



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



TESIS

**"Estudio químico preliminar y actividad antibacteriana de las
partes aéreas de *Piqueria triflora*"**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA

PRESENTA

GUDELIA VALENTÍNEZ MURGUÍA

DIRECTORES

D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

D.C. ARMANDO TALAVERA ALEMÁN

Morelia, Michoacán

Agosto 2022

“La vida no es fácil para ninguno de nosotros. Debemos tener perseverancia y, sobre todo, confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo y que esto debe ser alcanzado”.

Marie Curie

DEDICATORIA

A mis padres

David Valentínez Magaña y Elidia Murguía Bejarano por siempre creer en mí y brindarme su apoyo incondicional. Por educarme con los valores y principios que me han llevado a ser quien soy hoy en día. Por brindarme una educación de calidad y darme todo lo que estuvo en sus manos. Por ser mis pilares en los momentos de debilidad y tristeza y las tantas llamadas que alegran mis días. Por las palabras de aliento en los momentos más difíciles y por todo el apoyo que me ha ayudado a seguir mis sueños. ¡Los amo!

A mis hermanos

David Valentínez Murguía y José Luis Valentínez Murguía por ser mi más grande apoyo incondicional que me ha permitido lograr las metas en mi vida y estar para mí a pesar de las distancias. Por nunca dejarme sola en los momentos difíciles y sus palabras de aliento que me motivaron a nunca darme por vencida y ver el lado bueno de las cosas. Infinitas gracias por todos los cuidados que me brindan. Alejandro Valentínez Murguía por ser mi compañero de travesuras. Por demostrarme que cuando uno quiere se pueden lograr cosas y que si hay algo que te hace feliz debes de luchar por ello. Por compartir conmigo el más tierno y puro amor, mi sobrina Ainhoa, que llena mi vida de inmensa felicidad. Sin ustedes no sería ni la mitad de lo que soy ahora. ¡Los amo!

A mis abuelos

María Guadalupe Bejarano Villa por cuidarme desde pequeña, por todo el amor brindado, las incontables comidas preparadas con amor después de la escuela y los momentos inolvidables de risas. Rubén Murguía Valentínez por estar tan orgulloso de cada uno de mis logros. Por todas tus palabras de aliento cuando comencé la Universidad, los tantos consejos que me brindaste para ser mejor. Pero principalmente por los hermosos momentos de carcajadas, apretadas de cachetes, cosquillas y abrazos que reiniciaban mis días una y otra vez. Sé que están orgullosos de mí y que me siguen cuidando desde el cielo.

AGRADECIMIENTOS

A la D. C. Rosa Elva Norma del Río Torres, mi asesora de tesis, por brindarme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo, por la estancia tan amena todo este tiempo, por compartir sus conocimientos, por el apoyo que me permitió adquirir los conocimientos teóricos y prácticos que fueron la base para realizar el presente trabajo. Así mismo agradezco cada enseñanza y momentos compartidos fuera del laboratorio, cada convivio, el ser mi madrina de generación, fueron maravillosos y jamás los olvidaré. Gracias por siempre robar una sonrisa al Team Rosy.

Al D.C. Armando Talavera Alemán, mi co-asesor, por todo el apoyo que me brindo para lograr realizar este proyecto, por guiarme en el trayecto de mi tesis y resolver mis dudas, por la paciencia, la disposición y entrega para compartir sus conocimientos que me permitieron poder concluir este trabajo. Así mismo, agradezco las pláticas, enseñanzas y consejos en todo momento.

De igual manera quiero agradecer a las D. C. Laura Hernández Padilla y Lorena Martínez Alcantar por el apoyo brindado en la realización de las pruebas antibacterianas. A la D.C. Concepción Armenta Salinas del IIQB-UMSNH por realizar la determinación de los espectros de RMN que fueron fundamentales para el desarrollo de este proyecto. Al M.C. José Luis Salvador Hernández por la determinación del espectro de masa. Al D.Q. Juan Pablo García Merinos por la determinación del espectro de infrarrojo (IR).

Agradezco al Dr. Sergio Zamudio por la identificación de la especie vegetal.

Agradezco a D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado, D.C. Sandra Guadalupe Sánchez Ceja, D.C. Laura Hernández Padilla, D.Q. Gabriela Rodríguez García y M.C Sinuhé Galván Gómez por la disposición que tuvieron para ser jurados en mi titulación y revisar mi tesis, así como hacerme observaciones y correcciones con las que pude mejorar mi proyecto.

Principalmente agradezco a mi familia, sin su apoyo no podría haberlo logrado. A mis padres, David Valentínez Magaña y Elidia Murguía Bejarano, quienes han sido mis pilares, sin ustedes no podría estar en donde ahora estoy, gracias por estar al pendiente de mí y de cada uno de mis estudios, por el apoyo económico y recorrer conmigo este camino, por enseñarme los valores de la vida, por repetirme que se debe de luchar por los sueños y metas aun cuando haya obstáculos que parezca que son imposibles de superar, las palabras de aliento que siempre me motivaron a seguir adelante, por los consejos, pero sobre todo por nunca dejarme sola y estar para mí. Sé que estas palabras plasmadas no son suficientes para agradecer todo lo que han hecho por mí y aunque quisiera plasmar más, siento que no hay palabras exactas para hacerles saber todo lo que siento, simplemente ¡Gracias por todo!

A mis hermanos David Valentínez Murguía, José Luis Valentínez Murguía y Alejandro Valentínez Murguía, por todo lo que cada uno ha hecho por mí. Por recorrer conmigo este camino y no dejarme sola en los momentos difíciles. Por escucharme, ser mi consuelo y tranquilizarme con sus palabras que no solo fueron de aliento, sino de motivación. Estoy orgullosa de tenerlos en mi vida, y de lo que cada uno ha logrado en la suya, fueron mi inspiración muchos momentos y espero pronto poder regresarles un poco de lo mucho que ustedes me dieron.

A mis tías, Guadalupe Murguía Bejarano y Flor Murguía Bejarano, por recibirme siempre con los brazos abiertos, por brindarme su amor y cariño desde que tengo memoria, por apoyarme en cada etapa de mi vida y siempre estar presente en ella, por todos los buenos momentos de risas, por las pláticas que hemos tenido, pero principalmente por tomarse el tiempo de escucharme cuando lo necesite, por aconsejarme y apoyarme en mis decisiones. A mis primas Jesús María Ciprián Murguía y Perla Guadalupe Ciprián Murguía por recibirme con tanto cariño, por siempre acompañarme, por considérame como una hermana y demostrarme que tres siempre es mejor que una. Son personas especiales en mi vida y sé que puedo contar con ustedes en cualquier circunstancia. ¡Las quiero!

A Q.F.B. Jorge Enrique García Aguilar, por ser mi acompañarme en este trayecto y no dejarme sola en los momentos que sentía que todo lo estaba haciendo mal, por todos los abrazos que me confortaban, por las palabras de aliento y consejos que me ayudaron a no rendirme y seguir luchando. Por aguantar mis malos ratos, mis actitudes, frustraciones y desesperaciones al realizar este proyecto, por tranquilizarme en los momentos más difíciles y dolorosos, pero sobre todo por celebrar cada uno de mis avances y logros y cumplir mi sueño de tener otro perrito, Tanuky, que alegra todos mis días y que logra cambiar mi humor desde el momento en que cruzo la puerta de la casa. Simplemente gracias por estar ahí y apoyarme en todo.

A mis amigos y segunda familia, Marlen Morales Chávez, Laura Samantha Martínez Pérez, Mónica Paola Barajas Pérez, Juliana Irubí Carmona Martínez, José Carlos Valdovinos Figueroa, Óscar Gerardo Galvéz Cook , Alejandra García y Carlos Fernando Pahuja Andrade, por los ratos agradables que pasé en su compañía, por abrirme la puerta de su casa, por escucharme las tantas veces que necesite desahogarme, por cada uno de sus consejos y palabras de aliento, realmente aprecio mucho lo que todos ustedes hicieron por mí, fueron mi apoyo en muchos momentos difíciles y compañeros de muchas experiencias y diversiones en el trayecto de la Universidad, cada uno tuvo un papel importante en mi vida. ¡Los quiero mucho!

De igual manera expreso mi agradecimiento a mis amigos y compañeros del laboratorio, quienes hicieron mi estancia más amena y provechosa en todo momento; M.C. Dalia Ibet Díaz Arrellano, I.B. Adán Ríos Cruz, I.B. Goretti Patzimba García Farías, M.C. José Antonio Ferreira Sereno.

De Manera especial agradezco a mis siguientes compañeros y amigos. A la M.C. Odessa Magallón Chávez por recibirme en el equipo de trabajo el primer día, por enseñarme las bases del laboratorio, por resolver mis dudas durante mi proyecto, por los ánimos, las pláticas y amistad dentro y fuera del instituto. Al M.C. Antonio de Jesús Oliveros Ortiz por aceptarme como su chicharito en el periodo de mi servicio social, por transmitir sus conocimientos y explicarme las técnicas de

trabajo, así como también la paciencia y confianza para ayudarlo en sus actividades. A la M.C. Jessica Montserrat Lorenzo García e I.B. David Adrián Hernández Guerrero por recibirme con tanto cariño en la mesa de trabajo del cubi, por hacer más amena mi estancia con todas las pláticas, por sus aportaciones y consejos en el trayecto de mi proyecto, por la confianza brindada para poder consultar y hablar de cualquier tema y por su amistad no solo en el laboratorio. Al M.C. Sinuhé Galván Gómez quiero agradecerle por su recibimiento en la mesa de trabajo, pero de manera especial quiero agradecer todo el apoyo que me brindo para poder realizar este proyecto, por guiarme en el proceso, resolver cada una de mis dudas y compartir conmigo sus conocimientos y técnicas que me fueron de gran ayuda en el trayecto. Así mismo quiero agradecer su amistad, los consejos personales y las pláticas tan amenas. Al Q.F.B. Irving Raúl Vázquez Cacho por la amistad brindada, los consejos y pláticas de la vida, por tu ayuda durante mi experimentación y comentarios sobre la misma, por resolver mis dudas y compartir tus técnicas y conocimientos. A la M.C. Gabriela Servín García por compartirme sus conocimientos y técnica en la preparación de las Bases de Shift para realizar mi proyecto. A la M.C. Eva Esthefany Soto Guzmán y Q.F.B. Esaú Neftalí Hernández Reynoso por su amistad, las pláticas tan amenas que compartí con ustedes, y que me han ayudado a ver nuevos horizontes y oportunidades en mi vida. Al Q.F.B. José Carlos Ayala Almonte por la amistad brindada, por los momentos compartidos, las pláticas, por acompañarme en el trayecto de las mañanas al instituto, por tu ayuda y apoyo en licenciatura, así como también en el instituto.

Agradezco de manera especial a mis compañeros tesisistas que me acompañaron en el trayecto; P.Q.F.B. Carla Michele Montero Castro, por ser mi amiga y ser parte también de mi segunda familia, por brindarme tu apoyo en la licenciatura y en nuestra estadía en el instituto, así como también en los momentos en que más necesite de una amiga, por compartir tu buena vibra y alegrías conmigo, por las convivencias vividas que jamás olvidaré y escucharme cuando necesitaba desahogarme. P.Q.F.B. Mitzy Alejandra García Zamudio, por ser mi amiga, por todo el apoyo, los ánimos y buenas vibras que me brindaste no solo al momento de realizar este proyecto, sino también en mi vida personal, por las amenas pláticas y

consejos. P.Q.F.B. Alfredo Pontifes Perea por ser mi amigo, por las risas y pláticas, por las palabras de aliento, la compañía, el apoyo y consejos brindados. P.Q.F.B. Alonso Yael García Barrera por ser mi amigo y por los ánimos que me otorgaste durante mi experimentación.

A mis compañeros del servicio social y verano de investigación por hacer más amena mi estancia; Leonardo, Hilda Joselin, Julieta, Daniel, Nancy, Kerly, Axel, Dalia, Areli, Rodrigo y Rosario.

Agradezco de todo corazón a mi mejor amiga, Q.F.B. Erika Rafaela Rodríguez Bonaparte por brindarme todo su apoyo durante todos estos años de amistad, pero en especial por ser mi roomie y acompañarme durante la travesía del periodo universitario, por no dejarme sola en los momentos difíciles y acompañarme en los momentos más felices, por escucharme y aconsejarme en todo momento. Por aguantar mi estrés, mis caras, mi mal humor, mis corajes, y mis días de locura. Sin ti no hubiera logrado sentirme menos lejos de mi familia. ¡Te quiero millones!

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D. C. Rosa Elva Norma del Río Torres y el D. C. Armando Talavera Alemán. Con el apoyo económico de la CIC-UMSNH al proyecto de Investigación.

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XI
RESUMEN	XIII
ABSTRACT	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
2.1. <i>Piqueria triflora</i> :	19
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVOS	21
4.1. Objetivo general	21
4.2. Objetivos específicos	21
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	22
5.1. Generalidades	22
5.2. Materia vegetal	22
5.3. Obtención de los extractos	22
5.4. Evaluación preliminar de la actividad antibacteriana de las partes aéreas...	23
5.4.1. Cepas bacterianas	23
5.4.2. Pruebas de resistencia antimicrobiana	23
5.5. Estudio fitoquímico	25
5.5.1. Fraccionamiento del extracto de hexanos	25
5.5.2. Obtención de la base de Schiff	26
5.5.3. N-(4-metoxifenil)-2-(-(4-metoxifenilimino)metil)-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (22)	26
5.5.4. 6-((4-metoxifenil)imino)-2,3,3-trimetilciclohexa,4-dien-1-carbaldehído (23)	27
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	28
6.1. Evaluación preliminar de la actividad antibacteriana de las partes aéreas	30
6.2. Estudio fitoquímico	34
7. CONCLUSIONES	42
8. REFERENCIAS	43

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de acción de los antibióticos. Tomada de Murillo, 2022	2
Figura 2. Mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a los antibióticos. Tomada de De la Fuente-Salcido <i>et al.</i> , 2015.....	4
Figura 3. Distribución de la familia Asteraceae en la República Mexicana. Tomado de Villaseñor, 2018.	8
Figura 4. Espécimen de la planta <i>Piquería trinervia</i> Cav. Tomada de IBUNAM, 2015.....	9
Figura 5. Monoterpenos aislados de <i>P. trinervia</i>	11
Figura 6. Estructura molecular del piquerol A confirmada por rayos x. Tomada de Soriano-García <i>et al.</i> , 1983.....	11
Figura 7. Terpenos aislados de <i>P. trinervia</i>	12
Figura 8. Estructura molecular del trinervinol confirmada por rayos x. Tomada de Soriano-García <i>et al.</i> , 1996.....	13
Figura 9. Estructura del Piquerinol.	16
Figura 10. Hojas y flores de <i>Piquería triflora</i>	19
Figura 11. Espectros de RMN de ¹ H a 400 MHz. a) extracto de hexanos, b) extracto de diclorometano, c) extracto de metanol de <i>P. triflora</i>	29
Figura 12. Ensayos de difusión en placa con los extractos de <i>P. triflora</i> en un grupo de bacterias a) <i>Pseudomonas</i> PA01, b) <i>E. coli</i> , c) <i>S. aureus</i> , d) <i>Enterococcus</i> sp, e) <i>Staphylococcus</i> sp. a diferentes concentraciones 1) 5 mg/mL, 2) 1 mg/mL, 3) 0.5 mg/mL, 4) 0.05 mg/mL.....	32
Figura 13. Efecto de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto hexánico frente a <i>S. aureus</i> a tiempos cortos de tratamiento.	34
Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en CDCl ₃ de la fracción 91-100. .	35
Figura 15. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en CDCl ₃ de N-(4-metoxifenil)-2-(-(4-metoxifenilimino)metil)-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (22).	36
Figura 16. Espectro de RMN de ¹³ C a 100 MHz en CDCl ₃ de N-(4-metoxifenil)-2-(-(4-metoxifenilimino)metil)-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (22).	37
Figura 17. Experimento HETCOR de (N-(4-metoxifenil)-2-(-(4-metoxifenilimino)metil)-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (22).	38
Figura 18. Cromatograma y Espectro de masa de (N-(4-metoxifenil)-2-(-(4-metoxifenilimino)metil)-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (22).	39
Figura 19. Espectro de RMN de ¹ H a 400 MHz en CDCl ₃ de 6-((4-metoxifenil)imino)-2,3,3-trimetilciclohexa,4-dien-1-carbaldehído (23).	41

ÍNDICE ESQUEMAS

Esquema 1.	Modificaciones químicas del (-)- α -santalal (1).....	10
Esquema 2.	Derivados del Piquerol A	15
Esquema 3.	Etiquetado general de las cajas de Petri usadas en el ensayo.	25

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1.	Zona de inhibición (mm) de la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de las raíces gruesas de <i>P. trinervia</i>	17
Tabla 2.	Zona de inhibición (mm) de la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de las raíces delgadas de <i>P. trinervia</i>	17
Tabla 3.	Zona de inhibición (mm) de la actividad antibacteriana de las fracciones orgánicas de los extractos acuosos de las partes aéreas y raíz de <i>P. trinervia</i>	18
Tabla 4.	Rendimientos obtenidos de cada uno de los extractos trabajados en <i>P. triflora</i>	23
Tabla 5.	Preparación de disoluciones.	24

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

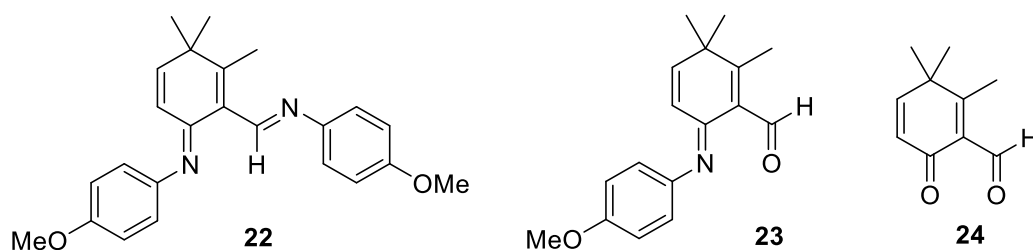
AcOEt	Acetato de etilo
AgNO ₃	Nitrato de plata
ATP	Adenosín Trifosfato
°C	Grados Celsius
¹³ C	Carbono 13
C	Carbono
c.b.p.	Cuanto baste para
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
cm	Centímetros
δ	Desplazamiento
d	Doble o doblete
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
EtOH	Etanol
eV	Electrovoltios
g	gramos
GC-MS	Gas chromatography mass spectrometry
¹ H	protón
H	Hidrógeno
h	Horas
HETCOR	Resonancia magnética nuclear de correlación heteronuclear
Hz	Hertz
IBUNAM	Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México
IR	Infrarrojo

<i>J</i>	Constante de acoplamiento
LB	Medio Luria-Bertani
[M ⁺]	Ion molecular
m	Metros
µg	Microgramos
µL	Microlitros
MDR	Multirresistencia
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
mm	Milímetros
Na	Sodio
NT	No probado
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	simple/singulete
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
uma	Unidad de masa atómica
$\bar{\nu}$ máx	Frecuencia máxima
XDR	Resistencia extrema
m/z	Relación masa carga

RESUMEN

El incremento de la resistencia antibacteriana a los antibióticos y la disminución de nuevos agentes antibacterianos eficaces y seguros ha puesto a las plantas tradicionales de uso medicinal como el recurso para encontrar fármacos ante infecciones microbiológicas. En el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos hexánico, diclorometano y metanólico obtenidos de las partes aéreas de *Piqueria triflora* mediante el método de difusión en placa (Kirby-Bauer), donde el extracto de diclorometano presentó una ligera actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* sp y el extracto hexánico mostró actividad bacteriostática frente a *S. aureus*.

El fraccionamiento del extracto hexánico y posterior tratamiento de una de las fracciones obtenidas con *p*-metoxianilina condujo al aislamiento de los derivados N-(4-metoxifenil)-2-(-(4-metoxifenilimino)metil)-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (**22**) y 6-((4-metoxifenil)imino)-2,3,3-trimetilciclohexa,4-dien-1-carbaldehído (**23**), por lo que se propone que ambos tienen como precursor al 2,3,3-trimetil-6-oxociclohexa-1,4-dien-1-carbaldehído (**24**). Los compuestos fueron identificados mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

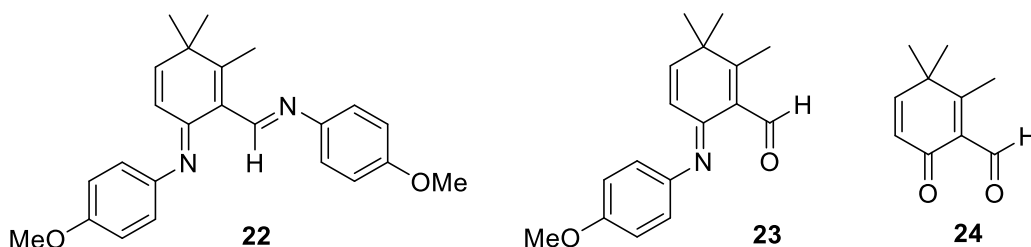


Palabras claves: efecto bacteriostático, antibacterianos, monoterpeno, iminas, productos naturales.

ABSTRACT

The increase in the bacterial resistance to antibiotics as well as the decrease in new effective and safe antibacterial drugs have made medicinal plants a resource to find new drugs against microbial infections. In the present work, the antibacterial activity of hexanes, dichloromethane, and methanol extracts obtained from the aerial parts of *Piqueria trifloral* were evaluated by the plate diffusion method (Kirby-Bauer) against five bacterial strains. The hexane extract showed a weak bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* sp., on the other hand, the hexane extract exhibited good bacteriostatic activity against *S. aureus*.

The hexane extract fractioning and then, the treatment of one of those fractions with *p*-methoxyaniline, yielded two derivatives the *N*-(4-methoxyphenyl)-2-(-(4-methoxyphenylimino)methyl)-3,4,4-trimethylcyclohexa-2,5-dien-1-imine (**22**), and the 6-((methoxyphenil)imino)-2,3,3-trimethylcyclohexa-1,4-diene-1-carbaldehyde (**23**), both of them are proposed to have as a precursor the 2,3,3-trimethyl-6-oxocyclohexa-1,4-diene-1-carbaldehyde (**24**). The obtained derivatives were identified by spectroscopic and spectrometric methods.



Key words: bacteriostatic effect, antibacterials, monoterpene, imines, natural products.

1. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son considerados como uno de los descubrimientos terapéuticos más importantes de la historia de la medicina. Su origen está relacionado a grandes sucesos; el descubrimiento del microscopio por Anton von Leeuwenhoeck, el asentamiento de las bases de la “teoría microbiana de la enfermedad” por Luis Pasteur en 1859, la siembra y detección del crecimiento bacteriano realizado por Robert Koch en 1881 y la técnica de tinción bacteriana realizada por Hans Cristian Gram, por mencionar algunos. Sin embargo, la era de los antibióticos comenzó con el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en el año 1928 a partir del hongo *Penicillium notatum* (Sierra y León, 2019).

El primer producto antibacteriano de origen natural fue descubierto por E. de Freudenreich al estudiar la pioecianasa, el pigmento azul liberado por *Pseudomonas aeruginosa*, que impedía el crecimiento de otras bacterias. Estudios posteriores demostraron que no solo inhibía el crecimiento, sino que podía destruir bacterias del carbunco, los abscesos cutáneos, la fiebre tifoidea y la peste, pero era demasiado tóxica e inestable para usarse en humanos, con esto terminó la historia de la primera sustancia antibiótica. Gerhard Domagk en 1930 notó que el prontosil presentaba efectos antibacterianos sobre estreptococos al ser administrado en animales enfermos, el residuo de sulfonamida asociado al colorante era el que presentaba las propiedades antibióticas, convirtiendo a las sulfas como el primer agente estable y sin toxicidad limitante que podía ser administrado para combatir infecciones (Belloso, 2009).

Los antimicrobianos actúan como bactericidas produciendo la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso o como bacteriostáticos inhibiendo el crecimiento bacteriano. Esto depende de su mecanismo de acción, su estructura, la concentración alcanzada en el sitio de la infección, el tiempo de acción y la fase de crecimiento de la bacteria (Paredes y Roca, 2004).

Los antibióticos ejercen su acción antimicrobiana a través de alguno de los cinco mecanismos que utilizan para actuar y causar daño en alguna de las rutas

metabólicas esenciales para la supervivencia de las bacterias (**Figura 1**): la inhibición de la replicación, la interrupción de la transcripción, la inhibición de la síntesis de proteínas o traducción, la inhibición de la síntesis de peptidoglucano (carbohidrato estructural de la pared celular de las bacterias) y pueden ejercer su acción para modificar y/o interrumpir la permeabilidad de la membrana celular (Murillo, 2022; Calvo y Martínez-Martínez, 2009, Bisso-Andrade, 2018).

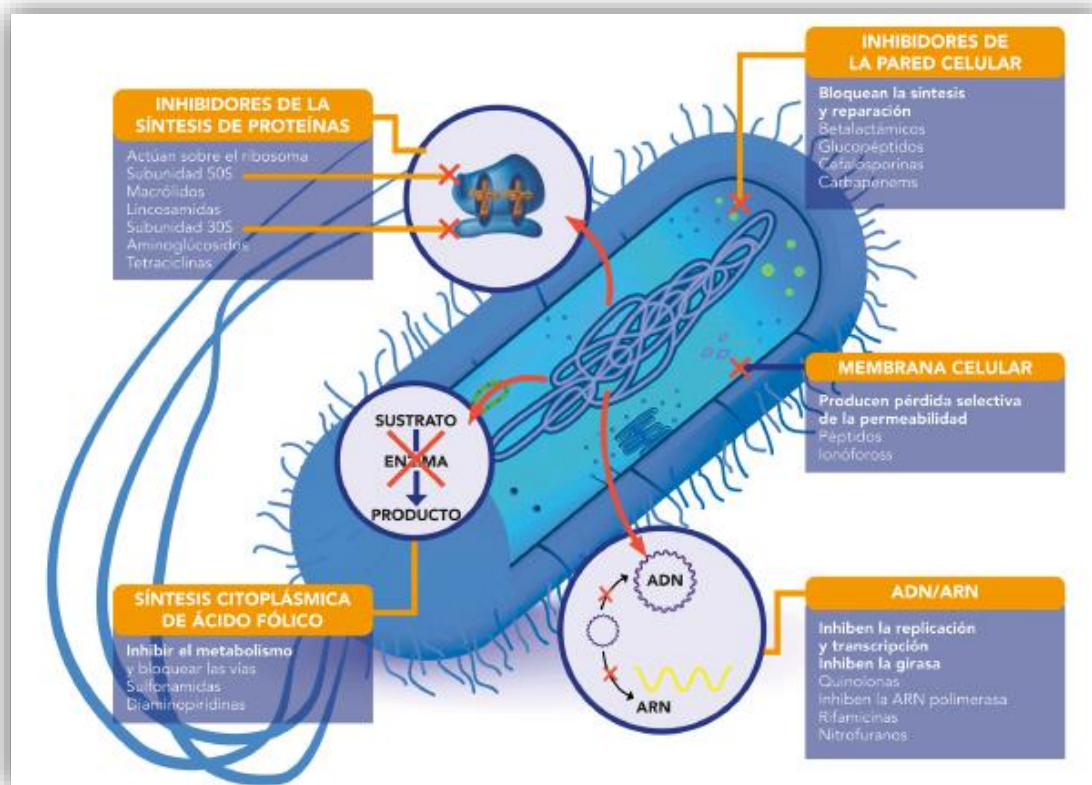


Figura 1. Mecanismos de acción de los antibióticos. Tomada de Murillo, 2022

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud a nivel mundial en evolución que constituye un fenómeno natural que se produce en los microorganismos, principalmente por el uso inadecuado de los antibióticos (empleo sin prescripción médica, tiempo inapropiado de consumo, incumplimiento de los horarios de administración e infradosificación), la pobre calidad de la medicina, la falta o deficientes programas de prevención y control de la infección, la débil

capacidad para detectar resistencia, la inadecuada vigilancia e insuficiente regulación de su uso (Fariña, 2016).

La resistencia es el mecanismo mediante el cual una bacteria puede disminuir la acción de agentes antimicrobianos. Es producida a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) que se transmite de generación en generación de manera vertical y por transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y trasposones que permite la transmisión a otras generaciones y especies bacterianas y se lleva a cabo de manera horizontal (Fernández *et al.*, 2003).

La resistencia bacteriana se clasifica según el número y la clase de antibióticos afectados. La multirresistencia (MDR) se define como la ausencia de sensibilidad a, por lo menos un fármaco en tres o más de las categorías de antibióticos; la resistencia extrema (XDR) se refiere a la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto en dos de ellas o menos, y la resistencia a todos los antimicrobianos se define como resistencia a todas las categorías de antibióticos (Rodríguez-Noriega *et al.*, 2014).

Las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos a través de varios mecanismos moleculares (**Figura 2**). 1: por mecanismos que minimizan las concentraciones intracelulares del antibiótico (baja penetración del antibiótico a la bacteria o aumento del flujo de salida de un antibiótico) 2: mecanismos que modifican el sitio blanco del antibiótico. 3: por mecanismos que inactivan el antibiótico por hidrólisis o modificación que es mediada por enzimas y es el principal mecanismo causante de resistencia bacteriana. La inactivación enzimática es causada por la acción de hidrolasas y transferasas sintetizadas por patógenos como estrategia de defensa bacteriana (De la Fuente-Salcido *et al.*, 2015; Patiño, 2003).

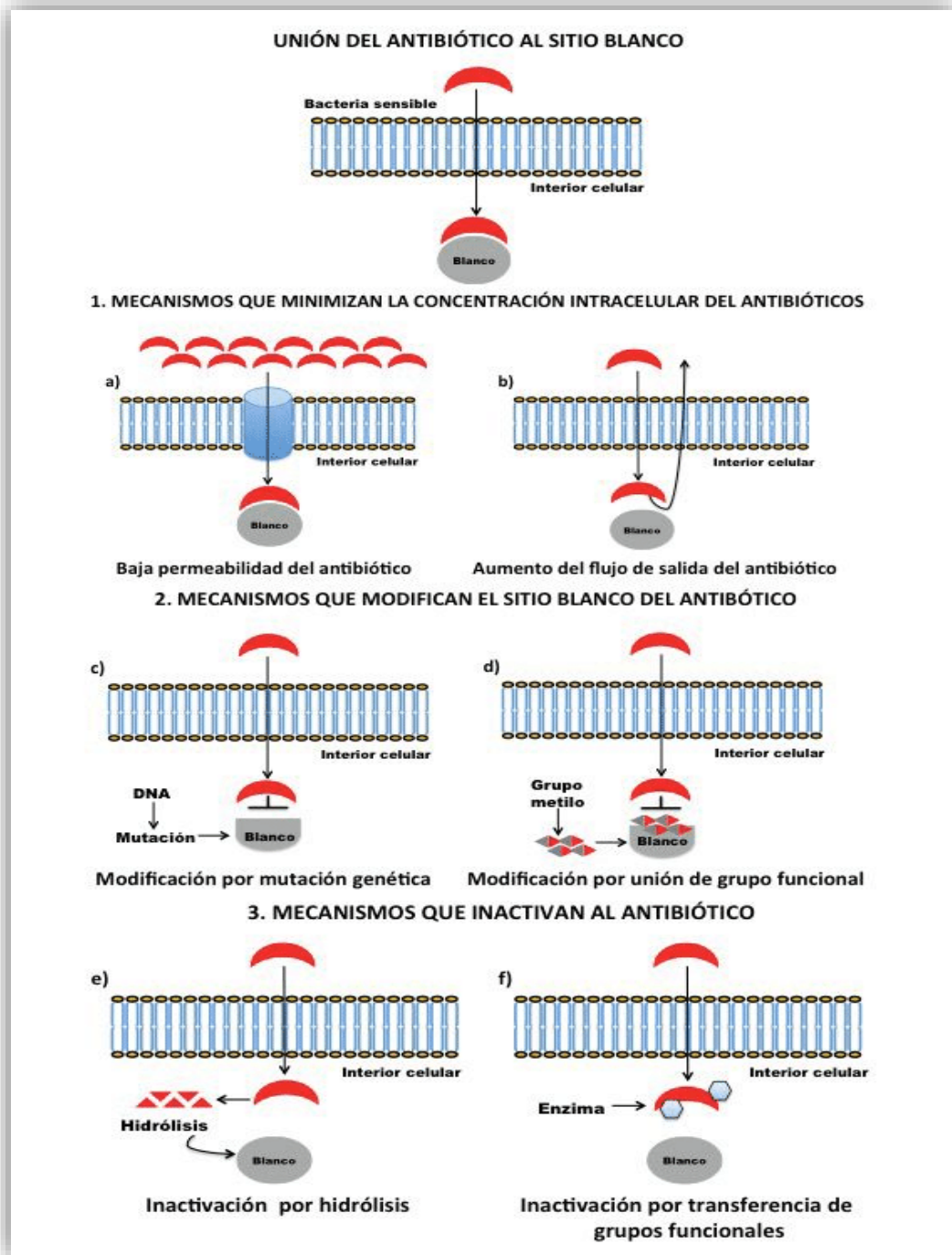


Figura 2. Mecanismos moleculares involucrados en la resistencia a los antibióticos.
Tomada de De la Fuente-Salcido *et al.*, 2015.

Los mecanismos de resistencia presentes en las bacterias pueden darse a nivel extracelular por: a) la formación de biopelículas que protege a las bacterias de la respuesta inmune del hospedador, o bien dificultando o impidiendo la acción antibiótica. b) la formación del sistema quorum sensing, mecanismo que regula la expresión de los genes en función de la densidad celular y ha permitido que ciertos tipos de bacterias patógenas adquieran resistencia a los antibióticos, reduciendo la eficiencia de los tratamientos e incrementando el desarrollo de la enfermedad. A nivel de envoltura celular por a) impermeabilidad limitada de los antimicrobianos al interior de la célula, debido a cambios en la conformación de la membrana o de la pared celular o por penetración limitada de los antimicrobianos a través de las barreras físicas, b) porinas de membranas que evitan el ingreso del antimicrobiano, c) bombas de expulsión que facilitan la salida de los antimicrobianos, y d) la inhibición de la síntesis de la pared celular. A nivel intracelular a través de a) sistemas de protección ribosomal que dificulta la acción de los antibióticos que actúan a nivel de la inhibición de la síntesis de proteínas, b) por modificación del sitio activo y c) por modificación genética debido a mutaciones de los genes, la activación de genes reguladores específicos y de transcripción global (Troncoso *et al.*, 2017; Serra, 2017).

Las principales vías para obtener fármacos son la extracción de fuentes naturales, la síntesis química y la biotecnología. Aunque la mayoría de los medicamentos son obtenidos por síntesis química, muchos proceden de la naturaleza, principalmente de las plantas. Los productos naturales son la principal fuente de nuevas moléculas de alto valor biológico. Sin embargo, en menos del 10% de estos recursos han sido estudiadas sus actividades biológicas (Díaz *et al.*, 2021).

En los últimos años con el enorme problema global de resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales, el enfoque de la investigación en las plantas en la búsqueda de productos naturales con presencia de actividad antibacteriana ha aumentado.

Dahanukar *et al.*, (2000), en su compilación de farmacología de plantas medicinales y productos naturales mencionan algunos productos naturales con

actividad antimicrobiana: 1) el clausenol, un alcaloide de carbazol, aislado de un extracto alcohólico de la corteza del tallo de *Clausena anisata*, era activo contra bacterias gram positivas y gram negativas. 2) el extracto alcohólico de nueces secas de *Semecarpus anacardium* mostró actividad *in vitro* contra tres cepas gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Proteus vulgaris*) y dos cepas gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium diphtheriae*). 3) los extractos alcohólicos y de acetona de las hojas de *Cassia alata* mostraron actividad antibacteriana *in vitro* contra *S. aureus*, *S. aureus* coagulasa positivo, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *B. sterothermophilus*, *E. coli* y *S. typhi*. El extracto alcohólico también inhibió el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae*, mientras que el extracto de acetona inhibió el crecimiento de *Vibrio cholerae*.

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de la actividad antibacteriana de los extractos de las partes aéreas de *Piqueria triflora*, así como el estudio químico del extracto hexánico.

2. ANTECEDENTES

Las plantas superiores son una inmensa fuente de moléculas con gran variedad de estructuras, que pueden presentar funciones específicas a las plantas, pero que también pueden tener actividades farmacológicas útiles para la salud. Entre los fármacos de origen natural más conocidos por su utilidad clínica están la morfina y la codeína, alcaloides extraídos del jugo de la adormidera *Pavaver somniferum* conocida comúnmente como planta del opio; los glucósidos cardiotónicos: digoxina obtenida de las hojas de *Digitalis lanata* y digitoxina obtenida de la *Digitalis purpurea*; los alcaloides con efecto antimuscarínico: atropina (o dl-hiosciamina), extraída de las plantas *Atropa belladonna* y *Datura stramonium*, y escopolamina (o l-hioscina) obtenida de *Hyoscyamus niger* (Mesa, 2017; Sáenz, 2003).

Las plantas del género *Piqueria* pertenecen a la familia Asteraceae o Compositae, Villaseñor (2018) a través de una revisión florística y taxonómica reporta a esta familia como el grupo vegetal más grande y diverso de plantas vasculares en México que posee una distribución cosmopolita a lo largo del país que va desde las dunas o vegetación costera hasta los picos nevados de las altas montañas, con un registro de 26 tribus, 417 géneros y 3113 especies, de las cuales 3050 son especies nativas y 1988 son endémicas del territorio nacional (**Figura 3**).

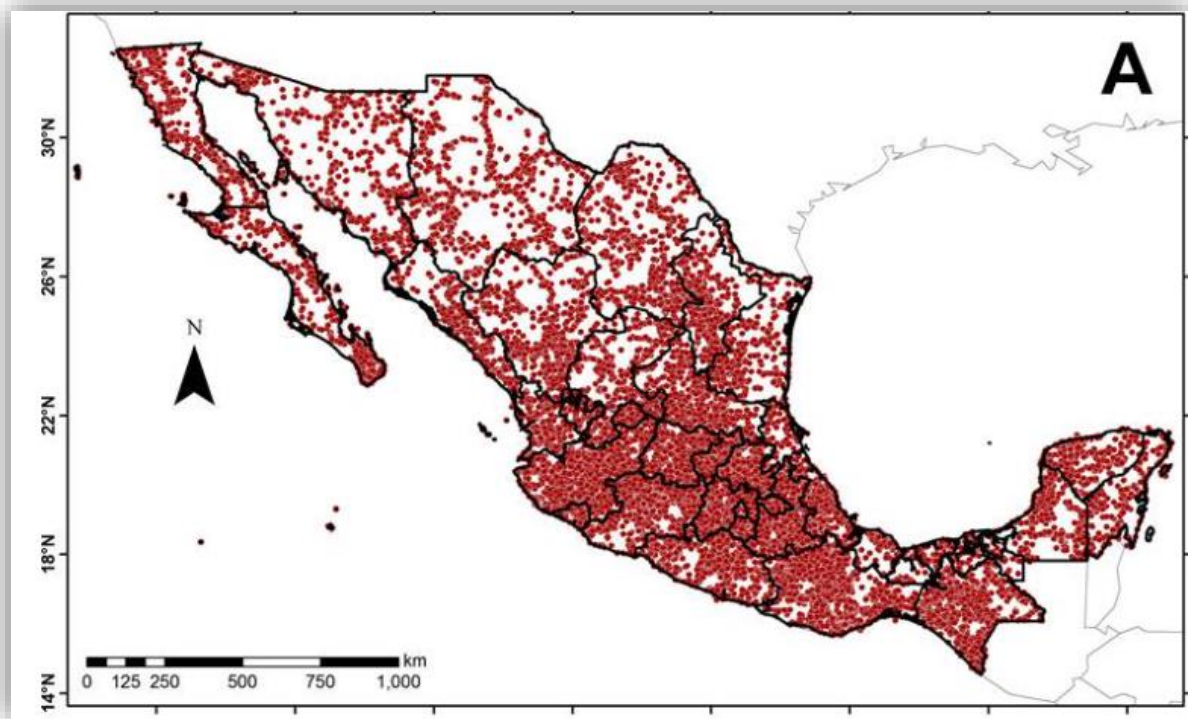


Figura 3. Distribución de la familia Asteraceae en la República Mexicana. Tomado de Villaseñor, 2018.

Las plantas que pertenecen al género *Piqueria* se caracterizan por ser hierbas anuales que comprenden las siguientes características: tallos erguidos y ramificados, hojas opuestas, pecioladas, de borde entero aserrado; flores hermafroditas, tubulosas, con corola blanca, tubo corto, piloso, limbo campanulado, anteras de base obtusa, sin apéndice en el conectivo; ramas largas, sobresalientes, claviformes de ápice obtuso, con numerosas papilas. El género comprende seis especies distribuidas en la República Mexicana, Costa Rica, Guatemala, Panamá, Brasil y Haití (Goldhaber, 2004).

De las especies que pertenecen al género, la más estudiada ha sido *Piqueria trinervia* Cav. (**Figura 4**), una planta silvestre ampliamente distribuida en el territorio mexicano desde Durango hasta Chiapas que crece en zonas boscosas de pino-encino, en lugares abiertos y soleados, en matorrales y en terrenos agrícolas entre 920 y 4200 m sobre el nivel del mar. Recibe varios nombres comunes es conocida

como hierba de San Nicolás, tabardillo, xoxonetzal, yocoxitlic y emphueste (Béjar *et al.*, 2000 y Jiménez-Estrada *et al.*, 2006).



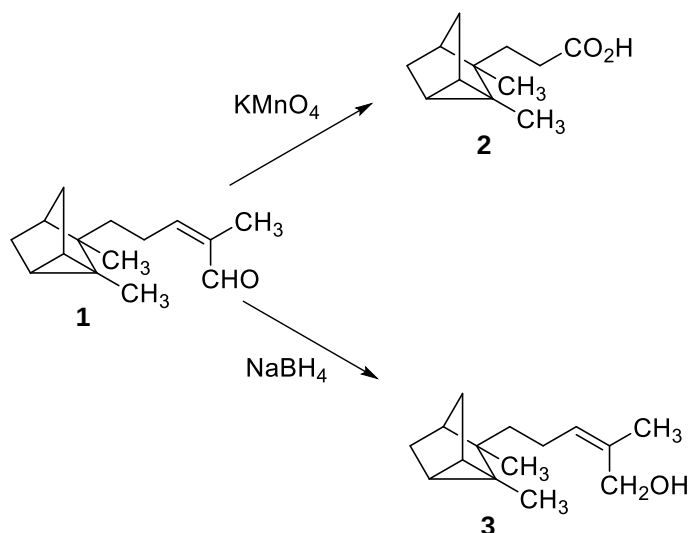
Figura 4. Espécimen de la planta *Piquería trinervia* Cav. Tomada de IBUNAM, 2015.

P. trinervia es una de las varias especies de plantas que han sido usadas en la medicina tradicional mexicana desde la época prehispánica. Su uso como febrífugo se remonta al siglo XVI. Su registro se realizó en el Códice Florentino bajo el nombre náhuatl de “Cuapupoltzin” donde Fray Bernardino de Sahagún escribió: **“La raíz cocida en agua, es beneficiosa para quien sufre de excesivo calor interno. La decocción en agua debe ser tomada. Entonces el paciente debe comer y evitar tomar cualquier otra agua. Con esto el calor es purgado y mitigado”**. La hierba también ha sido empleada en el tratamiento de diarrea, disentería, trastornos gastrointestinales como el empacho (enfermedad cultural que se describe como indigestión), dolor de estómago y fiebre tifoidea, mediante la

ingesta de una infusión o decocción de las hojas, flores y raíces (Cruz-Reyes *et al.*, 1989, Saad *et al.*, 2000, Ruiz de Esparza *et al.*, 2007).

Son varios y diversos los estudios que se han reportado de *P. trinervia*, de la cual se han podido aislar e identificar diferentes compuestos con actividad biológica.

A partir del análisis del extracto de raíces de *P. trinervia* extraído con éter/éter de petróleo en una proporción 1:2, Bohlmann y Zdero (1968), aislaron el aldehído sesquiterpénico (-)- α -santalal (**1**), que, al ser oxidado con KMnO_4 y NaOH fue transformado en ácido eksantálico (**2**). Mientras que por reducción con NaBH_4 en metanol obtuvieron una mínima cantidad del alcohol α -santalol (**3**) (**Esquema 1**).



Esquema 1. Modificaciones químicas del (-)- α -santalal (**1**).

Romo *et al.*, (1970), estudiaron la composición química en poblaciones diferentes de *P. trinervia*, que provenían del Pedregal de San Ángel (Ciudad de México) y de Atlacomulco (Estado de México). A partir del extracto etanólico de la planta colectada en el Pedregal de San Ángel aislaron un monoterpeno cristalino, que llamaron piquerol A (**4**) y el acetato de carquejilo (**5**). Mientras que de la colecta de Atlacomulco aislaron el acetato de carquejilo, el piquerol B (**6**) que es un diastereoisómero del piquerol A y el diacetato de piquerol B (**7**) (**Figura 5**).

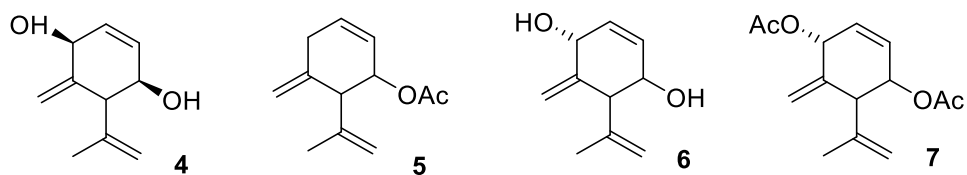


Figura 5. Monoterpenos aislados de *P. trinervia*

El monoterpeno piquerol A (**4**) es un anillo de ciclohexano tetrasustituido que posee tres dobles enlaces no conjugados y ha sido el compuesto más estudiado química y biológicamente del género pues ha demostrado poseer un espectro de acción biológica amplio. Soriano-García *et al.*, (1983), determinaron la estructura tanto cristalina como molecular del piquerol A aislado de *P. trinervia* Cav. (**Figura 6**). Confirmando a través de rayos x que la estructura es similar a la asignada en 1970 mediante RMN. Los resultados de la estructura tridimensional mostraron que el grupo isopropenilo es plano y el ángulo de separación con respecto al plano del anillo hexagonal es de 38.4° y que los grupos hidroxilo están sobre el plano del hexágono y el C₄ y H₅, están debajo de dicho plano.

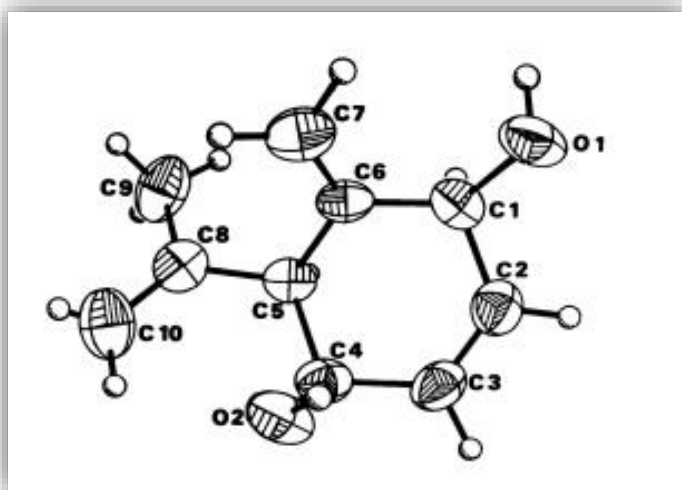


Figura 6. Estructura molecular del piquerol A confirmada por rayos x. Tomada de Soriano-García *et al.*, 1983.

Posteriormente de *P. trinervia* Bohlmann y Suwita (1978), de las raíces extraídas con éter/éter de petróleo en una proporción 1:2 aislaron los terpenos (**8-11**) que corresponden a Metil éter de tetrahydrocarquejol (**8**), acetato de 2-isobutiriloxi-2H-1,6-deshidrocarquejol (**9**), 4-acetoxisenecioato de isoferulol (**10**), 4-hidroxisenecioato de isoferulol (**11**) y de las partes aéreas aislaron al Senecioato de isoferulol (**12**) y Germacreno-D (**13**). Los terpenos **8** y **9** poseen el esqueleto carquejol, mientras que los terpenos **10-12** son aldehídos del tipo isoferulol (**Figura 7**).

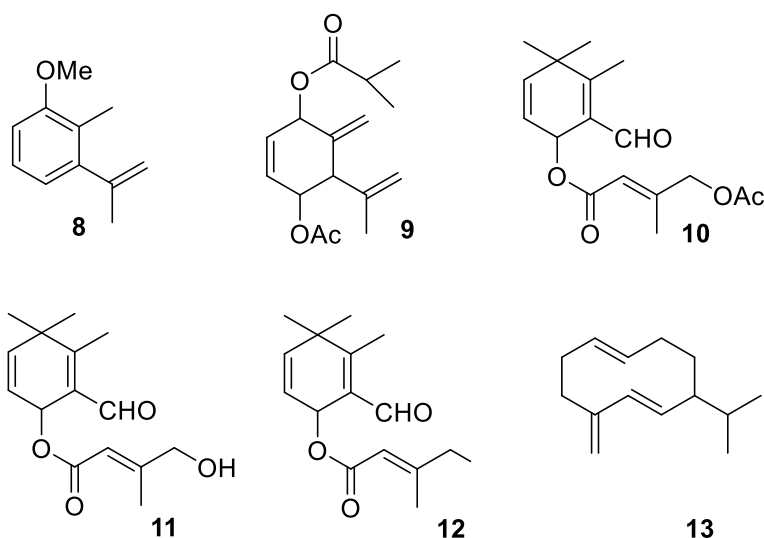


Figura 7. Terpenos aislados de *P. trinervia*.

Jiménez-Estrada y González de la Parra (1983), reportaron el aislamiento y determinación estructural de un diterpeno, denominado trinervinol (**14**), el primer diterpeno natural con esqueleto del pimarano, que posee cuatro grupos hidroxilo. El estudio fue realizado a partir del extracto con cloroformo que fue purificado por recristalización de acetona-metanol. También lo aislaron por cromatografía en sílica-gel del extracto metanólico de la planta de las fracciones eluidas con AcOEt 100% y AcOEt-MeOH 10%. Soriano-García *et al.*, (1996), determinaron la estructura cristalina y molecular del trinervinol (**Figura 8**) a través del estudio de difracción de rayos x.

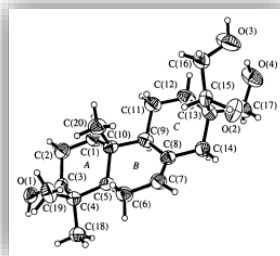
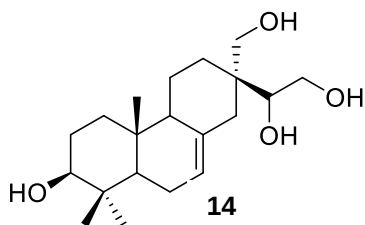


Figura 8. Estructura molecular del trinervinol confirmada por rayos x. Tomada de Soriano-García *et al.*, 1996.

Cruz-Reyes *et al.*, (1989), estudiaron la actividad molusquicida del piquerol A aislado de las hojas de *P. trinervia* sobre caracoles pulmonados, seis especies de limnaeidos, una de pláncidos y una de físidios, realizando ensayos a concentraciones de 50, 25 y 5 ppm durante periodos de 6 y 24 h a temperatura ambiente. Observaron un 100% de mortalidad a 50 ppm a las 6 h de exposición y en 25 ppm a las 24 h de exposición. En 5 ppm después de 24 h de exposición observaron una mortalidad del 60 a 100 %. Los resultados obtenidos en el estudio podrían considerar al terpeno como un molusquicida de origen natural.

Alentados por la actividad biológica del piquerol A González de la Parra *et al.*, (1991), analizaron el efecto que presentaban el piquerol A y piquerol B en garrapatas del ganado, *Boophilus microplus*. Los resultados obtenidos arrojaron que ambos compuestos tienen potencial acaricida contra las larvas de *B. microplus*; sin embargo, ninguno de los compuestos impidió la oviposición de la garrapata.

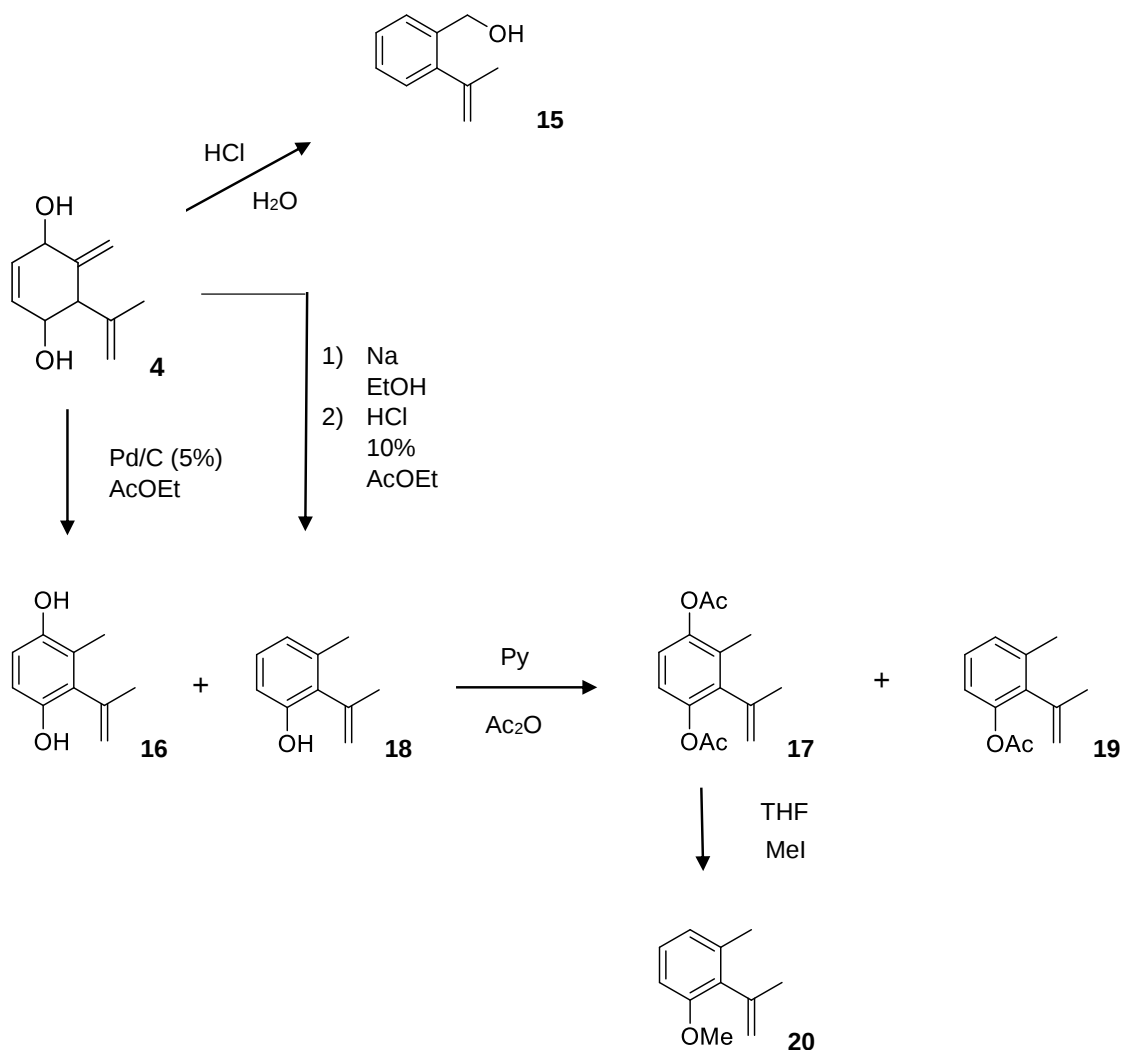
El amplio espectro de actividad biológica, así como la moderada toxicidad en mamíferos del piquerol A alentaron a Castro *et al.*, (1992), de realizar un estudio *in vitro* para determinar los posibles efectos inhibitorios del piquerol A sobre el crecimiento de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la tripanosomiasis americana o enfermedad de chagas que aqueja a millones de personas en Latinoamérica y que provoca edema, agrandamiento de los ganglios linfáticos, fiebre, postración y en la etapa crónica alteración del ritmo cardíaco que podría conducir a la falla. En el estudio observaron la inhibición del crecimiento a

concentraciones iguales o mayores a 200 µg del compuesto por mL de cultivo a cuatro días de exposición. En concentraciones de 800 µg/mL provocó lisis celular, entre el segundo y tercer día de exposición. Por lo que el estudio sugiere que el piquerol A puede ser un potencial recurso en el control de la enfermedad de Chagas.

Bajo la observación de que, en el hábitat de *P. trinervia* no crece ninguna otra planta, lo que indica un comportamiento alelopático Mendoza *et al.*, (1994), estudiaron y reportaron el mecanismo de acción del piquerol A y el diacetilpiquerol como compuestos aleloquímicos y su efecto sobre la fotosíntesis en los cloroplastos de guisantes lisados. En este estudio observaron que ambos compuestos tienen un efecto inhibitor sobre la formación de ATP y el transporte de electrones fosforilantes, no observaron efectos sobre otras actividades en la fotosíntesis, por lo que concluyeron que ambos compuestos inhiben la fosforilación.

Los estudios presentados en 1981 por González-de la Parra y colaboradores que mostraba la actividad alelopática del piquerol A al inhibir la germinación de diversas semillas y los estudios posteriores realizados por Mendoza y colaboradores en 1994 motivaron a Jiménez-Estrada *et al.*, (1996), a realizar transformaciones químicas del piquerol A en hidroquinona y derivados fenólicos y analizar el efecto que producían en las malezas (Jiménez-Estrada, 2006).

El piquerol A (**4**) fue transformado al derivado fenólico (**15**) por reacción con ácido clorhídrico en agua y fue aromatizado por tratamiento con Pd/C al 5% en AcOEt, generándose la 2,3-dialquilhidroquinona (**16**) así como el derivado **18** los cuales fueron acetilados con piridina/anhídrido acético para generar **17** y **19** respectivamente. El derivado **18** lo obtuvieron también mediante la reacción del Piquerol A con Na metálico y posteriormente llevaron a cabo su metilación con MeI/NaH para obtener **20** (**Esquema 2**). Analizaron el efecto del piquerol A y sus derivados sobre las malezas de *Amaranthus hypocondriacus* y *Echinochloa crusgalli*, encontraron que todos inhibieron el crecimiento, los derivados del piquerol actúan como poderosos inhibidores del crecimiento radicular de la maleza.



Esquema 2. Derivados del Piquerol A

Debido al potencial de *P. trinervia* para producir metabolitos medicinales importantes, Saad, *et al.*, (2000), examinaron el potencial de cultivos celulares de esta planta para ser estimulados por un elicitor fúngico para la producción de monoterpenos. Los elicitores fúngicos indujeron la producción de un nuevo monoterpeno que fue nombrado como Piquerinol (**21**) (**Figura 9**). Observaron también que el piquerol no era producido en dichos sistemas. En el trabajo concluyeron que, en los cultivos, *P. trinervia* podía sintetizar los monoterpenos

mediante dos rutas metabólicas, la primera era constitutiva y se expresaba en medios de cultivo tanto sólidos como líquidos; y la segunda consistía en una ruta inducible y que respondía a patógenos y sustancias elicitoras.

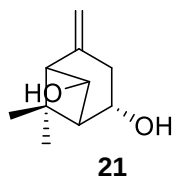


Figura 9. Estructura del Piquerinol.

Rufino-González *et al.*, (2017), estudiaron la actividad del piquerol, y del trinervinol aislados del extracto de diclorometano de las partes aéreas de la planta *P. trinervia* ante trofozoítos de *Giardia intestinalis* que fueron tratados con concentraciones (0.78-200µg/mL) por 48 horas. Dicha actividad se midió usando la reducción de azul de metileno y la citotoxicidad fue ensayada en fibroblastos humanos y células Vero por reducción de sales de tetrazoilo. De los compuestos analizados el trinervinol y piquerol mostraron actividad anti giardial.

P. trinervia es una de las plantas que poseen propiedad antimicrobiana, en México ha sido usada tradicionalmente para tratar la diarrea. En estudios realizados por Goldhaber (2004), se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de hexano, diclorometano y metanol de hojas e inflorescencias, tallos y raíces de *P. trinervia* frente a cepas de bacterias. Todos los extractos presentaron actividad antibacteriana y el extracto hexánico de tallos obtuvo los valores más altos de halos de inhibición, siendo las bacterias Gram negativas las más sensibles.

Ruiz de Esparza *et al.*, (2007), basándose en el estudio realizado por Goldhaber evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos hexánico, diclorometano, acetato de etilo y metanólico de las raíces gruesas y delgadas (5 mm o menos) de la planta. Los extractos fueron probados *in vitro* contra cepas de bacterias que son comunes en las infecciones intestinales. El extracto hexánico de las raíces gruesas fue activo contra las 11 cepas (**Tabla 1**), el extracto de acetato

de etilo de las raíces delgadas fue activo contra 8 de las cepas (**Tabla 2**), mientras que en los extractos de diclorometano y metanol se detectó poca actividad.

Tabla 1. Zona de inhibición (mm) de la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de las raíces gruesas de *P. trinervia*

	2mg/disco				3 mg/disco		
	Hexanos	DCM	AcOEt	MeOH	Hexanos	DCM	AcOEt
<i>B. subtilis</i>	13.0	14.5	12.5	9.5	12.0	---	12.0
<i>E. coli</i>	9.0	---	---	---	11.5	---	---
<i>E. coli</i> MDR	---	---	---	---	10.5	---	---
<i>E. aerogenes</i>	---	---	7.5	---	12.5	---	7.5
<i>E. agglomerans</i>	---	---	---	---	10.5	---	---
<i>S. aureus</i>	13.5	11.0	11.0	---	17.5	16.5	11.0
<i>S. epidermidis</i>	14.0	12.0	13.0	---	11.5	10.5	8.0
<i>S. boydii</i>	11.5	12.0	11.0	---	17.0	16.5	11.5
<i>S. typhi</i>	11.0	---	---	---	11.5	---	8.5
<i>Y. enterocolitica</i>	NT	NT	NT	---	24.0	13.5	17.0
<i>V. cholerae</i>	NT	NT	NT	---	32.5	30.0	26.5

*DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etilo, MeOH: metanol, ---: no inhibición, NT: no probado.

Tabla 2. Zona de inhibición (mm) de la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos de las raíces delgadas de *P. trinervia*

	2mg/disco				3 mg/disco		
	Hexanos	DCM	AcOEt	MeOH	Hexanos	DCM	AcOEt
<i>B. subtilis</i>	12.5	8.5	12.5	9.0	11.5	9.5	10.0
<i>E. coli</i>	---	---	---	---	---	---	7.0
<i>E. coli</i> MDR	---	---	---	---	---	---	---
<i>E. aerogenes</i>	---	---	---	---	---	---	8.5
<i>E. agglomerans</i>	8.7	---	---	---	9.0	8.0	---
<i>S. aureus</i>	12.0	---	11.0	---	12.0	---	9.5

<i>S. epidermidis</i>	11.5	10.5	11.0	---	10.5	---	8.0
<i>S. boydii</i>	9.5	---	9.0	---	10.5	---	9.0
<i>S. typhi</i>	9.5	---	---	---	---	---	8.5
<i>Y. enterocolitica</i>	NT	NT	NT	---	NT	NT	12.5
<i>V. cholerae</i>	NT	NT	NT	---	NT	NT	27.0

*DCM: diclorometano, AcOEt: acetato de etilo, MeOH: metanol, ---: no inhibición, NT: no probado.

También analizaron la actividad antibacteriana presente en las fracciones orgánicas de los extractos acuosos de las partes aéreas y raíz de *P. trinervia* que fueron obtenidas por partición líquido-líquido con diclorometano. Fueron probados *in vitro* frente a cepas de bacterias. *Y. enterocolitica* y *S. typhi* fueron las bacterias más sensibles frente a la fracción orgánica de las partes aéreas mientras que la fracción orgánica del extracto acuoso de raíz inhibió el crecimiento de *Y. enterocolitica*, *B. subtilis*, todas las *Salmonella* analizadas, *S. aureus* y *S. epidermidis* (**Tabla 3**).

Tabla 3. Zona de inhibición (mm) de la actividad antibacteriana de las fracciones orgánicas de los extractos acuosos de las partes aéreas y raíz de *P. trinervia*.

3 mg/disco

	Partes aéreas	Raíz
<i>S. subtilis</i>	13.0	7.0
<i>E. coli</i>	10.0	---
<i>E. aerogenes</i>	9.0	---
<i>E. agglomerans</i>	10.0	---
<i>S. aureus</i>	10.5	9.5
<i>S. epidermidis</i>	11.0	7.0
<i>S. gallinarum</i>	14.5	9.5
<i>S. typhi</i>	18.0	8.0
<i>S. dublin</i>	10.0	9.5
<i>Y. enterocolitica</i>	20.0	11.0

2.1. *Piqueria triflora*:

La planta *Piqueria triflora* (**Figura 10**) es una hierba erecta de 2 a 3 pies de altura, muy ramificada, con ramas peludas y estriadas; posee hojas opuestas estrechamente lanceoladas, obtusas en el ápice, cuneadas en la base, pubescentes en ambos lados, remotamente denticulada, pecíolo corto; inflorescencias racimosas triflorales con tres brácteas involucres en el exterior, completamente hirsutas; tubo de la corola exteriormente vellosa; aquenios claviformes de cinco costillas, negros, estrechándose hacia abajo, callosos en la base, con un pequeño callo casi oblicuo.

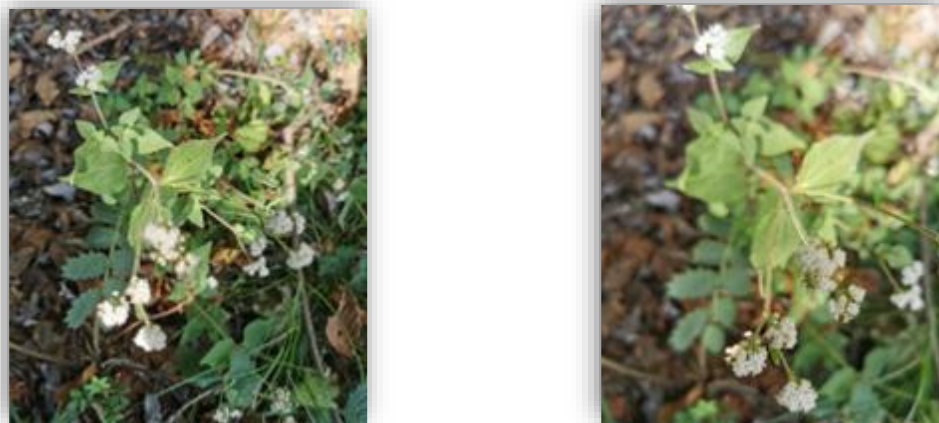


Figura 10. Hojas y flores de *Piqueria triflora*

Se diferencia de *Piqueria trinervia* y *Piqueria pilosa* en sus inflorescencias que son 3 contenidas en un soporte y en que esta última es peluda en el dorso. De *Piqueria serrata* se diferencia en su velloso, follaje y aquenios (Hemsley, 1881).

En el presente trabajo se reporta el estudio de la actividad antibacteriana, así como fitoquímico de las partes aéreas de *P. triflora*.

3. JUSTIFICACIÓN

La resistencia a los antibióticos es una amenaza para la salud a nivel mundial. Día tras día aparecen nuevos mecanismos de resistencia en las bacterias que dificultan la capacidad para tratar enfermedades infecciosas. Estudios fitoquímicos del género *Piqueria* han reportado una variedad de compuestos químicos que presentan diversas funciones biológicas, entre ellas la presencia de actividad antibacteriana. La actual lucha y búsqueda de nuevos compuestos contra la resistencia bacteriana a los antibióticos ha llevado a la ciencia a investigar los especímenes vegetales en busca de productos naturales que posean dicha actividad y que encaminen a nuevas investigaciones para detener la crisis actual. Por lo que esta investigación se ha centrado en el análisis de actividad antibacteriana de la planta *P. triflora*, así como el estudio químico de los extractos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Estudiar la actividad antibacteriana de diferentes extractos de las partes aéreas de *P. triflora* y aislar los productos naturales presentes en los extractos.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener los extractos de las partes aéreas de *P. triflora*.
- Analizar la actividad antibacteriana en los extractos obtenidos a través del método de antibiograma.
- Separar las fracciones activas mediante técnicas de cromatografía para aislar el o los compuestos activos.
- Caracterizar e identificar los compuestos aislados mediante métodos químicos y espectroscópicos.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1. Generalidades

La purificación de los compuestos se realizó empleando columnas cromatográficas, gel de sílice 230-400 mallas de la marca Merck como fase estacionaria, así como mezclas de disolventes destilados previo a su uso como fase móvil, en polaridades ascendentes.

Los espectros de RMN de protón (^1H) a 400 Megahertz (MHz) y de carbono 13 (^{13}C) a 100 MHz fueron determinados en un espectrómetro Varían Mercury Plus 400, empleando cloroformo deuterado (CDCl_3) o dimetilsulfóxido deuterado ($\text{DMSO}-d_6$) como disolventes y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. El espectro de masa se determinó en un equipo marca Thermo Scientific GC TRACE 1310 EM ISQ LT a 70 eV. Los espectros obtenidos tanto de RMN como GC-MS se procesaron mediante el programa MestReNova 14, en el espectro de RMN de ^1H se interpretan las señales como: s = simple y d = doble. El espectro de infrarrojo (IR) se determinó en un espectrómetro Thermo Scientific Nicolet iS10 usando reflectancia total atenuada ($\bar{\nu}$, cm^{-1}).

5.2. Materia vegetal

La colecta de la especie vegetal *P. triflora*, se realizó el 30 de noviembre del 2020 en el Cerro Burro, en el Municipio de Pátzcuaro, Michoacán. Una muestra fue autenticada por el Dr. Sergio Zamudio, Pátzcuaro, Michoacán RENDRT#19.

5.3. Obtención de los extractos

El material vegetal se secó a la sombra. Se obtuvo un lote de 485 g de las partes aéreas de la planta seca, se trituró y maceró con los disolventes (hexanos, diclorometano y metanol) en orden ascendente de polaridad y de manera secuenciada, durante tres días a temperatura ambiente. Una vez filtrado el disolvente se evaporó en rotavapor para obtener los extractos correspondientes (**Tabla 4**).

Tabla 4. Rendimientos obtenidos de cada uno de los extractos trabajados en *P. triflora*

Extractos	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hexanos	20	4.12
Diclorometano	10	2.06
Metanol	40	8.24

5.4. Evaluación preliminar de la actividad antibacteriana de las partes aéreas.

5.4.1. Cepas bacterianas

Las bacterias usadas en la experimentación fueron *Pseudomonas* PA01, *Escherichia coli* OP50, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp. y *Staphylococcus* sp.

5.4.2. Pruebas de resistencia antimicrobiana

Los Medios de cultivo utilizados fueron los siguientes:

- Medio líquido Luria-Bertani (LB): 0.5 g NaCl, 1 g de peptona de caseína, 0.5 g de extracto de levadura y agua destilada c.b.p. 100 mL, pH 7.
- Medio agar LB: 0.5 g NaCl, 1 g de peptona de caseína, 0.5 g de extracto de levadura, agua destilada c.b.p. 100 mL, pH 7 y 1.5 g de agar bacteriológico.

La prueba antibacteriana se realizó por el método de difusión en placa (Método Kirby-Bauer), utilizando aislados en medio líquido LB en crecimiento exponencial. Se preparó un pre-inóculo con las bacterias a ensayar en 3 mL de medio líquido LB el cual se incubó a 37°C por 18 h en rotación de 120 rpm.

De todas las bacterias, excepto *Enterococcus* sp (de la cual se colocaron 20 µL), se inocularon 10 µL del pre-inóculo en el centro de las cajas de medio sólido LB para posteriormente ser diseminadas empleando la técnica de estriado masivo por toda la placa con un hisopo estéril. Se inocularon tres cajas Petri con la misma

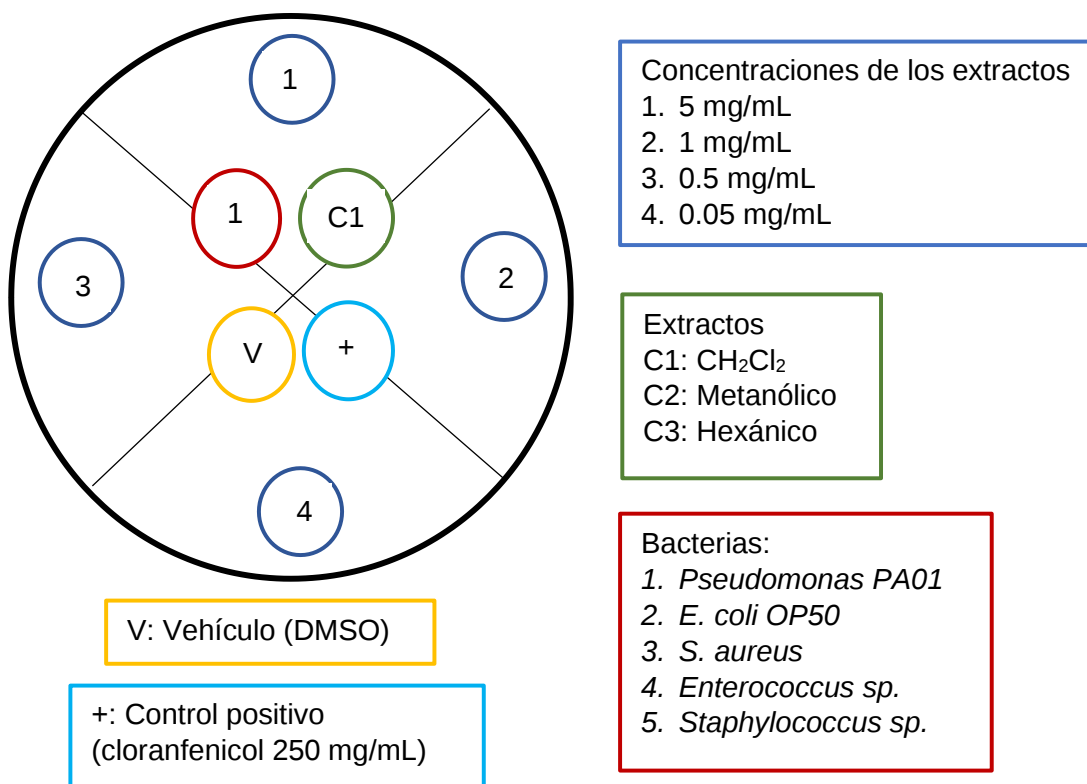
bacteria para poder probar un extracto diferente en cada una; se experimentaron los extractos a diferentes concentraciones.

Se realizaron ensayos de difusión en placa con los extractos hexánico, diclorometano y metanólico obtenidos de la planta en las cinco bacterias. Con el propósito de conocer la concentración de extracto necesaria para lograr inhibición de estos sobre las bacterias, se propuso tener extractos a diferentes concentraciones. Se disolvieron 50 mg de cada extracto en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) de lo cual se obtuvo una concentración de 50 mg/mL (stock ⁰) en cada extracto. Los extractos se diluyeron a las concentraciones 5, 1, 0.5 y 0.05 mg/mL. Para las disoluciones (**Tabla 5**) se preparó un vehículo de 50% DMSO y 50% PBS.

Tabla 5. Preparación de disoluciones.

1. 50 mg/mL	1:10 100 µL stock ⁰ + 900 µL vehículo	[5 mg/mL] ¹
2. 5 mg/mL	2:100 200 µL stock ¹ + 800 µL vehículo	[1 mg/mL] ²
3. 5 mg/mL	1:100 100 µL stock ¹ + 900 µL vehículo	[0.5 mg/mL] ³
4. 0.5 mg/mL	1:1000 100 µL stock ³ + 900 µL vehículo	[0.05 mg/mL] ⁴

Se colocaron los discos estériles de papel filtro en la placa después de la inoculación y fueron impregnados con 6 µL de las concentraciones diferentes de los extractos (5, 1, 0.5 y 0.05 mg/mL), se dejó que se absorbieran los extractos completamente antes de cerrar la caja. También se colocaron como control negativo un disco con el vehículo DMSO y como control positivo un disco con el antibiótico cloranfenicol 250 mg/mL. (**Esquema 3**). Se incubaron las cajas por un periodo de 24 h a 37°C.



Esquema 3. Etiquetado general de las cajas de Petri usadas en el ensayo.

5.5. Estudio fitoquímico

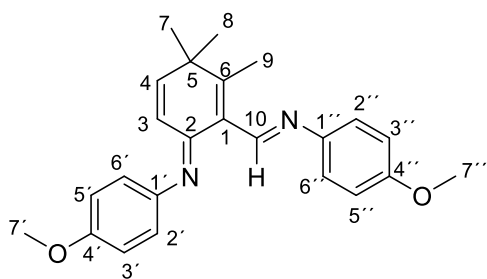
5.5.1. Fraccionamiento del extracto de hexanos

El fraccionamiento de 20 g del extracto de hexanos se realizó mediante columna cromatográfica, empleando una columna de vidrio con diámetro de 5.5 cm, gel de sílice como fase estacionaria con 13 cm de altura y como fase móvil mezcla de hexanos-AcOEt en orden de polaridad ascendente, colectando fracciones de 20 mL cada una, las cuales se monitorearon por cromatografía en placa fina (CCF). De la polaridad 4:1 hexanos-AcOEt se obtuvieron las fracciones 91-100 con un peso de 1.1673 g (correspondiente a mezclas de compuestos), de acuerdo con las bandas que mostraron en la cromatografía en placa fina.

5.5.2. Obtención de la base de Schiff

La reacción se llevó a cabo con 100 mg de la muestra de las fracciones (91-100), 100 mg de *p*-metoxianilina y 2 mL de MeOH en agitación constante a T. A. durante 90 min. La purificación del crudo de la reacción se realizó mediante columna cromatográfica, empleando una columna de vidrio con diámetro de 1.5 cm, gel de sílice como fase estacionaria con 11 cm de altura y como fase móvil mezcla de hexanos-AcOEt en orden de polaridad ascendente, colectando fracciones de 10 mL cada una, las cuales se monitorearon por cromatografía en capa fina (CCF). De la polaridad 9:1 hexanos-AcOEt se obtuvieron las fracciones 3 y 4 con un peso de 11 mg. De las cuales se realizó una recromatografía empleando una columna de vidrio con diámetro de 1.5 cm, gel de sílice impregnada con AgNO₃ como fase estacionaria con 11 cm de altura y como fase móvil una mezcla de hexanos-AcOEt en proporción 8:2, colectando fracciones de 5 mL cada una, las cuales se monitorearon por cromatografía en capa fina (CCF) con el mismo sistema de disolventes. Se obtuvieron dos fracciones principales, de acuerdo con el seguimiento realizado por cromatografía en capa fina, la primera correspondiente a la fracción 3. Y la segunda correspondiente a las fracciones 49-58.

5.5.3. N-(4-metoxifenil)-2-(-(4-metoxifenilimino)metil)-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (**22**)



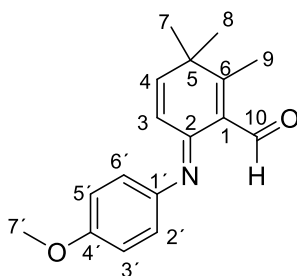
Se obtuvieron 6 mg puros (fracciones 49-58) de miel amarilla. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8.75 (1H, s, H-10), 7.20 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-3' y H-5'), 6.94 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, H-6', H-2'), 6.89 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-3'', H-5''), 6.76 (2H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6'', H-2''), 6.29 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-3), 6.19 (1H, d, *J* = 10.2 Hz, H-4), 3.84 (3 H, s, CH₃-7'), 3.82 (3H, s, CH₃-7''), 2.37 (3H, s, CH₃-9), 1.54 (6H, s, CH₃-7, CH₃-8).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 159.2 (C, C-2), 158.7 (C), 158.1 (CH, C-10), 156.2 (C), 151.8 (CH, C-4), 146.4 (C), 145.6 (C), 144.8 (C), 139.8 (C), 122.3 (CH, C-3'), 121.5 (C, C-5'), 116.4 (CH, C-3), 114.7 (CH, C-6''), 114.4 (CH, C-2''), 55.8 (CH_3 , C-7'), 55.7 (CH_3 , C-7''), 38.9 (C, C-5), 27.4 (CH_3 , C-7, C-8), 13.0 (CH_3 , C-9).

EMIE m/z (%) = 374.18 (25) [M^+], 359.16 (100), 273.11 (37), 226.12 (26), 134.06 (22).

IR $\bar{\nu}_{\text{max}}$ cm^{-1} (ATR): 2997, 2956, 2921, 2852, 2829, 1740, 1656, 1604, 1559, 1499.

5.5.4. 6-((4-metoxifenil)imino)-2,3,3-trimetilciclohexa,4-dien-1-carbaldehído (23).



Se obtuvieron 2 mg de miel amarilla (fracción 3). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 10.49 (1H, s, H-10), 6.90 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', H-5'), 6.76 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-6', H-2'), 6.32 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-3), 6.15 (1H, d, $J = 10.2$ Hz, H-4), 3.82 (3H, s, CH_3 -7'), 2.50 (3H, s, CH_3 -9), 1.38 (6H, s, CH_3 -7, CH_3 -8).

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las partes aéreas de la planta *Piqueria triflora* fueron secadas a la sombra, se trituraron y se colocaron a maceración a temperatura ambiente durante tres días, se obtuvieron los distintos extractos, los cuales se analizaron mediante RMN de ^1H (**Figura 11**). En el espectro del extracto hexánico (**Figura 11a**), se observó una señal en 10.2 ppm correspondiente al H de un aldehído. De 6.2 a 5.2 ppm se encontraron las señales correspondientes a H de dobles enlaces. Entre 4.7 y 3 ppm se observaron señales de H base de heteroátomos. En frecuencia baja en 2.2-0.9 ppm se visualizaron señales de metilos e hidrógenos alifáticos. En el extracto de diclorometano (**Figura 11b**), en aproximadamente 10.2 ppm se observan señales de H de aldehído. Entre 8 y 6.5 ppm se detectaron señales de H aromáticos. Entre 6.5 y 5 ppm se visualizaron H de dobles enlaces. Entre 5 y 3 ppm se observaron bases de heteroátomo, así como señales en la región de hidrógenos alifáticos. Mientras que en el extracto metanólico (**Figura 11c**) se observaron mayoritariamente compuestos con H base heteroátomo posiblemente azúcares.

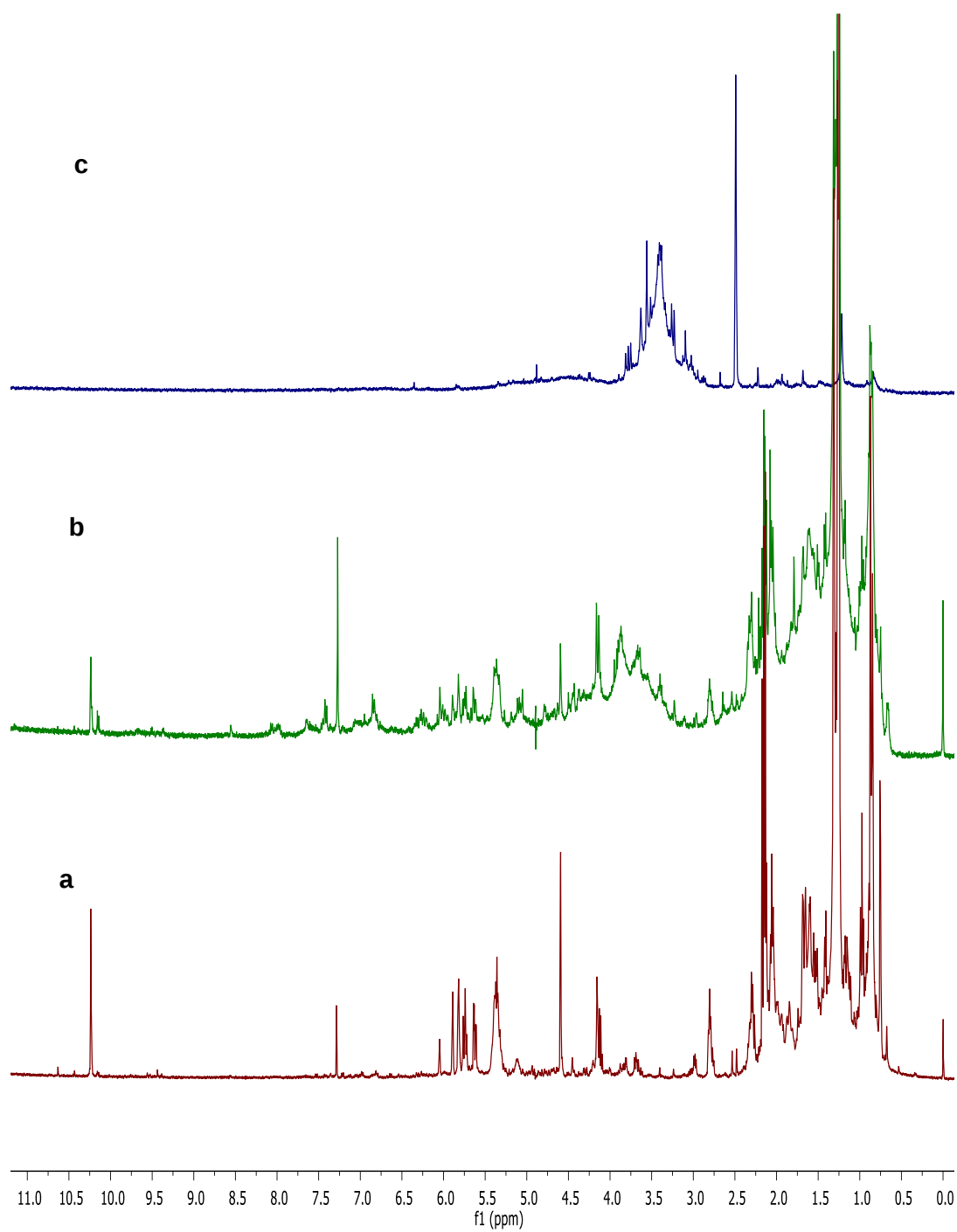


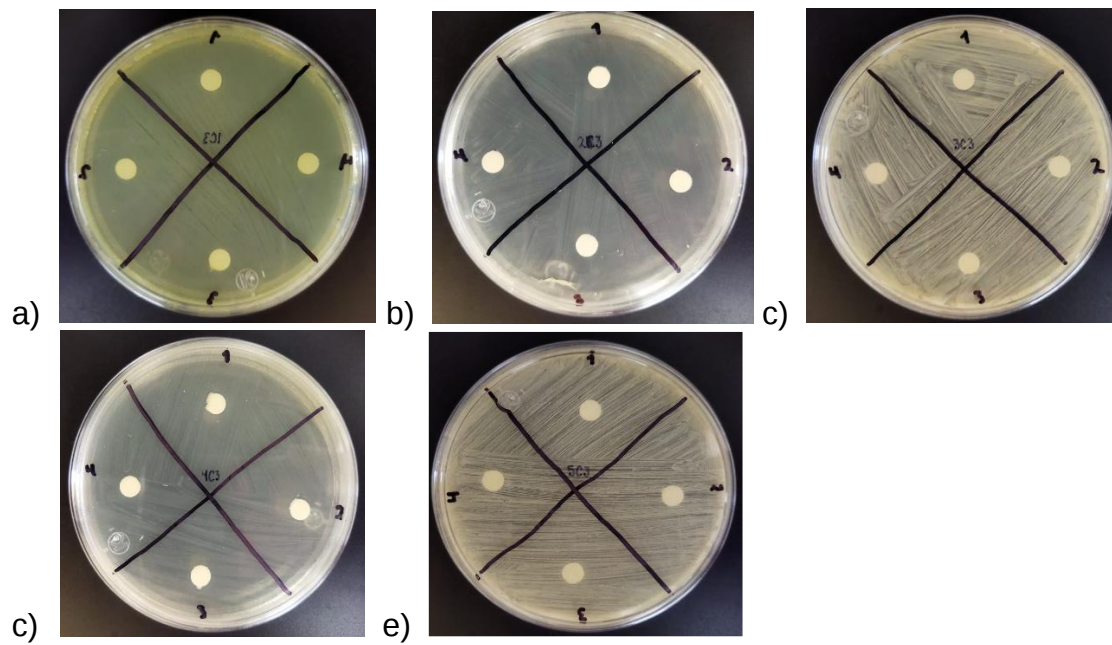
Figura 11. Espectros de RMN de ^1H a 400 MHz. a) extracto de hexanos, b) extracto de diclorometano, c) extracto de metanol de *P. triflora*.

6.1. Evaluación preliminar de la actividad antibacteriana de las partes aéreas.

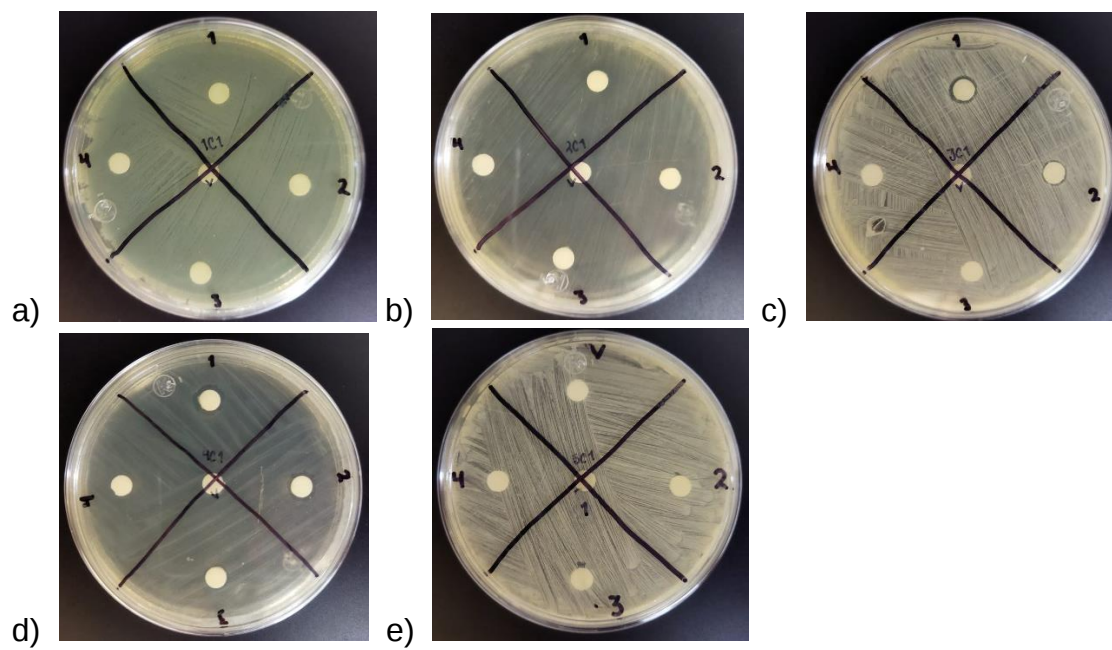
Una vez hecho el análisis de los espectros por RMN de ^1H se decidió medir la potencial actividad antibacteriana de los extractos obtenidos. Para lo cual se ensayaron en cinco cepas diferentes (*Pseudomonas* PA01, *Escherichia coli* OP50, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp. y *Staphylococcus* sp.) por el método de difusión en placa y se evaluó su capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano.

Se utilizaron concentraciones de los extractos disueltas en 50 % DMSO y 50 % PBS como vehículo. Las concentraciones ensayadas fueron (5, 1, 0.5 y 0.05 mg/mL). Como control negativo se utilizó el vehículo de DMSO y como control positivo el antibiótico cloranfenicol (250 mg/mL).

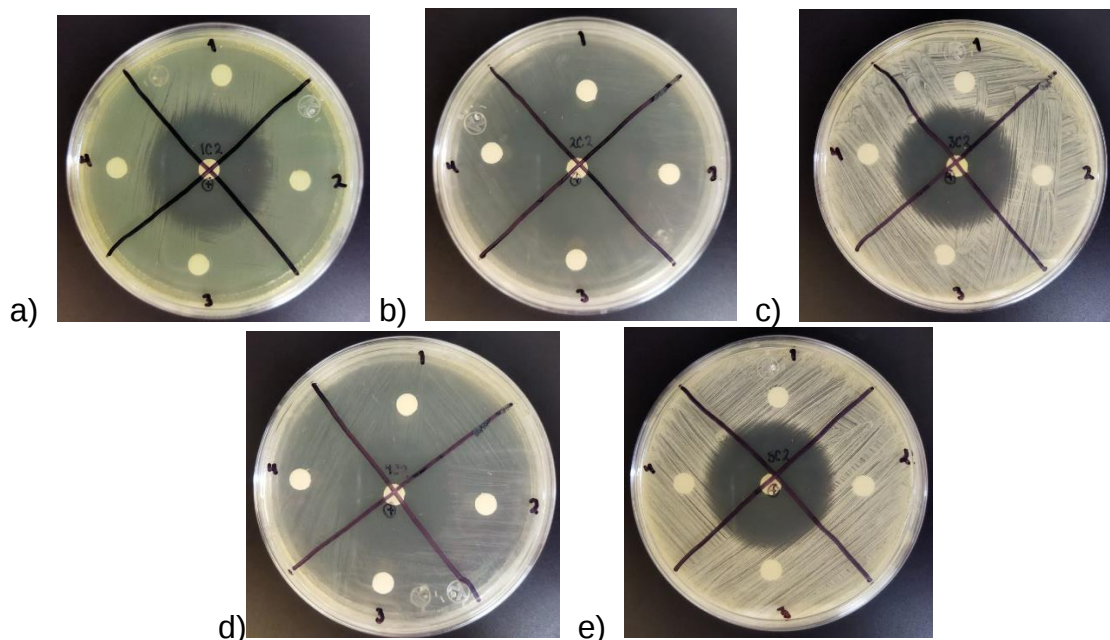
Los resultados se observan en la (**Figura 12**) donde para el extracto metanólico de la planta no se observó ningún efecto antibacteriano en ninguna de las cepas utilizadas (**Figura 12-3**). En el caso del extracto de CH_2Cl_2 se observó la presencia de pequeños halos de inhibición para *S. aureus* en concentraciones de 5 y 1 mg/mL (**Figura 12-2c**) y para *Enterococcus* sp en las mismas concentraciones (**Figura 12-2d**). Por último, el extracto hexánico mostró actividad bacteriostática para la cepa *S. aureus* a una concentración de 5 mg/mL a las 24 h (**Figura 12-1c**).



1. Efecto del extracto hexánico



2. Efecto del extracto CH_2Cl_2



3. Efecto del extracto metanólico

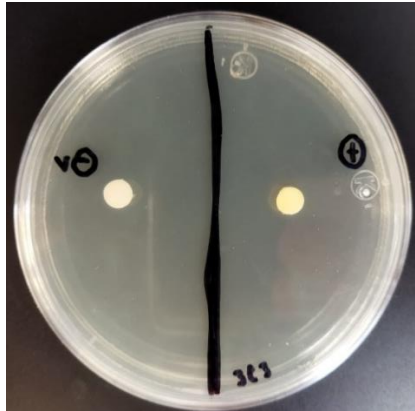
Figura 12. Ensayos de difusión en placa con los extractos de *P. triflora* en un grupo de bacterias a) *Pseudomonas* PA01, b) *E. coli*, c) *S. aureus*, d) *Enterococcus* sp, e) *Staphylococcus* sp. a diferentes concentraciones 1) 5 mg/mL, 2) 1 mg/mL, 3) 0.5 mg/mL, 4) 0.05 mg/mL.

Para demostrar el efecto bacteriostático del extracto hexánico se llevó a cabo el estudio empleando concentraciones de 5, 10, 25 y 50 mg/mL y determinación del efecto a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 horas) (**Figura 13**). Observándose a las 6 h un halo de inhibición en todas las concentraciones ensayadas (**Figura 13 b**); sin embargo, a partir de las 8 h se observó un ligero crecimiento bacteriano en la parte más externa del halo de inhibición (**Figura 13 c**) y a las 12 y 24 horas se visualiza que las bacterias han crecido completamente en las concentraciones de 5 y 10 mg/mL, mientras que en las concentraciones más altas se observó un ligero halo de inhibición (**Figuras 13 d, 13 e**)

Control +: cloranfenicol
Control -: vehículo DMSO

Concentraciones
5, 10, 25, 50 mg/mL

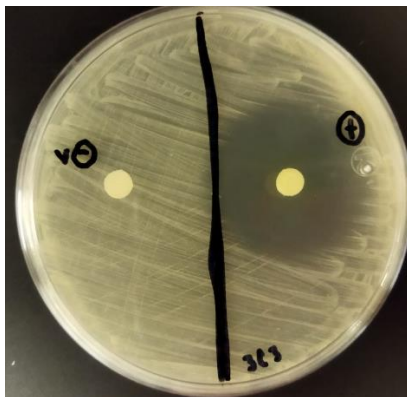
a) Tiempo 0



b) Tiempo 6 h



c) Tiempo 8 h



d) Tiempo 12 h

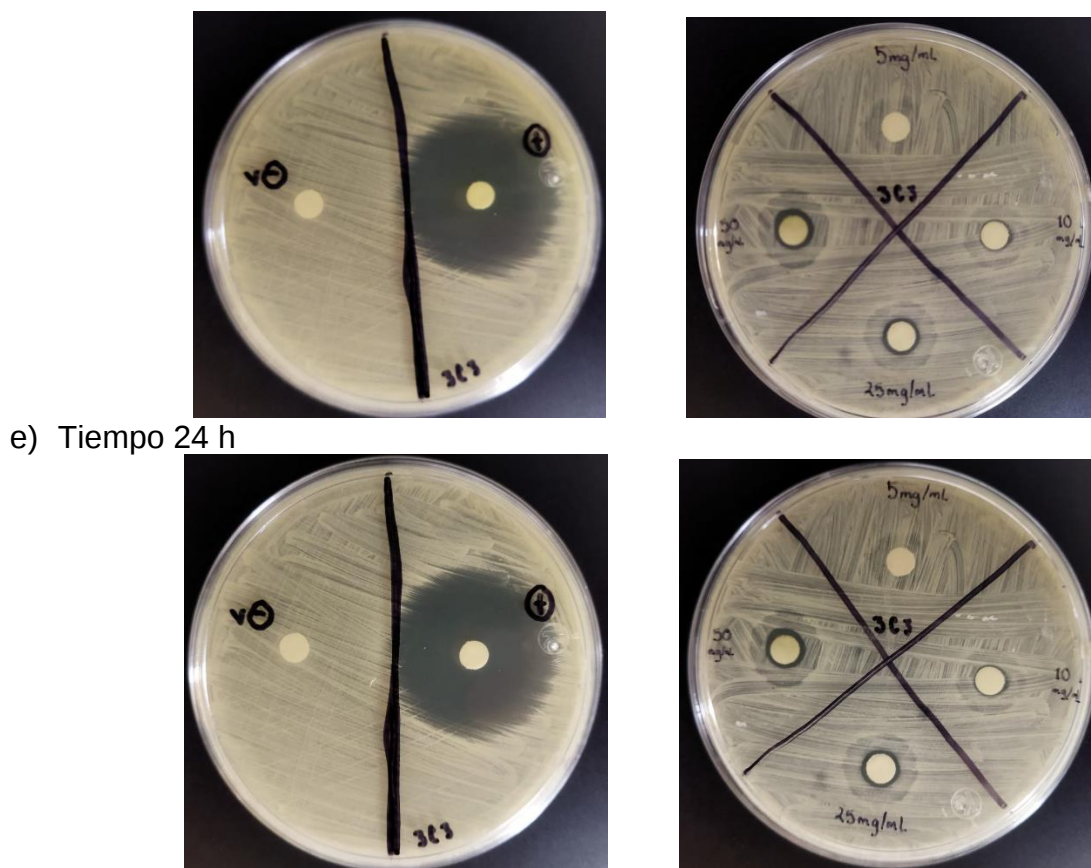


Figura 13. Efecto de la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto hexánico frente a *S. aureus* a tiempos cortos de tratamiento.

El análisis preliminar de actividad antibacteriana de los extractos permitió seleccionar al extracto hexánico para continuar con la purificación y obtención de los metabolitos. De este extracto se obtuvieron 20 g (4.12%) de miel color verde oscuro.

6.2. Estudio fitoquímico

El extracto hexánico se fraccionó mediante cromatografía en columna de la cual se obtuvieron mezclas que presentaban mayoritariamente aldehídos, de acuerdo con la RMN de ^1H . Por ejemplo, la fracción 91-100 donde su espectro de RMN de ^1H se observó en aproximadamente 10.2 ppm una señal correspondiente a un H de aldehído, entre 6 y 5 ppm señales correspondientes a H de doble enlace,

en 4.6 ppm una señal correspondiente a un metoxilo y señales de metilo y protones alifáticos entre 2.4 y 0.8 ppm (**Figura 14**).

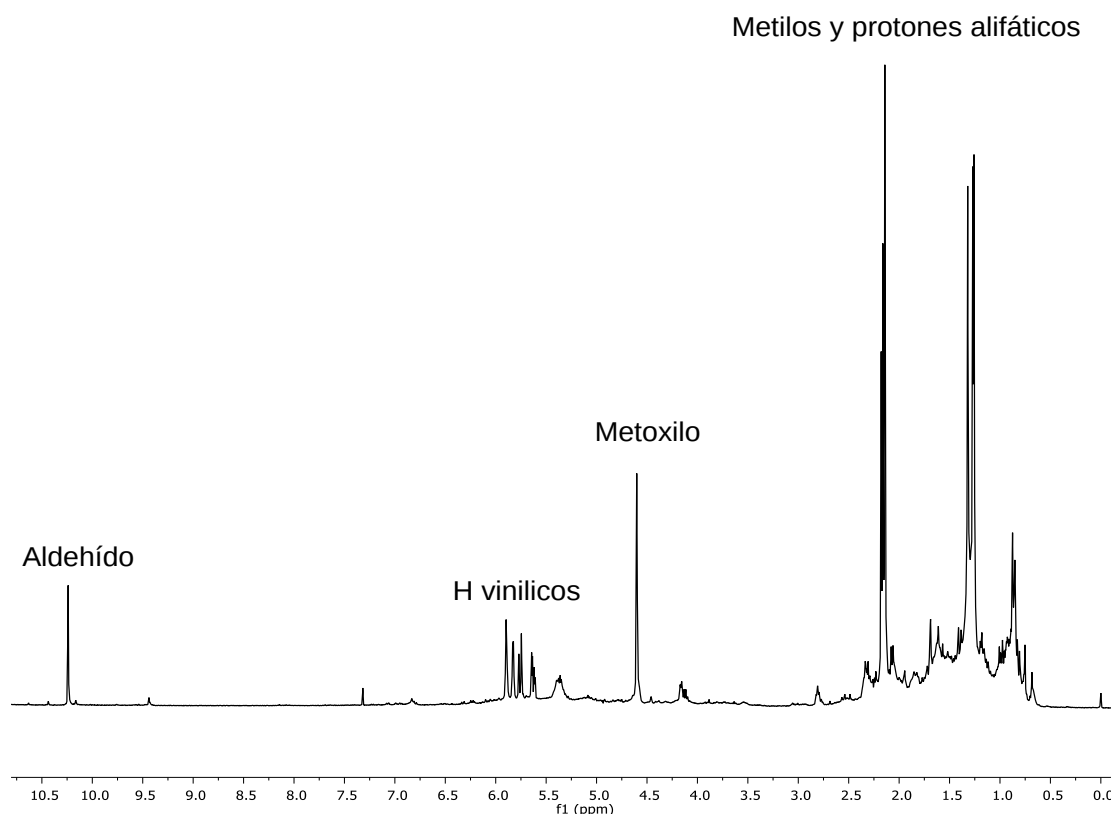


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de la fracción 91-100.

Intentos por purificar los aldehídos presentes en las mezclas condujeron a la descomposición de estos. Debido a esto se decidió obtener una base de Schiff para aislar un derivado del producto natural, por lo que la mezcla obtenida en las fracciones 91-100, se hizo reaccionar con *p*-metoxianilina en metanol. El crudo de la reacción se separó mediante cromatografía en columna de la cual en la polaridad 9:1 mezcla de Hexanos/AcOEt se obtuvieron 11 mg en las fracciones 3 y 4 donde se observaban dos compuestos mayoritarios. Mientras que en el resto de las fracciones se observó descomposición.

Las fracciones 3 y 4 obtenidas de la columna anterior se purificaron mediante recromatografía en columna empleando gel de sílice impregnada con AgNO_3 y una mezcla de Hexanos/AcOEt polaridad 4:1 como eluyente.

En las fracciones 49-58 de la recromatografía se obtuvo una miel amarilla que se analizó por RMN de ^1H (**Figura 15**) en cual se aprecian las siguientes señales: en 8.75 ppm una señal simple del H-10 base de la imina. En 7.20 y 6.94 ppm se observaron dos señales dobles que integraron para dos H cada una, con una constante de acoplamiento de 8.7 Hz, lo que indicó la presencia de un anillo de benceno *p*-disustituido correspondiente a una de las iminas. En 6.89 y 6.76 ppm se encontraron las dos señales dobles con $J = 8.6$ Hz correspondientes a la otra imina. En 6.29 y 6.19 ppm se visualizaron dos señales dobles con una constante de acoplamiento de 10.2 Hz de los H vinílicos H-3 y H-4, respectivamente. Se observaron dos señales simples intensas en 3.84 y 3.82 ppm que integraron para tres H cada una indicando la presencia de dos metoxilos y que corresponden a los metoxilos de las iminas. En 2.37 ppm se apreció otra señal simple que integró para tres H, característica de un metilo vinílico. Y por último en 1.54 ppm hay un desplazamiento de una señal simple que integró para seis H indicando la presencia de dos metilos traslapados.

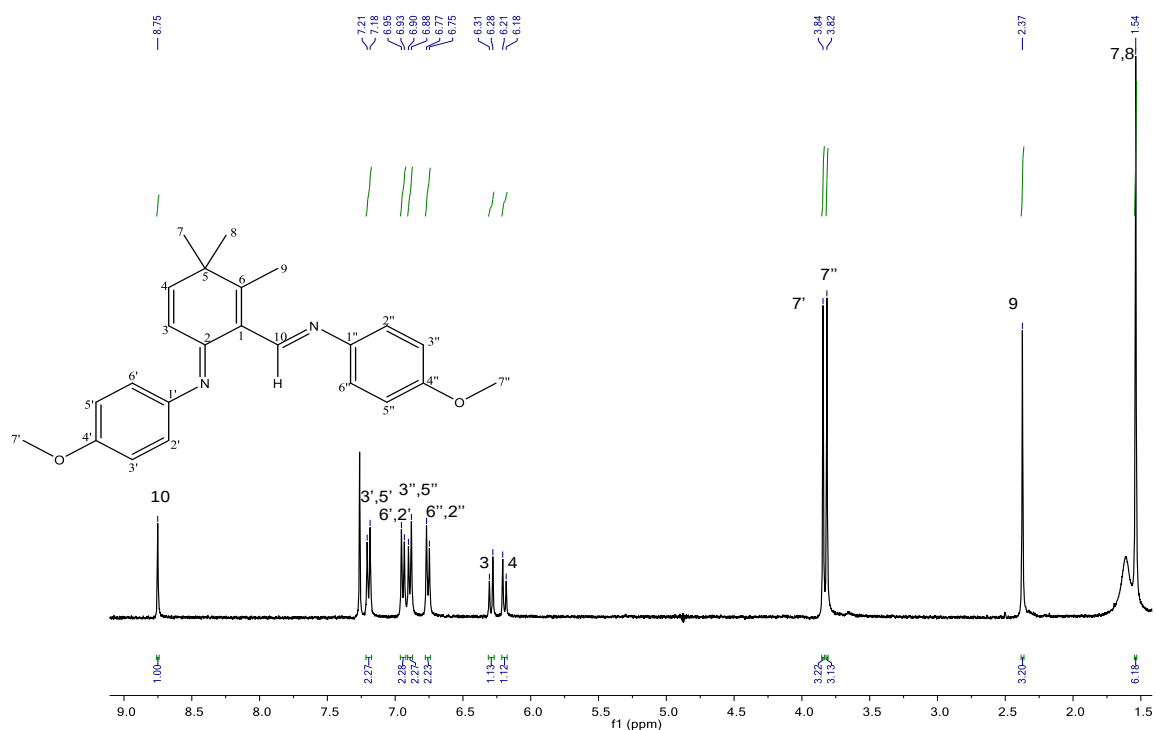


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de N-(4-metoxifenil)-2-(4-metoxifenilimino)metil-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (**22**).

El espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 16**) mostró 19 señales, de las cuales en 159.2 y 158.1 ppm se observaron dos señales que fueron asignadas a los carbonos sp^2 de las iminas, C-2 y C-10 respectivamente. Entre 158.7 y 139.8 ppm se encontraron seis señales que correspondieron con carbonos sp^2 cuaternarios. En 151.8 y 116.4 ppm se ubicaron las señales correspondientes a los carbonos de un doble enlace disustituido. Entre 122.3 y 114.4 se observaron cuatro señales de carbono correspondientes a los anillos p -disustituidos de dos grupos p -metoxianilina. En 55.8 y 55.7 ppm se encontraron las señales de dos grupos metoxilo lo que corroboró la formación de dos iminas. En 38.9 ppm se encontró la señal correspondiente al carbono cuaternario C-5. En 27.4 se observó una señal correspondiente a los metilos C-7 y C-8. Por último, en 13.0 ppm se percibió la señal para el metilo vinílico C-9.

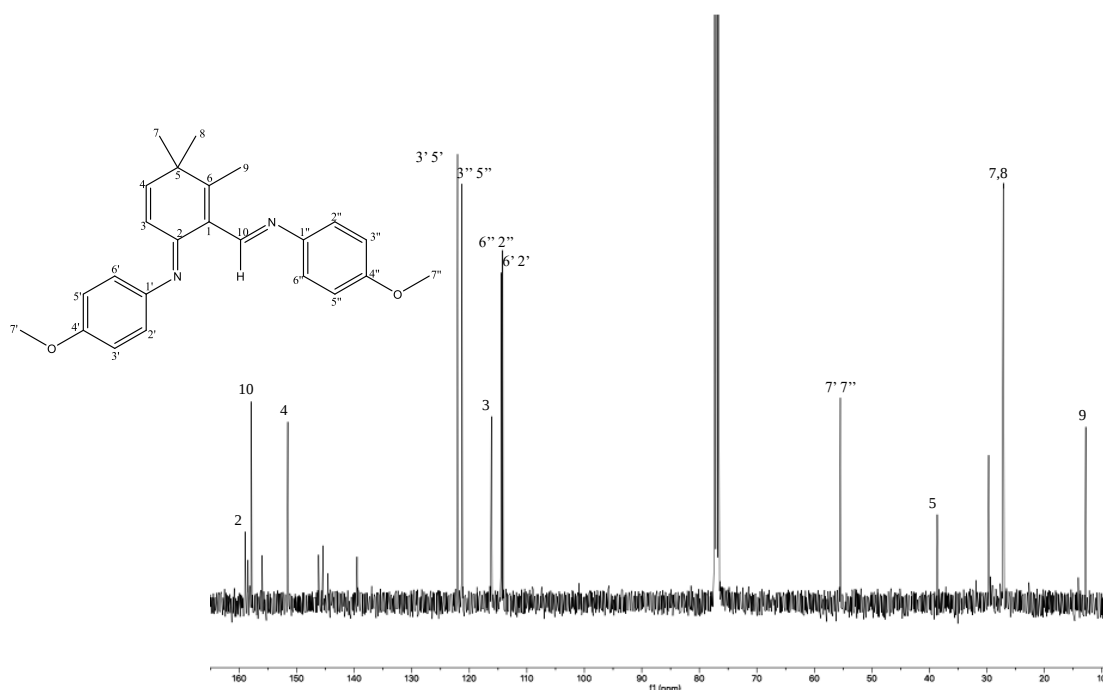


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de N-(4-metoxifenil)-2-(-(4-metoxifenilimino)metil)-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (**22**).

Con el experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) (**Figura 17**) se pudieron asignar las señales en el espectro de ^{13}C . Por ejemplo, la señal de H base de la imina correlacionó con una señal de C en 158.1 ppm lo que permitió asignar

al C-10. Las señales de H vinílicos en 6.29 y 6.19 ppm correlacionaron las señales de carbono ubicadas en 151.6 y 116.2 ppm lo que llevó a la asignación de los carbonos C-4 y C-3, respectivamente. Por último, la señal correspondiente al metilo vinílico mostró una correlación con la señal de carbono ubicada en 13.0 ppm.

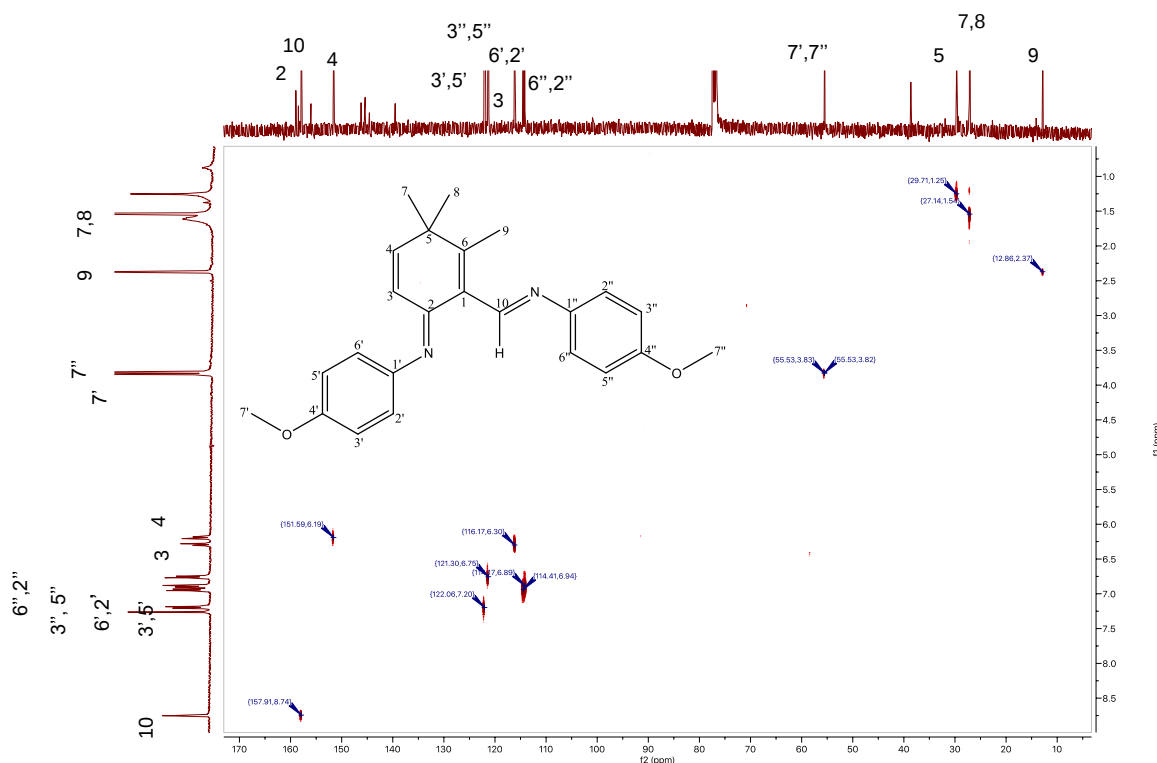


Figura 17. Experimento HETCOR de (N-(4-metoxifenil)-2-(-(4-metoxifenilimino)metil)-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (**22**).

El análisis de los datos de RMN en una y dos dimensiones permitió proponer que este compuesto presenta dos dobles enlaces no conjugados entre sí, en posiciones 1-6 y 3-4 donde uno de esos dobles enlaces se encuentra disustituido, mientras que el otro es un doble enlace tetrasustituido. También se pudo observar que el compuesto presenta tres metilos, uno vinílico y los otros dos geminales. Así como dos grupos imino, uno de los cuales corresponde a la reacción de un aldehído y una amina, esto debido a la señal que se encuentra en 8.75 ppm. Por lo anterior se propuso que la estructura corresponde al monoterpeno difuncionalizado **22**. La

propuesta de la estructura se respaldó con la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa, donde en el cromatograma se observó un pico con un tiempo de retención de 31.6 minutos, el cual mostró un ion molecular $[M^+]$ (m/z) de 374.18 uma, correspondiente para la fórmula molecular $C_{24}H_{26}N_2O_2$, que corresponde para la estructura propuesta (**Figura 18**). Al realizar una búsqueda en literatura no se encontraron reportes para este compuesto, por lo que se trata de un derivado nuevo.

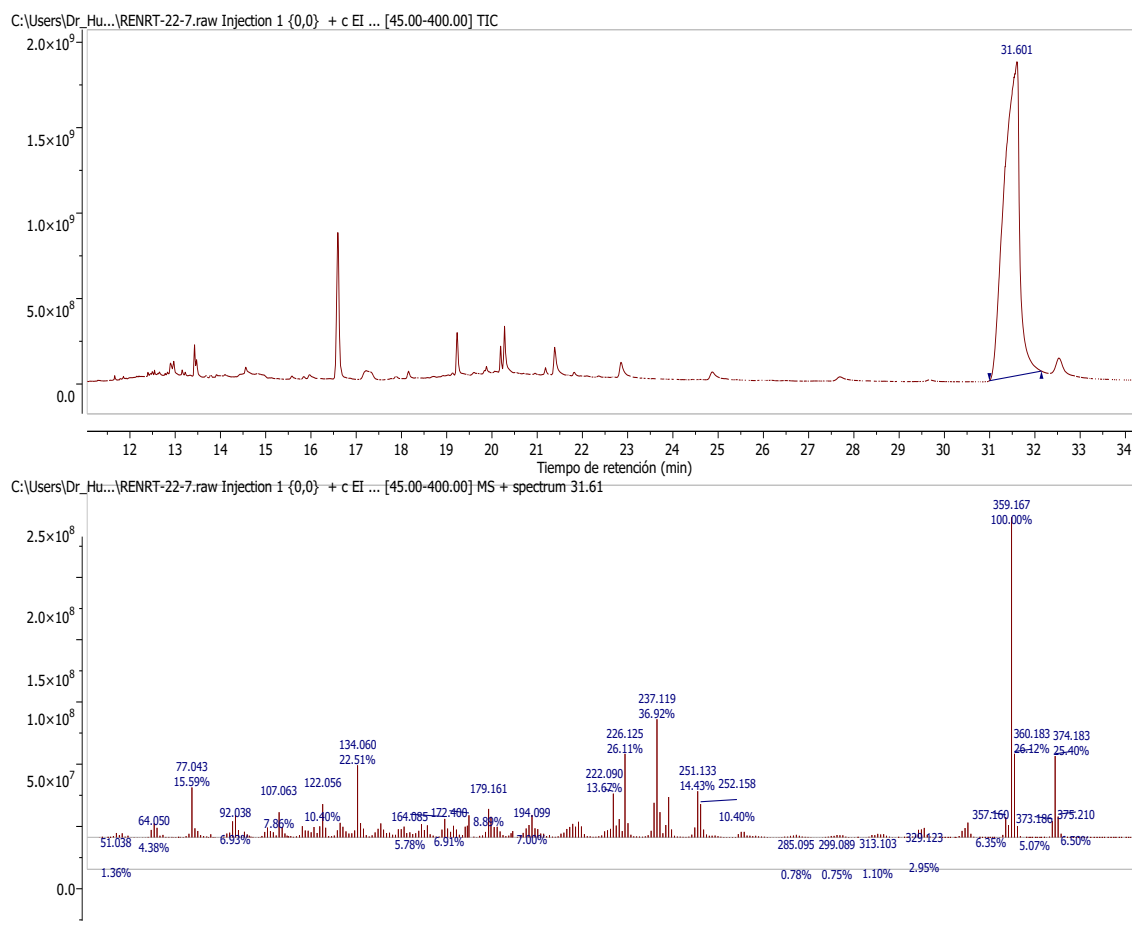


Figura 18. Cromatograma y Espectro de masa de (N-(4-metoxifenil)-2-((4-metoxifenilimino)methyl)-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (**22**).

Continuando con el estudio de las fracciones obtenidas, el análisis de RMN de 1H de las fracciones 3 y 4 de la recromatografía mostró patrones similares a los del compuesto descrito anteriormente (**Figura 19**). En 10.49 ppm se aprecia una

señal simple del H-10 correspondiente a un aldehído. En 6.90 y 6.76 ppm se observaron dos señales dobles que integraron para dos H cada una, con una constante de acoplamiento de 8.8 Hz, lo que indicó la presencia de un anillo de benceno *p*-disustituído correspondiente a la imina. En 6.32 y 6.15 ppm se visualizaron dos señales dobles con una constante de acoplamiento de 10.2 Hz de los H vinílicos H-3 y H-4, respectivamente. Se observó una señal simple intensa en 3.82 ppm que integra para tres H indicando la presencia de un metoxilo que corresponde al metoxilo de la imina. En 2.50 ppm se apreció otra señal simple que integró para tres H, característica de un metilo vinílico. Y por último en 1.38 ppm hay un desplazamiento de una señal simple que integró para seis H indicando la presencia de dos metilos traslapados. De acuerdo con estos datos se puede concluir que se trata de un derivado proveniente del mismo producto natural que el compuesto **22** pero en este caso solo reaccionó uno de los dos carbonilos, el correspondiente a la cetona. Por lo anterior se propone la estructura del compuesto **23** que presenta el mismo esqueleto que **22** y en el cual el aldehído se encuentra libre. Al realizar un estudio en la literatura no se han encontrado datos sobre este compuesto por lo que se trataría de una estructura nueva.

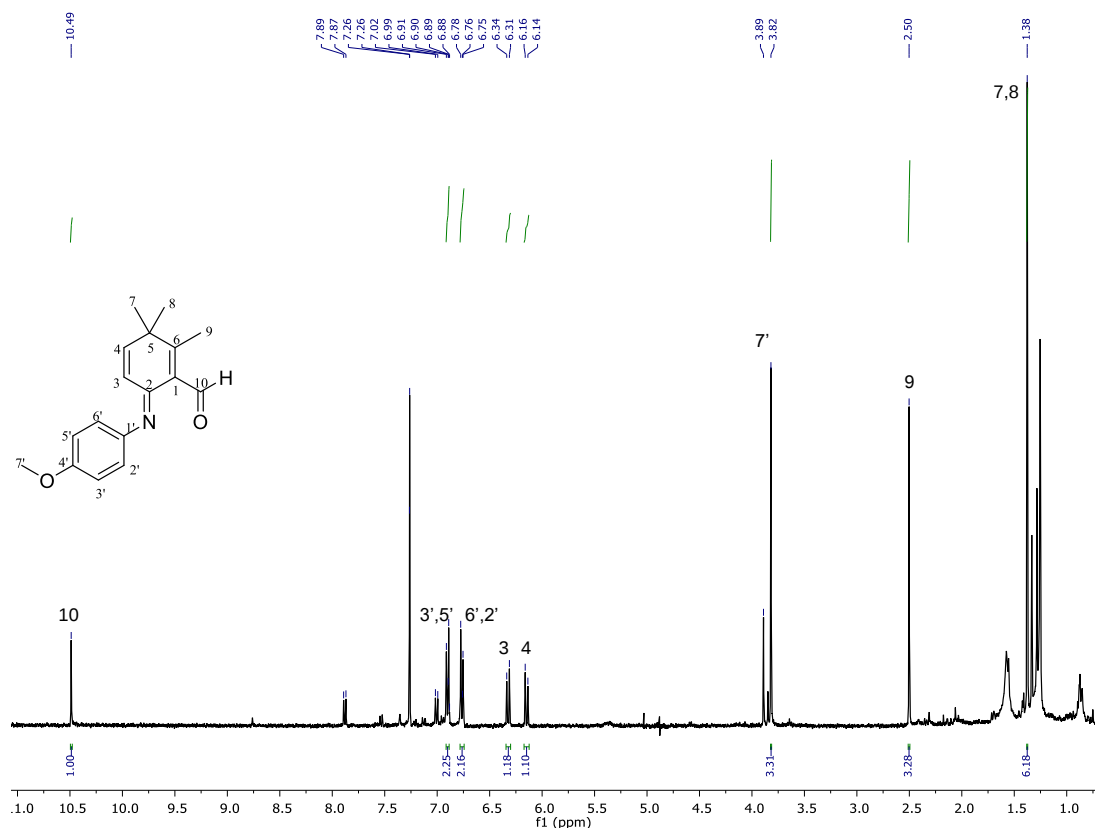
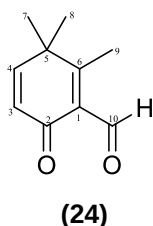


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de 6-((4-metoxifenil)imino)-2,3,3-trimetilciclohexa,4-dien-1-carbaldehído (**23**).

El análisis de los datos obtenidos para los dos compuestos **22** y **23**, permitió proponer que el producto natural precursor de dichos derivados corresponde al 2,3,3-trimetil-6-oxociclohexa-1,4-dien-1-carbaldehído (**24**), que comprende un esqueleto de isoferulol oxidado a la cetona correspondiente, el cual ha sido reportado mediante síntesis total (Anhalt *et al.*, 2003) y no se han encontrado reportes para su aislamiento de fuentes naturales. Sin embargo, debido a la baja cantidad que se aísla de los derivados no fue posible obtener el producto natural sin modificaciones.



7. CONCLUSIONES

El extracto de CH₂Cl₂ de las partes aéreas de *Piqueria triflora* presentó una ligera actividad inhibitoria frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus sp* en concentraciones de 5 y 1 mg/mL. Mientras que el extracto hexánico mostró actividad bacteriostática sobre la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 5, 10, 25 y 50 mg/mL.

El estudio químico a partir del extracto hexánico de *P. triflora* permitió preparar e identificar los compuestos N-(4-metoxifenil)-2-(-(4-metoxifenilimino)metil)-3,4,4-trimetilciclohexa-2,5-dien-1-imina (**22**) y 6-((4-metoxifenil)imino)-2,3,3-trimetilciclohexa,4-dien-1-carbaldehído (**23**) a través de la reacción de aminas primarias con derivados carbonílicos para la obtención de las iminas correspondientes (base de Schiff).

El producto natural precursor de **22** y **23** corresponde al monoterpeno 2,3,3-trimetil-6-oxociclohexa-1,4-dien-1-carbaldehído (**24**), el cual no ha sido reportado de una fuente natural.

Este es el primer estudio químico de las partes aéreas de *Piqueria triflora*.

8. REFERENCIAS

- Anhalt, K., Sprung, I. & Schulze, K. (2003). Synthesis of Chiral Cyclohexenones from α -Campholenic, Fencholenic, and β -Campholenic Derivatives. *Monatshefte für Chemie*, 134 (12), 1593-1606. Doi: 10.1007/s00706-003-0040-2.
- Béjar, E., Reyes-Chilpa, R. & Jiménez-Estrada, M. (2000). Bioactive compounds from selected plants used in the XVI century mexican Traditional Medicine. *Studies in Natural Products Chemistry*, 24(Part E), 799-844. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(00\)80055-1](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(00)80055-1).
- Belloso, W. H. (2009). Historia de los antibióticos. *Rev. Hosp. Ital. B. Aires*, 29(2), 102-111.
- Bisso-Andrade, A. (2018). Fundamentos básicos de la terapia antimicrobiana. *Rev Soc Peru Med Interna*, 31(1), 10-23.
- Bohlmann, F. & Suwita, A. (1978). New terpene derivates from *Piqueria trinervia*. *Phytochemistry*, 17(3), 560-561. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89369-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89369-3)
- Bohlmann, F. & Zdero, C. (1968). Isolierung von (-)- α -santalal aus *piqueria trinervia*. *Tetrahedron Letters*, 9(12), 1533-1535. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)98994-4](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)98994-4)
- Calvo, J. & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.11.001.
- Castro, C., Jiménez, M., & González-De la Parra, M. (1992). Inhibitory Effect of Piquerol A on the Growth of Epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med.*, 58(3), 281-282. <https://doi.org/10.1055/s-2006-961457>
- Cruz-Reyes, A., Chavarin, C., Campos, M. P., Taboada, J. & Jiménez, M. (1989). Actividad molusquicida del piquerol A aislado de *Piqueria trinervia* (Compositae) sobre ocho especies de caracoles pulmonados. *Memórias do*

Instituto Oswaldo Cruz, 84(1), 35-40. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761989000100007>

Dahanukar, S. A., Kulkarni, R. A. & Rege, N. N. (2000). Pharmacology of medicinal plants and natural products. *Indian Journal of Pharmacology*, 32(1), S81-S118.

De la Fuente-Salcido, N. M., Villareal-Prieto, J. M., Díaz, M. A. & García, A. P. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46(2), 7-16.

Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM). (2015). “*Piqueria Trinervia*” Cav. Herbario Nacional de México (MEXU), en Portal de Datos abiertos UNAM, Colecciones Universitarias. https://repositorio.unam.mx/contenidos/34piqueria-trinervia34-cav-2470004?c=4E2eax&d=false&q=*&i=1&v=1&t=search_1&as=0

Díaz, L., Suárez, Y., Rubio, A. & Travieso, M. (2021). Actualidad y perspectivas de los antimicrobianos naturales. *Revista Cubana de Farmacia*, 54(3), 1-22.

Fariña, N. (2016). Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. *Memorias del instituto de investigaciones en Ciencias de la Salud*, 14(1), 4-5.

Fernández, F., López, J., Ponce, L. M. & Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana Médica Militar* 32(1), 44-48.

Goldhaber, G. D. (2004). *Actividad Antibacteriana de Piqueria trinervia Cav. Sobre Algunas Bacterias Enteropatógenas* [tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional de la UNAM. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/390307>

González-de la Parra, M., Chávez-Peña, D., Jiménez-Estrada, M. & Ramos-Mundo, C. (1991). Acaricidal potential of piquerols A and B against *Boophilus*

microplus. Pesticide Science, 33(1), 73-80.
<https://doi.org/10.1002/ps.2780330108>

Hemsley, W. B. (1881). Botany Vol II. En F. Ducane Godman y Osbert Salvin (Ed.). *Biología centrali-americana; or, contributions to the knowledge of the fauna and flora of Mexico and Central America* (p. 77). Publicado por R. H. Porter.
<https://bibdigital.rjb.csic.es/records/item/12206-biologia-centrali-americana-botany-vol-ii>

Jiménez-Estrada, M., Navarro, A., Flores, M. V., Reyes, R., Hernández, B., Anaya, A. L. & Lotina-Hennsen, B. (1996). Transformation of terpene piquerol A to hydroquinone and phenolic derivatives. Effect to these compounds on weeds. *J. Agric. Food Chem.* 44(9), 2839-2841. <https://doi.org/10.1021/jf9406626>

Jiménez-Estrada, M., Saad, I., Sánchez-Contreras, Á., & Reyes-Chilpa, R. (2006). Estudios sobre monoterpenos e iridoides. En A. Romo de Vivar Romo (Ed.). *Química de la Flora Mexicana. Investigaciones en el instituto de Química de la UNAM* (pp. 39-62). Sociedad Química de México.

Jiménez-Estrada, M. y González de la Parra, M. (1983). Nuevo alcohol diterpénico aislado de *Piqueria trinervia* Cav. *Revista Latinoamericana de Química*, 14(1), 20-23.

Mendoza, J. L., Jiménez, M., & Lotina-Hennsen, B. (1994). Piquerol A and diacetyl piquerol act as energy transfer inhibitors of photosynthesis. *Pestic. Sci.* 40(1), 37-40. <https://doi.org/10.1002/ps.2780400107>

Mesa, A. M. (2017). Una visión histórica en el desarrollo de fármacos a partir de productos naturales. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 48(3), 16-27.

Murillo, F. J. (2022). Resistencia bacteriana una crisis actual. *Galenus Med.*
<https://med-cmc.com/resistencia-bacteriana-una-crisis-actual/>

Paredes, F. & Roca J. J. (2004). Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm*, 23(3), 116-124.

- Patiño, D. (2003). ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos? *Umbral Científico*, 1(3), 48-56.
- Rodríguez-Noriega, E., León-Garnica, G., Petersen-Morfin, S., Pérez-Gómez, H. R. González-Díaz, E. & Morfin-Otero, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*, 34(1), 181-190. <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.2142>.
- Romo, J., Romo de Vivar, A., Quijano, L., Ríos, T. & Díaz, E. (1970). Los componentes terpenoides de la *Piqueria trinervia* Cav. *Revista Latinoamericana de Química*, 1, 69-72.
- Rufino-González, Y., Ponce-Macotela, M., Jiménez-Estrada, M., Jiménez-Fragoso, C. N., Palencia, G., Sansón-Romero, G., Anzo-Osorio, A. & Martínez-Gordillo, M. N. (2017). *Piqueria trinervia* as a source of metabolites against *Giardia intestinalis*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1789-1791. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1325912>
- Ruíz de Esparza, R., Bye, R., Meckes, M., Torres, J. & Jiménez-Estrada, M. (2007). Antibacterial activity of *Piqueria trinervia*, a Mexican medicinal plant used to treat diarrhea. *Pharmaceutical Biology*, 45(6), 446-452. DOI: 10.1080/13880200701389011.
- Saad, I., Díaz, E., Chávez, I., Reyes-Chilpa., R., Rubluo, A. & Jiménez-Estrada, M. (2000). antifonal monoterpene production in elicited cell suspensión cultures of *Piqueria trinervia*. *Phytochemistry*, 55(1), 51-57. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00211-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00211-9)
- Sáenz, D. (2003). Medicamentos, plantas medicinales y productos naturales. *Fármacos*, 16(1), 13-20.
- Serra, M. A. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 402-419. <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2013>.

- Sierra, E, M, & León, M. Q. (2019). Terapia antibacteriana: rigen y evolución en el tiempo. *Revista Médica Electrónica*, 41(5), 1300-1309.
- Soriano-García, M., Jiménez, M., González de la Parra, M., Hernández, A., Schatz, M., & Campana C. (1983). Crystal and molecular structure of piquerol A a potent growth-inhibiting factor. *Chemistry Letters*, 12(5), 617-620. <https://doi.org/10.1246/cl.1983.617>
- Soriano-García, M., Jiménez, M., González de la Parra, M., Melendez, M. & Campos, M. P. (1996). Trinervinol. *Acta Cryst*, 52(1), 1458-1460.
- Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R. & Barrientos, L. (2017). Implicaciones estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *Int. J. Morphol*, 35(4), 1214-1223.
- Villaseñor, J. L. (2018). Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. *Botanical Sciences*, 96(2), 332-358. <https://doi.org/10.17129/botsci.1872>