte más reciente sobre la composición química de *Ludwigia octovalvis* lo realizaron en el año de 2018, de este estudio reportan la presencia de etil galato (**1**), isoorientina (**2**) y ácido gálico (**3**).^{56, 61}



En el 2005, Yan J, et. al., aislaron y caracterizaron los siguientes compuestos: ácido 2 α -hidroxi ursólico (4), ácido tormentico (5), maltol (6), daucosterol (7), ácido elágico (8), luteolina (9), apigenina (10), brevifolincarboxilato de metilo (11), ácido gálico (12) y el 3,4,8,9, dibenzo 10-polihidroxi [b,d]piran-6-ona (13).^{62, 63}



En el año 2004 se reportaron tres triterpenos de tipo oleanano : 23Z-cumaroilhederagenina (14), 23E-cumaroilhederagenina (15) y 3Z-cumaroilhederagenina (16), ácido oleanólico (17) y ácido ursólico (18).^{60, 64}



2.11 Antecedentes farmacológicos de *Ludwigia octovalvis*

Una de las actividades más sobresalientes reportadas para *L. octovalvis* son la actividad anti-proliferativa en adipocitos 3T3-L1.⁶⁵ Además, en años recientes, se describieron los efectos anti-envejecimiento, protectores del deterioro cognitivo y de mejora en el control glucémico (por actividad hipoglucemiante y antihiper glucémica) del extracto etanólico de *L. octovalvis*, en diferentes modelos in vitro e in vivo.⁶⁶ Los efectos sobre la glucemia de esta especie ya habían sido reportados anteriormente, lo que corrobora aún más este efecto.⁶¹

Con relación a la toxicidad, en un estudio reportado en 2012, se investigó la toxicidad aguda y subaguda de un extracto metanólico de hojas de *L. octovalvis* en ratones, encontrándose que la administración vía oral de 5000 mg/kg, en el modelo de toxicidad aguda, y hasta 800 mg/kg, en el modelo de toxicidad subaguda, no ocasionó letalidad, efecto toxicológico o

cambios significativos en los órganos internos. Sin embargo, una de sus dosis aumentó significativamente el recuento de glóbulos blancos, y al mismo tiempo disminuyó la ALT, AST y ALP.⁶⁷ Estos resultados podrían indicar actividad hepatoprotectora, que correlaciona con un reporte anterior en el que esta especie fue una de las más activas en dos modelos in vitro.⁶⁸ Además de las actividades descritas en la **Tabla 1** se muestran otras actividades.

Tabla 1. Estudios farmacológicos in vitro de diferentes extractos de *L. octovalvis*.

Extracto o compuesto evaluado	Concentración evaluada	Modelo Farmacológico	Referencias
Extracto etanólico	0.38-100 µg/mL	Captación de glucosa en células musculares. Producción de glucosa en células hepáticas	69, 63
Extracto etanólico	0.1 g/kg de peso corporal	Curva de tolerancia a la glucosa en ratones diabéticos inducidos por STZ 1 o por dieta alta en grasas. Reconocimiento de objetos en ratones diabéticos inducidos con dieta alta en grasas	70
Compuestos 14-16	1.2- 3.6 µM	Citotoxicidad en las líneas celulares KB y HT29.	60, 64
Extracto hidroalcohólico y fracciones	0.25 mg/mL	actividad inhibitoria de lipasa pancreática y actividad inhibitoria de α-glucosidasas	61
Extracto hexánico, diclorometano, metanolico.	≈100 mg/kg	Efecto antihipertensivo, antihiperglicemico, efecto toxicológico agudo en ratones	71

STZ = Estreptozotocina

3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones en vías urinarias han sido un factor de riesgo para las personas en todas las edades debido a que, pueden llegar a ser causantes de diversas complicaciones como la sepsis o en casos más graves, la muerte del paciente. Aunque en la industria farmacéutica existen una diversidad de antibióticos sintéticos para combatir las infecciones en vías urinarias, la mala administración y el uso indiscriminado han ocasionado que los microorganismos se vuelvan “resistentes” a los antibióticos. Por lo que es de suma importancia la búsqueda de nuevas fuentes de antibióticos como lo son las plantas.

Ludwigia octovalvis es conocida en la medicina tradicional en Morelos como “Clavillo” y cuenta con información etnomédica para tratar infecciones de la piel, diabetes, en casos de roña, además se menciona que esta planta puede ser empleada para aliviar afecciones renales, considerando este último padecimiento, el presente trabajo pretende aportar conocimiento químico y biológico de la especie que crece en nuestro país, enfocado principalmente a los padecimientos renales.

4. HIPÓTESIS

Ludwigia octovalvis colectada en el estado de Morelos contendrá metabolitos secundarios con un efecto antibacteriano.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Realizar un estudio fitoquímico y antibacteriano de partes aéreas de *Ludwigia octovalvis* que aporte evidencias sobre el contenido químico y permita sustentar el uso popular atribuido a esta especie en el estado de Morelos.

5.2 Objetivos específicos

- * Colectar la planta *Ludwigia octovalvis* en su hábitat natural.
- * Obtener un extracto hidroalcohólico de hojas secas de *L. octovalvis*.
- * Realizar un fraccionamiento cromatográfico con la finalidad de obtener fracciones de menor complejidad.
- * Evaluar actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico y fracciones obtenidas.
- * Identificar y caracterizar los compuestos químicos presentes en el extracto hidroalcohólico, haciendo uso de las técnicas de RMN y CG-EM.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Equipos y reactivos

6.1.1 Cromatografía en columna (C.C.)

Los análisis cromatográficos en columna abierta se efectuaron en columnas de vidrios de longitud y diámetro variables, se utilizó como fase estacionaria sílica en gel 60 Milipor (con un tamaño de partícula 0.063-0.200 mm), utilizando como sistema móvil, una mezcla de disolventes orgánicos en orden ascendente de polaridad. La sílica gel que se utilizó fue tanto la sílica como los disolventes grado industrial fueron previamente destilados y deshidratados con sulfato de sodio anhidro.

6.1.2 Cromatografía en capa fina (C.C.F)

Para dar seguimiento al fraccionamiento químico se utilizó la cromatografía en capa fina (C.C.F), con el propósito de agrupar fracciones obtenidas mediante su similitud química, para ello, se emplearon placas de aluminio recubiertas con una capa de gel de sílice 60 F254 Merck TLC. Para visualizar las placas se utilizó una lámpara de luz ultravioleta (UV) de onda corta de 254 nm y onda larga de 365 nm, y como reactivo cromogénico se utilizó sulfato cérico 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. Los reactivos empleados fueron obtenidos con proveedores comerciales y utilizados sin previa purificación.

6.1.3 Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) y de carbono trece (^{13}C -RMN), además de los espectros bidimensionales, fueron obtenidos en equipos Jeol ECZ600R 600MHz, Bruker AVANCE III HD 500MHz, Varian Mercury 200MHz, utilizando disolventes deuterados (CDCl_3 , CD_3OD).

6.1.4 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y espectrometría de masas de alta resolución

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una técnica que permite separar e identificar compuestos que sean volátiles o semivolátiles. Con el objetivo de identificar los compuestos en fracciones menos polares, así como concentraciones bajas del

contenido químico, se hizo uso del cromatógrafo de gases Agilent Technology 6890 acoplado a un detector de masas 5973N, donde el gas portador (Helio) pasa por la columna con flujo constante, la entrada se ajustó a 250°C, mientras que la temperatura inicial del horno fue a 40°C, seguido de un aumento a 280°C/minuto, para el espectrómetro de masas se utilizó el impacto electrónico positivo con energía de ionización a 70eV. Se utilizó el monitoreo selectivo de iones (SIM) para la detección, los picos se identificaron y cuantificaron mediante los iones de fragmentación. La información obtenida se comparó con la biblioteca de datos NIST (National Institute of Standard and Technology, siglas en inglés) mediante el patrón de fragmentación obtenido para cada compuesto utilizando un factor de coincidencia $\geq 80\%$. La espectrometría de masas de alta resolución es una técnica que permite la medida de las masas de los iones resultantes de la fragmentación de una molécula neutra, además permite la elucidación estructural de las mismas a través de la determinación de sus masas moleculares y de las masas de algunos fragmentos característicos de su estructura, para ello, es necesario ionizar las moléculas y obtener los iones formados en fase gaseosa obteniendo su espectro de masas y representa las abundancias iónicas de los fragmentos e ión molecular generados, respecto a su relación masa/carga. Para ello se hizo uso del equipo JEOL MS-700 de Alta resolución con análisis mediante FAB (Bombardeo con átomos rápidos) en modo positivo.

6.1.5 Infrarrojo

Los espectros de infrarrojo fueron obtenidos en un espectrómetro Infrarrojo de Transformada de Fourier (FTIR) Thermo Cientific modelo: Nicolet 6700 para detección con un rango espectral de 400 a 4000 cm^{-1} , en el cual se genera calor sobre los enlaces de las moléculas para observar los movimientos de sus átomos y grupos funcionales.

6.2 Material vegetal

La planta completa *Ludwigia octovalvis* fue colectada en su hábitat natural en el camino a Buena Vista del monte en Cuernavaca, Morelos, en septiembre de 2021, la persona que realizó la colecta de la planta fue el Mtro. Fidel Ocampo Bautista, quien preparó un ejemplar, el cual se envió para su clasificación taxonómica al herbario HUMO en el Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado

de Morelos (CIByC-UAEM), el Mtro. Gabriel Flores Franco, curador del herbario identificó la especie como *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) Raven de la familia *Onagraceae* y le asignó el número de folio 39816.

6.3 Preparación de extractos

Para la preparación de los extractos se utilizaron hojas secas, las cuales fueron secadas a temperatura ambiente bajo la sombra y posteriormente trituradas utilizando una licuadora. El proceso de extracción se llevó a cabo vía maceración a temperatura ambiente (X 3, cada 72 h), el primer extracto se obtuvo utilizando 300 g de material vegetal y se colocó en un matraz erlenmeyer de 5 litros, se preparó una mezcla etanol: agua (90:10 v/v) y se fue adicionando hasta cubrir las hojas. El segundo extracto se obtuvo colocando 245.6 g de hojas en un segundo matraz erlenmeyer de 5 litros y en esta ocasión se le adicionó una mezcla de diclorometano: metanol 90:10 v/v hasta cubrir el material vegetal.

Cada proceso de extracción fue separado por filtración y concentrado mediante destilación a presión reducida utilizando un rotaevaporador, después de llevar a sequedad el extracto y calcular el rendimiento, se guardó para su posterior uso (tabla 2).

Tabla 2. Extractos obtenidos de la planta silvestre *Ludwigia octovalvis*.

Parte de la planta	Material vegetal pesado (g)	Disolvente de extracción	Rendimiento		Clave
			Gramos (g)	Porcentaje (%)	
Hoja	696.4	Etanol: agua (90:10 %)	53.3019	7.65	LoHA
	245.6	Diclorometano: Metanol (90:10 %)	5.8642	2.38	LoDM

6.4 Fraccionamiento cromatográfico del extracto hidroalcohólico de *L. octovalvis*

El extracto hidroalcohólico (LoHA) se obtuvo como un residuo viscoso de color amarillo (53.3019 g), de este, se tomaron 10 g el cual se adsorbió en 10 g de sílica gel de fase normal, posteriormente se colocaron en una columna de vidrio (70 cm de altura y 4 cm de diámetro) empacada con 300 g de sílica gel de fase normal. Para el fraccionamiento se utilizaron mezclas de disolventes orgánicos en orden ascendente de polaridad, iniciando

con una mezcla de *n*-Hexano: Acetona 80:20 %, aumentando en gradiente de 10% cada vez, hasta llegar a 100% Acetona, seguido de una mezcla de Acetona: Metanol 90: 10%, en el mismo gradiente hasta llegar a 100% MeOH, por cada sistema se tomaron fracciones de 200 mL obteniendo un total de 78 fracciones, que se reunieron con base la similitud química observada en cromatografía en capa fina (C.C.F.), con ello se obtuvieron 13 grupos de fracciones que se identifican con las claves que se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Fracciones obtenidas del extracto hidroalcohólico (LoHA)

Fracción	Sistema/gradiente	Reuniones	g	Clave
1-5	80:20% Hx:Acetona	1-6	0.110	LoHA-1
6-10	70:30% Hx:Acetona	7-20	0.192	LoHA-2*
11-19	60:40% Hx:Acetona	21-29	0.578	LoHA-3*
20-27	50:50% Hx:Acetona	30-41	0.872	LoHA-4*
28-40	100% Acetona	42-45	1.612	LoHA-5*
41-47	90:10% Acetona:MeOH	46-51	0.876	LoHA-6
48-53	80:20% Acetona:MeOH	52-68	2.336	LoHA-7
54-58	70:30% Acetona:MeOH	69-78	2.922	LoHA-8*
59-63	60:40% Acetona:MeOH			
64-68	50:50% Acetona:MeOH			
69-78	100% MeOH			

Una vez concluido el fraccionamiento cromatográfico del extracto hidroalcohólico (LoHA) y habiendo observado y analizado el perfil químico de los grupos de fracciones por cromatografía en capa fina (Figura 3), se tomaron 5 mg del grupo de fracciones identificado con la clave LoHA-2 y se enviaron para su análisis en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Los grupos LoHA-3, LoHA-4 y LoHA-5 se seleccionaron para su purificaron por cromatografía en columna.

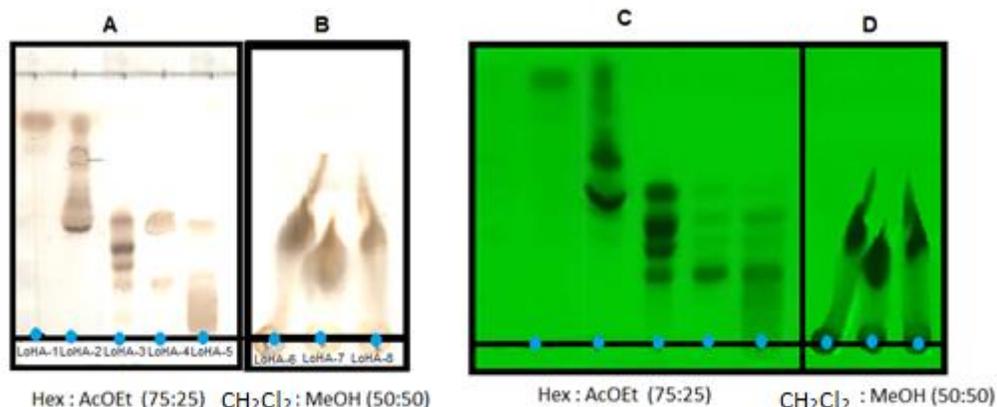


Figura 3. A) y B) muestran el perfil químico de los grupos LoHA-1 a LoHA-8 al ser revelados con sulfato cerico amoniacal y C) y D) muestra su perfil químico al ser visualizadas al irradiar luz ultravioleta a 234 nm.

6.4.1 Purificación de la fracción LoHA-3

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se pesó 0.4346 g de la fracción LoHA-3, al matraz se le adicionaron 3 mL de una solución de diclorometano: metanol (v/v) y posteriormente se agregaron 2 gramos de sílica gel de fase normal, el extracto se adsorbió en la sílica gel y se llevó a sequedad. En una columna de vidrio (40 cm de altura y 1.5 cm de diámetro) empacada con 16 gramos de sílica gel, se colocó el extracto libre de disolvente y se inició la separación de los componentes utilizando un sistema de gradientes con *n*-hexano: acetato de etilo (100:00 → 50:50), aumentando gradualmente la polaridad. Se obtuvieron un total de 88 fracciones de 10 ml cada una. Se agruparon de acuerdo con la similitud mostrada en CCF, obteniendo 7 subgrupos de fracciones (tabla 5).

Tabla 4. Fracciones obtenidas del grupo LoHA-3

Fracciones	Sistema/gradiente	Reuniones	(g)	Clave
1-27	100 % <i>n</i> -Hexano	1-14	0.0260	LoHA-3-1
28-39	98:02 % Hx:AcOEt	15-27	0.0080	LoHA-3-2*
40-58	97:03 % Hx:AcOEt	28-41	0.0104	LoHA-3-3*
59-61	96:04% Hx:AcOEt	42-54	0.0207	LoHA-3-4*
62-88	94:06% Hx:AcOEt	55-72	0.0649	LoHA-3-5*
89-94	92:08% Hx:AcOEt	73-84	0.0947	LoHA-3-6
95-96	50:50% Hx:AcOEt	85-96	0.1646	LoHA-3-7

La purificación del grupo de fracciones LoHA-3 se monitoreó por cromatografía en capa fina, con base a lo observado (figura 4) se seleccionaron para ser analizadas por CG-EM, por un lado, observar la pureza y por el otro si la pureza y la cantidad de muestra lo permitía, poder obtener espectros de Resonancia Magnética Nuclear, esto con la finalidad de poder sustentar la identidad estructural de los compuestos identificados en la biblioteca del equipo de CG-EM.

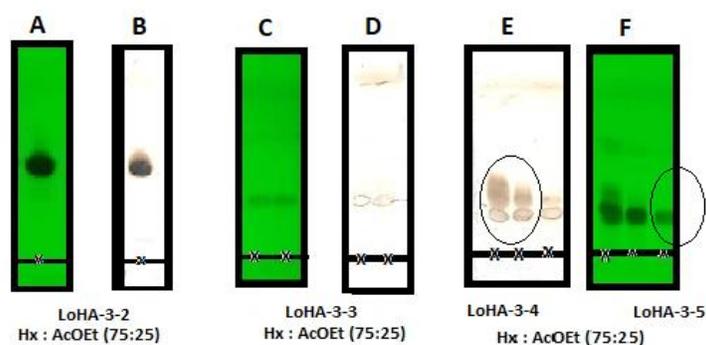


Figura 4. Cromatoplas de las subfracciones LoHA-3-2, LoHA-3-3, LoHA-3-4 y LoHA-3-5, reveladas con luz ultravioleta a 234 nm. (A, C y F) y Sulfato cérico amoniacal (B, D y E).

6.4.2 Purificación de la fracción LoHA-4

Se tomaron 0.5320 g y se adsorbieron en sílica gel (2 g), posteriormente se coloran en una columna de vidrio que contenía 16 gramos de sílica gel de fase normal, una vez adaptada la columna, se hizo para un sistema isocrático preparado con n-hexano y acetato de etilo (90:10), obteniendo fracciones de 50 ml. El curso de la purificación se siguió por CCF, observando que a partir de la fracción 23 se empezó a observar una solo mancha al ser revelada con sulfato cérico amoniacal y no a la luz ultravioleta, este compuesto se observó hasta fracción 38, se continuó obteniendo fracciones (39-47), sin embargo, ya no se observaron manchas o compuestos, por lo que se decidió terminar la purificación. Las fracciones reunidas (23-38) se colocaron en un vial previamente pesado, una vez eliminado el disolvente observamos un sólido amorfo blanco, se volvió a pesar el vial y se obtuvieron

346 mg de este sólido (figura 5). 18 mg de este sólido se disolvió en cloroformo deuterado (CDCl_3) y se envió para su análisis en RMN.



n-Hex :AcOEt (85:15)

Figura 5. Sólido amorfo obtenido del grupo de fracciones LoHA-4

6.4.3 Purificación de la fracción LoHA-5

Se tomaron 1.2513 g y se adsorbieron en sílica gel (4 g), posteriormente se coloran en una columna de vidrio que contenía 40 gramos de sílica gel de fase normal, una vez adaptada la columna, se preparó una mezcla con *n*-hexano: acetato de etilo (95:05), una vez empaquetada la columna con el extracto se empezó a adicionar la mezcla de disolventes y se fueron obteniendo fracciones de 50 mL, el sistema utilizado en esta purificación fue de gradientes, los cambios en la polaridad del sistema se fue realizando gradualmente en un porcentaje del 5% cada vez. El curso de la purificación se siguió por CCF, observando que a partir de la fracción 37 se empezó a observar una sola mancha al ser revelada con sulfato cérico amoniacal y no a la luz ultravioleta, este compuesto se observó hasta fracción 56, se continuó obteniendo fracciones y cuando se obtuvo la fracción 58 ya no se observó nada en la cromatoplaca, por lo que se tuvo que aumentar la polaridad en el sistema de elusión, la polaridad se fue incrementando en un 5% cada vez, cuando se utilizó el sistema *n*-hexano: acetato de etilo (70:30%) a partir de la fracción 83 se volvió a observar una mancha que solo reveló con el sulfato cérico amoniacal y no con luz UV, sin embargo se quedaba casi en el punto de aplicación, por lo que se tuvo que incrementar la polaridad del sistema de elusión, ahora se utilizó diclorometano: metanol (95:05%), esta mancha se observó hasta la fracción

94, las fracciones siguientes solo mostraron una mancha que solo se veía barrida al ser revelada y en los viales se observaba un líquido viscoso de color amarillo, por lo que se decidió dar por terminado el trabajo de purificación. Las fracciones 37-56 se reunieron en vial previamente pesado obteniendo 68 mg de un sólido amorfo blanco con clave LoHA-5-1, así mismo se realizó el mismo proceso para las fracciones 83-96 la cual se le asignó la clave LoHA-5-2, (figura 6), en esta ocasión se obtuvo un sólido amorfo amarillento (42 mg) que se podía disolver en una mezcla con CH_2Cl_2 : MeOH (90:10). 16 mg de este sólido se disolvió en cloroformo: metanol deuterados (CDCl_3 : CD_3OD) y se envió para su análisis en RMN.



CH_2Cl_2 : MeOH (95:05%)

Figura 6. Sólidos obtenidos del grupo de fracciones LoHA-5-1 y LoHA-5-2

Finalmente, de acuerdo con lo observado en CCF en los grupos de fracciones más polares LoHA-6, LoHA-7 y LoHA-8, se tomó la decisión de reunirlos esto debido a la similitud mostrada en CCF. Una vez que se reunieron se tomaron solo 3.5 g de este nuevo grupo de fracciones que se identificó con la clave LoHA-9 y se trabajó en columna abierta para su purificación.

6.4.4 Purificación de la fracción LoHA-9

A 3.5 gramos de este grupo de fracciones se le adicionaron 30 mL de metanol y una vez humedecido se le adicionaron 5 gramos de sílica gel de fase normal, esto con la finalidad de adsorber la fracción en sílica, eliminar el disolvente y así poder manipular mejor el sistema de gradientes que va a utilizar en su fraccionamiento. La fracción adsorbida se colocó en una columna de vidrio (50 cm de alto y 4 cm de diámetro) previamente empaquetada con 110 gramos de sílica gel de fase normal. Se utilizó un sistema de gradientes utilizando *n*-hexano: acetona como disolventes orgánicos, el incremento en el gradiente fue de un 10% cada vez, las fracciones obtenidas fueron de 100 mL cada una. Cuando se tenía lista la columna se inició adicionando el primer sistema que fue *n*-hexano: acetona (90:10), el segundo sistema fue *n*-hexano: acetona (80:20) hasta el sistema *n*-hexano: acetona (40:60) y finalmente se utilizó metanol al 100%. Se obtuvieron 70 fracciones, monitoreadas por CCF. Se agruparon de acuerdo a la similitud observada obteniendo las siguientes reuniones: 1-31 (43.4 mg, LoHA-9-1), 32-43 (97.3 mg, LoHA-9-2), 44-56 (98.3 mg, LoHA-9-3), 57-61(39.2 mg, LoHA-9-4), 62-65 23.7 mg, LoHA-9-5) y 66-70 (2.852 g, LoHA-9-6). Figura 7. Se tomaron 15.6 mg de las fracciones LoHA-9-2, se disolvieron en metanol deuterado y se enviaron para su análisis en RMN. Cabe mencionar que las fracciones 66-70, una vez reunidas y eliminado el disolvente se formó un sólido amorfo amarillento, se intentó disolver para ser analizado nuevamente por CCF y curiosamente ya no se disolvió, ni con agua, esto no permitió su análisis.

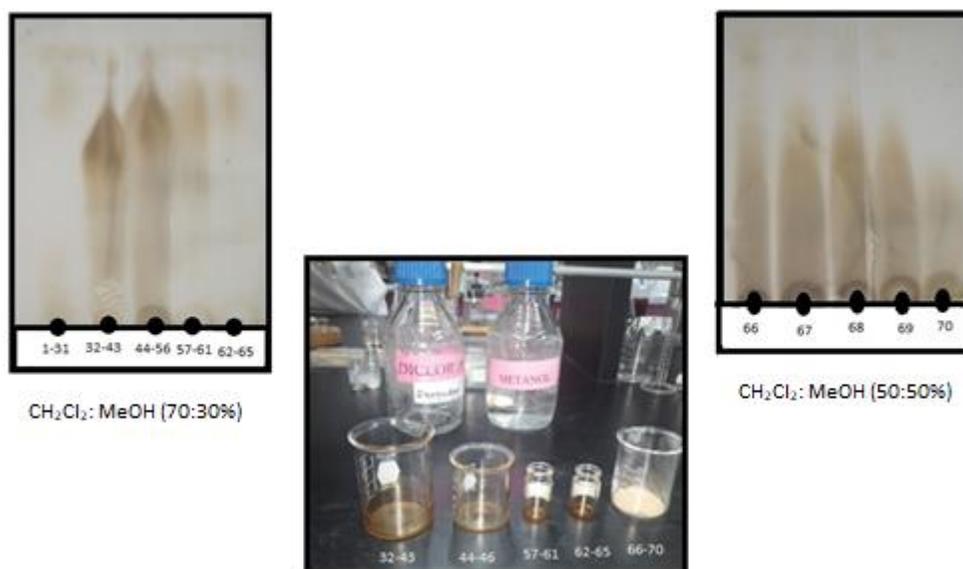


Figura 7. Facciones obtenidas del fraccionamiento del grupo LoHA-9

Una vez concluido el análisis cromatográfico del extracto hidroalcohólico (LoHA) se continuo con el análisis fitoquímico del extracto obtenido con diclorometano: metanol (LoDM).

6.5 Fraccionamiento primario del extracto de Diclorometano: metanol (LoDM)

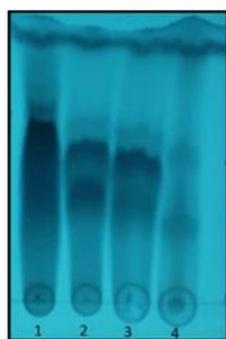
En una columna de vidrio se colocaron 140 g de sílica gel fase normal, posteriormente, se agregaron 4.8596 g del extracto LoDM que había sido previamente adsorbido en 5 g de sílica gel. Como fase móvil se utilizó un gradiente de polaridad ascendente iniciando con una mezcla de Hexano (Hx): Acetona 80:20, Acetona 100%, Acetona: Metanol (50:50) y finalmente MeOH 100%. Se obtuvieron 62 fracciones, que fueron reunidas de acuerdo con la similitud presentada en cromatografía en capa fina (CCF), finalmente se obtuvieron 7 fracciones primarias las cuales se muestran la tabla 6.

Tabla 5. Fraccionamiento primario del extracto diclorometano: metanol (LoDM)

Fracción	Sistema/Gradiente	Reuniones	(g)	Clave
1-5	80:20% Hx:Acetona	1-6	0.6735	LoDM-1
6-10	70:30% Hx:Acetona	8-19	0.0784	LoDM-2
11-17	60:40% Hx:Acetona	20-21	2.4503	LoDM-3*
18	50:50% Hx:Acetona	22-24	0.0657	LoDM-4

19-31	100% Acetona	25-26	0.7681	LoDM-5
32-40	90:10% Acetona:MeOH	27-31	0.0537	LoDM-6
41-48	80:20% Acetona:MeOH	32-62	0.3256	LoDM-7
49-51	70:30% Acetona:MeOH			
52-62	100% MeOH			

Este fraccionamiento no permitió obtener fracciones que mostraran en CCF manchas únicas, por lo que decidimos intentar una derivatización química tomando muestra de la fracción LoDM-3, esto debido a que fue la que se obtuvo en mayor cantidad y a que en CCF de fase reversa mostraba una semejanza con las fracciones LoDM-4, LoDM-5 y LoDM-6 (figura 8).

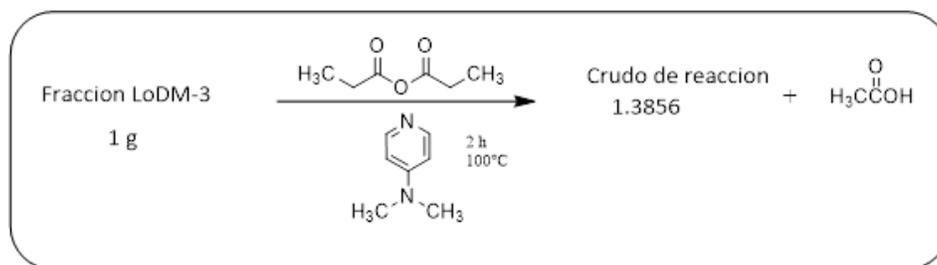


agua : acetonitrilo (80:20)

Figura 8. Cromatografía de fase reversa: LoDM-3 (1), LoDM-4 (2), LoDM-5 (3) y LoDM-6 (6).

6.5.1 Reacción de acetilación de LoDM-3

En un matraz Erlenmeyer de 125 mL se pesó 1 g de la fracción LoDM-3, al matraz se le agregó 4 mL de anhídrido acético como agente acilante y 2 mL de N, N-dimetilaminopiridina como catalizador, se colocó en una parrilla eléctrica a 100° C con agitación constante por 2 horas, la reacción se monitoreo por CCF cada 40 min. Después de que se observó de que la materia prima se había transformado, se detuvo la agitación y se retiró de la parrilla, cuando el crudo de reacción alcanzo la temperatura ambiente se le adicionaron 10 mL de una solución de HCl al 10% (esquema 1).



Esquema 1. Reacción propuesta para la acetilación de la fracción LoDM-3

Posteriormente se realizó un proceso de extracción utilizando 50 mL de acetato de etilo (por triplicado), la fase orgánica se concentró a sequedad mediante destilación a presión reducida utilizando un rotaevaporador. Obteniendo 1.3856 g de residuo o crudo de reacción. Este residuo se purificó por cromatografía en columna utilizando 42 gramos de SiO₂ como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron mezclas de disolventes orgánicos de polaridad ascendente, iniciando con un sistema de *n*-hexano (Hx): acetona 95:05 % y se obtuvieron fracciones de 50 mL, en la tabla 7 se observa el resumen de la purificación del crudo de reacción que identificamos con la clave LoDM-3-Ac.

Tabla 6. Fracciones obtenidas de la purificación de la fracción LoDM-3Ac

Fracciones	Sistema/gradiente	Reuniones	g	Clave
1-17	95:05% Hx:Acetona	12-17	0.0043	LoDM-3Ac-1
18-32	90:10% Hx:Acetona	18-31	0.0560	LoDM-3Ac-2*
33-43	85:15% Hx:Acetona	32-34	0.0247	LoDM-3Ac-3
44-47	80:20% Hx:Acetona	35-42	0.0207	LoDM-3Ac-4
48-51	70:30% Hx:Acetona	43-47	0.0062	LoDM-3Ac-5
52-55	50:50% Hx:Acetona	49-51	0.0947	LoDM-3Ac-6*
56-58	90:10% DCM:MeOH	52-57	0.0658	LoDM-3Ac-7
59-61	85:15% DCM:MeOH	58	0.1369	LoDM-3Ac-8*
62-64	70:30% DCM:MeOH	59	0.2458	LoDM-3Ac-9
65-68	100% MeOH	60	0.1632	LoDM-3Ac-10

6.5.2 Purificación de la fracción LoDM-3Ac-2

En una columna de vidrio empacada con 1.08 g de sílica gel como fase estacionaria se agregaron 40 mg de la fracción previamente absorbido en 0.4 g de SiO₂ fase normal. Se utilizó un sistema de elución isocrático con *n*-hexano: acetona (95:05). Al final se obtuvieron

11 fracciones las cuales por el análisis de CCF se reunieron por la similitud observada. La información se resume en la tabla 8.

Tabla 7. Purificación de la fracción LoDM-3Ac-2

Fracción	Sistema/gradiente	Reuniones	g	Clave
1-11	95:05% Hx: acetona	1-3	0.0150g	LoDM-3Ac-2A*
		4-8	0.0087 g	LoDM-3Ac-2B*
		9-11	0.0061 g	LoDM-3Ac-2C

Las fracciones LoDM-3Ac-2A y LoDM-3Ac-2B se obtuvieron como sólidos amorfos de color blanco, ambos son solubles en diclorometano y en cromatografía en capa fina solo mostraron una sola mancha para la fracción LoDM-3Ac-2A y en la fracción LoDM-3Ac-2B se observan 2 manchas. Cabe mencionar que ambas revelan al irradiar luz ultravioleta a 234 nm (figura 7A), pero no así, cuando se utiliza como revelador sulfato cérico amoniacal (figura 9B). Se determinó su punto fusión, para el sólido de la fracción LoDM-3Ac-2A y fue de 96-97 °C. Las fracciones LoDM-3Ac-2A (14 mg) y LoDM-3Ac-2B (8.2 mg) se disolvieron en cloroformo deuterado y se enviaron para su análisis por RMN. Así mismo, con el resto de las fracciones se utilizaron para ser analizadas por CG-EM.

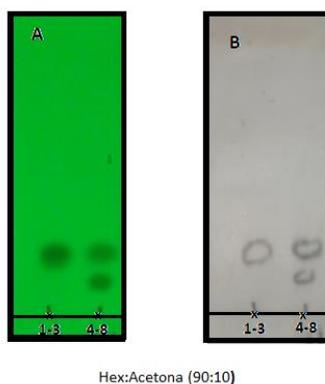


Figura 9. Contenido químico en las fracciones LoDM-3Ac-2A y LoDM-3Ac-2B.

6.5.2.1 Fracción LoDM-3Ac-6

Esta fracción se obtuvo como un aceite incoloro y en cromatografía en capa fina se observa una sola mancha de color café oscuro al ser revelada con sulfato cérico amoniacal (figura 10), y no revela al irradiar luz ultravioleta ni en onda corta (234 nm) ni en onda larga (366 nm). De esta fracción se tomaron 14 mg de muestra que se disolvió en cloroformo deuterado y se analizó por RMN.



Figura 10. Contenido químico de la fracción LoDM-3Ac-6

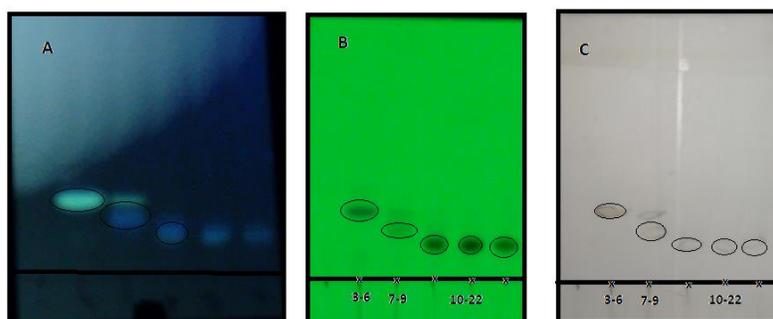
6.5.2.2 Purificación de la fracción LoDM-3Ac-8

En una columna empacada con 3 g de sílica gel, se agregó 102 mg de la fracción LoDM-3-8 previamente absorbida en 0.1 gramos de sílica gel de fase normal, para la separación se utilizó una fase móvil isocrática con *n*-Hexano: acetona (80:20), colectando fracciones de 5 mL. Se colectaron 40 fracciones y por similitud mostrada en CCF se llevó a cabo reunión de fracciones, obteniendo finalmente 5 subgrupos de fracciones. En la tabla 9 se resume la información obtenida.

Tabla 8. fracciones obtenida de LoDM-3Ac-8.

Fracción	Sistema/gradiente	Reuniones	g	Clave
1-30	80:20% Hx: Acetona	3-6	0.0182	LoDM-3Ac-8A*
		7-9	0.0061	LoDM-3Ac-8B*
		10-22	0.0143	LoDM-3Ac-8C*
		23-32	0.0106	LoDM-3Ac-8D
31-40	100% AcOEt	33-40	0.0126	LoDM-3Ac-8E

El monitoreo por CCF de la purificación de fracción LoDM-3Ac-8, permitió observar subfracciones que mostraron la presencia de una sola mancha, esto permitió seleccionar para su posterior análisis por CG-EM y RMN a las subfracciones con clave LoDM-3Ac-8A, LoDM3Ac-8B y LoDM3Ac-8C (figura 11).



Hex:Acetona (75:25)

Figura 11. CCF de las subfracciones LoDM-3Ac-8A, LoDM-3Ac-8B y LoDM-3Ac-8C. A) Luz UV onda larga (366 nm); B) Luz UV onda corta (234 nm) y C) Revelador sulfato cérico amoniacal

6.6 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para la cuantificación de la susceptibilidad *in vitro* de las bacterias ante un agente antimicrobiano se utilizan diversas técnicas, habitualmente se usan los métodos de dilución, en los cuales se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) la cual es definida como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y/o crecimiento de un determinado microorganismo de forma visible. En los resultados que se obtienen se pueden interpretar como susceptibles, intermedios o resistentes usando los criterios interpretativos del subcomité de ensayos de susceptibilidad de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), empleando concentraciones conocidas de bacterias y diluciones específicas del agente antimicrobiano.

Las pruebas de CMI se pueden realizar en métodos de dilución utilizando caldo o medios de agar, pero la técnica de microdilución en caldo es el método recomendado por la NCCLS.⁷²

6.6.1 Microdilución en caldo

La técnica de microdilución en caldo es un método útil para determinar la CMI en un gran número de muestras, además, de presentar una gran ventaja sobre el método de difusión, debido a la sensibilidad y empleo de cantidades pequeñas, también permite la diferenciación de un efecto bactericida o efecto bariostático.⁷² Esta prueba consiste en la preparación placas (de 96 pocillos), con caldo Müller Hinton con el agente antibacteriano (extracto, fracciones o compuestos puros) en distintas concentraciones, donde posteriormente, se inoculan con una suspensión estandarizada del microorganismo de estudio (el cual se prepara 24 horas antes), usando una celdilla como control positivo (caldo con inóculo), otra como control negativo (sólo caldo), los cuales después se incuban durante 24 h, lo que nos permite detectar si hay una inhibición o si hay desarrollo del microorganismo en la suspensión mediante la valoración de la turbidez del medio (figura 12).⁷²⁻⁷⁶

El método de microdilución en caldo que se empleó, se encuentra en el documento M100S Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing del *Laboratory Standards Institute* para las pruebas de microdilución en caldo para bacterias,⁷⁴ y fue realizado en el Laboratorio No. 5 de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, y la persona encargada de realizar las evaluaciones biológicas es la Dra. María Crystal Columba-Palomares.

Las cepas bacterianas empleadas para este estudio se muestran a continuación:

Escherichia coli ATCC 8739

*Streptococcus pyogenes** ATCC 19615

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Staphylococcus aureus (oxacilin-meticilin resistente) ATCC 43300

Pseudomonas aeruginosa ATCC Caso clínico

Salmonella typhimurium ATCC 14028

Como control positivo se utilizó Gentamicina (PISA®) con un factor de dilución de 0.002, y evaluado en concentraciones desde 40 µg/mL, a 0.15 µg/mL.

Las fracciones evaluadas fueron:

- Extracto LoHA
- LoHA-3
- LoHA-6
- LoHA-8
- LoDM-3

Las concentraciones evaluadas fueron de 500 µg/mL hasta 3.9 µg/mL.

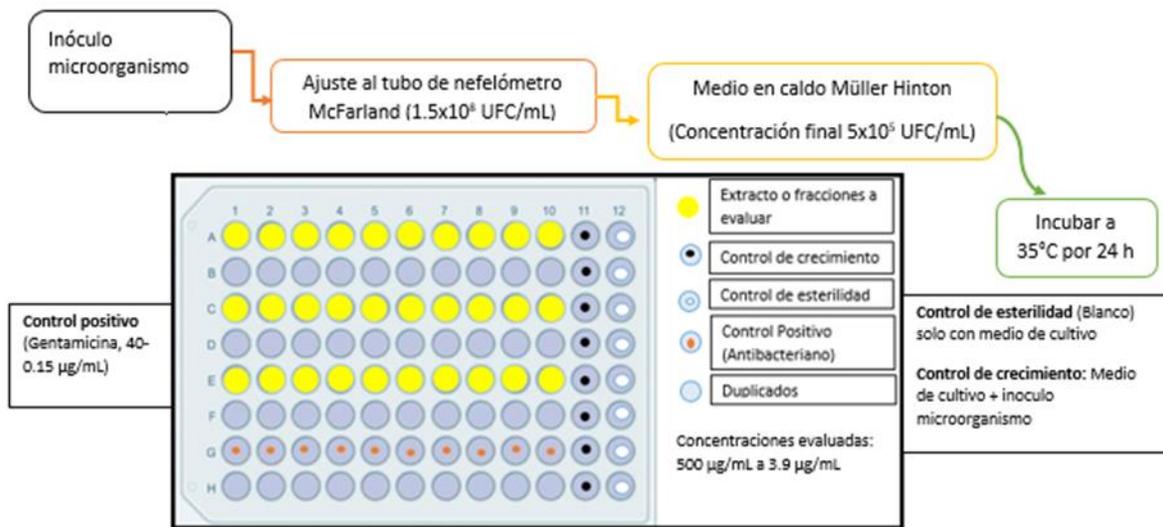


Figura 12. Desarrollo de la prueba de microdilución en caldo

El crecimiento en cada uno de los pozos se comparó visualmente con el control de crecimiento (sin el agente antimicrobiano), y se analizaron obteniendo sus absorbancias en el nefelómetro de McFarland (absorbancia de 0.08-0.12 a 625 nm)

El % de inhibición se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{AC - AM}{AC} \times 100 = \% \text{ Inhibición}$$

Donde:

AC=Absorbancia Control de Crecimiento

AM= Absorbancia Muestra

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados experimentales, así como el análisis o discusión de estos se irán describiendo de acuerdo con el orden que se tiene en la sección 6.

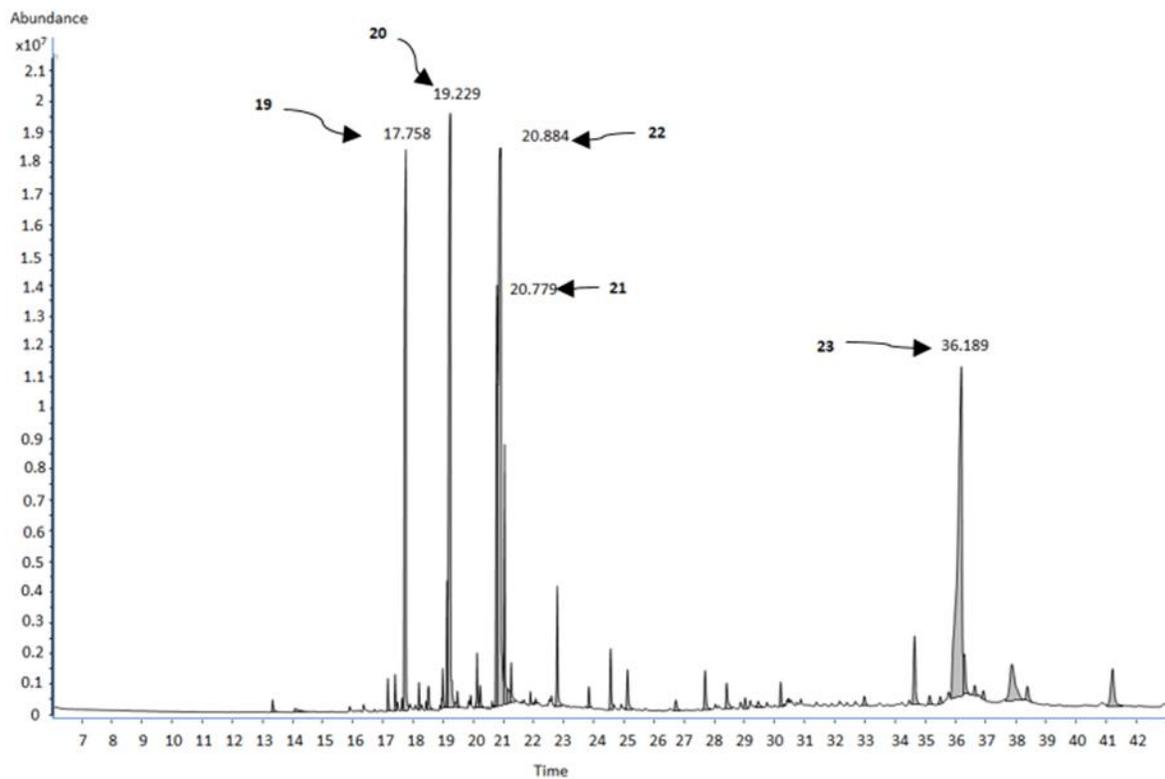
7.1 Estudio fitoquímico de *Ludwigia octovalvis*

Como ya se mencionó en la parte experimental 6.3, se obtuvo un extracto hidroalcohólico (LoHA) y uno con diclorometano: metanol (LoDM) y se analizaron sus componentes de forma independiente los primeros resultados que se presentaran son los obtenidos para el extracto hidroalcohólico (LoHA).

7.1.1 Análisis de CG-EM de LoHA-2

De la fracción LoHA-2 (tabla 3), se tomaron 2.8 mg y se disolvieron en diclorometano (0.5 mL), se colocó en un vial especial para ser inyectada en el cromatógrafo de gases, la identidad de los compuestos fue establecida por comparación de sus patrones de fragmentación, de acuerdo con la base de datos NIST 17a.

Del **cromatograma 1** se seleccionaron los picos de mayor abundancia, de acuerdo con los datos de la biblioteca del equipo, esta fracción está constituida por 5 compuestos principales (figura 13), una cetona hidrocarbonada (**19**, RT=17.758 min. A=11.42 %), tres ésteres de ácido grasos (**20**, RT=19.229 min., A=15.47 %), (**21**, RT=20.779 min., A=8.09 %), (**22**, RT= 20.884 min., A= 19.20 %) y Fitanodiona también conocida como vitamina K1 (**23**, RT= 36.189 min., A= 18.78 %).



Cromatograma 1. Contenido químico de la fracción LoHA-2

Tabla 9. Compuestos identificados por CG-EM en la fracción LoHA-2

Compuesto	RT (min)	m/z (M ⁺)	Abundancia (%)
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (19)	17.758	250	11.42
Palmitato de etilo (20)	19.229	284.3	15.47
Linoleato de etilo (21)	20.779	308.3	8.09
9,12,15-octadecatrienoato de etilo (Z, Z, Z) (22)	20.884	306.3	19.20
Fitonadiona (23)	36.189	225.1	18.78

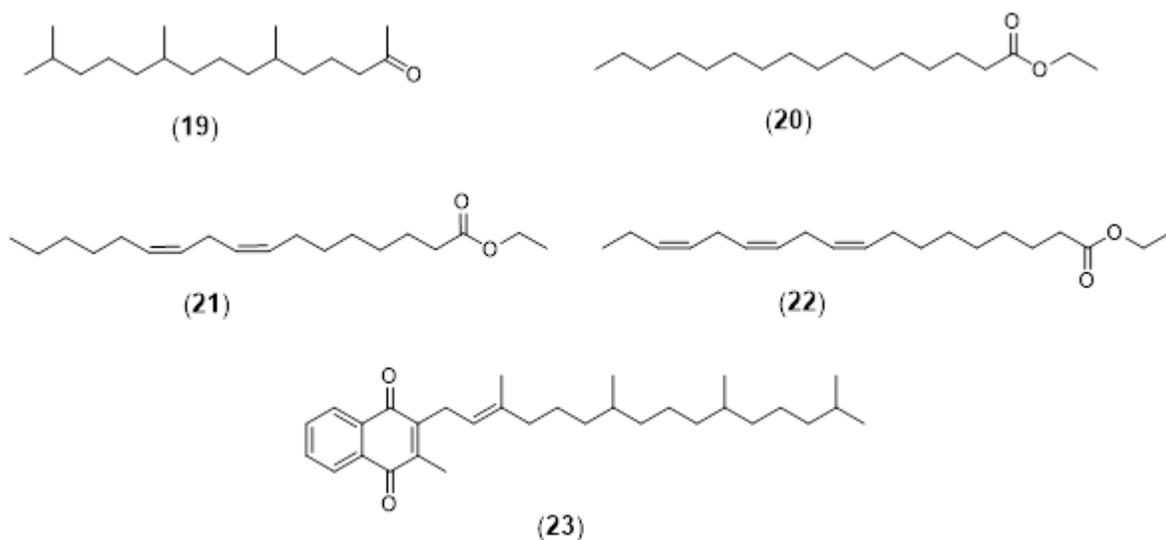


Figura 13. Compuestos identificados en la fracción LoHA-2.

Cabe mencionar, que del trabajo fitoquímico realizado encontramos que la mayoría de los compuestos identificados ya han sido reportados en otras especies, lo que resaltaremos de ellos son las evaluaciones biológicas que se encuentran reportadas. Para el caso del palmitato de etilo (**20**), se ha reportado actividad antiinflamatoria⁷⁷, el linoleato de etilo (**21**) se le atribuye actividad antibacteriana y es utilizado para el tratamiento del acné,⁷⁸⁻⁷⁹ mientras que 9,12,15-octadecatrienoato de etilo (Z, Z, Z) (**22**) se le atribuyen actividades antibacterianas y antioxidantes.⁸⁰⁻⁸² Mientras que la fitanodiona (**23**), mejor conocida como vitamina K1, es utilizada para la coagulación de la sangre.⁸³

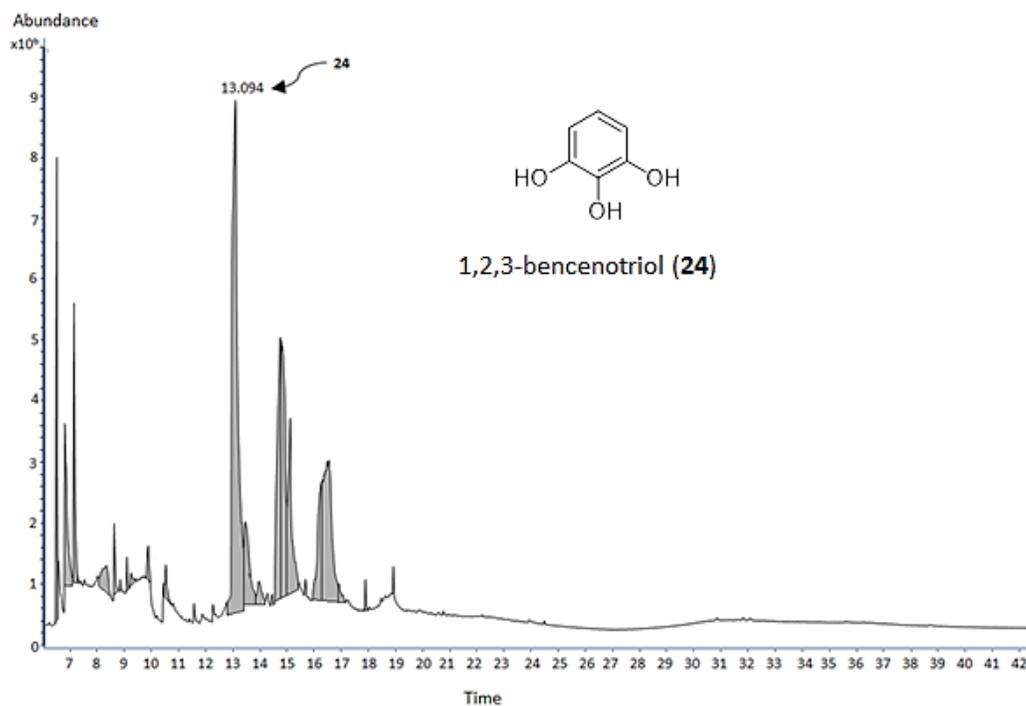
7.1.2 Análisis del contenido químico de la fracción LoHA-3

De acuerdo con sección experimental 6.4.1., se eligieron para su análisis mediante CG-EM, las subfracciones LoHA-3-2, LoHA-3-3, LoHA-3-4 y LoHA-3-5. Se tomaron muestras (2-3 mg) de cada subfracción y se disolvieron en 0.5 mL de diclorometano. El análisis de los cromatogramas y el contenido químico de cada una de ellas se muestran a continuación.

7.1.3 Análisis de la Subfracción LoHA-3-2

El **cromatograma 2**, obtenido para la subfracción LoHA-3-2, muestra al menos 5 componentes mayoritarios, al analizar cada uno de los picos encontramos que solo el compuesto con RT= 13.09 estaba de acuerdo con lo observado en CCF (figura 4A), los demás

picos corresponden a esteres hidrocarbonados. El compuesto principal identificado es el 1,2,3-bencenotriol (**24**).

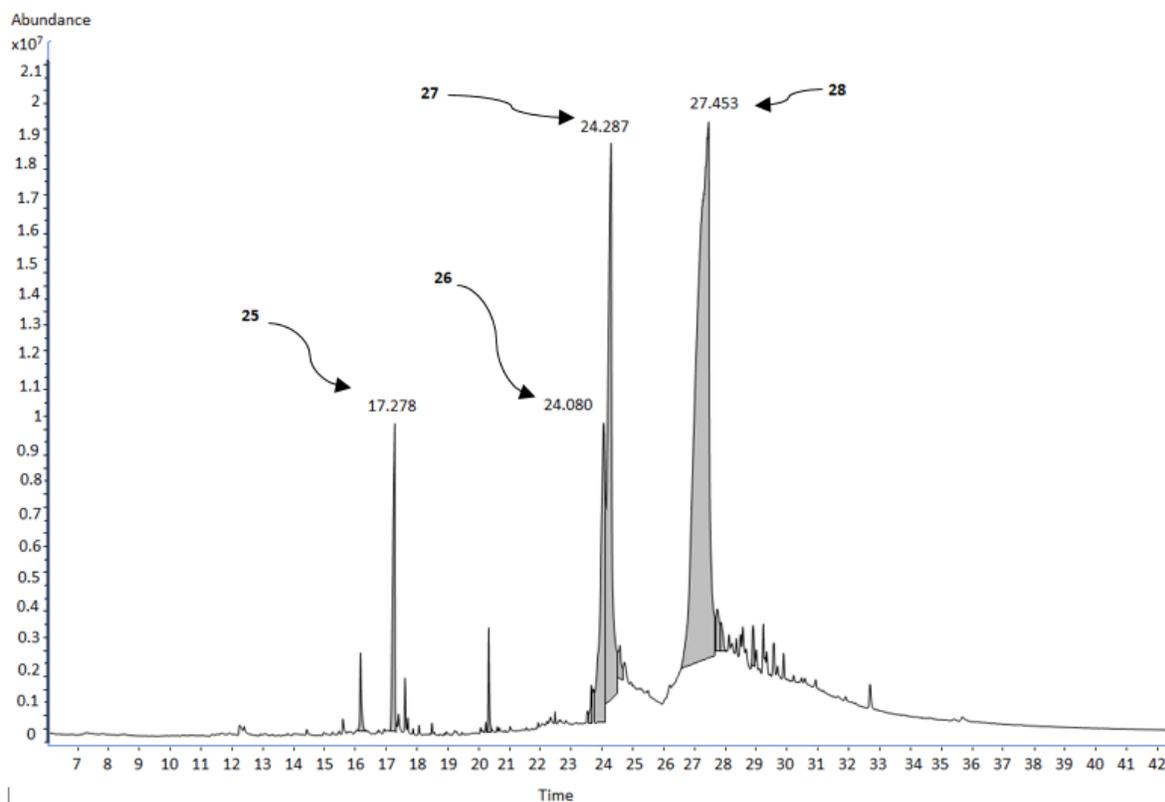


Cromatograma 2. Componente principal identificado en la subfracción LoHA-3-2

El 1,2,3-bencenotriol (**24**) comúnmente llamado pirogalol es un compuesto de la familia de los fenoles el cual ha demostrado tener propiedades antioxidantes, antimicrobianas contra bacterias Gram negativas y positivas.⁸⁴⁻⁸⁵ Ha sido objeto de estudio y se ha encontrado que es efectivo como agente preventivo con baja toxicidad contra el cáncer de colon.⁸⁶⁻⁸⁷

7.1.4 Análisis de la Subfracción LoHA-3-3

El **cromatograma 3** obtenido para la fracción LoHA-3-2 muestra 4 componentes principales, en la tabla 11, se muestran los tiempos de retención, peso molecular y su abundancia. Las estructuras para los componentes principales se ilustran en la figura 14.



Cromatograma 3. Obtenido de la fracción LoHA-3-2 analizada por CG-EM.

Tabla 10. Compuestos identificados en la subfracción LoHA-3-3

Compuesto	RT(min)	(M+) m/z	Abundancia (%)
Loliolida (25)	17.278	196.1	4.19
ácido palmitoleico (26)	24.080	236.2	9.39
Hexadecanoato de 2-dietil éster (27)	24.287	313.3	15.85
2-monolinoleína (28)	27.453	368.3	46.03

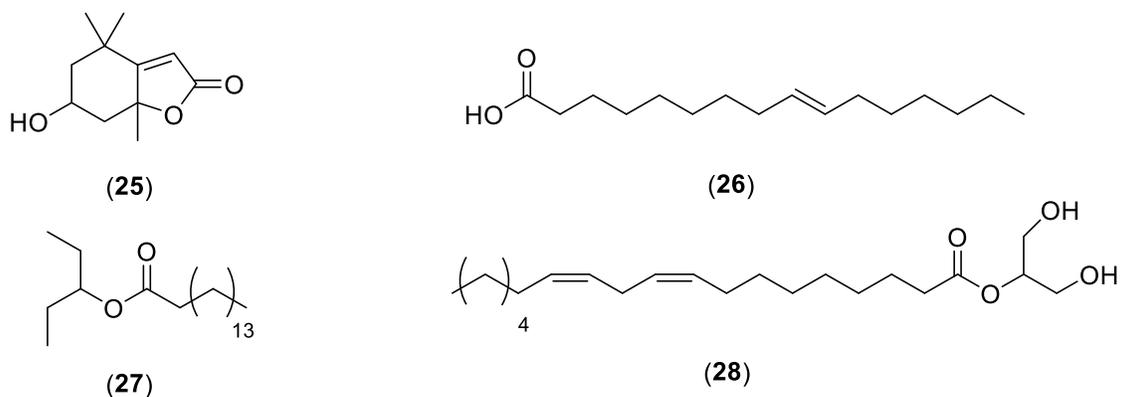


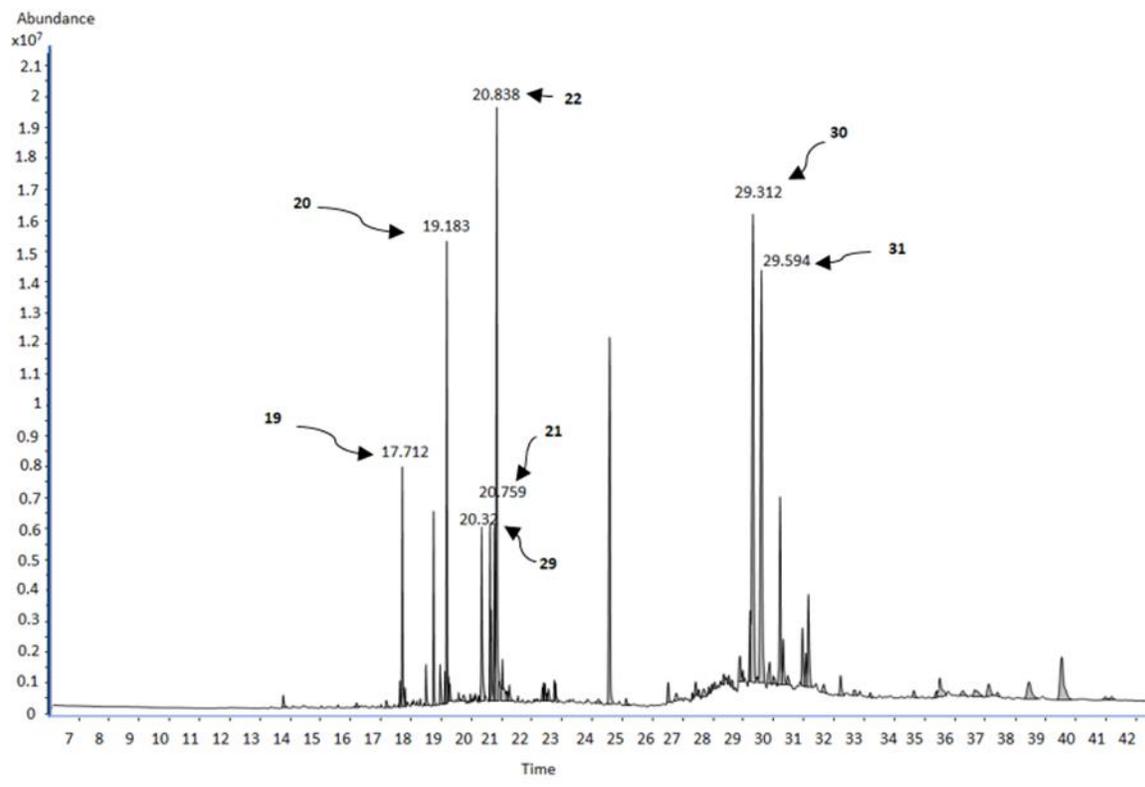
Figura 14. Estructura de los compuestos identificados en la subfracción LoHA-3-3

Loliolida (**25**) es un compuesto que ha demostrado ser un repelente natural, se ha reportado su actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Neisseria gonorrhoeae*, además se le ha atribuido actividad antioxidante, anti-fúngica, anti-cáncer, y como un inhibidor de la entrada del virus de la hepatitis C.⁸⁸⁻⁹¹

El ácido palmitoleico (**26**) es un ácido graso común, el cual tiene funciones con el cuidado de la piel y mucosas, mientras que el compuesto (**27**), tiene reportes de tener actividad contra *Chromobacterium violaceum*,⁹² y el compuesto (**28**) conocido comúnmente como 2-monolinoleína, tiene reportes de ser hipocolesterolémico, hepatoprotector, presentar actividad antioxidante, antiacné, pesticida, y utilizado como saborizante.⁹³

7.1.4.1 Análisis de la subfracción LoHA-3-4

El **cromatograma 4** obtenido por CG-EM de la fracción LoHA-3-4 muestra 7 compuestos mayoritarios, en la tabla 12 se resume la información obtenida para cada compuesto y en la figura 15 se muestran sus estructuras.



Cromatograma 4. Obtenido para la subfracción LoHA-3-4

Tabla 11. Compuestos identificados en la fracción LoHA-3-3 analizada

Compuesto	RT (min)	m/z (M ⁺)	Abundancia %
2-pentadecanona, 6,10,14-trimetil (19)	17.712	268.3	3.09
Palmitato de etilo (20)	19.183	284.3	6.20
Fitol (29)	20.332	278.3	3.44
Linoleato de etilo (21)	20.759	308.3	2.36
9,12,15-octadecatrienoato de etilo (Z, Z, Z) (22)	20.838	306.3	10.18
α -Tocospiro B (30)	29.312	462.4	14.07
α -Tocospiro A (31)	29.594	462.4	12.82

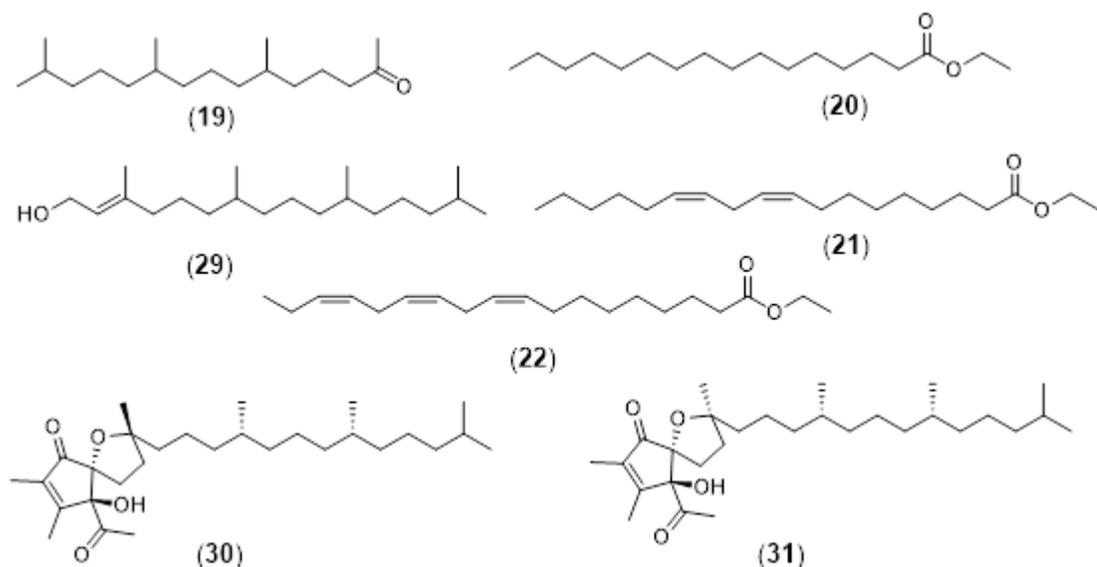
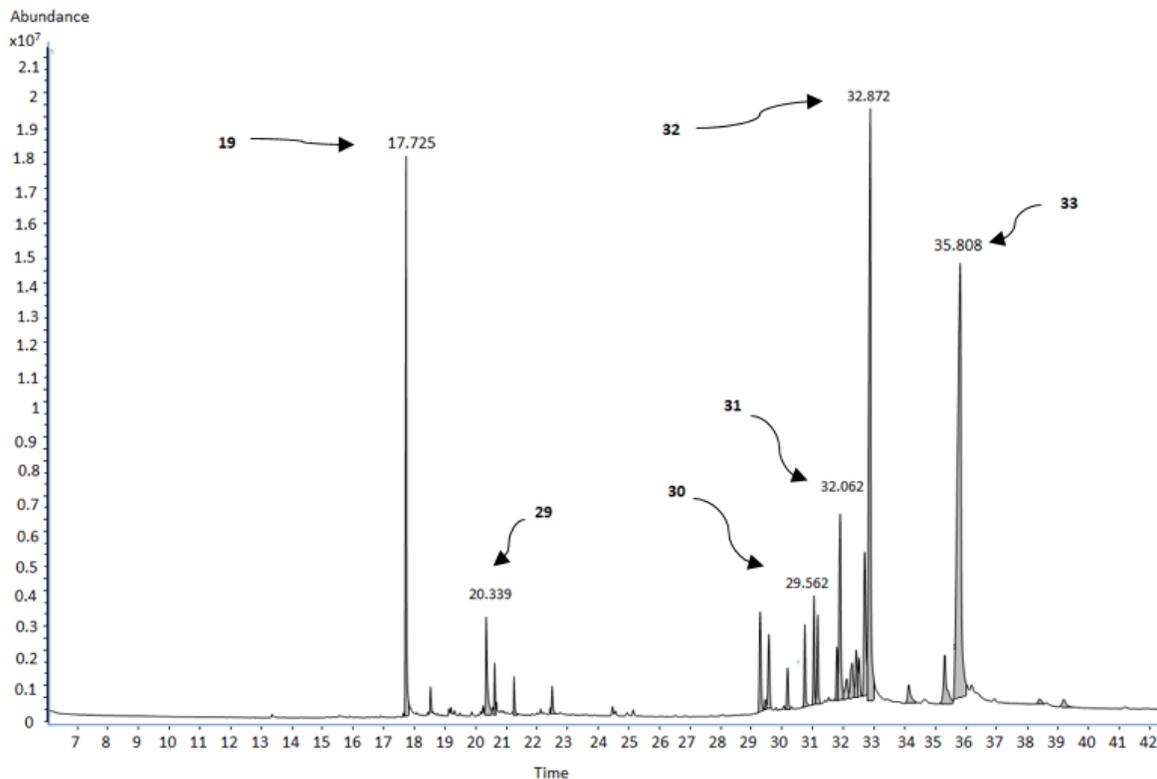


Figura 15. Compuestos identificados en la subfracción LoHA-3-4.

El α -tocospiro B (**30**) y el α -tocospiro A (**31**), son compuestos que han demostrado tener la capacidad para la inhibición de la α -glucosidasa, ⁹⁴⁻⁹⁵ mientras que el fitol (**29**), es un diterpeno miembro de los alcoholes acíclicos insaturados de cadena larga, el cual ha sido ampliamente estudiado y al que se le atribuyen una amplia gama de efectos biológicos, entre los cuales se encuentran actividad antioxidante, antimicrobiana, actividad citotóxica, antiinflamatorio, inhibidor de la α -glucosidasa, también se le atribuyen efectos ansiolíticos y anticonvulsivos. ⁹⁶⁻¹⁰¹

7.1.4.2 Análisis de la fracción LoHA-3-5

De la fracción con clave LoHA-3-5 se obtuvo el **cromatograma 5**, el cual muestra 6 picos principales, dos de ellos, los más abundantes, son un esteroide (**33**) y el segundo es un derivado del tocoferol (**32**) lo anterior se resume en la tabla 13 y figura 16.



Cromatograma 5. Obtenido para la fracción LoHA-3-5 analizada por CG-EM

Tabla 12. Compuestos identificados en la fracción LoHA-3-5 analizada por CG-EM

Compuesto	RT (min)	m/z (M ⁺)	Abundancia (%)
2-pentadecanona, 6,10,14-trimetil (19)	17.725	268.3	9.40
Fitol (29)	20.339	278.3	2.76
α -Tocospiro B (30)	29.562	262.4	2.14
α -Tocospiro A (31)	32.062	446.4	4.87
α -tocoferolquinona (32)	32.872	446.4	21.02
γ -sitosterol (33)	35.808	414.4	29.08

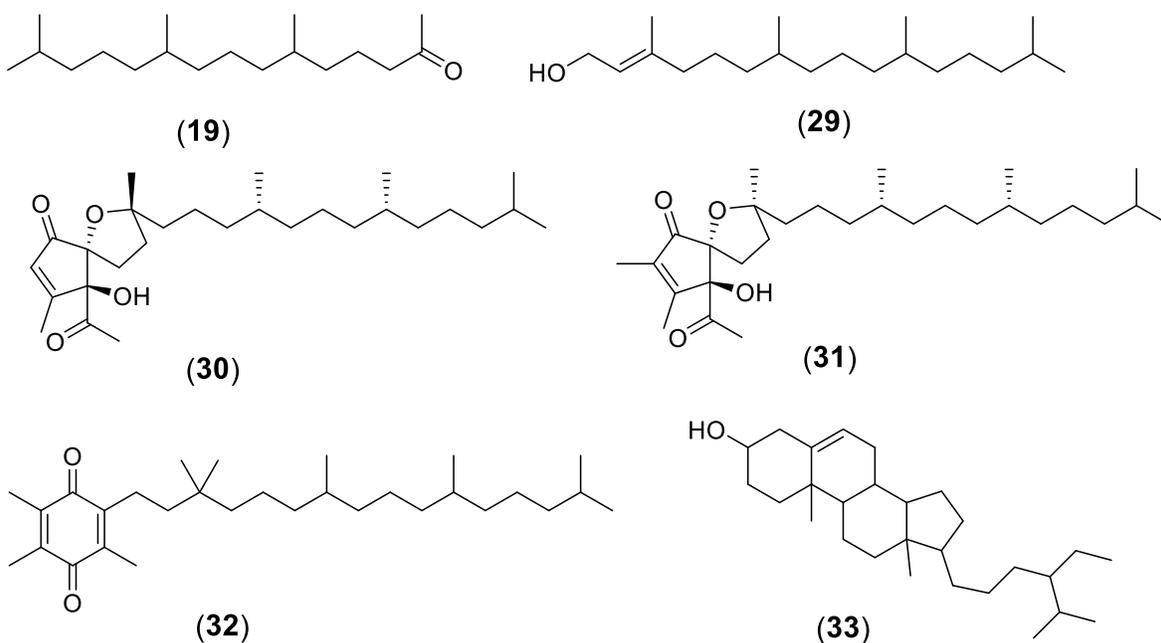


Figura 16. Estructuras de los compuestos identificados en la subfracción LoHA-3-5

y sitosterol (**33**) es un esteroles del cual se tienen reportes sobre la actividad antidiabética y su actividad como agente hipolipidemiante,¹⁰²⁻¹⁰⁵ mientras que la α tocoferolquinona (**32**) se le ha atribuido actividad antioxidante,¹⁰⁶ aunque no se ha reportado sobre su actividad antimicrobiana.

7.1.5 Análisis del contenido químico de la fracción LoHA-4

El sólido amorfo obtenido en la sección 6.4.2., se analizó por RMN, se obtuvieron los espectros de ^1H y ^{13}C , el análisis de sus datos permitieron establecer que trataba de un compuesto de tipo esteroidal y se identificó como β -sitosterol (**34**). Este compuesto se encuentra con mucha frecuencia en diferentes especies, en el laboratorio en donde realicé mi trabajo de tesis se encuentra una muestra, la cual se utiliza como referencia y por cromatografía se pensó en primera instancia en este compuesto, sin embargo, se obtuvieron los espectros de ^1H y ^{13}C para corroborar que se trataba del mismo compuesto. Las señales que caracterizan a este esteroles son la señal base de oxígeno, entre 3 y 4 ppm y s entre 5 y 5.2 ppm para vinilos, esto para hidrogeno y para carbono entre 120 y 140 ppm para carbonos sp^2 y para el base de oxígeno ente 75-80 ppm (figura 17).

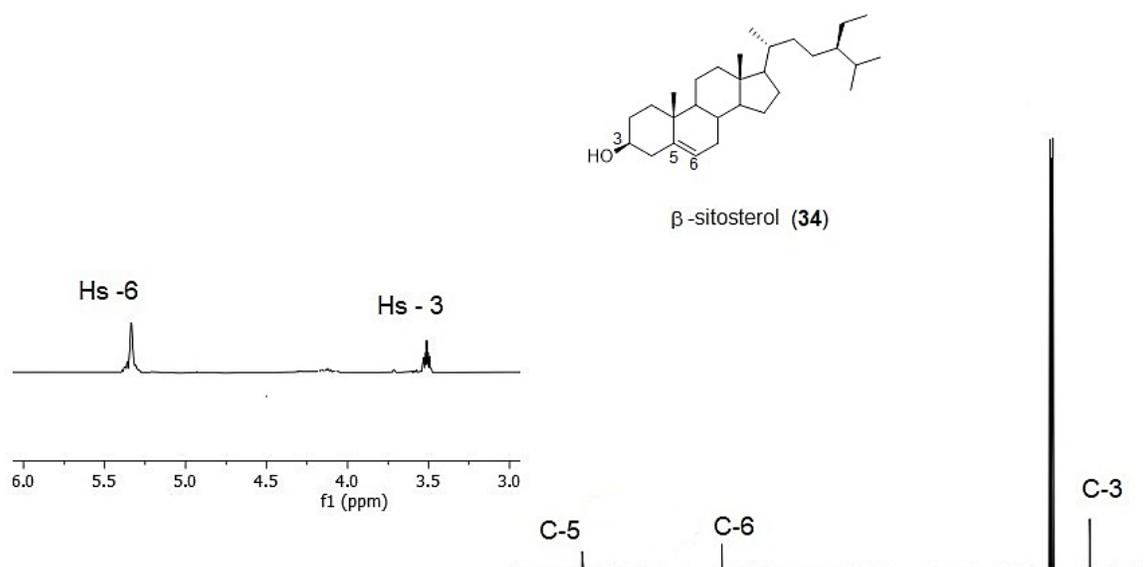


Figura 17. Señales de RMN de ^1H , ^{13}C (200 y 50 MHz, CDCl_3) del compuesto (34)

7.1.6 Análisis del contenido químico de la fracción LoHA-5

El análisis de los datos obtenidos por RMN ^1H y ^{13}C (figura 18) para el sólido amorfo descrito en la sección 6.4.3., a diferencia del compuesto (34), presentó varias señales en la región base de oxígeno, además de estas, se observa una señal doble en 4.31 ppm ($J = 7.5$ Hz) que corresponde a un acoplamiento $\text{H}_{\text{axial}}-\text{H}_{\text{axial}}$ y en 102 ppm, estas señales son características de una β -D-glucopiranos. Estas señales indican que se trata de glucósido de β -sitosterol (35).

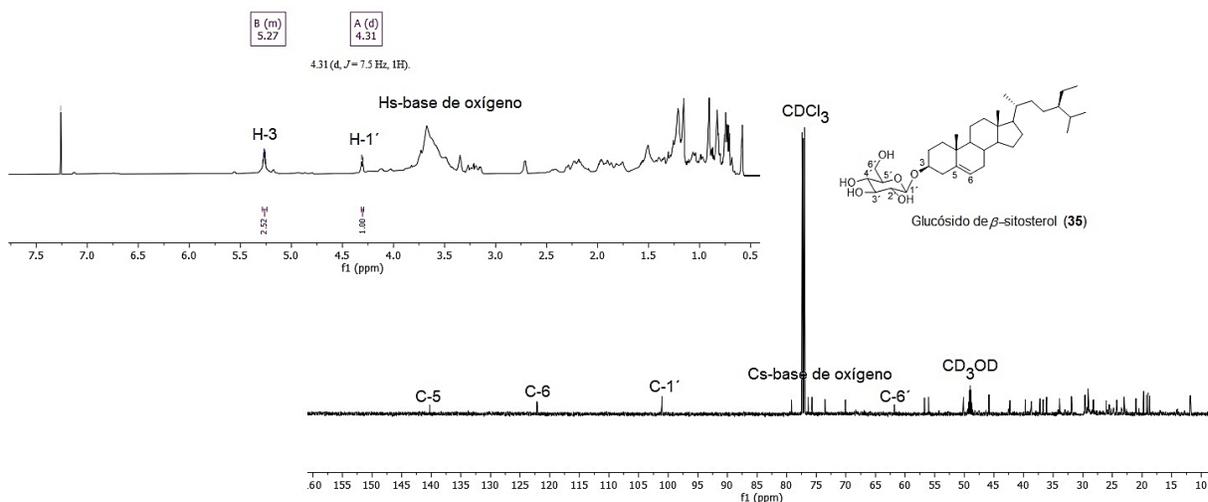


Figura 18. Señales de RMN de ^1H , ^{13}C (500 y 125 MHz, $\text{CDCl}_3:\text{CD}_3\text{OD}$) del compuesto (**35**)

El β -sitosterol (**34**) y su glucósido (**35**) son compuestos de la familia de los esteroides que ha demostrado tener la capacidad antiinflamatoria, antipirético, antimutagénico, y regulador de glucosa en sangre, aunque no se ha reportado sobre su actividad antimicrobiana.^{107, 108}

7.1.7 Análisis del contenido químico de la fracción LoHA-9

Con la finalidad de obtener fracciones de menor complejidad, se procedió a purificar la fracción LoHA-9, de este trabajo cromatográfico se eligió la subfracción LoHA-9-2, como ya se mencionó en la sección 6.4.4. De esta muestra se obtuvieron espectros de RMN de ^1H y ^{13}C y HSQC. El espectro de ^1H muestra varias señales entre 3 y 4 partes por millón (ppm) características de hidrogeno base de oxígeno de azúcares, las señales dobles observadas en δ 5.11 (1H, $J = 3.7$ Hz) y δ 4.48 (1H, $J = 7.8$ Hz), indican que al menos se encuentran 2 moléculas de azúcar, así mismo se observan varias señales entre δ 6.1 y δ 7.5 que corresponden a hidrógenos de sistemas aromáticos, lo que permite suponer que la subfracción LoHA-9-2 contiene como compuestos minoritarios compuestos de tipo fenólico y como componentes mayoritarios azúcares. Para esta fracción no fue posible llevar a cabo una buena separación, aunque en CCF no se ve una mancha tan compleja, la RMN nos indica que existen al menos 5 componentes que interaccionan entre sí, y que al menos en sílica de fase normal no es posible separar. Solo mostrare el espectro de HSQC (figura 19), ya que en

él se puede observar tanto las señales de hidrógenos, y carbono trece con una correlación a un enlace.

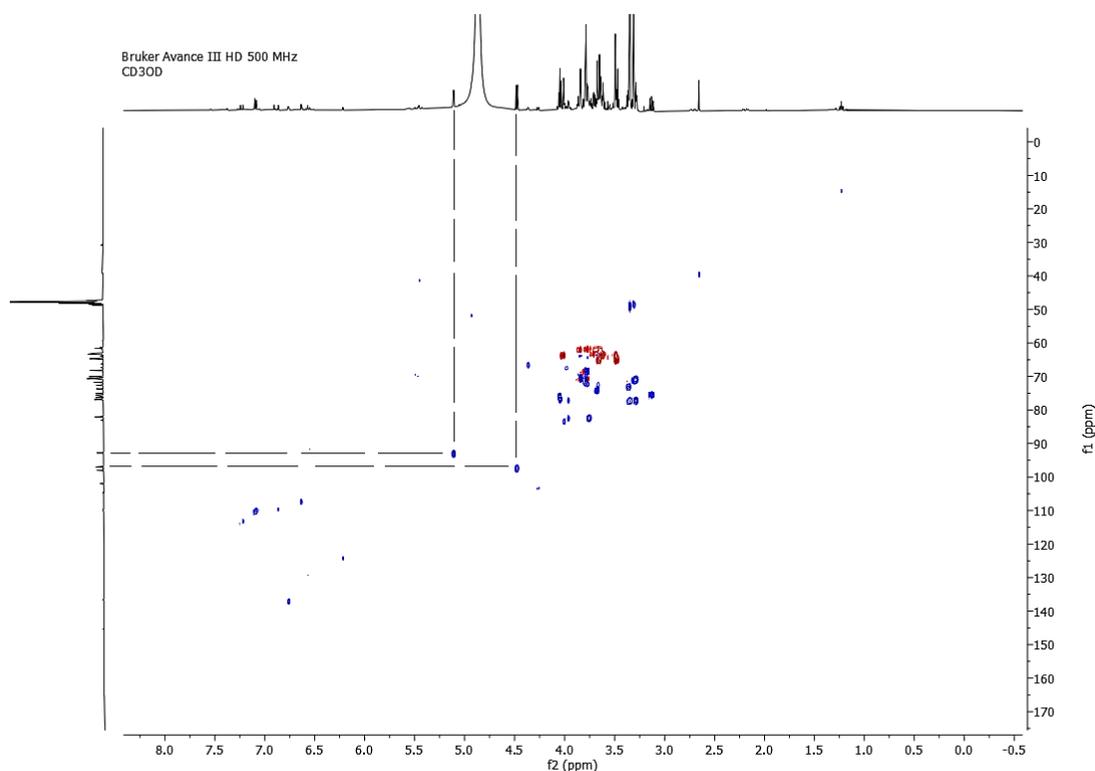


Figura 19. Espectro HSQC (500 MHz, CD₃OD) de la subfracción LoHA-9-2

Con el análisis de la subfracción LoHA-9-2 se concluye el trabajo fitoquímico realizado al extracto hidroalcohólico, por lo que ahora se describirán brevemente el análisis de los resultados obtenidos para el extracto de diclorometano: metanol (LoDM).

7.2 Resultados obtenidos del extracto de Diclorometano: metanol (LoDM)

De acuerdo con lo descrito en la parte experimental, del extracto LoDM, se obtuvieron 7 grupos de fracciones, de estas fracciones se eligió la fracción LoDM-3 para ser sometida a una derivatización química, esto debido a que en CCF se observaron manchas muy pegadas, aun utilizando CCF de fase reversa. La derivatización química que se decidió realizar, fue una reacción de esterificación, esto debido a que en CCF normal aparecía una mancha café al ser revelada con sulfato cérico amoniacal y no revelaba al irradiar Luz UV. El crudo de

reacción obtenido se purificó por cromatografía en columna obteniendo 10 subgrupos de fracciones, de las cuales las fracciones LoDM-3Ac-2, LoDM-3Ac-6 y LoDM-3Ac-8 se eligieron para ser analizadas, los resultados obtenidos se describen a continuación.

7.2.1 Purificación de la fracción LoDM-3Ac-2

Esta fracción se sometió nuevamente a un proceso de purificación y como ya se describió en la sección 6.5.2, se obtuvieron 3 subfracciones, de estos se eligieron las subfracciones LoDM3Ac-2A y LoDM3Ac-2B para ser analizadas por RMN y CG-EM. El sólido obtenido en la subfracción LoDM3Ac-2A, se envió a RMN. El espectro de RMN de ^1H solo mostro 4 señales, una señal en δ 7.26 corresponde al cloroformo deuterado, en δ_{H} :5.93 (q, $J = 0.8$ Hz, 1H), 2.65 (s, 3H) y 2.26 (d, $J= 0.9$ Hz, 3H). En el espectro de carbono se observan 8 señales en δ_{C} : 205.40, 181.23, 169.21, 161.36, 101.58, 100.01, 30.19 y 20.83 y que de acuerdo con el experimento dept, a su desplazamiento químico y a la correlación heteronuclear C-H, se determina que uno es metino, dos son metilos y cinco son carbonos cuaternarios. Con base a esta información y a la obtenida mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (figura 20, tabla 14) se estableció que se trata del compuesto identificado como: ácido dehidroacético (**36**). Los espectros de ^1H , ^{13}C , DEPT y HSQC se encuentran en la sección de anexos o material suplementario (espectros 1-4).

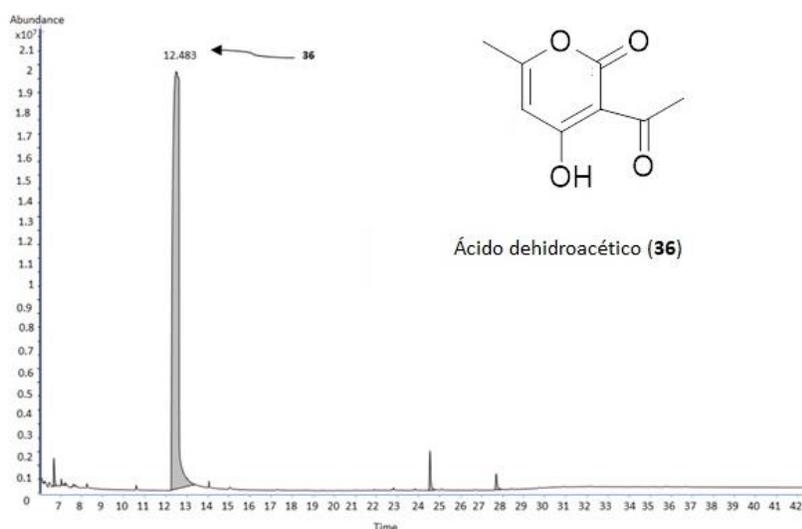


Figura 20. Cromatograma obtenido para la subfracción LoDM3Ac-2^a

Tabla 13. Compuesto identificado en la subfracción LoDM3-Ac-2A analizada por CG-EM

Compuesto	RT (min)	m/z (M ⁺)	Abundancia %
Ácido dehidroacético (36)	12.483	168.1	96.33%

El ácido dehidroacético (abreviado en la literatura química como DHA) es un fungicida y bactericida empleado en cosmética y en la industria alimentaria como aditivo conservante. Por regla general aparece bajo la denominación codificada E 265.¹⁰⁹ Como es biodegradable, este producto químico no representa un problema para el medio ambiente, y los riesgos para la salud son bastante bajos. Sin embargo, el compuesto está prohibido en aerosoles. La molécula del ácido dehidroacético es de tipo pirona. Se emplea como conservante de algunos encurtidos, como los pepinillos.¹¹⁰

Además, este compuesto tiene grupos funcionales reactivos y puede servir como reactivo en la síntesis orgánica.¹¹¹⁻¹¹⁴ Schiff bases derivadas del ácido dehidroacético y fenilendiaminas tienen un gran potencial como compuestos bioactivos, complejos de quelatos con ligandos de base de Schiff han encontrado aplicaciones en la terapia antibacteriana basado en la capacidad de escisión selectiva del ADN,¹¹⁵ imágenes cerebrales¹¹⁶ y catálisis.¹¹⁷ También se informó que se usaban en reacciones de polimerización, como biosensor y como quelante ligandos para la coordinación de cationes de metales de transición.^{118,119}

El sólido obtenido en la subfracción LoDM3Ac-2B se envió para su análisis por CG-EM y RMN. Lo observado en CCF se ve reflejado en el cromatograma de Gases, se observan 3 picos, los 2 más abundantes se identificaron por comparación con datos de la biblioteca del equipo NIST 17a (figura 21, tabla 15). Los espectros de RMN de ¹H, ¹³C, DEPT y HSQC se encuentran en la sección de anexos (espectros 5-8).

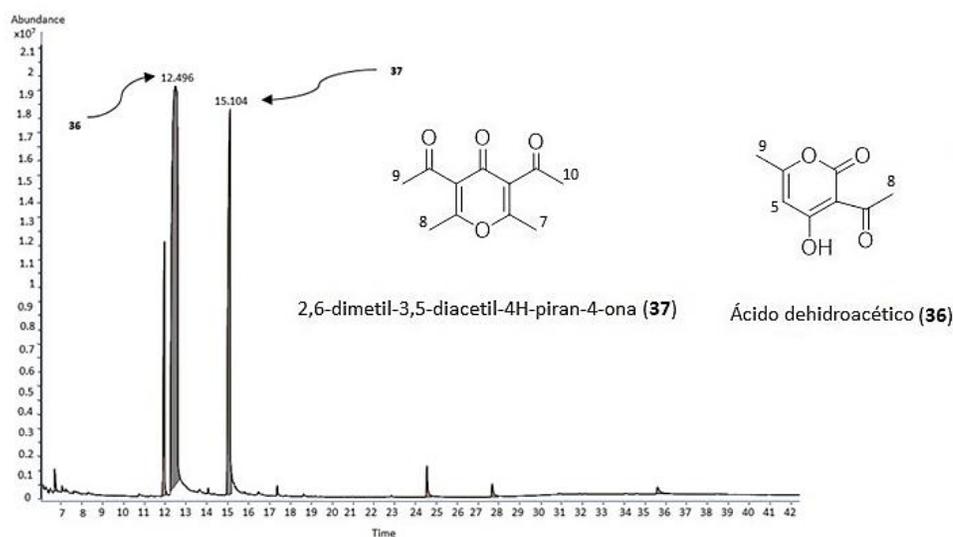


Figura 21. Cromatograma obtenido para la subfracción LoDM3Ac-2B

Tabla 14. Compuesto identificado en la subfracción LoDM-3Ac-2B analizada por CG-EM

Compuesto	RT (min)	m/z (M ⁺)	Abundancia %
Ácido dehidroacético (36)	12.496	168.1	63.95%
2,6-dimetil-3,5-diacetil-4H-piran-4-ona (37)	15.104	193.1	23.81%

7.2.2 Análisis de la fracción LoDM-3Ac-6

Se analizó la fracción LoDM-3Ac-6, primeramente, por RMN, obteniendo un espectro de ¹H y ¹³C (figura 22), lo que en ellos se observó es que se trataba de una mezcla de azúcares peracetilados, un poco difícil de separar, por lo que se decidió tomar muestra (3.2 mg) y enviarla para su análisis en CG-EM.

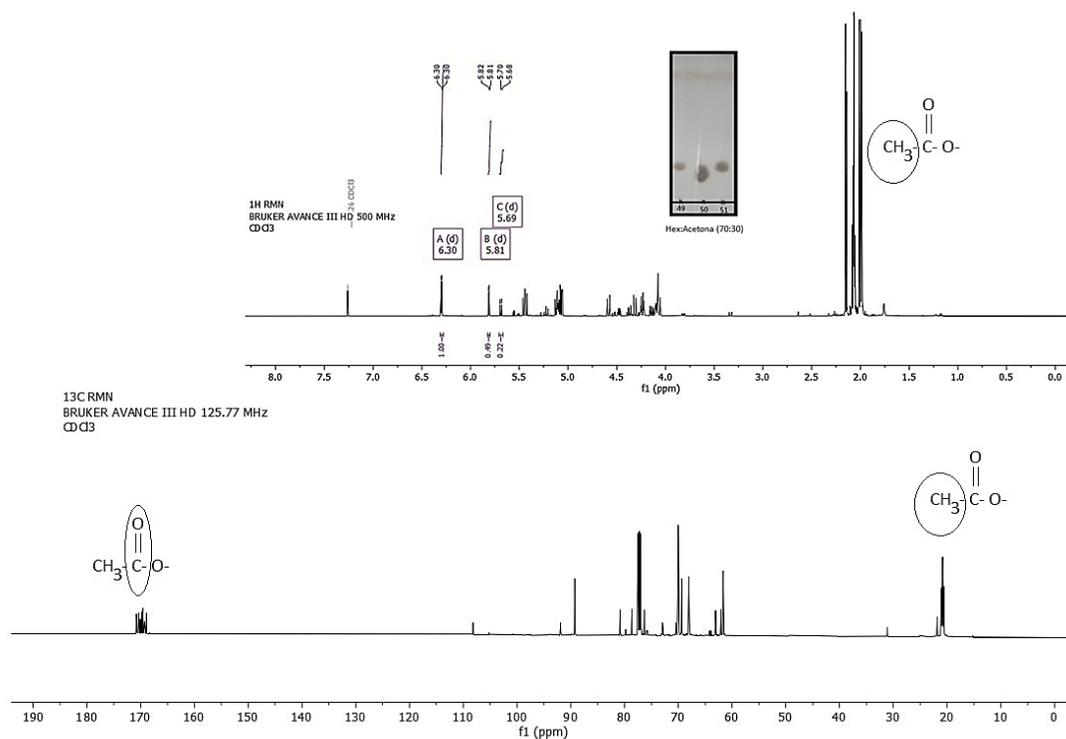
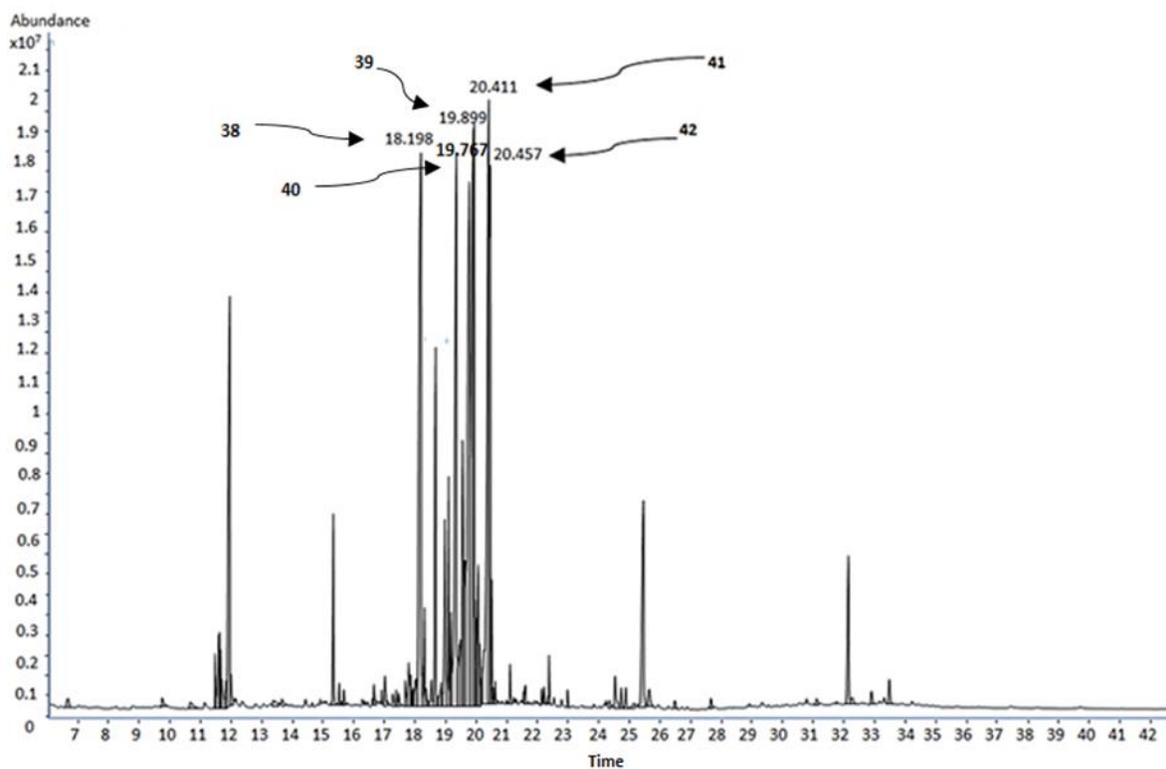


Figura 22. Espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de la fracción LoDM-3Ac-6

Una vez obtenido el cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas (cromatograma 6, tabla 16), se analizaron los picos más abundantes y por comparación con la biblioteca del equipo (NIST 17a) se identificaron los compuestos que se muestran en la figura 23.



Cromatograma 6. Cromatograma de la fracción LoDM-3Ac-6

Tabla 15. Compuestos identificados en la fracción LoDM-3Ac-6 analizada por CG-EM

Compuesto	RT (min)	m/z M ⁺	Abundancia %
D-Xilitol-pentaacetilado,2,3,4,5-penta-O-acetil (38)	18.198	289.1	9.98
D-glucosa-2,3,4,5,6-pentaacetato (39)	19.899	331.1	10.58
D-manosa pentaacetilada (40)	19.767	389.1	9.86
Myo-inositol hexaacetato (41)	20.411	289.1	10.49
D-glucitol hexaacetato (42)	20.457	375.2	5.41

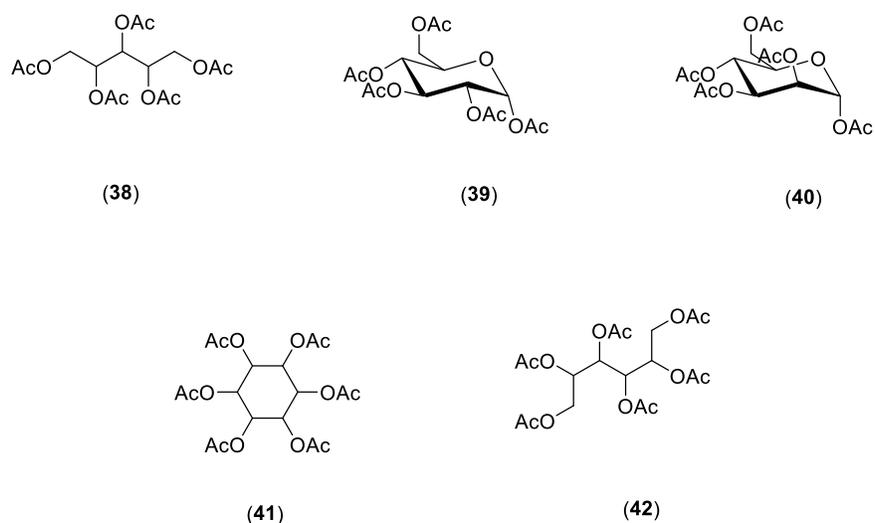


Figura 23. Compuestos identificados en la fracción LoDM-3Ac-6

El D-xilitol (**38**), es un poliol de 5 carbonos (alcohol de azúcar), que se encuentra en frutas y plantas, y es utilizado ampliamente en la industria como sustituto en la dieta para personas con deficiencia de insulina, también se le atribuyen actividades anticancerígenas, y remineralización, por lo cual es utilizado en la odontología, además de que puede ayudar a prevenir infecciones en vías respiratorias.¹²⁰ La D-manosa (**40**), es un monosacárido, usado como un suplemento dietético influenciando la contribución de gliconutrientes en la salud, además es un metabolito de interés industrial por sus propiedades, entre las que se encuentra su actividad para tratar o prevenir las infecciones en vías urinarias, inhibiendo la adhesión de las bacterias a las células uroepiteliales.¹²¹⁻¹²³ El mio-inositol (**41**), es un compuesto cíclico polihidroxlado, que ha demostrado poseer actividades regulatorias de la glucosa en sangre.¹²⁴

7.2.3 Purificación de la fracción LoDM-3Ac-8

De la fracción LoDM3Ac-8, sometida a proceso de purificación se obtuvieron 5 subgrupos de fracciones que se identificaron con las claves LoDM-3Ac-8A, LoDM-3Ac-8B, LoDM-3Ac-8C, LoDM-3Ac-8D y LoDM-3Ac-8E. De estas fracciones se determinó solamente analizar las subfracciones LoDM-3Ac-8A, LoDM-3Ac-8B y LoDM-3Ac-8C, y se obtuvieron los siguientes resultados:

7.2.3.1 Análisis de la subfracción LoDM-3Ac-8A

De esta fracción se obtuvo un sólido, soluble en diclorometano y en CCF se observó una sola mancha fosforescente al irradiar luz ultravioleta (366 nm). Al analizar el espectro de RMN de hidrógeno y carbono trece se observaron las siguientes señales; RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) δ : 8.51 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.91 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 7.09 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 6.48 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H), 2.75 (s, 3H). RMN de ^{13}C (151 MHz, CDCl_3) δ : 160.00, 159.23, 157.91, 151.15, 139.97, 117.48, 113.83, 110.27, 21.54. El análisis de estas señales llevo a asignar las dos señales dobles con constantes de acoplamiento de 9.8 Hz a 2 hidrógenos de un doble enlace que se estaban acoplando, guardando una geometría cis; así mismo, la señal simple a campo alto que integra para tres hidrógenos y que por su desplazamiento químico a δ 2.75, se encuentra desplazada a campo más bajo de lo habitual para grupos metilos, se consideró que esta unido a un sistema aromático. Las dos señales dobles restantes, se había pensado que podrían ser de 2 hidrógenos de un benceno que guardaban una relación 1,2 o de tipo orto, sin embargo, el valor de sus constantes de acoplamiento no estaba de acuerdo con los valores reportados para acoplamientos de tipo orto de un benceno. Se revisó en la literatura estos valores de constantes de acoplamiento y encontramos que se trataba de un heterociclo, en este caso de piridina, esto de alguna forma coincidía con lo observado en CCF, que la mancha era fosforescente en onda larga, lo cual no es común cuando el anillo no es benceno. Estos datos junto a los de carbono trece, así como los bidimensionales heteronucleares HSQC y HMBC permitieron identificar al compuesto con el nombre de 5-metil-2H-pirano[3,2-c] piridin-2-ona (**43**), esto de acuerdo con las siglas de la IUPAC. Cabe mencionar que este compuesto no se encontró reportado en la literatura, por lo que consideramos que es un producto natural nuevo reportado por primera vez en la especie *Ludwigia octovalvis*. El espectro de masas de alta resolución, este dato respalda la propuesta estructural para este compuesto. Solo mostraremos el espectro de hidrogeno en este apartado (figura 23) y EM-FAB+ alta resolución (figura 25), los espectros de ^{13}C , HSQC, HMBC (espectros 9-11).

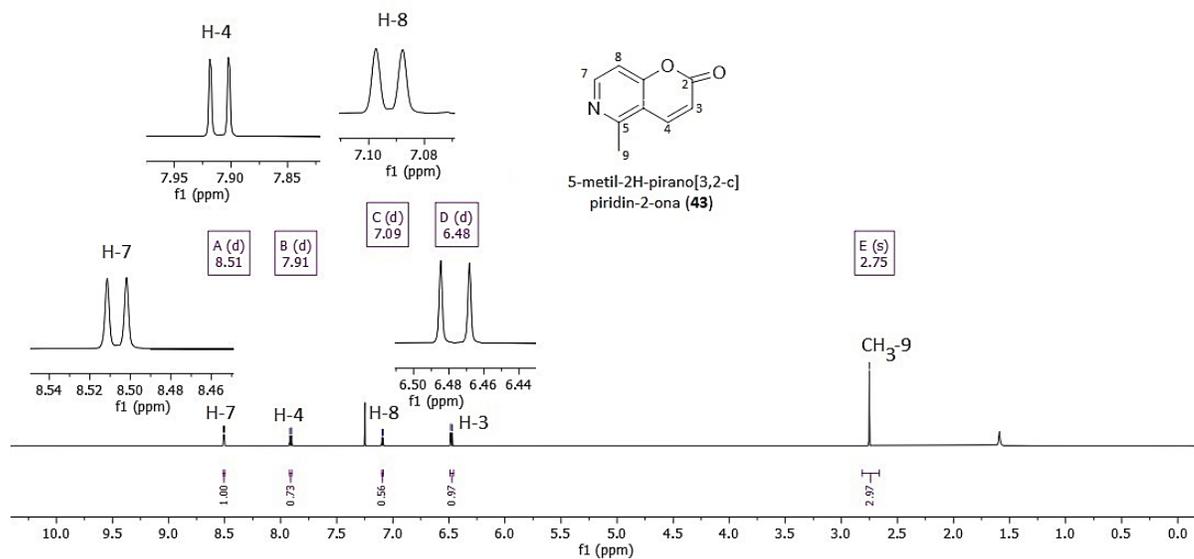


Figura 24. RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) del 5-metil-2H-pirano[3,2-c] piridin-2-ona (**43**)

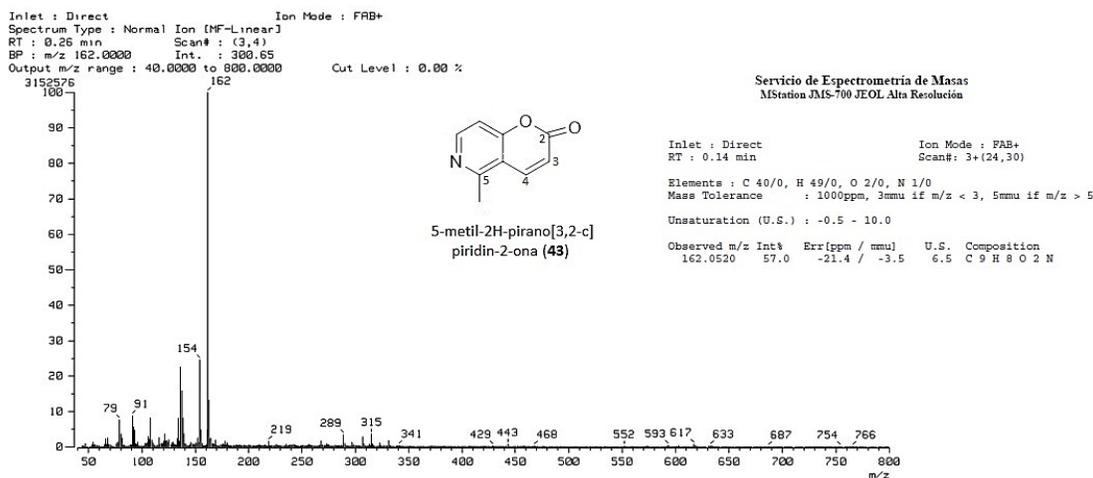


Figura 25. espectrometría de masas-masas FAB + y alta resolución del compuesto (**43**)

7.2.3.2 Análisis de la subfracción LoDM-3Ac-8B

De esta fracción se preparó una muestra (2.1 mg) disuelta en cloroformo y se envió para su análisis por CG/EM, lo que se pensó en un principio, de acuerdo con lo observado en CCF,

que la subfracción LoDM-3Ac-8B contenía un solo, el cromatograma mostro que había varios picos, dos de ellos abundantes (figura 26).

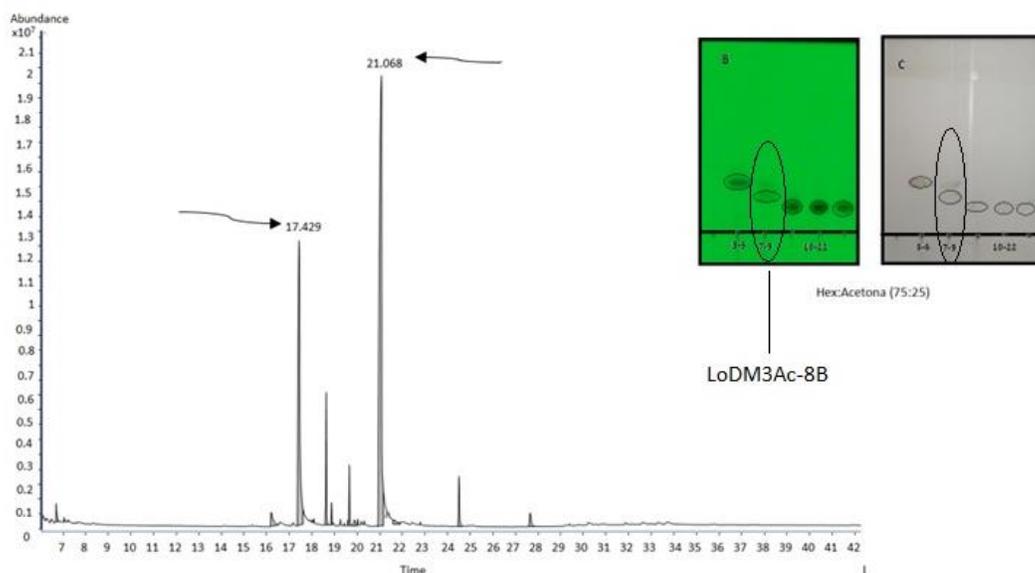


Figura 26. Cromatograma obtenido para la subfracción LoDM3Ac-8B.

Se analizó y se compararon los datos experimentales obtenidos con los de la biblioteca del equipo, estos resultados dieron información importante sobre la identidad estructural de estos picos o compuestos (tabla 17, figura 27).

Tabla 16. Compuestos identificados en la fracción LoDM-3Ac-8B analizada por CG-EM

Compuesto	RT (min)	m/z M ⁺	Abundancia %
7-(dietilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (44)	21.068	231.1	56.51
4,7-dimetil-2H,5H-pirano[4,3-b] piran-2,5-diona (45)	17.429	192.1	27.49

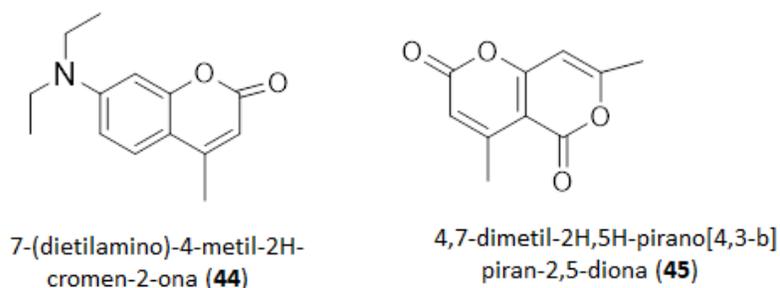


Figura 27. Compuestos identificados en la subfracción LoDM3Ac-8B

De esta fracción fue posible obtener un espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3), y efectivamente se observan señales al menos para dos compuestos, al analizar cada una de las señales se pudieron encontrar las señales correspondientes al compuesto (**45**), sin embargo, para el compuesto (**44**), no se encontraron las señales del benceno que muestra la estructura del compuesto que se encuentra en la biblioteca del equipo. Las señales que muestra el espectro de RMN de ^1H , corresponden a un benceno tetrasustituido, en donde los dos hidrógenos se encuentran en carbonos adyacentes, además de estas hay 2 señales dobles adicionales que muestran una constante de acoplamiento característica de hidrógenos vinílicos con geometría *cis*. La propuesta estructural para el compuesto (**44**) en base a los datos de RMN de ^1H , se ilustra en la figura 28.

Desafortunadamente no fue posible obtener en forma pura la fracción LoDM-3Ac-8B, se intentó purificar por cromatografía en placa preparativa, pero debido a que la cantidad era muy poca, se perdió parte de la muestra y lo poco que se obtuvo (3.2 mg) no está pura, esto lo pudimos establecer, obteniendo nuevamente el cromatograma de CG-EM.

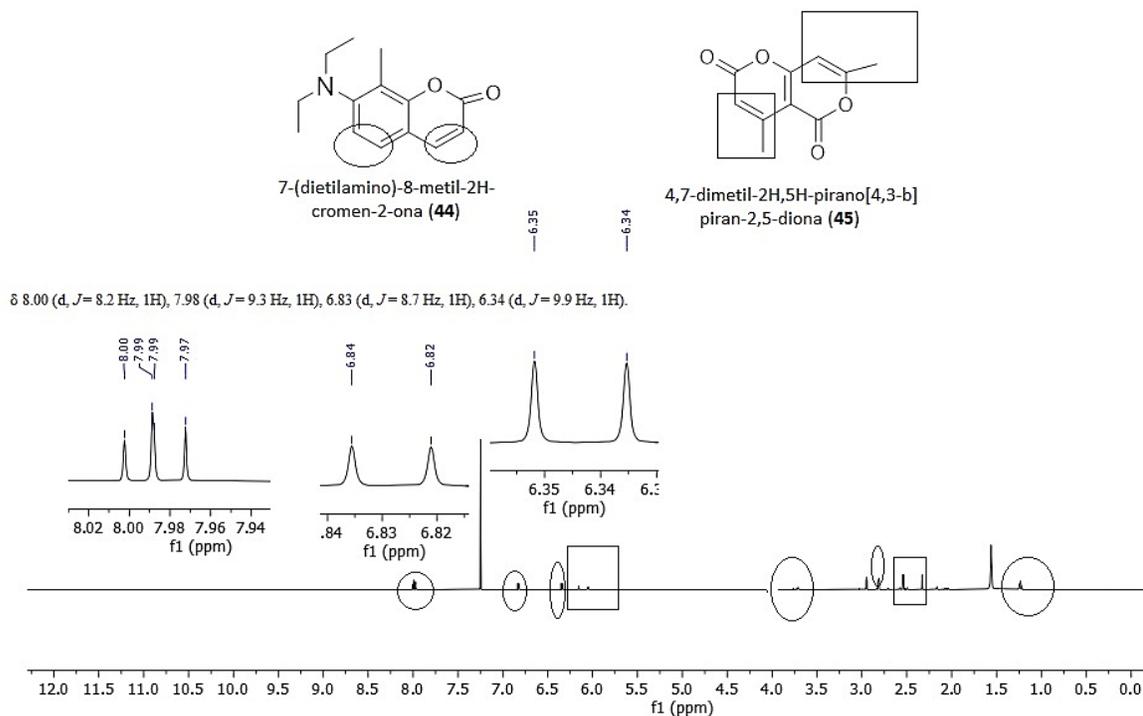


Figura 28. RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) de la subfracción LoDM-3Ac-8B

7.2.3.3 Análisis de la subfracción LoDM3Ac-8C

De esta subfracción se obtuvo el cromatograma de gases-masas (CG-EM), se observa un pico abundante y por comparación con lo descrito en la biblioteca encontramos nuevamente que se trataba del compuesto (**45**). La identidad estructural se pudo establecer inequívocamente por RMN de ^1H y HSQC, los cuales se encuentran en la sección de anexos (espectros 13 y 14). Así mismo, se obtuvieron las masas-masas de alta resolución y los experimentos de infrarrojo, lo cual apoya la identificación del compuesto como: 4,7-dimetil-2H,5H-pirano[4,3-b]piran-2,5-diona (**45**). Solo mostraremos en esta sección los datos obtenidos de Masas-Masas (Figura 29).

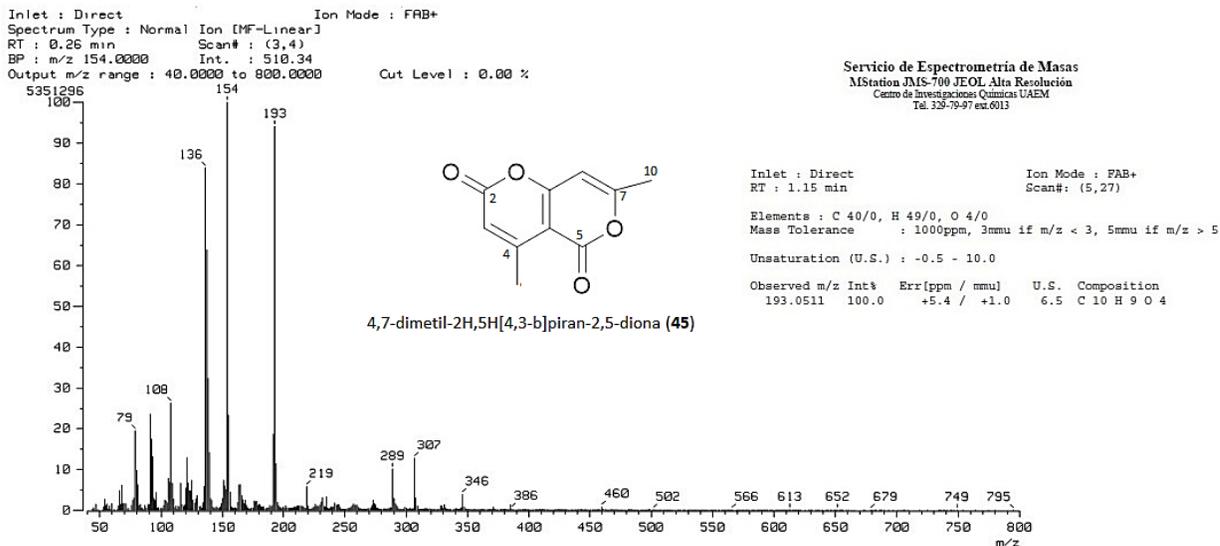


Figura 29. espectrometría de Masas-Masas FAB + y alta resolución del compuesto (45)

cabe mencionar que este nombre está de acuerdo con lo que describe el programa ChemDraw, para los compuestos (43), (44) y (45). También es importante mencionar que ningunos de estos compuestos se encontraron reportados en la literatura como productos naturales en ninguna especie vegetal, por lo que, de ser así, hemos decidido para una posible publicación identificarlos con el nombre de la especie, como: Ludwiginia A (43), Ludwiginia B (44) y Ludwiginia C (45).

7.3 Evaluación de actividad antimicrobiana

La evaluación antimicrobiana se realizó en el laboratorio de la Facultad de Farmacia en colaboración con la facultad de química, la persona encargada de supervisar la evaluación fue la Dra. Cristal Columba Palomares. Las cepas bacterianas empleadas fueron: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus aureus* (oxacilin-meticilin resistente) (ATCC 43300), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC Caso clínico) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) Como ya se mencionó en la sección 6.6.1., las fracciones evaluadas fueron: El extracto hidroalcohólico (LoHA) y las fracciones LoHA-3, LoHA-6, LoHA-8 y LoDM-3 (tabla 18).

Tabla 17. Cepas bacterianas utilizadas, extracto y fracciones evaluadas

Bacteria	ATCC	Tinción de Gram
<i>Escherichia coli</i>	8739	Negativa
<i>Streptococcus pyogenes</i> *	19615	Positiva
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Positiva
<i>Staphylococcus aureus</i> (oxacilin-meticilin resistente)	43300	Positiva
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	C.C	Negativa
<i>Salmonella typhimurium</i>	14028	Negativa

C.C= Caso clínico

*Cepario Facultad de Química,
Departamento de Biología de la UNAM



Facultad de Química
Departamento de Biología
CEPARIO



RESULTADOS PRELIMINARES DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Especie vegetal	Extracto/ Fracciones	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
		<i>E. coli</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. aureus SARM</i>
	Extracto LoHA	SA	SA	500	62.5	SA	62.5
	LoHA-3	SA	SA	500	62.5	SA	62.5
	LoHA-6	SA	SA	500	SA	SA	SA
	LoHA-8	SA	SA	250	SA	SA	SA
	LoDM-3	SA	SA	SA	31.2	SA	31.2
Gentamicina		≤ 0.62	2.5	0.62	≤ 0.62	≤ 0.62	20

SA= Sin Actividad a las concentraciones probadas

Como se puede apreciar en la tabla de resultados preliminares de actividad antimicrobiana, solo la fracción obtenida del extracto de diclorometano: metanol identificada con la clave

LoDM-3 mostró un efecto significativo frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300), de esta fracción se identificaron 10 compuestos (figura 30).

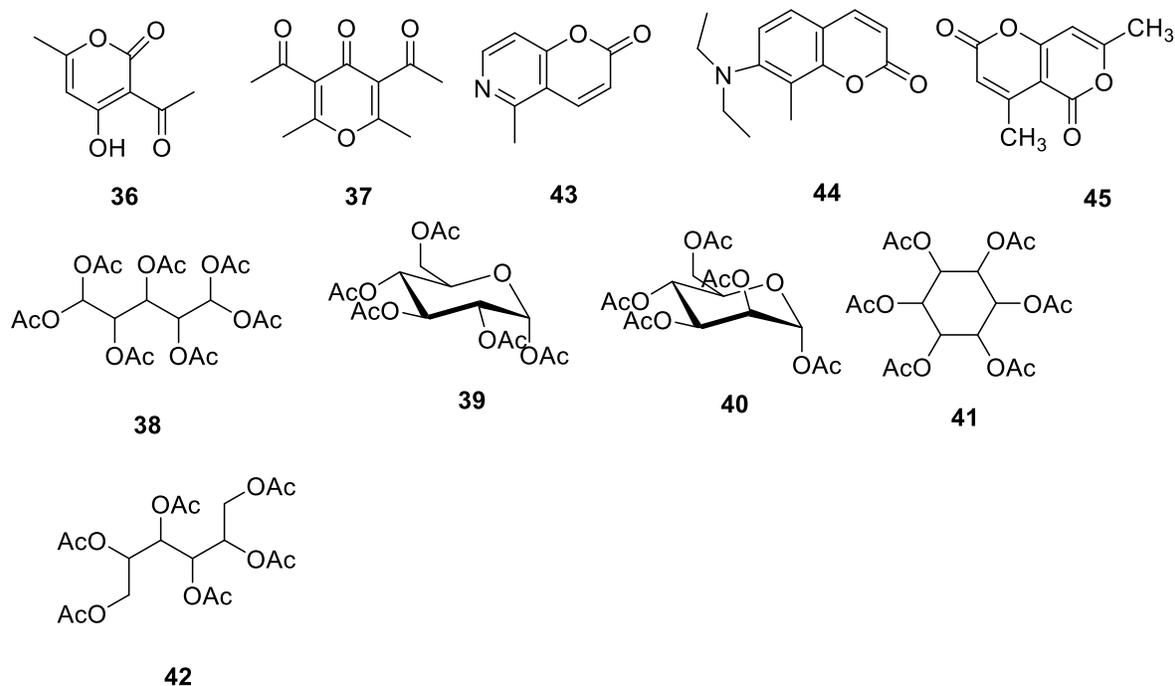
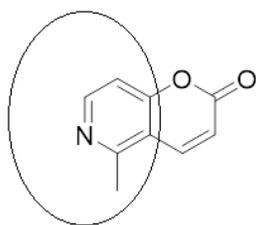
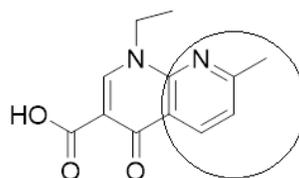


Figura 30. Compuestos identificados en la fracción LoDM-3

Por cuestiones de tiempo, en algunos casos la concentración y a la disponibilidad de las cepas bacterianas no fue posible evaluar los compuestos puros (**36-45**), y con estas evaluaciones poder establecer la participación de cada uno de estos en el efecto antibacteriano mostrado por la fracción de la cual fueron aislados. Además del compuesto (**36**), consideramos que el compuesto (**43**) puede mostrar un efecto antibacteriano, esto debido a la similitud estructural con un fármaco utilizado en infecciones en vías urinarias conocido como Pirifur, uno de los componentes de este fármaco es el ácido nalidíxico.



Compuesto (**43**)



Ácido nalidíxico

8. Conclusiones

La extracción con disolventes de polaridad creciente influyó en el contenido químico y en los resultados de la evaluación antimicrobiana, ya que, en el extracto hidroalcohólico (LoHA) se obtuvo en mayor concentración compuestos polihidroxilados y eso pudo haber influido sobre los compuestos minoritarios como: el 1,2,3-bencenotriol (**24**), Loliolida (**25**) y fitol (**29**), de los cuales existen reportes sobre su actividad antimicrobiana. Por otro lado, del extracto de diclorometano:metanol (LoDM), se identificaron el Ácido dehidroacético (**36**), (**44**), 2,6-dimetil-3,5-diacetil-4H-piran-4-ona (**37**), 5-metil-2H-pirano[3,2-c] piridin-2-ona (**43**), 7-(dietilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**44**) y 4,7-dimetil-2H,5H-pirano[4,3-b] piran-2,5-diona (**45**). Los resultados obtenidos de la evaluación antimicrobiana revelaron que el extracto hidroalcohólico (LoHA), la fracción LoHA-3 y el extracto de diclorometano: metanol (LoDM) mostraron inhibición frente a bacterias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 a valores de MIC de 62.5 µg/ml y 31.2 µg/ml respectivamente. Cabe resaltar que es el primer reporte de estos compuestos en una especie vegetal, y destacar, sobre todo, que los compuestos (**43-45**), es el primer reporte sobre su existencia.

9. Perspectivas

- * Trabajar nuevamente con material vegetal, que nos permita contar con una mayor concentración de los extractos LoHA y LoDM.
- * Purificar los extractos LoHA y LoDM, con la finalidad de obtener en mayor concentración los compuestos: El 1,2,3-bencenotriol (**24**), Loliolida (**25**), ácido dehidroacético (**36**), 2,6-dimetil-3,5-diacetil-4H-piran-4-ona (**37**), 5-metil-2H-pirano[3,2-c] piridin-2-ona (**43**), 7-(dietilamino)-4-metil-2H-cromen-2-ona (**44**) y 4,7-dimetil-2H,5H-pirano[4,3-b] piran-2,5-diona (**45**) y evaluar su efecto antimicrobiano.

10. Referencias

1. Muñoz Lopez de Bustamante. (1996). Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. (2da ed.) España.
2. Tácuna-Calderón, A., Moncada-Mapelli, E., Lens-Sardón, L., Huaccho-Rojas, J., Gamarra-Castillo, F., & Salazar-Granara, A. (2020). Estrategias de la Organización Mundial de la Salud en Medicina Tradicional y Reconocimiento de Sistemas de Medicina Tradicional. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 13(1), 101-102.
3. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (2021). Plantas medicinales de México. URL: [https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales de México](https://www.gob.mx/semarnat/articulos/plantas-medicinales-de-mexico).
4. Cordell, G. A. (1995) Changing Strategies in Natural Products Chemistry. *Phytochemistry* 1995, 40 1580-1585
5. M. Sato, G. Maulik, D. Bagchi, D.K. Das. (2000) Myocardial protection by protykin, a novel extract of trans-resveratrol and emodin. *Free Radic Res*, 32(2), pp. 135-144
6. Klayman, D. (1985). Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China. *Science*, 228(4703), 1049–1055.
7. Pigrau, C., & Escolà-Vergé, L. (2020). Infecciones urinarias recurrentes: desde la patogenia a las estrategias de prevención. *Medicina Clínica*, 155(4), 171-177.
8. Rendon, M. A., Reyes, A., Rosas, J. B., & Rodríguez, F. (2012). Infecciones de vías urinarias. Patrón de resistencia in vitro de *E. Coli* y *E. Coli* ESBL a quinolonas, trimetoprimasulfametoxazol y nitrofurantoína. *Med Int Mex*, 28(5), 434-9.
9. Sotto, A., De Boever, C. M., Fabbro-Peray, P., Gouby, A., Sirot, D., & Jourdan, J. (2001). Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study. *Journal of clinical microbiology*, 39(2), 438-444.

10. Díaz, J. (2020). Estudio químico y evaluación de la actividad antimicrobiana de *Mimosa albida* (vergonzosa). Tesis de maestría. Universidad Autónoma Del Estado De Morelos.
11. Organización mundial de la salud, Resistencia a los antimicrobianos. (Recuperado el 4 febrero 2023) URL:
<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20son%20los%20antimicrobianos%3F,los%20animales%20y%20las%20plantas>
12. Girón, W. (2008). Antimicrobianos. Artículo de revisión. Universidad Autónoma de Honduras. URL: <http://cidbimena.desastres.hn/RFCM/pdf/2008/pdf/RFCMVol5-2-2008-11.pdf>
13. Agrovemarket. (2007). Antibióticos y antimicrobianos.
URL: <https://www.agrovetmarket.com/investigacion-salud-animal/pdf/download/antibioticos-y-antimicrobianos>
14. Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), 44-52.
15. López, S., Fumagalli, J., & Gaglio, R. (2017). Guía de medicamentos esenciales para el PNA Antimicrobianos. República de Argentina. Recuperado de: <https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2020-06/guia-de-medicamentos-esenciales-para-el-pna-antimicrobianos-2017.pdf>
16. Ogle J.W. (2010). Tratamiento antimicrobiano. Hay W.W., & Levin M.J., & Sondheimer J.M., & Deterding R.R.(Eds.), *Diagnóstico y tratamiento pediátricos*, 19e. McGraw Hill. Recuperado el 04 de febrero de 2023. URL: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1481§ionid=97001326>
17. Secretaria de salud. (2022) Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud (IAAS) Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). México. Recuperado el 06 de febrero de 2023

URL:https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/770528/BOLET_NRHOVEA_GOSTO2022_Final_21102022_1.pdf

18. Secretaria de salud de Morelos. (2018). Morbilidad. Recuperado el 06 de febrero de 2023. URL: https://www.ssm.gob.mx/portal/diagnostico-estatal-en-salud/2018/Capitulo2.%202.5%20Morbilidad/suivecierres2017_general.pdf
19. ISSEA, Secretaria de salud. (2022). Boletín Epidemiológico diciembre 2022. Recuperado el 8 de febrero de 2023 URL: <https://www.issea.gob.mx/Docs/Boletines%20Epidemiologia/Panoramas%202022/BOLETIN%20EPIDEMIOLOGICO%20DICIEMBRE%202022.pdf>
20. Garza-Montúfar, M. E., Treviño-Valdez, P. D., & De la Garza-Salinas, L. H. (2018). Resistencia bacteriana y comorbilidades presentes en pacientes urológicos ambulatorios con urocultivos positivos. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 56(4), 347-353.
21. Secretaria de salud. (2013). Generalidades De Las Siete Principales Causas De Morbilidad En México 2005-2012. Vol 30. Num. 43. Recuperado el 10 de febrero de 2023 URL: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/12855/sem43.pdf>
22. Ortega-Lozano, A. J., Hernández-Cruz, E. Y., Gómez-Sierra, T., & Pedraza-Chaverri, J. (2023). Antimicrobial Activity of Spices Popularly Used in Mexico against Urinary Tract Infections. *Antibiotics*, 12(2), 325.
23. Figueroa, D., Hernández, D., Romero, L. (2017) Infección recurrente de vías urinarias. Guía de práctica clínica. Colegio Mexicano de Especialistas en Ginecología y Obstetricia. URL: http://www.comego.org.mx/formatos/Guias/%20GPC2015_3.pdf
24. Patterson, J. E., & Andriole, V. T. (1997). Bacterial urinary tract infections in diabetes. *Infectious Disease Clinics*, 11(3), 735-750.
25. Calderón-Jaimes, E., Casanova-Román, G., Galindo-Fraga, A., Gutiérrez-Escoto, P., Landa-Juárez, S., Moreno-Espinosa, S., ... & Valdez-Vázquez, R. (2013). Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(1), 3-10.

26. Lee, J. B., & Neild, G. H. (2007). Urinary tract infection. *Medicine*, 35(8), 423-428.
27. Secretaria de salud. (2022). PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES ASOCIADAS A LA ATENCIÓN DE LA SALUD (IAAS). Boletín Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). URL: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/770528/BOLET_NRHOVEAGOS TO2022_Final_21102022_1.pdf
28. Pérez Arbej, J. A., & Cameo Rico, M. I. (2009). Abordaje de la infección aguda del parénquima renal: estudio retrospectivo de los años 2005-2007. *Archivos Españoles de Urología (Ed. impresa)*, 62(3), 186-194.
29. Acosta-Terriquéz JE, Ramos-Martínez MA, Zamora-Aguilar LM, Murillo-Llanes J. Prevalencia de infección de vías urinarias en pacientes hospitalizadas con amenaza de parto pretérmino. *Ginecol Obstet Mex* 2014;82:737-743.
30. Enríquez, O. D. C., & González, J. H. T. (2022). Prevalencia, factores de riesgo y tratamiento de la infección de vías urinarias en mujeres embarazada. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 21(4), 1-11
31. Coria, M. D. P., Guzzetti, P., Suárez, M., Vigliarolo, L., Viegas Caetano, J. A., & Lopardo, H. (2018). Infecciones urinarias por *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus saprophyticus* y embarazo. *Acta bioquímica clínica latinoamericana*, 52(4), 423-42.
32. Echevarría-Zarate, J., Sarmiento Aguilar, E., & Osoro-Plenge, F. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta médica peruana*, 23(1), 26-31
33. Chavolla-canal, A. J., & Gonzalez-mercado, M. G. (2018). Factores de riesgo asociados con infección de la vía urinaria provocada por superbacterias. *Revista mexicana de urología*. 78(6), 425-433.
34. Rodríguez-Noriega, E., León-Garnica, G., Petersen-Morfín, S., Pérez-Gómez, H. R., González-Díaz, E., & Morfín-Otero, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*, 34, 181-190.

35. Schechner, V., Temkin, E., Harbarth, S., Carmeli, Y., & Schwaber, M. J. (2013). Epidemiological interpretation of studies examining the effect of antibiotic usage on resistance. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), 289-307.
36. Jorge, C., & Luis, M. (2009). Mecanismo de acción de los antimicrobianos. *Revista Elsevier*, 27(1), 44-52.
37. Durán, L. (2018). Resistencia antimicrobiana e implicancias para el manejo de infecciones del tracto urinario. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 29(2), 213-221.
38. Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M., & Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(2), 70-76.
39. Sotto, A., De Boever, C. M., Fabbro-Peray, P., Gouby, A., Sirot, D., & Jourdan, J. (2001). Risk factors for antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolated from hospitalized patients with urinary tract infections: a prospective study. *Journal of clinical microbiology*, 39(2), 438-444.
40. Bermúdez, A., Oliveira-Miranda, M. A., & Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*, 30(8), 453-459.
41. Akerele, O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro mundial de la salud 1993*; 14 (4): 390-395.
42. Guzmán, S., Díaz, R., González, M. (2017). Plantas medicinales la realidad de una tradición ancestral. Secretaría de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. URL: https://vun.inifap.gob.mx/VUN_MEDIA/BibliotecaWeb/_media/_folletoinformativo/1044_4729_Plantas_medicinales_la_realidad_de_una_tradici%C3%B3n_ancestral.pdf
43. Alamilla, L. Neyra, L. (2020). Plantas medicinales. *Biodiversidad mexicana*. URL: <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/medicinal/plantas>

44. Horacio, S. (2020). Plantas medicinales, tradición ancestral. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. URL: <https://www.gob.mx/inifap/articulos/plantas-medicinales-tradicion-ancestral>
45. Hotwani, K., Baliga, S., & Sharma, K. (2014). Phytodentistry: use of medicinal plants. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11(4), 233-251.
46. Martínez Aguilar, Y., Soto Rodríguez, F., Almeida Saavedra, M., Hermosilla Espinosa, R., & Martínez Yero, O. (2012). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L.(marañón). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(4), 320-329.
47. Altamirano, G. L. V., Moyota, J. M. Q., ubon Usca, I. R., & Rodríguez, J. A. V. (2020). Identificación de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Callistemon speciosus* (escobillón rojo). *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 39(2), 198-206.
48. Domingo, D. & Lopez-Brea, M. (2003). Plantas con actividad antimicrobiana. *Rev. Esp Quimioterap.* Vol. 16. (N°4): 385-393. URL: https://seq.es/wp-content/uploads/2008/08/seq.es_seq_0214-3429_16_4_385.pdf
49. Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., & Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
50. Palma Cruzado, Y. C., & Segura Delgado, E. Y. (2021). Uso de la herbolaria en el tratamiento de enfermedades del tracto urinario en la población femenina de Otuzco, Cajamarca–2021.
51. Mitra, S., Sarkar, N., & Barik, A. (2017). Long-chain alkanes and fatty acids from *Ludwigia octovalvis* weed leaf surface waxes as short-range attractant and ovipositional stimulant to *Altica cyanea* (Weber)(Coleoptera: Chrysomelidae). *Bulletin of entomological research*, 107(3), 391-400.
52. Mitra, S., Karmakar, A., Mukherjee, A., & Barik, A. (2017). The role of leaf volatiles of *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) Raven in the attraction of *Altica cyanea* (Weber)(Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Chemical Ecology*, 43, 679-692.

53. Global Biodiversity Information Facility, Recuperado el 05 de marzo de 2023 URL: <https://www.gbif.org/species/5420987>
54. Hanan, A., & Mondragon, J. (2009). *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) Raven. CONABIO. Recuperado el 05 de marzo de 2023. URL: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/onagraceae/ludwigia-octovalvis/fichas/ficha.htm>
55. Miguel-Vázquez, M. I., & Cerros-Tlatilpa, R. (2013). *Onagraceae* of Morelos, Mexico. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84(4), 1309-1315.
56. Ferra, D. L. M. (2019). Caracterización de inhibidores de enzimas digestivas involucradas en el control de la obesidad y la diabetes en *Ludwigia octovalvis*. Tesis Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
57. Cumana Campos, L. J. (2010). Clave para especies de *Ludwigia* L. (*Onagraceae*) de la región nor-oriental e insular de Venezuela depositadas en el herbario IRBR. *Acta Botánica Venezuelica*, 33(2), 299-327.
58. Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana, Recuperado el 05 de marzo de 2023 URL: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=ludwigia-octovalvis>.
59. Ramírez, G., Zavala, M., Pérez, J., & Zamilpa, A. (2012). In vitro screening of medicinal plants used in Mexico as antidiabetics with glucosidase and lipase inhibitory activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
60. Chang, C. I., Kuo, C. C., Chang, J. Y., & Kuo, Y. H. (2004). Three New Oleanane-Type Triterpenes from *Ludwigia octovalvis* with Cytotoxic Activity against Two Human Cancer Cell Lines. *Journal of natural products*, 67(1), 91-93.
61. Morales, D., Ramirez, G., Herrera-Arellano, A., Tortoriello, J., Zavala, M., & Zamilpa, A. (2018). Identification of digestive enzyme inhibitors from *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) PH Raven. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.

62. Yan, J., & Yang, X. W. (2005). Studies on the chemical constituents in herb of *Ludwigia octovalvis*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese Materia Médica*, 30(24), 1923-1926.
63. Lin, W. S., Lo, J. H., Yang, J. H., Wang, H. W., Fan, S. Z., Yen, J. H., & Wang, P. Y. (2017). *Ludwigia octovalvis* extract improves glycemic control and memory performance in diabetic mice. *Journal of ethnopharmacology*, 207, 211-219.
64. Chang, C. I., & Kuo, Y. H. (2007). Oleanane-type triterpenes from *Ludwigia octovalvis*. *Journal of Asian natural products research*, 9(1), 67-72.
65. SJ, Ng LT, Wang GH, Huang YJ, Chen JL, Sun FM. Chlorophyll a, an active anti-proliferative compound of *Ludwigia octovalvis*, activates the CD95 (APO-1/CD95) system and AMPK pathway in 3T3-L1 cells. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2010;48(2):716–21.
66. Murugesan T, Rao B, Sinha S, Biswas S, Pal M, Saha B. Anti-diabetic Activity of *Jussiaea suffruticosa* Extract in Rats. *Pharm Pharmacol Commun*. 2000; 6:451–3. DOI: 10.1111/j.2042-7158. 2000.tb00219.
67. Yakob, H. K., Uyub, A. M., & Sulaiman, S. F. (2012). Toxicological evaluation of 80% methanol extract of *Ludwigia octovalvis* (Jacq.) PH Raven leaves (Onagraceae) in BALB/c mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 142(3), 663-668. [Internet]. 2012;142(3):663–8.
68. Yang LL, Yen KY, Kiso Y, Hikino H. Antihepatotoxic actions of Formosan plant drugs. *J Ethnopharmacol*. 1987;19(1):103–10. DOI: 10.1016/0378-8741(87)90142-5.
69. Lin, W. S., Chen, J. Y., Wang, J. C., Chen, L. Y., Lin, C. H., Hsieh, T. R., ... & Wang, P. Y. (2014). The anti-aging effects of *Ludwigia octovalvis* on *Drosophila melanogaster* and SAMP8 mice. *Age*, 36, 689-703.
70. Yakob, H. K., Sulaiman, S. F., & Uyub, A. M. (2012). Antioxidant and antibacterial activity of *Ludwigia octovalvis* on *Escherichia coli* O157: H7 and some pathogenic bacteria. *World Applied Sciences Journal*, 16(1), 22-29.

71. Rodríguez, H. M. (2022). Estudios antidiabético y antihipertensivo de *Ludwigia octovalvis* en modelos murinos. Tesis Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
72. Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263-268.
73. Martínez-Ceja, A., Romero-Estrada, A., Columba-Palomares, M. C., Hurtado-Díaz, I., Alvarez, L., Teta-Talixtacta, R., ... & Bernabé-Antonio, A. (2022). Anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant activity of leaf and cell cultures extracts of *Randia aculeata* L. and its chemical components by GC-MS. *South African Journal of Botany*, 144, 206-218.
74. Benkova, M., Soukup, O., & Marek, J. (2020). Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of applied microbiology*, 129(4), 806-822.
75. Pérez Esteve, E., & Rivas Soler, A. (2021). Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria por métodos fenotípicos.
76. Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34, 33-41.
77. Saeed, N. M., El-Demerdash, E., Abdel-Rahman, H. M., Algandaby, M. M., Al-Abbasi, F. A., & Abdel-Naim, A. B. (2012). Anti-inflammatory activity of methyl palmitate and ethyl palmitate in different experimental rat models. *Toxicology and applied pharmacology*, 264(1), 84-93.
78. Ko, G. A., & Cho, S. K. (2018). Ethyl linoleate inhibits α -MSH-induced melanogenesis through Akt/GSK3 β / β -catenin signal pathway. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 22(1), 53.

79. Charakida, A., Charakida, M., & Chu, A. C. (2007). Double-blind, randomized, placebo-controlled study of a lotion containing triethyl citrate and ethyl linoleate in the treatment of acne vulgaris. *British Journal of Dermatology*, 157(3), 569-574.
80. Kumar, P. P., Kumaravel, S., & Lalitha, C. (2010). Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of *Vitex negundo*. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(7), 191-195.
81. Musa, A. M., Ibrahim, M. A., Aliyu, A. B., Abdullahi, M. S., Tajuddeen, N., Ibrahim, H., & Oyewale, A. O. (2015). Chemical composition and antimicrobial activity of hexane leaf extract of *Anisopus mannii* (*Asclepiadaceae*). *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 4(2), 129.
82. Wei, L. S., & Wee, W. (2011). Characterization of antimicrobial, antioxidant, anticancer properties and chemical composition of Malaysian *Andrographis paniculata* leaf extract. *Pharmacologyonline*, 2, 996-1002.
83. Hassan, M. M., Mossa, J. S., & Taragan, A. H. U. K. (1988). Analytical profile of phytonadione. In *Analytical Profiles of Drug Substances* (Vol. 17, pp. 449-531). Academic Press.
84. Vijayan, A. (2017). Phytochemical analysis of *Elaeocarpus blascoi* Weibel using gas chromatography-mass spectroscopy. *Journal of Natural Products and Resources*, 3(2), 125-129.
85. Gupta, A., Jeyakumar, E., & Lawrence, A. R. (2021). Pyrogallol: a competent therapeutic agent of the future. *Biotech Env Sc*, 23(2), 213-217.
86. Revathi, S., Hakkim, F. L., Kumar, N. R., Bakshi, H. A., Sangilimuthu, A. Y., Tambuwala, M. M., ... & Kayalvizhi, N. (2019). In vivo anti cancer potential of pyrogallol in murine model of colon cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(9), 2645.
87. Mitra, D., Dey, A., Biswas, I., & Das Mohapatra, P. K. (2021). Bioactive compounds as a potential inhibitor of colorectal cancer; an insilico study of Gallic acid and Pyrogallol. *Iranian Journal of Colorectal Research*, 9(1), 32-39.

88. Murata, M., Nakai, Y., Kawazu, K., Ishizaka, M., Kajiwar, H., Abe, H., ... & Seo, S. (2019). Loliolide, a carotenoid metabolite, is a potential endogenous inducer of herbivore resistance. *Plant Physiology*, 179(4), 1822-1833.
89. Grabarczyk, M., Wińska, K., Mączka, W., Potaniec, B., & Anioł, M. (2015). Loliolide—the most ubiquitous lactone. *Acta Universitatis Lodzianensis. Folia Biologica et Oecologica*, 11, 1-8.
90. Dias, M. K. H. M., Madusanka, D. M. D., Han, E. J., Kim, M. J., Jeon, Y. J., Kim, H. S., ... & Ahn, G. (2020). (–)-Loliolide isolated from *Sargassum horneri* protects against fine dust-induced oxidative stress in human keratinocytes. *Antioxidants*, 9(6), 474.
91. Chung, C. Y., Liu, C. H., Burnouf, T., Wang, G. H., Chang, S. P., Jassey, A., ... & Lin, L. T. (2016). Activity-based and fraction-guided analysis of *Phyllanthus urinaria* identifies loliolide as a potent inhibitor of hepatitis C virus entry. *Antiviral research*, 130, 58-68
92. Venkatramanan, M., Sankar Ganesh, P., Senthil, R., Akshay, J., Veera Ravi, A., Langeswaran, K., ... & Shankar, E. M. (2020). Inhibition of quorum sensing and biofilm formation in *Chromobacterium violaceum* by fruit extracts of *Passiflora edulis*. *ACS omega*, 5(40), 25605-25616.
93. Adeoye-Isijola, M. O., Olajuyigbe, O. O., Jonathan, S. G., & Cooposamy, R. M. (2018). Bioactive compounds in ethanol extract of *Lentinus squarrosulus* Mont-a Nigerian medicinal macrofungus. *African Journal of Traditional, Complementary and alternative medicines*, 15(2), 42-50.
94. Murugesu, S., Ibrahim, Z., Ahmed, Q. U., Nik Yusoff, N. I., Uzir, B. F., Perumal, V., ... & Khatib, A. (2018). Characterization of α -glucosidase inhibitors from *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by gas chromatography-mass spectrometry-based metabolomics and molecular docking simulation. *Molecules*, 23(9), 2402.
95. Mohammed, H. A., Abdelwahab, M. F., El-Ghaly, E. S. M., & Ragab, E. A. (2021). Phytochemical characterization, in vitro anti-inflammatory, anti-diabetic, and cytotoxic activities of the edible aromatic plant; *Pulicaria jaubertii*. *Molecules*, 26(1), 203.

96. Nokhala, A., Siddiqui, M. J., Ahmed, Q. U., Ahamad Bustamam, M. S., & Zakaria, Z. A. (2020). Investigation of α -glucosidase inhibitory metabolites from *Tetracera scandens* leaves by GC–MS metabolite profiling and docking studies. *Biomolecules*, 10(2), 287.
97. Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., ... & Atanasov, A. G. (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food and chemical toxicology*, 121, 82-94.
98. Santos, C. C. D. M. P., Salvadori, M. S., Mota, V. G., Costa, L. M., de Almeida, A. A. C., de Oliveira, G. A. L., ... & de Almeida, R. N. (2013). Antinociceptive and antioxidant activities of phytol in vivo and in vitro models. *Neuroscience Journal*, 2013.
99. Pejin, B., Kojic, V., & Bogdanovic, G. (2014). An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions. *Natural product research*, 28(22), 2053-2056.
100. Pejin, B., Savic, A., Sokovic, M., Glamoclija, J., Ciric, A., Nikolic, M., ... & Mojovic, M. (2014). Further in vitro evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. *Natural Product Research*, 28(6), 372-376.
101. Ghaneian, M. T., Ehrampoush, M. H., Jebali, A., Hekmatimoghaddam, S., & Mahmoudi, M. (2015). Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. *Environmental Health Engineering and Management Journal*, 2(1), 13-16.
102. Balamurugan, R., Duraipandiyan, V., & Ignacimuthu, S. (2011). Antidiabetic activity of γ -sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats. *European journal of pharmacology*, 667(1-3), 410-418.
103. Balamurugan, R., Stalin, A., Aravinthan, A., & Kim, J. H. (2015). γ -sitosterol a potent hypolipidemic agent: In silico docking analysis. *Medicinal Chemistry Research*, 24, 124-130.
104. Balamurugan, R., Stalin, A., & Ignacimuthu, S. (2012). Molecular docking of γ -sitosterol with some targets related to diabetes. *European journal of medicinal chemistry*, 47, 38-43.

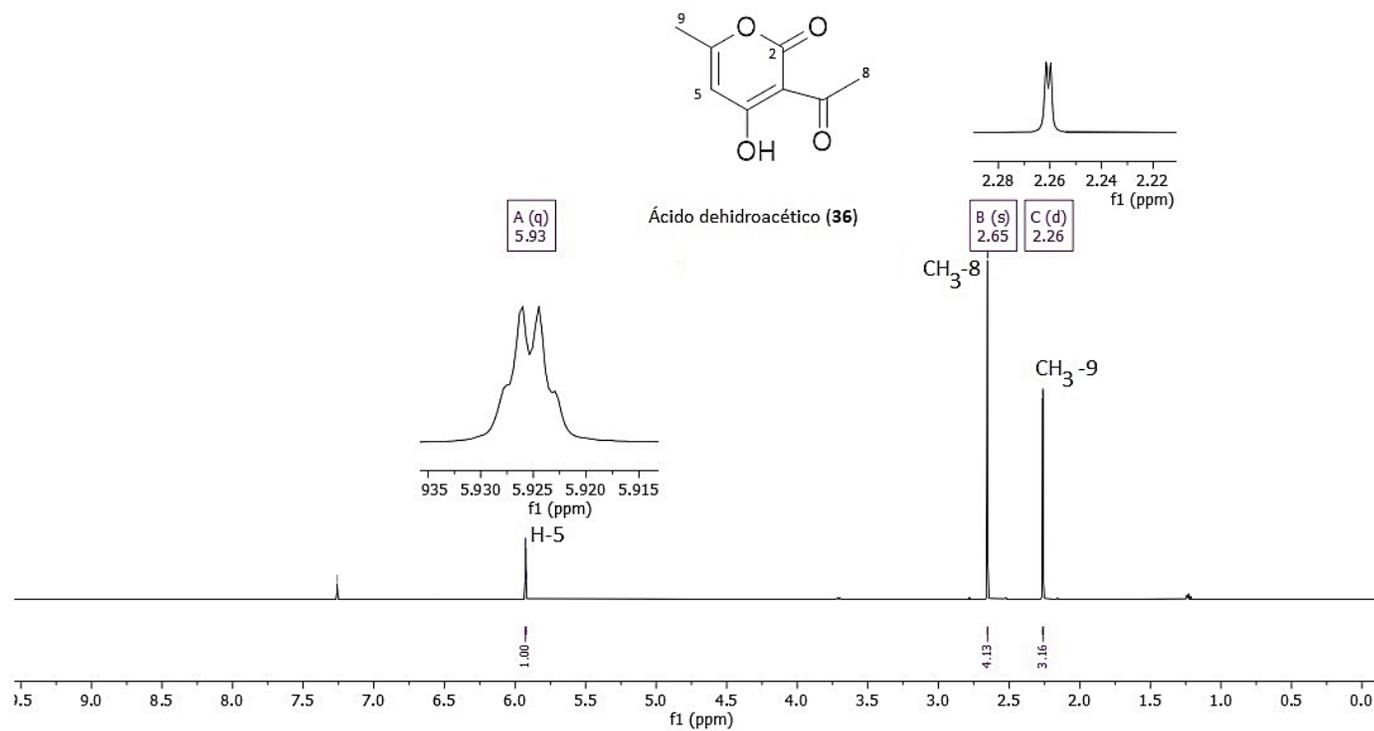
105. Sirikhansaeng, P., Tanee, T., Sudmoon, R., & Chaveerach, A. (2017). Major phytochemical as γ -sitosterol disclosing and toxicity testing in *Lagerstroemia* species. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2017.
106. Kruk, J., & Strzałka, K. (1995). Occurrence and function of α -tocopherol quinone in plants. Journal of plant physiology, 145(4), 405-409.
107. Ju, Y. H., Clausen, L. M., Allred, K. F., Almada, A. L., & Helferich, W. G. (2004). β -sitosterol, β -sitosterol glucoside, and a mixture of β -sitosterol and β -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice. The Journal of nutrition, 134(5), 1145-1151.
108. Villaseñor, I. M., Angelada, J., Canlas, A. P., & Echegoyen, D. (2002). Bioactivity studies on β -sitosterol and its glucoside. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives, 16(5), 417-421.
109. FAO, Codex Alimentarius. Requisitos generales, pág. 154
110. Handbook of Biocide and Preservative Use, Harold William Rossmore, p. 341 ISBN 0751402125.
111. E. Marengo, V. Gianotti, S. Angioi, and M.C. Gennaro, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 57–65.
112. M. Z. Chalaca, J. D. Figueroa-Villar, J. A. Ellena, and E. E. Castellano, *Inorg. Chim. Acta* 328 (2002) 45–52.
113. M. Cindrić, T. K. Novak, and K. Užarević, *J. Mol. Struct.* **750** (2005) 135–141.
114. O. Prakash, A. Kumar, and S. P. Singh, *Heterocycles* **63** (2004) 1193–1220.
115. N. Raman, S. Thalamuthu, J. D. Raja, M. A. Neelakandan, and S. Banerjee, *J. Chil. Chem. Soc.* **53** (2008) 1439–1443.
116. A. M. Verbruggen, *Eur. J. Nucl. Med.* **17** (1990) 346–364.
117. R. I. Kureshy, N. H. Khan, S. H. R. Abdi, S. T. Patel, P. Iyer, E. Suresh, and P. Dastidar, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **160** (2000) 217–227.

118. I. Roth, A. Aziz Jbarah, R. Holze, M. Friedrich, and S. Spange, *Macromol. Rapid Commun.* **27** (2006) 193–199.
119. C. Deng, M. Li, Q. Xie, M. Liu, Y. Tan, X. Xu, and S. Yao, *Anal. Chim. Acta* **557** (2006). 85–94.
120. Chen, X., Jiang, Z. H., Chen, S., & Qin, W. (2010). Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. *International Journal of Biological Sciences*, 6(7), 834.
121. Hu, X., Shi, Y., Zhang, P., Miao, M., Zhang, T., & Jiang, B. (2016). D-Mannose: Properties, production, and applications: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(4), 773-785.
122. Domenici, L., Monti, M., Bracchi, C., Giorgini, M., Colagiovanni, V., Muzii, L., & Benedetti Panici, P. (2016). D-mannose: a promising support for acute urinary tract infections in women. A pilot study. *European review for medical and pharmacological sciences*, 20(13), 2920-2925.
123. Kranjčec, B., Papeš, D., & Altarac, S. (2014). D-mannose powder for prophylaxis of recurrent urinary tract infections in women: a randomized clinical trial. *World journal of urology*, 32, 79-84.
124. Croze, M. L., & Soulage, C. O. (2013). Potential role and therapeutic interests of myo-inositol in metabolic diseases. *Biochimie*, 95(10), 1811–1827.

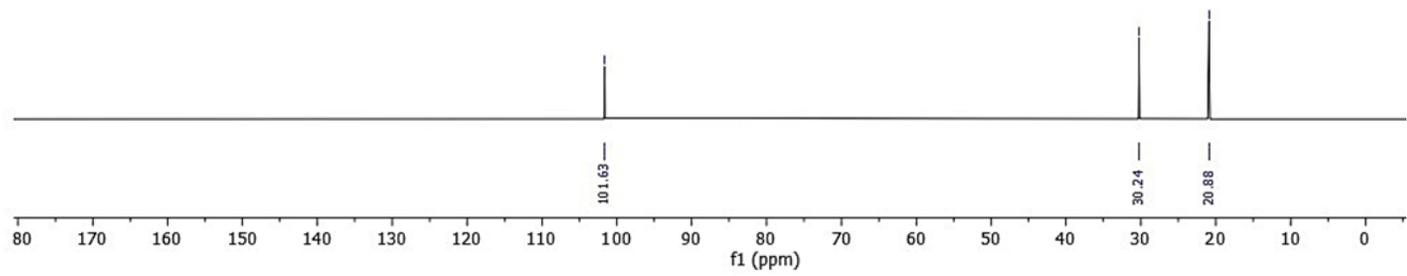
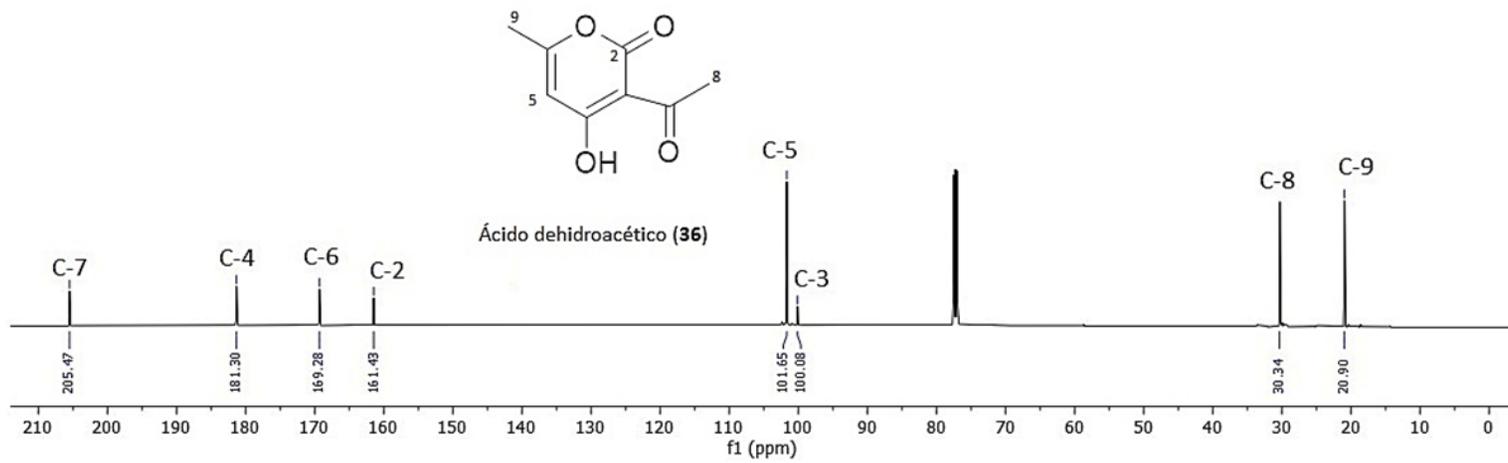
11. Anexos

¹H RMN
BRUKER AVANCE III HD 500 MHz
CDCl₃

—7.26 CDCl₃

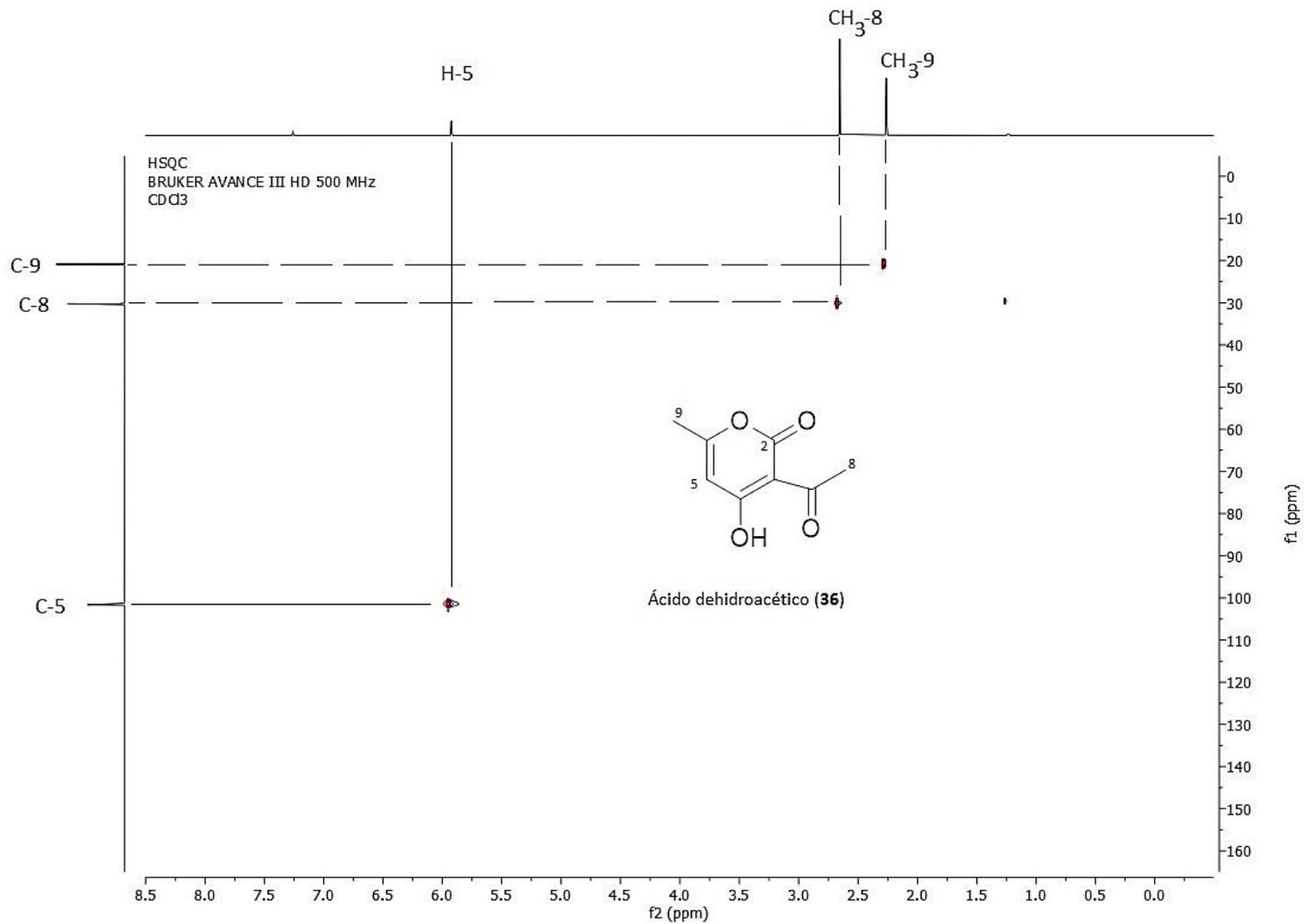


Espectro 1. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (36)



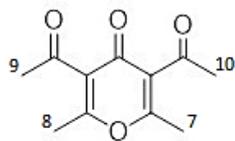
Espectro 2 RMN de ^{13}C y

Espectro 3 DEPT (125 MHz, CDCl_3) del compuesto (36)

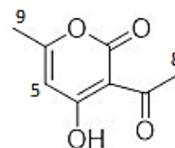


Espectro 4. HSQC (500 MHz, CDCl₃) del compuesto (**36**)

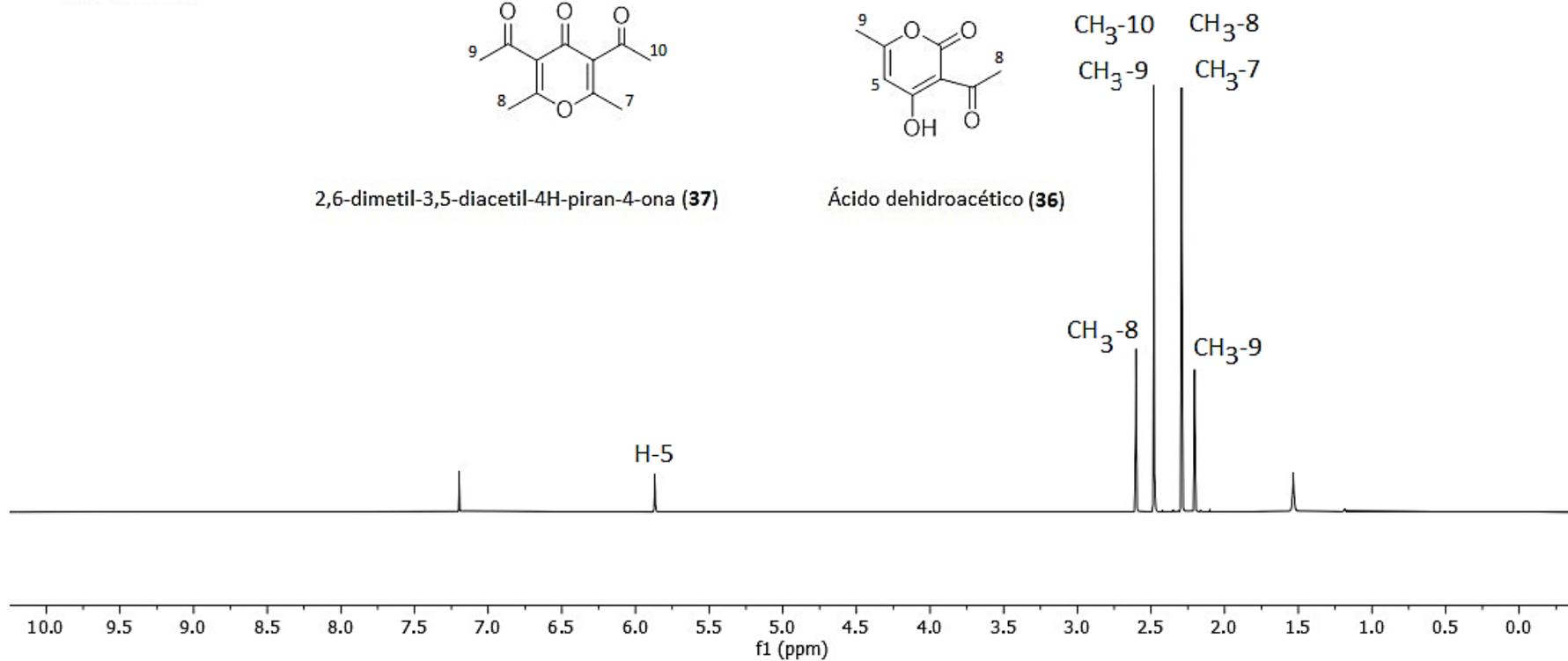
1H RMN
BRUKER AVANCE III HD 500 MHz
CDCl₃



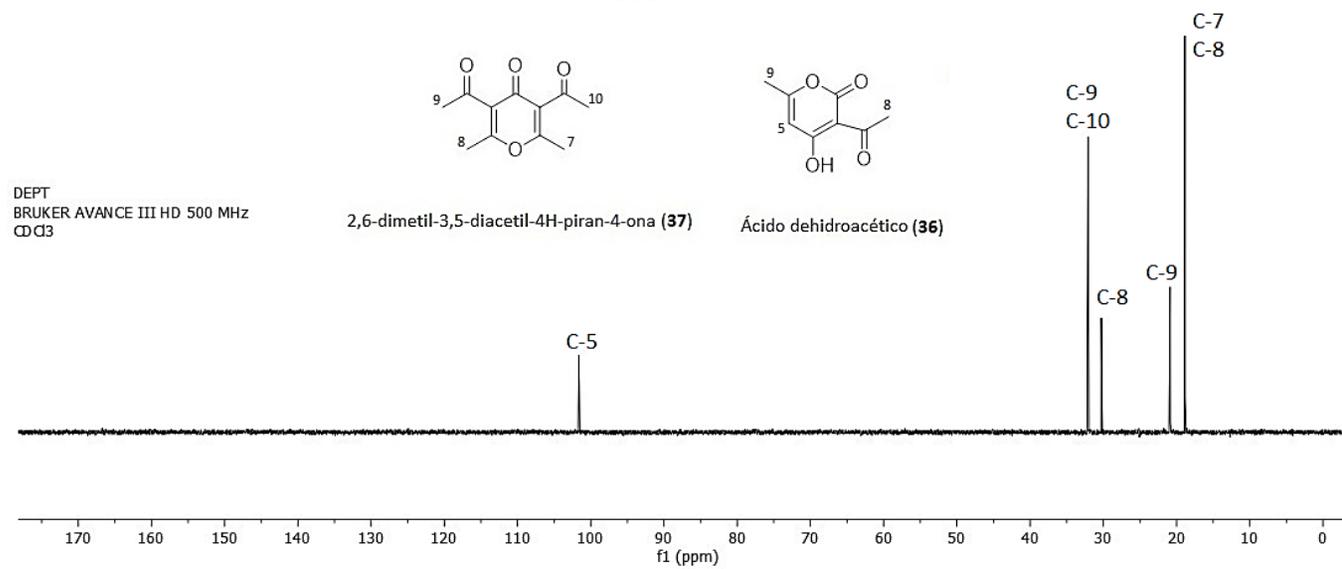
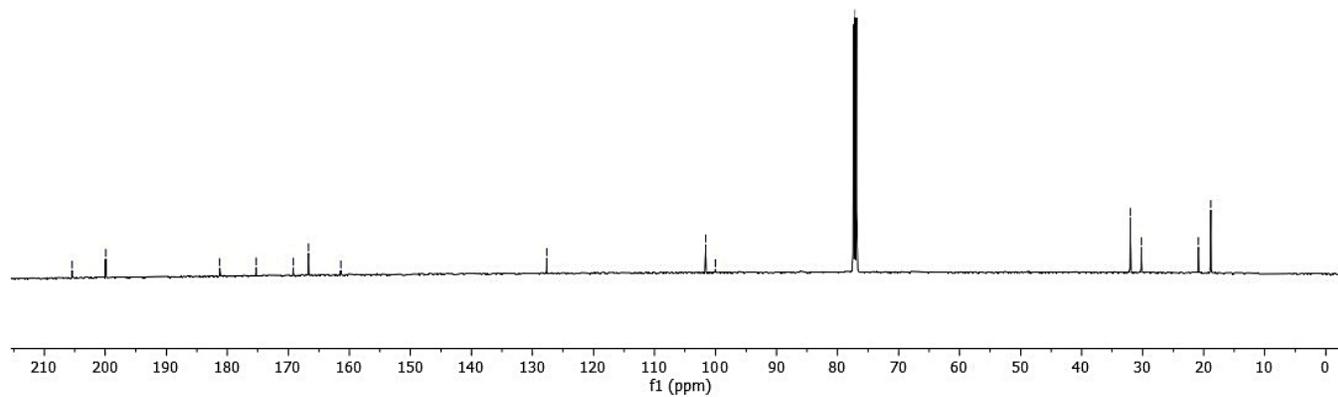
2,6-dimetil-3,5-diacetil-4H-piran-4-ona (**37**)



Ácido dehidroacético (**36**)

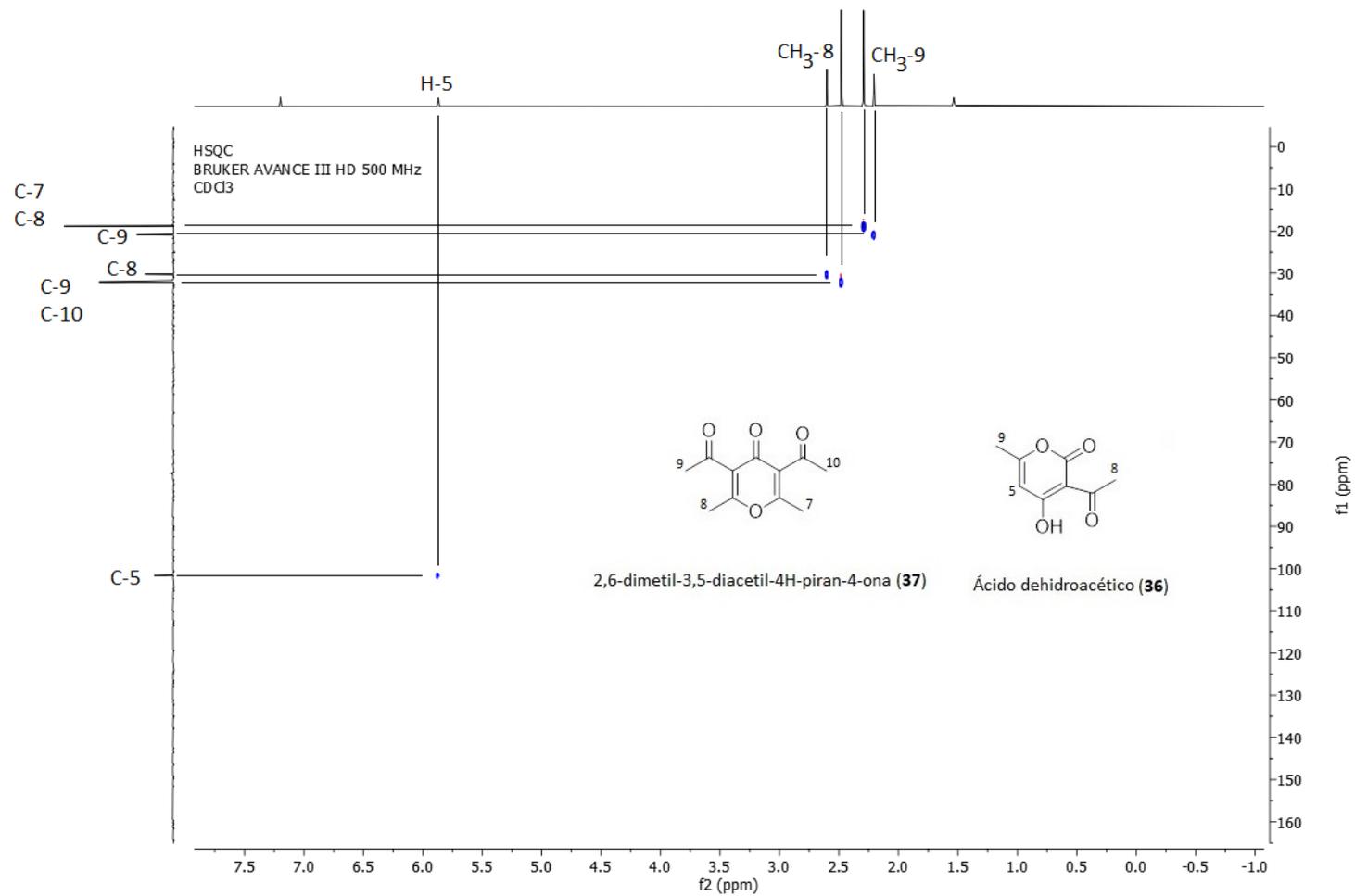


Espectro 5. RMN de ¹H (500 MHz, CDCl₃) de la mezcla de compuestos (**36**) y (**37**)

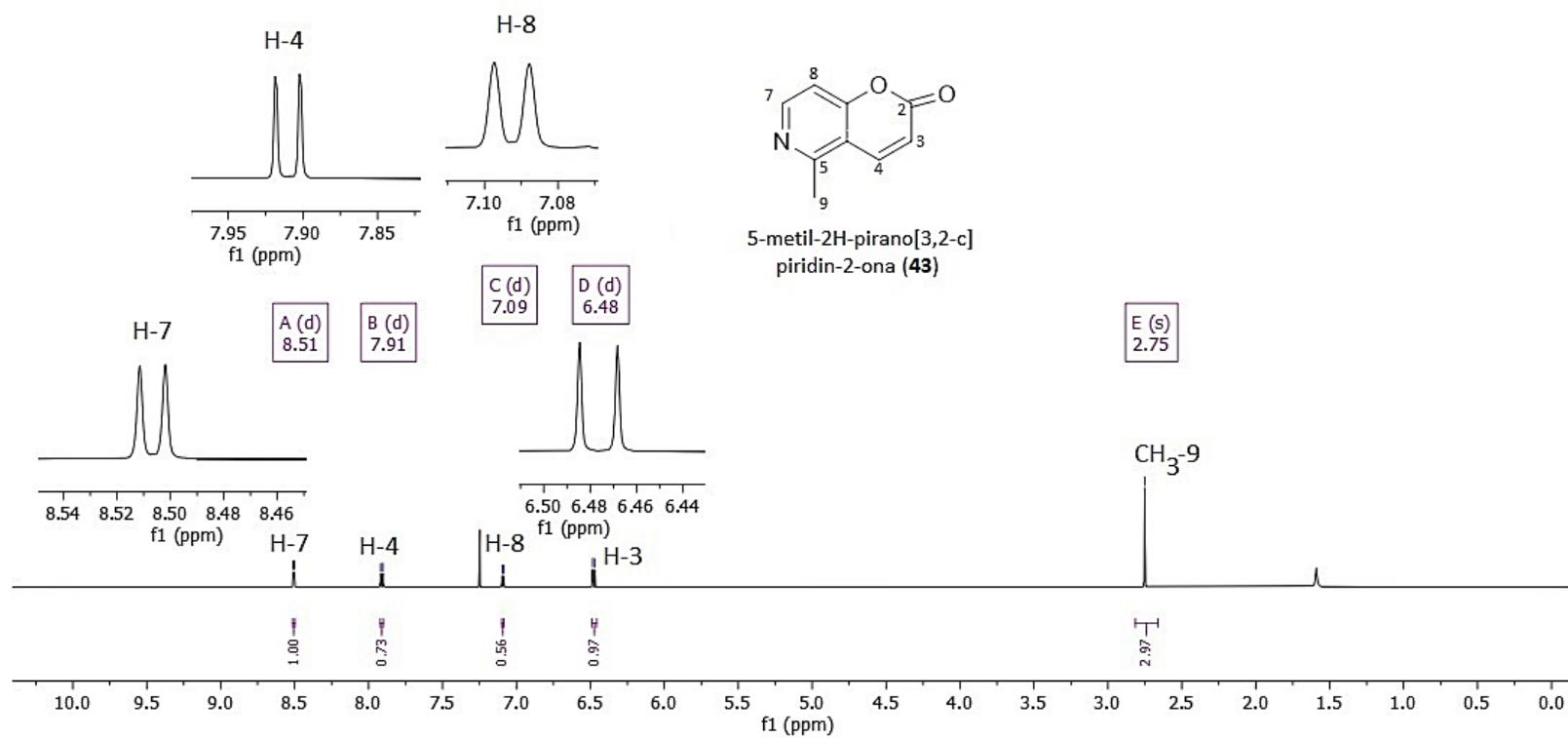


Espectro 6. RMN de ¹³C y

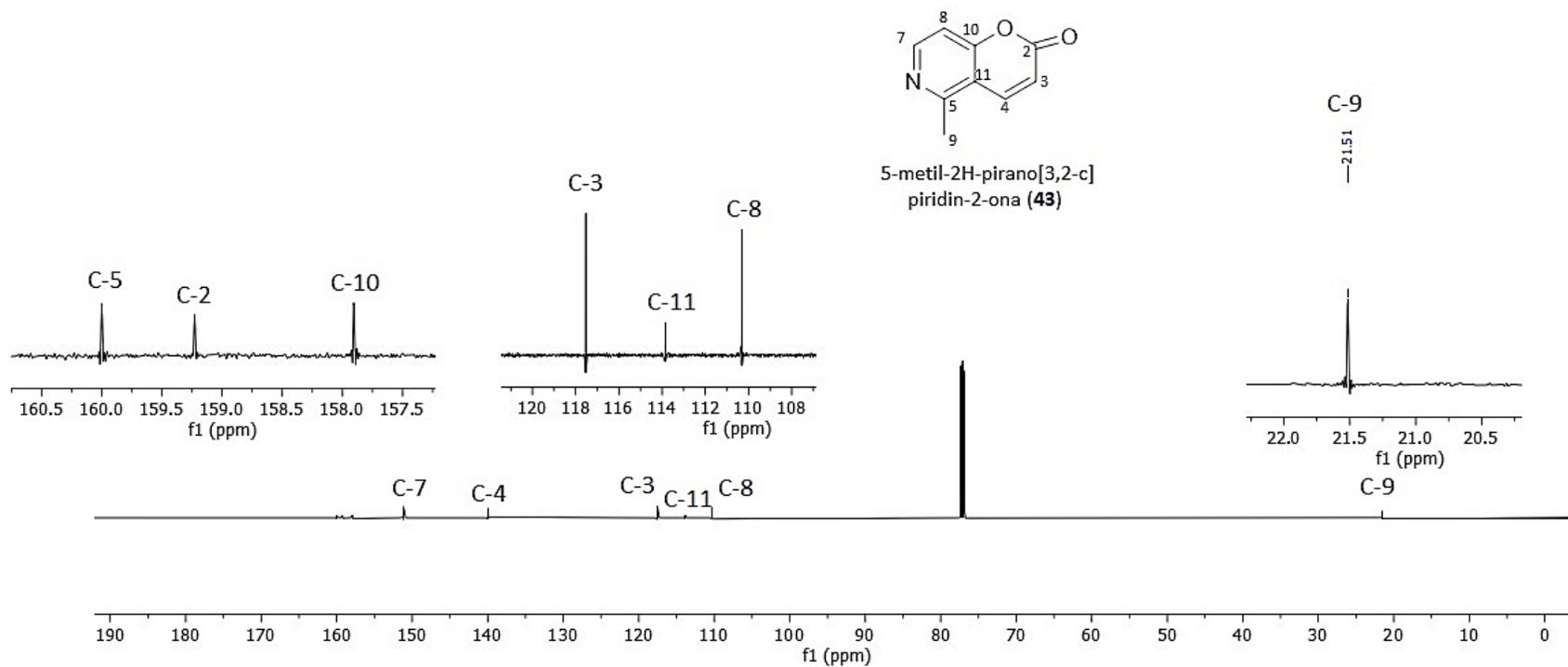
Espectro 7. DEPT (125 MHz, CDCl₃) de los compuestos (**36**) y (**37**)



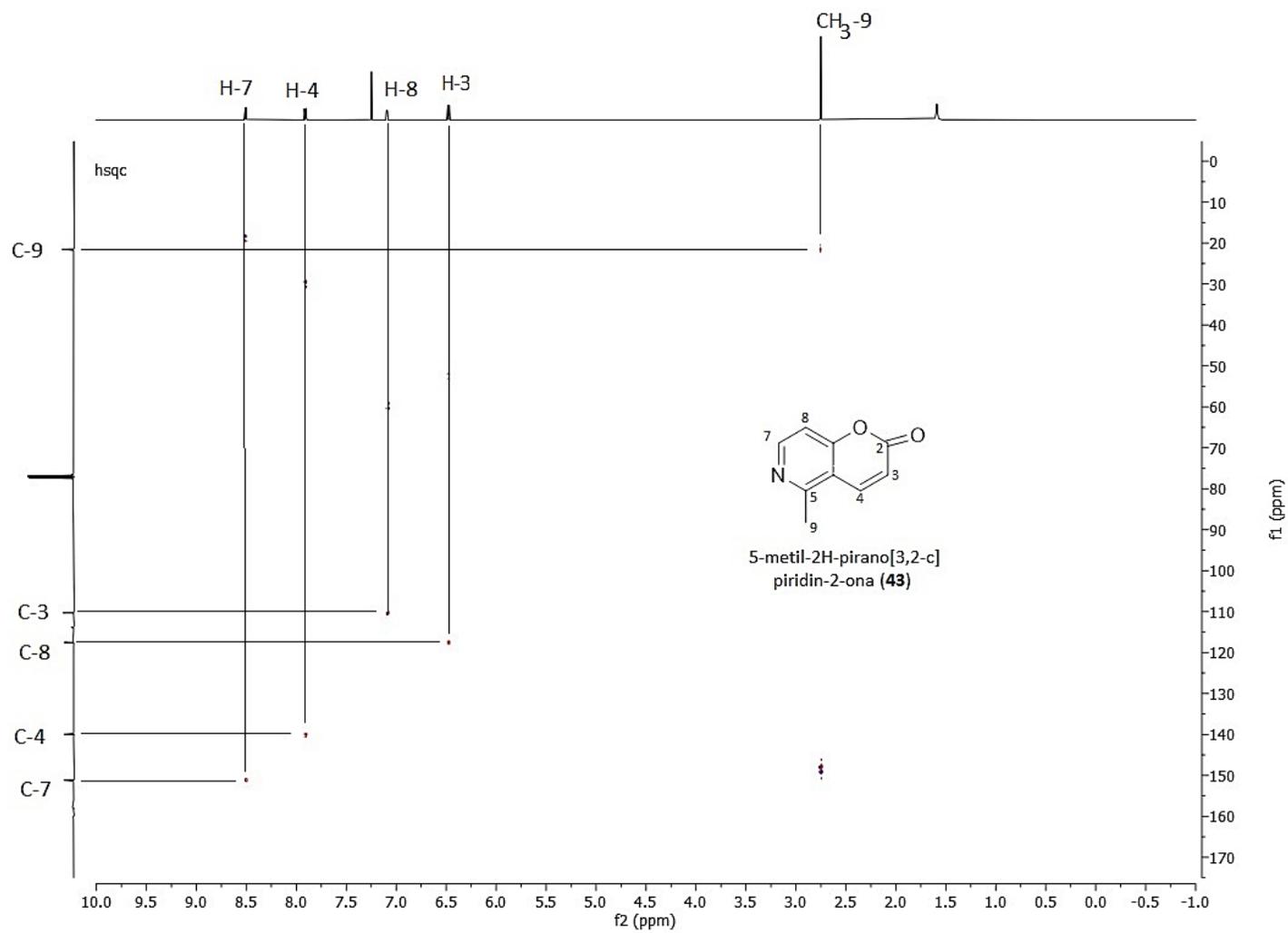
Espectro 8. HSQC (500 MHz, CDCl₃) de los compuestos (**36**) y (**37**)



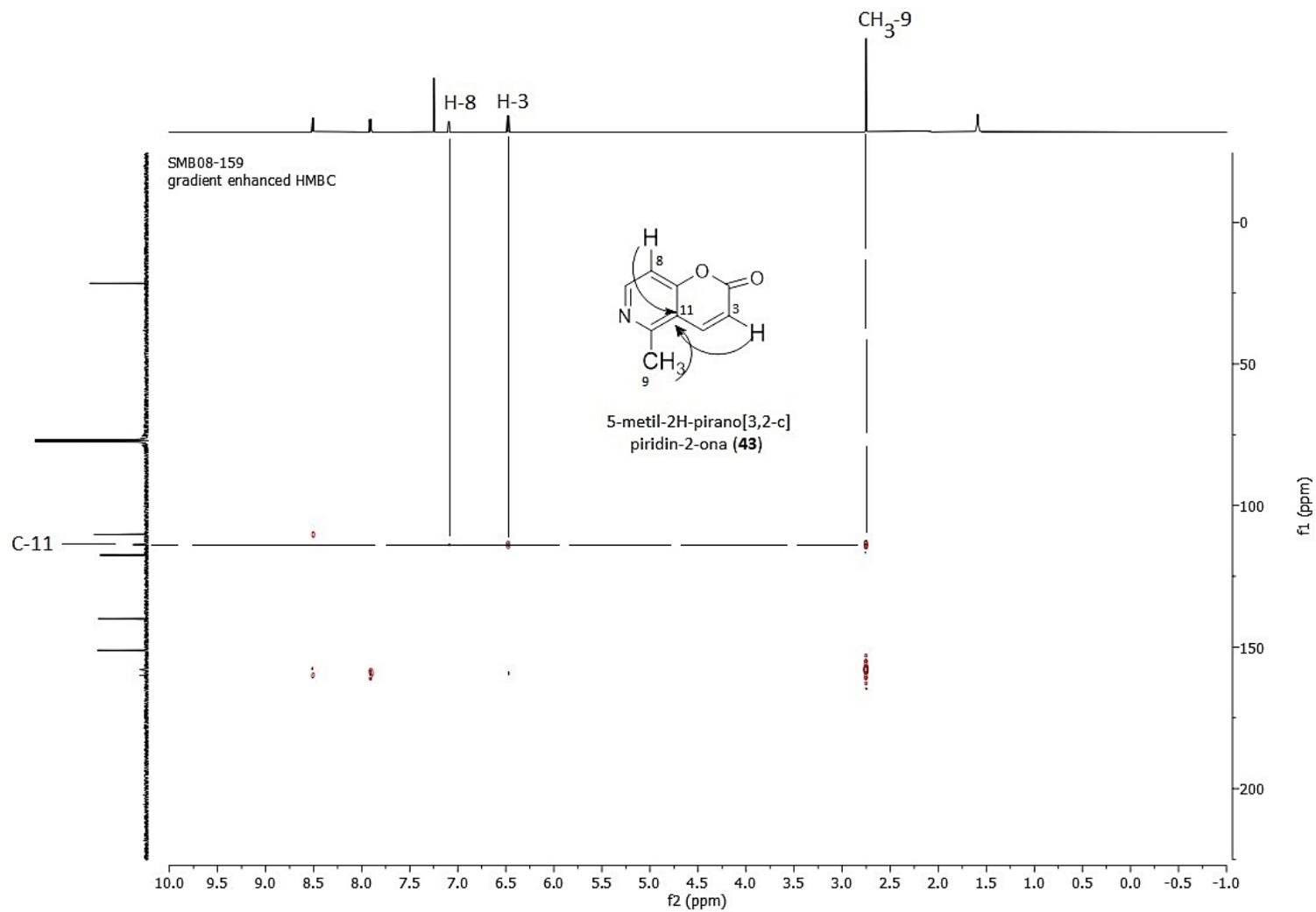
Espectro 9. RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) del compuesto (**43**)



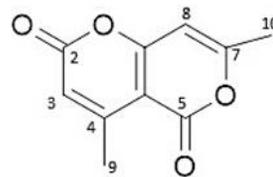
Espectro 10. RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃) del compuesto (**43**)



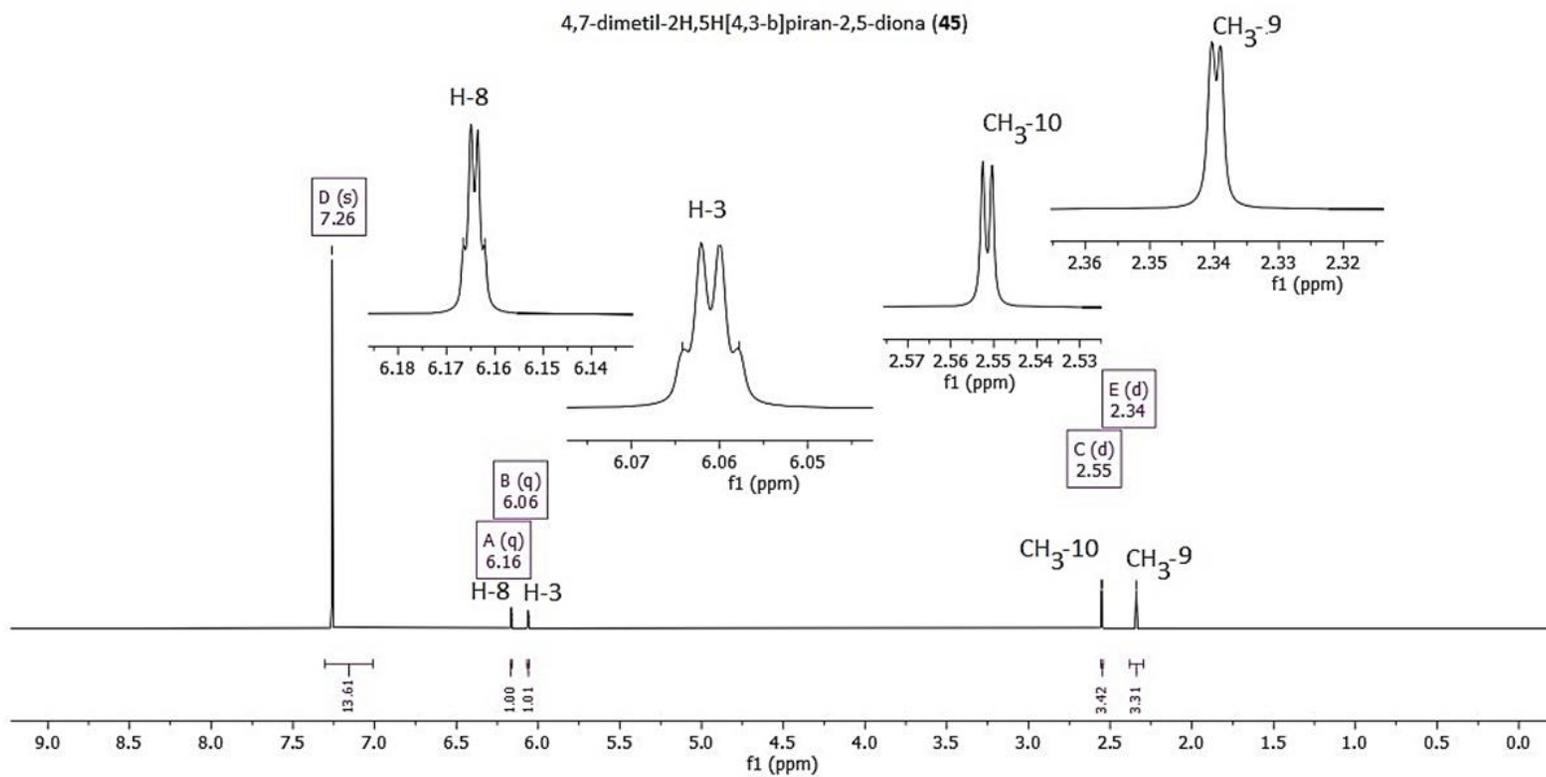
Espetro 11. HSQC (600 MHz, CDCl₃) del compuesto (43**)**



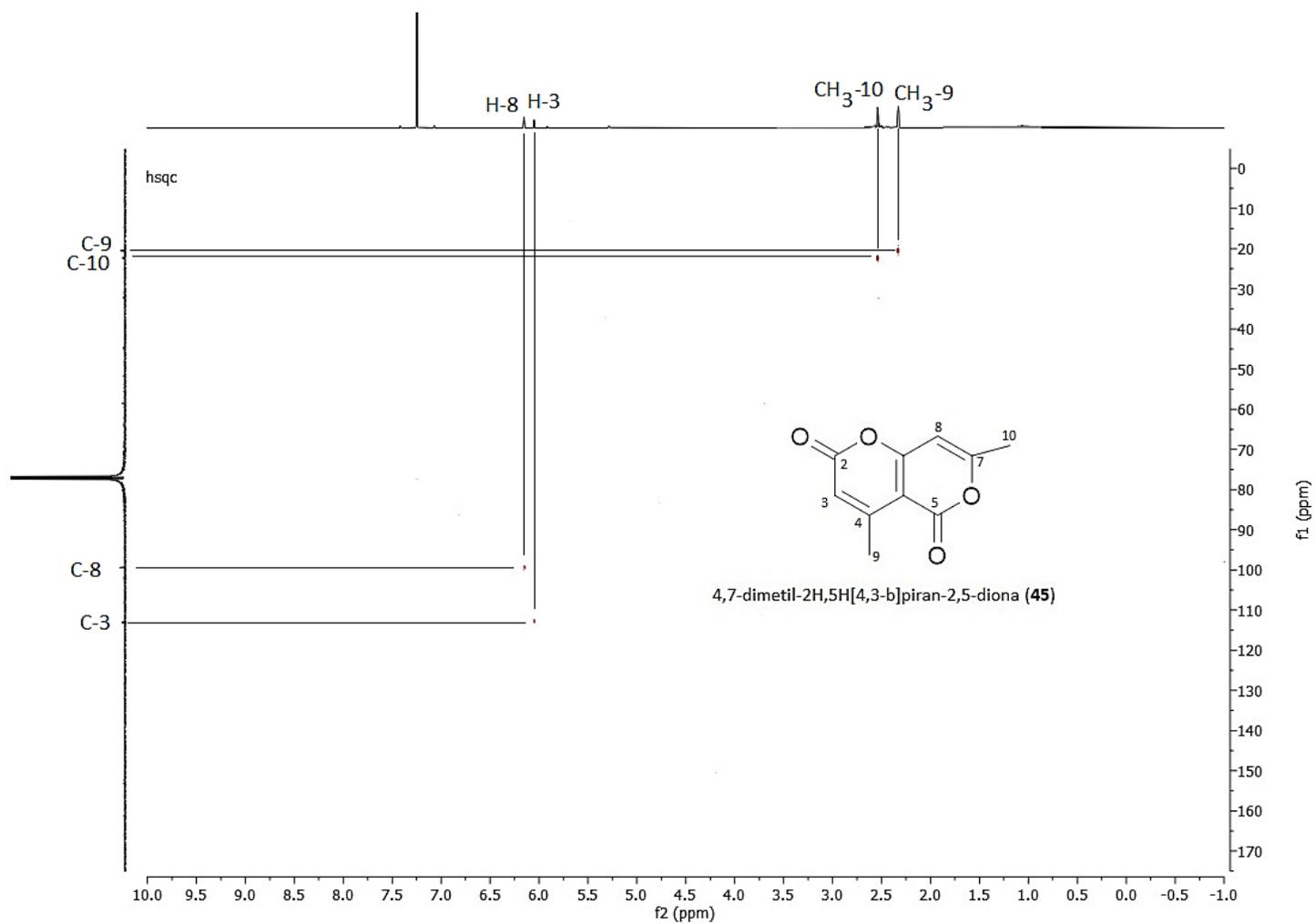
Espectro 12. HMBC (600 MHz, CDCl₃) del compuesto (**43**)



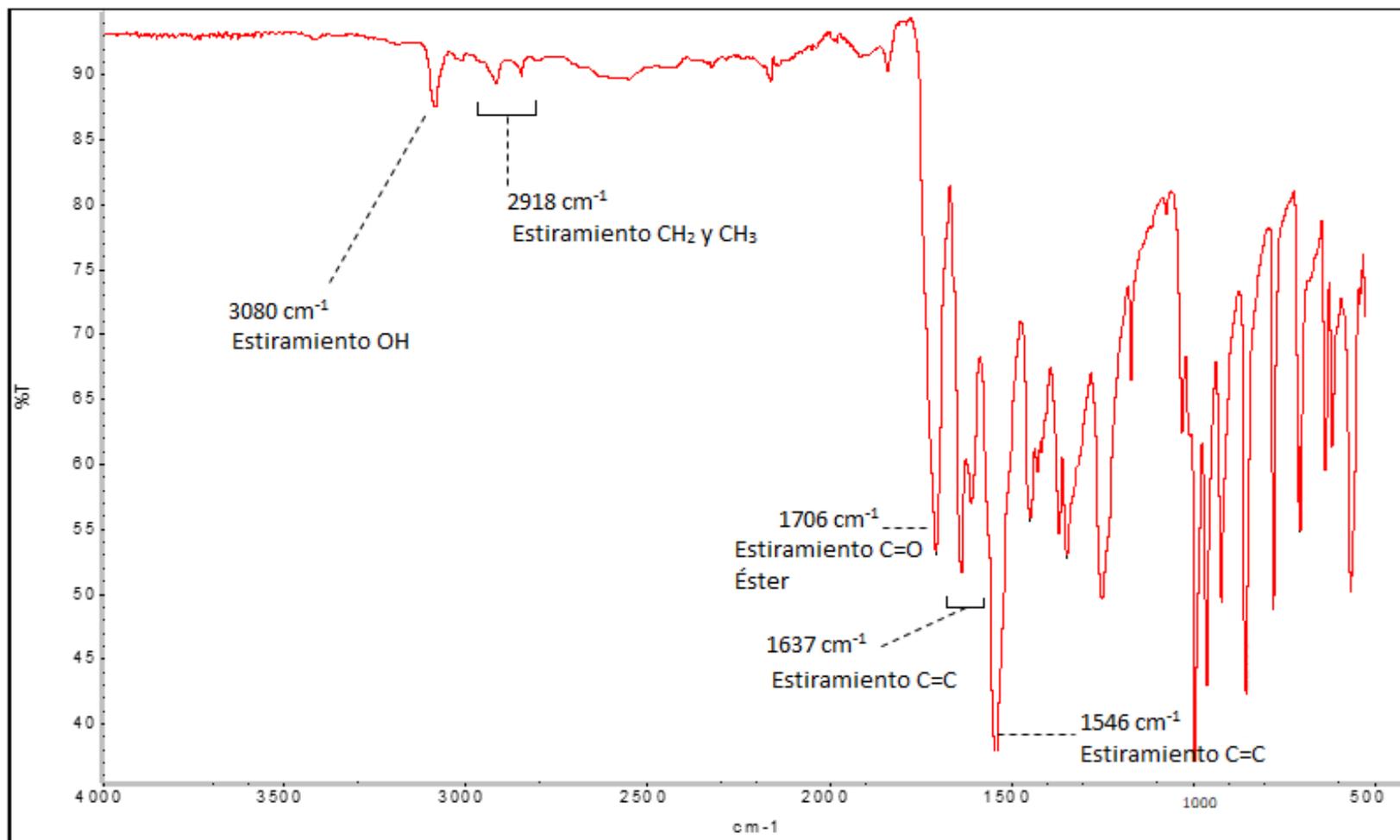
4,7-dimetil-2H,5H[4,3-b]piran-2,5-diona (**45**)



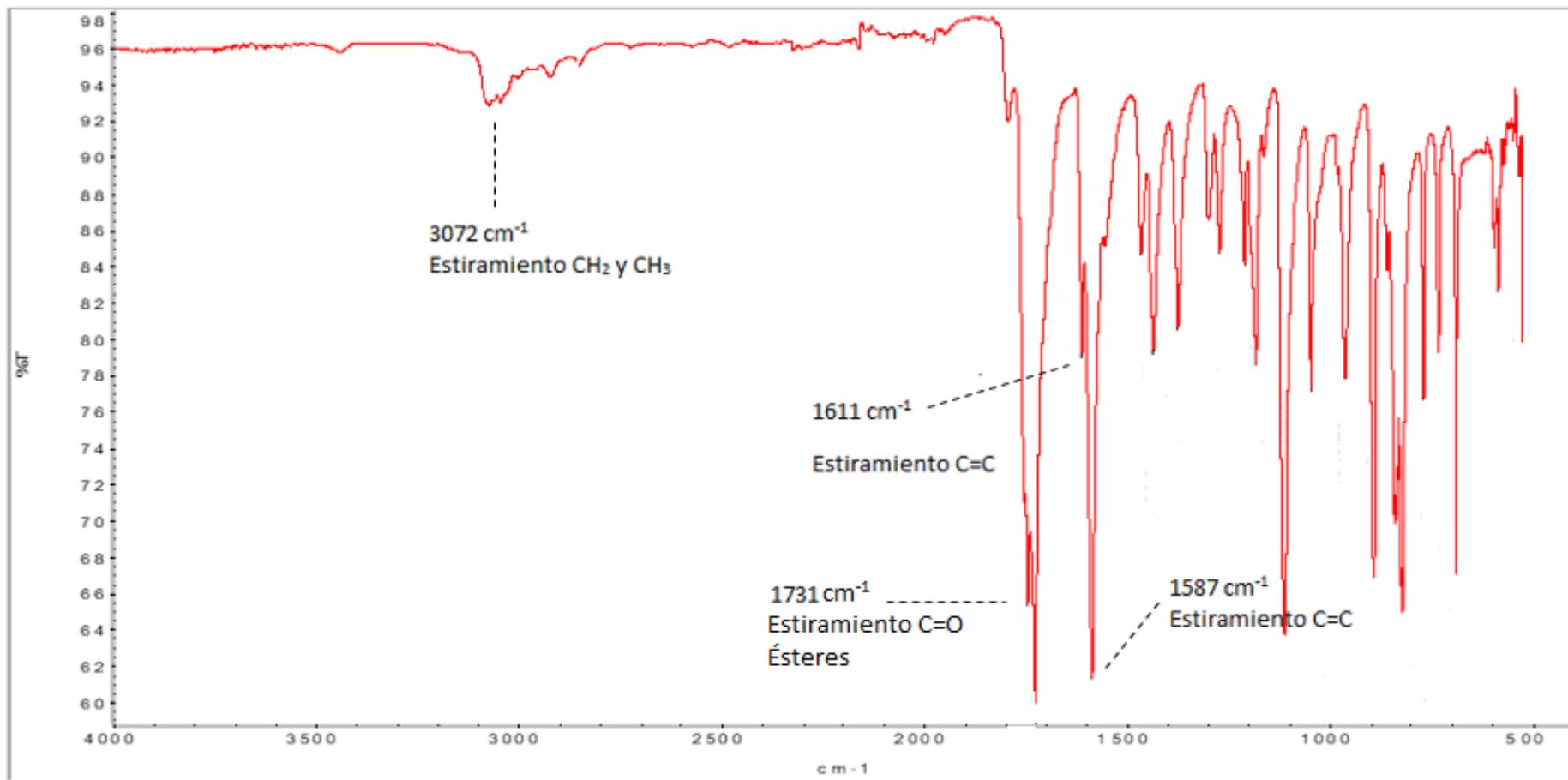
Espectro 13. RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) del compuesto (**45**)



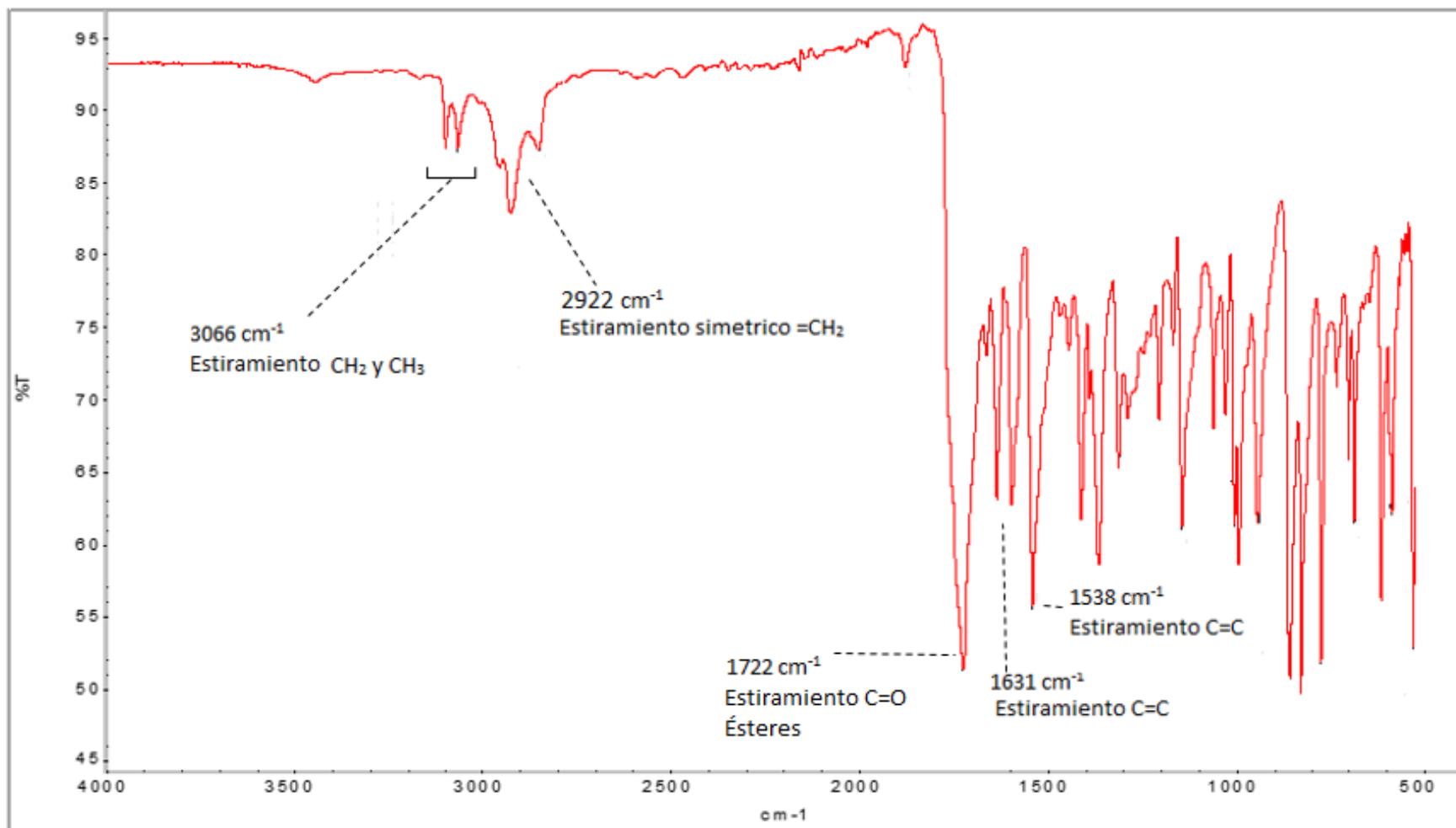
Espectro 14. HSQC (600 MHz, CDCl₃) del compuesto (**43**)



Espectro Infrarrojo 1. Compuesto (36)



Espectro Infrarrojo 2. Compuesto (43)



Espectro Infrarrojo 3. Compuesto (45)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Facultad de Ciencias
Químicas e Ingeniería

DRA. LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER
MTRA. SILVIA MARQUINA BAHENA
DRA. PERLA PATRICIA ROMÁN BRAVO
DRA. VALERI DOMÍNGUEZ VILLEGAS
MTRA. CRISTINA MARGARITA RODRÍGUEZ NARVAEZ
P R E S E N T E

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS e INGENIERÍA

Programas educativos de calidad reconocidos por CIEES, CACEI y CONACYT
SGI certificado en la norma ISO 9001:2015 e ISO 21001:2018

FORMA T-4A
NOMBRAMIENTO COMITÉ REVISOR

Cuernavaca, Mor., a **23 de junio de 2023**

Me permito comunicarles que han sido designados integrantes del **COMITÉ REVISOR** del trabajo de **TESIS**

Titulado:

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA DE PARTES AÉREAS DE *Ludwigia octovalvis*.

Que presenta el **C. CARLOS DANIEL OCAMPO RIVERA**

Del programa educativo de: **QUÍMICO INDUSTRIAL** de la **FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**

Para obtener el grado académico de: **LICENCIATURA EN QUÍMICO INDUSTRIAL**

Dirigido por: **MTRA. SILVIA MARQUINA BAHENA**

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta
Se anexa firma electrónica
DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA

D I C T A M E N

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA DE LA FCQeI
P R E S E N T E

En respuesta a su amable solicitud para emitir DICTÁMEN sobre el trabajo que se menciona, me permito informarle que nuestro voto es:

VOTO	NOMBRE
APROBATORIO	DRA. LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER
APROBATORIO	MTRA. SILVIA MARQUINA BAHENA
APROBATORIO	DRA. PERLA PATRICIA ROMÁN BRAVO
APROBATORIO	DRA. VALERI DOMÍNGUEZ VILLEGAS
APROBATORIO	MTRA. CRISTINA MARGARITA RODRÍGUEZ NARVAEZ

Se anexan firmas electrónicas de cada revisor, en las cuáles se incluye la fecha y hora que se ha emitido el voto aprobatorio.

VALH/dco

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209,
Tel. (777) 329 7000, Ext. 7039, fcqei@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



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

VIRIDIANA AYDEE LEON HERNANDEZ | Fecha:2023-06-23 17:10:27 | Firmante

HyYfREPxOiOWF7d2QcSxl/aXsW+meG/ey2fLBfx2C6OC1rGCmV57xuPgV5OeNjw1/3DTGk3e0fAv9fBNQUurJ1UfeNuznJc8m2A0J3IVeehx3WFSLwCUhPiGNF5GAXO+jZpMcJRAas8O44RJNfzaJWhaw7U69xiRfrdowfoSittl+jxrt0HiAkeVv/08B9YlyNEKXWzGj50ZvvCs+4O+GzEmNk6u+xwPkySE2s9abg4yczHOTDku+wJ4CrE2C2QPrrfT+QAwcXdBoXvo03o8+6Lj4q4J02PZ+/igR5JPJb6hZ4eGYOpVKnikZ8WZrXNSsirHoYwGDVtAuduBOEX9xA==

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



[rWP0Bcwk3](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Nm7nc1Bhhi2X1zkVJVZtuQjfZz00xh5I>





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:2023-06-26 13:38:42 | Firmante

IU35f1A0EDA0b3LMTkbrR1m79/3DzvtlfCUXFPcHntm0LRBTUU/OfFRfTIYQGFebbk4S7caG6vjpiqK5LTPr0i0T6C9JZE7uVfFj5NBHoDAsmMHpncYn9SWhTOiBTR6V/6vVqEzrDWTASyle0+p5edtELJp/vUDOOcStDDokwYHE4utDdZzpDX3WdYJAYPYhlgWB7iEk5dK44FJFNvpUaxdfhC8LU9eMC8s90jQj+T+29e5OePe5e36HCBy62ERdBNTGSpGZFBvrT2+jeUYpjjYlYfPQR4LYbacOdOb5MpQWMqWlG2FS4P62o/FMf7zJSP9FvV/XfFeb1V+eg==

SILVIA MARQUINA BAHENA | Fecha:2023-06-27 10:36:18 | Firmante

xKJski/Y3rU5PoJZp2VlcGc5sQ7xWNItE+cb3aF/XF5sVXhU0i3i7TW0stuvdF+AtTnsZiZckoev0LtrNbuQVVOIFGf2tdpD74NYJ+SUMmtmpPDDzNmKmskmSJbo1ZKFeqS4Mle7TZ5HhK/nAghbYZhFvsJLhEfra+C3JJZZWv7IEoobeRez9K+IBqyllL0SHhkWu5wge0nxtFemaKjWnK7tg777WU5Sia51DHEs/+TrSluQkAC2sTdCKeDiaPa3S18DRXmVbmjlvfh7M853dZwTa5+8yrQpmznIAFA5vt8cewryMUiYkumderU9ASuNeHnzPtelsMqE7jv/J3w==

CRISTINA MARGARITA RODRIGUEZ NARVAEZ | Fecha:2023-08-31 11:23:09 | Firmante

B4qq/X9f7u8zd9Sg5n/Z+h7zXsURw8EKUTOJNMHZ3C7IE19f2298103/j9GM4CYfJ5LHqWmJC9PQk+9fxyzp+AYaH2DHqPBxLZXmghU5sk//g/Erol0WhgP5j+hMY1ieNsxBY/iJoDThFDwOR20YwfnznN7s9UxPPvQw1d0xND8jADCOyQ3LpPj8bkRw7HskqoX18ZGCwhl0rda3Aq9ypHtHPxtLfEYKq7jc0STX5IM5LPQ9FAesQ0/ue4SCniWigiqgPtM830iDxLEuMUJt+dtwO7PkrLtaD+gmGlgezceGHZHEGNjua0pOvOYFs2dV2kFZ+M5hWlcmPaGg==

PERLA PATRICIA ROMAN BRAVO | Fecha:2023-09-08 23:38:06 | Firmante

GrJI57ibGJQ8wL6y7q00fHZxQN2aMvn2Y8Xn2pRTKx59yVgERTPGHvq7nu14Z6/Afkp6uc0wOwcxsjmeYEJuk38fHfi5KaCuHJDmjKYrV7IHavJ+teNofIXv7IbZsOpOJ0BqtppwsSy4SUqgIKMwlvK3lqEZ7+YmrVlm+v10PW8DNy7C/Hs3Ql6+3F+dZq2t2guJikFq+BwA0rHbT/Hnx86nfcSvxGBPJHKK0kLx+upSWeiD4bTRjV9v3g8Cy9NO4C9twGDrIbPZCLz79oUIWRP9GF/7/D/SaZUTQJcHxjys3xZ8FLOlrFaWcm0jXb5QEzI8EaXoH1V71z2+AQ==

VALERI DOMINGUEZ VILLEGAS | Fecha:2023-09-13 11:51:31 | Firmante

xOe8BX0hx/5aE+rQF54puVoLvQo3QUqiKIUa5LBXKFOi887crvm4PQBz7/bpsPWW283PjF1Z6jDPs7rC8THkvbKfAl6ItidNb6uQxnMBHicTNdy0gLGd68lyuEMBwf+VdZbSAdHUj1e33xh113dho374G3B28YffGOTb4uZXtjxJ0qlod+vp223e15HypmXvlH7UnT8yEmVr+/kz/XDok6Gw70gXLY4xsl/3gDvLwnBOVXsiflisy00BGoR154yQ1Yol4Od+TYB2IHVvkiqXHee1nuWcehi0yajtZdOy7h6EksZai5QLCZb8B598u5QIi8vDLf0bctsg8iSrTEjw==

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



K4giV5wzn

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/SQ4f03dIDZMbRclrkfmFg5m3Qli1BEmX>

