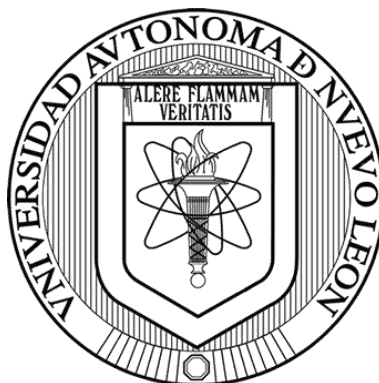


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS EN NANOPARTÍCULAS  
DE *CALENDULA OFFICINALLIS* CON EXTRACTOS DE OTRAS PLANTAS  
MEDICINALES SOBRE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* (ATCC 700603) Y  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* (ATCC 27853)

Por

LBG. Fernanda Godínez Herrera

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

2025

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS EN NANOPARTÍCULAS  
DE *CALENDULA OFFICINALLIS* CON EXTRACTOS DE OTRAS PLANTAS  
MEDICINALES SOBRE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* (ATCC 700603) Y  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* (ATCC 27853)

**Comité de Tesis**



---

**Dra. Catalina Rivas Morales**

Presidente



---

**Dr. David Gilberto García Hernández**

Secretario



---

**Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez**

Vocal



---

**Dra. Catalina Leos Rivas**

Vocal



---

**Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández**

Vocal



---

**Dra. Katiushka Arévalo Niño**  
Subdirector de posgrado



SUBDIRECCIÓN  
DE POSGRADO

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS EN NANOPARTÍCULAS  
DE *CALENDULA OFFICINALLIS* CON EXTRACTOS DE OTRAS PLANTAS  
MEDICINALES SOBRE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* (ATCC 700603) Y  
*PSEUDOMONAS AERUGINOSA* (ATCC 27853)

**Dirección de Tesis**



---

**Dra. Catalina Rivas Morales**

Directora Interna



---

**Dra. Rocío Álvarez Román**

Directora externa

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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Para la Universidad Autónoma de Nuevo León, una institución con excelencia académica e investigación que me permitió concluir mi formación académica e impulsarme de manera profesional.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo otorgado con la beca nacional para estudios de posgrado 2023-2 para el desarrollo de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y en particular al Laboratorio de Química Analítica por el apoyo de los recursos y la orientación en la realización de esta investigación.

A mis asesores, la Dra. Catalina Rivas por su guía y fe en mí persona y en el proyecto. A los doctores David Gilberto y Sergio Galindo por los conocimientos compartidos sobre microbiología y nanopartículas sin los cuales no hubiese podido llevar a cabo este proyecto. A las doctoras Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández y Dra. Rocío Álvarez Román por ser parte de mi comité. A la Dra. Catalina Leos por su apoyo en la retribución social, al igual, en darme la confianza de compartir mis conocimientos prácticos con los grupos de LCAs y QBPs.

A la MC. Rubí Alvarado por su paciencia y por compartirme sus conocimientos tanto en la formulación de las nanopartículas como en dudas académicas.

## DEDICATORIA

Los consejos proporcionados, las experiencias compartidas y los conocimientos transmitidos me han permitido crecer tanto en el ámbito profesional como en el personal. Sus palabras de aliento, confianza y motivación constante me han impulsado a convertirme en lo que soy hoy en día. Este logro también es de ustedes.

Este proyecto es resultado también del trabajo de equipo, del compañerismo desinteresado y la alegría del trabajo bien hecho. A mis compañeros de laboratorio alias Cuadro chico, sin quienes no hubiese encontrado el apoyo académico, físico y hasta emocional a lo largo de este tiempo. Sebas, Marce, Ale, Erick, Princesa, Cesar, Ana, Isra, Dani, esto no habría sido lo mismo sin ustedes. Gracias por coincidir y haber estado presentes en esas noches de desvelo, fines de semana y “pijamadas” para sacar resultados.

A Maximiliano, quien ha sido un apoyo constante en mi día a día. Tu paciencia infinita para ayudarme a encontrar soluciones, desde la más simple hasta la más compleja, ha sido fundamental para poder llegar hasta aquí. Por creer en mis capacidades cuando yo misma dudaba, por impulsarme a dar siempre lo mejor de mí y por ser esa voz de cordura que me ayudó a mantener los pies en la tierra sin perder de vista el objetivo.

A mi abuela y mi nana, quienes a pesar de los kilómetros que nos separan, su presencia se siente en cada momento importante de mi vida. No solo han sido testigos de mi crecimiento, sino, también sido las arquitectas de la persona en la que me estoy convirtiendo.

A mi hermana Vicky y mis primos Ahirton, Yael y Diana, con quienes tengo el privilegio de compartir no solo momentos, sino preocupaciones, anhelos y sueños. Sus risas y su entusiasmo contagioso han alegrado mis días grises. Gracias por ser mis cómplices, mis confidentes y mis ejemplos de fortaleza.

# ÍNDICE

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN.....                                                                                         | 1  |
| ABSTRACT.....                                                                                        | 2  |
| 7.0- INTRODUCCIÓN .....                                                                              | 3  |
| 2.-ANTECEDENTES.....                                                                                 | 5  |
| 2.1.-Uso de plantas medicinales .....                                                                | 5  |
| 2.1.1.- <i>Calendula officinalis</i> .....                                                           | 5  |
| 2.1.2.- <i>Mentha piperita</i> .....                                                                 | 7  |
| 2.1.3.- <i>Foeniculum vulgare</i> .....                                                              | 8  |
| 2.1.4.- <i>Tagetes lucida</i> .....                                                                  | 9  |
| 2.2.-Sinergismo .....                                                                                | 11 |
| 2.3.-Farmacorresistencia .....                                                                       | 11 |
| 2.4.- Bacterias en estudio .....                                                                     | 12 |
| 2.4.1.- <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....                                                           | 12 |
| 2.4.2.- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....                                                          | 13 |
| 2.5.-Nanopartículas .....                                                                            | 14 |
| 2.5.1.-Nanopartículas poliméricas .....                                                              | 15 |
| 2.5.6.- Método de Nanoprecipitación.....                                                             | 15 |
| Eudragit L-100 ® .....                                                                               | 16 |
| 3.0.-JUSTIFICACIÓN.....                                                                              | 17 |
| 4.0.- HIPÓTESIS.....                                                                                 | 18 |
| 5.1.-Objetivo general.....                                                                           | 19 |
| 5.2. Objetivos específicos .....                                                                     | 19 |
| 6.0.-MATERIALES Y MÉTODOS .....                                                                      | 20 |
| 6.1.-Material biológico:.....                                                                        | 20 |
| 6.2.-Obtención de extractos de diferente polaridad .....                                             | 20 |
| 6.3.-Pruebas de solubilidad .....                                                                    | 21 |
| 6.4.-Tamizaje fitoquímico para identificación de grupos funcionales mediante pruebas coloridas ..... | 21 |

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 6.4.1.-Alcaloides.....                                                                                      | 22 |
| 6.4.2.-Flavonoides.....                                                                                     | 22 |
| 6.4.3.-Sesquiterpenlactonas .....                                                                           | 23 |
| 6.4.4.-Carbohidratos .....                                                                                  | 23 |
| 6.4.5.-Cumarinas .....                                                                                      | 23 |
| 6.4.6.-Esteroles y triterpenos .....                                                                        | 23 |
| 6.4.7.-Oxhidrilos fenólicos (taninos vegetales).....                                                        | 24 |
| 6.4.8.-Insaturaciones .....                                                                                 | 24 |
| 6.5 – Activación de cepas <i>K. pneumoniae</i> ATTC 700603 y <i>P. aeruginosa</i> ATTC 27853 ..             | 24 |
| 6.5.1-Escalamiento McFarland de <i>K. pneumoniae</i> ATTC 700603 y <i>P. aeruginosa</i><br>ATTC 27853 ..... | 25 |
| 6.6 -Difusión en placa por pozo y disco de extractos en sinergia .....                                      | 25 |
| 6.7 -Prueba mínima inhibitoria (CMI) de extractos bioactivos .....                                          | 26 |
| 6.8 -Prueba de toxicidad por el método de hemólisis .....                                                   | 27 |
| 6.9 -Nanoprecipitación del extracto bioactivo .....                                                         | 29 |
| 6.10 – Prueba mínima inhibitoria (CMI) del extracto en nanopartículas.....                                  | 29 |
| 6.11 – Prueba de toxicidad por el método de hemólisis del extracto en nanopartículas..                      | 30 |
| 7.0 -ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....                                                                             | 31 |
| 8.0.-RESULTADOS .....                                                                                       | 32 |
| 8.1. Rendimiento y pruebas de solubilidad de extractos.....                                                 | 32 |
| 8.2.-Tamizaje fitoquímico para identificación de grupos funcionales mediante pruebas<br>coloridas .....     | 33 |
| 8.3.-Difusión en placa por pozo de extractos en sinergia.....                                               | 34 |
| 8.4.-Prueba mínima inhibitoria (CMI) de extractos bioactivos .....                                          | 35 |
| 8.5.-Prueba de toxicidad por el método de hemólisis .....                                                   | 36 |
| 8.6.- Nanoprecipitación del extracto bioactivo .....                                                        | 37 |
| 8.7.-Prueba mínima inhibitoria (CMI) del extracto en nanopartículas .....                                   | 38 |
| 8.8.-Prueba de toxicidad por el método de hemólisis del extracto en nanopartículas .....                    | 38 |
| 9.0.-DISCUSIÓN .....                                                                                        | 40 |
| 10.0.- CONCLUSIONES .....                                                                                   | 44 |
| 12.0.- REFERENCIAS.....                                                                                     | 46 |



## ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla     | Título                                                                                                                | Página |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>1</b>  | Taxonomía de <i>Calendula offiinalis</i>                                                                              | 6      |
| <b>2</b>  | Taxonomía de <i>Mentha piperita</i>                                                                                   | 8      |
| <b>3</b>  | Taxonomía de <i>Foeniculum vulgare</i>                                                                                | 9      |
| <b>4</b>  | Taxonomía de <i>Tagetes lucida</i>                                                                                    | 10     |
| <b>5</b>  | Taxonomía de <i>Klebsiella pneumoniae</i>                                                                             | 13     |
| <b>6</b>  | Taxonomía de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                                                            | 14     |
| <b>7</b>  | Solventes utilizados en la prueba de solubilidad de extractos metanólicos y hexánicos                                 | 21     |
| <b>8</b>  | Tratamientos para prueba de toxicidad                                                                                 | 27     |
| <b>9</b>  | Control negativo para prueba de toxicidad                                                                             | 28     |
| <b>10</b> | Blanco 1 para prueba de toxicidad                                                                                     | 28     |
| <b>11</b> | Resultados obtenidos en la prueba de solubilidad en extractos metanólicos y hexánicos                                 | 32     |
| <b>12</b> | Tamizaje fitoquímico de extractos hexánicos de plantas en estudio                                                     | 33     |
| <b>13</b> | Tamizaje fitoquímico de extractos metanólicos de plantas en estudio                                                   | 33     |
| <b>14</b> | Inhibición de extractos hexánicos sobre <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603                                              | 34     |
| <b>15</b> | Inhibición de extractos metanólicos sobre <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603                                            | 34     |
| <b>16</b> | Inhibición de extractos hexánicos sobre <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853                                               | 35     |
| <b>17</b> | Inhibición de extractos metanólicos sobre <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853                                             | 35     |
| <b>18</b> | Formulaciones de nanopartículas con el polímero Eudragit L-100® (Tratamiento y blanco)                                | 37     |
| <b>19</b> | Comparación del porcentaje hemolítico de la aplicación de la combinación bioactiva libre y aplicada en nanopartículas | 39     |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| <b>Figura</b> | <b>Título</b>                                                                                                                               | <b>Página</b> |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1             | <i>Calendula offiinalis</i>                                                                                                                 | 6             |
| 2             | <i>Mentha piperita</i>                                                                                                                      | 8             |
| 3             | <i>Foeniculum vulgare</i>                                                                                                                   | 9             |
| 4             | <i>Tagetes lucida</i>                                                                                                                       | 10            |
| 5             | Fórmula química de Eudragit L-100 ®, ésteres de ácido acrílico y metacrílico                                                                | 16            |
| 6             | Metodología de concentración mínima inhibitoria en placa de 96 pocillos con caldo Müller Hinton de los extractos individuales y en sinergia | 26            |
| 7             | Hemólisis del extracto metanólico de <i>C. officinalis</i>                                                                                  | 36            |
| 8             | Hemólisis del extracto de metanólico de <i>T. lucida</i>                                                                                    | 36            |
| 9             | Hemólisis de la combinación con mayor bioactividad                                                                                          | 37            |
| 10            | Grafica de comparación del porcentaje hemolítico de la aplicación de la combinación bioactiva libre y aplicada en nanopartículas            | 39            |

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

| Abreviatura | Equivalencia                    |
|-------------|---------------------------------|
| g           | Gramos                          |
| mg          | Miligramos                      |
| L           | Litro                           |
| mL          | Mililitro                       |
| μL          | Microlitro                      |
| μg          | Microgramo                      |
| ppm         | Partes por millón               |
| pH          | Potencial de hidrógeno          |
| nm          | nanómetro                       |
| mm          | Milímetro                       |
| cm          | Centímetro                      |
| h           | Hora                            |
| °C          | Grados centígrados              |
| UFC         | Unidades formadoras de colonias |
| rpm         | Repeticiones por minuto         |
| α           | Alfa                            |

## RESUMEN

Actualmente se ha descrito y notificado un incremento en los niveles de resistencia de microorganismos, tales como las bacterias causantes de septicemia en hospitales se han un incremento en promedio del 50%. Los métodos más utilizados para combatir este tipo de infecciones son los antibióticos, los cuales se tiene reportado resistencia bacteriana hasta en los de tercera generación. Para contrarrestar esta problemática se ha implementado el uso de plantas medicinales, como método alternativo, así como, su uso en conjunto con antibióticos. Se ha propuesto el uso de nanopartículas para incrementar el efecto antimicrobiano de fármacos ya que proporciona especificidad y protección al principio activo. Por tal motivo en este proyecto se plantea evaluar la inhibición de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, bacterias con farmacorresistencia, implementando nanopartículas cargadas de la combinación bioactiva de los extractos de diferente polaridad realizados con plantas medicinales; teniendo *Calendula officinalis* con *Tagetes lucida*, *C. officinalis* con *Foeniculum vulgare*, *C. officinalis* con *Mentha piperita*, *T. lucida* con *F. vulgare*, *T. lucida* con *M. piperita*, y *M. piperita* con *F. vulgare* (6 combinaciones a proporción 1:1 para cada polaridad). Se realizaron pruebas preliminares de difusión en pozo para ambas polaridades de extractos (hexano y metanol), donde los extractos hexánicos obtuvieron halos de inhibición nulos, mientras que los metanólicos mostraron halos mínimos y nulos. La combinación 1:1 de *C. officinalis* con *T. lucida* obtuvo la mayor bioactividad presentando halos de 4 mm sobre *K. pneumoniae* y 2 mm en *P. aeruginosa* a una concentración de 4,000 ppm. La CMI de los extractos individuales de *C. officinalis* y *T. lucida* sobre la bacteria *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 dieron una inhibición con 1,250 ppm, a su vez, la combinación (1:1) de *C. officinalis* y *T. lucida* mostró una inhibición a 1,000 ppm y actividad bacteriostática a 500 ppm. Por la parte de toxicidad, se realizó una prueba de hemólisis para los extractos individuales y la combinación (1:1); *C. officinalis* manifestó porcentajes altamente hemolíticos con 71.7% a 200 ppm, por otro lado, el extracto de *T. lucida* arroja un 3.3% y la combinación (1:1) 4.5% a 100 ppm. Por el método de nano-precipitación se obtuvieron 2 formulaciones con el polímero Eudragit L-100®, donde, se seleccionó la formulación 2 por tener parámetros óptimos: una media de tamaño de 173.3 nm, un índice de polidispersidad cercano a 0.200, y un potencial Z de -0.238. La CMI realizada a las nanopartículas cargadas se redujo de 1,250 ppm (combinación libre) a solo 208 ppm (nanopartículas), representando una disminución del 83.36%. Aunque se esperaba que la aplicación de nanopartículas también redujera la toxicidad, no observamos diferencias significativas entre la combinación libre y las nanopartículas cargadas a concentraciones iguales. Sin embargo, considerando la excelente reducción en la concentración efectiva y la ventaja de las propiedades dependientes del pH del polímero, nuestras nanopartículas representan una alternativa prometedora para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes.

## ABSTRACT

Currently, an increase in the levels of resistance among microorganisms has been described and reported, with an average increase of 50% in the case of bacteria that cause sepsis in hospitals. The most commonly used methods to combat these types of infections are antibiotics, with bacterial resistance reported even in third-generation antibiotics. To counteract this knowledge, the use of medicinal plants has been implemented as an alternative method, as well as their use in conjunction with antibiotics. The use of nanoparticles has been proposed to enhance the antimicrobial effect of drugs, as they provide specificity and protection to the active ingredient. Therefore, this project aims to evaluate the inhibition of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*, drug-resistant bacteria, by implementing nanoparticles loaded with the bioactive combination of extracts of different polarities made from medicinal plants. Having as combinations: *Calendula officinalis* with *Tagetes lucida*, *C. officinalis* with *Foeniculum vulgare*, *C. officinallis* with *Mentha piperita*, *T. lucida* with *F. vulgare*, *T. lucida* with *M. piperita*, and *M. piperita* with *F. vulgare* (6 combinations at a 1:1 proportion for each polarity). Preliminary well diffusion tests were performed for the extracts of both polarities (hexane and methanol), where the hexane extracts obtained zero inhibition halos, while the methanolic ones showed minimal and zero halos. The 1:1 combination of *C. officinalis* with *T. lucida* obtained the highest bioactivity presenting halos of 4 mm on *K. pneumoniae* and 2 mm in *P. aeruginosa* at a concentration of 4,000 ppm. The MIC of individual extracts of *C. officinallis* and *T. lucida* on *K. pneumoniae* ATCC 700603 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 bacteria showed inhibition at 1,250 ppm, while the 1:1 combination of *C. officinallis* and *T. lucida* showed inhibition at 1,000 ppm and bacteriostatic activity at 500 ppm. Regarding toxicity, a hemolysis test was performed for the individual extracts and the 1:1 combination; *C. officinalis* showed highly hemolytic percentages of 71.7% at 200 ppm, while the *T. lucida* extract showed 3.3% and the 1:1 combination 4.5% at 100 ppm. Two formulations with the Eudragit L-100® polymer were obtained by the nanoprecipitation method, formulation 2 was selected for its optimal parameters: an average particle size of 173.3 nm, a polydispersity index near 0.200, and a Z potential of -0.238. The MIC of the loaded nanoparticles was reduced from 1,250 ppm (free combination) to only 208 ppm (nanoparticles), representing a decrease of 83.36%. Although the application of nanoparticles was expected to also reduce toxicity, no significant differences were observed between the free combination and the nanoparticles at equal concentrations. However, considering the excellent reduction in effective concentration and the advantage of the polymer's pH-dependent properties, our nanoparticles represent a promising alternative for the treatment of infections caused by multidrug-resistant bacteria.

## 7.0- INTRODUCCIÓN

Las infecciones por microorganismos han existido a la par de nuestra existencia, sin embargo, no fue hasta hace tres siglos que se definió que eran agentes causantes de las mismas. (Regino, W. O. 2022). Civilizaciones antiguas como Egipto son consideradas pioneras en el área médica, brindando textos médicos con contenido de recetas para diferentes dolencias presentadas en esa época. Algunos de sus ingredientes utilizados eran minerales, plantas, y productos animales. El papiro Ebers abarca el uso de plantas como ajo, opio, café, cannabis y variedades con propiedades purgantes (NatGeo, 2021). A su vez, los griegos contaban con conocimientos médicos estructurados. Su principal consumo para la realización de rituales consistía en el uso de plantas con propiedades alucinógenas como el opio, cannabis, mandrágora, belladona y beleño (Burga Muñoz, R. B., & Quispe Chilón, M. E., 2022). En México, el uso de las plantas medicinales sigue siendo una práctica reconocida y estructurada. A partir de la conquista, los conocimientos holísticos evolucionaron al grado de integrar diferentes conocimientos, usos y especies. Estos conocimientos se han pasado de generación en generación, al grado que hoy en día se mantiene el conocimiento vivo en la cultura del país (Peralta Vázquez, C., 2022). Hoy en día contamos con métodos de la medicina moderna a nivel mundial, incluyendo a los antibióticos para combatir infecciones microbianas. Se tiene una clasificación de antibióticos de amplio espectro y de espectro reducido, la diferencia radica en los grupos en los que pueden actuar. Los antibióticos de amplio espectro pueden actuar contra una variedad grande de bacterias, como las Gram positivas y Gram negativas. Por otro lado, los antibióticos de espectro reducido solo son efectivos contra un grupo específico de bacterias (Brugueras, M. & García, M., 1998).

Aunque el uso de los antibióticos fue innovador, se está presentando una problemática global. En 2018, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (Cofepris) determinó la resistencia antimicrobiana (RAM) como una respuesta de los microorganismos a adaptarse por mecanismos variados a la exposición de los fármacos antimicrobianos, teniendo como resultado una ineficiencia a tratamientos e incremento en el riesgo de propagación de enfermedades.

Según la OMS (2021), se han reportado elevados niveles de resistencia (> 50%) en bacterias que causan septicemia en hospitales. Para combatirlas se utilizan los antibióticos convencionales, a los cuales no responden con eficiencia. En México (2022), las principales infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS), arrojaron un incremento en las infecciones bacterianas relacionadas a neumonías asociadas a ventilador, vías urinarias y en torrente sanguíneo ligadas a catéteres, incisiones profundas, y tejidos blandos. Donde, las principales bacterias causantes fueron *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Acinetobacter baumannii*.

## **2.-ANTECEDENTES**

### **2.1.-Uso de plantas medicinales**

El uso de las plantas para el beneficio de los humanos se remonta desde el principio de nuestra existencia. Las plantas han sido utilizadas como alimento, vestimenta, ornamentación; con fines aromáticos, recreativos, ritualísticos y medicinales a lo largo de los siglos. Por lo tanto, el estudio de estas se ha vuelto de suma importancia en muchas culturas.

Se utilizan las diferentes partes de la planta, esto dependiendo de la afección que se presente y el resultado específico que se busca lograr. Las partes más comunes que se llegan a utilizar son las hojas y las flores, en algunos casos es el tallo o la raíz. A sí mismo, varia el método de consumo, ya que puede ser consumido directamente (masticado), prepararse en infusiones, de manera homeopática o inhaladas (Guzmán M. et al, 2017).

#### **2.1.1.-*Calendula officinalis***

*Calendula officinalis* es conocida como botón de oro, caléndula, flor del muerto, mercadela, o maravilla. Ha llegado a tener un impacto a nivel mundial gracias a su aporte como hierba medicinal, tinte para telas, productos de alimentación y cosméticos. Su uso data de siglos atrás, fue utilizada por los antiguos griegos, egipcios, hindúes y árabes (Figura 1 y Tabla 1).

*C. officinalis* es una planta anual de un color verde claro, sus hojas son color verde oscuro y oblongo-lanceoladas, mientras que sus flores son de un color que va desde el amarillo hasta el anaranjado. Al ser anual, se cultiva y una vez florecida, se desecha. En la industria, se cultivan en viveros a una temperatura controlada de 2 a 6°C de noche y 20°C en el día. Tiene un poco o nula exigencia respecto al suelo donde se cultiva, aunque, se ha notado que crece mejor en suelos arcillosos. Tiene como principales plagas las larvas de

mariposas y polillas, pulgón, mosca blanca, caracoles y babosas (Lastra Valdés, H. & Piquet García, R., 1999)

Debido a la importancia de *C. officinalis* en el área médica, se han llevado a cabo diversas investigaciones. Están han reportado actividad analgésica, antiinflamatoria, hemostática, antibacteriana, antiviral, antifúngica, inmunoestimulante, y cicatrizante en sus componentes activos, también, se ha demostrado que disminuye la producción de caries, detiene procesos inflamatorios, disminuye el tiempo de cicatrización de heridas y cura infecciones (Diego, M. P., 2013)



Figura 1. *Calendula officinalis*

| Tabla 1. Taxonomía de <i>Calendula offiinalis</i> |                                     |
|---------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Reino                                             | <b>Plantae</b>                      |
| División                                          | <b>Magnoliophyta</b>                |
| Clase                                             | <b>Magnoliopsida</b>                |
| Subclase                                          | <b>Asteridae</b>                    |
| Orden                                             | <b>Asterales</b>                    |
| Familia                                           | <b>Asteraceae</b>                   |
| Genero                                            | <b><i>Calendula</i></b>             |
| Especie                                           | <b><i>Calendula officinalis</i></b> |

### 2.1.2.-*Mentha piperita*

*Mentha piperita*, también conocida como menta negra, es una especie híbrida estéril obtenida de la cruce de *Mentha aquatica* (menta acuática) y *Mentha spicata* (hierbabuena). Esta cruce crece esporádicamente en zonas templadas de Europa, donde se cultiva artificialmente desde el siglo XVII en Inglaterra. Gracias a su esterilidad prácticamente se propaga a partir de rizomas subterráneos, volviéndose una planta invasiva en ambos hemisferios (Hudz, N. et al, 2023).

La menta negra es una hierba permanente aromática que siempre se encuentra de color verde característico. Llega a medir de 40 a 80 cm de altura de forma erecta y lisa, sus tallos cuadrangulares son generalmente de un tono rojizo y velludos, con hojas opuestas de borde aserrado de 4.5 a 8.5 cm de largo y de 0.8 a 2 cm de ancho (Figura 2 y Tabla 2). Las flores de la *M. piperita* son de un tono entre rosado y violeta o púrpura de 4 a 5 cm de altura dispuestas en espigas terminales. El fruto está compuesto de 2 a 4 aquenios ovoides lisos y oscuros de aproximadamente 0.8 mm de largo (Siddeeg, A. et al, 2018).

Se han detectado diferentes usos medicinales para la menta, entre todas sus propiedades tenemos su actividad antiinflamatoria, analgésica y antibacteriana. La infusión de las hojas secas se ha utilizado a lo largo de los siglos para aliviar cólicos, hinchazón abdominal, estreñimiento, bronquitis, asma, hemorroides, descongestionante nasal, dolores musculares y combatir las bacterias que generan el mal aliento (Siddeeg, A. et al, 2018). Actualmente podemos encontrar la menta en productos de higiene bucal, como ingrediente en recetas de comida, y en productos farmacéuticos como antiinflamatorios (Muñoz, V. et al, 2022).



Figura 2.- *Mentha piperita*

| Tabla 2. Taxonomía de <i>Mentha piperita</i> |                               |
|----------------------------------------------|-------------------------------|
| Reino                                        | <b>Plantae</b>                |
| División                                     | <b>Magnoliophyta</b>          |
| Clase                                        | <b>Magnoliopsida</b>          |
| Orden                                        | <b>Lamiales</b>               |
| Familia                                      | <b>Lamiaceae</b>              |
| Genero                                       | <b><i>Mentha</i></b>          |
| Especie                                      | <b><i>Mentha piperita</i></b> |

### 2.1.3.- *Foeniculum vulgare*

*Foeniculum vulgare* (*Apiaceae*) comúnmente conocida como hinojo, es una conocida e importante planta medicinal y aromática ampliamente utilizada como carminativa, digestiva, lactogoga, diurética y en el tratamiento de trastornos respiratorios y gastrointestinales (Figura 3 y Tabla 3). Se ha informado que los fenoles, glucósidos fenólicos y compuestos aromáticos volátiles como el transanetol, tragol y la ferchona son los principales fitoconstituyentes de esta especie (Rather, M.A., et al., 2012)

Diferentes experimentos farmacológicos en varios modelos *in vitro* e *in vivo* han demostrado de manera convincente la capacidad de *F. vulgare* para exhibir actividades

antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes, antitrombóticas y hepatoprotectoras, lo que respalda la justificación de varios de sus usos terapéuticos.



Figura 3.- *Foeniculum vulgare*

| Tabla 3. Taxonomía de <i>Foeniculum vulgare</i> |                                  |
|-------------------------------------------------|----------------------------------|
| Reino                                           | <b>Plantae</b>                   |
| División                                        | <b>Magnoliophyta</b>             |
| Clase                                           | <b>Magnoliopsida</b>             |
| Orden                                           | <b>Apiales</b>                   |
| Familia                                         | <b>Apiaceae</b>                  |
| Genero                                          | <b><i>Foeniculum</i></b>         |
| Especie                                         | <b><i>Foeniculum vulgare</i></b> |

#### 2.1.4.-*Tagetes lucida*

*Tagetes lucida*, también conocida como yerbaniz o pericón, es nativa de México y Guatemala, donde crece en llanos, campos y a orillas de las carreteras; también se le ha encontrado en zonas de bosques templados. En la república mexicana se puede encontrar en los estados de climas templados, como por ejemplo en zonas de bosque pino-encino, selva baja caducifolia y zonas de transición, donde crece silvestremente (INAH, 2019).

La yerbaniz es una hierba permanente que llega a medir 80 cm de alto, tiene tallos glabros medianamente ramificados desde la base, y sus hojas son enteras, sésiles, de forma linear a oblanceoladas, con un margen aserrado y el ápice redondeado. Las inflorescencias son

cabezuelas agrupadas en corimbos, estos contienen flores de color amarillo ligadas de 3 a 4 y en el disco de 5 a 8, las cuales al momento de estrujarse segregan un olor característico a anís. El fruto tiende a ser una cipsela negruzca linear claviforme con un vilano de dos escamas aristiformes. Su temporada de floración radica desde septiembre hasta noviembre (Velasco, R. et al, 2019).

El yerbanis se ha utilizado a lo largo de los años como planta medicinal para problemas digestivos como cólicos intestinales, diarrea, disentería, parásitos, flatulencias, vómito, empacho y tifoidea. También, se tiene registro de su uso para contrarrestar padecimientos del sistema circulatorio como son las varices, en problemas respiratorios como resfriados y asma, y a su vez para problemas ginecológicos, ya que tiene propiedades abortivas. Cabe mencionar que en algunas culturas se sigue utilizando para los temazcales y las “limpias”. En el área de investigación médica se han realizado estudios con ratones para tratar padecimientos relacionados con la ansiedad, donde se corroboró que las propiedades del yerbanis sirven como ansiolítico y sedante-hipnótico (Velasco, R. et al, 2019).



Figura 4.- *Tagetes lucida*

| Tabla 4. Taxonomía de <i>Tagetes lucida</i> |                              |
|---------------------------------------------|------------------------------|
| Reino                                       | <b>Plantae</b>               |
| División                                    | <b>Magnoliopsida</b>         |
| Orden                                       | <b>Asterales</b>             |
| Familia                                     | <b>Asteraceae</b>            |
| Genero                                      | <b><i>Tagetes</i></b>        |
| Especie                                     | <b><i>Tagetes lucida</i></b> |

## 2.2.-Sinergismo

Se sabe que las plantas medicinales contienen compuestos simples y complejos, la presencia de estos compuestos varían entre cada especie. Cada compuesto se encuentra ligado a los mecanismos evolutivos que desarrolla cada especie, tales como son mecanismos de defensa, de adaptación al medio ambiente, y de sus interacciones biológicas. En el método de extracción de metabolitos se tiene que tomar en cuenta la naturaleza de cada compuesto, esto para seleccionar el solvente con polaridad adecuada.

Se ha investigado últimamente la sinergia entre extractos de plantas con antibióticos para incrementar el efecto contra las bacterias farmacorresistentes. Mathew Gideon y Zakari Ladan (2022) lograron obtener una sinergia repetitiva constante en combinaciones de extracto de *Calotropis procera* con diferentes antibióticos (amoxicilina, ampicilina y azitromicina), obteniendo zonas de inhibición más altas para *Salmonella spp*, *shigella spp*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus spp*.

## 2.3.-Farmacorresistencia

El uso de los antibióticos en su momento fue un desarrollo innovador que revolucionó la industria farmacéutica, aunque, en la actualidad se están volviendo obsoletos. La CDC en 2020 declaró que la mala administración, la automedicación y la exposición constante de los fármacos ha desencadenado que diversos organismos (bacterias, hongos y virus) generen resistencia. En 2017, la Organización mundial de la salud (OMS) publicó la lista global de bacterias resistentes con prioridad en la investigación de nuevos fármacos. En esta lista, las bacterias ESKAPE ocupan las primeras posiciones, colocadas en la clasificación como:

- Críticamente prioritarias: *Acitenobacter baumannii*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter spp*.
- Altamente prioritarias: *Enterococcus faecium* y *Staphylococcus aureus*

La OMS en 2021 proclamó la resistencia a antimicrobianos como una de las principales amenazas a la salud pública, reportando elevados niveles de resistencia, mayores al 50%, en bacterias que causan septicemia en hospitales. Esto no solo llega a amenazar los logros que se han obtenido con la medicina moderna, sino que también podrían ocasionar una crisis financiera mundial.

El Grupo de Coordinación Interorganismos sobre Resistencia a los Antimicrobianos (IACG) de las Naciones Unidas enfatizó que se podría llegar a 10 millones de defunciones anuales para el 2050, estimando que en el 2030 incrementa la pobreza extrema hasta 21 millones de personas.

Para las infecciones urinarias, la septicemia y algunas formas de diarrea se han reportado tasas elevadas de resistencia, lo que conlleva a un agotamiento de antibióticos eficaces. Por ejemplo, en el caso de *Klebsiella pneumoniae* se ha encontrado una tasa de resistencia al ciprofloxacino entre 4,1% y 79,4% según el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos y de su Uso (Protección contra riesgos sanitarios, 2018).

## **2.4.- Bacterias en estudio**

### **2.4.1.- *Klebsiella pneumoniae***

*K. pneumoniae* es una bacteria Gram negativa, encapsulada, no móvil, fermentadora de lactosa, anaerobia facultativa está presente en nuestra flora normal de la piel, la boca y los intestinos. Esta especie de *Klebsiella* desempeña un importante papel como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas, debido a su capacidad de causar infecciones severas y potencialmente mortales en pacientes sanos e inmunocomprometidos, asociándose a neumonías, infecciones en el tracto urinario, bacteriemias, abscesos hepáticos, y endoftalmitis (Tabla 6). Se le atribuye al éxito patogénico la presencia de factores de virulencia como sistemas de captación de hierro, vías del metabolismo de la

alantoína, porinas, sistemas de expulsión, fimbrias kpc, producción de polisacárido capsular y lipopolisacárido, y a su vez la presencia de genes de resistencia (Molina Vieira, A., 2021).

| Tabla 5. Taxonomía de <i>Klebsiella pneumoniae</i> |                                     |
|----------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Dominio                                            | <b>Bacteria</b>                     |
| Filo                                               | <b>Proteobacteria</b>               |
| Clase                                              | <b>Gammaproteobacteria</b>          |
| Orden                                              | <b>Enterobacterales</b>             |
| Familia                                            | <b>Enterobacteriaceae</b>           |
| Genero                                             | <b><i>Klebsiella</i></b>            |
| Especie                                            | <b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b> |

#### *Presencia de resistencias*

Otros estudios dirigidos a la cepa 700603, reportaron resistencia a penicilina, oxacilina, ampicilina, ticarcilina, mezlocilina, cefalotina, cefazolina, aztreonam, lincomicina, bacitracina, kanamicina y la vancomicina (Guevara Peralta, G.E., 2019).

#### **2.4.2.-*Pseudomonas aeruginosa***

*P. aeruginosa* es un patógeno ubicuo, oportunista, Gram negativo, con motilidad unipolar. Su morfología consta de una forma similar a la de un bastón, tiene un tamaño de entre 1.5 a 5  $\mu$  de largo y 0.5 a 1  $\mu$  de diámetro, cuenta con un flagelo que le permite movilidad. Su temperatura óptima de crecimiento varía desde los 20°C a los 40°C, siendo capaz de tolerar los cambios abruptos de extremos de temperatura a diferencia de otras especies de *Pseudomonas* (Tabla 5). Otra característica que define a esta especie es su capacidad por producir una variedad de pigmentos, como lo son la piocianina (de color azul verdoso), la

pioverdina (pigmento fluorescente de color verde amarillento) y la piorrubina (de color rojo). Como método de transmisión tenemos el contacto con piel lesionada o reblandecida, así como las mucosas al contacto con el agua u otros objetos contaminados. Otro mecanismo de transmisión es la inhalación de bioaerosoles o fluidos contaminados (Paz Zarza, V. M. et al., 2019).

| <b>Tabla 6. Taxonomía de <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> |                                      |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Dominio                                                    | <b>Bacteria</b>                      |
| Filo                                                       | <b>Proteobacteria</b>                |
| Clase                                                      | <b>Gammaproteobacteria</b>           |
| Orden                                                      | <b>Pseudomonadales</b>               |
| Familia                                                    | <b>Pseudomonadaceae</b>              |
| Genero                                                     | <b><i>Pseudomonas</i></b>            |
| Especie                                                    | <b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> |

#### *Presencia de resistencias*

La cepa 27853 contiene mutaciones en los genes cromosomales. Estas mutaciones le ayudan al patógeno a obtener resistencia a penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos, y a su vez, a los carbapenémicos gracias a la formación de biopelículas y producción de pili tipo IV o también conocido como T4P (Pérez González Y., 2020).

### **2.5.-Nanopartículas**

Se ha reportado que algunos extractos de plantas presentan diversas actividades: antifúngica, antibacteriana, antioxidante, entre otras. Estos efectos son debido a la presencia de compuestos como fenoles, flavonoides, taninos, saponinas, alcaloides, etc., algunos de ellos llegan a ser inestables a la luz y temperatura. Para evitar el deterioro en los compuestos se ha propuesto su incorporación en nanopartículas, estas además de brindar protección, se ha visto que llegan a incrementar el efecto deseado. (Sakhila, S. et al., 2022)

Las nanopartículas se clasifican según el material que las compone, su forma y el método de preparación. Según por el método de preparación, existen dos tipos de nanopartículas poliméricas: nanoesferas y nanocápsulas (Urrejola, M. C., et al, 2018). Se ha visto un incremento de eficacia en las rutas de administración transdérmica y transmucosal con el uso de nanopartículas poliméricas, siendo una alternativa a la vía oral y parenteral debido a que evaden el efecto de primer paso hepático y disminuyen efectos adversos tales como las irritaciones o ulceraciones gástricas (Mallandrich Miret, M., 2017).

### **2.5.1.-Nanopartículas poliméricas**

Los polímeros en definición son macromoléculas compuestas de un número de unidades repetitivas idénticas o similares. Mantienen una organización de arquitectura molecular en tipo cadena que contiene una multiplicidad de composiciones, estructuras y propiedades. Se tiene reportado en diversas investigaciones que las nanopartículas basadas en polisacáridos biocompatibles y biodegradables pueden llegar a medir entre 10 a 400 nm de diámetro, mientras que las micelas poliméricas pueden medir entre 10 a 50 nm de diámetro (Urrejola, M. C., et al, 2018).

La selección adecuada de polímeros, mezclas poliméricas y materiales permiten a la formulación controlar numerosas propiedades asociadas con las nanopartículas, logrando un éxito considerable en la actividad deseada. Abriendo una nueva perspectiva a la implementación de estas en el campo de los productos farmacéuticos, incluyendo aplicaciones como son las antimicrobianas, cicatrización de heridas, tratamiento del cáncer, periodoncia e ingeniería de tejidos (Thakkar, S., & Misra, M., 2017).

### **2.5.6.- Método de Nanoprecipitación**

En este método, moléculas bioactivas (puede ser extracto vegetal) y el polímero se disuelven en un solvente miscible en agua (metanol, acetona, isopropanol, etc.) y se añade a una solución acuosa que puede llegar a contener tensoactivos. Después de que el solvente

es evaporado, las nanopartículas permanecen en una suspensión acuosa (Jara González, M.O., 2016).

La estructura química del polímero determinará el comportamiento de encapsulación, degradación y liberación de moléculas bioactivas, por ejemplo, los polímeros anfifílicos se autoensamblan en una estructura con un núcleo cubierto, el núcleo tiene una característica hidrofílica que sirve como un depósito de genes, enzimas y medicamentos (Mishra, S., y Chatterjee, A., 2011). Gracias a las amplias posibilidades de generar combinaciones de materiales, las nanopartículas con cubiertas han sido clasificadas con base al material con que se construye el núcleo y la cubierta/envoltura.

### **Eudragit L-100 ®**

Eudragit ® es el nombre comercial para los copolímeros sintéticos derivados de ésteres de ácido acrílico y metacrílico. Los polímeros Eudragit ® presentan una gran versatilidad según los grupos funcionales en la cadena lateral del polímero utilizado (Dong, P. et al, 2019). En el caso de Eudragit L-100 ®, es un polímero acrílico empleado principalmente para recubrimiento de formas farmacéuticas sólidas. Tiene una liberación del principio activo a valores de pH superior a 6.0, por lo que principalmente utilizado para recubrimientos de tipo entérico o gastrorresistentes. Su estructura química es la siguiente:

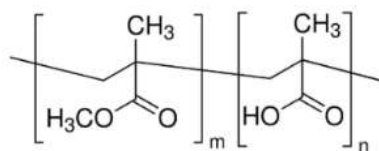


Figura 5. Fórmula química de Eudragit L-100 ®, ésteres de ácido acrílico y metacrílico.

### **3.0.-JUSTIFICACIÓN**

En los últimos años se ha incrementado de manera exponencial la resistencia bacteriana ante los antibióticos por tal motivo la OMS en el 2017 estableció la perspectiva llamada 2030-2050, donde indica las consecuencias ocasionadas por estas bacterias: Aumento en defunciones, saturación de hospitales y un receso económico a nivel mundial. Por lo que se buscan alternativas para tratar estas enfermedades infecciosas. Por tal motivo, en este proyecto Se investigó la sinergia de plantas medicinales incorporadas en nanopartículas para combatir esta problemática.

#### **4.0.- HIPÓTESIS**

Los extractos de plantas medicinales incorporados en nanopartículas incrementarán la actividad antimicrobiana sobre *Klebsiella pneumoniae* (ATTC 27853) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATTC 700603).

## 5.0.- OBJETIVOS

### 5.1.-Objetivo general

Evaluar la sinergia en la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas medicinales: *Calendula officinalis*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha piperita* y *Tagetes lucida*, incorporados en nanopartículas sobre *K. pneumoniae* (ATTC 700603) y *P. aeruginosa* (ATTC 27853).

### 5.2. Objetivos específicos

- Identificar la presencia de metabolitos en los extractos obtenidos de las plantas en estudio.
- Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas en estudio sobre *K. pneumoniae* (ATTC 700603) y *P. aeruginosa* (ATTC 27853).
- Evaluar la sinergia de los extractos bioactivos sobre las bacterias farmacorresistentes en estudio.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la combinación de los extractos bioactivos sinérgicos sobre las bacterias farmacorresistentes en estudio.
- Incorporar en nanopartículas el extracto sinérgico bioactivo.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de las nanopartículas obtenidas sobre las bacterias farmacorresistentes en estudio.
- Determinar la actividad hemolítica de los extractos: individuales, combinados y en nanopartículas.

## 6.0.-MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1.-Material biológico:

- Plantas obtenidas de la distribuidora PACALLI.
  - *Calendula officinalis*
  - *Foeniculum vulgare*
  - *Tagetes lucida*
  - *Mentha piperita*
- Cepas farmacorresistentes.
  - *Klebsiella pneumoniae* ATTC 700603
  - *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853

### 6.2.-Obtención de extractos de diferente polaridad

El material vegetal se obtuvo de la distribuidora PACALLI.

El material vegetal se trituró y se dejó macerar en hexano por 7 d. Una vez transcurrido este tiempo, se realizó una filtración y una segunda maceración al marco de extracción del material vegetal, con metanol para la obtención del extracto metanólico. Después, se eliminaron los solventes por el método de destilación a presión reducida a una temperatura de 35°C, posteriormente, se utilizó una estufa de secado a <40°C para eliminar completamente el solvente.

Una vez seco, se tomaron 100 mg del extracto y se colocaron en un vial al cual se adicionó un 1 mL de metanol para solubilizar con ayuda de un vórtex por 5 min.

Posteriormente, a los extractos hexánicos y metanólicos se realizaron las pruebas de solubilidad.

### 6.3.-Pruebas de solubilidad

Los extractos previamente obtenidos se sometieron a pruebas de solubilidad con diferentes solventes en diferentes proporciones. En tubos de ensayo se agregó un poco de extracto con la espátula y 1 mL de solvente, posteriormente, se llevó al vórtex por 2 min y al sonicador por 5 min sin calor. Este procedimiento se realizó igualmente con cada extracto metanólico y hexánico.

**Tabla 7. Solventes utilizados en la prueba de solubilidad de extractos metanólicos y hexánicos**

| Solventes           |                                  |
|---------------------|----------------------------------|
| DMSO 100%           | MEOH 100%                        |
| DMSO 90%            | Hexano 100%                      |
| DMSO 80%            | ETOH 100%                        |
| DMSO 70%            | Acetato de etilo 100%            |
| DMSO 60%            | Acetato de etilo : Metanol (1:1) |
| DMSO 40%            | DMSO : Hexano (1:1)              |
| DMSO 20%            | Acetato de etilo : Hexano (1:1)  |
| Agua destilada 100% | DMSO : Metanol (1:1)             |
| Acetona 100%        | Acetona : Isopropanol (1:1)      |

### 6.4.-Tamizaje fitoquímico para identificación de grupos funcionales mediante pruebas coloridas

Los extractos metanólicos y hexánicos solubilizados previamente, se utilizaron para realizar el tamizaje fitoquímico, el cual nos permite identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto, por medio de reacciones químicas que se basan en la formación de precipitados o cambios de color visibles (Verde-Star, M.J., García-González, S., & Rivas-Morales, C., 2016).

#### **6.4.1.-Alcaloides**

- Prueba de Dragendorff.

Se prepararon 2 soluciones A y B. En la solución 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. En la solución B se disolvieron 8 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua. Reactivo que se preparó a base de una mezcla de 5 mL de la solución A y 4 mL de la solución B con 100 mL de agua. Se disolvió 2 mg de extracto en etanol, posteriormente, se colocaron unas gotas en una placa de porcelana. En la placa de porcelana se le añadió unas gotas del reactivo preparado. La prueba fue considerada positiva al observar una coloración roja o naranja persistente por un periodo de 24 h.

#### **6.4.2.-Flavonoides**

- Prueba del  $H_2SO_4$ .

Se disolvieron unos cuantos miligramos del extracto en  $H_2SO_4$ . Dependiendo de la coloración que se obtuvo se definió el contenido, amarillo para flavonas, naranjaguinda para flavonas, rojo-azuloso para chalconas y rojo-púrpura para quinonas.

- Prueba de Shinoda.

El extracto disuelto se puso en contacto con limaduras de Mg, se aplicó calor a la flama y posteriormente se agregaron unas gotas de HCl, esta prueba fue considerada positiva al presentar coloraciones naranja, rojo, rosa, azul y violeta.

#### **6.4.3.-Sesquiterpenlactonas**

- Prueba de Baljet.

A 2 o 3 mg de la muestra se agregaron 3 a 4 gotas de la solución mezcla la cual consistió en una solución que contuvo ácido pícrico al 1% en etanol y una solución B de NaOH al 10%, se aceptó como un resultado positivo al tornarse de color naranja a roja oscura.

#### **6.4.4.-Carbohidratos**

- Prueba de Molish.

A 1 o 2 mg del extracto se agregó gota a gota el reactivo de Molish (alfa-naftol al 1 % en etanol), posteriormente se agregó 1 mL de ácido sulfúrico por las paredes, esta prueba fue aceptada como positiva al observar un anillo púrpura en la interfase.

#### **6.4.5.-Cumarinas**

- Prueba de NaOH

El extracto solubilizado se agregó de 1 o 2 mg del extracto en NaOH al 10%, se consideró positivo la producción de una coloración amarilla que desaparece al acidular la prueba.

#### **6.4.6.-Esteroles y triterpenos**

- Prueba de Liebermann-Buchard.

Se mezcló gota a gota 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo, posteriormente se enfrió a 0°C y se añadió una gota de ácido sulfúrico. Se aceptó como una prueba positiva al presentar colores azul, verde, rojo, anaranjado.

- Prueba de Salkowski.

Se colocó 1 a 2 mg en contacto con 1 mL de ácido sulfúrico, se aceptó como positiva la presencia de colores amarillo o rojo para esteroides y metilesteroides.

#### **6.4.7.-Oxidrilos fenólicos (taninos vegetales)**

- Prueba del  $\text{FeCl}_3$ .

Se disolvieron 1 a 2 mg del extracto en 1 mL de agua o etanol y se añadieron unas gotas de cloruro de hierro al 12.5% en agua, se aceptó como un resultado positivo la presencia un precipitado rojo, azul-violeta o verde.

#### **6.4.8.-Insaturaciones**

- Prueba del  $\text{KMnO}_4$ .

Se disolvieron 1 a 2 mg de la muestra en 1 mL de agua destilada, acetona o metanol y se añadió gota a gota una solución de  $\text{KMnO}_4$  al 2% en agua, se aceptó como positiva al observar decoloración o formación de precipitado café.

### **6.5 – Activación de cepas *K. pneumoniae* ATTC 700603 y *P. aeruginosa* ATTC 27853**

Las cepas evaluadas se obtuvieron del cepario de Química Analítica, las cuales están conservadas en cajas agar sangre, y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo donde se incubaron por 24 h a 36°C. Se realizó un pase por medio de un asa bacteriológica a tubos inclinados; los cuales nos servirán como cepario base.

Para la estandarización de las bacterias, se realizó un pase previo en caldo nutritivo. Por lo tanto, se prepararon varios tubos de cristal con un volumen de 4 mL de Caldo Müller Hinton en la campana de flujo laminar; estos se mantuvieron por 24 h en la incubadora como prueba de esterilidad. Pasado el tiempo se realizó un pase de cada una de las bacterias en la campana de flujo laminar, con el flujo encendido, para los cuales Se llevó a cabo la metodología siguiente: Esterilizar el asa bacteriológica en el mechero, tomar una asada del vial en conservación (tubo inclinado) e inocular un tubo de cristal previamente preparado; este proceso se repitió para cada una de las cepas de bacterias a evaluar. Los tubos inoculados se incubaron por un periodo de 24 h a 36°C.

#### **6.5.1-Escalamiento McFarland de *K. pneumoniae* ATTC 700603 y *P. aeruginosa* ATTC 27853**

Pasadas las 24 h de incubación de los tubos activados, se tomó una lectura a 625 nm para obtener la absorbancia inicial. Partiendo de la absorbancia inicial, dentro de la campana de flujo previamente esterilizada, se tomó un tubo de cristal con caldo nutritivo Müller Hinton y se agregaron inicialmente 100 µL del tubo activado, este procedimiento se repitió hasta que se obtuvo una lectura de 0.100 a 0.110 de absorbancia (Escalamiento McFarland a  $1 \times 10^8$  UFC/ mL).

#### **6.6 -Difusión en placa por pozo y disco de extractos en sinergia**

De los extractos hexánicos y metanólicos solubilizados en el punto anterior, se colocan 10 µL de extracto sobre un disco estéril, se dejaron secar y posteriormente se invirtió para colocar nuevamente 10 µL de extracto solubilizado. Ya que esté completamente seco el disco, se mantuvo dentro de un vial estéril hasta su uso.

Para realizar la inoculación de las cajas Petri, se realizó un extendido en placa mediante la toma de 100 µL de las cepas estandarizadas al tubo 0.5 de la escala de McFarland y se extendió con un asa Digralsky, posterior a eso, se colocó 5 pozos en el agar uno al centro (solvente) y 1 en cada cuadrante del medio. Se consideró el metanol como el control negativo, en los pozos de alrededor se vertieron las diluciones de los extractos individuales

y en sinergia. Para concluir se llevó a incubar a 36°C por 24 h para poder realizar el análisis de los resultados (Ramirez, L. S. & Castaño, D. M., 2009). En el caso de los extractos hexánicos s realizó la misma metodología descrita para el extracto metanólico.

### 6.7 -Prueba mínima inhibitoria (CMI) de extractos bioactivos

La prueba de concentración mínima inhibitoria se utilizaron placas de 96 pocillos y una campana de flujo laminar. La metodología se basó en el documento M7-A6 de CLSI (2003b).Donde en los pocillos A1, A2 y A3 se colocó la sinergia con mayor bioactividad y en los pocillos A4, A5 Y A6 el extracto individual. Se inició partiendo de una concentración de 40,000 ppm, se le realizó diluciones seriadas (40,000 ppm; 20,000 ppm; 10,000 ppm; 5,000 ppm; 2,500 ppm; 1,250 ppm; 625 ppm), posteriormente, se agregó la bacteria estandarizada. Esta prueba se le realizó por triplicado.

Como control en los pocillos A10, A 11 y A12 se colocó medio Müller Hinton, en los pocillos B10, B11 y B12 se añadió medio Müller Hinton más la bacteria estandarizada, en los pocillos C10, C11 y C12 se agregó solvente (metanol) más la bacteria, como el control negativo en los pocillos D10, D11 y D12 se colocó bacteria más el antibiótico (Vancomicina) previamente diluido 8 mg en 1 mL de agua destilada estéril. Finalmente, se destinó la columna 8 para realizar las diluciones del extracto incorporado a nanopartículas y la columna 9 para las diluciones de las nanopartículas blanco.

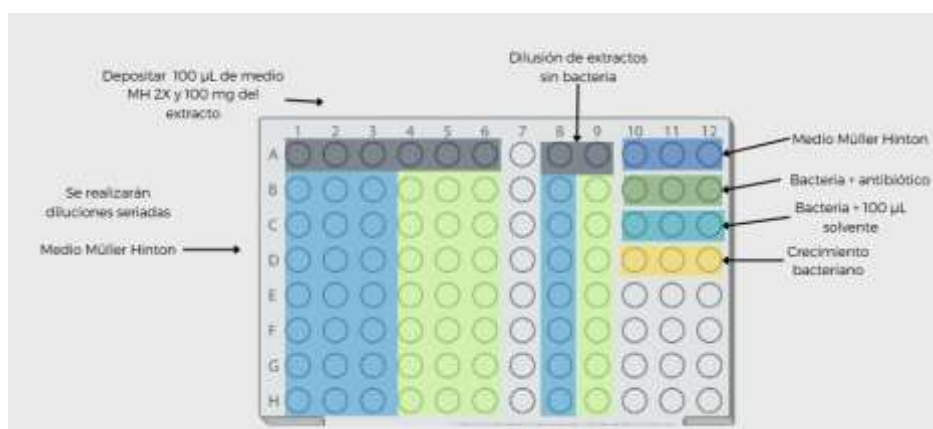


Figura 6. Metodología para determinar concentración mínima inhibitoria en placa de 96 pocillos con caldo Müller Hinton de los extractos individuales y en sinergia.

## 6.8 -Prueba de toxicidad por el método de hemólisis

Para la elaboración del paquete globular (PG) se obtuvieron muestras de sangre por medio de punción en pacientes de tipo de sangre O+. La muestra se colocó en tubos con EDTA para posteriormente centrifugar a 5,000 rpm durante 5 min. Después, se extrajo el sobrenadante, se aforó seguido de una homogenización al mismo nivel utilizando un buffer de fosfato salino (PBS) a un pH 7.4. El proceso se realizó 3 veces para retirar el plasma y sus componentes.

Una vez retirado el sobrenadante, se traspasó 5 mL del paquete globular a un matraz de aforación de 100 mL. Se aforó el matraz con PBS para obtener eritrocitos a una concentración de 5%.

Se contemplaron 3 tratamientos para la realización de la prueba, donde, se llevaron a cabo por triplicado. Para el tratamiento 1 se tomó la sinergia con mayor bioactividad, el tratamiento 2 constó del extracto metanólico de caléndula y el tratamiento 3 del extracto metanólico de yerbaniz. Para el control positivo se utilizaron 1,000 µL agua destilada y 250 µL Paquete globular (PG). En el Blanco 2 solo se utilizó 1,250 µL de PBS. PBS (Galindo Contreras, 2022).

**Tabla 8. Tratamientos para prueba de toxicidad**

| <b>Tubos</b>               | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Concentración (ppm)</b> | 1,000    | 800      | 600      | 400      | 200      | 100      |
| <b>Tratamiento (µL)</b>    | 125      | 100      | 75       | 50       | 25       | 12       |
| <b>PBS (µL)</b>            | 875      | 900      | 925      | 950      | 975      | 988      |
| <b>PG (µL)</b>             | 250      | 250      | 250      | 250      | 250      | 250      |

**Tabla 9. Control negativo para prueba de toxicidad**

| <b>Tubos</b>               | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Concentración (ppm)</b> | 1,000    | 800      | 600      | 400      | 200      | 100      |
| <b>Metanol (μL)</b>        | 125      | 100      | 75       | 50       | 25       | 12       |
| <b>PBS (μL)</b>            | 875      | 900      | 925      | 950      | 975      | 988      |
| <b>PG (μL)</b>             | 250      | 250      | 250      | 250      | 250      | 250      |

**Tabla 10. Blanco 1 para prueba de toxicidad**

| <b>Tubos</b>               | <b>1</b> | <b>2</b> | <b>3</b> | <b>4</b> | <b>5</b> | <b>6</b> |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| <b>Concentración (ppm)</b> | 1,000    | 800      | 600      | 400      | 200      | 100      |
| <b>Tratamiento (μL)</b>    | 125      | 100      | 75       | 50       | 25       | 12       |
| <b>PBS (μL)</b>            | 875      | 900      | 925      | 950      | 975      | 988      |
| <b>PBS (μL)</b>            | 250      | 250      | 250      | 250      | 250      | 250      |

Se pasaron 200 μL de sobrenadante de cada tubo a una placa de 96 pocillos para posteriormente realizar la lectura de absorbancia de cada pocillo a 550 nm. Finalmente, a partir de la siguiente fórmula se calculó el porcentaje hemolítico.

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{(ABS_{MTA} - ABS_0)}{(ABS_C - ABS_0)} \times 100$$

*MTA: Muestra o tratamiento*

*0: PBS*

*C: Control +*

## **6.9 -Nanoprecipitación del extracto bioactivo**

Para el tratamiento se utilizó una formulación de fase orgánica constó de 100 mg del polímero Eudragit L-100, 25 mg de extracto de caléndula, 25 mg de extracto de yerbaniz y 5 mL de metanol. Primeramente, se pesó en un vaso de precipitado 100 mg de polímero y se solubilizó en los 5 mL de solvente (metanol). A continuación, en otro vaso de precipitado se pesaron los 50 mg de la combinación de extractos (1:1). Posteriormente, se solubilizaron los extractos con el polímero previamente disuelto en el solvente.

Para la fase acuosa se utilizaron 10 mL de agua destilada, esta, se vertió en un reactor con un agitador. El reactor se colocó sobre una plancha de agitación sin calor a 200 rpm mientras se inyectaba la fase orgánica. Finalmente se llevó las nanopartículas en suspensión al rotavapor para proceder a la eliminación del solvente. Las nanopartículas se mantuvieron suspendidas en 10 mL de agua destilada en viales de vidrio.

La formulación de las nanopartículas blanco constó de una fase orgánica de 100 mg de polímero y 5 mL de metanol, y una la fase acuosa de 10 mL de agua destilada. Se realizó la misma metodología expuesta para la realización de las nanopartículas con tratamiento.

Por medio del nanosizer se determinó el tamaño, índice de polidispersidad y potencial Z de los 3 lotes obtenidos del tratamiento y 3 lotes del blanco. (Alvarado Lerma, 2025).

## **6.10 – Prueba mínima inhibitoria (CMI) del extracto en nanopartículas**

Se realizó la misma metodología seguida en el punto 6.7, con la sustitución del extracto por las nanopartículas cargadas y las nanopartículas blanco.

### **6.11 – Prueba de toxicidad por el método de hemólisis del extracto en nanopartículas**

Se realizó la misma metodología seguida en el punto **6.8**, con la sustitución del extracto por las nanopartículas cargadas y las nanopartículas blanco a la misma concentración.

## 7.0 -ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentaron como medias  $\pm$  desviación estándar (DE) de los experimentos independientes realizados por triplicado. Para evaluar las diferencias en la capacidad inhibitoria entre las diferentes combinaciones de los extractos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Posteriormente, ya seleccionada la combinación con mayor bioactividad sobre *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, se aplicó la prueba t Student para determinar si existe diferencia significativa en la concentración mínima inhibitoria (CMI) entre los extractos individuales y su combinación 1:1. Para el análisis de toxicidad se empleó la prueba t Student con el fin de evaluar las diferencias del porcentaje hemolítico entre los extractos individuales y su combinación 1:1.

Se realizó un ANOVA bidireccional para determinar si existen diferencias significativas en la CMI entre la combinación libre y las nanopartículas cargadas sobre ambas bacterias. Se complementó el análisis con una comparación frente el control positivo (Vancomicina) mediante la prueba de Dunett.

La comparación de toxicidad de la combinación libre y las nanopartículas cargadas se realizó mediante la prueba ANOVA de una vía, donde el factor 1 fue la forma del extracto (libre y en nanopartículas). Para la prueba se empleó PBS como control negativo, nanopartículas blanco como control del vehículo, y agua destilada como control positivo. Este análisis permitió determinar si el empleo de nanopartículas reduce significativamente el porcentaje de hemólisis de la combinación bioactiva. (Espinoza Mijango A 2023)

Todos los análisis estadísticos realizados utilizaron un nivel de significancia de  $\alpha = 0.05$ .

## 8.0.-RESULTADOS

### 8.1. Rendimiento y pruebas de solubilidad de extractos

Se pudo observar un menor rendimiento en los extractos hexánicos, teniendo para *Foeniculum vulgare* 0.8%, *Tagetes lucida* 0.9%, *Mentha piperita* 1.4%, y para *Calendula officinalis* 1.8%. Contrastante con los rendimientos obtenidos de los extractos metanólicos, donde *F. vulgare* obtuvo 8.2%, *T. lucida* 10.38%, *M. piperita* 10.41%, y *C. officinalis* 12.16%.

Se realizaron pruebas de solubilidad con solventes de diferente polaridad. Para los extractos hexánicos se seleccionó la mezcla de solventes Acetato de etilo : Metanol (1:1), en el caso de los extractos metanólicos se seleccionó el solvente metanol para disolver cada extracto.

**Tabla 11. Resultados obtenidos en la prueba de solubilidad en extractos metanólicos y hexánicos**

| Lista de solventes               |   |                                  |   |
|----------------------------------|---|----------------------------------|---|
| Extractos Hexánicos (%)          |   | Extractos Metanólicos (%)        |   |
| DMSO 100                         | - | DMSO 100                         | + |
| DMSO 90                          | - | DMSO 90                          | + |
| DMSO 80                          | - | DMSO 80                          | + |
| DMSO 70                          | - | DMSO 70                          | + |
| DMSO 60                          | - | DMSO 60                          | + |
| DMSO 40                          | - | DMSO 40                          | + |
| DMSO 20                          | - | DMSO 20                          | + |
| Agua destilada                   | - | Agua destilada                   | - |
| MEOH                             | - | MEOH                             | + |
| Hexano                           | + | Hexano                           | - |
| ETOH                             | - | ETOH                             | - |
| Acetato de etilo                 | + | Acetato de etilo                 | + |
| Acetato de etilo : Metanol (1:1) | + | Acetato de etilo : Metanol (1:1) | + |
| DMSO : Hexano (1:1)              | - | DMSO : Hexano (1:1)              | - |
| Acetato de etilo : Hexano (1:1)  | + | Acetato de etilo : Hexano (1:1)  | - |
| DMSO : Metanol (1:1)             | - | DMSO : Metanol (1:1)             | + |
| Acetona                          | + | Acetona                          | - |
| Acetona : Isopropanol (1:1)      | + | Acetona : Isopropanol (1:1)      | - |

## 8.2.-Tamizaje fitoquímico para identificación de grupos funcionales mediante pruebas coloridas

Se realizó el tamizaje fitoquímico de los extractos hexánicos y metanólicos mediante pruebas coloridas de los extractos por individual para comprobar la presencia de metabolitos secundarios en los diferentes procesos de maceración (Tabla 12 y 13).

Tabla 12. Tamizaje fitoquímico de extractos hexánicos de plantas en estudio

| Prueba química       | Y | C | H | M |
|----------------------|---|---|---|---|
| Esteroles            | - | + | - | + |
| Cumarinas            | - | + | + | - |
| Quinonas             | + | + | - | + |
| Sesquiterpenlactonas | + | + | - | - |
| Saponinas            | - | - | - | - |
| Flavonoides          | - | - | - | - |
| Carbohidratos        | + | + | + | + |
| Taninos              | - | + | - | - |

Y: *T. lucida*; C: *C. officinalis*; H: *F. vulgare*; M: *M. piperita*

Tabla 13. Tamizaje fitoquímico de extractos metanólicos de plantas en estudio

| Prueba química       | Y | C | H | M |
|----------------------|---|---|---|---|
| Esteroles            | - | + | - | - |
| Cumarinas            | + | + | + | + |
| Quinonas             | + | + | + | + |
| Sesquiterpenlactonas | - | + | - | + |
| Saponinas            | + | - | - | + |
| Flavonoides          | + | + | - | - |
| Carbohidratos        | + | + | + | + |
| Taninos              | + | + | - | + |

Y: *T. lucida*; C: *C. officinalis*; H: *F. vulgare*; M: *M. piperita*

### 8.3.-Difusión en placa por pozo de extractos en sinergia

Podemos observar en los extractos hexánicos una nula producción de halos de inhibición mientras que en los extractos metanólicos hubo la presencia de halos de inhibición mínimos o nulos sobre *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Tablas 14 y 15). En las combinaciones 1:1 de los extractos se observaron halos de inhibición para la combinación 1:1 de *C. officinalis* y *T. lucida* sobre *K. pneumoniae* de 4 mm y *P. aeruginosa* de 2 mm a una concentración de 4,000 ppm (Tabla 15 y Tabla 16).

**Tabla 14. Inhibición de extracto hexánico sobre *K. pneumoniae* ATCC 700603**

| Extracto                      | Inhibición (mm) | Combinación de extractos (1:1)              | Inhibición (mm) |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------------------------|-----------------|
| <i>Calendula officinallis</i> | 0               | <i>C. officinallis</i> : <i>F. vulgare</i>  | 0               |
| <i>Tagetes lucida</i>         | 0               | <i>C. officinallis</i> : <i>M. piperita</i> | 0               |
| <i>Foeniculum vulgare</i>     | 0               | <i>T. lucida</i> : <i>F. vulgare</i>        | 0               |
| <i>Mentha piperita</i>        | 0               | <i>T. lucida</i> : <i>M. piperita</i>       | 0               |
|                               |                 | <i>F. vulgare</i> : <i>M. piperita</i>      | 0               |
|                               |                 | <i>C. officinallis</i> : <i>T. lucida</i>   | 0               |

**Tabla 15. Inhibición de extracto metanólico sobre *K. pneumoniae* ATCC 700603**

| Extracto                      | Inhibición (mm) | Combinación de extractos (1:1)              | Inhibición (mm) |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------------------------|-----------------|
| <i>Calendula officinallis</i> | 0               | <i>C. officinallis</i> : <i>F. vulgare</i>  | 2.0 ± 0.5       |
| <i>Tagetes lucida</i>         | 0               | <i>C. officinallis</i> : <i>M. piperita</i> | 0               |
| <i>Foeniculum vulgare</i>     | 0               | <i>T. lucida</i> : <i>F. vulgare</i>        | 2.0 ± 1.0       |
| <i>Mentha piperita</i>        | 0               | <i>T. lucida</i> : <i>M. piperita</i>       | 0               |
|                               |                 | <i>F. vulgare</i> : <i>M. piperita</i>      | 0               |
|                               |                 | <i>C. officinallis</i> : <i>T. lucida</i>   | 4.0 ± 0.5       |

**Tabla 16. Inhibición de extracto hexánico sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853**

| Extracto                      | Inhibición (mm) | Combinación de extractos (1:1)              | Inhibición (mm) |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------------------------|-----------------|
| <i>Calendula officinallis</i> | 0               | <i>C. officinallis</i> : <i>F. vulgare</i>  | 0               |
| <i>Tagetes lucida</i>         | 0               | <i>C. officinallis</i> : <i>M. piperita</i> | 0               |
| <i>Foeniculum vulgare</i>     | 0               | <i>T. lucida</i> : <i>F. vulgare</i>        | 0               |
| <i>Mentha piperita</i>        | 0               | <i>T. lucida</i> : <i>M. piperita</i>       | 0               |
|                               |                 | <i>F. vulgare</i> : <i>M. piperita</i>      | 0               |
|                               |                 | <i>C. officinallis</i> : <i>T. lucida</i>   | 0               |

**Tabla 17. Inhibición de extracto metanólico sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853**

| Extracto                      | Inhibición (mm) | Combinación de extractos (1:1)              | Inhibición (mm) |
|-------------------------------|-----------------|---------------------------------------------|-----------------|
| <i>Calendula officinallis</i> | 0               | <i>C. officinallis</i> : <i>F. vulgare</i>  | 0               |
| <i>Tagetes lucida</i>         | 0               | <i>C. officinallis</i> : <i>M. piperita</i> | 0               |
| <i>Foeniculum vulgare</i>     | 0               | <i>T. lucida</i> : <i>F. vulgare</i>        | 1.0 ± 0.5       |
| <i>Mentha piperita</i>        | 0               | <i>T. lucida</i> : <i>M. piperita</i>       | 0               |
|                               |                 | <i>F. vulgare</i> : <i>M. piperita</i>      | 0               |
|                               |                 | <i>C. officinallis</i> : <i>T. lucida</i>   | 2.0 ± 0.5       |

#### 8.4.-Prueba mínima inhibitoria (CMI) de extractos bioactivos

Se comprobó la actividad antimicrobiana de los extractos individuales de *C. officinallis* y *T. lucida* sobre la bacteria *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, dando inhibición hasta la concentración de 1,250 ppm. A su vez se probó la sinergia de la combinación (1:1) de *C. officinallis* y *T. lucida* donde se mostró inhibición a la concentración 1,000 ppm y actividad bacteriostática a 500 ppm. El procedimiento fue realizado por triplicado.

### 8.5.-Prueba de toxicidad por el método de hemólisis

Se sometieron 3 tratamientos a prueba de hemólisis, donde, el tratamiento 1 se tomó la sinergia con mayor bioactividad, el tratamiento 2 constó del extracto metanólico de caléndula y el tratamiento 3 del extracto metanólico de yerbaniz.

Para el tratamiento correspondiente al extracto de caléndula podemos observar porcentajes altos de hemólisis, empezando con 99.3% para 1,000 ppm hasta un porcentaje de 77.3% para 200 ppm; esto con una  $R^2$  de 0.9155.

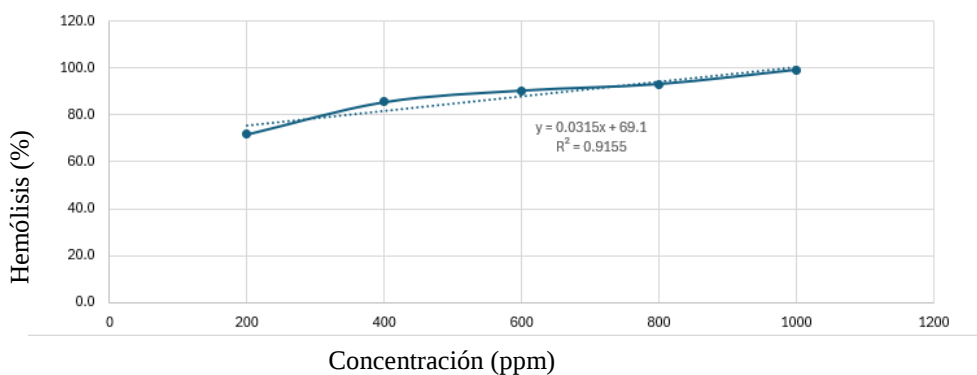


Figura 7. Hemólisis del extracto metanólico de *C. officinalis*.

En el tratamiento correspondiente al extracto de yerbaniz se observan porcentajes más aceptables de hemólisis, empezando con 14.5% para 600 ppm, siguiendo con 6.6% para 400 ppm y terminando en un porcentaje de 3.3% para 100 ppm; esto con una  $R^2$  de 0.9057.

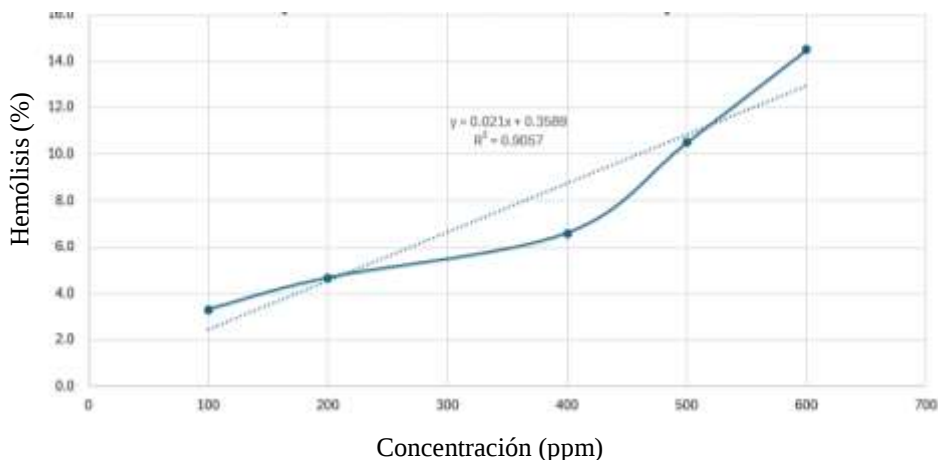


Figura 8. Hemólisis del extracto de metanólico de *T. lucida*.

Finalmente, el tratamiento correspondiente a la sinergia con mayor bioactividad se observan porcentajes parcialmente hemolíticos para 100 ppm, empezando con 96.5% para 1,000 ppm, siguiendo con 35% para 400 ppm y terminando en un porcentaje de 4.5% para 100 ppm; esto con una  $R^2$  de 0.9834.

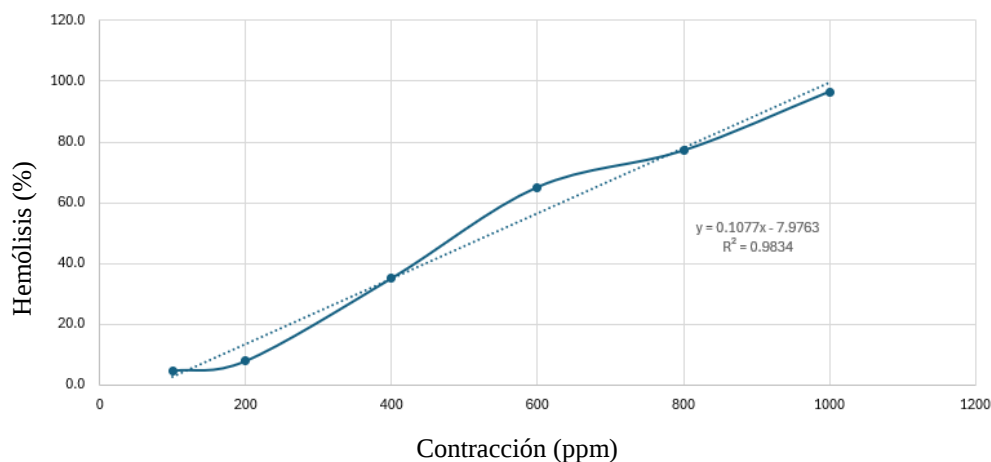


Figura 9. Hemólisis de la combinación con mayor bioactividad.

## 8.6.- Nanoprecipitación del extracto bioactivo

Se seleccionó la formulación 2 donde se obtuvo una media de tamaño de 173.3, un índice de polidispersidad cercano a 0.200, y un potencial Z de -0.238. En el blanco se obtuvo una media de tamaño de 90.09, un índice de polidispersidad cercano a 0.200, y un potencial Z de -0.240.

**Tabla 18. Formulaciones de nanopartículas con el polímero Eudragit L-100 ® (Tratamiento y blanco).**

| F  | Fase orgánica |               |              | Fase acuosa         | T     | IP    | PZ     |
|----|---------------|---------------|--------------|---------------------|-------|-------|--------|
|    | P (mg)        | Cb (1:1) (mg) | Metanol (mL) | Agua destilada (mL) |       |       |        |
| 1T | 80            | 40            | 5            | 10                  | 75.26 | 0.198 | -0.214 |
| 1B | 80            | 0             | 5            | 10                  | 70.33 | 0.214 | -0.197 |
| 2T | 100           | 50            | 5            | 10                  | 173.3 | 0.240 | -0.238 |
| 2B | 100           | 0             | 5            | 10                  | 90.09 | 0.191 | -0.240 |

F: Formulación; P: Polímero; Cb: Combinación bioactiva; T: Tamaño; IP: Índice de polidispersidad; PZ: Potencial Z; 1T: Tratamiento 1; 1B: Blanco 1; 2T: Tratamiento 2; 2B: Blanco 2

### 8.7.-Prueba mínima inhibitoria (CMI) del extracto en nanopartículas

Se comprobó si existe un incremento en la actividad antimicrobiana de la sinergia de *C. officinalis* y *T. lucida* ya incorporada a nanopartículas sobre la bacteria *K. pneumoniae* ATCC 700603 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Se observó una inhibición de 34% del crecimiento de *P. aeruginosa* a 104 ppm, y una inhibición total de *K. pneumoniae* a 208 ppm, a una proporción 1:1. Simultáneamente se observó una disminución del biofilm en todos los pocillos sometidos al tratamiento.

Procedimiento realizado por triplicado.

Para obtener el porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente formula:

$$\% \text{ Inhibición: } \frac{(C - CN) - (T - CT)}{(C - CN)} \times 100$$

*C*: Control de crecimiento

*CN*: Control negativo

*T*: Tratamiento

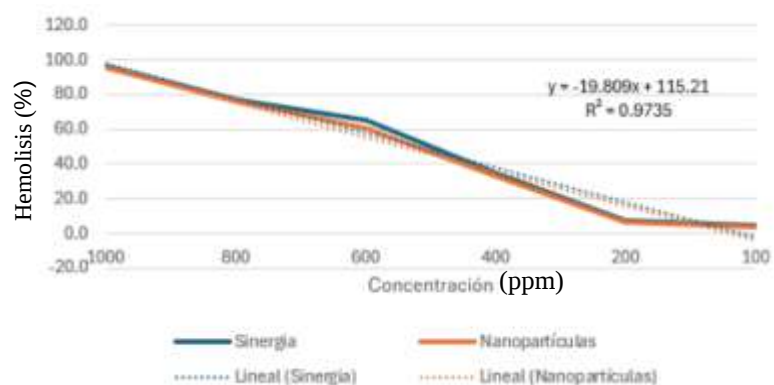
*CT*: Control de tratamiento (sin bacteria)

### 8.8.-Prueba de toxicidad por el método de hemólisis del extracto en nanopartículas

Se realizó una comparación del tratamiento de la combinación bioactiva libre y las nanopartículas cargadas de la combinación bioactiva. La aplicación de las nanopartículas se busca que sea de manera tópica, ya que el polímero tiene una liberación en pH de heridas infectadas por las bacterias *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

**Tabla 19. Comparación del porcentaje hemolítico de la aplicación de la combinación bioactiva libre y aplicada en nanopartículas.**

| Muestra                 | Concentración (ppm) |           |                  |                  |         |         |
|-------------------------|---------------------|-----------|------------------|------------------|---------|---------|
|                         | 1,000               | 800       | 600              | 400              | 200     | 100     |
|                         | Hemolisis (%)       |           |                  |                  |         |         |
| Nanopartículas cargadas | 95.1± 0.2           | 75.8± 1.5 | 61.0±2.5         | 33.5± <u>1.3</u> | 6.2±0.2 | 3.7±1.2 |
| Combinación bioactiva   | 96.5± 1.5           | 77.1±1.1  | 65.0± <u>3.9</u> | 35.0±0.9         | 7.7±0.3 | 4.5±2.9 |



**Figura 10. Porcentaje hemolítico en la combinación bioactiva libre y aplicada en nanopartículas.**

## 9.0.-DISCUSIÓN

Se obtuvieron extractos de diferente polaridad con los solventes metanol y hexano. En el caso de los extractos hexánicos se observó la mayor presencia de metabolitos no polares como los esteroides, como se observa para el extracto de *T. lucida* (Y), al igual que la presencia de quinonas y carbohidratos. Para el extracto de *C. officinalis* (C) se encontró la presencia de esteroides, cumarinas, quinonas, carbohidratos y taninos. En el extracto de *F. vulgare* (H) observamos la presencia de cumarinas y carbohidratos. Finalmente, en el extracto de *M. piperita* (M) se puede observar la presencia de esteroides, quinonas y carbohidratos. Se puede observar la presencia de carbohidratos (compuestos polares) en la mayoría de los extractos, esto se le puede atribuir a la presencia de glicósidos. Los glicósidos contienen un carbohidrato unido a un lípido, lo que les permite ser parcialmente solubles en hexano. Por otro lado, la presencia de esteroides y de algunos flavonoides menos polares eran esperados para este tipo de maceración (Alberts, Bruce, 1992).

La maceración por medio del solvente metanol espera la presencia de metabolitos como flavonoides más polares, compuestos fenólicos, saponinas, taninos y carbohidratos bioactivos. En el caso de los extractos metanólicos obtenidos se mostró la presencia de cumarinas, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos y carbohidratos para el extracto de *T. lucida* (Y). Para el extracto de *C. officinalis* (C) se encontró la presencia de esteroides, cumarinas, quinonas, flavonoides, carbohidratos y taninos. En el extracto de *F. vulgare* (H) observamos la presencia de cumarinas, quinonas y carbohidratos. Finalmente, en el extracto de *M. piperita* (M) se puede observar la presencia de cumarinas, quinonas, saponinas, carbohidratos y taninos. Según la literatura, los metabolitos obtenidos han demostrado capacidad antimicrobiana contra *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, como ambas bacterias son Gram negativas, contienen una membrana externa que actúa como barrera adicional contra compuestos hidrofóbicos (extraídos con hexano). Los compuestos más polares, en este caso extraídos por metanol, podrían tener mejor acceso a las dianas celulares de ambas bacterias (A Paule Manzano, 2022).

Para comprobar la actividad inhibitoria de los extractos de diferente polaridad se realizó una prueba preliminar por difusión en disco, donde los extractos hexánicos no generaron

halos de inhibición sobre ambas bacterias. A su vez, podemos observar que los extractos metanólicos generaron halos de inhibición mínimos o nulos. Se realizaron combinaciones 1:1 de los extractos con su respectiva polaridad para comprobar si existe un aumento en la formación de halos de inhibición. Se pudo observar halos de inhibición para la combinación 1:1 de *C. officinalis* y *T. lucida* sobre *K. pneumoniae* de 4 mm y *P. aeruginosa* de 2 mm a una concentración de 4,000 ppm. Zulfiqer Shahan (2019) obtuvo con extracto de hoja de *C. officinalis* macerado en éter de petróleo halos de inhibición de hasta 1.5 cm, inhibiendo parcialmente *K. pneumoniae* sin multifarmacorresistencia, siendo resultados más favorables con un extracto con mayores propiedades no polares en una bacteria sin resistencias adquiridas.

Se pasó a la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), donde se observó una actividad bactericida a 1,000 ppm y bacteriostática a 500 ppm de cada extracto. Comparándolo con Ana Luiza do Rosario Palma (2023) que utilizó extractos glicólicos de *Capsicum annum* en biopelículas de cepas multifarmacorresistentes de *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, donde obtuvo una concentración en el CMI de 1,560 ppm y 50,000 ppm, podemos observar una CMI similar para *K. pneumoniae*. En el caso de *P. aeruginosa*, se observa una diferencia significativa entre el extracto de *C. annum* y *C. officinalis*, teniendo nuestro extracto una CMI considerable para un extracto crudo.

Para comprobar la toxicidad de los extractos solos y de la combinación bioactiva se realizó una prueba de hemólisis. Se obtuvo que el extracto solo de *C. officinalis* es hemolítico hasta 200 ppm, a comparación del extracto de *T. lucida* que mostró ser parcialmente hemolítico a 200 ppm y no hemolítico a 100 ppm. La combinación 1:1 de ambos extractos resultó ser parcialmente hemolítica a 100 ppm con un porcentaje de hemólisis de 4.5. A. ASHRAF et al. (2017), obtuvieron extractos de diferente polaridad de hojas de *C. officinalis* L. por medio de maceración, donde el extracto metanólico mostró los mayores efectos hemolíticos, ellos le atribuyeron a la alta cantidad de saponinas extraídas con este solvente. Por lo que podemos adjuntar el efecto hemolítico del extracto metanólico realizado de *C. officinalis* a la presencia mínima de saponinas que se pudieron obtener, dando un falso positivo en la prueba fitoquímica de saponinas. Por otro lado, en el 2022, Liliana De La Cruz-Jiménez, analizó la planta *Tagetes nelsonii* (del mismo género que *T. lucida*) extraída de Chiapas, México. Esta presentó una

actividad no hemolítica a 140 ppm, por lo tanto, no se demuestra una diferencia significativa a la actividad hemolítica del extracto metanólico de *T. lucida* realizado.

Para incrementar la capacidad antimicrobiana obtenida con la combinación 1:1 de los extractos metanólicos de *T. lucida* y *C. officinalis* se planteó el uso de nanopartículas poliméricas con el polímero Eudragit L-100 ® por el método de nanoprecipitación. Se realizaron 2 formulaciones para este polímero, donde se seleccionó la formulación 2 ya que obtuvo una media de tamaño de 173.3, un índice de polidispersidad cercano a 0.200, y un potencial Z de -0.238, resultados óptimos para la penetración del biofilm generado por ambas bacterias. Joel H. Elizondo-Luevano (2023), desarrolló nanopartículas no hidrosolubles con el flavonoide quercetina y el polímero Eudragit L-100 ® mediante la técnica de nanoprecipitación, donde, la técnica permitió la producción de lotes con tamaños menores a 200 nm y un PDI menor de 0.2 con 5 mg de quercetina y 50 mg de polímero. Se puede observar que se mantienen los mismos parámetros de tamaño y PDI a las nanopartículas cargadas realizadas, aunque, a diferencia, las nanopartículas realizadas utilizaron el doble de la concentración (100 mg) del polímero y se utilizó 10 veces más de extracto (50 mg).

Igualmente se pasó a la determinación de CMI de las nanopartículas, donde se obtuvo inhibición a una concentración de 208 ppm para ambas bacterias y actividad bacteriostática a 104 ppm para *P. aeruginosa*. Al momento de emplear el uso combinado de extractos, se espera la mejora de su acción farmacológica (sinergia), ya que estas actúan sobre múltiples dianas simultáneamente. Por otro lado, se busca reducir las dosis de los componentes individuales y minimizar los efectos secundarios (toxicológicos). Jae Young Jeong (2023) obtuvo que la combinación de los extractos de *Sanguisorba officinalis* L. y *Uncaria gambir* Roxb. generaron una interacción sinérgica. Las CMI de los extractos individuales disminuyeron 4 veces de 250 ppm (individuales) a 62.5 ppm (combinados). En el caso de la combinación realizada podemos observar una disminución de 83.36% de una concentración de 1,250 ppm a 208 ppm debido a la aplicación de nanopartículas poliméricas.

Finalmente se realizó la prueba de hemólisis para comprobar si el uso de nanopartículas poliméricas también disminuye el porcentaje hemolítico. Los resultados demostraron que no existe diferencia significativa entre la aplicación de la combinación libre a

aplicada en nanopartículas, por lo que se busca que la aplicación sea de manera tópica, en heridas infectadas por las bacterias *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. Joel H. Elizondo-Luevano (2023) determinó la toxicidad de la quercetina libre y aplicada en nanopartículas con el polímero Eudragit L-100® mediante una prueba de hemólisis, donde, no se mostró una diferencia de toxicidad significativa. Al igual que la diferencia de toxicidad hemolítica entre nuestra combinación libre y las nanopartículas cargadas.

## 10.0.- CONCLUSIONES

La combinación de los extractos metanólicos de *T. lucida* (Yerbaniz) y *C. officinalis* (Caléndula) fue la combinación con mayor bioactividad, ya que mostraron una mayor inhibición sobre *K. pneumoniae* (ATTC 700603), con halos de 4 mm, y *P. aeruginosa* (ATTC 27853), con halos de 2 mm, a una concentración de 4,000 ppm. Mientras que la combinación de extractos metanólicos de *T. lucida* y *F. vulgare* (Hinojo) mostraron halos de inhibición menores en ambas cepas (2 mm y 1 mm). Comprobando así, que existe un efecto sinérgico en ambas combinaciones.

- Se obtuvo la CMI de la combinación (1:1) de *C. oficinallis* y *T. lucida* donde mostró inhibición a la concentración de 1,250 ppm y actividad bacteriostática a 625 ppm.
- El porcentaje hemolítico de la combinación (1:1) fue considerablemente aceptable con 4.5% a 100 ppm, a comparación del extracto libre de *C. officinalis* que mostró ser hemolítico con 77.3% a 200 ppm.
- Las nanopartículas de la combinación bioactiva presentaron un tamaño menor a 200 nm, con un ZP de -0.238 y un PDI de 0.240 con el polímero Eudragit L-100 ® en base a lo esperado.
- La CMI de las nanopartículas cargadas mostraron una disminución del 83.36%, de una concentración de 1,250 ppm a 208 ppm. La combinación bioactiva disminuyó el porcentaje hemolítico a un 4.5% a 100 ppm, en comparación con el extracto metanólico de *C. officinalis* que presentó alto porcentaje hemolítico de 71.7% a 200 ppm.
- El uso de nanopartículas poliméricas no disminuyó el porcentaje hemolítico a comparación del uso de la combinación bioactiva libre a las mismas concentraciones.

## **11.0.- PERSPECTIVAS**

- Realizar estudios adicionales sobre la biocompatibilidad y toxicidad de las nanopartículas para determinar su aplicación terapéutica.
- Controlar la liberación de los extractos para una mejora en su administración controlada.
- Probar si en combinación de antibacterianos, a los que ya se les atribuye una resistencia, incrementa la efectividad.
- Estudiar el mecanismo de acción de los extractos metanólicos y las nanopartículas al interactuar con las células para poder modular los mecanismos de resistencia.
- Desarrollo de formulaciones a escala piloto.

## 12.0.- REFERENCIAS

- Alvarado Lerma, R. (2025). *Formulación de nanoinsecticidas con extracto de semilla de Litchi chinensis S. para el control de Aedes aegypti L.* [Tesis de maestría en manejo y aprovechamiento integral de recursos bióticos]. Universidad autónoma de Nuevo León.
- Ashraf, A., Riraz, M., Nasrullah, M., Hanif, M., Javaid, B., Ali, S., & Qayyum, M. A. (2017). Phytochemical, antioxidant and cytotoxicity studies OF *Calendula officinalis* L. (POT MARIGOLD) leaves extracts. *Oxidation Communications* 40, 1-1, 120-130. [https://www.researchgate.net/profile/Arooba-Ashraf/publication/307594164\\_Phytochemical\\_antioxidant\\_and\\_cytotoxicity\\_studies\\_of\\_Calendula\\_officinalis\\_Pot\\_marigold\\_leaves\\_extracts/links/602f66c54585158939b48edc/Phytochemical-antioxidant-and-cytotoxicity-studies-of-Calendula-officinalis-Pot-marigold-leaves-extracts.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Arooba-Ashraf/publication/307594164_Phytochemical_antioxidant_and_cytotoxicity_studies_of_Calendula_officinalis_Pot_marigold_leaves_extracts/links/602f66c54585158939b48edc/Phytochemical-antioxidant-and-cytotoxicity-studies-of-Calendula-officinalis-Pot-marigold-leaves-extracts.pdf)
- Burga Muñoz, R. B., & Quispe Chilón, M. E. (2022). Análisis de la utilización de plantas medicinales para enfermedades fúngicas en la población de Shaullo Chico–Baños del Inca, Cajamarca 2022.
- Bruguera, Manuel, & Morejón García, Moisés. (1998). Antibacterianos de acción sistémica: Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), 347-361. Recuperado en 05 de junio de 2025, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21251998000400008&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21251998000400008&lng=es&tlng=es).
- CDC. (2020). Preguntas y respuestas sobre el uso de antibióticos | Prescripción y uso de antibióticos | CDC. Recuperado 22 de enero de 2023, de <https://www.cdc.gov/antibiotic-use/sp/should-know.html>
- De La Cruz-Jiménez, L., Hernández-Torres, M. A., Monroy-García, I. N., Rivas-Morales, C., Verde-Star, M. J., Gonzalez-Villasana, V., & Viveros-Valdez, E. (2022). Biological activities of seven medicinal plants used in Chiapas, Mexico. *Plants*, 11(14), 1790.

- Diego, M. P. (2013). Las tinturas madre homeopáticas de *Calendula officinalis* y *Echinacea angustifolia* como antiséptico oral. *Revista Médica de Homeopatía*, 6(3), 112-126. <https://doi.org/10.1016/j.homeo.2013.07.005>
- do Rosário Palma, A. L., Santos, P. B. D. R. E. D., Pereira, T. C., Marcucci, M. C., Sawaya, A. C. H. F., & de Oliveira, L. D. (2023). Effects of *Calendula officinalis* and *Capsicum annum* glycolic extracts on planktonic cells and biofilms of multidrug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*, 39(2), 145-156.
- Dong, P., Sahle, F. F., Lohan, S. B., Saeidpour, S., Albrecht, S., Teutloff, C., ... & Meinke, M. C. (2019). pH-sensitive Eudragit® L 100 nanoparticles promote cutaneous penetration and drug release on the skin. *Journal of Controlled Release*, 295, 214-222.
- Elizondo-Luevano, JH, Castro-Ríos, R., Parra-Saldívar, R., Larqué-García, H., Garza-Tapia, M., Melchor-Martínez, EM, & Chávez-Montes, A. (2023). Influence of polymer and solvent variables on the nanoencapsulation of the flavonoid quercetin: A preliminary study based on Eudragit® polymers. *Applied Sciences*, (13), 7816.
- Espinoza Mijangos A.J. (2023) Evaluación de extractos metanólicos libres y nanoencapsulados de *Smilax spp.*, *Chiranthodendron pentadactylon*, y *Peumus boldus* contra bacterias de interés dermatológico. [Tesis de maestría en manejo y aprovechamiento integral de recursos bióticos]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Galindo Contreras, E. I. (2022). *Obtención, caracterización fitoquímica de los extractos vegetales de Illicium verum y Brosimum alicastrum y su evaluación hemolítica* [Tesis de maestría en odontología avanzada]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Gideon, M., & Ladan, Z. (2022). Synergistic Combinatorial Strategy for Combating Antimicrobial Resistance (AMR) in Clinical Bacteria by Combining Antibiotics with Plant Extracts. *Fine Chemical Engineering*, 1-12. <https://doi.org/10.37256/fce.4120232071>

- Guevara Peralta, G. E. (2019). Determinación de carbapenemasas KPC y OXA-48, que fenotípicamente pertenecen al grupo de las serincarbapenemasas, en cultivos de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, mayo–julio, Trujillo 2018.
- Guzmán Maldonado, S. H., Díaz Huacuz, R. S., & González Chavira, M. M. (2017). *Plantas medicinales la realidad de una tradición ancestral* (1.<sup>a</sup> ed., Vol. 1044) [Electrónico]. INIFAP. [https://vun.inifap.gob.mx/BibliotecaWeb/\\_Content?/=1044](https://vun.inifap.gob.mx/BibliotecaWeb/_Content?/=1044)
- Hudz, N., Kobylinska, L., Pokajewicz, K., Horčinová Sedláčková, V., Fedin, R., Voloshyn, M., Myskiv, I., Brindza, J., Wieczorek, PP y Lipok, J. (2023). *Mentha piperita* : Essential oils and extracts, their biological activities and prospects for the development of new medicinal and cosmetic products. *Molecules*, 28 (21),7444. <https://doi.org/10.3390/molecules28217444>
- Jara González, M. O. (2016). Análisis sistemático de variables determinantes en la producción de nanopartículas poliméricas de Eudragit® RS, RL y PCL por el método de nanoprecipitación.
- Jeong, JY, Jung, IG, Yum, SH y Hwang, YJ (2023). Efectos inhibitorios sinérgicos in vitro de combinaciones de extractos de plantas sobre el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Pharmaceuticals* , 16 (10), 1491.
- Lastra Valdés, Humberto, & Piquet García, Rosario. (1999). *Calendula officinalis*. *Revista Cubana de Farmacia*, 33(3), 188-194. Recuperado en 04 de octubre de 2023, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75151999000300007&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151999000300007&lng=es&tlng=es).
- Mallandrich Miret, M. (2017). Estudio de formulaciones de ketorolaco de trometamina para aplicación sobre mucosas y piel. <https://diposit.ub.edu/dspace/handle/2445/118622>
- Mishra, S., y Chatterjee, A. (2011). Nueva síntesis de nanopartículas poliméricas y copolímeras mediante la técnica de microemulsión atomizada y

su caracterización. *Polímeros para Tecnologías Avanzadas* , 22 (12), 1593-1601.

- Molina Vieira Lins, A. (2021). Revisión sistemática al respecto de la infección por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa en pacientes internados en terapia intensiva.
- NatGeo. (2021, 20 agosto). La medicina en Egipto, así curaban enfermedades en el Antiguo Egipto. [historia.nationalgeographic.com.es. https://historia.nationalgeographic.com.es/a/medicina-egipto-asi-curaban-enfermedades-antiguo-egipto\\_6289](https://historia.nationalgeographic.com.es/a/medicina-egipto-asi-curaban-enfermedades-antiguo-egipto_6289)
- OMS. (2021, 17 noviembre). Resistencia a los antimicrobianos. Organización Mundial de la Salud. Recuperado 22 de enero de 2023, de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Paz-Zarza, V. M., Mangwani-Mordani, S., Martínez-Maldonado, A., Álvarez-Hernández, D. A., Solano-Gálvez, S. G., & Vázquez-López, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena De Infectología*, 36(2), 180-189. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182019000200180>
- Peralta Vázquez, C. (2022). Latinoamérica alberga toda la flora medicinal usada en la antigüedad. Universo sistema de noticias UV. <https://www.uv.mx/prensa/ciencia/latinoamerica-alberga-toda-la-flora-medicinal-usada-en-la-antigüedad/>
- Pérez González, Y. (2020). Determinación de la eficiencia antimicrobiana del extracto etanólico de la flor de sospó (*Pseudobombax ellipticum*) En las bacterias *Escherichia coli* 11229, *Escherichia coli* 25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- Protección Contra Riesgos Sanitarios, C. F. P. (2018). Estrategia Nacional de Acción contra la Resistencia a los Antimicrobianos en México. [gob.mx. https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/estrategia-nacional-de-accion-contra-la-resistencia-a-los-antimicrobianos-en-mexico](https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/estrategia-nacional-de-accion-contra-la-resistencia-a-los-antimicrobianos-en-mexico)

- Rather, M. A., Dar, B. A., Sofi, S. N., Bhat, B. A., & Qurishi, M. A. (2012). *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, S1574-S1583. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.04.011>
- Regino, W. O. (2022). Helicobacter pylori: el descubrimiento que rompió un dogma en Medicina. *Revista colombiana de Gastroenterología*, 37(3), 334-338.
- Sakhila, S., Mahardika, R., & Nurhadini. (2022). Nanoencapsulation of Simpura (Dillenia indica L.) Leaf Extract For Antibacterial. *ALKIMIA : Jurnal Ilmu Kimia Dan Terapan*, 6(2), 251-262. <https://doi.org/10.19109/alkimia.v6i2.13675>
- Shahen, M. Z., Mahmud, S., Rony, M. H., Sohana, S. N., Imran, M. A. S., Al Maruf, M. A., ... & Alam, M. S. (2019). Effect of antibiotic susceptibility and inhibitory activity for the control of growth and survival of microorganisms of extracts of Calendula officinalis. *Eur. J. Med. Health Sci*, 1(1), 1-9.
- Siddeeg, A., A. Salih, Z., E. Mukhtar, R. M., & O. Ali, A. (2018). Extraction and characterization of peppermint (Mentha piperita) essential oil and its assessment as antioxidant and antibacteria. *Gezira Journal Of Engineering And Applied Sciences*, 13(1). [https://www.researchgate.net/publication/328631741\\_Extraction\\_and\\_Characterization\\_of\\_Peppermint\\_Mentha\\_piperita\\_Essential\\_Oil\\_and\\_its\\_Assessment\\_as\\_Antioxidant\\_and\\_Antibacterial](https://www.researchgate.net/publication/328631741_Extraction_and_Characterization_of_Peppermint_Mentha_piperita_Essential_Oil_and_its_Assessment_as_Antioxidant_and_Antibacterial)
- Thakkar, S., & Misra, M. (2017). Electrospun polymeric nanofibers: New horizons in drug delivery. *European Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 107, 148-167. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.07.001>
- Urrejola, M. C., Soto, L. V., Zumarán, C. C., Peñaloza, J. P., Álvarez, B., Fuentevilla, I., & Haidar, Z. S. (2018). Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *International Journal Of Morphology*, 36(4), 1463-1471. <https://doi.org/10.4067/s0717-95022018000401463>

- 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