

**UNIVERSIDAD DE LAS AMÉRICAS PUEBLA**

Escuela de Ciencias

Departamento de Ciencias Químico-Biológicas



**Análisis fitoquímico, antimicrobiano y tóxico de extractos de *Urtica chamaedryoides***

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta la estudiante

**Venus Thalia Flores Amaro**

**169645**

**Licenciatura en Nanotecnología e Ingeniería Molecular**

Dr. Luis Ricardo Hernández

San Andrés Cholula, Puebla.

Otoño 2024

Hoja de firmas

## **HOJA DE FIRMAS**

Tesis que, para completar los requisitos del Programa de Honores presenta el estudiante

**Venus Thalia Flores Amaro ID 169645**

### **Director de Tesis**

---

**Dr. Luis Ricardo Hernández**

### **Presidente de Tesis**

---

**Dr. Eugenio Sánchez Arreola**

### **Secretario de Tesis**

---

**Dra. Candy Yuriria Ramírez Zavaleta**

## **DEDICATORIA**

La presente tesis está dedicada, con todo mi amor y gratitud, a mis padres, quienes han sido mis pilares fundamentales de mi vida y mi mayor fuente de inspiración para seguir adelante. Cada página del presente manuscrito no sólo muestra un logro personal, sino que también demuestra un profundo acto de agradecimiento hacia ustedes, quienes, con gran sacrificio y esfuerzo, me brindaron la educación que ustedes no tuvieron la oportunidad de recibir.

Papá, mamá he aprendido que no hay sueño demasiado grande ni meta inalcanzable cuando uno trabaja con dedicación, humildad, y perseverancia. Su confianza y apoyo ha sido inquebrantable en mí, incluso en los momentos que dudé de mí misma, en los que no encontraba la luz ustedes me guiaron para atravesar estos desafíos.

Esta tesis no sólo muestra esfuerzo, sudor, desesperación, ansiedad, lágrimas y estudio; sino que para mí es una gran satisfacción haberla redactado, pues me llena de orgullo saber que de cierto modo es un regalo hacia ustedes, y refleja un símbolo de mi gratitud eterna. Cada sacrificio que han hecho, cada palabra de aliento, cada consejo y por no dudar de mí, han sido pieza clave para que hoy pueda alcanzar este sueño de culminar mis estudios.

Siempre estaré en deuda con ustedes, y créanme que valoro el sacrificio que han hecho por mí a lo largo de estos años, en mi etapa como estudiante. Gracias por ser mi refugio en los días difíciles y por ser un verdadero ejemplo de fortaleza y amor, lo cual me llenó de motivación para realizar esta tesis y finalizar mi carrera universitaria.

A ustedes por ser mi modelo para seguir, son mi mayor orgullo, y este logro se los dedico con todo mi corazón.

## AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer a Dios y a San Judas Tadeo, porque, aunque no me considero al 100% una fiel creyente, me han ayudado a lo largo de mis estudios y mi vida. Ustedes son la prueba de que los cambios pueden lograrse.

En segunda, a mi hermana Aránzazu porque sin ella, no hubiera logrado llegar hasta donde estoy, gracias a ella, he logrado ser perseverante y dedicada. Sin su guía desde pequeña, no hubiera podido convertirme en quién soy.

A mí, por brindarme tremenda paciencia al llevar a cabo este proyecto de investigación y por no rendirme, luchar y seguir adelante.

A Sierra, por ser mi confidente, por ver mis momentos de crisis, y por permitirme ser vulnerable. Gracias por quedarte en mis momentos de locura, tristeza, chisme, ansiedad, y felicidad. Agradezco que seas parte de mi vida y que los caminos nos hayan juntado. Fuiste un gran apoyo emocional.

A Diego Buenfil, por ser una gran persona que me topé en la carrera. Gracias por tus ocurrencias, tus chistes y tu total honestidad, nunca cambies.

A Gael, que sorprendentemente pasamos por situaciones similares, y siempre comprendió por lo que pasaba, por escucharme y aconsejarme, y que, así como yo, el también será parte de la primera generación con un grado universitario.

A Miguel y Luis, que quizá nunca tendrán la oportunidad de leer esta tesis, pero ellos fueron los verdaderos maestros al enseñarme con paciencia y cariño como realizar las pruebas antimicrobianas, desde preparar un agar, hasta esterilizar el material.

A Scar, por ser mi primera amiga de la carrera, y por su apoyo incondicional.

A Pau Monroy, por ser la primera persona que conocí durante mi etapa universitaria, quién siempre me contagió con sus tarareos de canciones, su risa y su gran energía.

A Ixchel, por ser mi acompañante durante varias de mis pruebas antimicrobianas, y así como también Ann por su tiempo, por compartirme chismes y muchas risas que pasamos en el Vips de la universidad.

Gracias a los de las carreras de ciencias, en especial de bioquímica y qfb por extender su mano y adoptarme como su amiga, muchas gracias, Eva, Marlene, Amaury, Brit, Sofi ,Vale y Roberto.

Por último, a Pame, Lía, Max, Mildred, Aaron, Renata, Marsell y Mariana por tantos años de una amistad fiel e invaluable, por compaginar con ustedes, por nuestras aventuras, por nuestros recuerdos, y por tantos momentos que hemos compartido. Espero que en futuras etapas sea así y que nos podamos seguir frecuentando.

A mi perrita Vasha, porque me acompañó a mis desveladas, y me alegró en los momentos más difíciles.

# ÍNDICE

HOJA DE FIRMAS .....	2
DEDICATORIA .....	3
AGRADECIMIENTOS .....	4
1. INTRODUCCIÓN .....	10
1.1 Antecedentes .....	11
1.2 Justificación .....	12
2. MARCO TEÓRICO .....	12
2.1 Género <i>Urtica</i> .....	12
2.2. <i>Urtica chamaedryoides</i> .....	16
2.3 Clasificación .....	17
2.4 Distribución .....	17
2.5 Recolección .....	18
2.6 Conservación .....	18
2.7 Química de <i>Urtica spp.</i> .....	18
2.8 Destilación .....	19
2.8.1 Destilación simple .....	19
2.9 Solventes de una extracción .....	20
2.9.1 Propiedades de los solventes para extracción .....	20
2.9 Extracción .....	21
2.9.1 Maceración .....	21
2.9.2 Infusión .....	21
2.10 Pruebas fitoquímicas .....	22
2.10.1 Metabolitos primarios .....	22
2.10.2 Metabolitos secundarios .....	22
2.11 Cromatografía de capa fina (CCF) .....	23
2.12 Rotavapor a presión reducida .....	23
2.13 Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (IR-TF) .....	23
2.14 Resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN- <sup>1</sup> H) .....	23

2.15 Cromatografía en columna (CC) .....	24
2.16 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).....	25
2.17 Pruebas biológicas .....	26
2.17.1 Método Kirby-Bauer o difusión de disco.....	26
2.17.2 Modelos <i>in vivo</i> para toxicidad .....	26
2.17.2.1 Agentes Patógenos .....	26
2.17.2.2 Actividad letal con <i>Artemia spp.</i> .....	27
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	28
3.1 Hipótesis .....	28
3.2 Objetivo General.....	28
3.3 Objetivos Específicos .....	28
4. METODOLOGÍA.....	29
4.1. Disolventes y reactivos .....	29
4. 2 Equipos y materiales.....	30
4.3 Obtención e identificación de la planta .....	33
4.4 Proceso obtención de la muestra .....	33
4.5 Maceración con disolventes orgánicos .....	33
4.6 Evaporación a presión reducida.....	34
4.7 Pruebas Fitoquímicas.....	34
4. 7. 1 Alcaloides .....	35
4. 7. 2 Saponinas .....	35
4. 7. 3 Triterpenos .....	35
4. 7. 4 Taninos.....	35
4. 7. 5 Flavonoides .....	35
4. 7. 6 Glucósidos cianogénicos.....	36
4. 7. 7 Glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas.....	36
4. 7. 8 Determinación de cumarinas con extracto acuoso.....	37
4. 7. 8. 1 Extracto Acuoso.....	37
4. 7. 8. 2 Determinación de cumarinas.....	37

4. 7. 9 Determinación de antraquinonas: reacción de Borntrager .....	37
4. 7. 10 Determinación de esteroides .....	38
4. 7. 11 Método rápido de Webb para alcaloides.....	38
4.8 Preparación de medios de cultivo .....	38
4. 8. 1 Preparación de Agar Müller-Hinton .....	38
4. 8. 2 Preparación de Agar MacConkey .....	39
4. 8. 2. 1 Preparación de Agar Dextrosa-Sabouraud.....	39
4. 8. 2. 2 Preparación de Agar Sal Manitol .....	39
4. 8. 2. 3 Preparación de Agar Nutritivo .....	39
4. 9 Consideraciones para el manejo y esterilización de medios de cultivo y materiales de laboratorio	40
4. 9. 1 Esterilización de medios de cultivo y materiales de laboratorio con autoclave.....	40
4.9.2 Vertido de medio de cultivo bajo condiciones asépticas .....	41
4.10 Evaluación de esterilidad en medios de cultivo microbiológicos.....	41
4.11 Siembra de bacterias en Cultivos Microbiológicos .....	41
4.12 Preparación de la escala de McFarland .....	41
4.13 Siembra bacteriana en agua isotónica.....	42
4.14 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el Método Kirby-Bauer .....	42
4.15 Bioensayo de actividad biológica con nauplios de <i>Artemia</i> spp. ....	43
4.16 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear (RMN- <sup>1</sup> H) .....	44
4.17 Análisis IR-TF .....	44
4.18 Cromatografía.....	44
4. 18. 1 Cromatografía en capa fina.....	44
4. 18. 2 Cromatografía en sílica gel .....	44
4.18. 3 Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM) .....	44
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	45
5.1 Extracción.....	45
5.2 Pruebas fitoquímicas preliminares.....	46
5.3 Cromatografía en columna de sílica gel .....	47



5.4 Desplazamientos químicos de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico por resonancia magnética nuclear de (RMN- <sup>1</sup> H).....	49
5.5 Pruebas de actividad biológica .....	51
5.5.1 Método Kirby-Bauer o difusión de disco.....	51
5.5.2 Bioensayo de toxicidad <i>Artemia</i> spp.....	54
5.6 Análisis Infrarrojo (IR-TF).....	57
5.7 Cromatografía de gases acoplado a masas .....	59
6. CONCLUSIONES.....	63
7. REFERENCIAS .....	65
8. ANEXOS .....	72
8.1 Espectros de Resonancia Magnética Nuclear fracciones de extracto clorofórmico .....	72

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, distintas culturas han implementado el uso de plantas con propósitos terapéuticos y medicinales. Las plantas medicinales han sido parte integral de la cultura y la medicina. Incluso, un 25% de los fármacos prescritos mundialmente, provienen de las plantas (Alonso Castro et al., 2012). La medicina tradicional implica prácticas donde se utiliza el conocimiento y creencias, las cuales incorporan plantas como medicinas, terapias espirituales y físicas, que se aplican de manera individual o combinadas para tratar, diagnosticar y prevenir enfermedades. En países desarrollados, la adaptación de la medicina tradicional se considera medicina alternativa (Khan & Ahmad, 2019).

En cambio, la medicina herbal conocida como “fitomedicina”, utiliza las plantas con propósito terapéutico y curativo de enfermedades, así como también para mejorar la salud humana. De acuerdo con la OMS, los medicamentos a base de plantas son aquellos que contienen un ingrediente activo, ya sea de las partes aéreas o subterráneas de la planta (Khan & Ahmad, 2019).

La medicina herbaria se ha practicado desde hace siglos y la gente ha recurrido a los remedios caseros para curar pequeños malestares como gripa, tos, alergias, malestar estomacal y dental. De hecho, en términos del conocimiento sobre medicina tradicional, México ha sido reconocido como el segundo país más importante en el mundo, debido a su riqueza y tradición ancestral en el uso de plantas medicinales, justo después de China. El territorio mexicano se ha caracterizado por un amplio rango de condiciones medioambientales que favorecen el crecimiento de aproximadamente 4500 especies de estas plantas, de las cuales algunas han sido usadas por alrededor de 56 grupos étnicos (Gómez Álvarez, Regino, 2024; Valdivia-Correa et al., 2016).

Datos históricos y arqueológicos, han indicado que, por más de 5000 años, grupos humanos de Mesoamérica han usado las plantas para propósitos curativos. Muchas especies que se han utilizado en México se han ocupado desde tiempo prehispánicos para tratar diferentes males como la infección por parásitos intestinales, inflamación, infecciones, quemaduras, cáncer, diabetes, entre otros (Gutiérrez-Grijalva & Heredia, 2019). A nivel nacional, Oaxaca es reconocido como el estado con más conocimiento y sabiduría sobre las plantas medicinales (Cruz-Pérez Alejandra Lucía et al., 2021).

Hoy en día, se ha reportado que cerca de un tercio de la población mundial, sigue usando las plantas como remedio natural (Gutiérrez-Grijalva & Heredia, 2019). En la actualidad, el interés por las plantas

medicinales ha resurgido, impulsado por una creciente búsqueda de alternativas naturales a los tratamientos farmacológicos convencionales.

## 1.1 Antecedentes

La fitoquímica es una disciplina científica cuyo objetivo es obtener compuestos químicos, elaborados por las plantas, a través de extracción, aislamiento, purificación y elucidación de su estructura química. Además, se enfoca en la caracterización de la actividad biológica de estas sustancias, que pueden perjudicar o beneficiar la salud humana, animales y microorganismos (Sánchez y García Figueroa, 2022).

Las plantas medicinales han aumentado su popularidad debido a su potencial terapéutico. Muchos fármacos que contiene propiedades antitumorales, antimicrobianas y antihepatotóxicas, contienen plantas medicinales, pues son una fuente rica de compuestos bioactivos. Además, se les ha atribuido propiedades benéficas, tal es el caso del fármaco Paclitaxel, que se usa para tratar algunos tipos de cáncer y que proviene de la corteza del árbol conocido como tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*) (Gutiérrez-Grijalva & Heredia, 2019).

Este tipo de fármacos que contienen compuestos bioactivos provenientes de las plantas, se les conoce como “fitomedicinas”, las cuales se caracterizan por ser seguras y eficientes, y por ello sus propiedades son estudiadas a detalle. Los compuestos químicos de la planta se conocen como fitoquímicos: esta palabra proviene de la palabra griega “*Phyto*”, que significa planta. El crecimiento de las plantas y el mecanismo de defensa ante patógenos y depredadores, también es causado por la presencia de estos fitoquímicos.

Los agentes bioactivos son carbohidratos, flavonoides, esteroides, taninos, alcaloides y terpenoides que derivan de la parte aérea y floral de las plantas, lo que incluye hojas, frutas, semillas y cortezas. Adicionalmente, estos agentes se producen en procesos metabólicos primarios y secundarios. (Habiba & Yasmeen, 2023). Los metabolitos primarios son compuestos que, utilizados en funciones vitales de las plantas, tales como su crecimiento y reproducción; entre estos se encuentran proteínas, carbohidratos, lípidos, como grasas y aceites, así como ácidos nucleicos y vitaminas. En el caso de los animales y el hombre, estos metabolitos primarios se usan como alimento (Sánchez y García Figueroa, 2022).

Los metabolitos primarios son compuestos que, utilizados en funciones vitales de las plantas, tales como su crecimiento y reproducción; entre estos se encuentran proteínas, carbohidratos, lípidos, como grasas y

aceites, así como ácidos nucleicos y vitaminas. En el caso de los animales y el hombre, estos metabolitos primarios se usan como alimento (Sánchez y García Figueroa, 2022).

Por otra parte, los metabolitos secundarios, son aquellos que protegen a las plantas de enfermedades, pues actúan como moléculas de defensa y reguladores (Erb y Kliebenstein, 2020). Los metabolitos secundarios con frecuencia tienen color, olor, sabor, y actividad biológica y son abundantes en organismos que carecen de un sistema inmunológico (Sánchez y García Figueroa, 2022). Además, los metabolitos secundarios poseen diferentes efectos biológicos como antibióticos, antifúngicos, y antivirales, debido a que protegen a las plantas de agentes patógenos. Los metabolitos secundarios de las plantas se clasifican en distintas clases que incluyen fenoles, alcaloides, saponinas, terpenos, lípidos y carbohidratos (Builders, 2019).

## **1.2 Justificación**

Las plantas medicinales son una excelente herramienta para la generación de nuevos remedios para tratar distintas enfermedades. Por todo lo anterior, es importante evaluar la presencia de compuestos bioactivos en plantas como *Urtica chamaedryoides*, usada en la medicina tradicional mexicana. Cabe mencionar que, esta especie no se ha investigado fitoquímicamente aún como otras especies que pertenecen al mismo género *Urtica*, pues no existen registros sobre esta planta bastante abundante en México y Estados Unidos.

Es por ello, que surge la necesidad de abordar esta investigación fitoquímica para comprender el potencial terapéutico que puede llegar a tener esta planta. La obtención y caracterización de los compuestos bioactivos, permitirá conocer su estructura y evaluar su eficacia ante ciertos patógenos. Además, es de suma importancia este tipo de evaluación para conocer, si esta planta posee los mismos efectos terapéuticos, tales como efectos antimicrobianos, antioxidantes, anticancerígenos, antidiabéticos, antiinflamatorios, antifúngicos, antivirales y antiartríticos, que tienen otras especies del mismo género ya bastante estudiadas como *Urtica Urens* L., *Urtica. pilulifera* L., y *Urtica dioica* L (Hari Prasad Devkota et al., 2022).

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Género *Urtica***

Ortiga es el nombre común que poseen las plantas del género *Urtica* de la familia Urticaceae. Existen alrededor de 46 especies pertenecientes a este género. Los miembros más destacados son *Urtica dioica* L. y *U. urens* L., las cuales son nativas de continentes como Europa, África, Asia y Norteamérica. Además,

estas plantas se caracterizan por ser herbáceas perennes e incluso pueden llegar a crecer hasta 2 m de altura (Kregiel et al., 2018).

La característica más conocida de esta planta es la presencia de unos pelos urticantes que liberan un líquido cáustico, el cual produce una irritación intensa, escozor e inflamación en la piel cuando se toca o se roza. Debido a sus cualidades urticantes se conocen como “malas hierbas”. En inglés, se conoce como “nettles” o “stinging nettles” a causa de sus pelos urticantes, que pican como aguijón o aguja y de ahí deriva su nombre (Mishra & Kharel, 2013).

El nombre de esta planta y su familia entera: la Urticaceae; proviene del término de *Urtica*, que significa “aquella que quema”; del Latin *urere*, “quemar”. Por extensión, el término “urticaria” significa cualquier picazón similar a la causada por las picaduras de ortiga (Eugenia N, 1961). Los pelos urticantes son tan pequeños, que son invisibles al ojo humano, y se les conocen como tricomas. Estos tricomas, cuando entran en contacto con la piel, pueden perforarla e inyectar sustancias tales como ácido fórmico, histamina, acetilcolina y serotonina. Cuando estas toxinas llegan a la piel, causan irritación y comezón que puede durar hasta 12 horas (Kregiel et al., 2018).

Estas plantas se describen como herbáceas o subfrutescentes, cubiertas de pelos urticantes y no urticantes, con hojas simples, pecioladas, de bordes aserrados, estípulas persistentes, lámina cubierta de cistolitos redondos o largos, o ambos. Además, cuentan con inflorescencia en glomérulos sésiles o pedicelados, simples o espiciformes (Eugenia, 1961).

Las flores son monoicas o dioicas, tetrámeras; las masculinas están compuestas de un periantio formado de 4 segmentos iguales con pelos en la cara exterior, 4 estambres epipétalos de filamentos arqueados hacia el centro de la flor en el capullo. La flor femenina contiene 4 segmentos desiguales, 2 externos pequeños y 2 internos grandes, con pelos esparcidos en forma característica para cada especie, ovario unilocular, con un solo estilo y un estigma peniciliado persistente y un solo rudimento seminal ortótropo y de inserción basal (Eugenia N, 1961).

Las *Urticas*, crecen alrededor de todo el mundo, en climas templados, prefieren hábitats sombreados con bastante humedad. Por lo general, se encuentran en bosques, junto a ríos o arroyos. Comúnmente, este

tipo de plantas crecen en suelos muy ricos en nitrógeno. Como se mencionó previamente, se denominan “malas hierbas”, pero de acuerdo con los autores Dreyer y Müssing, las ortigas pueden mejorar los suelos sobrefertilizados con nitrógeno y fosfato (Dreyer & Müssig, 2000). En la siguiente tabla se enlistan las 46 especies que pertenecen al género *Urtica*.

**Tabla 1.** Especies más comunes pertenecientes al género *Urtica* (*Search Results — the Plant List, 2024; EFlora Search Page, 2024*)

No.	Nombre	Sinónimos	Hábitats
1	<i>U. angustifolia</i> Fisch. ex Hornem.	<i>U. dioica</i> var. <i>angustifolia</i> (Fisch. ex Hornem.) Ledeb. <i>U. foliosa</i> Blume	China, Japón, Corea
2	<i>U. ardens</i> Link	<i>U. himalayensis</i> Kunth & Bouché <i>U. mairei</i> var. <i>oblongifolia</i> CJ Chen <i>U. zayuensis</i> CJ Chen	Bután, India, Nepal, Sikkim
3	<i>U. atrichocaulis</i> (Hand.-Mazz.) C.J. Chen	<i>U. dioica</i> var. <i>atrichocaulis</i> Hand.-Mazz.	China - Guizhou, Sichuan, Yunnan
4	<i>U. atrovirens</i> Req. ex Loisel.	-	Francia, Italia, España
5	<i>U. ballotifolia</i> Wedd.	-	Colombia, Ecuador
6	<i>U. berteriana</i> Phil.	-	Chile, Bolivia, Argentina, Colombia
7	<i>U. buchtienii</i> Ross	-	Chile, Argentina
8	<i>U. cannabina</i> L.	<i>U. cannabina</i> f. <i>angustiloba</i> Chu	Rusia, Suecia, Países Bajos, China
9	<i>U. chamaedryoides</i> Pursh	<i>U. chamaedryoides</i> var. <i>runyonii</i> Correll	Estados Unidos, México
10	<i>U. circularis</i> Sorarú	<i>U. chamaedryoides</i> var. <i>circularis</i> Hauman <i>U. spathulata</i> var. <i>circularis</i> Hicken	Brasil, Argentina, Paraguay, Uruguay
11	<i>U. dioica</i> L.	<i>U. galeopsisifolia</i> Wierzb. ex Opiz	Estados Unidos, Nueva Zelanda, Turquía, Europa
12	<i>U. echinata</i> Benth.	<i>U. andicola</i> Wedd.	Bolivia, Perú, Argentina, Ecuador
13	<i>U. fissa</i> E. Pritz.	<i>U. pinfaensis</i> H. Lév. & Blin en H. Lév.	China, Taiwán, Egipto, Vietnam
14	<i>U. flabellata</i> Kunth	-	Bolivia, Perú, Ecuador, Chile, Colombia

15	<i>U. galeopsifolia</i> J. Jacq. ex Blume	-	Rusia, Ucrania, Bielorrusia
16	<i>U. glomeruliflora</i> Steud.	<i>U. fernandeziana</i> Ross ex Skottsbo.	Chile
17	<i>U. haussknechtii</i> Boiss.	-	Pavo
18	<i>U. hiperborea</i> Jacq. ex Wedd.	<i>U. kunlunshanica</i> Chang Y. Yang	Nepal, India y China
19	<i>U. kioviensis</i> Rogow.	<i>U. dioica</i> var. <i>kioviensis</i> (Rogow.) Wedd. <i>U. dioica</i> subsp. <i>koviensis</i> Buia	Europa, Israel, Rusia
20	<i>U. laetevirens</i> Maxim.	-	China, Japón, Corea
21	<i>U. leptophylla</i> Kunth	<i>U. copeyana</i> Killip <i>U. nicaraguensis</i> Liebm.	Costa Rica, Colombia, Perú, Bolivia, Ecuador
22	<i>U. lilloi</i> (Hauman) Geltman	<i>U. magellanica</i> var. <i>lilloi</i> Hauman	Argentina
23	<i>U. longispica</i> Killip	-	Ecuador, Perú, Colombia
24	<i>U. macbridei</i> Killip	-	Ecuador, Perú
25	<i>U. magellanica</i> Juss. ex Poir.	<i>U. bracteata</i> Steud. <i>U. darwinii</i> Hook. <i>U. dioica</i> var. <i>pycnantha</i> Wedd. & DC. <i>U. dioica</i> var. <i>steudelii</i> Wedd. <i>U. magellanica</i> subsp. <i>bracteata</i> (Steud.) Geltman <i>U. magellanica</i> var. <i>bracteata</i> (Steud.) Wedd. <i>U. pseudodioica</i> Steud.	Chile, Perú, Bolivia, Argentina, Ecuador
26	<i>U. mairei</i> H. Lév.	-	China, India, Bután
27	<i>U. masafuerae</i> Phil.	-	Chile
28	<i>U. membranacea</i> Poir. ex Savigny	<i>Dubrueilia membranacea</i> Gaudich. <i>U. caudata</i> Vahl <i>U. dubia</i> Forssk.	Europa, Argelia
29	<i>U. mexicana</i> Liebm.	-	México, Guatemala
30	<i>U. mollis</i> Steud.	<i>U. dioica</i> var. <i>mollis</i> (Steud.) Wedd. <i>U. diplotricha</i> Phil.	Perú, Chile, Argentina
31	<i>U. morifolia</i> Poir.	-	Europa
32	<i>U. orizabae</i> Liebm.	-	México, Estados Unidos, Cuba
33	<i>U. parviflora</i> Roxb.	-	Nepal, India, Estados Unidos, China, Bután
34	<i>U. pilulifera</i> L.	<i>U. dodartii</i> L.	Túnez, Israel, Chipre, Costa Rica, Turquía

35	<i>U. platyphylla</i> Wedd.	<i>U. dioica</i> subsp. <i>platyphylla</i> P. Medvedev <i>U. takedana</i> Ohwi	Japón, Rusia
36	<i>U. praetermissa</i> V.W. Steinm.	-	México
37	<i>U. pubescens</i> Ledeb.	-	México
38	<i>U. rupestris</i> Guss.	-	Italia
39	<i>U. sondenii</i> (Simmons) Avrorin ex Geltman	<i>U. dioica</i> subsp. <i>sondenii</i> (Simmons) Hyl. <i>U. dioica</i> var. <i>sondenii</i> Simmons	Canadá
40	<i>U. spiralis</i> Blume	-	México
41	<i>U. stachyoides</i> Webb & Benth.	-	España, México
42	<i>U. taiwaniana</i> S.S. Ying	-	Taiwán
43	<i>U. thunbergiana</i> Siebold & Zucc.	<i>U. macrorrhiza</i> Hand.-Mazz.	Japón, Corea, China
44	<i>U. triangularis</i> Hand.-Mazz.	-	Porcelana
45	<i>U. trichantha</i> (Wedd.) Acevedo & NAVAS	<i>U. echinata</i> var. <i>trichantha</i> Wedd	Chile, Bolivia, Perú
46	<i>U. urens</i> L.	<i>U. trianae</i> Rusby	Estados Unidos, México, Europa, Israel, Nueva Zelanda

## 2.2. *Urtica chamaedryoides*

Originaria de Estados Unidos y México, se le conoce como buba, chichicastle, hierba blanca, meloncillo u ortiguilla. Esta es una hierba anual, erecta, con pelos urticantes y pelos simples, de tallos débiles, que mide entre 30 y 80 cm de altura; sus hojas son alargadas en forma ovalada, sus flores son pequeñas y verdes, que forman agrupaciones globosas en las axilas de las hojas, y sus frutos son pequeños.

Posee hojas opuestas de lámina flabeliforme hasta elíptico-circular, base ampliamente cunada, dentada y algunas veces cordada, con cistolitos alargados y baciliformes. Las plantas masculinas poseen hojas pediceladas, cáliz sin pelos y filamentos más largos que los sépalos, mientras que las femeninas contienen sépalos menores muy pequeños y los mayores con pelos ralos. Además, posee de flores monoicas pequeñas, dispuestas en glomérulos a veces racimosos (Sistema de Información de Biodiversidad, 2024).

Habita en clima cálido, semiseco y templado, entre los 420 y los 2950 msnm. Crece a orillas de cuerpos de agua como los arroyos o riachuelos y asociada a bosques tropicales perennifolios, bosques mesófilos de montaña, de encino y de pino. Esta planta se usa para dolores musculares, así como también, pero en menor frecuencia contra afecciones de la piel como sarampión, caspa, caída de cabello, ronchas y llagas.



En el caso del sarampión, se baña a los niños con esta con el cocimiento de las hojas (Basurto F. 1982, y col).

Se administra también en decocción, en casos de anemia, y asma. Las hojas se frotan en la piel para aliviar calambres y dolores musculares. La raíz se hierve y se toma para detener hemorragias nasales. Se aplica en enfermedades del aparato digestivo como diarrea y disentería. Igualmente, funciona como purgante y antihelmíntico, y se utiliza también para tratar otras afecciones como el mal de aire, tuberculosis, pulmonía, y fiebre (Basurto F. 1982, y col).

### 2.3 Clasificación

Esta planta pertenece al reino Plantae, al subreino Tracheobionta (plantas vasculares); superdivisión Spermatophyta (plantas con semillas); división Magnoliophyta (plantas con flor); clase Magnoliopsida (dicotiledóneas); subclase Hamamelididae, orden *Urticales*, familia Urticaceae, género *Urtica* y por último especie *Urtica chamaedryoides Pursh* (USDA Plants Database, 2024).

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de la *Urtica chamaedryoides Pursh* (Abi Sleiman et al., 2024).

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Urticales
<b>Familia</b>	Urticaceae
<b>Género</b>	<i>Urtica</i>
<b>Especie</b>	<i>Urtica chamaedryoides Pursh</i>

*Urtica chamaedryoides* puede confundirse con *Urtica urens* L., la cual se distingue por sus hojas superiores más chicas y angostas, sus dientes son triangulares con lados rectos y ampollas en la superficie de su cara superior redondas, oscuras y más abundantes (Correll y Johnston, 1970).

### 2.4 Distribución

Esta especie se encuentra distribuida en el sureste de Estados Unidos y el norte de México. Los autores Villaseñor y Espinosa en 1998 reportaron su presencia en Chiapas, Ciudad de México, Hidalgo, Estado

de México, Tamaulipas, Tlaxcala, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Puebla, Querétaro y Veracruz (*Urtica chamaedryoides* - *Ficha Informativa*, 2024); (Villaseñor R. & Espinosa G., 1998).

En el caso de Estados Unidos, se encuentra en los estados de Nuevo México, Ohio, Oklahoma, Kansas, Alabama, Arkansas, Florida, Georgia, Illinois, Luisiana, Mississippi, Missouri, Texas, Tennessee, Carolina del Norte y Carolina del Sur (*Lady Bird Johnson Wildflower Center - the University of Texas at Austin*, 2014).

## **2.5 Recolección**

Las partes aéreas de la ortiga se cosechan justo antes de la floración o poco después, ya que es cuando las hojas y raíces contienen la mayor concentración de compuestos activos. Aunque la planta florece entre abril y diciembre, es en el inicio de este período cuando se recomienda su recolección (Dhouibi et al. 2020).

Generalmente, se recoge la planta entera, dependiendo el uso que se le vaya a dar, aunque es mejor recolectar las unidades floridas y hojas de tallos jóvenes. Para fines medicinales, se recomienda recolectarla desde mayo hasta agosto. Es indispensable el uso de guantes para la colecta debido a que las hojas son muy irritantes (iNaturalist , 2016).

## **2.6 Conservación**

Esta planta se debe dejar secar, bien extendida, en un lugar ventilado y a la sombra. Al estar seca, sólo se guardan las hojas, que pueden triturarse para su preservación. iNaturalist , 2016).

## **2.7 Química de *Urtica* spp.**

Existen diversos factores que afectan la composición química de la ortiga, tales como el genotipo, el suelo, el tiempo de cosecha y el clima (Baumli et al., 2023; Marcin Masłowski et al., 2022; Moreira et al., 2020). En un análisis de Adhikari et al. (2015), se dice que la especie *Urtica dioica* L. contiene 90% humedad, 3.7% de proteínas, 0.6% de grasa, 2.1% de cenizas, 6.4% de fibra dietética y un 7.1% de carbohidratos. En la Tabla 3, se desglosa la composición química general de las hojas de ortiga.

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica de la *Urtica dioica* L. (Adhikari et al., 2015) .

Parámetro	Contenido
Humedad (%)	7,04 ± 0,77
Proteína cruda (%)	33,77 ± 0,35
Fibra cruda (%)	9,08 ± 0,14
Grasa cruda (%)	3,55 ± 0,06
Cenizas totales (%)	16,21 ± 0,54
Carbohidratos (%)	37,39 ± 0,72
Calcio (mg/100 g)	168,77 ± 1,47
Hierro (mg/100 g)	227,89 ± 0,21
Taninos (%)	0,93 ± 0,01
Polifenoles (mg GAE/g)	128,75 ± 0,21
Carotenoides (µg/g, db)	3496,67 ± 0,56
Valor calórico (kcal/100 g)	307,24 ± 0,13

Otros estudios han detectado una cantidad significativa de compuestos biológicamente activos. Se ha encontrado que las hojas de la especie *Urtica dioica* L. contienen ácido palmítico, *cis* -9,12-linoleico y  $\alpha$ -linolénico terpenoides, carotenoides, neoxantina, violaxantina, luteína, licopeno, clorofila, vitaminas, taninos, carbohidratos, esteroides, polisacáridos e isolectina (Hari Prasad Devkota et al., 2022).

## 2.8 Destilación

La destilación es una de las técnicas primordiales para la purificación de disolventes y se basa en la diferencia entre los puntos de ebullición de las sustancias que constituyen una mezcla. En una destilación, se ebulle un líquido en el "matraz de ebullición" y luego los vapores viajan a otra sección del aparato, llamado "condensador" donde entran en contacto con una superficie fría. Los vapores se condensan en esta superficie fría y el líquido condensado, es decir el "destilado" gotea en un depósito separado del líquido original (Nichols, 2017).

### 2.8.1 Destilación simple

Se usa para separar líquidos con un punto de ebullición menor a 150 °C de impurezas no volátiles, o bien, para separar aquellas mezclas de líquidos miscibles que difieran en su punto de ebullición en al menos en 25°C (Nichols, 2017).

## 2.9 Solventes de una extracción

El solvente se elige dependiendo del tipo de planta. Por lo general, se usan solventes polares como el agua, metanol y etanol para la extracción de compuestos polares. Si en su lugar se desea obtener compuestos no polares, se usan solventes como hexano o diclorometano (Abubakar & Haque, 2020). El proceso de extracción comienza con el menos polar, y termina con el más polar. La siguiente tabla (Tabla 4) muestra el orden de polaridad de manera creciente.

**Tabla 4.** Polaridad de solventes para proceso de extracción (Abubakar & Haque, 2020).

Número	Solvente	Polaridad
1	n-hexano	0.009
2	Éter de petróleo	0.117
3	Dietil éter	0.117
4	Acetato de etilo	0.228
5	Cloroformo	0.259
6	Diclorometano	0.309
7	Acetona	0.355
8	n-Butanol	0.586
9	Etanol	0.654
10	Metanol	0.762
11	Agua	1.000

### 2.9.1 Propiedades de los solventes para extracción

Por lo general, los solventes más usados para este procedimiento de extracción son agua, hexano, cloroformo y metanol.

- Agua: Solvente polar, económico, no tóxico y no inflamable. La desventaja es que promueve el crecimiento bacteriano y de moho; puede ocasionarse hidrólisis y se requiere una gran cantidad de calor para obtener el extracto concentrado (Abubakar & Haque, 2020).
- Cloroformo: Solvente no polar, es útil para la extracción de terpenoides, flavonoides, grasas y aceites. La desventaja es que es carcinogénico y sedativo (Abubakar & Haque, 2020).
- Hexano: Es un solvente no polar, con un bajo punto de ebullición que permite una velocidad de evaporación alta. Además, sirve para extraer ácidos grasos y lípidos.

- Metanol: Es un solvente polar, que se usa para obtener sustancias hidrofílicas, es altamente volátil, por lo que la extracción es más sencilla. Asimismo, este solvente se usa para obtener extractos de alta actividad antioxidante.

## **2.9 Extracción**

La extracción se define como un método para la separación de compuestos activos de una planta usando ciertos tipos de solventes. Esta técnica separa los metabolitos solubles de la planta. Los productos obtenidos son mezclas complejas, en un estado líquido o semisólido, que se obtiene al final del proceso de extracción y se denomina extracto. Esto incluye infusiones, maceraciones decocciones, tinturas, extractos en polvo y fluidos. Los compuestos químicos que se obtienen de una extracción son alcaloides, glicósidos, terpenoides, flavonoides, ligninas, entre otros (Handa et al., 2008).

### **2.9.1 Maceración**

La maceración es un procedimiento de extracción sólido-líquido. Esta técnica toma material crudo, usualmente hojas, flores, ramas o raíces las cuales usualmente se colocan trituradas o en pequeñas piezas dentro de un recipiente. Seguido, se ponen en contacto con un solvente a temperatura ambiente, con agitación ocasional y se dejan reposar por tres días (Handa et al., 2008).

El prolongado tiempo de remojo rompe la pared celular lo que hace que los compuestos bioactivos pasen al disolvente. Posteriormente, el proceso de extracción se completa al filtrar el solvente. Durante, la filtración se presan los residuos vegetales y se recuperan los compuestos bioactivos de la planta. La eficiencia se verá determinada por el tipo, polaridad del disolvente, el material vegetal y el tiempo de extracción (Subramanian & C. Anandharamakrishnan, 2023; Farooq et al., 2022).

Diferentes fitoquímicos como polifenoles, flavonoides, alcaloides, taninos, cumarinas, terpenoides, polipéptidos, glicósidos, esteroides, quinonas y saponinas pueden obtenerse, estos pueden variar de acuerdo con el solvente usado (Verap, D. et al., 2023). Su presencia puede evaluarse mediante pruebas fitoquímicas preliminares.

### **2.9.2 Infusión**

La infusión es otro método de extracción tradicional similar a la maceración con la diferencia en el solvente y la temperatura. Para esta extracción se usa agua o etanol. La planta se mezcla con el solvente y se deja por un periodo corto de tiempo (Ergen et al., 2018; Abubakar and Haque, 2020).

## **2.10 Pruebas fitoquímicas**

Análisis fitoquímico cualitativo para identificar la presencia o ausencia de ciertos compuestos químicos. A pesar de que ya existen técnicas precisas, se siguen realizando estas pruebas de manera preliminar para determinar la existencia de metabolitos secundarios, tales como flavonoides, glicósidos, triterpenos, flavonoides, taninos, alcaloides, antraquinonas y esteroides, que pueden ser de importancia biológica (Wang et al., 2022).

### **2.10.1 Metabolitos primarios**

Las plantas sintetizan una gran cantidad de compuestos orgánicos, los cuales son el resultado de los procesos metabólicos como glicólisis, ciclo de Krebs y ciclo de Calvin que ayudan a procesos vitales de la misma, como crecimiento, división celular, respiración, fotosíntesis, reproducción, y almacenamiento. Aquellos compuestos que llevan a cabo estas funciones, se les conoce como metabolitos primarios. En resumen, son compuestos esenciales para la planta, y estos son carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos y ácidos orgánicos (Sangwan et al., 2018; Bhatla & Lal, 2023).

### **2.10.2 Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios, también son referidos como productos secundarios o metabolitos especializados. Este tipo de compuestos secundarios, pueden ser usados en el diagnóstico de estudios quimio taxonómicos. Debido a sus propiedades son adecuados para biocombustibles, biomateriales e industrias farmacéuticas (Bhatla & Lal, 2023).

A diferencia de los metabolitos primarios, son compuestos orgánicos que no son esenciales para procesos de crecimiento o reproducción. Básicamente, como se menciona al inicio de la presente tesis, son compuestos producidos para defensa y supervivencia de la planta, ante condiciones externas o amenazas, tales como insectos o condiciones extremas del medioambiente (Narang et al., 2023).

Algunos de ellos poseen propiedades medicinales, lo que los convierte en importantes compuestos farmacológicamente activos. Estos metabolitos secundarios, se pueden clasificar de acuerdo con su composición, estructura, solubilidad o vía de síntesis. Las categorías más comunes son terpenos, fenólicos, esteroides, flavonoides, cumarinas, taninos, compuestos fenólicos, ligninas, alcaloides y estilbenos (Omokhefe Bruce, 2022).

### **2.11 Cromatografía de capa fina (CCF)**

Es una técnica de cromatografía que se usa para separar los componentes de manera individual provenientes de una mezcla. Se utiliza una cromatoplaca hecha de gel de sílice u óxido de aluminio como fase estacionaria. La muestra se coloca en forma de un punto o una línea en la base de la placa y la placa se introduce en un recipiente cerrado, el cual contiene la fase móvil, que usualmente es un solvente o mezcla de solventes. La fase móvil ascenderá por capilaridad, arrastrando los compuestos y por ende se separan. Una vez que el disolvente ha alcanzado una distancia adecuada, se retira la placa y se deja secar. Con una lámpara UV, se pueden observar los compuestos que no se ven a simple vista (Meyer, 2005).

### **2.12 Rotavapor a presión reducida**

Un evaporador rotatorio permite una destilación a presión reducida; es decir, que una solución en un matraz de fondo redondo se coloca en el baño de agua caliente y se lo hace girar, mientras el sistema es evacuado parcialmente por una bomba de vacío. La presión reducida hace que el disolvente hierva a una temperatura inferior a la normal, y al girar el matraz se incrementa la superficie del líquido y por ende la velocidad de evaporación. El vapor del disolvente se condensa cuando entra en contacto con un condensador de agua y gotea en el matraz receptor. Una vez que se elimina el disolvente, el extracto o compuesto libre de disolvente se queda en el matraz (Nichols, 2022).

### **2.13 Espectroscopía Infrarroja por transformada de Fourier (IR-TF)**

La espectroscopía infrarroja se usa para determinar distintos grupos funcionales en fases líquidas y sólidas mediante el uso de haz de radiaciones infrarrojas. Una espectroscopía infrarroja mide la absorción de la radiación IR realizada por cada enlace en la molécula, por lo que en el espectro se designa como % de transmitancia (T) vs. el número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ).

Cuando la radiación IR interactúa con el enlace covalente de los materiales que tienen un dipolo eléctrico, la molécula absorbe energía y el enlace comienza a oscilar de ida y vuelta. Dicha vibración genera un momento dipolar oscilante que provoca la absorción de radiación IR (Khan et al., 2018).

### **2.14 Resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN- $^1\text{H}$ )**

El fenómeno de la resonancia nuclear magnética (RMN) fue descubierto en 1946 por Purcell y Bloch. Esta espectroscopía se basa en la interacción de momentos magnéticos de los núcleos atómicos con un campo magnético externo. Cada núcleo magnético posee un spin nuclear, el cual es una forma de momento

angular intrínseco; este spin está asociado a un número cuántico conocido como número de spin (Lambert et al., 2019).

Los núcleos con un número par de protones y neutrones tienen un spin nuclear igual a cero, por lo que no presentan un momento magnético. En cambio, los núcleos con un número impar de protones y neutrones como  $^1\text{H}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  tienen un momento magnético y un spin nuclear de  $\frac{1}{2}$ . Cuando los núcleos se encuentran en el campo magnético estático, estos se alinean con el campo. Al aplicar un pulso de radiofrecuencia (RF) perpendicular a este campo, los núcleos absorben energía y son perturbados fuera de su alineación. La frecuencia a la que resuenan depende directamente del campo magnético aplicado, de acuerdo con la ecuación de precesión de Larmor (Vladimír Mlynárik, 2016; Lambert et al., 2019).

Los núcleos no resuenan todos a la misma frecuencia, debido al efecto de blindaje causado por los electrones, ya que generan campos magnéticos locales que disminuyen o aumentan el campo magnético efectivo en el núcleo. Como consecuencia, las frecuencias de resonancia de los núcleos varían con el entorno químico del núcleo y es, por ello que es posible diferenciar ciertos fragmentos estructurales orgánicos específicos en compuestos orgánicos (por ejemplo, metil, metileno o metino) y sus sustituyentes (por ejemplo, OH, NH<sub>2</sub>, NH, COOH, CONH). Por último, el desplazamiento químico es una medida del grado en que la frecuencia de resonancia se ve afectada por el entorno químico del núcleo. Este fenómeno es crucial para la interpretación espectroscópica en RMN, ya que proporciona información sobre la estructura química y las interacciones moleculares (Vladimír Mlynárik, 2016).

### **2.15 Cromatografía en columna (CC)**

Es una técnica que permite aislar y purificar compuestos de una mezcla. Implica el uso de varios mecanismos como cromatografía de adsorción, tamiz molecular e intercambio iónico. Consiste en una columna compuesta por un tubo de vidrio largo (5-50 mm de diámetro y 30-70 cm de longitud), un filtro de lana de vidrio (algodón) que se coloca al fondo, y una llave de paso. Se usa sílice, alúmina o celulosa como fase estacionaria, mientras que la fase móvil es un disolvente (Abubakar & Haque, 2020).

El proceso comienza añadiendo una relación de 1:20 de extracto-fase estacionaria, lo cual significa, por ejemplo, 1 g de la muestra (el extracto) y 20 g de la fase estacionaria que se deben empaquetar en la



columna. Se añade suficiente solvente y el extracto se siembra por la parte superior de la columna y se deja que la fase móvil (el solvente) lo vaya arrastrando por gravedad. Se recoge lo que va eluyendo de la columna en fracciones (Abubakar & Haque, 2020).

## **2.16 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)**

Esta técnica de cromatografía de gases implica una separación de aquellos compuestos orgánicos que son volátiles o semi-volátiles como hidrocarburos, alcoholes, o aromáticos. Al acoplarse con la espectrometría de masas, es posible obtener los espectros de masas de los componentes eluidos de la columna para compararlos con una biblioteca y así poder realizar una identificación tentativa de los constituyentes del extracto cromatografiado. Este tipo de cromatografía se encuentra limitada con analitos que son fáciles de volatilizar y que no sean termolábiles (*Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) Information | Thermo Fisher Scientific - MX, 2024*).

Lo que sucede en este proceso es que la muestra se vaporiza, de tal forma, que queda en fase gaseosa y es separada en cada uno de sus componentes usando una columna capilar cubierta con una fase estacionaria. Los compuestos son propulsados por un gas portador inerte como el helio, el hidrógeno o el nitrógeno. Cuando se separan los componentes de la mezcla, cada compuesto eluye de la columna en un momento diferente de acuerdo con su punto de ebullición, su polaridad y afinidad con la fase estacionaria. El tiempo de elución se denomina tiempo de retención del compuesto (Sparkman et al., 2011).

Una vez que los componentes salen de la columna, son ionizados y fragmentados por el espectrómetro de masas utilizando fuentes de ionización electrónica o química. Las moléculas y los fragmentos ionizados son acelerados a través del analizador de masas del instrumento, que muy a menudo es una trampa de iones o cuadrupolo. Es aquí donde se separan los iones según sus diferentes relaciones masa-carga ( $m/z$ ) (Sparkman et al., 2011).

Las áreas de pico, por su parte, son proporcionales a la cantidad del compuesto correspondiente. Cuando una muestra compleja es separada por CG-EM, producirá muchos picos diferentes en el cromatograma de gas y cada pico genera un espectro de masa único usado para la identificación tentativa (*Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) Information | Thermo Fisher Scientific - MX, 2024*).

## **2.17 Pruebas biológicas**

### **2.17.1 Método Kirby-Bauer o difusión de disco**

La determinación de la resistencia bacteriana es un proceso importante para determinar el manejo y tratamiento de pacientes infectados. El método por difusión de disco es una prueba de susceptibilidad que permite determinar la sensibilidad o resistencia de compuestos antimicrobianos ante microorganismos (Hudzicki, 2009).

El procedimiento implica colocar discos de papel filtro de 6 mm impregnados con una concentración conocida del compuesto antimicrobiano. El compuesto antimicrobiano comienza a difundirse en el agar al tiempo que el patógeno inoculado va creciendo en el medio de cultivo de Müller-Hinton. Si el compuesto antimicrobiano funciona, se observará un halo de inhibición (Li et al., 2023).

### **2.17.2 Modelos *in vivo* para toxicidad**

#### **2.17.2.1 Agentes Patógenos**

Los agentes patógenos son microorganismos que causan enfermedades en los humanos y otros organismos. Entre ellos destacan bacterias, virus, hongos, protistas, priones y parásitos. Estos patógenos se pueden esparcir por medio de tierra, agua, comida y sangre contaminada, así como también por contacto sexual y picadura de insectos. Los patógenos deben tener ciertos mecanismos para ingresar a su huésped y evadir la destrucción inmediata por parte del sistema inmunológico del huésped (Alberts et al., 2024).

La mayoría de las bacterias no son patógenas y las que lo son contienen genes de virulencia específicos que median las interacciones con el huésped, provocando respuestas particulares de las células huésped que promueven la replicación y propagación del patógeno. Los hongos patógenos, los protozoos y otros parásitos eucariotas suelen pasar por varias formas diferentes durante el curso de la infección; la capacidad de cambiar de una a otra suele ser necesaria para que los parásitos puedan sobrevivir en un huésped y causar la enfermedad (Alberts et al., 2002).

A diferencia de las bacterias y los parásitos eucariotas, los virus no tienen metabolismo propio ni capacidad intrínseca para producir las proteínas codificadas por sus genomas de ADN o ARN. Dependen exclusivamente de subvertir la maquinaria de la célula huésped para producir sus proteínas y replicar sus genomas. Los priones, los agentes infecciosos más pequeños y simples, no contienen ácido nucleico; en cambio, son proteínas raras, plegadas de manera aberrante, que catalizan el plegamiento incorrecto de proteínas en el huésped que comparten su secuencia primaria de aminoácidos (Alberts et al., 2024).

#### **2.17.2.2 Actividad letal con *Artemia spp.***

Como se ha mencionado a lo largo de la presente tesis, existe una vasta biodiversidad de compuestos bioactivos en las plantas con propiedades terapéuticas tales como actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas y antitumorales. No obstante, a pesar de los posibles beneficios, es importante conocer si existen compuestos tóxicos en estas plantas.

Por ello la evaluación de la toxicidad en los extractos es importante, para asegurar el uso seguro de estas sustancias. Existen diversos modelos que se pueden usar para las pruebas de toxicidad, como las ratas. Debido a las prácticas éticas ante el testeo de plantas, se han buscado alternativas tales como el bioensayo con *Artemia salina L.* conocidas como artemias.

El ensayo consiste en que las larvas o nauplios se exponen a la sustancia o extracto, a diferentes concentraciones por 24 horas. Este tipo de ensayo es económico, con respuesta rápida, debido a la corta vida y sensibilidad al estrés en el ambiente de las artemias. La desventaja de este tipo de experimento es que debido a que las artemias son un organismo muy simple, no comparte las mismas rutas metabólicas que las de los humanos, limitando el comportamiento toxicológico para nuestra especie (Silva & Silva, 2023). Sin embargo, se puede establecer cierta correlación con la toxicidad en humanos y también inferir los efectos adversos de ciertas sustancias si contaminan mantos acuíferos.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 3.1 Hipótesis

Dado que se han reportado otras especies del género *Urtica* con potencial terapéutico, tales como actividades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes, es posible que los extractos obtenidos de la planta *Urtica chamaedryoides* presenten actividad biológica similar, lo que sugiere una posible fuente de compuestos bioactivos.

#### 3.2 Objetivo General

Evaluar la actividad biológica de la planta *Urtica chamaedryoides* con un enfoque en sus propiedades antimicrobianas y tóxicas, así como también su contenido fitoquímico que permita conducir a la identificación de compuestos bioactivos.

#### 3.3 Objetivos Específicos

- Recolectar material vegetal de la planta *Urtica chamaedryoides*, enfocado en la hoja y flor.
- Preparar extractos de distintas polaridades a partir de la parte aérea (flor y hoja) de la planta, siguiendo una secuencia de polaridad creciente (hexano, cloroformo, y metanol).
- Realizar pruebas fitoquímicas preliminares para la detección inicial de compuestos presentes en los extractos.
- Analizar la composición química de los extractos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (IR-TF).
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico ante diferentes cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas, así como también cepas fúngicas por el método de difusión en disco.
- Separar los componentes del extracto clorofórmico por cromatografía en columna.
- Evaluar la toxicidad de cada extracto a través de un bioensayo con *Artemia spp.*

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Disolventes y reactivos

- Acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ )
- Ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )
- Ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ )
- Ácido clorhídrico concentrado ( $\text{HCl}$ )
- Ácido sulfúrico concentrado ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
- Agar Dextrosa Sabouraud
- Agar MacConkey
- Agar Müller-Hinton
- Agar Nutritivo
- Agar Sal y Manitol
- Agua Destilada
- Agua salina
- Anhídrido acético ( $\text{CH}_3\text{CO}$ )<sub>2</sub>O
- Benceno ( $\text{C}_6\text{H}_6$ )
- Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ )
- Cloroformo-D 99.8% para RMN  $\text{CDCl}_3$
- Cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2$ ).
- Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )
- Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ )
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )
- Fosfomicina (FOS)
- Hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ )
- Hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ )
- Hidróxido de potasio (KOH)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )

- Nitroprusiato de sodio en agua al 5% ( $C_5N_6OFe$ )
- Peróxido de hidrógeno al 3% ( $H_2O_2$ )
- Piridina ( $C_5H_5N$ )
- Polvo de zinc ( $Zn$ )
- Quistes de *Artemia spp.* Eclosión Azul
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Gelatina
- Reactivo de Grignard
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de Rosenthaler
- Reactivo de Wagner
- Tricloruro de antimonio ( $SbCl_3$ )
- Virutas de magnesio amalgamado ( $Mg$ )
- Sílice/sílica gel marca Sigma-Aldrich tamaño de poro 60 Å 70-230 mesh, 63-200  $\mu m$  para columna cromatográfica
- Sílica Gel Desecante

#### **4. 2 Equipos y materiales**

- Adaptador
- Agilent FTIR Cary 630
- Agitador magnético
- Anillos de soporte
- Autoclave vertical de 30 x 60cm AESA CV-300
- Balanza analítica
- Baño de agua
- Base metálica
- Cabeza de destilación de 3 bocas
- Cabina de seguridad biológica A2 de Clase II Thermo Scientific serie 1300
- Cajas Petri de 100 x15 mm
- Campana de extracción

- Clip para sujetar matraz para evaporación
- Codo de destilación
- Columna
- Condensador serpentín
- Cristalizador de vidrio capacidad 2.5 L 190 x 100
- Cristalizador de vidrio capacidad 500 mL
- Cromatoplasmas para Cromatografía de Capa Fina (TLC) Silica Gel F<sub>254</sub> de aluminio 20 x 20 cm Merck
- Desecador
- Embudo Buchner
- Embudo de cristal
- Embudo de extracción
- Espátulas
- Espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyHigh Thermo Scientific
- Espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear Bruker Ascend 400 MHz
- Evaporador rotativo, Laborota 4000 efficient Heidolph Laborota
- Gradillas para Eppendorf
- Gradillas para tubo de ensaye
- Hisopos estériles
- Incubadora ICB capacidad 45 L
- Lámpara de luz UV compacta onda corta/ larga 254/365 nm Modelo UVGL-25
- Mangueras de hule látex
- Manta calefactora
- Matraces Erlenmeyer 125 mL
- Matraces Erlenmeyer 150 mL
- Matraces Erlenmeyer 2000 mL
- Matraces Erlenmeyer 250 mL
- Matraces Erlenmeyer 6000 mL
- Matraces Erlenmeyer 4000 mL
- Matraz colector 1000

- Matraz de fondo redondo 6000 mL
- Matraz de fondo redondo 4000 mL
- Matraz Kitasato
- Matraz para evaporación 500 mL 24/40
- Mechero Bunsen
- Mechero Fischer
- Micropipetas
- Microplacas de 96 pocillos
- Papel Aluminio
- Papel Filtro
- Papel Parafilm
- Parilla de agitación y calentamiento
- Perlas de ebullición
- Pinza de tres dedos
- Pinzas para sostener matraz colector
- Pipeta graduada de 1 mL
- Pipeta graduada de 10 mL
- Pipeta graduada de 5 mL
- Pipetas graduadas
- Probetas
- Recirculador de agua FC30
- Refrigerante
- Rotavapor Buchi R-210
- Sonicador Branson CPX2800
- Termómetro
- Tubos de ensaye
- Tubos de resonancia Magnética Sigma-Aldrich Wilmad® 5 mm diámetro frecuencia límite 500 MHz
- Tubos Eppendorf
- Tubos Falcon de 15 mL



- Tubos Falcon de 25 mL
- Vasos de precipitado
- Viales de vidrio 22 mL Screw Top ámbar Sigma-Aldrich
- Viales de vidrio 22 mL Screw Top Sigma-Aldrich
- Viales de vidrio ámbar para cromatografía
- Cromatógrafo de Gases Shimadzu Nexis CG-2030 acoplado con espectrómetro de masas

### **4.3 Obtención e identificación de la planta**

Ejemplares de la especie *Urtica chamaedryoides* Pursh fueron recolectados el día 15 de junio de 2022 en Atlixco por el Dr. Cristóbal Sánchez Sánchez del Jardín Etnobotánico Francisco Peláez Roldán, ubicado en San Andrés Cholula, Puebla, México. Esta planta fue clasificada por la Dra. Mireya Burgos Hernández (número de accesión 156311) del Herbario-Hortorio CHAPA del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, México.

### **4.4 Proceso obtención de la muestra**

Se recolectaron aproximadamente 20 kilogramos de material vegetal fresco, el cual fue secado sobre papel absorbente en un lugar ventilado y a la sombra. Posteriormente, cada día se volteó la planta para evitar la formación de hongos causados por humedad. Al tercer día, se comenzó con la separación cuidadosa de tallos, hojas, y flores, debido a las propiedades urticantes de las hojas. Se agruparon las flores con las hojas, descartando los tallos. En este trabajo se estudiaron sólo las flores y hojas de esta especie que, según la bibliografía consultada sobre especies relacionadas, constituyen las partes más relevantes por sus propiedades bioactivas.

### **4.5 Maceración con disolventes orgánicos**

Se maceraron diferentes muestras de material seco, con distintos pesos de 373.4 g, 589.8 g, y 998.8 g. Cada muestra fue sumergida en 5 L de hexano, 5 L de cloroformo, 5 L de metanol. Este proceso se repitió por triplicado. El material vegetal, junto con el disolvente correspondiente, se dejó reposar por un período de 3 días. Durante este lapso, la mezcla se agitó de manera esporádica y mecánica para facilitar la extracción de los compuestos solubles. Los matraces se cubrieron con papel aluminio para evitar la evaporación de los solventes.

Al finalizar el tercer día, se filtró el macerado. La filtración se llevó a cabo usando un embudo de cristal y colocando un algodón en la parte superior de este para evitar que las flores y hojas quedaran en el extracto. Entre cada cambio de solvente orgánico, se retiró la planta del matraz y se extendió nuevamente en papel absorbente. Se colocó en la campana de extracción con el sistema encendido para secar adecuadamente la planta y evaporar cualquier solvente remanente.

#### **4.6 Evaporación a presión reducida**

Una vez finalizada la maceración, el disolvente que contenía los compuestos extraídos se transfirió a un matraz de evaporación. Este matraz se colocó en el rotavapor Büchi R-210 y también con el evaporador rotativo, Laborota 4000 efficient Heidolph, donde se ajustó la temperatura y la agitación, según el tipo de disolvente utilizado: hexano, cloroformo o metanol. Las temperaturas del baño María se establecieron de acuerdo con las propiedades específicas de cada disolvente.

Se seleccionó el nivel 3 de agitación, para evitar que se proyectara el disolvente hacia el condensador. El solvente orgánico utilizado se recuperó, mientras que, en el matraz de evaporación, quedó material vegetal cremoso semi-viscoso sólido. Para facilitar la extracción de este residuo, se añadió una pequeña cantidad del disolvente orgánico utilizado. Este método garantiza la recuperación eficiente de los solventes y la concentración adecuada del extracto obtenido.

Los extractos obtenidos se almacenaron en viales de vidrio, previamente pesados. Estos viales se sellaron con papel aluminio, realizando pequeñas perforaciones para permitir la evaporación del solvente a temperatura ambiente. En algunos casos, el solvente se evaporó rápidamente, mientras que en otros se tardó más tiempo; para estos últimos, se utilizó un desecador con gel de sílice bajo vacío para acelerar el proceso.

En algunas ocasiones, si quedaba material macerado sin evaporar, este se conservó en refrigeración hasta su uso posterior. Antes de su reutilización, se retiró del refrigerador y se dejó reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 min. Después, se colocó en el rotavapor Buchi R-210, y se obtuvo el extracto.

#### **4.7 Pruebas Fitoquímicas**

En esta sección, se describen las pruebas realizadas de manera cualitativa para la identificación de metabolitos secundarios del extracto clorofórmico correspondiente a la planta *Urtica Chamaedryoides*.

#### **4. 7. 1 Alcaloides**

En un tubo de ensayo, se adicionaron 0.01 g de extracto clorofórmico y se disolvieron en HCl al 5%. Se agitó y se filtró hasta que se volvió completamente transparente. El filtrado se ensayó con los reactivos Mayer, Dragendorff y Wagner. Las pruebas se consideraron positivas, si aparecía un precipitado.

#### **4. 7. 2 Saponinas**

##### a) Agua Caliente

En un tubo de ensayo, se colocaron 0.01 g de extracto clorofórmico con 1 mL agua caliente y se agitó vigorosamente por ~3 min. La prueba se consideró positiva, si se formaba por unos minutos una espuma estable con apariencia de panal.

##### b) Rosenthaler

Otra porción de extracto clorofórmico de 0.01 g, se agregó en un tubo de ensayo. Posteriormente, se añadieron unas 2 gotas del reactivo Rosenthaler y una gota de ácido sulfúrico concentrado. La coloración violeta indicó la presencia de saponinas de triterpenos pentacíclicos.

#### **4. 7. 3 Triterpenos**

En un tubo de ensayo se agregaron 0.01 g de extracto clorofórmico y se disolvió en 1 mL de cloroformo. Se agregó 1 mL de anhídrido acético resbalando por las paredes del tubo. Se dejó reposar en frío. Si ocurría la aparición de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase, al añadir ácido sulfúrico concentrado, se consideró positiva la prueba.

#### **4. 7. 4 Taninos**

Se disolvieron 0.01 g de extracto clorofórmico en 1 mL de cloroformo. Se filtró y se tomaron alícuotas de 1 mL para las pruebas con cloruro férrico y con reactivo de gelatina. Si aparecía un precipitado azul-negruzco, la prueba indicaba la presencia de taninos hidrolizables; en cambio, si el precipitado era de color pardo-verdoso se mostraba la presencia de taninos condensados. En ambos casos, se consideró positiva la prueba.

#### **4. 7. 5 Flavonoides**

##### a) Reacción con vapores de amoníaco

En un tubo de ensayo se agregó una porción de ~0.01 g de extracto clorofórmico y se disolvió en 1 mL de cloroformo. Se impregnó el extracto en una tira de papel filtro y se dejó secar a temperatura ambiente. En

una campana de extracción, se introdujo una parrilla a calentamiento, y en un vaso de precipitado de 10 mL, se colocaron 3 mL de amoníaco. Se calentó, y una vez que comenzó a evaporarse, se expuso la tira de papel filtro a los vapores. La aparición de una coloración amarilla ocre indicó una prueba positiva.

b) Shinoda

En un tubo de ensaye se adicionaron 0.01 g de extracto clorofórmico y 1 mL de cloroformo. Se agregaron unos dos trocitos de viruta de magnesio amalgamado y unas 5 gotas de HCl concentrado. La aparición de colores del rojo profundo al magenta indicó la presencia de una flavonona o dihidroflavonol, mientras que las dihidrochalconas y otros flavonoides no reaccionaron.

c) Pew's

En un tubo de ensaye, se adicionaron 0.01 g de extracto clorofórmico y 1 mL de cloroformo. Luego, se le agrega 5 mg de polvo de zinc y unas 5 gotas de HCl 5N. Si al realizar esta prueba aparecen colores rojizos, esto indica la presencia de dihidroflavonoides, y si se produce una coloración rosa o café se indica la presencia de flavononas, dihidrochalconas y otros flavonoides. En ambos casos, se considera positiva la prueba.

d) Hidróxido de sodio

En otro tubo de ensaye, se adicionaron 0.01 g de extracto clorofórmico y 1 mL de cloroformo. Seguidamente, se agregaron 5 gotas de NaOH al 5%. La aparición de colores amarillo o naranja se considera indicativa de la presencia de flavonoides.

#### **4. 7. 6 Glucósidos cianogénicos**

Se colocó una tira de papel impregnado con reactivo de Grignard en la boca de un tubo de ensaye que contenía 0.01 g de extracto clorofórmico disueltos en 1 mL de cloroformo. Se calentó entre 30 y 35°C. La aparición de color rojo o rosa se consideró positivo.

#### **4. 7. 7 Glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas**

a) Baljet

Se añadieron 0.01 g de extracto clorofórmico y 1 mL de cloroformo a un tubo de ensaye. Después, se agregaron 2 o 3 gotas del reactivo Baljet. La prueba es positiva cuando una coloración anaranjada o roja oscura aparece.

b) Legal

Se agregaron 0.01 g de extracto clorofórmico y se disolvieron en 1 mL de cloroformo, luego se añadieron 2 o 3 gotas de piridina. Se adicionó una gota de solución nitroprusiato de sodio en agua al 5%, la cual se debe preparar recientemente y de una a tres gotas de NaOH 2N. Si ocurre una coloración roja intensa, entonces es la prueba es positiva.

c) Cloruro de antimonio

Se disolvieron 4 gotas de cloruro de antimonio en 0.01 g de extracto clorofórmico disueltos en 1 mL de cloroformo. La aparición de un color violeta azulado se considera como prueba positiva.

#### **4. 7. 8 Determinación de cumarinas con extracto acuoso**

##### **4. 7. 8. 1 Extracto Acuoso**

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 5 g de la parte aérea seca de la planta (hojas y flor) con suficiente cantidad de agua para cubrirlas (aproximadamente 100 mL). Se dejaron reposar las mezclas durante dos días, en un refrigerador, pues se corría el riesgo de formación de bacterias y hongos. Después, se filtraron las mezclas a través papel filtro y los filtrados de cada planta constituyeron sus extractos acuosos.

##### **4. 7. 8. 2 Determinación de cumarinas**

Para la detección de las cumarinas sublímales, se calentó el extracto acuoso en un tubo de ensaye tapado con papel filtro impregnado con 2000  $\mu$ L de KOH 5M. Si el papel exhibe puntos fluorescentes bajo luz U. V., la prueba es positiva.

#### **4. 7. 9 Determinación de antraquinonas: reacción de Borntrager**

Se hirvieron 7.5 mg de planta pulverizada durante ~5 min con 2.5 mL de KOH 0.5 N y 0.25 mL de peróxido de hidrógeno al 3 %. Se enfrió la suspensión y se filtró. El filtrado se aciduló con 2.5 gotas de ácido acético y después se extrajo con 2.5 mL de benceno. Se separó la capa bencénica amarilla y con 1.25 mL de solución bencénica se disolvieron 0.625 mL de hidróxido de amonio. La prueba indica la presencia de antraquinonas si se colorea de rojo la capa alcalina.

#### **4. 7. 10 Determinación de esteroides**

Se colocaron hojas de la planta seca pulverizada en una placa Petri de vidrio y se añadieron 0.5 mL de anhídrido acético y luego 2 gotas de ácido sulfúrico. En casos positivos se observan coloraciones cambiantes, verdes, azules, rosas o púrpura.

#### **4. 7. 11 Método rápido de Webb para alcaloides**

Se mezclaron 5 g de planta seca pulverizada con suficiente HCl al 1 % de manera que cubriera la planta para formar una suspensión y obtener después 2 mL de filtrado. La suspensión se vertió en un matraz Erlenmeyer y se colocó en baño María a 80°C. La mezcla se calentó por 4 h y se agitó periódicamente. Se retiró la suspensión, se dejó enfriar y se filtró. Como el filtrado fue menor de 2 mL se añadió al residuo suficiente HCl al 1 % hasta ajustarlo a 2 mL. Por separado se ensayaron alícuotas de 0.2 mL del filtrado con volúmenes de 0.1 mL con los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff.

### **4.8 Preparación de medios de cultivo**

La preparación de los medios de cultivo implicó la elaboración de medios de crecimiento con agar para sembrar las bacterias iniciales que se estudiarán mediante los antibiogramas. Así como también, el medio de cultivo Müller-Hinton que se preparó para los antibiogramas. Por otro lado, los medios de cultivo que se prepararon para sembrar las cepas iniciales fueron los agares Sal Manitol, Dextrosa Sabouraud, y MacConkey.

El agar MacConkey se empleó para el crecimiento de cepas bacterianas Gram negativas tales como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica serovar Typhi*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae*. El agar Sal Manitol se empleó para la cepa bacteriana Gram positiva *Staphylococcus aureus*. Por último, el agar Dextrosa Sabouraud se empleó para la levadura *Candida albicans* y el agar Nutritivo se utilizó para la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis*.

#### **4. 8. 1 Preparación de Agar Müller-Hinton**

Se prepararon un total de 36 placas Petri del Agar Müller Hinton, con un volumen aproximado de 20 mL. Es por ello que, se adicionan 38 g de Agar Müller Hinton en 1 L de agua destilada. Debido a que se manejan extractos de solventes polares y no polares, se añade alrededor de un 1% de Tween 80. En este caso, se adicionaron 7.2 mL de Tween 80, evitando la formación de burbujas. El medio de cultivo se tapa con un algodón envuelto con una gasa estéril. La mezcla se calentó agitando frecuentemente y se hirvió

por 1-2 minutos hasta su disolución total. Finalmente, la disolución se colocó en recipientes apropiados, etiquetados con cinta testigo y se esterilizaron en autoclave a 121°C, 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

#### **4. 8. 2 Preparación de Agar MacConkey**

Se pesaron 8.0557 g de agar MacConkey para preparar 160 mL de medio, y un total de 8 placas Petri, pues las cepas bacterianas crecen en este medio. El medio de cultivo se tapa con un algodón envuelto con una gasa estéril. Se calentó agitando frecuentemente e hirvió por 1-2 min hasta su disolución total. La disolución se pasó a recipientes apropiados, etiquetados con cinta testigo, y se esterilizaron en autoclave a 121°C, 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

##### **4. 8. 2. 1 Preparación de Agar Dextrosa-Sabouraud**

Se pesaron 2.6013 g de agar de Dextrosa-Sabouraud para preparar dos placas Petri con un volumen de 20 mL cada una. El medio de cultivo se tapó con algodón envuelto con una gasa estéril. Se calentó agitando frecuentemente e hirvió por 1-2 minutos hasta su disolución total. Finalmente, la disolución se vació en recipientes apropiados, etiquetados con cinta testigo, y se esterilizaron en autoclave a 121°C, 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

##### **4. 8. 2. 2 Preparación de Agar Sal Manitol**

Se pesaron 4.4087 g de agar manitol salado para preparar dos placas Petri con un volumen de 20 mL cada una. El medio de cultivo se tapó con un algodón envuelto con una gasa estéril. Se calentó agitando frecuentemente e hirvió por 1-2 minutos hasta su disolución total. Finalmente, la disolución se vació en recipientes apropiados, etiquetados con cinta testigo, y se esterilizaron en autoclave a 121°C, 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

##### **4. 8. 2. 3 Preparación de Agar Nutritivo**

Se pesaron 1.24 g de agar Nutritivo para preparar dos placas Petri con un volumen de 20 mL cada una. El medio de cultivo se tapó con un algodón envuelto con una gasa estéril. Se calentó agitando frecuentemente e hirvió por 1-2 min hasta su disolución total. Finalmente, la disolución se vació en recipientes apropiados, etiquetados con cinta testigo, y se esterilizaron en autoclave a 121°C, 1 kg/cm<sup>2</sup> durante 15 minutos.

#### **4. 9 Consideraciones para el manejo y esterilización de medios de cultivo y materiales de laboratorio**

Antes y después de la esterilización de los medios de cultivo y materiales de laboratorio, es necesario tener en cuenta ciertos aspectos importantes. Todos los contenedores, que contienen materiales de laboratorio o medios de cultivos, deben estar etiquetados con una cinta testigo, para garantizar una esterilización adecuada.

En el caso de los medios de cultivo, se colocó en la boquilla del matraz Erlenmeyer, un tapón de algodón envuelto en 1 o 2 gasas estériles. Otro tipo de material de laboratorio, como las puntas de micropipeta, se colocaron en un vaso de precipitados y se cubrieron con una lámina de papel aluminio. Los discos de papel filtro, que se utilizaron para la prueba Kirby-Bauer, se almacenaron en tubos Eppendorf y, sólo en este caso, son los únicos recipientes que se cerraron herméticamente.

En casos, donde se esterilizó algún reactivo, como el agua isotónica u otro tipo de material almacenado en recipientes de vidrio con tapa, estos no se cerraron por completo, sino que se dejaron ligeramente ajustados para evitar presión interna excesiva durante el proceso de esterilización. Los medios de cultivo y materiales esterilizados se colocaron en un área estéril de trabajo.

##### **4. 9. 1 Esterilización de medios de cultivo y materiales de laboratorio con autoclave**

Los medios de cultivo se esterilizaron en una autoclave vertical modelo Enrey EV-24. Previo a la esterilización de los cultivos, a los contenedores de vidrio se les colocó una cinta adhesiva indicadora de esterilización, conocida como cinta testigo. La cinta testigo indicará un cambio de color verde a un color negro a través de las rayas impresas.

Es por ello que, para su manejo se verificó que el nivel de agua de la autoclave cubrirá la resistencia metálica. Una vez verificado lo anterior, se conectó la autoclave y se encendió el interruptor a un nivel medio. Se esperó por algunos minutos hasta que comenzó a salir un ligero vapor. Se apagó el interruptor, y en la canastilla, se colocó el material a esterilizar.

Se tapó la autoclave, de manera que las llaves se cerraran de manera opuesta y en parejas. Se dejó abierta la válvula de escape. Se encendió nuevamente la autoclave, y se movió el interruptor al nivel más alto. Aproximadamente, de 5 o 10 minutos, comenzaron a salir vapores, lo que indica que la válvula debía cerrarse.

Una vez cerrada, la presión subió, hasta que llegará a 15 psi o 1 kg/cm<sup>2</sup>. Asimismo, se verificó que la temperatura estuviera a 121°C. Se debía mantener constante, pero si seguía aumentando la presión, se



debía ajustar el interruptor a un nivel medio. Una vez que la presión y la temperatura estuvieran estables, se dejó la autoclave por unos 15 minutos.

Una vez que finalizó el tiempo estipulado de 15 minutos, se apagó y desconectó la autoclave. Se abrió la válvula lentamente para liberar la presión. Cuando la presión llegó a 0, se abrió la tapa, evitando que los vapores estuvieran en contacto con la cara.

#### **4.9.2 Vertido de medio de cultivo bajo condiciones asépticas**

Se desinfectó la cabina de seguridad biológica A2 de Clase II Thermo Scientific serie 1300 con alcohol al 70% y luz UV por 30 minutos. Dentro de la campana se vaciaron en placas Petri los medios correspondientes. Para prevenir contaminación, se evitó el contacto de la boquilla del matraz o contenedor de vidrio con las cajas Petri. Una vez distribuido el medio de cultivo en las cajas Petri, se dejó gelificar por 15 min.

#### **4.10 Evaluación de esterilidad en medios de cultivo microbiológicos**

Los medios de cultivo gelificados se voltearon para evitar la condensación de agua y se colocaron en una estufa de incubación modelo ICB 45 L. Las placas se incubaron por 24 horas a una temperatura entre 35°C a 37° C. Si no se presentaba alguna evidencia representativa de crecimiento microbiano, estos cultivos fueron viables para el sembrado de microorganismos.

#### **4.11 Siembra de bacterias en Cultivos Microbiológicos**

Para la siembra de microorganismos, se desinfectó la zona de trabajo con alcohol al 70%. Se prendió un mechero Fisher, y se manipularon las placas en un radio menor a 20 cm. Se calentó al rojo vivo un asa bacteriológica en la flama del mechero Fischer. Se tomaron las bacterias previamente descongeladas y se realizó un estriado sobre cuadrantes radiales.

#### **4.12 Preparación de la escala de McFarland**

Un estándar de McFarland es una solución química de cloruro de bario ( $BaCl_2$ ) en ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) que produce un precipitado fino de sulfato de bario. Este estándar es comparable con una suspensión bacteriana de concentración conocida. Al ajustar los volúmenes de ambos reactivos, se pueden preparar diferentes estándares de McFarland con distintos grados de turbidez (Leber, 2016).

Se prepararon estándares de turbidez 0.5-2, de acuerdo con la Tabla 5.

**Tabla 5.** Preparación de estándares de McFarland (Leber, 2016).

<b>Estándar McFarland</b>	<b>1 % de BaCl<sub>2</sub> (mL)</b>	<b>1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (mL)</b>	<b>Densidad aproximada de recuento celular (x10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias UFC/mL).</b>
0.5	0.05	9.95	1.5 x 10 <sup>8</sup>
1.0	0.1	9.9	3.0 x 10 <sup>8</sup>
2.0	0.2	9.8	6.0 x 10 <sup>8</sup>

La mezcla resultante se colocó en un tubo con tapa de rosca. La solución de densidad del estándar de McFarland precipitará y formará grumos con el tiempo, por lo que es necesario agitarla antes de cada uso.

#### **4.13 Siembra bacteriana en agua isotónica**

Al tener los estándares de McFarland, se permite estandarizar un número aproximado de bacterias en una suspensión líquida al comparar visualmente la turbidez del estándar de McFarland. Por lo que, en una zona estéril, con un mechero Fischer, se calentó el asa bacteriológica al rojo vivo intenso. Después, se colocó el asa en una zona del medio de cultivo donde no haya crecido nada. Posteriormente, se tomó una cantidad considerable del microorganismo y se mezcló en la solución isotónica al 85%. Se revolvió y se comparó con el estándar de McFarland. Si aún la solución no llegaba a la turbidez deseada, se agrega una mayor cantidad de microorganismo.

En el presente trabajo, se utilizó la Turbidez 1 para preparar soluciones con microorganismos *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Bacillus subtilis* y *Enterobacter cloacae*. El estándar de turbidez 2 se empleó para aquellas suspensiones con *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

#### **4.14 Evaluación de la actividad antimicrobiana por el Método Kirby-Bauer**

Como se ha mencionado en los procedimientos anteriores, el lugar debe ser estéril. Se realizó el procedimiento tal y como es indicado en la sección titulada “vertido de medio de cultivo bajo condiciones asépticas”. En el presente trabajo de tesis, se evaluaron los microorganismos *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Cada uno de ellos, fue inoculado con un hisopo estéril en una placa Petri estéril con agar Müller-Hinton. Después, se colocaron un total de 5 discos; 4 discos con 30  $\mu\text{L}$  de cada una de las concentraciones de extracto y el quinto disco con 30  $\mu\text{L}$  de fosfomicina de una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  como control positivo. Cada una de las placas fue destinada a una bacteria y un extracto. El proceso se realiza por triplicado, teniendo un total de 15 placas Petri de 100 x 15 mm para los antibiogramas por el Método Kirby-Bauer. Los extractos evaluados para cada microorganismo fueron hexánico, clorofórmico, y metanólico. Las concentraciones empleadas fueron 50, 100, 150 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Adicionalmente, se llevó a cabo un experimento usando concentraciones mucho mayores, de 100 mg/mL y 500 mg/mL para verificar si había algún tipo de actividad. La metodología se modificó ligeramente, en su lugar se colocaron 7 discos en total; 6 discos con 30  $\mu\text{L}$  de ambas concentraciones (3 de cada concentración, respectivamente) de extracto y el séptimo disco con 30  $\mu\text{L}$  de fosfomicina de una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se añadieron dos cepas extras de microorganismos a analizar; *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus subtilis*.

#### **4.15 Bioensayo de actividad biológica con nauplios de *Artemia* spp.**

Se preparó una solución de agua salina con una concentración de 30 g/L. Posteriormente, para obtener los nauplios de *Artemia* spp., se añadieron 100 mg de quistes en un cristizador de vidrio de 190 x 100 mm con capacidad para 2.5 L. Los quistes se dejaron eclosionar por 48 horas. Durante este periodo de tiempo se prepararon las soluciones stock con concentración de 10,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  disueltos en agua destilada de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico. Seguidamente, se prepararon concentraciones de 2000, 1000, 500, 100, 50 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

De igual forma, se prepararon tubos de ensaye, donde se les añadió 1 mL de agua salina. Una vez eclosionadas las artemias, se adicionaron grupos de ~10-15 nauplios en cada tubo y se llevó hasta casi su volumen máximo para agregar al final el extracto de cada concentración. En cada tubo se añadió, el extracto hasta llegar a un volumen total de 5 mL. Se mezcló completamente y el proceso se realizó por triplicado. El tiempo de exposición de estos nauplios fue de 20 horas. Una vez culminado el tiempo de exposición, se realizó el conteo de artemias muertas y sobrevivientes. Se estimaron los valores de  $\text{CL}_{50}$  usando el método de análisis Probit.

#### **4.16 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear (RMN-<sup>1</sup>H)**

Se preparó la muestra disolviendo el compuesto en disolvente deuterado, para este caso CDCl<sub>3</sub> y CD<sub>3</sub>OD. Se colocó la muestra en un tubo de resonancia magnética nuclear y se verificó el nivel de muestra apto para RMN. Se ajustaron las condiciones, a una frecuencia de 400 MHz.

#### **4.17 Análisis IR-TF**

Se realizaron lecturas de infrarrojo con el equipo Agilent FTIR Cary 630 con las muestras de los extractos disueltas en su respectivo solvente. Se utilizaron los solventes orgánicos correspondientes a cada uno de los extractos para la información de ruido y eliminación de fondo. El análisis se realizó en un rango de 3800–600 cm<sup>-1</sup>.

#### **4.18 Cromatografía**

##### **4.18.1 Cromatografía en capa fina**

Como fase estacionaria, se utilizó una placa delgada de aluminio recubierta con gel de sílice de un grosor aproximado de 0.1 mm. Una pequeña cantidad del extracto se aplicó cerca del extremo inferior de la placa utilizando un tubo capilar. Se dejó secar para formar una mancha concentrada. La placa se colocó en un recipiente cerrado que contenía eluyente o fase móvil; un solvente o mezcla de solventes con diferentes polaridades. Se retiró la placa y se dejó secar. Los compuestos se visualizaron bajo luz UV.

##### **4.18.2 Cromatografía en sílica gel**

Se seleccionó una columna cromatográfica adecuada y se midió la altura para mantener la relación 1:20, muestra: sílica gel. Se colocó un algodón al fondo y se llenó con sílica gel. La sílica se humedeció con un eluyente orgánico. En este caso, se usó cloroformo. Una vez humedecida la fase estacionaria, se añadió el analito disuelto en un solvente compatible. Se dejó fluir el eluyente, permitiendo la separación de compuestos con base en su afinidad. Los compuestos afines a la sílica se moverán lento, y los que no, avanzarán rápido.

##### **4.18.3 Cromatografía de gases acoplada a masas (CG-EM)**

El análisis de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) se llevó a cabo en un cromatógrafo de Gases Shimadzu Nexis CG-2030 acoplado con espectrómetro de masas CGEM-QP2020 NX. Los extractos se prepararon en una concentración de 10 mg/mL. La muestra se disolvió en un solvente

adecuado, y se colocó dentro de un vial ámbar para cromatografía de gases, evitando cualquier fotodegradación.

Se utilizó una inyección en modo split con una relación de división de 5:1. La temperatura de inyección se estableció en 250 °C, el flujo total en 9.0 mL/min, la presión en 57.4 kPa y el flujo de la columna en 1.0 mL/min. El gas portador que se ocupó fue helio, con una velocidad lineal de 36.5 cm/s.

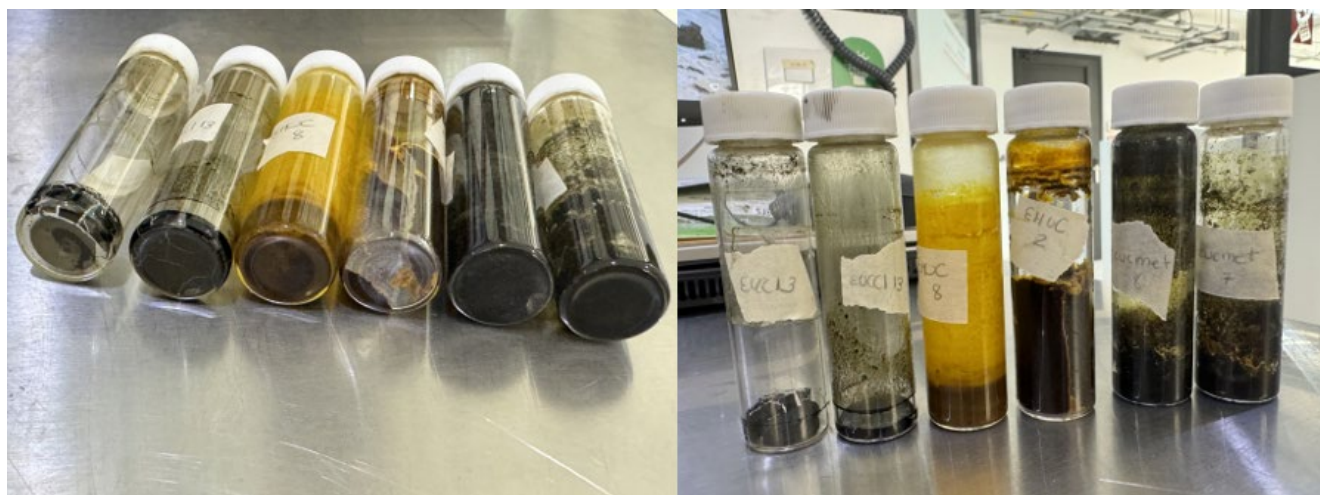
La temperatura inicial del horno se estableció en 60 °C, durante 2 minutos. Posteriormente, se incrementó a una tasa de 30 °C/min hasta alcanzar los 200 °C, durante 5 minutos. Finalmente, la temperatura se incrementó de nuevo a una tasa de 20 °C/min hasta llegar a 325 °C, la cual se mantuvo por 10 minutos.

Se ajustó la temperatura de la fuente de iones a 200 °C, mientras que la temperatura de la interfaz se estableció en 250 °C. El tiempo de corte del solvente es de 2 minutos. Las adquisiciones se realizaron en modo de escaneo, con un rango de masas de 40 a 700 m/z y un tiempo de adquisición de 24.9 minutos (de 3.00 a 27.90 minutos).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Extracción

Cada uno de los extractos obtenidos mostró colores particulares, pero presentaron el mismo tipo de textura. El extracto hexánico, se caracterizó por tener una tonalidad de color amarillo ocre. El clorofórmico y metanólico, por su parte, poseían ambos un color verde, siendo el extracto clorofórmico ligeramente más claro (Figura 1).



**Figura 1.** a) Extractos clorofórmico EUCCI, hexánico EHUC y metanólico EUCMET.

Los extractos mostraban una consistencia cremosa sólida, se conservaron en viales de vidrio, se rotularon y se almacenaron para futuros experimentos y análisis espectroscópicos tales como RMN de  $^1\text{H}$  e IR-TF. En la Tabla 6, se muestran los pesos obtenidos de cada uno de ellos, así como su respectivo rendimiento. Se partió de 1962 g de material vegetal seco.

En comparación con los extractos hexánico y clorofórmico, se obtuvo una mayor cantidad del extracto metanólico, esto indica que esta especie produce más compuestos polares que no polares o de polaridad media.

**Tabla 6.** Peso en gramos de los extractos obtenidos de la planta *Urtica chamaedryoides* (elaboración propia).

Extracto	Coloración	Peso en gramos (g)	Rendimiento
Hexánico	Amarillo ocre	19.7283	1.00%
Clorofórmico	Verde oscuro	16.2763	0.83%
Metanólico	Verde oscuro	70.8933	3.61 %

## 5.2 Pruebas fitoquímicas preliminares

Las pruebas fitoquímicas preliminares descritas en la sección de la metodología, arrojaron los siguientes resultados los cuales se muestran en la Tabla 7, donde los resultados positivos de diversas pruebas fitoquímicas se representan con el símbolo (+) y los negativos con el símbolo (-) a los que se evaluó el extracto clorofórmico.

**Tabla 7.** Resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares para el extracto clorofórmico *Urtica chamaedryoides* en donde (+) indica que el resultado es positivo y (-) es el resultado negativo (elaboración propia).

Prueba fitoquímica	Tipo de Prueba	Resultado
Alcaloides	Mayer	-
	Dragendorff	-
	Wagner	-
Saponinas	Agua Caliente	-
	Rosenthaler	-

Triterpenos	Anhídrido acético	+
Taninos	Cloruro férrico	+
	Reactivo de gelatina	+
Flavonoides	Vapores de amoníaco	-
	Shinoda	-
	Pew's	-
	Hidróxido de sodio	-
Glucósidos cianogénicos	Grignard	-
Glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas	Baljet	-
	Legal	-
	Cloruro de antimonio	-
Determinación de cumarinas con extracto acuoso	Luz UV	-
Determinación de antraquinonas	Reacción de Borntrager	-
Método rápido de Webb para alcaloides	Mayer	-
	Dragendorff	-
	Wagner	-
Determinación de esteroides	Anhídrido acético & Ácido sulfúrico	-

### 5.3 Cromatografía en columna de sílica gel

Se decidió analizar el extracto clorofórmico, debido a la técnica cromatografía en capa fina (CCF), determinó que este extracto mostraba una mayor separación de los compuestos, en comparación con los extractos hexánico y metanólico. La cromatografía por plaqueo o capa fina, determina qué solventes o mezcla de solventes brinda la mejor separación entre los compuestos; en este caso, el mejor solvente fue el cloroformo, y también la combinación de solventes de cloroformo y metanol 50:50.

Se montó una columna de cristal con 100.0262 g de sílica gel, y se sembraron 4.0671 g del extracto clorofórmico. Se recolectaron un total de 64 fracciones, en donde 23 fracciones correspondieron una polaridad del 100% clorofórmica, 3 fracciones clorofórmicas combinada con 0.1% de metanol, 33 fracciones con cambio de polaridad 50:50 cloroformo: metanol y 5 fracciones con polaridad 100% metanólica. El volumen recolectado por fracción fue de ~75 mL.

Las fracciones obtenidas fueron evaporadas en el rotavapor. Nuevamente, por medio de un plaqueo de cromatografía en capa fina, se realizaron siembras de las fracciones con un capilar. Este método permitió

diferenciar los compuestos, así como juntar aquellos que eran iguales en un solo vial. Por lo tanto, se redujeron las fracciones en 32 frascos de 22 mL con un volumen  $\leq 1$  mL. En la Tabla 8, se muestra el peso en gramos de las fracciones obtenidas a partir del extracto, como su polaridad.

**Tabla 8.** Fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna del extracto clorofórmico (elaboración propia).

<b>Polaridad</b>	<b>Fracciones</b>	<b>Peso (g)</b>
100 Cloroformo	1-2	0.0368
100 Cloroformo	3-4	0.0188
100 Cloroformo	5-7	0.0049
100 Cloroformo	8	0.0262
100 Cloroformo	9-10	0.03
100 Cloroformo	11	0.0266
100 Cloroformo	12, 13	0.033
100 Cloroformo	14	0.0216
100 Cloroformo	15-18	0.0453
100 Cloroformo	19	0.0152
100 Cloroformo	20	0.0928
100 Cloroformo	21	0.0006
100 Cloroformo	22	0.0014
100 Cloroformo	23	0.0004
Cl-0.1% metanol	24-26	0.0097
50:50 Cloroformo:metanol	27-32	0.0109
50:50 Cloroformo:metanol	33	0.001
50:50 Cloroformo:metanol	34-36	0.0004
50:50 Cloroformo:metanol	37-39	0.0103
50:50 Cloroformo:metanol	40-44	0.2936
50:50 Cloroformo:metanol	45	0.4013
50:50 Cloroformo:metanol	46,47	0.1668
50:50 Cloroformo:metanol	48	0.7942
50:50 Cloroformo:metanol	49	0.2766
50:50 Cloroformo:metanol	50-52	0.2738
50:50 Cloroformo:metanol	53	0.1268
50:50 Cloroformo:metanol	54-57	0.3416
50:50 Cloroformo:metanol	58	0.1116

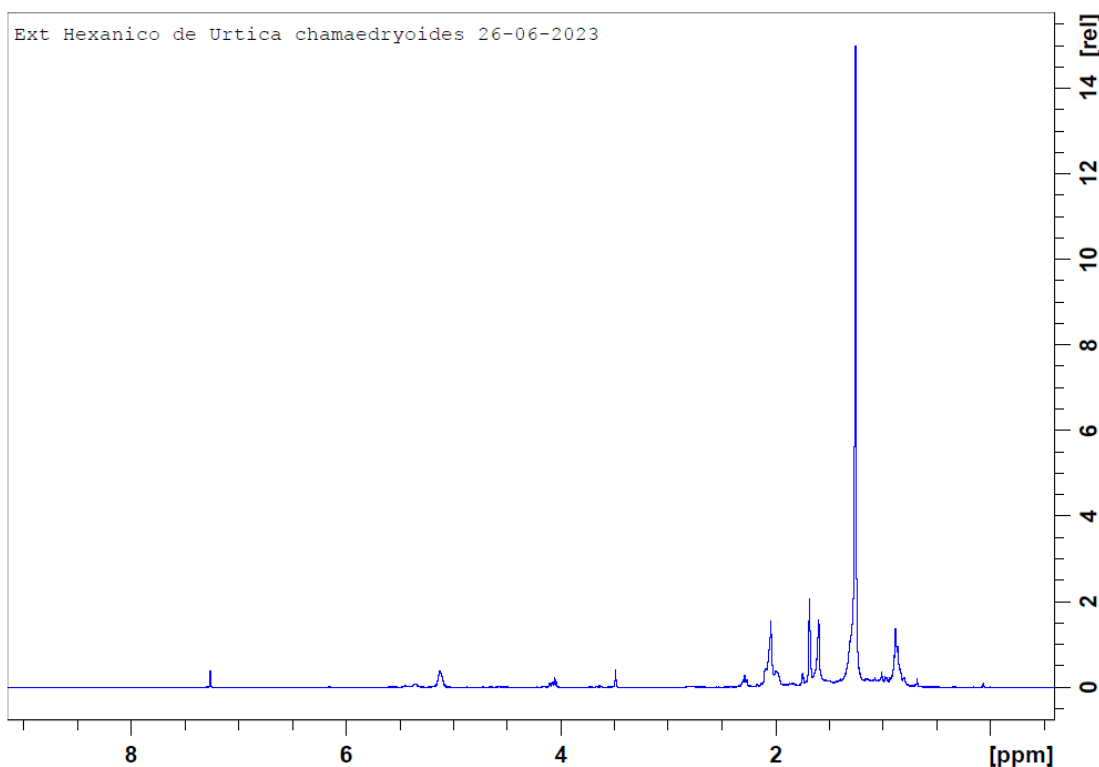


50:50 Cloroformo:metanol	59	0.0794
100 Metanol	60, 61	0.0889
100 Metanol	62, 63	0.0575
100 Metanol	64	0.0851

El peso recolectado total que corresponde a la sumatoria de todas las fracciones es de 3.4831 gramos. Por lo que, se perdió un total de 0.584 g, correspondiente al remanente en la columna. De acuerdo con lo obtenido en la cromatografía de capa fina, se requería un aumento de polaridad; esto se determinó a través de que las placas que se revelaron con ácido sulfúrico. Con base en los gramos obtenidos por la sumatoria de las fracciones, y la cantidad de siembra inicial del extracto, se obtuvo un rendimiento de 85.64%.

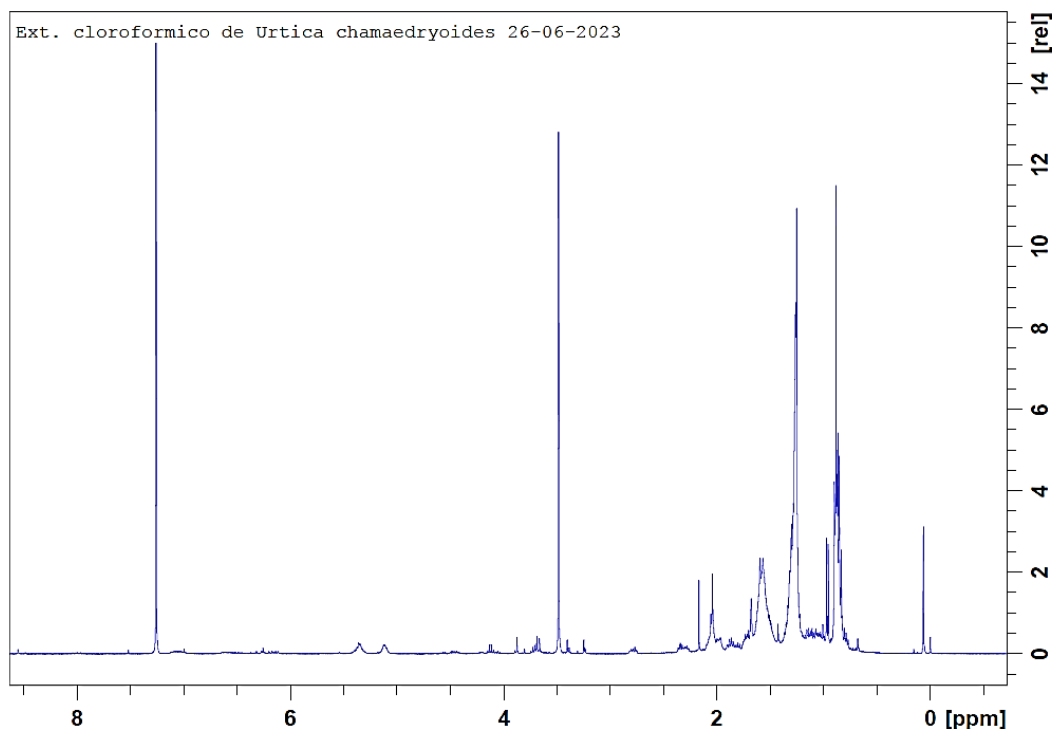
#### 5.4 Desplazamientos químicos de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico por resonancia magnética nuclear de ( $^1\text{H}$ )

Los extractos obtenidos fueron analizados por medio de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$ ; una técnica cuya importancia recae en la en la capacidad de proporcionar información detallada sobre la estructura molecular y el entorno químico de los protones, permitiendo así la identificación de compuestos y el estudio de interacciones moleculares en diversas muestras.



**Figura 2.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de 400 MHz del extracto hexánico.

La Figura 2 muestra, el espectro RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz del extracto hexánico obtenido a partir de la flor y hojas de la planta *Urtica chamaedryoides*. La región destacable de este espectro es la región comprendida del desplazamiento químico ( $\delta$ ) de 0.6 ppm hasta 2 ppm, indicando que este extracto está constituido, principalmente, por compuestos alquílicos de cadena larga. Las señales en 4 y 5 ppm, sugieren la presencia de ésteres grasos.

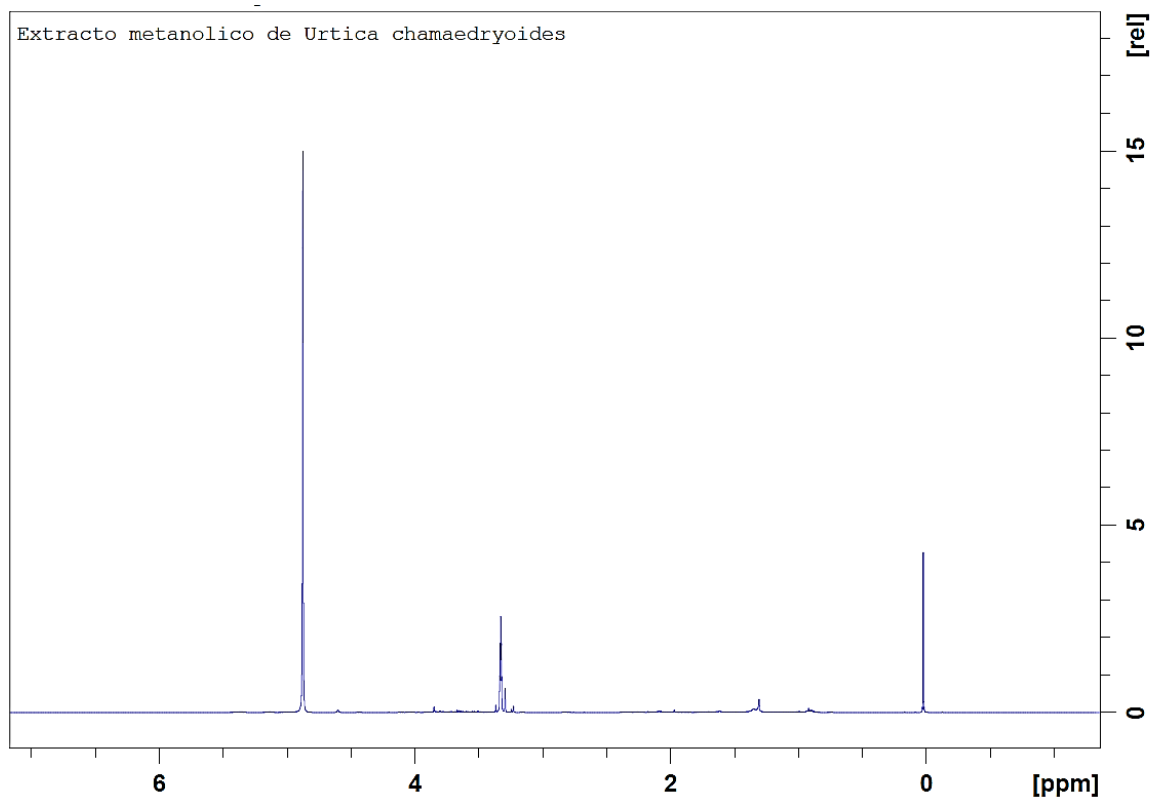


**Figura 3.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  de 400 MHz del extracto cloroformico.

Para el caso del espectro de RMN- $^1\text{H}$  del extracto cloroformico se observa, como era de esperarse, la presencia de compuestos más polares que los presentes en el extracto hexánico. Se sigue observando compuestos alquílicos de cadena larga, como grasas, debido a la señal intensa en 1 ppm. Sin embargo, se observan más señales en la región de 3 a 5 ppm, indicando la presencia de alcoholes y ésteres, probablemente con insaturaciones.

A continuación, se muestra el último espectro de los extractos, perteneciente al extracto metanólico. Se observa que disminuyó la cantidad de compuestos no polares para aumentar las señales que indican la

presencia de compuestos más polares, en la región de 2 a 5 ppm. En la región del desplazamiento químico de 3 ppm, indica la presencia de agua y alrededor de 5 ppm indica la presencia de solvente de metanol.



**Figura 4.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 400 MHz del extracto metanólico.

## 5.5 Pruebas de actividad biológica

### 5.5.1 Método Kirby-Bauer o difusión de disco

En la siguiente Tabla 9, se pueden apreciar los resultados obtenidos de las pruebas antimicrobianas de 6 cepas de bacterianas y 1 cepa fúngica. En este ensayo, se analizaron bacterias Gram-positivas, como *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, y Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella thiphy* y *Klebsiella pneumoniae*.

A continuación, se presenta la actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos, hexánico, clorofórmico, y metanólico. De acuerdo con las concentraciones analizadas, se encontró que existe una ligera actividad antimicrobiana. El extracto hexánico a una concentración de 200 µg/mL presentó actividad contra la cepa fúngica *Candida albicans* y con la cepa bacteriana *Salmonella typhi*.

En estas pruebas, el control positivo fue la fosfomicina a 2 00 µg/mL, el cuál es un antibiótico bactericida que se emplea para tratar enfermedades del tracto urinario. Este antibiótico es activo *in vitro* ante numerosas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Pediamécum, 2015). Las bacterias que mostraron resistencia a la fosfomicina fueron *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis* y *Klebsiella pneumoniae*. El control negativo fue el DMSO en el caso único de la cepa fúngica.

La siguiente tabla muestra los diámetros de los halos de inhibición obtenidos para los microorganismos utilizados. La mayoría presentó resistencia, por lo que estos no presentaron halos de inhibición y se muestran como “Resistente”.

**Tabla 9.** Actividad *in vitro* de la *Urtica chamaedryoides* contra microorganismos (elaboración propia).

Diámetro de los halos de inhibición (mm)					
Extracto hexánico					
Microorganismos	Concentración 50 µg/mL	Concentración 100 µg/mL	Concentración 150 µg/mL	Concentración 200 µg/mL	Control +
<i>Candida albicans</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	-
<i>Escherichia coli</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	16
<i>Enterobacter cloacae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	0
<i>Staphylococcus. aureus</i>	Resistente	Resistente	Resistente	7.2	19
<i>Salmonella thiphy</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	23.2
Extracto clorofórmico					
<i>Candida albicans</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	-
<i>Escherichia coli</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	16
<i>Enterobacter cloacae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	7
<i>Staphylococcus. aureus</i>	Resistente	Resistente	Resistente	7.2	19.8
<i>Salmonella thiphy</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	20
Extracto metanólico					
<i>Candida albicans</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	-
<i>Escherichia coli</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	25.3
<i>Enterobacter cloacae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	0
<i>Staphylococcus. aureus</i>	Resistente	Resistente	Resistente	7.2	19
<i>Salmonella thiphy</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	17.4

De acuerdo con los resultados obtenidos en la anterior tabla, la mayoría de las bacterias presentaron resistencia ante los extractos utilizados. En comparación con un estudio realizado por Dar et al. (2012), las fracciones hexánicas del extracto de la planta *Urtica dioica*, presentan actividad microbiana ante estas mismas bacterias.

Por otro lado, en lo reportado por Kregiel et al. (2018), diferentes especies del género *Urtica*, presentan esta actividad antimicrobiana. De este mismo artículo, se muestra por medio de la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), que los extractos presentan esta actividad en un rango desde 1.8 µg/mL hasta 72.43 mg/mL.

En la Tabla 10, se muestra otra prueba con concentraciones mayores, donde en ciertos microorganismos si se presentó un halo de inhibición. Con base en los estudios mencionados, y con el tamaño del disco (6.5 mm), resulta que aquellos extractos se consideran inactivos si el halo de inhibición es  $\leq$  a 7 mm, con actividad moderada si  $\leq$ 10 mm, buena actividad si el halo es  $\leq$ 15 mm, y una excelente actividad si el halo de inhibición es  $>$ 15 mm.

**Tabla 10.** Actividad *in vitro* de la *Urtica chamaedryoides* contra microorganismos a concentraciones mayores (elaboración propia).

Diámetro de los halos de inhibición (mm)							
Microorganismo	Extracto hexánico		Extracto clorofórmico		Extracto metanólico		Control +
	Concentración 100 mg/mL	Concentración 500 mg/mL	Concentración 100 mg/mL	Concentración 500 mg/mL	Concentración 100 mg/mL	Concentración 500 mg/mL	
<i>Candida albicans</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	-
<i>Escherichia coli</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	19.3
<i>Enterobacter cloacae</i>	Resistente	Resistente	9	9.8	8	8.9	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	8.5	8.7	9.2	10	8.3	8	24.2
<i>Salmonella thiphy</i>	8	8.2	8.7	11.3	8.7	9	16.8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	0
<i>Bacillus subtilis</i>	Resistente	Resistente	8	9	Resistente	Resistente	15

De acuerdo con los resultados obtenidos, los extractos presentaron actividad antimicrobiana moderada. Es importante mencionar que estas cepas no son del tipo ATCC, por lo que no se puede garantizar una trazabilidad de los resultados. Para este estudio, se usaron bacterias que derivan de distintos lugares, tales como hospitales, las cuales posiblemente han desarrollado mayor resistencia.

### 5.5.2 Bioensayo de toxicidad *Artemia* spp.

Este método permite evaluar la toxicidad del extracto, pues proporciona información inicial y preliminar de toxicidad y es un indicador de bioactividad, previo a experimentar en líneas celulares (Pino Pérez, Oriela & Lazo, 2024). En este bioensayo, se determinó la toxicidad de tres extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de la planta *Urtica chamaedryoides* a distintas concentraciones, y se determinó el porcentaje de mortalidad que produce cada extracto.

Las concentraciones utilizadas fueron 2000, 1000, 500, 100 y 10  $\mu\text{g/mL}$ . En cada uno de los tubos de ensayo, se depositó entre 10-20 artemias y se observó la supervivencia de estas en cada concentración por 20 horas. En general, no se presentó actividad tóxica, puesto que se requieren de concentraciones más altas, lo que, de acuerdo con la Tabla 11 de Pinzón, R y Sánchez, C. (1995), esto se considera inocuo. En cuanto a los resultados obtenidos el extracto metanólico requiere de 2035.8  $\mu\text{g/mL}$  para alcanzar el 50% de letalidad en *Artemia salina*.

**Tabla 11.** Clasificación de toxicidad según Pinzón, R y Sánchez, C. (1995)

	Toxicidad	$\mu\text{g/mL}$
1	Extremadamente tóxico	0-10
2	Altamente tóxico	10-100
3	Moderadamente tóxico	100-500
4	Ligeramente tóxico	500-1000
5	Prácticamente no tóxico	1000-1500
6	Relativamente inocuo	>1500

Por el contrario, en el extracto hexánico se requieren de muy altas concentraciones para alcanzar una letalidad del 50%. En base con el experimento realizado, se llegó a un porcentaje de letalidad de 5.55% a

2000 µg/mL. Similarmente, sucedió lo mismo con el extracto clorofórmico donde el máximo porcentaje de letalidad fue de 22.22% a 2000 µg/mL.

Ninguno de los extractos presenta riesgo de toxicidad cuando muestran valores  $CL_{50} \leq 1000$  µg/mL. Por lo que, la *Urtica Chamaedryoides* no es tóxica. A continuación, se muestran los resultados obtenidos con respecto a cada extracto.

**Tabla 12.** Efecto tóxico del extracto hexánico *Urtica Chamaedryoides* sobre nauplios de la *Artemia* spp.

Concentración (µg/mL)	Log <sub>10</sub> (C)	% Letalidad	CL <sub>50</sub> (mg/mL)
2000	3.301029996	5.555555556	120.0790806
1000	3	1.960784314	
500	2.698970004	1.5625	
100	2	0	
10	1	0	

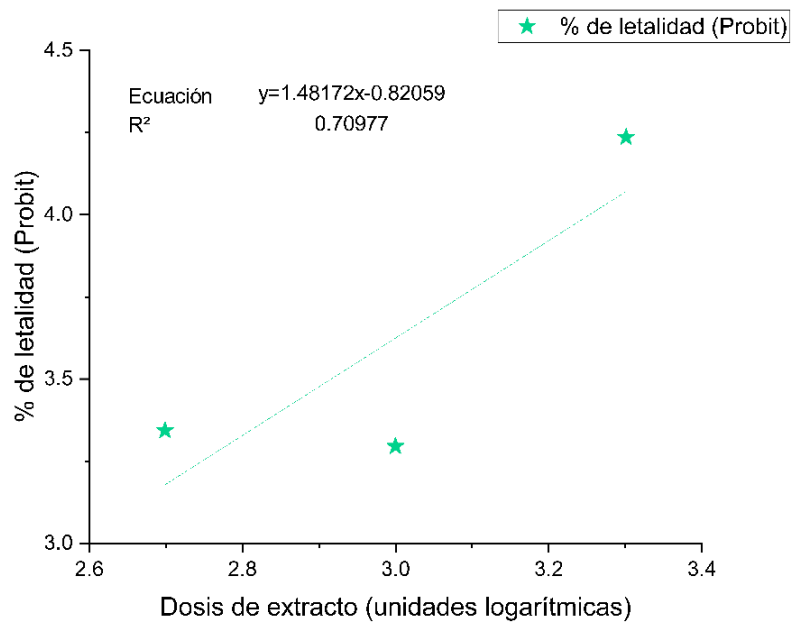
**Tabla 13.** Efecto tóxico del extracto clorofórmico *Urtica Chamaedryoides* sobre nauplios de la *Artemia* spp.

Concentración (µg/mL)	Log <sub>10</sub> (C)	% Letalidad	CL <sub>50</sub> (mg/mL)
2000	3.301029996	22.22222222	8.478627824
1000	3	4.411764706	
500	2.698970004	4.87804878	
100	2	0	
10	1	0	

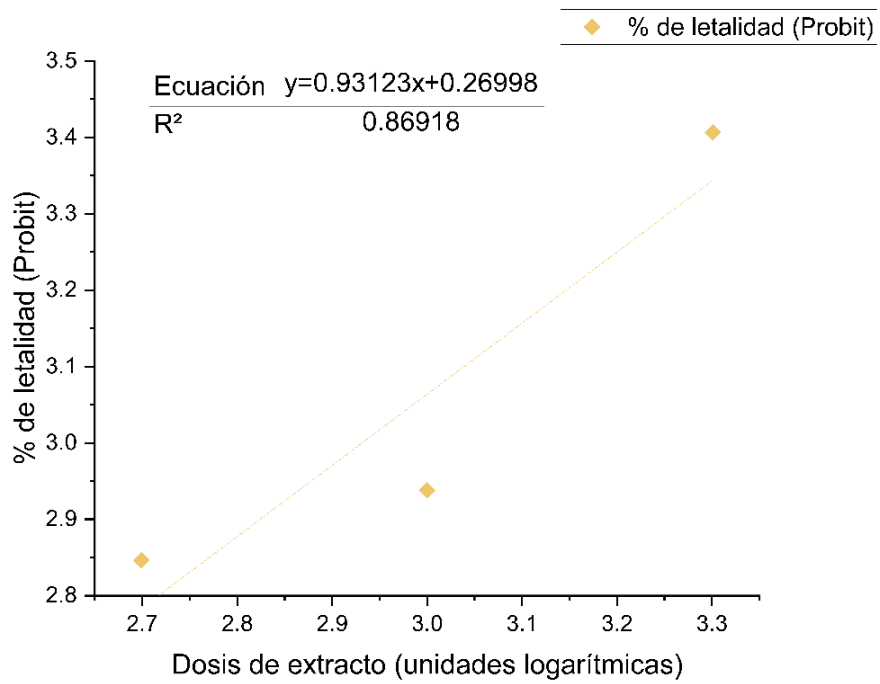
**Tabla 14.** Efecto tóxico del extracto metánolico *Urtica Chamaedryoides* sobre nauplios de la *Artemia* spp.

Concentración (µg/mL)	Log <sub>10</sub> (C)	% Letalidad	CL <sub>50</sub> (mg/mL)
2000	3.301029996	42.30769231	2.035802486
1000	3	30.23255814	
500	2.698970004	3.03030303	
100	2	0	
10	1	0	

Del mismo modo, se realizaron los gráficos correspondientes del ensayo de toxicidad que muestran la ecuación que permite obtener la concentración de letalidad al 50%.



**Figura 5.** Análisis Probit del bioensayo de *Artemia* spp. del extracto clorofórmico.



**Figura 6.** Análisis Probit del bioensayo de *Artemia* spp. del extracto hexánico.



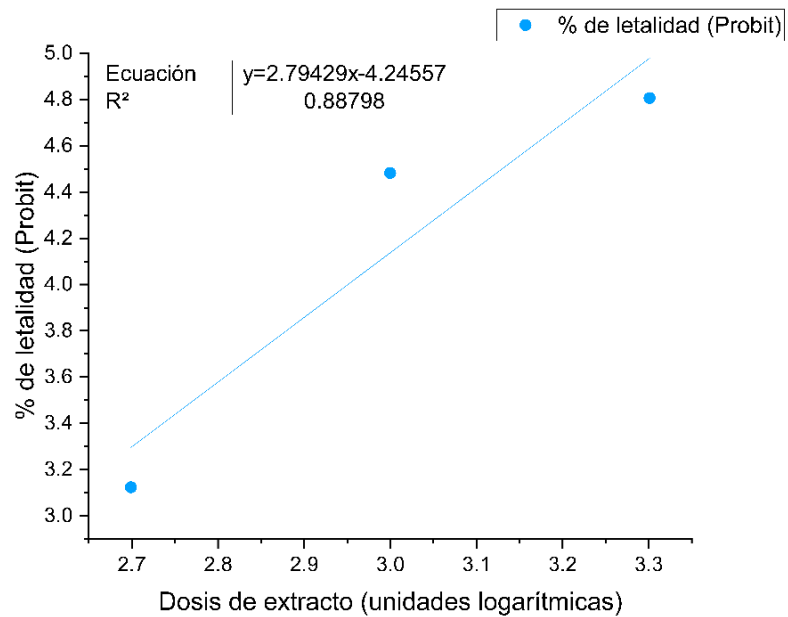


Figura 7. Análisis Probit del bioensayo de *Artemia* spp. del extracto metanólico.

### 5.6 Análisis Infrarrojo (IR-TF)

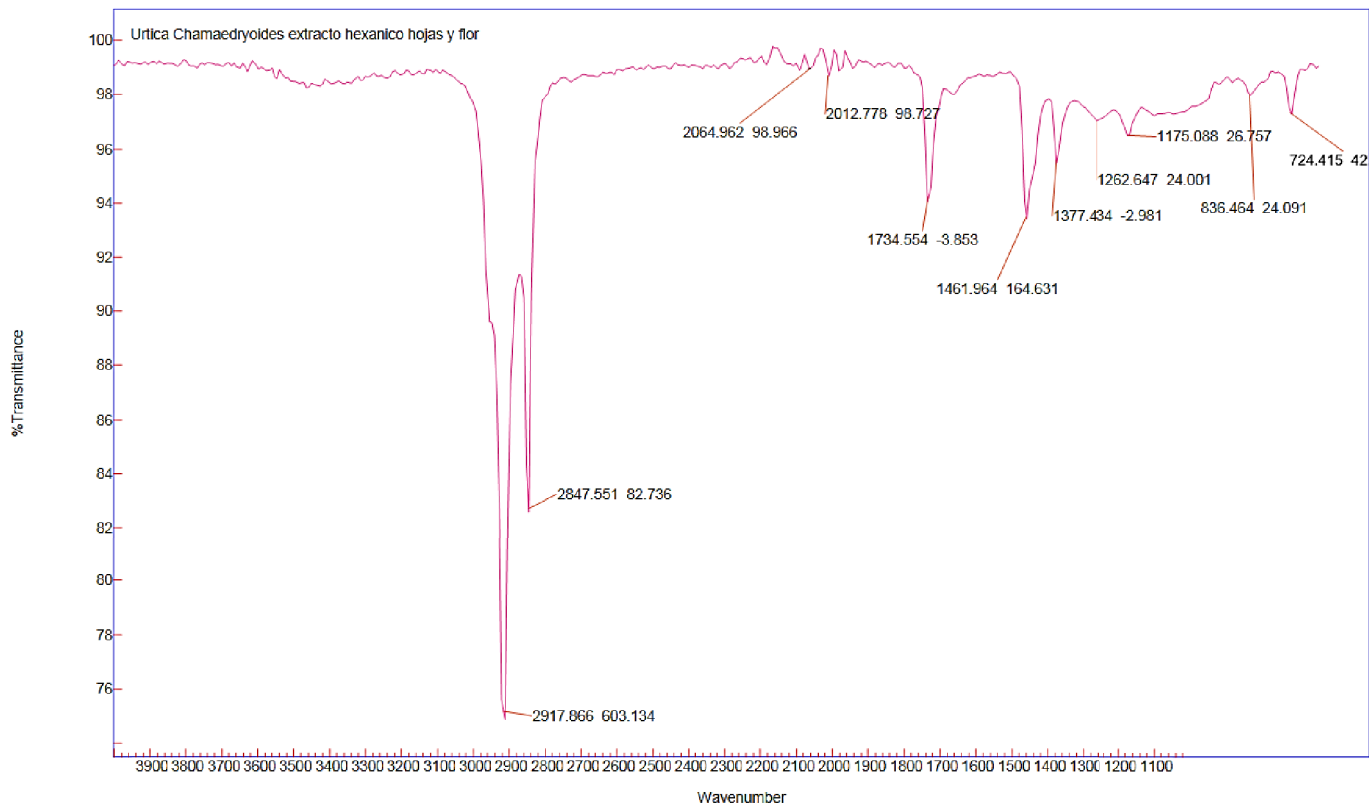
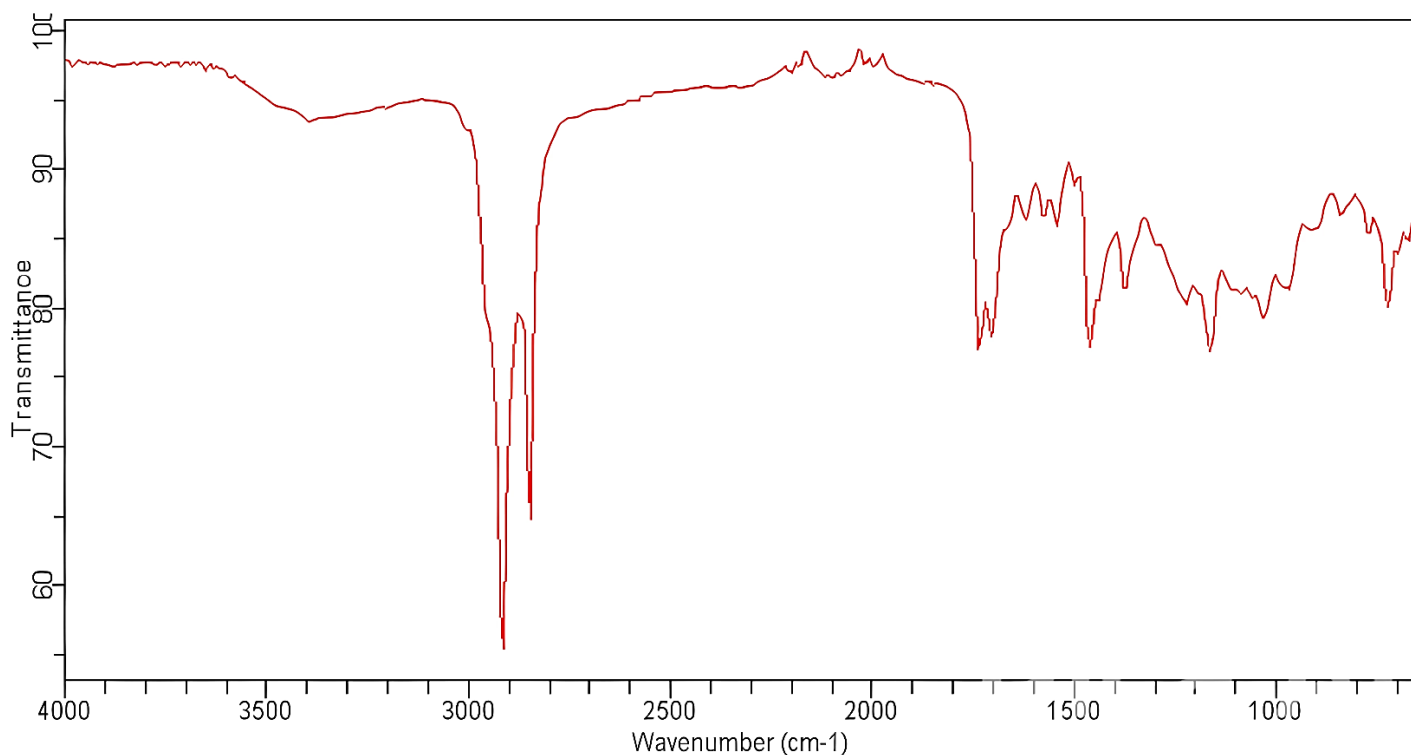


Figura 8. Espectro infrarrojo del extracto hexánico de la planta *Urtica chamaedryoides*.

El espectro infrarrojo del extracto hexánico de la planta *Urtica chamaedryoides*, mostrado en la Figura 8, indica la presencia de alcanos, debido a las bandas intensas ubicadas en las frecuencias  $2917\text{ cm}^{-1}$  y  $2847\text{ cm}^{-1}$ , las cuales usualmente corresponden a grupos metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) y metilo ( $-\text{CH}_3-$ ). La banda observada en  $1734\text{ cm}^{-1}$  es atribuida a la vibración de estiramiento característica del grupo carbonilo  $\text{C}=\text{O}$ , donde este tipo de enlaces en cetonas, ésteres o aldehídos suelen aparecer en los rangos de  $1700\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ . La frecuencia de  $1461.964\text{ cm}^{-1}$  posiblemente corresponde a una vibración de flexión de los grupos metileno. La señal en  $1377\text{ cm}^{-1}$  se relaciona con las vibraciones de flexión  $\text{C-H}$  de grupos metilo.

Las bandas en este rango  $1262\text{ cm}^{-1}$  y  $1175\text{ cm}^{-1}$  sugieren la vibración de estiramiento del enlace  $\text{C-O}$  en alcoholes o éteres.



**Figura 9.** Espectro infrarrojo del extracto clorofórmico de la planta *Urtica chamaedryoides*.

En comparación con los demás espectros de infrarrojo, el espectro infrarrojo del extracto clorofórmico de la planta *Urtica chamaedryoides* mostró un número mayor de bandas. La banda más intensa y característica se encuentra en  $2922\text{ cm}^{-1}$ , la cual en conjunto con la banda localizada en  $2853\text{ cm}^{-1}$  de la Figura 9, corresponden a una vibración de estiramiento  $\text{C-H}$  en alcanos de grupos metileno ( $-\text{CH}_2-$ ) y metilo ( $-\text{CH}_3-$ ). En  $1736\text{ cm}^{-1}$  se encuentra una vibración típica del grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ), lo que se asocia a la presencia de grupos funcionales como ésteres o cetonas.

La vibración de estiramiento C-O en alcoholes o éteres, son típicas en el rango de  $1000-1300\text{ cm}^{-1}$ , por lo que corresponde a las bandas en las frecuencias  $1036\text{ cm}^{-1}$  y  $1171\text{ cm}^{-1}$ . La última frecuencia en  $719\text{ cm}^{-1}$  suele estar asociada con vibraciones de tipo balanceo del enlace  $\text{CH}_2$  en alcanos.



**Figura 10.** Espectro infrarrojo del extracto metanólico de la planta *Urtica chamaedryoides*.

En la Figura 10, se muestra el espectro infrarrojo del extracto metanólico, donde se observa una banda ancha característica de la vibración de estiramiento del enlace O-H en  $3341\text{ cm}^{-1}$ . Esta banda sugiere la presencia de alcoholes o grupos fenólicos. Asimismo, las frecuencias en  $2924\text{ cm}^{-1}$  y  $2854\text{ cm}^{-1}$  están asociadas a la vibración de estiramiento C-H de grupos metileno en alcanos.

Por otro lado, la presencia de una banda en  $1623\text{ cm}^{-1}$  muestra una vibración de estiramiento típica de un grupo C=C. Por último, la banda en  $1047\text{ cm}^{-1}$  confirma la presencia de los grupos funcionales de alcoholes al haber una vibración de estiramiento de C-O.

## 5.7 Cromatografía de gases acoplado a masas

En la Figura 11, se muestra el cromatograma del extracto clorofórmico. La identificación tentativa de los componentes del extracto se reporta en la Tabla 15.

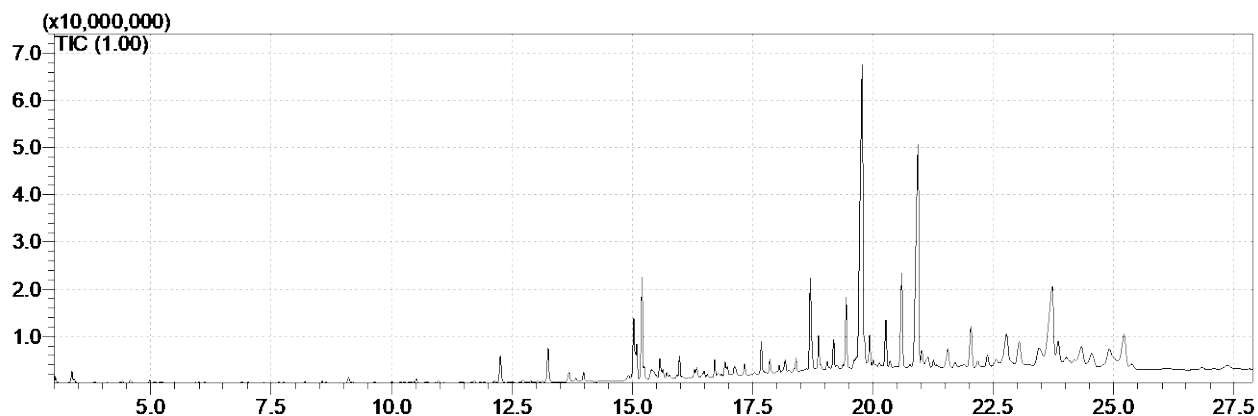


Figura 11. Cromatograma del extracto hexánico de la planta *Urtica chamaedryoides*.

Tabla 15. Análisis CG-EM del extracto hexánico de la planta *Urtica chamaedryoides*.

Nombre del Compuesto Químico	Tiempo Retención	Área %	SI
Acetato de tricosilo	21.717	0.63	97
1-Decanol, 2-etilo	9.653	0.04	96
Tridecano, 5-propilo-	10.732	0.05	95
1,3-Pentanodiol, 2,2,4-trimetilo	6.385	0.02	94
5-colesteno-3-ol, 24-metilo	22.783	4.15	94
1,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno-3-ol, 2,6,10,15,19,23-hexametilo-, (todo-E)-(.+/-)	26.849	0.55	93
Hexadecano, 2-metilo	9.807	0.09	93
Linoleato de fitilo	27.788	1.39	93
Estigmasta-5,22-dieno-3-ol, (3 $\beta$ ,22E)-	23.041	2.7	93
Ácido tetradecanoico, éster etílico	11.435	0.07	92
Ácido eicosatrienoico 11,14,17-, éster metílico	15.115	4.88	92
5-hepten-2-ona, 6-metilo	5.098	0.13	92
Ácido hexadecenoico 9-, éster metílico, (Z)-	13.045	0.04	92
Octacosanol	21.024	2.85	91
Limóneno	5.492	0.07	90
(3E)-3-hexen-2-ona	4.986	0.2	90
$\alpha$ -Amirina	24.92	2.6	89
6-Undecanona	3.381	0.3	89
Ácido docosenoico (E)-13	16.949	1.02	88
5,9,13-pentadecatrieno-2-ona, 6,10,14-trimetilo-, (E,E)	17.136	0.76	88
Ácido propanoico 2-metilo-, éster de 2,4,4- trimetilpentilo de 3-hidroxi	7.667	0.08	87
2,4-Decadienal, (E,E)-	7.375	0.02	87
3-buten-2-ona, 4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)-	8.574	0.08	87
6,11-Dimetil-2,6,10-dodecatrien-1-ol	19.458	2.39	87
9,19-ciclolanost-24-en-3-ol, (3 $\beta$ )	24.55	1.47	87

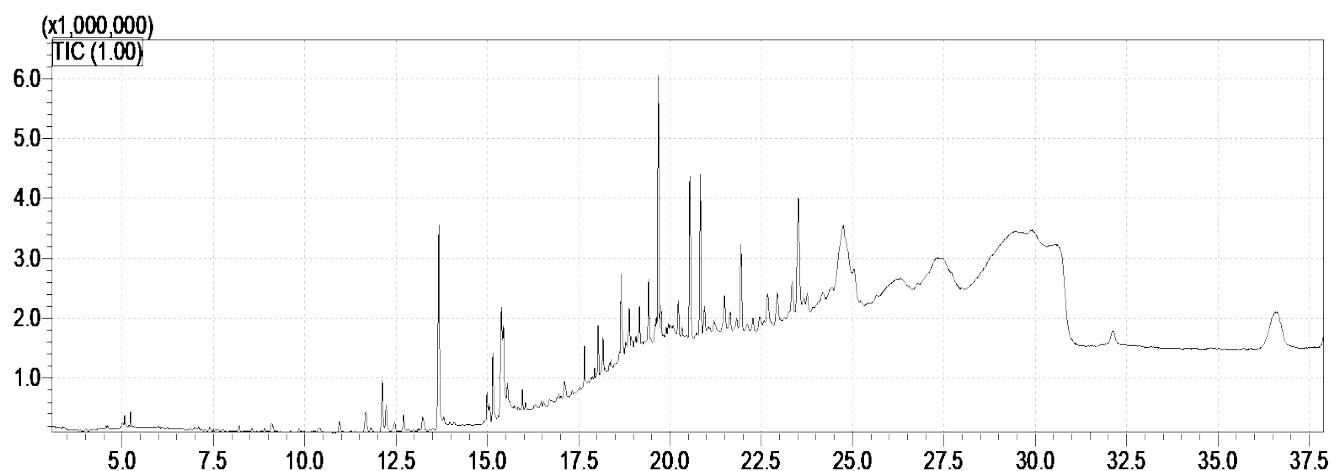
Ácido heptacosanoico , éster metílico	18.895	3.82	86
2-etil-1-decanol	9.653	0.04	86
2-pentanona , 3-metilo	4.586	0.2	86
Miristato de butilo	13.916	0.37	86
Ácido tetradecanoico , éster propílico	12.801	0.12	85
Metil eicosa-11.14.17-trienoato (11Z.14Z.17Z)	15.073	2.74	85
Diisobutirato de 2,2,4-trimetil-1.3-pentanodiol	9.355	0.04	85
Acetato de 6-octen-1-ol , dimetil-3.7	12.49	0.03	85
Citronelol	19.439	2	85
Ácido docosanoico , éster docosilo	34.902	0.16	84
Acetato lup-20(29)-en-3-ol, (3β)	25.798	0.29	84
Ácido ciclopentano undecanoico	7.097	0.11	82
(1R,2S,4S,5R,7R)-5-isopropil-1-metil-3,8-dioxatriciclo[5.1.0.02,4]octano	11.72	0.07	81
1-metilcicloheptanol	6.126	0.04	80
Alcohol fenílico	6.145	0.02	80
Acetato, (Z)-11-Tetradecen-1-ol	10.444	0.21	80
7-octen-2-ol, 2-metil-6-metileno	7.105	0.03	80
Vitamina E	21.563	1.48	80

Los compuestos, tentativamente identificados por la cromatografía de gases, entran en la clasificación de emolientes, acondicionadores, humectantes y fragancias; a excepción del compuesto estigmasta-5,22-dieno-3-ol (3β,22E) que muestra actividad antimicrobiana contra los *microorganismos Candida stellatoidea*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella pneumoniae* con halos de inhibición de 25, 25, 27, 28, 30, 31 y 34 mm respectivamente (Achika, J. I., Ndukwe, G. I., & Ayo, R. G. , 2016).

Otro compuesto que se encontró del extracto hexánico es la α-Amirina que se caracteriza por su actividad antioxidante y antiinflamatoria. En el artículo de Neto et al. (2021), se menciona que las amirinas son triterpenos que tienen un efecto gastroprotector y actividad antiinflamatoria e hipoglucémica. Inclusive los triterpenos α y β-amirina han mostrado citotoxicidad contra algunas líneas de células cancerosas como HL-60, leucemia promielocítica, SF-295, glioblastoma, HCT-8, cáncer de colon, MDAMB-435 y melanoma.

Igualmente, el compuesto octacosanol también posee actividades biológicas importantes, tales como antifatiga, anti-hipoxia, antioxidante, antiinflamatoria, antitumoral, antibacteriana, anti-edad y anti-Parkinson (Zhou et al., 2022). Otro de los compuestos con actividad biológica es el acetato lup-20(29)-en-3-ol (3β), el cual varios estudios han demostrado que posee actividad antiinflamatoria, antioxidante,

anticancerígena y antimicrobiana (Liu et al., 2020). Este triterpenoide se ha sugerido como agente potencial en la quimiopreención del carcinoma de vesícula biliar humana (Castro, M, J, 2015). Para finalizar, la vitamina E, que se conoce por ser un antioxidante liposoluble, que posee efectos antiinflamatorios y antioxidantes en la piel (Cassano, 2012).



**Figura 12.** Cromatograma del extracto clorofórmico de la planta *Urtica chamaedryoides*.

De acuerdo con lo anteriormente descrito, cada uno de los compuestos con una similitud a  $\geq 80\%$  indican una fuerte presencia en el extracto.

**Tabla 16.** Análisis CG-EM del extracto clorofórmico de la planta *Urtica chamaedryoides*

Nombre del Compuesto Químico	Tiempo Retención	Área %	SI
Hexilenglicol	4.571	0.09	95
Ácido 9,12,15-octadecatrienoico, éster metílico, (Z,Z,Z)-	15.062	0.0	95
(5E)-6,10-dimetil-5,9-undecadien-2-ona	8.208	0.04	94
Geranilacetona	8.209	0.13	93
Isofitol	13.526	0.02	89
Tetradecanoato de metilo	10.976	0.12	89
4-penteno-2-ol, 2-metilo	4.379	0.09	88
E,E-2,13-octadecadien-1-ol	19.435	2.47	87
1,2,3-propanotriol	5.024	0.34	86
3-Hexeno-2,5-diol	5.083	0.18	86
Ciclohexanol, 4-(1-metiletil)	18.897	2.48	86
DL- $\alpha$ -Tocoferol	21.490	1.21	86
Meadowlactone	21.850	1.43	85
2H-piran-2-ona, tetrahidro-6-undecilo-	16.722	0.41	84
Heptadecanal	17.3222	0.11	84

<b>Hexacosanal</b>	21.200	1.27	84
<b>10-metoxi-nb- <math>\alpha</math>-metilcorinanteol</b>	10.952	0.18	83
<b>Acetato 1-Docosanol</b>	25.695	0.63	83
<b>4-(1,5-dihidroxi-2,6,6-trimetilciclohexeno-2-il)but-3-en-2-ona</b>	9.847	0.14	83
<b>Nonanol trimetílico</b>	7.414	0.03	82
<b>Brasiliamida A</b>	24.782	0.71	80

Al realizar una revisión exhaustiva, los componentes principales que conforman a este extracto son humectantes, emolientes o fragancias que se emplean dentro de la industria cosmética. No obstante, DL- $\alpha$ -Tocoferol es un tipo de vitamina E, lo que indica que el extracto posee actividad antioxidante para proteger a la piel del daño oxidativo. Así también, en el artículo de Fujita et al. (2002), se encontró que las brasiliamidas son una clase de alcaloides piperazínicos producidos por *Penicillium brasilianum*. Estos compuestos han sido estudiados y se ha encontrado que tienen actividad convulsiva contra las larvas de *Bombyx mori*, que son los gusanos de seda (Yuan et al., 2020).

## 6. CONCLUSIONES

Después de un análisis fitoquímico de la planta *Urtica chamaedryoides*, se ha revelado que los extractos de esta planta poseen compuestos bioactivos con gran interés terapéutico. Por lo cual, esta investigación sugiere que, en un futuro, sería valioso aislar estos compuestos para realizar estudios más detallados sobre sus propiedades y potenciales aplicaciones.

Además, por medio de la espectrometría de masas fue posible determinar aquellos compuestos de importancia biológica. Inesperadamente, el extracto hexánico fue el que presentó mayor concentración de estos compuestos bioactivos. Este tipo de hallazgo es bastante interesante, pues usualmente la actividad bioactiva se encuentra en extractos más polares como metanólicos, acuosos o etanólicos.

A pesar de que la mayoría de los compuestos identificados en este estudio son humectantes o emolientes, su presencia no descarta la posibilidad de futuras aplicaciones en la industria cosmética. Esto sugiere que, la planta *Urtica chamaedryoides* podría ser una fuente innovadora de ingredientes naturales para el cuidado personal, en específico de la piel.

En cuanto al análisis de la actividad antimicrobiana, se abre una brecha para llevar a cabo estudios adicionales usando cepas ATCC o usando una metodología diferente a la de difusión por discos. La falta de información sobre la planta resalta la necesidad de realizar investigaciones más profundas para

descubrir un posible potencial para el desarrollo de fármacos. Con base en los resultados del análisis cromatográfico de gases, se propone que *Urtica chamaedryoides* posee actividades biológicas similares a las del género *Urtica*. No obstante, trabajar con concentraciones bajas obstaculiza la detección de actividad biológica. Además, de que las propiedades de la planta cambiaron al estar seca, pues se no se reportó actividad tóxica, pero es bien sabido que al tocar una planta del género *Urtica* se genera de inmediato una reacción de comezón y ardor.

Por último, puede plantearse la posibilidad de que los compuestos bioactivos se encapsulen en pequeños nanosistemas para su transporte. Esta estrategia no solo podría aumentar su eficiencia, sino también facilitar su aplicación en diferentes campos, incluyendo la farmacología y la cosmética. En resumen, *Urtica chamaedryoides* representa un área prometedora para futuras investigaciones y aplicaciones prácticas en el ámbito de la salud y el bienestar.



## 7. REFERENCIAS

- Abi Sleiman, M., Younes, M., Hajj, R., Salameh, T., Abi Rached, S., Abi Younes, R., Daoud, L., Doumiati, J. L., Frem, F., Ishak, R., Medawar, C., Naim, H. Y., & Rizk, S. (2024). *Urtica dioica*: Anticancer Properties and Other Systemic Health Benefits from In Vitro to Clinical Trials. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(13), 7501–7501. <https://doi.org/10.3390/ijms25137501>
- Abubakar, A., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1–1. [https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_175_19)
- Achika, J. I., Ndukwe, G. I., & Ayo, R. G. (2016). Isolation, Characterization and Antimicrobial Activity of 3 $\beta$ , 22E-Stigmasta-5, 22-dien-3-ol from the Aerial Part of *Aeschynomene uniflora* E. Mey. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 11(5), 1–8. <https://doi.org/10.9734/BJPR/2016/23506>
- Adhikari, B. M., Bajracharya, A., & Shrestha, A. K. (2015). Comparison of nutritional properties of Stinging nettle (*Urtica dioica*) flour with wheat and barley flours. *Food Science & Nutrition*, 4(1), 119–124. <https://doi.org/10.1002/fsn3.259>
- Alberts, B., Johnson, A., & Lewis, J. (2002). *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). Garland.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2024). *Introduction to Pathogens*. Nih.gov; Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26917/#:~:text=Infectious%20diseases%20are%20caused%20by,by%20the%20host%20immune%20system.>
- Alonso Castro, Angel Josabad, (2012). "Evaluación y caracterización de los efectos citotóxico y antitumoral de kaempferitrina". (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/90589>
- Basurto, F., Esquivel, E., & García, G. (1982). *Terminos - Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana* :: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Unam.mx. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=urtica-chamaedryoides>
- Baumli, J., Antal, N., Dorina Casoni, & Cimpoi, C. (2023). Use of Secondary Metabolites Profiling and Antioxidant Activity to Unravel the Differences between Two Species of Nettle. *Plants*, 12(18), 3233–3233. <https://doi.org/10.3390/plants12183233>

- Bhatla, S. C., & Lal, M. A. (2023). *Secondary Metabolites*. 765–808. [https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1\\_33](https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1_33)
- Builders, P. F. (2019). *Herbal medicine*. Intechopen. (Original work published 2019)
- Cassano, R. (2012). Vitamin E chemistry, biological activity and benefits on the skin. *Human Health Handbooks*, 144–163. [https://doi.org/10.3920/978-90-8686-729-5\\_9](https://doi.org/10.3920/978-90-8686-729-5_9)
- Castro, M. J. (2015). *Síntesis de derivados triterpénicos con potencial actividad anticolinesterasa*. 27–30.
- Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. Pediamécum. Edición 2015. ISSN 2531-2464. Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/fosfomicina>. Consultado el 01/11/2024.
- Cruz-Pérez , A. L., Jacqueline, B.-R., Bernal-Ramírez Luis Alberto, David, B.-A., & Beatriz, R.-A. (2021). Actualized inventory of medicinal plants used in traditional medicine in Oaxaca, Mexico. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13002-020-00431-y>
- Dar, S. A., Farooq Ahmad Ganai, Yousuf, A. R., Masood-ul-Hassan Balkhi, Bhat, T. M., & Sharma, P. (2012). Pharmacological and toxicological evaluation of *Urtica dioica*. *Pharmaceutical Biology*, 51(2), 170–180. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.715172>
- Dhouibi, R., Affes, H., Ben Salem, M., Hammami, S., Sahnoun, Z., Zeghal, K. M., & Ksouda, K. (2020). Screening of pharmacological uses of *Urtica dioica* and others benefits. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 150, 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2019.05.008>
- Donovan Stewart Correll, & Marshall Conring Johnston. (1970). *Manual of the Vascular Plants of Texas*. Texas Research Foundation.
- Dreyer, J., & Müssig, J. (2000). New horizons in natural fibre production: separation of hemp and nettle with enzymes. In *3rd International Symposium Biorohstoff Hanf and Andere Faserpflanzen* , 13–16.
- eFlora* Search Page. (2024). Efloras.org. [http://www.efloras.org/browse.aspx?flora\\_id=0&name\\_str=%20urtica&btnSearch=Search](http://www.efloras.org/browse.aspx?flora_id=0&name_str=%20urtica&btnSearch=Search)
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *PLANT PHYSIOLOGY*, 184(1), 39–52. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00433>
- Ergen, N., Hoşbaş, S., Deliorman Orhan, D., Aslan, M., Sezik, E., & Atalay, A. (2018). Evaluation of the lifespan extension effects of several Turkish medicinal plants in *Caenorhabditis elegans*. *Turkish Journal of Biology*, 42(2). <https://doi.org/10.3906/biy-1711-5>

- Eugenia, N. (1961). *VOLUMEN IX -JULIO 1961 395 EL GÉNERO URTICA EN CHILE*.  
<https://botanicaargentina.org.ar/wp-content/uploads/2018/09/395-413025.pdf>
- Farooq, S., Shabir Ahmad Mir, Manzoor Ahmad Shah, & Annamalai Manickavasagan. (2022). Extraction techniques. *Elsevier EBooks*, 23–37. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822475-5.00005-3>
- Fujita, T., Makishima, D., Akiyama, K., & Hayashi, H. (2002). New Convulsive Compounds, Brasilamides A and B, from *Penicillium brasilianum* Batista JV-379. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(8), 1697–1705. <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1697>
- Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) Information | Thermo Fisher Scientific - MX*. (2024).  
 Thermofisher.com. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc-ms-information.html>
- Gómez Álvarez, Regino. (2024). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 43–49. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=s0187-73802012000100007&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=s0187-73802012000100007&script=sci_arttext)
- Gutiérrez-Grijalva, E. P., & Heredia, B. (2019, July 6). *PLANTAS MEDICINALES MEXICANAS: DE LA TRADICIÓN A LA CIENCIA*. Centro de Investigación En Alimentación Y Desarrollo (CIAD).  
<https://www.ciad.mx/plantas-medicinales-mexicanas-de-la-tradicion-a-la-ciencia/>
- Habiba, U., & Yasmeen, H. (2023). Article 7 Part of the Alternative and Complementary Medicine Commons Recommended Citation Recommended Citation Afzal, I. *Journal of Bioresource Management Journal of Bioresource Management*, 10(4).  
<https://corescholar.libraries.wright.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1589&context=jbm>
- Handa, S. S., Khanuja, S. P. S., Rakesh, D. D., & Longo, G. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. [https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction\\_technologies\\_for\\_medicinal\\_and\\_aromatic\\_plants\\_0.pdf](https://www.unido.org/sites/default/files/2009-10/Extraction_technologies_for_medicinal_and_aromatic_plants_0.pdf)
- Hari Prasad Devkota, Keshav Raj Paudel, Shristi Khanal, Baral, A., Panth, N., Anjana Adhikari-Devkota, Jha, N. K., Das, N., Singh, S. K., Dinesh Kumar Chellappan, Dua, K., & Hansbro, P. M. (2022). Stinging Nettle (*Urtica dioica* L.): Nutritional Composition, Bioactive Compounds, and Food Functional Properties. *Molecules*, 27(16), 5219–5219.  
<https://doi.org/10.3390/molecules27165219>
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. In *American Society for Microbiology*. American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/2594ce26->

bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf

- iNaturalist . (2016). Ortiga (*Urtica dioica*). iNaturalist Mexico. <https://mexico.inaturalist.org/taxa/51884-Urtica-dioica>
- Khan, S. A., Khan, S. B., Khan, L. U., Farooq, A., Akhtar, K., & Asiri, A. M. (2018). Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Application in Functional Groups and Nanomaterials Characterization. *Springer EBooks*, 317–344. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92955-2_9)
- Kregiel, D., Pawlikowska, E., & Antolak, H. (2018). *Urtica* spp.: Ordinary Plants with Extraordinary Properties. *Molecules*, 23(7), 1664. <https://doi.org/10.3390/molecules23071664>
- Lady Bird Johnson Wildflower Center - The University of Texas at Austin. (2014). Wildflower.org. [https://www.wildflower.org/plants/result.php?id\\_plant=urch3](https://www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=urch3)
- Lambert, J. B., Mazzola, E. P., & Ridge, C. (2019). *Nuclear magnetic resonance spectroscopy: an introduction to principles, applications, and experimental methods*. John Wiley & Sons.
- Leber, A. L. (2016). Preparation of Routine Media and Reagents Used in Antimicrobial Susceptibility Testing. *ASM Press EBooks*, 5.20.1.1-5.20.3.10. <https://doi.org/10.1128/9781555818814.ch5.20.1>
- Li, K., Zhong, W., Li, P., Ren, J., Jiang, K., & Wu, W. (2023). Antibacterial mechanism of lignin and lignin-based antimicrobial materials in different fields. *International Journal of Biological Macromolecules*, 252, 126281–126281. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126281>
- Liu, K., Zhang, X., Xie, L., Deng, M., Chen, H., Song, J., Long, J., Li, X., & Luo, J. (2020). Lupeol and its derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents: Molecular mechanisms and therapeutic efficacy. *Pharmacological Research*, 164, 105373–105373. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105373>
- Marcin Masłowski, Andrii Aleksieiev, Justyna Miedzianowska, Efenberger-Szmechtyk, M., & Strzelec, K. (2022). Antioxidant and Anti-Aging Activity of Freeze-Dried Alcohol-Water Extracts from Common Nettle (*Urtica dioica* L.) and Peppermint (*Mentha piperita* L.) in Elastomer Vulcanizates. *Polymers*, 14(7), 1460–1460. <https://doi.org/10.3390/polym14071460>
- Meyer, V. R. (2005). CHROMATOGRAPHY | Overview. *Encyclopedia of Analytical Science*, 89–98. <https://doi.org/10.1016/b0-12-369397-7/00090-x>
- Mishra, A., & Kharel, G. P. (2013). Preservation and Quality Evaluation of Sisnu (*Urtica plaviflora*) by Making Gundruk like Fermented Product. *Journal of Food Science and Technology Nepal*, 6, 114–117. <https://doi.org/10.3126/jfstn.v6i0.8272>

- Moreira, S. A., Silva, S., Costa, E. M., Saraiva, J. A., & Maria Manuela Pintado. (2020). Effect of high hydrostatic pressure extraction on biological activities of stinging nettle extracts. *Food & Function*, 11(1), 921–931. <https://doi.org/10.1039/c9fo02442e>
- Narang, U., Kurian, N. K., & Bayram, S. (2023). Enigmatic secondary metabolites: Microbial melanins and their applications. *Elsevier EBooks*, 337–351. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-95241-5.00017-4>
- Neto, S. F., Prada, A. L., Achod, L. D. R., Torquato, H. F. V., Lima, C. S., Paredes-Gamero, E. J., Silva de Moraes, M. O., Lima, E. S., Sosa, E. H., de Souza, T. P., & Amado, J. R. R. (2021).  $\alpha$ -amyrin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111656. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111656>
- Nichols, L. (2017, October 5). 5: *Distillation*. Chemistry LibreTexts. [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Organic\\_Chemistry\\_Lab\\_Techniques\\_\(Nichols\)/05%3A\\_Distillation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_Lab_Techniques_(Nichols)/05%3A_Distillation)
- Nichols, L. (2022, October 30). 5.6A: *Descripción general de la evaporación rotatoria*. LibreTexts Español; Butte College. [https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica\\_Org%C3%A1nica/T%C3%A9cnicas\\_de\\_Laboratorio\\_de\\_Qu%C3%ADmica\\_Org%C3%A1nica\\_\(Nichols\)/05%3A\\_Destilaci%C3%B3n/5.06%3A\\_Evaporaci%C3%B3n\\_Rotativa/5.6A%3A\\_Descripci%C3%B3n\\_general\\_de\\_la\\_evaporaci%C3%B3n\\_rotatoria](https://espanol.libretexts.org/Quimica/Qu%C3%ADmica_Org%C3%A1nica/T%C3%A9cnicas_de_Laboratorio_de_Qu%C3%ADmica_Org%C3%A1nica_(Nichols)/05%3A_Destilaci%C3%B3n/5.06%3A_Evaporaci%C3%B3n_Rotativa/5.6A%3A_Descripci%C3%B3n_general_de_la_evaporaci%C3%B3n_rotatoria)
- Omokhefe Bruce, S. (2022). Secondary Metabolites from Natural Products. *Secondary Metabolites - Trends and Reviews*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102222>
- Pino Pérez, Oriela, & Lazo, J. (2024). ENSAYO DE ARTEMIA: ÚTIL HERRAMIENTA DE TRABAJO PARA ECOTOXICÓLOGOS Y QUÍMICOS DE PRODUCTOS NATURALES. *Revista de Protección Vegetal*, 25(1), 34–43. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522010000100008&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522010000100008&lng=es)
- Pinzón, R y Sánchez C. (1995). *Manual de Técnicas de Investigación CYTED*, p.p 63-70.
- Sánchez y García Figueroa, F. L. (2022). *Fitoquímica* (pp. 11–12). Universidad Nacional Autónoma De México. <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/2022/Publicaciones/libros/cbiologia/Fitoquimica.pdf>
- Sangwan, N. S., Jadaun, J. S., Tripathi, S., Mishra, B., Narnoliya, L. K., & Sangwan, R. S. (2018). Plant Metabolic Engineering. *Elsevier EBooks*, 143–175. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-815870->

8.00009-7

- Search results — The Plant List.* (2024). Theplantlist.org.  
<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Urtica+>
- Silva, L. M. da, & Silva, F. J. da. (2023). BIOASSAY WITH ARTEMIA SALINA L.: A GATEWAY TO UNDERSTANDING THE TOXICITY OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS. *Botânica, Ecologia E Sustentabilidade: Uma Perspectiva Multidisciplinar*, 50–69.  
<https://doi.org/10.37885/230814206>
- Sistema de Información de Biodiversidad . (2024). *Urtica chamaedryoides | SIB, Parques Nacionales, Argentina*. Sistema de Información de Biodiversidad. <https://sib.gob.ar/especies/urtica-chamaedryoides?tab=info-general>
- Sparkman, O. D., Penton, Z., & Kitson, F. G. (2011). *Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide* (2nd ed.). Academic Press.
- Subramanian, P., & C. Anandharamakrishnan. (2023). Extraction of bioactive compounds. *Elsevier EBooks*, 45–87. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824312-1.00002-9>
- Urtica chamaedryoides - ficha informativa.* (2024). Conabio.gob.mx.  
<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/urticaceae/urtica-chamaedryoides/fichas/ficha.htm>
- USDA Plants Database.* (2024). Usda.gov. <https://plants.usda.gov/home/plantProfile?symbol=URCH3>
- Valdivia-Correa, B., Gómez-Gutiérrez, C., Uribe, M., & Méndez-Sánchez, N. (2016). Herbal Medicine in Mexico: A Cause of Hepatotoxicity. A Critical Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 235. <https://doi.org/10.3390/ijms17020235>
- Verep, D., Ates, S., & Karaogul, E. (2023). A Review of Extraction Methods for Obtaining Bioactive Compounds in Plant-Based Raw Materials. *Journal of Bartın Faculty of Forestry*, 25(3), 492–513.  
<https://doi.org/10.24011/barofd.1303285>
- Villaseñor R., J. L., & Espinosa G., F. J. (1998). *Catálogo de malezas de México*. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica.
- Vladimír Mlynárik. (2016). Introduction to nuclear magnetic resonance. *Analytical Biochemistry*, 529, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.05.006>
- Wade, L. G. (1993). *Química Organica*. PEARSON.
- Wang, L., Kong, D., Tian, J., Zhao, W., Chen, Y., An, Y., Liu, X., Wang, F., Cai, F., Sun, X., Liu, Q., Zhang, W., Tian, J., & Zhou, H. (2022). Tapinanthus species: A review of botany and biology,

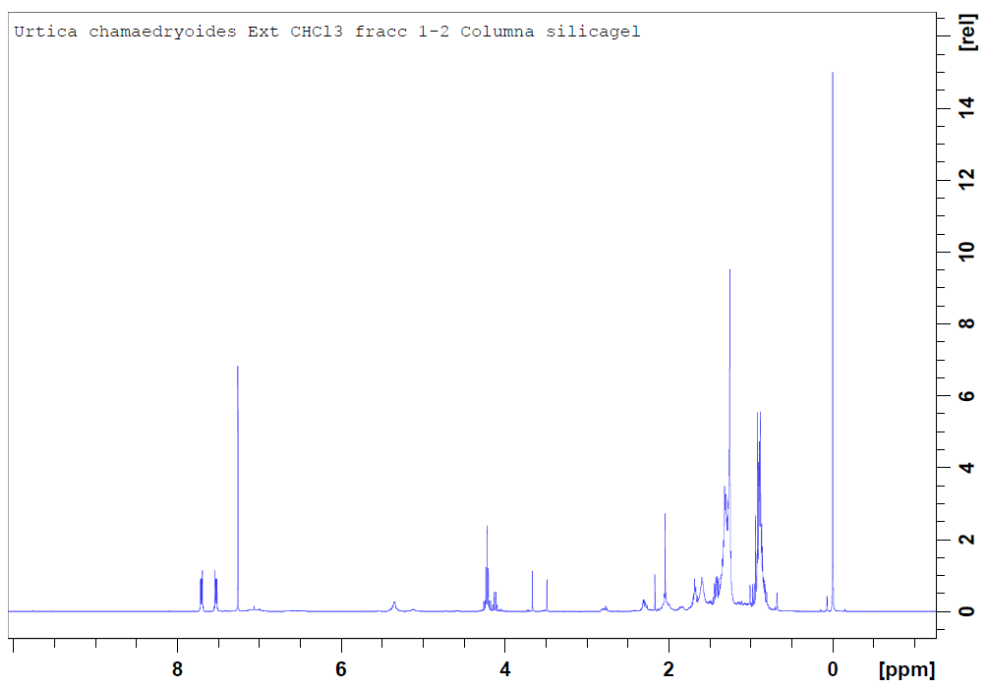
secondary metabolites, ethnomedical uses, current pharmacology and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, 296, 115462–115462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115462>

Yuan, B., Liu, D., Guan, X., Yan, Y., Zhang, J., Zhang, Y., Yang, D., Ma, M., & Lin, W. (2020). Piperazine ring formation by a single-module NRPS and cleavage by an  $\alpha$ -KG-dependent nonheme iron dioxygenase in brasiliamide biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(14), 6149–6159. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10678-w>

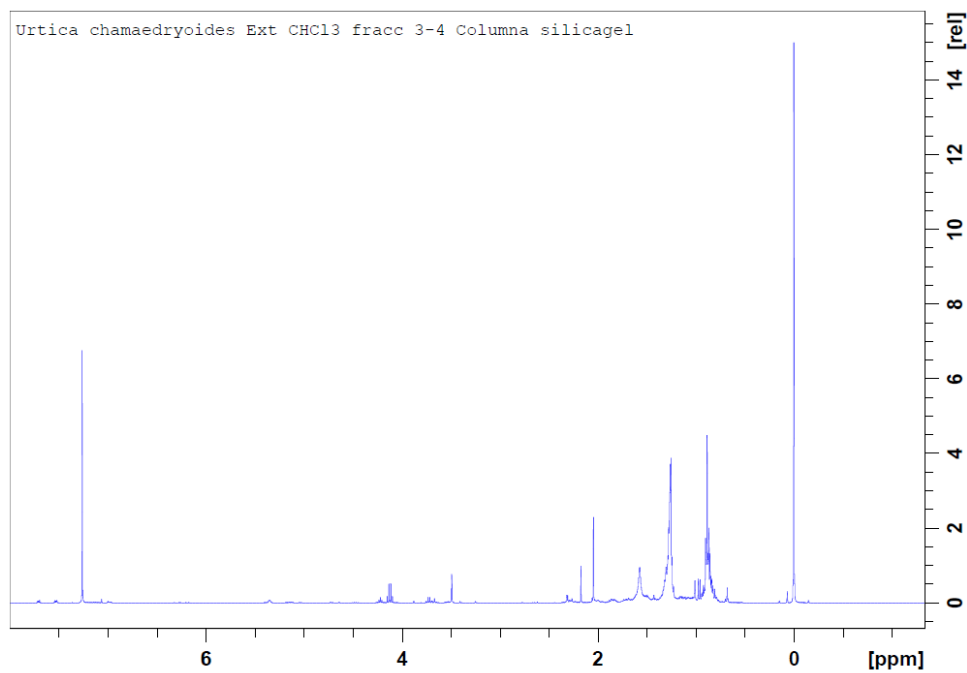
Zhou, Y., Cao, F., Luo, F., & Lin, Q. (2022). Octacosanol and health benefits: Biological functions and mechanisms of action. *Food Bioscience*, 47, 101632–101632. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101632>

## 8. ANEXOS

### 8.1 Espectros de Resonancia Magnética Nuclear fracciones de extracto clorofórmico

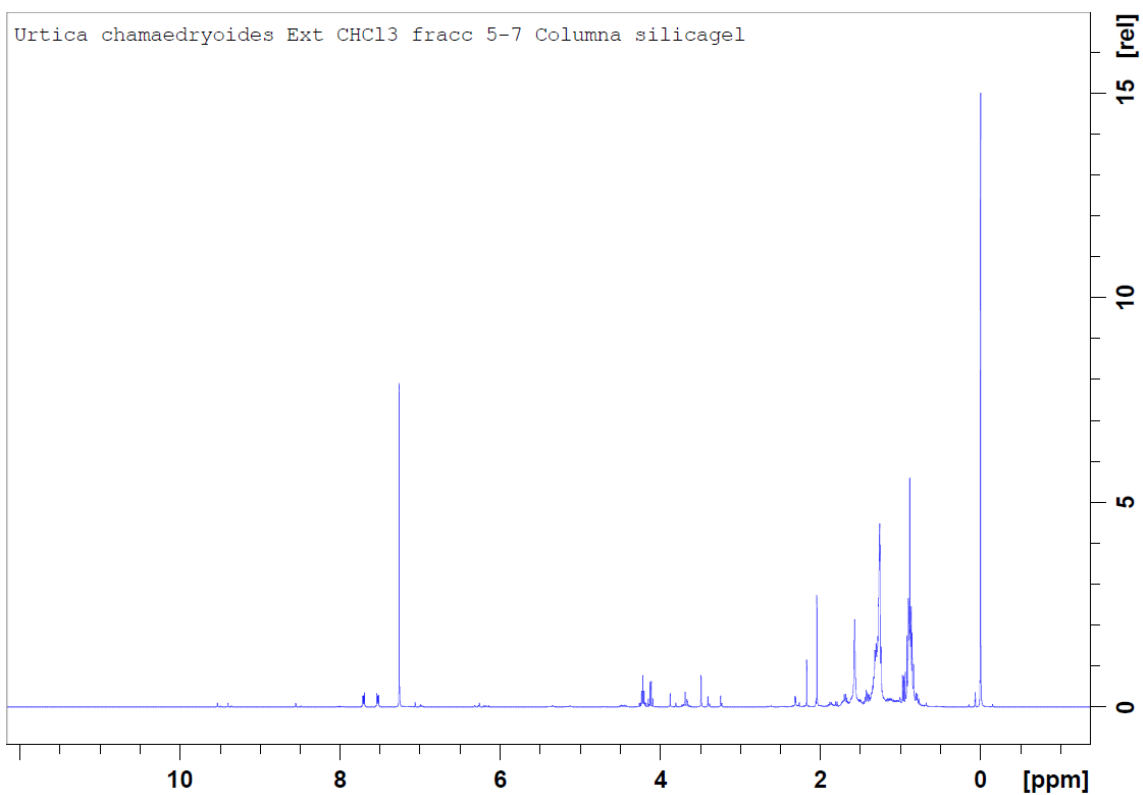


**Figura 13.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 1-2 del extracto clorofórmico.

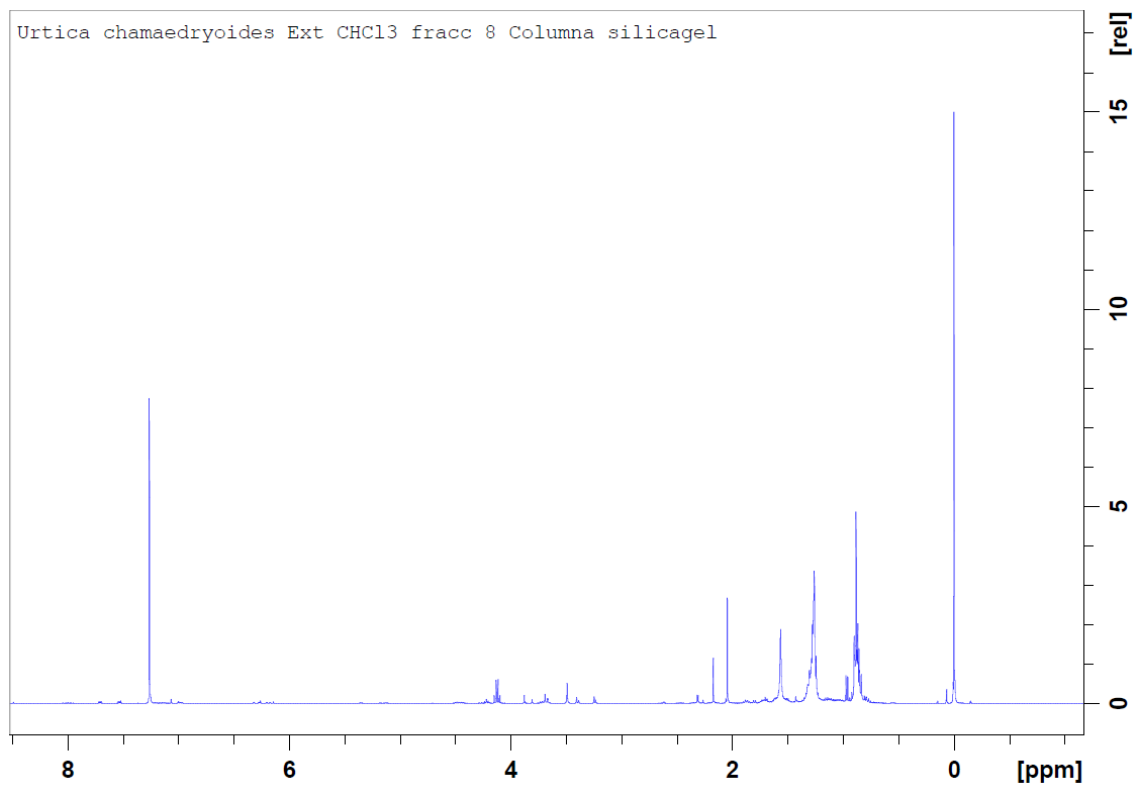


**Figura 14.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 3-4 del extracto clorofórmico.

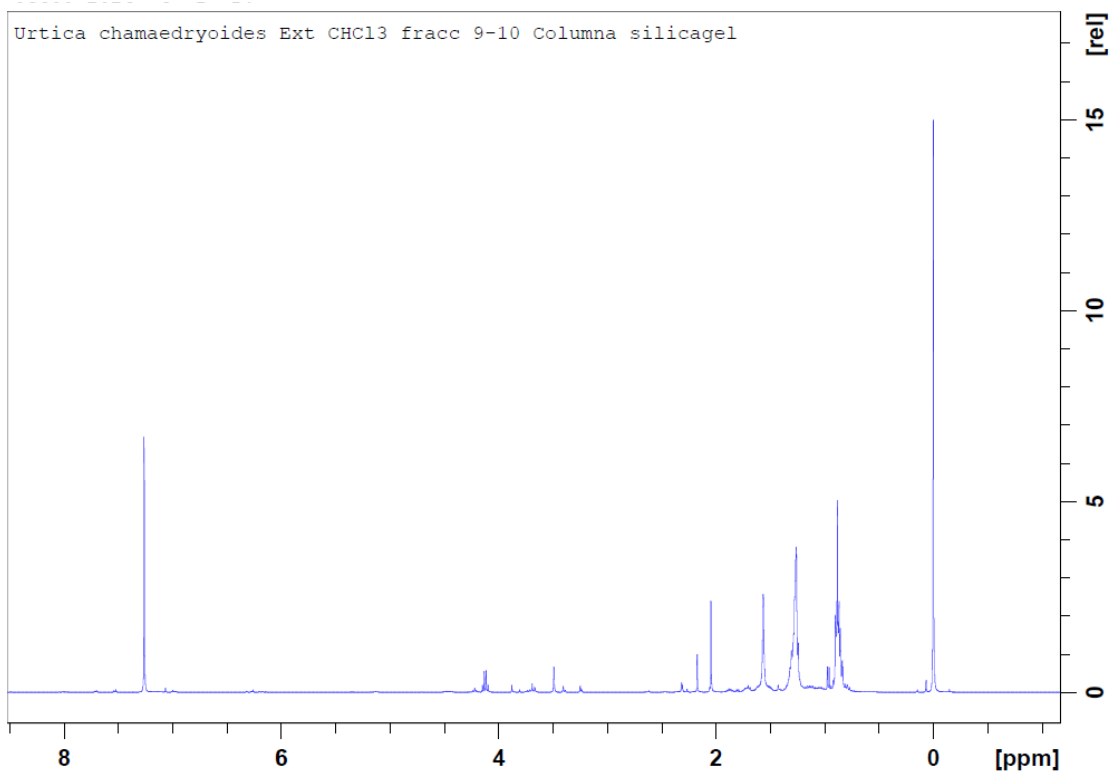




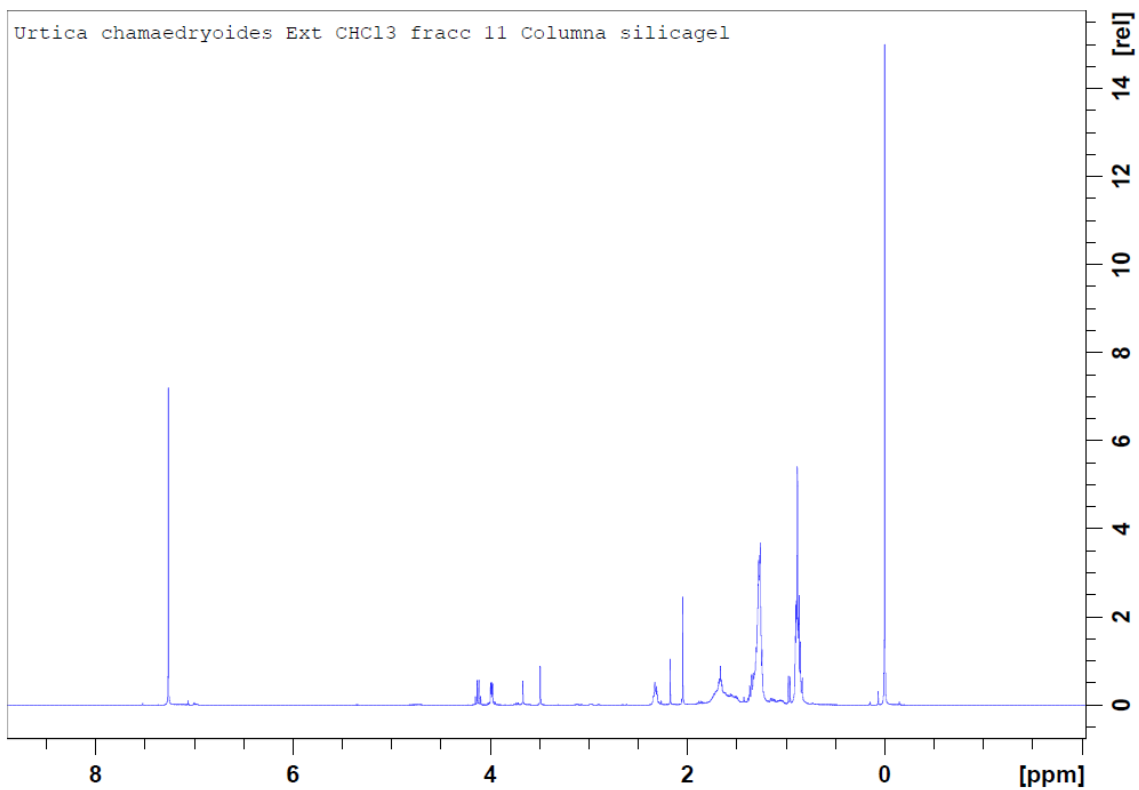
**Figura 15.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 5-7 del extracto clorofórmico.



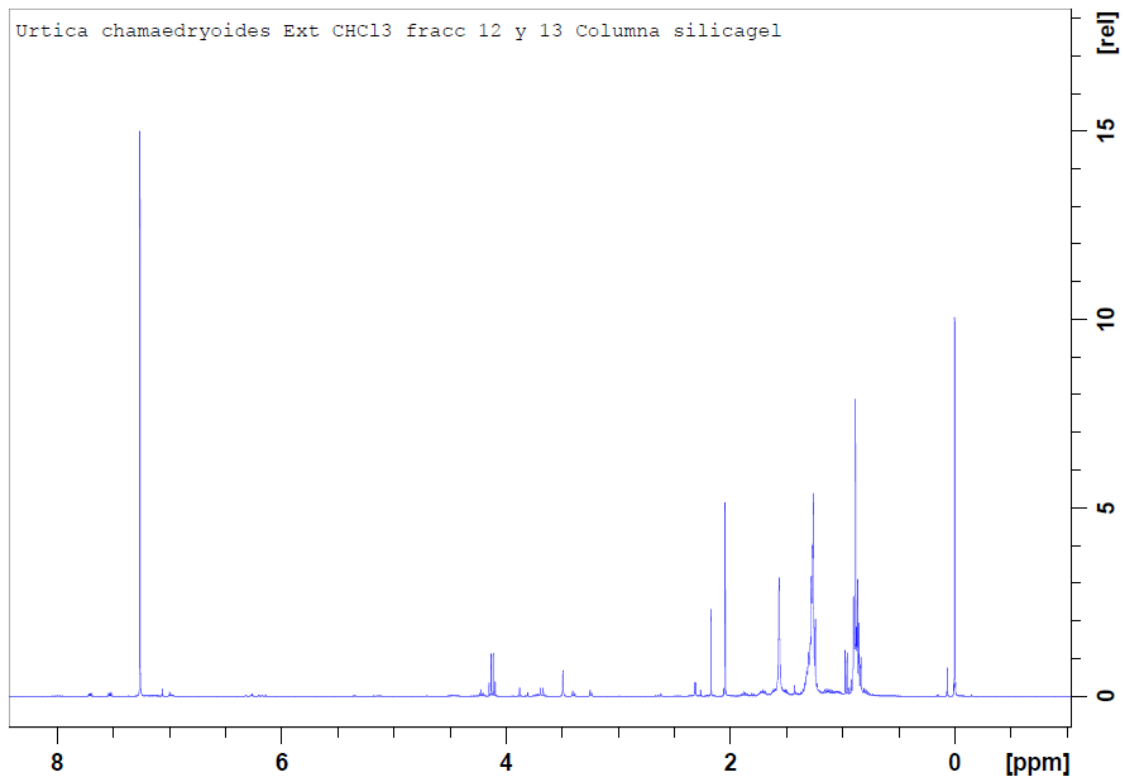
**Figura 16.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 8 del extracto clorofórmico.



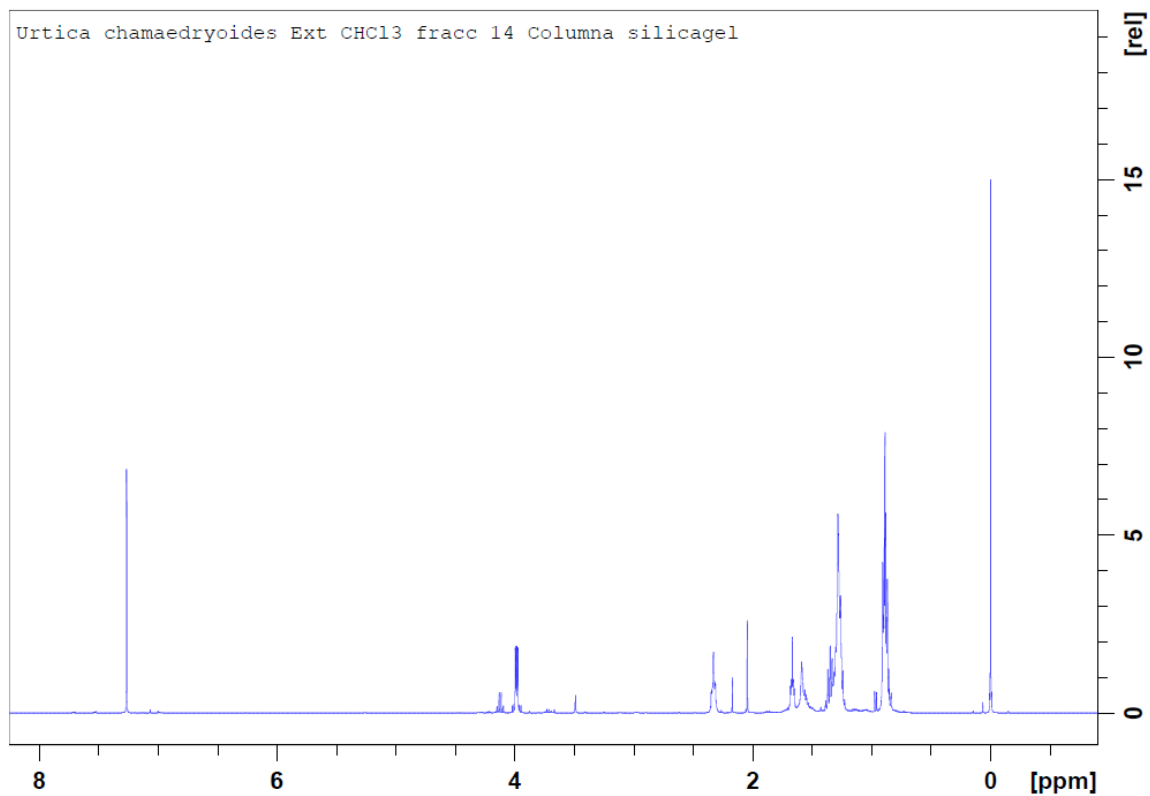
**Figura 17.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 9-10 del extracto clorofórmico.



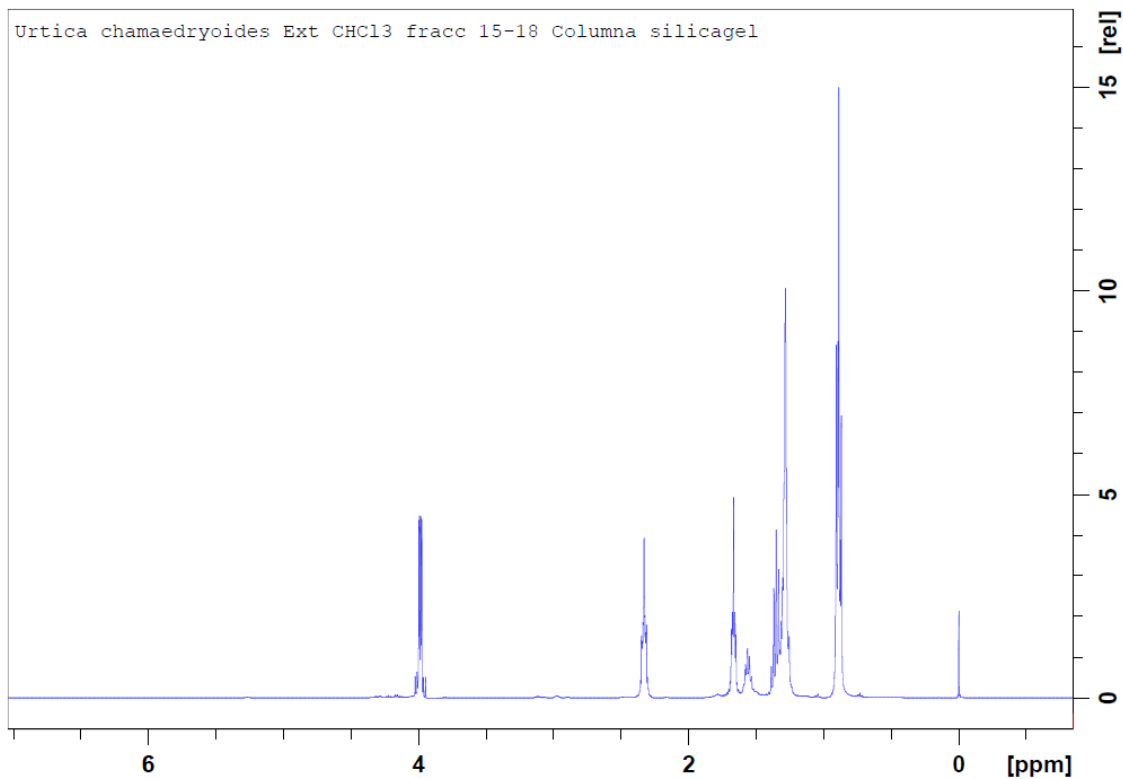
**Figura 18.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 11 del extracto clorofórmico.



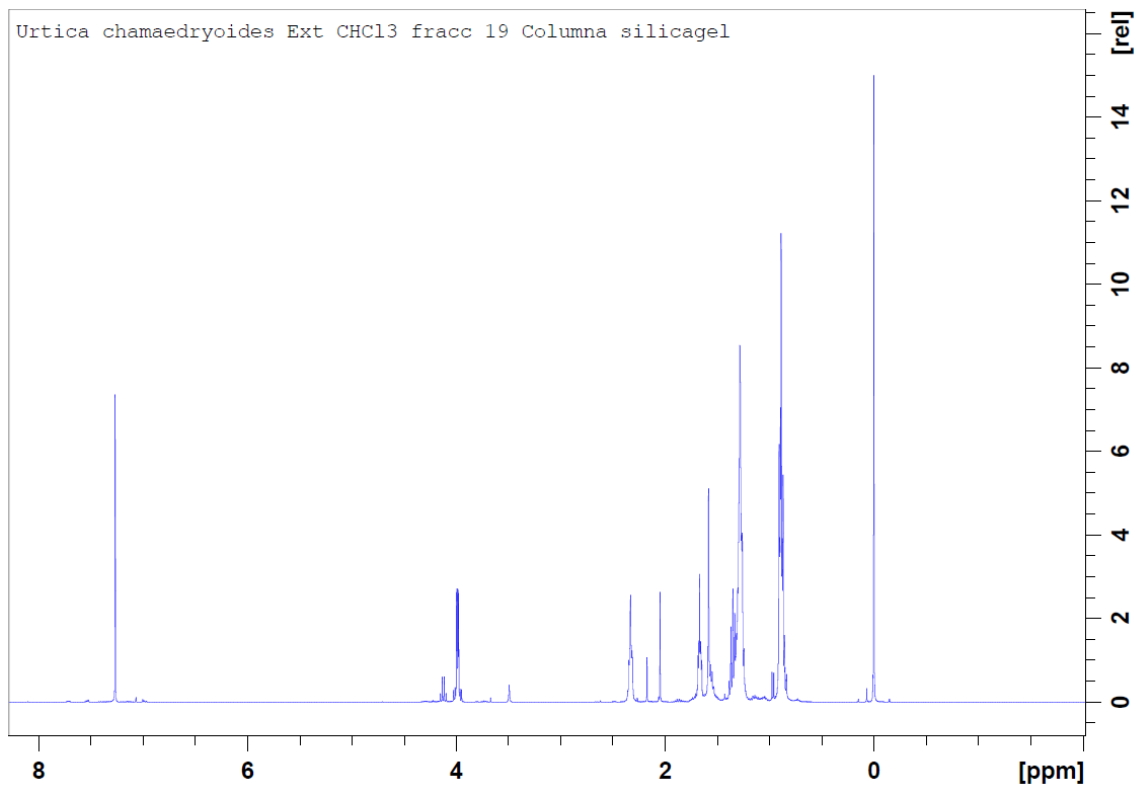
**Figura 19.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 12-13 del extracto clorofórmico.



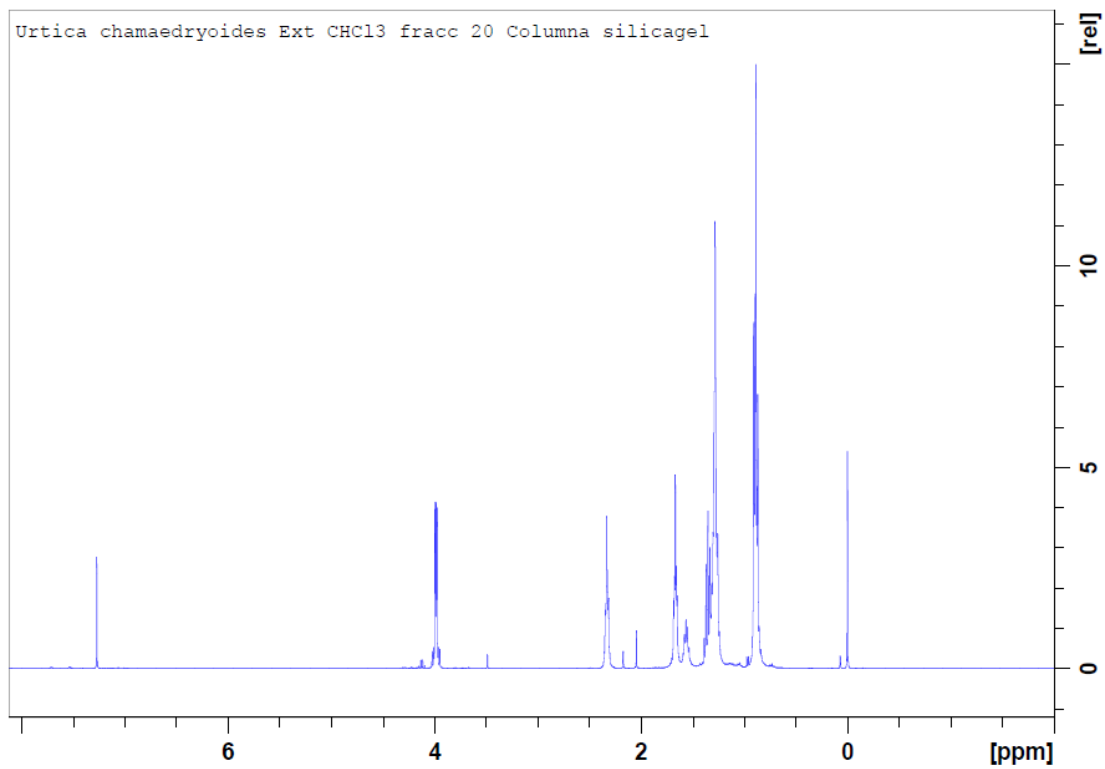
**Figura 20.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 14 del extracto clorofórmico.



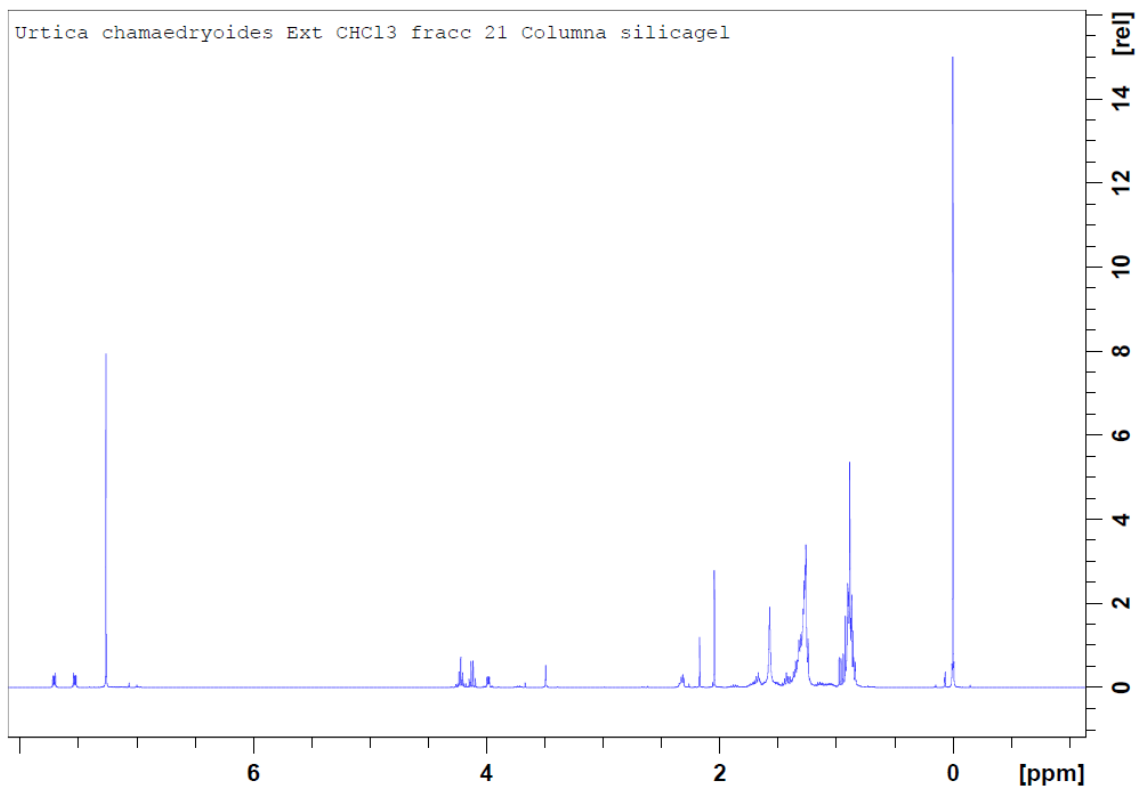
**Figura 21.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 15-18 del extracto clorofórmico.



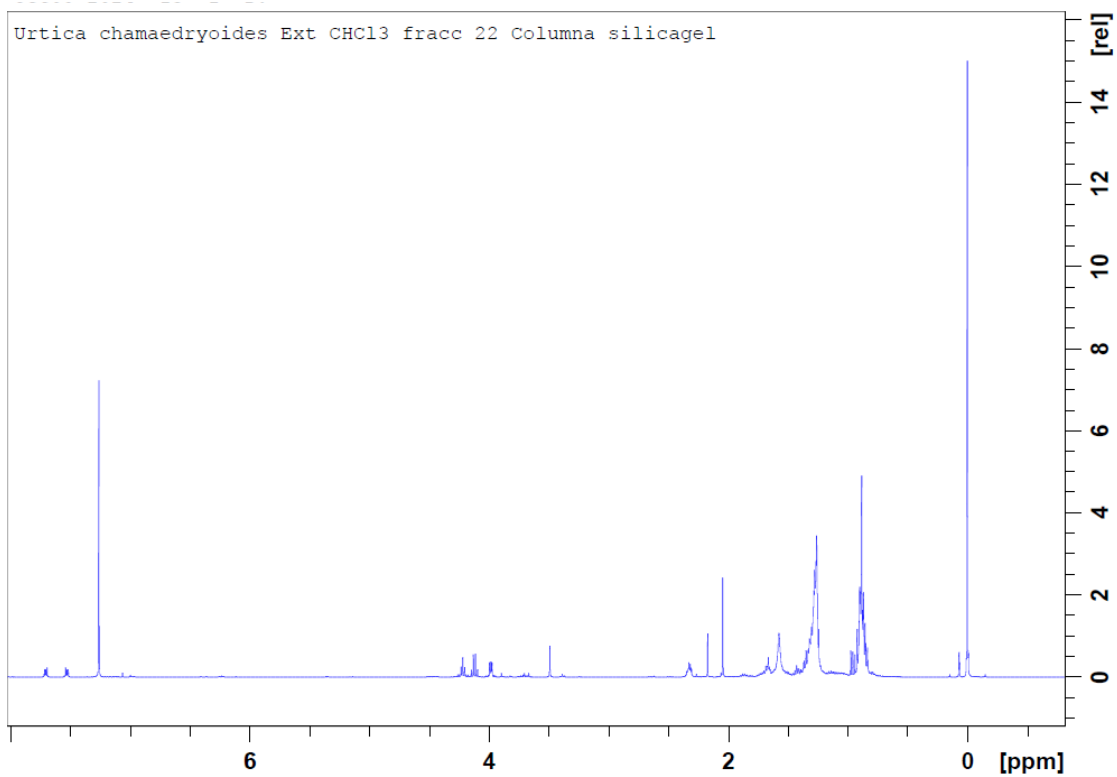
**Figura 22.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 19 del extracto clorofórmico.



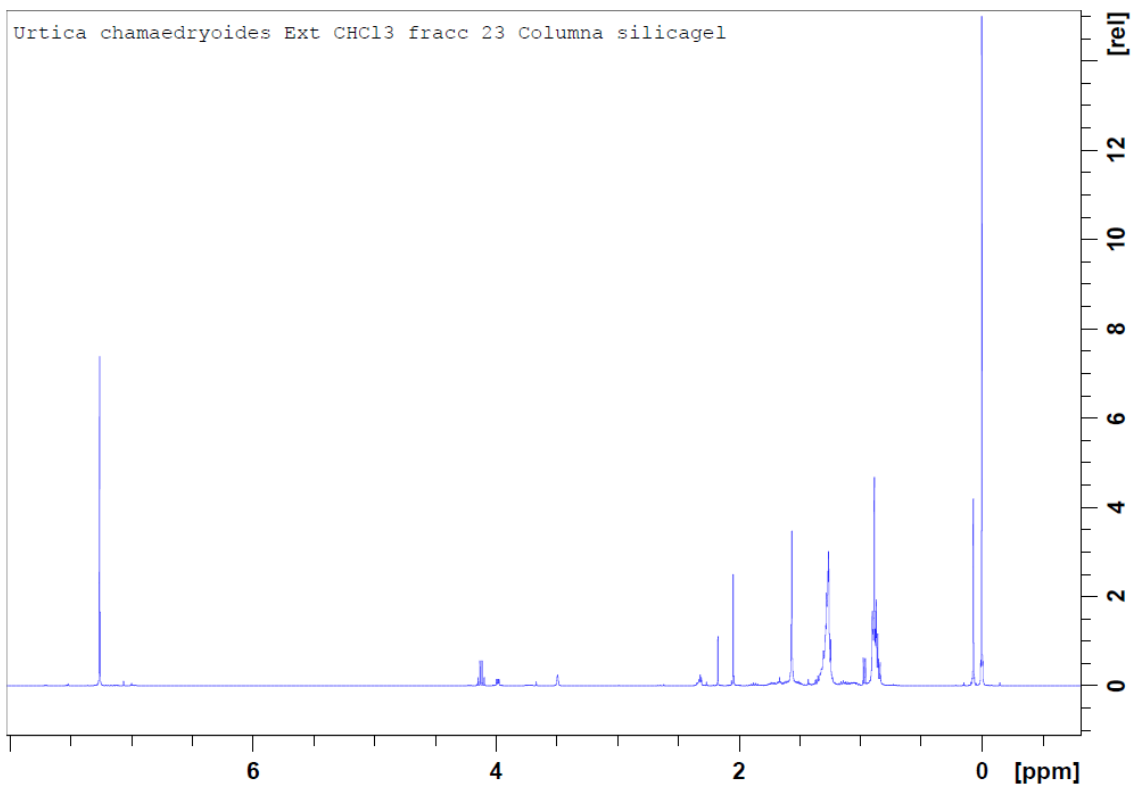
**Figura 23.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 20 del extracto clorofórmico.



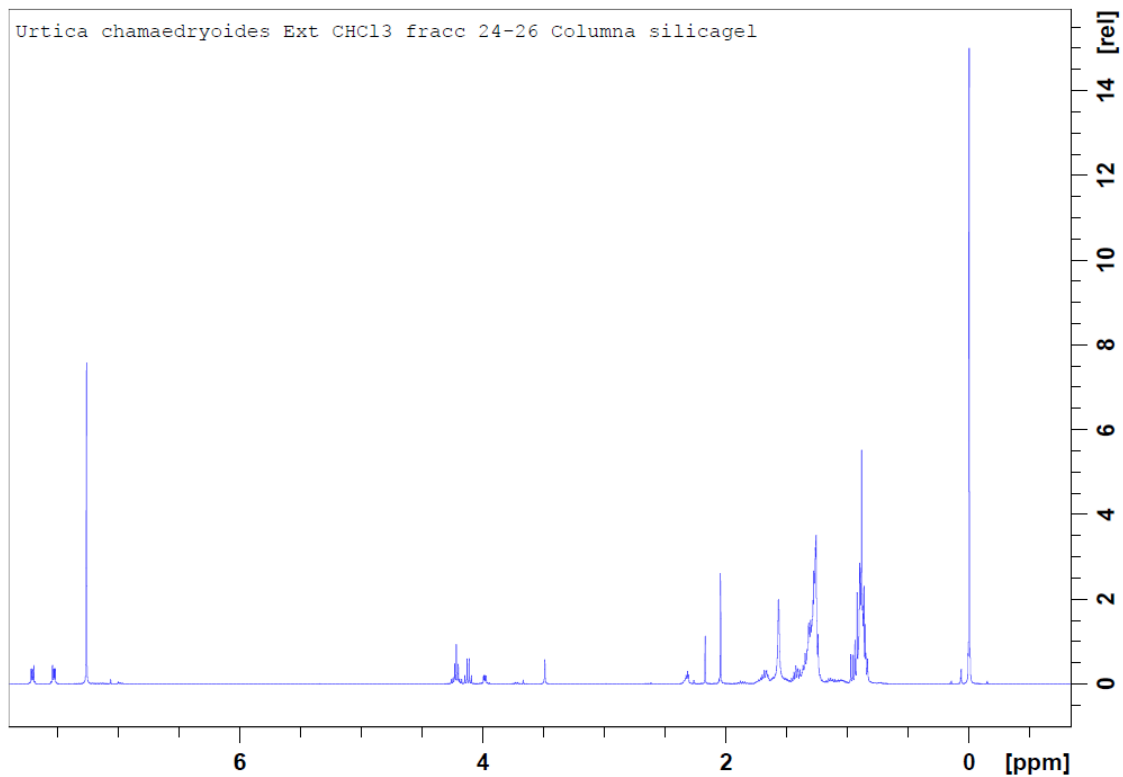
**Figura 24.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 21 del extracto clorofórmico.



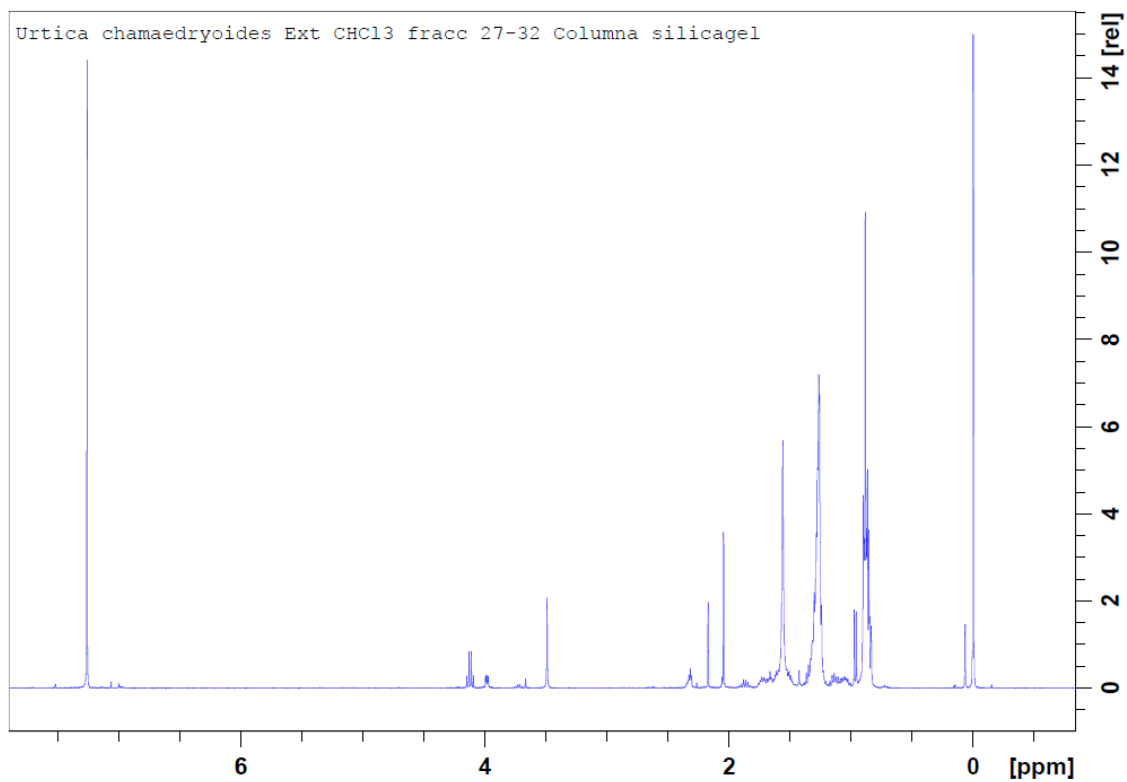
**Figura 25.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 22 del extracto clorofórmico.



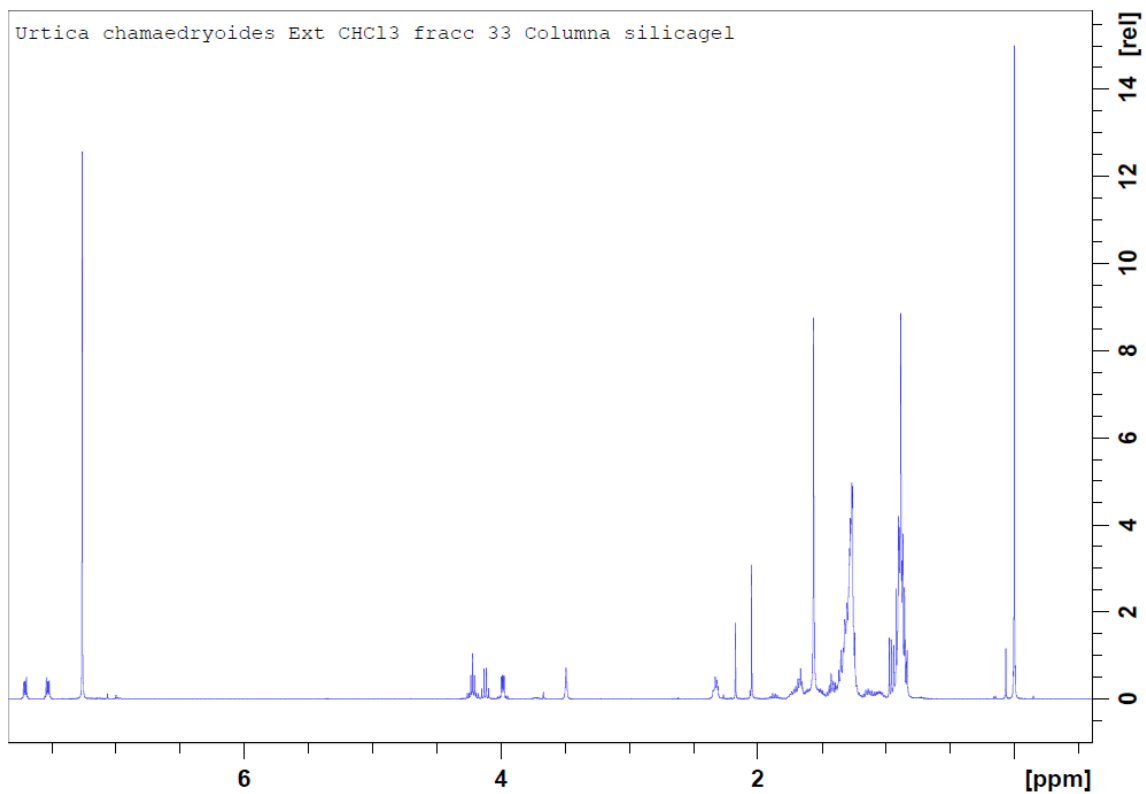
**Figura 26.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 23 del extracto clorofórmico.



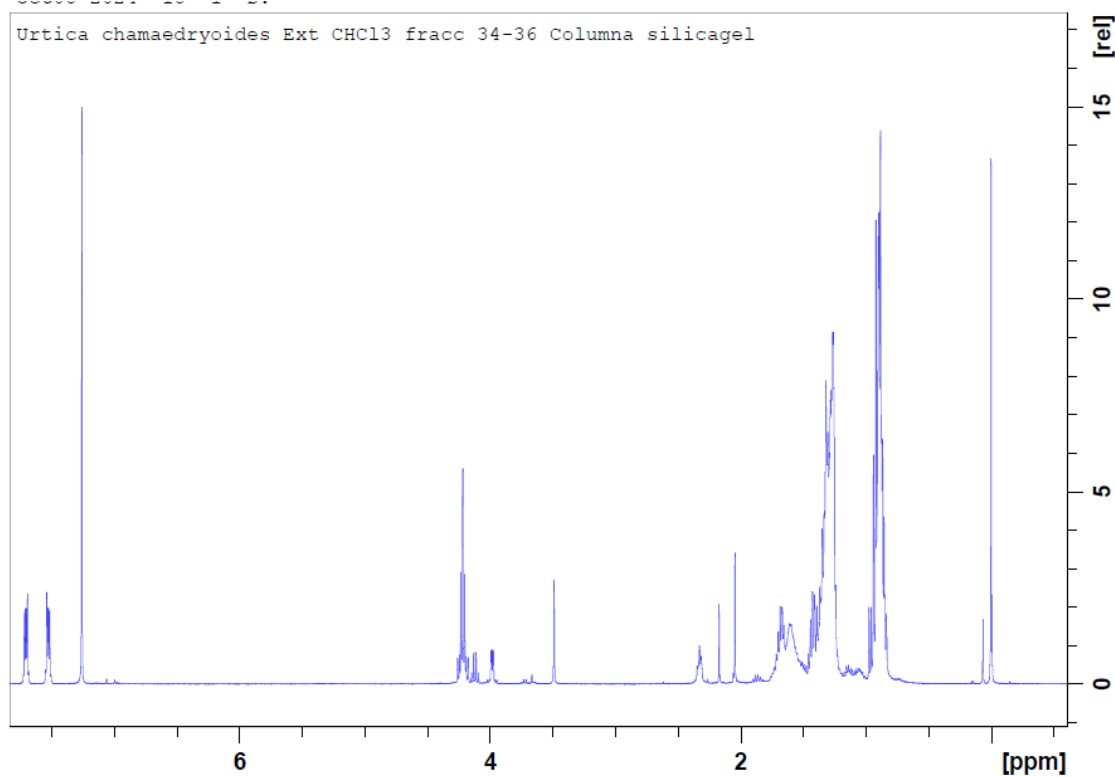
**Figura 27.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 24-26 del extracto clorofórmico.



**Figura 28.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 27-32 del extracto clorofórmico.

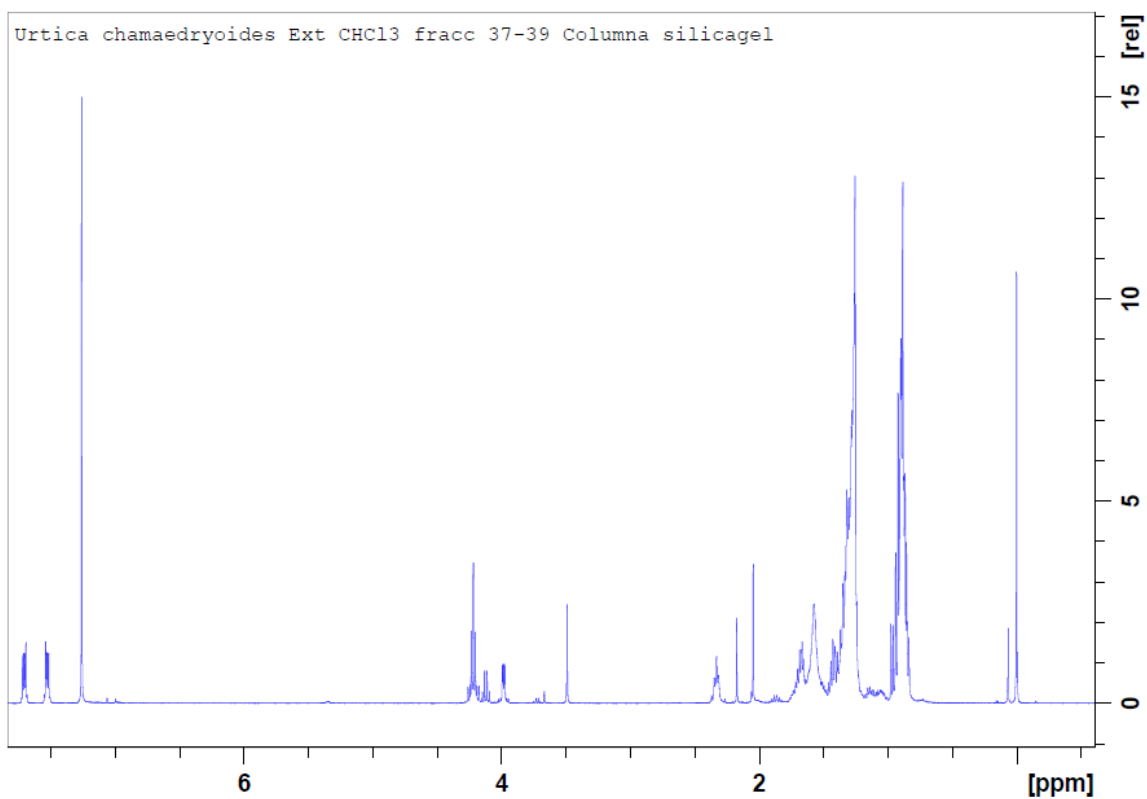


**Figura 29.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 33 del extracto clorofórmico.

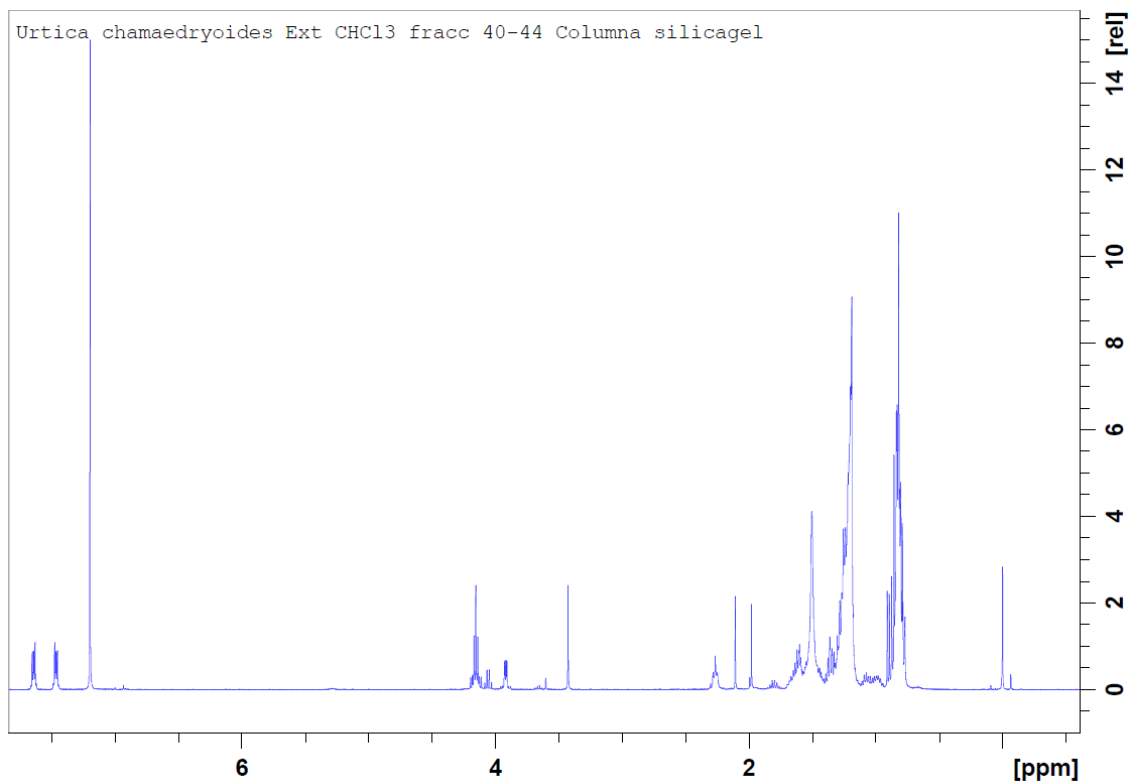


**Figura 30.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 34-36 del extracto clorofórmico.

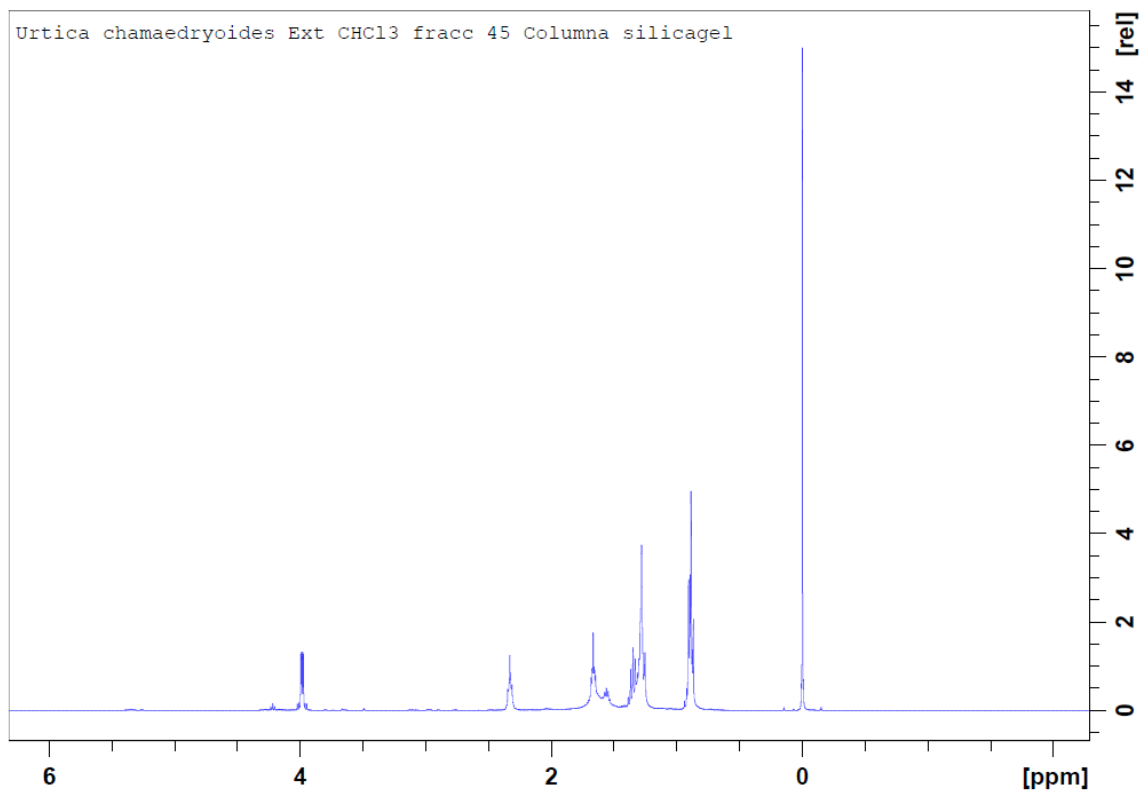




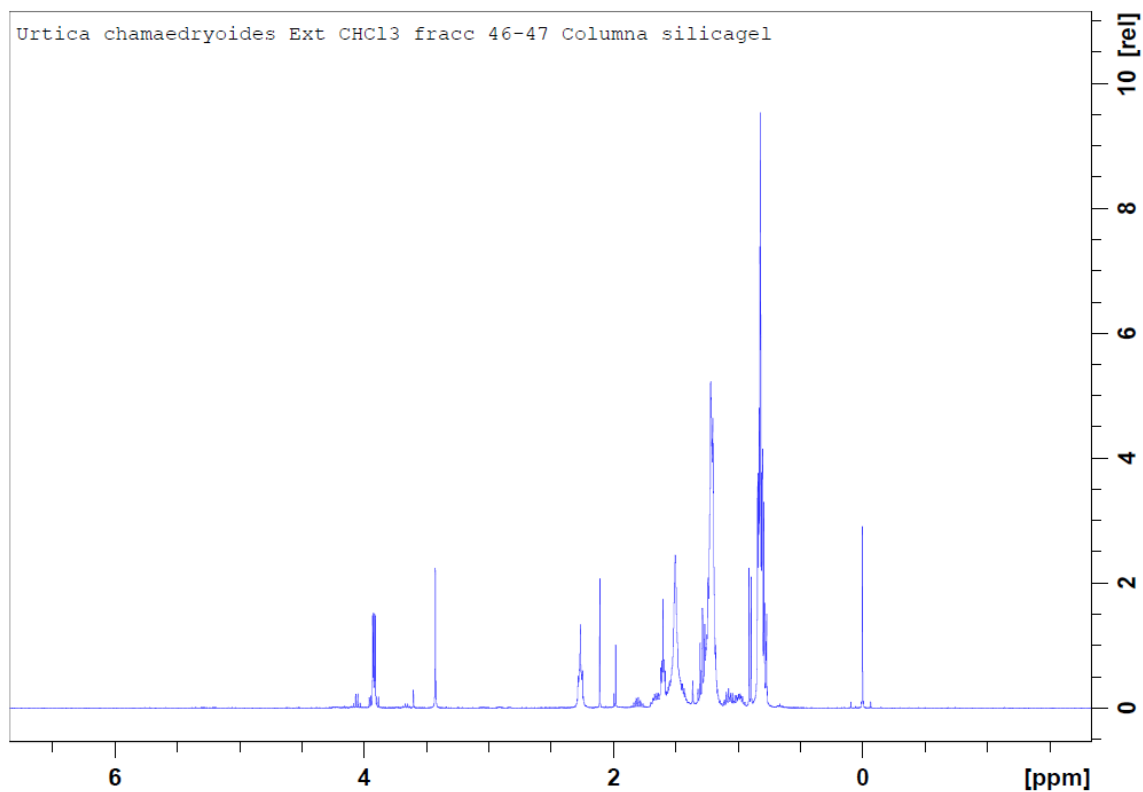
**Figura 31.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 37-39 del extracto clorofórmico.



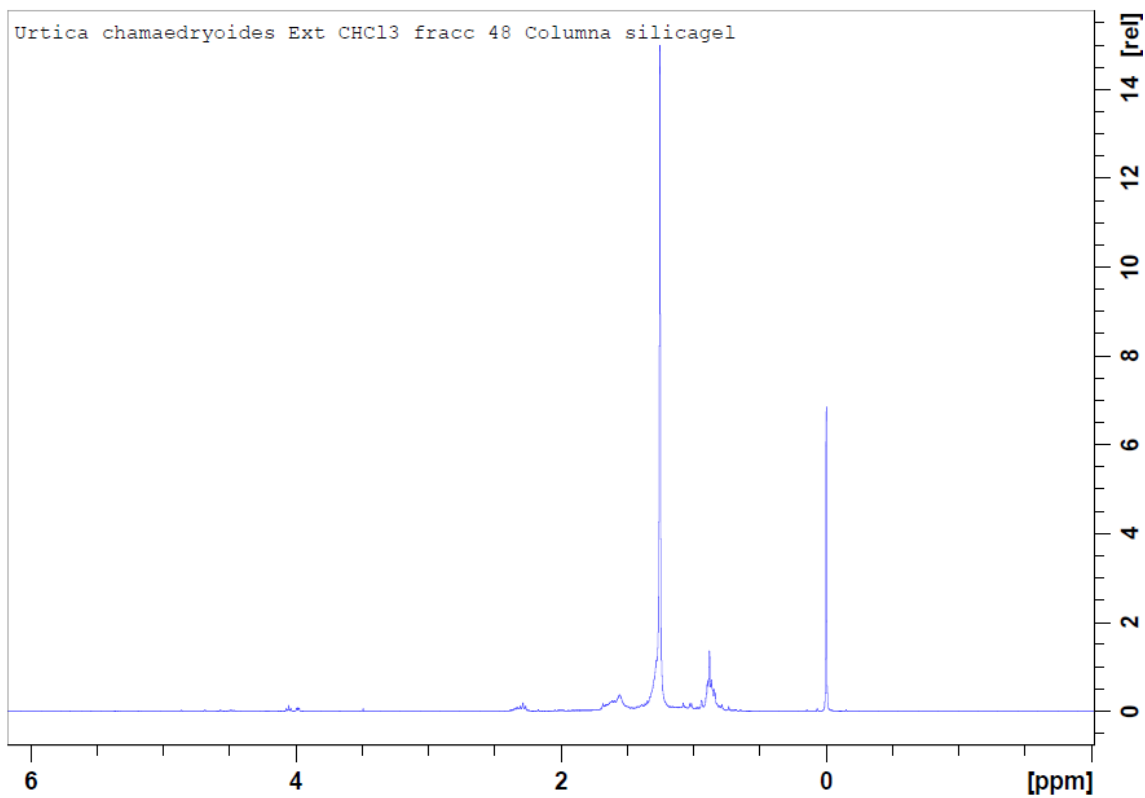
**Figura 32.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 40-44 del extracto clorofórmico.



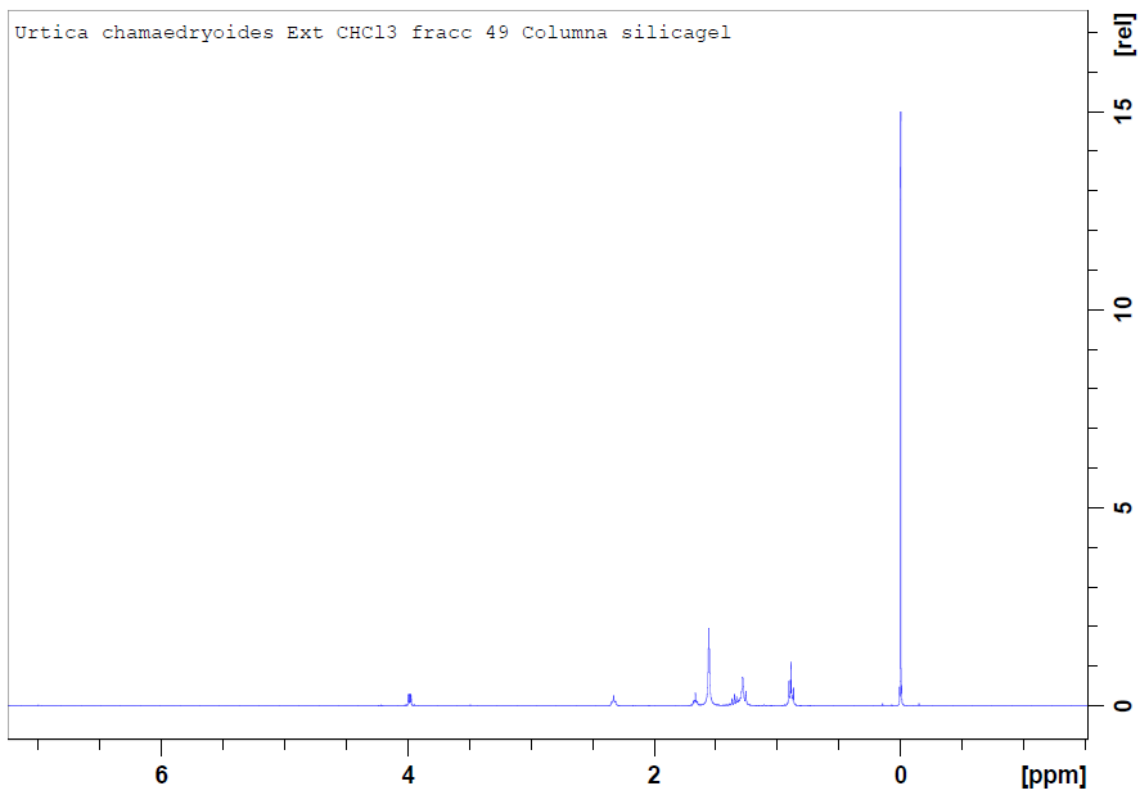
**Figura 33.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 45 del extracto clorofórmico.



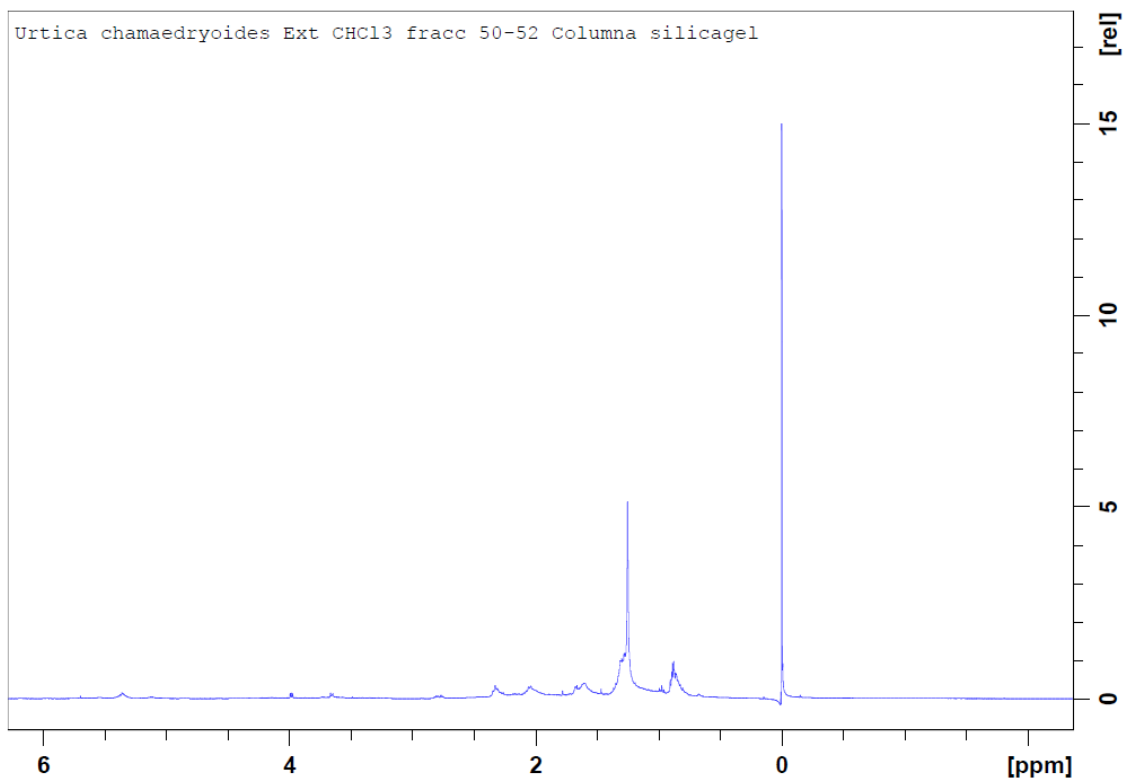
**Figura 34.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 46-47 del extracto clorofórmico.



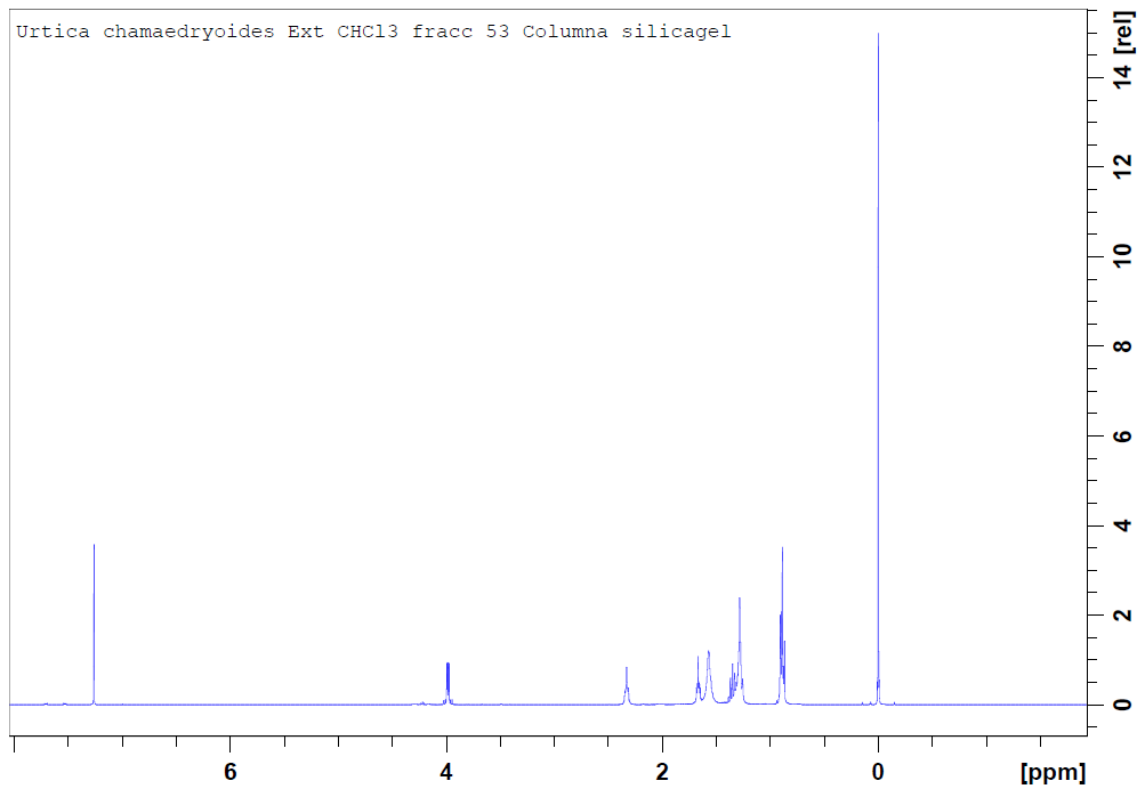
**Figura 35.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 48 del extracto clorofórmico.



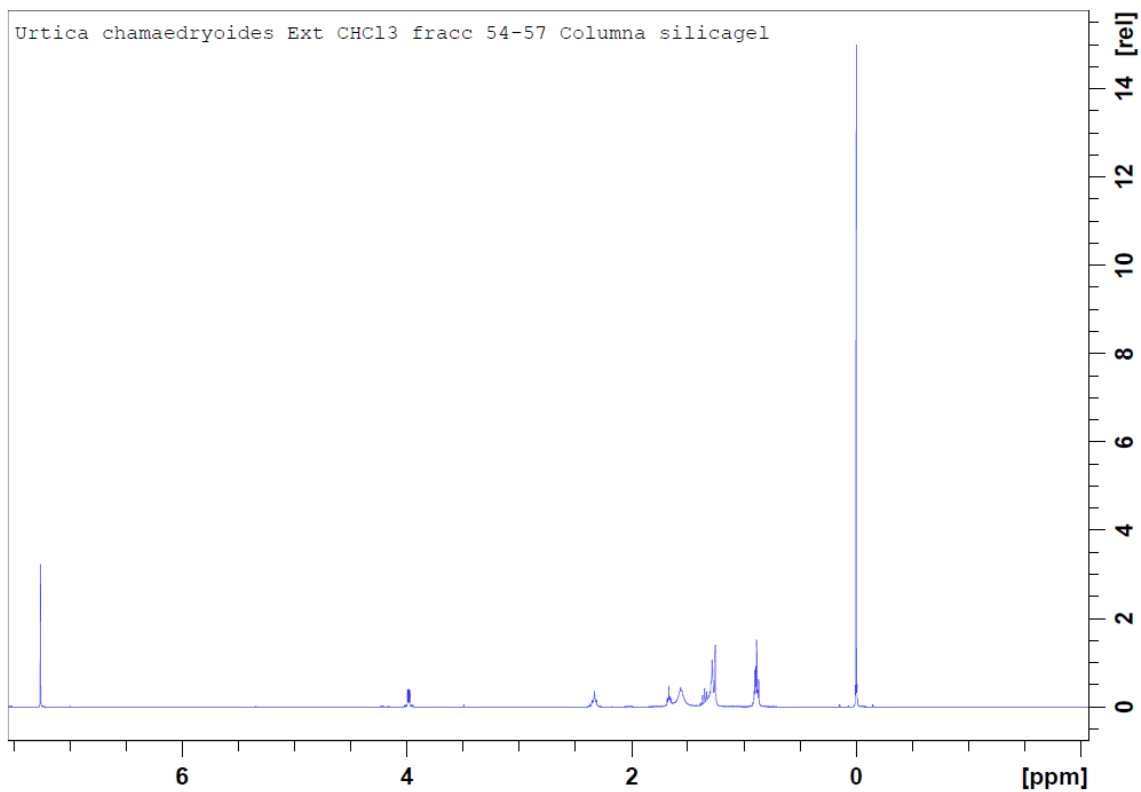
**Figura 36.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 49 del extracto clorofórmico.



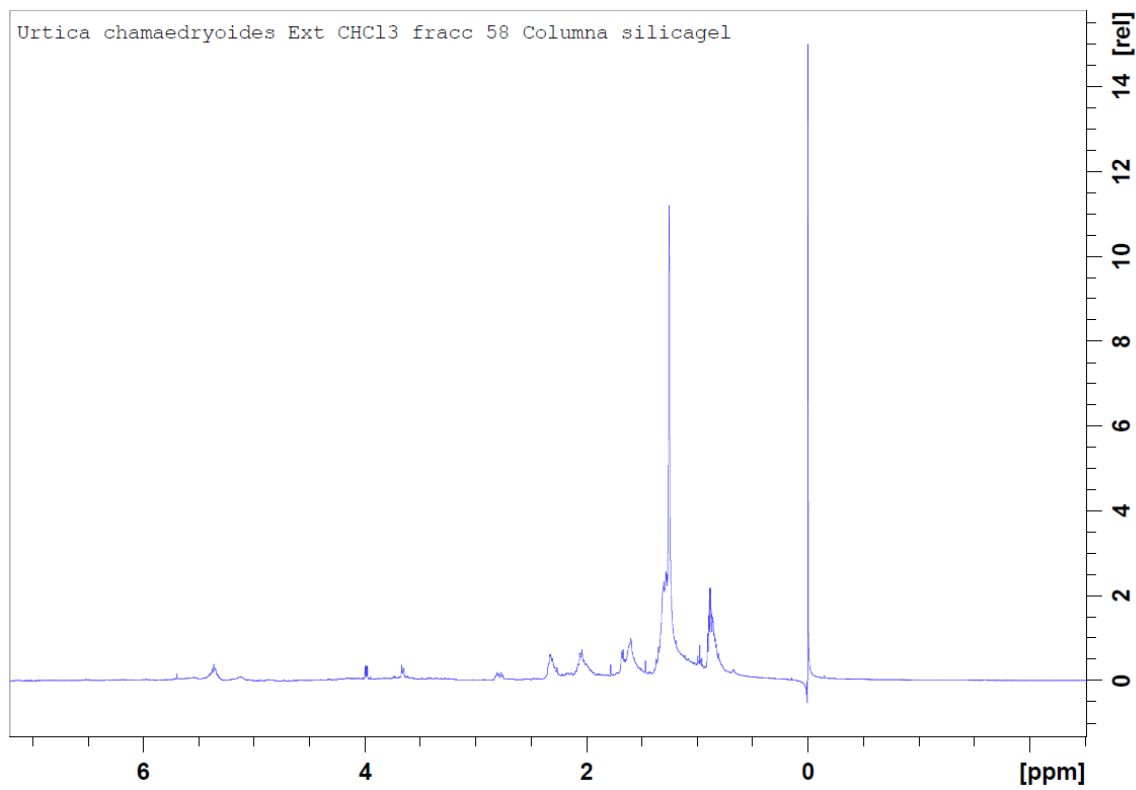
**Figura 37.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 50-52 del extracto clorofórmico.



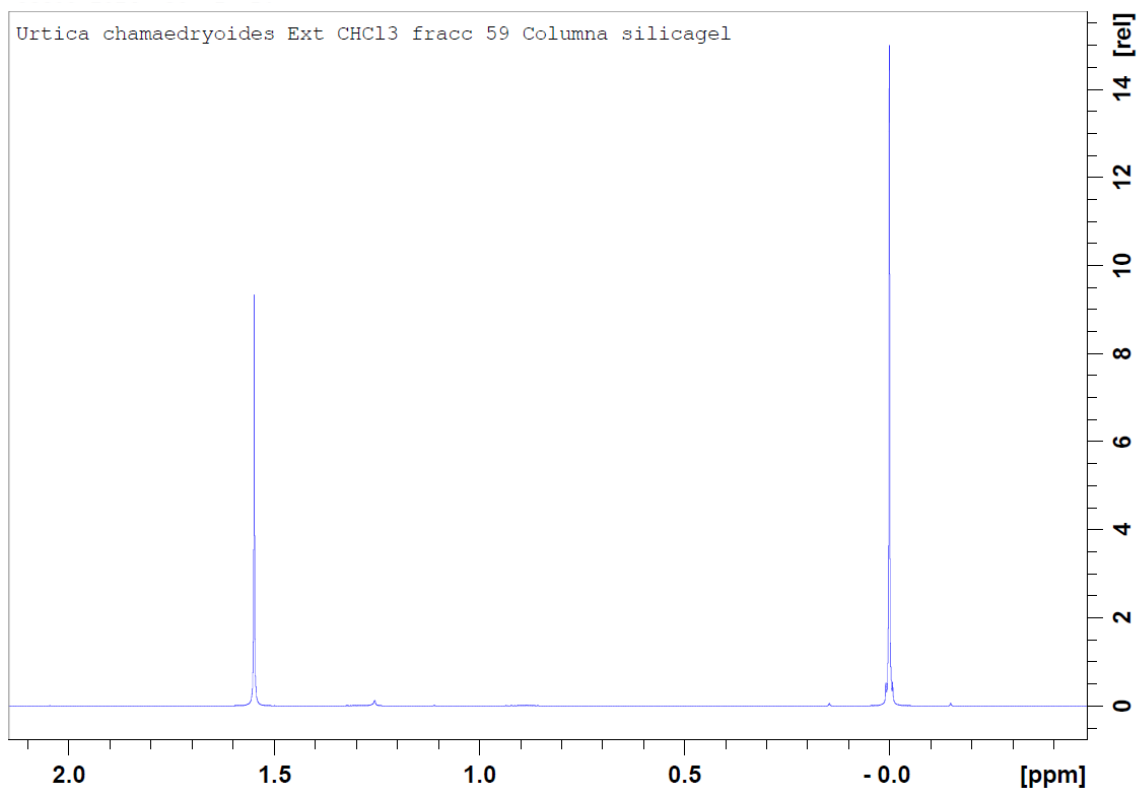
**Figura 38.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 53 del extracto clorofórmico.



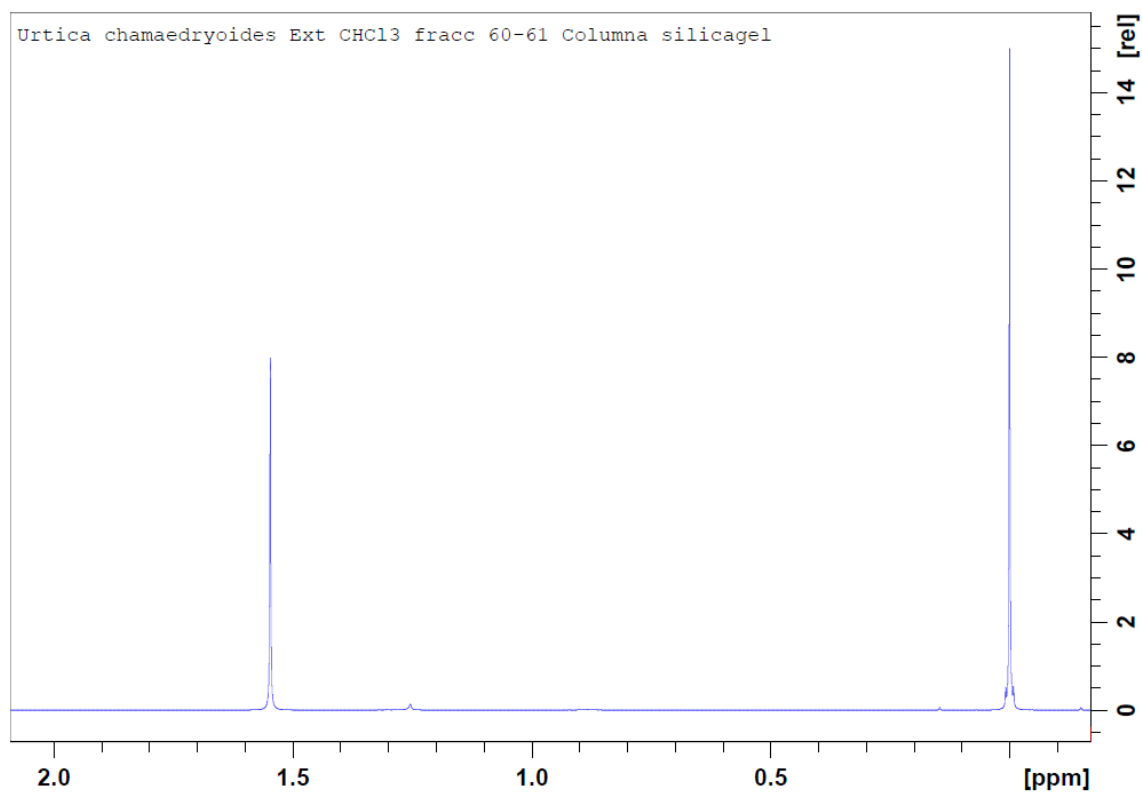
**Figura 39.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 54-57 del extracto clorofórmico.



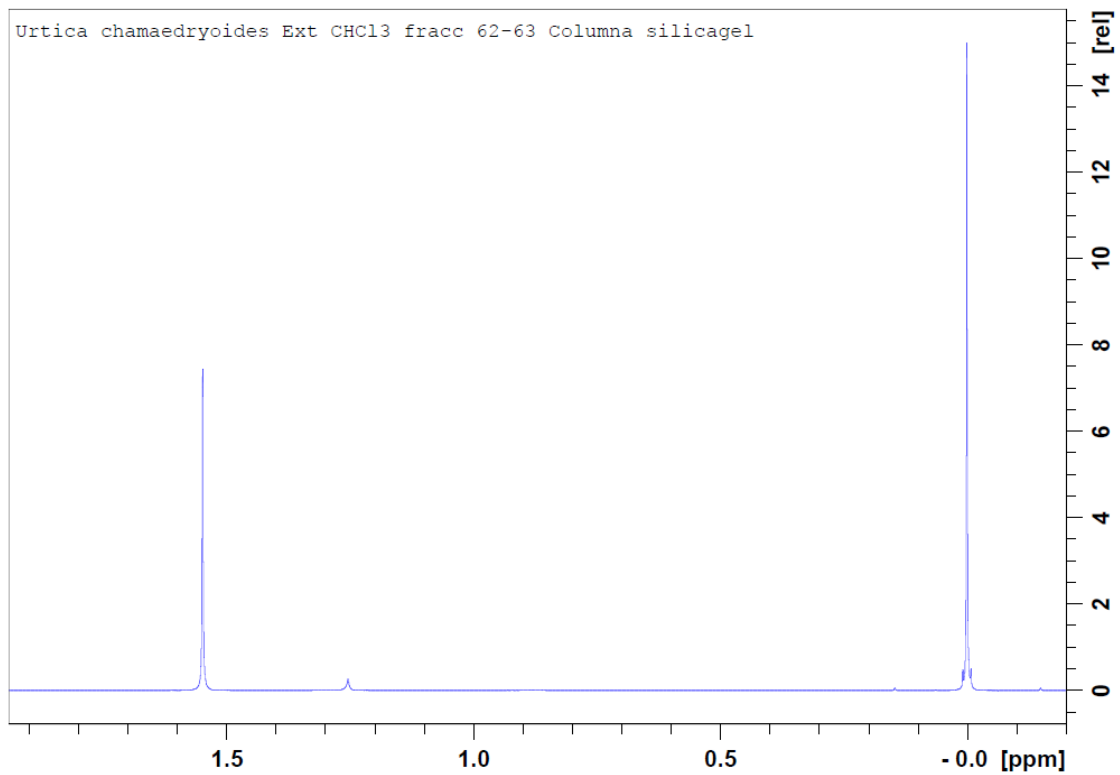
**Figura 40.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 58 del extracto clorofórmico.



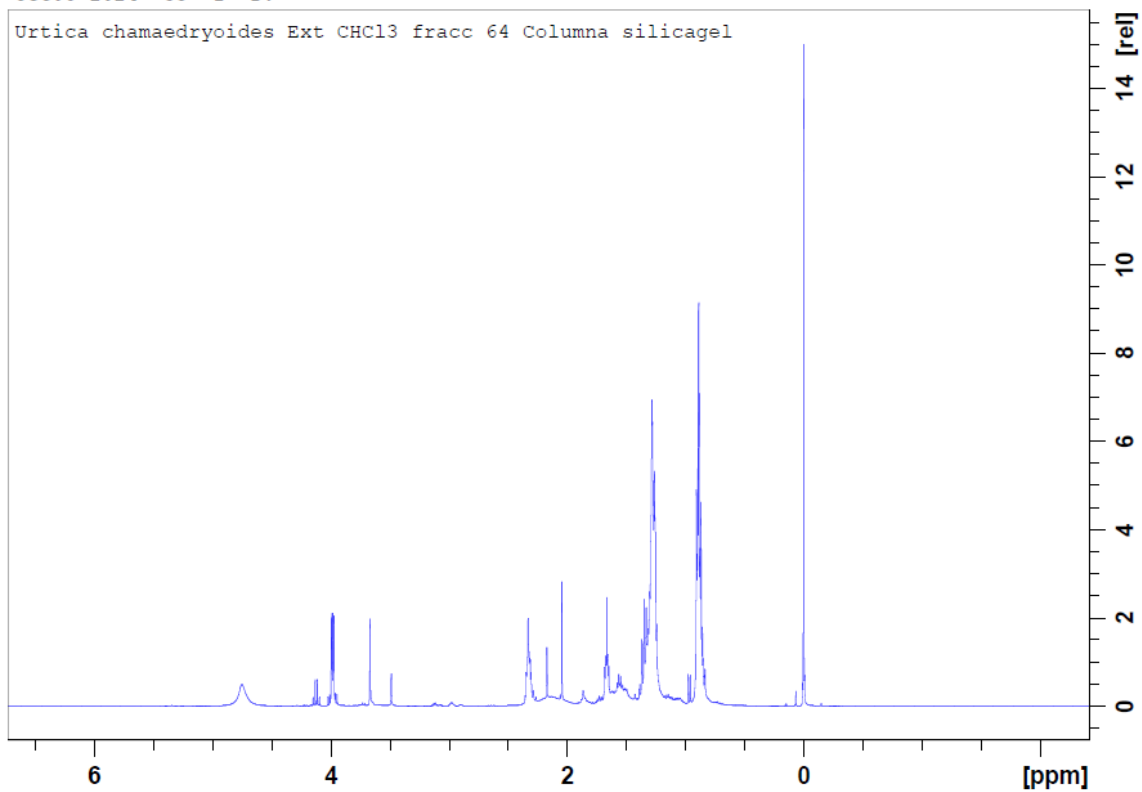
**Figura 41.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 59 del extracto clorofórmico.



**Figura 42.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 60-61 del extracto clorofórmico.



**Figura 43.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de las fracciones 62-63 del extracto clorofórmico.



**Figura 44.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción 64 del extracto clorofórmico.