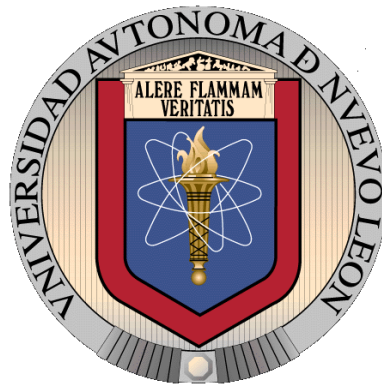


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN DE EXTRACTOS METANÓLICOS LIBRES Y
NANOENCAPSULADOS DE *SMILAX SPP.*, *CHIRANTHODENDRON*
PENTADACTYLON, Y *PEUMUS BOLDUS* CONTRA BACTERIAS DE INTERÉS
DERMATOLÓGICO

POR

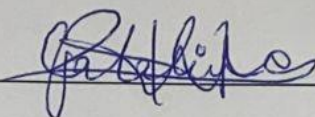
LBG. ANGELA JAQUELIN ESPINOZA MIJANGOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
MANEJO Y APROVECHAMIENTO INTEGRAL DE RECURSOS BIÓTICOS

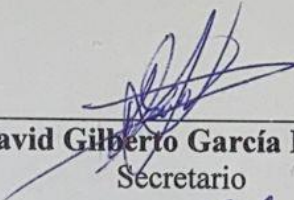
2023

“Evaluación de extractos metanolicos libres y nanoencapsulados de *Smilax spp.*,
Chiranthodendron pentadactylon, y *Peumus boldus* contra bacterias de interés
dermatológico”

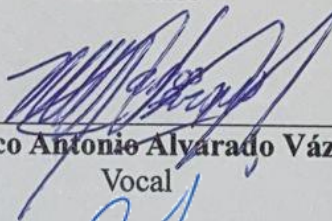
Comité de Tesis



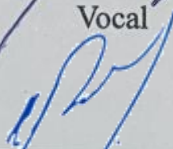
Dra. Catalina Leos Rivas
Presidente



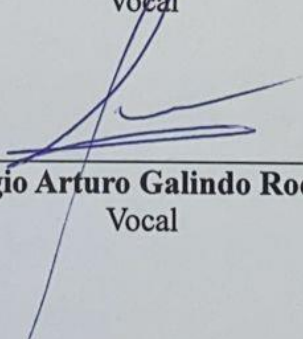
Dr. David Gilberto García Hernández
Secretario



Dr. Marco Antonio Alvarado Vázquez
Vocal



Dra. Catalina Rivas Morales
Vocal

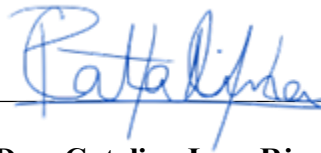


Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez
Vocal

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Subdirector de Posgrado

Evaluación de extractos metanólicos libres y nanoencapsulados *de Smilax spp.*,
Chiranthodendron pentadactylon, y *Peumus boldus* contra bacterias de interés
dermatológico”

Dirección de Tesis



Dra. Catalina Leos Rivas
Director Interno



Dra. Rocío Álvarez Román
Directora Externa

DEDICATORIAS

Quiero agradecer...

A Dios que me da la capacidad de maravillarme y preguntarme el porqué de las cosas que me rodean, así como colocarme en el lugar donde debía estar en el momento adecuado, algunos lo llaman suerte, yo creo que es el destino.

A mis padres Arnulfo y Magda quienes siempre están detrás de mí dándome fuerza y aliento para seguir adelante, por escucharme hablar de mi investigación de forma tan atenta, por recordarme mis motivaciones en la investigación cuando no sabía qué hacer. Por enseñarme que las cosas deben de hacerse bien desde un inicio. Por motivarme a no depender del conocimiento que ya tengo y seguí buscando nuevas incógnitas que solucionar. Agradezco esas noches en las que no me dejaron sola y cuidaron de mí con todo su amor. Agradezco cada uno de sus actos de amor disfrazados de preocupación y de bromas.

A mis hermanas Cam y Sam por permitirme mostrarles mi mundo dentro del laboratorio, asombrándose y enorgulleciéndose de todo lo que su hermana hacía por permitirme olvidarme de mis preocupaciones cuando estaba a su lado. Pero más que nada por el inmenso amor que profesan día a día.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada
número 809130

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el proyecto A PAICYT No 323-CN-
2022 por el apoyo económico que contribuyo en la realización de este trabajo

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Leos por ser tan buena y noble guía, por permitirme desarrollar el proyecto que realmente era de mi interés, por todo su apoyo y gran comprensión.

A la Doctora Rivas por su dirección como mi tutora en cada una de las correcciones de mis trabajos, así como su apoyo en la vida.

Al Doctor Galindo por su apoyo como mi tutor y comprensión al entrar en el mundo de la nanotecnología, que sin su guía no habría sido tan sencillo.

Al Doctor David por su gran paciencia y vocación por enseñar, así como su guía y cuidado en el desarrollo de este trabajo.

Por las amistades formadas a lo largo de estos dos años, principalmente por poner a Carlos en mi camino que durante estos 2 años un gran amigo, con el que avance en las clases, el que me acompañó a congresos y me escucho cuando los resultados no eran los esperados, sin él la maestría habría sido un tiempo muy solitario. Muchas gracias por ser mi amigo y tenerme infinita paciencia.

También agradezco a presencia de Diego en mi vida, quien me dio palabras de apoyo y siempre confió en todo lo que podría llegar a lograr.

También quisiera agradecer a Llaca y Daniel, por sus horas extra apoyando en los experimentos, que sin ellos probablemente habría tardado mucho más.

A Fernanda por permitirme enseñarle lo necesario para poder seguir desarrollándose prácticamente.

A Sebastián y André por todo su apoyo y alegría en el laboratorio.

También quiero agradecer mucho a Nancy y Anahí por su paciencia y motivación cuando tenía que hacer lotes, gracias por hacerlo todo más ameno.

Por último, quisiera agradecer a Jordan por toda su paciencia, por creer en mí, siempre tratar de apoyarme y hacer que crea en todo lo que soy capaz de hacer. Por escuchar todas mis quejas y frustraciones cuando los experimentos no iban como debían.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1 Plantas medicinales	2
2.1.1 · <i>Smilax spp. L</i>	3
2.1.2 · <i>Chiranthodendron pentadactylon</i>	4
2.1.3 · <i>Peumus boldus</i>	5
2.2 Factores que predisponen a las infecciones bacterianas	6
2.3 Bacterias de interés nosocomial	7
2.3.1 · <i>Enterococcus faecalis</i>	7
2.3.2 <i>Pseudomona aeruginosa</i>	8
2.3.3 <i>Acinetobacter baumannii</i>	9
2.3.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
2.3.5 <i>Escherichia coli</i>	11
2.4 Nanoencapsulación	11
3. Justificación	13
4. Hipótesis	14
5. Objetivo General	15
6. Objetivos Específicos	15
7. Metodología	16
7.1 Material biológico	16
7.2 Material vegetal	16
7.3 Activación de las cepas	17
7.4 Escalamiento McFarland	17
7.5 Antibiograma	18
7.6 Obtención de los extractos metanólicos	18
7.7 Preparación de los extractos	18
7.8 Difusión en placa por disco	19
7.9 Concentración mínima inhibitoria	19
7.10 Pruebas cualitativas para la determinación parcial de grupos funcionales	19
7.10.1 Alcaloides	19
7.10.1.1 Prueba de Dragendorff.	19
7.10.2 Flavonoide	20
7.10.2.1 Prueba del H ₂ SO ₄ .	20
7.10.2.2 Prueba de Shinoda.	20
7.10.3 Sesquiterpenlactonas.	20
7.10.3.1 Prueba de Baljet.	20
7.10.4 Carbohidratos.	20
7.10.4.1 Prueba de Molish.	20
7.10.5 Cumarinas	20
7.10.5.1 Prueba de las cumarinas	20
7.10.6 Esteroles y triterpenos.	21

7.10.6.1 Prueba de Liebermann-Buchard	21
7.10.7 Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales)	21
7.10.7.1 Prueba del FeCl ₃ .	21
7.11 Prueba de hemolíticas	21
7.12 Nanoencapsulación	22
7.13 Tamaño, índice de polidispersidad (IP) y potencial zeta	22
8. Resultados	23
9. Discusión	30
10. Conclusiones	33
11. Bibliografía	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Cepas bacterianas	16
2	Plantas de estudio	17
3	Perfil de resistencia de cepas bacterianas	23
4	Tamizaje fitoquímico	24
5	Diámetros de halos de inhibición	24
6	Concentración mínima inhibitoria	25
7	Porcentajes de hemólisis	26
8	Tamaño de nanopartículas	27
9	Tamizaje fitoquímico de las nanopartículas	27
10	Inhibición de las nanopartículas (mm)	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	<i>Smilax domingensis</i>	4
2	Flor de <i>C. pentadactylon</i>	5
3	Hojas, flores y fruto de <i>Peumus boldus</i>	6
4	Halos de inhibición de y de sobre <i>E. faecalis</i> 29212	25
5	Halos de inhibición del blanco sobre <i>P. aeruginosa</i> 27853	28
6	Halos de inhibición <i>C. pentadactylon</i> (FM) sobre <i>P. aeruginosa</i> 27853	28
7	Halos de inhibición <i>Smilax spp.</i> (CC) sobre <i>P. aeruginosa</i> 27853	29

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

NP: Nanopartícula

NP-E: Nanopartícula con extracto

Np-BCO: Nanopartícula blanco

PI: Índice de polidispersidad

pH: Potencial de hidrogeno

PBS: Buffer de fosfato salino

Porcentaje peso / peso: p/p

°C: Grados centígrados

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad bactericida sobre microorganismos farmacorresistentes de interés dérmico de los extractos metanólicos y nanoencapsulados de *Smilax spp.*, *Chiranthodendron pentadactylon*, y *Peumus boldus*. La obtención de nanopartículas cargadas con extractos vegetales permite favorecer la protección, la biodisponibilidad y la dosificación de los compuestos que se encuentran dispersos en la matriz polimérica. Además, se estableció su actividad bactericida en especies de interés dermatológico como lo son *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. Como hipótesis se planteó que los extractos metanólicos de *Smilax spp.*, *Chiranthodendron pentadactylon*, y *Peumus boldus* libres y nanoencapsulados presentaran actividad bactericida. En este trabajo se realizó la evaluación de la actividad bactericida del extracto metanólico libre de *C. pentadactylon* y *Smilax spp.*, y los halos de inhibición fueron de $6\pm 1\text{mm}$ y $6.7\pm 0.416\text{ mm}$ respectivamente contra *E. faecalis* 29212. De igual forma se evaluó la actividad bactericida de los extractos nanoencapsulados de *Smilax spp* y *C. pentadactylon* contra *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *E. coli*.

ABSTRACT

The objective of this work has been to evaluate the bactericidal activity on drug-resistant microorganisms of dermatological interest of methanolic and nanoencapsulated extracts of *Smilax spp.*, *Chiranthodendron pentadactylon*, and *Peumus boldus*. The synthesis of nanoparticles loaded with plant extracts is a methodology that allows the protection, bioavailability, and dosing of compounds that are dispersed throughout the polymeric matrix, which allows for experimental manipulation to obtain different concentrations to establish their bactericidal activity in dermatological species of interest such as *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, and *E. coli*. The hypothesis was that both methanolic extracts and synthesized nanocapsules would present bactericidal activity. This work presents the evaluation of the bactericidal activities presented by the methanolic extract of *C. pentadactylon* and *Smilax spp.*, presenting inhibition halos of 6 + 1 mm and 6.7 + 0.416 mm, respectively, against *E. faecalis* 29212. Similarly, the bactericidal activity presented by the nanoencapsulated extracts of *Smilax spp.* and *C. pentadactylon* against *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, and *E. coli* is proposed.

1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas a lo largo de la historia de la humanidad ha sido una práctica bastante común, considerándose una de las principales acciones realizadas para contrarrestar distintas afecciones, desde malestares como el dolor de estómago y el dolor de cabeza, hasta su uso como auxiliar en el tratamiento de infecciones y de heridas abiertas. Sin embargo, este tipo de propiedades que se les atribuyen a las plantas no están completamente estudiadas, por lo que, la identificación dichas actividades proporciona un amplio medio de estudio. A partir de ello, el número de investigaciones en esta índole ha ido aumentando, debido a que, con el paso del tiempo, los microorganismos que se combatían con ciertos tratamientos han ido ganando resistencia ante los tratamientos de primera línea de defensa, a este tipo de microorganismos se les conoce como bacterias multifármacorresistentes. Estos microorganismos han adquirido resistencia o factores de virulencia que les permiten hacer frente a los antibióticos de uso normal. En la búsqueda de nuevas alternativas, las plantas medicinales tienen un papel primordial, así como la implementación de nuevas metodologías que permitan la disponibilidad y la protección de los productos finales de estas plantas medicinales como son los extractos medicinales; para este último fin, las nanopartículas poliméricas han sido probadas con éxito como sistemas de liberación de extractos vegetales.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plantas medicinales

Con el paso del tiempo, el uso de las plantas en la medicina ha resultado de gran importancia, permitiendo fundar las bases de la medicina moderna a partir del conocimiento empírico resguardado de generación en generación.

Entre los vestigios más antiguos, se posiciona Irak a unos 60,000 años aproximadamente, donde se encontró enterrado en un cementerio un neandertal con plantas como el senecio, la milenrama y el malvavisco. También se han encontrado registros en tablillas de escritura cuneiforme de aproximadamente 4,000 años AC, donde se describían tratamientos preparados mediante opio, tomillo y mostaza. En el caso de las culturas mesoamericanas, estas tenían un conocimiento avanzado con relación a las plantas, en la medicina azteca era practicada por 40 tipos diferentes de especialistas, los cuales eran denominados como Titici, dentro de ellos se encontraban cirujanos, parteros, hueseros, etc. Desafortunadamente en el año 1521, con la llegada de los españoles, estos destruyeron todo lo que encontraban a su paso, quemando así libros y sacrificando sacerdotes, que eran los encargados de transmitir las enseñanzas (Velasco L., et al., 2004).

En la actualidad, la ciencia contemporánea ha reconocido la efectividad de los compuestos bioactivos de las plantas, incluyéndolos dentro de la farmacoterapia moderna. La curación mediante plantas medicinales es tan antigua como la humanidad en sí. Existe una conexión entre el hombre y la búsqueda de nuevas drogas en la naturaleza, dejando a su paso una amplia gama de fuentes de consulta, como son documentos escritos, los monumentos preservados y hasta ejemplares medicinales originales. El uso consciente de las plantas medicinales es el resultado de muchos años de pruebas de alternativas contra diversas enfermedades, lo cual le permitió al hombre aprender a buscar formas de aprovechar e implementar los recursos vegetales con los que contaba, realizando así diferencias entre el uso de la corteza, las semillas, el fruto y otras partes de la planta. Como “droga cruda” o recurso vegetal crudo, se considera un preparado natural que no ha sido modificado desde su origen vegetal, animal, microbiano o minerales y que, al ser utilizado, permite el tratamiento de alguna dolencia o enfermedad específicas. Estos se han encontrado

descritos en algunas farmacopeas y han sido clasificados a partir de: i) morfología, ii) taxonomía, iii) orden alfabético, iv) actividad terapéutica o v) sustancias químicas que la conformaban y con el paso del tiempo, mediante su perfil filogenético. Cabe mencionar que, en base a las partes del recurso vegetal crudo utilizado, se clasifica en organizados y no organizados. En el caso de los organizados son preparaciones a partir de todo el órgano de la planta como hojas, raíces, flores o semillas para tratamientos en específico. Mientras que los no organizados son preparaciones a partir de plantas indiferenciadas, donde no se utilizaron órganos específicos para su preparación como lo son los bálsamos, resinas o aceites esenciales (Delgoda, 2016).

2.1.1 *Smilax spp. L*

El género *Smilax* incluye alrededor de 350 especies, de las cual se calcula que se cuenta en Mesoamérica con al menos 26 especies (Caceres et. al., 2009). Es comúnmente conocida como zarzapilla o cocolmea. Crece en regiones templadas especialmente en el este de Asia, América del Sur y América del Norte (Yilmaz et. al., 2023). Su crecimiento se ve favorecido por climas cálidos y húmedos en suelos arenosos ligeros que se encuentren bien drenados y que sean ricos en humus (Wilson, 2016). *Smilax china* L. es un rizoma ampliamente distribuido en China comúnmente usado de forma medicinal tanto como alimento en las hojas tiernas como del rizoma finamente cortado, el cual se le han reportado propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, diuréticas y digestivas. En el caso de las hojas se consumen como una dieta medicinal adecuada para pacientes con cáncer, debido a la rica variedad de vitaminas saludables, proteínas y coloides. En cuanto a los resultados de estudios farmacológicos se ha observado que *Smilax china* L. Tiene actividades antiinflamatorias, hipolipemiantes, de circulación sanguínea y antioxidantes (Song- Tao et. al., 2023). Además, se ha reportado el uso del rizoma *Smilax glabra* Roxb, para el tratamiento de la diabetes (Gunn y Che, 2013). En la figura 1 se muestra una imagen de *Smilax domingensis*, planta utilizada en este estudio.



Fig. 1 *Smilax domingensis* (Caceres et al. 2009) .

Reino Plantae

Filo Tracheophyta

Clase Liliopsida

Orden Liliales

Familia Smilacaceae

Género *Smilax L.*

2.1.2 Chiranthodendron pentadactylon

Conocido, comúnmente en México, como “flor de manita” o “mano de león”. Es un árbol perenne, encontrado en zonas de bosques húmedos mixtos en zonas del sur de México y zonas montañosas de Guatemala (Velázquez et al., 2012). Cuenta con flores con estambres rojos con forma de uña, la cual simula la forma de una mano (Figura 2). Mide hasta 30 m de altura, las hojas son simples cordadas con 5 o 7 lóbulo, sus flores se encuentran opuestas a las hojas, las cuales producen una gran cantidad de néctar. Sus tiempos de desarrollo generativo son aproximadamente de 3 años y cuentan con periodos de floración constituidos entre noviembre y abril, donde el periodo de mayor abundancia se encuentra en el mes de febrero (Hernández et al., 2020).

De forma tradicional es utilizado para el control de afecciones del corazón. En base a estudios realizados, se ha reportado actividad antibacteriana, antiviral, antiparasitaria, antisecretoras y vasorrelajante (Velázquez et al., 2012).



Fig. 2 Flor de *C. pentadactylon* (Alemán 2010)

Reino: Vegetal

División: Antophyta

Clase: Angiospermae

Subclase: Dicotiledonea

Orden: Malvales

Familia: Sterculiaceae

Género: Chiranthodendron

Especie: pentadactylon

2.1.3 Peumus boldus

Planta comúnmente conocida como boldo. Es perenne y puede alcanzar alturas de hasta 6 m. Posee hojas perennes, coriáceas y de forma ovalada, de color verde oscuro brillante en la parte superior y más pálidas en la parte inferior (Figura 3). El boldo, también ha sido objeto de estudios científicos, que han confirmado algunas de las propiedades medicinales atribuidas a esta planta. Por ejemplo, se ha demostrado que tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, hepatoprotectoras y antitumorales (Villamar y Gómez, 2006).



Fig. 3 Hojas, flores y fruto de *Peumus boldus* (Campoverde, 2019)

Reino: Plantae (plantas)

División: Magnoliophyta (plantas con flores)

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Orden: Laurales

Familia: Monimiaceae

Género: *Peumus*

Especie: *boldus*

2.2 Factores que predisponen a las infecciones bacterianas

Existen algunos factores que favorecen la presencia de infecciones bacterianas como lo son: la higiene inadecuada, la humedad, las condiciones climáticas, los hacinamientos, la dermatosis inflamatoria preexistente y el uso no controlado de antibióticos. Estos factores permiten que, las bacterias patógenas presenten una mejor adherencia o multiplicación en el hospedero. Aunado a esto, existen algunos factores de riesgo como la diabetes mellitus, insuficiencia renal con hemodiálisis, la sorosis, los cuales permiten que el ser humano se encuentre más susceptible a la colonización de ciertos microorganismos oportunistas como *S. aureus*.

Por otro lado, las infecciones cutáneas provocadas por bacterias permiten observar un amplio grupo de cuadros clínicos con diversas etiologías, patogenia y pronóstico. En la piel, las bacterias pueden localizarse en la dermis, la epidermis o hipodermis así como en los anexos cutáneos. Dentro de este tipo de infecciones cutáneas se encuentran (Sanchez y Sáenz, 2006):

- Impetigo
- Síndrome de la piel escaldada
- Foliculitis
- Abscesos cutáneos
- Celulitis y erisipela.

2.3 Bacterias de interés nosocomial

2.3.1 Enterococcus faecalis

Bacteria Gram positiva, de forma esférica u ovoide con un tamaño de 0.6 a 2.0 x 0.6 a 2.5 μm . No cuentan con movilidad, son aerobios facultativos, catalasa negativos con excepción de algunas cepas al crecer en medios que contengan sangre, cuentan con capacidad fermentativa amplia a los carbohidratos. Con una temperatura de crecimiento amplia desde los 10 a 40°C (Díaz et al., 2010).

Se pueden encontrar de forma común como parte del microbiota del tracto genitourinario y en la saliva, estos son organismos oportunistas para los seres humanos, asociados a patógenos nosocomiales causantes de: infecciones de tracto urinario, bacteremia, endocarditis, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones de tejidos blandos, en casos extremos provoca meningitis (López, 2012).

Multifarmacorresistencia: El Centro de Control de Enfermedades (CDC) ha reportado que *Enterococcus* presenta una resistencia adquirida a vancomicina, debido a la adquisición de información genética de otro organismo. Algunos de los genes que se han identificado que confieren este tipo de actividad son vanA y vanB. Conocer el tipo de resistencia que presentan las diferentes cepas es un punto crítico para poder controlar las infecciones, se

tienen reportes de aislados con genes vanA que al realizar pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI) a vancomicina muestran valores $> 128 \mu\text{g/ml}$ y para teicoplanina $\geq 16 \mu\text{g/ml}$. Por otro lado, en el caso de aquellas resistencias conferidas por vanB se ha observado que producen niveles inferiores de resistencia a la vancomicina con MIC de 16 a 64 $\mu\text{g/ml}$ y a teicoplanina con MIC $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ (CDC, 2010).

2.3.2 *Pseudomona aeruginosa*

Bacilo Gram negativo, de carácter oportunista, perteneciente a la familia Pseudomonaceae, con un tamaño aproximado desde 2 a 4 x 0.5 a 1 μm . Este patógeno cuenta con gran versatilidad debido a que soporta un rango de temperatura amplio que va desde los 4 hasta los 42°C y a que cuenta con la capacidad de sobrevivir con niveles bajos de nutrientes. No cuenta con capacidad fermentadora de lactosa o glucosa, pero es catalasa y oxidasa positivo. De igual forma cuenta con la capacidad de producir tres tipos de pigmentos como la piocianina de coloración azul verdoso, la pioverdina de coloración fluorescente verde amarillento y la piorrubina de coloración rojiza.

Este patógeno es de distribución amplia en la naturaleza, observable en el agua, suelos húmedos, en algunos vegetales, de igual forma se puede observar en la microbiota normal saprofita de las zonas húmedas de la piel humana.

Esta bacteria es capaz de formar biopelícula, lo cual permite la adherencia a dispositivos médicos como catéteres u objetos de uso común como lo son los lentes de contacto. Debido a esta característica es capaz de producir diferentes afecciones, tales como: infecciones dérmicas, neumonía, otitis externa o infección ocular; además, en el caso de pacientes intrahospitalarios inmunocomprometidos se ha reportado que es la responsable de neumonías, meningitis, sobreinfección de heridas, ectimas gangrenosas, infecciones urinarias, infecciones osteoarticulares, endocarditis, infecciones oculares y septicemia (Databio, 2016). Dependiendo del área donde se encuentre, *P. aeruginosa* presenta tasas de colonización en el humano de 0 a 2% para la piel, de 0 a 3.3% en la mucosa nasal, de 0 a 6.6% en garganta y de 2.6 a 24% en muestras fecales, en el caso de hospitalizaciones, el porcentaje de colonización alcanza hasta un 50% sobre todo en aquellos pacientes en

los que se han visto comprometidas las barreras cutáneas o mucosas, o con su sistema inmunitario comprometido (Lister, Wolter y Hanson, 2009).

Multifarmacorresistencia: Cuenta con diferentes mecanismos de resistencia a antibióticos, principalmente, ha sido asociada a la formación de biopelículas bacterianas y también a la fagocitosis mediante componentes del sistema inmune adaptativo. Por otra parte, se encuentra la producción de β lactamasas de amplio espectro, la alteración de las proteínas fijadoras de penicilina, la mutación de porinas, entre otros mecanismos que confieren actividades contra antibióticos carbapenémicos y β - lactámicos. En casos de infecciones nosocomiales estas se han relacionado principalmente a la producción de biopelículas (Ochoa et al., 2013).

2.3.3 *Acinetobacter baumannii*

Bacilo corto Gram negativo de un tamaño aproximado de 0.9 a 1.6 μm , se observa al microscopio en agrupaciones de duplas, aeróbico estricto, catalasa positiva, no cuenta con mecanismos de movilidad, de esporulación, ni capacidad fermentadora, sin embargo, cuenta con cápsula. La temperatura óptima de crecimiento es de 20 a 30°C. Patógeno observable en la naturaleza y como parte de la microbiota de la piel humana, el cual cuenta con la capacidad de colonizar de forma transitoria el tracto respiratorio. Comúnmente se encuentra en ambientes hospitalarios, en pacientes con alguna comorbilidad, o que se encuentran en un estado crítico, especialmente en aquellos pacientes inmunodeprimidos o pertenecientes a las unidades de cuidados intensivos y en las unidades de quemados (González, 2010); en estos últimos casos, está asociado a infecciones como la septicemia, la neumonía, del tracto urinario, meningitis e incluso endocarditis. Los pacientes más susceptibles a estas afecciones son aquellos que cuentan con equipos de respiración, dispositivos como catéteres, heridas abiertas por post cirugía o por quemaduras y aquellas con estadías hospitalarias prolongadas (CDC, 2019).

Multifarmacorresistencia: Se han presentado cepas con resistencia a penicilina, cefalosporina de primera y segunda generación, así como algunos tipos de cefalosporina de tercera generación, aminoglucósidos y fluorquinolonas.

La producción de β - lactamasas es considerado el principal mecanismo de resistencia contra β -lactámicos, donde se ha descrito un predominio en la producción de enzimas de tipo cefalosporina cromosómica tipo 1, confiriendo la principal resistencia a cefalosporina de primera y segunda generación y efectiva también en algunos tipos de cefalosporina de tercera generación. Por otro lado, se ha reportado la generación de penicilinasas plasmídicas, así como de carbenicilinasas, las cuales confieren la resistencia a ampicilina, carboxipenicilinas y a ureidopenicilinas. (López y López-Brea, 2000)

2.3.4 *Klebsiella pneumoniae*

Es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriácea*, con un tamaño aproximado de 0.5 a 2 μm , él cual no presenta movilidad, cuenta con la capacidad de generar una cápsula que funge como un factor importante en el desarrollo de la virulencia de la bacteria. Es anaerobio estricto, no esporulado, cuenta con capacidad fermentadora de glucosa y lactosa, catalasa positiva, sin embargo, es oxidasa y nitrato negativa. Se encuentra de forma ubicua en la mucosa nasofaríngea, así como del intestino en el humano, en algunas ocasiones es posible encontrarla también en la piel. Por otra parte, es posible encontrarla en vegetales, carne y en algunas ocasiones en el agua potable. De igual forma se ha observado su presencia en ambientes intrahospitalarios, donde su porcentaje de colonización alcanza hasta un 70% en heces, viéndose determinado este porcentaje por el tiempo de hospitalización y los tratamientos previos utilizados (Vergara, 2015) Las principales formas de exposición a este patógeno en el ambiente hospitalario es debido a equipos de respiración, catéteres o heridas intravenosas (CDC, 2010).

Multifarmacorresistencia: Presenta resistencia a la ampicilina debido a la presencia de β -lactamasas, las cuales son codificadas en el cromosoma de la bacteria transportado mediante plásmidos, lo que ha permitido la transmisión a otras especies y géneros bacterianos de forma rápida. Mediante estas enzimas se ha observado que confieren resistencia a la penicilina, algunos tipos de cefalosporinas y monobactámicos (López y Echaverri, 2009). En algunas ocasiones se ha reportado la presencia de enzimas como las carbapenemasas, las cuales contrarrestan a los carbapenémicos, fármacos usados para contrarrestar las infecciones ocasionadas por *K. pneumoniae*. A partir de estos sistemas de protección por parte de las cepas de *K. pneumoniae* se les denomina multifarmacorresistentes, a partir de lo cual son considerados de alto riesgo. De una forma

más puntual, también son considerados multifarmacorresistentes cuando muestran resistencia ante todos los antibióticos denominados de primera línea contra *A. baumannii*, incluyendo en esta consideración a los β -lactámicos, las fluorquinolonas y los aminoglucósidos.

2.3.5 *Escherichia coli*

Esta cepa bacteriana, es un bacilo Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriácea*, con un tamaño aproximado de 0.3 a 1.6 μm , presenta movilidad debido a los flagelos peritricos, los cuales rodean su cuerpo, es considerado anaerobio facultativo (Rodríguez-Angeles, 2002). No se le atribuye la actividad formadora de esporas, también es oxidasa negativa, es fermentador de glucosa, así como reductor de nitritos y catalasa positiva. Se han encontrado casos en los que posee una microcápsula. Esta cepa se encuentra de forma común en la microbiota del tracto gastrointestinal y es eliminada mediante las heces (Salas, 2014).

Multifarmacorresistencia: Se ha observado una resistencia debajo del 4% en el uso de fosfomicina y nitrofurantoina, mientras que, en el caso de las cefalosporinas de segunda y tercera generación una resistencia por debajo del 10%. En el uso de amoxicilina-ácido clavulánico, la resistencia aumenta a un 21.5% y para trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacino y ampicilina el aumento fue superior al 30%. (Betrán, Cortes y López, 2015)

2.4 Nanoencapsulación

El proceso de nanoencapsulación incluye sistemas vesiculares que permiten rodear el agente activo dentro de una cavidad. La cubierta se conforma por un polímero, que dependiendo de sus características fisicoquímicas, permite controlar la liberación del encapsulado. La nanoencapsulación permite el aumento de la eficacia, la especificidad y la capacidad de acción del agente terapéutico en cuestión. En este caso los nanoportadores buscan proteger su carga útil de la degradación en el entorno biológico, buscando lograr una mejor biodisponibilidad y una prolongada presencia del agente en la sangre y en la

absorción celular (Kumari, et al. 2014). Las características de las nanopartículas a producir dependen del método de elaboración, las propiedades químicas, físicas y características de la sustancia activa a encapsular (Urrejola, et al., 2018). Las nanopartículas usadas para este tipo de actividad son las poliméricas, las cuales son consideradas sistemas coloidales menores a 1 μm a la cual se le puede unir, encapsular, atrapar o diluir el componente activo a una matriz polimérica específica. Debido a su matriz polimérica estas presentan características como: protección de los activos sensibles a la degradación, una liberación controlada de las sustancias activas encapsuladas y localización en órganos específicos. Las nanoestructuras han sido ampliamente utilizadas para promover la interacción con la piel, debido a que promueven una mayor difusión en la capa superficial de la piel. Se ha observado que las nanocápsulas promueven el contacto directo del activo con el estrato corneo y los apéndices de la piel, por lo cual permiten la facilidad de liberación del compuesto activo (Travieso et al., 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

La posibilidad de una infección bacteriana en heridas quirúrgicas presenta un gran problema, ocupando la tercera infección nosocomial a nivel global. Estas producen el 14-16% de las infecciones nosocomiales y el 38% en pacientes con infecciones postoperatorios.

Así mismo, la generación de microorganismos resistentes a los antimicrobianos ha ocasionado la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento tomando como base la lista de una serie de familias bacterianas denominada “patógenos prioritarios” reportada por la OMS en el año 2017. En base a lo antes mencionado, esta investigación se orientó a la evaluación de extractos de plantas medicinales, crudos y nanoencapsulados, para combatir las infecciones bacterianas y promover la regeneración de los tejidos dañados por estos procesos.

4. HIPÓTESIS

Los extractos metanólicos y nanoencapsulados de *Smilax spp.*, *Chiranthodendron pentadactylon*, y *Peumus boldus* presentan actividad bactericida.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad bactericida sobre microorganismos farmacorresistentes de interés dérmico de los extractos metanólicos y nanoencapsulados de *Smilax spp.*, *Chiranthodendron pentadactylon* y *Peumus boldus*

6. Objetivos Específicos

1. Obtener los extractos metanólicos de *Smilax spp.*, *Chiranthodendron pentadactylon* y *Peumus boldus* por la técnica de maceración.
2. Determinar el perfil de resistencia de las bacterias en estudio mediante un antibiograma.
3. Evaluar la actividad bactericida de los extractos obtenidos, sobre cepas Gram positivas (*E. faecalis*) y Gram negativas (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *E. coli*), mediante el método de difusión en pozo.
4. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de los extractos con mejor actividad antimicrobiana.
5. Realizar un tamizaje fitoquímico para determinar la presencia de los metabolitos y grupos funcionales en los extractos activos.
6. Determinar la actividad citotóxica de los extractos bioactivos mediante pruebas hemolíticas.
7. Evaluar la actividad bactericida de los extractos nanoencapsulados sobre cepas Gram positivas (*E. faecalis*) y Gram negativas (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *E. coli*) mediante el método de difusión en pozo.

7. METODOLOGÍA

7.1 Material biológico

Se trabajó con una cepa Gram Positiva y cuatro especies Gram Negativas que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas bacterianas. CORREGIR TABLA, DEFINIR CUALES SON LAS COLUMNAS Y CUALES LAS LÍNEAS

Gram positivas	
<i>E. faecalis</i> 29212	
Gram negativas	
<i>K. pneumoniae</i> 700603	<i>E. coli</i> 25922
<i>A. baumannii</i> 15308	<i>P. aeruginosa</i> 27853

7.2 Material vegetal

Los materiales vegetales, a partir de los cuales se obtuvieron los extractos, se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Plantas de estudio

Planta	Parte de la planta
<i>Smilax spp</i> (Cocolmecha)	Raíz
<i>Chiranthodendron pentadactylon</i> (Flor de manita)	Flor
<i>Peumus boldus</i> (Boldo)	Hoja

7.3 Activación de las cepas

Las cepas bacterianas fueron obtenidas del cepario que se encontraba en conservación en el Laboratorio de Química Analítica de la FCB. Se preparó caldo nutritivo y se vertió un volumen de 4 ml en tubos de cristal. Posteriormente, los tubos pasaron un periodo de incubación de 24 h para comprobar su esterilidad. Si la prueba resultaba negativa (ausencia de contaminación en el tubo de caldo nutritivo), se realizaba la activación de las cepas a evaluar en cada uno de los tubos de caldo nutritivo mediante el uso de un asa bacteriológica en la campana de flujo laminar, con el flujo encendido. Luego, se tomaba una asada del vial en conservación y se inoculaba cada tubo mediante la inmersión del asa en el tubo de caldo nutritivo. Este proceso se realizaba con las cepas que se evaluaban. Por último, los tubos previamente inoculados se incubaron por un periodo de 24 horas a 36°C (García, 2010).

7.4 Escalamiento McFarland

Después del periodo de incubación, se midió la absorbancia de los tubos activados a 600 nm y se ajustó la absorbancia inicial entre 0.100 y 0.110. Para lograr esto, se tomó un tubo de cristal con caldo nutritivo dentro de la campana de flujo laminar y se agregaron 10 µl

inicialmente a partir de los tubos activados hasta que se obtuvo la lectura deseada (García, 2016).

7.5 Antibiograma

Se tomó un tubo con el cultivo bacteriano previamente estandarizado en 0.5 de la escala de McFarland (1X10⁸ UFC/ml) y se sembró en una placa de agar Müller Hinton mediante extendido en placa con un asa Digrafsky. Luego, se colocaron los discos Multibac ID de la casa comercial Investigación Diagnóstica con unas pinzas estériles en la placa, distribuyéndose alejados de los bordes y con espacio entre cada uno de los discos para evitar que los halos de inhibición no se vean superpuestos. Finalmente, se incubaron a 36°C por 24 h. (García, 2016)

7.6 Obtención de los extractos metanólicos

Se realizó la maceración estática a partir del material vegetal seco y molido *Smilax spp.*, *C. pentadactylon* y *P. boldus* obtenidos de la casa comercial Pacalli. Para esto se tomaron 100 g en un matraz Erlenmeyer y se adicionaron 300 ml de metanol por un lapso de 15 d. Posteriormente, se llevó a la concentración del extracto a presión reducida en un evaporador rotativo, por un periodo aproximado de 2 h a una temperatura de 40°C. Al obtener el extracto concentrado se realizaron lavados con el mismo solvente utilizado para su óptima recuperación, finalmente, se llevó a un horno de secado por unos 15 d a una temperatura de 40°C para la evaporación del solvente de lavado, finalmente se realizó la determinación del rendimiento y se almacenó en un lugar fresco y protegido de la luz. (García, 2010).

7.7 Preparación de los extractos

Para la resuspensión de los extractos se tomaron 100 mg de cada uno de los extractos y se agregó 1 ml de metanol, este se llevó al sonicador por 5 min para su óptimo manejo para las pruebas preliminares, en el caso de los estudios de concentración mínima inhibitoria, se partió del stock antes mencionado y se realizaron 4 diluciones seriadas del mismo extracto (Espinoza, 2020).

7.8 Actividad bactericida por difusión en placa por disco

Inicialmente se tomaron 100 µl del inóculo de las cepas, previamente estandarizado en 0.5 de la escala de McFarland (1×10^8 UFC/ml), y se realizó el extendido con un asa Digrafsky, posteriormente se agregaron sensidiscos impregnados con 10 µl por lado del extracto MEOH a una concentración de 100 mg/mL alrededor de la caja, de cada uno de los extractos. Posteriormente, se incubaron a 36°C por 24 h y se midieron los halos de inhibición formados (Sanchez et al., 2016).

7.9 Concentración mínima inhibitoria

Se realizó la inoculación de las cajas Petri, mediante un extendido en placa, a partir de un tubo con el cultivo bacteriano previamente estandarizado en 0.5 de la escala de McFarland (1×10^8 UFC/ml) mediante la toma de 100 µl de las cepas y se extendió con un asa Digrafsky. Después se agregaron sensidiscos impregnados con 10 µl por lado del extracto MEOH partiendo de una concentración inicial de 100 mg/ml y realizando diluciones 4 seriadas. Así, se obtuvieron 5 sensidiscos posicionados alrededor de la caja, de cada una de las diluciones de los extractos y un control negativo con MEOH puro en el centro de la caja. Posteriormente, se incubaron a 36°C por 24 h y se midieron los halos de inhibición formados (Sanchez et al., 2016).

7.10 Pruebas cualitativas para la determinación parcial de grupos funcionales

7.10.1 Alcaloides

7.10.1.1 Prueba de Dragendorff.

Se tomaron 0.85 g de nitrato de bismuto y se disolvieron en una mezcla de 10 ml de ácido acético glacial y 40 ml de agua, para preparar la solución A y B. El reactivo se preparó mezclando 5 ml de la solución A y 4 ml de la solución B con 100 ml de agua. Los resultados se consideraron positivos al observar una coloración roja o naranja persistente por un periodo de 24 h (Verde-Star et al., 2016).

7.10.2 Flavonoide

7.10.2.1 Prueba del H₂SO₄.

La prueba consistió en disolver 4 mg del extracto en H₂SO₄, al obtener una coloración amarilla es positiva para flavones, en cuanto a una coloración naranja, se considera positiva para flavonas, la coloración rojo-azuloso es positiva para chalconas mientras que la coloración rojo-púrpura para quinonas (Verde-Star et al., 2016).

7.10.2.2 Prueba de Shinoda.

En un tubo con el extracto disuelto en etanol se agregaron limaduras de Mg, se aplicó calor a la flama y posteriormente se agregaron unas gotas de HCl, los resultados de esta prueba son aceptados como positivos al observar coloraciones naranja, rojo, rosa, azul y violeta (Verde-Star et al., 2016).

7.10.3 Sesquiterpenlactonas.

7.10.3.1 Prueba de Baljet.

Se tomó 3 mg del extracto y se agregaron 3 o 4 gotas de una solución contenía ácido pícrico al 1% en etanol y NaOH al 10%. Los resultados fueron reportados como positivos al desarrollar una coloración naranja a roja oscura (Verde-Star et al., 2016).

7.10.4 Carbohidratos.

7.10.4.1 Prueba de Molish.

Se añadió gota a gota reactivo Molish (1% alfa-naftol en etanol) a 1 o 2 mg del extracto, luego se añadió 1 ml de ácido sulfúrico a través de la pared; la prueba se aceptó como positiva cuando se observó un anillo púrpura en la interfase (Verde-Star et al., 2016).

7.10.5 Cumarinas

7.10.5.1 Prueba de las cumarinas.

Se disolvió 1 ó 2 mg del extracto en NaOH al 10%, se tomó como resultado positivo la aparición de un color amarillo, el cual se eliminó acidificando la muestra (Verde-Star et al., 2016).

7.10.6 Esteroles y triterpenos.

7.10.6.1 Prueba de Liebermann-Buchard

Se adicionó 1 ml de ácido acético gota a gota y 1 ml de cloroformo y se llevó a enfriar a 0°C, posteriormente se agregó una gota de ácido sulfúrico. Se ha aceptado como prueba positiva en la presentación de los colores azul, verde, rojo y naranja (Verde-Star et al., 2016).

7.10.7 Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales)

7.10.7.1 Prueba del FeCl₃.

Se tomaron 1 a 2 mg del extracto y se disolvieron en 1 ml de agua o etanol y se añadieron unas gotas de una solución al 12,5% de cloruro férrico en agua, se tomó como positivo un precipitado rojo, azul-violeta o verde (Verde-Star et al., 2016).

7.11 Prueba de hemólisis

La muestra de sangre se obtuvo de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-253-SSA1-2012. A partir de una muestra de sangre humana O+, se centrifugaron 2,5 ml de sangre a 3000 rpm durante 15 min a temperatura ambiente. El sobrenadante de la superficie se eliminó cuidadosamente y el sedimento se lavó 3 veces con solución salina isotónica tamponada con fosfato, pH 7,4 (PBS). Luego los eritrocitos previamente obtenidos se pusieron en contacto con un extracto metanólico. Para el tratamiento se tomó 250 µl de un paquete globular y se sirvió en 6 tubos cónicos de 1.5 ml cada uno, de menor a mayor concentración se suministró de 975 a 997.5 µl de PBS, luego de 25 a 2.5 µl del extracto metanólico se agregó de mayor a menor y se incubó por 30 min a 37°C en un lugar protegido de la luz, se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min a 4°C, transcurrido el tiempo de centrifugación se tomaron 100 µl de cada tubo y se colocaron en una microplaca de 96 pocillos para la determinación del porcentaje de hemólisis según las lecturas del espectrofotómetro a 540 nm. En el caso de una muestra en blanco, se tomaron 250 µl de PBS y se agregaron a 6 tubos cónicos de 1,5 ml, de menor a mayor, de 975 a 997,5 µl de PBS y de mayor a menor, de 25 a 2,5 µl. extracto metanólico, se incubó por 30 min a 37°C en un lugar protegido de la luz, se centrifugó a 13.000 rpm por 5 min a 4°C, transcurrido el tiempo de centrifugación se tomaron 100 µl de cada tubo y se colocaron en una

microplaca de 96 pocillos, el porcentaje de hemólisis se determinó mediante las lecturas del espectrofotómetro a 540 nm. (Hernández, 2020).

7.12 Nanoencapsulación

La obtención de nanocapsulas (NP) se realizó mediante la técnica de nanoprecipitación descrita por Fessi et al (1989). Inicialmente se prepararon 6 ml de una fase orgánica compuesta de metanol y acetona, Eudragit RSPO el extracto vegetal. Posteriormente, se inyectó la fase orgánica en la fase acuosa que contenía alcohol polivinílico al 5% (p/p), la cual se encontró bajo agitación magnética constante (400 rpm) a temperatura ambiente (Cavazos-Rodríguez, 2011). Por último, el disolvente se evaporó a presión reducida (Heidolph Instruments, GER) a 100 rpm a 40°C. Para la elaboración de las NP blanco (NP-BCO) se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente pero no se adicionará el E (Espinosa, 2021).

7.13 Tamaño, índice de polidispersidad (IP) y potencial zeta

Se utilizó una suspensión acuosa de NP-E y NP-BCO para determinar el tamaño medio de partícula y el PI. Se midió en un ángulo de dispersión de 90 grados usando dispersión de luz dinámica, mientras que el potencial zeta se midió usando microelectroforesis láser Doppler (Zetasizer Nano-ZS90, Malvern Instruments, Reino Unido) (Espinosa, 2021).

8. RESULTADOS

Para los antibiogramas realizados, como se muestra en la Tabla 3, se encontró que las cepas aun cuentan con sensibilidad contra algunos antibióticos de uso hospitalario, siendo la vancomicina el antibiótico con mayor sensibilidad a las bacterias, sin embargo, se encontró la resistencia a al menos 10 antibióticos por *K. pneumoniae*, siendo su contraparte *A. baumannii*, la cual solo mostró resistencia a 5 antibióticos utilizados.

Tabla 3. Perfil de Resistencia de las cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Antibiótico	Bacteria					
	<i>E. coli</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Ampicilina	+	+	+	+	+	+
Carbencilina	+	+	+	-	-	+
Gentamicina	+	+	-	-	-	-
Amikacina	+	-	+	-	-	-
Netilmicina	+	+	-	-	-	-
Sulfametasol/ trimetropim	+	-	+	+	+	+
Norfloxacino	+	-	+	-	-	+
Cefotaxima	-	+	+	-	+	-
Cloranfenicol	-	-	+	-	-	+
Nitrofurantoina	-	-	+	+	-	+
Cefalotina	-	-	+	-	+	+
Ciprofloxacina	-	-	+	-	+	+
Clindomicina	-	-	-	+	+	-
Dicloxacilina	-	-	-	+	-	-
Eritromicina	-	-	-	+	+	-
Penicilina	-	-	-	+	+	-
Tetracilina	-	-	-	+	-	-
Vancomicina	-	-	-	-	+	-

Interpretación: +Presente; - Ausente

Por medio del tamizaje fitoquímico (Tabla 4), se observa que el extracto de *P. boldus* contaba con una mayor presencia de metabolitos, resultando positivo en ocho de las nueve pruebas realizadas, mientras que, el extracto de *C. pentadactylon* contaba con cinco de las nueve pruebas realizadas

Tabla 4. Tamizaje fitoquímico de los extractos metanólicos de las plantas en estudio

Prueba	Metabolitos	Extracto evaluado		
		<i>C. pentadactylon</i> MEOH	<i>Smilax spp.</i> MEOH	<i>P. boldus</i> MEOH
Lieberman-Buchard	Esteroles y triterpenos	+	+	+
Cumarinas	Cumarinas	-	+	+
Baljet	Sesquiterpenlactonas	-	+	+
Quinonas	Quinonas	+	+	+
Saponinas	Saponinas	-	-	+
Shinoda	Flavonoide	+	-	+
Taninos	Taninos	+	+	+
Antrona	Carbohidratos	+	+	+
Dragendorff	Alcaloides	-	-	-

Interpretación: ++ Abundante; + Moderado; +/- Escaso; - Nulo; *No reportado.

En el estudio preliminar de actividad inhibitoria (Tabla 5) se observó actividad en los extractos *Smilax spp.* y *C. pentadactylon* contra la sepa *E. faecalis* 29212 mostrando halos de inhibición de 6 ± 1 mm y 6.7 ± 0.41 mm, respectivamente (Figura 4).

Tabla 5. Inhibición de los extractos sobre las diferentes bacterias evaluadas

Bacteria	Halo de Inhibición (mm)			
	<i>C. pentadactylon</i>	<i>Smilax spp.</i>	<i>P. boldus</i>	MEOH
<i>S. aureus</i> BAA-44	0 ± 0.1	0	0	0
<i>E. coli</i> 25922	0	0	0	0
<i>E. faecalis</i> 29212	6 ± 1	6.7 ± 0.416	0	0
<i>K. pneumoniae</i> 700603	0	0	0	0
<i>A. baumannii</i> 15308	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> 27853	0	0	0	0

n=3 \pm DE

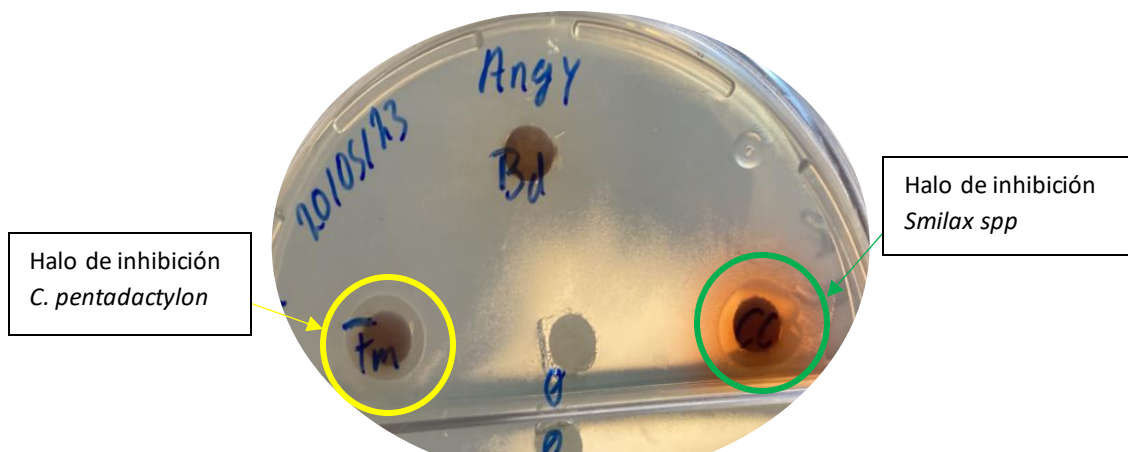


Fig. 4 Inhibición de *C. pentadactylon* y *Smilax spp.* contra *E. faecalis* 29212

En el caso de la CMI (Tabla 6) se observó actividad con ambos extractos hasta el sensidisco de 50 mg/ml de cada extracto. Se observaron halos de inhibición de 3.3 ± 1.154 mm para *Smilax spp.* y 2.3 ± 0.577 mm para *C. pentadactylon*.

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de las plantas en estudio sobre *E. faecalis* 29212

Extracto	Concentración (mg/ml)	Halo de inhibición (mm)
<i>Smilax spp.</i>	100	5.3 ± 1.154
	50	3.3 ± 1.154
	25	0
	12.5	0
	6.25	0
<i>C. pentadactylon</i>	100	4.6 ± 1.154
	50	2.3 ± 0.577
	25	0
	12.5	0
	6.25	0

n=3, \pm DE

En el caso de los porcentajes de hemólisis (Tabla 7) se observó, que el extracto de *P. boldus* a una concentración de 1000 µg/ml, presentó el mayor porcentaje de hemólisis, con un valor de 1.633 %. Mientras que, el extracto de *C. pentadactylon*, a la misma concentración presentó el menor porcentaje de hemólisis, con un valor de 0.760% de hemólisis.

Tabla 7. Porcentajes de hemólisis de las plantas en estudio

Extracto	Concentración (µg/ml)	% hemólisis
<i>Smilax spp</i>	1000	1.499 ± 0.404
	800	1.173 ± 0.907
	600	1.130 ± 0.513
	400	0.609 ± 0.230
	200	0.491 ± 0.321
	100	0.371 ± 0.360
<i>C. pentadactylon</i>	1000	0.760 ± 0.585
	800	0.712 ± 0.6
	600	0.674 ± 0.5
	400	0.634 ± 0.2
	200	0.592 ± 0.7
	100	0.357 ± 0.5
<i>P. boldus</i>	1000	1.633 ± 0.3
	800	1.576 ± 0.2
	600	1.090 ± 0.3
	400	0.958 ± 0.3
	200	0.629 ± 0.1
	100	0

n= 3

Cuando los extractos fueron nanoencapsulados, se observó que con el extracto de *C. pentadactylon* se obtuvieron nanopartículas con un tamaño de 148 ± 11.998 nm y con el extracto de *Smilax spp*. Las nanopartículas presentaron un tamaño de 138.3 ± 4.757 nm (Tabla8).

Tabla 8. Tamaño de nanopartículas obtenidas con los extractos

Nanopartículas	Tamaño (nm)	índice de polidispersidad (PDI)	Potencial Z (mV)
Blanco	120.7 ±8.835	0.152±0.023	39.2±1.300
<i>Smilax spp.</i>	138.3 ±4.757	0.173±0.010	17.26±2.307
<i>C. pentadactylon</i>	148.1 ±11.998	0.195±0.160	18±2.402

n=3

En el caso de la presencia de los metabolitos secundarios, se observó que estos se encontraban tanto en el sobrenadante como en el pellet de las nanopartículas cargadas de los dos extractos (Tabla 9). El sobrenadante de las nanopartículas con el extracto de *Smilax spp.* presentó más metabolitos que el sobrenadante del *C. pentadactylon*.

Tabla 9. Tamizaje fitoquímico de las nanopartículas de *Smilax spp* y *C. pentadactylon*

Prueba Química	Blanco		<i>Smilax spp.</i>		<i>C. pentadactylon</i>	
	Sobrenadante	Pellet	Sobrenadante	Pellet	Sobrenadante	Pellet
Lieberman buchar	-	-	+	+	+	+
OH fenolico (Taninos)	-	-	+	++	+	+
Cumarinas	-	-	-	+	-	-
Quinonas	-	-	-	-	-	+
Baljet	-	-	++	+	-	+
Saponinas	-	-	-	-	-	-
Shinoda	-	-	+	-	-	+
Antrona	-	-	+	+	+	+

Interpretación ++ Abundante + Moderado +/- Escaso - Nulo

En relación a la inhibición del crecimiento de las bacterias al aplicar las nanopartículas (Tabla 10), se observó que las nanopartículas blanco (sin extracto) presentaron pequeños halos de inhibición para las cinco bacterias evaluadas (Figura 5). Cuando se aplicaron las nanopartículas cargadas con los extractos, los halos de inhibición fueron mayores que con las nanopartículas blanco, a excepción de *A. baumannii* 15308 con *Smilax spp.* El mayor halo de inhibición se observó con las nanopartículas de *Smilax spp* contra *K. pneumoniae* 7006003, con halos de inhibición de 14.22 ± 2.156 mm. Cuando se aplicaron las nanopartículas con *C. pentadactylon*, el mayor halo de inhibición fue contra *P. aeruginosa*

27853 con un halo de inhibición de 13.11 ± 0.820 mm (Figura 6). El halo de inhibición de *Smilax spp.* contra *P. aeruginosa* 27853 fue de 11.56 ± 0.488 mm (Figura 7).

Tabla 10. Inhibición de las nanopartículas de *Smilax spp* y *C. pentadactylon*

Bacteria	Halos de inhibición (mm)		
	Blanco	<i>Smilax</i>	<i>C. pentadactylon</i>
<i>E. coli</i> 25922	3.78 ± 1.097	8.67 ± 0.488	10.89 ± 0.544
<i>E. faecalis</i> 29212	4.67 ± 0.667	7.00 ± 0	8.67 ± 0.398
<i>A. baumannii</i> 15308	11.78 ± 1.333	11.78 ± 0	13.56 ± 0
<i>K. pneumoniae</i> 700603	6.22 ± 0.667	14.22 ± 2.156	11.33 ± 0.488
<i>P. aeruginosa</i> 27853	7.33 ± 0	11.56 ± 0.488	13.11 ± 0.820



Fig. 5 Halos de inhibición de las nanopartículas blanco sobre *P. aeruginosa* 27853



Fig. 6 Halos de inhibición *C. pentadactylon* (FM) sobre *P. aeruginosa* 27853

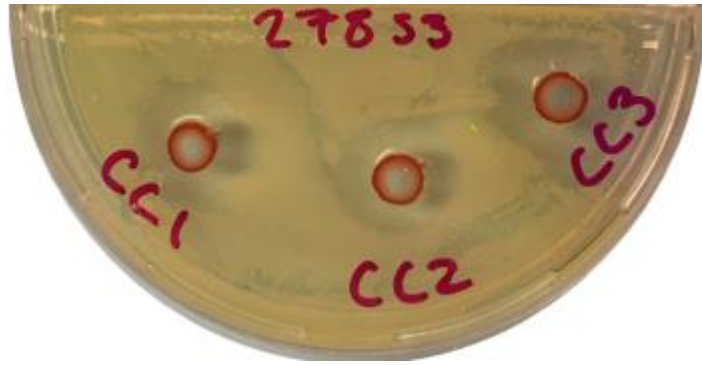


Fig. 7 Halos de inhibición *Smilax spp.* (CC) sobre *P. aeruginosa* 27853

9. DISCUSIÓN

Los estudios cualitativos de los metabolitos secundarios presentes en las plantas se han impulsado aproximadamente desde 1983 con la creación de la Asociación Latinoamericana de Fitoquímica (Moyna, 2002). En este estudio la composición del extracto metanólico de *Smilax spp.*, (Tabla 4), indica la presencia de esteroides, cumarinas, sesquiterpenlactonas, quinonas, taninos y carbohidratos. En estudios previos de Soledip y col en 2022, no se reporta la presencia de sesquiterpenlactonas, quinonas y carbohidratos. Cabe mencionar que a las sesquiterpenlactonas se les atribuye actividades biológicas importantes, tales como antitumorales, citotóxicas y antiinflamatorias (Ruiz y Suarez, 2015). En el caso de las quinonas, se les atribuyen actividades antimetabólicas, anticancerígenas, antibacterianas y antiproliferativas (Durán et al., 2013).

En otra investigación con el extracto de *S. purhampuy*, se reporta la presencia de metabolitos, como flavonoides y alcaloides, metabolitos ausentes en el extracto de *Smilax spp* de este trabajo. Dichos metabolitos han presentado importantes actividades biológicas, tales como antioxidante, antiinflamatoria, antigangranante, antihemorrágica, vasodilatadora, antiviral y antibacteriana (Álvarez y Orallo, 2003). El extracto de *Smilax spp* tampoco presentó saponinas, a las cuales se les atribuye actividad antimicrobiana, anticancerígena y antihemolítica principalmente.

Los metabolitos presentes en *Smilax spp.* son capaces de producir un halo de inhibición de 6.66 mm contra la bacteria multifarmacorresistente de *E. faecalis* 29212. En cuanto a la CMI, McMurray y col 2020 reportaron valores de CMI de 125 mg/l con extracto de *Smilax glabra* Roxb contra la *E. coli* 25922, mientras que en este trabajo no se observó actividad del extracto crudo de *Smilax spp* contra la *E. coli* 25922 multifarmacorresistente.

Por otro lado, en el extracto de *C. pentadactylon* se estableció la presencia de esteroides, cumarinas, sesquiterpenlactonas, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, y carbohidratos. En estudios realizados por Calzada y col en 2017, se reporta únicamente la presencia de flavonoides. Los flavonoides presentes en el extracto de *C. pentadactylon* podría ser responsables de la actividad bactericida sobre *E. faecalis* 2912 multifarmacorresistente con halos de inhibición de 6 mm. En cuanto a la CMI, Calzada y

col 2017 reportan valores de 2mg/ml del extracto metanolico de *C. pentadactylon* contra *E. coli*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella spp.* y *Vibrio cholerae* (Calzada et. al. 2017), mientras que, en este trabajo, el extracto metanolico de *C. pentadactylon*, presentó una CMI de 50 mg/ml contra la bacteria multifarmacorresistente *E. faecalis* 29212.

En relación con el extracto metanolico de *P. boldus*, se observó la presencia de esteroides, cumarinas, sesquiterpenlactonas, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, y carbohidratos. Estos resultados coinciden con los reportados por Campoverde (2019) con el extracto etanólico, él cual reporta una gran cantidad de metabolitos presentes en el extracto etanolico de *P. boldus* a excepción de los alcaloides. La composición química de ambos extractos es semejante debido a la polaridad similar entre ambos disolventes.

A pesar de la gran cantidad de metabolitos contenidos el extracto metanolico de *P. boldus*, el extracto no presentó actividad inhibitoria contra las bacterias evaluadas. Estos resultados no coinciden con aquellos reportados por Castillo y col en 2016, donde el extracto acetónico de *P. boldus* presentó actividad contra *E. coli* y *B. cereus*.

En las pruebas hemolíticas de los tres extractos metanólicos de las plantas en estudio, se estableció baja toxicidad. A una concentración de 1,000 µg/ml, para *Smilax spp* el porcentaje de inhibición fue de 1.4%, para *C. pentadactylon* de 0.76% y para *P. boldus* de 1.63%. Datos reportados por Mesdaghinia (2019) indican que porcentajes de hemólisis menores al 2%, pueden ser considerados como no hemolítico.

Por otra parte, en cuanto a las formulaciones de nanopartículas de los extractos, el tamaño obtenido con el extracto de *Smilax spp* fue de 138.3 nm con un PDI de 0.173 y para el extracto de *C. pentadactylon* de 149.166 con un PDI de 0.180. Estos tamaños fueron ligeramente menores que aquellos reportados por Martinez Rivas (2018) con nanopartículas del extracto metanólico de *Leucophyllum* y por Armendariz-Barragan (2018) con nanopartículas del extracto metanólico de *Schinus molle*, probablemente debido a la composición química del polímero utilizado. En relación al potencial zeta de las nanopartículas con extracto, se obtuvieron valores positivos mayores a 15 mV, lo cual podría proporcionarle estabilidad a las nanopartículas. (Gómez, 2014).

En relación a la actividad antibacteriana, se observó que las nanopartículas blanco (sin extracto) presentaron pequeños halos de inhibición contra las cinco bacterias evaluadas en este trabajo. Estos resultados coinciden con aquellos reportados por Porras y col (2012) que observaron que las nanopartículas de quitosano poseen inhibición de crecimiento bacteriano al incorporar el extracto de mora. Además, en este trabajo se observó que las nanopartículas poliméricas de Eudragit RSPO muestran una inhibición en el crecimiento bacteriano potencializado al contener los extractos de *Smilax spp.* y *C. pentadactylon* como se muestran en la tabla 10.

Dentro del uso de las nanopartículas poliméricas contra microorganismos, Heya (2021) reportó que NP de Eudragit S100 con extracto de *Euphorbia tirucalli*, disminuía la CMI en comparación con el extracto crudo. Inicialmente se reportaba una CMI de 125 µg/mL para el extracto crudo, mientras que, para la NP-E se obtenía una CMI de 55.55 µg/mL. Estos resultados coinciden con el incremento en la actividad bactericida presentado por las NP con los extractos de *Smilax spp* y *C. pentadactylon*. Las nanopartículas con Smilax favorecieron la inhibición de crecimiento bacteriano contra *E. coli* 25922, *E. faecalis* 29212, *K pneumoniae* 700603 y *P. aeruginosa* 27853. En el caso de las nanopartículas con *C. pentadactylon*, el incremento en la inhibición fue contra *E. coli* 25922, *E. faecalis* 29212, *K pneumoniae* 700603, *P. aeruginosa* 27853 y *A. baumannii* 15308. Este comportamiento puede ser atribuido a las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, ya que su tamaño nanométrico permitiría un mayor contacto superficial entre la bacteria y la nanopartícula con extracto favoreciendo así su actividad biológica (Roduner y col 2006).

10. Conclusiones

En este estudio se determinó que los extractos metanólicos de *Smilax spp* y *C. pentadactylon* presentan una actividad inhibitoria considerable frente a *E. faecalis* 29212 y ningún extracto presentó actividad hemolítica. Se logró integrar estos extractos en nanopartículas poliméricas para obtener formulaciones estables con tamaño y polidispersidad adecuados. Además, la actividad inhibitoria de los extractos nanoformulados contra las bacterias farmacorresistentes fue mejorada.

Se recomienda continuar con la investigación sobre la incorporación de extractos de plantas en nanopartículas para ser aplicados como coadyuvantes terapéuticos en el tratamiento de infecciones ocasionada por microorganismos farmacorresistentes.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Alemán Ponce, J. (2019). *Lectinas de la flor de manita (Chiranthodendron pentadactylon) Purificación y su función vasorelajadora*. Biblioteca Virtual UMSNH. Recuperado de http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/2912
2. Álvarez Castro, E. y Orallo Cambeiro, F. (2003). Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Offarm*, 22(10), 130-140.
3. Armendariz-Barragan, B. (2018). *Nanomedicinas a base de productos naturales para el tratamiento de la tuberculosis* [Tesis de doctorado no publicada]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
4. Betrán A., Cortés A. y López C. (2015). Evaluación de la resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Barbastro (Huesca). *Revista Española de Quimioterapia*, 28(5), 263,264.
5. Cáceres, A., Cruz, S., Martínez, V., & Gattuso, M. (2009). Validación de la actividad biocida e inmunomoduladora del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Smilax domingensis* Willd. cultivado en Guatemala. *Revista de Fitoterapia*, 9(1), 45-48.
6. Campoverde, G. y Aracely, J. (2019). *Estudio farmacognóstico de productos naturales procesados de uso medicinal comercializados en Quito a base de Boldo *Peumus boldus* y de su extracto vegetal* [Tesis de licenciatura no publicada]. Quito: UCE.
7. Calzada F., Juárez T., García-Hernández N., Valdes M., Ávila O., Mulia L. y Velázquez C. (2017). Antiprotozoal, antibacterial, and antidiarrheal properties from the flowers of *Chiranthodendron pentadactylon* and isolated flavonoids.

Pharmacognosy Magazine, 13(50), 240-244.0020.
<https://dx.doi.org/10.4103/0973-1296.204564>

8. Castillo Archila, J., Trejo Diaz, G., Caballero Roque, A., Meza Gordillo, P., Dominguez Espinosa, M., Olivier López F. y Pulido González D. (2016). Evaluación del efecto antibacteriano de extractos de ocho plantas del estado de Chiapas. *LACANDONIA*, 10(1), 7-10.
9. Cavazos-Rodríguez M. (2011). *Encapsulación de moléculas antioxidantes en nanopartículas poliméricas para su aplicación dermatológica* [Tesis de Maestría no publicada]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
10. Centers for Disease Control and Prevention. (24 de noviembre de 2010). *Klebsiella pneumoniae* in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/hai/organisms/klebsiella/klebsiella.html>
11. Centers for Disease Control and Prevention. (24 de noviembre de 2010). Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) and the Clinical Laboratory. <https://www.cdc.gov/hai/settings/lab/vreclinical-laboratory.html>
12. Centers for Disease Control and Prevention. (13 de noviembre de 2019). *Acinetobacter* in Healthcare Settings. <https://www.cdc.gov/hai/settings/lab/vreclinical-laboratory.html>
13. Heya, Michel Stéphane (2021) Actividad antifúngica in vitro de extractos crudos y formulados de *Euphorbia tirucalli*. Doctorado thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León.
14. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. (28 de febrero de 2022). (DataBio) *Pseudomonas aeruginosa*. <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/pseudomonas-aeruginosa>

15. Delgoda, R. (2016). Farmacognosia: Fundamentos, aplicaciones y estrategias. Prensa Académica. 81-86
16. Díaz Pérez, M., Rodríguez Martínez, C. y Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147-161.
17. Durán Lengua, M., Gaitán Ibarra, R., y Olivero Verbel, J. (2013). Búsqueda en bases de datos de actividad biológica de moléculas quinoides. *Revista Cubana de Información en Ciencias de la Salud*, 24(4), 416-430.
18. Espinosa Carranza, N. (2021). *Valoración biofísica del carvacrol nanoencapsulado para su uso como dermoprotector* [Tesis de maestría no publicada]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
19. Espinoza Mijangos, A. (2020). *Actividad antimicrobiana de extractos acuosos de plantas sobre cepas multifarmacorresistentes* [Tesis de licenciatura] Universidad Autónoma de Nuevo León.
20. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J.Ph., Ammoury, N. y Benita, S. (1989). Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics*, 55(1), R1-R4.
21. García Hernández, D. (2009). *Actividad bactericida de los extractos etanólicos : de *Heliopsis longipes*, *Cecropia obtusifolia* y *Gymnosperma glutinosum** [Tesis de licenciatura] Universidad Autónoma de Nuevo León.
22. García Hernández, David Gilberto (2016) Actividad biológica, separación, aislamiento e identificación de metabolitos activos de plantas utilizadas en la

medicina tradicional mexicana. Doctorado thesis, Universidad Autónoma de Nuevo León.

23. Gómez-Gaete, C. (2014). Nanopartículas poliméricas: tecnología y aplicaciones farmacéuticas. *Rev. Farmacol. Chile*, 7(2), 7-16.
24. González Chávez, M. (2010). *Mecanismos de resistencia a carbapenemes en cepas de Acinetobacter baumannii causantes de infecciones intrahospitalarias* [Tesis de licenciatura no publicada]. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.
25. Gunn, J., Che, C.-T. y Farnsworth, N. (2013). Chapter 33 - Diabetes and Natural Products. Watson, R. y Preedy, V. (Eds.), *Bioactive Food as Dietary Interventions for Diabetes* (pp. 381-394). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397153-1.00042-1>
26. Hernandez Iglesias, S. (2020) *Actividad antimicrobiana y antihemolítica del extracto metanólico de Cymbopogon ciratus sobre bacterias de importancia clínica* [Tesis de licenciatura] Universidad Autónoma de Nuevo León.
27. Hernández-Langford, D., Siqueiros-Delgado, M. y Ruíz-Sánchez E. (2020). Nuclear phylogeography of the temperate tree species *Chiranthodendron pentadactylon* (Malvaceae): Quaternary relicts in Mesoamerican cloud forests. *BMC Evol Biol*, 20(1):44. <https://doi.org/10.1186/s12862-020-01605-8>
28. Lister, P., Wolter, D. y Hanson, N. (2009). Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *American Society for Microbiology Journals*, 22(4), 582-610. <https://doi.org/10.1128/CMR.00040-09>

29. López Vargas, J. y Echeverri Toro, Lina. (2009). *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Scielo*, 23(2), 157-161.
30. López S. y López-Brea M. (2000). ¿Qué debemos saber acerca de las infecciones por *Acinetobacter baumannii*? *Elsevier*, 18(3), 153-156.
31. Martínez Rivas, C. J. (2018). Formulación y evaluación biológica de nanomedicinas con extracto del cenizo *Leucophyllum frutescens* (BERL.) IM Johnston (Scrophulariaceae) contra *Mycobacterium tuberculosis* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
32. McMurray, R. L., Ball, M. E. E., Tunney, M. M., Corcionivoschi, N., & Situ, C. (2020). Actividad antibacteriana de cuatro extractos de plantas extraídas de plantas medicinales tradicionales chinas contra *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis*. *Microorganismos*, 8(6), 962.
33. Mesdaghinia, A., Pourpak, Z., Naddafi, K., Nodehi, RN, Alizadeh, Z., Rezaei, S., y Faraji, M. (2019). Un método in vitro para evaluar la hemólisis de glóbulos rojos humanos (RBC) tratados con partículas en suspensión en el aire (PM10). *MethodsX*, 6, 156-161.
34. Moyna, P. (2000). Historia(s) de la sociedad latinoamericana de fitoquímica. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 1(3), 24-26.
35. Ochoa, A., López-Montiel, F., Escalona, G., Cruz-Córdova, A., Dávila, L., López-Martínez, B., Jiménez-Tapia, Y., Giono, S., Eslava, C., Hernández-Castro, R., y Xicohtencatl-Cortes, J. (2013). Características patogénicas de cepas de

Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 70(2), 136-150.

36. Porras, M., Madrigal, S., y Vega-Baudrit, J. (2012). Síntesis de nanopartículas poliméricas de quitosano funcionalizadas con extractos de la mora (*Rubus glaucus*) y su evaluación preliminar como agentes antimicrobianos. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia*, 22(1), 81-91.
37. Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44(5), 464-475.
38. Roduner, E. (2006). Size matters: why nanomaterials are different. *Chemical society reviews*, 35(7), 583-592.
39. Ruiz-Reyes, E., y Suarez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 9-24.
40. Salas, C. (2014). *Elaboración y evaluación del material didáctico variedades enterovirulentas de Escherichia coli* [Tesis de licenciatura no publicada]. Universidad Autónoma de México.
41. Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S.L., & García-Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 77-100
42. Sánchez-Saldaña, L., y Sáenz-Anduaga, E. (2006). Infecciones cutáneas bacterianas. *Dermatología Peruana*, 16(1), 7-31.

43. Soledispa Cañarte, P., Mangas Marín, R., García Mir, V., Miranda Martínez, M., Matute Jimbo, C. y Tello, Mayorga, A. (2022). Estudio farmacognóstico y capacidad antioxidante de la especie *Smilax purhampuy* Ruiz que crece en Ecuador. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*, 10(3), 387-396. https://doi.org/10.56499/jppres21.1303_10.3.387
44. Song-Tao, W., Zhao, Y., Xiang-Ling, P., Qiu, L., Huang, Y. y Xiao-Ge, C. (2023). The active components of *Smilax china* L. against cancer by interfering with the interactions among associated proteins. *Journal of Functional Foods*, 106, 105591. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105591>
45. Travieso Novelles, M., Rubio Ortega, A., y Pino Pérez, O. (2019). Las nanopartículas a partir de plantas como base para el diseño de nuevos antimicrobianos. *Revista Cubana de Farmacia*, 51(4). Recuperado de <http://www.revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/263/178>
46. Urrejola, C., Soto, L., Zumarán, C., Peñaloza, J., Álvarez, B., Fuentesvilla, I. & Haidar, Z. (2018) Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: estructura, métodos de elaboración, características, propiedades, biofuncionalización y tecnologías de autoensamblaje capa por capa (layer-by-layer self-assembly). *International Journal of Morphology*, 36(4), 1463-1471. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022018000401463>
47. Velázquez, C., Correa-Basurto, J., Garcia-Hernandez, N., Barbosa, E., Tesoro-Cruz, E., Calzada, S., y Calzada, F. (2012). Anti-diarrheal activity of (–)-Epicatechin from *Chiranthodendron pentadactylon* Larreat: Experimental and computational studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 143(2), 716-719. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.039>
48. Verde-Star, M.J., García-González, S., & Rivas-Morales, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Rivas-Morales, C., Oranday-

Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España: OmniaScience. 1-40

49. Vergara López, S. (2015). *Estudio clínico y epidemiológico de un brote nosocomial producido por Klebsiella oxytoca productora de IMP-8* [Tesis de doctorado] Universidad de Sevilla.

50. Wilson, L. (2016). Spices and Flavoring Crops: Tubers and Roots. Caballero, R., Finglas, P. y Toldra, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 93-97). Elsevier Science & Technology. ISBN: 978-0-12-384947-2

51. Yılmaz Sarıaltın, S., Çiçek Polat, D. y Özgür Yalçın, C. (2023). Cytotoxic and antioxidant activities and phytochemical analysis of *Smilax excelsa* L. and *Aegopodium podagraria* L. *Food Bioscience*, 52(1), 102359. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102359>