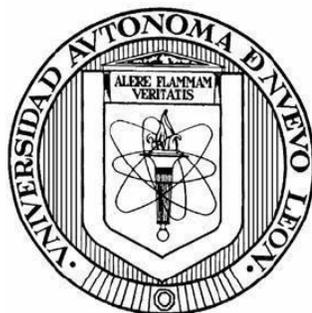


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



BIOPROSPECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ESPECIES
VEGETALES SOBRE BACTERIAS ASOCIADAS A ÚLCERA DE PIE DIABÉTICO

POR

QBP. MYRNA CECILIA NÁJERA PEÑA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

2022

**BIOPROSPECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE ESPECIES
VEGETALES SOBRE BACTERIAS ASOCIADAS A ÚLCERA DE PIE
DIABÉTICO**

Comité de Tesis



Dra. María Porfiria Barrón González
Presidente



Dra. Yadira Quiñones Gutiérrez
Secretario



Dr. Ramón Gerardo Rodríguez Garza
Vocal



Dra. Licet Villarreal Treviño
Vocal



MC. Daniel Julio Eguiarte Lara
Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado parcialmente por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica, PAICYT, UANL CN1222-20.

Donde sea que estés, eres uno con las nubes y uno con el sol y las estrellas que ves. Eres uno con todo.

Shunryu Suzuki

En homenaje y memoria al
† Dr. Sergio Moreno Limón †
quien fue vocal de este proyecto, compañero y amigo, gracias eternas por todo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por no soltarme de su mano cuando más lo he necesitado, por el don de la vida y guiarme a lo largo de este camino. Agradezco a él porque sigo aquí valorando y disfrutando cada vez más mis logros, por mostrarme a las personas correctas para mi camino espiritual, por las enseñanzas que sin duda vienen de él y por tantas bendiciones en las que él está presente. Te agradezco, por tanto y todo.

A la Dra. María Porfiria Barrón González, directora y asesora de este trabajo, por abrirme las puertas del laboratorio. Gracias por su paciencia, disposición, tiempo y apoyo durante el desarrollo de mi tesis, por sus enseñanzas y consejos para llevar a cabo y concluir este proyecto.

A mis estimados y queridos vocales: Dra. Yadira Quiñones, Dra. Licet Villarreal, Dr. Sergio Moreno QEPD (†), Dr. Ramón Rodríguez y Dr. Daniel Eguiarte, les agradezco su disponibilidad y apoyo en el transcurso de este proyecto.

A CONACYT por el apoyo económico brindado durante estos dos años.

A mis amigos y compañeros de maestría: Gabriela Sánchez, Oscar Castillo, Esteban López, por el gran equipo que somos juntos y separados, estoy muy orgullosa de ustedes por haber concluido otro logro más y por estos dos años de momentos agradables. A mi mejor amigo Omar Villaseñor, gracias por siempre estar para mí.

A mi amiga de laboratorio Beatriz Licea, porque estuviste trabajando conmigo, gracias por hacer mi estancia en el laboratorio más alegre, amena, por compartir conmigo tantas horas de bioensayos, por tus dulces que eran salvación para días tan pesados. Gracias por las risas, por las pláticas y por tu amistad.

DEDICATORIAS

A ustedes mis pilares de vida y fortaleza, que con su peculiaridad me demuestran todos los días que me aman, por formar a la mujer que hoy puedo ser, y porque sin ustedes ninguno de mis logros tendría una razón. Gracias por creer en su hija, son tanto para mí, los amo infinitamente papás.

A mis dos hermanos, que muchos lazos nos unen, siempre estaremos unidos.

Al amor de mi vida, por su apoyo incondicional durante la maestría, por tu paciencia y por estar a mi lado todos estos años compartiendo momentos inolvidables...Te amo Marco.

A mis abuelitos Virginia, Santiago (+) sus recuerdos los llevo en mi corazón y nunca los olvidaré. A mi abuelita Chabe, gracias por compartir sus consejos de vida conmigo, por brindarme su cariño y amor siempre.

A mi perrito Odie ojitos de aceituna, por transmitirme felicidad en los momentos de estrés, por ser mi amigo fiel.

Y a mis loros Tuki, Tiki, Kiwi y Piolin por sus cantos, ocurrencias y compañía en las noches de estudio.

También le dedico esta tesis a todas las personas que me brindaron consejos, son maestros de vida que me impulsaron a no darme por vencida, a concluir todo lo que inicio, a confiar en mí misma para desarrollar mejor mis habilidades.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	5
RESUMEN	13
1.INTRODUCCIÓN	15
2.ANTECEDENTES.....	17
2.1 Generalidades del pie diabético.....	17
2.2 Clasificaciones de severidad del pie diabético (PD).....	19
2.3 Infección y microorganismos asociados a úlceras diabéticas.....	20
2.4 Tratamiento	21
2.5 Fitoterapia.....	26
2.6 Material vegetal y propiedades	27
2.7 Toxicidad.....	38
2.7.1 Hemólisis en eritrocitos humanos por extractos etanólicos.....	38
2.8 Biomateriales	39
2.9 Polímeros bioactivos para la elaboración de apósitos	39
2.9.1 Alginato.....	40
2.9.2 Carboximetilcelulosa.....	40
3. JUSTIFICACIÓN.....	41
4. HIPÓTESIS.....	42
5. OBJETIVOS	42
5.1 Objetivo General.....	42
5.2 Objetivos Especificos	42
6. MATERIAL Y MÉTODOS	43
6.1 Material biológico	43
6.1.1 Bacterias aisladas a partir de úlcera de pie diabético (UPD)	43
6.2 Material vegetal.....	44
6.2.1 Colecta e identificación.....	44
6.2.2 Material vegetal utilizado en el transcurso de esta investigación	45
6.2.3 Procesamiento de las especies para la obtención de extractos etanólicos.....	46
6.2.4 Perfil fitoquímico de los extractos etanólicos del material vegetal	47
6.3 BIOENSAYO <i>IN VITRO</i>	49
6.3.1 Valoración de la inhibición de los extractos etanólicos sobre BAUPD.....	49
6.3.2 Evaluación de la actividad citotóxicas.....	50
6.3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana sobre BAUPD de las fracciones	

obtenidas de cada extracto etanólico	51
6.4 Biopelícula	52
6.4.1 Elaboración de biopelículas de alginato de sodio y carboximetilcelulosa ...	52
6.6 Bioensayo <i>in vivo</i>	54
6.7 Análisis Estadístico	55
6.8 Estrategia General	56
7. RESULTADOS	57
7.1 Bacterias asociadas a úlcera de pie diabético	57
7.2 Valoración de la hemólisis ocasionada por cepas relacionadas a UPD	60
7.3 Cinética de crecimiento de bacterias asociadas a UPD	61
7.4 Determinación de grupos fitoquímicos presentes en los extractos etanólicos	62
7.5 Evaluación de la actividad biológica de los extractos etanólicos de especies	64
7.6 Evaluación de la actividad hemolítica de los extractos seleccionados con mayor actividad biológica mediante método de Hemólisis indirecta en placa.....	68
7.7 Fraccionamiento de extractos etanólicos seleccionados y Evaluación de la actividad inhibitoria sobre cepas de microorganismos aisladas de UPD.....	69
7.8 Evaluación <i>in vitro</i> de biopelículas funcionalizadas con EE de <i>P. laevigata</i> y <i>V. officinalis</i> con actividad antibacteriana sobre cepas aisladas de UPD.....	72
7.9 Actividad citotóxica <i>in vitro</i> del extracto de <i>P. laevigata</i> sobre células VERO	74
7.10 Valoración <i>in vivo</i> de biopelícula de Ag+ EE-PI sobre herida	75
8. DISCUSIÓN	80
9. CONCLUSIONES	92
10. PERSPECTIVAS	93
11. BIBLIOGRAFÍA	94
12. ANEXO 1. Análisis estadístico.....	108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Etiología de infecciones del pie diabético (IPD)	18
2	Tratamiento antibiótico empírico de las infecciones del pie diabético	22
3	Descripción taxonómica de <i>V. officinalis</i>	29
4	Descripción taxonómica de <i>Cordia boissieri</i>	29
5	Descripción taxonómica de <i>Prosopis laevigata</i>	34
6	Descripción taxonómica de <i>Morus</i>	36
7	Descripción taxonómica de <i>Eucalyptus</i>	38
8	Etapas del procesamiento del material vegetal para la obtención de los extractos etanólicos	50
9	Descripción de las pruebas para detectar grupos funcionales presentes en los extractos etanólicos	51
10	Descripción de las características analizadas para las bacterias aisladas de UPD	65
11	Comparación de grupos fitoquímicos presentes en los extractos etanólicos estudiados.	67
12	Determinación de UFC/mL (1×10^{-7}) cultivadas en presencia de extractos etanólicos de las especies vegetales utilizadas en el proyecto.	71
13	Inhibición porcentual de las cepas de bacterias aisladas de las UPD y cultivadas en presencia de extractos etanólicos de cinco especies vegetales	72
14	Evaluación de la actividad antibacteriana de las biopelículas funcionalizadas con metabolitos secundarios	80
15	Comparación de la inhibición porcentual de células VERO en presencia del extracto etanólico de <i>P. laevigata</i> a siete dosis	82
16	Comparación de la DL50 [$\mu\text{g/mL}$] del extracto etanólico de <i>P. laevigata</i> sobre células VERO	83
17	Evolución de la cicatrización	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Aspecto general de pie diabético con ulceraciones	17
2	Aspecto general de <i>V. officinalis</i> y taxonomía	28
3	Aspecto general de <i>Cordia boissieri</i>	29
4	Aspecto general de <i>P. laevigata</i>	34
5	Aspecto general de Morus	36
6	Aspecto de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	37
7	Fotografía de <i>Verbena officinalis</i>	47
8	Fotografía de Morus	47
9	Fotografía de <i>Prosopis laevigata</i>	48
10	Fotografía de <i>Cordia boissieri</i>	48
11	Fotografía de <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	49
12	Esquema de estrategia experimental general que se siguió en este proyecto	60
13	Aspecto macroscópico de las cepas aisladas de úlceras diabéticas	61
14	Observación microscópica de las cepas aisladas de UPD	62
15	Prueba de movilidad de las cepas aisladas de UPD	63
16	Prueba de Hemólisis de cepas aisladas de úlcera de pie diabético	64
17	Cinética de crecimiento de Cepas (C1, C2, C3 y C4)	66
18	Determinación de la actividad biológica de los extractos etanólicos de especies vegetales sobre bacterias aisladas de úlcera diabética por método espectrofotometría	69
19	Inhibición porcentual comparativa entre los EE de cinco especies vegetales comparadas con la inhibición del antibiótico ceftriaxona	70

20	Determinación de inhibición porcentual de las cepas aisladas de UPD en presencia de los cinco EE utilizados por el método de UFC/mL	72
21	Método de Hemólisis indirecta en placa	73
22	Especies vegetales que presentaron halo de Hemólisis en agar sangre	74
23	Cromatograma en papel de <i>P. laevigata</i>	75
24	Fracciones obtenidas de los extractos de <i>P. laevigata</i> y <i>V. officinalis</i>	75
25	Inhibición de fracciones obtenidas del extracto de <i>V. officinalis</i> sobre C1 y C2 aislada de ulcera de pie diabético.	76
26	Determinación de inhibición en cm de las fracciones obtenidas de <i>V. officinalis</i> comparadas con el antibiótico ceftriaxona 0.5 µg/mL.	77
27	Inhibición de fracciones obtenidas del extracto de <i>P. laevigata</i> sobre C3 y C4 aislada de ulcera de pie diabético	78
28	Determinación de inhibición en cm de las fracciones obtenidas de <i>P. laevigata</i> comparadas con el antibiótico ceftriaxona 0.5 µg/mL.	79
29	Evaluación antibacteriana de diferentes biopelículas con metabolitos secundarios de extractos de <i>V. officinalis</i> y <i>P. laevigata</i>	81
30	Resultado de citotoxicidad del extracto etanólico de <i>P. laevigata</i>	82
31	Biopelículas elaboradas en base a Alginato de sodio y colocación sobre piel de murino	85

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ag-Na	-----	Alginato de sodio
API	-----	Analytical Profile Index
BAUPD	-----	Bacterias asociadas a úlcera de pie diabético
CM	-----	Carboximentilcelulosa
DL ₅₀	-----	Dosis letal media
DM	-----	Diabetes mellitus
DMEM	-----	Dulbeccos modified Eagle medium
DMSO	-----	Dimetilsulfato
DO	-----	Densidad óptica
DFU	-----	Diabetic Foot Ulcer
ECN	-----	Estafilococos coagulasa negativos
FBS	-----	Suero fetal bovino
FE	-----	Fase estacionaria
FeCl ₃	-----	Cloruro de hierro
FM	-----	Fase móvil
H ₂ O ₂	-----	Peróxido de hidrogeno
H ₂ SO ₄	-----	Ácido sulfúrico
HCl	-----	Ácido clorhídrico
ICGS	-----	International Consensus Grading System
IDSA	-----	Infectious Diseases Society of America
INEGI	-----	Instituto de Información Nacional de Estadística y Geografía
IPD	-----	Infección de pie diabético
IWGDF	-----	International Working Group on the Diabetic Foot
KMnO ₄	-----	Permanganato de potasio
MTT	-----	345 dimetiltiazol 2,5 difeniltetrazolio bromuro
NaOH	-----	Hidróxido de sodio
OMS	-----	Organización Mundial de la Salud
PBS	-----	Proteínas Ligandas a la Penicilina
PD	-----	Pie diabético
SARM	-----	<i>S. aureus</i> Resistente a Meticilina
UFC	-----	Unidades Formadoras de Colonias
UPD	-----	Úlcera de Pie Diabético
VERO	-----	Células epiteliales del riñón de mono verde africano
VI	-----	Vía intravenosa
VO	-----	Vía oral

RESUMEN

Las úlceras del pie diabético son una complicación significativa y a menudo preceden a la amputación traumática de las extremidades inferiores. Los tratamientos de elección que se proponen para favorecer la cicatrización de la herida, son antibioterapias y cirugías, que ocasionan efectos secundarios como daños renales, hepáticos y resistencia microbiana. Existen terapias alternativas, como la fitoterapia, en donde se ha optado por buscar compuestos activos para erradicar la infección causada por los microorganismos que se encuentran en las úlceras, además de cicatrizar la herida y evitar su extensión. Objetivos: diseñar biopelícula de Ag como apósito de extractos etanólicos de *Verbena officinalis*, *Cordia boissieri*, *Morus*, *Prosopis laevigata* y *Eucalyptus camaldulensis* y valorar la actividad inhibitoria *in vitro* sobre bacterias asociadas a UPD; así como su evaluación *in vivo* sobre un modelo murino. Metodología: Se aislaron 4 cepas bacterianas que presentan morfología de cocos, motilidad positiva, catalasa negativa, aerobias facultativas, Hemólisis alfa y tinción Gram positiva 3 de las 4 cepas. Posteriormente se obtuvieron los extractos etanólicos (EE) de metabolitos secundarios de las especies vegetales antes mencionadas y se realizó: a) el análisis fitoquímico, b) evaluación de la actividad antibacteriana sobre las 4 cepas de bacterias aisladas de UPD por recuento bacteriano en placa. Enseguida se seleccionaron los fitoextractos con mayor actividad antibacteriana y se evaluó la actividad citotóxica por el método de Hemólisis indirecta y se determinó que solamente los EE de *P. laevigata* y *V. officinalis* no causan hemólisis. Del fraccionamiento de los EE de *V. officinalis* y *P. laevigata* se obtuvo que *P. laevigata* presentó mayor actividad antibacteriana sobre la cepa 3. Se diseñaron biopelículas de Ag+EE-*P. laevigata*, Ag+Ceftriaxona y solo Alginato y se valoró la actividad antibacteriana *in vitro*; la biopelícula de Ag+EE-*P. laevigata* inhibió 93.58 % el crecimiento de la cepa 3, posteriormente se evaluó esta biopelícula en heridas infectadas con la cepa 3 en un modelo murino juvenil hembras Balb/C observando la cicatrización de las heridas de los murinos tratados con la biopelícula de Ag+EE-*P. laevigata*. Estos resultados representan un gran avance en el posible tratamiento alternativo de la infección bacteriana de las úlceras de pie diabético, previniendo el daño de extremidades inferiores y futuras amputaciones.

ABSTRACT

Diabetic foot ulcers are a significant complication and often precede traumatic amputation of the lower extremities. The treatments of choice that are proposed to promote wound healing are antibiotics and surgeries, which cause side effects such as kidney and liver damage and microbial resistance. There are alternative therapies, such as herbal medicine, where it has been chosen to look for active compounds to eradicate the infection caused by the microorganisms found in the ulcers, in addition to healing the wound and preventing its spread. Objectives: to design Ag biofilm as a dressing for ethanolic extracts of *Verbena officinalis*, *Cordia boissieri*, *Morus nigra*, *Prosopis laevigata* and *Eucalyptus camaldulensis* and to assess the inhibitory activity *in vitro* on bacteria associated with UPD; as well as its *in vivo* evaluation on a murine model. Methodology: 4 bacterial strains were isolated that present cocci morphology, positive motility, negative catalase, facultative aerobes, alpha hemolysis and positive Gram staining 3 of the 4 strains. Subsequently, the ethanolic extracts (EE) of secondary metabolites of the aforementioned plant species were obtained and the following were performed: a) phytochemical analysis, b) evaluation of the antibacterial activity on the 4 strains of bacteria isolated from UPD by bacterial plaque count. Next, the phytoextracts with the highest antibacterial activity were selected and the cytotoxic activity was evaluated by the indirect hemolysis method and it was determined that only the EE of *P. laevigata* and *V. officinalis* do not cause hemolysis. From the fractionation of the EE of *V. officinalis* and *P. laevigata* it was obtained that *P. laevigata* presented greater antibacterial activity on strain 3. Ag + EE- *P. laevigata* biofilms were designed, Ag + Ceftriaxone and only Alginate and the antibacterial activity was assessed *in vitro*; the Ag + EE- *P. laevigata* biofilm inhibited 93.58% the growth of strain 3, subsequently this biofilm was evaluated in wounds infected with strain 3 in a Balb / C female juvenile murine model observing the wound healing of murines treated with the Ag + EE-*P. laevigata* biofilm. These results represent a great advance in the possible alternative treatment of bacterial infection of diabetic foot ulcers, preventing damage to the lower limbs and future amputations.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes es una enfermedad grave y crónica que comprende una serie de alteraciones metabólicas frecuentes que se caracterizan por la presencia de hiperglucemia, que es debida a un déficit en la secreción de insulina, ocurriendo un descenso de las demandas biológicas de glucosa o bien un incremento en su producción.

La diabetes mellitus (DM) es considerada actualmente como uno de los principales problemas de salud mundial, y una de las causas más frecuentes de hospitalización en adultos. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018 publicada por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) la diabetes fue la segunda causa de muerte a nivel nacional en 2019, pues cobró la vida de 104 mil 354 personas. En los hospitales de Seguridad Social en México (IMSS) se concentra la mayoría, por lo que hay saturación en los servicios de urgencias y hospitalización por pacientes con diabetes mellitus (Montiel 2017).

Actualmente en México existen 8.6 millones de personas con diabetes lo que representa una prevalencia de 17%. En Nuevo León la prevalencia es de 14.60%. El programa de diabetes mellitus de la Secretaría de Salud afirma que las complicaciones de la diabetes se encuentran asociadas a estilos de vida no saludables dentro de los que se encuentran la alimentación hipercalórica, poca o nula actividad física, entre otros (Secretaría de Salud 2012). Las complicaciones relacionadas con la diabetes han aumentado particularmente el pie diabético, lo que lleva a un deterioro significativo de la calidad de vida de las personas que la padecen. El pie diabético es una complicación grave consecuencia de la diabetes, es la pérdida de la integridad de la barrera subcutánea, lo que favorece la aparición de lesiones de la piel y provoca un daño en los vasos sanguíneos y nervios. Los pacientes presentan disminución en la sensibilidad y mala circulación del pie, derivando a la formación de una úlcera, considerándose como principal causa posible de amputación (Frykber y Banks 2016).

La Organización Mundial de la Salud (OMS 2016) declara que los agentes participantes en la infección del pie diabético varían según se trata de una infección superficial o profunda en las úlceras, y características como el tiempo de evolución de la lesión, factores metabólicos del paciente, higiene del pie, el lugar de residencia, el uso previo de antibióticos, entre otras. El retraso de la cicatrización de las úlceras del pie diabético (UPD) supone un problema complejo en la salud de los pacientes y disminución en la calidad de vida de las personas afectadas. Un diagnóstico rápido, así como el inicio de antibioterapia empírica temprana dirigida a los microorganismos causantes de la infección son vitales para poder conservar el miembro afectado, sin embargo, el fracaso del tratamiento antibiótico bien dirigido puede deberse al desarrollo de resistencias, sobreinfección o a la extensión de la infección al hueso, además de ocasionar efectos secundarios en hígado o riñón (García et al. 2007).

La terapia óptima para el control de las infecciones de pie diabético (IPD) aún no se ha establecido, es multidisciplinario, pero autores coinciden en que el aislamiento y la identificación del agente microbiano infectante es esencial para una terapia antibiótica apropiada, de acuerdo con los patrones de sensibilidad (Shaw et al. 2010).

Hoy día, se ha observado un especial interés por el empleo de plantas medicinales en el tratamiento de procesos infecciosos, debido a las limitaciones del uso de antibióticos sintéticos y de otras terapias disponibles. La importancia de la fitoterapia en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades es una fuente de descubrimiento de nuevas drogas que en algunos casos tiene un costo inferior a la síntesis de nuevos fármacos, se ha demostrado que aproximadamente la mitad de los medicamentos aprobados por la FDA entre 1981 y 2019 son naturales o derivados de productos naturales (Newman y Cragg 2020). El regreso del interés científico sobre las plantas medicinales, investigando su riqueza y variabilidad química, ha impulsado su empleo en muchas partes del mundo, representando una forma complementaria de curar, en que el empirismo de la terapia queda atrás en función de la evidencia científica.

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del pie diabético

El pie es la parte más vulnerable en un diabético, está más alejado del sistema nervioso central y se convierte en el sitio común de lesiones complicadas. Al pie diabético se le define como el conjunto de síndromes en los que la existencia de neuropatía, isquemia e infección provocan alteraciones tisulares o úlceras secundarias ocasionando una importante morbilidad que puede devenir en amputaciones (Tirado et al. 2014). Es la complicación crónica de la diabetes mellitus, la primera causa de amputaciones no traumáticas en el mundo, además de ser la mayor causa de admisión de pacientes diabéticos en los hospitales y se debe al riesgo de desarrollar úlceras en las extremidades inferiores, teniendo una incidencia de un 15% sobre todos los pacientes que portan diabetes (Martínez et al. 2020).

El pie neuropático no se úlcera espontáneamente, son el resultado de la interacción de diferentes factores que contribuyen a la ruptura del pie en riesgo, no existe un mecanismo de ulceración sino una combinación de insensibilidad y factores extrínsecos como caminar descalzo, pisar objetos afilados, usar zapatos mal ajustados o factores intrínsecos como sensación disminuida y el desarrollo de una callosidad que progresa a una úlcera al caminar (Sereday et al. 2009). La neuropatía es la patología más importante, juega un papel importante en el desarrollo del pie diabético y se encuentra en más del 90% de los casos con diabetes mellitus tipo 2, conduce a la ulceración y en México es la causa más importante de amputación de miembros inferiores (Reynoso et al. 2020; Toledo et al. 2009).

Las personas con diabetes mellitus tipo 2 que desarrollan pie diabético tienen características particulares, entre las que se encuentran tener más de siete años de evolución de la enfermedad y glucosa sostenida mayor de 183 mg/dl (Gallegos 2012).

En un estudio realizado en Monterrey Nuevo León, se hace referencia a que la presencia de pie diabético es variable dependiendo de factores como la región geográfica, el nivel socioeconómico de la persona y el nivel educativo, debido a la capacidad de asimilar la información y contar con recursos necesarios para el cuidado de la enfermedad. En el mismo año, hubo otra investigación en Monterrey N.L. en donde se menciona que hay una relación estrecha entre la caracterización de las personas con ulceraciones, es decir, identificaron las características personales, familiares, clínicas y socioeconómicas de las personas con diabetes mellitus tipo 2 con ulceraciones en alguna de sus manifestaciones y determinaron que factores como: sexo, más frecuente en pacientes de género masculino que en femenino, el rango de edad: presentándose mayormente de 31 hasta 95 años, y otro factor importante es que la mayoría de los pacientes que se investigaron en este caso, eran viudos, la pérdida de su pareja provoca alteraciones de la salud como depresión, desánimo y pérdida del deseo de vivir. Con respecto al consumo de alcohol, tabaco, marihuana y cocaína, la prevalencia fue en consumo de alcohol y tabaco (Gardea et al. 2015).

Los factores de riesgo y las complicaciones pueden ser prevenidos o minimizados a partir de un amplio conocimiento de estos y en la clasificación de los mismos, con el fin de disminuir el desarrollo de úlceras en el pie, las amputaciones y la tasa de mortalidad (Reynoso et al. 2020).

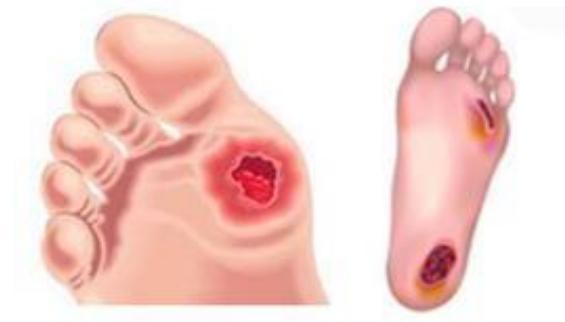


Figura 1.- Aspecto general de pie diabético con ulceraciones. Se observan úlceras plantares localizadas prevalentemente en primer y quinto metatarsiano en zonas acras (Reynoso et al. 2020).

2.2 Clasificaciones de severidad del pie diabético (PD)

Para realizar una clasificación de una UPD debe hacerse una evaluación exhaustiva. Una clasificación apropiada debe facilitar el tratamiento de la úlcera y por lo general predecir la evolución de esta. Ningún sistema de clasificación se usa de manera universal, pero uno de los más utilizados es el descrito por Wagner (Pérez et al. 2019) que incluye 6 grados según la profundidad de la úlcera, gravedad, la extensión de la necrosis tisular y se consideran infecciones a partir del grado 3. También es muy utilizada la clasificación de la Universidad de Texas, una derivación del esquema de Wagner, que combina grados y estadios, es más compleja, pero hace hincapié en la presencia o la ausencia de infección como modificador de comorbilidad e isquemia, indicadores de mala evolución de la úlcera (Gorosito 2020).

El International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF) y Infectious Diseases Society of America (IDSA), han propuesto por separado una clasificación relativamente intercambiable, donde la presencia de infección en la herida es definida clínicamente, y no por la positividad en un cultivo. La clasificación de la IWGDF tiene 4 categorías, que van desde no infectado, hasta infección severa. La diferenciación se basa en signos y síntomas clínicos, nos permite la detección de pie en riesgo, lo que constituye una estrategia costo-efectiva para disminuir la amputación mayor, posee criterios que pueden ser utilizados por centros de salud con mínimos recursos (González et al. 2019).

En la IDSA el grado 1 son heridas leves que no tienen purulencia o manifestación de inflamación, el grado 2 tiene dos o más manifestaciones de inflamación, y no hay evidencia de celulitis a más de 2 cm alrededor del sitio de la úlcera y el paciente no tiene ningún síntoma sistémico. En el grado 3, la celulitis se extiende más allá de 2 cm del sitio de la úlcera, o está por debajo de la fascia, así como abscesos profundos y gangrena. El grado 4 o severo, está acompañado de osteomielitis, toxicidad sistémica o inestabilidad metabólica, tal como fiebre, hipotensión, taquicardia, confusión, leucocitosis, acidosis, hiperglicemia y azotemia.

La elección del sistema de PD a utilizar está condicionada por aspectos como los recursos disponibles o los objetivos que se persiguen. Existe un número muy elevado de sistemas de clasificación de PD publicados, y la importancia de una correcta clasificación de las lesiones determina el tratamiento a realizar y el aporte de datos sobre el pronóstico de los pacientes respecto a posibles amputaciones. Por ello, en los últimos años la tendencia es el desarrollo de sistemas más complejos que vayan más allá de los aspectos descriptivos y que sean capaces de prever el riesgo de amputación de forma eficaz (González et al. 2019).

2.3 Infección y microorganismos asociados a úlceras diabéticas

Aproximadamente 56 % de las úlceras de pie diabético se infectan. El pie diabético infectado es una de las complicaciones más frecuentes de la diabetes mellitus, se asocia a complicaciones graves, constituye la principal causa de hospitalización y amputación de miembros inferiores (Carro et al. 2020). Las infecciones se localizan en la piel y los tejidos blandos, pero no es infrecuente que el hueso se vea afectado. Los signos clínicos de infección involucran celulitis, edema, incremento en la temperatura local, coloración anormal, olor desagradable y formación de abscesos. Desde el punto de vista microbiológico, la distinción entre colonización e infección en una úlcera crónica tampoco es siempre factible. La colonización es la norma en las úlceras del pie diabético y generalmente no interfiere la cicatrización. Cuando la carga bacteriana es mayor o igual a 10^5 UFC/cm² o gramo de tejido, se considera que los microorganismos son capaces de sobrepasar los mecanismos defensivos, retrasar la cicatrización, invadir los tejidos y producir una infección, además que se deben presentar los signos clínicos (Barberán et al. 2009). El adecuado y precoz diagnóstico de la infección, el conocimiento de su gravedad, la detección del microorganismo causante y los antibióticos a los que son sensibles se hace mandatorio para efectuar un tratamiento temprano y apropiado de las infecciones en el pie diabético (Martínez et al. 2020).

Los microorganismos causales de estas infecciones proceden de la flora cutánea e intestinal del propio paciente; *Staphylococcus aureus* es el más prevalente de todos. Pero existen variaciones en función del tipo de infección y determinadas situaciones del paciente. En las infecciones superficiales, agudas y leves predominan los cocos Grampositivos (*S. aureus* y los estreptococos betahemolíticos, sobre todo del grupo A y B), mientras que las más profundas y graves suelen ser polimicrobianas con cocos Grampositivos, bacilos Gramnegativos (Enterobacterias y *P. aeruginosa*) y anaerobios (Peptostreptococcus y Bacteroides). Los anaerobios se encuentran en presencia de isquemia o necrosis y generalmente formando parte de infecciones mixtas. Los pacientes con úlceras crónicas suelen tener infecciones polimicrobianas y los que, además, han recibido antibióticos recientemente, manipulación quirúrgica o han estado hospitalizados o en centros sociosanitarios acaban por ser colonizados o infectados por microorganismos multirresistentes como: *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), estafilococos coagulasa negativos (ECN), enterococos, e incluso levaduras (*Candida*) (Carro et al. 2020).

En la Tabla 1, se muestran los microorganismos asociados a úlceras diabéticas en diferentes estados clínicos de infección.

Tabla 1.- Etiología de infecciones del pie diabético (IPD) tomado de (Liu et al. 2017)

Infección	Microorganismos
Celulitis	<i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i>
Úlcera no tratada con antibióticos	<i>S. aureus</i> <i>S. pyogenes</i>
Úlcera tratada previamente con antibióticos	<i>S. aureus</i> <i>S. aureus resistente a meticilina (SARM)</i> <i>Estafilococo coagulasa-negativo (ECN)</i> <i>Streptococcus spp</i> <i>Enterococcus sp</i> <i>Enterobacterias</i> <i>P. aeruginosa</i> ^a <i>Candida spp</i> ^b <i>Corynebacterium spp</i> ^b <i>Otros bacilos Gramnegativos no fermentadores</i> ^b .
Fascitis necrosante	<i>Cocos Grampositivos aerobios</i> <i>Enterobacterias</i> <i>Bacilos Gramnegativos</i>

^a Úlcera macerada ^b Microorganismos menos prevalentes

En dos ensayos clínicos publicados del pie diabético (Lipsky et al. 2015) los cocos Grampositivos representaron el 70-80% de los aislamientos, situándose la incidencia de *S. aureus* meticilina resistente entre el 5-15%, aunque en algunas series este porcentaje llega a ser hasta del 30%, por lo que el conocimiento de la microbiota local es muy recomendable dada la gran variabilidad entre estudios. El conocimiento de la presencia de *S. aureus* meticilina resistente a su vez es importante porque se asocia con una pobre cicatrización, bacteriemia, mayor mortalidad e incidencia de pérdida de extremidad (Cervantes et al. 2014). La etiología por *Pseudomonas aeruginosa* es más variable; en la mayoría de los casos son pacientes muy crónicos, tratados previamente con antibióticos y asociados al sistema sanitario, por lo que se hace muy difícil distinguir entre colonización e infección y por tanto poder definir su poder patogénico.

Reporta (Frykberg y Banks 2003) en un estudio que, para analizar la microbiología de las úlceras, se deben tomar cultivos cuando hay signos de infección como purulencia o inflamación, además de tomar del drenaje purulento o del material curado de la base de la úlcera. Las infecciones polimicrobianas predominan en las infecciones graves del pie diabético o incluyen una variedad de cocos aerobios Grampositivos, Gramnegativos como *Pseudomonas spp*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* y *Proteus*, así como por anaerobios (Frykberg 2003; Joseph y Lipsky 2015).

El objetivo del muestreo y cultivo a partir de muestras de pie diabético es identificar al o los microorganismos responsables de la infección, y no para diagnosticar la infección por si misma (Ochoa et al. 2018). El consenso para tomar una muestra se basa en que la infección de pie diabético (IPD) debe haber sido diagnosticada con base a signos y síntomas clínicos, confirmada y clasificada por un experto, la muestra solo debe tomarse si la confirmación clínica indica infección grado 2-4 de acuerdo con el International Consensus Grading System (ICGS) (Lipsky et al. 2015). Antes de tomar la muestra, la

herida debe haber sido debridada quirúrgicamente para eliminar las bacterias colonizantes y la carga bacteriana, dando lugar a una mejor posibilidad de cultivar solo el organismo causante de la infección y evitar los organismos colonizantes. Aún no existe un consenso sobre el tipo de muestra ideal y al momento existen informes de muestras tomadas mediante aspirados, raspados, hisopo y biopsia, todo esto dependiendo del criterio del médico tratante y la afectación que pueda causar el muestreo de acuerdo con las condiciones de la herida y del paciente (Ochoa et al. 2018).

Para infecciones complicadas a osteomielitis, el método de elección de muestreo es la obtención de una biopsia de hueso quirúrgicamente. La investigación radiológica es un componente crítico para la evaluación de la infección en este caso (Jeffcoate et al. 2009; Lipsky et al. 2014). La terapia previa con antibióticos también condiciona el tipo de microorganismo que se puede aislar. Pacientes sin tratamientos previos, generalmente presentan infección por Gram-positivos aerobios, mientras que, en pacientes previamente tratados, los Gram-negativos prevalecen y generalmente con resistencia a antibióticos, lo cual requiere terapias de amplio espectro y de mayor tiempo (Miller y Henry 2009). En pacientes hospitalizados y/o con tratamiento antimicrobiano previo, se agregan otras bacterias de mayor resistencia a antibacterianos tales como *S. aureus* meticilina resistente, Enterococos (especialmente con uso previo de cefalosporinas) y bacilos Gram negativos no fermentadores (*Pseudomonas* y *Acinetobacter baumannii*) (Barberán et al. 2009).

Debido al incremento de la farmacorresistencia existe la necesidad de identificar el agente causal antes de iniciar la terapia con antibiótico (Joseph y Lipsky 2010). Como esto puede retrasar críticamente el inicio del tratamiento, se recomienda iniciar una terapia de amplio espectro y cuando el resultado microbiológico esté disponible, reducir el espectro antibiótico solo para atacar al agente etiológico. Con esto, el análisis microbiológico provee información útil para optimizar el tratamiento, mejorar la evolución, evitar o disminuir el tiempo de hospitalización y las amputaciones, limitar los posibles efectos secundarios y la selección de bacterias resistentes a antibióticos (Tascini et al. 2011).

El uso muy frecuente de antibióticos en los pacientes con ulceración hace que la aparición de resistencias a éstos sea un factor por considerar en la elección del tratamiento antibiótico empírico, dado que la emergencia de estos microorganismos multirresistentes puede conllevar, especialmente en el caso de *S. aureus* meticilina resistente, un peor pronóstico y un mayor riesgo de amputación (Cervantes et al. 2014).

Por otra parte, en recientes estudios (Barberán et al. 2009) encontraron que, en los pacientes con úlcera del pie diabético complicada con osteomielitis, tratándose de una de las infecciones más frecuentes en el pie diabético, que se presenta entre el 10-15% de las infecciones leves y casi el 50% de las infecciones graves. Se desarrolla cuando la úlcera penetra a nivel de hueso o la articulación, la ubicación más frecuente son las cabezas de los metatarsianos y la articulación metatarso falángica del primer dedo. La osteomielitis del pie diabético suele producirse por el resultado de la penetración en profundidad de una infección contigua de partes blandas a partir de una herida.

Hasta el momento la literatura revisada demuestra que la osteomielitis puede ser causada por una gran variedad de microorganismos, de los cuales las bacterias constituyen los agentes etiológicos principales, siendo el *S. aureus* el patógeno aislado con mayor frecuencia en los cultivos óseos, bien de forma aislada o en presencia de otro agente patógeno.

Múltiples estudios han determinado los microorganismos presentes en estas infecciones, y su sensibilidad a antibióticos (Martínez et al. 2020), en España, demuestra que los microorganismos más frecuentes son *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. En Guatemala, se reporta como el más frecuente *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* sp, y *Enterococcus* sp (Balbuena 2017), en República Dominicana, indicó como más frecuentes a *P. aeruginosa*, *Klebsiella* sp, *E. coli* y *S. aureus*, y en un estudio realizado en México, se demuestra que los microorganismos más resistentes son *S. aureus*, *E. coli*, y *Staphylococcus epidermidis* (Ruiz et al. 2017).

2.4 Tratamiento

El tratamiento en las IPD es complejo y relativamente largo (desde 2 hasta 10 semanas) y a la fecha no existen guías oficiales o estandarizadas de abordaje; todo depende de la experiencia del médico tratante y de los consensos que se han logrado en las reuniones científicas para tratar el tema. Las opciones de tratamiento van desde el control metabólico del paciente, pasando por la terapia con antibióticos y terapias adicionales como oxígeno hiperbárico, con utilización de cirugía lo más conservadora posible, hasta llegar a la amputación de la zona afectada (Bansal et al. 2017).

La antibioterapia es el abordaje inicial para bloquear el proceso infeccioso en el pie (Liu et al. 2017). Bajo esta condición, los defectos funcionales de los neutrófilos hacen aconsejable preferentemente el uso de antibióticos bactericidas y la prolongación del tratamiento; la isquemia condiciona el empleo de dosis de antibióticos elevadas, y la prevalencia de insuficiencia renal conduce a evitar fármacos nefrotóxicos (Lipsky et al. 2004). La gravedad de la infección condiciona la selección del tratamiento antimicrobiano empírico, el lugar donde se realiza, y la vía de administración (Jude et al. 2007; Jeffcoate et al. 2009).

Una vez conocido el agente causal y su sensibilidad, sobre todo si el aislamiento es en cultivo puro, se harán los cambios pertinentes para adecuar el tratamiento. Ante el fracaso de una terapia correcta, hay que valorar la necesidad de cirugía y la existencia de microorganismos causales no aislados por un mal procedimiento de las muestras o por ser de difícil crecimiento. Uno de los grandes problemas actuales de la antibioterapia empírica inicial es el riesgo de fracaso por la presencia de microorganismos resistentes. La probabilidad de acertar desde el principio es mucho mayor si se conoce la prevalencia local de los microorganismos causales y sus patrones de sensibilidad (Barberán et al. 2009).

(Carro et al. 2020) recientemente menciona que el tratamiento antibiótico debe ser iniciado en forma endovenosa a la brevedad, realizando cobertura de amplio espectro para Gram negativos, Gram positivos y anaerobios, y el paciente debe ser internado. Las recomendaciones de la IDSA, en relación al esquema inicial para infecciones moderadas a graves, incluyen diferentes antibióticos tales como levofloxacina, ceftriaxona, moxifloxacina, ertapenem, ciprofloxacina con clindamicina. En un estudio realizado por (Báez et al. 2017) mencionan que el uso empírico de ceftriaxona ayudó a mejorar la calidad de evolución de los pacientes con úlceras diabéticas en 3 grado de clasificación de Wagner, úlceras profundas acompañadas de celulitis, infección con formación de abscesos, cambios de color y en algunos casos osteomielitis, la mayoría de los casos requerían intervención quirúrgica. La ventaja de utilizar este antibiótico, es la excreción del mismo, ya que se excreta por el tracto biliar y no se requiere el ajuste de las dosis en caso de insuficiencia renal. En el caso de las infecciones superficiales y leves pueden tratarse con antibióticos orales con actividad sobre cocos Grampositivos aerobios (*S. aureus* y *Streptococcus spp*) y de buena biodisponibilidad. Una opción apropiada es la amoxicilina-ácido clavulánico, y en caso de alergia a los betalactámicos puede usarse levofloxino, clindamicina o en caso de SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina), cotrimoxazol, Tabla 2.

Tabla 2.- Tratamiento antibiótico empírico de las infecciones del pie diabético. (García et al. 2019).

Infeción	Primera elección	Alternativa
Leve	Amoxicilina Ácido clavulánico VO	Levofloxacino VO Clindamicina VO Cotrimoxazol VO
Moderada- Grave	Entrapenem IV Linezolid IV/VO Glucopéptido IV	Piperacilina IV Ceftriaxona Amoxicilina, ácido clavulánico IV Cefalosporina IV Metronidazol IV/VO Clindamicina IV/VO Linezolid IV/VO
Muy Grave	Imipinem Piperacilina-tazobactam IV Linezolid IV	Fluoroquinola IV Amikacina IV

El tratamiento de la infección requiere terapia antimicrobiana, que puede administrarse por vía sistémica (a todo el cuerpo por vía oral o parenteral (es decir, intravenosa o intramuscular) o tópica (es decir, localmente, mediante la aplicación de antisépticos, antibióticos u otras preparaciones antimicrobianas (soluciones, cremas, geles, pomadas). A veces es difícil para el médico determinar si una herida del pie diabético está infectada, especialmente si el paciente tiene neuropatía periférica o enfermedad arterial. Además, la presencia de microorganismos, especialmente si son patógenos o están presentes en grandes cantidades, también puede perjudicar la cicatrización de heridas. Dados los problemas asociados con el tratamiento de las infecciones del pie diabético, el tratamiento con antimicrobianos tópicos tiene beneficios potenciales, por ejemplo, podría dar lugar a niveles muy altos de medicamentos en el sitio infectado (con poco o nada en otros sitios) y puede permitir el uso de agentes que no pueden administrarse por vía sistémica (Lipsky et al. 2015).

Estos hallazgos, combinados con el deseo de evitarla terapia antibiótica sistémica cuando sea posible, han llevado a muchos médicos a considerar el uso de la terapia antimicrobiana tópica para las heridas infectadas abiertas, especialmente aquellas que no cicatrizan a pesar del tratamiento aparentemente apropiado.

Los antimicrobianos tópicos se han formulado tradicionalmente de una de dos maneras. Como ungüentos, son más oclusivos, a menudo contienen vaselina y se usan mejor para lesiones secas. Como cremas, son menos oclusivas, se lavan con agua, son menos sucias y son las mejores para las lesiones húmedas. Las nuevas tecnologías han permitido la incorporación de antimicrobianos en los apósitos, como alginatos, espumas, colágeno y esponjas, lo que potencialmente permite la liberación controlada en la superficie de la herida. Un problema importante con las terapias tópicas es que internacionalmente ninguna agencia de supervisión oficial ha estandarizado y aprobado pruebas específicas para establecer la eficacia y seguridad de estos agentes (Cooper 2004).

El uso de una aplicación tópica tiene muchas ventajas potenciales en comparación con la administración de antibióticos sistémicos, que incluyen: una concentración alta y sostenida del agente antimicrobiano en el sitio de la infección; la necesidad de usar solo una cantidad limitada del antimicrobiano en el sitio seleccionado; evitar la posible toxicidad asociada con el tratamiento sistémico; capacidad de usar nuevos agentes no disponibles para uso sistémico; aplicación fácil en el entorno ambulatorio; y potencialmente mejor adherencia del paciente al tratamiento. Los tratamientos tópicos también pueden resultar útiles para abordar el problema global creciente de los organismos resistentes a múltiples fármacos que ahora no se pueden tratar con la mayoría de los agentes sistémicos (Neely et al. 2009).

Una revisión resumió y analizó los datos sobre la efectividad de la terapia antibiótica sistémica para las infecciones del pie diabético (Selva et al. 2015). Sin embargo, la falta de datos disponibles ha dificultado la evaluación de la eficacia de los antimicrobianos tópicos para las úlceras del pie diabético (Drucker 2012; Lipsky et al. 2015; Peters et al. 2016).

Experimentos realizados, han evaluado los agentes antimicrobianos para diversas heridas crónicas (incluidas las úlceras del pie diabético) concluyendo que pocos agentes sistémicos mejoraron los resultados, pero la curación acelerada se asoció con el uso de varias sustancias tópicas (O'Meara et al. 2014). Un estudio encontró que tratamiento con antibióticos o antisépticos para curar las úlceras venosas de las piernas encontró algunas pruebas que respaldan el uso de yodo cadexómero, pero no el uso rutinario de productos a base de miel o plata (O'Meara et al. 2014). Se necesitaban más pruebas antes de poder llegar a conclusiones sobre otros agentes. Se ha evaluado, la efectividad de varias intervenciones para mejorar la curación de las úlceras crónicas del pie diabético encontró evidencia limitada del beneficio de cualquier agente para la curación de las heridas del pie diabético (Game et al. 2016).

Otra revisión del tratamiento con apósitos para heridas a base de plata o agentes tópicos para las úlceras del pie diabético no encontró ensayos controlados aleatorios que informaran resultados sobre las tasas de curación o la resolución de la infección (Bergin y Wraight 2006). Del mismo modo, una revisión de apósitos o agentes tópicos que contienen plata para tratar heridas crónicas infectadas o contaminadas concluyó que no había pruebas suficientes, sobre la base de tres ensayos aleatorios, para recomendar estos tratamientos (Vermeulen et al. 2017).

Se ha reportado, sobre la miel tópica para el tratamiento de heridas concluyendo que puede reducir el tiempo de curación para quemaduras leves a moderadas de espesor superficial y parcial e incluso heridas postoperatorias infectadas, pero no acelera significativamente la cicatrización de la úlcera de la pierna (Jull et al. 2015).

Finalmente, un estudio reciente de la efectividad de las intervenciones en el tratamiento de las infecciones del pie diabético encontró seis estudios que investigaron el uso de agentes tópicos (Peters et al. 2016), pero los métodos y resultados no permitieron a los autores obtener conclusiones definitivas. Entre los dos estudios de antibióticos tópicos, uno encontró que un péptido antimicrobiano, la crema de pexiganán (Locilex®), fue similar en efectividad a un antibiótico sistémico (ofloxacina) en el tratamiento de las úlceras del pie diabético levemente infectadas, mientras que otro estudio de terapia adyuvante con un colágeno de gentamicina (junto con la terapia antibiótica sistémica) fue difícil de interpretar debido a problemas metodológicos (Peters et al. 2016).

2.5 Fitoterapia

Dentro de los reinos de la naturaleza que contribuyen hasta hoy en disminuir síntomas y prevenir enfermedades, destaca el reino vegetal. Las plantas, debido a su complejo metabolismo del cual sólo se conoce un tercio, considerando la variedad de especies existentes a nivel mundial y aquellas inexploradas hasta hoy, sin considerar aquellas especies ya extintas (Avello y Cisternas 2010).

La investigación de plantas medicinales, en la última década, ha adquirido gran importancia, se han explorado las propiedades farmacológicas de numerosas plantas medicinales y las oportunidades en fitoterapia que ofrecen nuevos enfoques para combatir las enfermedades. Aproximadamente el 25% de los fármacos existentes tienen una extracción vegetal o bien se han sintetizado a partir de sustancias obtenidas en la investigación fitoquímica (Bhalla et al. 2015). El interés científico sobre las plantas medicinales, investigando su riqueza y variabilidad química, ha impulsado una revalorización de su empleo en muchas partes del mundo, representando una forma complementaria de curar, en que el empirismo de la terapia queda atrás en función de la evidencia científica, armonizando la medicina (Gallegos 2012). A diferencia de la medicina sintética o convencional, la fitoterapia utiliza matrices vegetales complejas. Estas matrices las constituyen plantas enteras, partes de ellas (hojas, raíces, frutos o corteza) y sus metabolitos secundarios resultados de tratamientos directos con algún solvente o medio que concentre los compuestos afines y facilite su administración, son los llamados extractos. En cualquier caso, en esta matriz compleja nos encontramos con un sin número de compuestos de diferente naturaleza química, a esta mezcla se la llama fitocomplejo. El fitocomplejo es la mezcla de sustancias activas y otras acompañantes que actúan en conjunto para lograr un mismo fin terapéutico, que no sería el mismo si se administraran por separado, como monosustancias. Estas sustancias activas son llamadas técnicamente metabolitos secundarios y se refieren a las sustancias que son el producto secundario de la fotosíntesis y que intervienen en procesos vegetales como la defensa frente a patógenos, y protección a los rayos UV, entre otros. La mezcla de metabolitos secundarios es única para cada especie, puesto que su biosíntesis se rige principalmente

por la genética vegetal, pero también influyen la fisiología, el estrés, la procedencia geográfica y condiciones de recolección del vegetal, entre otros factores. Los metabolitos secundarios corresponden a compuestos que dependiendo de la orden genética pueden ser biosintetizados siguiendo diversas rutas metabólicas, así podemos encontrar compuestos de la familia fenólica como los flavonoides; terpénica como las saponinas y aceites esenciales; alcaloides como la cafeína; esteroidea como los cardiotónicos y fitohormonas, y polímeros heterogéneos como las gomas y mucílagos (Allaica, 2015).

En México existe una extensa variedad de tratamientos fitoterapéuticos que forman parte de la herbolaria tradicional se han transmitido en la población, principalmente de generación en generación. Soportada por aproximadamente 5000 especies, la herbolaria ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas (García et al. 2019). Tanto en los países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo, el uso y la comercialización de fitofármacos y productos naturales con fines medicinales muestran un crecimiento acelerado en los últimos años (Cordero et al. 2002), lo que se evidencia con el aumento significativo en la demanda mundial por estos productos.

2.6 Material vegetal y propiedades

Se han realizado investigaciones dirigidas a buscar nuevas terapias antimicrobianas como opciones alternas a los tratamientos con antibióticos conocidos, debido a la alta tasa de resistencia que presentan los patógenos microbianos (Pava et al. 2017).

Los diversos mecanismos de acción antibacteriana de las plantas y los posibles metabolitos implicados han sido estudiados mediante ensayos de susceptibilidad antimicrobiana y análisis fitoquímicos debido a los potenciales usos contra las enfermedades infecciosas. Diversos estudios han demostrado que los fitometabolitos secundarios obtenidos, tales como alcaloides, flavonoides, taninos y otros compuestos de naturaleza fenólica son responsables de las actividades antimicrobianas (Pandey 2007).

2.6.1 *Verbena officinalis*

Verbena officinalis (Figura 2) reconocida también como hierba de Santa Isabel, verbena macho, verbena de San Juan. La familia de las *Verbenaceas* es muy amplia, se estima existen 250 especies distintas sin contar a algunas subespecies, y aunque similares en aspecto, no todas son medicinales. En la (Tabla 3) se muestra el análisis taxonómico de acuerdo con (Claros 2006).



Figura 2. Aspecto general de *V. officinalis* y taxonomía. A. En donde se observan las flores, y las hojas B (Claros et al. 2006).

Tabla 3. Descripción taxonómica de *V. officinalis* (Claros et al. 2006)

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Lamiales
Familia:	Verbenaceae
Genero:	Verbena
Especie:	<i>Verbena officinalis</i>

Es una hierba perenne que puede crecer fácilmente en cualquier terreno, se encuentran en terrenos con cierta humedad y en bordes de caminos. Su tallo es recto y puede alcanzar alturas de 1 metro, y de él se desprenden una gran cantidad de ramas las cuales tienen un surco marcado, las hojas tienen formas de lanzas irregulares, con lóbulos de colores que van desde lila claro hasta púrpura intenso, se agrupan en forma de espigas, de las que sobresale una flor. Se le puede encontrar en praderas, bosques, cercana a cuerpos de agua, y en escombreras, debido a su gran adaptabilidad. La verbena completa resulta de interés

para fines medicinales, raíces, tallos, hojas y flores los cuales tienen funciones estimulantes sobre el sistema nervioso, en enfermedades de la piel se utiliza como agente suavizante, antiinflamatorio y antibacteriano, especialmente para tratar heridas de difícil cicatrización. Posee el heterósido verbenalósido, el cual a partir de esta sustancia se obtienen otros compuestos con efectos similares como el verbenalol, la verbenalina, y el hastatósido. Como sedante se emplea como relajante cardíaco, para combatir el insomnio, aminorar estados de ansiedad, disminuir dolores intensos de cabeza como las migrañas. También tiene propiedades astringentes (por los taninos) que ayudan a la sanación de heridas, posee efectos antiinflamatorios (por los mucílagos), por lo que resulta ideal para una gran variedad de lesiones. Provoca la circulación de sangre en forma local, lo cual tiene efectos benéficos en las heridas.

Estudios realizados muestran que el extracto de cloroformo de las partes aéreas de la planta, tienen acción antiinflamatoria y analgésica aplicada por vía tópica. Por otra parte, se ha evaluado su actividad cicatrizante, se realizó una investigación acerca de extracto acuoso de *V. officinalis* en la cicatrización de heridas cutáneas inducidas. Concluyendo que el uso del extracto de *V. officinalis*, es benéfico en la cicatrización de heridas (Sharmilla y Ortega 2013).

V. officinalis mostró una notable actividad antimicrobiana frente a aislamientos clínicos de bacterias, los extractos etanólicos de sus tallos, hojas y raíces y sus fracciones fueron efectivos frente a cepas Gram positivas, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, así como cepas Gramnegativas de *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Citrobacter freundii*. El extracto etanólico de tallo fue más potente para inhibir el crecimiento de todos los microorganismos, que exhibieron una actividad significativa contra las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, incluso más alto que el antibiótico amoxicilina. En este trabajo se confirmaron los usos etnomedicinales de *V. officinalis* como remedio para las infecciones microbianas (Ahmed et al. 2017).

2.6.2 *Cordia boissieri*

Cordia boissieri (Figura 3), también conocido como anacahuita, olivo mexicano; es un árbol perenne que llega a medir 5 metros de altura, sus hojas son ovadas, de 15 a 20 cm de largo y de superficie pilosa o aterciopelada. Posee unas flores blancas con centro amarillento; su fruto es ovoide, de color pardo verdoso. Tiene una distribución por el Noreste del México a lo largo de la Sierra Madre Oriental. Se le considera la flor oficial del Estado de Nuevo León. Tradicionalmente las hojas son utilizadas en el tratamiento de reumatismo y problemas bronquiales (Alvarado et al. 2004). En la Tabla 4 se presenta la taxonomía de *Cordia boissieri*, de acuerdo con (Quattrocchi 2000).

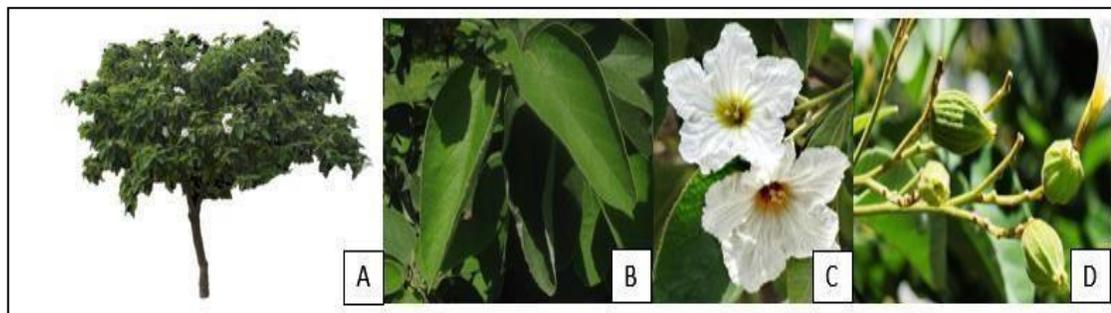


Figura 3. Aspecto general de *Cordia boissieri* A. En donde se observan sus hojas de textura aterciopelada B, flores C y fruto D (Quattrocchi 2000).

Tabla 4. Descripción taxonómica de *Cordia boissieri* (Quattrocchi 2000)

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Lamiales
Familia:	Boraginaceae
Genero:	<i>Cordia</i>
Especie:	<i>Cordia boissieri</i>

Recientemente se reportó que *C. boissieri* posee actividad antibacteriana contra *S. aureus*, utilizando las hojas de la planta; así también se menciona la aproximación a un aislamiento en el cual se identificó una estructura triterpénica (Pérez 2019).

En otro trabajo demostraron que esta especie posee potencial antimicrobiano contra *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* (Mendoza et al. 2017). También se ha registrado investigación acerca de los aceites esenciales a partir de las flores de anacahuita cultivada en Egipto, donde los principales componentes determinados fueron tipo sesquiterpenos como la clase predominante (Owis 2014). En un estudio reportaron que aceites esenciales de *C. boissieri* mostraron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras (Rodríguez et al. 2014).

En el estudio de (Pérez 2019) determinaron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* de raíz y hoja en extractos metanólicos y en extractos de diclorometano; el extracto metanólico además presentó actividad contra *C. albicans* y contra *Serratia marcescens* y baja actividad frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* y *E. cloacae*. Así mismo se observó actividad en extractos metanólicos en hojas, flor, fruto y raíz contra *S. pneumonie*.

Algunas especies de *C. boissieri* ha sido reportada por poseer efectos relacionados con el tratamiento de la diabetes mellitus, por lo que esta especie tiene potencial para el manejo de diabetes. Se realizó un estudio en el cual se entrevistaron pacientes femeninas diagnosticadas con diabetes mellitus y éstas mencionaron que la anacahuita es usada dentro de los remedios herbales para tratar la diabetes (Johnson et al. 2006).

2.6.3 *Prosopis laevigata*

El mezquite es considerado un recurso natural muy importante para las zonas áridas y semiáridas, debido a los diferentes usos: alimento para el ganado (hojas y vainas), alimentación humana, en forma de harinas y bebidas fermentadas. De la corteza se extraen curtientes, la madera es utilizada para duela, madera aserrada, mangos de herramientas, hormas para zapatos en escala industrial, gomas y taninos. El mezquite se distribuye en regiones áridas y semiáridas de México y regiones del sur y sureste de los Estados Unidos. En México desde el estado de Sonora hasta el estado de Oaxaca, pasando por todos los estados del centro, este y oeste.

Es un árbol (Figura 4) o arbusto leñoso, el tallo se ramifica a baja altura en ocasiones al nivel del suelo. Alcanza hasta 12-14 m de altura. La madera es dura y pesada, en el centro es café o negra muy durable por su dureza y consistencia (Rodríguez et al. 2014).



Figura 4. Aspecto general de *P. laevigata* (flores A, ramas espinosas B y hojas C) (Rodríguez et al. 2014).

Las hojas son bipinadas, las flores se encuentran agrupadas en inflorescencias en espigas, son sumamente pequeñas y producen un aroma y néctar agradable para la polinización. La raíz es profunda. El fruto es una vaina, la semilla es del tamaño de un frijol o menor en forma aplastada o aplanada. Las ramas presentan espinas laterales. El crecimiento de mezquite se encuentra íntimamente relacionado con la profundidad del suelo y la disponibilidad de agua en el subsuelo. Por tal motivo, los ejemplares que alcanzan mayor altura y grosor del fuste se localizan en valles con suelos profundos, así como en los márgenes de ríos y arroyos, cuerpos de agua y drenaje de los escasos escurrimientos en zonas áridas y semiáridas (Dhananjaya et al. 2014).

La madera también se utiliza para leña y para obtener carbón de excelente calidad por su altopoder calorífico. El mezquite ha sido estudiado extensivamente revelando propiedades medicinales atribuidas a los alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas y compuestos fenólicos distribuidos en las partes leñosas de la planta, así como en hojas y en polen (Dhananjaya et al. 2014). En la Tabla 5 se presenta la taxonomía de *P. laevigata* de acuerdo con Fontana et al.2018

Tabla 5. Descripción taxonómica de *Prosopis laevigata* (Fontana et al. 2018)

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Fabales
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Genero:	Prosopis
Especie:	<i>Prosopis laevigata</i>

En las vainas y semillas de mezquite se han reportado 10-15% proteínas y particularmente un 38% de proteína en los núcleos de la semilla, considerándolas una excelente fuente de péptidos bioactivos (Ríos et al. 2007). En los extractos del mezquite se han confirmado propiedades hipoglucemiantes y antihiperlipidémicas (Sharma y Singla 2013), actividad antidiabética, actividad cardioprotectora y antihipertensiva (Huisamen et al. 2013) y, además, actividad antibacteriana *in vitro* (Dos Santos et al. 2015;De Souza et al. 2011). Se reportó que las cumarinas, alcaloides, taninos y flavonoides en el extracto de *P. laevigata*.

Dentro de los resultados de las pruebas preliminares antimicrobianas realizadas por el método de difusión de pozos, encontraron que el extracto de *P. laevigata* fue activo contra todos los aislados clínicos como: *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, y *S. aureus* (Sánchez et al. 2016).

En un reciente estudio utilizando la semilla, demuestran y concluyen que los biopéptidos aislados de semilla de mezquite mostraron *in vitro* actividad inhibitoria contra *B. cereus*.

2.6.4 Morus spp

Morus, árbol de la familia de las Moráceas, de tronco gris y ramas pardas (Figura 5). Las hojas alternas son simples, ovales y con el envés cubierto de pelillos cortos. Las flores unisexuadas se agrupan en amentos. Las flores macho muestran un periantio compuesto de cuatro pétalos y cuatro estambres; las femeninas tienen pétalos lisos y ovario de estigma desnudo. El fruto (Figura 5 A, B) es una mora formada por un receptáculo cónico cubierto de numerosas drupas. Las hojas utilizan como alimento para los gusanos de seda y también como forraje. Los frutos frescos tienen un sabor agrídulce, contienen un 22% de azúcares y pueden desecarse y conservarse fácilmente. Contienen, además de azúcares, ácidos málico y cítrico, pectinas, vitamina C, carotenos y otras vitaminas (Yang et al. 2010). En la (Tabla 6) se muestra la taxonomía de Morus spp, según (Medina et al. 2009).

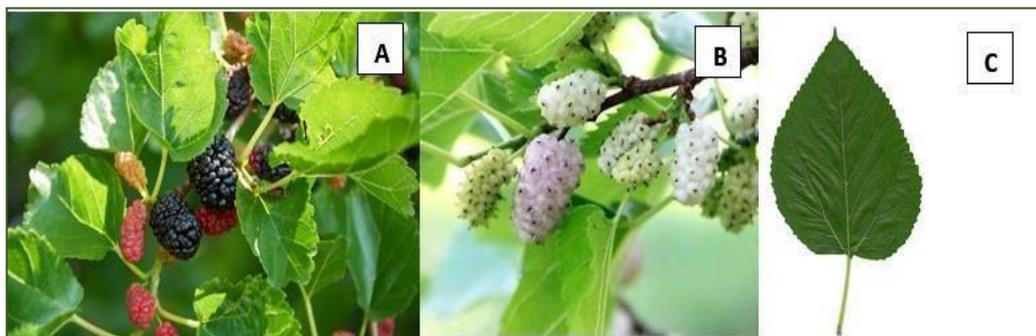


Figura 5. Aspecto general de Morus. En A) fruto de *Morus nigra*; B) fruto de *Morus alba* y en C) se observa el aspecto típico de la hoja (Medina et al. 2009).

Tabla 6. Descripción taxonómica de Morus (Medina et al. 2009)

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Rosales
Familia:	Moraceae
Genero:	Moreae
Especie:	Morus spp

Varios estudios clínicos confirman las propiedades hipoglucemiantes del *Morus alba*. En particular, el extracto de morera blanca reduce de forma significativa los niveles de glucosa. También se obtiene de las hojas de este árbol un flavonoide, que podría ser de utilidad en el tratamiento de la gota. Recientemente se reportaron alrededor de 34 diferentes flavonoides y 11 compuestos fenólicos en las hojas de *M. alba*. Las moracinas constituyen una fuente importante de agentes antiinfectivos, pues poseen una marcada actividad antibacteriana y fungicida.

En un estudio (Casañola et al. 2013) menciona la actividad antimicrobiana de las variedades de *Morus* contra la bacteria Gram positiva *S. aureus* y frente a bacterias cariogénicas. Los extractos de *Morus* presentaron actividad por encima del efecto inhibitorio de azitromicina y ciprofloxacino, lo que evidencia el potencial bactericida de los extractos de morera para combatir estos patógenos.

Los extractos de hojas de morera se mencionan que muestran actividad antimicrobiana frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. krusei* y *Aspergillus flavus*. Esta actividad antimicrobiana de los extractos, puede ser atribuida a la presencia de fenoles y flavonoides que tienen múltiples efectos biológicos incluyendo los efectos antioxidante, cicatrizante y antimicrobiano.

Otro estudio, ha descubierto que los componentes presentes en las hojas y raíces oxiresveratrol y O-beta-D glucopiranosido, tienen actividad inhibitoria de la tirosinasa, una enzima que favorece la aparición de manchas en la piel. Además de las propiedades hemostáticas para frenar el sangrado, el jugo de moras se ha utilizado en casos de heridas (Casañola et al. 2013).

2.6.5 *Eucalyptus camaldulensis*

Eucalyptus (Figura 6) es un árbol de hasta 40 m de altura, el tallo es retorcido de corteza rugosa y color gris plateado, las hojas jóvenes son lanceoladas, cordadas cubiertas por una capa blancuzca. Las hojas maduras lanceoladas, acuminadas, redondeadas y asimétricas de color verde brillante, las flores son solitarias en pedículos cortos. No hay sépalos, pero hay numerosos estambres largos colocados hacia el interior, que se abren a lo largo de toda la longitud en 2 divisiones. Es originario del sureste australiano y de Tasmania, su taxonomía de acuerdo con (Duyker 2003) se muestra en la (Tabla 7).



Figura 6. Aspecto de *Eucalyptus camaldulensis*. A, se muestran las hojas; B tronco y corteza (Duyker 2003)

Tabla 7. Descripción taxonómica de *Eucalyptus* (Duyker 2003)

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Myrtales
Familia:	Myrtaceae
Genero:	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>

Se ha utilizado para desecar pantanos por la gran avidez que tiene del agua. No resiste el frío ni las sequías prolongadas. Las partes utilizadas son el aceite extraído de las hojas frescas y las hojas adultas (cladodios) sin pecíolo. Su uso ha significado de una gran importancia para la eliminación de plagas de insectos, pero ha representado una amenaza al medio ambiente pues transforma los ecosistemas por desecación de la tierra donde se planta. Sus hojas, contienen aceite esencial cineol, monoterpenos: pinero, cimeno, limoneno, felandreno. Aldehídos: butiraldehído, taninos, flavona: eucaliptina, (Kenichi et al. 2015). El eucalipto tiene efecto antibacteriano y fungicida. La droga inhibe la biosíntesis de la prostaglandina y tiene un efecto rubefaciente leve, expectorante y disminuye las secreciones, cuando se usade forma tópica. Tiene uso interno para combatir el catarro y de externo para las afecciones reumáticas. El aceite se ha usado para el estatus asmático, tos, sinusitis, fiebre, gripe, escarlata, trastornos gástricos, sarampión, parasitosis y como antiséptico intestinal. Las hojas presentan la misma utilidad para enfermedades del hígado, la vesícula biliar, la pérdida del apetito y diabetes. Su uso tópico ha sido efectivo en verrugas, acné, cicatrización de úlceras dérmicas, sangrado de las encías, reumatismo y neuralgia (Takahashi et al. 2004).

Se han examinado ampliamente los aceites esenciales y los extractos de plantas de *Eucalyptus*, demostraron que el aceite esencial de *E. camaldulensis* es activo contra muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas. El efecto antibacteriano se confirma para extractos de corteza y hojas. El aceite esencial y los extractos se encuentran entre los más activos contra las bacterias en comparación con los de otras especies del género *Eucalyptus*. Algunos estudios muestran que la actividad antimicrobiana de los extractos y aceites esenciales puede potenciarse aún más en combinaciones con antibióticos (betalactámicos, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, polimixinas), antivirales (aciclovir) y extractos de otras plantas (Verica y Petar 2019).

Un reciente estudio reveló que la actividad antibacteriana de tres extractos solventes (metanol, diclorometano y éter de petróleo) de hojas de *E. camaldulensis* y se evaluaron frente a seis especies microbianas: *Klebsiella spp*, *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis*. *E. camaldulensis* exhibió notables potenciales antimicrobianos. Estudios polifenólicos son responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos de planta.

2.7 Toxicidad

Varias especies de plantas han demostrado su potencial para proveer drogas efectivas contra enfermedades, por lo que, muchos grupos de investigación se dedican a evaluar extractos vegetales como estrategia para hallar nuevas alternativas terapéuticas frente a diferentes afecciones. Sin embargo, es bien conocido que muchas plantas pueden ocasionar reacciones tóxicas a quienes las utilizan. Por esta razón, se llevan a cabo investigaciones con el propósito de determinar, además de la acción farmacológica, la toxicidad de las plantas medicinales. La evaluación toxicológica preclínica se realiza rutinariamente en ratones. El elevado costo de estas pruebas, así como el sufrimiento causado a los animales ha motivado el reemplazo de experimentos que utilicen animales de laboratorio, la reducción del número de animales usados en cada prueba o el perfeccionamiento de las metodologías existentes con el propósito de reducir el dolor y el estrés a los animales (Rodríguez 2014).

2.7.1 Hemólisis en eritrocitos humanos por extractos etanólicos

Método de Hemólisis indirecta en placa: El término hemólisis se refiere al fenómeno de ruptura o lisis de la membrana del eritrocito que provoca la liberación de la hemoglobina (Hernández 2014). La actividad hemolítica mínima indirecta mide la cantidad de hemólisis (en cm mediante halo de hemólisis) producida por una determinada cantidad de veneno, droga o extracto, pero como prueba de laboratorio, no sobre animales vivos, por eso es indirecta. Para su determinación se utiliza el método modificado de (Gutiérrez et al. 1988) que consiste en utilizar una muestra de sangre y agar en placas de Petri. Sobre

la placa se realizan perforaciones como mínimo de 3 mm de diámetro sobre las que se depositan en cada una de ellas el extracto, veneno o droga y el control de solución salina como control negativo de la hemólisis. Las placas deben incubarse a una temperatura de 37 °C durante 24 horas y entonces se mide el diámetro del área de hemólisis producida por cada una de las dosis.

2.8 Biomateriales

Los apósitos para heridas juegan un papel importante en la gestión de la cicatrización, en particular, los apósitos elaborados con polímeros se utilizan ampliamente para heridas exudativas; ya que, por lo general estos apósitos son biodegradables, biocompatibles y no tóxicos para la piel. Además, presentan buenas propiedades de manipulación de fluidos que fomentan la curación de las heridas en un ambiente húmedo y controlado (Hian et al. 2011). La idea típica del uso de un apósito para la curación de heridas cutáneas superficiales se basa en la presencia de un entorno húmedo alrededor de la herida, además de absorber los exudados de la superficie de la herida, ya que se sabe las heridas muestran un aparente aumento en las tasas de reepitelización cuando se mantienen en un entorno local húmedo (Kamoun et al. 2013). Los apósitos preparados con materiales naturales son elaborados principalmente de polisacáridos, proteínas y lípidos, y son generalmente biodegradables, no tóxicos y biocompatibles con los tejidos (Leceta et al. 2013).

2.9 Polímeros bioactivos para la elaboración de apósitos

En los últimos años, los profesionales de la salud enfrentan a un número creciente de pacientes que sufren de heridas y quemaduras difíciles de tratar. Como ya ha sido mencionado, durante el proceso de cicatrización de la herida, el apósito debe proteger la lesión y contribuir a la recuperación de los tejidos. Debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, formación de hidrogel y similitud a las moléculas que comprenden la matriz extracelular, los biopolímeros, que son macromoléculas presentes en los seres vivos, han sido ampliamente utilizados en el campo de la ingeniería de tejidos y medicina para el cuidado de heridas y quemaduras (Pereira y Bartolo 2013).

2.9.1 Alginato

El alginato es un polímero natural, relativamente económico, que se obtiene principalmente a partir de las algas pardas y de la biosíntesis de algunas bacterias. Es un polisacárido lineal, compuesto de α -L-glucurónico y β -D-manurónico; cuenta con propiedades como alta hidrofiliidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad, capacidad para formar películas e hidrogeles, por lo que ha sido ampliamente utilizado en aplicaciones biomédicas; como en vendajes de heridas, andamios y materiales de impresión dental o quirúrgicos entre muchos otros. Este tipo de apósitos están indicados para heridas moderadas a muy exudativas y el componente de calcio dentro del apósito actúa como un agente hemostático, por lo que es útil en heridas sangrantes. Por lo cual, las cintas y vendajes de alginato que ya han sido fabricadas son particularmente útiles en la protección de la herida de piel (Kamoun et al. 2013; Momoh et al. 2015).

2.9.2 Carboximetilcelulosa

La carboximetilcelulosa es un polisacárido, derivado de la celulosa y compuesto por grupos carboximetil. Es de alto peso molecular que en contacto con el agua el exudado confiere un pH ácido a la solución, posee una alta capacidad absorbente y forma un gel viscoso. Estudios reportan apósitos hidrocoloideos de carboximetilcelulosa en donde proporcionan una barrera bacteriana que retiene la humedad fisiológica de la herida, es moldeable, adherente, moderadamente absorbente, impermeable a bacterias, agua y otros contaminantes. Este tipo de apósito está indicado en quemaduras tipo A sin infección, pie diabético en grados 0, I y II sin infección, protege y favorece la granulación y epitelización en heridas y úlceras. Por otro lado, está contraindicado cuando la herida está infectada o con riesgo de infección y cuando hay exposición de músculos, tendones o huesos, ya que estimula la formación de la microbiota. Sin embargo, las sustancias hidrocoloideas junto con el exudado de la lesión crean un gel que mantiene un ambiente húmedo que favorece la cicatrización y protege de la infección (Benedi y Romero 2006).

3. JUSTIFICACIÓN

Las úlceras de pie diabético se consideran un factor importante de morbilidad, pérdida de extremidades y mortalidad. Se desarrollan como resultado de un trauma menor en el pie insensible, la infección y la insuficiencia vascular conducen a gangrena y amputación. Se han establecido diversos tratamientos convencionales que pueden llegar a ser agresivos para el paciente, van desde reconstrucción arterial periférica para mejorar el flujo sanguíneo, desbridamiento del tejido sangrante sano, la amputación para evitar que la infección se extienda, así como la antibioterapia, cuya problemática radica en la resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos infectantes, daños renales y hepáticos para el paciente. Las recientes investigaciones van dirigidas a buscar nuevas terapias antimicrobianas como opciones alternas a los tratamientos con antibióticos conocidos, la Organización Mundial de la Salud, establece que mediante la bioprospección y aprovechando los recursos naturales, se pueden diseñar alternativas de tratamientos. Dada la alta frecuencia de estas heridas, sus resultados adversos potencialmente graves y la posibilidad de beneficio para prevenir o curar infecciones o acelerar la cicatrización de heridas y para reducir el uso innecesario de antibióticos sistémicos. En este trabajo realizamos una investigación para tratar la infección en las úlceras de pie diabético, en donde se utilizaron metabolitos secundarios de cinco especies vegetales y se diseñaron apósitos o películas funcionalizadas con fitometabolitos secundarios con actividad antibacteriana sobre cepas bacterianas aisladas de úlceras diabéticas en modelo murino Balb/C.

4. HIPÓTESIS

Las biopelículas funcionalizadas con fitometabolitos secundarios presentan actividad inhibitoria *in vivo* e *in vitro* sobre bacterias aisladas a partir de úlcera de pie diabético.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar biopelículas como apósito de metabolitos secundarios de *Verbena officinalis*, *Cordia boissieri*, *Morus* spp, *Prosopis laevigata* y *Eucalyptus camaldulensis* con actividad inhibitoria sobre bacterias asociadas a úlcera de pie diabético, así como su evaluación *in vivo* sobre el modelo murino Balb/C.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar e identificar microorganismos a partir de úlcera de pie diabético y establecer la cinética de crecimiento.
2. Colecta e identificación y proceso de extracción etanólica de las especies vegetales de *Verbena officinalis*, *Cordia boissieri*, *Morus*, *Prosopis laevigata* y *Eucalyptus camaldulensi*, así como determinar los metabolitos presentes mediante perfil fitoquímico.
3. Bioensayo *in vitro*: Pruebas de toxicidad de los extractos etanólicos sobre línea celular VERO por el método de MTT y actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios presentes en los extractos sobre BAUPD por espectrofotometría y UFC/ml.
4. Diseño, elaboración y evaluación de biopelículas con metabolitos antimicrobianos sobre cepas aisladas de UPD.
5. *Bioensayo in vivo*: Determinación de la actividad de biopelículas funcionalizadas con metabolitos antimicrobianos sobre las heridas en modelo murino hembra Balb/C, en base a avance de cierre de herida.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

- Línea celular VERO
- Eritrocitos de *Homo sapiens*
- Murinos Balb/C

6.1.1 Bacterias aisladas a partir de úlcera de pie diabético (UPD)

- a) Aislamiento e identificación:** Para el aislamiento microbiológico a partir de úlceras de pie diabético, durante el procesamiento microbiológico de las muestras se obtuvieron por toma profunda de la úlcera realizando un barrido de la zona afectada. Se sembraron en placas Petri conteniendo medio MPT, se tomaron muestras de las colonias, a las cuales se les realizaron tinciones simples para observar su morfología, tinción de Gram, prueba de catalasa, prueba de Hemólisis y pruebas bioquímicas, para la identificación de las bacterias correspondiente a cada cepa, se aislaron e identificaron en medio MPT, y fueron incubadas a 37°C durante 24 horas y posteriormente se mantuvieron en refrigeración a 4°C hasta su empleo. Las cepas aisladas de úlceras de pie diabético se mantienen en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Biología Celular y Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- b) Cinética de crecimiento:** Se dispuso de 12 tubos de borosilicato con tapón de rosca, los cuales contenían 5 mL de caldo MPT, se inocularon con una asada de las cepas aisladas y enseguida se incubaron a 37°C, y cada hora se realizaron las lecturas de absorbancia correspondientes a 635 nm durante un lapso de 12 h, se registró y se graficó cada lectura. Este evento se realizó por triplicado.

6.1.2 Eritrocitos humanos desfibrinados: La recolección de la sangre de individuo sano fue por punción venosa con jeringa y posteriormente fue desfibrinada.

6.1.3 Línea celular VERO: El cultivo celular VERO, se utilizó como modelo para la detección de compuestos biológicamente activos presentes en el extracto etanólico de *P. laevigata*.

6.1.4 Modelo murino Balb/C *Mus musculus*: Se utilizó como modelo experimental para el bioensayo in vivo hembras *Mus musculus* Balb/C clínicamente sanas de 6-8 semanas, se recibió la asesoría del Dr y MVZ. Daniel Julio Eguiarte Lara.

6.2 Material vegetal

6.2.1 Colecta e identificación: El material vegetal que se utilizó para realizar este ensayo, son plantas que se encuentran en el campo de la región. La recolección de las hojas fue en el mismo lugar de procedencia. Se recolectaron aproximadamente 2 kg de hojas de cada especie. El transporte de las hojas desde el lugar de recolección hacia el laboratorio fue en bolsas limpias para evitar contaminación, asegurando la ventilación y evitando la putrefacción en pocas horas. Una parte de los especímenes colectados fueron colocados en una prensa botánica para después ser depositados en el Herbario de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, al final se obtuvo el número de registro por espécimen y la identificación del material vegetal.

6.2.2 Material vegetal utilizado en el transcurso de esta investigación

En la Tabla 8 se muestra un compendio del material vegetal colectado, conteniendo su nombre común o vulgar, imagen representativa del espécimen empleado, el nombre científico de acuerdo al sistema taxonómico binomial, la parte utilizada para obtener el extracto etanólico, además contiene indicado la ubicación de la colecta.

Tabla 8: Compendio del material vegetal sometido a extracción etanólica.

Imagen de autoría propia: (Nájera 2021)

Nombre común	Imagen representativa	Nombre científico	Parte utilizada	Ubicación de colecta
Verbena		<i>Verbena officinalis</i>	Hojas Tallo	Ejido La Tapona, Villa Hidalgo, S.L.P.
Morera, Mora		<i>Morus spp</i>	Hojas	Ejido El Castillo, Cadereyta Jiménez N.L.
Mezquite		<i>Prosopis laevigata</i>	Hojas	Ejido Palmitos, Cadereyta Jiménez N.L.
Anacahuita		<i>Cordia boissieri</i>	Hojas	Carretera a Ejido Chihuahuita, Cadereyta Jiménez N.L.
Eucalipto		<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Hojas	Zona Centro, Cadereyta Jiménez N.L.

6.2.3 Procesamiento de las especies para la obtención de extractos etanólicos

Una vez colectado el material vegetal, se procesó como se describe en la Tabla 9

Tabla 9. Etapas del procesamiento del material vegetal para la obtención de los extractos etanólicos

Etapas	Procedimiento
Lavado	Se enjuagó el material vegetal a chorro de agua corriente, hasta eliminar cualquier residuo ajeno al material vegetal.
Extracción	La obtención del extracto etanólico a partir del material vegetal, se realizó agregando a matraces Erlenmeyer, hojas de la planta, y posteriormente se agregó etanol hasta cubrir las muestras. Estos matraces se cubrieron con papel para evitar el contacto con la luz, y se mantuvieron en agitación constante durante 7 días, en condiciones a temperatura ambiente.
Filtración	Después de los 7 días, se filtró el contenido en cada matraz, por medio de papel filtro Whatman No.1.
Concentración del extracto	El solvente etanol se destiló con ayuda de un rotavapor, a 60°C temperatura de ebullición del etanol. Se obtuvo el extracto concentrado el cual se colocó en un vaso de precipitado, y enseguida se colocó en la estufa a temperatura de 37°C, para su completo secado, posteriormente el extracto se raspó, se almacenó en un frasco ámbar y su contenido se conservó en las mismas condiciones de temperatura.

6.2.4 Perfil fitoquímico de los extractos etanólicos del material vegetal

Se realizó de acuerdo con Domínguez X, 1973. Al extracto etanólico de cada especie vegetal se le realizará un análisis fitoquímico de acuerdo con (Domínguez 1973) con la finalidad de identificar los componentes químicos como se describe en la Tabla 10.

Tabla 10. Descripción de las pruebas para detectar grupos funcionales presentes en los extractos etanólicos (Domínguez, 1973)

Grupo Funcional	Prueba	Procedimiento
Grupo Carbonilo	2,4-Dinitrofenilhidracina	De 1 a 10 mg de la muestra se disolvieron con etanol, se le añadió una solución saturada de 2,4 dinitrofenilhidracina en HCl 6 N; la formación de un precipitado amarillo o anaranjado indicó la presencia del grupo carbonilo.
Oxhidrilos fenólicos	FeCl ₃	Se disolvieron 1 a 2 mg de la muestra en 1 mL de agua o etanol y después se añadieron unas gotas de cloruro de hierro al 12.5% en agua. La aparición de un precipitado rojo, azul, violeta o verde se consideró positivo.
	Liebermann-Burchard	Se mezcló 1 mL de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfriaron a 0° y se les añadió una gota de ácido sulfúrico. Se agregaron gotas del reactivo a la muestra. Con la formación de color azul, verde, rojo, anaranjado, la muestra se tomó positiva.
Esteroles Terpenos	Salkowki	Similar a la anterior, la muestra 1 a 2 mg en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico, se desarrollaron los colores amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.
Flavonoides	H ₂ SO ₄	Una pequeña cantidad de la muestra se disolvió en H ₂ SO ₄ y se observó una coloración amarilla para flavonoides, anaranjado-guindo para flavonas, rojo azulado para chalconas, y rojo púrpura para quinonas.
Alcaloides	Dragendorff	Se realizaron dos soluciones, para la preparación A, se disolvieron 0.85 g de nitrato de bismuto, en una mezcla de 10 mL de ácido acético glacial y 40 mL de agua. Para la solución B se disolvieron 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. El reactivo se preparó mezclando 5 mL de la solución A, 4 mL de la solución B y 100 mL de agua. El reactivo es estable por un año, y la prueba es positiva para alcaloides al dar una coloración roja o naranja persistente.

Sesquiterpenlactonas	Baljet	A 3 o 4 gotas de la solución mezcla, se le agregaron 2 a 3 mg del reactivo, si la prueba es positiva se torna a color naranja o roja oscura. La solución mezcla se preparó 1:1 consistiendo en una solución A que contenía ácido pícrico al 1% en etanol, y una B, con NaOH al 10%.
Aromaticidad	Ácido sulfúrico formaldehído	Se preparó una mezcla de 1 mL de ácido sulfúrico concentrado con una gota de formaldehído. Se agregó 1 a 5 mg de la muestra disuelta en disolvente no aromático, se añadieron unas gotas de la mezcla anterior, y si la prueba cambia de color rojo-violeta, se consideró positiva.
Saponinas	Bicarbonato de sodio	Se disolvieron de 1 a 2 mg de la muestra en agua o etanol y se le agregaron de 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, se agitó ligeramente, luego se agregaron 2 a 4 gotas de la solución de bicarbonato de sodio. La aparición de burbujas y su permanencia por más de 1 minuto, indicó una prueba positiva para la prueba de saponinas.
Insaturaciones	KMnO ₄	Se disolvieron de 1 a 2 mg de la muestra en 1 mL de agua, acetona, o metanol y se añadió gota a gota una solución de KMnO ₄ al 2% en agua. La prueba es positiva al observar decoloración o formación de precipitado café en menos de 1 min, resultado de la formación de óxido de manganeso.
	Molish	A 1 o 2 mg de la muestra, se le agregó gota a gota el reactivo de Molish (alfanaftol al 1% en etanol), luego 1 mL de ácido sulfúrico por las paredes. La prueba es positiva cuando la formación de anillo coloreado en la interfase color purpura.
Carbohidratos	Cumarinas	Se disolvieron 1 a 2 mg de muestra en NaOH al 10%; si aparece una coloración amarilla que desaparece al acidular, la reacción es positiva.
	Lactonas	Se disolvieron 1 a 2 mg de muestra en solución alcohólica de NaOH al 10%. Un color amarillo o anaranjado que se pierde o desaparece al agregar unas gotas de HCl indicó la presencia de un anillo láctónico.

6.2.5 Preparación de solución madre o stock de los extractos vegetales

Cuando ya se obtuvieron los extractos etanólicos puros, se procedió a la preparación de la solución stock o solución madre, se preparó disolviendo una cantidad conocida del extracto etanólico de cada una de las especies vegetales evaluadas, en cierto volumen de agua destilada estéril hasta saturación y a partir de esta solución stock, se realizaron los cálculos necesarios para obtener la concentración deseada en cada prueba. Una vez preparada, se esterilizó por filtración empleando filtros Millipore de 0.22 μm .

6.3 BIOENSAYO IN VITRO

6.3.1 Valoración de la inhibición de los extractos etanólicos sobre BAUPD

a) **Activación de las bacterias:** Las cepas de los microorganismos se mantuvieron activas mediante resiembras. 2 días previos a cada bioensayo. Agregando a 3 tubos, 5 mL de caldo MPT estéril, un inóculo de aproximadamente 100 μl de cada una de las cepas en condiciones de esterilidad, e incubando a 37°C por 24 horas. Las resiembras se realizaron por triplicado.

b) Cinética de crecimiento de las BAUPD

Método espectrofotometría: Se tomó un inóculo inicial de 100 μl de cada una de las cepas previamente activadas y la concentración de 1000 μl / 1 mg/mL de cada uno de los extractos vegetales a evaluar y se mezclaron en tubos, conteniendo 5 mL de caldo MPT estéril, los tubos se incubaron a 37°C por 24 horas y se procedió a leer las absorbancias de los tubos a 635 nm en un espectrofotómetro, finalmente se realizaron los cálculos pertinentes a los valores obtenidos y se graficaron dichos resultados.

c) **Determinación de UFC/mL (Recuento bacteriano en placa):** En tubos, conteniendo un volumen de 9 mL de solución salina fisiológica al 0.85%, se agregó 1 mL de la mezcla de los tratamientos con extractos vegetales y las cepas aisladas, realizando diluciones seriadas en placas Petri por triplicado para cada uno de los tratamientos. Posteriormente en condiciones de esterilidad, se vertieron a las placas Petri 15 mL de agar nutritivo, homogenizando la muestra, se dejó solidificar y se incubaron las placas a 37°C durante 24 horas. Pasado el tiempo, se determinó la actividad biológica de los tratamientos de recuento en placa, realizando los cálculos correspondientes al número de colonias obtenidas (UFC/mL) y graficando los resultados.

6.3.2 Evaluación de la actividad citotóxica sobre eritrocitos humanos de los extractos con mayor actividad antibacteriana

a) **Obtención de muestra de sangre total y procedimiento para defibrinación:**

La sangre humana se obtuvo a partir de recolección por punción venosa de individuo sano (sin hábitos de fumar y bebidas alcohólicas, sin padecimientos de infección o ingesta de antibióticos) previo a la toma de muestra. La extracción de sangre del donante fue mediante técnica de jeringa. El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la Norma establecida (NOM-087-SSA-1997) para este procedimiento y con las medidas de bioseguridad pertinentes. Inmediatamente después de la extracción se procedió a defibrinar la sangre mecánicamente que consiste en revolver cierta cantidad de sangre requerida con perlas de vidrio o aplicador de madera estéril en un frasco Erlenmeyer (a 90 rpm por 7-9 minutos). La sangre es defibrinada cuando se han removido los factores de coagulación y se pueden ver en el frasco como una malla de fibras translúcidas, como lo indica (Kay et al. 2009).

b) Método de Hemólisis indirecta en placa para evaluar la actividad citotóxica de los extractos seleccionados: Se utilizó el método modificado de (Gutiérrez et al. 1988). Consistió en agregar aproximadamente 0.5 mL de sangre desfibrinada a placas Petri multipocillos y posteriormente se agregó agar nutritivo estéril. Se realizó de la siguiente manera: Sobre la placa se realizaron tres pocillos como mínimo de 3 mm de diámetro sobre las que se depositó en dos de ellos 50 µl del extracto seleccionado a la dosis de 1 mg/mL y el otro pocillo se utilizó como control negativo de la hemólisis que contenía 50 µl solución salina fisiológica 0.85%. Las placas se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Pasando el tiempo se midió el diámetro del área de hemólisis producida por cada uno de los extractos seleccionados. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

6.3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana sobre BAUPD de las fracciones obtenidas de cada extracto etanólico

a) Fraccionamiento por cromatografía de extractos etanólicos con actividad antibacteriana: La IUPAC define a la cromatografía en papel, como un método físico de separación mediante el cual los componentes de una mezcla se separan por distribución entre dos fases: una estacionaria (FE) y otra móvil (FM). De este modo, cada sustancia migra de forma diferencial, conforme a sus propias características físicas y al tipo de fuerzas intermoleculares que pueda establecer con ambas fases. Como fase móvil o eluyente se utilizó etanol, y como fase estacionaria papel filtro. Antes de aplicar los extractos, se trazó con un lápiz una línea a 2 cm del borde inferior del papel sobre la que se depositó la muestra con un capilar hasta formar una mancha nítida, dejando evaporar el eluyente entre cada aplicación. Se utilizó un cromatograma para cada extracto. Posteriormente, el papel se suspendió dentro de la cuba con la precaución de que el eluyente solo alcanzara el punto de aplicación por capilaridad. Se cerró, y se dejó desarrollar por 20 minutos. Una vez retirado, se secó con corriente de aire, y se determinaron las fracciones del extracto, debido al orden de separación. A partir del cromatograma, y en condiciones de

esterilidad, con una perforadora se obtuvieron discos de papel filtro con cada una de las fracciones de los extractos y se identificaron.

- b) Determinación de la actividad antibacteriana de las fracciones de extractos etanólicos:** En cajas Petri con agar nutritivo, fueron inoculadas las cepas mediante técnica de césped o siembra masiva y se inoculó una placa por cepa. Posteriormente fueron colocados en la placa con agar, el papel filtro con las fracciones obtenidas de cada extracto, el extracto crudo, y como control se utilizó antibiótico ceftriaxona a la misma concentración utilizada en los ensayos anteriores. En este ensayo se utilizaron los extractos y las cepas en los que hubo mayor inhibición en la técnica de UFC/mL. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Pasando las 24 horas, se obtienen los halos de inhibición, se midieron con un vernier y se graficaron. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

6.4 BIOPELÍCULA

6.4.1 Elaboración de biopelículas de alginato de sodio y carboximetilcelulosa con metabolitos con actividad antimicrobiana

Se pesó sobre la balanza analítica la cantidad de Alginato de sodio/CMC necesaria para preparar las soluciones. Posteriormente se colocó la cantidad de reactivo previamente pesado sobre el vaso de precipitado con agua destilada. Debido al grado de polimerización de los biopolímeros es necesario solubilizarlos con ayuda de una plancha magnética induciendo calor y mezclando con un agitador magnético y las soluciones se esterilizaron. Posteriormente se pesó determinada cantidad de extracto que presentó actividad antimicrobiana de acuerdo a la concentración deseada o antibiótico ceftriaxona a cierta concentración, y se agregó a la solución. Con ayuda de un agitador magnético se solubilizó y después se vació a moldes o placas multipocillos. Este ensayo fue realizado en condiciones de esterilidad.

6.4.2 Evaluación de biopelículas funcionalizadas con metabolitos con actividad antibacteriana sobre cepas aisladas de UPD

En cajas Petri con medio MPT, fueron inoculadas las cepas mediante técnica de césped o siembra masiva y se inoculó una placa por cepa, posteriormente fueron colocados discos de biopelículas con los metabolitos de los extractos que presentaron mayor actividad antimicrobiana. Se realizaron biopelículas de Alginato de sodio, carboximetilcelulosa y una mezcla de ambos con los extractos de *P. laevigata* y *V. officinalis*. Se incubaron a 37°C durante 24 horas. Pasando las 24 horas, se obtienen los halos de inhibición, se midieron con un vernier y se graficaron. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

6.5 Valoración citotóxica *in vitro* de *P. laevigata* en células VERO por la técnica MTT

El cultivo celular se mantuvo activo mediante resiembras dos días previos al ensayo de toxicidad. Se utilizó la línea celular de Riñón de Mono Verde de África/VERO, las células se cultivaron en medio DMEM (Medio Eagles Modificado) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), penicilina, estreptomycin, y se mantuvieron en una atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C durante 48 horas. Una vez observado el tamizaje de células en la placa. Se vació el medio y se agregaron 3 mL de Tripsina-EDTA y se incubaron por 15 minutos para lograr la disgregación de las células, posteriormente se agregó 3 mL de medio DMEM y se colocaron en un tubo cónico estéril de 15 mL. Se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se le agregaron 3 mL de medio DMEM. Posteriormente se tomaron 50 µl de azul trypan y se procedió a realizar el conteo de células vivas en cámara de Neubauer realizando cálculos correspondientes para obtener 5x10⁴ células por pocillo. Una vez ajustado el número de células se colocaron 100 µl de la suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pozos y se incubaron por 24 horas, para permitir la adherencia de las células para que formen la monocapa. Pasando las 24 horas, se retiró el medio de golpe y se colocaron 100 µl del tratamiento (Extracto de *P. laevigata*) a

concentraciones desde 1000 a 10 µg/mL y se incubaron a 37°C por 48 horas en una atmosfera de 5% CO₂. Posteriormente se retiró el tratamiento y se realizaron dos lavados con DMEM; se agregaron 15 µl del reactivo MTT 3(4,5 dimethyl thiazol 2 yl) 5 diphenyl tetrazolium bromide en cada pozo.

Las placas se agitaron levemente por 4 horas a 37°C, el sobrenadante se removió, se retiró de golpe y se agregaron 100 µl de Dimetil sulfato 100% (DMSO) a cada uno de los pocillos, nuevamente las placas se agitaron levemente para solubilizar los cristales de formazan y finalmente se realizó la lectura de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 570 nm. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del MTT realizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células. Posteriormente se calculó el porcentaje de viabilidad celular usando la siguiente fórmula:

$$\% Viabilidad\ celular = 100 - \left[\frac{(DO\ extracto - DO\ blanco)}{DO\ control - DO\ blanco} \right] \times 100$$

6.6 BIOENSAYO IN VIVO

Valoración de la biopelícula con fitometabolitos secundarios sobre herida en modelo murino Balb/C

Se empleó modelo murino hembras adultas Balb/c *Mus musculus*, clínicamente sanas. Los animales fueron alojados en jaulas de acero inoxidable en un ambiente adecuado de 25°C con un fotoperiodo de 12 horas. El ensayo se efectuó colocando la biopelícula conteniendo el extracto etanólico seleccionado, en herida de aproximadamente 1 cm de longitud, se colocó sobre la piel del murino, previamente infectadas con las bacterias aisladas de UPD. Las biopelículas se mantuvieron en contacto directo con la piel por un periodo de 24 horas, y después de dicho periodo se colocó otro parche diariamente durante 9 días conforme al avance del cierre de la herida. Durante todo el proceso se dosificó a los murinos fármacos para evitar el dolor de la herida.

6.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico consistió en dos pasos,

PASOS	PARÁMETRO	PRUEBA	CONSIDERACIONES	PAQUETE ESTADÍSTICO EMPLEADO
Primero	Normalidad	Kolmogorov-Smirnov.	determinación de la distribución de los datos obtenidos para cada variable estudiada	SPSS versión 22.0
Segundo	para los pasos con una distribución normal predominante	prueba ANOVA de una vía	para evaluar el nivel de significancia de la diferencia entre la media de los grupos de los que consta el experimento (control y tratamientos) con comparación múltiple de medias	
	En los casos en que se encontró diferencia entre los grupos	prueba de Tukey	para evaluar el nivel de significancia de la diferencia de la media entre tratamiento seleccionado y el grupo control.	

7.3 ESTRATEGIA GENERAL

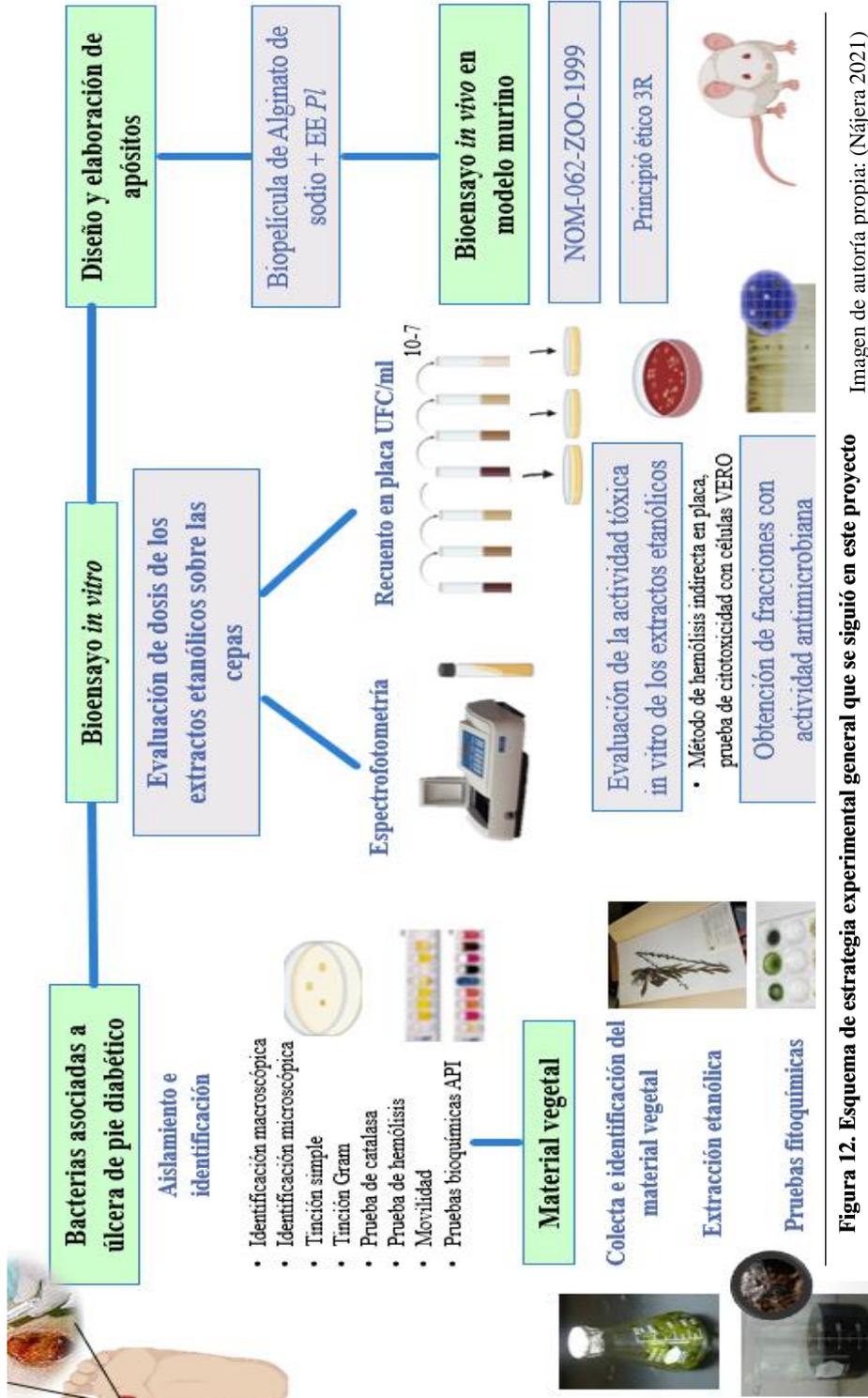


Imagen de autoría propia: (Nájera 2021)

Figura 12. Esquema de estrategia experimental general que se siguió en este proyecto

7. RESULTADOS

7.1 Bacterias asociadas a úlcera de pie diabético

a) Identificación y aislamiento

El aislamiento de los microorganismos se realizó por toma profunda de la úlcera de pie diabético, se realizó el cultivo inicial por extensión en placa o siembra césped en placa Petri, de la cual se obtuvo gran cantidad de colonias, posteriormente se realizaron diluciones y plaqueos obteniendo disminución en el número de colonias, lo cual permitió realizar aislamientos y tinciones simples y de Gram, lo cual permitió ir descartando colonias, para finalmente seleccionar solamente cuatro cepas representantes de aislados de úlceras de pie diabético. Posteriormente se procedió a realizar una serie de resiembras en medio MPT, incubadas a 37°C para mantenerlas metabólicamente activadas.

b) Caracterización macroscópica

Una vez aisladas las cepas, se procedieron a sembrarse en agar MPT a 37°C de 18-24 horas para obtener su caracterización macroscópica. Los resultados pueden observarse en la siguiente Figura 13 y en la Tabla 10. Para las 4 cepas se nota una morfología macroscópica similar como colonias tamaño pequeño, color y consistencia cremosa y con bordes elevados.

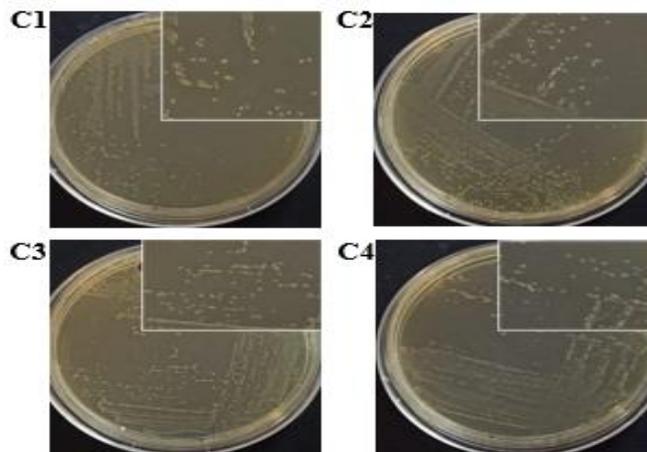


Figura 13. Aspecto macroscópico de las cepas aisladas de úlceras diabéticas. Imagen de autoría propia (Nájera 2021)

c) Caracterización microscópica

Enseguida se realizó tinción simple y tinción de Gram para la identificación presuntiva de cada cepa y para observar al microscopio óptica la morfología típica del cultivo Figura 14.

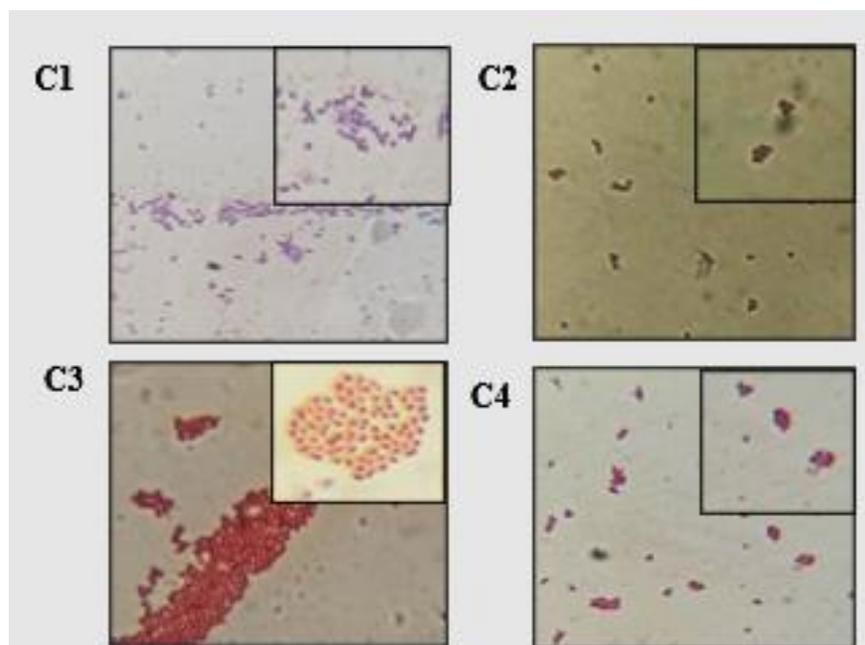


Figura 14. Observación microscópica de las cepas aisladas de UPD. Tinción de Gram. Cepa 1 (C1) diplococos Gram (+); Cepa 2 morfología cocos Gram (+); Cepa 3 morfología cocos Gram (-); Cepa 4 coco Gram (+). Imagen de autoría propia (Nájera 2021)

d) Caracterización bioquímica preliminar (Prueba catalasa)

Se realizó la prueba bioquímica de la producción de la enzima catalasa a cada cepa, para esta prueba se añadieron unas gotas de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) sobre las placas con cultivo microbiano de cada cepa. No se observó la aparición de burbujas de O_2 en ninguna de las cepas aisladas, por lo tanto, indica una prueba de catalasa negativa.

e) Prueba de movilidad bacteriana

La movilidad bacteriana se puede observar de forma directa mediante el examen de los tubos después de la incubación a 18-24 horas a 37°C. El crecimiento se propaga desde la línea de inoculación si el microorganismo es móvil. Los microorganismos altamente móviles presentan crecimiento por todo el tubo. Los microorganismos no móviles se producen solamente a lo largo de la línea de inoculación. Los ensayos se realizaron por triplicado, y se pueden observar en la siguiente Figura 15 los resultados. A la izquierda se pueden observar ambas pruebas donde se representa la movilidad y la inmovilidad bacteriana respectivamente, esto para realizar una comparativa entre las 4 cepas de estudio, observándose C1, C2, C3 y C4 como prueba positiva al presentar crecimiento que va desde la línea de punción y migrando a los lados provocando turbidez.

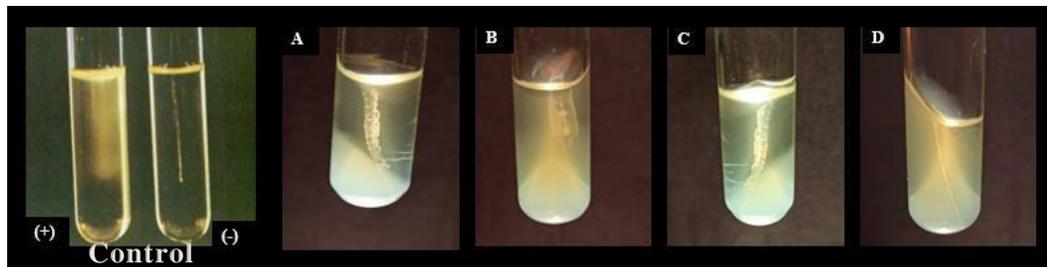


Figura 15. Prueba de movilidad de las cepas aisladas de UPD. A) C1 prueba de movilidad(+); B) C2 movilidad (+); C) C3 movilidad (+); D) C4 movilidad (+) en agar MPT. Imagen de autoría propia (Nájera 2021)

7.2 Valoración de la hemólisis ocasionada por cepas relacionadas a UPD

La hemólisis en agar sangre es otra de las características iniciales para orientar el esquema de identificación de los microorganismos, además de la catalasa. Consiste en un medio de cultivo enriquecido con la adición de sangre y permite distinguir 3 tipos de bacterias: alfa hemolíticos, beta hemolíticos y gamma hemolíticos. En la siguiente imagen se muestran las 4 cepas aisladas de úlcera de pie diabético en placa multipocillos en donde se inocularon 50 µl de cada una en los pocillos. Como control se utilizó medio de cultivo MPT estéril sin inocular y antibiótico ceftriaxona, se pueden observar Figura 16. Se observa una coloración verdosa alrededor de los pocillos inoculados con las 4 cepas, indicando una lisis parcial de eritrocitos características de la hemólisis alfa.

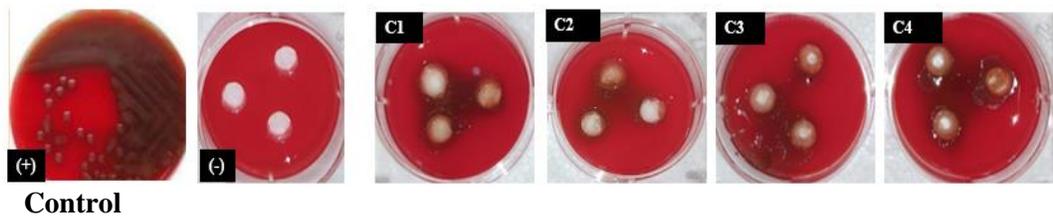


Figura 16. Prueba de hemólisis de cepas aisladas de úlcera de pie diabético. C1: cepa 1; C2: cepa 2; C3: cepa 3; C4: cepa 4. Los controles se muestran a la izquierda (+) *Streptococcus* sp; (-) Caldo MPT sin inóculo. Los resultados muestran que las 4 cepas son hemolíticas. Imagen de autoría propia (Nájera 2021)

En la Tabla 10 se muestran los resultados del análisis macroscópico, microscópico, bioquímico, movilidad, y hemólisis realizadas a las cepas que fueron aisladas de úlcera de pie diabético.

Tabla 10. Características morfológicas y bioquímicas para BAUPD

BAUPD	Morfología microscópica	Tinción de Gram	Motilidad	Catalasa	Hemólisis	Requisitos de oxígeno
C1	Diplococos	+	+	-	Alfa	Aerobia facultativa
C2	Cocos	+	+	-	Alfa	Aerobia facultativa
C3	Cocos	-	+	-	Alfa	Aerobia facultativa
C4	Cocos	+	+	-	Alfa	Aerobia facultativa

(+): Positivo (-): Negativo; BAUPD: Bacterias asociadas a úlcera de pie diabético

7.4 Cinética de crecimiento de bacterias asociadas a UPD

En la siguiente figura, se observa la cinética de crecimiento correspondiente a las 4 cepas que fueron aisladas a partir de úlcera de pie diabético a una concentración de 100 µl, empleando caldo MPT para su cultivo. Durante las primeras dos horas de incubación en las 4 cepas, se observa un ligero crecimiento que corresponde a la fase de adaptación, y posteriormente a partir de la tercera hora de incubación se observó un incremento celular iniciando la fase exponencial la cual continua hasta la novena hora de incubación, lo que indica que a partir de la hora 6 es factible trabajar con el cultivo de las 4 cepas a 100 µl. Enseguida se puede observar la fase estacionaria manteniéndose hasta la hora 12. El crecimiento de las cepas se monitoreó durante 12 horas y no se llegó a observar fase de muerte. Cada punto graficado corresponde al promedio de tres eventos independientes por triplicado.

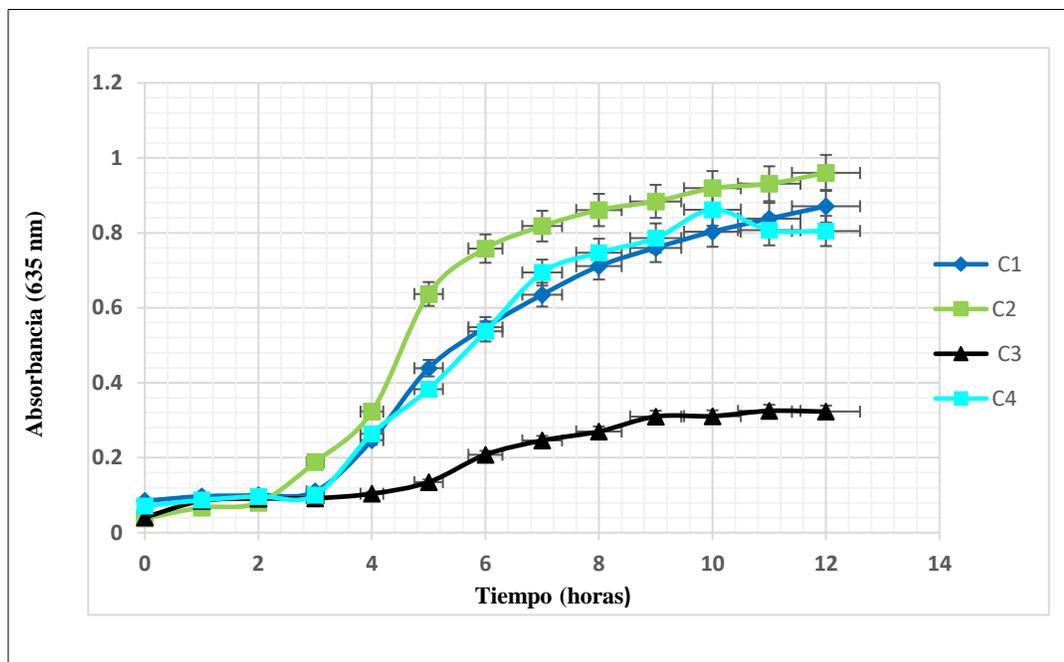


Figura 17. Cinética de crecimiento de Cepas (C1, C2, C3 y C4) a una concentración de inóculo de 100 μ l. *: Hora 6 de incubación.

En base a los resultados de la cinética de crecimiento realizada, y siguiendo con el objetivo de determinar las UFC/ mL cultivados en presencia de la concentración de 1 mg/mL de los extractos etánicos, se estableció el plaqueo a las 6 horas de incubación, empleando como inóculo una concentración de 100 μ l de cada una de las cepas.

7.5 Determinación de grupos fitoquímicos presentes en los extractos etánicos de especies vegetales

Se realizó la extracción etanólica de las especies vegetales *V. officinalis* (hoja y tallo), *C. boissieri* (hoja), *Morus* (hoja), *P. laevigata* (hoja) y *E. camaldulensis* (hoja) y posteriormente se les realizaron pruebas fitoquímicas de acuerdo con (Domínguez X, 1973) para identificar grupos funcionales, los resultados se pueden observar en la Tabla 11.

Tabla 11. Comparación de grupos fitoquímicos presentes en los extractos etánolicos de especies vegetales.

PRUEBAS FITOQUÍMICAS	Detección de:	Extractos etánolicos de especies vegetales				
		PL	EC	M	CB	VO
KmnO ₄	Insaturaciones	+	+	-	-	-
2,4-Dinitrofenilhidracina	Carbonilo	+	+	-	+	+
FeCl ₃	Oxhidrilos fenólicos	-	+	-	-	-
H ₂ SO ₄	Flavonoides	+	+	+	-	+
		flavona				flavonoides
Salkowski	Esteroles y Terpenos	+	-	-	-	+
Molish	Carbohidratos	+	+	-	-	+
Baljet	Sesquiterpenlactonas	+	+	+	-	-
Dragendorff	Alcaloides	+	-	-	-	+
Bicarbonato de sodio	Saponinas	-	+	+	+	-
H ₂ SO ₄ -Formaldehído	Aromaticidad	+	-	-	-	-
Cumarinas		+	+	-	-	-
Lactonas		+	-	-	-	-
Total		10	8	3	2	5

PL: *Prosopis laevigata*; EC: *Eucalyptus camaldulensis*; M: *Morus* sp; CB: *Cordia boissieri*; VO: *Verbena officinalis*.

Se determinó la presencia de saponinas, flavonoides y carbohidratos en la mayoría de los extractos. Las especies con mayor presencia de grupos funcionales fueron *Prosopis laevigata* (PL), *Eucalyptus camaldulensis* (EC) y *Verbena officinalis* (VO). En cuanto a *Prosopis laevigata* (mezquite), se observó a excepción de grupo carbonilo y oxhidrilos fenólicos, la presencia de todos los grupos funcionales investigados. Por el contrario, la especie *Cordia boissieri* (anacahuita) presentó menor cantidad de metabolitos secundarios analizados, siendo los destacados grupo carbonilo y saponinas.

7.5 Evaluación de la actividad biológica de los extractos etanólicos de especies vegetales sobre cepas de bacterias aisladas de UPD

a) Método espectrofotometría

Se realizó la lectura de los tubos conteniendo 5 mL de medio MPT, así como 100 µl del inóculo de las cepas aisladas de UPD previamente activadas, en presencia de la concentración de 1 mg/mL de cada uno de los extractos vegetales evaluados. Se incubaron a 37°C por 24 horas y se realizaron las lecturas al espectrofotómetro a una longitud de onda de 635 nm. Se realizó el registro de la información obtenida, el análisis correspondiente y los gráficos.

En la Figura 18, se encuentran graficados los valores de absorbancia obtenidos por este método. Se empleó un control positivo de viabilidad celular con un inóculo inicial de 100 µl y como control negativo se utilizó el antibiótico ceftriaxona a una concentración de 0.5 µg/mL. Se observa que solo las cepas 1 y 2 son sensibles al antibiótico ceftriaxona a la dosis evaluada y los 5 extractos, inhiben el crecimiento de las 4 cepas aisladas de UPD. Los resultados obtenidos en este bioensayo son el resultado de tres eventos independientes por triplicado, graficando las medias en el programa Microsoft Excel.

Posteriormente se realizó el análisis de inhibición porcentual y los resultados se muestran en la Figura 19 se observa que el EE de Morus inhibe el crecimiento de las cuatro cepas en mayor proporción que el antibiótico seleccionado. La C1 es susceptible a todos los extractos seleccionados, en la C2 solo es susceptible el extracto de Morus, de manera que en la C3 y C4 todos los extractos son susceptibles a 1 mg/mL.

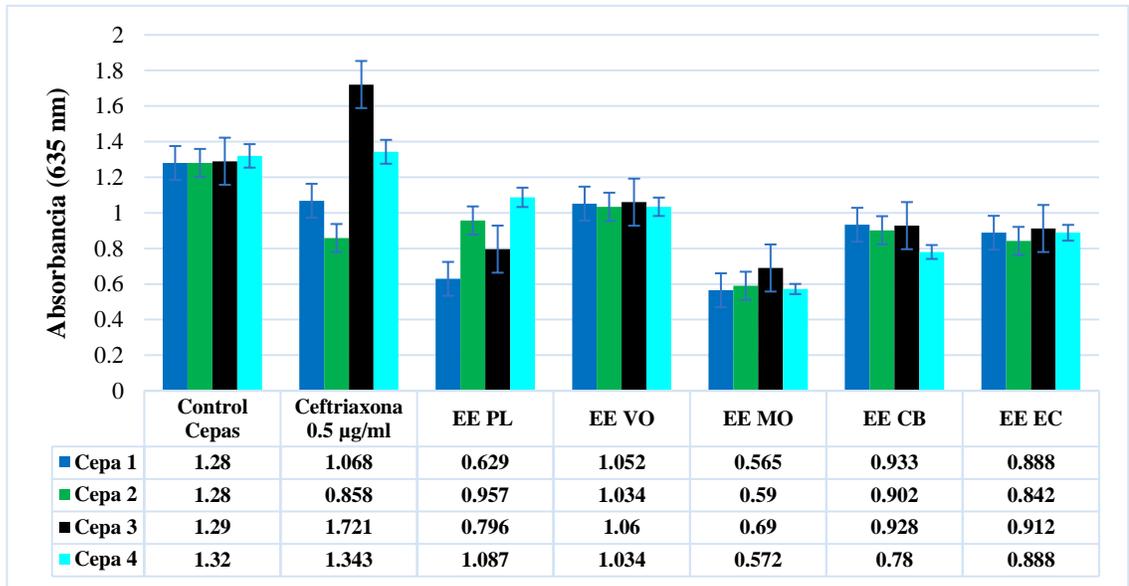


Figura 18. Determinación de la actividad biológica de los extractos etanólicos de especies vegetales sobre bacterias aisladas de úlcera diabética por método espectrofotometría. Se observa que los tres extractos etanólicos seleccionados para evaluarlos sobre 4 cepas aisladas de UPD inhiben el crecimiento a 1 mg/mL. PL: *Prosopis laevigata*; EC: *Eucalyptus camaldulensis*; M: *Morus* sp; CB: *Cordia boissieri*; VO: *Verbena officinalis*.

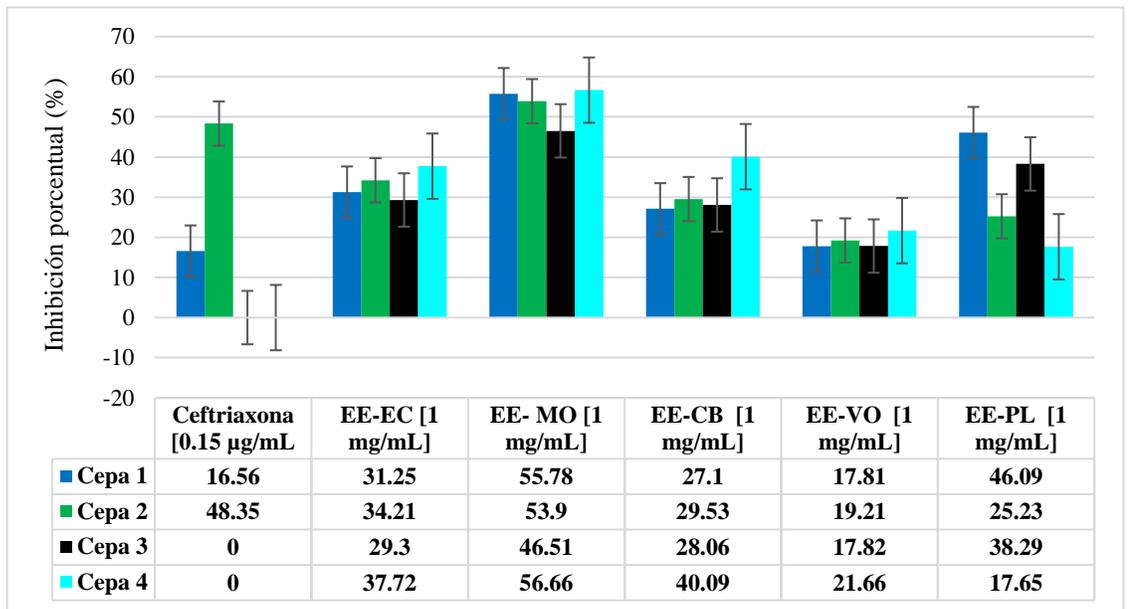


Figura 19. Inhibición porcentual comparativa entre los EE de cinco especies vegetales comparadas con la inhibición del antibiótico ceftriaxona.

PL: *Prosopis laevigata*; EC: *Eucalyptus camaldulensis*; M: *Morus* sp; CB: *Cordia boissieri*; VO: *Verbena officinalis*

b) Recuento bacteriano en placa (UFC/mL)

A continuación, de los datos obtenidos por el método de espectrofotometría se procedió a determinar el número de células viables por el método de recuento bacteriano en placa, graficando los resultados en UFC/mL. En la siguiente Tabla 12 se muestran los valores UFC/mL obtenidos, empleando la concentración de 1 mg/mL de los extractos *P. laevigata*, *E. camaldulensis*, *Morus*, *C. boissieri* y *V. officinalis* sobre el crecimiento de las 4 cepas aisladas empleando MPT agar y realizando diluciones y plaqu coastos hasta la dilución 1×10^{-7} , observando los siguientes resultados.

Tabla 12. Determinación de UFC/mL (1×10^{-7}) cultivadas en presencia de extractos etanólicos de las especies vegetales utilizadas en el proyecto.

Tratamientos ↓ Cepas →	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4
Control	468	1186	824*	856
Ceftriaxona [0.15 µg/mL]	92	253	I	I
EE-EC [1 mg/mL]	I	506	1148	772
EE- MO [1 mg/mL]	155	796	515	877
EE- PL [1 mg/mL]	326	801	55*	190
EE- CB [1 mg/mL]	I	406	745	886
EE-VO [1 mg/mL]	212	393	833	640

PL: *Prosopis laevigata*; EC: *Eucalyptus camaldulensis*; M: *Morus sp.*; CB: *Cordia boissieri*; VO: *Verbena officinalis*. I: Incontables

*Se observa diferencia estadística significativa entre el control (UFC/mL de la cepa 3) y el tratamiento (UFC/mL de cepa 3) cultivada e presencia de EE-PL.

En base a las UFC/mL obtenidos de las cuatro cepas de UPD cultivadas en presencia de los cinco EE seleccionados, se realizó el análisis para determinar la inhibición porcentual obtenida en cada uno de los tratamientos, los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Inhibición porcentual de las cepas de bacterias aisladas de las UPD y cultivadas en presencia de extractos etanólicos de cinco especies vegetales

	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4
Ceftriaxona [0.15 µg/mL]	80.34	78.67	0	0
EE-EC [1 mg/mL]	0	57.33	0	9.81
EE- MO [1 mg/mL]	66.88	32.88	37.5	0
EE- PL [1mg/mL]	30.35	34.44	93.58	76.87
EE- CB [1 mg/mL]	0	65.72	9.56	0
EE-VO [1 mg/mL]	54.70	66.86	0	25.23

EE: Extracto etanólico, PL: *Prosopis laevigata*; EC: *Eucalyptus camaldulensis*; M: *Morus sp*; CB: *Cordia boissieri*; VO: *Verbena officinalis*.

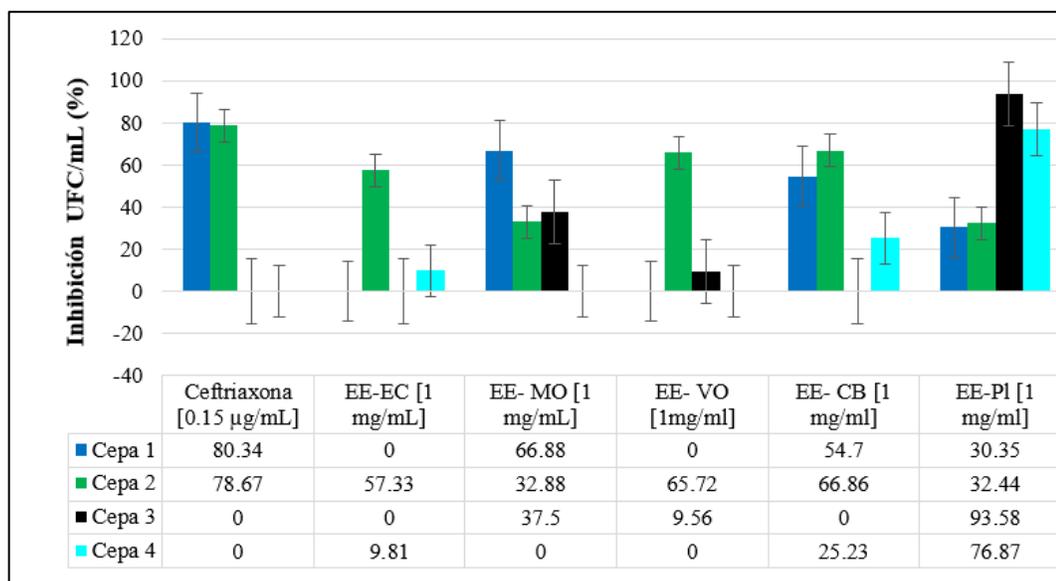


Figura 20. Comparación de inhibición porcentual de las cepas aisladas de UPD en presencia de EE utilizados por el método de UFC/mL. EE: Extracto etanólico, PL: *Prosopis laevigata*; EC: *Eucalyptus camaldulensis*; M: *Morus sp*; CB: *Cordia boissieri*; VO: *Verbena officinalis*.

Los resultados obtenidos en la Tabla 13 y Figura 20 para el control positivo utilizando antibiótico ceftriaxona a 0.15 µg/mL muestran inhibición solamente para Cepa 1 y Cepa 2, como se había reflejado en los resultados de espectrofotometría. El extracto vegetal de *Morus* sp, presentó mayor inhibición porcentual para la Cepa 1 a comparación de todos los demás extractos utilizados. Para la Cepa 2 los extractos con mayor inhibición son el extracto de *E. camaldulensis*, de *C. boissieri* y de *V. officinalis*. Por otra parte, *P. laevigata* presenta mayor actividad biológica sobre el crecimiento de la Cepa 3 y Cepa 4, de la misma manera que *V. officinalis*. Los resultados obtenidos en este bioensayo son el resultado de tres eventos independientes por triplicado.

7.6 Evaluación de la actividad hemolítica de los extractos seleccionados con mayor actividad biológica mediante método de Hemólisis indirecta en placa

Se evaluó la actividad hemolítica de los extractos etanólicos a una concentración de 1mg/mL sobre eritrocitos humanos sanos, con el fin de determinar algún efecto en estas células que indicaran hemólisis de las especies vegetales. Como control, se utilizó solución salina fisiológica. Los siguientes resultados son a las 24 horas de incubación a 37 °C y se muestran en la siguiente Figura 21.

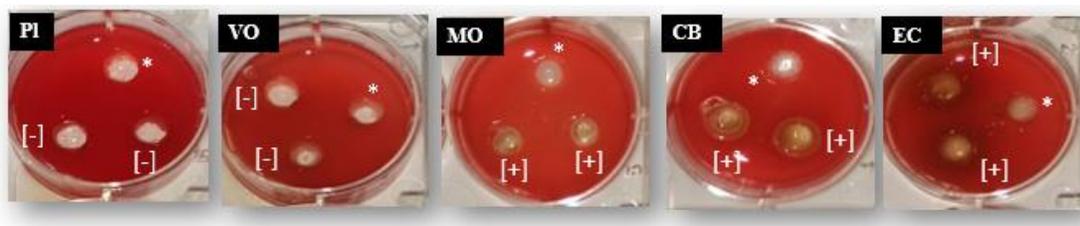


Figura 21. Método de Hemólisis indirecta en placa en donde se muestran los extractos etanólicos de las especies vegetales utilizadas en el ensayo con agar sangre. PL: corresponde al extracto de *P. laevigata*; VO: *V. officinalis*; MO: *Morus* spp; CB: *C. boissieri* y EC: *E. camaldulensis*. La concentración de los extractos es de 1 mg/mL y en cada uno de ellos se observan dos pocillos con extracto y un pocillo que corresponde al control con solución salina fisiológica (*). Imagen de autoría propia (Nájera 2021)

Tanto *P. laevigata* como *V. officinalis* no presentaron halo de Hemólisis Figura 21, este resultado indica que ninguno de ellos a la concentración utilizada es tóxico para los eritrocitos. Mientras que los extractos de *Morus spp*, *C. boissieri* y *E. camaldulensis* presentaron halos de hemólisis, siendo *C. boissieri* el extracto más hemolítico para eritrocitos Figura 22.

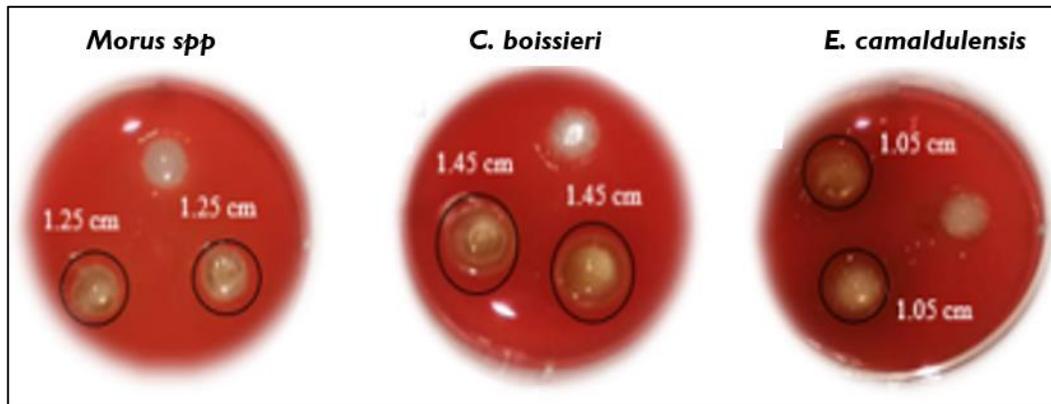


Figura 22. Especies vegetales que presentaron halo de Hemólisis en agar sangre. Se observa que *Morus spp* generó un halo de Hemólisis de 1.25 cm, *C. boissieri* con halo de Hemólisis de 1.45 cm y *E. camaldulensis* con 1.05 cm. Imagen de autoría propia (Nájera 2021)

7.7 Fraccionamiento de extractos etanólicos seleccionados y Evaluación de la actividad inhibitoria sobre cepas de microorganismos aisladas de UPD

Posterior a la prueba de Hemólisis se decidió continuar trabajando con los extractos etanólicos de *V. officinalis* y *P. laevigata* ya que no presentaron halo de hemólisis en los eritrocitos, y se realizó la cromatografía en papel para separar fracciones.

Cromatografía en papel: En la Figura 23 se muestran las cromatografías en papel con etanol como eluyentes de los extractos de *V. officinalis* y *P. laevigata* que además de no presentar hemólisis, presentaron actividad antimicrobiana para las cepas aisladas de UPD. De cada uno de los extractos se obtuvieron 3 fracciones.

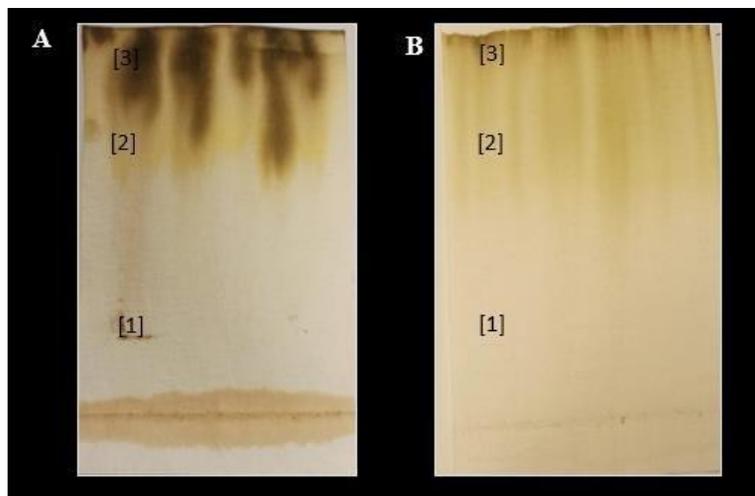


Figura 23. Cromatograma en papel de *P. laevigata* (A) y *V. officinalis* (B) Imagen de autoría propia (Nájera 2021).

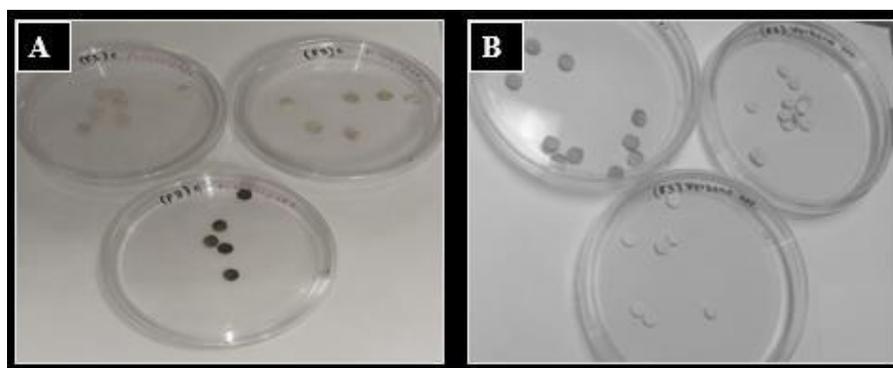


Figura 24. Fracciones (F1, F2 y F3) obtenidas de los extractos de *P. laevigata* y *V. officinalis*. Imagen de autoría propia (Nájera 2021)

A partir de las fracciones obtenidas de cada extracto, se probó la actividad antimicrobiana de cada fracción colocándolas sobre placas Petri con agar nutritivo inoculadas con las 4 cepas mediante técnica de césped. Se dejaron incubando a 37°C durante 18-24 horas. Los resultados se muestran en las siguientes Figuras 25-26.

Los resultados obtenidos de la inhibición del fraccionamiento de *V. officinalis* indica que tanto las fracciones como el extracto crudo inhiben a la C1, pero el extracto crudo inhibió a la C1 de igual manera que el antibiótico ceftriaxona a la concentración de 0.5 µg/mL. Respecto a la C2, solamente la fracción 2 y el extracto crudo inhibieron en menor medida que el antibiótico utilizado. El extracto crudo de *V. officinalis* inhibe a la C1 y a la C2.

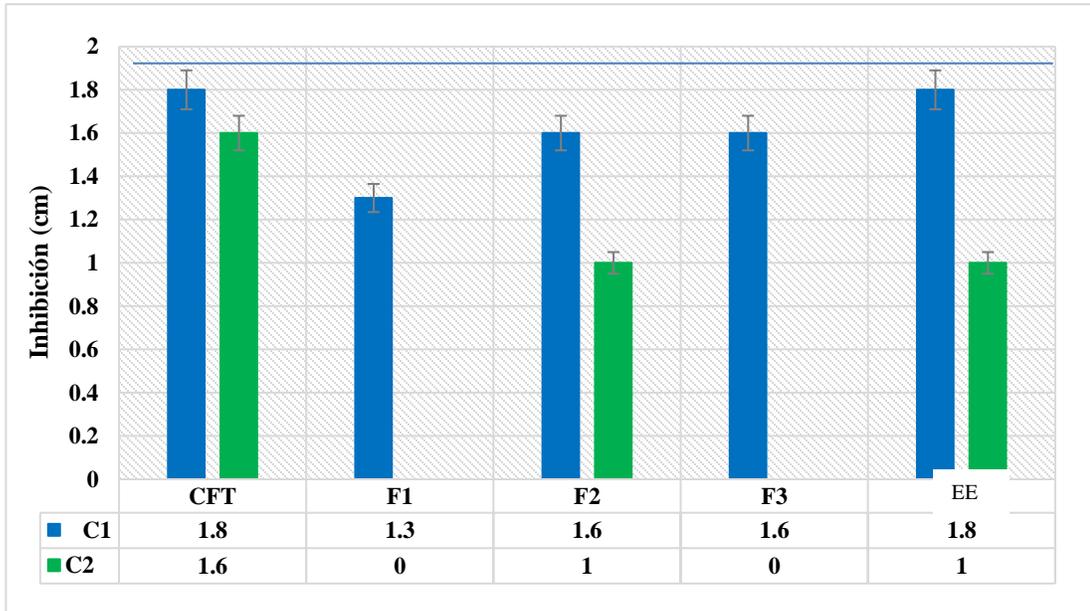


Figura 26. Determinación de inhibición en cm de las fracciones obtenidas de *V. officinalis* comparadas con el antibiótico ceftriaxona 0.5 µg/mL.

CFT: Ceftriaxona, C1: Cepa 1, C2: Cepa 2, F1: Fracción 1, F2: Fracción 2, F3: Fracción 3, EC: Extracto etanólico.

Estos resultados indican la inhibición a las C3 y C4 del fraccionamiento de *P. laevigata*, tanto F2, F3 y el extracto crudo con mayor proporción a la C3 que el antibiótico ceftriaxona utilizado a la concentración de 0.5 µg/mL. Por lo tanto, todas las fracciones y el extracto crudo de *P. laevigata* inhiben a la C3. Respecto a la C4, solamente la F3 y el EC inhibieron en mayor medida que el antibiótico utilizado. Sin embargo, todas las fracciones y el extracto crudo de *P. laevigata* inhiben a la C4.

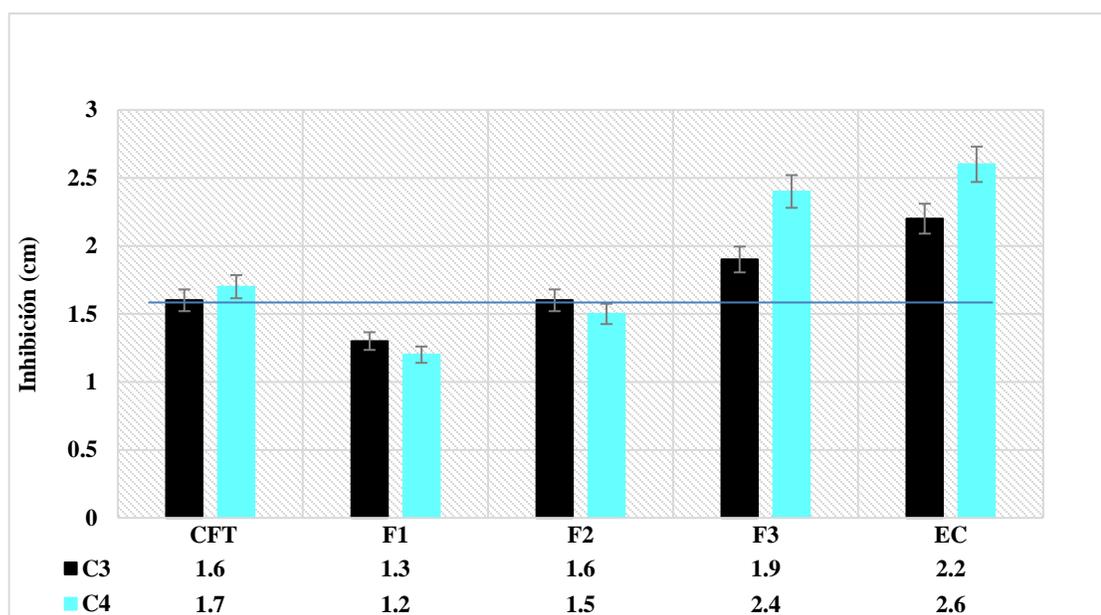


Figura 28. Determinación de inhibición en cm de las fracciones obtenidas de *P. laevigata* comparadas con el antibiótico ceftriaxona 0.5 µg/mL.

7.8 Evaluación *in vitro* de biopelículas funcionalizadas con EE de *P.laevigata* y *V. officinalis* con actividad antibacteriana sobre cepas aisladas de UPD

Se realizaron biopelículas de Alginato de sodio (Ag), carboximetilcelulosa (CMC) y una mezcla de ambos con los extractos de *P. laevigata* y *V. officinalis*. Se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de las biopelículas y las cepas bacterianas aisladas de UPD, se incubaron a 37°C durante 24 horas. Pasando las 24 horas, se obtienen los halos de inhibición, se midieron con un vernier y se graficaron. Los ensayos fueron

realizados por triplicado y se muestran en la Tabla 14 y Figura 29. En el que se puede observar que el tratamiento que presentó mayor actividad antibacteriana fueron las biopelículas de Alginato de sodio (Ag) con extracto etanólico de *P. laevigata* teniendo mayor halo de inhibición de 1.3 cm para la Cepa 3.

Tabla 14. Evaluación de la actividad antibacteriana de las biopelículas funcionalizadas sobre BAUPD

	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4
CMC + <i>Pl</i>	-	-	-	-
Ag + <i>Pl</i>	+ (1.1 cm)	+ (1 cm)	+ (1.3 cm)	+ (1 cm)
CMC + <i>Vo</i>	-	-	-	-
Ag + <i>Vo</i>	-	-	-	-
CMC+ Ag+ <i>Pl</i>	+ (0.9 cm)	-	-	-
CMC+ Ag+ <i>Vo</i>	-	-	-	-

(+) Halo de inhibición (-) Sin inhibición: CMC: Carboximetilcelulosa; Ag: Alginato de sodio; *Pl*: *Prosopis laevigata*; *Vo*: *Verbena officinalis*

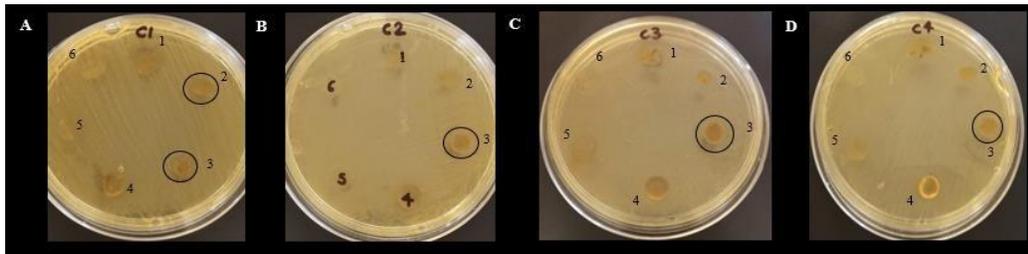


Figura 29. Evaluación antibacteriana de diferentes biopelículas con metabolitos secundarios de extractos de *V.officinalis* y *P.laevigata* A) Cepa 1 con halo inhibición en 2: 0.9 cm y 3: 1.1 cm; B) Cepa2 con halo de inhibición en 3: 1.0 cm; C) Cepa 3 con mayor halo de inhibición en 3: 1.3 cm; D) Cepa 4 con halo de inhibición en 3: 1.0 cm. 1) CMC+*Pl*; 2)CMC+Ag+*Pl*; 3)Ag+*Pl*; 4) CMC+ *Vo*; 5)CMC+Ag+*Pl*; 6) Ag+*Vo*. Imagen de autoría propia (Nájera 2021)

Por lo tanto, se seleccionó el extracto etanólico de *P. laevigata* para evaluar la citotoxicidad de este extracto, previo a evaluar las biopelículas de alginato *in vivo* en modelo murino.

7.9 Actividad citotóxica *in vitro* del extracto de *P. laevigata* sobre células VERO

La prueba de citotoxicidad en la línea celular VERO (ATCC® CCL-81) demostró que el extracto etanólico de *P. laevigata* presentó una toxicidad moderada en sus primeras tres concentraciones 1000, 500 y 250 µg/mL (Figura 32). Al evaluar la actividad biológica del extracto etanólico sobre las células VERO, se obtuvieron valores de inhibición porcentual, las cuales se muestran en la Tabla 15.

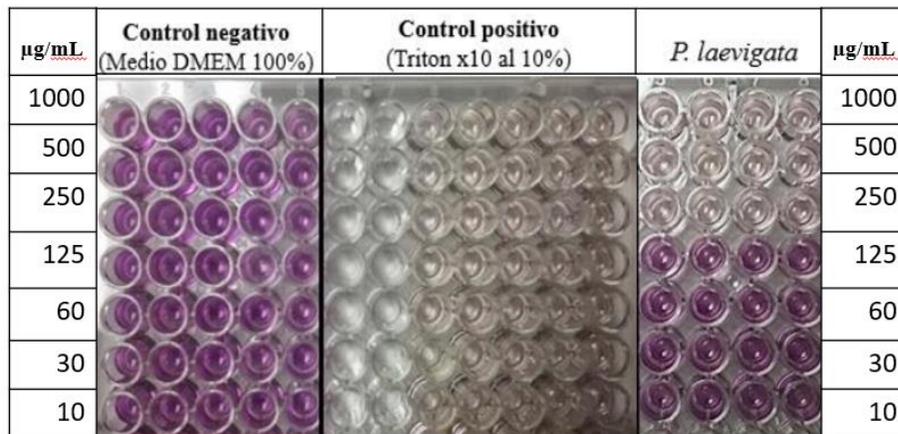


Figura 32. Resultado de citotoxicidad del extracto etanólico de *P. laevigata*.
Imagen de autoría propia (Nájera 2021)

Tabla 15. Comparación de la inhibición(%) de células VERO en presencia del EE- *P. laevigata*

Dosis [µg/mL]	Inhibición (%)
1000	55
500	56
250	50
125	0
60	8
30	2
10	14

Posteriormente se determinó el valor DL₅₀ [µg/mL] para las células VERO, los valores se muestran en la Tabla 16, y de acuerdo con (Vanhaecke 1981), los valores para inhibir la mitad de la densidad celular están en el rango de 100-1000 µg/mL,

lo cual cae en la categoría de moderadamente tóxico.

Tabla 16. Comparación de la DL₅₀ [µg/mL] del extracto etanólico de *P. laevigata* sobre células VERO

Extracto etanólico	DL ₅₀ [µg/mL]	Categoría de toxicidad	
		Rango [µg/mL]	Clasificación
<i>P. laevigata</i>	403.3	100-1000	Moderadamente tóxico

7.10 Valoración *in vivo* de biopelícula de Ag+ EE-PI sobre herida en modelo murino hembra Balb/C en base a avance de cierre de la herida

El presente ensayo tuvo como objetivo determinar cualitativamente el efecto cicatrizante de las biopelículas de Alginato con el extracto etanólico de *P. laevigata* en murinas hembras Balb/C. Se utilizaron hembras *Mus musculus* Balb/C clínicamente sanas de 6-8 semanas, que se mantuvieron en condiciones de esterilidad y con desparasitación previa con ivermectina. Los animales fueron alojados en jaulas de acero inoxidable en un ambiente adecuado de 25°C con fotoperiodo de 12 horas de luz/oscuridad. Los animales fueron tratados de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999 y se utilizó en todo momento el principio ético de 3R para experimentación de animales de laboratorio. Preoperatorio a la cirugía en murinos, se pesaron y se calculó la dosis de anestesia local (Lidocaína). Durante la cirugía, se recortó el pelo del área y se realizó asepsia del lomo, realizando una herida de 1 cm de longitud aproximadamente y se colocó la biopelícula sobre la piel del murino, heridas previamente infectadas con la Cepa 3.

Postoperatorio se administró analgésico tramadol en el agua de uso. Las biopelículas se mantuvieron en contacto directo con la piel por un periodo de 24 horas, y después de dicho periodo se colocó otro parche diariamente durante 9 días conforme al avance del cierre de la herida. Para la evaluación cicatrizante, se formaron 3 grupos de 3 ratones cada uno ver Tabla 18. Al grupo uno se aplicó la

anestesia local y se realizó la herida y no se inoculó. Al grupo dos se anestesió localmente, se realizó la incisión y se aplicó sobre la herida la solución bacteriana de la Cepa 3. Posteriormente se aplicó la biopelícula de Alginato de sodio con *P. laevigata* (Ag+EE-PI). Al grupo tres se le aplicó la biopelícula de Alginato con el antibiótico Ceftriaxona (Ag+ Cftx).

Se revisó la herida diariamente, se colocó parche en condiciones de esterilidad del día 1 al día 9, y cada tercer día se tomó fotografía a la herida para ver el avance en el proceso de cicatrización. Los signos que se tomaron en cuenta para la valoración de los resultados fueron infección, inflamación del área donde se realizó la herida, eritema, pérdida de pelo y cierre de la herida.

En la siguiente Figura 31 se muestran ambos tratamientos de biopelículas utilizados en el ensayo con modelo murino. Una de las características que se pueden observar de estos parches, es que es adaptable, flexible y de fácil manipulación. Se encuentra libre de contaminantes ya que fue elaborado en condiciones de esterilidad y se demostró *in vitro* que no estimula el crecimiento o la proliferación de bacterias. Es adherible a la piel debido a las propias características del Alginato, por lo que al momento de retirarlo no causa trauma o dolor en las heridas.

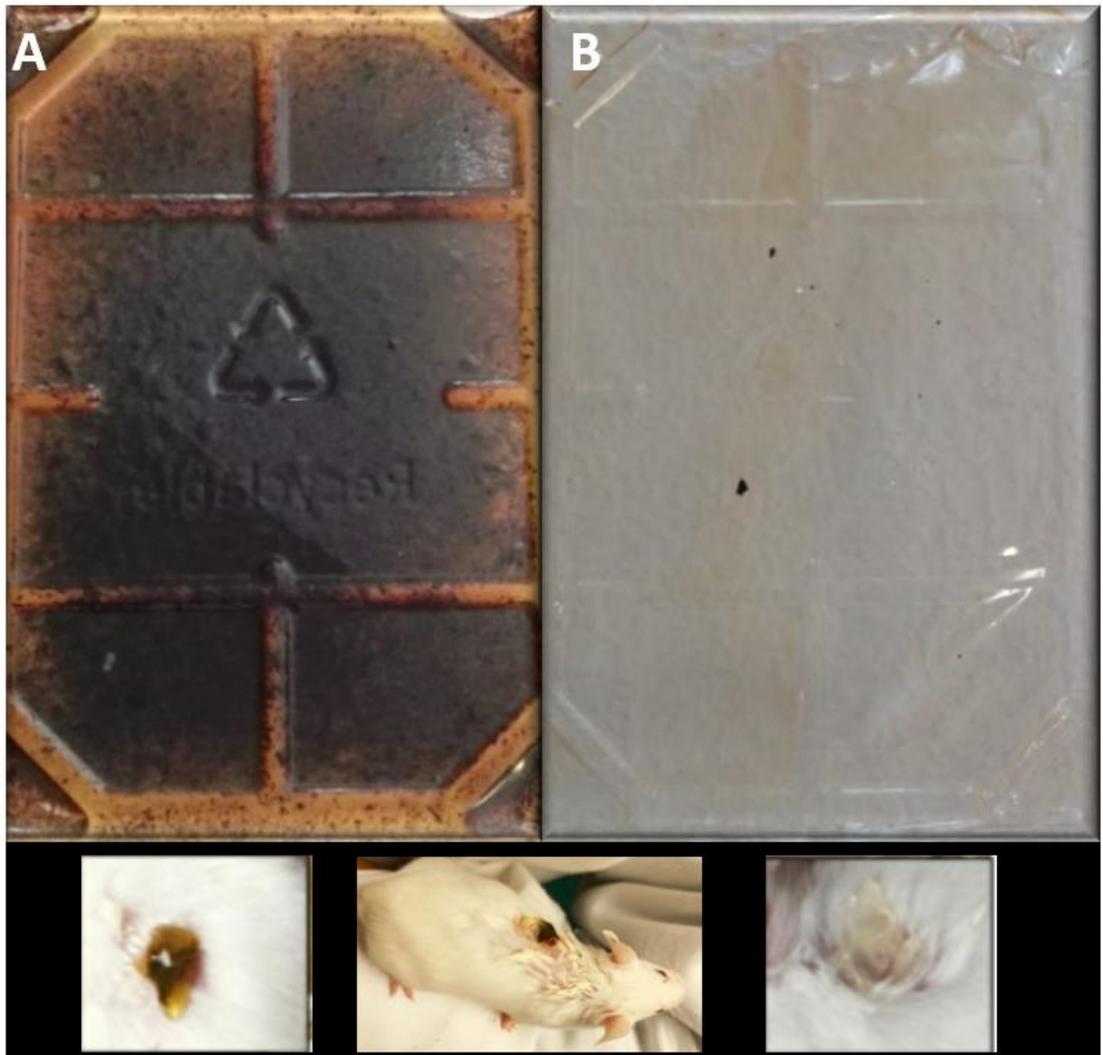


Figura 31. Biopelículas elaboradas en base a Alginato de sodio y colocación sobre piel de murino. A) Biopelícula base Alginato con extracto de *P.laevigata*. B) Biopelícula base Alginato con antibiótico ceftriaxona, ambas se utilizaron como tratamiento cicatrizante en heridas de murino. En la imagen de inferior izquierda, se puede observar la colocación de la biopelícula directamente en herida infectada. Imagen de autoría propia (Nájera 2021).

Tabla 17. Evolución de la cicatrización de los diferentes tratamientos

Tratamiento	Días				
	1	3	6	9	16
Control (Grupo 1)					
Biopelícula de Alginato + EE-<i>P. laevigata</i> (Grupo 2)					
Biopelícula de Alginato + antibiótico (Grupo 3)					

En este ensayo se puso a prueba el modelo *in vitro* de la biopelícula de Alginato con *P. laevigata*, comparado con el grupo control que no fue inoculado y la biopelícula de Alginato con Ceftriaxona (antibiótico comúnmente utilizado en infecciones de úlceras).

Las observaciones se describen a continuación para el control y cada tratamiento:

Grupo control: cicatrizó en menor tiempo, ya que en el día 6 ya se observaba el avance en el cierre de la herida, no presentó signos de inflamación, de pérdida de pelo, y el eritema que se observa era mínimo, para el día 9 la herida cicatrizó y el pelo del murino cubrió completamente la zona al día 16.

Tratamiento de la biopelícula de Alginato con *P. laevigata*: pese a haber sido infectada, mostró recuperación de herida a partir del día 7 (datos no mostrados). Similar al grupo control, no se presentaron signos de eritema o pérdida de pelo. Para el día 9, la herida cicatrizó y el pelo del murino cubrió completamente la zona al día 16.

Tratamiento de biopelícula de Alginato con antibiótico: los signos de infección se hicieron presentes desde el segundo día, hubo inflamación de la zona, eritema, y pérdida de pelo, esto debido probablemente a la resistencia de esta cepa con respecto al antibiótico, al día 16 se mostró recuperación de la herida y crecimiento de pelo en la zona afectada, pero se muestran signos de la herida.

Para cada grupo se utilizaron 3 ratones, y para este último tratamiento dos de ratones a partir del día 6, se empezaron a tratar con el parche con mezquite. Para el día 9, el ratón que tenía solamente parche con antibiótico, logró cerrar la herida. Los otros dos ratones tratados con mezquite, desde el día 8 cerró su herida. Los resultados obtenidos son favorables para el tratamiento de biopelícula con *P. laevigata*.

8. DISCUSIÓN

La presente investigación tuvo como objetivo principal el diseño de biopelículas con metabolitos secundarios de extractos etanólicos vegetales con actividad inhibitoria sobre bacterias aisladas de úlcera diabética. El aislamiento de las bacterias se realizó a partir de las úlceras de pie diabético mediante toma profunda por medio de la propia gasa con exudado del paciente y las bacterias aisladas se identificaron como Cepa 1, 2, 3 y 4. (Hernández et al. 2014) menciona que para la realización de las pruebas microbiológicas en específico de las úlceras diabéticas, la obtención de la muestra debe ser la adecuada para el tipo de herida, y que las muestras que son obtenidas con hisopo o con gasa recogiendo el exudado además de ser un método de aislamiento rápido y sencillo, son capaces de identificar con precisión los patógenos implicados en las infecciones de pie diabético que no afectan hueso, sobre todo en estadios iniciales de estas infecciones, por ejemplo en Grados 1-2 de la escala de Wagner, pero no en el Grado 3, y se reporta como la técnica más utilizada con confiabilidad del 90%. Otros autores consultados al respecto (Lipsky et al. 2014) indican que las muestras son más fiables cuando se obtienen de biopsia de tejido con confiabilidad de obtener microorganismos patógenos causantes de la infección del 99%, sin embargo, este método precisa de un tratamiento previo y de un protocolo de seguridad y asepsia más estricto al considerarse una prueba invasiva para el paciente.

Al respecto de la microbiología de las úlceras y a partir del aislamiento, se obtuvo que las Cepas 1, 2 y 4 son cocos Gram positivos, mientras que la Cepa 3 son cocos Gram negativos. De acuerdo con (Hernández et al. 2014) observaron que las bacterias Gram positivas se encontraban en los primeros grados de infección de la escala de Wagner de úlceras diabéticas con una frecuencia del 60%, mientras que en el grupo de bacterias Gram negativas, se encuentran en el grado III de infección con úlceras profundas que afectan tendón, y hueso, con una frecuencia del 40%. Por otro lado, (Matías et al. 2015) en un estudio sobre microbiología del pie diabético, menciona que también obtuvieron un incremento en el aislamiento de bacterias Gram positivas con respecto a las negativas, y que los aislamientos más frecuentes fueron cocos Gram positivos como *Enterococcus spp*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus spp*, y entre las bacterias Gram

negativas más frecuentes se encuentran *E. coli*, *P.aeruginosa* entre otras.

Por otra parte, las plantas producen una gran variedad de compuestos bioactivos y metabolitos secundarios como medio de defensa al ataque de insectos, microorganismos y de adaptación a ambientes adversos (temperatura, humedad, intensidad de luz, sequia) (Ramakrishna y Aswathanarayana, 2011) y cumplen funciones no esenciales en ellas. La elección del material vegetal estudiado en este trabajo se deriva de que existen antecedentes que hablan sobre su actividad antimicrobiana, además que son utilizadas en la medicina tradicional para tratar afecciones de la piel como infecciones, heridas, quemaduras y úlceras, como es el caso de la mora, eucalipto, anacahuita, verbena y el mezquite. Una de las ventajas es que todas estas especies están distribuidas en la región, principalmente en los estados del norte de México.

Para la obtención de los extractos vegetales se empleó como solvente etanol por su alta polaridad la cual le permite extraer mayor cantidad de sustancias activas, la elección del etanol se realizó principalmente porque su nivel de toxicidad en el organismo es mucho menor que otros solventes como el metanol. (Xavier et al. 2015) menciona que en la medicina tradicional las plantas se maceraban con etanol y lo considera como un solvente con baja toxicidad para el humano y un procedimiento de extracción seguro y eficiente. Otros autores reportan que la eficiencia de extracción también se ve significativamente afectada por la composición del solvente (Gironi y Piemonte, 2011) y han demostrado la superioridad del uso de solventes polares (etanol) sobre solventes no polares (n-hexano) en la extracción de sustancias como los metabolitos secundarios con actividad antioxidante.

Posterior a la obtención de los extractos etanólicos se procedió a realizar una serie de pruebas químicas colorimétricas, que permiten un análisis cualitativo con base a la presencia de varios grupos funcionales; esto lo indica (Xavier et al. 2015) con respecto a las mezclas de productos naturales que han sido extraídos con solventes, mencionando que cuando un reactivo reacciona con un metabolito se produce un compuesto colorido.

Las diferentes partes de una planta están desigualmente provistas de principios activos

como son los alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas, quinonas, taninos y terpenoides. Se ha demostrado que existe gran variación en cuanto a la concentración de estos en la planta, no hay un patrón de máxima producción ni órganos especiales de almacenaje de metabolitos secundarios, sin embargo, lo común es que las mayores concentraciones de estos tipos de compuestos se encuentren en hojas, flores y semillas (Soto 2011). En este proyecto se trabajó con las hojas que son el asiento de todas las síntesis químicas vegetales, además de que es la parte más empleada en muchos estudios (54.1 %) porque contiene una gran cantidad de heterósidos, compuestos que se emplean como medicamentos y poseen la mayor parte de los alcaloides, seguida de la raíz (10.2%), el tallo (9.2%), la flor (8.2%), corteza (6.1%), fruto (5.1%), semilla (4.1%), resina (2%) y la planta completa (1%).

Uno de los ejemplares vegetales utilizados en este trabajo es *P. laevigata* y la actividad biológica que presento en los ensayos sobre el crecimiento de las cepas podría deberse a la gran cantidad de metabolitos secundarios presentes en el extracto, es comúnmente llamado Mezquite, y se trabajó principalmente con hojas. Es considerado como medicinal debido a que posee ciertas propiedades biológicas las cuales son atribuidas a la presencia de fitoquímicos como los compuestos fenólicos y los alcaloides. Los resultados que se obtuvieron en el tamizaje fitoquímico de *P. laevigata* fue la especie con mayor presencia de grupos funcionales (Ver Tabla 12), esto indica que los metabolitos secundarios fueron arrastrados satisfactoriamente con el solvente utilizado y se evidencia al dar positivo a las pruebas coloridas del tamizaje fitoquímico evaluadas. (Marcano et al. 2012) en un estudio en donde también realizaron un tamizaje fitoquímico de hoja de *Prosopis* para evaluarlas con diferentes solventes, menciona que con el solvente etanol encontraron compuestos fenólicos y alcaloides como apigenina, catequina y mezquitol, además de que a estos metabolitos se les atribuye su actividad antimicrobiana.

De los grupos funcionales encontrados en el extracto etanólico de *P. laevigata*, también a los flavonoides se les atribuye la propiedad antimicrobiana, dado que varios tipos de flavonoides son conocidos por conferir resistencia al ataque de microorganismos (Modak et al. 2002). Hay evidencia de los terpenos al estar presente en los extractos, es evidente

su actividad antimicrobiana, y se debe a la perturbación de la bicapa lipídica en la membrana plasmática, lo que conduce a una alteración de la permeabilidad. En un estudio (Garzón 2008) coincide con los resultados que se obtuvieron respecto a los metabolitos secundarios encontrados en *P. laevigata*.

Hay otros mecanismos por los cuales los componentes activos de los extractos pueden inhibir el crecimiento microbiano: inhibición de la síntesis de la pared celular y la activación de enzimas que destruyen esa pared, aumento de la permeabilidad de la membrana celular, interferencia con la síntesis de proteínas y alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos, entre otros (Valencia 2016).

Para *V. officinalis* los metabolitos secundarios que destacan en este trabajo, son los flavonoides, esteroides, terpenos y los alcaloides. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura (Locke et al. 2016) en donde se evalúa el perfil fitoquímico de las hojas de *V. officinalis* con diferentes solventes.

Los grupos funcionales encontrados en el extracto etanólico de *E. camaldulensis* presentan variabilidad comparados con lo de otros autores, (Naranjo et al. 2009) menciona en un estudio que se realizó con diferentes especies de *Eucalyptus sp*, que se encuentran presentes esteroides, terpenos y alcaloides, y que son estos precisamente los que poseen la actividad antibacteriana. En los resultados que se obtuvieron del tamizaje, esos metabolitos no estuvieron presentes.

Tanto *Morus spp* como *C. boissieri*, fueron las dos especies vegetales con menor cantidad de grupos funcionales que se detectaron, y se encontraron como principales compuestos a las saponinas (Ver Tabla 12). En el perfil fitoquímico realizado por (Demiray et al. 2009) se encontraron como principales compuestos de *Morus spp*, la presencia de compuestos fenólicos, lactonas, esteroides, terpenos y alcaloides, que no fueron encontrados en el extracto etanólico realizado. Para *C. boissieri* diversos autores coinciden (Matías 2015 y Alvarado et al. 2004) en que los metabolitos que se han aislado con mayor frecuencia de las hojas son los terpenos, flavonoides y taninos, sin embargo, se conoce que numerosos factores pueden afectar los resultados en el análisis fitoquímico, entre ellos se encuentran

los ambientales como el clima, la temperatura, la fertilidad de los suelos y la exposición a patógenos. Otros factores como el órgano vegetal de muestra, el tiempo de recolección del material, las diferentes polaridades de los extractos utilizados para la extracción y los métodos de determinación, afectan también considerable los resultados.

Se determinó la sensibilidad de las bacterias aisladas de UPD a los extractos etanólicos de las cinco especies vegetales por medio del método de espectrofotometría la cual se utilizaron 100 μ L del inóculo de las cepas aisladas previamente activadas, en presencia de la concentración de 1 mg/mL de cada uno de los extractos vegetales evaluados y como control positivo de viabilidad celular se empleó un inóculo inicial de 100 μ g y como control negativo se utilizó el antibiótico ceftriaxona a una concentración de 0.5 μ g/mL esto con la finalidad de determinar un resultado preliminar de inhibición de los extractos a la bacterias y se confirmó mediante el método de recuento en placa por UFC/mL

En base a los resultados mediante espectrofotometría se observó que solo la cepa 1 y 2 son sensibles al antibiótico ceftriaxona a la dosis evaluada, cabe mencionarse que se determinó la dosis de 0.5 μ g/mL de acuerdo a estudios previos realizados en el laboratorio (datos no mostrados). Este antibiótico, es una cefalosporina de tercera generación y posee un amplio espectro de actividad contra bacterias Grampositivas y Gramnegativas, además, de todas las cefalosporinas es la que tiene mayor semivida plasmática, permitiendo la administración de una sola dosis al día. Lo recetan los médicos a partir del 1 grado de afectación hasta el grado 3 de la escala de Wagner de úlceras diabéticas que son grados no avanzados y previenen una infección mayor y por ende amputaciones y a partir del grado 3, se suele utilizar ceftriaxona en combinación con otro antibiótico como clindamicina en pacientes con infecciones graves y polimicrobianas (Báez et al. 2017). Sin embargo, tanto la Cepa 3 como la Cepa 4 de los resultados, se observa resistencia por medio de las cepas a la concentración del antibiótico utilizada, (Pérez 2019) menciona que la ceftriaxona también puede llegar a ser resistente frente *Enterobacter spp*, *Pseudomonas spp*, *Klebsiella spp*, *Citrobacter diversus* y *Streptococcus spp*. (Gómez et al. 2015) la ceftriaxona como todos los antibióticos betalactámicos es bactericida e inhibe la síntesis de la pared bacteriana al unirse específicamente a unas proteínas llamadas “proteínas

ligandos de la penicilina (PBPs)” que se localizan en dicha pared. Las PBPs son responsables de varios de los pasos en la síntesis de la pared bacteriana y estas proteínas son diferentes para cada especie bacteriana, por lo que la actividad de cada uno de los antibióticos betalactámicos depende de la capacidad de estos para acceder y unirse a dichas proteínas. Una vez que el antibiótico se ha unido a las PBPs estas pierden su capacidad funcional, con lo que la bacteria pierde su capacidad para formar la pared, siendo el resultado final la lisis de la bacteria.

Aunque la ceftriaxona es activa frente a la mayor parte de las bacterias Grampositivas incluyendolas cepas de estafilococos productoras de penicilinas, las cefalosporinas de primera generación suelen ser más activas. Sin embargo, los mecanismos de resistencia adquiridos y transmisibles consisten fundamentalmente en la producción de enzimas bacterianas que inactivan los antibióticos o en la aparición de modificaciones que impiden la llegada del fármaco al punto diana o en la alteración del propio punto diana. Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas. La principal problemática de utilizar antibióticos radica en la resistencia por parte de los microorganismos infectantes, además de daños renales como la litiasis a la que se asocia el uso de este antibiótico por la precipitación con el calcio, además de daños hepáticos para el paciente (Kluytmans et al. 2013).

Por lo tanto, de los datos preliminares obtenidos por el método de espectrofotometría, se procedió a determinar el número de células viables por el método de recuento bacteriano en placa obteniendo las UFC/mL y, por ende, el porcentaje de inhibición de las bacterias frente a los extractos. Este método cuantitativo se considera como el estándar de oro para la confirmación y los avances de este método incluyen la habilidad de escoger la dilución estadísticamente más apropiada para la cuenta, y la capacidad de contar exactamente las colonias presentes en la placa (Ríos et al. 2007). El uso de plantas como antimicrobiano puede inhibir las bacterias por un mecanismo diferente al de los antibióticos. Las plantas medicinales tienen un gran impacto positivo en el tratamiento de enfermedades

infecciosas causadas por bacterias. La exploración de nuevos antimicrobianos en las plantas genera un enfoque diferente para minimizar la resistencia a los antibióticos, en base a las unidades formadoras obtenidas de las 4 cepas se puede destacar que tanto Cepa 3 y Cepa 4 permanecieron resistentes al antibiótico ceftriaxona a la dosis evaluada, y se puede observar la notoria inhibición de los extractos etanólicos a las cepas evaluadas (Ver Tabla 13 y Tabla 14), en donde se muestra la inhibición porcentual. Para la Cepa 1, el extracto que inhibió en mayor proporción fue el de *Morus spp* con un 66.88% y le sigue *V. officinalis* con 54.70%, para la Cepa 2 el extracto de *V. officinalis* presentó mayor inhibición con un 66.86%, seguido de *C. boissieri* con 65.72% y *E. camaldulensis* con 57.33%. Para la Cepa 3 y Cepa 4, el único extracto que inhibió fue el de *P. laevigata* con 93.58% y 76.87% respectivamente y esto es favorable, debido a que estas cepas fueron resistentes al antibiótico ceftriaxona a 0.15 µg/mL.

La actividad biológica que presentaron estos extractos, se debe a la cantidad y a los metabolitos secundarios presentes en ellos. En el caso de *Morus spp*, se ha reportado por (Díaz et al. 2017) que el extracto etanólico presentó actividad inhibitoria para microorganismos Grampositivos como *S. aureus*, Enterococos, *Bacillus*, *Streptococcus* y fue debido a los flavonoides y los fenoles. Las bacterias Grampositivas tienden a ser más susceptibles ya que su pared celular es menos compleja y carecen de una filtración efectiva contra grandes moléculas y debido al tamaño de los poros en su envoltura celular son menos selectivas. Estos metabolitos secundarios afectan a las bacterias aumentando la permeabilidad de la membrana bacteriana e inhibición del ADN (González 2014).

Para *V. officinalis*, se ha reportado (Claros et al. 2006) que la presencia de los metabolitos secundarios como son flavonoides, esteroides, terpenos y alcaloides, le confieren actividad antibacteriana, y con mayor frecuencia los flavonoides mono y dihidroxilados sobre bacterias Grampositivas como *S. aureus*, *Bacillus subtilis* y Gramnegativas como *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*. En el caso de los terpenos, su actividad antibacteriana se debe a la perturbación de la bicapa lipídica en la membrana plasmática y alteración en su permeabilidad.

El extracto etanólico de *P. laevigata* inhibió a la Cepa 3 Gramnegativa y a la Cepa 4 Grampositiva, además en el análisis fitoquímico fue el extracto etanólico con mayor presencia de metabolitos secundarios positivos. Considerando la gran variedad de compuestos químicos presentes en el extracto obtenido, es muy probable que su actividad antimicrobiana no sea atribuible a un compuesto o mecanismo específico. Sino a la acción combinada de varios de ellos sobre distintos orgánulos de la célula (Vargas 2004). Por esta razón es probable que exista una sinergia entre los metabolitos que constituyen dicho extracto, potenciando su efecto contra las bacterias.

Otro de los propósitos de este estudio fue el evaluar la actividad hemolítica de los extractos que presentaron mayor actividad biológica sobre las cepas aisladas de las úlceras, se realizó mediante el método de Hemólisis indirecta en placa. Este método se considera indirecto porque mide la cantidad de hemólisis producida por determinado extracto como prueba de laboratorio *in vitro*, no sobre animales vivos y se utilizó la metodología modificada por (Gauthier et al. 2009).

Para el análisis de la actividad hemolítica en placa de los cinco extractos en estudio, el resultado se clasificó como hemólisis o no hemólisis. Tanto *V. officinalis* como *P. laevigata* no presentaron zona clara de hemólisis alrededor de los pocillos después de 24 horas de incubación evidenciando que su mecanismo de acción no afecta la membrana del eritrocito. Mientras que *C. boissieri*, Morusy *E. camaldulensis* mostraron zona de hemólisis de 1.05 a 1.45 cm de diámetro. El extracto que presentó mayor zona de hemólisis fue *C. boissieri*. Los resultados obtenidos de hemólisis de los extractos etanólicos de las especies vegetales utilizadas, coinciden con lo reportado por otros autores, además han relacionado la Hemólisis de los extractos etanólicos evaluados, con la presencia de saponinas (Baumann et al. 2015).

La presencia de las saponinas en los extractos ha demostrado *in vitro* tener un efecto hemolizante, propiedad que se atribuye a su interacción con los esteroides de la membrana eritrocitaria que induce un aumento de la permeabilidad de la membrana y un movimiento de iones sodio y agua entran, el potasio sale y por ende la membrana explota, permitiendo de este modo la salida de la hemoglobina (Melzig et al. 2009). Tanto *P. laevigata* como *V.*

officinalis que no fueron hemolíticas, en el perfil fitoquímico no hubo presencia de saponinas. Mientras que los extractos que fueron hemolíticos si había presencia de saponinas. Las saponinas pueden provocar efectos adversos como reacciones hemolíticas y su uso ha sido determinante en el desarrollo de diferentes potenciales terapéuticos, ya que amedrenta el uso de abundantes extractos de plantas; sin embargo, la relación de la lisis con otras actividades biológicas como la antibacteriana, antitumoral, adyuvante y antiinflamatoria ha tenido buenos resultados sobre las membranas celulares (Mena et al. 2015). Los extractos que fueron hemolíticos presentan actividad antibacteriana con las cepas aisladas de úlcera de pie diabético, sin embargo, no es factible emplearlos de manera tópica *in vivo* debido a su capacidad de ocasionar lisis celular.

Se realizó el fraccionamiento de los extractos etanólicos de *V. officinalis* y de *P. laevigata* usando etanol como eluyente y obteniendo 3 fracciones de cada extracto. Posteriormente se realizó la evaluación antibacteriana de estas fracciones junto con el extracto crudo, utilizando ceftriaxona como control, observándose que el extracto crudo de *V. officinalis* muestra inhibición sobre Cepas 1 y 2, y el extracto crudo de *P. laevigata* sobre Cepas 3 y 4. Los extractos etanólicos crudos presentaron inhibición sobre las bacterias aisladas de úlcera de piediabético, y por lo tanto son útiles para el desarrollo de la formulación de tópicos antimicrobianos, como es el caso de las biopelículas funcionalizadas.

Se realizaron biopelículas de alginato de sodio (AS), carboximetilcelulosa (CMC) y mezcla de ambos, con los extractos de *P. laevigata* y *V. officinalis*, que fueron los extractos etanólicos que presentaron mayor actividad antibacteriana. La biopelícula que presentó mayor actividad antibacteriana *in vitro* con las 4 BAUPD fue la de Alginato con extracto de *P. laevigata*, presentando mayor halo de inhibición comparado con los otros tratamientos. El Alginato es un biopolímero no tóxico, biodegradable, biocompatible, soluble en agua, es utilizado en la fabricación de apósitos para curación de heridas cutáneas y regeneración de piel en los últimos años. Se obtiene principalmente del alga parda *Microcystis pyrifera* y está compuesta de α -L-gulurónico y β -D-manurónico. En esta investigación se utilizó AS para la elaboración de las biopelículas, siendo estos los más utilizados en las ciencias de los biomateriales para la curación de heridas, ya que

cuando estos materiales entran en contacto con la herida y el exudado se forma un gel hidrófilo debido al intercambio entre los iones presentes en este apósito y el exudado de la herida, esto mismo, facilita la retirada del apósito, están indicados para heridas moderadas a muy exudativas (Valencia et al. 2016).

Su actividad biológica se basa en la degradación del exudado y promoción de una cama húmeda que evita la desecación de la herida sin irritar. Además, estimula a los monocitos para elevar la concentración local de citocinas, como la interleucina-6 y el factor de necrosis tumoral (Kamoun et al. 2013) Se postula que estos mediadores proinflamatorios promueven la adecuada reparación de las heridas (Ash et al. 2013) El alginato de sodio no es antibacteriano por si mismo y no inhibe bacterias, sin embargo, tampoco ayuda a la proliferación de las mismas. Por esta razón, se tomó la decisión de realizar biopelículas con alginato que junto con sus propiedades se potencien con el extracto etanólico antibacteriano de *P. laevigata* como una propuesta diferente a la alternativa con antibióticos para la curación de úlceras de pie diabético.

Actualmente en el mercado, existen apósitos de alginato de sodio de la marca Convatec y línea Aquacel, los cuales están diseñados con una mezcla de Alginato y como principio activo contienen plata, la cual está ampliamente demostrada su capacidad antimicrobiana, sin embargo, los iones de plata a nivel celular y específicamente en las mitocondrias tiene la capacidad de desestabilizar la cadena transportadora de electrones, por lo cual se verá afectada la capacidad a nivel celular de generar energía o ATP para poder realizar las actividades básicas a nivel celular, aunado a que estos residuos de plata se acumulan a nivel celular, por lo que continuará realizando daño a las bacterias patógenas como a nivel celular, impidiendo la cicatrización de la herida.

Otro de los objetivos de esta investigación fue determinar la actividad citotóxica del extracto de *P. laevigata* que fue el que presentó mayor inhibición y porcentaje de inhibición sobre la Cepa 3, que se utilizó para los ensayos in vivo. El ensayo se realizó sobre células eucariotas con el fin de determinar la factibilidad de poder emplearse en murinos y posteriormente en humanos. Por medio del ensayo de MTT empleando células VERO y un análisis estadístico de la prueba Tukey se determinó que, a concentraciones

de 1000, 500 y 250 µg/mL se presenta una inhibición del desarrollo celular en lo que respecta a la toxicidad del extracto etanólico de *P. laevigata*, considerándose como moderadamente tóxico. Los reportes de toxicidad de *P. laevigata*, se centran en su vaina, y tiene relación con la presencia de taninos que son los responsables de la coloración rojiza de la vaina (Arnero 2015) cuya característica principal es bloquear y precipitar proteínas. Otro autor reporta que la goma de mezquite contiene taninos como en contenidos de 0,5-2% (Córdova 2004), lo que se ha considerado como una limitante para su aplicación en la industria alimenticia debido a su posible toxicidad. Sin embargo, no existen reportes de su toxicidad en hojas.

Los modelos animales son indispensables en la investigación biomédica. Han sido utilizados desde los primeros días del descubrimiento científico y continúan siendo utilizados hoy en día para nuestro entendimiento de las funciones individuales de los genes, los mecanismos de diferentes enfermedades y la efectividad y toxicidad de varias medicinas y drogas (Arriaga et al. 2015). El último objetivo de esta investigación fue determinar el efecto cicatrizante de las biopelículas de Alginato con *P. laevigata* en murinos Balb/C *Mus musculus* inoculados con la cepa en la cual actuó el extracto etanólico de *P. laevigata*. Se decidió utilizar este animal experimental debido a que fueron donados y su uso tiene ventajas como son el fácil cuidado y mantenimiento por su pequeño tamaño, bajo costo de manutención, suelen ser dóciles, es una cepa definida y diversidad de características específicas que sirven como modelo, y normalmente se utilizan para ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, entre otras ramas (Beura et al. 2016). Previo a la incisión que se realizó en el lomo del ratón, se colocó lidocaína como anestésico local bajo la asesoría de un médico veterinario, y tal como lo indica la literatura (Falconi et al. 2010) en el que cualquier procedimiento que cause mayor dolor o molestia en los animales requiere el uso de tranquilizantes, analgésicos o anestésicos. En nuestro caso se utilizó tramadol a dosis recomendada de acuerdo a su peso, previo y post a la incisión tal como lo indica la NOM-062-ZOO-1999 que menciona que los preanalgésicos ayudan a reducir o eliminar la etapa de excitación del animal y facilita su inmovilización.

En todo momento de este ensayo nos basamos en los requerimientos de NOM-062-ZOO-1999 para el manejo y cuidado de animales experimentales. La biopelícula que se realizó

con el biopolímero de Alginato de sodio y *P. laevigata* reúne características que la definen como un apósito ideal para la curación y cicatrización de heridas. Permite proteger e incluso de acuerdo a los resultados obtenidos en modelo murino, optimiza el proceso de cicatrización al disminuir los signos de infección, brinda un ambiente óptimo necesario para preservar los principios fisiológicos básicos de humedad, oxigenación y circulación sanguínea. Las características físicas de la biopelícula también cumplen con los criterios para la elección de un apósito, ya que es adaptable, flexible, de fácil manipulación, es libre de contaminantes ya que se elaboró en condiciones de esterilidad, y al ser retirado no permite trauma o dolor. Se obtuvieron resultados favorables de cicatrización, cierre de herida en los ratones y pese a que se infectaron las heridas, no presentaron signos físicos de infección.

Los ratones cicatrizaron en mayor tiempo comparado con el tratamiento que no fue infectado (control), pero en menor tiempo que el tratamiento de la biopelícula con antibiótico. Incluso, los ratones del tratamiento con antibiótico a los 6 días del ensayo, se potenciaron los signos de infección local, por ética de experimentación animal se decidió tratarlos con las biopelículas de *P. laevigata*, y obtuvimos una notable mejoría al día 9. Es importante que, al trabajar con modelos experimentales de animales en investigación, se considere que un objetivo tan importante como el de obtener resultados, será el de minimizar cualquier dolor o angustia que dichos animales puedan sufrir y debe ser parte de un punto de vista humanitario al manifestarse actitudes de respeto, afecto y gratitud hacia el animal. Asimismo, debe ser prioritario el principio de las tres R de la experimentación humanizada para con los animales (Benavides et al. 2014), como el reducir al máximo el número de ellos, reemplazar siempre que sea posible el animal de experimentación por otro modelo experimental y refinar los métodos y las técnicas utilizadas de modo que produzcan al animal el menor sufrimiento posible. Al obtener resultados favorables en este ensayo, nos indican que el uso de estas biopelículas son una alternativa a una nueva línea de investigación con la creación de un apósito de Alginato de sodio que en combinación de extracto de *P. laevigata* da lugar a una opción terapéutica en el manejo de heridas.

9. CONCLUSIONES

- La biopelícula de Alginato de sodio funcionalizada con el extracto etanólico de *P. laevigata* presentó resultados favorables en la cicatrización de heridas en modelo murino.
- El extracto etanólico de *P. laevigata* in vitro mostró un porcentaje del 93.58% de actividad inhibitoria sobre el crecimiento de la Cepa 3.
- El extracto etanólico de *P. laevigata* posee los siguientes metabolitos secundarios: Flavonoides, alcaloides, esteroides y terpenos, cumarinas, lactonas, carbohidratos e insaturaciones.
- El extracto etanólico de *P. laevigata* no es hemolítico en eritrocitos humanos, y presenta moderada toxicidad sobre células eucariotas VERO a concentraciones de 403.3 µg/mL.
- La Cepa 3 y la Cepa 4 aisladas de UPD son resistentes al antibiótico Ceftriaxona a la concentración evaluada.

10. PERSPECTIVAS

De los resultados que se obtuvieron en la presente investigación se observó que de los 5 extractos evaluados, el extracto etanólico de *P. laevigata* presentó mayor actividad antibacteriana sobre la Cepa 3 aislada de úlcera de pie diabético, por los metabolitos secundarios presentes, lo convierte en un extracto de interés para inhibir otras bacterias e incluso otros microorganismos. Además, de los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*, hacen a las biopelículas de alginato de sodio con el extracto de *P. laevigata* una alternativa terapéutica para la cicatrización de heridas y úlceras diabéticas. Una de las perspectivas y visualizaciones de este estudio es en un futuro realizar trabajos encaminados a la obtención del compuesto activo específico de la actividad inhibitoria del extracto etanólico y buscar de diferentes ejemplares vegetales con actividad antibacteriana incluso mayor que el extracto evaluado, así mismo, poder evaluarlos sobre otros microorganismos de interés como bacterias con diferente morfología y patogenicidad diferente a las evaluadas, levaduras aisladas de úlceras de pie diabético, e incluso de otras infecciones. Por otra parte, otra perspectiva sería diseñar y evaluar diferentes biopelículas con otros polímeros incluso antibacterianos y realizar combinaciones entre ellos para lograr cicatrizar las heridas en menor tiempo al evaluado. El trabajar con modelo murino, realizar pruebas de hemólisis del extracto y citotoxicidad sobre células eucariotas y obtener resultados que superó las expectativas, nos permite continuar con los ensayos para posteriormente evaluarlos en humanos y continuar con el proceso de patente.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, M., Foroughbakhch, R., Jurado, E. Rocha, A. 2004. Caracterización morfológica y nutricional del fruto de anacahuita (*Cordia boissiei* A. DC.) en dos localidades del Noreste de México. *Int. J. Exp. Bot.* 85–90
- Arnero C, 2015. La vaina del mezquite “*Prosopis spp*” en la alimentación del ganado. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Laguna, División regional de Ciencia Animal.
- Arriaga, E., Uribe, R., Pedraza, G Mata, E. 2015. Métodos para la identificación de animales de laboratorio. Recuperado:http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/Metodos_recomendados_ComBioet19Ene2015final.pdf
- Allaica Tenesaca. 2015. Efecto cicatrizante de *Caesalpinia spinosa* y Fitoquímica. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/12544006>
- Ahmed Dildar, Ahmed Qasim Kamal, Chaudhary Ashraf. 2017. *Verbena officinalis* a herb with promising broad spectrum antimicrobial potential. Environment shapes medicinal plant use in Nepal. 20132768. Doi: 10.1098/rspb.2017.2768.
- Ash Sedef Can, Meryem Sedef Erdal, Sevgi Güngör, Yildiz Özsoy, 2013. “Optimization and Characterization of Chitosan Films for Transdermal Delivery of Ondansetron,” *Molecules* 18,5455-5471.
- Avello LM, Cisternas IF. 2010. Fitoterapia, sus orígenes, características y su situación en Chile, *Revista Medicinal de Chile* 138.

- Balbuena Padilla N. 2017. Resistencia en las Infecciones de pie diabético. Hospital Regional Dr. Antonio Musa, San Pedro de Macorís, República Dominicana. Enero 2015 – Enero 2017. UCE Ciencia. Revista de postgrado, [S.l.], v. 5, n. 1, feb. 2017. ISSN 2306-3556. Disponible en: <http://uceciencia.edu.do/index.php/OJS/article/view/94/87>.
- Bansal, E., Garg, A., Bhatia, S, Attri, A. K., and Chander, J. 2017. Spectrum of microbial flora in diabetic foot ulcers. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 204-208.
- Báez Salablanca, RF Francisco, Gonzalez M. 2017. Uso de ceftriaxona en pacientes con diagnóstico de pie diabético en la sala de aislamiento de adultos del hospital. Escuela Regional Asunción. Universidad Autónoma de Nicaragua Managua.
- Barberán J, Zaragoza R, García JE. 2009. Consensus document on treatment of infections in diabetic foot. *Rev Esp. Quimioter*; 24:233-262.
- Baumann, Man S, Huang Li, Zhang Y. 2015. Chemical study and medical application of saponins as anticancer agents. *Fitoterapia*. 81: 70314
- Benedi Juana, Romero Carmen. 2006. Apositos. *Farmacía Espacio de Salud*. Formación continuada. Ediciones Doyma. 20:52-56
- Benavides, F, Guénet, J. 2014. Manual de genética de roedores de laboratorio, principios básicos y aplicaciones. Recuperado de: <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/00- indice.pdf>
- Bergin SM, Wraight P. 2006. Silver based wound dressings and topical agents for treating diabetic foot ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Beura, L., Hamilton, S., Bi, K., Schenkel, J., Odumade, O., Casey, K., Thompson, E., Fraser, K., Rosato, P., Filali, A., Sekaly, R., Jenkins, M., Vezys, V., Haining, W., Jameson, S. & Masopust, D. 2016. Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory <https://www.nature.com/nature/journal/v532/n7600/pdf/nature17655.pdf>

- Bhalla, Y., Gupta, V. K y Jaitak V. (2015). Anticancer activity of essential oils: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 3643-3653. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6267>
- Carro GV, Saurral R, Witman EL, Braver JD, David R, Alterini PA, Illuminati G, Carrió LM, Torres JC. Ataque de pie diabético. Descripción fisiopatológica, presentación clínica, tratamiento y evolución [Diabetic foot attack. Pathophysiological description, clinical presentation, treatment and outcomes]. *Medicina (B Aires)*. 2020; 80(5):523-530. Spanish. PMID: 33048798.
- Casañola-Martín, Yovani Marrero-Ponce, Huong Le-Thi-Thu, Mahmud Tareq Hassan Khan, Francisco Torrens, Antonio Rescigno, y Concepción Abad. 2013. La enzima tirosinasa: Inhibidores de origen natural y sintético.
- Cervantes J, Carmona B. 2014. Eficacia del pirofosfato de tiamina o cocarboxilasa en el rescate
- Claros P, 2006. Determinación de la actividad Anti-*Helicobacter pylori* de *Plantago major* (Llantén), *Verbena officinalis* (Verbena), *Clinopodium bolivianum* (Khoa), *Caléndula officinalis* (Caléndula), *Piper angustifolium* (Matico) y *Rubus boliviensis* (Khari khari) por el método de difusión de disco. La Paz, Bolivia, IIFB-LNRBC.
- Cooper R. 2004. A review of the evidence for the use of topical antimicrobial agents in wound care. *World Wide Wounds*. February.
- Cordero CC. 2002. Implementación de un método in vitro de evaluación preliminar de actividad anticáncer de extractos vegetales empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis pregrado. Universidad Nacional de Colombia Química Farmacéutica.
- Córdova MRE. 2004. Clasificación y caracterización fisicoquímica de la goma de mezquite (chúcata) cruda y ultrafiltrada. Tesis. Universidad de Sonora. Hermosillo, Sonora, México. 110 pp.

- De Souza Cândido E, Soares Pinto MF, Barbosa Pelegrini P, Bergamin Lima T, Nascimento Silva O, Pogue R, Grossi-de-Sá MF, Franco OL. 2011. Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *The FASEB Journal*
- Demiray S, Pintado ME, Castro PML. 2009. Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *World Academy of Science, Engineering and Technology*.
- Dhananjaya SP, Dahms HU, Malliga P. 2014. Pharmacological potentials of phenolic compounds from *Prosopis* spp -a Review. *Journal of Coastal Life Medicine* 918-924.
- Díaz S, Morales L, Carballo F. 2017. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas diversas. Volumen 40, Ministerios de Educación Superior, Central de España Republicana.
- Domínguez X. 1973. Alcaloides: Métodos de Investigación Fitoquímica. Limosa Nuevo León México SA. 211-242.
- Dos Santos EJ, de Albuquerque Pereira Souza AC, Ramos Pereira CA. 2015. Mesquite pod meal in sheep diet: intake, apparent digestibility of nutrients and nitrogen balance. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 55-59.
- Drucker CR. 2012. Update on topical antibiotics in dermatology. *Dermatologic Therapy*
- Duyker Edward. 2003. *Citizen Labillardière: A Naturalist's Life in Revolution and Exploration 1755-1834* Melbourne: Melbourne University Press.
- Falconi, E., García, L., Marín, O., Padrón, R., Rivas, M., Vargas, G. 2010. Manual para el manejo de animales con fines de experimentación y enseñanza. Recuperado de: http://www.archivos.ujat.mx/dacbiol/docencia/lineamientos/manejo_animales.pdf

- Fontana, Pérez, Luna. 2018. Características evolutivas en *Prosopis* spp, citogenética, genética e hibridaciones. Facultad de Recursos Naturales, DOI: 10.1590/2175-7860201869212.
- Frykber RG y Banks J. 2016. Management of Diabetic Foot Ulcers: A Review, Federal Practitioner.
- Frykberg, R. G. 2003. An evidence-based approach to diabetic foot infections. The American Journal of Surgery.
- Gallegos G. 2012. Caracterización de las personas con pie diabético, Facultad de Enfermería, Tesis de Posgrado, UANL.
- Game FL, Apelqvist J, Attinger C, Hartemann A, Hinchliffe RJ, Löndahl M, et al. International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF). 2016. Effectiveness of interventions to enhance healing of chronic ulcers of the foot in diabetes: a systematic review. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*
- García Gasca, Andrade MH. 2007. Efecto del tostado de la vaina de mezquite sobre el contenido de proteínas y factores antinutrición. Lic en medicina veterinaria y zootecnia, Facultad de Ciencias Naturales UAQ.
- Gardea, D., López, K.S., Alonso, B.A., Alonso, M.T.J. & Alonso C.M.M. 2015. Violencia escolar y consumo de alcohol en adolescentes en etapa de secundaria, en Monterrey, México, *Revista de Enfermería Herediana*.
- Garzón, G. 2008. Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biol. Colomb.*, Vol. 13 No. 3: 27–36
- Gauthier C, Legault J, Pichette A. 2009. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane-and oleanane-type saponins. *Bioorg. Med. Chem.*

- Gironi, F., Piemonte, V. 2011. Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design* 89, 857-862. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2010.11.003>
- Gómez J, Vázquez G, Hernández Torres A. 2015. Los betalactámicos en la práctica clínica. Servicio de medicina interna, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia
- González E, Mamani M, Mamani B, 2014. Evaluación de la actividad anti-*helicobacter pylori* del aceite esencial de *Clinopodium bolivianum* por el método de impregnación en disco. Facultad de ciencias farmacéuticas y bioquímicas. La Paz, Bolivia.
- González, Stuart A, Rivera JO. 2019. Comparison of herbal products use in two largest border communitites between the US and Mexico. HerbalGram.
- Gorosito, Ibáñez S, Meléndez SL. 2020. Congreso de cicatrización de heridas. BA Argentina. Órgano Oficial de la Asociación Interdisciplinaria.
- Gutiérrez J.M, C. Avila, R. Rojas. 1988. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polylivalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon*. 26, 411-413.
- Hernández J, Camacho A. Ordaz, D´Armas H, Yáñez D, 2014. Metabolitos secundarios, letalidad y actividad antimicrobiana de los extractos de tres corales y tres moluscos marinos de Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*. 58(2): 677-688. ISSN-0034-7744.
- Hian Goh, P. Sia Heng, L. Chan. 2011. “Cross-linker and non-gelling Na effects on multifunctional alginate dressings,” *Carbpol*.
- Huisamen B, George C, Genade S, Dietrich D. 2013. Cardioprotective and anti-hypertensive effects of *Prosopis glandulosa* in rat models of pre-diabetes. *Cardiovascular Journal of Africa* 24:10-16

- Jeffcoate WJ, Price PE, Phillips CJ, Game FL, Mudge E, Davies S, et al. Ensayo controlado aleatorio del uso de tres preparaciones de apósitos en el tratamiento de la ulceración crónica del pie en la diabetes. *Evaluación de tecnologías sanitarias* 2009; 13 (54): 1-110.
- Johnson, L. cols. 2006. Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the southwestern United States. *Phytother. Res.* 20, 250–255 (2006).
- Joseph, W. S. and Lipsky, B. A. 2010. Medical therapy of diabetic foot infections. *Journal of the American Podiatric Medical Association*. Too.
- Jude EB, Apelqvist J, Spraul M, Martini J. 2007. Silver Dressing Study Group. Estudio prospectivo aleatorizado y controlado de apósitos de hidrofibra que contienen apósitos de plata iónica o alginato de calcio en úlceras no isquémicas del pie diabético. *Diabetic Medicine*.
- Jull AB, Cullum N, Dumville JC, Westby MJ, Deshpande S, Walker N. 2015. Honey as a topical treatment for wounds. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Kamoun, E. Kenawy, T. Tamer, M. El-Meligy, M. Mohy Eldin. 2013. “Poly (vinyl alcohol)-alginate physically crosslinked hydrogel membranes for wound dressing applications: Characterization and bio-evaluation,” 12.003.
- Kay M, Damanni MM, Glynn A. 2009. *Prácticas de Seguridad Estándar en el Laboratorio de Microbiología*. CDC OMS. Programa de Educación Médica Continua. Vol. 15.
- Kenichi Isoda, Tsuyoshi Seki, Yosuke Inoue, Koji Umeda, Takahiro Nishizaka, Hisateru Tanabe, Yutaka Takagi, Koichi Ishida and Hitoshi Mizutani. (2015). Efficacy of the combined use of a facial cleanser and moisturizers for the care of mild acne patients with sensitive skin. *The Journal of Dermatology* Volume 42, pages 181–188.

- Kluytmans JA, Overdeest IT, Willemsen I, Kluytmans-van den Bergh MF, van der Zwaluw K, Heck M. 2013. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: Comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clin Infect Dis*. 56:478–87.
- Leceta, P. Guerrero, K. de la Caba. 2013. “Functional properties of chitosan- based films,” *Carbohydrate Polymers* 339-346.
- Lipsky BA, Armstrong DG, Citron DM, Tice AD, Morgenstern DE, Abramson MA. 2015. Ertapenem versus piperacillin/tazobactam for diabetic foot infections (SIDESTEP): prospective, randomised, controlled, double-blinded, multicentre trial.
- Lipsky BA, Berendt AR. 2004. Diagnosis and treatment of diabetic foot infections. *Clin Infect Dis* 39: 885-910
- Lipsky BA, Holroyd KJ, Zasloff M. 2008. Topical versus systemic antimicrobial therapy for treating mildly infected diabetic foot ulcers: a randomized, controlled, double-blinded, multicenter trial of pexiganan cream. *Clin Infect Dis*; 47:1537-45.
- Lipsky BA, Itani K, Norden C. 2014. Linezolid Diabetic Foot Infections Study Group. Treating foot infections in diabetic patients: a randomized, multicenter, open-label trial of linezolid versus ampicillin-sulbactam/amoxicillin-clavulanate.
- Liu PC, Yan YK, Ma YJ. 2017. Los probióticos reducen las infecciones postoperatorias en pacientes sometidos a cirugía colorrectal: una revisión sistemática y un metanálisis. *Gastroenterología Investigación y práctica*.
- Lock, O. 2016. *Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales*. 2ª. Ed. Fondo editorial, PUCP, Lima, Perú.
- Long, X. Ran, L. Zhang, Q. Guo, T. Yang, J. Gao, H. Cheng, T. Cheng, C. Shi, Y. Su, Y. 2013. “A method for the preparation of silver nanoparticles using commercially available carboxymethyl chitosan and sunlight,” *Materials Letters*.

- Marcano, D., M. Hasegawa. Lock, 2012. Fitoquímica Orgánica. 2da. Edición. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- Martínez, Ramírez Almagro C, Campilo Soto A, Morales Cuenca. 2020. Infecciones del pie diabético, prevalencia de los distintos microorganismos y sensibilidad a antimicrobianos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
- Matías, E. Fraham M, Liu. 2015. The genus *Cordia*: Botanists, ethno, chemical and pharmacological aspects. *Brazilian J. Pharmacogn.* 25, 542–552.
- Melzig M, Hebestreit P, Gaidi G. 2009. Structure activity relationship of saponins to enhance toxic effects of agrostin. *Rev Planta Med.*;71(11):1088-90.
- Medina, M.G., D.E. García, P. Morantinos y L.J. Cova. 2009. La morera (*Morus spp.*) como recurso forrajero: Avances y consideraciones de investigación. *Zoot. Trop.* 27(4): 343-362.
- Mena Valdés, I Dra. Beatriz Tamargo Santos, I MSc. Eva Salas Olivet, I Dr. Luis Enrique Plaza Paredes, II Lic. Yisel Blanco Hernández III. Anselmo Otero González IV Dr. Gustavo Sierra 2015. Determination of saponins and others secondary metabolites in aqueous extracts of *Sapindus Saponariam* (jaboncillo) Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana. La Habana, Cuba. II Universidad de Ciencias Médicas. Guayaquil, Ecuador.
- Mendoza Escobedo MA, 2017. Aislamiento de compuestos a partir de *Cordia boissieri* con actividad, Ciencias de la Salud. UNAM.
- Miller, A. and Henry, M. 2009. Update in diagnosis and treatment of diabetes foot infections.
- Modak, Arrieta F, Urzúa B. 2002. Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*: efecto del tipo de estructura. Facultad de Química y Biología, Departamento de Ciencias Químicas, Santiago Chile.

- Momoh, J.S. Boateng, S.C.W. Richardson, B. Z. Chowdhry, J.C. Mitchell. 2015. "Development and functional characterization of alginate dressing as potential protein delivery system for wound healing," *International Journal of Biological Macromolecules*
- Montiel. 2017. Direct costs in the management of diabetic foot, *Revista Chilena de Cirugía* Pages 118-123.
- Naranjo, Paz; Patricia S.; Gómez S, Sandra G. 2009. Evaluación fitoquímica de extractos naturales de *Eucalyptus citriodora* y *Pinus caribaea* con actividad biocida. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, vol. 8, núm. 5, 445-448
- Neely AN, Gardner J, Durkee P, Warden GD, Greenhalgh DG, Gallagher JJ. 2009. Are topical antimicrobials effective against bacteria that are highly resistant to systemic antibiotics. *Journal of Burn Care and Research*.
- Newman DJ, Cragg GM 2020. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades *J Nat Prod.* 2020 Mar 27;83(3):770-803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285. Epub 2020 Mar 12. PMID: 32162523.
- NOM-062-ZOO- Norma Oficial Mexicana. 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Recuperado de: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- NOM-087- Norma Oficial Mexicana - SEMARNAT. 1997. Requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos. Disponible: <http://siga.jalisco.gob.mx/assets/documentos/normatividad/nom087semarnat1997>
- O'Meara S, Al-Kurdi D, Ologun Y, Ovington LG, Martyn-St James M, Richardson R. 2014. Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

- Ochoa ME, Gonzalez G, Ascencio L, Vasquez C. 2018. Tipos de bacterias en cultivos de secreción de pie diabético en pacientes de Manzanillo, Colima, México, Facultad de Medicina, Universidad de Colima, Colima, México.
- OMS Organización Mundial de la Salud. 2016. Diabetes. Día Mundial de la Salud. Ginebra Disponible en <http://www.who.int/diabetes/es>
- Owis, A. I. 2014. Composition of essential oil from flowers of *Cordia boissieri* and revision of the use of sesquiterpenes as taxonomic markers for the genus *Cordia*. World J. Pharm.Pharm. Sci. 3, 133–141
- Pandey A. 2007. Anti-staphylococcal activity of a pan-tropical aggressive and obnoxious weed *Parihenium histerophorus*: *in vitro* study. National Academy Science Letters.
- Pava Rodriguez, Zarate Sanabria, Sánchez Leal. 2017. Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. Volumen 15. Doi: <https://doi.org/10.22490/24629448.1963>
- Pereira, P. Bártolo. 2013. “Degradation behavior of biopolymer-based membranes for skin tissue regeneration,” Procedia Engineering 285 -291.
- Pérez García, Rio Arellano, Norma M. De la Fuente-Salcido. 2019. Extracción preliminar y determinación de la actividad biológica de péptidos de semilla de *Prosopis laevigata* (mezquite) Universidad Autónoma de Coahuila, Facultad Ciencias Biológicas. Bioprospección y Bioprocesos.
- Peters EJ, Lipsky BA, Aragón-Sánchez J, Boyko EJ, Diggle M, Embil JM. 2016. International Working Group on the Diabetic Foot (IWGDF). Interventions in the management of infection in the foot in diabetes: a systematic review. Diabetes/Metabolism Research and Reviews.
- Quattrocchi, Umberto 2000. CRC World Dictionary of Plant Names: A-C. CRC Press. pp. 612-613.

- Ramakrishna, A., Aswathanarayana, G. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plants Signaling & Behavior*, 6:11, 1720-1731.
- Reynoso Trujeque, Hernández, Nieves. 2020. Prevalencia y características clínicas del pie diabético en fase pre-ulcerosa en pacientes con diabetes mellitus. *Revista Ocronos*. Vol. 3.
- Ríos S., J. C., E. Soto C. y R. Rosales S. 2007. Evaluación de métodos de extracción de semilla para la conservación del mezquite en Durango, México. In: VI Simposio Internacional Sobre Manejo Sostenible de Recursos Forestales. (SIMFOR). Pinar del Río, Cuba. 8 p.
- Rodríguez CJM, Gómez C. 2014. Plantas mexicanas al mundo. In: *Plantas que curan. Guía México*. Roig JT. 1998. *Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba*. La Habana: Editorial Científico-Técnica.
- Ruiz M, Miranda S, González J, Ochoa F. 2017. Microorganismos bacteriológicos más frecuentes y resistencia en las infecciones de pie diabético en el Hospital Regional Dr. Valentín Gómez Farias, del ISSSTE, México.
- Sánchez L, García Lopez, Durán García, Salinas Rodriguez. 2016. Yield and nutrient content of pods from three variants of mesquite *Prosopis laevigata* en el Altiplano Potosino, México.
- Secretaria de salud. Programa de acciones específicas de Diabetes Mellitus. 2007-2012. México DF: Secretaria de Salud; 2008 Disponible en: <http://www.cenave.gob.mx/propagación/diabetes.pdf>
- Selva Olid A, Solà I, Barajas-Nava LA, Gianneo OD, Bonfill Cosp X, Lipsky BA. 2015. Systemic antibiotics for treating diabetic foot infections. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

- Sereday Bragnolo JC, Martí ML, Tesone C, Tesone PA. 2009. Pacientes amputados de miembros inferiores. Estudios en 4 hospitales de la ciudad de Buenos Aires. Revista Sociedad Argentina
- Sharma D, Singla YP. 2013. Evaluation of antihyperglycemic and antihyperlipidemic activity.
- Sharmilla, Ortega. 2013. Extracto acuoso de Verbena (*Verbena officinalis L.*) en la cicatrización de heridas cutáneas inducidas en cuyes. Tesis (Ing. Zootecnista) Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María.
- Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Research and Clinical Practice, Volumen 87, Issue 1. Pag 4-14.
- Soto F. 2011. Caracterización química, fitoquímica y antibacteriana *in vitro* de las hojas del *Anacardium occidentale L.* Tesis Máster en Química-Biológica; Bayamo, Granma, Cuba.
- Takahashi T, R. Kokubo and M. Sakaino. 2004. Antimicrobial activities of eucalyptus leaf extracts and flavonoids from *Eucalyptus maculata*. Letters in Applied Microbiology Volume 39, pages 60–64.
- Tascini, C., Piaggese, A., Tagliaferri, E., Iacopi, E., Fondelli, S., Tedeschi, A., Rizzo, L, and Menichetti, F. 2011. Microbiology at first visit of moderate to severe diabetic foot infection with antimicrobial activity and a survey of quinolone monotherapy. Diabetes research and clinical practice.
- Tirado, López, Tirado. 2014. Guía práctica clínica del pie diabético. I Med Plus Journals. Vol:10, DOI: 10.3823

Toledo A, MD, Lijuzu Vega, BSc, Keren Vega, BSc, Nathacha Ramos, BSc, Carluis Zerpa, BSc, Daniel Aparicio, BSc, Valmore Bermúdez, MD, MPH, PhD, Manuel Velasco. 2009. Centro de Investigaciones Endocrino Metabólicas “Dr. Félix Gómez”, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo 1 Clinical Pharmacology Unit.

Valencia G, Estrada M, Requena V, Rodríguez G, 2016. Apósitos de polímeros naturales para regeneración de la piel. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez México, Instituto de Ciencias Biomédicas.

Vargas A.C. 2004. Actividad antimicrobiana "*in vitro*" de extracto alcohólico de *Prosopis*. Ciencia Rural, 34(1), p. 159-163.

Verica Aleksic, Petar Knezevic. 2019. Antimicrobial activity of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn, Plant extracts and essential oils: A review. DOI: 10.1016/j.indcrop.2019.02.051

Vermeulen H, Hattem JM, Storm-Versloot MN, Ubbink DT. 2017. Topical silver for treating infected wounds. Cochrane Database of Systematic Reviews.

WHO. 1991. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. WHO. Munich:

Xavier, L.; Freire, M.S.; Vidal-Tato, I.; González-Álvarez, J. 2015. Application of aqueous two phase systems based on polyethylene glycol and sodium citrate for the recovery of phenolic compounds from Eucalyptus wood. Maderas. Ciencia y Tecnología 17(2):345-354.

Yang Y, Gong T, Liu C, Chen RY. 2010. Four new 2-arylbenzofuran derivatives from leaves of *Morus alba* L. Chem Pharm Bull.

Páginas electronicas:

<https://www.aafp.org/afp/2002/1101/p1655.html>

https://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/

ANEXO 1

7.1 Análisis Estadístico

El análisis estadístico consistió en dos pasos,

PASOS	PARÁMETRO	PRUEBA	CONSIDERACIONES
Primero	Normalidad	Kolmogorov-Smirnov.	determinación de la distribución de los datos obtenidos para cada variable estudiada
Segundo	para los pasos con una distribución normal predominante	prueba ANOVA de una vía	para evaluar el nivel de significancia de la diferencia entre la media de los grupos de los que consta el experimento (control y tratamientos) con comparación múltiple de medias
	En los casos en que se encontró diferencia entre los grupos	prueba de Tukey	para evaluar el nivel de significancia de la diferencia de la media entre los tratamientos y del grupo control contra cada uno de los tratamientos

NORMALIDAD

1. Hipótesis de normalidad

H₀: Los datos siguen una distribución normal

H₁: Los datos no siguen una distribución normal

2. Nivel de significancia

NC: 0.95

α : 0.05

3. Prueba de normalidad

Si $n > 50$ se aplica Kolmogorov-Smirnov

Si $n \leq 50$ se aplica Shapiro-Wilk

4. Estadístico de prueba

Si P-value < 0.05 se rechaza *H₀*

Si P-value ≥ 0.05 se acepta la *H₀* y se rechaza la *H₁*

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
UFC - Control	.107	54	.183	.977	54	.375
UFC - EE PI	.112	54	.086	.968	54	.165

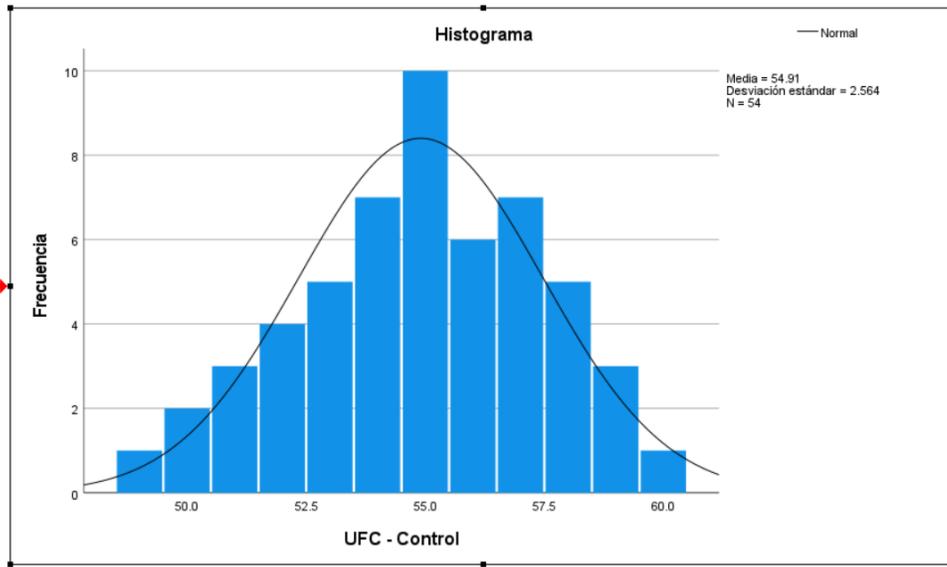
a. Corrección de significación de Lilliefors

=Se rechaza la H₀, por lo tanto los datos siguen una distribución normal.

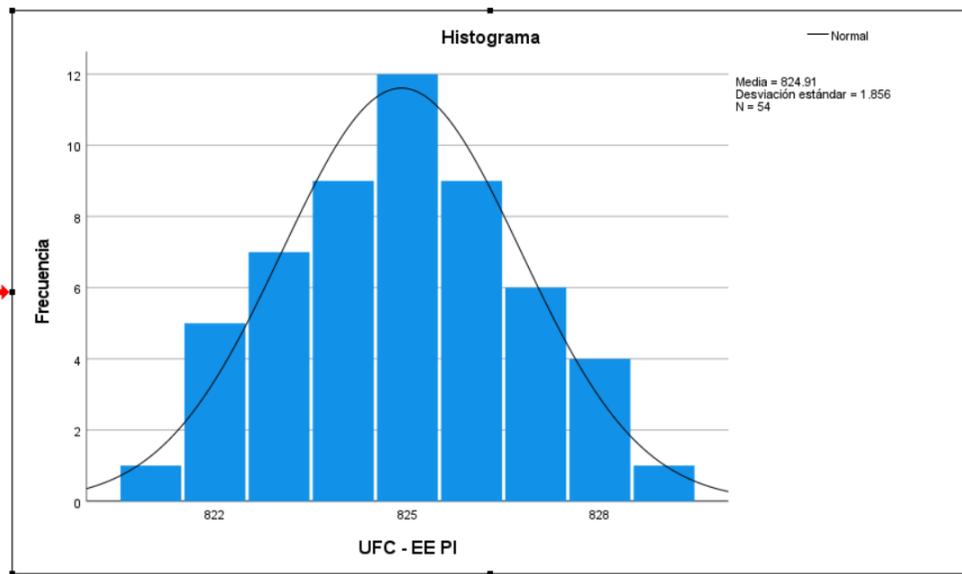
Resumen de procesamiento de casos						
	Casos					
	Válido		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
UFC - Control	54	100.0%	0	0.0%	54	100.0%
UFC - EE PI	54	100.0%	0	0.0%	54	100.0%

Descriptivos				
			Estadístico	Error estándar
UFC - Control	Media		54.91	.349
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	54.21	
		Límite superior	55.61	
	Media recortada al 5%		54.95	
	Mediana		55.00	
	Varianza		6.576	
	Desv. estándar		2.564	
	Mínimo		49	
	Máximo		60	
	Rango		11	
	Rango intercuartil		4	
	Asimetría		-.235	.325
	Curtosis		-.467	.639
UFC - EE PI	Media		824.91	.253
	95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	824.40	
		Límite superior	825.41	
	Media recortada al 5%		824.90	
	Mediana		825.00	
	Varianza		3.444	
	Desv. estándar		1.856	
	Mínimo		821	
	Máximo		829	
	Rango		8	
	Rango intercuartil		2	
	Asimetría		.048	.325
	Curtosis		-.571	.639

UFC - Control



UFC - EE PI



Coefficiente de correlación

V1: Crecimiento de Cepa 3 bajo condiciones normales

V2: Crecimiento de Cepa 3 en presencia del EE-PI

1. Hipótesis de correlación

Ho: No existe correlación entre las variables V1 y V2

H1: Existe correlación entre las variables V1 y V2

2. Nivel de significancia

NC: 0.95

A : 0.05 (margen de error)

3. Prueba de correlación

Paramétrica: Coeficiente de Pearson

No paramétrica: Coeficiente de Spearman

4. Estadístico de prueba

Sí P-value <0.05 se rechaza *Ho*

Sí P-value >0.05 se acepta la *Ho* y se rechaza la *H1*

Correlaciones			
		UFC - Control	UFC - EE PI
UFC - Control	Correlación de Pearson	1	-.002
	Sig. (bilateral)		.989
	N	54	54
UFC - EE PI	Correlación de Pearson	-.002	1
	Sig. (bilateral)	.989	
	N	54	54

=Se acepta la *Ho*, por lo tanto no existe correlación entre las variables V1 y V2.



ANOVA

Selección de datos

Se seleccionó la Cepa 3 y el EE-PI para realizar el análisis estadístico (Tabla 12)

Se evalúan y comparan las medias de UFC/mL de la cepa 3 en cultivo normal (control) y en presencia del EE-PI (tratamiento).

Tabla 12. Determinación de UFC/mL (1×10^{-7}) cultivadas en presencia de extractos etanólicos de las especies vegetales utilizadas en el proyecto.

Tratamientos ↓	Cepas →	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4
Control		468	1186	824	856
Ceftriaxona [0.15 µg/mL]		92	253	I	I
EE-EC [1 mg/mL]		1	506	1148	772
EE- MO [1 mg/mL]		155	796	515	877
EE- PL [1 mg/mL]		326	801	55	190
EE- CB [1 mg/mL]		1	406	745	886
EE-VO [1 mg/mL]		212	393	833	640

PL: *Prosopis laevigata*; EC: *Eucalyptus camaldulensis*; M: *Morus sp*; CB: *Cordia boissieri*; VO: *Verbena officinalis*. I: Incontables

Se planteó lo siguiente:

H0: Las medias del rendimiento de UFC/mL de la cepa 3 control y cultivada en presencia del EE-PI son iguales con 95% de confiabilidad

H1: Las medias del rendimiento de UFC/mL de la cepa 3 control y cultivada en presencia del EE-PI son diferentes con 95% de confiabilidad

Del análisis de ANOVA:

Sí $p < 0.05$, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna (H1)

Sí $P > 0.05$, se acepta la hipótesis nula (Ho)

$F_{tab} > F_{cal}$ -----Se acepta Ho

$F_{cal} > F_{tab}$ -----Se acepta H1

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
UFC-Control	4	3296	824	394.666667		
UFC-EEPI	4	220	55	4.66666667		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1182722	1	1182722	5923.48247	3.2391E-10	5.987377607
Dentro de los grupos	1198	6	199.6666667			
Total	1183920	7				

CONCLUSIÓN: Debido a que 3.23×10^{-10} es menor que 0.05, por lo tanto se acepta la Hipótesis alterna (H1 Las medias del rendimiento de UFC/mL de la cepa 3 control y cultivada en presencia del EE-PI son diferentes con 95% de confiabilidad)

Y como F calculada (5923) es mayor que F crítica (5.98) por lo tanto se acepta la H1.

Tabla Tuckey	
HSD=	24.44549788
Multiplicador=	3.46
Mse=	199.6666667
n=	4

	A	B
A		769
B	-769	

CONCLUSIÓN FINAL:

Sí existe diferencia estadística significativa entre las UFC-control de la Cepa 3 y las UFC de la cepa 3 cultivadas en el EEP-1.