

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Actividad Antimicrobiana y Relación Estructura Actividad
del Alcaloide Berberina y Compuestos Derivados**



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

TODO LO ILUMINAN

Que para obtener el Título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

Presenta

Ana Sarahí Alegría Hernández

Hermosillo, Sonora

Diciembre de 2017

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**

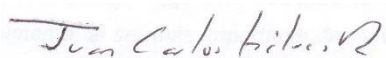


Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Esta tesis se realizó en los laboratorios del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora, bajo la dirección del Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz y asesoría del M.C. Mario Alberto Leyva Peralta.

FORMA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Ana Sarahí Alegría Hernández la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico en Alimentos.



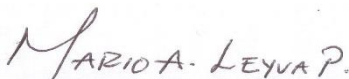
Dr. Juan Carlos Gálvez Ruiz

Presidente



Dra. Abril Zoraida Graciano Verdugo

Secretario



M.C. Mario Alberto Leyva Peralta

Vocal



Dr. Víctor Manuel Ocaño Higuera

Suplente

DEDICATORIA

A mi familia por su cariño y apoyo, pero, sobre todo, por su paciencia a lo largo de este proceso. A mis tíos (Tomas, Zulema) por su enorme amor y ser mis segundos padres. A ese pequeño ángel que llegó a mi vida para llenarla de felicidad, Ramón Ángel, pero especialmente, al ser más importante de mi vida, mi eterno amor, mi motor, mi inspiración, mi soporte y mi amor incondicional, MI MADRE.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité sinodal: Dr. Juan Carlos Gálvez Ruíz, mi director de tesis, por permitirme formar parte de su grupo de investigación, Dra. Abril Graciano, Dr. Víctor Ocaño y M.C. Mario Leyva, por su apoyo, disponibilidad e invaluable consejos.

A mis impulsores en el mundo de la investigación, mis maestros de vida y mejores amigos, Mario Leyva y Edgard Esquer, sin duda alguna mis mayores ejemplos de dedicación, esfuerzo y trabajo. Gracias por su extrema paciencia, por sus consejos, por sus palabras de aliento, por convertir mis días de frustración en una nueva motivación, por compartir sus conocimientos conmigo y dejarme ser parte de su vida, ustedes ya son una parte muy importante en la mía. En fin, por todo el tiempo y apoyo brindado. Porque si hay un problema... Haz un TLC. ¡GRACIAS!

A mi segunda familia (Ephraim, Sughey, Belem, Joel) por adoptarme con tanto amor, por su apoyo en cada momento difícil, por compartir mis logros y mis alegrías; por siempre estar presente y aguantarme en mis momentos de debilidad; por sus innumerables palabras de aliento y su fe en mí.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Wenceslao, Angela, Dulce, Shava, Judas y Lili por acompañarme a lo largo de este proceso, por amistad y hacer de mis días una aventura.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
General	3
Particulares	3
REVISIÓN DE LA LITERATURA	4
Resistencia a Antimicrobianos	4
Metabolitos Secundarios	5
Alcaloides	7
Berberina y Actividad Biológica	11
Modificaciones Químicas de Berberina	12
METODOLOGÍA	13
Reacciones de Modificación	13
Hidrólisis del Grupo Acetal: Reacción con Tricloruro de Boro (BCl_3)	13
Asociación del Alcaloide con Ácido Geránico y Ácido Sórbico: Reacción de Esterificación de Stenglich	13
Purificación, Identificación y Caracterización	15
Aislamiento y Purificación	15
Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	15
Espectroscopia de Infrarrojo (IR)	15
Espectrometría de Masas (MS)	16
Punto de Fusión	16
Actividad Antimicrobiana	16

Relación Estructura Actividad	17
Análisis Estadístico	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
Identificación y Caracterización	18
Evaluación Antimicrobiana	26
Análisis de Relación Estructura Actividad	38
CONCLUSIONES	41
RECOMENDACIONES	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	MIC ₅₀ de los compuestos: berberina, 2,3-DHPB, 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS	28

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Ejemplos de principales grupos de metabolitos secundarios	6
2.	Ejemplos de estructuras de alcaloides con actividad biológica	8
3.	Esqueleto base de un alcaloide protoberberínico	9
4.	Esqueleto base de un alcaloide bencilquinolina	9
5.	Estructura base de aporfirina:aporeina	10
6.	Esqueleto base de pavina	10
7.	Estructura base de alcaloide bencilisoquinolinas: berbamina	11
8.	Síntesis del compuesto 2,3-dihidroxiprotoberberina	14
9.	Reacción de esterificación del compuesto 2,3-dihidroxiprotoberberina con compuestos de tipo ácido carboxílico	14
10.	Espectros de infrarrojo (IR) de berberina y sus compuestos derivados: 2,3-DHPB, 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS	21
11.	Espectro de RMN ¹ H en CDCl ₃ : DMSO-D ₈ de berberina	22
12.	Espectro de RMN ¹ H en CDCl ₃ del compuesto 2,3-DHPB	23
13.	Espectro de RMN ¹ H en CDCl ₃ del compuesto 2,3-DHPB-AG	24
14.	Espectro de RMN ¹ H en CDCl ₃ del compuesto 2,3-DHPB-AS	25
15.	Actividad antimicrobiana de berberina, 2,3-DHPB, 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS contra <i>Escherichia coli</i> .	27
16.	Actividad antimicrobiana de berberina, 2,3-DHPB, 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS contra <i>Staphylococcus aureus</i>	27
17.	Actividad antimicrobiana de berberina, 2,3-DHPB, 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS contra <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	28
18.	Cinética de la actividad antimicrobiana de las diferentes concentraciones de berberina	31
19.	Cinética de la actividad antimicrobiana de las diferentes concentraciones de 2,3-DHPB	32
20.	Cinética de la actividad antimicrobiana de las diferentes concentraciones de 2,3-DHPB-AG	33
21.	Cinética de la actividad antimicrobiana de las diferentes concentraciones de 2,3-DHPB-AS	35

22.	Modelos propuestos para el mecanismo de acción de péptidos catiónicos antimicrobianos	36
23.	Estructura de la pared celular de bacterias Gram negativas y Gram positivas	38

RESUMEN

Debido al uso y abuso de los antibióticos, el sector salud enfrenta la problemática de la resistencia a antibióticos que algunos microorganismos, principalmente bacterias, están desarrollando; siendo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y muy recientemente, *Vibrio parahaemolyticus*, las principales bacterias en presentar esta característica. Durante los últimos años, diversas investigaciones se han enfocado al estudio de métodos alternativos para atacar esta problemática, resaltando el análisis de productos naturales. Por lo anterior, en este trabajo se llevó a cabo la modificación química del alcaloide berberina con ácido geránico y ácido sórbico, mediante una reacción de hidrólisis de su grupo acetal obteniéndose el compuesto 2,3-dihidroxiprotoberberina (2,3-DHPB) y, posteriormente, a través de una reacción de esterificación de Steglich, se llevó a cabo la asociación con ácido geránico (AG) y con ácido sórbico (AS), obteniéndose los compuestos 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS, respectivamente. Una vez sintetizados los compuestos, se evaluó la actividad antibacteriana de estos, y de su compuesto precursor, contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*, mediante la técnica de microdilución. Así mismo, se evaluó la relación estructura-actividad. Entre los principales resultados obtenidos, se destaca que berberina mostró una concentración mínima inhibitoria a la cual inhibieron el crecimiento bacteriano en un 50% (MIC₅₀) menor a 100 µg/mL contra *Escherichia coli*. Con respecto a *Staphylococcus aureus*, berberina y 2,3-DHP-AG mostraron una MIC₅₀ menor a 100 µg/mL y 2,3-DHPB-AS presentó una MIC₅₀ entre 100 y 200. Y, finalmente, 2,3-DHPB-AG presentó actividad contra *Vibrio parahaemolyticus* con un rango de MIC₅₀ entre 400 y 800 µg/mL. Después del análisis de la relación estructura-actividad, se encontró que la presencia del grupo acetal, o los ésteres, y la carga positiva en el átomo de nitrógeno son necesarios para mantener la actividad antibacteriana, y que las bacterias Gram (+) pudieran ser más susceptibles a estos compuestos. Además, la actividad antibacteriana podría estar relacionada con la manera de interacción de éstos compuestos catiónicos con la membrana bacteriana (específicamente el modelo alfombra), ya que este se basa en las interacciones iónicas que resultan de la unión de las cargas positivas de los compuestos con las cargas negativas de la membrana bacteriana.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, existe una gran problemática por el abuso de antibióticos. El uso descontrolado de estos, ha generado una deficiencia en su capacidad de ejercer un efecto sobre ciertos microorganismos, ya que estos adoptan ciertas formas de resistencia al ser expuestos a los antimicrobianos. Esto trae como consecuencia la ineficacia de los medicamentos y las infecciones persisten en el organismo, aumentando así el riesgo de propagación a otras personas.

Unos de los principales microorganismos que han desarrollado esta característica de resistencia a los antimicrobianos, son las bacterias, encabezando la lista *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Recientemente, también se han dado registros en los que se afirma que *Vibrio parahaemolyticus* ha presentado esta capacidad de resistencia (OMS, 2016).

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones en las que se buscan nuevas alternativas para combatir esta problemática. Una de las principales ramas de estudio es la evaluación de productos naturales, ya que, tradicionalmente, se utilizaban estos productos, principalmente las plantas, para tratar enfermedades comunes como gripe, dolores de cabeza, malestares estomacales, entre otros.

El avance de estos estudios, han dado a conocer que, las plantas, además de tener un metabolismo primario, que le sirve para llevar a cabo procesos necesarios para su sobrevivencia como fotosíntesis, producción de energía, etc., al verse en condiciones adversas o al ser atacada por organismos (ya sean animales, insectos, virus, bacterias y hongos) estas tienen la capacidad de desarrollar un metabolismo secundario, confiriéndole a la planta la capacidad para protegerse, entre muchos otros factores, contra el exceso de luz solar, contra nematodos, virus, bacterias y hongos, adicionalmente aumentan su competencia en relación con otras plantas (Ávalos y col., 2009).

Se han identificado y caracterizado diversos compuestos producto del metabolismo secundario de las plantas, los cuales han sido clasificados en diferentes grupos. Como ejemplo de ellos se tiene a los terpenos, glucósidos, compuestos fenólicos y alcaloides, siendo estos últimos los de interés para el presente trabajo. Diferentes estudios han demostrado la capacidad que tienen los alcaloides de producir una respuesta nerviosa y conferir propiedades analgésicas, antiinflamatorias, antiviral, anticancerígena y

antibacterial, entre muchas otras. Específicamente, en este trabajo se evaluará el alcaloide berberina, el cual se ha reportado tiene propiedades anticancerígenas, antivirales, antifúngicas, bactericidas y bacteriostáticas (Kupeli y col., 2002; Hahn y Ciak, 1976). Además, otros análisis han avalado que su modificación química aumenta las capacidades biológicas antes mencionadas (Leyva y col., 2017).

Es por esto que, para el presente trabajo se planteó como objetivo, evaluar la actividad antimicrobiana del alcaloide berberina, y sus derivados, modificados químicamente a través del rompimiento del grupo acetal (metilendioxi, $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$) y la asociación química con moléculas alifáticas tipo ácido carboxílico (ácido geránico y ácido sórbico), contra las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

OBJETIVOS

General

Evaluar la actividad antibacteriana del alcaloide berberina y de sus derivados modificados químicamente con ácido geránico y ácido sórbico, contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Vibrio parahaemolyticus* y establecer una relación estructura-actividad.

Particulares

- I.- Modificar el alcaloide berberina con ácido geránico y ácido sórbico.
- II.- Determinar el efecto de la modificación química de berberina en su actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Vibrio parahaemolyticus*.
- III.- Realizar un análisis para establecer la relación estructura-actividad (REA) de berberina y sus derivados.

REVISIÓN DE LA LITERATURA

Resistencia a Antimicrobianos

Según datos de la organización mundial de la salud (OMS), la resistencia a antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivirales o antihelmínticos, etc.), se produce cuando los microorganismos (hongos, bacterias, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a ellos. Como consecuencia, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que aumenta el riesgo de propagación a otras personas. Sin antimicrobianos eficientes, diversos procedimientos médicos como trasplantes de órganos, quimioterapias, tratamientos contra diabetes, entre otros, se convertirán en intervenciones de muy alto riesgo.

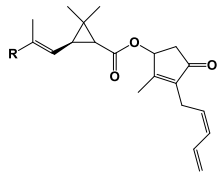
Esta resistencia aparece de forma natural con el tiempo, ya que estos microorganismos logran modificarse genéticamente y, aunado a esto, el mal uso y el abuso de los antibióticos, profundizan esta característica. Los agentes involucrados (microorganismos) generalmente se encuentran presentes en las personas. Sin embargo, también pueden estar presentes en animales y el medio ambiente. La transmisión puede ser dada de persona a persona o incluso, de animales a personas. Un mal control de infecciones, condiciones insalubres y hasta la manipulación inadecuada de alimentos promueven dicha oposición a los antimicrobianos. Actualmente, este problema es global. Los pacientes con infecciones causadas por bacterias farmacorresistentes, son los más propensos a tener malos pronósticos clínicos e incluso llegar a la muerte. Además, estas personas tienden a consumir más recursos, en comparación a los infectados por bacterias no resistentes. Un informe presentado por la OMS revela que la resistencia a las fluoroquinolonas (fármaco utilizado para atacar enfermedades urinarias por *Escherichia coli*) está muy extendida, de igual manera, menciona que el tratamiento de infecciones por *Staphylococcus aureus* con fármacos de primera línea, es ya, generalizada. Así mismo, una guía de sanidad, publicada por la OMS, indica la importancia que actualmente tiene *Vibrio parahaemolyticus*, respecto a esta característica, ya que, además, de ser un indicativo de salubridad en productos marinos, también hay reportes que indican su resistencia a antibióticos (OMS, 2016).

Metabolitos Secundarios

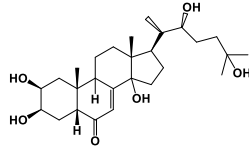
Cuando se habla de productos naturales se hace referencia a los extractos o sustancias que se obtienen de organismos vivos tales como bacterias, algas, hongos, animales y plantas (Pérez, 2006) y que, generalmente, tienen un uso medicinal o tradicional.

Ávalos y col. (2009) dicen que, a diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado, y de la energía, a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos. Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Estos metabolitos se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, familia o incluso algunas especies (Ávalos y col., 2009). En general, los metabolitos secundarios se sintetizan en respuesta a un estímulo ambiental específico, tales como un daño inducido por un herbívoro, por infecciones o por privación de nutrientes (Dickschat, 2011). Dichos productos les ayudan a las plantas a defenderse contra microorganismos tales como bacterias, hongos y virus, contra herbívoros, así como también a adaptarse a los cambios climáticos específicos para cada región (Agustini-Costa y col., 2012).

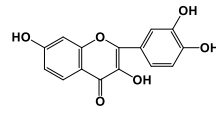
Una simple clasificación de metabolitos secundarios es la que describen Agustini-Costa y col. (2012), en la cual incluyen (Figura 1): terpenos (tales como glucósidos cardiotónicos, carotenoides, compuestos volátiles y esteroides), compuestos fenólicos (tales como ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos, estilbenos, flavonoides y taninos) y compuestos que contienen nitrógeno (tales como alcaloides y glucosinolatos).



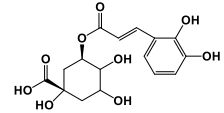
Piretrina I



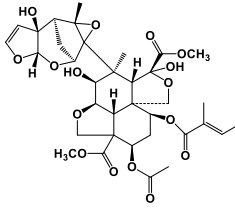
Ecdisona



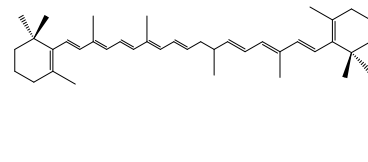
Flavonoles



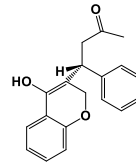
Ácido cafeico



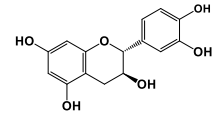
Azadiractina



β-Caroteno



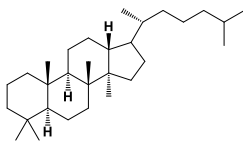
Warfarina



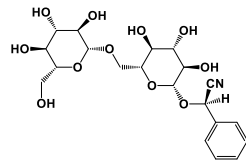
Catequina

Terpenos

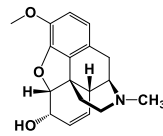
Compuestos fenólicos



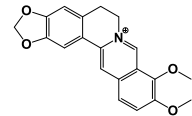
Dammarano



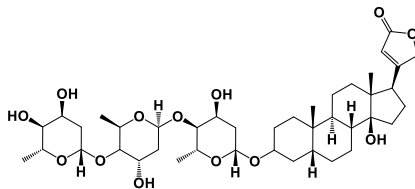
Amigdalina



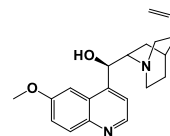
Codeína



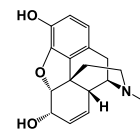
Berberina



Digitoxina



Quinina



Morfina

Glicósidos

Alcaloides

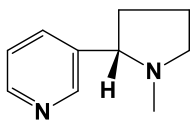
Figura 1. Ejemplos de los principales grupos de metabolitos secundarios (Leyva y col., 2013).

Alcaloides

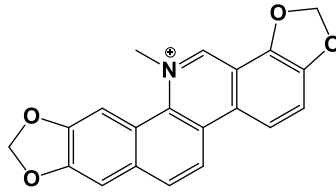
Los alcaloides son un grupo estructuralmente diverso de más de 12,000 compuestos encontrados en más del 20% de las especies de plantas (Agustini-Costa y col., 2012). Aunque no existe una única clasificación, los alcaloides se distinguen sobre la base de su similitud estructural o un precursor común, por ejemplo, bencilisoquinolina, tripano, pirrolizidina o alcaloides de purina. En general, estos compuestos llegan a ser tóxicos en alguna medida y parecen, en primer lugar, contribuir en la defensa contra infecciones por microorganismos y ataques de herbívoros (Kennedy y Wightman, 2011).

Los alcaloides se asocian con una amplia gama de actividades farmacológicas. Algunos tienen actividades antibióticas y otros interfieren como patrones de comportamiento, como los antidepresivos y alucinógenos (Agustini-Costa y col., 2012). En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas, la mayoría de ellas a consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas casi todos los alcaloides son tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos (Ávalos, 2009). Sus efectos inhibitorios del crecimiento de microorganismos patógenos están dados por su capacidad de intercalarse con el DNA, de detener la síntesis de proteínas, inducir la apoptosis e inhibir las enzimas del metabolismo de carbohidratos (Wink y col., 1999).

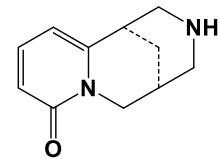
El aislamiento de estos compuestos, se ha dado principalmente de plantas superiores. Su actividad biológica a nivel de sistema nervioso, dio pie a las primeras investigaciones, siendo los alcaloides las primeras sustancias naturales estudiadas (Mazid y col., 2011). Berberina, palmitina y sanginarina son alcaloides isoquinolinicos tóxicos para insectos y vertebrados, pero también inhiben el crecimiento de bacterias, hongos y virus (Figura 2). Estos alcaloides reaccionan con grupos aniónicos y grupos nucleofílicos de aminoácidos o de otras moléculas como receptores y enzimas, inhibiendo su función (Schmeller y col., 1997).



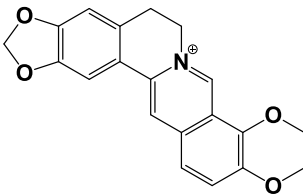
Nicotina
(insecticida)



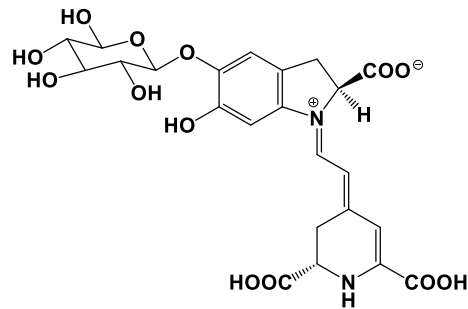
Sanginarina
(antimicrobiano)



Citisina
(nematicida)



Berberina
(antimicrobiano)



Betanina
(antioxidante)

Figura 2. Ejemplos de estructuras de alcaloides con actividad biológica durante la respuesta de defensa de *Nicotiana tabacum* (nicotina), de miembros de la familia *Papavearaceae* (sanginarina), de la familia *Berberidaceae* (berberina), de plantas del género *Cytisus* (citisina) y de *Beta vulgaris* (betanina) (Sepúlveda y col., 2003).

Los alcaloides que han sido encontrados en el género *Berberis* (familia *Berberidaceae*) se pueden agrupar de acuerdo al núcleo del cual se derivan (Bentley, 1995), como se muestran a continuación:

Protoberberinas. En este grupo normalmente se pueden encontrar bases cuaternarias con las posiciones 2,3 y 9,10 oxigenadas (Figura 3) (Grycova, 2007).

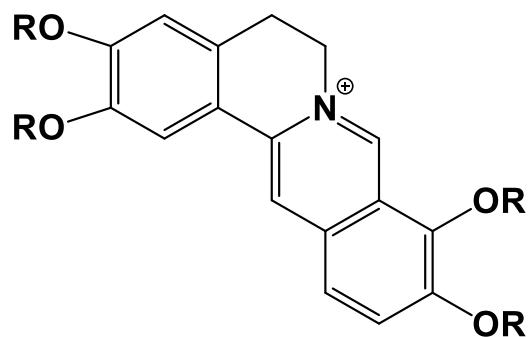


Figura 3. Estructura base de un alcaloide protoberberínico (Nuñez, 2010).

Bencilquinolinas. Su biosíntesis se da a partir de la tirosina y son precursores de otros compuestos alcaloidales que en su gran mayoría conservan las sustituciones oxigenadas presentes en este núcleo base (Figura 4) (Nuñez, 2010).

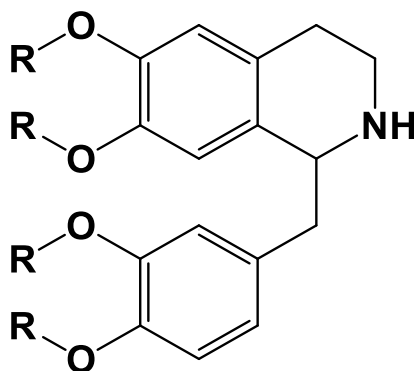


Figura 4. Estructura base de un alcaloide bencilquinolina (Nuñez, 2010).

Aporfinas. Los esqueletos aporfínicos se producen biogenéticamente por oxidación de los grupos fenólicos de las benciltetrahydroquinolinas por medio de un acoplamiento oxidativo mono electrónico entre los carbonos 8 y 10 (Figura 5).

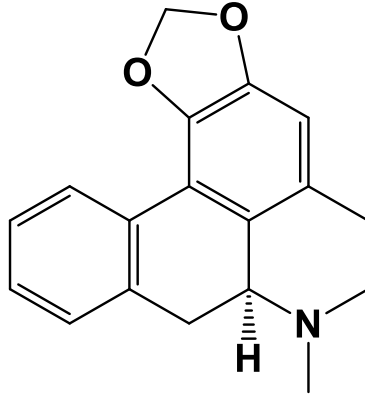


Figura 5. Estructura de aporfina: aporeina (Nuñez, 2010).

Pavinas. Clase de alcaloides derivados biogénicamente de los bencilisoquinolinas (Figura 6), se encuentran en la familia *Lauraceae* (Gözler, 1983).

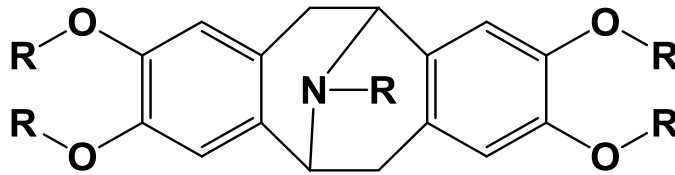


Figura 6. Esqueleto base de pavina (Nuñez, 2010).

Bencilisoquinolinas. Este tipo de alcaloides posee, por lo general, un puente éter que une dos estructuras bencilisoquinolínicas. Pueden estar metiladas en el nitrógeno del anillo heterocíclico y presentar alguna actividad dependiendo de su estereoquímica en las posiciones 1 y 1' (Figura 7) (Ratsimamanga-Urverg, 1992; Mambu, 2000).

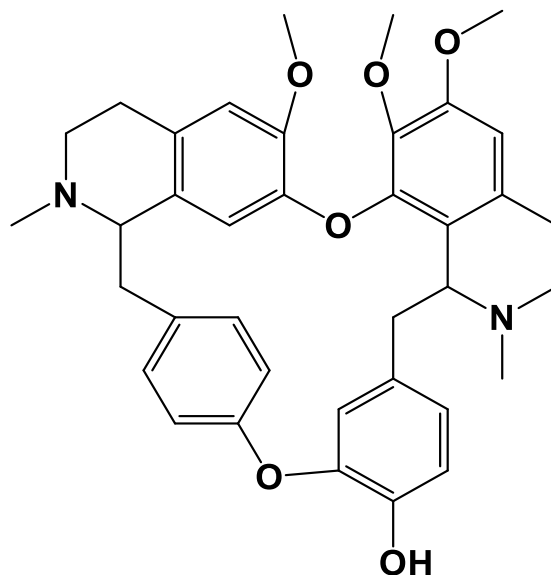


Figura 7. Estructura de alcaloide bencilisoquinolinas: berbamina.

Berberina y Actividades Biológicas

La familia *Berberidaceae* contiene principalmente compuestos de tipo isoquinolina, lignano y flavonoide. Su composición química característica muestra alcaloides derivados de L-tirosina (Romero, 2005), siendo berberina el compuesto más representativo de los alcaloides de tipo isoquinolínico presentes en esta familia; especialmente en los géneros *Berberis* y *Mohania* (Nuñez, 2010).

Berberina es un alcaloide isoquinolínico con un color amarillo brillante, que se encuentra generalmente en las raíces, rizomas, tallos y corteza de plantas tales como *Berberis aquifolium* (Uva de Oregon), *Berberis vulgaris* (agracejo) y *Berberis aristata* (cúrcuma); y en plantas presentes en la etnofarmacopea sonoreense como *Argemone gracilentia* y *A. ochroleuca* (Leyva y col., 2013). Es utilizada contra infecciones de hongos, bacterias, levaduras, parásitos y virus. Además, reduce niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre, reduce la grasa y evita fibrosis en el hígado, suprime el crecimiento de una variedad de células tumorales como cáncer de mama, de páncreas, próstata, gástrico, melanoma y leucemia (Maco, 2012). Este alcaloide no es tóxico a dosis terapéuticas. A dosis altas puede causar malestar gastrointestinal, disnea, disminución de la presión arterial y daño cardíaco (Kupeli y col., 2002).

A berberina se le atribuyen varias actividades farmacológicas, lo que ha llevado a realizar diversos estudios que revelan que la molécula posee una serie de propiedades, tales como, antidiarreica, antiinflamatoria, efecto antipirético, analgésico (Kupeli y col., 2002). Así mismo, posee características antimicrobianas, inhibiendo el crecimiento de muchos microorganismos incluyendo hongos, protozoos y bacterias (Hahn y Ciak, 1976).

Modificaciones Químicas de Berberina

Estudios recientes han demostrado que la modificación química de la estructura de compuestos naturales resulta ser una estrategia importante para optimizar las propiedades farmacológicas. En la actualidad, existe un gran interés en el desarrollo de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana, esto debido al aumento mundial de los casos de resistencia a los antibióticos.

Recientemente, se ha buscado el desarrollo de nuevos antibióticos clínicamente útiles que resulten en antimicrobianos de amplio espectro, agentes con poca tendencia a inducir resistencia antimicrobiana y con la capacidad de ofrecer una solución eficaz a las infecciones causadas por bacterias latentes o bacterias de división lenta. Para el diseño de estos compuestos, se han basado en la naturaleza lipofílica de la membrana bacteriana, por lo cual se han diseñado compuestos adicionando moléculas hidrofóbicas a su estructura de la tal manera que puedan tener una mayor interacción con la membrana bacteriana y así ejercer su actividad biológica (Hai-ning y col., 2013).

De igual manera, diferentes estudios han demostrado que la conjugación de cadenas alifáticas con la estructura de compuestos naturales, proporcionan ciertas propiedades que mejoran su actividad biológica tales como mayor lipofilia, captación celular y retención celular para una actividad biológica sostenida (Chhikara y col., 2012). Mahapatra y colaboradores (2014) demostraron que, la acción antitubercular de berberina, al ser sometida a modificaciones químicas de diversos compuestos (alifáticos, halógenos y bencílicos) aumentaba, dando como resultado una concentración mínima inhibitoria (MIC) de dos a tres veces menor (4-8 $\mu\text{g/mL}$) que la de berberina (16 $\mu\text{g/mL}$).

METODOLOGÍA

Reacciones de Modificación

Hidrólisis del Grupo Acetal: Reacción con Tricloruro de Boro (BCl_3)

En un matraz bola de 100 mL, se hizo reaccionar berberina con BCl_3 en una proporción 2:5, en 30 mL de diclorometano (DCM, CH_2Cl_2) anhidro en una atmósfera de nitrógeno (N_2). Este procedimiento se dividió en dos etapas; en la primera etapa la reacción se mantuvo en hielo por 30 min. Posteriormente, se retiró el hielo y la reacción se dejó a temperatura ambiente (TA) hasta un tiempo final de 4 h. Para detener el proceso se adicionaron 2 mL de agua miliQ durante 30 min (Figura 8). Una vez finalizada la reacción, se concentró a vacío y el compuesto obtenido se purificó por cromatografía en columna, utilizando 30% de metanol en diclorometano como eluyente. Es proceso produjo como resultado la síntesis del 2,3-dihidroxiprotoberberina (2,3-DHPB).

Asociación del Alcaloide con Ácido Geránico y Ácido Sórbico: Reacción de Esterificación de Stenglich

Los compuestos tipo ácidos carboxílicos (ác. geránico y ácido sórbico) se asociaron al producto resultante de la primera modificación (2,3-DHPB), mediante una reacción de esterificación de Stenglich. Esta reacción se realizó en dos etapas; en la primera, se hizo reaccionar el ácido carboxílico con N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) en una proporción 4:6, respectivamente, en 20 mL de diclorometano anhidro, en un matraz bola de 100 mL. Dicha etapa se mantuvo a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno durante 30 min. En la segunda etapa, el compuesto 2,3-DHPB se disolvió en 2 mL de N,N'-dimetilformamida (DMF) y se agregó gota a gota a la mezcla de reacción de la primera etapa y la reacción se mantuvo en agitación a temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno durante 24 h (Figura 9). Posteriormente, se filtró y concentró a vacío, finalmente el compuesto se purificó por cromatografía en columna, usando 20% de metanol en diclorometano como eluyente.

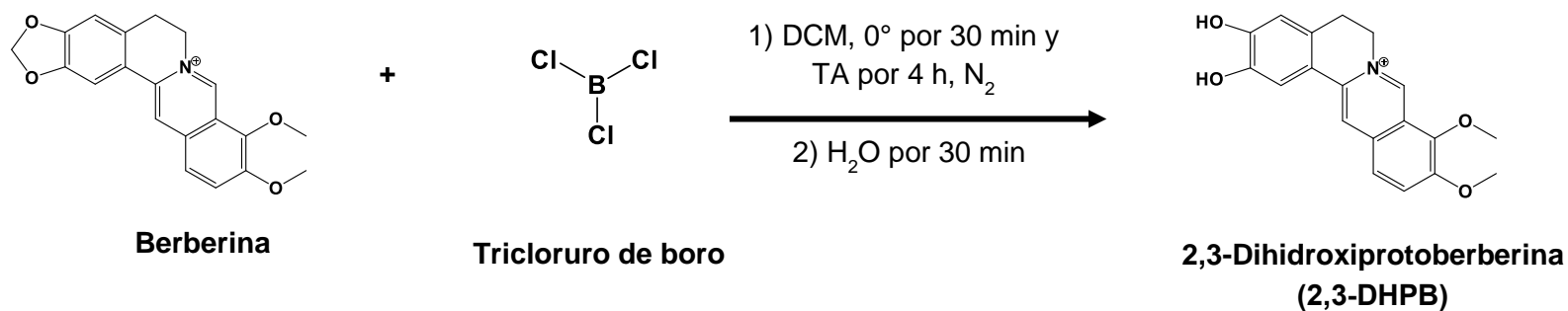


Figura 8. Síntesis de 2,3-dihidroxiprotoberberina.

14

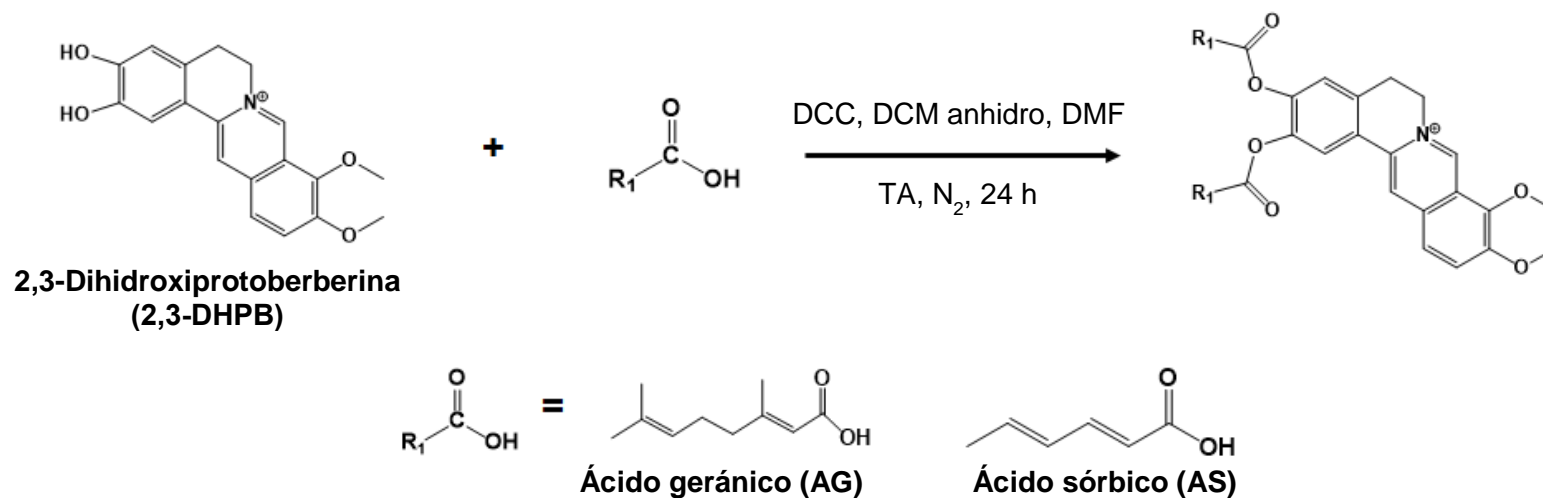


Figura 9. Reacción de esterificación del compuesto 2,3-dihidroxiprotoberberina con compuestos de tipo ácido carboxílico

Purificación, Identificación y Caracterización

Aislamiento y purificación

El aislamiento y purificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de cromatografía en columna, utilizando columnas cromatográficas de vidrio de 4.5 x 70 cm y 2 x 50 cm. Como fase estacionaria se utilizó sílica gel de 200-400 mesh marca sigma Aldrich, y como fase móvil mezclas de diclorometano (DCM) y metanol (MeOH) en diferentes proporciones: iniciando con DCM (100 %), DCM:MeOH (95:5), DCM:MeOH (90:10) y DCM:MeOH (85:15), principalmente. Se tomaron fracciones de 50 mL, y cada una de las fracciones fue monitoreada utilizando placas de cromatografía en capa fina (TLC sílica gel 60 F254, Merck) y se observó en lámpara de UV a dos longitudes de onda, longitud corta de nm y longitud larga de nm. El aislamiento y purificación de los compuestos fue monitorizada por TLC.

Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

El análisis de las muestras por RMN de protón (^1H), carbono (^{13}C) y su bidimensional HSQC (correlación heteronuclear de coherencia cuántica simple) se realizaron en un equipo Bruker Avance, a una frecuencia de 400 MHz (Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales, de la Universidad de Sonora). Se utilizaron como solventes cloroformo (CDCl_3), metanol (CD_3OD) y dimetilsulfóxido (DMSO-D_8) deuterados; todos los desplazamientos químicos tuvieron como referencia tetrametilsilano (TMS).

Espectroscopia de Infrarrojo (IR)

Para el análisis de infrarrojo se utilizó el equipo FT-IR Bruker Vector 22 y como matriz bromuro de potasio (KBr). Las muestras sólidas se mezclaron con KBr y se hicieron pastillas muy delgadas para su análisis. El intervalo de lectura en infrarrojo fue de 4000 a 400 cm^{-1} .

Espectrometría de Masas (MS)

En la determinación del peso molecular de cada uno de los compuestos, se utilizó un equipo de espectrometría de masas de alta resolución JOEL The Mstation JMS-700 con un modo de ionización positiva de bombardeo atómico acelerado (FAB+).

Punto de Fusión

Para la determinación del punto de fusión de cada uno de los compuestos se utilizó el aparato Fisher Johns con termómetro digital.

Evaluación de la Actividad Antimicrobiana

En esta etapa se determinó la MIC₅₀ (ésta representa la mínima concentración en la que el 50% de las células bacterianas se ven inhibidas), mediante la técnica de microdilución (Navarro y col.,2013; Esquer y col., 2016); esto se realizó en microplacas de 96 pozos, en las cuales se evaluaron los compuestos resultantes de las modificaciones químicas de berberina: 2,3-dihidroxiprotoberberina asociada a ácido geránico (2,3-DHPB-AG), 2,3-dihidroxiprotoberberina asociada a ácido sórbico (2,3-DHPB-AS) y sus precursores (berberina y 2,3-DHPB).

Primeramente, se obtuvieron las suspensiones bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Vibrio parahaemolyticus* (CAIM 1772), las cuales fueron ajustadas al estándar 0.5 de MacFarland, que corresponde a un contenido de 1×10^8 UFC por mL. Posteriormente, se prepararon diluciones de los compuestos derivados de berberina (compuestos sólidos) a concentraciones de 800, 400, 200 y 100 µg/mL, partiendo de una solución stock de 5 mg/mL en dimetil sulfóxido (DMSO), dichas diluciones se realizaron en caldos; el uso de estos medios de cultivo dependió de que bacteria sería la evaluada. En el caso de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se utilizó caldo Mueller Hinton y para la evaluación de *Vibrio parahaemolyticus*, caldo soya tripticaseína. Posteriormente, en las microplacas, se colocaron 200 µL de las diluciones de los compuestos a evaluar, esto a las diferentes concentraciones y 15 µL del inóculo bacteriano. Como antibiótico control, se utilizó gentamicina a una concentración de 12

µg/mL y como control negativo (100% de crecimiento) DMSO; estas placas se llevaron a incubación a una temperatura de 37°C. Después se prosiguió con la toma de absorbancias (densidad óptica, D.O) a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas en un lector de Elisa a 630nm (Navarro y col.,2013; Esquer y col., 2016). Por último, se graficaron las absorbancias de crecimiento bacteriano a cada concentración de los compuestos evaluados.

Relación Estructura Actividad

Se realizó un análisis de relación estructura actividad (REA) con la finalidad de determinar el grupo o los grupos funcionales responsables de la actividad antimicrobiana, realizándose a través de la comparación entre los cambios estructurales realizados al alcaloide berberina y su actividad antimicrobiana contra las diferentes cepas bacterianas utilizadas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Vibrio parahaemolyticus* (CAIM 1772).

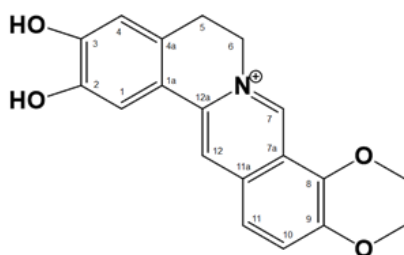
Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados por medio de un análisis de varianza a través de las pruebas Toker y Dunnet con un valor de significancia ($p < 0.05$), en el cual se comparó berberina con respecto a sus modificaciones, a las diferentes concentraciones evaluadas en cada bacteria.

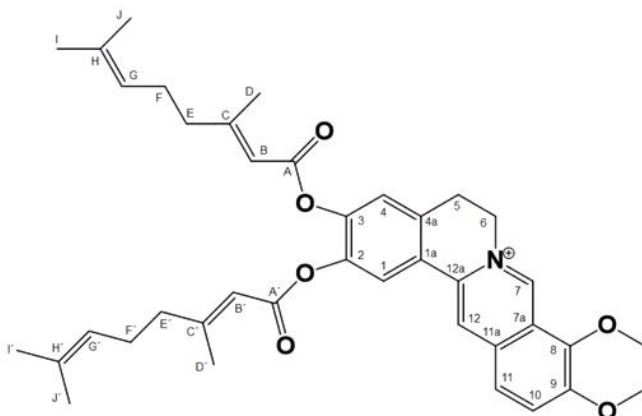
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y Caracterización

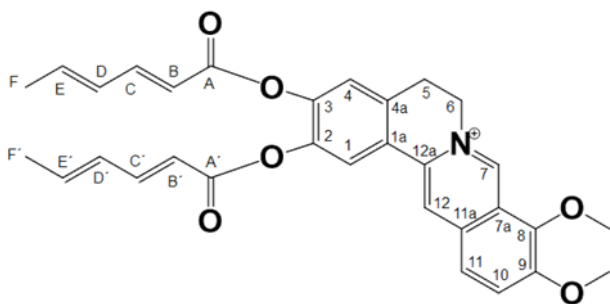
La identificación y caracterización de los compuestos derivados de berberina se realizó a través de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y espectrometría de masa de alta resolución en modo FAB $^+$. A continuación, se presentan las características físico-químicas de los compuestos obtenidos.



2,3-Dihidroxiprotoberberina (2,3-DHPB): Sólido color café. Punto de fusión 208-210 °C, rendimiento: 92 %, IR: $\nu(\text{cm}^{-1})$ 3234 (-OH). ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) (δ , ppm) 3.17 (H-5), 4.09 (9-OCH $_3$), 4.19 (8-OCH $_3$), 4.90 (H-6), 6.82 (H-4), 7.50 (1H), 7.98 (H-11), 8.10 (H-10), 8.57 (H-12), 9.42 (3-OH), 9.10 (H-10), 9.67 (2-OH). MS (m/z), FAB $^+$: 324 [$M + H$] $^+$.



2,3-DHPB-AG: Sólido anaranjado. Punto de fusión 196-197 °C, rendimiento: 56 %, IR: $\nu(\text{cm}^{-1})$ 1740, (C=O). ^1H RMN (400 MHz, CDCl $_3$) (δ , ppm) 1.43 (H-I and H-I'), 1.71 (H-J and H-J'), 2.22 (H-E, H-F, H-E' and H-F'), 2.27 (H-D and H-D'), 3.32 (H-5), 4.03 (9-OCH $_3$), 4.27 (8-OCH $_3$), 5.10 (H-G and H-G'), 5.38 (H-6), 5.89 (H-B and H-B'), 6.98 (H-1), 7.84 (H-4 and H-11), 7.92 (H-10), 8.41 (H-12), 10.68 (H-7). MS (m/z), FAB $^+$: 624 [$M + H$] $^+$.



2,3-DHPB-AS: Sólido amarillo. Punto de fusión 124-126 °C, rendimiento: 30 %, IR: $\nu(\text{cm}^{-1})$ 1736, (C=O,), $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 1.90 (H-F y H-F'), 3.43 (H-5), 4.06 (9-OCH₃), 4.29 (8-OCH₃), 5.27 (H-6),

5.91 (H-B and H-B'), 6.31 (H-D, H-D', H-E and H-E'), 7.28 (H-C and H-C'), 7.45 (H-1), 7.90 (H-4 and H-11), 7.92 (H-10), 8.42 (H-12), 10.45 (H-7). MS (m/z), FAB⁺: 512 [$M + H$]⁺.

La Figura 10 muestra los espectros de IR de berberina y los compuestos derivados. En el espectro del compuesto 2,3-DHPB, se muestra la aparición de una banda ancha a 3368 cm^{-1} que corresponde a los grupos hidroxilos (OH) de la molécula, formados en la ruptura del grupo acetal (metilendioxi, -O-CH₂-O-) del alcaloide berberina a través de la reacción con BCl₃. En los espectros de IR de los compuestos 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS, no se observa la banda correspondiente a los grupos hidroxilos, sin embargo, se observa una nueva banda muy definida a 1734 y 1736 cm^{-1} , respectivamente. Esta banda corresponde al grupo carbonilo (C=O) del éster formado en la esterificación del ácido geránico y/o ácido sórbico al compuesto 2,3-DHPB.

A través de un análisis de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) se corroboró la obtención de estos derivados de berberina y lo observado por IR. La Figura 11 muestra el espectro de RMN ^1H del compuesto berberina y se señala el desplazamiento químico (en ppm) para cada tipo de protón en la molécula, con la finalidad de comparar este espectro con los espectros de sus compuestos derivados. La Figura 12 muestra el espectro del compuesto 2,3-DHPB, en donde los cambios más significativos observados son la desaparición de la señal a 6.14 ppm que correspondía al grupo acetal en berberina, y la formación de los grupos hidroxilos (en 9.10 y 9.67 ppm) en donde se llevó a cabo el rompimiento de este grupo.

Las figuras 13 y 14 muestran los espectros de RMN ^1H de los compuestos 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS, respectivamente. Los cambios más significativos observados en ambos espectros, es la desaparición de las señales de los grupos hidroxilos y la aparición de las señales correspondientes a los compuestos ácido geránico y ácido sórbico. En los espectros se señala el desplazamiento químico (en ppm) de cada tipo de protón en la molécula de ambos compuestos. Se lograron rendimientos de 92%, 56% y 30% para

2,3-DHPB, 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS, respectivamente, resaltando que, la síntesis de estos compuestos se llevó a cabo en condiciones suaves (temperatura ambiente y tiempos cortos). Además, es importante mencionar la estabilidad química de los compuestos (no se degradan fácilmente, no requiere condiciones especiales de almacenamiento, no son susceptibles al calor ni a la luz), por lo anterior se puede considerar un método de obtención relativamente sencillo, lo que facilita su reproducibilidad.

En diversos estudios se ha demostrado la variabilidad de los rendimientos en las reacciones de esterificación, dependiendo principalmente de la complejidad estructural de los compuestos utilizados y de las condiciones de reacción. Hamzah K y col. (2015), mostraron los resultados de un estudio de esterificación del ácido benzoico con alcoholes de cadena variable, catalizada por ácido sulfúrico y condiciones de microondas. En este estudio se observó que, al variar la temperatura, de 90 hasta 130 °C a diferentes tiempos, y usando microondas, se podrían mejorar los rendimientos de reacción. De hecho, al ir aumentando la temperatura se obtuvieron mejorías en los rendimientos, desde 6% hasta un aumento del 78% total.

La esterificación de Steglich es una reacción que utiliza el reactivo DCC y un acoplante como la 4-dimetilaminopiridina (DMAP), para llevar a cabo la esterificación entre un ácido carboxílico (RCOOH) y un alcohol (ROH). Este tipo de acoplantes activan el grupo carboxílico hacia una forma más electrofílica, y así llevar la reacción en menos tiempo. En la literatura se presentan algunos trabajos sobre la esterificación directa del grupo hidroxilo aplicándose diferentes metodologías, pero todas muestran rendimientos bajos cuando se utilizaron ácidos grasos en la preparación de ésteres, rendimientos que van desde el 10 al 79%.

Guilles y col. (2015) presentaron en sus estudios una reacción para la preparación de ésteres usando la metodología de esterificación de Steglich, en donde además de DCC utilizaron como acoplante DMAP a temperatura ambiente por 72 horas, donde obtuvieron el compuesto tipo éster en un rendimiento muy bajo, de tan sólo 10%. También reportan una optimización de tiempo de reacción de 24 horas al aumentarle los equivalentes de DCC y DMAP. Sin embargo, no obtuvieron un aumento significativo en el porcentaje de rendimiento del compuesto.

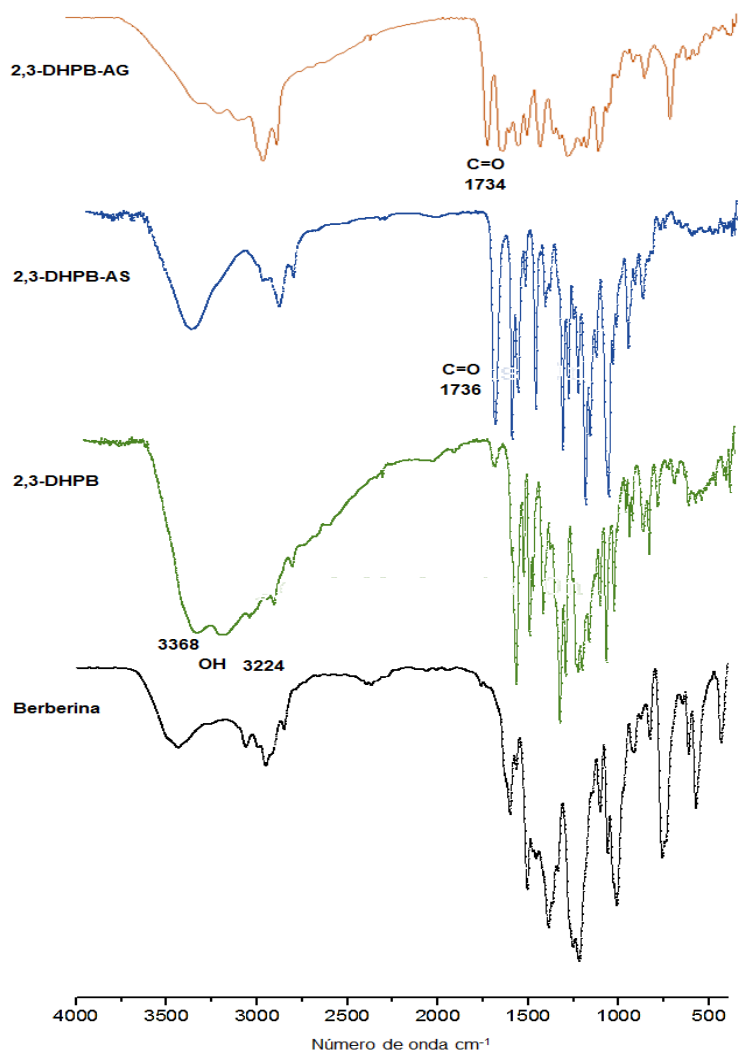


Figura 10. Espectros de infrarrojo (IR) de berberina y sus compuestos derivados: 2,3-DHPB, 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS. Los estudios se realizaron en sólido con pastillas de bromuro de potasio (KBr)

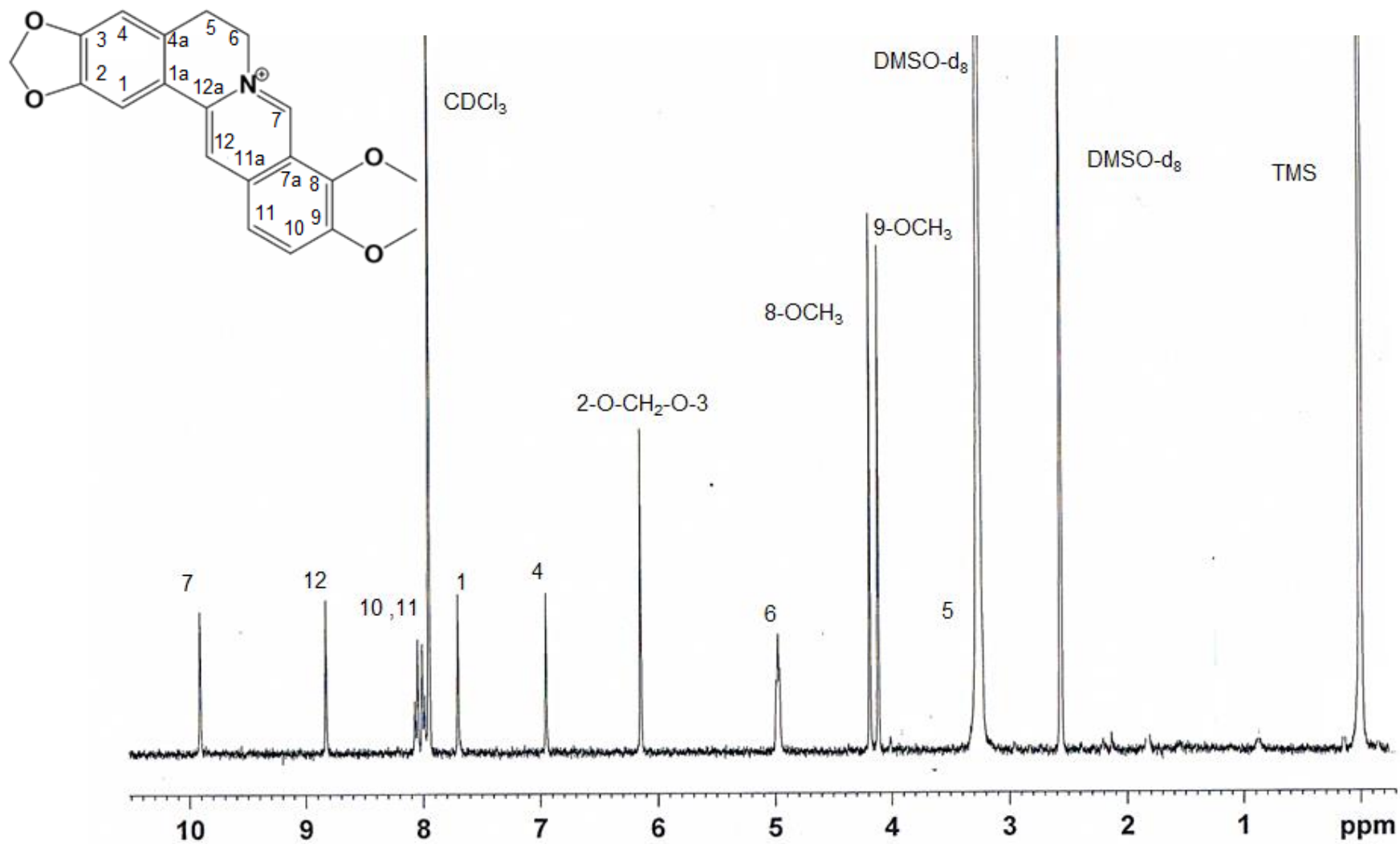


Figura 11. Espectro de RMN ¹H en CDCl₃: DMSO-d₈ de berberina, 400 MHz.

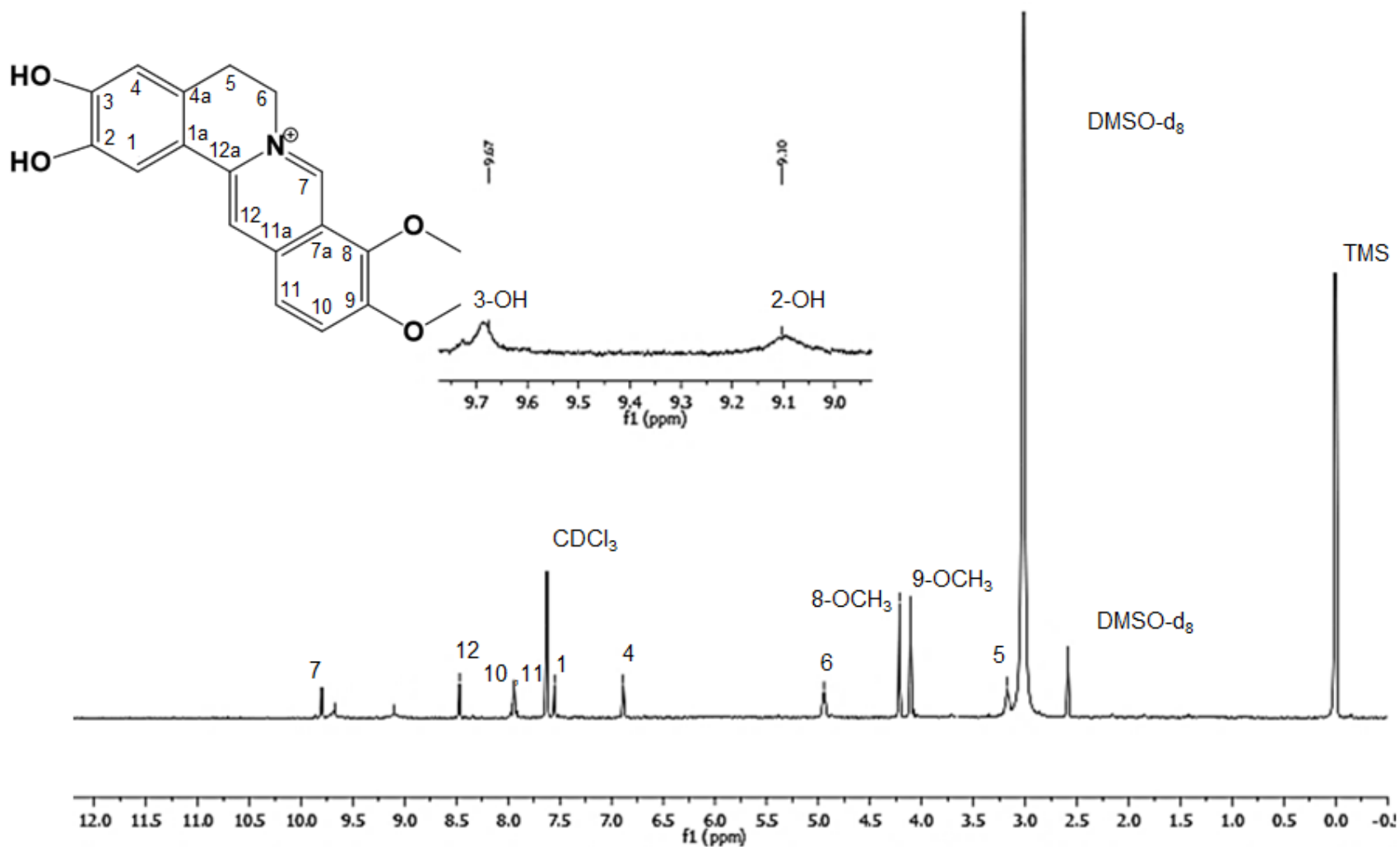


Figura 12. Espectro de RMN ¹H en CDCl₃ del compuesto 2,3-DHPB, 400 MHz

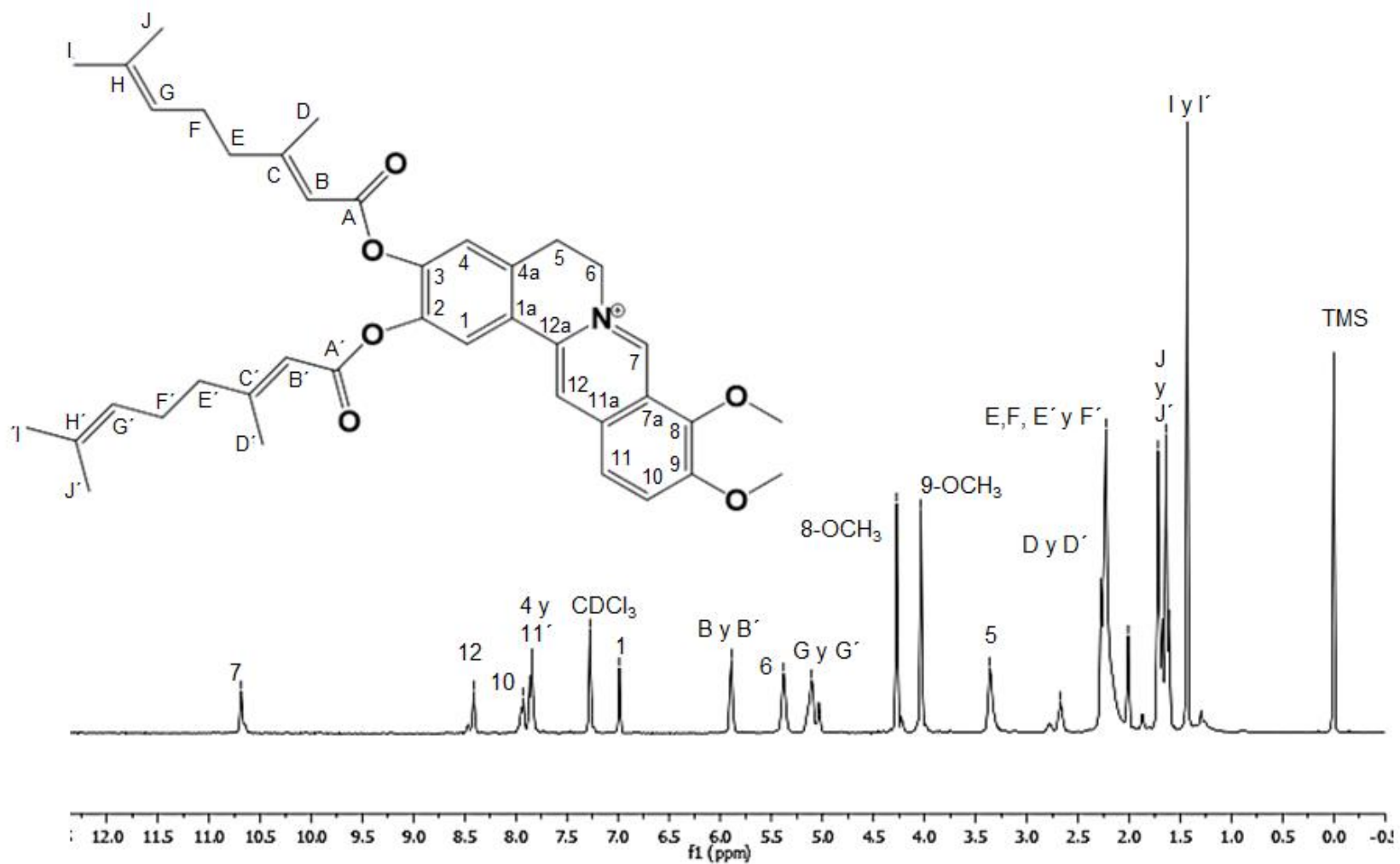


Figura 13. Espectro de RMN ^1H en CDCl_3 del compuesto 2,3-DHPB-AG, 400 MHz. Cloroformo deuterado (CDCl_3) y tetrametilsilano (TMS)

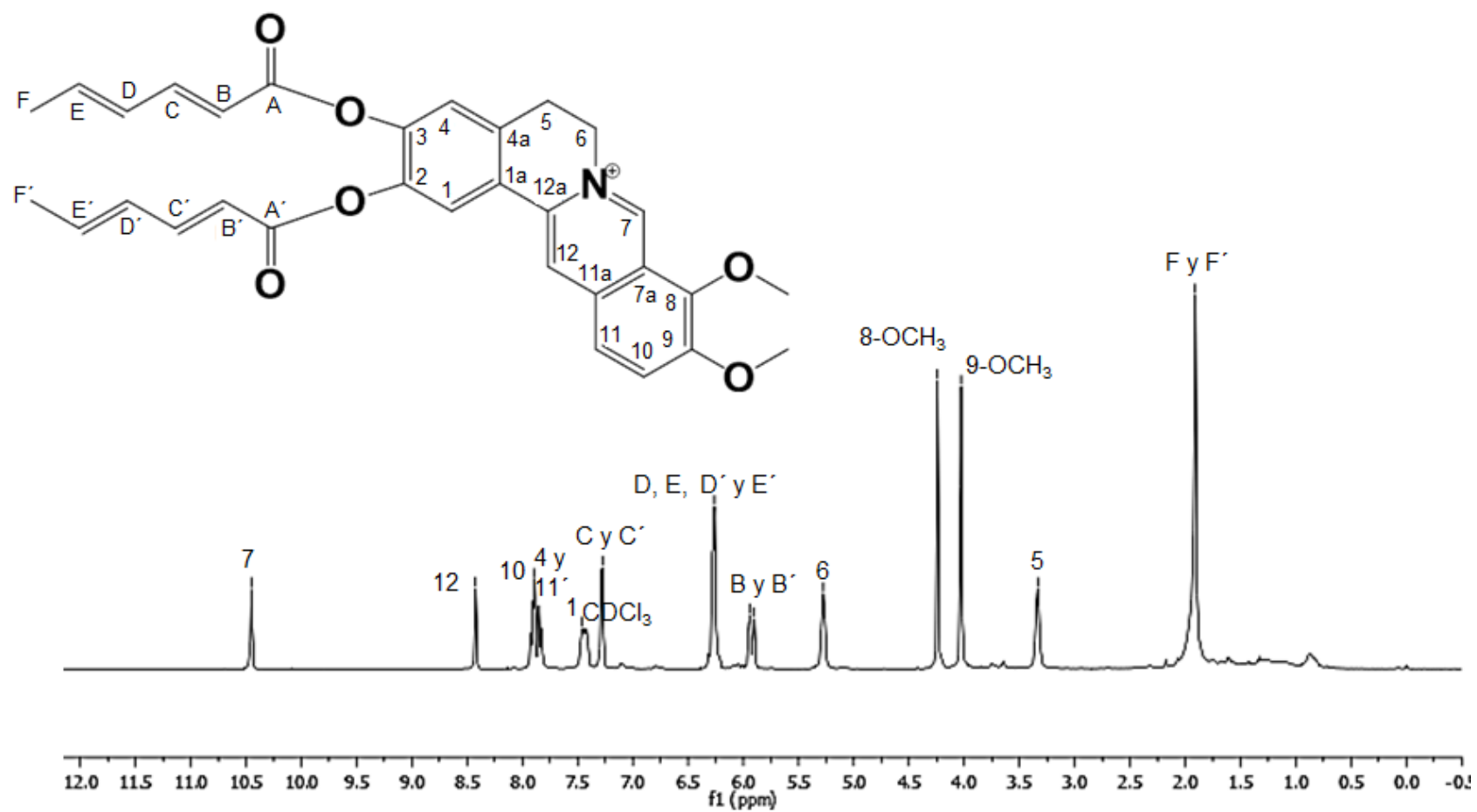


Figura 14. Espectro de RMN ^1H en CDCl_3 del compuesto 2,3-DHPB-AS, 400 MHz.

Considerándose todas las metodologías probadas, la esterificación de Steglich presentó los resultados más significativos, a pesar de los bajos rendimientos. En este estudio, también los autores presentaron un resultado favorable en este tipo de esterificación, observándose un aumento en los rendimientos en los compuestos de esterificación de diferentes ácidos grasos, al utilizar en la reacción del ácido de Lewis $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como catalizador, además de DCC/DMAP. Obtuvieron un aumento del rendimiento del 56% en una reacción de 24 horas.

Comparando los rendimientos de los compuestos obtenidos en nuestro estudio a través de las reacciones de esterificación con los resultados mostrados en la literatura, los rendimientos para cada compuesto de la esterificación son aceptables y comparables para este tipo de compuestos. Además, logramos llevar a cabo la síntesis del éster a través de la reacción solamente con DCC sin utilizar un acoplante (como DMAP), además la reacción se llevó a cabo en atmósfera inerte (N_2), en condiciones suaves de temperatura (temperatura ambiente) y un tiempo de reacción ligeramente corto (24 h).

Evaluación Antimicrobiana

En las Figuras 15, 16 y 17 se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana al término de las 48 horas de las diferentes concentraciones de los compuestos evaluados (berberina, 2,3-DHPB, 2,3-DHPB-AG, 2,3-DHPB-AS) contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*, respectivamente; en dichas figuras se muestra una línea horizontal negra, la cual indica el valor de referencia de MIC_{50} .

Para el caso de *Escherichia coli*, se puede observar que tanto berberina como la 2,3-DHPB inhiben el crecimiento de esta bacteria a una concentración menor de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 15).

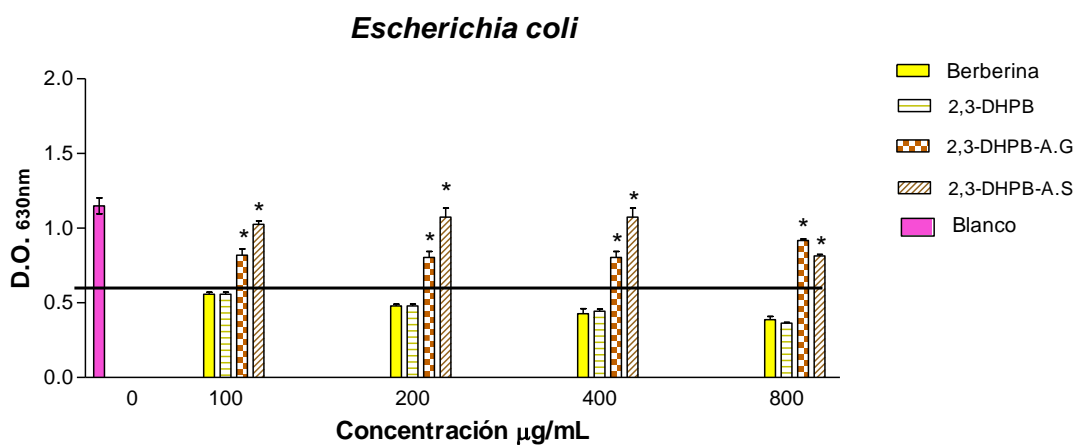


Figura 15. Actividad antimicrobiana de compuestos evaluados (a diferentes concentraciones) contra *Escherichia coli*. *Diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la Figura 16, se puede observar que, para *Staphylococcus aureus*, berberina muestra una MIC₅₀ a una concentración menor de 100 µg/MI, mientras que la 2,3-DHPB-AG tiene una MIC₅₀ menor a 100 µg/mL y 2,3-DHPB-AS presenta una MIC₅₀ entre 100 y 200 µg/mL.

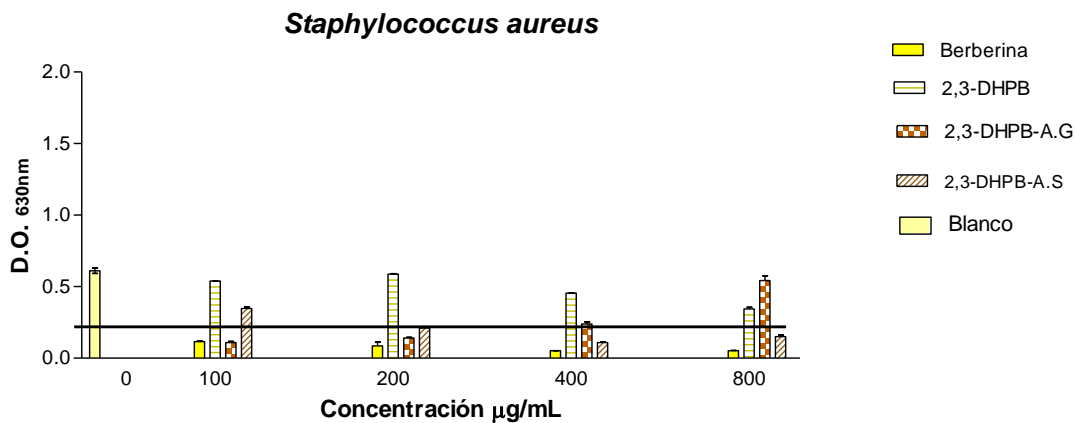


Figura 16. Actividad antimicrobiana de compuestos evaluados (a diferentes concentraciones) contra *Staphylococcus aureus*. *Diferencias significativas ($p < 0.05$).

En la Figura 17, se muestra que, para *Vibrio parahaemolyticus*, sólo 2,3-DHPB-AG tiene una MIC₅₀ entre 400 y 800 µg/mL.

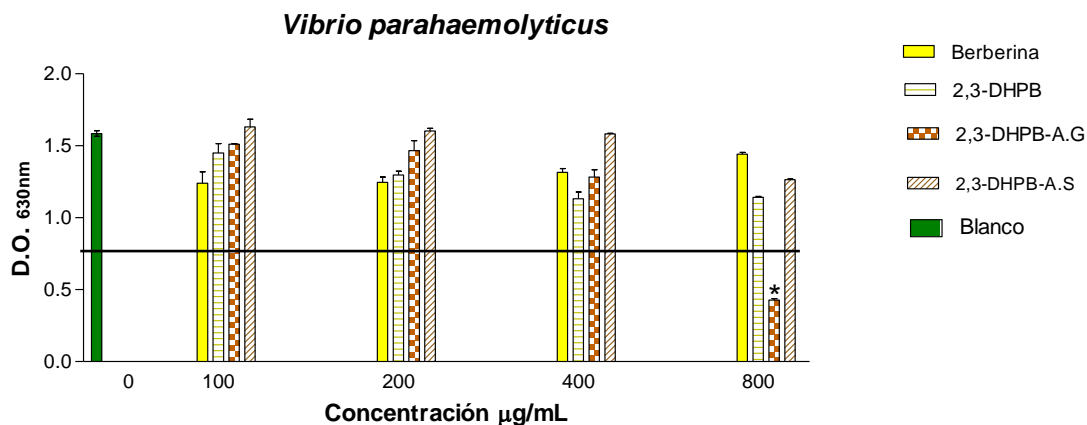


Figura 17. Actividad antimicrobiana de compuestos evaluados (a diferentes concentraciones) contra *Vibrio parahaemolyticus*. *Diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 1. Valores de MIC₅₀ (concentración mínima inhibitoria del 50%) de los compuestos: berberina, 2,3-DHPB, 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio parahaemolyticus*.

Compuesto	MIC ₅₀ (µg/mL)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Berberina	<100	<100	>800
2,3-DHPB	<100	>800	>800
2,3-DHPB-AG	>800	<100	400-800
2,3-DHPB-AS	>800	100-200	>800

En la tabla 1, se puede ver que berberina tiene mejor MIC₅₀ contra *Escherichia coli*, ya que se requiere de una concentración menor (con respecto al resto de los compuestos) para mostrar una actividad inhibitoria, al igual que para *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS también tienen un efecto inhibitorio sobre esta bacteria (*Staphylococcus aureus*). Y en relación con *Vibrio parahaemolyticus*, sólo 2,3-

DHPB-AG tienen una inhibición del 50% de las células bacterianas a concentraciones entre 400 y 800 µg/mL.

En comparación con lo que reportan Wang y colaboradores en 2013; ellos evaluaron modificaciones químicas de un alcaloide tipo quinolona, en el cual se adicionaron compuestos de naturaleza alifática de 2 hasta 15 átomos de carbono. En dicha investigación obtuvieron concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de entre 128 y 16 µg/mL, contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis* (Wang y col., 2013), que con respecto a las MIC's obtenidas en el presente trabajo (respecto a *Staphylococcus aureus*), se puede observar que se encuentran dentro del mismo rango.

En las Figura 18 presentan las cinéticas de la actividad antimicrobiana de cada una de las diluciones de berberina contra las bacterias: *Escherichia coli* (a), *Staphylococcus aureus* (b) y *Vibrio parahaemolyticus* (c).

Para explicar la actividad biológica de estos compuestos, primeramente, se tiene que definir que es un efecto bactericida. El efecto bactericida es la propiedad que posee el compuesto para causar la muerte de la bacteria, esto es una reacción irreversible.

En la Figura 18 a) se puede apreciar que, a una concentración de 800 µg/mL, el alcaloide berberina tiene un efecto inhibitorio contra *Escherichia coli*, a partir de las 12 horas, ya que la densidad óptica (D.O.) se mantiene y es la mitad con respecto al control. Por el contrario, en la figura 18 b) se observa como berberina ejerce una actividad bactericida a partir de 100 µg/mL sobre *Staphylococcus aureus*, ya que hay un descenso marcado en la densidad óptica; esto indica una menor turbidez en el pozo, por lo cual se infiere que las bacterias fueron susceptibles al compuesto y por ende llegaron a una fase de muerte. Con respecto a *Vibrio parahaemolyticus* (Figura 18 c), berberina no afecta el crecimiento bacteriano.

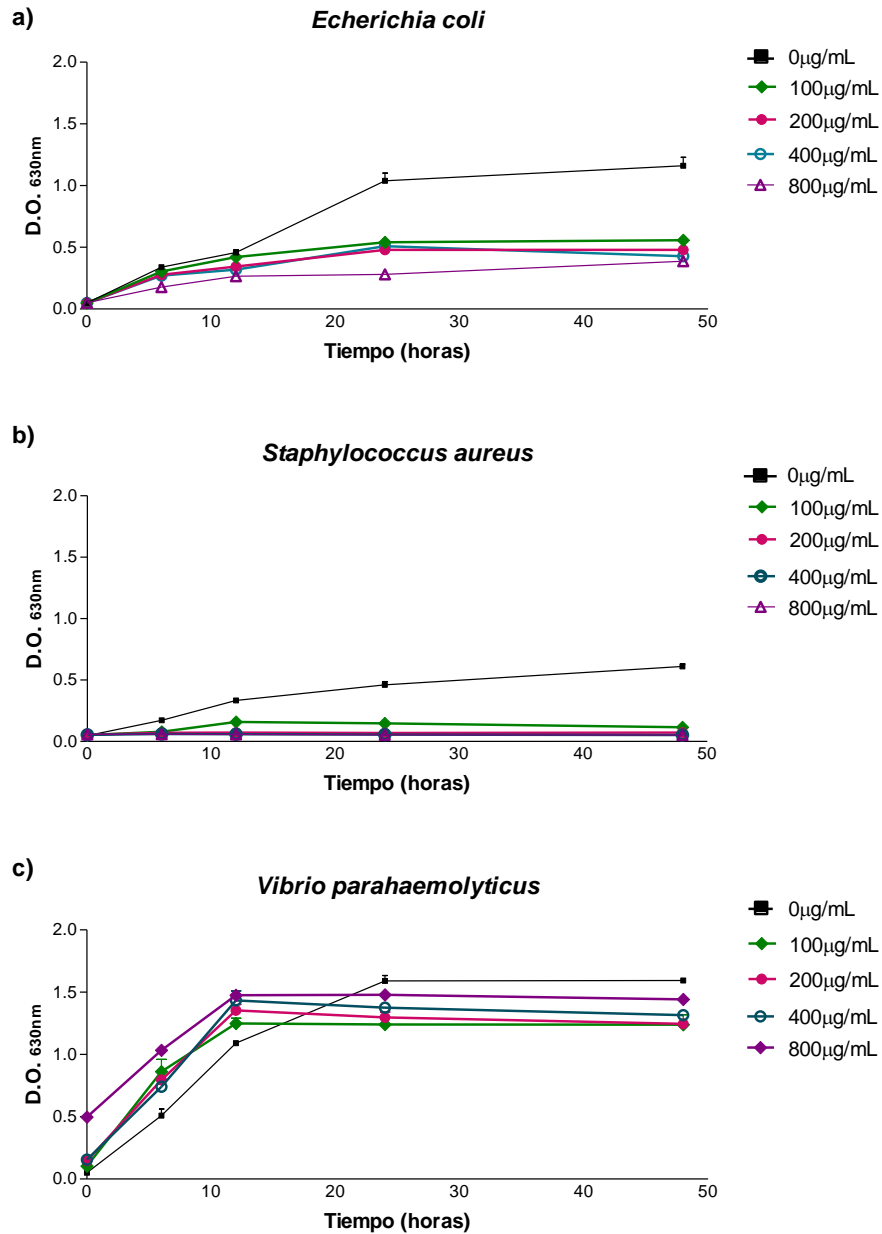


Figura18. Cinética de la actividad antimicrobiana de las diferentes concentraciones de berberina contra: a) *Escherichia coli*, b) *Staphylococcus aureus* y c) *Vibrio parahaemolyticus*

En la Figura 19 se muestran las cinéticas de la actividad biológica de 2,3-DHPB, que al igual que berberina se evaluaron las mismas bacterias: *Escherichia coli* (a), *Staphylococcus aureus* (b) y *Vibrio parahaemolyticus* (c).

En dicha figura se observa claramente que el compuesto 2,3-DHPB no tiene ningún efecto inhibitorio sobre ninguna de las cepas evaluadas, ya que el comportamiento de las gráficas sigue la tendencia del control.

Siguiendo con las cinéticas de la actividad antimicrobiana, en la figura 20, se muestran los resultados correspondientes al análisis de dicha actividad del compuesto resultante de la segunda modificación química de berberina. El cuál es la asociación del ácido geránico (2,3-DHPB-AG.).

Respecto a la capacidad inhibitoria de este compuesto contra *Escherichia coli* (Figura 20 a), se deduce que, a partir de una concentración de 400 µg/mL si hay un efecto en el que se inhibe la bacteria, ya que hay una estabilidad en la densidad óptica, mientras que, en el control, siempre tiende a aumentar.

En el caso de *Staphylococcus aureus* es claro el efecto inhibitorio que tiene contra la cepa, ya que la tendencia es, en todas las concentraciones evaluadas, descendente. A diferencia de *Vibrio parahaemolyticus*, que sólo a concentraciones de entre 400 y 800 µg/mL tuvo efecto.

Es importante mencionar que, tomando el blanco como referencia, ninguna de las concentraciones de 2,3-DHPB-AG evaluadas coinciden con la absorbancia de partida, ya que a este compuesto (a diferencia de los anteriores) su modificación química no sólo actúa sobre su actividad biológica, sino que también, en una de sus características físicas que es el color, el cual sufre un incremento en su tonalidad. Por lo cual su absorbancia inicial no coincide con el blanco. Sin embargo, la tendencia en la absorbancia es la que nos sirve como guía para determinar su efecto antiproliferativo.

En la Figura 21, se presentan las cinéticas de la actividad antimicrobiana de 2,3-DHPB asociado a ácido sórbico (2,3-DHPB-AS). En la figura 21a) y 21c) se puede observar que 2,3-DHPB-AS no tiene un efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli* y *Vibrio parahaemolyticus* respectivamente, a ninguna de las concentraciones analizadas. Por el contrario, se puede apreciar que contra *Staphylococcus aureus* (Figura 21b), si se presenta un comportamiento de inhibición a partir de una concentración de 200 µg/mL.

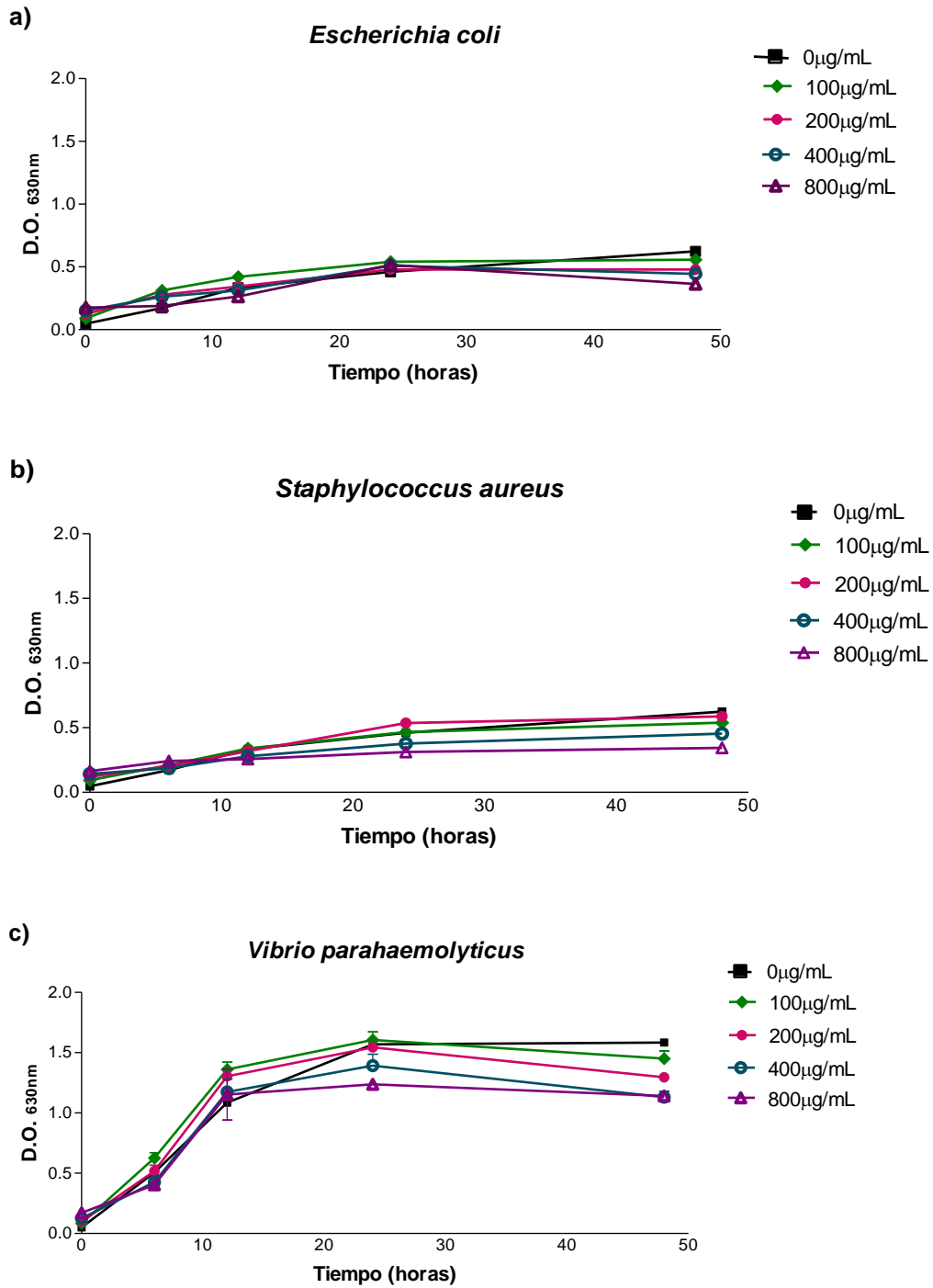


Figura 19. Cinética de la actividad antimicrobiana de las diferentes concentraciones de 2,3-DHPB contra: a) *Escherichia coli*, b) *Staphylococcus aureus* y c) *Vibrio parahaemolyticus*.

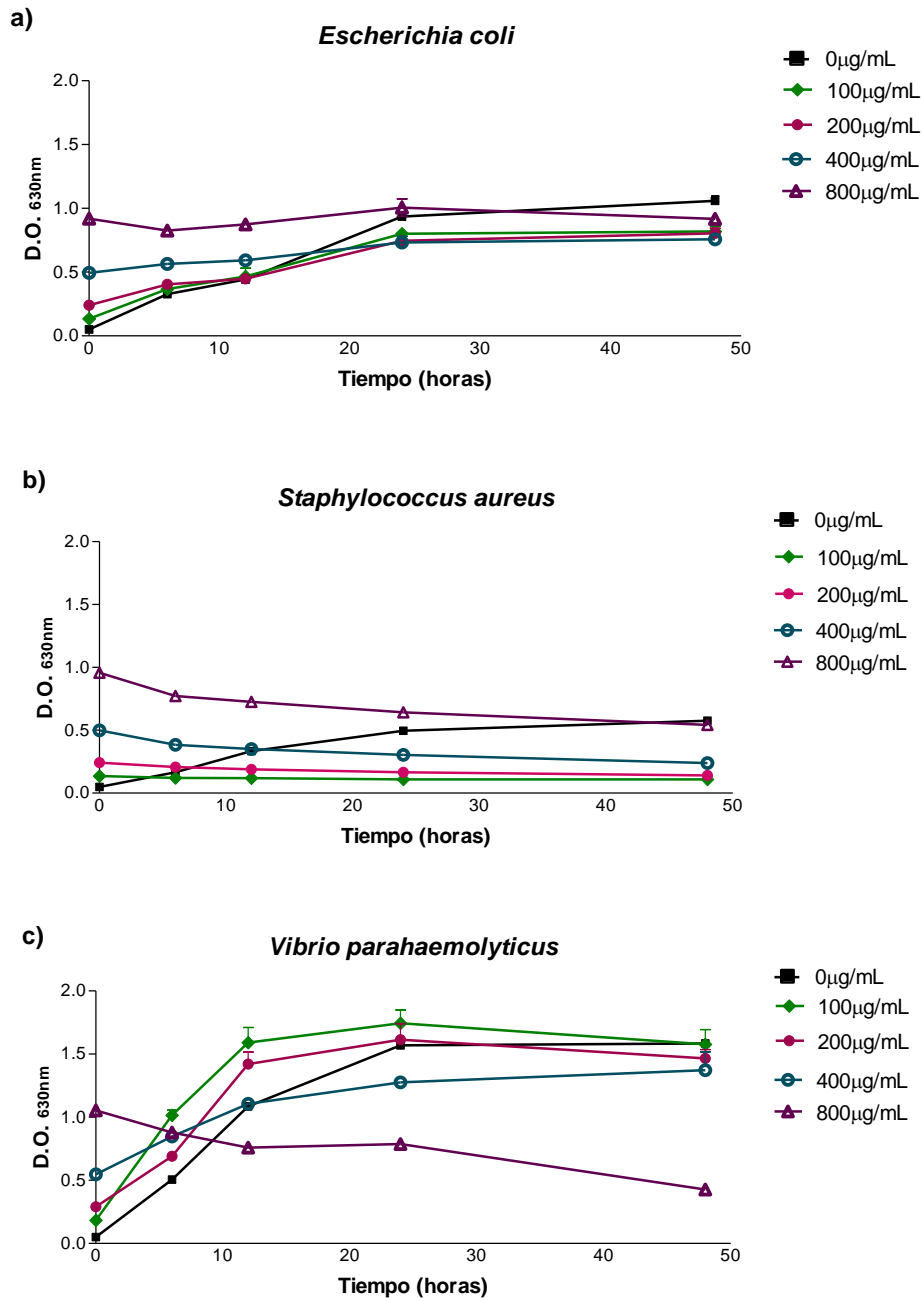


Figura 20. Cinética de la actividad antimicrobiana de las diferentes concentraciones de 2,3-DHPB-AG contra: a) *Escherichia coli*, b) *Staphylococcus aureus* y c) *Vibrio parahaemolyticus*

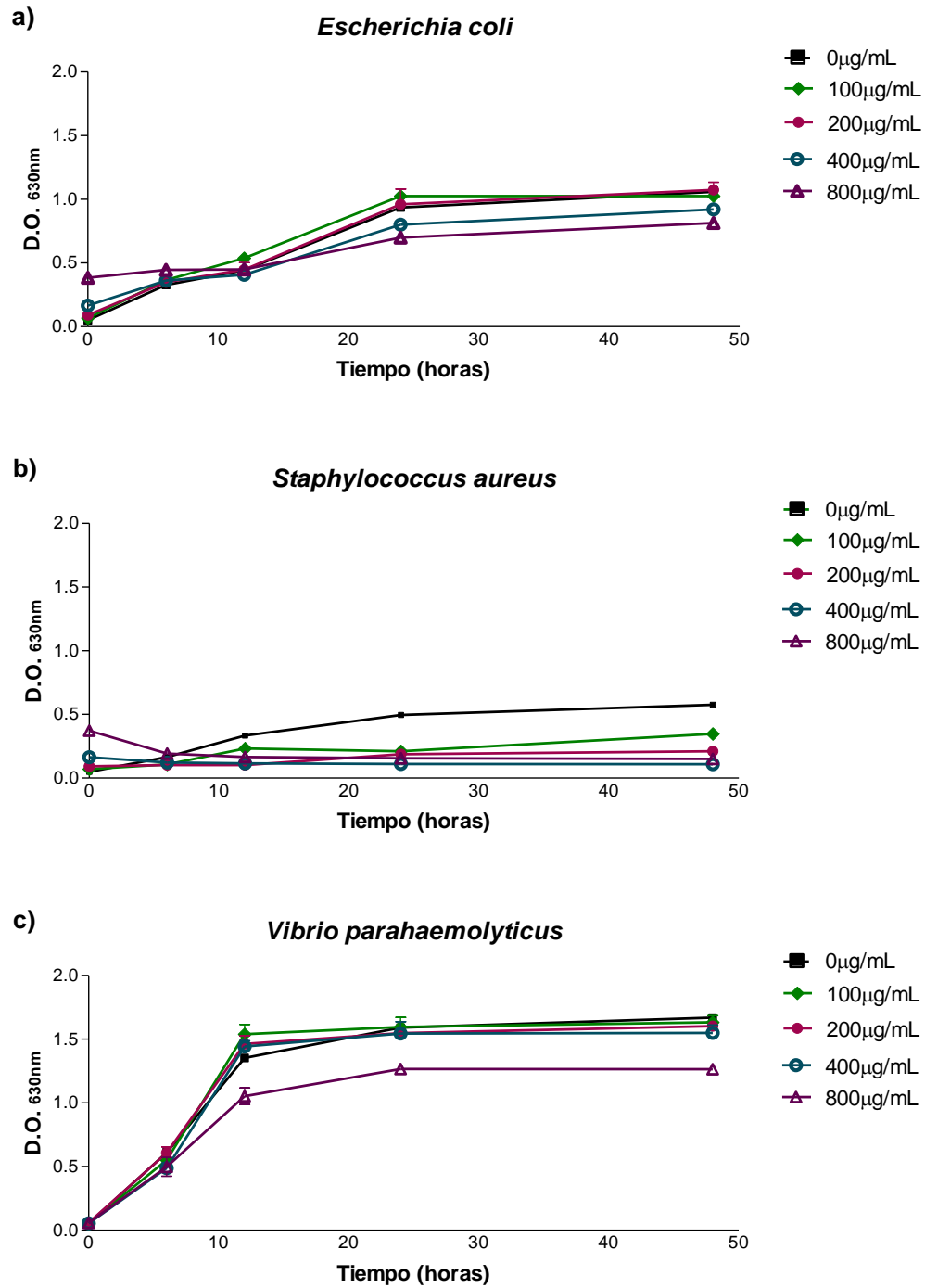


Figura 21. Cinética de la actividad antimicrobiana de las diferentes concentraciones de 2,3-DHPB-A.S contra: a) *Escherichia coli*, b) *Staphylococcus aureus* y c) *Vibrio parahaemolyticus*

Las dimensiones, las características químicas, la viabilidad y la complejidad de la membrana hacen que resulte difícil proporcionar evidencia experimental de la acción de los agentes disruptores de la membrana bacteriana a nivel molecular. La mayoría de lo que se conoce actualmente sobre la acción de los compuestos hidrofílicos catiónicos antimicrobianos se derivan del estudio del modo de acción de los péptidos catiónicos antimicrobianos, y sólo muy pocos de ellos se han caracterizado químicamente. Algunas herramientas utilizadas para el modelo de acción incluyen: difracción de neutrones, espectroscopia de fluorescencia, RMN de estado sólido, resonancia paramagnética de electrones (ERP) y espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).

Para explicar la acción de los compuestos catiónicos, se han propuesto tres modelos (Figura 22), los cuales están basados en el uso de membranas de fosfolípidos de mono capas, bicapas o liposomas. Estos los conforman, el modelo de “barril (barrel-stave)” (Figura 22A). Este se basa en el hecho de que los compuestos catiónicos pueden formar canales a través de bicapas lipídicas de la membrana. El otro es el modelo de “alfombra” (Figura 22B), en el cual los derivados catiónicos antimicrobianos interactúan con los compuestos de la membrana cargados negativamente a través de interacciones iónicas. Y una vez que alcanza la concentración local crítica, los segmentos hidrofóbicos son expulsados del agua e interaccionan hidrofólicamente con los lípidos de la membrana. Por último, el modelo toroidal (Figura 22C), para aliviar la deformación de curvatura causada por la unión del compuesto, las capas de fosfolípidos se doblan de una a otra (Ido y col., 2014).

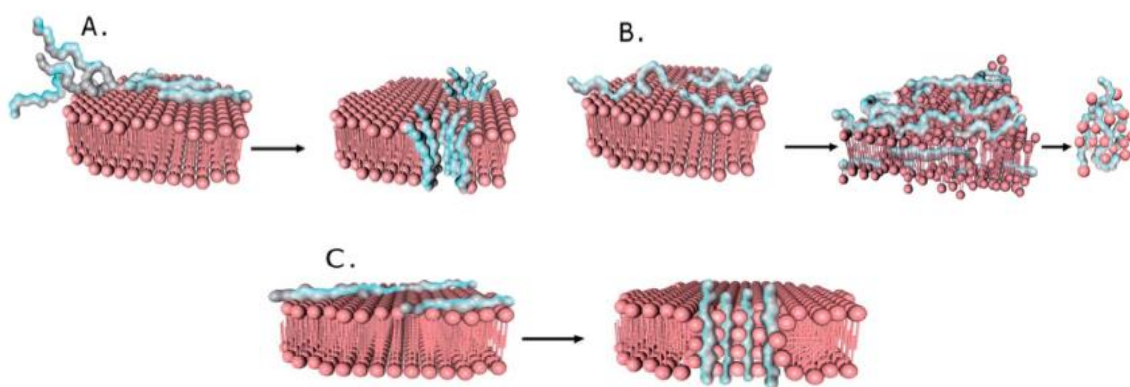


Figura 22. Modelos propuestos para el mecanismo de acción de derivados catiónicos antimicrobianos. A) modelo de barril (barrel-stave), B) modelo alfombra y C) modelo toroidal. (Ido y Fridman., 2014)

Por lo antes descrito, se puede deducir que el modelo que mejor se adapta al estudio realizado, es el modelo de “alfombra”, ya que berberina cuenta con una carga positiva en su estructura y en los productos de sus modificaciones se conservó esa característica; así mismo el modelo de barril explicaría el mecanismo al realizar las modificaciones sobre las propiedades lipofílicas de la molécula. Al formar las interacciones iónicas, la membrana queda deficiente en cargas negativas, por lo tanto, dichas interacciones conducen a rupturas y descomposición de la bicapa lipídica y esto a su vez lleva a una despolarización, disfunción y descomposición de la membrana. Además, es importante mencionar que la permeabilidad de la membrana es diferente para cada compuesto antimicrobiano.

Además del modelo de acción, existen cinco mecanismos que confieren resistencia a compuestos catiónicos antimicrobianos, que de igual manera que los modelos de acción funcionan como bases para establecer nuevas metodologías de acción, pero ahora con relación a la capacidad de las bacterias a resistir al ataque de este tipo de antimicrobianos.

El primer mecanismo involucra la degradación lineal de los compuestos antimicrobianos catiónicos por enzimas bacterianas. El segundo mecanismo involucra la secreción de enzimas bacterianas que se unen a los compuestos y evitan su interacción con la membrana. La incorporación de grupos químicos cargados positivamente dentro de varios componentes de la membrana bacteriana es base del tercer mecanismo, que conduce a una reducción de la afinidad de los compuestos antimicrobianos (hidrofílicos) con la membrana bacteriana. El cuarto mecanismo es el resultado de la formación de biopelículas, las cuales son significativamente menos permeables a las moléculas más pequeñas. Y, por último, la resistencia a varios antimicrobianos catiónicos, se han asociado con la acción de las bombas bacterianas efervescentes (Ido y col., 2014).

Por tanto, se pueden considerar los dos primeros mecanismos para explicar por qué algunos de los compuestos evaluados presentan una inhibición (disminución de la densidad óptica); o también, para explicar por qué en algunos casos el comportamiento cinético siempre es ascendente (no hay actividad del compuesto). Un claro ejemplo de esto es berberina contra *Escherichia coli* (Figura 18a), en esta cinética se presenta un comportamiento ascendente en la densidad óptica de los compuestos, por lo que se puede decir que, la bacteria produce una secreción de enzimas, las cuales se unen al compuesto e impiden su interacción con la membrana. Es por esto que, en ningún punto de la gráfica, se puede observar una disminución de absorbancia.

Análisis de Relación Estructura Actividad

En estudios realizados por Leyva (2017), encontró que, los grupos metilendioxi (acetal, -O-CH₂-O-) y metoxilos (-O-CH₃) del alcaloide berberina son esenciales para su actividad antiproliferativa; el rompimiento de estos grupos en el presente estudio disminuyó la actividad de berberina contra las diferentes líneas celulares evaluadas. Previamente, se determinó que la asociación de moléculas de naturaleza lipofílica (cadenas alifáticas) de aproximadamente 10 átomos de carbono e insaturaciones (ácido geránico) aumenta la actividad antiproliferativa del alcaloide berberina (Leyva, 2017).

Los resultados mostrados en la evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos derivados de berberina 2,3-DHPB, 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS fueron similares a los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antiproliferativa de estos mismos compuestos.

Berberina mostró actividad antiproliferativa contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; mientras que 2,3-DHPB no mostró actividad contra ninguna bacteria evaluada. Además, se observó que el aumento de la lipofilicidad del alcaloide a través de la asociación de los compuestos ácido geránico o ácido sórbico, mostró un resultado positivo en la actividad antibacteriana ya que 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS mostraron una actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* (Tabla 1), demostrándose que el grupo metilendioxi es esencial para la actividad antibacteriana, contra estas bacterias, especialmente contra *Staphylococcus aureus* (bacteria gram positiva), siendo esta la más susceptible.

De los compuestos resultante de la asociación de los compuestos tipo ácido carboxílico, el compuesto 2,3-DHPB-AG mostró una mayor actividad contra *Staphylococcus aureus* comparado con el compuesto 2,3-DHPB-AS. Sin embargo, no logró aumentar la actividad que inicialmente presentó berberina, demostrándose que la asociación de compuestos lipofílicos de entre 6 a 10 átomos de carbono (ácido sórbico y ácido geránico, respectivamente) no logró aumentar la actividad antimicrobiana de berberina. Sin embargo, mantienen la capacidad inhibitoria del compuesto original.

En la actividad antimicrobiana evaluada contra *Vibrio parahaemolyticus*, el compuesto que presentó actividad frente a esta bacteria fue 2,3-DHPB-AG, con respecto al compuesto berberina y a los otros compuestos derivados. Con estos resultados se

demonstró que la asociación del compuesto ácido geránico (compuesto lipofílico) al alcaloide berberina aumenta su actividad antibacteriana contra la bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. *Escherichia coli* y *Vibrio parahaemolyticus* son bacterias Gram negativas, las cuales están compuestas por una capa gruesa de lípidos que les confiere mayor resistencia a los antibióticos y se esperaría que al aumentar la naturaleza lipofílica, en este caso del alcaloide berberina, aumentara su actividad antibacteriana, esto debido a un aumento de la afinidad e interacción con la membrana del microorganismo. Como se puede inferir de las cinéticas, las bacterias de este tipo (Gram negativas) son menos susceptibles a este tipo de compuestos. Sin embargo, si hay un aumento en la lipofilicidad de estos mismos, se esperaría que la susceptibilidad de las cepas aumente, como ocurrió en el caso de *Vibrio parahaemolyticus*.

Estudios recientes sobre la resistencia de antibióticos han demostrado que las modificaciones químicas de compuestos con sustituyentes lipofílicos han aumentado la actividad antimicrobiana contra una serie de bacterias Gram (+) y Gram (-), provocando un aumento de la lipofilicidad de los compuestos originales y una mayor interacción con la membrana de los microorganismos, habiendo un mayor efecto de estos compuestos (Dolezay y col., 2016; Zhang y col., 2012).

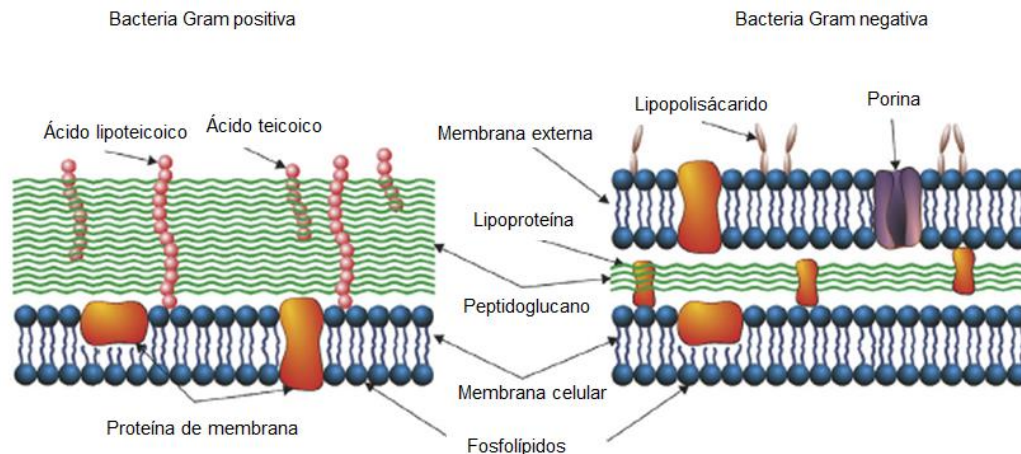


Figura 23. Estructura de la pared celular de bacterias Gram negativas y Gram positivas. (Dolezay y col., 2016)

Estudios publicados por Zhang y col. (2012), demostraron que derivados de ácidos grasos de hasta 14 átomos de carbono o ácidos grasos insaturados y sus derivados monoglicerados de hasta 18 átomos de carbono presentaron una mayor actividad contra *Staphylococcus aureus*. También obtuvo que ácidos grasos saturados de cadena media e insaturados de cadena larga son potentes antimicrobianos contra bacterias Gram (+). Estos estudios nos dan información importante para futuros derivados de berberina, en donde la asociación de compuestos lipofílicos (por ejemplo, ácidos grasos) de hasta 18 átomos de carbono podrían aumentar la actividad antimicrobiana del alcaloide.

La membrana y pared celular de las bacterias son esenciales, es por eso que sirven de objetivo atractivo para el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos. Las membranas bacterianas tienen estructuras relativamente conservadas donde los compuestos pueden ejercer una actividad bactericida, además este tipo de antibióticos no requiere permeabilidad celular, que es frecuentemente un obstáculo para el desarrollo de antibióticos. Las bacterias contienen en su membrana externa componentes cargados negativamente que son objetivos importantes para compuestos antimicrobianos. Las bacterias Gram (-) contiene lipopolisacárido (LPS) y las bacterias Gram (+) contienen ácido teicoico; aquellos compuestos que contengan una carga positiva en su estructura tendrán afinidad hacia estos componentes de la membrana bacterias, ejerciendo una actividad sobre estos microorganismos.

Doleza y col. (2016), realizaron un estudio de compuestos con actividad antibacteriana, derivados de sales de 3-hidroxipiridinio con diferentes longitudes de cadena N-alquilo. Los resultados indicaron que aquellos compuestos que tenían una carga positiva (aminas cuaternarias) presentaban una mayor actividad contra diversas cepas bacterianas. Estos resultados y lo mencionado anteriormente nos proporciona información relevante para entender el mecanismo por el cual berberina y sus derivados presentan actividad contra las bacterias evaluadas en este proyecto.

Tomando en cuenta, que la actividad antibacteriana de los compuestos derivados de berberina contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* estaba relacionada con la alteración de las propiedades lipofílicas/hidrofílicas del alcaloide berberina, se puede establecer la hipótesis de que estos derivados presentan una doble actividad antibacteriana debido a su carga neta positiva (en el átomo de nitrógeno), que pudiera interaccionar con componentes de membrana como LPS (lipopolisacárido) y ácido teicoico,

como se establece en la literatura, así como por las interacciones lipofílicas entre la membrana y la parte no polar de los compuestos.

La estructura externa del LPS está constituido por una cadena de polisacárido, la cual es de naturaleza polar, esta información nos puede ayudar para entender un poco más la actividad de los compuestos. Como se observó en los resultados, el compuesto berberina mostró mayor actividad frente a *Escherichia coli* (bacteria Gram negativa, contiene LPS), este compuesto es de naturaleza polar; el compuesto 2,3-DHPB-AS no mostró actividad frente a este microorganismo, siendo este compuesto de naturaleza lipofílica. Teniendo en cuenta esta información, es más viable que berberina tenga mayor afinidad hacia la parte polisacárido del LPS y de esa manera tener un efecto contra la bacteria.

Otro aspecto importante que podemos tomar en cuenta es el tamaño de la molécula, la asociación de ácido geránico y/o ácido sórbico al alcaloide berberina, aumenta el volumen (tamaño) del alcaloide, por lo cual, si estos compuestos derivados pudieran interaccionar con el LPS, el aumento de su tamaño pudiera provocar un impedimento estérico y por lo tanto la interacción entre la carga positiva del alcaloide y la carga negativa del LPS se vería afectada, teniendo como resultado una actividad nula contra esta bacteria.

Y, por último, según los resultados obtenidos por Wang y colaboradores en 2013, concluyen que la asociación de cadenas alifáticas de entre 9 y 15 átomos de carbono disminuyen las mínimas concentraciones inhibitorias, lo cual estaba relacionado con un aumento en la actividad biológica, que, comparado con los resultados presentados en este estudio, la asociación de compuestos de 6 y 10 átomos de carbono (ácido sórbico y ácido geránico, respectivamente) también aumento su actividad antimicrobiana.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron tres compuestos derivados del alcaloide berberina. Las reacciones se llevaron a cabo en condiciones moderadas, temperatura ambiente y tiempos cortos, obteniendo rendimientos variados: 2,3-DHPB (92%), 2,3-DHPB-AG (56%) y 2,3-DHPB-AS (30%).

Berberina presentó una actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, mientras que berberina, 2,3-DHPB-AG y 2,3-DHPB-AS ejercieron efecto sobre *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, solamente 2,3-DHPB-AG presentó una actividad inhibitoria sobre *Vibrio parahaemolyticus*. Por lo tanto, la carga positiva de berberina y la presencia del grupo acetal, son fundamentales para la actividad antimicrobiana.

Según el análisis de relación estructura actividad, se propone que el mecanismo por el cual este tipo de derivados muestra actividad antibacteriana es a través de la interacción de la carga positiva del átomo de nitrógeno (berberina) con la carga negativa de los componentes de la membrana bacteriana (LPS y ácido teicoico), así como la interacción lipofílica entre la parte no polar del compuesto y la parte lipídica de la membrana.

El aumento de la lipofilicidad de berberina a través de la asociación con ácido geránico (2,3-DHPB-AG) aumenta la actividad del alcaloide contra *Vibrio parahaemolyticus*.

La bacteria más susceptible a los compuestos resultantes de la asociación con ácido sórbico y ácido geránico fue *Staphylococcus aureus*.

RECOMENDACIONES

- Realizar modificaciones químicas al alcaloide berberina con compuestos tipo ácidos grasos (saturados e insaturados) con cadenas de 10 átomos de carbonos o mayores.
- Probar la actividad de esos nuevos compuestos contra diferentes bacterias (aumentar el número de cepas a evaluar)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agustini-Costa, T. Vieira, R. Bizzo, H. Silveira, D. Gimenes, M. 2012. Chromatography and its applications. Ch. 8. Biochemistry, Genetic and Molecular Biology. Sasikumar Dhanaraso.
- Avalos, A. Pérez, E. 2009. Metabolismos secundarios de plantas. Recursos Educativos (Biología), serie fisiología vegetal. 2(3): 119-145.
- Bentley, W. The Isoquinoline Alkaloids. Pergamon Press. 1995.
- Brossi, A. 1986. Alkaloids: chemistry and pharmacology. Academic Press. 29:35-38.
- Cichewicz, R. Kouzi, S. 2004. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and VIH infection Medicinal Research Reviews. 24(1): 90-114.
- Clark, W. Kahn, M. Mitra, A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. Journal Organic Chemistry. 43(14): 1-3.
- Dickschat, J. 2011. Biosynthesis and function of secondary metabolites. Beilstein Journal Organic Chemistry. 7:1620-1621.
- Dolezal, R. Soukup, O. Malinak, D. Savedra, R. Merek, J. Dolezalova, M. Pasdiovova, M. Slajkova, S. Kovabecny, J. Honegr, J. Ramalho, T. Kuca, K. 2016. Towards understanding the mechanism of action of antibacterial N-alkyl-3-hydroxypyridinium salts: Biological activities, molecular modeling and QSAR studies. European Journal of Medicinal Chemistry. 121(2016):699-711.
- Esquer E., Nieves M., Rivas M., Miranda A., and Piña P. 2016. Effects of methanolic macroalgae extracts from *Caulerpa sertularioides* and *Ulva lactuca* on *Litopenaeus vannamei* survival in the presence of *Vibrio* bacteria. Fish & Shellfish Immunology. 51:346-350.
- Gözler, B., Lantz, M., Shamma, M. 1983. The pavine and isopavine alkaloids. J. Nat. Prod. 46:293-309.
- Grycová, L., Jirli, D., Marek, R. 2007. Quaternary protoberberine alkaloids Phytochemistry. 68:150-175.

- Hahn, F. and Ciak, J. 1976. Berberine. *Antibiotics*. 3:577-584.
- Ho, Y. Yang, J. Li, T. 2009. Berberine suppresses *in vitro* migration and invasion of human SCC-4 tongue squamous cancer cells through the inhibitors of FAK, IKK, NF- κ B, u-PA and MMP-2 and -9. *Cancer Letters* 279(2):155-162.
- Ido M. Herzog, and Micha F. 2014. Design and synthesis of membrane-targeting antibiotics: from peptides- to aminosugar-based antimicrobial cationic amphiphiles. *Med. Chem. Commun.* 5: 1015-1024.
- Kennedy, D. Wightman, E. 2011. Herbal extracts and phytochemicals plant secondary metabolites and the enhancement of human brain function. *American Society for Nutrition*. 2: 32-50
- Kupeli, E., Kosar, M., Yesilada, E., Husnu, K. and Baser, C. 2002 Comparative study on the anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic effects isoquinoline alkaloids from the roots of Turkish *Berberis* species. *Life Sci.* 72:645-657.
- Leyva, M. 2017. Modificación química y evaluación de la actividad antiproliferativa de compuestos aislados de la especie vegetal *Argemone gracilentia*. Universidad de Sonora, Sonora. Tesis de Doctorado.
- Leyva, M. 2013. Identificación de Compuestos con Actividad Antiproliferativa de *Argemone gracilentia*. Universidad de Sonora, Sonora. Tesis de Maestría.
- Leyva, M. 2010. Evaluación de la actividad antiproliferativa y actividad antioxidante de *Argemone pleiacantha*, Hermosillo, Sonora. Tesis de Licenciatura.
- Lu, J. Bao, J. Chen, X. Huang, M. Wang, Y. 2012. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-12.
- Mahapatra A. Vijay M., Nitin P., Vikrant R., and Inshad A. 2014. Synthesis and antitubercular activity of berberine derivatives. *Chemistry of Natural Compounds*. 50(2): 321
- Mambu, L., Martin, M.T., Razafimahefa, D., Ramanitrahasimbola, D., Rasoanaivo, P., Frappier, F. 2000. Spectral characterisation and antiplasmodial activity of bisbenzylisoquinolines from *Isolona*. *Planta Medica*. 66(6):537-540.

- Mazid, M. Khan, T. Mohammad, F. 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. *Biology and Medicine*. 3(2): 232-249.
- Mohammed, A. 2006. Study of the alkaloids of *Argemone ochroleuca* growing in Saudi Arabia. Arabia. King Saud University Tesis de Maestría.
- Navarro M., Ruiz P., Valencia D., Robles R., Ruiz E., Virués C., Hernandez J., Domínguez Z., and Velazquez C. 2013. Antibacterial Activity of Sonoran Propolis and Some of Its Constituents Against Clinically Significant *Vibrio* Species. *Foodborne pathogens and disease*. 10(2): 150-158
- Navarro, V., Villareal, M., Rojas, G. 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in mexican traditional medicine for of treatment of infectious diseases. *Journal of Ethnopharmacology*. 53:43-147.
- Núñez, P. 2010. Estudio fitoquímico de la especie nativa *Berberis tabeinsis*(LAC) *Berberidaceae*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Tesis de Maestría.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia a antimicrobianos. Nota descriptiva, 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Pereira, C. Rosa, P. Meireles, A. 2007. Extraction and isolation of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis*. *Technical and Economical Analysis*. 1-6.
- Pérez, I. 2006. Metabolitos secundarios aislados de las raíces y hojas de *Stevia jorullensis* H.B.K. Pachuca de Soto, Hidalgo. Tesis de licenciatura
- Ratsimamanga-Urverg, S., Rasoanaivo, P., Ramiamanana, L., Milijaona, R., Rafatro, H., Verdier, F., Rakoto-Ratsimamanga, A., Le Bras, J. 1992. In vitro antimalarial activity and chloroquine potentiating action of two bisbenzylisoquinoline enantiomer alkaloids isolated from *Strychnopsis thouarsii* and *Spirospermum penduliflorum*. *Planta Med*. 58(6): 540-543.
- Schmeller, T., Latz-Brüning, B., and Wink, M. 1997. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry* 44:257- 266.
- Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M. 2003 La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3): 355-363.

- Sun, Y. Xun, K. Wang, Y. Chen, X. 2009. A systematic review of the anticancer properties of berberine, an natural product from Chinese herbs. *Anti-cancer Drugs*. 20(9):757-769.
- Wang, N. Feng, Y. Zhu, M. Tsang, C. Man, K. Tong, Y. Tsao, S. 2010. Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cell: the cellular mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry*. 111:1426-1436
- Yuh-Chwen, C. Fang-Rong, C. Ashraf, T. Pei-Wen, H. Yang-Chang, W. 2003. Cytotoxic benzophenanthridine and benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone Mexicana*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*. 23: 521-526
- Zhang, H. Zhang, L. Peng, L. Dung, X. Wu, D. Wu, V. Feng, F. 2012. Quantitative structure-activity relationships of antimicrobial fatty acids and derivatives against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Zhejiang University- SCIENCE B*. 13(2):83-93.