



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**“USO DE LA QUIMIOMETRÍA PARA LA
CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS CON ACTIVIDAD
ANTITUBERCULOSA DE PLANTAS NATIVAS DEL ESTADO
DE VERACRUZ”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
M.Q.B. AXHELL ALEID CORNEJO BÁEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. ALBERTO SÁNCHEZ MÉDINA

Xalapa, Ver.

Junio de 2021

Becario CONACYT No. 560976/297059

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Alberto Sánchez Medina en el laboratorio de farmacología y quimiometría del Instituto de Química Aplicada de la Universidad Veracruzana, así como en el laboratorio de Inmunoquímica II de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, con el apoyo financiero de los recursos institucionales del Instituto de Química Aplicada de la Universidad Veracruzana. Además del recurso del programa de becas para estudios de posgrado otorgado por el CONACYT No. de Becario 560976/297059

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por brindarme y financiar mi beca de doctorado con el número 560976/297059 durante el periodo de agosto de 2016 a julio de 2020 para la obtención del grado de Doctora en Ciencias Biomédicas.

A mi director de tesis el **Dr. Alberto Sánchez Medina** que me ha brindado su apoyo y sus conocimientos, por enseñarme y adentrarme al mundo de la investigación científica y por su amistad a lo largo de 7 años.

A la **Dra. Julieta Luna Herrera** de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional por el apoyo y las facilidades otorgadas para la realización de mis experimentos en su laboratorio.

Al **Dr. Edison Francisco Nicolalde Morejon** del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana por su apoyo en la colecta e identificación de las especies vegetales.

A la **Dra. Maribel Vázquez Hernández** directora del IQA por las facilidades otorgadas para desarrollar parte de mi trabajo de tesis en este instituto.

A la **Dra. Zaira Domínguez Esquivel** por el apoyo y las facilidades otorgadas para el uso del HPLC-UV.

Al **Mtro. Rodolfo Méndez Bellido** del laboratorio de Química Orgánica del Instituto de Ciencias Básicas por el apoyo y asesoramiento para el fraccionamiento de mis extractos.

A la **Mtra. Claudia Verónica Quiroz** por el apoyo brindado durante la elaboración de los extractos.

A la **QC. Guadalupe Adriana Vásquez Reyes** por el apoyo y las facilidades para la obtención de los espectros de ^1H -RMN.

A los miembros de mi comité de tesis, en especial al **Dr. Roberto Zenteno Cuevas** y a la **Dra. Rebeca García Román** que revisaron mi trabajo y me realizaron aportaciones significativas a lo largo de estos años.

A mis **compañeros del Doctorado en Ciencias Biomédicas y del equipo de trabajo de quimiometría** por su amistad a lo largo de estos años.

DEDICATORIAS

Le dedico este trabajo que he desarrollado a lo largo de 4 años primero que nada **a Dios**, por darme salud y la paciencia necesaria para poder lograr y concluir este trabajo.

A mis hijos César Caleb y Alejandro Biel, que son la bendición más grande que Dios me ha dado. Por hacerme descubrir mis fortalezas y cosas en mí que no sabía que existían ni podía hacer. Por enseñarme que el amor no se divide, ¡se multiplica! Los amo mis niños hermosos.

A mi esposo César por todo el amor y el apoyo brindado en todo momento y en cada etapa de mi carrera y de mi vida, te amo.

A mis padres, Alejandro y Concepción por su amor y apoyo incondicional en todo momento, por los consejos y ánimos que me dan para seguir adelante, por cuidarme a mi bebé cuando tenía mucho trabajo que hacer, sin ustedes no lo hubiera logrado, muchas gracias.

A mi hermana Tanit por estar al pendiente y apoyarme siempre que la necesito y a mis **sobrinas** por alegrarme los días y querer tanto a mis bebés.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Aspectos generales de la tuberculosis.....	3
2.3. Incidencia de la tuberculosis	5
2.4. Fármacos empleados para el tratamiento de la tuberculosis	6
2.5. Mecanismos de resistencia de <i>M. tuberculosis</i>	14
2.6. Nuevos compuestos con actividad antituberculosa.....	15
2.7. Medicina tradicional mexicana	17
2.8. Plantas seleccionadas para su estudio.....	18
2.8.1. <i>Bidens alba</i> L. (DC).....	19
2.8.2. <i>Xylosma flexuosum</i> (H. B. & K.) Hemsl	22
2.9. Análisis químico de plantas medicinales.....	24
2.10. Quimiometría	26
2.10.1. Pre-tratamiento de los datos: Teoría	27
2.10.2. Análisis de Componentes Principales (PCA)	29
2.10.3. Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) y Proyecciones Ortogonales a las Estructuras Latentes (O-PLS).....	30

Capítulo 1. Introducción

2.11. Quimiometría aplicada al estudio de PNs	32
3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	38
4. HIPÓTESIS	39
5. OBJETIVOS.....	40
5.1. Objetivo general.....	40
5.2. Objetivos particulares	40
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
6.1. Colecta del material vegetal y obtención de los extractos	41
6.2. Acondicionamiento del material vegetal.....	41
6.3. Obtención de los extractos y fracciones.....	41
6.3.2. Partición del extracto metanólico con disolventes de polaridad ascendente de <i>B. alba</i> y <i>X. flexuosum</i>	42
6.4. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).....	43
6.4.1. Equipo de HPLC-UV	43
6.4.2. Preparación de las soluciones de trabajo	44
6.4.3. Condiciones cromatográficas	44
6.5. Determinación de la actividad contra <i>M. tuberculosis</i> H37Rv de los extractos y fracciones de <i>B. alba</i> y <i>X. flexuosum</i>	45
6.5.1. Preparación de medios de cultivo.....	45
6.5.3. Preparación de Stocks de los extractos y fracciones.....	46
6.5.4. Preparación de soluciones de trabajo	46
6.5.5. Preparación del inóculo	46
6.5.6. Determinación la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) mediante el ensayo en microplaca de azul alamar (MABA)	47
6.6. Pre-tratamiento de los datos de HPLC-UV.....	48
6.7. Análisis Quimiométrico de los datos obtenidos por HPLC-UV.....	49

Capítulo 1. Introducción

6.8. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de Protón (¹ H-RMN) de los extractos y fracciones de <i>B. alba</i>	49
6.9. Pre-tratamiento de los datos obtenidos de ¹ H-RMN de <i>B. alba</i>	50
6.10. Análisis Quimiométrico de ¹ H-RMN de la planta más activa	50
6.11. Fraccionamiento cromatográfico de la Fc Hex de la raíz de <i>B. alba</i>	50
6.11.1. Determinación de la MIC de las fracciones de <i>B. alba</i>	52
6.11.2. Caracterización por ¹ H-RMN de los metabolitos con actividad antituberculosa de la Fracción 8 de <i>B. alba</i>	52
7. RESULTADOS	53
7.1. Rendimientos del material vegetal	53
7.2. Obtención de los perfiles cromatográficos por HPLC de los extractos y fracciones de <i>B. alba</i> y <i>X. flexuosum</i>	55
7.3. Determinación de la actividad contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv de extractos y fracciones de <i>B. alba</i> y <i>X. flexuosum</i>	59
7.4. Análisis quimiométrico de los perfiles cromatográficos de <i>B. alba</i> L.....	60
7.4.1. Análisis de componentes principales (PCA)	61
7.4.2. Construcción del modelo de proyecciones ortogonales a las estructuras latentes (O-PLS).....	68
7.4.3. Evaluación del modelo O-PLS.....	69
7.5. Análisis quimiométrico de los perfiles cromatográficos de <i>X. flexuosum</i>	72
7.5.1. Construcción del modelo de Proyecciones Ortogonales a las Estructuras Latentes (O-PLS).....	79
7.5.2. Evaluación del modelo O-PLS.....	79
7.6. Obtención de los perfiles químicos mediante ¹ H-RMN de los extractos y fracciones de <i>B. alba</i>	82
7.7. Análisis quimiométrico de ¹ H-RMN de los extractos y fracciones de <i>B. alba</i> L.	84

Capítulo 1. Introducción

7.7.1. Análisis de componentes principales (PCA)	84
7.7.2. Construcción del modelo de Proyecciones Ortogonales a las Estructuras Latentes (O-PLS).....	89
7.7.3. Evaluación del modelo de O-PLS.....	89
7.8. Determinación de la MIC de las fracciones de la Fc Hex de la raíz de <i>Bidens alba</i> por medio del ensayo de azul alamar	92
8. DISCUSIÓN.....	95
8.1. <i>Bidens alba</i>	95
8.2. <i>Xylosma flexuosum</i>	99
8.3. Quimiometría de ¹ H-RMN de la planta más activa	102
9. CONCLUSIONES.....	110
10. PERSPECTIVAS.....	111
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
12. ANEXOS.....	126

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis	11
Tabla 2. Fármacos subsidiarios para el tratamiento de la tuberculosis.....	13
Tabla 3. Gradiente de elución HPLC.	45
Tabla 4. Gradiente de elución de cromatografía en columna de la Fc. Hex de <i>B. alba</i>	51
Tabla 5. Fracciones de <i>B. alba</i> con su clave asignada.	51
Tabla 8. Porcentajes de recuperación de la extracción del material vegetal con hexano.....	53
Tabla 9. Porcentajes de recuperación de la extracción del material vegetal con solventes de polaridad ascendente.....	54
Tabla 10. Actividad inhibitoria de extractos y fracciones de <i>B. alba</i>	59
Tabla 11. Actividad inhibitoria de extractos y fracciones de <i>X. flexuosum</i>	60
Tabla 12. MIC obtenida de las fracciones de la Fc Hex de la Raíz de <i>B. alba</i>	92

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i>	3
Figura 2. Ciclo de vida patogénico de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
Figura 3. Fármacos de primera línea empleados para el tratamiento de la tuberculosis.	8
Figura 4. Fármacos de segunda línea empleados para el tratamiento de la tuberculosis.	10
Figura 5. Parte aérea de <i>B. alba</i> (L.) DC.....	19
Figura 6. Ejemplos de los principales metabolitos secundarios presentes en el género <i>Bidens</i>	21
Figura 7. Corteza de <i>X. flexuosum</i>	22
Figura 8. Ejemplos de metabolitos secundarios presentes en el género <i>Xylosma</i> . .	23
Figura 9. Compuestos con actividad antituberculosa, aislados de la planta <i>Zanthoxylum capense</i> Thunb.(Rutaceae)	25
Figura 10. <i>Score plot</i> de PCA, claramente se puede ver la agrupación de las muestras.....	30
Figura 11. Gráfico de O-PLS, obtenido de los perfiles cromatográficos de extractos de plantas; los picos hacia abajo representan los metabolitos bioactivos	31
Figura 12. Diseño experimental para guiar la caracterización de PNs bioactivos por medio de quimiometría.	37
Figura 13. Técnica de para la obtención de los extractos metanólicos y hexánicos crudos de <i>B. alba</i> y <i>X. flexuosum</i>	42
Figura 14. Técnica usada para la partición del Ext MeOH de <i>B. alba</i> y - <i>X. flexuosum</i> con disolventes de polaridad ascendente.	43
Figura 15. Perfiles cromatográficos de los extractos y fracciones de <i>B. alba</i> a 210 nm. con línea base corregida y picos alineados.....	57
Figura 16. Perfiles cromatográficos de los extractos y fracciones de <i>X. flexuosum</i> a 210 nm con línea base corregida y picos alineados.....	58
Figura 17. Componentes creados en el PCA de <i>B. alba</i> a 210 nm.....	61
Figura 18. <i>Score plot</i> de PC3 vs PC5 de los extractos y fracciones de <i>B. alba</i>	63
Figura 19. <i>Loading plot</i> de PC3 vs PC5 de los extractos y fracciones de <i>B. alba</i>	65

Capítulo 1. Introducción

Figura 20. X-Variable line plot de las variables correspondientes a la Fc Hex de la raíz de <i>B. alba</i>	66
Figura 21. Cromatograma de la Fc Hex de la raíz de <i>B. alba</i> ,	67
Figura 22. O-PLS-DA de las 14 muestras de extractos y fracciones de <i>B. alba</i>	70
Figura 23. <i>Contribution plot</i> de O-PLS de la Fc Hex de la raíz de <i>B. alba</i> ,	71
Figura 24. <i>Score plot</i> PC1 vs PC2 de extractos y fracciones de <i>X. flexuosum</i>	75
Figura 25. <i>Loading plot</i> de PC1 vs PC2 de extractos y fracciones de <i>X. flexuosum</i>	76
Figura 26. Cromatograma del Ext Hex de la Hojas de <i>X. flexuosum</i>	77
Figura 27. Cromatograma del Ext Hex de las hojas de <i>X. flexuosum</i>	78
Figura 28. O-PLS-DA de los extractos y fracciones de <i>X. flexuosum</i>	80
Figura 29. <i>Contribution plot</i> de O-PLS del ext Hex de hojas de <i>X. flexuosum</i>	81
Figura 30. Espectros de ¹ H-RMN normalizados y apilados de todos los extractos y fracciones de <i>B. alba</i> L.	83
Figura 31. <i>Score plot</i> de PC2 vs PC3 de los extractos y fracciones de <i>B. alba</i>	86
Figura 32. <i>Loading plot</i> de ¹ H-RMN de los extractos y fracciones de <i>B. alba</i>	87
Figura 33. Espectro de ¹ H-RMN de la Fc Hex de la raíz de <i>B. alba</i>	88
Figura 34. O-PLS de los extractos y fracciones por ¹ H-RMN de <i>B. alba</i>	90
Figura 35. <i>Contribution plot</i> de O-PLS de la Fc Hex de <i>B. alba</i> por ¹ H-RMN. $\delta=0.92$, 1.28, 4.20, 4.28, 7.60, 7.72 y 8.08 ppm.....	91
Figura 36. Espectro de ¹ H-RMN de la Fc8 de <i>B. alba</i>	94
Figura 37. Cromatograma de la Fc Hex de Raíz de <i>B. alba</i> señalando los picos obtenidos en el modelo de O-PLS.	98
Figura 38. Cromatograma señalando los picos obtenidos en el modelo de O-PLS	101
Figura 39. Regiones ampliadas de los espectros de ¹ H-RMN de la Fc Hex de <i>B. alba</i>	104
Figura 40. Espectro de la Fc 8 de la Fc Hex de la raíz de <i>B. alba</i>	109

Capítulo 1. Introducción

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
¹ H-RMN	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
µg	Microgramos
µL	Microlitros
AcOEt	Acetato de Etilo
airPLS	Adaptive Iteratively Reweighted Penalized Least Squares
ATCC	American Type Culture Collection
BCG	Vacuna <i>Bacillus Calmette-Guerin</i>
<i>B. alba</i>	<i>Bidens alba</i>
<i>B. pilosa</i>	<i>Bidens pilosa</i>
CD ₃ OD	Metanol Deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
COW	Correlation Optimized Warping
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPPH	Actividad del Depurador del Radical 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl
Ext	Extracto
Fc	Fracción
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
g	Gramos
GC	Cromatografía De Gases
H ₂ O	Agua
Hex	Hexano
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución)
IL	Interleucina
IR	Espectroscopía de infrarrojo
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mtb-MDR</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> multidrogorresistente

Capítulo 1. Introducción

MABA	Microplate Assay Blue Alamar (Ensayo Azul Alamar En Microplaca)
MATE	Multi-Antimicrobial Extrusion Protein (Familia de expulsión de compuestos tóxicos y multifármacos)
MFS	Major Facilitator Superfamily (Superfamilia de Máximo Facilitador)
MBC	Minimal Bactericity Concentration (Concentración Mínima Bactericida)
MBD	Middlebrook
MDR	Multidrogorresistente
MeOH	Metanol
MH	Mueller Hinton
MIC	Minimal Inhibitory Concentration (Concentración Mínima Inhibitoria)
mL	Mililitros
MS	Espectrometría De Masas
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MTT	3- (4,5- dimetiltiazol -2-il) -2,5-difenil bromuro de tetrazolio
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleótido
NCE	Nuevas Entidades Químicas
NIRS	Espectroscopía De Infrarrojo Cercano
nm	Nanómetros
OADC	Ácido Oleico, Albúmina, Dextrosa Y Catalasa
OMS	Organización Mundial De La Salud
O-PLS	Orthogonal Projections to Latent Structures (Proyecciones Ortogonales A Las Estructuras Latentes)
p/v	Peso/volumen
PA	Parte Aérea
PC	Principal Component (Componente Principal)
PCA	Principal Component Analysis (Análisis de Componentes Principales)
PLS	Projections Of Partial Least Squares (Proyecciones de Mínimos Cuadrados Parciales)
PMN	Polimorfonucleares

Capítulo 1. Introducción

PNs	Productos Naturales
ppm	Partes por millón
PTT	Tiempo parcial de tromboplastina
Q²	Coefficiente de relación
R²	Coefficiente de determinación
REMA	Resazurin Microtiter Assay (Ensayo de Resazurina En Microplaca)
RFU	Unidades Relativas De Fluorescencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RND	Resistance Nodulation Division (Resistencia a División por Nodulación)
rpm	Revoluciones por minuto
RR-TB	Tuberculosis Resistente A Rifampicina
SNC	Sistema Nervioso Central
SMR	Small Multidrug Resistance (Pequeña Resistencia a Múltiples Fármacos)
SSE	Errores De La Suma De Cuadrados
TB	Tuberculosis
TB-P	Tuberculosis Pulmonar
TB-DR	Tuberculosis Drogorresistente
TB-MDR	Tuberculosis Multidrogorresistente
TB-XDR	Tuberculosis Extremadamente Resistente
TLC	Thin Layer Chromatography (Cromatografía En Capa Fina)
TMS	Tetrametilsilano
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral Alfa
t_R	Tiempo de Retención
UHPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida De Ultra Alto Rendimiento)
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
WHO	Organización Mundial de La Salud
<i>X. flexuosum</i>	<i>Xylosma flexuosum</i>

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que suele afectar los pulmones y es causada principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis*. El tratamiento actualmente disponible requiere de un tiempo prolongado y causa efectos secundarios lo que conlleva al paciente al abandono del tratamiento, esto ocasiona la aparición de cepas multidrogorresistentes (Mtb-MDR). Debido a esto, son requeridos nuevos fármacos con actividad antituberculosa y que sean seguros para los pacientes y los productos naturales (PN) representan una excelente alternativa para la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos. En este sentido, las técnicas quimiométricas son una herramienta novedosa para la caracterización de PN bioactivos. Por lo anterior, en el presente trabajo se determinó la actividad antituberculosa de dos plantas nativas del estado de Veracruz: *Bidens alba* (L.) DC y *Xylosma flexuosum* (H. B. & K.) HEMSL contra la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv por medio del ensayo en microplaca de azul alamar (MABA). Se obtuvieron los perfiles químicos de ambas plantas por HPLC-UV y se realizó el análisis quimiométrico usando el análisis de componentes principales (PCA) y proyecciones ortogonales a las estructuras latentes (O-PLS) para detectar las variables responsables de la bioactividad. Los resultados mostraron que ambas plantas poseen metabolitos con actividad antituberculosa, siendo la fracción hexánica (Fc Hex) de la raíz de *B. alba* la más activa con una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 25 µg/mL y el extracto hexánico (Ext Hex) de las hojas de *X. flexuosum* con una MIC= 50 µg/mL. La Fc Hex de la raíz de *B. alba* fue la más activa, por lo cual, se obtuvo su perfil químico por ¹H-RMN y se realizó el análisis quimiométrico. Para corroborar esta bioactividad la Fc Hex de la raíz se fraccionó y se determinó la MIC de cada una. La Fc 8 fue la más activa con una MIC=12.5 µg/mL, se obtuvo el espectro de ¹H-RMN donde se identificaron los protones presentes en las moléculas responsables de la actividad antituberculosa, encontrándose la presencia de protones alifáticos (δ = 0.92 y 1.28 ppm); protones unidos a oxígenos, característicos de azúcares (rango de δ = 3.5–4.5 ppm). Con estos resultados concluimos que la quimiometría es una herramienta importante para la caracterización de metabolitos bioactivos.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that usually affects the lungs and is caused mainly by the bacterium *Mycobacterium tuberculosis*. The currently available treatment requires a long time, causes side effects which leads the patient to abandon the treatment, this causes the appearance of multidrug resistant strains (*Mtb*-MDR). Due to this, new drugs with anti-tuberculosis activity are required, which are safe for patients and natural products (NP) represent an excellent alternative for the search and development of new anti-tuberculosis drugs. In this sense, chemometric techniques are a novel tool for characterizing bioactive PN. Therefore, in the present work the antituberculosis activity of two native plants of the state of Veracruz was determined: *Bidens alba* (L.) DC and *Xylosma flexuosum* (HB & K.) HEMSL against the strain of *M. tuberculosis* H37Rv by means of the alamar blue microplate assay (MABA). Chemical profiles of both plants were obtained by HPLC-UV and chemometric analysis was performed using principal component analysis (PCA) and orthogonal projections to latent structures (O-PLS) to detect the variables responsible for bioactivity. The results showed that both plants possess metabolites with antituberculosis activity, being the hexane fraction (Fc Hex) of the root of *B. alba* the most active with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 25 µg / mL and the hexane extract (Ext Hex) of *X. flexuosum* leaves with MIC = 50 µg / mL. The Fc Hex of the root of *B. alba* was the most active, therefore, its chemical profile was obtained by ¹H-NMR and the chemometric analysis was carried out. To corroborate this bioactivity, the Fc Hex of the root was fractionated and the MIC of each one was determined. Fc 8 was the most active with a MIC = 12.5 µg / mL, the ¹H-NMR spectrum was obtained where the protons present in the molecules responsible for the antituberculosis activity were identified, finding the presence of aliphatic protons ($\delta = 0.92$ and 1.28 ppm); protons bound to oxygen, characteristic of sugars (range $\delta = 3.5$ – 4.5 ppm). With these results we conclude that chemometric is an important tool for the characterization of bioactive metabolites.

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, que afecta principalmente los pulmones, sin embargo, también se puede diseminar a otros órganos y tejidos (WHO, 2018a). Es transmitida de persona a persona a través de gotitas de saliva provenientes de la garganta y pulmones de las personas con la enfermedad respiratoria activa. El tratamiento empleado actualmente para tratar la TB sensible a los fármacos requiere de mínimo 6 meses causando numerosos efectos secundarios, además de que es ineficaz para las cepas farmacorresistentes (FR) (Zumla *et al.*, 2014; WHO, 2018a).

En el año 2019 se registró un total de 45,637 casos nuevos de TB pulmonar en la república mexicana. El estado de Veracruz registró 4,451 casos nuevos, con estas cifras el estado de Veracruz se posicionó en el primer lugar con el mayor número de casos de TB (Secretaría de Salud, 2019). A pesar de los buenos resultados del tratamiento actual contra la TB se requieren nuevos fármacos que provoquen menos efectos secundarios, con tiempos de duración menores y eficaces contra las cepas de *M. tuberculosis* multidrogorresistentes (*Mtb*-MDR). Esto nos lleva a pensar que, durante décadas nuestros antepasados han aprovechado los principios activos que poseen algunas plantas para su uso medicinal, debido a sus constituyentes químicos, generalmente metabolitos secundarios que las plantas producen para mediar las interacciones entre la planta y su ambiente (Elena Monroy-Vázquez *et al.*, 2009). Estos metabolitos son llamados Productos Naturales (PN) y algunos de ellos tienen propiedades biológicas, por lo que la industria farmacéutica ha explorado ampliamente este campo, sin embargo, aún hay muchas plantas sin documentar y sin reportes de su actividad biológica. El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antituberculosa de extractos y fracciones de *B. alba* (L.) DC y *Xylosma flexuosum* (H. B. & K.) HEMSL utilizando técnicas quimiométricas para determinar el (los) metabolito (s) responsable (s) de la actividad antituberculosa.

Capítulo 1. Introducción

La quimiometría es la combinación de matemáticas, estadística, y otros métodos basados en la lógica para gestionar de manera eficiente e interpretar datos analíticos. Las técnicas quimiométricas pueden identificar rápidamente las variables clave que son importantes para hacer distinciones entre las muestras (Bansal *et al.*, 2014). Entre las técnicas quimiométricas que se emplearon en este proyecto se encuentra el análisis de componentes principales (PCA) y las proyecciones ortogonales de las estructuras latentes (O-PLS). El PCA es una de las técnicas de análisis multivariante más utilizadas, su principal objetivo es reducir los datos a unas pocas dimensiones características para la visualización y análisis, esto se logra mediante el cálculo de un nuevo conjunto de variables o componentes principales (PCs), cada uno de los cuales es una combinación lineal de las variables originales (Arumugam *et al.*, 2012). Por otra parte, la aplicación del O-PLS proporciona un patrón de discriminación que puede ser correlacionado con la actividad biológica, ya que el modelo ilustra las clases de compuestos responsables de las agrupaciones observadas en el modelo de PCA, con la adición de una variable “Y” obtenida de los resultados *in vitro* contra *M. tuberculosis* H37Rv. (Galindo-Prieto, Eriksson and Trygg, 2015) Por tales motivos, estas dos técnicas se utilizaron para caracterizar los metabolitos con actividad antituberculosa de *B. alba* ó *X. flexuosum*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Aspectos generales de la tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis es el principal agente etiológico de la TB en los seres humanos, padecimiento infeccioso y transmisible descrito por Villemin en 1865, pero fue hasta 1882 que Robert Koch logró aislarlo en cultivos e inocularlo experimentalmente en animales, de donde pudo recuperarlo, lo que confirmó su papel patógeno (Romero Cabello, Raúl, Romero Feregrino, Raúl & Romero Feregrino, 2018). *Mycobacterium tuberculosis* son bacilos de 1 a 10 μm de longitud, se multiplican dentro de las células fagocíticas, principalmente macrófagos y monocitos. Más del 60% de su pared celular se compone de lípidos denominados ácidos micólicos (ácidos grasos de cadena muy larga, de C_{30} a C_{90}), que están covalentemente unidos al peptidoglicano, el arabinogalactano, el cual se une al peptidoglicano por un enlace fosfodiéster. La membrana celular de las micobacterias también contiene manósidos de fosfatidilinositol y lipoarabinomananos (LAM) (Brennan, 1995; Zuber *et al.*, 2008). Por fuera de la membrana esta la capa de peptidoglicano se compone de N-acetilglucosamina en un enlace β -1,4 con ácido N-glucolilmurámico. Algunos de los residuos de ácido N-glucolilmurámico están unidos por enlaces fosfodiéster a una capa superpuesta de macromoléculas de polisacáridos de cadena ramificada llamadas arabinogalactanos, los residuos de arabinosa alejados de esta capa se unen a los ácidos micólicos superpuestos (Figura 1), (Woods, 2008).

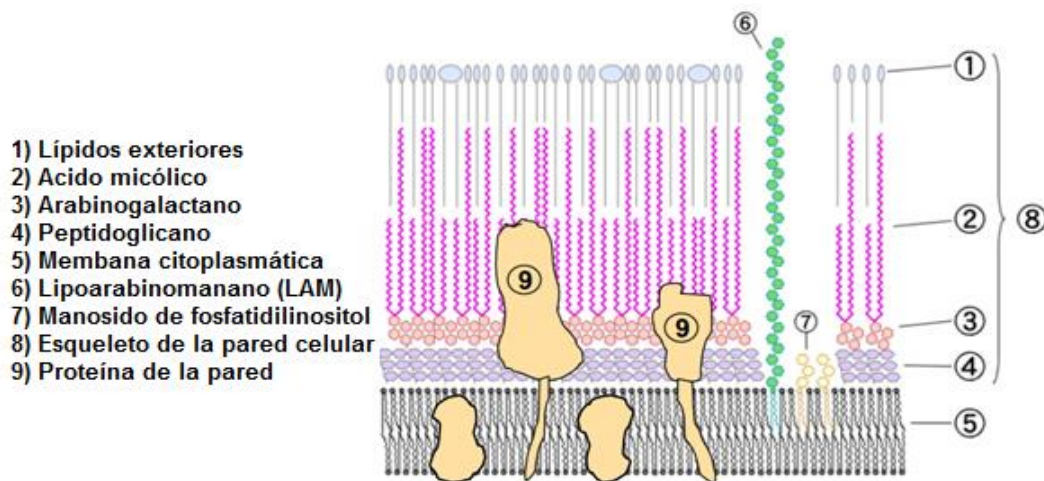


Figura 1. Estructura de la pared celular de *M. tuberculosis*. Fuente: Facultad de Medicina, UBA. N.d.

Capítulo 2. Antecedentes

Ningún componente por sí solo puede considerarse como factor de patogenicidad, sin embargo, el factor cordón que causa la agrupación de los bacilos en filas paralelas es la trehalosa 6'6 dimicolato, la cual está relacionada con cepas virulentas y es la responsable de la inhibición de la migración de polimorfonucleares (PMN) al sitio de colonización e induce la formación de granulomas (Romero Cabello, Raúl, Romero Feregrino, Raúl & Romero Feregrino, 2018).

2.2. Mecanismo de infección

La tuberculosis se transmite de persona a persona por la inhalación de “gotitas flügge” que contienen las micobacterias cuando las personas con tuberculosis pulmonar activa tosen, estornudan o hablan; una vez inhalada la bacteria alcanza los alveolos pulmonares, donde se replica dentro de los macrófagos residentes dificultando la maduración del fagosoma y su fusión con los lisosomas, proporcionando las condiciones favorables para la supervivencia y la replicación (Cambier, Falkow and Ramakrishnan, 2014).

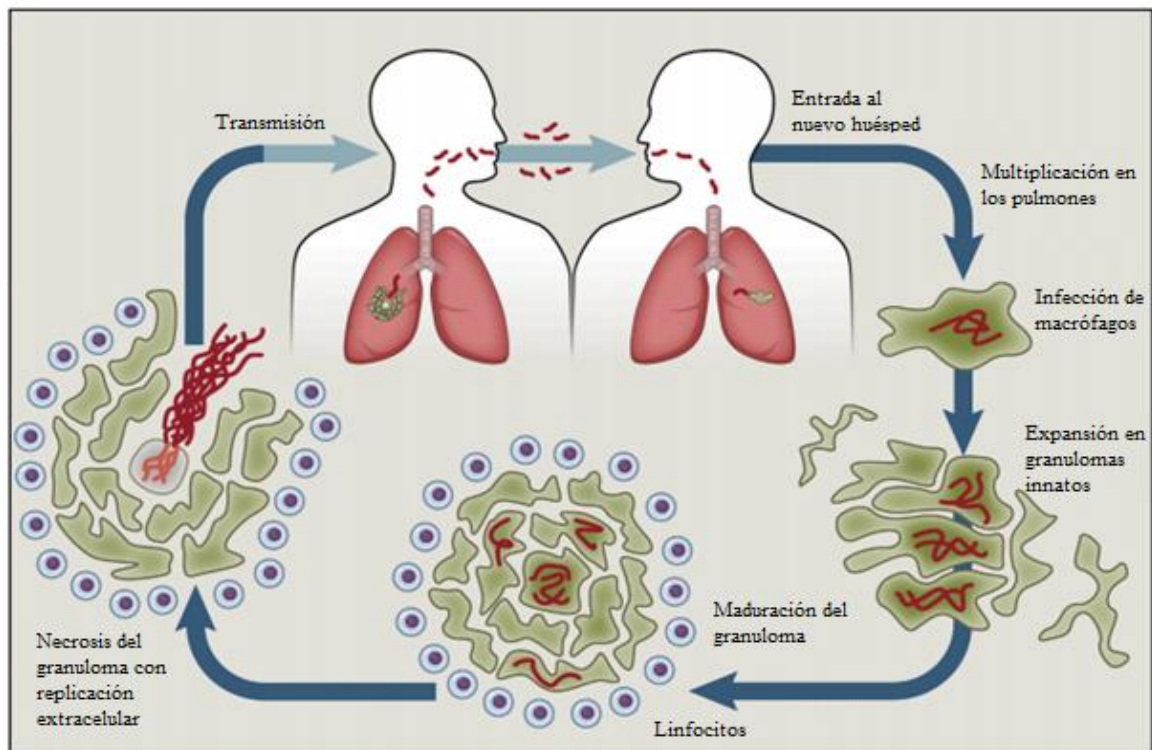


Figura 2. Ciclo de vida patogénico de *Mycobacterium tuberculosis*. Modificado (Cambier, Falkow and Ramakrishnan, 2014).

Capítulo 2. Antecedentes

En la Figura 2 se puede observar cómo los bacilos tuberculosos reclutan macrófagos en la superficie del pulmón, estos se infectan y transportan las bacterias a través del epitelio pulmonar hacia los tejidos más profundos. Durante los estadios tempranos del proceso infeccioso, los macrófagos infectados comienzan a secretar citocinas proinflamatorias como interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-12 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), así como quimiocinas, las cuales reclutan a neutrófilos, monocitos, macrófagos, células T y células B al sitio de infección. Las células reclutadas forman el granuloma, estructura organizada compuesta de macrófagos, localizados centralmente y rodeados por linfocitos T y B. Este granuloma ayuda a contener y prevenir la diseminación de la infección y favorece el contacto entre la célula T y el macrófago (Geffner, 2008). El granuloma en sus primeras etapas expande la infección al permitir que las bacterias se propaguen a los macrófagos recién llegados. A medida que se desarrolla la inmunidad adaptativa, el granuloma puede restringir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, en muchas circunstancias, los macrófagos infectados del granuloma pueden sufrir necrosis, formando un núcleo necrótico que soporta el crecimiento bacteriano y la transmisión al próximo huésped (Cambier, Falkow and Ramakrishnan, 2014).

2.3. Incidencia de la tuberculosis

La epidemia de tuberculosis es más grande de lo que se había estimado previamente, lo que refleja nuevos datos de vigilancia epidemiológica. Según la OMS en el año 2019, se registraron 10,0 millones de nuevos casos de tuberculosis en todo el mundo, de los cuales 5,6 millones (56%) correspondían a hombres, 3,2 millones (32%) a mujeres y 1,2 millones (12%) a niños. Las personas que viven con el VIH representaron el 8.2% de todos los nuevos casos de tuberculosis. La TB-FR continúa siendo una crisis de salud pública, en el 2018, hubo aproximadamente medio millón de casos nuevos (rango de 417,000-556,000) que desarrollaron TB resistente a rifampicina (RR-TB) de los cuales el 78% fue de MDR-TB. Por otra parte, se estima que en 2019 hubo 1,2 millones de defunciones por TB entre personas VIH negativas y un adicional de 208,000 muertes de personas VIH positivas (World Health Organization, 2020).

Capítulo 2. Antecedentes

En el año 2019 se registró un total de 45,637 casos nuevos de TB-P en la república mexicana. El estado de Veracruz registró 4,451 casos nuevos, de los cuales 2,405 correspondían a hombres y 2,046 a mujeres. Con estas cifras el estado de Veracruz se posicionó en el primer lugar con el mayor número de casos de TB (Secretaría de Salud, 2019). Por otra parte, en ese mismo año se registraron 1846 defunciones a nivel nacional, de las cuales 184 muertes correspondieron al estado de Veracruz ubicándose en el segundo lugar respecto a defunciones por esta infección, después de Baja California con 237 decesos (Salud., 2020). Hasta el mes de marzo de 2020 se había registrado un total de 11,159 casos nuevos de TB en México, de los cuales 1,593 casos corresponden al estado de Veracruz (810 hombres y 783 mujeres) (Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud, 2020). Por otra parte, en cuanto a tuberculosis fármaco resistente (TB-FR) hay registros de que del año 2010 al 2018 se han registrado 250 casos por año, de los cuales el 70% de la TB-FR se concentra en 8 estados: Nuevo León, Veracruz, Baja California, Guerrero, Tamaulipas, Puebla, Estado de México y Chiapas (Salud, 2019).

2.4. Fármacos empleados para el tratamiento de la tuberculosis

La vacuna *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) es la única vacuna contra la TB en uso clínico, previene la tuberculosis diseminada en niños pequeños, sin embargo, tiene una eficacia limitada para prevenir la enfermedad transmisible en adolescentes y adultos (Achkar and Prados-Rosales, 2018).

Las micobacterias presentan una resistencia natural a numerosos antibacterianos, por el hecho de poseer una pared celular compleja, muy hidrófoba, con una permeabilidad reducida para un gran número de compuestos, aunado a que la penetración de los antibióticos en cavidades pulmonares, pus o material caseoso resulta muy difícil. Por otra parte, el pH del material caseoso y del interior de los macrófagos es muy bajo, lo que condiciona la actividad de los distintos fármacos (Abbate *et al.*, 2007). *Mycobacterium tuberculosis* tiene un tiempo de replicación prolongado, además, tiene la capacidad de entrar en periodos de latencia con una limitada actividad metabólica, debido a ello, el tratamiento de la tuberculosis debe interferir en cada etapa de replicación del bacilo y debe realizarse con antimicrobianos específicos (con actividad antituberculosa) que

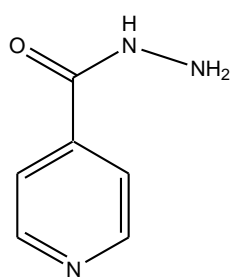
Capítulo 2. Antecedentes

tienen la capacidad de atacar diferentes blancos en cada fase de replicación o de latencia del bacilo (Castillo, 2004). Los fármacos actualmente empleados para el tratamiento de la tuberculosis se dividen en dos grupos:

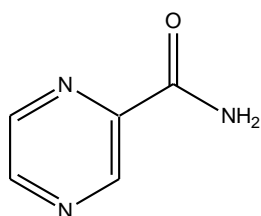
- 1) Fármacos de primera línea: isoniazida, rifampicina, pirazinamida, etambutol y estreptomina (Figura 3).
- 2) Fármacos de segunda línea o subsidiarios, son utilizables en reacciones adversas y resistencias: kanamicina, amikacina, capreomicina, rifabutina, rifapentina, ácido para-aminosalicílico (PAS), etionamida-protionamida, cicloserina-terizidona, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, moxifloxacina (Figura 4) (Abbate *et al.*, 2007).

La isoniazida se utiliza para atacar a los bacilos metabólicamente activos, es un profármaco bactericida intra y extracelular que actúa inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos y otros ácidos grasos de cadena larga (Castillo, 2004); la rifampicina es un fármaco bactericida y actúa en los bacilos metabólicamente activos, en estado de latencia y con crecimiento intermitente inhibiendo la síntesis del ARNm y por lo tanto la transcripción de proteínas; la pirazinamida es bactericida y tiene acción frente a bacilos en estado de latencia en el interior de los macrófagos (Coll, 2003); la estreptomina es un fármaco bactericida en medio alcalino y extracelular, inhibe la síntesis proteica bloqueando la traducción del ARNm (Coll, 2009). Por otra parte, el etambutol es un fármaco bacteriostático que actúa inhibiendo la síntesis de arabinogalactano y lipoarabinomano de la pared celular; otro medicamento bacteriostático es el ácido para-aminosalicílico, que inhibe la producción de ácido fólico (MathWorks, 2020). La etionamida es un fármaco bactericida débil y actúa inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos (Camacho, Picó and Ferrer, 2010; Carneiro *et al.*, 2019).

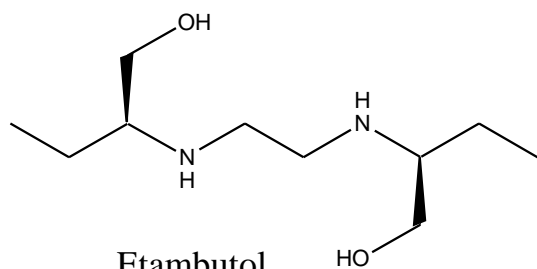
Capítulo 2. Antecedentes



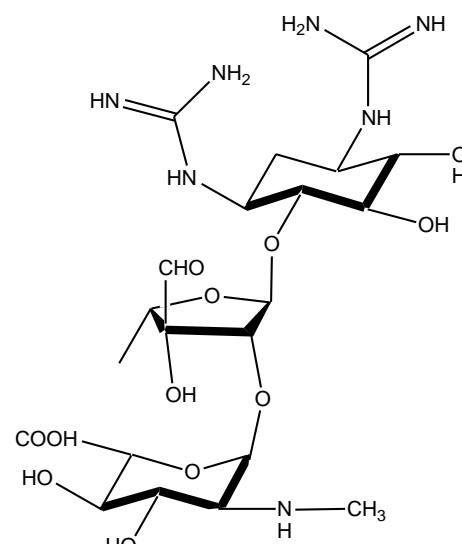
Isoniazida



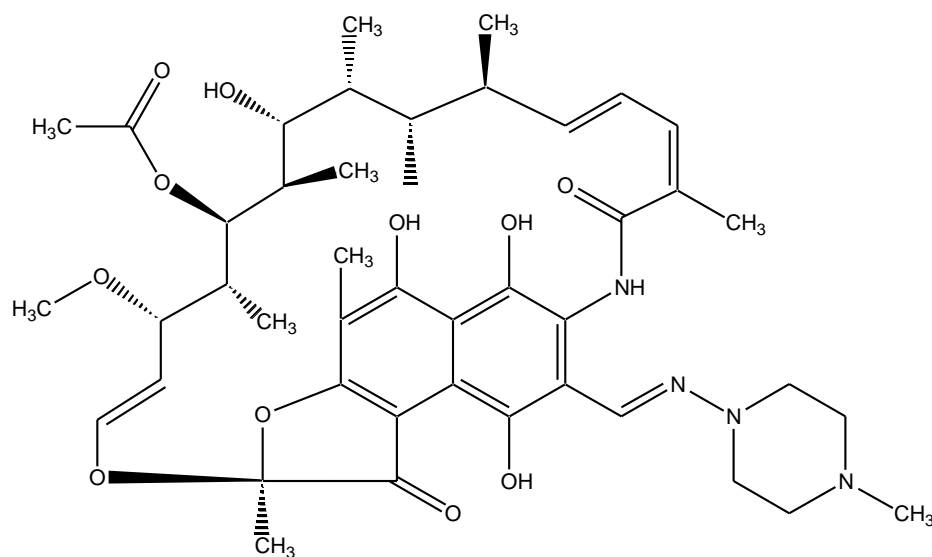
Pirazinamida



Etambutol



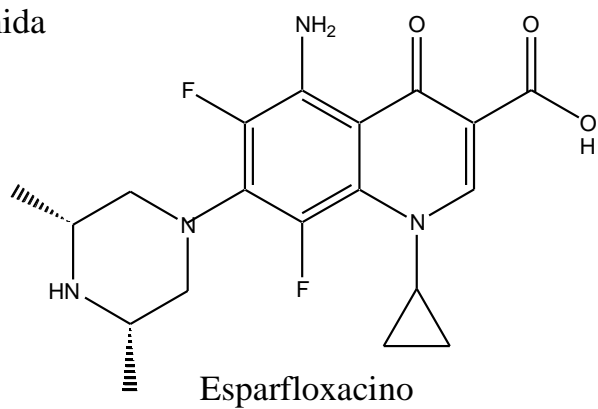
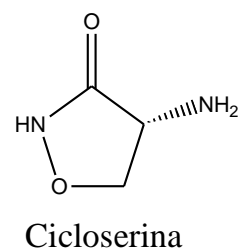
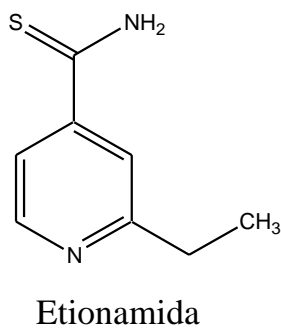
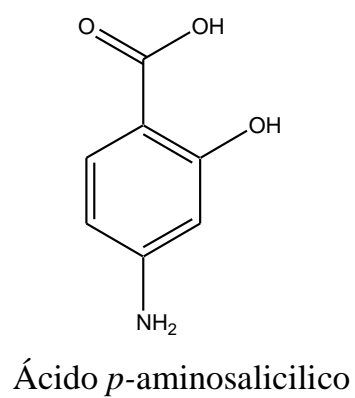
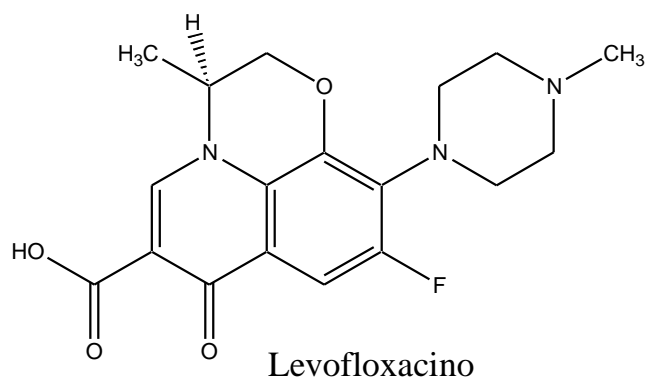
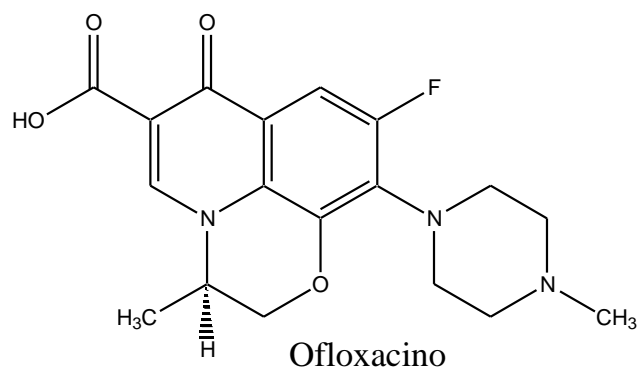
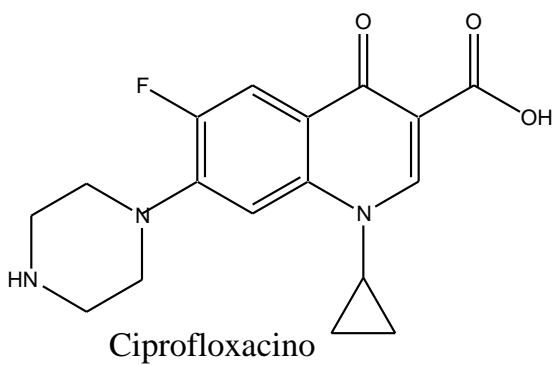
Estreptomicina



Rifampicina

Figura 3. Fármacos de primera línea empleados para el tratamiento de la tuberculosis.

Capítulo 2. Antecedentes



Capítulo 2. Antecedentes

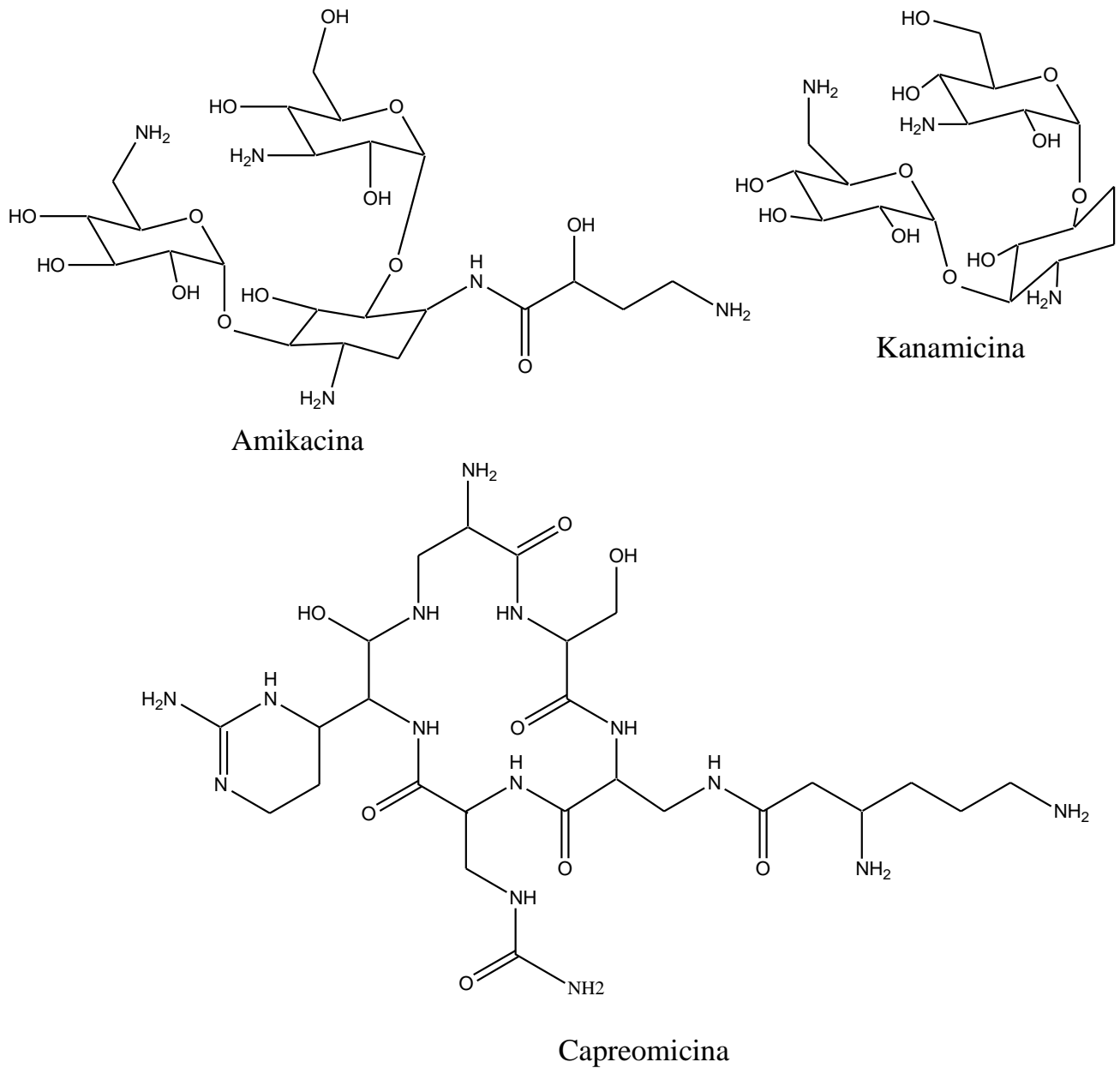


Figura 4. Fármacos de segunda línea empleados para el tratamiento de la tuberculosis.

El tratamiento actual contra la TB es de al menos 6 meses. Cuatro de los medicamentos orales de primera línea (rifampicina, isoniazida, pirazinamida, etambutol y estreptomicina) (Tabla 1) deben de ser tomados en conjunto durante los dos primeros meses de tratamiento, y dos de ellos (rifampicina e isoniazida) durante los cuatro meses posteriores de tratamiento en la fase de continuación. Estos regímenes de tratamiento se asocian con altas tasas de incumplimiento, aumento de la mortalidad y pueden crear

Capítulo 2. Antecedentes

casos crónicos de TB-FR (Zumla *et al.*, 2014). Los pacientes con TB pulmonar pueden tener bacilos tuberculosos activos e inactivos, siendo estos últimos difíciles de eliminar con los fármacos antituberculosos utilizados actualmente, favoreciendo el desarrollo de cepas resistentes e infecciones latentes.

Tabla 1. Fármacos de primera línea para el tratamiento de la tuberculosis (Abbate *et al.*, 2007).

Fármaco	Actividad	Efectos adversos	Penetración en el SNC
Isoniazida	Bactericida	Hepatitis tóxica (<2%, aumenta con la edad y asociación con otros fármacos). Neuropatía periférica Excitación del SNC (convulsiones) Síndrome pseudo-lúpico. Reacciones de hipersensibilidad, acné	Concentraciones iguales a las séricas.
Rifampicina	Bactericida	Intolerancia gástrica Hipersensibilidad cutánea. Hepatitis tóxica. Reacciones inmunológicas Leves: síndrome pseudo gripal. Graves*:PTT, trombocitopenia, anemia hemolítica, insuficiencia renal aguda. Interacciones farmacológicas**. Coloración naranja de fluidos corporales, ropas y lentes de contacto.	10-20% de los niveles séricos, mejora con la inflamación meníngea.
Pirazinamida	Bactericida	Hepatitis tóxica (relacionada con la dosis). Trastornos gastrointestinales. Artritis gotosa, la hiperuricemia asintomática es normal. Rash por hipersensibilidad. Dermatitis fotosensible	Concentraciones igual a las séricas.
Etambutol	Bacteriostático	Neuritis óptica retrobulbar, relacionada con la dosis. Reacciones cutáneas de hipersensibilidad. Alopecia	Penetración escasa aún con inflamación.
Estreptomina	Bacteriostático	Ototoxicidad Nefrotoxicidad	Penetración escasa aún con inflamación.

SNC: Sistema Nervioso Central, PTT: Tiempo parcial de tromboplastina

*Su aparición implica la suspensión definitiva de la R.

**La R es un potente inductor del citocromo P450 (isoenzima CYP3A4) por lo que presenta numerosas interacciones farmacológicas.

Capítulo 2. Antecedentes

La población de bacterias de *M. tuberculosis* de un individuo infectado pueden tener una sensibilidad diferencial a los medicamentos, que puede surgir a través de tres mecanismos (Kester and Fortune, 2014). Las bacterias "persistentes" y "resistentes" surgen de dos de los tres mecanismos, y estos tipos de bacteria son los menos sensibles a los antibióticos (Natalie Verstraeten, Wouter Knapen, Maarten Fauvart, 2016). Las bacterias resistentes tienen rasgos hereditarios derivados de una o más mutaciones en genes cuyos productos son necesarios para una eficacia máxima de antibióticos. La adquisición de tales mutaciones puede conducir a la generación de cepas bacterianas estables y resistentes a los medicamentos (Russell, 2017). Un tercer tipo de sensibilidad reducida al medicamento puede ocurrir porque algunas bacterias en una población tienen la capacidad de sobrevivir una exposición transitoria a concentraciones de antibióticos que generalmente serían letales. Este fenómeno, conocido como tolerancia fenotípica, se promueve por la heterogeneidad de una población bacteriana. Además, esta forma de insensibilidad a los medicamentos es sin duda el mayor obstáculo para la quimioterapia efectiva. En contraste con la persistencia y la resistencia, la tolerancia fenotípica involucra una proporción sustancial de bacterias en una población dada que exhibe baja sensibilidad a la exposición al fármaco (Kester and Fortune, 2014). La resistencia a los antimicrobianos es el fenómeno por el cual un microorganismo deja de ser afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Es consecuencia de la capacidad de la bacteria de neutralizar el efecto de los antibióticos (Organization, 2019).

Se habla de TB resistente al referirse a los casos causados por *M. tuberculosis* resistente a uno de los antituberculosos de primera línea. La TB-MDR es cuando los casos son causados por *M. tuberculosis* resistente a isoniazida y rifampicina, requiere al menos de 20 meses de tratamiento con medicamentos de segunda línea compuestos de capreomicina, kanamicina, amikacina y fluoroquinolonas; estos son más tóxicos, menos eficientes y con tasas de curación en el rango de 60-75% (Riccardi and Pasca, 2014; Organization, 2019). Por otra parte, la TB extremadamente resistente a los fármacos (TB-XDR) es la resistencia de *M. tuberculosis* a la rifampicina, isoniazida más a cualquier fluoroquinolona y al menos a uno de los tres medicamentos inyectables de segunda línea: amikacina, kanamicina o capreomicina (Tabla 2) (Abbate *et al.*, 2007; Organization, 2019). En pacientes afectados por TB-XDR, las posibilidades de tratamiento exitoso son bastante bajas (Riccardi and Pasca, 2014) lo que apuntala la necesidad urgente de

Capítulo 2. Antecedentes

descubrir nuevas alternativas terapéuticas a las actualmente existentes y que sean efectivas contra cepas de *Mtb*-MDR, mejorando algunos de los efectos secundarios y en donde los tiempos de tratamiento sean más cortos, por tales motivos los productos naturales pueden ser de gran relevancia en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos.

Tabla 2. Fármacos subsidiarios para el tratamiento de la tuberculosis (Sharma et al., 2017).

Fármaco	Actividad	Efectos adversos	Penetración en el SNC	Uso en insuficiencia renal/diálisis
Kanamicia y amikacina	Aminoglucósido bactericida	Ototoxicidad Nefrotoxicidad	Penetración escasa aún con inflamación.	Ajustar dosis por clearance de creatinina. En dializados: dosis usual postdiálisis.
Capreomicina	Antibiótico polipéptido bactericida	Ototoxicidad Nefrotoxicidad	No penetra meninges	Ajustar dosis por clearance de creatinina. En dializados: dosis usual postdiálisis.
Etionamida	Bactericida débil. Resistencia cruzada con tiacetazona	Sabor metálico Gastrointestinales Hepatotoxicidad (2%) Neurotoxicidad Hipotiroidismo	Concentraciones igual a las séricas	Dosis de 250-500 mg/d con clearance de creatinina < 30 ml/ min o dializados.
Cicloserina-Terizidona (L-cicloserina)	Bacteriostático	Neurotoxicidad: depresión, sicosis, convulsiones.	Concentraciones igual a las séricas	Contraindicada con clearance de creatinina < 50 ml/min. En dializados: 500 mg posdiálisis.
PAS (ácido p-aminosalicílico)	Bacteriostático	Intolerancia digestiva Rash Hipotiroidismo Hepatitis tóxica.	Penetra meninges	Dosis usual
Rifabutin (resistencia cruzada en rifampicina)	Bactericida. Puede asociarse con algunos inhibidores de proteasa.	Neutropenia en HIV+ Intolerancia gastrointestinal Hepatotoxicidad, Rash Síndrome pseudogripal Coloración naranja de fluidos corporales, ropa y lentes de contacto.	Penetra meninges inflamadas	Dosis usual
Rifapentina	Antibiótico bactericida	Similares a la RMP, potente inductor del citocromo P-450	No hay información.	No hay información.
Ciprofloxacina (la quinolona de menor actividad anti-TBC)	5-F quinolona, bactericida	Tendinitis (aquiliana). Neurotoxicidad: excitación, delirio, convulsiones. Prolongación del QT. Trastornos gastrointestinales. Rash Escasa fotosensibilización.	30 a 50% con inflamación	Ajustar dosis por clearance de creatinina. No es eliminada por hemodiálisis.
Ofloxacina	5-F quinolona	Tendinitis (anquiliana) Neurotoxicidad: excitación, delirio, convulsiones.	30 a 50%	Ajustar dosis por clearance de creatinina. No es eliminada por hemodiálisis.

Capítulo 2. Antecedentes

		Prolongación del QT. Trastornos gastrointestinales. Rash. Fotosensibilización.		
Levofloxacin	5-F quinolona bactericida	Tendinitis (aquiliana). Neurotoxicidad: excitación, delirio, convulsiones. Prolongación del QT. Trastornos gastrointestinales Rash Escasa fotosensibilización.	16 a 20%	Ajustar dosis por clearance de creatinina. No es eliminada por hemodiálisis.
Moxifloxacin	18-metoxi-4F quinolona. Bactericida, fluoroquinolona anti- TBC más potente	Tendinitis (aquiliana) Neurotoxicidad: excitación, delirio, convulsiones. Prolongación del QT Trastornos gastrointestinales. Rash	Penetración comparable a otras fluoroquinolonas en modelos animales.	Ajustar dosis por clearance de creatinina. No es eliminada por hemodiálisis.

2.5. Mecanismos de resistencia de *M. tuberculosis*

Existen varios factores que promueven la resistencia de *M. tuberculosis* a los fármacos, los cuales están implicados en la aparición de cepas MDR. Hay dos tipos de resistencias: la resistencia adquirida y la resistencia constitutiva. En *M. tuberculosis* la resistencia adquirida se debe principalmente por alteraciones en genes que codifican el blanco de los antibióticos (Nguyen and Thompson, 2006)

La resistencia constitutiva o intrínseca, es aquella que no ha sido adquirida como resultado de una exposición previa a antibióticos. Entre este tipo de resistencia tenemos, que debido a la composición de la pared celular de las micobacterias esta tiene una permeabilidad restringida para un gran número de compuestos antibacterianos. Es decir, los antibióticos no polares pueden ingresar a la célula por difusión a través de la bicapa hidrofóbica, mientras que los antibióticos polares utilizan canales como las porinas para ingresar. Otro mecanismo de resistencia es la modificación y degradación enzimática de los antibióticos (Gómez-Tangarife *et al.*, 2018). Por otra parte, los mecanismos de salida contribuyen de manera importante a la resistencia intrínseca a los fármacos como las bombas de eflujo. Las bombas de eflujo son proteínas transportadoras localizadas en la membrana citoplasmática y actúan como transportadores activos, ya que requieren una fuente de energía. Su papel fisiológico es proteger a la célula contra moléculas tóxicas,

Capítulo 2. Antecedentes

incluyendo antibióticos, al transportarlos una vez que ingresan a la célula bacteriana hacia el ambiente extracelular (Balganesh *et al.*, 2012; Gómez-Tangarife *et al.*, 2018). El aumento en la expresión de genes que codifican las proteínas que regulan el mecanismo de las bombas de eflujo es la primera etapa del proceso de farmacorresistencia, ya que ocasiona una disminución de los niveles de antibióticos intracelulares a través del mecanismo de salida, lo que permite a *M. tuberculosis* sobrevivir durante un largo tiempo hasta que se produce una mutación cromosómica contra ciertos antibióticos (Umar *et al.*, 2019).

Aunque las bombas de eflujo se conocen principalmente por su papel en la salida de antimicrobianos, las bombas de eflujo están involucradas principalmente en procesos fisiológicos como la comunicación de célula a célula, la homeostasis del pH, virulencia bacteriana, desintoxicación de metabolitos intracelulares y tráfico de señales intracelulares (Machado *et al.*, 2018). Las bombas de eflujo de *M. tuberculosis* pertenecen a diferentes grupos: transportadores primarios, a los cuales pertenece la familia de casete de unión a ATP (ABC) que utilizan como fuente de energía el ATP y los transportadores secundarios, que se caracterizan por utilizar el gradiente de protones o iones de sodio como fuente de energía, estos últimos se dividen en 4 familias: Superfamilia de Máximo Facilitador (MFS), Familia Multi-fármaco Resistencia Pequeña (SMR), Resistencia a División por Nodulación (RND) y Familia de Expulsión de Compuestos Tóxicos y multi-fármacos (MATE) (Balganesh *et al.*, 2012; Gómez-Tangarife *et al.*, 2018; Umar *et al.*, 2019).

2.6. Nuevos compuestos con actividad antituberculosa

En la actualidad, se encuentran 22 medicamentos para el tratamiento de la TB sensible y TB-MDR en ensayos de fase I, II o III. Estos comprenden 13 nuevos compuestos, dos medicamentos que han recibido aprobación regulatoria acelerada, un medicamento que fue aprobado recientemente por la FDA de los Estados Unidos y seis medicamentos reutilizados. Varios regímenes de combinación con fármacos nuevos o reutilizados se encuentran en ensayos de fase II o III. Además, hay 14 vacunas candidatas en ensayos clínicos: tres en la Fase I, nueve en la Fase II y dos en la Fase III.

Capítulo 2. Antecedentes

Incluyen candidatos para prevenir la infección y la enfermedad de TB, y candidatos para ayudar a mejorar los resultados del tratamiento de la enfermedad de TB (World Health Organization, 2020).

Debido a la emergencia global de la TB son necesarios nuevos fármacos con mecanismos de acción diferentes, sin resistencias cruzadas con los demás fármacos antituberculosos, que tengan actividad frente a las cepas sensibles a fármacos y a las MDR y que tengan el potencial de reducir la duración y la frecuencia de dosificación del tratamiento (Coll, 2009). Es por esto, que se ha trabajado en el desarrollo y descubrimiento de nuevas moléculas con actividad contra *M. tuberculosis*, para el desarrollo de nuevos fármacos antituberculosos.

Esencialmente, el descubrimiento de un nuevo compuesto químico con actividad antituberculosa implica la identificación de nuevas entidades químicas (NCE), que tengan las características requeridas para un medicamento. Estas entidades se pueden obtener mediante síntesis química o mediante el aislamiento de productos naturales (PN).

Los PN son metabolitos secundarios de cualquier fuente natural, como plantas, animales, hongos, bacterias y organismos marinos que han desempeñado un papel importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (Patridge *et al.*, 2016; Guo, 2017). Se estima que aproximadamente más de la mitad de los productos farmacéuticos en uso clínico en la actualidad se derivan de PN (Awan, Shaw and Ellis, 2016; Rao *et al.*, 2019). Esto es acertado si pensamos que nuestros antepasados utilizaban las plantas para el tratamiento de diversas enfermedades, y dichos conocimientos han ido pasado de generación en generación, hasta cierto punto donde la industria farmacéutica ha sabido explotar este campo en el desarrollo de nuevos fármacos con distintos tipos de actividades biológicas. El número de NCE, derivado de PN y aprobado para la venta de 1981 a 2014 fue de 1,328; la mayoría de estos en las áreas anticancerígenas, antibacterianas y antivirales (Newman and Cragg, 2016).

2.7. Medicina tradicional mexicana

La OMS define a la medicina tradicional como todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (Organización Mundial de la Salud, 2020).

En México, al igual que en otros países la medicina tradicional es una fuente importante para el tratamiento de enfermedades (Molina-Salinas *et al.*, 2007). En la medicina tradicional, las especies vegetales utilizadas son preparadas y administradas de diferentes maneras de acuerdo con el padecimiento que sufre la persona. México es el segundo país que más plantas medicinales posee, con un aproximado de 4,500 especies de plantas de uso medicinal, y solo el 11% de estas se ha evaluado y comprobado su eficacia química, farmacológica y biomédica (Domínguez-Barradas, Cruz-Morales and González-Gándara, 2015). El estado de Veracruz es poseedor de alrededor de 1,205 especies vegetales medicinales (Cano, L., Vázquez, M. & Jácome, 1997). En Veracruz la parte de la planta comúnmente usada en los remedios herbolarios son las hojas, seguida de la planta completa con raíz, tallos, ramas, la planta entera sin raíz y frutos respectivamente. En cuanto a su forma de preparación destacan principalmente las plantas hervidas o en cocimiento, crudas, en cataplasmas, tés o infusiones o untadas (Gheno Heredia *et al.*, 2011).

Las plantas medicinales tienen diversos usos en la medicina moderna, entre los cuales destacan:

- Son fuente de agentes terapéuticos directos
- Se emplean como materias primas para la fabricación de compuestos semisintéticos más complejos.
- Las estructuras químicas derivadas de las sustancias vegetales pueden servir de modelos para nuevos productos sintéticos.
- Se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos compuestos (Akerlele, 1993).

Capítulo 2. Antecedentes

Las familias de plantas que exhiben propiedades antibacterianas incluyen la *Asteriaceae* con 57 especies (16.61%), *Lamiaceae* con 21 especies (6.12%) y *Euphorbiaceae* con 14 especies (4.08%). Estas familias son las más diversas en el territorio mexicano. *Asteriaceae* es una familia importante en la farmacopea mexicana debido a la gran cantidad de especies disponibles en el país y una amplia gama de PN presentes en las especies vegetales. Se han encontrado una gran cantidad de metabolitos secundarios de diferentes clases químicas en esta familia, incluidos poliacetilenos, lactonas sesquiterpénicas, aceites esenciales, alcaloides y flavonoides (Sharma *et al.*, 2017).

2.8. Plantas seleccionadas para su estudio

En un trabajo previo de maestría, se eligieron dos plantas nativas del estado de Veracruz que son utilizadas en la medicina tradicional del estado para tratar la tuberculosis o síntomas relacionados, como fiebre, tos, sangre en el esputo y otras enfermedades infecciosas. Se demostró la actividad antituberculosa de *Bidens pilosa* L. *Xylosma flexousum* (H. B. & K.) Hemsl, obteniéndose MICs de 190 µg/mL (Cornejo Báez and Sánchez Medina, 2016)) debido a esto, se decidió seguir trabajando con estos géneros de plantas para poder llegar al metabolito responsable de la actividad antituberculosa. Estas plantas son: *Bidens alba* (L.) DC y *Xylosma flexousum* (H. B. & K.) Hemsl.

Estas dos plantas se eligieron con base a los siguientes criterios:

- ✓ Plantas nativas del Estado de Veracruz.
- ✓ Utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la TB o síntomas relacionados a esta enfermedad.
- ✓ Que tengan reportes previos de su actividad contra *M. tuberculosis*.
- ✓ Que no exista información de los metabolitos responsables de dicha actividad.
- ✓ Que su distribución este en zonas aledañas al municipio de Xalapa.

Capítulo 2. Antecedentes

2.8.1. *Bidens alba* L. (DC)

Bidens alba L. (DC) pertenece a la familia *Asteraceae* es una maleza anual ampliamente distribuida por las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Singh *et al.*, 2017).



Reino	<i>Plantae</i> - Plantas
Subreino	<i>Tracheobionta</i> - Plantas vasculares
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i> - Plantas con semillas
División	<i>Megaliophyta</i> - Plantas con flores
Clase	<i>Magnoliopsida</i> -Dicotiledoneas
Subclase	<i>Asteridae</i>
Familia	<i>Asteriaceae/Compositae</i>
Genero	<i>Bidens</i> L.
Especie	<i>Bidens alba</i> (L.) DC.

(Heike, 1995; Vibrans, 2011)

Figura 5. Parte aérea de *B. alba* (L.) DC

2.8.1.1. Características botánicas

Bidens alba (L.) DC (Figura 5) se conoce comúnmente en el estado de Veracruz como mozote, mozote blanco, aceitilla tropical. En cuanto a su sinonimia científica se conoce como *Bidens pilosa* var. *radiata* Sch. Bip. in Webb & Barthelet, *Bidens leucantha* (L.) Willd (Ballard, 1986). *Bidens alba* pertenece al complejo *Bidens pilosa*, que incluye tres especies: *Bidens alba*, *Bidens odorata* y *Bidens pilosa*. Sin embargo, se considera solo como una especie variable, con el nombre de *Bidens pilosa*. Pero, concedores del grupo consideran que es mejor una separación taxonómica (Ballard, 1986). Se encontraron tres especies de *Bidens* (con variedades cada una), entre ellas esta *Bidens odorata* que se encuentra en regiones templadas más que tropicales, mientras con *Bidens alba* es al revés, *Bidens pilosa* es más asociada a la perturbación y asentamientos humanos que las demás. Además, tienen diferencias en el número de cromosomas que poseen, diploides ($n = 12$) *Bidens odorata* Cav.; tetraploides *B. alba* (L.) DC ($n = 24$); y hexaploide *B. pilosa* L. ($n = 36$) y la reproducción se lleva a cabo de diferente forma (Heike, 1995; Vibrans, 2011). Es una planta compuesta con flores liguladas blancas

Capítulo 2. Antecedentes

alargadas, de 5 a 8 pétalos, a menudo con rayas, tintes rosas o moradas, flores tubulares amarillas, con dos tipos de brácteas, las exteriores verdes y angostas, hasta 4 mm de largo, y las interiores escariosas, las semillas alargadas y con dos aristas, éstas con setos retrorsos, tallo cuadrado, hojas divididas tres a cinco veces. Raíz: Pivotante y fuerte (Lu *et al.*, 2014).

2.8.1.2. Distribución en México

Bidens alba es una maleza cosmopolita nativa de América Central y del Norte (Souza-Filho *et al.*, 2019), tiene aproximadamente 340 especies (Vibrans, 2011). Se encuentra en Tamaulipas, San Luís Potosí, Querétaro, Hidalgo, Puebla, Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Chiapas, Campeche, Quintana Roo y Yucatán, aunque probablemente también en otras regiones (Boffil Cárdenas *et al.*, 2005).

2.8.1.3. Usos medicinales

En algunas partes del mundo, la planta se consume como alimento, mientras que en otros países *B. alba* se utiliza en medicinas tradicionales (Singh *et al.*, 2017). Se usa como antiinflamatorio, diurético, hepatoprotector, en la angina, para la hepatitis, amigdalitis, laringitis, dolor de cabeza, de estómago, de muelas, como tratamiento de las intoxicaciones, los trastornos digestivos, diarrea, estomatitis, conjuntivitis, bronquitis, entre otros (Oliveira *et al.*, 2004a; Gautam *et al.*, 2007; Bartolome *et al.*, 2013; Bilanda *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2017; van Nguyen Thien *et al.*, 2017; Shandukani *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2018; Alam *et al.*, 2019).

2.8.1.4. Estudios fitoquímicos y de actividad biológica del género

Bidens pilosa es la especie más estudiada, hay informes de su actividad antidiabética, antihipertensiva, antioxidante, antibacteriana, antiplasmódica, anticancerígena, antiinflamatoria, antimicobacteriana (Meléndes Camargo *et al.*, 2004; Hernández-Sánchez *et al.*, 2018). Por otro lado, *B. odorata* tiene informes sobre sus actividades hipolipidémicas, antimicobacterianas y diuréticas (Franco *et al.*, 2019). Sin embargo, hay pocos informes sobre la bioactividad de *Bidens alba*.

Capítulo 2. Antecedentes

En la medicina tradicional, *B. alba* se usa para tratar la hipertensión, la ictericia y la diabetes. Se ha demostrado que esta planta tiene actividades anticancerígenas, antiinflamatorias y analgésicas, además de presentar una baja toxicidad. Entre los componentes químicos más comunes se encuentran los poliacetilenos (34%), chalconas (12%), flavonoides (9%) y fenilpropanoides (9%) (Figura 6) (United States Department of Agriculture and Service., no date; UNAM, 2002).

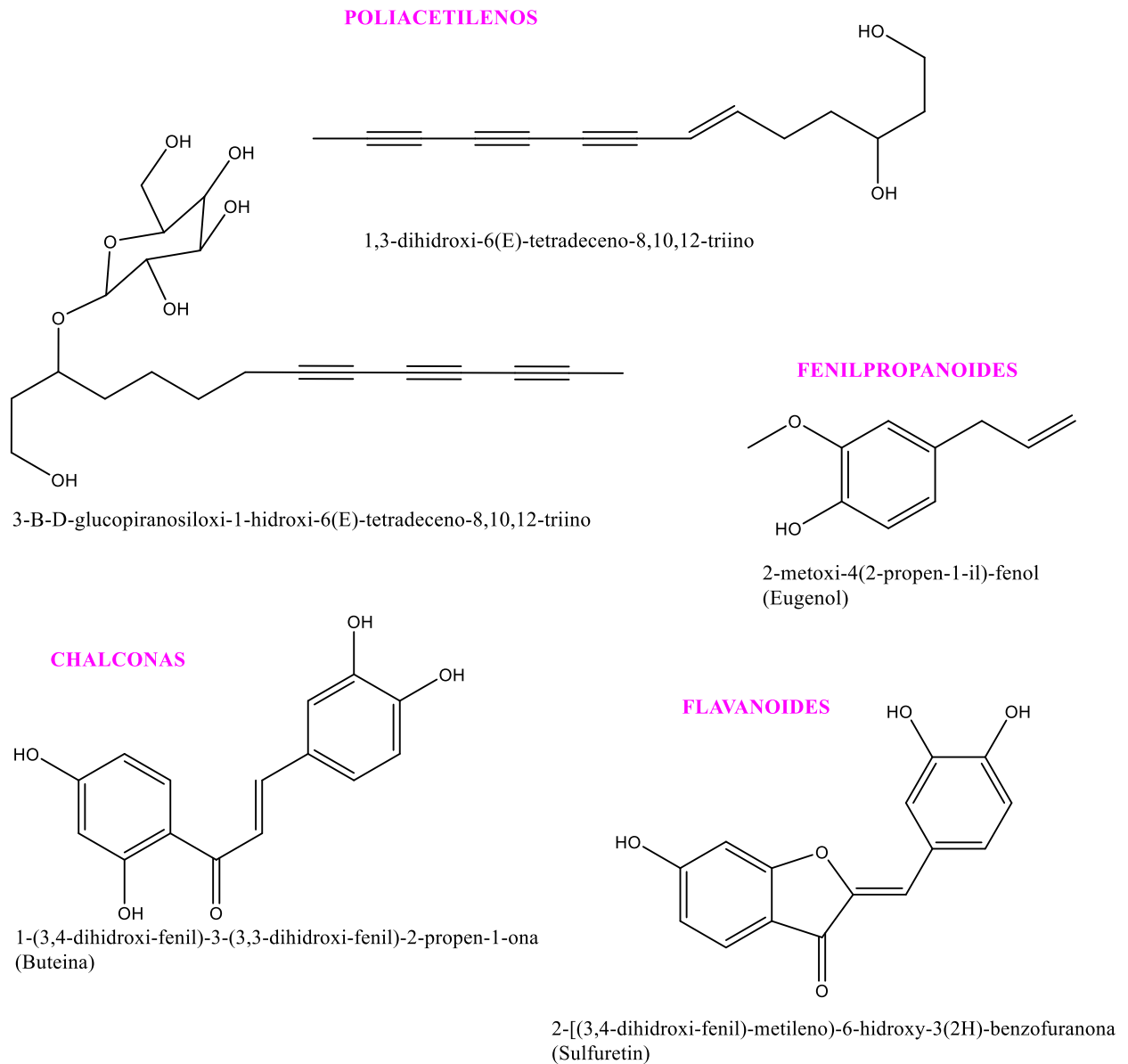


Figura 6. Ejemplos de los principales metabolitos secundarios presentes en el género *Bidens*. Fuente: (Silva et al., 2011).

Capítulo 2. Antecedentes

2.8.2. *Xylosma flexuosum* (H. B. & K.) Hemsl

Xylosma flexuosa (H. B. & K.) Hemsl pertenece a la familia *Flacourtiaceae* es un árbol o en ocasiones un arbusto distribuido en México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Venezuela y Curazao. En México es vulnerable a la extinción (Menezes-De-Oliveira *et al.*, 2011).



Reino	<i>Plantae</i> - Plantas
Subreino	<i>Tracheophyta</i> - Plantas vasculares
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i> - Plantas con semillas
División	<i>Megaliophyta</i> - Plantas con flores
Clase	<i>Magnoliopsida</i> -Dicotiledoneas
Orden	<i>Malpighiales</i>
Familia	<i>Salicaceae/Flacourtiaceae</i>
Genero	<i>Xylosma</i>
Especie	<i>Xylosma flexuosum</i>

(Cano, L., Vázquez, M. & Jácome, 1997)

Figura 7. Corteza de *X. flexuosum*

2.8.2.1. Características botánicas

Xylosma flexuosum (Figura 7) es conocida en el estado de Veracruz como coronilla, escobilla, palo de brujo y tempisc. En cuanto a su sinonimia científica se conoce con los nombres de *Flacourtiosa flexuosa* Kunth, *Hisingera flexuosa* (Kunth) Clos, *Hisingera nítida* Seemann, *Myroxylon flexuosum* (Kunth) Kuntze, *Xylosma anisophyllum* Standley, *Xylosma nitidum* Hemsley, *Xylosma paliurus* (Clos) Briq. Su época de floración es de marzo a octubre (Cano, L., Vázquez, M. & Jácome, 1997).

2.8.2.2. Distribución en México

Se encuentra distribuida en los estados de Campeche, Colima, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Sinaloa, Sonora, Puebla, San Luis Potosí, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán. A una altitud de 700-2050 msnm (Cano *et al.*, 1997).

2.8.2.3. Usos medicinales

En la sierra de los Tuxtlas, se usa como antipirético, en la región sur de la cuenca sedimentaria de Tampico, Tamaulipas y Misantla, en Veracruz se usa para curar la TB, en la Sierra Norte de Puebla se utiliza para la tos y para los tlacotes (Truong *et al.*, 2011a).

2.8.2.4. Estudios fitoquímicos y de actividad biológica del género

No existen reportes de la actividad contra *M. tuberculosis* de *X. flexuosum*, sin embargo, se evaluó la actividad de *Xylosma longifolia* contra *M. tuberculosis*; de esta planta se aisló el compuesto 8-hidroxi-6-metoxi-3-pentilisocumarina (Figura 8 A) el cual resultó ser el más activo contra *M. tuberculosis* H37Rv con un valor de MIC de 40.5 µg/mL (Truong *et al.*, 2011b). Así mismo, fue evaluada la actividad antioxidante y antidermatofitos demostrando su bioactividad (Devi, Singh and Singh, 2013)

Se han aislado algunos metabolitos de *X. flexuosum*, tales como (rel)-2-([2,6-dibenzoil]-β-glucopiranosiloxi)-5-hidroxibenzoil-1R,2R,6R-trihidroxi-3-oxociclohex-4-enoato (xilosmin) y tres glucósidos: Salirespolida, poliotrisosida and 2'-benzoylpoliotrisosida. También ha sido aislado el triperpeno 3β-lup-20(29)-en-3-ol (lupeol), que ha demostrado su actividad inmunomoduladora (Figura 8 B) (Menezes-De-Oliveira *et al.*, 2011; Wahdaningsih *et al.*, 2020).

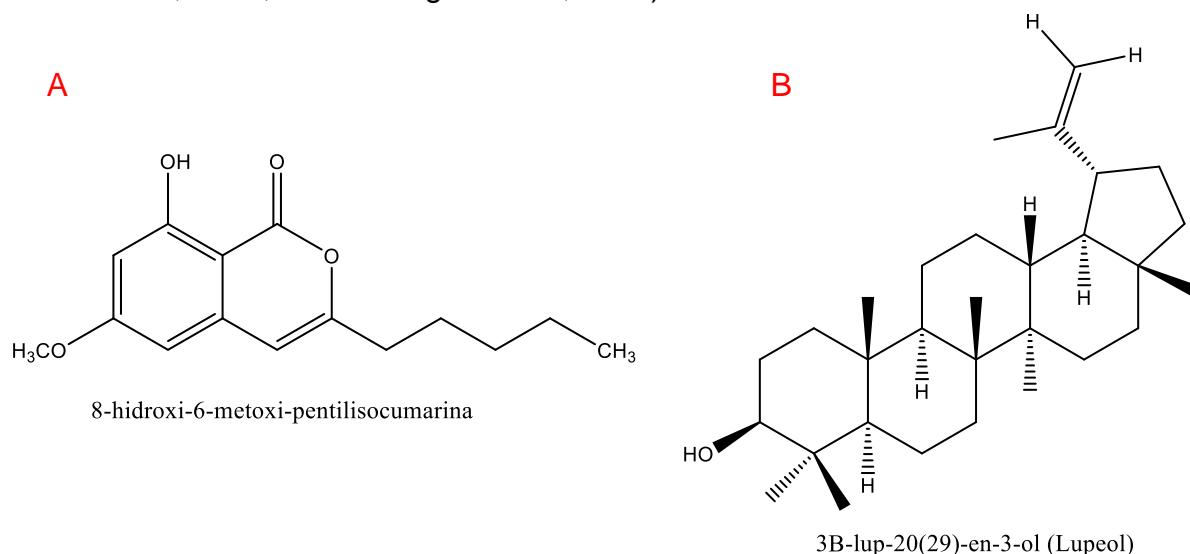


Figura 8. Ejemplos de metabolitos secundarios presentes en el género *Xylosma*.

2.9. Análisis químico de plantas medicinales

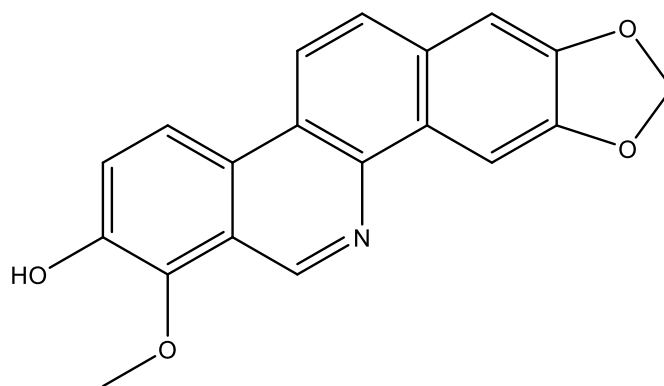
Durante muchos años la estrategia más usada para el aislamiento de productos naturales bioactivos ha sido el fraccionamiento guiado por bioensayo. Este método implica el fraccionamiento repetitivo a escala preparativa y la evaluación de la actividad biológica hasta el aislamiento e identificación de los constituyentes puros con la actividad biológica seleccionada (Kvalheim et al., 2011; Brusotti et al., 2014). Esta metodología clásica ha proporcionado un buen medio para el aislamiento dirigido de los componentes bioactivos de extractos de plantas complejos, sin embargo, la enorme cantidad de material biológico requerido para este procedimiento y el riesgo de perder la actividad biológica durante el proceso de aislamiento debido a la dilución o descomposición del metabolito en los procesos, limitan el atractivo de esta metodología, que además se percibe como costosa, requiere mucho tiempo y mucha mano de obra (Alvarez-Zapata et al., 2015).

Usando esta estrategia, se han aislado numerosos compuestos químicos bioactivos de plantas, hongos, bacterias y organismos marinos. Los compuestos que se han aislado usando esta estrategia incluyen: compuestos con actividad citotóxica, como el 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona-4'-O-β-D-glucósido, 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona-4'-O-(6''-acetil)-β-D-glucósido y 5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona del extracto etanólico de *Coronopus didymus* (IC₅₀= 43.50, 0.63 y 3.67 μM, respectivamente) (Noreen et al., 2016) y un aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* que también muestra actividad citotóxica (Degenhardt et al., 2016). Dos iridoides con actividad antiproliferativa fueron obtenidos de la fracción de diclorometano de *Euphrasia pectinata*: eufrasina y campinol (IC₅₀= 0.2 y 1.9 μM, respectivamente) (Marcotullio et al., 2015).

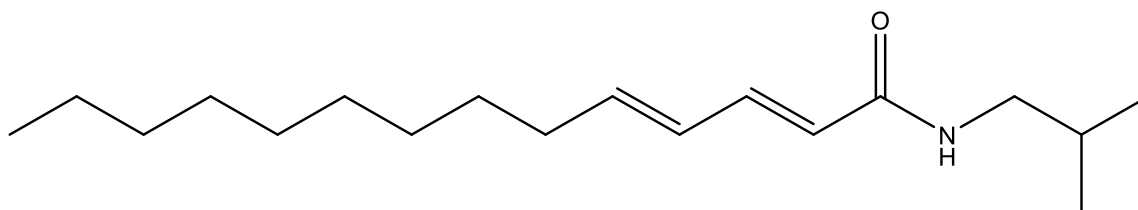
También se han aislado compuestos con actividad antibacteriana tales como lupelol, ácido betúlinico, ácido ursólico y el ácido 2-α-hidroxiursólico aislados de extractos de *Curtisia dentata* (Shai et al., 2008); el lupeol-3β-O-cinamato, lupeol-3β-O-dihidrocinamato y filacantona (MIC= 0.5, 0.25 mg.ml⁻¹ y 5.0 mg.ml⁻¹, respectivamente) aislado de extractos de *Cnidocolus quercifolius* Pohl (de Oliveira-Júnior et al., 2018); de esta misma planta se han aislado compuestos con actividad antioxidante, como α, γ y δ-tocoferoles y el fitosterol, β-sitostero (Santos et al., 2017). También se han aislado

Capítulo 2. Antecedentes

compuestos con actividad antituberculosa, como el alcaloide decarina y N-isobutil-(2E,4E)-2,4-tetradecadienamida que mostraron una MIC de 1,6 $\mu\text{g/mL}$., aislados de *Zanthoxylum capense* (Luo *et al.*, 2013). Esta estrategia ha demostrado ser exitosa para guiar el aislamiento de compuestos bioactivos de extractos de plantas, sin embargo, se pueden mejorar las cualidades de esta metodología cuando se combina con quimiometría (Arumugam *et al.*, 2012).



1-metoxi-[1,3]benzodioxolo[5,6-c]fenantridin-2-ol (Decarina)



N-isobutil-(2E,4E)-2,4-tetradecadienamida

Figura 9. Compuestos con actividad antituberculosa, aislados de la planta *Zanthoxylum capense* Thunb.(Rutaceae) con una MIC de 1.6 $\mu\text{g/mL}$. Fuente: (Luo *et al.*, 2013).

Algunas de las ventajas que nos ofrece el uso de la quimiometría es que se requiere una menor cantidad del material vegetal, menos disolventes, un menor tiempo de trabajo y por lo tanto es de menor costo, además de que se pueden detectar los metabolitos responsables de la actividad biológica y conocer la naturaleza de los metabolitos bioactivos en los extractos de plantas (Alvarez-zapata *et al.*, 2015; Kubova *et al.*, 2017; Walicová *et al.*, 2017).

2.10. Quimiometría

Durante muchos años, el análisis multivariado se ha utilizado en diversas áreas, como informática, ingeniería, farmacia, química entre otras, para la reducción de un conjunto de datos de interés. En farmacología, ha contribuido al desarrollo de nuevos fármacos, sus formas farmacéuticas y la fabricación de estos (dos Santos *et al.*, 2018); otra área en la que se aplica el análisis multivariante es en química (Cornejo-Báez *et al.*, 2020), y recibe el nombre de "quimiometría" debido a que se realiza utilizando datos provenientes de sistemas químicos (Brereton, 2014).

El término "quimiometría" fue introducido por Svante Wold en 1971, más tarde, en 1974, junto con Bruce Kowalski, lanzaron *Sociedad Internacional de Quimiometría* (International Chemometrics Society) (Bansal *et al.*, 2014), quien definió a la quimiometría como *-la ciencia de relacionar las mediciones realizadas en un sistema o proceso químico con el estado del sistema mediante la aplicación de matemáticas y métodos estadísticos-* (Brereton, 2014; C. Q. Li *et al.*, 2019). Desde entonces, la quimiometría se ha desarrollado rápidamente y se ha aplicado ampliamente en las áreas de la química (Kumar *et al.*, 2014). Actualmente, hay disponibles varios softwares comerciales para análisis multivariados y quimiometría, como AM IX-TOOLS (Bruker BioSpin, GmbH, MA, EE. UU.), Matlab con la herramienta de estadísticas x (MathWorks, Natick, MA, EE. UU.), Minitab (Minitab, State College, PA, EE. UU., Pirouette (Info-metrix, Bothell, WA, EE. UU.), SIMCA-P (Umetrics, Umeå, Suecia), SPSS (SPSS, Chicago, IL, EE. UU.) Unscrambler (software CAMO, Woodbridge, NJ, EE. UU.). Además, hay muchos programas gratuitos para análisis multivariados, como Chemostat, Metaboanalyst, R (cran), entre otros, aunque este último requiere una programación previa (Alvarez-Zapata *et al.*, 2015; Cornejo-Báez *et al.*, 2020).

El análisis de datos multivariantes implica el análisis de datos que consisten en numerosas variables medidas a partir de una serie de muestras. El objetivo del análisis de datos multivariados es determinar todas las variaciones en el estudio de la matriz de datos. Por lo tanto, las herramientas quimiométricas tratan de encontrar las relaciones entre las muestras y las variables en un conjunto de datos dado y convertirlas en nuevas variables latentes. El análisis de datos multivariados se clasifica principalmente en

Capítulo 2. Antecedentes

métodos de regresión multivariante y de calibración multivariable basados en la complejidad de los datos (Kumar *et al.*, 2014). El reconocimiento de patrones por medio del análisis estadístico multivariado se puede dividir en dos categorías: supervisado y no supervisado. El reconocimiento de un patrón no supervisado se utiliza para la visualización de datos mediante la observación de la relación entre las muestras y las variables con ninguna clase predeterminada. Se utiliza generalmente como un paso principal a fin de controlar un grupo de muestras (Yudthavorasit *et al.*, 2014).

La quimiometría ha resuelto muchos problemas analíticos en la ciencia farmacéutica, por ejemplo, en cuanto a la autenticidad de las hierbas medicinales, el análisis de centros quirales de medicamentos, la identificación de medicamentos falsificados etcétera (Monakhova *et al.*, 2017). Los métodos quimiométricos que se usaron en este estudio fueron el Análisis de Componentes Principales (PCA) y las Proyecciones Ortogonales a las Estructuras Latentes (O-PLS), ya que estas técnicas han proporcionado excelentes resultados en la detección y caracterización de metabolitos bioactivos (Charles and Alamsjah, 2019; Xia *et al.*, 2019), sin embargo, antes de llevar a cabo el análisis quimiométrico se debe de realizar un pretratamiento de datos con el fin de eliminar el ruido de este análisis.

2.10.1. Pre-tratamiento de los datos: Teoría

Es preciso realizar la corrección de la línea base y la alineación de los picos de los cromatogramas con el fin de evitar las interferencias en el análisis quimiométrico. Para esto se usa el programa MATLAB, el cual utiliza dos algoritmos.

El algoritmo adaptive iteratively reweighted Penalized Least Squares (airPLS) que no requiere ninguna intervención del usuario e información previa; el método funciona cambiando de forma iterativa los pesos de los errores de suma de cuadrados (SSE) entre la línea base ajustada y las señales originales, y los pesos de los SSE se obtienen de forma adaptativa utilizando la diferencia entre la línea base ajustada previamente y las señales originales. El estimador de referencia es rápido y flexible. El algoritmo se implementa en lenguaje R y MATLAB™, que está disponible como software de código

Capítulo 2. Antecedentes

abierto (<http://code.google.com/p/airpls>) (Zhang, Chen and Liang, 2010; Engel *et al.*, 2013). Por otro lado, el algoritmo *Correlation Optimized Warping (COW)* es un método clásico de deformación en alineación. Alinea dos cromatogramas por estiramiento lineal y compresión en la unidad de segmento. El procedimiento de alineación de COW consiste principalmente en tres pasos clave: primero cortar el cromatograma en segmentos, y luego estirar y desplazar linealmente los puntos a lo largo del eje de tiempo, y finalmente calcular el coeficiente de correlación entre el cromatograma de referencia y el cromatograma de prueba después de la alineación (Engel *et al.*, 2013; Alvarez-Zapata *et al.*, 2015). COW está disponible como algoritmo de uso libre en http://www.models.life.ku.dk/DTW_COW?fbclid=IwAR2gyLzwp0P6RdQJ_oboS6FkH6KzeD6HezS3fG5I3wgAmC1cN5_UAyTVexo

Para el pretratamiento de los datos de $^1\text{H-NMR}$ se usa el software MestRenova, en el cual, se busca normalizar las señales alineando la línea base, apodizando se debe poner una señal conocida como referencia (es decir, TMS) y el desplazamiento de frecuencia es ajustado a 0.0 ppm (McKenzie *et al.*, 2011). Finalmente, otro paso importante de pretratamiento de datos es la transformación de datos, donde la variabilidad de la información deseada se maximiza mientras que la información no deseada se minimiza. Los perfiles de cromatograma se pueden organizar en una matriz de datos $X = n \times p$, donde los n son los objetos (muestras) constituyen las filas y las p son las variables (puntos de tiempo de medición), las columnas. El centrado de columna (para eliminar la media de columna de cada elemento de columna correspondiente), la escala de Pareto (para igualar la contribución de diferentes variables asignando diferentes pesos a cada variable y la normalización de rango (calculando la diferencia entre cada elemento de una fila y el elemento mínimo de la misma fila y dividiendo el resultado con el obtenido de la diferencia entre los elementos máximo y mínimo de esa misma fila) se usan comúnmente para transformar datos (Nagar *et al.*, 2015).

2.10.2. Análisis de Componentes Principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica estadística de análisis multivariado no supervisado que permite que la información contenida en un conjunto de p variables “*loadings*” de interés se seccione en nuevas variables independientes. Cada una explica una parte específica de la información y a través de una combinación lineal a partir de las variables originales es posible resumir la información en unos pocos componentes que reducen la dimensión del problema (Arumugam *et al.*, 2012). El PCA es un algoritmo matemático que reduce los datos multidimensionales a un sistema de coordenadas que permite una interpretación gráfica de estos (Kasote *et al.*, 2014). La distribución espacial de las muestras se puede observar en una parcela de puntuación (*score plot*) donde muestras similares se agrupan juntas y muestras diferentes caen más separadas (Esbensen and Geladi, 2009) .

Los datos para el PCA deben ser recogidos en una matriz de dos vías o matriz, llamada X , en la que los vectores de columna representan "variables" (por ejemplo, atributos, longitudes de onda, tiempo de retención, parámetros físicos/químicos, valores de toxicidad, y respuestas biológicas), y la fila de los vectores representan "objetos" para el que se miden estas variables (Tistaert *et al.*, 2009). De esta forma el PCA reduce el número de variables y permite la visualización de la información incluida en la matriz (Ecuación 1).

$$X = n \times p \quad (1)$$

Por combinaciones lineales de las variables originales, PCA produce las llamadas variables latentes o componentes principales (PC), de tal manera que describen la mayor variación posible en X . Los gráficos de *score plot* (Figura 9) dan información respecto a la (des) similitud de los objetos, por ejemplo, sobre su tendencia de agrupamiento, mientras que los *loading plots* proporcionan información sobre la contribución de las variables originales (Tistaert, Dejaegher and Heyden, 2011).

Capítulo 2. Antecedentes

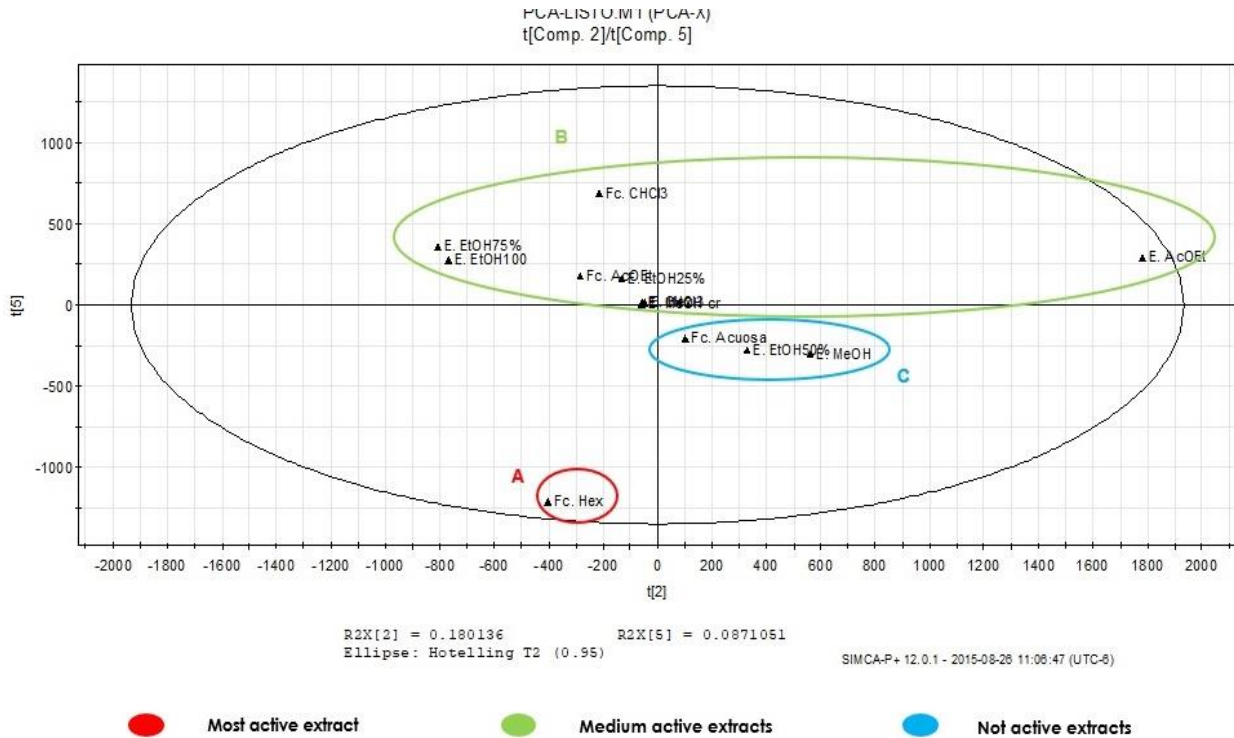


Figura 10. Score plot de PCA, claramente se puede ver la agrupación de las muestras Fuente:(Cornejo Báez and Sánchez Medina, 2016)

2.10.3. Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) y Proyecciones Ortogonales a las Estructuras Latentes (O-PLS).

Las proyecciones parciales de mínimos cuadrados a estructuras latentes (PLS), son una técnica ampliamente utilizada con gran poder de predicción, pero la interpretación de los coeficientes de regresión del modelo puede ser complicada para las muestras biológicas complejas debido a la modelización de pequeñas variaciones ortogonales en la matriz de datos X (Galindo-Prieto, Eriksson and Trygg, 2015). PLS es una técnica de regresión para modelar la relación entre dos bloques de datos (X y Y) que maximizan la covarianza cuadrada X-Y. PLS es muy útil para el modelo de interpretación, pero también para predecir Y de X (Souihi *et al.*, 2015; Ortiz-Herrero *et al.*, 2019).

Las proyecciones ortogonales a estructuras latentes (O-PLS) son una extensión de PLS, el objetivo es dividir la variación sistemática en el bloque X en dos partes, una que modela la correlación entre X e Y (predictivo) y otra que muestra la variación sistemática

Capítulo 2. Antecedentes

de X no relacionada (ortogonal) a Y (Tistaert, Dejaegher and Heyden, 2011). En O-PLS, estas variaciones ortogonales se eliminan de la matriz de datos antes de la construcción de un modelo PLS de un componente (Tistaert *et al.*, 2011). Esto mejora la interpretabilidad del modelo al tiempo que preserva su poder. Ambos métodos incluyen la construcción de un modelo de regresión que maximiza la covarianza entre las cargas del descriptor y la respuesta. Las cargas del descriptor en esos componentes especifican el origen de esta no correlación, también llamada variación ortogonal. La variación correlacionada con la respuesta puede ser interpretada por las cargas en el componente predictivo del modelo O-PLS (Trygg and Wold, 2002; Souihi *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017).

La calidad de un modelo O-PLS se describe mediante el valor R^2Y , es decir, la correlación entre los valores observados y pronosticados para la respuesta estudiada, y el valor Q^2 , es decir, la correlación entre lo observado y la validación cruzada de la respuesta predicha. Cuanto mayor sea el valor de R^2Y y Q^2 , mejor será la respuesta que se puede describir y predecir en función de las cargas del descriptor, respectivamente (Galindo-Prieto, Eriksson and Trygg, 2015). Además, O-PLS proporciona una interpretación de modelo superior al separar la variación sistemática contenida en la matriz de datos X en dos partes, una parte predictiva que se correlaciona con Y y una parte ortogonal que no se correlaciona con Y (Cardoso-Taketa *et al.*, 2008).

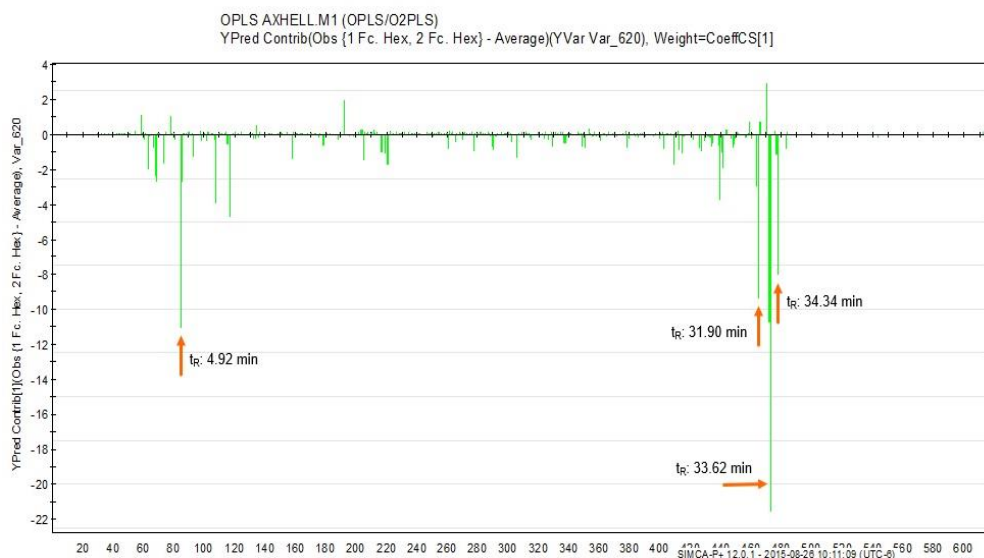


Figura 11. Gráfico de O-PLS, obtenido de los perfiles cromatográficos de extractos de plantas; los picos hacia abajo representan los metabolitos bioactivos. Fuente: (Cornejo Báez and Sánchez Medina, 2016)

2.11. Quimiometría aplicada al estudio de PNs

La OMS aceptó el análisis de huellas dactilares (*fingerprints*) como una metodología para la evaluación de productos naturales. Un *fingerprint* puede definirse como un perfil característico que refleja la composición química compleja de cualquier muestra analizada, y puede obtenerse mediante técnicas espectroscópicas, cromatográficas o electroforéticas (Cardoso-Taketa *et al.*, 2008; WHO, 2018b).

Se han propuesto varias técnicas para el análisis químico de las plantas medicinales y cualquier PN, entre estas incluyen la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) combinada con espectrometría de masas (MS) y/o espectrofotometría de detección UV-Vis, cromatografía de gases (GC), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrofotometría, espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS), cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC), movilidad iónica (MS), electroforesis capilar (CE), ensayos colorimétricos. La técnica analítica de HPLC es la más popular para el análisis de productos a base de hierbas y extractos de fuentes naturales. Es una herramienta fácil de usar, técnica totalmente automatizada con alta resolución, selectividad y sensibilidad. Una de las principales ventajas de HPLC es la posibilidad de acoplar la técnica a diferentes detectores, uno de los detectores más utilizados en HPLC es el detector ultravioleta (UV) y la detección de matriz de diodos (DAD) para compuestos absorbentes de UV (Gad *et al.*, 2013). Cabe mencionar que algunos compuestos alifáticos no absorben luz UV, debido a la ausencia de cromóforos tales como anillos aromáticos, dobles enlaces, y otros sistemas conjugados (Georgiev *et al.*, 2011). Por otra parte, la aplicación de RMN para el análisis de plantas ha sido ya demostrada como un método adecuado y suficiente para llevar a cabo este tipo de análisis, ya que permite la detección simultánea de diversos grupos de metabolitos secundarios y de abundantes metabolitos primarios (Alaerts *et al.*, 2010; Kim, Choi and Verpoorte, 2010; Mendiola *et al.*, 2010). Además, la espectroscopia de ^1H RMN posee una gran ventaja sobre las otras técnicas, la intensidad de la señal es dependiente sólo de la concentración molar en la solución, lo que permite la directa comparación de las concentraciones de todos los compuestos presentes en la muestra sin curvas de calibración para cada compuesto individual (Brusotti, G., Cesari, I. Dentamaro, A., Caccialanza, G., & Massolini, 2014).

Capítulo 2. Antecedentes

El perfil metabólico de una planta nos proporciona una herramienta importante para la identificación de compuestos químicos y blancos de compuestos bioactivos que se encuentran presentes en plantas medicinales. A través de un análisis general de extractos crudos, es posible discriminar especímenes de plantas activas y no activas de las mismas especies que se encuentran en diferentes lugares o que exhiben diversas variables. El análisis cromatográfico de *fingerprints* permitiría una evaluación más amplia de las muestras, especialmente cuando todos los picos no son cuantificables, y resaltaría pequeñas diferencias entre muestras que no pueden determinarse mediante la cuantificación de compuestos individuales, tales *fingerprints* combinados con el pretratamiento de los datos (es decir, la alineación de los picos, la eliminación del ruido de fondo y la normalización), permiten un enfoque alternativo para comparar el perfil cromatográfico completo, utilizando técnicas quimiométricas (Alaerts *et al.*, 2010; Cornejo-Báez *et al.*, 2020).

Las técnicas quimiométricas también se han aplicado en la estandarización y el control de calidad de las plantas medicinales de uso comercial (Mendiola *et al.*, 2010; Rózańska, Dymerski and Namieśnik, 2018; Sereshti *et al.*, 2018). Existen diversos métodos analíticos y quimiométricos para la estandarización de la calidad e identificación de los adulterantes en los suplementos a base de hierbas y alimentos (Moon *et al.*, 2018; Deconinck *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019), para la evaluación de la autenticidad de los materiales vegetales en remedios herbales y otros extractos (Lucio-Gutiérrez *et al.*, 2019) y para la detección de plantas reguladas en los suplementos a base de hierbas (Deconinck *et al.*, 2019; Mukherjee, 2019); dado que los extractos de hierbas son complejos y a menudo incluyen cientos o miles de compuestos, la quimiometría proporciona un medio para comprender su composición química, que es esencial para las evaluaciones de riesgos de seguridad. La quimiometría ha demostrado ser útil para la producción y estandarización de los extractos de plantas cuando es requerida una cierta concentración de algún metabolito de interés (Sharma *et al.*, 2012; Schulze *et al.*, 2014; Hidalgo *et al.*, 2018; H. Li *et al.*, 2019; L. Hu *et al.*, 2019) y para determinar el contenido de algún metabolito en específico (Sharma *et al.*, 2012; Fadil *et al.*, 2017). Además, la quimiometría se usa ampliamente en la clasificación taxonómica de plantas, de sus diferentes variedades y en la clasificación según su origen geográfico (Maisuthisakul, Pasuk and Ritthiruangdej, 2008; Qi *et al.*, 2011; Watkins *et al.*, 2012;

Capítulo 2. Antecedentes

Bapela, Meyer and Heyman, 2015; Miao *et al.*, 2016; Huo *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Mandrone *et al.*, 2018; Sridhar and Charles, 2018; Banerjee *et al.*, 2019; Figueiredo *et al.*, 2019); para la evaluación de la variabilidad química entre diferentes poblaciones de plantas una misma especie o género (Watkins *et al.*, 2012); para evaluar y clasificar los metabolitos presentes en las plantas de acuerdo con la actividad biológica que presenten (Nguyen Hoai *et al.*, 2009).

2.12. Quimiometría para la caracterización de PNs bioactivos a partir de fuentes naturales

Las técnicas quimiométricas se pueden usar como una estrategia complementaria para la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en fuentes naturales, (Tistaert *et al.*, 2009, 2012). Los metabolitos secundarios son un subconjunto del metaboloma de las plantas, son ese grupo de moléculas pequeñas separadas de los metabolitos primarios que son requeridos para la vida en todos los organismos (Li *et al.*, 2020). La metabolómica tiene como base la quimiometría y recientemente se ha discutido la aplicación de la metabolómica al descubrimiento de fármacos y la comprensión de los mecanismos de acción de las plantas medicinales con actividades biológicas, ya que el perfil metabólico proporciona el potencial para determinar el mecanismo de acción de extractos o aislados de plantas medicinales, así como para determinar los compuestos activos de diferentes plantas con la misma actividad biológica (Tuyiringire *et al.*, 2020)

En 2009, Nguyen y colaboradores analizaron los *fingerprints* de varias especies de *Mallotus* por medio de HPLC y evaluaron su capacidad antioxidante utilizando la actividad del depurador del radical 1,1-difenil-2picrylhidrazilo (DPPH). Utilizando técnicas quimiométricas, como PCA y PLS, la actividad antioxidante observada se correlacionó con los picos observados en los *fingerprints* de HPLC, revelando los picos responsables de la actividad antioxidante (Nguyen Hoai *et al.*, 2009). Luego, Tistaert y sus colaboradores aplicaron y evaluaron varias técnicas de calibración multivariadas a los *fingerprints* de *Mallotus* para buscar la mejor técnica que indicara los picos responsables de la actividad antioxidante. Analizando un conjunto de datos que contenían los *fingerprints* de HPLC de 39 muestras de *Mallotus* y se evaluó su actividad antioxidante. Los autores concluyeron que el O-PLS es la técnica de mejor rendimiento para indicar

Capítulo 2. Antecedentes

los compuestos antioxidantes en los extractos de *Mallotus* debido a su simplicidad y reproducibilidad (Tistaert *et al.*, 2009, 2012). Por otra parte, Gao y colaboradores, evaluaron la actividad antiproliferativa de extractos de raíces de *Scutellaria baicalensis* en la línea celular de pulmón humano SK-MES-1. A partir de los perfiles químicos de HPLC y ¹H-NMR de los extractos de *S. baicalensis* combinados técnicas quimiométricas como el PCA y PLS, los autores mencionan que identificaron 3 compuestos: la baicalina, la baicaleína y wogonina como los compuestos responsables de la actividad de inhibición del crecimiento celular de los extractos (Gao *et al.*, 2010).

Algo importante que se debe de tener en cuenta es el concepto de “metabolómica”, que es usada para identificar y cuantificar metabolitos de bajo peso molecular y para producir perfiles de metabolitos que reflejen el estado de un sistema biológico de interés (Wolfender *et al.*, 2019). La metabolómica mide los cambios en las concentraciones relativas de los metabolitos como resultado de factores internos o externos y, por lo tanto, puede identificar las interacciones que ocurren entre sistemas biológicos, fármacos y enfermedades (Dewi *et al.*, 2013). Sin embargo, la metabolómica se basa en técnicas quimiométricas, porque las utiliza para comprender la variabilidad en los sistemas biológicos. En general, el papel de las herramientas ‘ómicas ahora se reconoce plenamente como una estrategia poderosa para la priorización de los PNs con actividad biológica (Bapela *et al.*, 2019).

Un ejemplo de esta metodología fue desarrollado por (Sharma *et al.*, 2012) quien comparó los perfiles metabólicos de ¹H-NMR de diferentes extractos de *Galphimia glauca*. Después de un análisis quimiométrico utilizando PLS-DA y los datos de la evaluación de las actividades ansiolíticas, sedantes y antiinflamatorias de los extractos, pudieron correlacionar las galfiminas con la actividad sedante de la planta. Los resultados respaldaron la eficacia de ¹H-RMN y la quimiometría para la determinación de PN bioactivos. Por otro lado, (Dewi *et al.*, 2013) estudiaron la correlación de las señales obtenidas por RMN de los metabolitos presentes en extractos de *Boesenbergia rotunda* con el objetivo de identificar los compuestos que se correlacionaban con la actividad de unión al receptor de adenosina A1. El análisis de O-PLS predijo que dos compuestos previamente reportados en esta planta, la pinocembrina y la hidroxipanduratina fueron los responsables de la unión al receptor A1. Con estos resultados, los autores

Capítulo 2. Antecedentes

manifestaron que la identificación de compuestos bioactivos de extractos de plantas usando $^1\text{H-RMN}$ y HPLC apoyados en las técnicas quimiométricas es más eficiente que el uso del fraccionamiento guiado por bioensayo. Otro ejemplo, es el de Bapela y sus colaboradores que evaluaron la actividad antiplasmodial de extractos de 20 especies de plantas, seguido de un análisis por PCA de los espectros de $^1\text{H-RMN}$ el cual no mostró un patrón de agrupación de las muestras de acuerdo con su actividad biológica, sin embargo, la aplicación del O-PLS a los perfiles de $^1\text{H-RMN}$ dio como resultado un patrón de discriminación que se correlacionó con la actividad biológica. De estos resultados, dos alcaloides indólicos con actividad antiplasmodial fueron identificados de *Tabernaemontana elegans*, además, se aislaron friedelina y morindolida de *Vangueria infausta* subsp. *Infausta* (Bapela *et al.*, 2019).

Otra aplicación interesante de la quimiometría, pero escasamente utilizada, es para caracterizar los PNs. Un ejemplo de ello es el realizado por (Alvarez-Zapata *et al.*, 2015); que evaluaron la actividad leishmanicida de los extractos y fracciones de *Colubrina greggii*, y se obtuvieron los *fingerprints* mediante HPLC-UV. Los datos se analizaron usando PCA y O-PLS y los resultados mostraron los tiempos retención (t_R) de los compuestos químicos responsables de la actividad leishmanicida. Estos datos se usaron para guiar la purificación final por HPLC semipreparativa de dos componentes ($t_R= 48.7$ y 49.5 min, respectivamente). La evaluación adicional *in vitro* de estos confirmó que eran los compuestos responsables de la actividad biológica, además, estos picos eran los componentes minoritarios de la planta. Por lo tanto, los autores concluyeron que la quimiometría es una herramienta valiosa para mejorar y guiar el aislamiento de PN bioactivos, incluso cuando son compuestos minoritarios (Bansal *et al.*, 2014; Brereton *et al.*, 2017; Li, Y., Shen, Y. Yao, C. & Guo, 2020).

Es importante mencionar que, en un estudio realizado previamente, se evaluó la actividad antituberculosa de los extractos de dos plantas nativas del estado de Veracruz: *B. pilosa* L. y *X. flexuosum* (H. B. & K.) Hemsl, los extractos hexánicos mostraron la mejor actividad con una MIC de 190 y 250 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, además, se determinó por medio de un análisis quimiométrico de los perfiles de HPLC a los picos responsables de la actividad antituberculosa (Cornejo Báez and Sánchez Medina, 2016).

Capítulo 2. Antecedentes

Por los argumentos anteriores, se propone el uso de la quimiometría como una herramienta complementaria para la caracterización de PNs bioactivos. En una publicación reciente producto de este trabajo de investigación se propuso el siguiente diseño experimental para llevar a cabo.

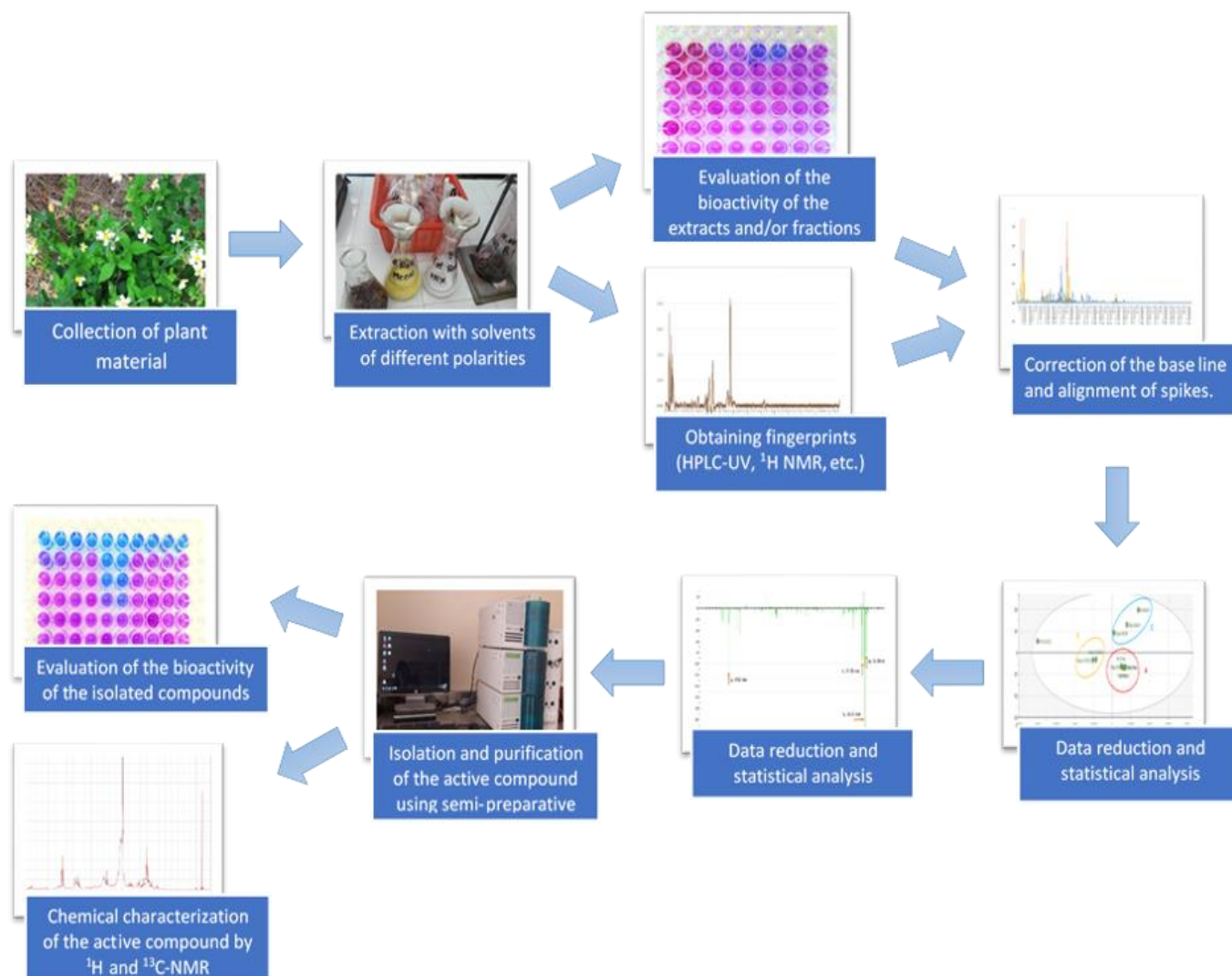


Figura 12. Diseño experimental para guiar la caracterización de PNs bioactivos por medio de quimiometría. Fuente: (Cornejo-Báez et al., 2020).

3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Cada año se registran más de 10.0 millones de nuevos casos de tuberculosis y 1.4 millones de muertes a nivel mundial, por lo que esta enfermedad se ubica como la primera causa de muerte en el mundo respecto a enfermedades infecciosas. El tratamiento actualmente disponible requiere de mínimo 6 meses, causando múltiples efectos secundarios tales como náuseas, vómito, ototoxicidad, neurotoxicidad, hepatotoxicidad etc., esto conlleva a que los pacientes abandonen el tratamiento antes de finalizarlo, lo que propicia la aparición de cepas de *Mtb*-MDR, que requieren de un tratamiento más largo y tóxico. Por estos motivos, se necesitan más fármacos con actividad antimicobacteriana y los PN representan una excelente fuente para la búsqueda y desarrollo de nuevas moléculas con actividades biológicas. Se estima que más de la mitad de los fármacos que actualmente se encuentran en el mercado provienen de un PN o tienen como estructura base un PN. Para la identificación y caracterización de PN con actividad biológica se propone el uso de la quimiometría. Esta técnica cuenta con varias ventajas, entre las que destacan el uso de una pequeña cantidad de material vegetal, menos cantidad de disolventes, menor complejidad y requiere de un menor tiempo de trabajo, lo cual aminora los costos. Además, se obtienen los perfiles químicos de las plantas, lo que es muy importante, ya que actualmente varias especies se encuentran en peligro de extinción, como es el caso de *X. flexuosum*.

Por estos motivos, en el presente trabajo de tesis se realizó una serie de extracciones de cada parte de *Bidens alba* y *Xylosma flexuosum*, se determinó su actividad antituberculosa por medio del ensayo MABA y realizar el análisis quimiométrico, con estos datos, a la planta más activa se le realizó un fraccionamiento y se obtuvo nuevamente el espectro de ^1H -RMN, con el cual se pudo realizar la caracterización de los protones presentes en los metabolitos responsables de la actividad antituberculosa.

4. HIPÓTESIS

El análisis quimiométrico nos permite caracterizar los metabolitos con actividad antituberculosa presentes en *Bidens alba* (L.) DC ó *Xylosma flexuosum* H.B & K. Hemsl.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar por medio de técnicas quimiométricas a los metabolitos responsables de la actividad antituberculosa de plantas nativas del estado de Veracruz.

5.2. Objetivos particulares

- Obtener los perfiles cromatográficos por HPLC-UV de cada extracto y fracción de *B. alba* y *X. flexuosum*.
- Determinar la MIC contra *M. tuberculosis* H37Rv mediante el ensayo de MABA.
- Realizar el análisis quimiométrico de los perfiles de HPLC de los extractos y fracciones de ambas plantas.
- Efectuar el análisis quimiométrico de ¹H-RMN de los extractos y fracciones de la planta más activa.
- Llevar a cabo la caracterización por medio de ¹H-RMN de las fracciones más activa.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Colecta del material vegetal y obtención de los extractos

La colecta del material vegetal se realizó en el mes de octubre de 2016. *X. flexuosum* se colectó en el municipio de Xalapa en el santuario el bosque de la niebla ubicado en la carretera antigua a Coatepec con coordenadas 19° 30' 44.8" N y 96° 56' 15.5" W a 1337 msnm. *B. alba* se colectó en la congregación de Otilpan el municipio Tlalnehuayocan con coordenadas 19° 33' 29.4" N y 96° 58' 30.0" W a 1560 msnm. La identificación taxonómica la realizó el Dr. Edison Francisco Nicolalde Morejon en el Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana, para lo cual se dejó un ejemplar de herbario en el Centro de Investigaciones Biológicas de la UV registrado con el número de boucher 20567UV.

6.2. Acondicionamiento del material vegetal

Una vez colectado el material vegetal se dejó secar a temperatura ambiente, en la sombra y con una adecuada ventilación para impedir la aparición de hongos. Una vez secas se etiquetaron y se colocaron en bolsas con cierre hermético.

6.3. Obtención de los extractos y fracciones

Las extracciones de las plantas se llevaron a cabo de la siguiente manera: de *B. alba* se realizó una extracción de las flores, tallos, hojas y de la raíz. De *X. flexuosum* se realizó una extracción de las hojas, ramas y parte aérea.

6.3.1. Obtención de los extractos crudos metanólicos y hexánicos de *B. alba* y *X. flexuosum*

Se molió finamente el material vegetal seco en una licuadora industrial. Se pesaron 25 g de material vegetal de cada parte de las plantas y se le adicionaron 250 mL de MeOH al 100%, también se pesaron 25 g del material vegetal de cada parte de

Capítulo 6. Materiales y método

la planta y se le adiciono 250 mL de hexano; se extrajeron por sonicación (Ultrasonido Cole- Parmer 8891) durante 40 min, dos veces. Una vez obtenido los extractos, se evaporó el disolvente en un rotavapor (Buchi B-480) y se secó por liofilización. Este procedimiento fue realizado de la misma manera para ambas plantas (Figura 12).

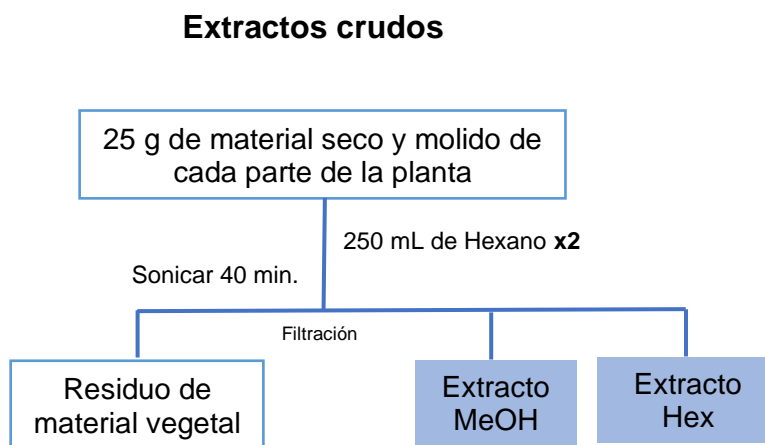


Figura 13. Técnica de para la obtención de los extractos metanólicos y hexánicos crudos de *B. alba* y *X. flexuosum*.

6.3.2. Partición del extracto metanólico con disolventes de polaridad ascendente de *B. alba* y *X. flexuosum*

Para realizar la partición, se pesó 1 g del extracto MeOH crudo de cada planta y se resuspendió en 250 mL de una solución de MeOH/H₂O a una concentración 1:9 usando sonicación. Una vez homogenizado, se le adicionó 400 mL de Hex y se colocó en agitación magnética a 650 r.p.m. (Corning PC-620D) durante 20 min. Se recupero la fase orgánica y el residuo acuoso fue sometido al fraccionamiento con CH₂Cl₂ y al final se obtuvo la fase acuosa, la cual no fue contemplada en estos análisis. Se realizaron dos extracciones con cada disolvente. Una vez obtenidas las fracciones se eliminó el exceso de disolvente empleando un rotavapor (Buchi B-480) y posteriormente se secó por liofilización.

Capítulo 6. Materiales y método

Partición con disolventes de polaridad ascendente

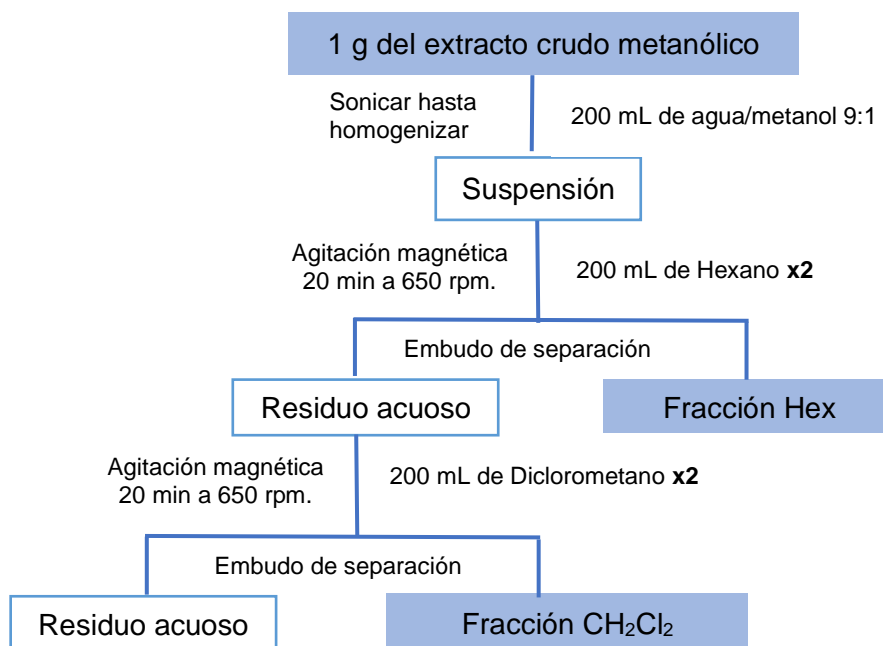


Figura 14. Técnica usada para la partición del Ext MeOH de *B. alba* y *X. flexuosum* con disolventes de polaridad ascendente.

6.4. Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

6.4.1. Equipo de HPLC-UV

La separación cromatográfica se llevó a cabo en un equipo de HPLC *Varian ProStar* con detector de arreglo de diodos UV-DAD utilizando una longitud de onda de 210 y 285 nm. La columna cromatográfica utilizada fue de la marca Thermo ODS Hypersil (250 mm x 4.6 mm) Particle Size: 5 μ . Los análisis se efectuaron a temperatura ambiente.

6.4.2. Preparación de las soluciones de trabajo

Se pesaron 10 mg/mL de cada uno de los extractos a evaluar y se disolvieron con ayuda de vortex (Fine Vortex, Fine PCR, Daigger®) y sonicación (Ultrasonido Branson 2510) en 1 mL de una mezcla de agua: metanol a una concentración de 7: (hasta formar una mezcla homogénea. Después se preparó una mezcla 1:1 de acetonitrilo (Tedia) y ácido fórmico (Sigma Aldrich) al 0.01%, posteriormente a los extractos de 10 mg/mL se les hicieron diluciones seriadas hasta 1:4 con la mezcla de acetonitrilo:ácido fórmico (1:1), para obtener una concentración de 2.5 mg/mL. Finalmente se filtró la solución de trabajo utilizando los filtros (Thermo Scientific, Titan 3, Nylon Membrane 0.45 µm) y se inyectó 20 µL de la solución de trabajo al equipo HPLC.

Para la fase móvil se preparó el ácido fórmico al 0.01% agregando 100 µL de ácido fórmico en 1 L de agua Milli Q. El ácido fórmico al 0.01% y el acetonitrilo se filtraron cada tercer día para eliminar cualquier suciedad en estos en un sistema de filtración con vacío. Y posteriormente se sometieron a sonicación para desgasificar la fase móvil. El ácido fórmico se deja en sonicación durante 30 min y el acetonitrilo por 25 min.

6.4.3. Condiciones cromatográficas

Se prepararon 2.5 mg/mL de cada uno de los extractos de *B. alba* y *X. flexuosum*. La separación cromatográfica se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: el volumen de inyección para las muestras y diluciones de curva de calibración fue de 20 µL, con un flujo de 1 mL/min. La fase móvil estuvo compuesta por una solución de ácido fórmico al 0.01% (Sigma Aldrich) y acetonitrilo (Tedia). Se utilizó el gradiente de elución de la tabla 3. Las longitudes de onda UV de detección fueron de 210 y 285 nm. Todos los análisis se llevaron a cabo por duplicado.

Capítulo 6. Materiales y método

Tabla 3. Gradiente de elución HPLC.

Tiempo (min)	Fase móvil A* (%)	Fase móvil B** (%)
0-3	90	10
3-20	76.5	23.5
20-60	68.5	31.5
60-83	60	40
83-90	0	100
90-92	90	10

*Ácido fórmico 0.01% **Acetonitrilo

6.5. Determinación de la actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv de los extractos y fracciones de *B. alba* y *X. flexuosum*

La evaluación de la actividad antituberculosa se llevó a bajo la metodología del Ensayo de Azul Alamar en Microplaca (MABA) descrito por (Palomino et al., 2002) utilizando una cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv que procede de la American Type Culture Collection (ATCC) sensible a todos los fármacos de primera línea.

6.5.1. Preparación de medios de cultivo

Para los ensayos se utilizó medio Middlebrook 7H9 enriquecido con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) (MDB 7H9 con OADC). Se pesaron 1.044 g de medio Middlebrook 7H9 (Sigma) para 200 mL de agua destilada y se le adicionaron 888µL de glicerol. Se esterilizó en autoclave por 10 minutos (121°C, 15 libras/pulgada²). Una vez que el medio estuvo a temperatura ambiente se suplementó con el medio de enriquecimiento OADC al 10%, se ajustó el pH a 6.6 ± 0.2 y se esterilizó por filtración (membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm).

6.5.2. Material biológico

La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv se sembró en 5 mL de medio Middlebrook 7H9 adicionado al 10% con Ácido oleico-Dextrosa-Catalasa (OADC) y se incubó a

Capítulo 6. Materiales y método

37°C hasta que la micobacteria alcanzó la fase logarítmica, (entre 2 y 3 semanas), una vez alcanzada esta fase se comenzó con los ensayos *in vitro*.

6.5.3. Preparación de Stocks de los extractos y fracciones

Se prepararon en viales de vidrio las soluciones stock con una concentración final de 10 mg/mL de los extractos y fracciones de ambas plantas, los cuales se disolvieron en Dimetilsulfóxido (DMSO), para ello se pesaron 10 mg del extracto o fracción en la balanza analítica y se disolvieron en 1000 µL de DMSO. Posteriormente se colocaron en vórtex y se sonicaron hasta solubilizar. Se dejó reposar las soluciones stock un mínimo de 4 horas para que el DMSO ejerciera su acción bactericida. Finalmente, se tomaron alícuotas de 200 µL en tubos eppendorf estériles de 0.5 mL.

6.5.4. Preparación de soluciones de trabajo

Se prepararon las soluciones de trabajo 4x= 800 µg/mL para todos los extractos y fracciones. Para ello, se agregaron 920 µL de medio de cultivo Middlebrook (MDB) 7H9 sin OADC en un vial de 1.5 mL. Posteriormente se adicionaron 80 µL del respectivo stock y se alicuotaron en viales eppendorf estériles los cuales se refrigeraron a 4°C.

6.5.5. Preparación del inóculo

Se recogieron las colonias de *M. tuberculosis H37Rv* con un asa bacteriológica desechable estéril y se colocaron en un frasco con 8 mL de solución salina estéril. Se colocó en vortex por 30 seg. a una velocidad de 1. Se dejó reposar durante 15 min y se tomó el sobrenadante con una pipeta pasteur desechable estéril, se transfirió la suspensión al vial del nefelómetro y se ajustó la turbidez al estándar 1 de la escala de McFarland (equivalente a 184-186 NTU). Posteriormente, se realizó una dilución 1:50 en medio (MDB 7H9 con OADC y así se obtuvo el inóculo bacteriano que se agregó en el ensayo de azul alamar en microplaca. El ensayo se realizó con los cultivos de las micobacterias cuando se encontraban en fase logarítmica, para esto el cultivo de

Capítulo 6. Materiales y método

las micobacterias se diluyó 1:10 en medio Middlebrook 7H9 adicionado al 10% con OADC, posteriormente en cada uno de los pozos que están dentro del recuadro azul (Figura 13) se colocaron 100 μL de dicha suspensión micobacteriana.

6.5.6. Determinación la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) mediante el ensayo en microplaca de azul alamar (MABA)

Para evaluar la actividad contra *M. tuberculosis* H37Rv, se utilizó el ensayo redox Azul Alamar™ (Cell Viability Reagent, Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) en microplaca (MABA), se llevó a cabo como se describe por (Franzblau *et al.*, 1998). El ensayo se realizó en placas de fondo plano de poliestireno de 96 pocillos con tapas de cubierta baja (Corning/Costar 3585), se añadieron 200 μL de agua destilada estéril a los pocillos perimetrales, y se añadió 100 μL de caldo de Middlebrook 7H9 suplementado con OADC a los pocillos restantes.

Posteriormente de la fila B2-B11 se agregaron 100 μL de las soluciones de trabajo, las cuales se evaluaron por duplicado. Después, en cada uno de los pozos que están dentro del recuadro azul se colocaron 100 μL de la suspensión micobacteriana. Utilizando una pipeta multicanal se homogenizó la solución y se realizaron diluciones seriadas 1:2 hasta la fila G y los 100 μL de la última dilución se desecharon, teniendo así concentraciones desde los 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y con un volumen final de 300 μL en cada uno de los pozos.

Se incluyeron 3 controles de crecimiento micobacteriano en el estudio, estos se muestran en la fila H, cada uno de estos controles se realizó por duplicado:

- ✓ Control del 100% de crecimiento: 100 μL de medio Middlebrook 7H9 más 100 μL de la suspensión micobacteriana.
- ✓ Control del 10% crecimiento: 190 μL de medio Middlebrook 7H9 más 10 μL de la suspensión micobacteriana.
- ✓ Control del 1% crecimiento: 199 μL de medio Middlebrook 7H9 más 1 μL de la suspensión micobacteriana.

Capítulo 6. Materiales y método

Como controles negativos (sin crecimiento de bacterias) se usaron 200 μL del medio de cultivo. Finalmente, Las placas se sellaron con Parafilm® y se guardaron en bolsas (permeable a CO_2) y se procedió a incubar las placas a 37°C de 4-5 días hasta que el crecimiento de los controles fuese el adecuado para el revelado y la lectura de la placa.

Una vez terminado el tiempo de incubación (4 a 5 días) se le agregó 20 μL del colorante azul alamar a cada uno de los pozos controles y de los pozos donde se analizaron los compuestos, las placas se incubaron nuevamente a 37°C por 24 horas.

Terminado este tiempo de incubación con el colorante azul alamar se procedió a la interpretación de los resultados, para esto se realizó una lectura en el fluorómetro en el cual se obtuvieron las unidades relativas de fluorescencia (RFU). Comparando los valores obtenidos de los pozos problema con los valores obtenidos en los pozos de los controles de 100%, 10% y 1% se obtuvo la MIC de cada compuesto analizado, estas lecturas se comprobaron de forma visual y se fotografió cada placa para tener un registro.

6.6. Pre-tratamiento de los datos de HPLC-UV

Una vez obtenidos los cromatogramas, se exportaron los datos de las unidades de absorbancia en formato Excel Microsoft Office ® para el pre-tratamiento de los datos. Posteriormente los datos se exportaron al software MATLAB para la corrección de línea base usando el algoritmo (airPLS), para la alineación de los picos se usó el algoritmo (COW) descritos anteriormente. Una vez concluido el pre-tratamiento de los datos fueron importados al software SIMCA versión 15.0.2, Umetrics, para llevar a cabo el Análisis de Componentes Principales (PCA) y las Proyecciones Ortogonales a las Estructuras Latentes (O-PLS). Para ambos análisis se decidió eliminar la tabla de picos de la muestra de hojas MeOH, ya que las hojas contienen mucha clorofila y esto causaba ruido en el análisis, además de que la muestra no presentó actividad en contra de *M. tuberculosis*.

6.7. Análisis Quimiométrico de los datos obtenidos por HPLC-UV

Para el análisis de componentes principales (PCA) la matriz de datos X consistió en 15 tablas de picos obtenidos de las absorbancias UV de los extractos de *B. alba* y en 12 tablas de picos de *X. flexuosum*. Para las proyecciones ortogonales a las estructuras latentes (O-PLS) se adicionó la variable Y, que fueron los valores de las MIC obtenidas en los ensayos in vitro en contra de *M. tuberculosis* de cada uno de los extractos y fracciones, los análisis se realizaron con el software SIMCA versión 15.0.2, Umetrics.

6.8. Análisis por Resonancia Magnética Nuclear de Protón (¹H-RMN) de los extractos y fracciones de *B. alba*

Se obtuvieron los espectros de ¹H-RMN de la planta con mayor actividad antituberculosa. Para ello, se pesaron 10.0 mg de cada uno de los extractos secos de *B. alba* y se disolvieron en 600 µL de CD₃OD (Sigma Aldrich) (99.8 %) y contiene 0.05% v/v TMS. Los espectros de ¹H-RMN se registraron en el espectrómetro de resonancia magnética nuclear Agilent Technologies Modelo DD2 a 25.0°C operando a una frecuencia de RMN de protón de 500 MHz. Cada espectro ¹H-RMN consiste en 128 escanes que requieren 8 minutos y 8 segundos de tiempo de adquisición con los siguientes parámetros: 0,16 Hz/punto, ancho de pulso (PW) = 3.850 ms, y tiempo de relajación (RD) = 1.000 s. Una secuencia de pre-saturación se utiliza para suprimir la señal de H₂O residual con baja potencia de irradiación selectiva a la frecuencia de H₂O durante el retardo de reciclaje. Se aplica transformada de Fourier sobre FIDs con LB = 0,3 Hz. Se realiza corrección de fase y línea de base de forma manual sobre los espectros resultantes, y se hace referencia al disolvente CD₃OD 3.31 ppm, utilizando el software MestReNova versión 12.0.

6.9. Pre-tratamiento de los datos obtenidos de ^1H -RMN de *B. alba*

Los espectros de ^1H -RMN se reducen automáticamente a archivos .csv. Se usó el software MestReNova para el pretratamiento de los datos. Se normalizaron las señales alineando la línea base y apodizando, posteriormente se pone como referencia una señal conocida, en este caso fue TMS a 0.0 ppm. El desplazamiento de la frecuencia es ajustado a 0.0 ppm. Las intensidades espectrales fueron normalizadas sobre las intensidades totales y se redujeron a regiones integradas de igual anchura (0.04 ppm) correspondiente a la región de $\delta = 0.0$ -10.0 ppm. Las regiones de $\delta = 4.80$ - 4.90 ppm y $\delta = 3.30$ - 3.32 ppm se excluyen del análisis debido a la señal residual de CD_3OD .

6.10. Análisis Quimiométrico de ^1H -RMN de la planta más activa

Para el PCA la matriz de datos X consistió en 15 tablas de picos para *B. alba*, obtenidas de los desplazamientos químicos de los compuestos existentes en dicha planta. Para el O-PLS se adicionó la variable Y que fueron las MIC obtenidas en los ensayos *in vitro* contra *M. tuberculosis*. Los análisis se realizaron con el software SIMCA versión 15.0.2, Umetrics.

6.11. Fraccionamiento cromatográfico de la Fc Hex de la raíz de *B. alba*

Debido a que la Fc Hex de la raíz de *B. alba* presentó la mejor actividad antituberculosa, se decidió realizar un fraccionamiento en columna. Para ello, se mezcló 1.7 g de la fc. Hex de *B. alba* con 5 g de silica y se mezcló perfectamente. Posteriormente se pesaron 40 g de silica y se resuspendió en 500 mL de hexano, se mezcló perfectamente. Se colocó un algodón compactado al final de la columna cromatográfica (de que largo y diámetro, marca) con la ayuda de una varilla de vidrio y se vertió la silica ya disuelta con el hexano, se eluyó 2 veces con el mismo disolvente y finalmente se agregó la mezcla de la fc. Hex con la silica y se selló con un algodón compactado. Se le agregaron 500 mL de hexano (volumen final), y se sacaron fracciones de 250 mL cada una. El sistema de elución que se utilizó fue el siguiente:

Capítulo 6. Materiales y método

Tabla 4. Gradiente de elución de cromatografía en columna de la Fc. Hex de *B. alba*.

% Hex	% AcOEt
100	0
95	5
90	10
85	15
80	20
75	25
60	40
40	60
0	100

Del proceso de fraccionamiento se obtuvo un total de 52 fracciones, las cuales se plaquearon mediante TLC (ver anexos), las que tenían las mismas manchas pertenecientes a compuestos similares se juntaron, de tal forma que se obtuvieron 14 fracciones en total (tabla 5), las fracciones 1, 2 3 y 4 se desecharon ya que no mostraron ninguna mancha en el TLC.

Tabla 5. Fracciones de *B. alba* con su clave asignada.

Fracciones de <i>B. alba</i>	
Fracción	Clave asignada
Fracción 5	1Ba
Fracción 6	2Ba
Fracción 7	3Ba
Fracción 8	4Ba
Fracción 9 y 10	5Ba
Fracción 11, 12 y 13	6Ba
Fracción 14, 15, 16, 17, 18 y 19	7Ba
Fracción 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26	8Ba
Fracción 27, 28, 29, 30 y 31	9Ba
Fracción 32, 33, 34, 35, 36, 37 y 38	10Ba
Fracción 39, 40, 41, 42 y 43	11Ba
Fracción 44, 45, 46, 47, 48 y 49	12Ba
Fracción 50, 51 y 52	13Ba

Capítulo 6. Materiales y método

6.11.1. Determinación de la MIC de las fracciones de *B. alba*

Para la determinación de la MIC se evaluó un total de 13 fracciones de *B. alba* y contra la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv a distintas concentraciones. Todas las fracciones fueron disueltas en DMSO a una concentración de 5 mg/mL y fueron evaluadas 3 veces, por duplicado intraensayo. La metodología empleada fue igual que en la sección 6.6.

6.11.2. Caracterización por ¹H-RMN de los metabolitos con actividad antituberculosa de la Fracción 8 de *B. alba*

Se realizó la caracterización de los metabolitos responsables de la actividad contra *M. tuberculosis* que se encontraban en la Fc 8, la cual resultó ser la Fc más activa de la raíz de *B. alba*. Se realizó por medio de ¹H -RMN bajo las mismas condiciones que se describen en la sección 6.8.2.

7. RESULTADOS

7.1. Rendimientos del material vegetal

La extracción del material vegetal seco se llevó a cabo por medio de sonicación. Se obtuvo un total de 12 extractos y fracciones de *X. flexuosum* y 16 extractos y fracciones de *B. alba*. Una vez teniendo todos los extractos de las dos plantas se liofilizaron para estabilizar las muestras.

En general todas las muestras dieron porcentajes de recuperación suficientes para las pruebas biológicas y para el análisis por HPLC y ¹H RMN, tomando en cuenta la pequeña cantidad de material vegetal empleado para cada extracción. En las siguientes tablas se proporcionan los gramos y los porcentajes de recuperación obtenidos de cada extracto. En la tabla 8 se muestran los porcentajes de recuperación de la extracción con hexano, como se puede observar los rendimientos son muy bajos, esto puede deberse a que la planta no posee muchos compuestos de baja polaridad.

Tabla 6. Porcentajes de recuperación resultantes de la extracción del material vegetal con hexano.

Planta	Parte de la planta	Extracto obtenido (g)	% de recuperación
<i>B. alba</i>	Flores	0.06	0.41
	Tallos	0.09	0.36
	Hojas	0.02	0.08
	Raíz	0.06	0.61
<i>X flexuosum</i>	Tallos	0.07	0.28
	Hojas	0.15	0.6
	Parte aérea	0.09	0.36

Por otra parte, los extractos metanólicos crudos son los que poseen un mayor rendimiento en ambas plantas (tabla 9), obteniendo un porcentaje de recuperación mayor de las flores en *B. alba* y de las hojas en *X. flexuosum* de 15.22% y 9.22% respectivamente, esto podría deberse a que las plantas tienen más compuestos polares que no polares.

Capítulo 7. Resultados

Posteriormente, los extractos metanólicos se fraccionaron con disolventes de polaridad ascendente, se obtuvieron buenos rendimientos con todos los disolventes. Por esto, se puede considerar que los rendimientos obtenidos con sonicación son óptimos al ser comparados con otras técnicas de extracción tales como la extracción soxhlet, percloración y agitación con calor (Castillo, 2004).

Tabla 7. Porcentajes de recuperación resultantes de la extracción del material vegetal con solventes de polaridad ascendente.

Planta	Parte de la planta	Extracto/Fracción	Extracto obtenido (g)	% de recuperación
<i>X. flexuosum</i>	Tallos	Extracto crudo MeOH	0.85	3.41
		Fracción Hex	0.05	10.0
		Fracción CH ₂ Cl ₂	0.02	4.0
	Hojas	Extracto crudo MeOH	2.30	9.22
		Fracción Hex	0.16	10.66
		Fracción CH ₂ Cl ₂	0.10	6.66
	Parte aérea	Extracto crudo MeOH	1.66	6.64
		Fracción Hex	0.04	4.0
		Fracción CH ₂ Cl ₂	0.06	6.0
<i>B. alba</i>	Flores	Extracto crudo MeOH	3.80	15.22
		Fracción Hex	0.16	11.42
		Fracción CH ₂ Cl ₂	0.11	7.85
	Tallos	Extracto crudo MeOH	1.69	6.76
		Fracción Hex	0.05	4.76
		Fracción CH ₂ Cl ₂	0.03	2.85
	Hojas	Extracto crudo MeOH	2.36	9.44
		Fracción Hex	0.14	14.28
		Fracción CH ₂ Cl ₂	0.12	12.24
	Raíz	Extracto crudo MeOH	0.81	3.24
		Fracción Hex	0.04	7.81
		Fracción CH ₂ Cl ₂	0.07	13.67

7.2. Obtención de los perfiles cromatográficos por HPLC de los extractos y fracciones de *B. alba* y *X. flexuosum*

En esta sección se pueden observar los cromatogramas obtenidos de cada una de las partes de *B. alba* y *Xylosma flexuosum*.

En el anexo 1 se pueden observar los perfiles cromatográficos antes de la corrección de línea base y alineación de picos, se observa que la línea base tiende a caer negativamente en algunas muestras y los picos no se observan alineados unos con otros. Sin embargo, en el anexo 2 se observan los perfiles cromatográficos con la línea base corregida y los picos se encuentran alineados unos con otros, excepto la muestra del extracto de las hojas MeOH, el cual no se alinea completamente con los demás. Esto podría deberse a la alta concentración de clorofilas presentes en las hojas, por lo cual, el cromatograma de este extracto se muestra desfasado, aunque se aplique la corrección de la línea base y alineación de los picos. Debido a esto, se decidió excluir del análisis quimiométrico a esta muestra, además de que no presentó ningún efecto inhibitorio en contra de *M. tuberculosis*. Si los datos de la muestra se conservaran para el análisis quimiométrico, probablemente el software lo catalogaría como una variable que tiene una alta contribución (mejor actividad antituberculosa) con respecto a las demás muestras, cuando en realidad no la tiene. Para ello, los datos se exportaron a Excel para su pre-tratamiento, después se exportaron al software MATLAB para la corrección de la línea base y la alineación de los picos. En la Figura 12 se aprecia los perfiles cromatográficos ya corregidos de la línea base y con los picos alineados y sin el extracto de hojas MeOH.

Por otra parte, en el anexo 3 se puede observar los cromatogramas de los extractos de *B. alba* a 285 nm. Se muestran los perfiles cromatográficos antes de la corrección de la línea base y la alineación de picos, donde se puede observar que hay picos negativos y que el desplazamiento de los picos no siguió específicamente la línea base. En el anexo 4 se observa que la línea base de perfiles cromatográficos se encuentra corregida y los picos están completamente alineados a excepción del cromatograma del ext MeOH de las hojas, que al igual que en la lectura a 210 nm

Capítulo 7. Resultados

aparece desfasada y no completamente alineado, por lo cual también se excluyó de los datos para no afectar el análisis quimiométrico. En el anexo 5 se aprecian los perfiles cromatográficos de los extractos y fracciones de *B. alba* a 285 nm sin el ext MeOH de las hojas.

En el caso de *Xylosma flexuosum* se puede ver en el anexo 6 los perfiles cromatográficos a 210 nm sin corrección de la línea base ni alineación de picos. Se puede ver como al principio de la corrida la línea base va subiendo hasta llegar al 0, posteriormente a los pocos minutos antes de finalizar la corrida, la línea base va descendiendo negativamente. Una vez que corregimos la línea base y alineamos los picos en el software MATLAB el resultado es una línea base pareja y picos completamente alineados como se puede ver en la Figura 13. Por otra parte, en los perfiles cromatográficos de *X. flexuosum* a 285 nm no sucede lo mismo que a 210 nm. En el anexo 7 se observan los perfiles cromatográficos sin correcciones, se puede ver que la línea base está desfasada y tiende a subir demasiado y a desplazarse negativamente en algunas muestras. Una vez realizada la corrección de la línea base y la alineación de picos esto se pudo corregir. De igual manera que en *Bidens pilosa*, se puede apreciar que en los perfiles cromatográficos evaluados a 210 nm aparecen muchos más picos que a 285 nm ya no se ven. Por esta razón para el análisis quimiométrico se emplearon los datos obtenidos a 210 nm.

Capítulo 7. Resultados

Cromatogramas de *B. alba* a 210 nm corregidos, sin el extracto de Hojas MeOH

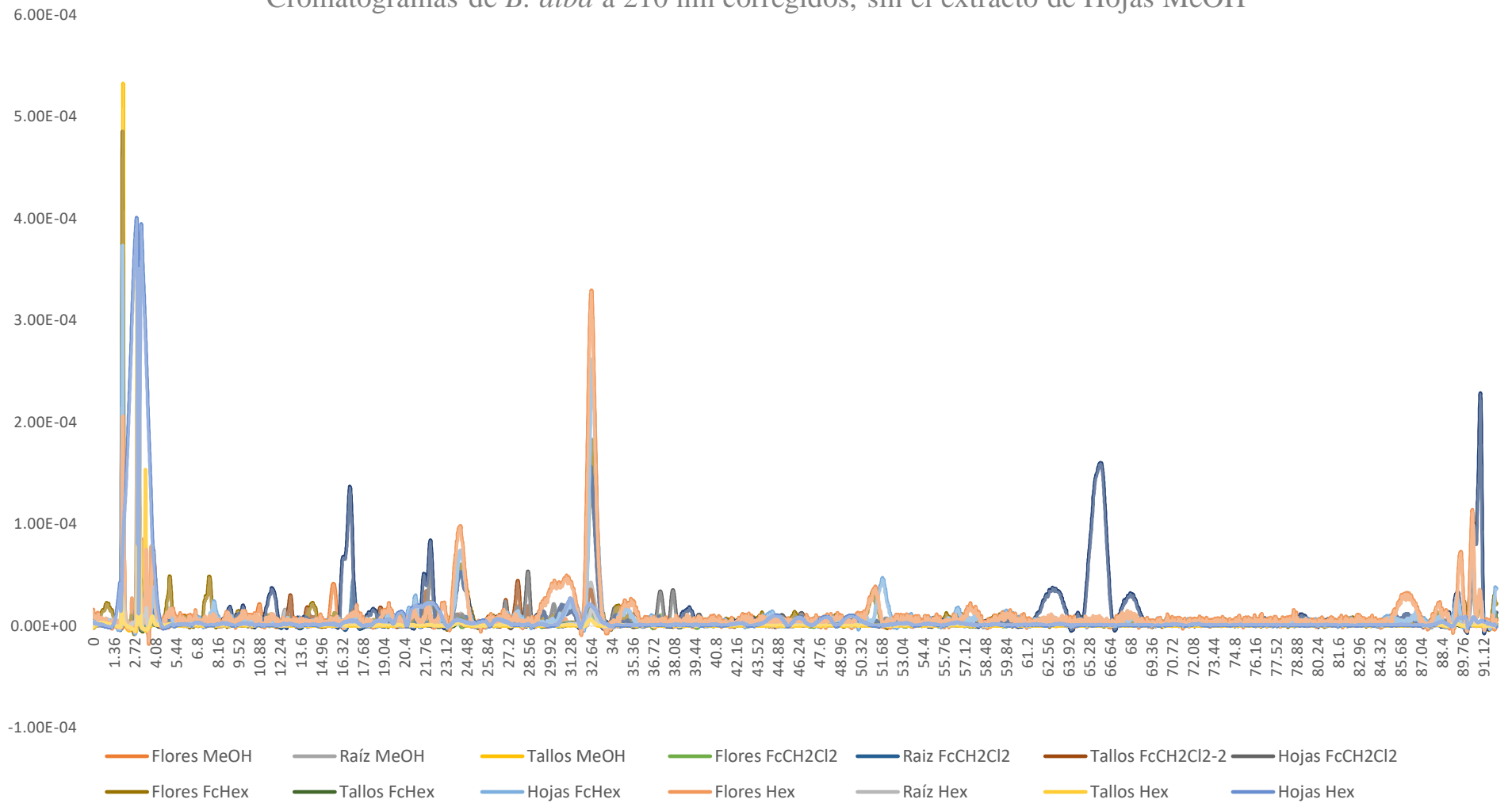


Figura 15. Perfiles cromatográficos de los extractos y fracciones de *B. alba* a 210 nm. con línea base corregida y picos alineados. El extracto de hojas MeOH fue excluido.

Capítulo 7. Resultados

Cromatogramas de *X. flexuosum* a 210 nm corregidos

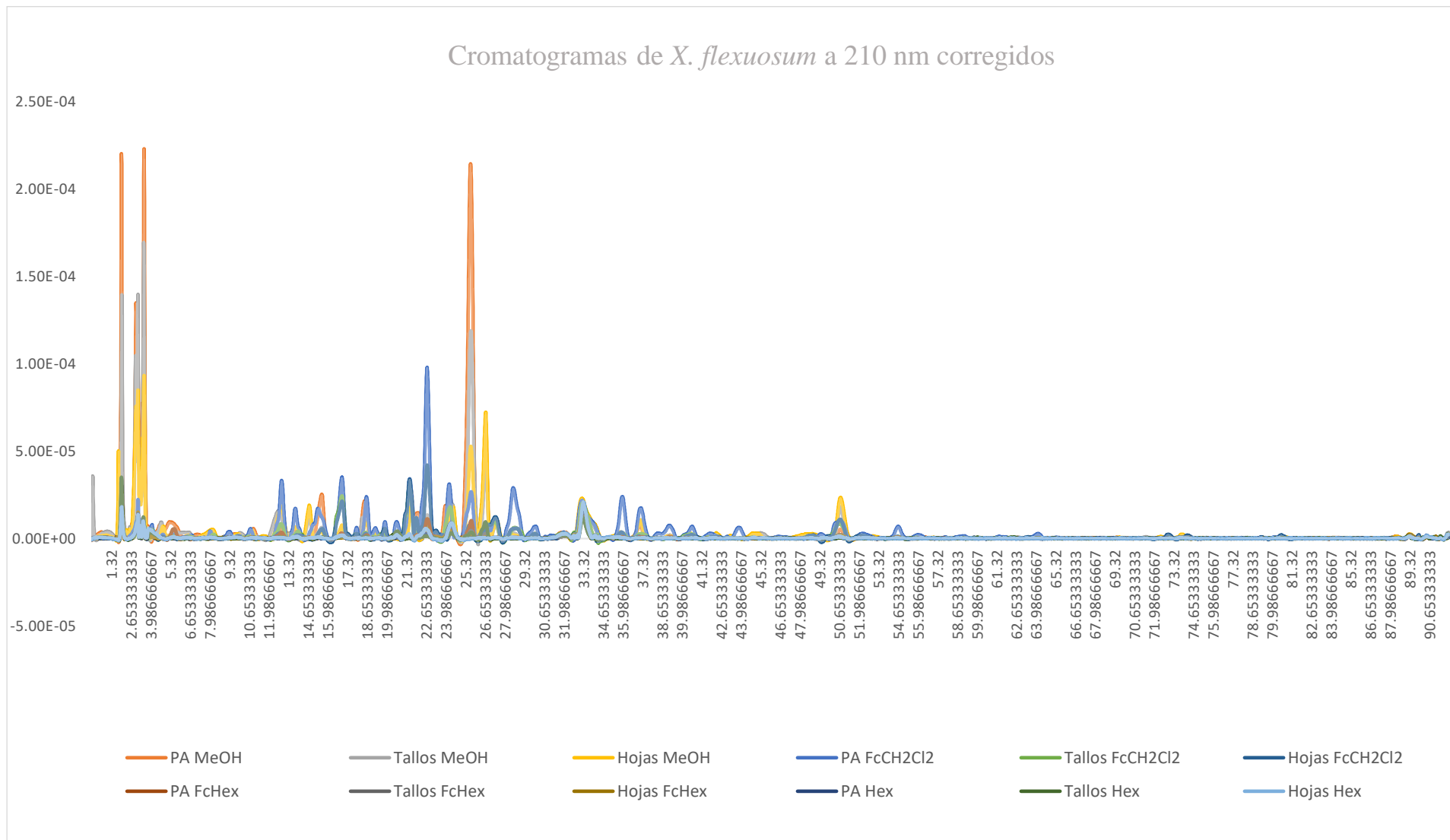


Figura 16. Perfiles cromatográficos de los extractos y fracciones de *X. flexuosum* a 210 nm con línea base corregida y picos alineados.

Capítulo 7. Resultados

7.3. Determinación de la actividad contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv de extractos y fracciones de *B. alba* y *X. flexuosum*.

En este estudio se evaluó la actividad en contra de *M. tuberculosis* de los extractos y fracciones de *B. alba* y *X. flexuosum*. Se evaluó un total de 20 extractos de *B. alba* y 12 extractos de *X. flexuosum*. Todos los extractos se evaluaron a distintas concentraciones partiendo de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL mediante el ensayo en microplaca azul alamar (MABA).

En la tabla 10 se muestran las MICs obtenidas de los extractos y fracciones de *B. alba*. La Fc hex de la raíz fue la más activa, mostrando una MIC de 25 µg/mL. En general todos los extractos provenientes de la raíz tuvieron actividad bactericida frente a *M. tuberculosis* en comparación con los extractos provenientes de otras partes de la planta de *B. alba*. Además, la Fc hex y la Fc CH₂Cl₂ de las flores, tallos, hojas y raíz tuvieron MIC de 200 µg/mL contra *M. tuberculosis*.

Tabla 8. Actividad inhibitoria de extractos y fracciones de *B. alba*.

Planta	Parte de la planta	Extracto/Fracción	MIC (µg/mL)
<i>B. alba</i>	Flores	Extracto crudo MeOH	NI
		Fracción Hex	200
		Fracción CH ₂ Cl ₂	200
		Extracto Hex crudo	NI
	Tallos	Extracto crudo MeOH	NI
		Fracción Hex	200
		Fracción CH ₂ Cl ₂	200
		Extracto Hex crudo	200
	Hojas	Extracto crudo MeOH	NI
		Fracción Hex	200
		Fracción CH ₂ Cl ₂	200
		Extracto Hex crudo	NI
	Raíz	Extracto crudo MeOH	200
		Fracción Hex	25
		Fracción CH ₂ Cl ₂	200
		Extracto Hex crudo	200

MIC= Concentración Mínima Inhibitoria; NI= No Inhibitorio a la máxima concentración evaluada.
Experimentos realizados: Replicas= 2, n=2.

Capítulo 7. Resultados

Por otra parte, en la tabla 11 se aprecian las MIC's obtenidas de los extractos y fracciones de *X. flexuosum*. En este caso se puede apreciar que el Ext Hex crudo de las hojas tuvo una MIC de 50 µg/mL, siendo el extracto que presentó mejor actividad inhibitoria de la micobacteria. Por otra parte, los Ext MeOH de tallos, hojas, PA y la Fc Hex resultaron no inhibitorias a 200 µg/mL la máxima concentración evaluada. Los demás mostraron una MIC de 200 µg/mL.

Tabla 9. Actividad inhibitoria de extractos y fracciones de *X. flexuosum*

Planta	Parte de la planta	Extracto/Fracción	MIC (µg/mL)
<i>X. flexuosum</i>	Tallos	Extracto crudo MeOH	NI
		Fracción Hex	200
		Fracción CH ₂ Cl ₂	200
		Extracto Hex crudo	200
	Hojas	Extracto crudo MeOH	NI
		Fracción Hex	200
		Fracción CH ₂ Cl ₂	200
		Extracto Hex crudo	50
	Parte aérea (PA)	Extracto crudo MeOH	NI
		Fracción Hex	200
		Fracción CH ₂ Cl ₂	200
		Extracto Hex crudo	200

MIC= Concentración Mínima Inhibitoria; NI= No Inhibitorio a la máxima concentración evaluada, Experimentos realizados: Replicas= 2, n=2.

7.4. Análisis quimiométrico de los perfiles cromatográficos de *B. alba* L.

Se obtuvieron un total de 6,091 variables de cada uno de los extractos y fracciones de *B. alba*, que posteriormente se exportaron al software MATLAB para la corrección de la línea base y la alineación de los picos. Una vez realizado este procedimiento se importaron los datos al software SIMCA versión 15.0.2, Umetrics, en el cual se realizó un escalado de Pareto/N de los datos para proseguir con el PCA.

7.4.1. Análisis de componentes principales (PCA)

En total se usaron 5 PCs (Figura 17) y se analizaron distintas combinaciones entre cada uno de ellos que formaban las agrupaciones. Se analizó el PC1 vs PC2, PC1 vs PC3, PC1 vs PC4, PC1 vs PC5, PC2 vs PC1 y así sucesivamente hasta comprobar todas las formaciones de *clusters* (ver anexos). Los PC se eligieron de modo que la información importante de los datos se mantuviera sólo en algunas de estas nuevas variables, que se resumen de manera efectiva en las muestras u observaciones mostradas (Shin *et al.*, 2010).

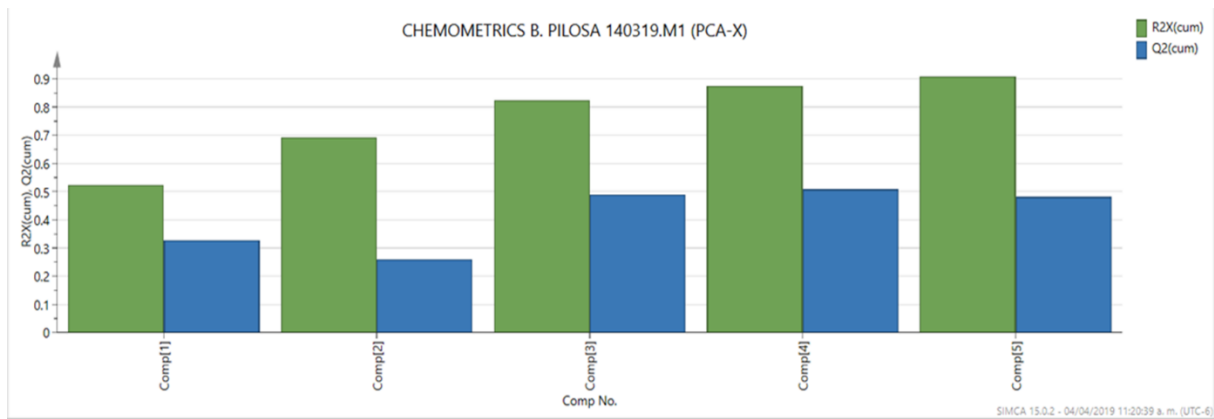


Figura 17. Componentes creados en el PCA de *B. alba* a 210 nm.

Al obtener el *score plot* de la combinación del PC3 vs PC5 (Figura 18) se obtuvieron tres *clusters* (agrupaciones) que explican las MIC's obtenidas para cada una de las muestras en los ensayos de MABA. Los *clusters* formados son ilustrados por elipses y letras y se puede observar que las 14 muestras fueron discriminadas en 3 grupos. El PC3 explica el 13.3% de la varianza y el PC5 explica el 0.33% de la varianza, sin embargo, esto puede deberse a que cada PC sucesivo no está correlacionado con los PCs anteriores y expresa la mayor parte de la varianza restante como sea posible. Por esto mismo, las demás combinaciones se descartaron al no mostrar una correlación entre las agrupaciones con la actividad antituberculosa o con la naturaleza de los extractos y fracciones debido a la poca varianza expresada por los PCs o en este caso como el análisis es supervisado, descartamos aquellas

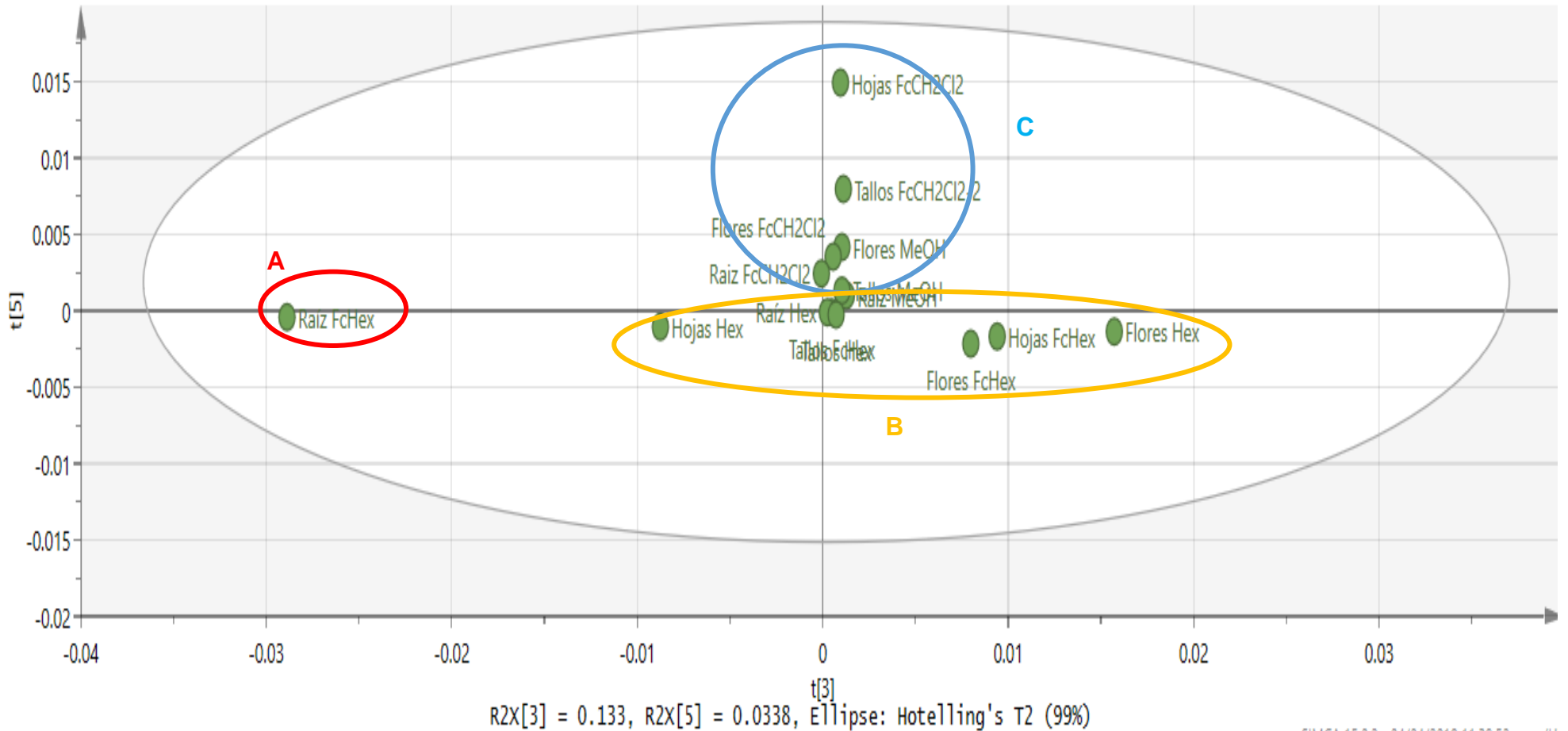
Capítulo 7. Resultados

agrupaciones en donde nuestra muestra de interés (Fc Hex de la raíz) estuviera en una agrupación que no permitiera la visualización de las variables que contribuyen en esta muestra (Umetrics, 2019). Por tal motivo se decidió trabajar con la combinación de PC3 con PC5.

El primer *cluster* “A” identificado fue el de la Fc Hex de la raíz de *B. alba* el cual en los ensayos biológicos mostró una MIC de 25 µg/mL, catalogándose como el extracto más activo frente a *M. tuberculosis*. Este *cluster* se encuentra ubicado en un score negativo de PC5 alejado de los demás extractos, debido a que este tiene mayor influencia posiblemente por tener el/los compuestos con actividad antituberculosa esta muestra se alejó de las demás. El segundo *cluster* identificado fue el “B” que se encuentra ubicado en la parte central del score negativo de PC3 y PC5, sin embargo, las muestras tienen mayor peso en el score negativo de PC3. En este score se encuentran los extractos y las fracciones Hex de las flores, hojas, tallos y raíz y que tuvieron tendencia al agrupamiento, podríamos atribuir la correlación positiva a que la mayoría de estos extractos y fracciones obtuvieron una MIC de 200 µg/mL. Finalmente, el último *cluster* identificado es el “C” que se encuentra ubicado en la parte central del score positivo de PC5, en este espacio se ubican los extractos y fracciones MeOH y CH₂Cl₂ de las flores, hojas, tallos y raíz, los cuales no presentaron actividad a la máxima concentración evaluada, a excepción de los extractos de raíz, que todos presentaron buena actividad antimicobacteriana, sin embargo, al ser un extracto de CH₂Cl₂ se agrupó con los demás extractos de la misma naturaleza. La posición que adopten las muestras en el *score plot* se debe a sus similitudes y diferencias en sus perfiles químicos (Umetrics, 2019).

La ventaja de realizar un análisis por PCA es que se pueden observar las diferentes agrupaciones de las muestras que influyen mayoritariamente en la actividad contra *M. tuberculosis* y así seleccionar el que mejor resultado muestre, de acuerdo a los resultados de los ensayos *in vitro*, motivo por el cual, se decidió trabajar con el PC3 vs PC5 ya que la Fc Hex de la raíz cayó alejada de las demás y así se pudo realizar el *loading plot* sin ningún problema y visualizar todas las variables que influyen en esta muestra.

Capítulo 7. Resultados



SIMCA 15.0.2 - 04/04/2019 11:38:52 a. m. (1)

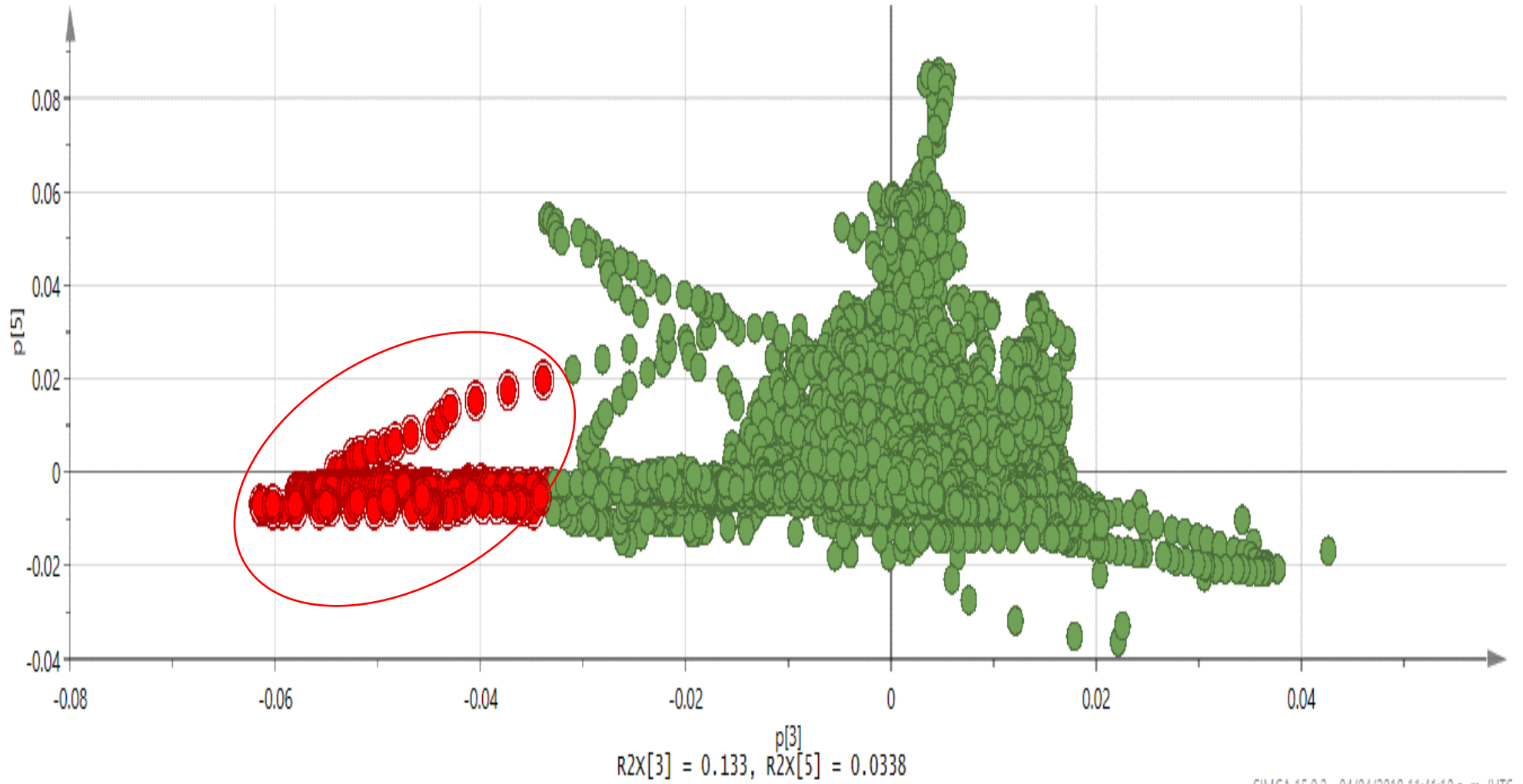
- Alta actividad antituberculosa
- Mediana actividad antituberculosa
- Sin actividad antituberculosa

Figura 18. Score plot de PC3 vs PC5 de los extractos y fracciones de *B. alba*. El PCA muestra tres agrupaciones de acuerdo con su actividad biológica obtenida en los ensayos de MABA.

Capítulo 7. Resultados

El *loading plot* es un gráfico que muestra que variables influyen en el modelo de PCA y permite investigar la relación que tienen estas variables en el modelo (Umetrics, 2019). Este gráfico nos permite observar que variables tienen mayor influencia en la muestra que obtuvo la mejor MIC, que en este caso fue la Fc Hex de la raíz de *B. alba*, la cual se alejó del resto de las muestras en el gráfico de PCA. El gráfico de *loading plot* (Figura 19) está representado por puntos verdes (variables) y las variables de interés aparecen en rojo. Posteriormente se obtuvo el *X-variable line plot*, que es un gráfico lineal, el cual nos permite visualizar cuales son las variables X seleccionadas en el *loading plot* que contribuyen a que la muestra se separe de las demás (Figura 20). En este gráfico se pueden observar las variables que influyen en que la muestra de la Fc Hex de la raíz caiga separada de las demás muestras, estas variables son de la 1225 a la 1277, de la 4894 a la 4992 y de la 6796 a la 6832. Al buscar estas variables en la tabla de datos de los cromatogramas se encontraron estas variables con los t_R de 16.32-17.01, 65.21-66.54 y 90.57-91.08 min.

Al ubicar los picos en los cromatogramas se observó que se encontraban únicamente en la Fc Hex de la raíz. Se pudo identificar a tres picos principales, los cuales corresponden a los t_R antes mencionados (Figura 21) y, por el t_R en que salieron, el de $t_R= 16.32-17.01$ se debe a un compuesto polar, ya que este salió primero de la columna cuando el gradiente de elución tenía el 76.5% en la fase móvil A (ácido fórmico); el siguiente pico se debe a un compuesto medianamente polar, ya que eluyó de la columna cuando la fase móvil A estaba al 60%; y el último compuesto identificado en el t_R de 90.57- 91.08 se debe a un compuesto no polar, ya que este fue expulsado de la columna después de que la fase móvil A llegara al 0%, cuando la fase móvil A alcanzó un flujo del 90% prácticamente limpió la columna y se expulsó este compuesto. Sin embargo, no responsabilizaremos a estos compuestos de la actividad antituberculosa sin antes realizar el análisis de O-PLS, simplemente este análisis nos da una idea de cuales podrían ser las variables involucradas en la actividad antituberculosa.



SIMCA 15.0.2 - 04/04/2019 11:41:10 a. m. /UTC

Figura 19. Loading plot de PC3 vs PC5 de los extractos y fracciones de *B. alba*.

Capítulo 7. Resultados

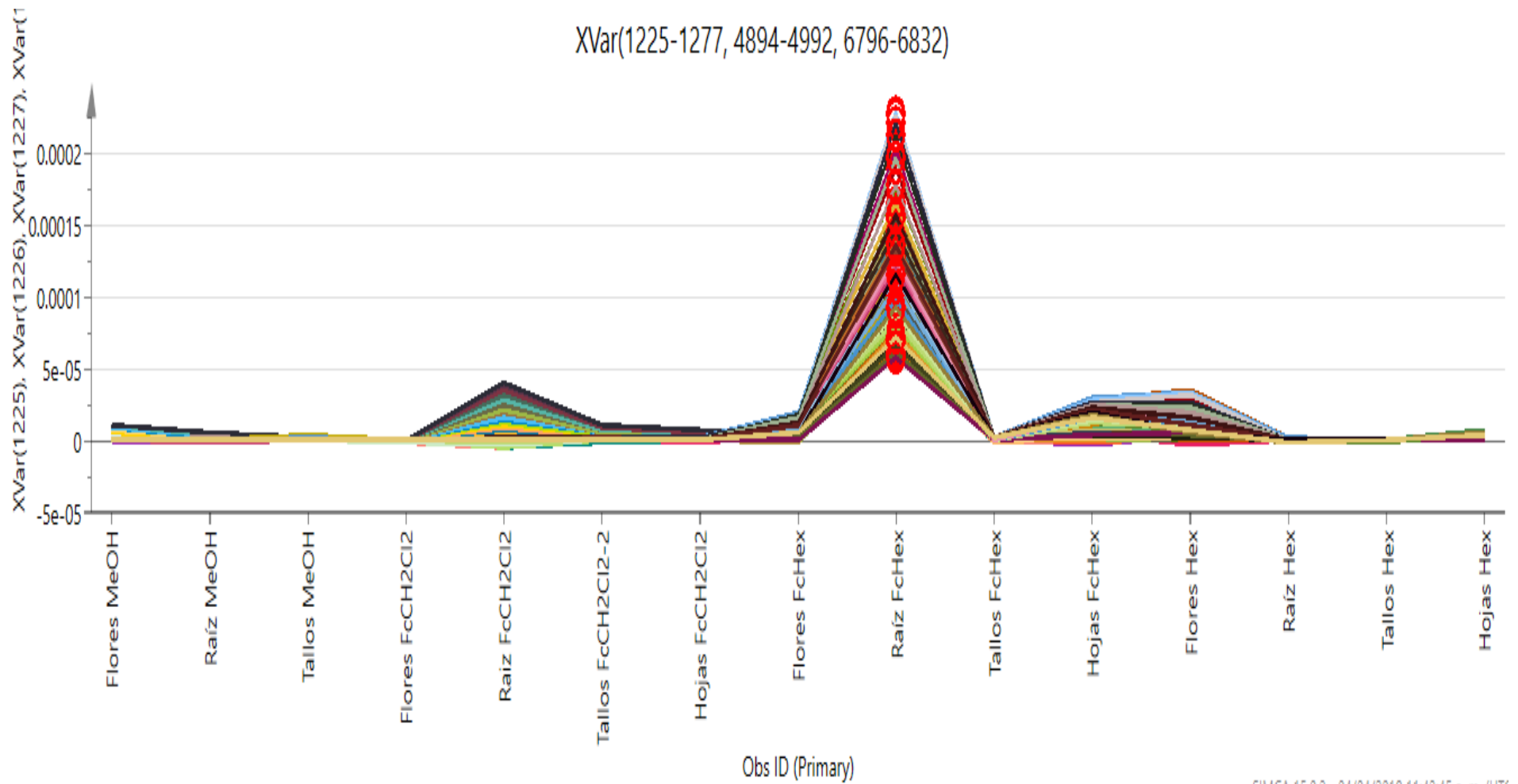


Figura 20. X-Variable line plot de las variables correspondientes a la Fc Hex de la raíz de *B. alba*.

Capítulo 7. Resultados

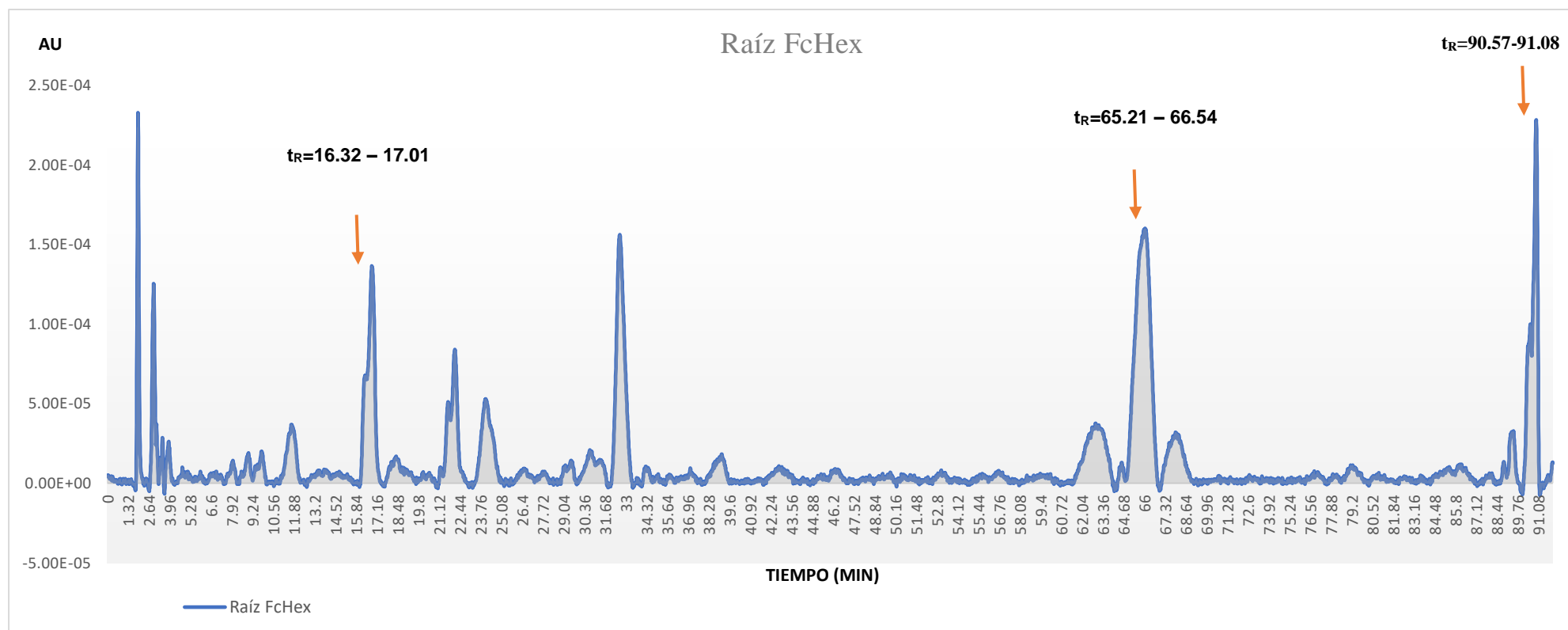


Figura 21. Cromatograma de la Fc Hex de la raíz de *B. alba*, se puede observar que los picos marcados son los correspondientes a las variables obtenidas del análisis del *X-variable line plot*.

7.4.2. Construcción del modelo de proyecciones ortogonales a las estructuras latentes (O-PLS)

Se construyó un modelo de calibración multivariante O-PLS con 14 muestras provenientes de los perfiles cromatográficos de HPLC-UV y se le añadió una matriz Y, que está representada por los valores obtenidos para cada extracto y fracción de las MIC frente a *M. tuberculosis*.

Previamente a la construcción del modelo se probaron distintos métodos para normalizar los datos y se eligió escalado de Pareto/N. Existen 3 parámetros para medir la calidad y la confiabilidad de un modelo de O-PLS. Estos parámetros son R^2X (cum), R^2Y (cum) y Q^2 (cum). R^2 es el porcentaje de variación del conjunto de datos X o Y explicado por el modelo. R^2 es una medida de ajuste. Un R^2 grande es una condición necesaria para un buen modelo, pero no es suficiente. Puede haber modelos pobres incluso con R^2 grandes. Se puede tener un modelo pobre de R^2 cuando tienes poca reproducibilidad en tus datos (mucho ruido). Es por esto, que se decidió eliminar la muestra de las hojas MeOH, porque en los cromatogramas causaban mucho ruido (Umetrics, 2019).

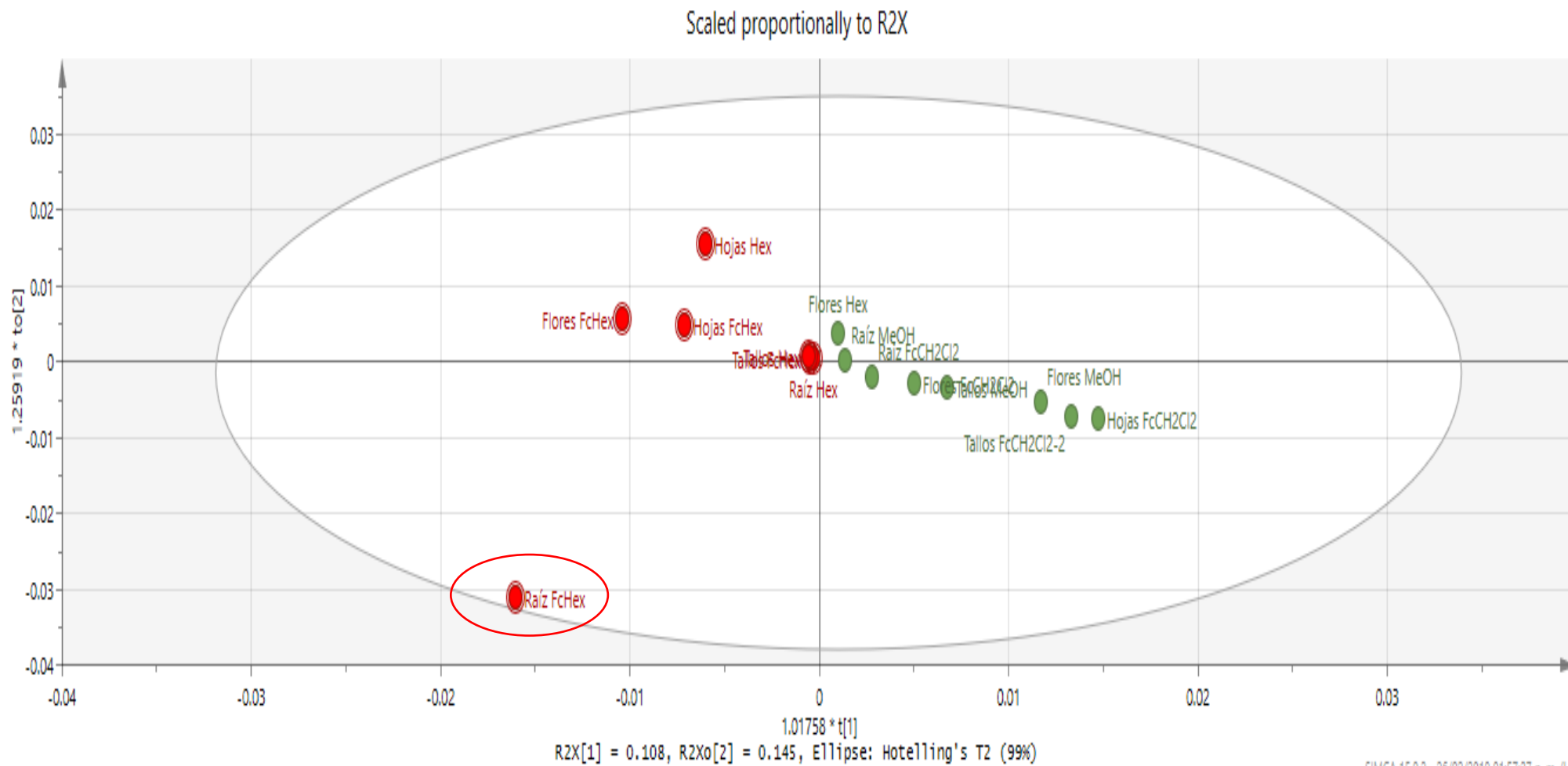
Por otra parte, Q^2 es un porcentaje de la variación del conjunto de datos (X en PCA) predicho por el modelo de acuerdo con la validación cruzada. Q^2 indica qué tan bien predice nuevos datos un modelo. Un Q^2 grande (>0.5) indica buena predictibilidad. Se obtendrá un Q^2 deficiente cuando los datos tengan mucho ruido, o cuando el modelo esté dominado por unos pocos valores atípicos dispersos (Nguyen Hoai *et al.*, 2009). Del modelo obtenido se mostraron valores de R^2X (cum)= 0.706, R^2Y (cum)= 1, Q^2 (cum)= 0.216. Esto quiere decir que es un buen modelo respecto a la medición de la variabilidad en X y en Y, pero el modelo es pobre en cuanto a predicción de los valores de Y. Sin embargo, este parámetro no es necesario para el análisis que se llevó a cabo, ya que no se requiere predecir datos de Y, debido a que se realizaron los ensayos in vitro para la determinación de la MIC de los extractos y fracciones.

7.4.3. Evaluación del modelo O-PLS

Con el fin de obtener las variables responsables de la actividad antituberculosa se realizó un análisis discriminante de datos O-PLS. En el gráfico obtenido se puede ver como las 14 muestras se discriminaron en dos grupos: los activos y los no activos. Este gráfico es importante realizarlo en el análisis de un problema de separación (discriminación) de dos clases de datos, por ejemplo, el grupo control frente al grupo tratado, en este caso, la agrupación se dio del lado izquierdo debido a las muestras activas contra *M. tuberculosis* contra las muestras que no presentaron actividad frente a dichas micobacterias que se agruparon del lado derecho (Figura 22). El modelo de O-PLS-DA siempre tendrá un componente predictivo, y ninguno, uno o más componentes ortogonales. El gráfico de dispersión de t_1 vs t_{10} es una ventana en el espacio X en la que la separación de las dos clases de observaciones ocurre en dirección horizontal (t_1). Por lo tanto, es suficiente para interpretar la carga correspondiente (*loading plot*) para descubrir las variables con capacidad de discriminación de clase. Por otra parte, la dirección vertical t_{10} se expresa dentro de la variabilidad de clase, que no está relacionada con la discriminación entre dos clases, pero que es importante para la compresión total del problema. Para saber que variables intervienen en la actividad antituberculosa se procedió a realizar el *contribution plot* (Hernández-Sánchez *et al.*, 2018).

El *contribution plot* es un gráfico que nos muestra el porqué de un punto en un gráfico de dispersión o *Hotelling T²*, de una o varias variables. En este caso se seleccionó solo la muestra de interés, que es la Fc Hex de la raíz y se obtuvo el *contribution plot* de esta muestra (Figura 23). Con el *contribution plot*, se puede conocer cuáles son las variables que tienen la presunta actividad antituberculosa. Los picos negativos corresponden en el gráfico a las variables con actividad antituberculosa. Estas aparecen a $t_R = 91.48, 91.17, 90.02, 80.29, 66.98, 64.25, 41.74, 23.26$ y 16.04 min.

Capítulo 7. Resultados



SIMCA 15.0.2 - 26/02/2019 01:57:27 a.m. (U)

Figura 22. O-PLS-DA de las 14 muestras de extractos y fracciones de *B. alba*.

Capítulo 7. Resultados

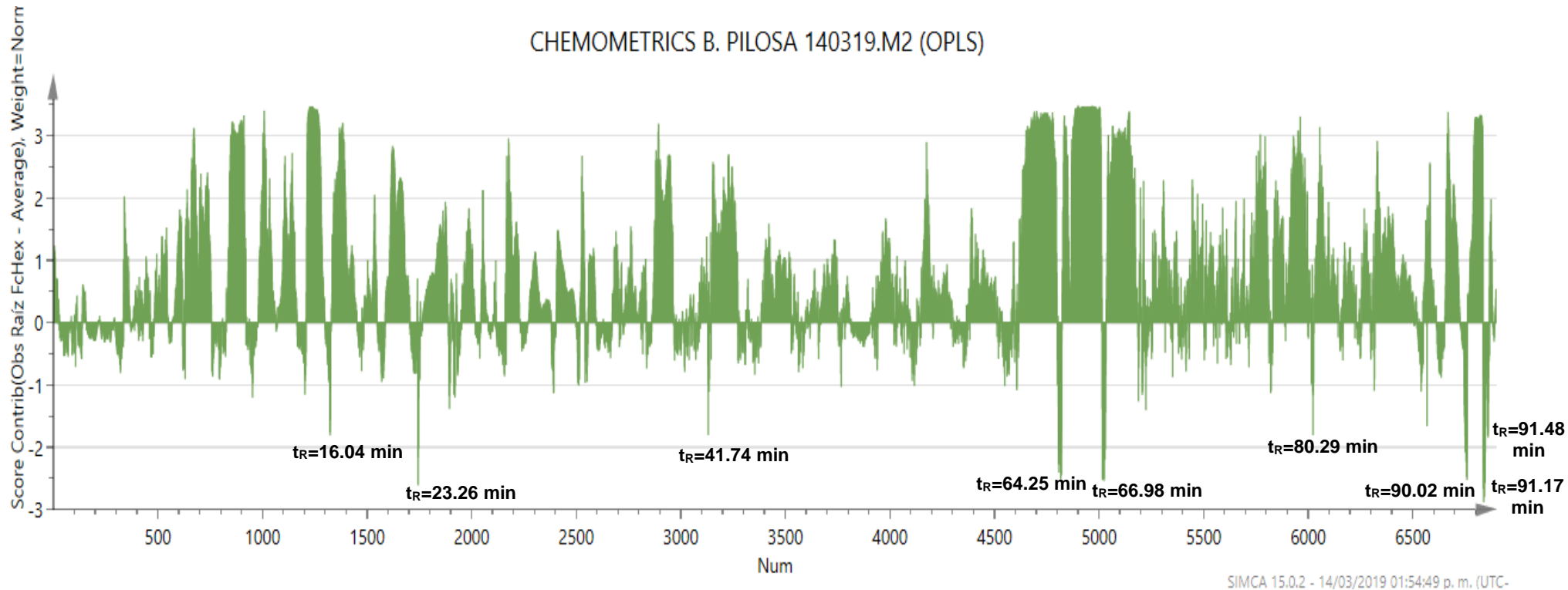


Figura 23. Contribution plot de O-PLS de la Fc Hex de la raíz de *B. alba*, muestra los tiempos de retención de los compuestos probablemente responsables de la actividad antituberculosa. $t_R= 16.04, 23.26, 41.74, 62.25, 66.98, 80.29, 90.02, 91.17$ y 91.48 min.

7.5. Análisis quimiométrico de los perfiles cromatográficos de *X. flexuosum*

Se obtuvo un total de 6,091 variables de cada uno de los extractos y fracciones de *X. flexuosum*. Una vez corregida la línea base y alineados los picos de los cromatogramas como se describió previamente, los datos fueron importados al software SIMCA versión 15.0.2, Umetrics, para realizar el PCA. Una vez importados los datos se realizó un escalado de Pareto a los datos y se continuó con el PCA.

Para el análisis de *score plot* se analizaron las diferentes combinaciones de componentes y se compararon entre ellos mismos, para ver cual formaba agrupaciones que pudieran explicar las similitudes o diferencias entre las variables implicadas, ya sea en la actividad antituberculosa o en la naturaleza química de los extractos y fracciones. Se comparó el PC1 vs PC2, el PC2 vs PC3 y así sucesivamente hasta encontrar los componentes que tuvieran una mayor explicación (ver anexos). En total se utilizaron cinco PCs y se analizaron sus diferentes combinaciones. El PC1 vs PC2 obtuvo la mejor agrupación, que explica la naturaleza de los extractos (Figura 24), las demás combinaciones se descartaron al no mostrar ninguna correlación entre las agrupaciones respecto con la actividad biológica o a la similitud química de las muestras debido a la poca varianza expresada por los PCs (ver anexos).

El análisis de *score plot* PC1 explica el 46.7% de la varianza, mientras que el PC2 explica el 27.1% de varianza. En el PCA se identificaron 3 agrupaciones principales. El primer *cluster* "A" identificado fue el extracto Hex de las hojas, este está ubicado en el *score* negativo del PC2 y aparece separado del resto de las muestras, este extracto es el más activo presentando una MIC de 50 µg/mL. El segundo *cluster* identificado fue el "B" que se encuentra ubicado en el *score* positivo, las muestras que se agruparon son las que no tuvieron actividad frente a *M. tuberculosis* y fueron todos los extractos MeOH. Por otra parte, el último *cluster* identificado fue el "C" que se encuentra ubicado en la parte central del *score* positivo de PC2. La PA Hex, PA Fc CH₂Cl₂, PA Fc Hex, Hojas Fc Hex, Tallos Hex y Tallos Fc CH₂Cl₂ tuvieron tendencia al agrupamiento, debido a que todos los extractos y

Capítulo 7. Resultados

fracciones tuvieron una MIC de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La Fc CH_2Cl_2 de las hojas se agrupó en este *cluster*. Sin embargo, no presentó actividad a la máxima concentración evaluada. Esto puede deberse a que probablemente en la fracción existan compuestos similares a las demás muestras que tuvieron tendencia al agrupamiento, ya que como bien sabemos las plantas son una mezcla compleja de metabolitos con distintas estructuras químicas y actividades biológicas.

En la Figura 24 se observan las agrupaciones formadas con el PC1 vs PC2. El primer *cluster* identificado está representado con la letra "A" y se encuentra ubicado en el *score* positivo de PC2, éste representa a las muestras polares obtenidas con MeOH, que son los extractos de PA MeOH, tallos MeOH y hojas MeOH. En los ensayos de MABA estas muestras no presentaron actividad en contra de *M. tuberculosis*. El segundo *cluster* identificado está representado con la letra "B", se encuentra ubicado en el *score* negativo de PC2 y corresponde a las muestras de mediana polaridad, correspondientes a las fracciones CH_2Cl_2 , en este caso se observa que la muestra de la Fc CH_2Cl_2 se alejó del grupo, esto quiere decir que a pesar de que fueron extraídos por el mismo disolvente, esta fracción presenta diferencias en sus compuestos químicos que las Fc de Tallos y Hojas CH_2Cl_2 y por lo cual, alejó del *cluster*. En los ensayos de MABA la Fc CH_2Cl_2 de tallos y la PA obtuvieron una MIC= 200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en cambio la Fc CH_2Cl_2 de las Hojas no presentó inhibición del crecimiento de la micobacteria. El tercer *cluster* identificado está representado con la letra "C" y corresponde a las muestras no polares, correspondientes a 6 muestras de los extractos y fracciones Hex. Éste *cluster* está ubicado en el *score* negativo de PC1. La Fc Hex de Tallos no presentó actividad significativa, la Fc Hex de las Hojas presentó una MIC= 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al igual que la Fc Hex PA, Ext Hex, de Tallos y el Ext Hex de PA. El extracto que obtuvo la mejor MIC fue el Ext Hex de Hojas con una MIC= 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sin embargo, como las muestras se agruparon por polaridad y no por actividad biológica, nuestra muestra de interés el Ext Hex de Hojas con MIC=50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aparece agrupada en los demás ext y Fc Hex y es difícil obtener las X-variables que influyen en esta muestra. En el *loading plot* (Figura 25) se observan las variables que influyen en las agrupaciones que adoptan las muestras, sin embargo, es difícil obtener

Capítulo 7. Resultados

las que se encuentran en el Ext Hex de Hojas (las marcadas con rojo) debido a que aparecen muy juntas y esto dificulta visualizarlas.

Al realizar el *X-variable line plot* (Figura 26) se aprecian mejor las variables que contribuyen en cada muestra. En el Ext Hex de Hojas arroja que las variables: 24-33, 119-130, 293-295, 318, 319, 460-465, 1521-1529, 1855, 1856, 2448-2453, 2640-2659, 4369, 5282, 5696, 6230, 6329, 6346, 6883-6900 correspondientes a los $t_R = 0.3-0.5$, 1.5-1.7, 4.22-4.24, 6.12-6.18, 20.26-20.37, 24.72-24.74, 32.62-32.69, 35.18-35.44, 61.84, 79.41, 75.93, 83.05, 84.37, 84.6, 91.76-91.98 min. Respectivamente. Al revisar los perfiles cromatográficos de *X. flexuosum* se observó la presencia de picos situados en los $t_R = 3.89-4.24$, 24.72-24.79, 32.62-35.44, 91.76-91.98 min (Figura 27). El pico más grande fue el que se encuentra en el $t_R = 35.62-35.44$, sin embargo, no se puede atribuirle la actividad biológica hasta realizar el O-PLS de estas muestras.

Capítulo 7. Resultados

PCA Y OPLS Xylosma 210 nm_210318.M1 (PCA-X)

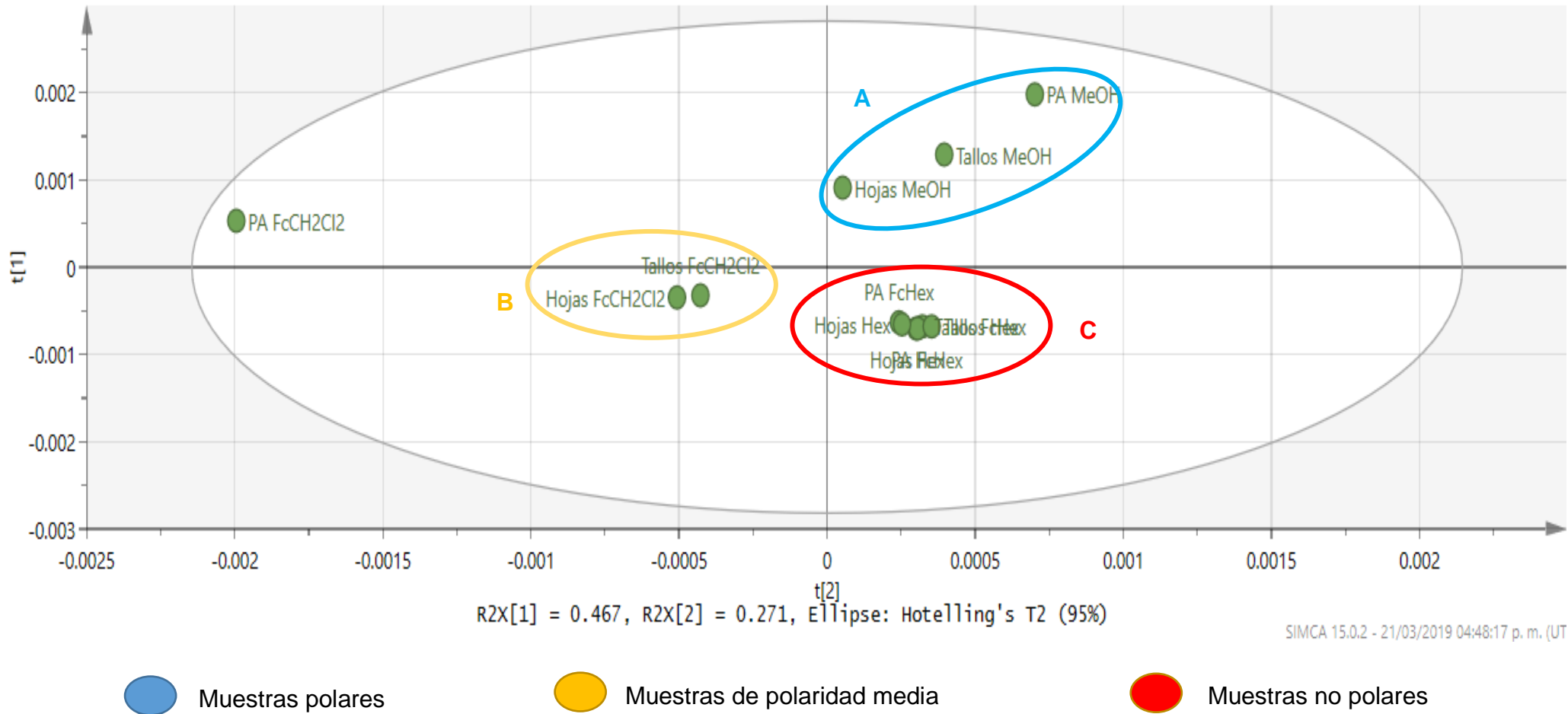


Figura 24. Score plot PC1 vs PC2 de extractos y fracciones de *X. flexuosum*. El PCA muestra 3 agrupaciones de acuerdo con la polaridad de los compuestos presentes en las muestras.

PCA Y OPLS Xylosma 210 nm_210318.M1 (PCA-X)
Colored according to model terms

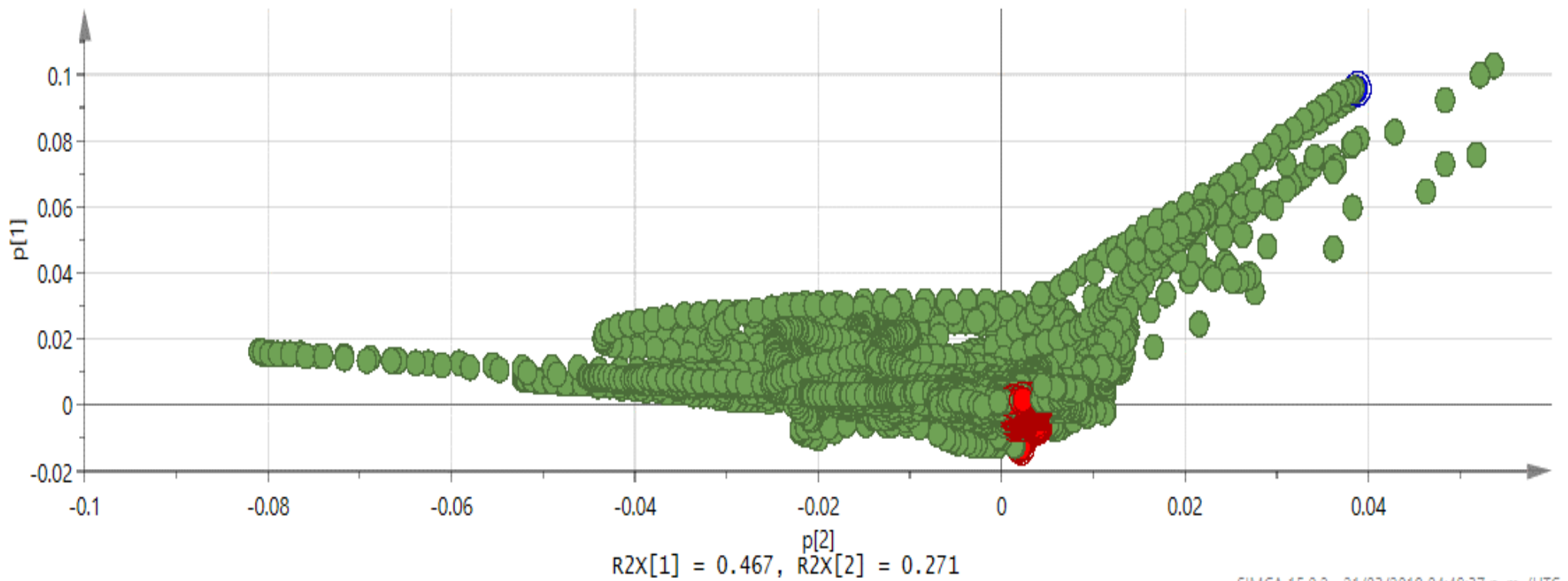
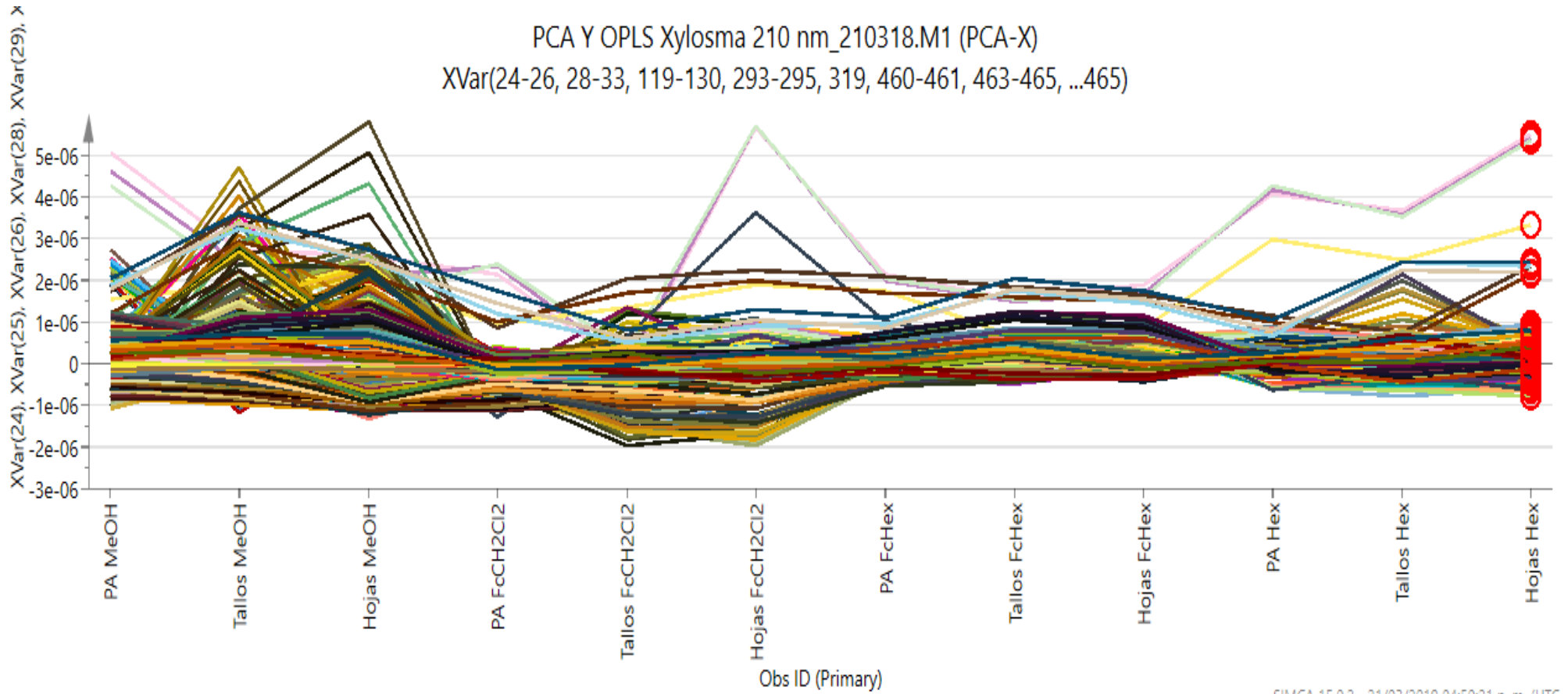


Figura 25. Loading plot de PC1 vs PC2 de los extractos y fracciones de *X. flexuosum*

Capítulo 7. Resultados

PCA Y OPLS Xylosma 210 nm_210318.M1 (PCA-X)
XVar(24-26, 28-33, 119-130, 293-295, 319, 460-461, 463-465, ...465)



SIMCA 15.0.2 21/03/2019 04:50:21 p.m. / IITF

Figura 26. Cromatograma del Ext Hex de la Hojas de *X. flexuosum*, se puede observar que los picos marcados son los correspondientes a las variables obtenidas del análisis del *X-variable line plot*.

Capítulo 7. Resultados

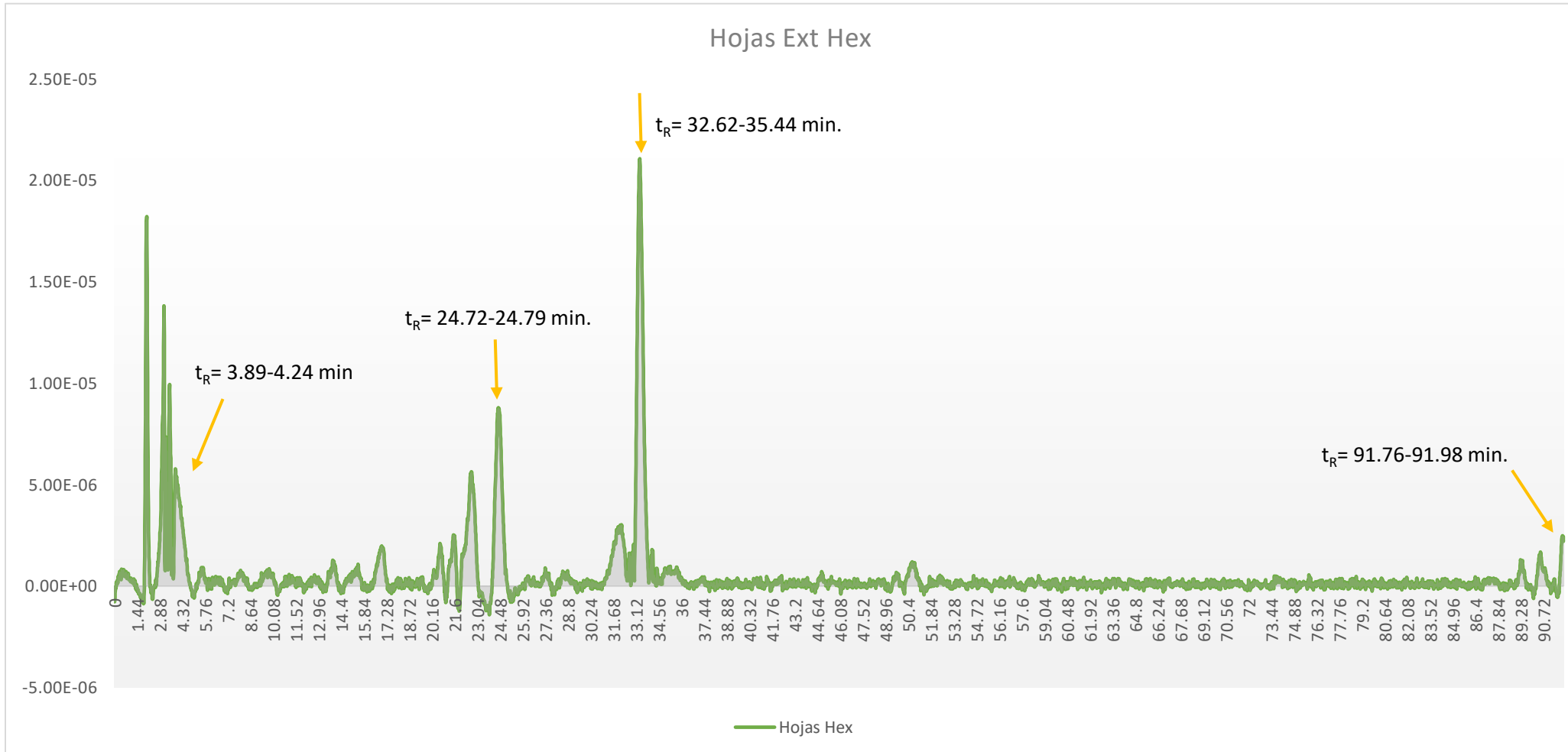


Figura 27. Cromatograma del Ext Hex de las hojas de *X. flexuosum*, se puede observar que los picos marcados son los correspondientes a las variables obtenidas del análisis del *X-variable line plot*.

7.5.1. Construcción del modelo de Proyecciones Ortogonales a las Estructuras Latentes (O-PLS)

Para determinar cuáles son las variables que influyen en la actividad antituberculosa se construyó un modelo de calibración multivariada O-PLS al igual que con *B. alba*. Previa a la construcción del modelo se probaron diferentes métodos de normalización de los datos, y el que mejor resultado mostró fue el escalado de Pareto, además se añadió la variable Y con los resultados de la MIC de los extractos y fracciones de *X. flexuosum* contra *M. tuberculosis*. Respecto a la calidad y confiabilidad del modelo O-PLS construido, obtuvimos valores de R^2X (cum)=0.832 R^2Y (cum)=1 y Q^2 (cum)=0.86. Valores cercanos a 1 para R^2X (cum) y R^2Y (cum) indican que el modelo es robusto. R^2X y R^2Y indican el porcentaje de variación del conjunto de datos X o Y explicado por el modelo. Un R^2 grande es una condición necesaria para un buen modelo. En cuanto a Q^2 (cum) indica la capacidad predictiva del modelo y valores >0.5 indican un buen modelo predictivo (Nguyen Hoai *et al.*, 2009; Umetrics, 2019). En este caso, no nos interesa evaluar el modelo predictivo, ya que se realizaron los análisis in vitro para obtener las MIC de los Ext y Fc contra *M. tuberculosis*.

7.5.2. Evaluación del modelo O-PLS

Con el fin de indicar cuales son las variables responsables de la actividad antituberculosa se procedió a analizar el coeficiente de regresión de los extractos y fracciones de *X. flexuosum*. Primero se realizó un O-PLS-DA y al observar el *score scatter plot* (diagrama de dispersión) se puede apreciar que las muestras se dividieron en dos grupos, las que presentaron actividad en contra de los bacilos tuberculosos agrupadas del lado izquierdo y las que no presentaron ningún grado de inhibición del lado derecho (Figura 28).

Se realizó un *contribution plot* de la muestra de Ext Hex de Hojas, en el cual se observa que los picos negativos son los correspondientes a las variables que influyen en la actividad biológica contra los bacilos tuberculosos (Figura 29).

Capítulo 7. Resultados

PCA Y OPLS Xylosma 210 nm_210318.M2 (OPLS)
Scaled proportionally to R2X

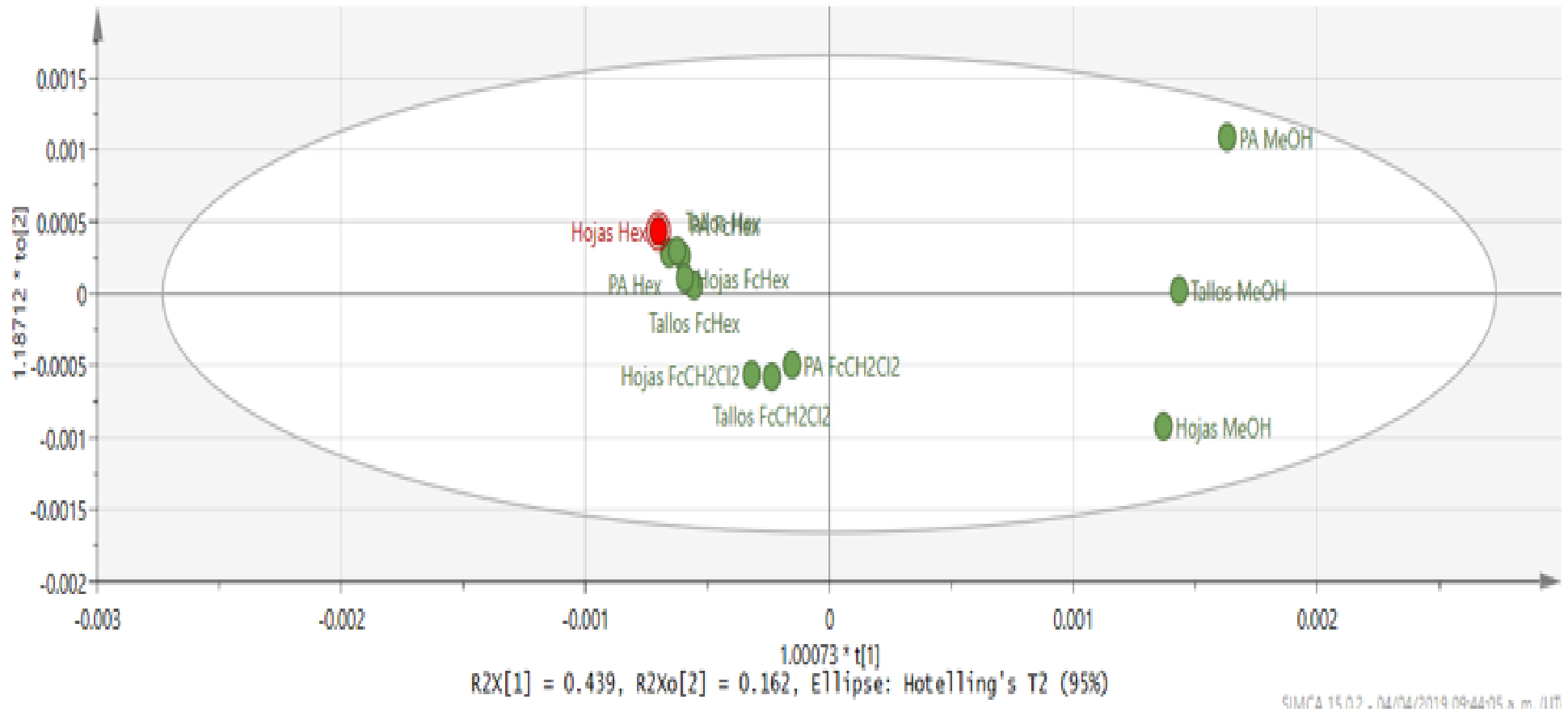


Figura 28. O-PLS-DA de las 12 muestras de extractos y fracciones de *X. flexuosum*

Capítulo 7. Resultados

PCA Y OPLS Xylosma 210 nm_210318.M2 (OPLS)
Colored variables outside their 3 std. dev. range

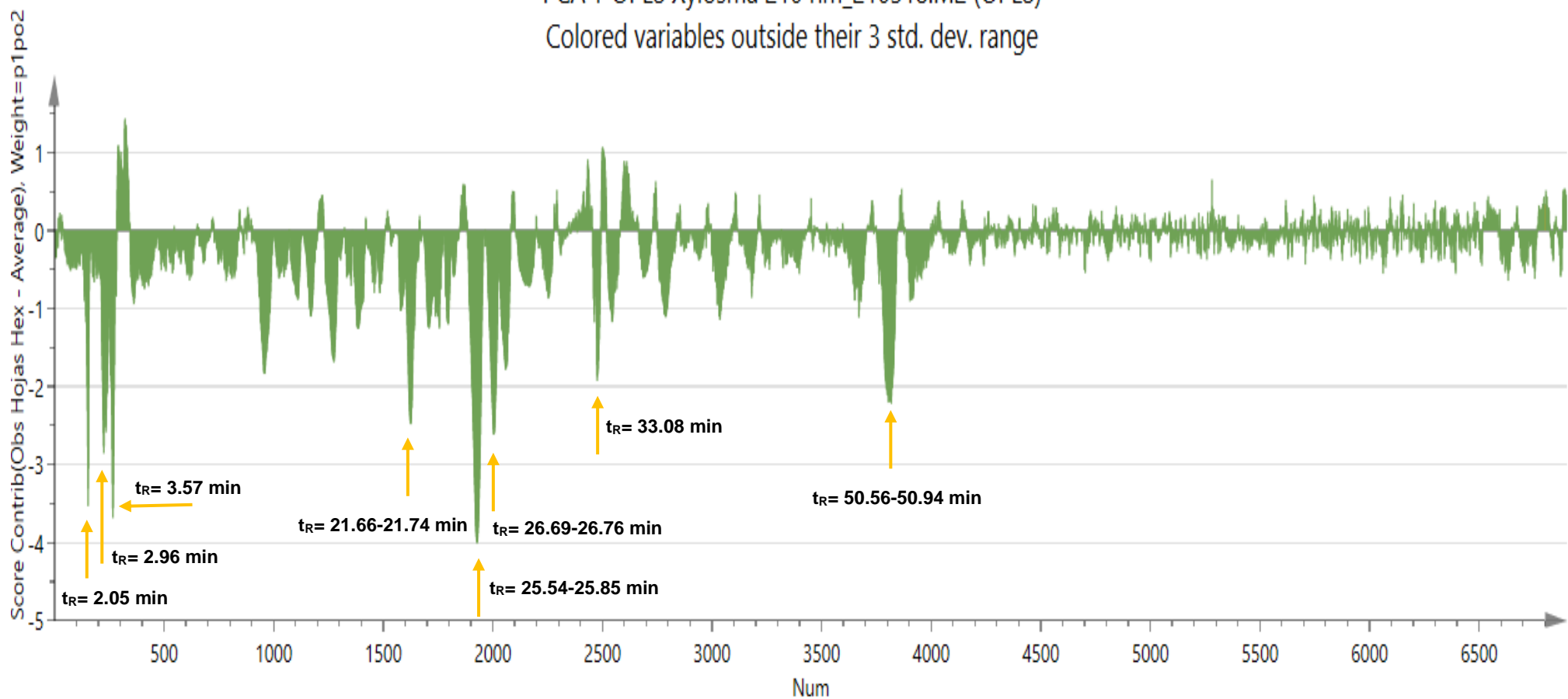


Figura 29. Contribution plot de O-PLS del ext Hex de hojas de *X. flexuosum*, muestra los tiempos de retención de los compuestos probablemente responsables de la actividad antituberculosa. t_R = 2.05, 2.96, 3.57, 21.66-21.74, 25.54-25.85, 26.69-26.76, 33.08 y 50.56-50.94 min.

7.6. Obtención de los perfiles químicos mediante ^1H -RMN de los extractos y fracciones de *B. alba*

Una vez obtenidos los resultados de la MIC de cada extracto y fracción se pudo determinar cuál muestra fue la más activa. Con los resultados del análisis quimiométrico se pudo comparar el gráfico de contribución de ambas plantas para determinar cuántas variables contribuían (en cada extracto con mejor actividad) y en qué proporción lo hacían, esto con la finalidad de que la contribución que presentan los metabolitos con actividad antituberculosa no sea un posible sinergismo. Debido a ello, se decidió seguir trabajando con *B. alba* y dejar a *X. flexuosum*, ya que, esta última presentó un mayor número de variables que contribuían enormemente a la actividad antimicrobiana.

Se obtuvieron los espectros de cada una de las muestras de *B. alba*. Los espectros ^1H -RMN se obtuvieron en un sistema de RMN Agilent a 500 MHz usando metanol- d_4 como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como patrón interno.

Antes de la normalización de los espectros, algunas de las señales aparecían un poco movidas y la línea base estaba un poco dispareja, por lo cual, se llevó a cabo la normalización de los espectros. Lo primero que se hizo fue ajustar la línea base de todos los espectros, se normalizó a X, para ello se referenció al disolvente de referencia CD_3OD y el estándar interno TMS a 0.0 ppm. Se ajustó el desplazamiento de la frecuencia a 0.04 ppm. Posteriormente normalizamos a Y que corresponde a la altura de los picos a 0.0 ppm y se le asignó un valor de 1000. Finalmente se suprimieron las señales del CD_3OD en desplazamiento $\delta = 3.30\text{--}3.32$ y de $4.80\text{--}4.90$ ppm para que no interfirieran en el análisis quimiométrico, esto con la finalidad de eliminar las variables que pudieran tener mayor contribución en los datos por la intensidad de las señales y la presencia de estos en todas las muestras. Una vez ya realizados todos estos pasos se obtuvieron los espectros apilados (Figura 30).

Capítulo 7. Resultados

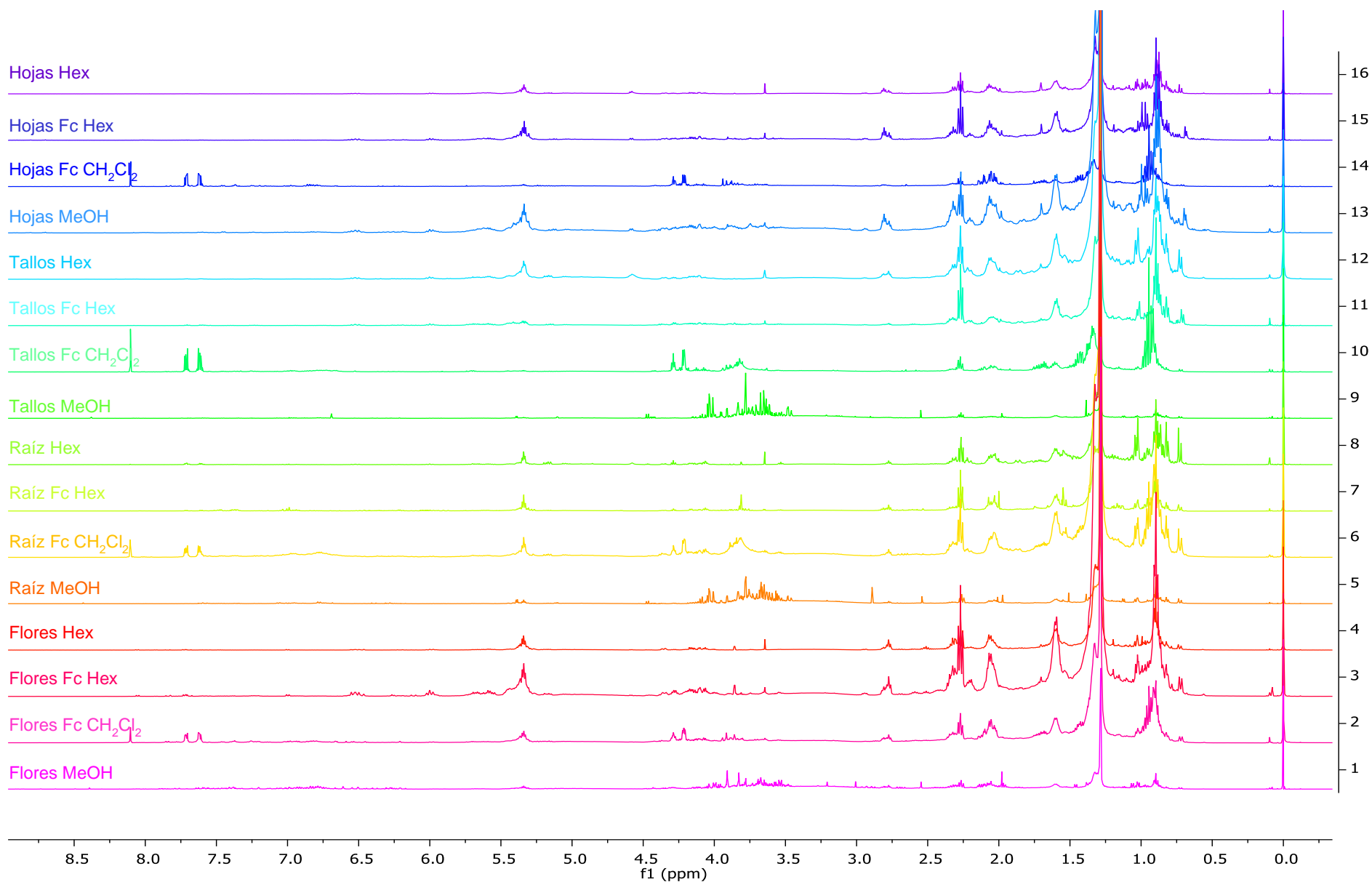


Figura 30. Espectros de ¹H-RMN normalizados y apilados de todos los extractos y fracciones de *B. alba* L. Se suprimió la señal residual del disolvente de referencia CD₃OD (δ =3.31 y 4.85 ppm).

7.7. Análisis quimiométrico de ^1H -RMN de los extractos y fracciones de *B. alba* L.

Los datos se guardaron como los valores de los picos y se redujeron automáticamente en archivos .csv los cuales se exportaron a Excel para el procesamiento de los datos. Se corrigieron los nombres, se eliminaron los datos <0.0 ppm y >11.96 ppm, los rangos se ajustaron a un solo valor, para esto se sacó la media de los dos valores dados en la primera celda y se sumó 0.04 (bit) para así obtener el segundo valor del desplazamiento químico, se arrastró a todas las celdas para tener el valor correspondiente para cada uno. Por otra parte, al igual que en el análisis quimiométrico de los perfiles cromatográficos también se excluyó el Ext MeOH de las hojas, para tener los mismos datos.

7.7.1. Análisis de componentes principales (PCA)

Una vez lista la tabla de datos se exportaron al software SIMCA versión 15.0.2, Umetrics para el análisis quimiométrico, en el cual se realizó un escalado de Pareto/N de los datos para proseguir con el PCA, en el cual se generaron 5 PCs. Se probaron distintas combinaciones de PC's (ver anexos) para observar si existían agrupaciones en cuanto a su actividad biológica, polaridad de las muestras o partes de la planta; la que mejor correlación nos dio de acuerdo con la polaridad de las muestras fue el análisis supervisado de PC2 vs PC3.

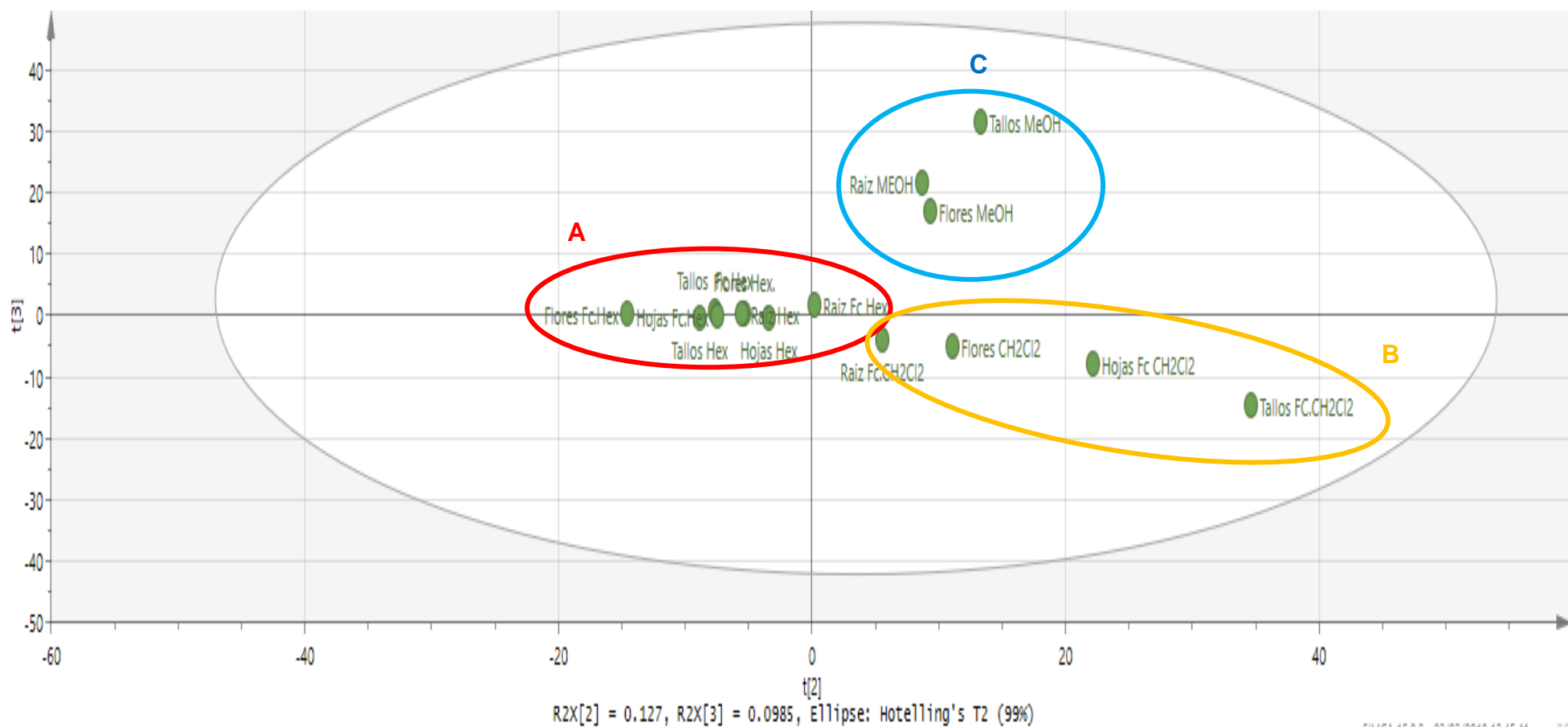
Al obtener el *score plot* del PC2 (12.7% de varianza) contra PC3 (0.98% de varianza) nos mostró que las 15 muestras formaron 3 *clusters* principales, los cuales se agruparon de acuerdo a la polaridad de las muestras (Figura 31). Los *clusters* formados son ilustrados con elipses y letras. El primer *cluster* identificado "A" que se encuentra ubicado en el centro del *score* positivo de PC2 y en la parte central del *score* negativo de PC3 en el *score* se formó mediante la agrupación de los extractos y fracciones Hex, es decir las muestras que componen esta agrupación son no polares por lo cual tuvieron tendencia al agrupamiento, además la MIC obtenida por estas muestras fue ≤ 200 $\mu\text{g/mL}$, a excepción de la Fc Hex de la raíz que fue la más activa

Capítulo 7. Resultados

con una MIC de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se encuentra ubicada en la parte central del *score plot*, sin embargo, se ubica sin duda alguna en el *score* positivo de PC3, un poco más alejada que las demás muestras de la misma polaridad. El segundo *cluster* identificado fue el “B” se encuentra ubicado en el *score* negativo de PC2, en él se muestra el agrupamiento de las muestras con mediana polaridad, es decir aquí se ubican los extractos y fracciones de CH_2Cl_2 , los cuales tuvieron una MIC $>200 \mu\text{g}/\text{mL}$. El último *cluster* identificado fue el “C” que se encuentra ubicado en el *score* positivo de PC3, en este *cluster* tuvieron tendencia al agrupamiento las muestras polares que son los extractos MeOH. Estas muestras no tuvieron actividad en contra de *M. tuberculosis* a excepción del extracto MeOH de la Raíz que tuvo una MIC de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para entender mejor las agrupaciones formadas por las muestras, observamos el *loading plot*, así tendremos una idea de cuáles son las variables que contribuyen a la actividad biológica. El *loading plot* (Figura 32) nos muestra el mismo gráfico que el *score plot*, sin embargo, en vez de mostrarnos las muestras agrupadas, en este gráfico se puede observar cuales son las variables presentes en las muestras (extractos o fracciones) que se parecen químicamente y por lo tanto caen juntas o en el caso contrario, que no se parecen químicamente y por lo tanto caen alejadas unas de otras. En el gráfico de *score plot* se observan 3 *clusters*, sin embargo, nuestra muestra de interés que es la Fc Hex de la raíz no aparece alejada de las demás como en el caso del PCA de los perfiles cromatográficos, por lo cual el análisis del *loading plot* se nos dificulta un poco, ya que todas las variables de interés aparecen amontonadas y se dificulta mucho ver cuáles son las variables que únicamente están en la Fc Hex de la raíz. Se seleccionaron las variables que por la ubicación que adoptaron en la parcela pudieran estar en la Fc Hex de la raíz y se obtuvo el *X-variable line plot*, el cual nos arrojó un gráfico que muestra que las X-variables son: 1-13, 15, 29, 31, 60, 62, 63 y 74. Se analizaron los desplazamientos químicos de los picos que corresponden a estas variables, y se buscaron estas señales en la muestra de la Fc Hex de raíz. Estas variables corresponden a $\delta = 0.128 - 0.528, 0.608, 1.16, 1.24, 2.40, 2.48, 2.52$ y 2.80 ppm. (Figura 33)

Capítulo 7. Resultados



SIMCA 15.0.2 - 03/03/2019 12:45:41 a.m. (IT)

● Muestras no polares

● Muestras medianamente polares

● Muestras Polares

Figura 31. Score plot de PC2 vs PC3 de los extractos y fracciones de *B. alba*. El PCA muestra tres agrupaciones de acuerdo con la polaridad de los compuestos presentes en las muestras.

Capítulo 7. Resultados

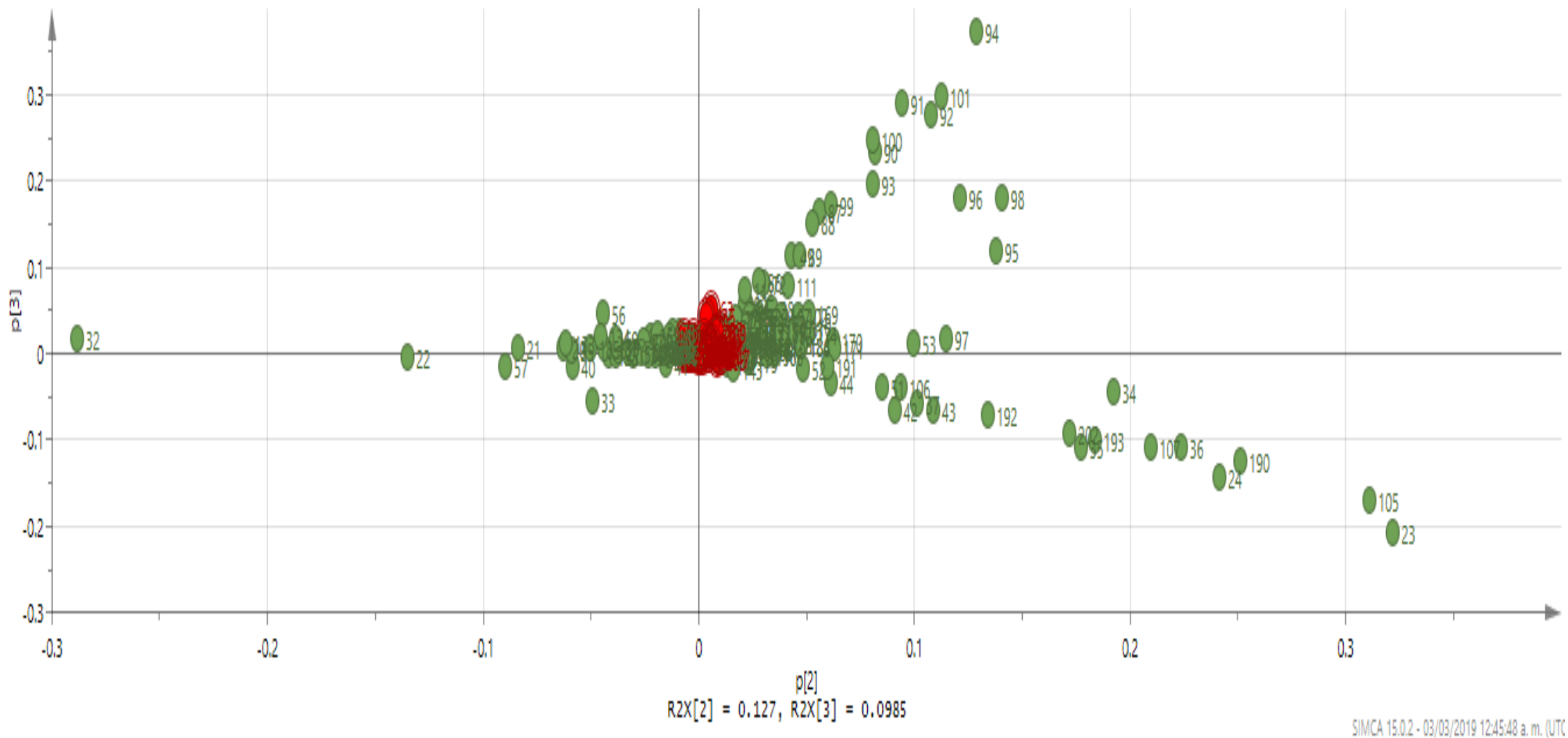


Figura 32. Loading plot de ^1H -RMN de los extractos y fracciones de *B. alba*.

Capítulo 7. Resultados

PROTON_01
asm2018-2

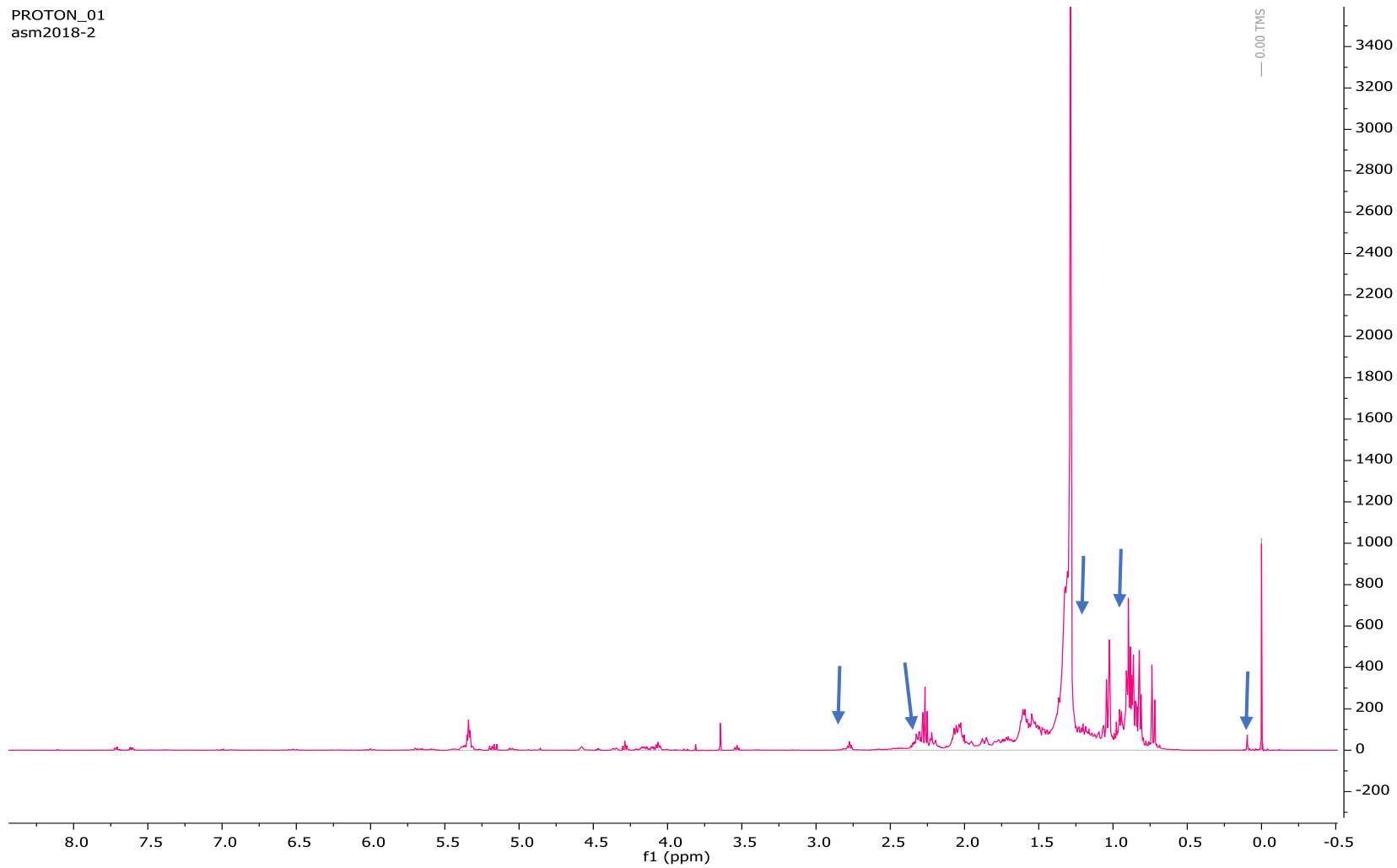


Figura 33. Espectro de ¹H-RMN de la Fc Hex de la raíz de *B. alba*.

7.7.2. Construcción del modelo de Proyecciones Ortogonales a las Estructuras Latentes (O-PLS)

Antes de la construcción del modelo, se probaron diferentes tipos de normalización de los datos, el que mejor resultado nos dio fue el escalado de Pareto/N, además se añadió la variable Y, que como mencionamos anteriormente la variable Y está conformada por los valores obtenidos de la actividad biológica, en este caso la MIC que obtuvimos en los resultados *in vitro* en contra de *M. tuberculosis*. En cuanto a la calidad y confiabilidad del modelo O-PLS obtuvimos valores de R^2X (cum)=0.907 R^2Y (cum)=0.918 y para Q^2 (cum)= 0.0561. Los dos primeros valores nos indican que el modelo construido es robusto, ya que tenemos valores cercanos a 1. Sin embargo, la capacidad predictiva del modelo no es buena, ya que no se acerca al valor de 0.5 (Heike, 1995). En este caso no se requiere predecir la actividad de las muestras porque se realizaron los ensayos *in vitro*.

7.7.3. Evaluación del modelo de O-PLS

Con el fin de indicar cuales son las variables responsables de la actividad antituberculosa se procedió a analizar el coeficiente de regresión de los extractos y fracciones de *B. alba*. Primero se realizó un O-PLS-DA (análisis discriminante de datos) y al observar el *score scatter plot* (diagrama de dispersión) se puede apreciar que las muestras se dividieron en dos partes, las activas del lado izquierdo y las no activas de lado derecho (Figura 34). Por otra parte, al realizar el *contribution plot* de la Fc Hex de la raíz, el gráfico muestra una barra hacia abajo por cada variable activa, en este caso se puede observar que las variables que tienen un efecto en la contribución de la actividad antituberculosa de la Fc Hex de la raíz. Se puede ver en la Figura 35 que los picos negativos son los que el modelo nos indica como activos.

Capítulo 7. Resultados

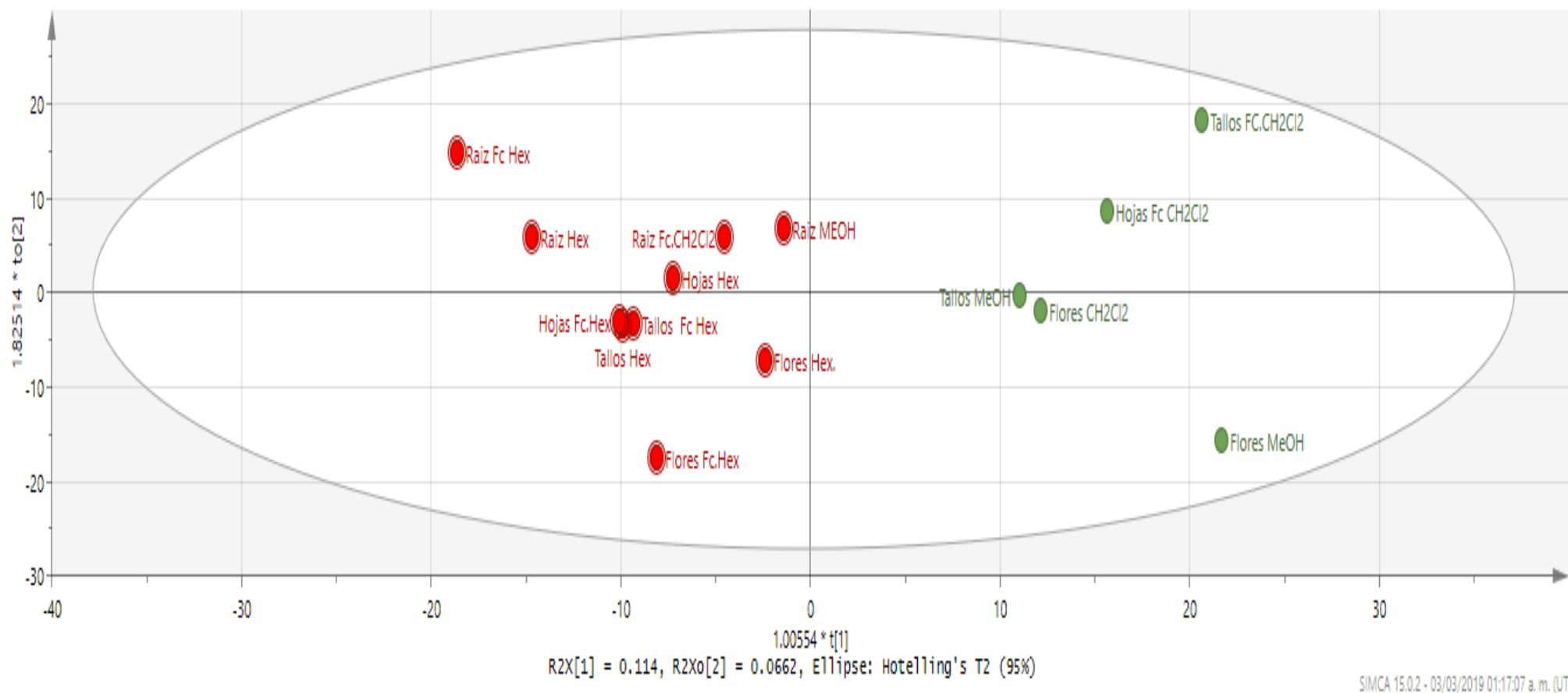


Figura 34.O-PLS de las 14 muestras de extractos y fracciones por ^1H -RMN de *B. alba*

Capítulo 7. Resultados

RMN_QUIMIOMETRIA_PICO_MUESTRAS2,4,6,8ETC_010319.M2 (OPLS)
Colored variables outside their 3 std. dev. range

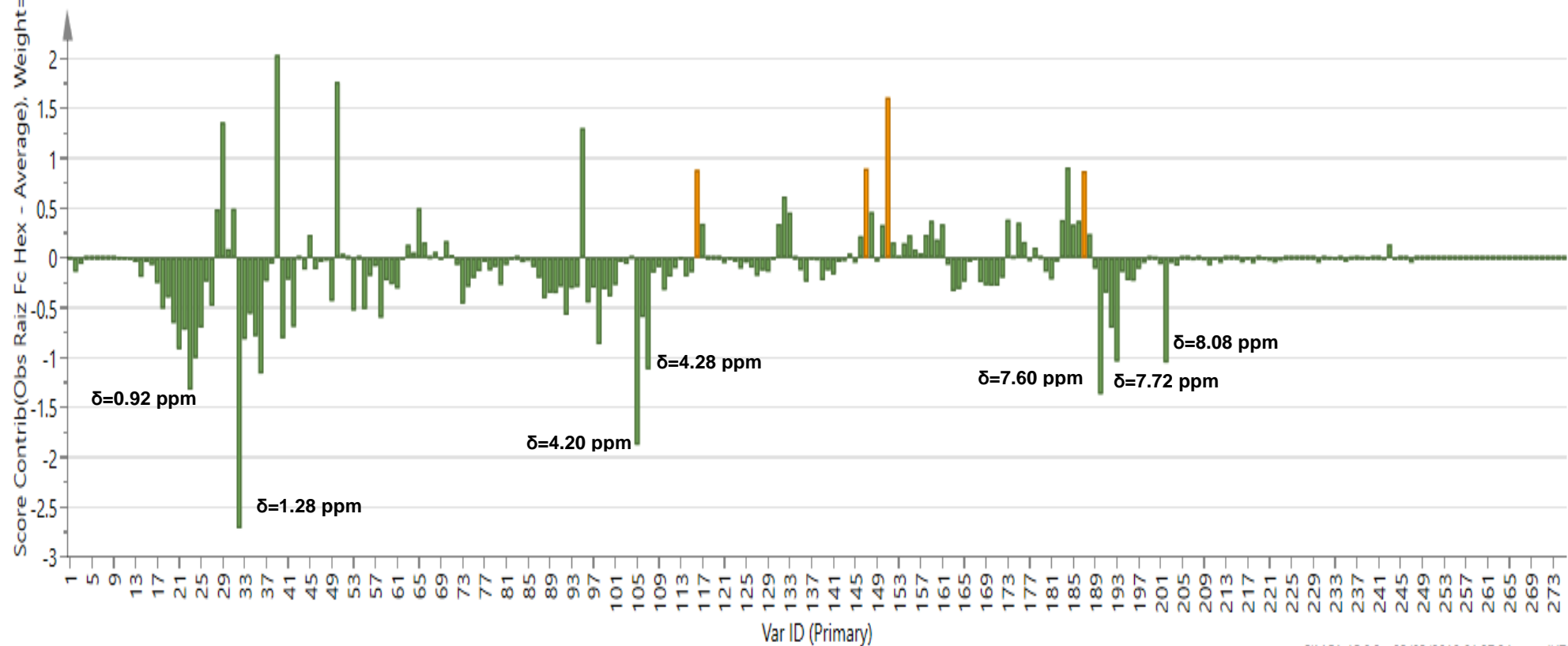


Figura 35. Contribution plot de O-PLS de la Fc Hex de *B. alba* por ^1H -RMN. $\delta=0.92, 1.28, 4.20, 4.28, 7.60, 7.72$ y 8.08 ppm.

Capítulo 7. Resultados

7.8. Determinación de la MIC de las fracciones de la Fc Hex de la raíz de *Bidens alba* por medio del ensayo de azul alamar

De acuerdo con el análisis quimiométrico y los resultados de la actividad antituberculosa, se fraccionó la Fc Hex de la raíz, ya que fue la más activa, obteniendo un total de 13 fracciones a las cuales se les determinó la MIC. Se obtuvieron los siguientes resultados.

Como se puede observar en la tabla 12, todas las fracciones evaluadas tuvieron actividad en contra de *M. tuberculosis* H37Rv, sin embargo, la Fc8 mostró una mejor actividad antituberculosa con una MIC de 12.5 µg/mL.

Tabla 10. MIC obtenida de las fracciones de la Fc Hex de la Raíz de *B. alba*.

Fracciones de <i>B. alba</i>	
Fracción	MIC (µg/mL)
1Ba	100
2Ba	50
3Ba	50
4Ba	50
5Ba	50
6Ba	100
7Ba	100
8Ba	12.5
9Ba	>100
10Ba	>100
11Ba	>100
12Ba	>100
13Ba	>100

MIC= Concentración Mínima Inhibitoria; NI= No Inhibitorio a la máxima concentración evaluada. Experimentos realizados: Replicas= 2, n=3.

Finalmente, se realizó un análisis de ¹H-RMN a la Fc8 de *B. alba*, ya que es la Fc que mejor actividad antituberculosa mostró, esto con el fin de caracterizar a los metabolitos responsable de la actividad antituberculosa.

Capítulo 7. Resultados

7.8.1. Caracterización por ^1H -RMN de la fracción 8 de la raíz de *B. alba*.

Se obtuvo un espectro de ^1H -RMN de la Fc8 de *B. alba*, ya que fue la que mostró una mejor actividad antimicobacteriana (Figura 35) en el cual se pueden observar las señales del compuesto responsable de la actividad antituberculosa. Se referenció TMS a $\delta= 0.0$ ppm y las regiones de $\delta= 4.80- 4.90$ ppm y $\delta= 3.30- 3.32$ ppm se suprimieron debido a la señal residual de CD_3OD .

En la Figura 36, se observa un singulete con un desplazamiento químico de $\delta= 7.89$ ppm correspondiente a hidrógenos unidos a un sistema aromático, al igual que las señales que se encuentran en $\delta=6.53$ y 6.26 ppm. En $\delta=4.85$, 4.12 , 4.11 , 4.10 y 4.06 ppm se observan señales correspondientes a protones vinílicos o de protones unidos a oxígenos. Por otra parte, se observan señales muy pequeñas en $\delta=2.60$, 2.58 y 2.56 que por el desplazamiento químico corresponden a protones de alquinos. En la región de $\delta= 3.37$ a 2.26 ppm y otras señales más pequeñas en $\delta= 2.13$ a 1.82 ppm. Finalmente se observan las señales correspondientes a protones alifáticos con $\delta=1.61$, 1.52 , 1.29 , 1.11 , 1.02 , 0.90 y 0.89 ppm respectivamente.

Capítulo 8. Discusión

PROTON_01
asm1621

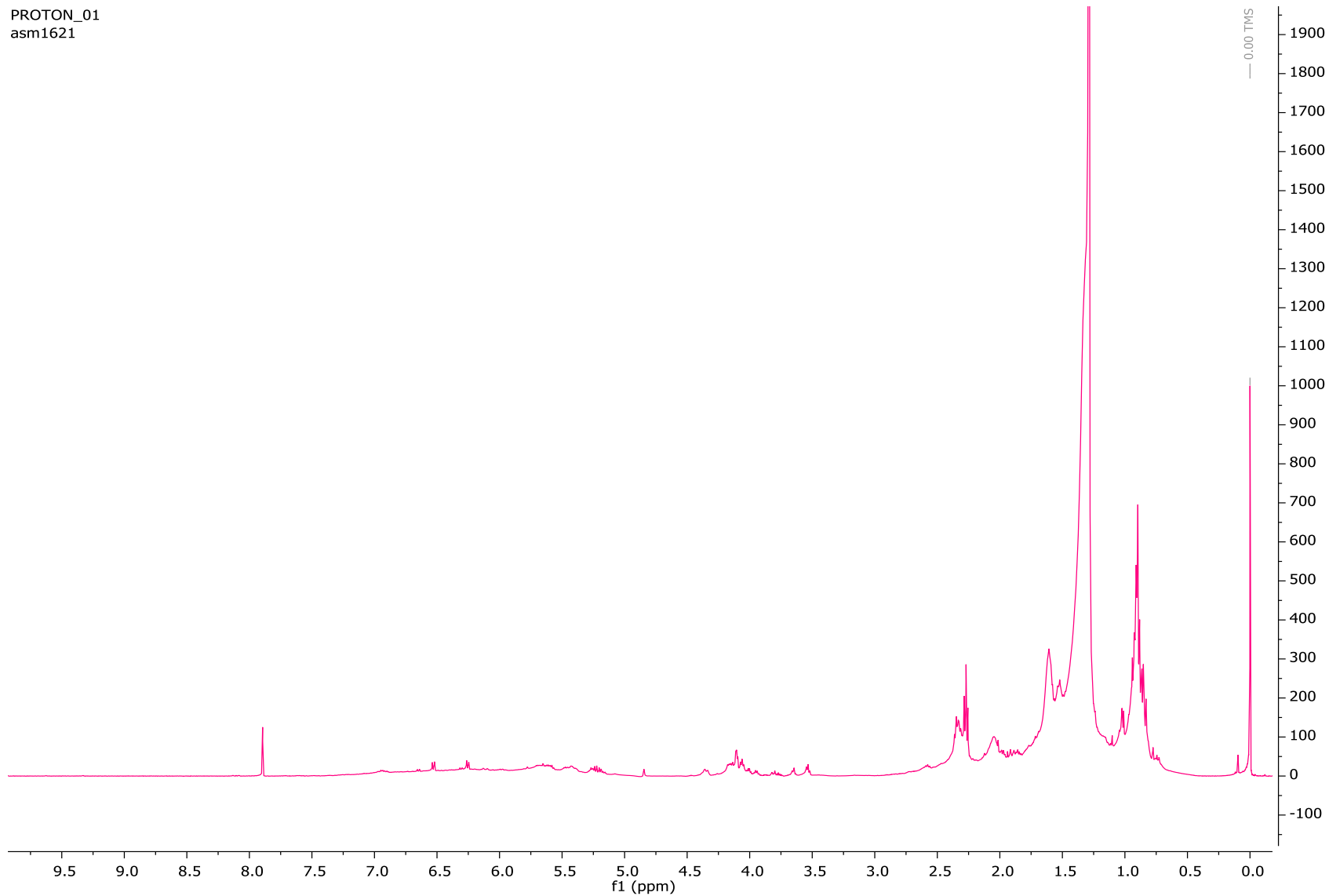


Figura 36. Espectro de ¹H-RMN de la Fc8 de *B. alba*

8. DISCUSIÓN

8.1. *Bidens alba*

En la determinación de la actividad antituberculosa de los extractos y fracciones de *B. alba*, todos los extractos y fracciones provenientes de la raíz presentaron actividad bactericida frente a *M. tuberculosis* a diferencia de los extractos provenientes de otras partes de la planta. La Fc Hex de flores, hojas y tallos fue activa a una MIC de 200 µg/mL, sin embargo, la Fc Hex de la raíz mostró una actividad superior a la obtenida por los demás extractos y fracciones mostrando una MIC de 25 µg/mL. Esta actividad antituberculosa de la Fc Hex puede deberse al hecho de que la pared celular de *M. tuberculosis* está compuesta principalmente de ácidos micólicos, por lo tanto, estos ácidos grasos de cadena larga no permiten que los compuestos polares penetren la pared celular de la micobacteria, sin embargo, los compuestos no polares pueden atravesarla sin ningún problema (Riley, 2010) pudiendo así llegar a su diana.

Recientemente se evaluó la actividad antituberculosa de *Bidens odorata* por (Hernández-Sánchez *et al.*, 2018), que es una planta del mismo género, pero diferente especie. Ellos reportan dos compuestos con actividad antimicobacteriana aislados de las fracciones de AcOEt y de EtOH/CH₂Cl₂, las cuales, presentaron MIC de 50 y 12.5 µg/mL. Estos compuestos fueron caracterizados por RMN para conocer su estructura química; siendo que son plantas de la misma familia y género se espera encontrar compuestos similares, por lo que, en el presente trabajo se buscaron similitudes en los desplazamientos químicos reportados con los que obtuvimos. El primer compuesto que reportaron es un compuesto glucosídico que muestra desplazamientos químicos característicos de protones aromáticos en $\delta = 7.95, 7.46$ y 7.13 ppm. También reportan protones vinílicos en $\delta = 7.63$ y 6.34 y β -D-glucopiranosida $\delta = 4.57, 4.34, 3.79$ y 3.52 ppm. Al analizar los espectros obtenidos se encontraron desplazamientos químicos similares en algunos de los extractos, especialmente en las fracciones de CH₂Cl₂. Por ejemplo: en las flores, en las hojas y en los tallos de las fracciones de CH₂Cl₂ se pudieron observar desplazamientos químicos de protones aromáticos a $\delta = 8.11, 7.71,$

Capítulo 8. Discusión

7.62 ppm; protones vinílicos a $\delta = 5.34$ ppm y también se podrían encontrar los desplazamientos de protones anoméricos en $\delta = 5.34$, 4.29 y 4.22 ppm entre otros. Sin embargo, los extractos son mezclas complejas, por lo cual, no se puede atribuir la bioactividad a una sola molécula con cierto desplazamiento químico. Por otra parte, con se puede afirmar que, aunque a simple vista sean iguales *B. alba* y *B. odorata* son químicamente distintas (Heike, 1995; Vibrans, 2011)

Por otra parte, el segundo compuesto reportado es el ácido 3-5 dihidroxibenzoico, sin embargo, este ya ha sido aislado previamente de la planta *Helianthemum canum* y se demostró su actividad antibacteriana y antioxidante (Baldemir *et al.*, 2017). Cabe destacar, que este grupo de estudio únicamente evaluó la parte aérea de la planta en su totalidad; en cambio, en el presente estudio se procesó cada parte de *B. alba* por separado y añadimos al estudio a la raíz. También, se realizaron diferentes extracciones y así, se pudo saber, qué parte de la planta en específico posee los compuestos con mejor actividad antituberculosa. Por lo que se pudo continuar con este trabajo de investigación sin llegar al mismo compuesto que ellos aislaron.

Una vez, obtenidos los *fingerprints* y los resultados de la actividad antituberculosa de todos los extractos y fracciones se hizo uso de la quimiometría para llegar al compuesto activo (Cornejo-Báez *et al.*, 2020). El PCA se usó para descubrir las relaciones entre un conjunto de variables (actividad biológica) con respecto a las variables de un conjunto de datos (perfiles químicos de los extractos y fracciones. La reducción de datos se consiguió manteniendo los primeros PCs que contienen la mayor parte de la información en los datos (McKenzie *et al.*, 2011). Utilizando los perfiles químicos obtenidos por HPLC-UV se probaron distintas combinaciones de PC supervisando el comportamiento de las muestras respecto a su actividad antituberculosa obtenida previamente en los resultados *in vitro* (Anexos). La mejor combinación fue el PC3 con el PC5 ya que mostró una buena agrupación de las muestras respecto a la MIC obtenida en los ensayos *in vitro*, siendo que la Fc Hex de la raíz (la más activa) cayó separada del resto de los demás extractos y fracciones. Al revisar el *loading plot* se observaron las variables que influyeron en que la Fc Hex de

Capítulo 8. Discusión

la raíz cayera alejada del resto de las muestras, esto la hace diferente de las demás, y al ser la que mostró una mejor MIC para *M. tuberculosis*, nos indica que estos compuestos tienen participación en la actividad antituberculosa. Por otra parte, se realizó el O-PLS en el cual se observaron como picos negativos a los picos responsables de la actividad antituberculosa, a un $t_R= 91.48, 91.17, 90.02, 80.29, 66.98, 64.25, 41.74, 23.26$ y 16.04 min. Al analizar el perfil cromatográfico de la Fc Hex de raíz de *B. alba* se pudo observar observar que los picos con $t_R= 91.02 - 91.48$ min corresponden a un solo pico grande que se encuentra al final del cromatograma. El pico negativo de $t_R=80.29$ min no es representativo, por lo cual se descarta, los picos negativos de $t_R=66.98$ y 64.25 min corresponden a otro pico grande situado en medio del cromatograma; los picos de $t_R=41.74$ min no es representativo por lo cual se descarta. Los picos de $t_R=23.26$ min se encuentra unido con uno de $t_R=25.24$ min y finalmente el pico con $t_R= 16.04$ min también se encontró en el cromatograma. Por lo anterior se presume que los picos negativos obtenidos en el O-PLS presentes en la Fc Hex de la raíz de *B. alba* son los mismos picos que los obtenidos en el *X-variable line plot*, a excepción de $t_R= 23.26$ min. Aunque difieren en lo mínimo en los tiempos de retención, los picos involucrados en ambos análisis son los mismos. Por lo cual, se puede afirmar que los picos responsables de la actividad antituberculosa de la Fc Hex de la raíz son las variables presentes en $t_R= 16.04, 23.26, 64.25, 66.98, 90.02, 91.17, 91.48$ min (Figura 37).

Capítulo 8. Discusión

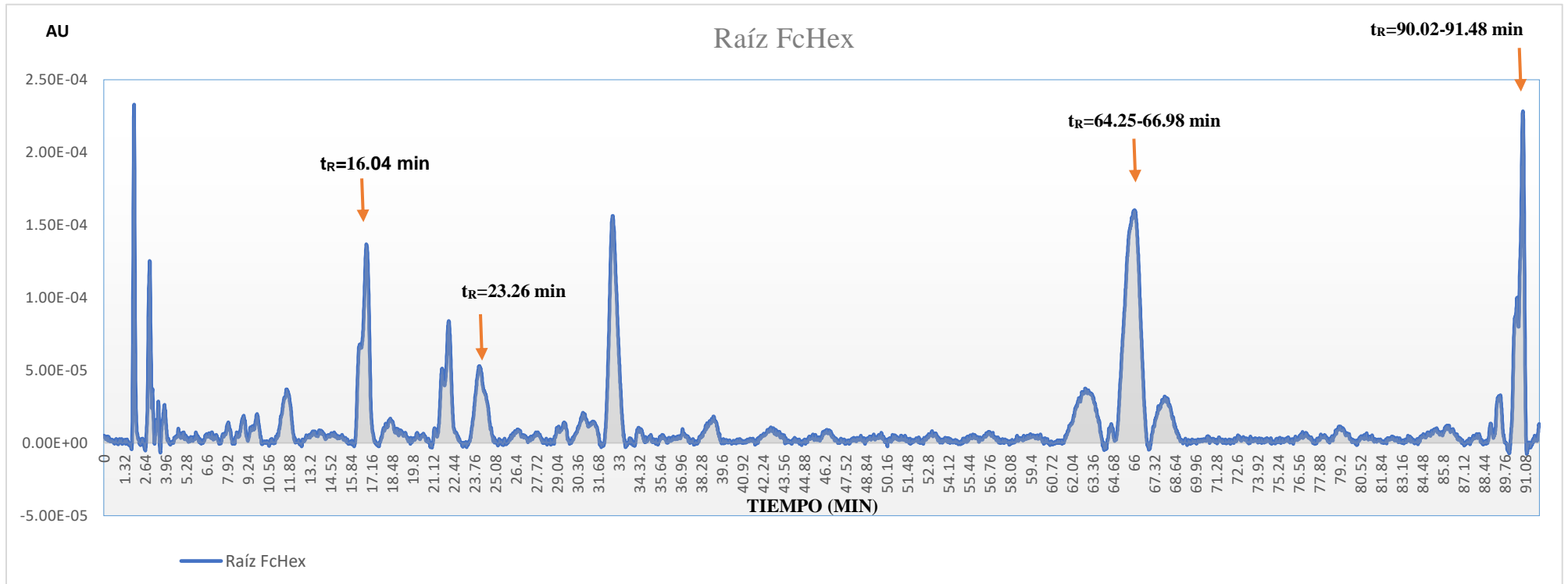


Figura 37. Cromatograma de la Fc Hex de Raíz de *B. alba* señalando los picos obtenidos en el modelo de O-PLS.

8.2. *Xylosma flexuosum*

El Ext Hex crudo de las hojas tuvo una MIC de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo el extracto que presentó mejor actividad inhibitoria de la micobacteria. Por otra parte, los Ext MeOH de tallos, hojas, PA y la Fc Hex resultaron no inhibitorias a la máxima concentración evaluada y los demás extractos mostraron una MIC de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No hay reportes sobre la actividad biológica de esta planta, incluso en México se considera en peligro de extinción (Menezes-De-Oliveira *et al.*, 2011), sin embargo, hay reportes de que los extractos de otras especies de *Xylosma* han presentado moderada actividad antibacteriana, actividad citotóxica y antioxidante (Mosaddik *et al.*, 2004)

En el análisis quimiométrico de los perfiles cromatográficos, se probaron varias combinaciones de PC para el PCA, en donde el PC1 vs PC2 obtuvo la mejor agrupación, ya que todos los extractos se agruparon según su polaridad, es decir todas las muestras Hex formaron un *cluster*, las muestras con CH_2Cl_2 formaron el segundo *cluster* y por último las muestras provenientes del Ext MeOH se agruparon juntas, a diferencia de los *clusters* obtenidos con *B. alba*, que se agruparon de acuerdo a la actividad antituberculosa que presentaron los extractos. En el análisis de O-PLS, se realizó el *contribution plot* del Ext Hex de Hojas y se obtuvo como resultado que los picos negativos responsables de la actividad antituberculosa son las variables: 155, 223, 269, 1626-1632, 24.82 y 3793-3822 que corresponden a los $t_{\text{R}}=2.05, 2.96, 3.57, 21.66-21.71, 25.54-25.85, 26.69-26.76, 33.08$ y $50.56-50.94$ min. Al analizar el perfil cromatográfico del Ext Hex de Hojas se pudo observar que hay picos que efectivamente se encuentran en el cromatograma y hay picos que son muy pequeños, ya que se encuentran al ras de la línea base como los de $t_{\text{R}}=27.52$ y $26.69-26.76$ min. Los cuales fueron descartados. En la Figura 38 se muestra el perfil cromatográfico del Ext Hex de Hojas, sin embargo, el pico en $t_{\text{R}}=25.54-25.85$ se descartó del análisis a pesar de ser el pico negativo con mayor contribución en el O-PLS. Como mencionamos anteriormente en el *X-variable line plot* de PCA nos arrojó las variables con $t_{\text{R}}=24.72-24.79$ min. Como las que tienen mayor contribución en la muestra, y comparándolos en el perfil cromatográfico corresponden a unos de los picos más evidentes del cromatograma del Ext Hex de Hojas. En este caso, este pico

Capítulo 8. Discusión

puede estar enmascarado por el efecto del pico mayoritario que se encuentra al lado, por lo cual, se le puede atribuir a que las variables con $t_R= 24.72$ a 25.56 son provenientes del mismo pico en el cromatograma. Con estos análisis concluimos que hay 7 picos responsables de la actividad antituberculosa del Ext Hex de las Hojas se encuentran ubicados en $t_R=2.05, 2.96, 3.57, 21.66-21.74, 24.72-25.56, 33.08$ y $50.56-50.94$ min.

El extracto más activo fue el Ext Hex de las hojas, por lo cual, se realizó el fraccionamiento y se volvió a determinar la actividad antituberculosa de cada una de las fracciones, siendo la Fc8 la más activa, sin embargo, la MIC no mejoró, se mantuvo en $50 \mu\text{g/mL}$. Probablemente en la Fc8 aún hay otros compuestos que enmascaran la actividad antituberculosa del compuesto que ejerce la inhibición de *M. tuberculosis*. Debido a ciertos contratiempos con la pandemia, no se pudieron obtener los espectros de las muestras de *X. flexuosum* ni de la Fc8 debido al poco rendimiento obtenido, sin embargo, sería una buena opción continuar con este trabajo, ya que hay poca información sobre esta planta. Y sería bueno conocer la naturaleza de los compuestos que participan en la actividad antituberculosa de este extracto, y en el mejor caso aislarlos e identificarlos. Como se mencionó anteriormente se sabe muy poco de esta planta, sin embargo, hay reportes de que la familia *Flacourtiaceae* posee terpenos, lactonas y azúcares (Menezes-De-Oliveira *et al.*, 2011; Nko'o *et al.*, 2021) , además hay reportes de que el compuesto 8-hidroxi-6-methoxi-pentilisocoumarina presenta actividad contra *M. tuberculosis* con una MIC de $40.5 \mu\text{g/mL}$, debido a ello, el compuesto responsable de la actividad antituberculosa probablemente tenga una estructura similar, ya que las MICs se asemejan mucho (Truong *et al.*, 2011b).

Capítulo 8. Discusión

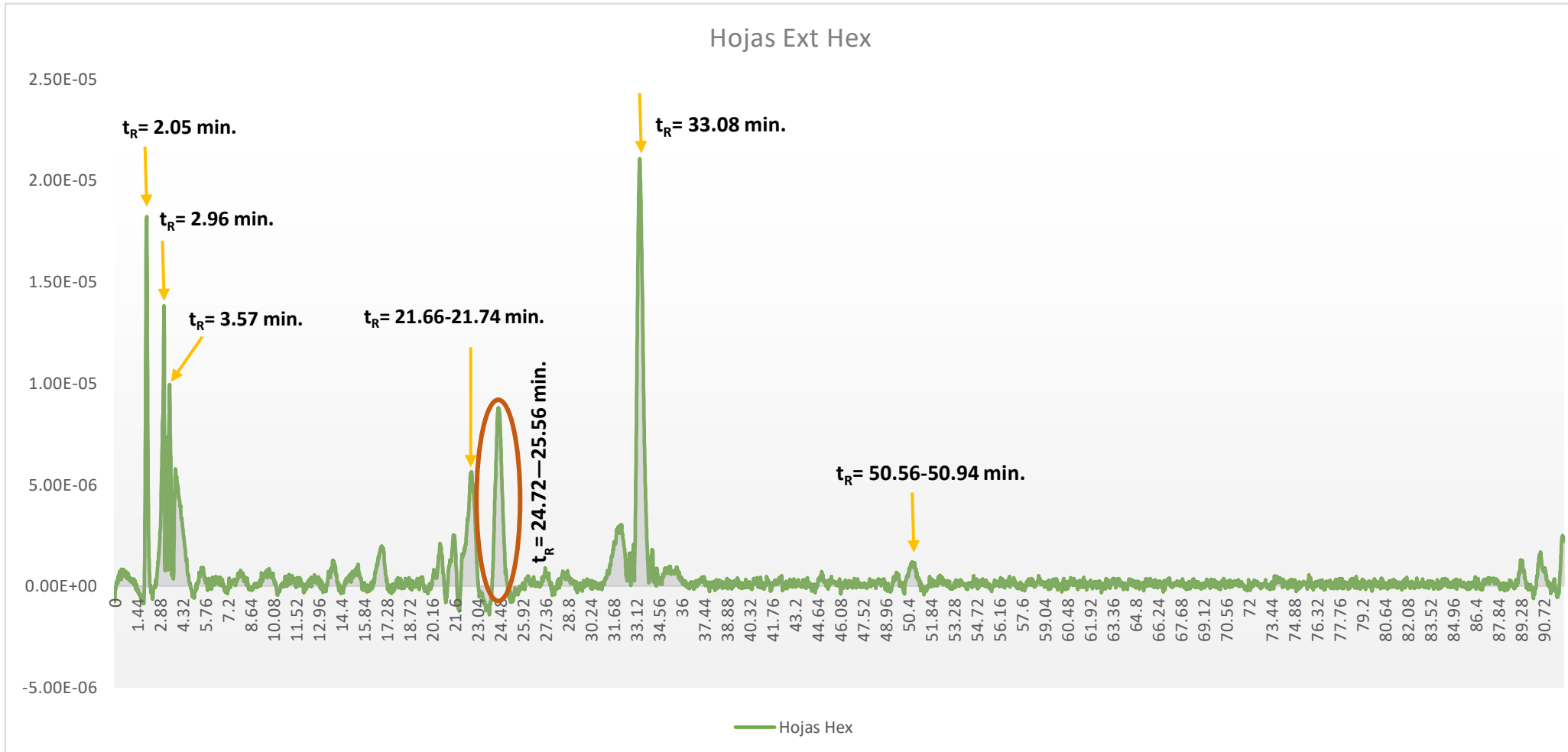


Figura 38. Cromatograma señalando los picos obtenidos en el modelo de O-PLS además del pico obtenido en el resultado del *X-variable line plot* señalado con una elipse.

8.3. Quimiometría de ^1H -RMN de la planta más activa

Una vez obtenidos los resultados del análisis quimiométrico de HPLC-UV de ambas plantas, se determinó que la planta más activa fue *B. alba*, en especial la Fc Hex de la raíz, que en el *contribution plot* nos mostró 5 picos negativos con una contribución mayor a 2, por lo cual, quiere decir que la acción de estos metabolitos es poco probable que se esté enmascarando con otros compuestos minoritarios radames, umetrics. Por tal motivo se decidió realizar un análisis quimiométrico de los perfiles por ^1H -RMN.

En el PCA se probaron y supervisaron distintas combinaciones de PC, la que mejor correlación mostró de acuerdo con la polaridad de las muestras fue PC2 vs PC3. Sin embargo, no mostró una buena separación de las muestras como en el caso del PCA por HPLC-UV. El análisis del *loading plot* se dificultó un poco, ya que todas las variables de interés se encontraban muy juntas, lo cual dificultó la identificación cuáles de las variables que están presentes en la Fc Hex de la raíz.

Por otra parte, el análisis de O-PLS mostró como responsables de la actividad antituberculosa a las señales presentes en 0.92, 1.28, 1.44, 3.92, 4.20, 4.28, 7.60, 7.72 y 8.08 ppm. Al buscar estas señales en el espectro de la Fc Hex de la Raíz de *B. alba* se observó que algunas de estas señales si están presentes y otras no. En la Figura 39 se muestran las señales ampliadas de ^1H -RMN. La primera variable tomada en cuenta fue la 23 que está en 0.92 ppm, al analizar el espectro se pudo observar que sí se encuentra, sin embargo, es un pico no bien definido y pequeño, estos hidrógenos están situados sobre cadenas alifáticas, ya que estos protones presentan valores de δ próximos a 1.0. La variable 32 es la más grande, por lo cual puede tener más peso en el análisis. Está situada en 1.28 ppm, se puede ver en la imagen que corresponde a la mitad de un pico muy alto, por lo cual esta señal puede involucrar más de una variable, esto lo confirmamos al ver el grafico de contribución, donde se observa que la variable 33, sin embargo, la barra es muy pequeña por lo cual no se consideró, pero puede ser que estas variables pequeñas tengan la actividad biológica aún más fuerte que las demás variables, pero su efecto se encuentra enmascarado

Capítulo 8. Discusión

por las variables de mayor tamaño (Alvarez-zapata *et al.*, 2015), en este caso los valores de δ también corresponden a protones alifáticos, que comparando resultados con el O-PLS de HPLC-UV son los protones del compuesto que salió a un $t_R= 90.02-91.48$ min., lo cual explica la polaridad de estos.

Por otra parte, la variable 105 corresponde a la señal en $\delta= 4.20$ ppm que en el *contribution plot* es la segunda más grande, sin embargo, al buscar la señal en el espectro, no apareció. Por lo cual, la variable se descarta como posible responsable de la actividad antituberculosa. La siguiente variable analizada fue la 107, correspondiente a 4.28 ppm, se encontró la señal en dicha región del espectro y corresponde a la parte central derecha de un triplete, en este caso la acción pudiera deberse a protones anoméricos. Recordando los picos obtenidos en el análisis de O-PLS de los perfiles cromatográficos, se obtuvo un pico en $t_R= 16.04$ min, en este caso podría deberse a la presencia de algún azúcar ejerciendo este tipo de acción, ya que los azúcares son compuestos polares que bien pueden eluir a este tiempo de retención. La siguiente señal analizada fue la correspondiente a 7.60 ppm correspondiente a la variable 190, en la señal se encontró que corresponde a un pico bien definido, la siguiente señal situada en 7.72 ppm correspondiente a la variable 193, muestra dos señales juntas. Estas señales ubicadas en 7.60 y 7.72 ppm corresponden a hidrógenos unidos a un sistema aromático. Finalmente se identificó la variable 202 correspondiente a la señal en 8.08 correspondiente a dos picos muy pequeños juntos, que también se atribuye la actividad a un compuesto aromático de acuerdo con los desplazamientos químicos que adoptan los protones en RMN, los cuales se pueden correlacionar con el pico situado en $t_R=64.25-66.98$ min, compuesto que posee mediana polaridad.

Capítulo 8. Discusión

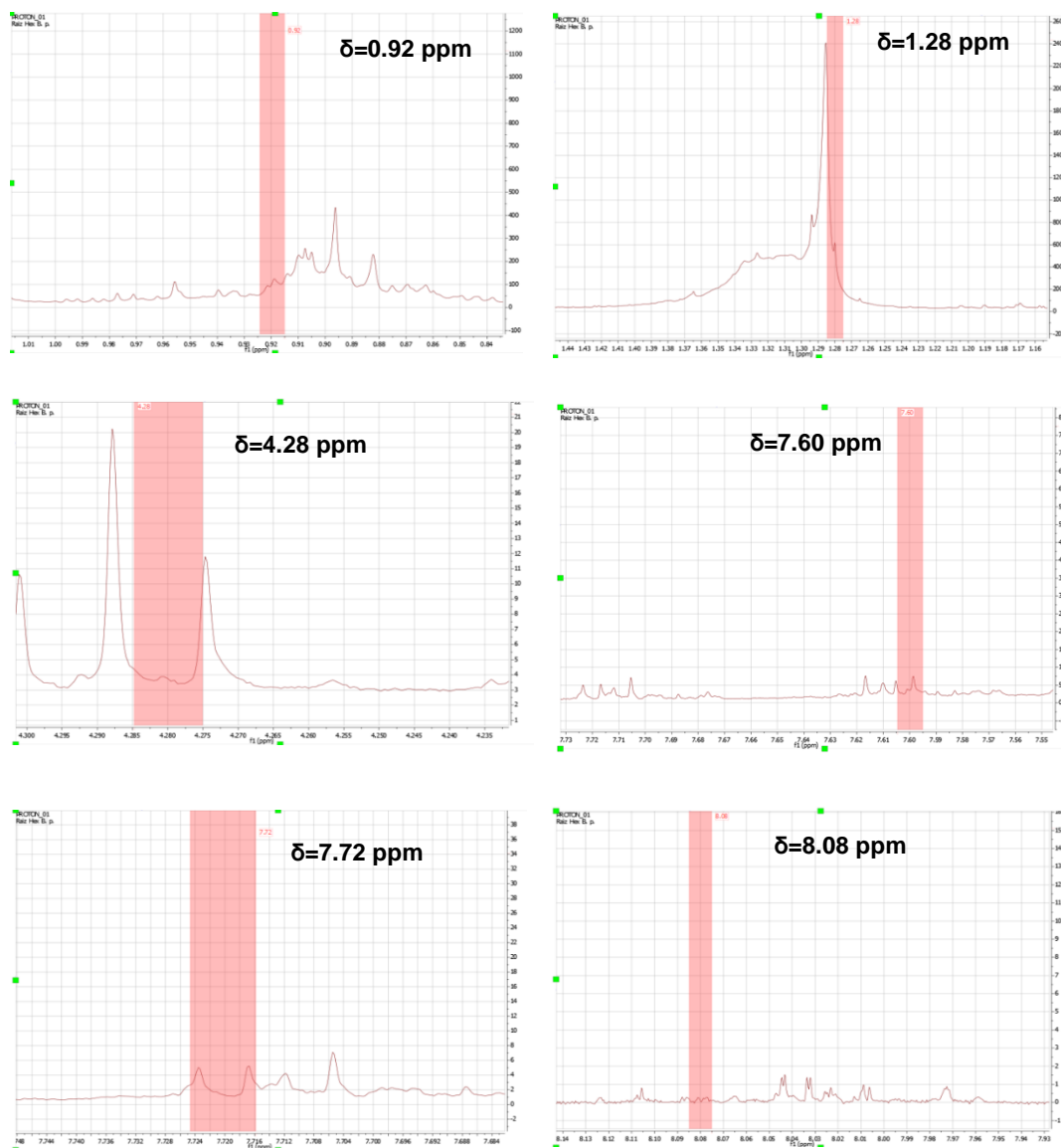


Figura 39. Regiones ampliadas de los espectros de ^1H -RMN de la Fc Hex de *B. alba*.

Como el extracto más activo fue la Fc Hex de la raíz se llevó a cabo un fraccionamiento para corroborar que las señales que el O-PLS mostró como responsables de la actividad antituberculosa estuvieran presentes en la fracción con mejor actividad se optó por realizar un fraccionamiento con una columna cromatográfica. Una vez obtenidas las fracciones se realizó la determinación de la MIC para detectar la fracción más activa contra *M. tuberculosis* por medio del ensayo MABA, los resultados revelaron que la Fc8 fue la que mejor actividad mostró frente a

Capítulo 8. Discusión

M tuberculosis H37Rv con una MIC de 12.5 µg/mL. Con estos resultados se puede afirmar que *B. alba* tiene metabolitos con actividad antituberculosa, ya que la Fc8 duplicó su actividad antimicobacteriana (recordando que antes del fraccionamiento presentaba una MIC de 25 µg/mL). Por este motivo, la Fc8 se sometió nuevamente a un análisis de ¹H-RMN en donde se pudo observar los desplazamientos químicos correspondientes a los protones presentes en los metabolitos con actividad antituberculosa que se encontraron en esta fracción.

Aunque la Fc8 sigue siendo una mezcla homogénea de compuestos y no se encuentra totalmente pura debido al poco rendimiento que se obtuvo en el fraccionamiento, con el análisis de ¹H-RMN se puede conocer la naturaleza de los metabolitos presentes en esta fracción y proponer la estructura del compuesto antituberculoso (Figura 40), ya que se tiene documentado que tipo de compuestos predominan en la familia *Asteraceae* y sobre todo en el género *Bidens*.

La familia *Asteraceae* son ricas en metabolitos secundarios de diferentes clases químicas entre los que destacan poliacetilenos, sesquiterpenos, lactonas, alcaloides y flavonoides (Sharma *et al.*, 2017). Además, en la literatura hay reportes de que la familia *Asteraceae* tiene compuestos conocidos como guaianolide, que son una clase importante de metabolitos secundarios muy activos (X. Hu *et al.*, 2019). Por otra parte, se conoce que el complejo *Bidens pilosa*, al cual pertenece *B. alba* (Ballard, 1986) presentan entre sus principales metabolitos secundarios poliacetilenos, chalconas, flavonoides, terpenos y fenilpropanoides (Grombone-Guaratini *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2011; Lv and Zhang, 2013; Hu *et al.*, 2018), por lo cual, con base a esto y a las señales obtenidas en el espectro de ¹H-RMN se puede proponer la estructura del metabolito involucrado en la actividad antituberculosa. Además, es importante señalar, que los flavonoides, fenilpropanoides y chalconas son metabolitos secundarios que tienen afinidad por disolventes polares debido a los grupos funcionales que se encuentran presentes en estas moléculas, por lo cual, prácticamente se descartan estas clases de metabolitos secundarios, ya que los extractos polares y medianamente polares no mostraron una MIC significativa, a diferencia de los extractos y fracciones hexánicos.

Capítulo 8. Discusión

Existen reportes de que se han encontrado poliacetilenos en la superficie exterior de algunas raíces de plantas en mayor concentración (Rawson *et al.*, 2013), Además, los poliacetilenos producidos por la familia *Asteraceae* son estructuralmente diversos e incluyen tiofenos, alcanidas, lactonas, furanos, espirocetales, aromáticos y glucósidos (Pollo *et al.*, 2013a).

Al analizar el espectro obtenido de la Fc8 con los resultados obtenidos del análisis de O-PLS se puede observar que la señal en $\delta=0.92$ ppm se encuentra aún presente en la Fc8, además hay otras señales a los lados. La señal en $\delta=1.28$ ppm también está presente en la Fc8 formando parte del pico más alto y abarcando la región desde $\delta=1.28 - 1.30$ ppm. Como la fracción es hexánica lo que más se observa en esta región son señales de protones alifáticos. Por otra parte, la región de $\delta=2.5-3.0$ ppm es característica de protones de alquinos, en el espectro se pueden ver las señales presentes en esa región, sin embargo, son muy pequeñas, debido a que pueden estar a muy bajas concentraciones. Existen reportes de que los poliacetilenos se encuentran en bajas concentraciones debido a que son muy inestables y reactivos, ya que son muy susceptibles a sufrir reacciones de oxidación, cuando las formas aisladas son expuestas al aire; suelen degradarse con la luz o a descomponerse debido a una variación de pH (Minto and Blacklock, 2008; Silva *et al.*, 2015). La detección e identificación de poliacetilenos en plantas es fundamental debido a que exhiben importantes propiedades biológicas y algunos de ellos han demostrado tener actividad antiviral (Pollo *et al.*, 2013b), antibacteriana (Móricz, Ott and Morlock, 2018), antibiofilms (Emad *et al.*, 2020), angiogénica (Zhu *et al.*, 2021), citotóxica (Ki *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2020) y antiinflamatoria (Xu *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2021) e incluso, se han aislado poliacetilenos que mostraron actividad antimicobacteriana (Schinkovitz and Michael Stavri, 2008). Por otra parte, se ha identificado en *B. alba* el poliacetileno fenil-hepta-1,3,5-triino que ha demostrado tener actividad larvícida (Arnason *et al.*, 1981).

En la región de $\delta=6.5 - 8.0$ ppm es donde se observan los protones unidos a un sistema aromático, en este caso se observa un singulete en $\delta=7.89$, probablemente se trata de un aromático sustituido con algo que lo está desplazando hacia campo

Capítulo 8. Discusión

alto. El O-PLS nos arroja que las señales presentes en $\delta=7.60$, 7.72 y 8.08 ppm son las responsables de contribuir a la actividad antituberculosa, aunque no son las mismas señales que de $\delta=7.89$ ppm, se trata de un protón aromático, el cual podría tratarse de un flavonoide, fenilpropanoide o una chalcona, que han mostrado tener un amplio espectro de actividades biológicas (Hoffmann and Hölzl, 1988; Redl, Davis and Bauer, 1992; Oliveira *et al.*, 2004b; Chang *et al.*, 2007; Yuan *et al.*, 2008; Alves Borges Leal *et al.*, 2021; Ferreira *et al.*, 2021; Xavier *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2021). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, estos tipos de metabolitos secundarios se descartan ya que estos compuestos son muy polares y es muy poco probable encontrarlos en una fracción hexánica, además el OPLS no marcó como tal este desplazamiento químico, por lo cual se descarta.

Con todos estos resultados y el análisis realizado, no se puede atribuirle la actividad antituberculosa a un compuesto químico en específico, ya que no fue posible obtener una fracción totalmente pura y, en consecuencia, aún hay metabolitos que están expresándose en el perfil químico de $^1\text{H-RMN}$ y que probablemente no tengan ninguna relación con la actividad antituberculosa, sin embargo, se puede conocer un poco sobre la naturaleza de los metabolitos responsables de la actividad antituberculosa. Se sugiere que el compuesto activo podría ser un poliacetileno, ya que esta planta contiene en su mayoría este tipo de metabolitos secundarios, además, el O-PLS muestra la presencia de protones unidos a oxígenos, característicos de glúcidos ($\delta=4.20$ y 4.28 ppm), por lo anterior, este poliacetileno podría estar unido a un azúcar, estructuras que se han encontrado en este género y especies del complejo *B. pilosa*. Recientemente se identificaron dos nuevos poliacetilenos glucosados en *B. parviflora*, para lo cual elucidaron sus estructuras mostrando desplazamientos químicos similares a los que obtuvimos en el O-PLS. Ellos reportan desplazamientos químicos de los protones vecinos al triple enlace de $\delta=4.83$ ppm a 5.85 ppm, si bien es cierto que no se tienen estos desplazamientos químicos exactamente, es porque los sustituyentes no son los mismos, y eso afecta en el desplazamiento químico. Además, se reportan los desplazamientos químicos de los protones unidos a una cadena alifática que posee este poliacetileno, coincidiendo en las señales que el O-PLS nos da con mayor contribución ($\delta=0.092$ y 1.28 ppm) (Zhu *et al.*, 2021). Además,

Capítulo 8. Discusión

estos desplazamientos químicos también concuerdan con lo reportado previamente por (Kobaisy *et al.*, 1997).

Los poliacetilenos son moléculas hidrófobas que han demostrado tener actividad antibacteriana y antimicobacteriana (Kobaisy *et al.*, 1997; Schinkovitz and Michael Stavri, 2008). Se conoce que los posibles mecanismos de acción de los poliacetilenos se deben principalmente a la reactividad del triple enlace, lo que los hace susceptibles a una amplia gama de reacciones de sustitución, adición y ciclación, las cuales juegan un papel importante en la unión a proteínas (Rawson *et al.*, 2013). Debido a ello, se puede suponer que este metabolito entra por difusión a través de la pared celular de *M. tuberculosis*, igual que la rifampicina; una vez que llega al citoplasma interactúa con ciertas proteínas o enzimas responsables de la síntesis de ácidos micólicos. Por otra parte, los poliacetilenos se asemejan al ácido oleico y linoleico, que se ha demostrado que inhiben la biosíntesis de ácidos grasos de la pared celular de las bacterias ácido-lácticas, por lo cual, la acción de los poliacetilenos puede deberse a este modo de acción, o bien, pueden actuar inhibiendo la insaturación de los ácidos grasos que la bacteria sintetiza para su pared celular, provocando así que estos se acumulen dentro de la micobacteria ocasionando que se muera (Schinkovitz and Michael Stavri, 2008; Rawson *et al.*, 2013; Gómez-Tangarife *et al.*, 2018). En adición, si se observan las estructuras de todos los fármacos con actividad antituberculosa, la mayoría de ellos tiene al menos un grupo amino en su estructura, por lo cual, también debe ser algo importante para la actividad contra *M. tuberculosis*, debido a ello, no se puede descartar que el poliacetileno al cual se le está atribuyendo la bioactividad pueda tener algún nitrógeno en su estructura, el cual, podría estar potenciando su actividad.

Capítulo 8. Discusión

TON_01
1621

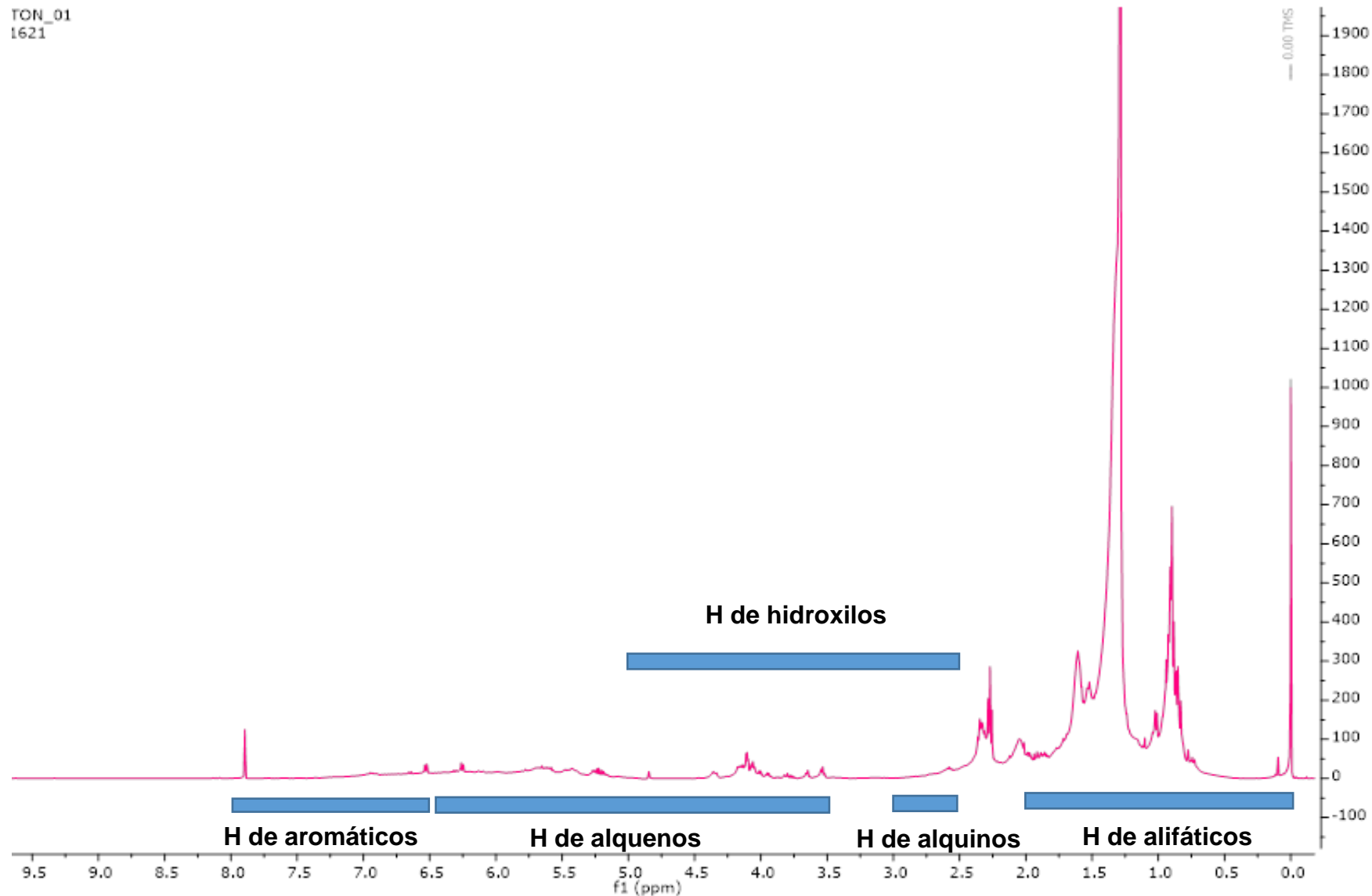


Figura 40. Espectro de la Fc 8 de la Fc Hex de la raíz de *B. alba*, se puede ver la naturaleza de los protones presentes en los metabolitos con actividad antituberculosa

9. CONCLUSIONES

Bidens alba y *Xylosma flexuosum* presentan compuestos con actividad contra *M. tuberculosis*. La fracción hexánica de la raíz de *B. alba* presentó una MIC de 25 µg/mL, y la fracción 8 proveniente de la fracción hexánica de la raíz exhibió una MIC de 12.5 µg/mL. Por otra parte, el extracto hexánico de *X. flexuosum* presentó una MIC de 50 µg/mL. Con estos resultados se respalda el uso de estas plantas en la medicina tradicional del estado de Veracruz para el tratamiento de la tuberculosis.

El análisis quimiométrico de los perfiles cromatográficos de *B. alba*, reveló que existe una buena correlación entre los *clusters* formados de acuerdo a la actividad biológica obtenida en los ensayos de MABA. El O-PLS de los perfiles cromatográficos pudo determinar los picos que tienen mayor contribución en la actividad antituberculosa, encontrándose en $t_R= 16.04, 23.26, 64.25-66.98$ y $90.02-91.48$ min. En cuanto a *X. flexuosum* el PCA agrupó a las muestras de acuerdo con la polaridad de los extractos, el O-PLS determinó los picos responsables de la actividad antituberculosa, encontrándose en $t_R=2.05, 2.96, 3.57, 21.66-21.74, 33.08$ y $50.56-50.94$ min.

El análisis quimiométrico de $^1\text{H-RMN}$ de *B. alba* O-PLS nos mostró las señales de los protones presentes en la molécula con actividad antituberculosa, sin embargo, no todas las señales se encontraron presentes en la fracción 8, siendo los protones con $\delta=0.92, 1.28, 4.20$ y 4.28 ppm los que se encontraron presentes en la fracción 8, atribuyéndole la bioactividad a un poliacetileno glucosado, ya que los desplazamientos químicos corresponden a este tipo de metabolitos.

Se pudieron determinar los metabolitos responsables de la actividad antituberculosa de *B. alba* y *X. flexuosum*. Mientras que con los datos obtenidos por $^1\text{H NMR}$, se determinó la naturaleza de los tipos de protones presentes en las moléculas con actividad antituberculosa.

10. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos, es pertinente realizar una nueva colecta de material vegetal, en el mismo lugar y en la misma temporada en la que se colectó. Realizar las fracciones hexánicas de interés de la misma forma, pero tratando de obtener un mayor rendimiento, para poder aislar e identificar al metabolito responsable de la actividad antituberculosa de ambas plantas.

Evaluar la toxicidad de los extractos y de las moléculas bioactivas aisladas en líneas celulares de macrófagos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbate, E. H. *et al.* (2007) "Tratamiento de la tuberculosis. Guía práctica elaborada por la Sección Tuberculosis, Asociación Argentina de Medicina Respiratoria," *Medicina*, 67(3), pp. 295–305.
2. Achkar, J. M. and Prados-Rosales, R. (2018) "Updates on antibody functions in Mycobacterium tuberculosis infection and their relevance for developing a vaccine against tuberculosis," *Current Opinion in Immunology*, 53, pp. 30–37. doi: 10.1016/j.coi.2018.04.004.
3. Akerele, O. (1993) "Medicina tradicional Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar," *Foro Mundial de la Salud*, 14, pp. 390–395.
4. Alaerts, G. *et al.* (2010) "Recent Developments in Chromatographic Fingerprints from Herbal Products: Set-Up and Data Analysis," *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 13(10), pp. 900–922. doi: 10.2174/138620710793360284.
5. Alam, F. *et al.* (2019) "Enzymes inhibitors from natural sources with antidiabetic activity: A review," *Phytotherapy Research*, 33(1), pp. 41–54. doi: 10.1002/ptr.6211.
6. Alvarez-Zapata, R. *et al.* (2015) "Chemometrics-enhanced high performance liquid chromatography-ultraviolet detection of bioactive metabolites from phytochemically unknown plants," *Journal of Chromatography A*, 1422, pp. 213–221. doi: 10.1016/j.chroma.2015.10.026.
7. Alvarez-zapata, R. *et al.* (2015) "Chemometrics-enhanced high performance liquid chromatography-ultraviolet detection of bioactive metabolites from phytochemically unknown plants," *Journal of Chromatography A j*, 1422, pp. 213–221. doi: 10.1016/j.chroma.2015.10.026.
8. Alves Borges Leal, A. L. *et al.* (2021) "Potentiating activity of Norfloxacin by synthetic chalcones against NorA overproducing Staphylococcus aureus," *Microbial Pathogenesis*. Academic Press, p. 104894. doi: 10.1016/j.micpath.2021.104894.
9. Arnason, T. *et al.* (1981) "Mosquito larvicidal activity of polyacetylenes from species in the Asteraceae," *Biochemical Systematics and Ecology*, 9(1), pp. 63–68. doi: 10.1016/0305-1978(81)90061-2.
10. Arumugam, R. *et al.* (2012) "Determination of element contents in herbal drugs: Chemometric approach," *Food Chemistry*, 135(4), pp. 2372–2377. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.040.
11. Awan, A. R., Shaw, W. M. and Ellis, T. (2016) "Biosynthesis of therapeutic natural products using synthetic biology," *Advanced Drug Delivery Reviews*, 105, pp. 96–106. doi: 10.1016/j.addr.2016.04.010.
12. Baldemir, A. *et al.* (2017) "Phytochemical Profile and Biological Activities of Helianthemum canum L. baumg. from Turkey," *Chemistry and Biodiversity*. doi: 10.1002/cbdv.201700052.

13. Balganesch, M. *et al.* (2012) “Efflux pumps of *Mycobacterium tuberculosis* play a significant role in antituberculosis activity of potential drug candidates,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(5), pp. 2643–2651. doi: 10.1128/AAC.06003-11.
14. Ballard, R. (1986) “*Bidens pilosa* complex (Asteraceae) in North and Central America.,” *American Journal of Botany*, 73(10), pp. 1452–1465. doi: 10.2307/2443850.
15. Banerjee, T. *et al.* (2019) “Ovicidal and larvicidal effects of extracts from leaves of *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Wall.ex Nees against field isolates of human hookworm (*Ancylostoma duodenale*),” *Journal of Ethnopharmacology*, 235(January), pp. 489–500. doi: 10.1016/j.jep.2019.02.021.
16. Bansal, A. *et al.* (2014) “Chemometrics: A new scenario in herbal drug standardization,” 4(4), pp. 223–233. doi: 10.1016/j.jpha.2013.12.001.
17. Bapela, M. J. *et al.* (2019) “¹H NMR-based metabolomics of antimalarial plant species traditionally used by Vha-Venda people in Limpopo Province, South Africa and isolation of antiplasmodial compounds,” *Journal of Ethnopharmacology*, 228(July 2018), pp. 148–155. doi: 10.1016/j.jep.2018.07.022.
18. Bapela, M. J., Meyer, J. J. M. and Heyman, H. M. (2015) “Isolation of antiplasmodial compounds from traditionally used plants by means of NMR-based metabolomics and chromatography,” *South African Journal of Botany*, 98, pp. 170–171. doi: 10.1016/j.sajb.2015.03.015.
19. Bartolome, A. P., Villaseñor, I. M. and Yang, W. C. (2013) “*Bidens pilosa* L. (Asteraceae): Botanical properties, traditional uses, phytochemistry, and pharmacology,” *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. doi: 10.1155/2013/340215.
20. Bilanda, D. C. *et al.* (2017) “*Bidens pilosa* Ethylene acetate extract can protect against L-NAME-induced hypertension on rats,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/s12906-017-1972-0.
21. Boffil Cárdenas, M.A. & Cardellá Rosales, L. (2005) “La *Bidens pilosa*: Planta medicinal que posee una amplia potencialidad terapéutica,” *Medicentro Electrónica Revista en Internet*, p. Consultado el 15-04-2020.
22. Brennan, P. J. (1995) “The Envelope of *Mycobacteria*,” *Annual Review of Biochemistry*, 64(1), pp. 29–63. doi: 10.1146/annurev.biochem.64.1.29.
23. Brereton, R. G. (2014) “A short history of chemometrics: A personal view,” *Journal of Chemometrics*, 28(10), pp. 749–760. doi: 10.1002/cem.2633.
24. Brereton, R. G. *et al.* (2017) “Chemometrics in analytical chemistry—part I: history, experimental design and data analysis tools,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(25), pp. 5891–5899. doi: 10.1007/s00216-017-0517-1.
25. Brusotti, G., Cesari, I. Dentamaro, A., Caccialanza, G., & Massolini, G. (2014) “Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87, pp. 218–228. doi: 10.1016/j.jpba.2013.03.007.

26. Camacho, J., Picó, J. and Ferrer, A. (2010) "Data understanding with PCA: Structural and Variance Information plots," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. doi: 10.1016/j.chemolab.2009.10.005.
27. Cambier, C. J., Falkow, S. and Ramakrishnan, L. (2014) "Host evasion and exploitation schemes of Mycobacterium tuberculosis," *Cell*, 159(7), pp. 1497–1509. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.024.
28. Cano, L., Vázquez, M. & Jácome, E. (1997) *Flora medicinal de Veracruz. Inventario etnobotánico*. Edited by U. Veracruzana. Xalapa, Veracruz: Veracruzana, Universidad.
29. Cardoso-Taketa, A. T. *et al.* (2008) "Metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant Galphimia glauca using nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate data analysis," *Planta Medica*. doi: 10.1055/s-2008-1074583.
30. Carneiro, C. R. *et al.* (2019) "Identification of Luminescent Markers for Gunshot Residues: Fluorescence, Raman Spectroscopy, and Chemometrics," *Analytical Chemistry*, 91(19), pp. 12444–12452. doi: 10.1021/acs.analchem.9b03079.
31. Castillo, A. (2004) "Medicamentos antituberculosos.," *Revista Peruana de Pediatría*, pp. 52–56. Available at: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rpp/v57n3/contenido.htm>.
32. Chang, S. L. *et al.* (2007) "Flavonoids, centaurein and centaureidin, from Bidens pilosa, stimulate IFN- γ expression," *Journal of Ethnopharmacology*, 112(2), pp. 232–236. doi: 10.1016/j.jep.2007.03.001.
33. Charles, A. L. and Alamsjah, M. A. (2019) "Application of chemometric techniques: An innovative approach to discriminate two seaweed cultivars by physico-functional properties," *Food Chemistry*, 289(March), pp. 269–277. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.03.051.
34. Coll, P. (2003) "Fármacos con actividad frente a Mycobacterium tuberculosis," *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(6), pp. 299–308. doi: 10.1157/13048578.
35. Coll, P. (2009) "Active drugs against Mycobacterium tuberculosis," *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(8), pp. 474–480. doi: 10.1016/j.eimc.2009.06.010.
36. Cornejo Báez, A. A. and Sánchez Medina, A. (2016) *Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de Bidens pilosa L. y Xylosma flexuosum (H.B & K.) Hemsl y estudio quimiométrico de la actividad antituberculosa de los perfiles cromatográficos de Bidens pilosa L.*
37. Cornejo-Báez, A. A. *et al.* (2020) "Chemometrics: a complementary tool to guide the isolation of pharmacologically active natural products," *Drug Discovery Today*, 25(1), pp. 27–37. doi: 10.1016/j.drudis.2019.09.016.
38. Deconinck, E. *et al.* (2019) "A strategy based on fingerprinting and chemometrics for the detection of regulated plants in plant food supplements from the Belgian market: Two case studies," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 166, pp. 189–196. doi: 10.1016/j.jpba.2019.01.015.
39. Degenhardt, R. T. *et al.* (2016) "Characterization and evaluation of the cytotoxic potential of the essential oil of Chenopodium ambrosioides," *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26(1), pp. 56–61. doi: 10.1016/j.bjp.2015.08.012.

40. Devi, W. R., Singh, S. B. and Singh, C. B. (2013) “Antioxidant and anti-dermatophytic properties leaf and stem bark of *Xylosma longifolium* clos,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*. doi: 10.1186/1472-6882-13-155.
41. Dewi, N. *et al.* (2013) “NMR metabolomics for identification of adenosine A1 receptor binding compounds from *Boesenbergia rotunda* rhizomes extract,” *Journal of Ethnopharmacology*, 150(1), pp. 95–99. doi: 10.1016/j.jep.2013.08.012.
42. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud (2020) *Boletín Epidemiológico. Semana 13, 2020. Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica. Sistema único de información.*, 13. México. Available at: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/sinave/sinave_04.html#.
43. Domínguez-Barradas, C., Cruz-Morales, G. E. and González-Gándara, C. (2015) “Plantas de uso medicinal de la Reserva Ecológica ‘Sierra de Otontepec’, municipio de Chontla, Veracruz, México,” *CienciaUAT*. doi: 10.29059/cienciauat.v9i2.708.
44. Elena Monroy-Vázquez, M. *et al.* (2009) “Bio-guided study of an alcoholic extract of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz fruits,” *Agrociencia*, 43(8), pp. 777–790.
45. Emad, F. *et al.* (2020) “Three new polyacetylene glycosides (PAGs) from the aerial part of *Launaea capitata* (Asteraceae) with anti-biofilm activity against *Staphylococcus aureus*,” *Fitoterapia*, 143, p. 104548. doi: 10.1016/j.fitote.2020.104548.
46. Engel, J. *et al.* (2013) “Breaking with trends in pre-processing?,” *Trends in Analytical Chemistry*, 50, pp. 96–106. doi: 10.1016/j.trac.2013.04.015.
47. Esbensen, K. H. and Geladi, P. (2009) “Principal Component Analysis: Concept, Geometrical Interpretation, Mathematical Background, Algorithms, History, Practice,” *Comprehensive Chemometrics*, 2, pp. 211–226. doi: 10.1016/B978-044452701-1.00043-0.
48. Fadil, M. *et al.* (2017) “Intrapopulation variability of *Myrtus communis* L. growing in Morocco: Chemometric investigation and antibacterial activity,” *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 7(May), pp. 35–40. doi: 10.1016/j.jarmap.2017.04.006.
49. Ferreira, M. K. A. *et al.* (2021) “Chalcones reverse the anxiety and convulsive behavior of adult zebrafish,” *Epilepsy and Behavior*, 117, p. 107881. doi: 10.1016/j.yebeh.2021.107881.
50. Figueiredo, P. L. B. *et al.* (2019) “Composition, antioxidant capacity and cytotoxic activity of *Eugenia uniflora* L. chemotype-oils from the Amazon,” *Journal of Ethnopharmacology*, 232(December 2018), pp. 30–38. doi: 10.1016/j.jep.2018.12.011.
51. Franco, S. D. *et al.* (2019) “In Vitro Evaluation of the Potential Antioxidant of *Bidens segetum* Mart. ex Colla (Asteraceae) in Melanocyte and Melanoma Cells,” *Journal of Biosciences and Medicines*, 7, pp. 112–125. doi: 10.4236/jbm.2019.712010.
52. Franzblau, S. G. *et al.* (1998) “Rapid, low-technology MIC determination with clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates by using the microplate Alamar Blue assay,” *Journal of Clinical Microbiology*. doi: 10.1128/jcm.36.2.362-366.1998.

53. Gad, H. A. *et al.* (2013) “Application of chemometrics in authentication of herbal medicines: A review,” *Phytochemical Analysis*, pp. 1–24. doi: 10.1002/pca.2378.
54. Galindo-Prieto, B., Eriksson, L. and Trygg, J. (2015) “Variable influence on projection (VIP) for OPLS models and its applicability in multivariate time series analysis,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 146, pp. 297–304. doi: 10.1016/j.chemolab.2015.05.001.
55. Gao, J. *et al.* (2010) “Secondary metabolite mapping identifies Scutellaria inhibitors of human lung cancer cells,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53(3), pp. 723–728. doi: 10.1016/j.jpba.2010.04.019.
56. Gautam, R., Saklani, A. and Jachak, S. M. (2007) “Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents,” *Journal of Ethnopharmacology*. doi: 10.1016/j.jep.2006.12.031.
57. Geffner, L. F. / J. (2008) *Introducción a la Inmunología Humana*. 6a edn. Médica Panamericana.
58. Georgiev, M. I. *et al.* (2011) “Metabolic differentiations and classification of Verbascum species by NMR-based metabolomics,” *Phytochemistry*, 72(16), pp. 2045–2051. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.07.005.
59. Gheno Heredia, Y. *et al.* (2011) “Las plantas medicinales de la organización de parteras y médicos indígenas tradicionales de Ixhuatlancillo, Veracruz, México y su significancia cultural,” *Polibotánica*.
60. Gómez-Tangarife, V. J. *et al.* (2018) “Resistencia a Medicamentos en Mycobacterium tuberculosis: contribución de mecanismos constitutivos y adquiridos,” *Rev. Salud Pública*, 20(4), pp. 491–497. doi: <https://doi.org/10.15446/rsap.V20n4.50575>.
61. Grombone-Guaratini, M. T. *et al.* (2005) “Sesquiterpene and polyacetylene profile of the Bidens pilosa complex (Asteraceae: Heliantheae) from Southeast of Brazil,” *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(5), pp. 479–486. doi: 10.1016/j.bse.2004.11.005.
62. Guo, Z. (2017) “The modification of natural products for medical use,” *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(2), pp. 119–136. doi: 10.1016/j.apsb.2016.06.003.
63. Heike, V. (1995) “BIDENS PILOSA L. Y BIDENS ODORATA CAV. (ASTERACEAE: HELIANTHEAE) EN LA VEGETACION URBANA DE LA CIUDAD DE MEXICO,” *Acta Botánica Mexicana*, 32, pp. 85–89.
64. Hernández-Sánchez, K. M. *et al.* (2018) “Antimycobacterial and hypolipemiant activities of Bidens odorata (Cavanilles),” *Journal of Ethnopharmacology*, 222(February), pp. 159–164. doi: 10.1016/j.jep.2018.04.028.
65. Hidalgo, M. J. *et al.* (2018) “Classification of organic olives based on chemometric analysis of elemental data,” *Microchemical Journal*, 142(March), pp. 30–35. doi: 10.1016/j.microc.2018.06.002.
66. Hoffmann, B. and Hölzl, J. (1988) “A methylated chalcone glucoside from Bidens pilosa,” *Phytochemistry*, 27(11), pp. 3700–3701. doi: 10.1016/0031-9422(88)80806-9.
67. Hu, H. M. *et al.* (2018) “Chemical constituents from Bidens bipinnata Linn.,” *Biochemical Systematics and Ecology*, 79, pp. 44–49. doi: 10.1016/j.bse.2018.05.005.

68. Hu, L. *et al.* (2019) “Quality evaluation and traceability of *Bletilla striata* by fluorescence fingerprint coupled with multiway chemometrics analysis,” *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), pp. 1413–1424. doi: 10.1002/jsfa.9344.
69. Hu, X. *et al.* (2019) “Allylative approaches to the synthesis of complex guaianolide sesquiterpenes from apiaceae and asteraceae,” *Journal of the American Chemical Society*, 141(37), pp. 14904–14915. doi: 10.1021/jacs.9b08001.
70. Huo, T. *et al.* (2017) “Plasma metabolomics study of the hepatoprotective effect of glycyrrhetic acid on realgar-induced sub-chronic hepatotoxicity in mice via ¹H NMR analysis,” *Journal of Ethnopharmacology*, 208(July), pp. 36–43. doi: 10.1016/j.jep.2017.06.043.
71. Juan Carlos Palomino, Anandi Martin, Mirtha Camacho, Humberto Guerra, J. S. and F. P. (2002) “Resarzurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), pp. 2720–2722. doi: 10.1128/AAC.46.8.2720-2722.2002.
72. Kasote, D. *et al.* (2014) “Chemical profiling and chemometric analysis of South African propolis,” *Biochemical Systematics and Ecology*, 55, pp. 156–163. doi: 10.1016/j.bse.2014.03.012.
73. Kester, J. C. and Fortune, S. M. (2014) “Persisters and beyond: Mechanisms of phenotypic drug resistance and drug tolerance in bacteria,” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 49(2), pp. 91–101. doi: 10.3109/10409238.2013.869543.
74. Ki, D. W. *et al.* (2020) “New cytotoxic polyacetylene amides from the Egyptian marine sponge *Siphonochalina siphonella*,” *Fitoterapia*, 142, p. 104511. doi: 10.1016/j.fitote.2020.104511.
75. Kim, H. K., Choi, Y. H. and Verpoorte, R. (2010) “NMR-based metabolomic analysis of plants,” *Nature Protocols*, 5(3), pp. 536–549. doi: 10.1038/nprot.2009.237.
76. Kobaisy, M. *et al.* (1997) “Antimycobacterial polyynes of Devil’s club (*Oplopanax horridus*), a north american native medicinal plant,” *Journal of Natural Products*, 60(11), pp. 1210–1213. doi: 10.1021/np970182j.
77. Kubova, K. *et al.* (2017) “The influence of thermal treatment and type of insoluble poly(meth)acrylates on dissolution behavior of very soluble drug from hypromellose matrix tablets evaluated by multivariate data analysis,” *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(2), pp. 206–217. doi: 10.1080/10837450.2016.1193191.
78. Kumar, N. *et al.* (2014) “Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview,” *Talanta*. Elsevier, pp. 186–199. doi: 10.1016/j.talanta.2014.02.003.
79. Kvalheim, O. M. *et al.* (2011) “Chromatographic profiling and multivariate analysis for screening and quantifying the contributions from individual components to the bioactive signature in natural products,” *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 107(1), pp. 98–105. doi: 10.1016/j.chemolab.2011.02.002.

80. Li, C. Q. *et al.* (2019) "Collaboration patterns and network in chemometrics," *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 191(February), pp. 21–29. doi: 10.1016/j.chemolab.2019.05.011.
81. Li, H. *et al.* (2019) "Multiple fingerprint profiles and chemometrics analysis of polysaccharides from *Sarcandra glabra*," *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, pp. 957–967. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.103.
82. Li, Q. *et al.* (2017) "Fingerprint–efficacy study of the quaternary alkaloids in *Corydalis yanhusuo*," *Journal of Ethnopharmacology*, 207(June), pp. 108–117. doi: 10.1016/j.jep.2017.06.036.
83. Li, X.-R. *et al.* (2021) "Polyacetylene glucosides from the florets of *Carthamus tinctorius* and their anti-inflammatory activity," *Phytochemistry*, 187, p. 112770. doi: 10.1016/j.phytochem.2021.112770.
84. Li, Y. *et al.* (2020) "The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants," *Plant Physiology and Biochemistry*, 148(December 2019), pp. 80–89. doi: 10.1016/j.plaphy.2020.01.006.
85. Li, Y., Shen, Y. Yao, C. & Guo, D. (2020) "Quality assessment of herbal medicines based on chemical fingerprints combined with chemometrics approach: A review," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, p. 108197. doi: 10.1016/j.matdes.2019.108197.
86. Lu, Y.-B. *et al.* (2014) "Microsatellite Markers for the Invasive Species *Bidens alba* (Asteraceae)," *Applications in Plant Sciences*, 2(5), p. 1400008. doi: 10.3732/apps.1400008.
87. Lucio-Gutiérrez, J. R. *et al.* (2019) "Selective 1D-TOCSY and chemometrics to evaluate authenticity of *Turnera diffusa* and related botanical extracts," *Phytochemistry Letters*, 30(January), pp. 62–68. doi: 10.1016/j.phytol.2019.01.011.
88. Luo, X. *et al.* (2013) "Zanthoxylum capense constituents with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in vitro and ex vivo within human macrophages," *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), pp. 417–422. doi: 10.1016/j.jep.2013.01.013.
89. Lv, J. L. and Zhang, L. bin (2013) "Flavonoids and polyacetylenes from the aerial parts of *Bidens tripartita*," *Biochemical Systematics and Ecology*, 48, pp. 42–44. doi: 10.1016/j.bse.2012.11.016.
90. Machado, D. *et al.* (2018) "Insights on *Mycobacterium leprae* efflux pumps and their implications in drug resistance and virulence," *Frontiers in Microbiology*, 9(DEC), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2018.03072.
91. Maisuthisakul, P., Pasuk, S. and Ritthiruangdej, P. (2008) "Relationship between antioxidant properties and chemical composition of some Thai plants," *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(3), pp. 229–240. doi: 10.1016/j.jfca.2007.11.005.
92. Mandrone, M. *et al.* (2018) "Identification of a Collagenase-Inhibiting Flavonoid from *Alchemilla vulgaris* Using NMR-Based Metabolomics," *Planta Medica*, 84(12–13), pp. 941–946. doi: 10.1055/a-0630-2079.
93. Marcotullio, M. C. *et al.* (2015) "Bioassay-guided fractionation of *Euphrasia pectinata* Ten. and isolation of iridoids with antiproliferative activity," *Phytochemistry Letters*, 12, pp. 252–256. doi: 10.1016/j.phytol.2015.04.022.

94. MathWorks (2020) *MATLAB, Preprocesamiento de datos*. Available at: <https://la.mathworks.com/help/matlab/preprocessing-data.html> (Accessed: June 2, 2020).
95. McKenzie, J. S. *et al.* (2011) "Analysis of complex mixtures using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and chemometrics," *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 59(4), pp. 336–359. doi: 10.1016/j.pnmrs.2011.04.003.
96. Meléndes Camargo, M. E., Berdeja, B. and Guadalupe, Miranda. (2004) "Diuretic effect of the aqueous extract of *Bidens odorata* in the rat," *Journal of Ethnopharmacology*, 95, pp. 363–366. doi: 10.1016/j.jep.2004.08.005.
97. Mendiola, J. A. *et al.* (2010) "Design of natural food antioxidant ingredients through a chemometric approach," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), pp. 787–792. doi: 10.1021/jf901951z.
98. Menezes-De-Oliveira, D. *et al.* (2011) "The triterpenes 3 β -Lup-20(29)-en-3-ol and 3 β -Lup-20(29)-en-3-yl acetate and the carbohydrate 1,2,3,4,5,6-hexa-O-acetyl-dulcitol as photosynthesis light reactions inhibitors," *Molecules*, 16(12), pp. 9939–9956. doi: 10.3390/molecules16129939.
99. Miao, Y. J. *et al.* (2016) "Metabolomics study on the toxicity of *Annona squamosa* by ultraperformance liquid-chromatography high-definition mass spectrometry coupled with pattern recognition approach and metabolic pathways analysis," *Journal of Ethnopharmacology*, 184, pp. 187–195. doi: 10.1016/j.jep.2016.03.006.
100. Minto, R. E. and Blacklock, B. J. (2008) "Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products," *Progress in Lipid Research*, 47(4), pp. 233–306. doi: 10.1016/j.plipres.2008.02.002.
101. Molina-Salinas, G. M. *et al.* (2007) "Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity," *Journal of Ethnopharmacology*. doi: 10.1016/j.jep.2006.08.014.
102. Moon, B. C. *et al.* (2018) "Establishment of a PCR assay for the detection and discrimination of authentic *Cordyceps* and adulterant species in food and herbal medicines," *Molecules*, 23(8), pp. 1–16. doi: 10.3390/molecules23081932.
103. Móricz, Á. M., Ott, P. G. and Morlock, G. E. (2018) "Discovered acetylcholinesterase inhibition and antibacterial activity of polyacetylenes in tansy root extract via effect-directed chromatographic fingerprints," *Journal of Chromatography A*, 1543, pp. 73–80. doi: 10.1016/j.chroma.2018.02.038.
104. Mosaddik, M. A. *et al.* (2004) "Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity," *Phytomedicine*, 11(5), pp. 461–466. doi: 10.1016/j.phymed.2003.12.001.
105. Mukherjee, P. K. (2019) *Qualitative Analysis for Evaluation of Herbal Drugs, Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*. doi: 10.1016/b978-0-12-813374-3.00004-1.
106. Nagar, A. *et al.* (2015) "Comparative extraction and enrichment techniques for pyrethrins from flowers of *Chrysanthemum cinerariaefolium*," *Industrial Crops and Products*. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.07.043.

Capítulo 11. Anexos

107. Natalie Verstraeten, Wouter Knapen, Maarten Fauvart, and J. M. (2016) "A Historical Perspective on Bacterial Persistence," in Michiels, J. and Fauvart, M. (ed.) *Bacterial Persistence. Methods and Protocols*. Humana Press, p. 244.
108. Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2016) "Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014," *Journal of Natural Products*, 79(3), pp. 629–661. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.
109. Nguyen Hoai, N. *et al.* (2009) "Development of HPLC fingerprints for *Mallotus* species extracts and evaluation of the peaks responsible for their antioxidant activity," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(5), pp. 753–763. doi: 10.1016/j.jpba.2009.06.016.
110. Nguyen, L. and Thompson, C. J. (2006) "Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm," *Trends in Microbiology*, 14(7), pp. 304–312. doi: 10.1016/j.tim.2006.05.005.
111. van Nguyen Thien, T. *et al.* (2017) "Two new compounds and α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Bidens pilosa* L.," *Phytochemistry Letters*, 20(April), pp. 119–122. doi: 10.1016/j.phytol.2017.04.015.
112. Nko'o, M. H. J. *et al.* (2021) "Two new friedelane lactones from the roots of *Caloncoba glauca* (Flacourtiaceae) and evaluation of their cardiotoxic activity on isolated frog's heart," *Phytochemistry Letters*, 42, pp. 27–35. doi: 10.1016/j.phytol.2021.01.002.
113. Noreen, H., Farman, M. and McCullagh, J. S. O. (2016) "Bioassay-guided isolation of cytotoxic flavonoids from aerial parts of *Coronopus didymus*," *Journal of Ethnopharmacology*, 194(July), pp. 971–980. doi: 10.1016/j.jep.2016.10.074.
114. Oliveira, F. Q. *et al.* (2004a) "New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids," *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1), pp. 39–42. doi: 10.1016/j.jep.2004.03.026.
115. Oliveira, F. Q. *et al.* (2004b) "New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids," *Journal of Ethnopharmacology*, 93(1), pp. 39–42. doi: 10.1016/j.jep.2004.03.026.
116. de Oliveira-Júnior, R. G. *et al.* (2018) "Antibacterial activity of terpenoids isolated from *Cnidioscolus quercifolius* Pohl (Euphorbiaceae), a Brazilian medicinal plant from Caatinga biome," *European Journal of Integrative Medicine*, 24(October), pp. 30–34. doi: 10.1016/j.eujim.2018.10.011.
117. Organización Mundial de la Salud (2020) *Medicina tradicional: Definiciones, Medicina tradicional*. Available at: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/.
118. Organization, W. H. (2019) *GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2019*. Available at: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>.
119. Ortiz-Herrero, L. *et al.* (2019) "OPLS multivariate regression of FTIR-ATR spectra of acrylic paints for age estimation in contemporary artworks," *Talanta*, 205(July), p. 120114. doi: 10.1016/j.talanta.2019.120114.

Capítulo 11. Anexos

120. Patridge, E. *et al.* (2016) “An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives,” *Drug Discovery Today*, 21(2), pp. 204–207. doi: 10.1016/j.drudis.2015.01.009.
121. Pollo, L. A. E. *et al.* (2013a) “Polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities,” *Phytochemistry*, 95, pp. 375–383. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.07.011.
122. Pollo, L. A. E. *et al.* (2013b) “Polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities,” *Phytochemistry*, 95, pp. 375–383. doi: 10.1016/j.phytochem.2013.07.011.
123. Qi, Y. *et al.* (2011) “A plasma metabonomic investigation into the intervention of volatile oil of *Magnolia biondii* Pamp on rat model of acute inflammation,” *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), pp. 487–494. doi: 10.1016/j.jep.2011.05.045.
124. Rao, T. *et al.* (2019) “The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective,” *Pharmacological Research*, 146(87), p. 104283. doi: 10.1016/j.phrs.2019.104283.
125. Rawson, A. *et al.* (2013) “Stability of falcarinol type polyacetylenes during processing of Apiaceae vegetables,” *Trends in Food Science and Technology*, 30(2), pp. 133–141. doi: 10.1016/j.tifs.2013.01.002.
126. Redl, K., Davis, B. and Bauer, R. (1992) “Chalcone glycosides from *Bidens campylothea*,” *Phytochemistry*, 32(1), pp. 218–220. doi: 10.1016/0031-9422(92)80140-A.
127. Riccardi, G. and Pasca, M. R. (2014) “Trends in discovery of new drugs for tuberculosis therapy,” *Journal of Antibiotics*, 67(9), pp. 655–659. doi: 10.1038/ja.2014.109.
128. Riley, L. W. (2010) “Regulação da composição lipídica da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis* e o seu efeito na persistência bacteriana *in vitro*,” *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 16, pp. S37–S42. doi: 10.1016/s0873-2159(15)30091-x.
129. Romero Cabello, Raúl, Romero Feregrino, Raúl & Romero Feregrino, Rodrigo. (2018) *Microbiología y Parasitología Humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 4a edición. Edited by E. M. Panamericana. Ciudad de México.
130. Róžańska, A., Dymerski, T. and Namieśnik, J. (2018) “Novel analytical method for detection of orange juice adulteration based on ultra-fast gas chromatography,” *Monatshefte fur Chemie*, 149(9), pp. 1615–1621. doi: 10.1007/s00706-018-2233-8.
131. Russell, D. (2017) “Diversity breeds tolerance Premature lambs grown in a bag,” *Nature*, 546, pp. 44–45.
132. Salud., D. G. de I. en Salud. S. de I. de la S. de (2020) *Causas e defunción en México*. Available at: <http://sinaiscap.salud.gob.mx:8080/DGIS/> (Accessed: June 14, 2021).
133. Salud, S. de (2019) *Micobacteriosis: Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de la Tuberculosis y Lepra, Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las (Tuberculosis y Lepra)*. Available at:

Capítulo 11. Anexos

http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/18_Manual_Micobacteriosis.pdf.

134. Santos, K. A. *et al.* (2017) "Chemical composition, antioxidant activity and thermal analysis of oil extracted from favela (*Cnidocolus quercifolius*) seeds," *Industrial Crops and Products*, 97, pp. 368–373. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.12.045.
135. dos Santos, V. H. J. M. *et al.* (2018) "Evaluation of different samplers and storage temperature effect on the methane carbon stable isotope analysis," *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(10). doi: 10.1007/s10661-018-6934-6.
136. Schinkovitz, A. and Michael Stavri, S. G. and F. B. (2008) "Antimycobacterial Polyacetylenes from *Levisticum officinal*," *Phytotherapy Research*, 22(4), pp. 681–684. doi: 10.1002/ptr.2408.
137. Schulze, A. E. *et al.* (2014) "Chemometric analysis of chromatographic fingerprints shows potential of *Cyclopia maculata* (andrews) kies for production of standardized extracts with high xanthone content," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(43), pp. 10542–10551. doi: 10.1021/jf5028735.
138. Secretaría de Salud (2019) "Boletín Epidemiológico. Semana 52, 2019. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información.," *Suive, Dge*, 36(52).
139. Sereshti, H. *et al.* (2018) "Quality control of saffron and evaluation of potential adulteration by means of thin layer chromatography-image analysis and chemometrics methods," *Food Control*, 90, pp. 48–57. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.02.026.
140. Shai, L. J. *et al.* (2008) "Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves," *Journal of Ethnopharmacology*. doi: 10.1016/j.jep.2008.06.036.
141. Shandukani, P. D. *et al.* (2018) "Antibacterial activity and in situ efficacy of *Bidens pilosa* Linn and *Dichrostachys cinerea* Wight et Arn extracts against common diarrhoea-causing waterborne bacteria," *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/s12906-018-2230-9.
142. Sharma, A. *et al.* (2012) "A comparison on the metabolic profiling of the Mexican anxiolytic and sedative plant *Galphimia glauca* four years later," *Journal of Ethnopharmacology*, 141(3), pp. 964–974. doi: 10.1016/j.jep.2012.03.033.
143. Sharma, A. *et al.* (2017) "Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine," *Journal of Ethnopharmacology*, 208, pp. 264–329. doi: 10.1016/j.jep.2016.04.045.
144. Shen, Y. *et al.* (2018) "Anticancer effect of petroleum ether extract from *Bidens pilosa* L and its constituent's analysis by GC-MS," *Journal of Ethnopharmacology*, 217, pp. 126–133. doi: 10.1016/j.jep.2018.02.019.
145. Shin, E. C. *et al.* (2010) "Chemometric approach to fatty acid profiles in Runner-type peanut cultivars by principal component analysis (PCA)," *Food Chemistry*. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.07.058.
146. Silva, A. F. T. *et al.* (2017) "Statistical process control of cocrystallization processes: A comparison between OPLS and PLS," *International Journal of Pharmaceutics*, 520(1–2), pp. 29–38. doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.01.052.

147. Silva, D. B. *et al.* (2015) “Post-column sodiation to enhance the detection of polyacetylene glycosides in LC-DAD-MS analyses: An example from *Bidens gardneri* (Asteraceae),” *Talanta*, 135, pp. 87–93. doi: 10.1016/j.talanta.2014.12.024.
148. Silva, F. L. *et al.* (2011) “Compilation of secondary metabolites from *bidens pilosa* L.,” *Molecules*, 16(2), pp. 1070–1102. doi: 10.3390/molecules16021070.
149. Singh, G. *et al.* (2017) “Pharmacological potential of *Bidens pilosa* L. and determination of bioactive compounds using UHPLC-QqQLIT-MS/MS and GC/MS,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), pp. 1–16. doi: 10.1186/s12906-017-2000-0.
150. Souihi, N. *et al.* (2013) “A quality by design approach to investigate the effect of mannitol and dicalcium phosphate qualities on roll compaction,” *International Journal of Pharmaceutics*, 447(1–2), pp. 47–61. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.02.036.
151. Souihi, N. *et al.* (2015) “OPLS in batch monitoring - Opens up new opportunities,” *Analytica Chimica Acta*, 857, pp. 28–38. doi: 10.1016/j.aca.2014.12.003.
152. Souza-Filho, P. R. de M. *et al.* (2019) “The role of pericarp in *Bidens* L. heterocarpy (Asteraceae),” *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 257(December 2018), pp. 1–10. doi: 10.1016/j.flora.2019.151426.
153. Sridhar, K. and Charles, A. L. (2018) “Application of multivariate statistical techniques to assess the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of commercial grape cultivars,” *Journal of Chemometrics*, 32(12), pp. 1–13. doi: 10.1002/cem.3073.
154. Tistaert, C. *et al.* (2009) “Potential antioxidant compounds in *Mallotus* species fingerprints. Part I: Indication, using linear multivariate calibration techniques,” *Analytica Chimica Acta*, 652(1–2), pp. 189–197. doi: 10.1016/j.aca.2009.08.024.
155. Tistaert, C. *et al.* (2011) “Dissimilar chromatographic systems to indicate and identify antioxidants from *Mallotus* species,” *Talanta*, 83(4), pp. 1198–1208. doi: 10.1016/j.talanta.2010.11.027.
156. Tistaert, C. *et al.* (2012) “Potential antioxidant compounds in *Mallotus* species fingerprints. Part II: Fingerprint alignment, data analysis and peak identification,” *Analytica Chimica Acta*, 721, pp. 35–43. doi: 10.1016/j.aca.2012.01.058.
157. Tistaert, C., Dejaegher, B. and Heyden, Y. vander (2011) “Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review,” *Analytica Chimica Acta*, 690(2), pp. 148–161. doi: 10.1016/j.aca.2011.02.023.
158. Truong, B. N. *et al.* (2011a) “Chemical constituents from *Xylosma longifolia* and their anti-tubercular activity,” *Phytochemistry Letters*. doi: 10.1016/j.phytol.2011.04.008.
159. Truong, B. N. *et al.* (2011b) “Chemical constituents from *Xylosma longifolia* and their anti-tubercular activity,” *Phytochemistry Letters*, 4(3), pp. 250–253. doi: 10.1016/j.phytol.2011.04.008.

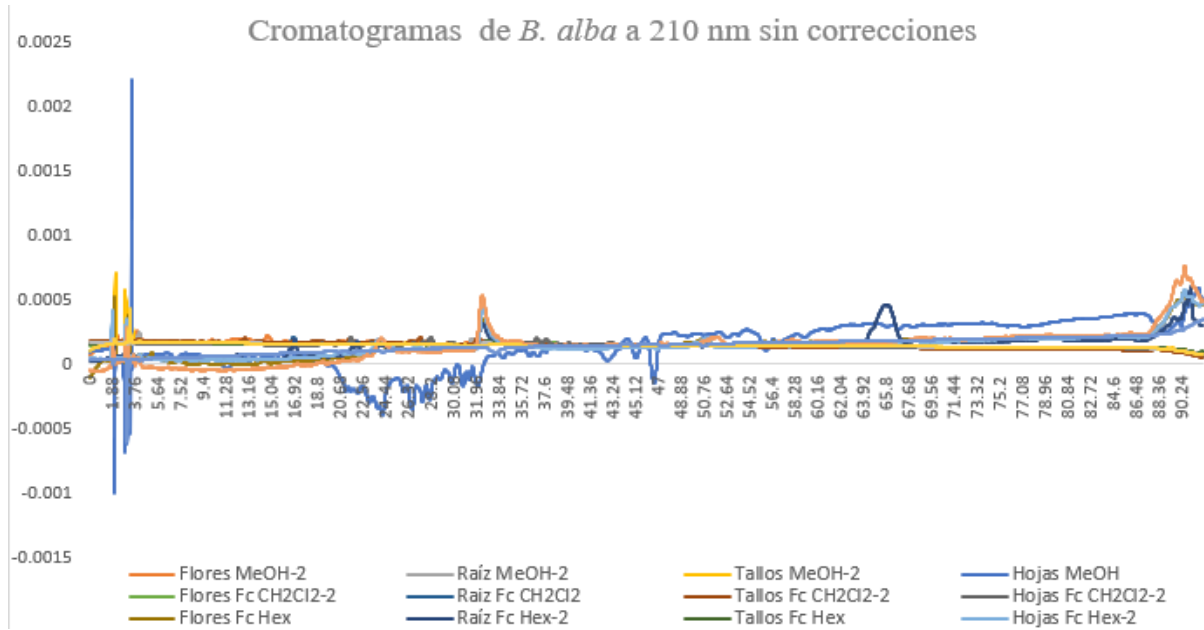
Capítulo 11. Anexos

160. Trygg, J. and Wold, S. (2002) "Orthogonal projections to latent structures (O-PLS)," *Journal of Chemometrics*, 16(3), pp. 119–128. doi: 10.1002/cem.695.
161. Tuyiringire, N. *et al.* (2020) "Three promising antimycobacterial medicinal plants reviewed as potential sources of drug hit candidates against multidrug-resistant tuberculosis," *Tuberculosis*, 124(August), p. 101987. doi: 10.1016/j.tube.2020.101987.
162. Umar, F. *et al.* (2019) "The effect of anti-tuberculosis drugs therapy on mRNA efflux pump gene expression of Rv1250 in Mycobacterium tuberculosis collected from tuberculosis patients," *New Microbes and New Infections*, 32, p. 100609. doi: 10.1016/j.nmni.2019.100609.
163. Umetrics (2019) "SIMCA version 15.0.2, Umetrics." Sweden. Available at: <https://umetrics.com/about-us>.
164. UNAM, I. de B. de la (2002) *Xylosma flexuosum*, *archivo informativo, IREKANI*. Available at: <http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/12236?proyecto=Irekani> (Accessed: November 1, 2019).
165. United States Department of Agriculture, (USDA) and Service., N. R. C. (no date) *Xylosma flexuosa*, *Plant Database*. Available at: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=XYFL3> (Accessed: November 11, 2019).
166. Vibrans, H. (2011) *Malezas de México, Consultado el 03/11/2019*. Available at: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/bidensalba/fichas/ficha.htm>.
167. Wahdaningsih, S. *et al.* (2020) "Terpenoid-lupeol of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) and its immunomodulatory activity," *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. doi: 10.36721/PJPS.2020.33.2.REG.505-510.1.
168. Walicová, V. *et al.* (2017) "Design and evaluation of mucoadhesive oral films containing sodium hyaluronate using multivariate data analysis," *Pharmaceutical Development and Technology*, 22(2), pp. 229–236. doi: 10.1080/10837450.2016.1194857.
169. Wang, T. *et al.* (2019) "Rapid identification and quantification of cheaper vegetable oil adulteration in camellia oil by using excitation-emission matrix fluorescence spectroscopy combined with chemometrics," *Food Chemistry*, 293(April), pp. 348–357. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.04.109.
170. Watkins, F. *et al.* (2012) "Antimicrobial assays of three native British plants used in Anglo-Saxon medicine for wound healing formulations in 10th century England," *Journal of Ethnopharmacology*, 144(2), pp. 408–415. doi: 10.1016/j.jep.2012.09.031.
171. WHO (2018a) *GLOBAL TUBERCULOSIS REPORT 2018, Reports*. doi: 10.1016/j.pharep.2017.02.021.
172. WHO (2018b) "Guidelines on good manufacturing practices for the," *WHO Technical Report Series*, (1010), pp. 153–178. Available at: https://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/publications/trs1010_annex2.pdf.
173. Wolfender, J. L. *et al.* (2019) "Innovative omics-based approaches for prioritisation and targeted isolation of natural products-new strategies for drug

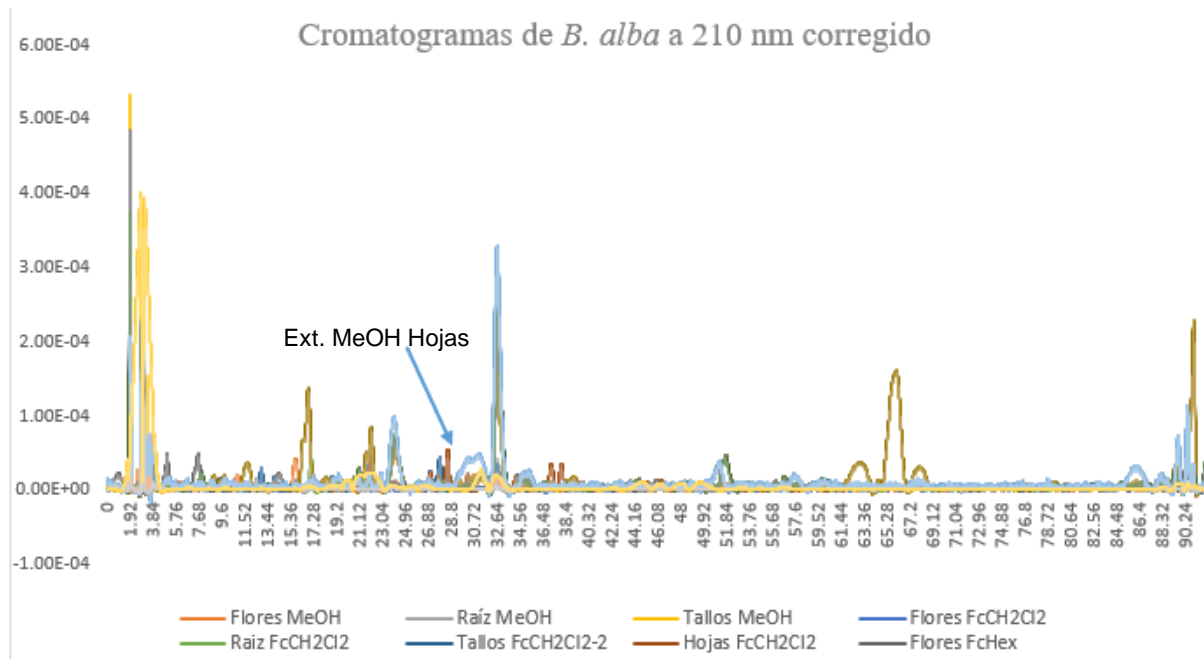
Capítulo 11. Anexos

- discovery,” *Natural Product Reports*, 36(6), pp. 855–868. doi: 10.1039/c9np00004f.
174. Woods, W. C. W. (†) / S. D. A. / W. M. J. / E. W. K. / G. W. P. / P. C. S. / G. L. (2008) *Koneman. Diagnóstico microbiológico*. 6a edn. Argentina: Médica Panamericana.
175. World Health Organization (2020) *Global Tuberculosis Report, 2020*.
176. Xavier, J. da C. *et al.* (2021) “Spectroscopic analysis by NMR, FT-Raman, ATR-FTIR, and UV-Vis, evaluation of antimicrobial activity, and in silico studies of chalcones derived from 2-hydroxyacetophenone,” *Journal of Molecular Structure*, p. 130647. doi: 10.1016/j.molstruc.2021.130647.
177. Xia, J. *et al.* (2019) “Fourier transform infrared spectroscopy and chemometrics for the discrimination of paper relic types,” *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 219, pp. 8–14. doi: 10.1016/j.saa.2018.09.059.
178. Xu, W. J. *et al.* (2020) “Toonasindiynes A-F, new polyacetylenes from *Toona sinensis* with cytotoxic and anti-inflammatory activities,” *Fitoterapia*, 146, p. 104667. doi: 10.1016/j.fitote.2020.104667.
179. Yang, X. *et al.* (2021) “Flavonoids-rich extract from *Bidens bipinnata* L. protects pancreatic β -cells against oxidative stress-induced apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways,” *Journal of Ethnopharmacology*, 275, p. 114097. doi: 10.1016/j.jep.2021.114097.
180. Yuan, L. P. *et al.* (2008) “Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis,” *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), pp. 539–546. doi: 10.1016/j.jep.2008.01.010.
181. Zhang, Z. M., Chen, S. and Liang, Y. Z. (2010) “Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares,” *Analyst*, 135(5), pp. 1138–1146. doi: 10.1039/b922045c.
182. Zhu, Y. J. *et al.* (2021) “Two new polyacetylene glucosides and a new caffeoyl derivative with angiogenic activity from *Bidens parviflora* Willd.,” *Phytochemistry Letters*, 42(February), pp. 82–86. doi: 10.1016/j.phytol.2021.01.005.
183. Zuber, B. *et al.* (2008) “Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state,” *Journal of Bacteriology*, 190(16), pp. 5672–5680. doi: 10.1128/JB.01919-07.
184. Zumla, A. I. *et al.* (2014) “New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: Needs, advances, and future prospects,” *The Lancet Infectious Diseases*, 14(4), pp. 327–340. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70328-1.

12. ANEXOS



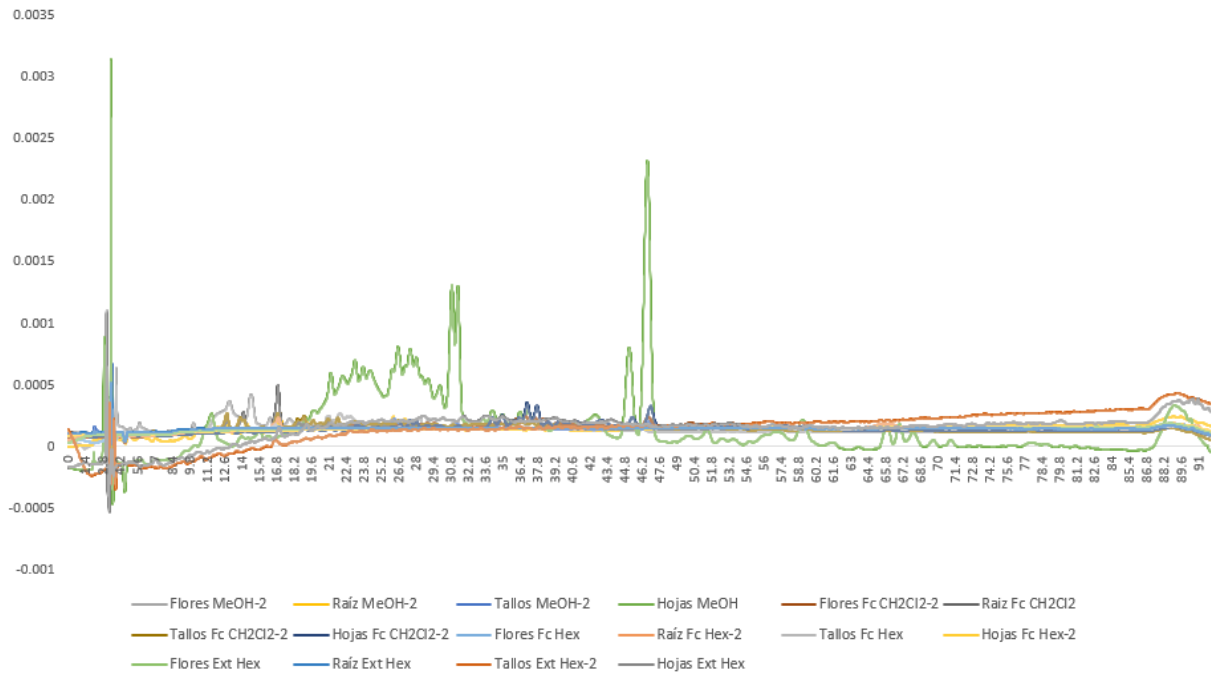
Anexo 1. Perfiles cromatográficos de extractos y fracciones de *B. alba* a 210 nm sin corrección de línea base ni alineación de picos.



Anexo 2. Perfiles cromatográficos de *B. alba* a 210 nm con línea base corregida y picos alineados. La muestra señalada corresponde al extracto de Hojas MeOH, que no queda del todo alineado, por lo cual se excluye de los datos.

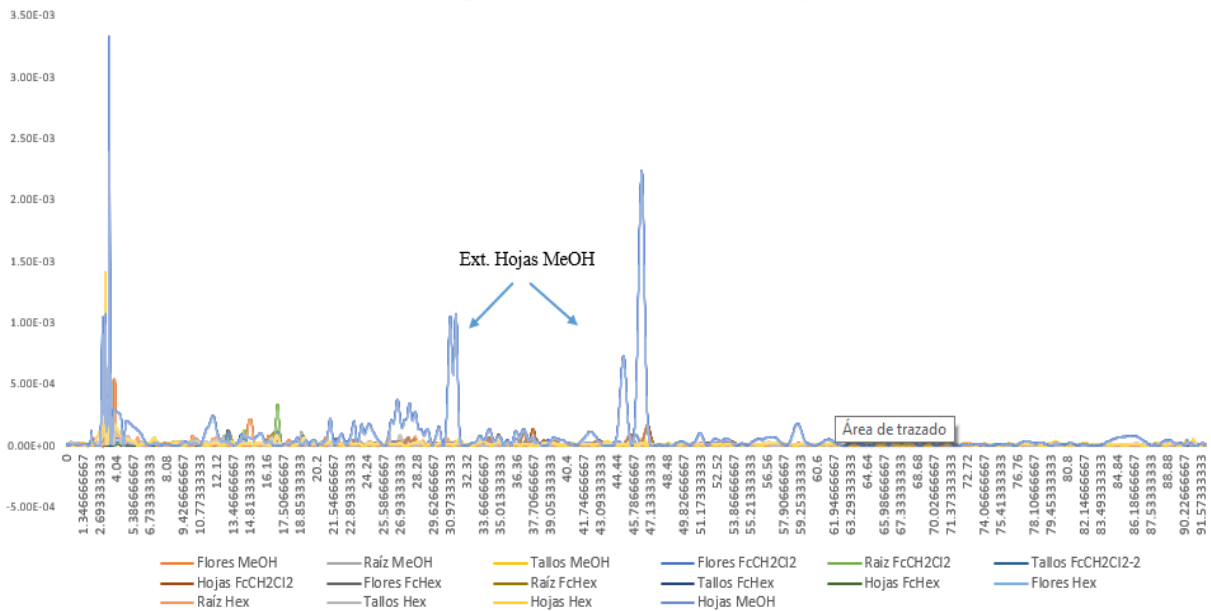
Capítulo 11. Anexos

Cromatogramas de *B. alba* a 285 nm sin correcciones.



Anexo 3. Perfiles cromatográficos de extractos y fracciones de *B. alba* a 285 nm sin corrección de línea base ni alineación de picos.

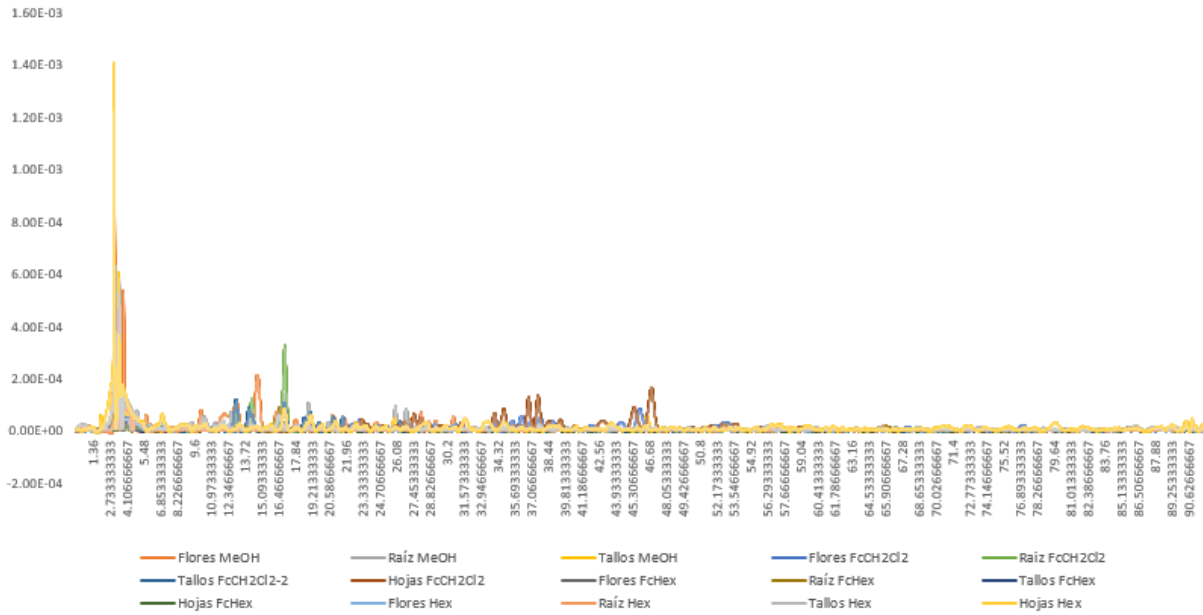
Cromatogramas de *B. alba* a 285 nm corregidos



Anexo 4. Perfiles cromatográficos de *B. alba* a 285 nm corregidos. La muestra señalada corresponde al extracto de hojas MeOH que no queda del todo alineado, por lo cual se excluye de los datos.

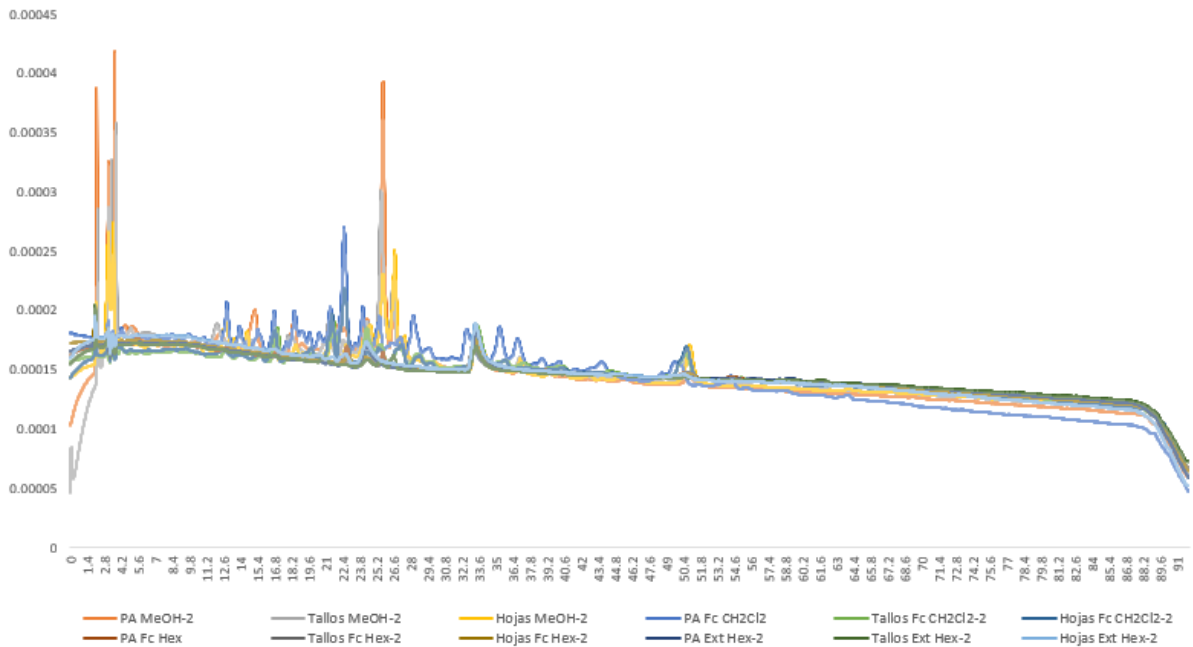
Capítulo 11. Anexos

Cromatogramas de *B. alba* a 285 nm sin ext. hojas MeOH



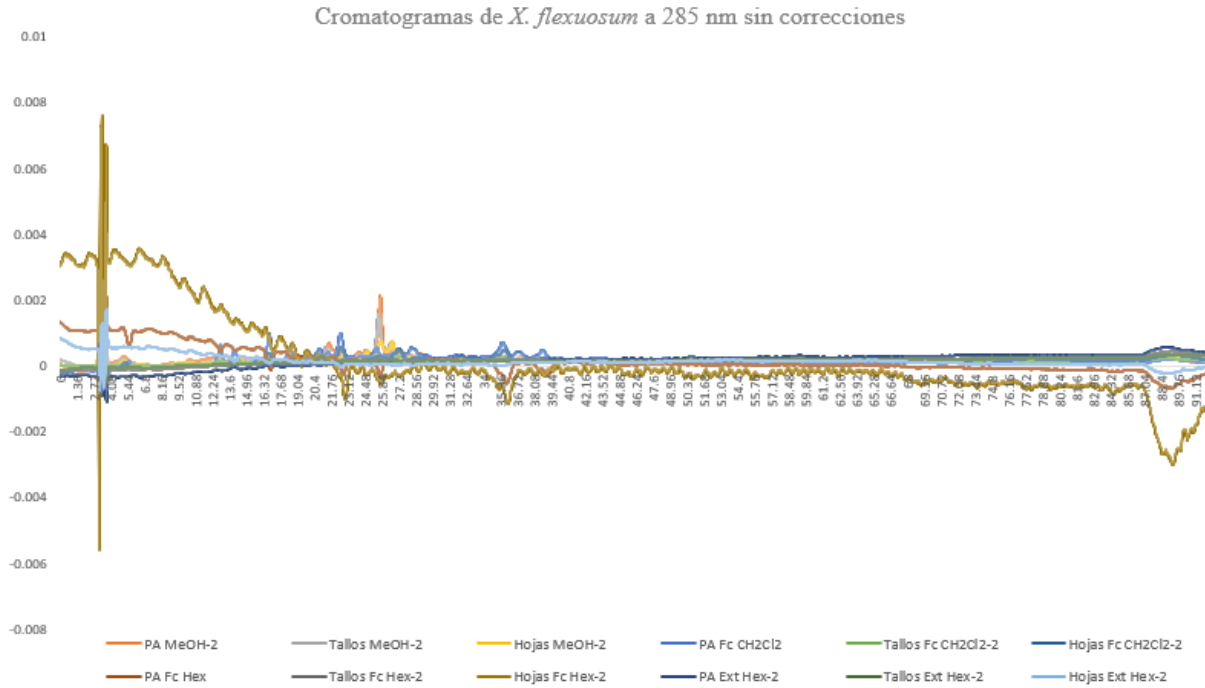
Anexo 5. Perfiles cromatográficos de extractos y fracciones de *B. alba* a 285 nm con línea base corregida y picos alineados, el extracto de Hojas MeOH fue excluido del análisis

Cromatogramas de *X. flexuosum* a 210 nm sin correcciones

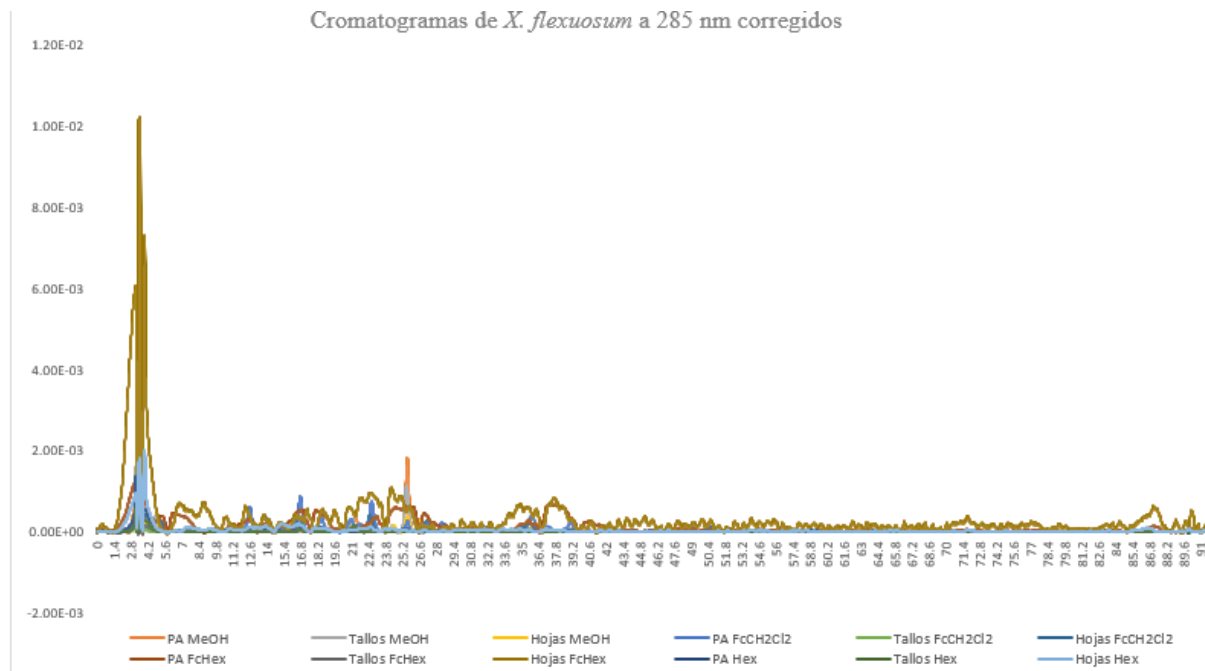


Anexo 6. Perfiles cromatográficos de extractos y fracciones de *X. flexuosum* a 210 nm, sin correcciones.

Capítulo 11. Anexos

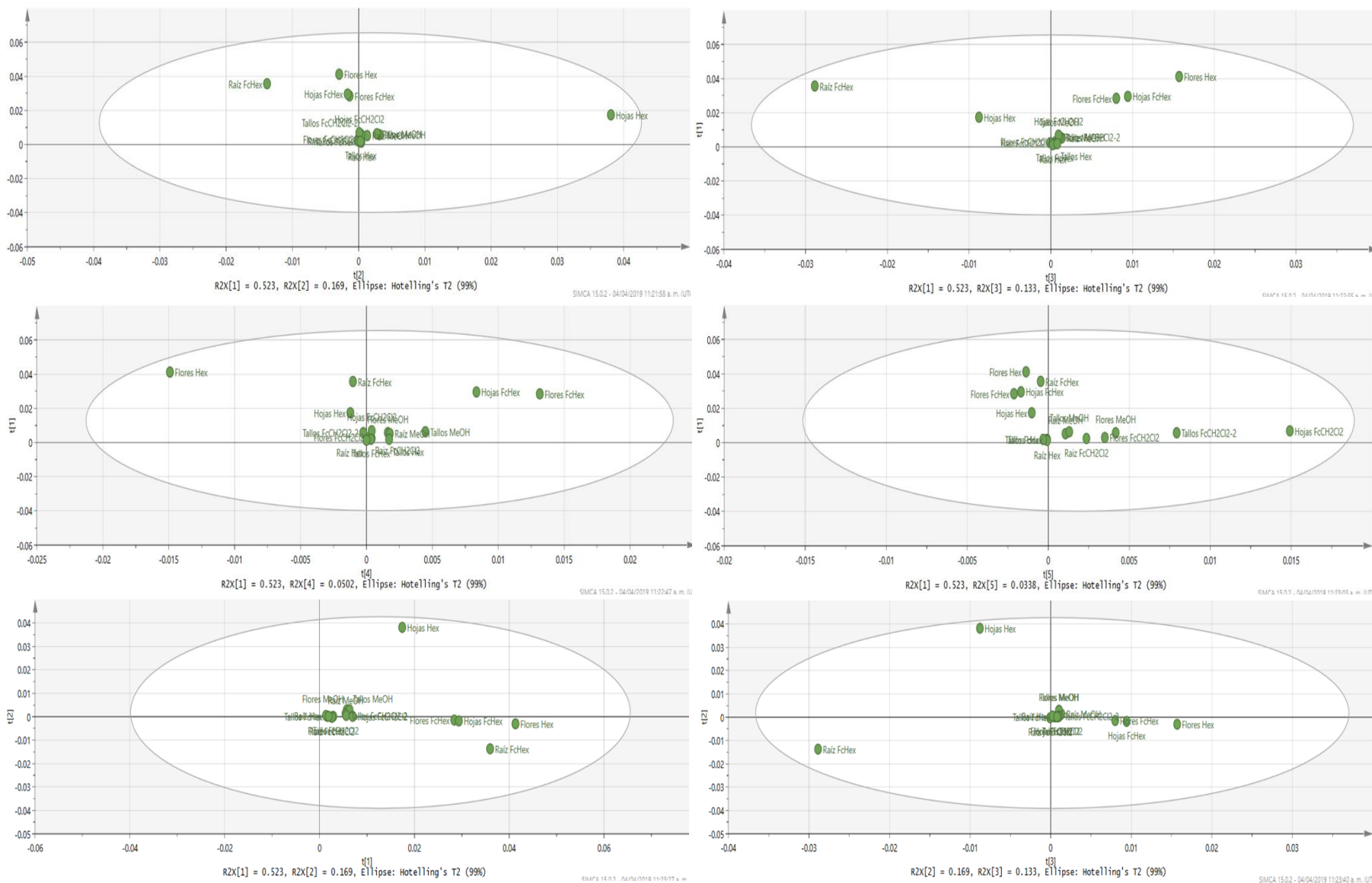


Anexo 7. Perfiles cromatográficos de *X. flexuosum* a 285 nm sin corrección de línea base ni alineación de picos.



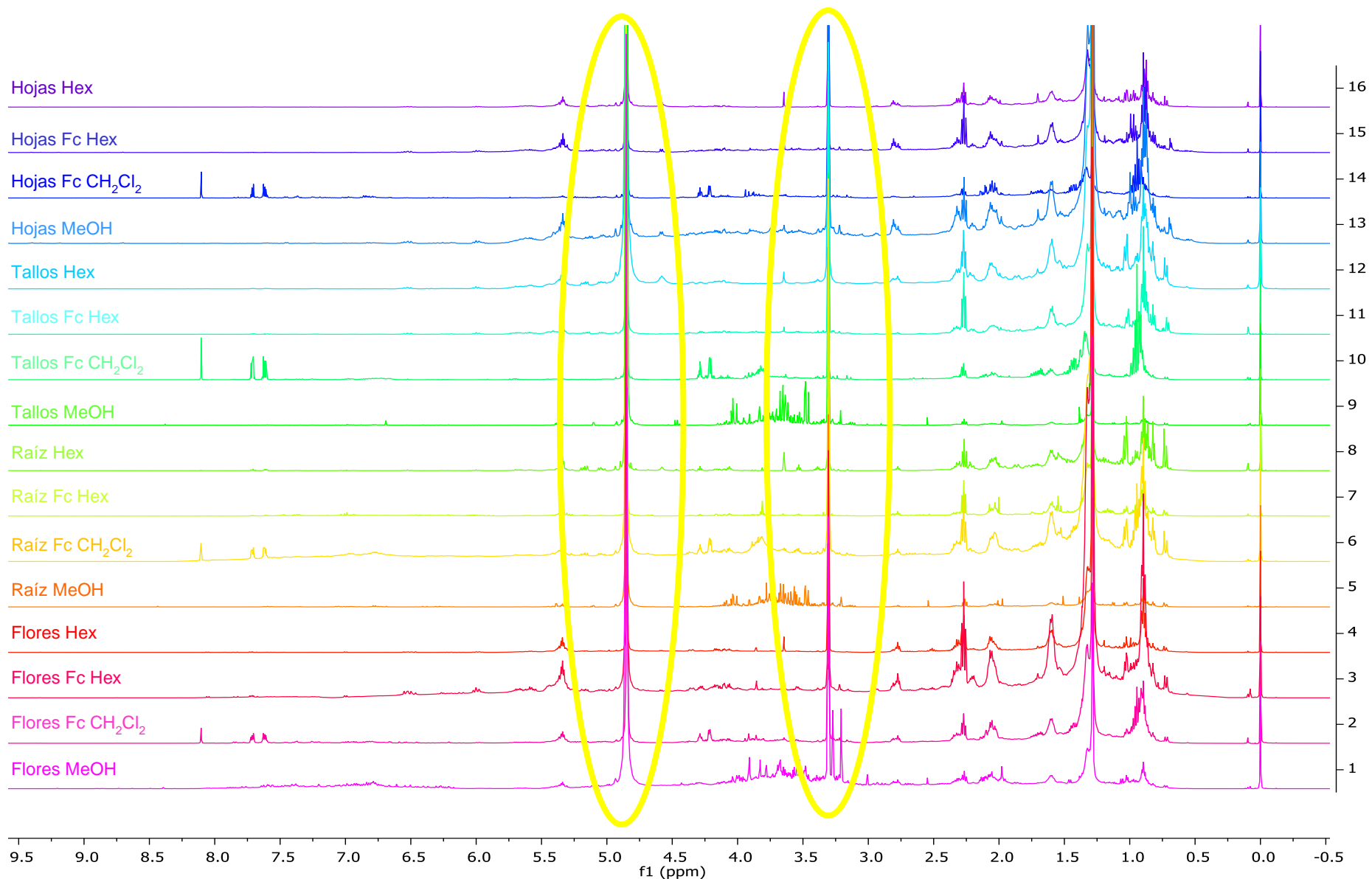
Anexo 8. Perfiles cromatográficos de extractos y fracciones de *X. flexuosum* a 285 nm con corrección de línea base y alineación de pico.

Capítulo 11. Anexos



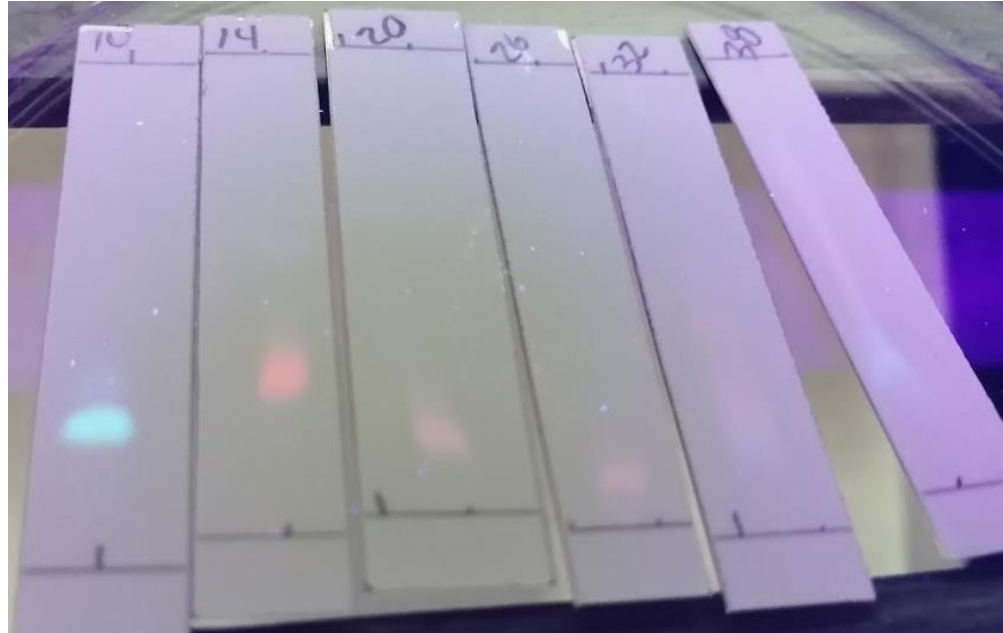
Anexo 9. Graficos de score plot obtenidos de la combinación de diferentes Pcs.

Capítulo 11. Anexos

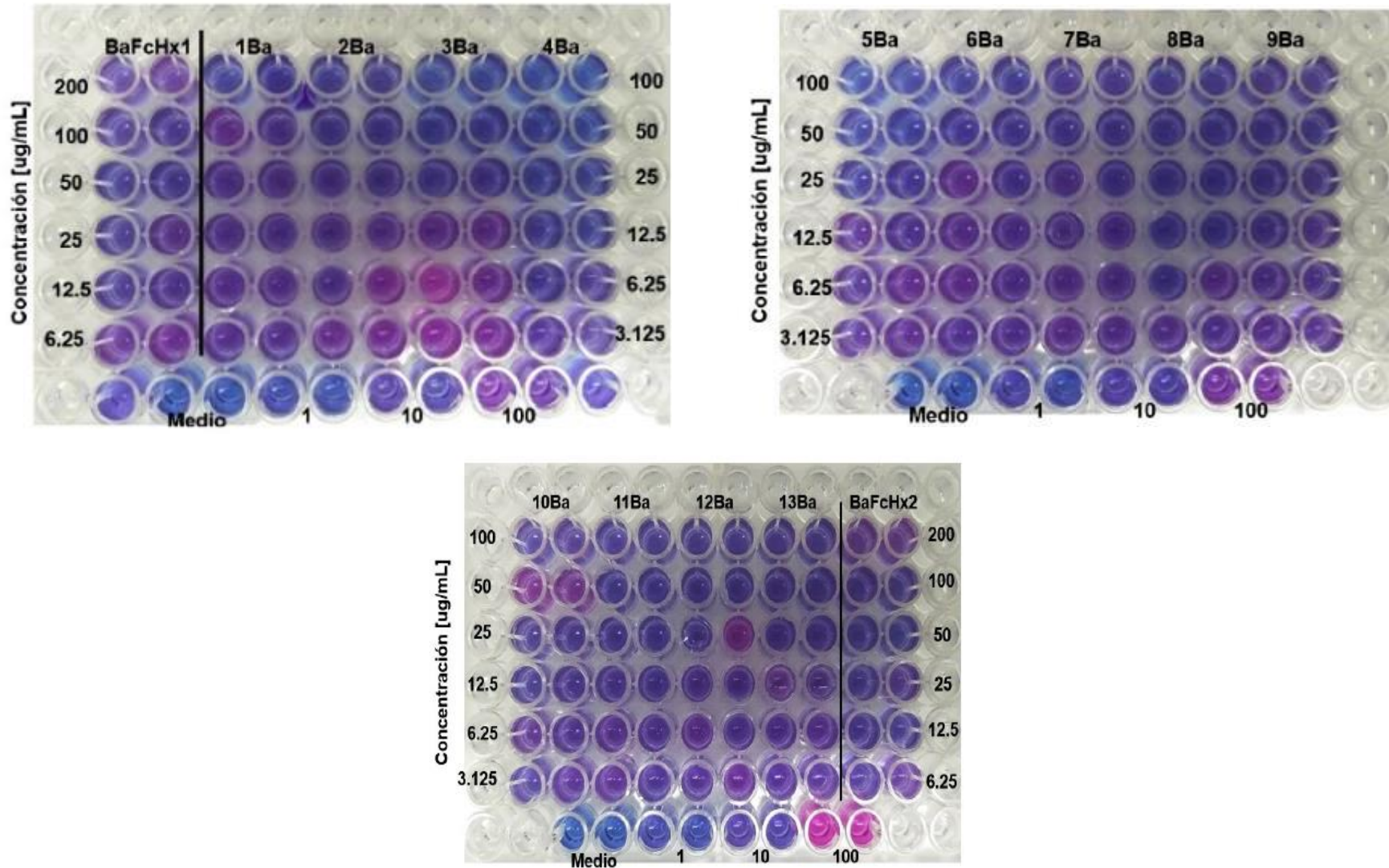


Anexo 10. Espectros de H-RMN apilados con señales de disolvente de referencia CD₃OD en $\delta=3.31$ y 4.85 ppm. de todos los extractos y fracciones de *B. alba*.

Capítulo 11. Anexos



Anexo 11. TLC de las fracciones obtenidas de la Fc Hex de *B. alba*. LA fc 8 que resultó ser la más activa está conformada por las fc 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26.



Anexo 12. Determinación de la MIC de las fracciones obtenidas de la Fc Hex de la raíz de *B. alba* por medio del ensayo MABA

Análisis quimiométrico de la actividad antituberculosa de los extractos de *Bidens alba* (L.) DC.

Axhell Aleid Cornejo-Báez,^{1,2} Julieta Luna-Herrera,² Maribel Vázquez-Hernández,³ Claudia V. Moreno-Quirós,³ y Alberto Sánchez-Medina^{2*}

¹Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa Enríquez, Veracruz, México. ²Laboratorio de Inmunofarmacología II, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Col. Casco de Santo Tomas, Delegación Gustavo A. Madero, C.P. 11340, Ciudad de México, México. ³Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa Enríquez, Veracruz, México. *Correo: absanchez@uv.mx

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, Productos naturales, *Bidens alba*, Quimiometría

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que afecta principalmente los pulmones. Se registraron 10.0 millones de casos de TB en 2018.¹ El tratamiento requiere de un tiempo prolongado causando numerosos efectos secundarios, esto conlleva al abandono del tratamiento y a la aparición de cepas multirresistentes (Mtb-MDR).² Por tales motivos se requieren nuevos fármacos y los productos naturales (PN) desempeñan un papel importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. *Bidens alba* es usada en la medicina tradicional, se ha demostrado su actividad anticancerígena,³ antidiabética,⁴ y analgésica,⁵ pero no hay reportes de su actividad antituberculosa. Existen numerosas técnicas para el descubrimiento y aislamiento de PN, pero la quimiometría es una herramienta novedosa para guiar el aislamiento de PN bioactivos.^{6,7}

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron extractos de distintas polaridades de cada parte de la planta y se obtuvo su perfil por HPLC-UV y RMN-¹H. La evaluación de la actividad antituberculosa se realizó mediante el ensayo en microplaca azul alamar (MABA) con la cepa *M.tuberculosis* H37Rv; mediante técnicas quimiométricas se determinaron los metabolitos bioactivos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que *B. alba* posee metabolitos con actividad antituberculosa. La fracción hexánica de la raíz fue la más activa (MIC=25.0 µg/mL). En el análisis quimiométrico de RMN-¹H y HPLC-UV se determinaron como presuntos responsables de la actividad antituberculosa compuestos con protones alifáticos (δ =0.92 y 1.28 ppm) con t_R = 90.02, 91.17, 91.48 min;

protones de azúcares (δ =4.28 ppm) t_R =16.04, 23.26 min; protones de compuestos aromáticos (δ =7.60, 7.72 y 8.08 ppm) t_R = 64.25, 66.98 min.

CONCLUSIONES

Mediante el análisis quimiométrico de los datos obtenidos por HPLC-UV se determinaron los metabolitos responsables de la actividad antituberculosa de *B. alba*. Mientras que con los datos obtenidos por RMN-¹H se determinaron los tipos de protones asociados a la actividad antituberculosa.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología por la beca número 560976/297059.

REFERENCIAS

1. Organization, W. H. *Global tuberculosis report 2019*.
2. Hoagland, D. et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 102, 55–72.
3. Ong, P. L. et al. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 46, 1535–1547.
4. López Guerra, R.L., et al. *Acta Farmacológica Brasileira*, 2001, 20, 85–93.
5. Yuan, Minggüi et al. *Agricultural Biotechnology*, 2019, 8, 174–178.
6. Cornejo-Báez, A. et al. *Drug Discovery Today*, 2020, 25, 27–37.
7. Alvarez-Zapata, R. et al. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1422, 213–221.

“Análisis quimiométrico de la actividad antituberculosa de los extractos de *Bidens alba* DC”

Axhell Aleid Cornejo-Báez^{1,2}, Julieta Luna-Herrera³, Maribel Vazquez-Hernández², Alberto Sánchez-Medina²

1. Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa Enríquez, Veracruz, México.
 2. Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa Enríquez, Veracruz, México.
 3. Laboratorio de Inmunquímica II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N, Col. Casco de Santo Tomas. Del. Gustavo A. Madero, C.P. 11340, Ciudad de México, México.
 *acornejo2809@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada especialmente por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) que afecta principalmente los pulmones. En el año 2018 se registraron 10.0 millones de casos y 1.2 millones de muertes por TB.¹ El tratamiento disponible consta de un tiempo prolongado causando numerosos efectos secundarios, causando que el paciente abandone la terapia y se propicie la aparición de cepas de Mtb multidrogorresistentes (Mtb-MDR)², por tales motivos se requieren nuevos fármacos y los productos naturales (PN) desempeñan un papel importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. *Bidens alba* es una planta que se usa en la medicina tradicional y se ha demostrado su actividad anticancerígena³, antiinflamatoria⁴, y analgésica⁵ pero no existen reportes de su actividad antituberculosa. Existen numerosas técnicas para el descubrimiento y aislamiento de PN, pero las técnicas quimiométricas son una herramienta novedosa para guiar el aislamiento de PN bioactivos⁶.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material vegetal → **Extracción con solventes de distintas polaridades** → **Evaluación de la bioactividad de los extractos y/o fracciones** → **Obtención de los fingerprints (HPLC-UV, ¹H-NMR, etc.)** → **Corrección de las líneas base y alineación de los picos** → **Reducción de datos y análisis estadístico** → **Reducción de datos y análisis estadístico** → **Alkermiento y purificación del compuesto activo usando métodos semipreparativos** → **Evaluación de la bioactividad de los compuestos aislados** → **Caracterización química del compuesto activo por ¹H and ¹³C-NMR**

RESULTADOS DEL ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

Análisis de componentes principales (PCA)
 Gráfico de Score plot de PCA de 8. píalos 210 nm.
 Gráfico de Loading plot de PCA de 8. píalos 210 nm.

Proyecciones ortogonales a las estructuras latentes (O-PLS) de HPLC-UV
 Contribución plot de OPLS de la Fc Hex de raíz de *B. alba* píalo 210 nm.
 Proyección ortogonal a las estructuras latentes (OPLS) de 8. píalos 210 nm.

Proyecciones ortogonales a las estructuras latentes (O-PLS) de ¹H-RMN
 Contribución plot de OPLS de la Fc Hex de raíz de *B. alba* píalo 210 nm.
 Picos responsables de la actividad antituberculosa en *B. alba*.

RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA

Ensayo en microplaca de Azul Alamar (MABA)
 Cepa: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

Raíz FcHex MIC=25µg/mL **Raíz F8 MIC=12.5µg/mL**

Espectro de ¹H-RMN de la Fc 8 Raíz *B. alba*

Protones aromáticos	Alquenos	Alquinos
7.10 ppm	1.22 ppm	1.13 ppm
6.78 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
6.50 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
6.22 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
5.94 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
5.66 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
5.38 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
5.10 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
4.82 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
4.54 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
4.26 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
3.98 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
3.70 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
3.42 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
3.14 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
2.86 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
2.58 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
2.30 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
2.02 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
1.74 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
1.46 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
1.18 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
0.90 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
0.62 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
0.34 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm
0.06 ppm	1.13 ppm	1.13 ppm

B. alba es rica en poliacetilenos

CONCLUSIONES

En este trabajo se pudo confirmar la actividad antituberculosa de la FcHex de la raíz de *B. alba* con una MIC=25 µg/mL. Con el análisis quimiométrico de ¹H-RMN y HPLC-UV identificamos los picos responsables de la actividad antituberculosa correspondientes a protones alifáticos (δ=0.92 y 1.26 ppm) con t_r= 90.02, 91.17, 91.48 min.; protones de azúcares (δ=16.04 y 23.26 ppm) t_r=16.04, 23.26 y protones aromáticos (δ=7.60, 7.72 y 8.06 ppm) t_r= 64.25, 66.98 min. Al realizar el fraccionamiento de la Fc Hex de la raíz, la fracción No. 8 de la mostró una mejor actividad antituberculosa con una MIC=12.5 µg/mL, al comparar el espectro de ¹H-RMN nos pudimos percatar de que la señal en δ= 1.28 ppm se mantuvo presente y resaltando la contribución que tiene en el análisis de OPLS. Además podemos observar señales correspondientes a protones de alquinos, alquenos y aromáticos, por lo cual, esta planta al ser rica en poliacetilenos nos da una pauta de la estructura del compuesto responsable de la actividad antituberculosa.

REFERENCIAS

- Organization, W. H. Global tuberculosis report 2019.
- Hogland, D. T. et al., *Advanced Drug Delivery Reviews* 102, 55–72 (2016).
- Ong, P. L. et al. *Food and Chemical Toxicology* 46, 1535–1547 (2008).
- López Guerra, R.L. et al. *Acta farmacéutica bonaerense* 20, 89–93 (2001).
- Yuan, M. et al. *Agricultural Biotechnology* 8, 174–176 (2019).

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca No. 560576/297059 durante el periodo Agosto 2016 - Julio 2020 para la realización de mis estudios de doctorado.
- A Claudia Verónica Moreno Quiroz por su ayuda y asesoría durante el proceso.

Anexo 14. Poster presentado en la 16a Reunión Internacional en Investigación en Productos Naturales, mayo de 2021.



Teaser Chemometrics offers an important complementary tool to enhance the searching and isolation of bioactive natural products from natural sources.



Chemometrics: a complementary tool to guide the isolation of pharmacologically active natural products

Reviews • FOUNDATION REVIEW

Axhell A. Cornejo-Báez^{1,4}, Luis M. Peña-Rodríguez²,
Radamés Álvarez-Zapata³, Maribel Vázquez-Hernández¹ and
Alberto Sánchez-Medina¹

¹Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa-Enríquez, Veracruz, México

²Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130 Chuburná de Hidalgo, C.P. 97205, Mérida, Yucatán, México

³Centro de Estudios de Desarrollo Sustentable y Aprovechamiento de la Vida Silvestre (CEDESU) de la Universidad Autónoma de Campeche. Avenida Héroe de Nacozari #480, C.P. 24079, San Francisco de Campeche, Campeche, México

⁴Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa Enríquez, Veracruz, México

Natural products (NPs) are specialized metabolites from natural sources, such as plants, animals, fungi, and bacteria, that have had an important role in the discovery and development of new drugs. For many years, bioassay-guided isolation has been the most used strategy for the isolation of bioactive NPs. Chemometrics is the science of relating the measurements made in a system or chemical process to the application of mathematical and statistical methods. Recently, chemometric techniques have been widely used in NP studies, including the detection of bioactive NPs from medicinal plants, chemotaxonomy, determination of geographical origin of medicinal plants and herbal products, and for quality control purposes. In this review, we propose a chemometric-enhanced strategy as a new approach for speeding up the isolation of bioactive NPs while reducing the quantities of biological material and organic solvents used.

Introduction

The development of new drugs is a complex, slow, and expensive process. The time from the discovery of a potential drug until it reaches the market can be ~12 years or more, with an investment of ~ US\$2870 million [1]. Discovery of a new lead compound involves the identification of new chemical entities (NCEs) that have the characteristics required for a drug. These entities can be obtained by chemical synthesis or by an isolation process of NPs. NPs are

Corresponding author: Sánchez-Medina, A. (albsanchez@uv.mx)

1359-6446/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.09.016>

Axhell A. Cornejo-Báez is currently a first-year PhD student in biomedical sciences. She also holds a MPhil in biorganic chemistry and a BSc in clinical chemistry from the University of Veracruz. Her PhD focuses on the use of chemometrics to search for natural products from medicinal plants with antibacterial and antimycobacterial activity.



Luis M. Peña-Rodríguez is a senior scientist at the Plant Biotechnology Unit of Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán. He has a BSc degree in industrial chemistry from the University of Toluca (Mexico) and a PhD in chemistry from the University of Alberta (Canada). He has carried out postdoctoral and sabbatical research stays at North Carolina State University (USA), University of New Brunswick (Canada), National University in Mexico City (Mexico), and Technical University in Munich (Germany).



Radamés Álvarez-Zapata received his BSc in biochemical engineering from the Technological Institute of Mérida and his MSc in biotechnology from the Center for Scientific Research in Yucatán. His current research centers on the characterization of biomolecules using chemometrics for the detection of molecules of technological interest from plants and microorganisms.



Maribel Vázquez-Hernández is a senior researcher at the University of Veracruz. She was awarded a BSc in chemistry from the University of Veracruz and a PhD in chemical sciences from the National Polytechnic Institute in Mexico. She is an IUPAC Fellow. Her current research includes the synthesis and structural analysis of organic compounds with biological activity.



www.drugdiscoverytoday.com 27

Anexo 15. Artículo de revisión generado como producto de este trabajo de tesis, Revista Drug Discovery Today, enero 2020.



“ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE *Bidens pilosa* L.”

Cornejo-Báez Axxhell Aleid^{1,2}, Luna-Herrera Julieta², García-Rodríguez Rosa Virginia², Domínguez-Ezquivel Zaira¹ y Sánchez-Medina Alberto^{2,3}.

1. Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa Enríquez, Veracruz, México. *albsanchez@uv.mx
2. Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa Enríquez, Veracruz, México.
3. Laboratorio de Inmunquímica II. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala S/N. Col. Casco de Santo Tomás, Deleg. Gustavo A. Madero. C.P. 11340, Ciudad de México.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que afecta principalmente los pulmones¹. El tratamiento actualmente disponible para la TB es muy tóxico e ineficaz para las bacterias farmacoresistentes (FR)², por tales motivos se requieren nuevos fármacos, menos tóxicos y más eficaces en contra de los bacilos FR. Se estima que más de la mitad de los productos farmacéuticos que actualmente se encuentran en el mercado se derivan de productos naturales (PNs)³. Los PNs son metabolitos secundarios de fuentes naturales, como plantas, animales, hongos, bacterias y organismos marinos que han desempeñado un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Hoy en día existe una novedosa estrategia para la identificación y aislamiento de PNs con actividad biológica, son amigables con el medio ambiente, reducen el tiempo de análisis y costos, estas son las técnicas quimiométricas^{4,5}. La quimiometría es la ciencia de relacionar las mediciones realizadas en un sistema o proceso químico a través de la aplicación de métodos matemáticos y estadísticos⁶. En el presente trabajo se eligieron dos plantas nativas del estado de Veracruz usadas en el tratamiento de la TB o síntomas relacionados y a través de técnicas quimiométricas acelerar el aislamiento de PNs bioactivos.

RESULTADOS

Análisis de componentes principales (PCA)



Proyecciones ortogonales a las estructuras latentes (O-PLS) de HPLC-UV



Proyecciones ortogonales a las estructuras latentes (O-PLS) de 1H-RMN



METODOLOGÍA



RESULTADOS

Ensayo en microplaca de Azul Alamar (MABA)



CONCLUSIONES

En este trabajo se pudo confirmar la actividad antituberculosa de la FcHex de la raíz de *B. pilosa* con una MIC=25 µg/mL. Mediante el análisis quimiométrico se detectaron los picos responsables de la actividad antituberculosa, con $t_R=16.04, 23.26, 64.25, 66.98, 90.02, 91.17, 91.48$ min.; además este trabajo se complementó con el análisis quimiométrico de los perfiles de ¹H-RMN, identificando los picos con $\delta=0.92$ y 1.28 son de protones alifáticos; $\delta=4.28$ son protones que se encuentran en azúcares; $\delta=7.60, 7.72$ y 8.08 corresponden a protones aromáticos. Por lo cual, nuestro siguiente paso será obtener las fracciones necesarias de FcHex de la raíz de *B. pilosa* para poder llevar a cabo el ensayo de MABA para posteriormente aislar al metabolito responsable de la actividad antituberculosa e identificarlo por medio de técnicas espectroscópicas.

AGRADECIMIENTOS

• Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca No. 560976/297059 durante el periodo Agosto 2016 - Julio 2020 para la realización de mis estudios de doctorado.

REFERENCIAS

1. World Health Organization. (2018). Global tuberculosis Report.
2. Zumia et al., 2014. The Lancet Infectious Diseases. 14, 327-340.
3. Awan, A. et al., 2016. Drug Deliv. Rev., vol. 105, pp. 96-106.
4. Cornejo-Báez et al., 2016. Drug Discovery Today. In press.
5. Alvarez et al., 2015. Journal of Chromatography. 1422, 213-221.
6. Bansal, A. et al., 2014. vol. 4, no. 4, pp. 223-233

Anexo 16. Poster presentado en el Simposio de Química Aplicada, facultad de QFB, Xalapa. Octubre de 2019.

“ESTUDIO QUIMIOMÉTRICO DE LA ACTIVIDAD ANTITUBERCULOSA DE *Bidens pilosa* L. *Xylosma flexuosum* (H.B. & K.) Hemsl”

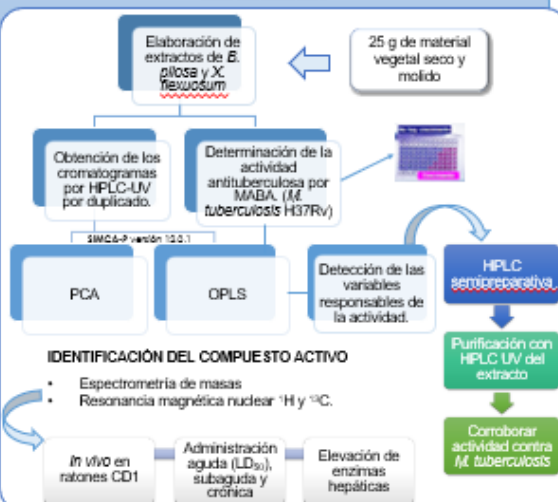
Cornejo-Báez Axhell Aleid¹, García-Rodríguez Rosa Virginia¹, Zenteno- Cuevas Roberto² y Sánchez-Medina Alberto^{1*}.

1. Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa Enríquez, Veracruz, México. Correo: acornejo2809@gmail.com, rosqa74@hotmail.com y albsanchez@uv.mx
2. Instituto de Salud Pública, Universidad Veracruzana. Av. Luis Castelazo Ayala s/n, Col. Industrial Animas, C.P. 91190, Xalapa Enríquez, Veracruz, México. Correo: robzencue@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada principalmente por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* que afecta principalmente los pulmones¹. El tratamiento actualmente disponible para la TB es ineficaz para las bacterias farmacorresistentes², por lo tanto, son requeridos nuevos fármacos y los productos naturales (PN) desempeñan un papel importante en el proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. En el año 2014 el estado de Veracruz ocupó el sexto lugar a nivel nacional en incidencia por TB pulmonar, registrándose un total de 2,131 casos nuevos de TB en todas sus formas, de éstas 1,840 casos fueron de TB pulmonar y 43 casos fueron de TB farmacorresistente³. En México, al igual que en otros países en desarrollo, la medicina tradicional es una fuente importante de productos para el tratamiento de enfermedades, se estima que alrededor del 25% de la población mexicana depende exclusivamente del uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades⁴. El estado de Veracruz es poseedor de una gran diversidad florística calculada en aproximadamente 7,500 especies de plantas vasculares, de estas se estima que 500 son plantas medicinales⁵. Hoy en día existe una nueva metodología para la identificación y aislamiento de PNs con actividad biológica, además de que son amigables con el medio ambiente, reducen el tiempo de análisis y costos, estas son las técnicas quimiométricas⁶. Por lo tanto, en el presente trabajo se eligieron dos plantas nativas del estado de Veracruz las cuales son empleadas en la medicina tradicional del estado para tratar diversos padecimientos asociados a tuberculosis y las cuales no habían sido estudiados previamente los metabolitos responsables.

METODOLOGÍA



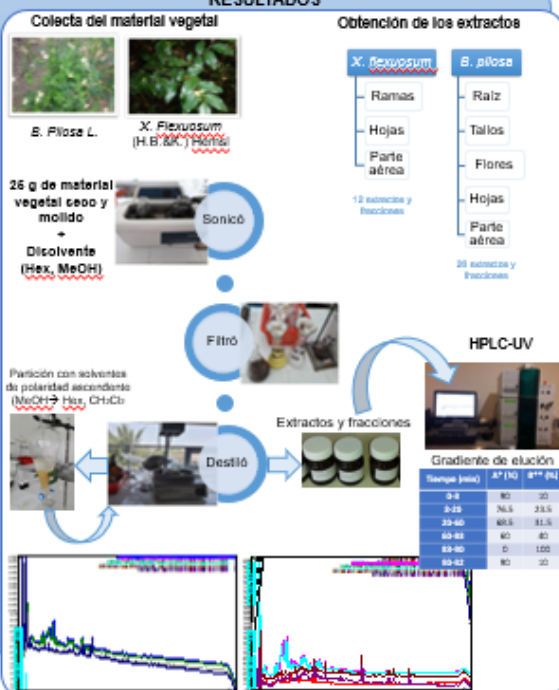
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

- Se probaron diferentes métodos previamente reportados para la separación cromatográfica en HPLC-UV, sin embargo ninguno de los métodos usados dio buenos resultados en la separación de picos.
- Esto puede deberse a que al ser distintas plantas los metabolitos y concentraciones presentes en estas varían y por lo tanto los tiempos de retención son diferentes.
- Debido a esto se ajustaron los métodos empleados hasta obtener una mejor separación y definición de los picos.
- Actualmente se sigue trabajando en la obtención de los cromatogramas, sin embargo la buena resolución de este método nos va a permitir seguir adelante con el análisis quimiométrico.

AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a la MCB. Claudia Moreno Quiroz por todo el apoyo y las facilidades brindadas para la obtención de los extractos.
- Agradezco a la Dra. Zaira Domínguez del laboratorio SARA unidad Xico por las facilidades otorgadas en el uso del HPLC.
- Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca No. 560976/297059 durante el periodo Agosto 2016 - Julio 2020 para la realización de mis estudios de doctorado.

RESULTADOS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. (2014). Global tuberculosis Report 2014.
2. Zumla et al., 2014. New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects. *The Lancet Infectious Diseases* 14, 327-340.
3. Fuentes et al., 2014. Plan de trabajo, Programa de tuberculosis 2015. Secretaría de Salud del Estado de Veracruz.
4. Molina et al., 2007. Evaluation of the flora of Northern Mexico for in vitro antimicrobial and antituberculosis activity. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 435-441.
5. Gheno et al., 2011. Las plantas medicinales de la organización de parteras y médicos indígenas tradicionales de Ihuatlanillo, Veracruz, México y su significancia cultural. *Polibotánica* 31, 199-251.
6. Álvarez et al., 2015. Chemometrics-enhanced high performance liquid chromatography ultraviolet detection of bioactive metabolites from phytochemically unknown plants. *Journal of Chromatography* 1422, 213-221.

Anexo 17. Poster presentado en la Reunión de egresados y estudiantes de la Maestría en Química Bioorgánica y el Doctorado en Ciencias Biomédicas, marzo de 2018.