



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias Químicas

**Evaluación de la actividad antimicrobiana,  
farmacológica y genotóxica de *Catasetum integerrimum*  
Hook (Orchidaceae)**

Tesis para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Químicas**

**Presenta:**

**Torres Rico Daniel**

**Comité tutelar:**

**Directora de tesis: Dra. Candy Carranza Álvarez**

**Codirector de tesis: Dr. Alejandro Hernández Morales**



REPOSITORIO INSTITUCIONAL



## **UASLP-Sistema de Bibliotecas**

### **Repositorio Institucional Tesis Digitales Restricciones de Uso DERECHOS RESERVADOS**

#### **PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en este Trabajo Terminal está protegido por la Ley Federal de Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos.

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material 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 el autor o autores. Cualquier uso distinto o con fines de lucro, reproducción, edición o modificación será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Evaluación de la actividad antimicrobiana, farmacológica y genotóxica de *Catasetum integerrimum* Hook (Orchidaceae) © 2025 por Torres Rico Daniel se distribuye bajo una licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International

La parte experimental del proyecto de Maestría en Ciencias Químicas se llevó a cabo en el Laboratorio de Ciencias Ambientales de la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, durante el periodo de enero de 2023 a agosto de 2025. Fue desarrollado bajo la dirección de la Dra. Candy Carranza Álvarez, con la codirección del Dr. Alejandro Hernández Morales y la asesoría del Dr. Ángel Josabad Alonso Castro.

La maestría en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí forma parte del Sistema Nacional de Posgrados de Calidad (SNP) del SECIHTI, con registro 00519. Se recibió apoyo de beca SECIHTI con número 813248, vinculada al CVU 1181114.

Los datos generados en el trabajo titulado "Evaluación de la actividad antimicrobiana, farmacológica y genotóxica de *Catasetum integerrimum* Hook (Orchidaceae)" están bajo resguardo de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Investigación y Estudios de  
Posgrado en Ciencias Químicas  
Programa de Maestría

Formato M15

## Solicitud de Registro de Tesis Maestría

San Luis Potosí S.L.P., a Diciembre/ 16 /2024

**Comité Académico del PCQ  
FCQ de la UASLP  
Presente**

**En atención a: Coordinador del Posgrado**

Por este conducto solicito a Usted se lleve a cabo el registro de título de tesis de Maestría, el cual quedo definido de la siguiente manera: Evaluación de la actividad antimicrobiana, farmacológica y genotóxica de *Catsetum integerrimum* Hook (Orchidaceae).

que desarrollará el estudiante: Daniel Torres Rico

bajo la dirección y/o Co -dirección de: Dra. Candy Carranza Álvarez y el Dr. Alejandro Hernández Morales.

Asimismo, le comunico que el proyecto en el cual trabajará el alumno involucrará el manejo de animales de experimentación, estudios con seres humanos o muestras derivadas de los mismos, el manejo y/o generación de organismos genéticamente modificados y requiere de aval de Comité de Ética e investigación de la FCQ.

(Complete la opción que aplique en su caso):

( x ) Sí debido a que: Se trabajó con modelos animales de ratones Balb/c

( ) No

( ) No Aplica

Sin otro particular, quedo de Usted.

**A T E N T A M E N T E**

Daniel Torres Rico

Dra. Candy Carranza Álvarez

Nombre y firma del estudiante

Directora de Tesis



Guanajuato, Gto. 04 de noviembre de 2022  
Dictamen CEPIUG 76A/2022

Dr. Ángel Josabad Alonso Castro  
Departamento de Farmacia  
División de Ciencias Naturales y Exactas  
Campus Guanajuato  
Universidad de Guanajuato  
Presente

En relación con la adenda a su protocolo de investigación en animales enviado por usted denominado: **"Evaluación de los efectos farmacológicos de extractos etanólicos de dos orquídeas mexicanas"**, del cual es usted responsable; el Comité de Ética para la Investigación de la Universidad de Guanajuato (CEPIUG) se reunió de manera presencial y se revisaron en el mismo los requisitos éticos y normativos nacionales e internacionales aplicables al proyecto.

El pleno del CEPIUG, considera que el protocolo y los anexos, cumplen los requisitos bioéticos y por el presente dictamen informa a usted que el proyecto ha sido:

#### APROBADO

Dicho dictamen quedó asentado en el acta número **CEPIUG-A07-2022**. El código asignado por el CEPIUG al proyecto es: **CIBIUG-P48-2022** para que en lo sucesivo sea citado en los informes y publicaciones. Además, se le informa que debe entregar una carta compromiso dirigida al presidente del CEPIUG, incluyendo los apartados del art 33 de los lineamientos del CEPIUG disponibles en [www.cepiug.ugto.mx](http://www.cepiug.ugto.mx)

Asimismo, se le informa que el presente dictamen tiene una vigencia de un año y para obtener el refrendo o renovación de la vigencia, deberá presentar un breve informe en formato libre, señalando el grado de avance del proyecto, notificando cambios, reacciones inesperadas, así como cualquier modificación en el proyecto. **Al finalizar el proyecto debe enviar un breve informe indicando si se presentaron efectos adversos o problemas o cambios durante su realización, así como los medios por los cuales se dio información de los resultados a los participantes y a la comunidad científica.**

El CEPIUG se reserva el derecho de revisar el desarrollo del proyecto con el objeto de proteger los derechos y la dignidad de los participantes.

Atentamente,  
"La verdad os hará libres"

DRA. MA. EUGENIA GARAY SEVILLA  
LA PRESIDENTA DEL COMITÉ

C.C.P. DR. LUIS FELIPE GUERRERO AGRIPINO - RECTOR GENERAL U.G.  
DRA. CECILIA RAMOS ESTRADA - SECRETARIA GENERAL U.G.  
DR. SERGIO ANTONIO SILVA MUÑOZ - SECRETARIO ACADÉMICO  
DR. MAURO NAPSUCIALE MENDIVIL - DIRECTOR DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN Y AL POSGRADO U.G.  
EXPEDIENTE



COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO  
Calzada de Guadalupe S/N.  
Guanajuato, Guanajuato, México. C. P. 36000  
[www.cepiug.ugto.mx](http://www.cepiug.ugto.mx)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Posgrado en Ciencias Químicas

**Evaluación de la actividad antimicrobiana, farmacológica y genotóxica de *Catasetum integerrimum* Hook (Orchidaceae)**

Tesis para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Químicas**

**Presenta:**

**Torres Rico Daniel**

**SINODALES:**

**Dr. Alejandro Hernández Morales**  
Presidente

\_\_\_\_\_

**Dra. Candy Carranza Álvarez**  
Secretaria

\_\_\_\_\_

**Dr. Ángel Josabad Alonso Castro**  
Vocal

\_\_\_\_\_

**Dr. Luis Jesús Castillo Pérez**  
Suplente

\_\_\_\_\_

## **INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORIAL ACADÉMICO**

Dra. Candy Carranza Álvarez, Directora de tesis. Profesora Investigadora de Tiempo Completo de la FEPZH de la UASLP, miembro del núcleo académico básico del Posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Alejandro Hernández Morales, Codirector de tesis. Profesor Investigador de Tiempo Completo de la FEPZH de la UASLP, miembro del núcleo académico básico del Posgrado en Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P.

Dr. Ángel Josabad Alonso Castro, Asesor externo de tesis. Adscrito al Departamento de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato.



## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado  
Posgrado en Ciencias Químicas  
Programa de Maestría

Formato M5

### Carta Cesión de Derechos

San Luis Potosí, S.L.P., a 30/06/2025

En la ciudad de San Luis Potosí el día 30 del mes de junio del año 2025. El que suscribe Daniel Torres Rico, alumno del programa de posgrado en Ciencias Químicas adscrito a Universidad Autónoma de San Luis Potosí manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo terminal, realizado bajo la dirección de: Dra. Candy Carranza Álvarez y el Dr. Alejandro Hernández Morales, y cede los derechos del trabajo titulado Evaluación de la actividad antimicrobiana, farmacológica y genotóxica de *Catasetum integerrimum* Hook (Orchidaceae) a la **Universidad Autónoma de San Luis Potosí**, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir de forma total o parcial texto, gráficas, imágenes o cualquier contenido del trabajo sin el permiso expreso del o los autores. Éste, puede ser obtenido directamente con el autor o autores escribiendo a la siguiente dirección danieltorresrico.98@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.

---

Daniel Torres Rico

Nombre y firma del alumno



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ  
Facultad de Ciencias Químicas  
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado  
Posgrado en Ciencias Químicas  
Programa de Maestría

Formato M28

## Carta de Análisis de Similitud

San Luis Potosí SLP a julio 15 del 2025

**L.B. María Zita Acosta Nava**  
**Biblioteca de Posgrado FCQ**

**Asunto:** Reporte de porcentaje de similitud de tesis de grado

Por este medio me permito informarle el porcentaje de similitud obtenido mediante Ithenticate para la tesis titulada “Evaluación de la actividad antimicrobiana, farmacológica y genotóxica de *Catasetum integerrimum* Hook (Orchidaceae)”, presentada por el autor Torres Rico Daniel. La tesis es requisito para obtener el grado de Maestría en el Posgrado en Ciencias Químicas. El análisis reveló un porcentaje de similitud de 24% excluyendo referencias y metodología.

Agradezco sinceramente su valioso tiempo y dedicación para llevar a cabo una exhaustiva revisión de la tesis. Quedo a su disposición para cualquier consulta o inquietud que pueda surgir en el proceso.

Sin más por el momento, le envío un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E:**

Dr. Fidel Martínez Gutiérrez  
Coordinador Académico del Posgrado  
en Ciencias Químicas

*Esta tesis esta dedica a mis padres, que siempre estuvieron a mi lado, apoyándome y guiando me en todos mis pasos, permitiéndome alcanzar una meta más*

*Dedicada a mi Dios, que siempre me dio bendiciones, amor y salud para poder afrontar mis problemas.*

*Dedicada al amor de mi vida, que siempre me apoyo y me hizo ver y corregir todos mis errores*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco de manera muy especial a la Dra. Candy Carranza, por darme la oportunidad de llevar a cabo el presente trabajo, por su apoyo constante, por sus consejos, por su confianza y el conocimiento que invirtió en mi formación.

Al Dr. Alejandro Hernández Morales por la asesoría, el apoyo, la colaboración y la atención que me ofreció durante la realización del presente proyecto.

Al Dr. Ángel Josabad Alonso Castro, por su asesoría y gran apoyo en la realización de mi estancia y la escritura del presente trabajo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por mostrar siempre apoyo durante la realización del presente proyecto. Especial agradecimiento al Dr. Luis J. Castillo Pérez, M.C. Amauri Ponce Hernández, M.C. Claudia E. Moctezuma, M.C. Ángel Montes Rocha, M.C. Rocío C. Díaz Torres, M.C. David Torres Cruz, BQ. Alejandra Morales López, BQ. Juan Gilberto Ceballos Maldonado, BQ. Javier Alexis GR.

Al CONAHCyT por otorgarme la beca para financiar mis estudios de maestría y poder cumplir con la realización de este proyecto.

A cada uno de los doctores de la Facultad de Ciencias Químicas que ayudaron en mi formación profesional de maestría a través de la impartición de materias que me ayudaron para la comprensión y realización de este proyecto.

## RESUMEN

En México, las poblaciones indígenas poseen una fuerte cultura asociada al uso de plantas medicinales, entre las que destacan algunas especies de orquídeas como *Catasetum integerrimum*, utilizada en la Huasteca Potosina poblaciones de la etnia tenek y náhuatl para el tratamiento de infecciones renales y de vías urinarias. Esta orquídea no cuenta con estudios científicos que respalden esta propiedad, incluyendo su seguridad toxicológica. En esta investigación se evaluó la actividad antimicrobiana, farmacéutica y genotóxica de *C. integerrimum* a través de extractos etanólicos de pseudobulbos (ESCI) y plantas cultivadas *in vitro* (EICI). Para la evaluación de la actividad antimicrobiana e inhibitoria del *Quorum Sensing* (QSI) se emplearon las pruebas de difusión en disco, concentración mínima inhibitoria y cuantificación bacteriana por goteo, presentando un efecto nulo en la actividad antimicrobiana sobre las cepas de interés clínico y en la QSI. La actividad antinociceptiva del ESCI (10-100 mg/kg p.o.) se evaluó mediante pruebas químicas (ácido acético y formalina) y térmicas (hot plate). Asimismo, la actividad antiinflamatoria se evaluó mediante la prueba de edema auricular inducido por 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). Finalmente, la evaluación de la actividad genotóxica de *C. integerrimum* (10-500 µg/mL) se realizó a través del ensayo cometa. El ESCI mostró efecto antinociceptivo en los 3 modelos, a partir de las dosis de 50 mg/kg, presentando el mejor efecto en la prueba de contorciones inducidas por ácido acético. Además, presentó un bajo efecto antiinflamatorio en comparación con el diclofenaco (1.16%). Por otro lado, el ESCI mostró daños en el ADN a partir de concentraciones de 50 µg/mL. El efecto antinociceptivo del ESCI fue bloqueado por el uso de naloxona en las pruebas de hot plate y formalina, indicando un mecanismo de acción relacionado al sistema opioidérgico. Este estudio comprueba la presencia de actividad antinociceptiva por los pseudobulbos de *C. integerrimum*, sugiriendo un consumo moderado para el tratamiento del dolor, asimismo, sugiere una importante fuente de investigación a futuro.

**Palabras clave:** *C. integerrimum*, antinociceptivo, antiinflamatorio, *quorum sensing*, genotóxico.

## ABSTRACT

In Mexico, indigenous populations have a strong culture associated with the use of medicinal plants, including some species of orchids such as *Catasetum integerrimum*, used in the Huasteca Potosina by the Tenek and Nahuatl ethnic groups for the treatment of kidney and urinary tract infections. This orchid represents an important alternative treatment for the population; however, no scientific studies have supported this property, including its toxicological safety. In this research, the antimicrobial, pharmaceutical and genotoxic activity of *C. integerrimum* was evaluated through ethanolic extracts of pseudobulbs (ESCI) and in vitro cultured plants (EICI). For the evaluation of the antimicrobial and inhibitory activity of Quorum Sensing (QSI), disc diffusion tests, minimum inhibitory concentration and bacterial quantification by droplet were used, presenting a null effect on the antimicrobial activity on the strains of clinical interest and QSI. The antinociceptive activity of ESCI (10-100 mg/kg p.o.) was evaluated by chemical (acetic acid and formalin) and thermal (hot plate) tests. Likewise, anti-inflammatory activity was evaluated by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced atrial edema test. Finally, the evaluation of the genotoxic activity of *C. integerrimum* (10-500 µg/mL) was performed by the comet assay. ESCI showed an antinociceptive effect in all 3 models, starting at doses of 50 mg/kg, presenting the best effect in the acetic acid-induced contortions test. In addition, it showed a low anti-inflammatory effect compared with the reference drug. On the other hand, ESCI showed DNA damage at concentrations of 50 µg/mL and above. The antinociceptive effect of ESCI was blocked using naloxone in the hot plate and formalin tests, indicating an opioidergic system-related mechanism of action. This study proves the presence of antinociceptive activity by the pseudobulbs of *C. integerrimum*, suggesting a moderate consumption for the treatment of pain, and suggests an important source of future research.

**Key words:** *C. integerrimum*, antinociceptive, anti-inflammatory, *quorum sensing*, genotoxic.

# CONTENIDO

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
CAPITULO II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Generalidades de las orquídeas .....	5
2.2 Las orquídeas en México.....	8
2.3 Usos etnofarmacológicos de las orquídeas.....	8
2.4 Generalidades de la orquídea <i>C. integerrimum</i> .....	10
2.4.1 Clasificación taxonómica de <i>C. integerrimum</i> .....	11
2.5 Descripción botánica de <i>C. integerrimum</i> .....	12
2.5.1 Propiedades etnofarmacológicas de <i>C. integerrimum</i> .....	14
2.6 Infecciones de las vías urinarias .....	14
2.6.1 Alternativas contra las bacterias resistentes a antibióticos.....	16
2.6.2 Estudios de la QSI a través de extractos de plantas .....	16
2.7 Dolor e inflamación como síntomas.....	17
2.7.1 Pruebas antinociceptivas.....	20
2.7.2 Pruebas antiinflamatorias .....	21
2.8 Toxicidad por consumo de plantas medicinales .....	22
2.8.1. Ensayo de electroforesis alcalina de células individuales .....	23
CAPITULO III. OBJETIVOS .....	25
3.1 Planteamiento del problema .....	25
3.2 Justificación .....	25
3.3 Hipótesis y objetivos.....	26
3.3.1 Hipótesis.....	26
3.3.2 Objetivo general .....	26
3.3.3 Objetivos específicos .....	26
CAPITULO IV. METODOLOGIA.....	27
4.1 Material vegetal y elaboración del extracto etanólico .....	27
4.2 Pruebas de susceptibilidad Antimicrobiana y Anti-Quorum Sensing .....	27
4.2.1 Preparación del inóculo bacteriano.....	27
4.2.2 Prueba de difusión en disco.....	28
4.2.3 Actividad Anti- <i>Quorum Sensing</i> .....	29

4.2.4 Fraccionamiento de los extractos .....	29
4.2.5 Cromatografía en capa fina (TLC): .....	30
4.2.6 Microdilución en placa.....	30
4.2.7 Cuantificación bacteriana por goteo en placa .....	31
4.3 Pruebas de susceptibilidad antinociceptiva y antiinflamatoria .....	31
4.3.1 Prueba de hot plate (Placa caliente).....	31
4.3.2 Prueba de contorciones inducidas por ácido acético 1%.....	32
4.3.4 Prueba de formalina .....	32
4.3.5 Inflamación aguda por TPA.....	32
4.4 Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN por ensayo cometa.....	33
4.5 Análisis estadístico .....	35
CAPITULO VIII. REFERENCIAS.....	36

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor de <i>Odontoglossum crispum</i> para ejemplificar la estructura floral generalizada de la familia Orchidaceae. Tomado de Singer (2009). .....	5
Figura 2. Tipos de orquídeas según su hábitat: A) <i>Cypripedium calceolus</i> , terrestre; B) <i>Phragmipedium longifolium</i> , litofita; C) <i>Odontoglossum crispum</i> , epifita. ....	7
Figura 3. Distribución geográfica de <i>C. integerrimum</i> en México. Tomado de Salazar (1990). ....	11
Figura 4. Apariencia de la flor masculina de <i>C. integerrimum</i> .....	12
Figura 5. Ilustración de <i>C. integerrimum</i> . Elaborada por Gerardo A. Salazar. Tomada de Salazar (1990). ....	13

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Usos etnofarmacológicos del género <i>Catasetum</i> . ....	9
--	---

## CAPITULO 1 INTRODUCCIÓN

En México se han registrado más de cuatro mil especies de plantas con atributos medicinales, representando un 15% del total de la flora del país. El uso de estas plantas es en forma de extractos elaborados a partir de procedimientos como la maceración, decocción e infusión (CONABIO, 2020; Gallegos-Zurita, 2016). Dentro de las plantas medicinales, está presente la familia *Orchidaceae*, dado que algunas orquídeas son utilizadas y comercializadas con fines medicinales (Cano-Asseleih et al., 2015; Cox Tamay, 2013; Vergara-Galicia et al., 2013; Solano Gómez et al., 1996), un ejemplo es *C. integerrimum*, la cual se comercializa en la Huasteca Potosina, debido a su potencial medicinal, siendo empleada en el tratamiento contra infecciones renales y urinarias. Sin embargo, no hay estudios científicos recientes que avalen esta propiedad.

Entre los principales estudios asociados a la evaluación de la actividad antimicrobiana, un método actual es la evaluación de la inhibición del *Quorum Sensing* (QSI), siendo este un mecanismo de regulación de la expresión genética en respuesta a la densidad de la población celular, a través de la producción y liberación de moléculas de señal externa (autoinductores). El *Quorum Sensing* (QS) es utilizado por bacterias para regular la formación de biopelículas, la transferencia de ADN conyugal, patogénesis, producción de polisacáridos extracelulares, entre otros procesos (Rehman y Leiknes, 2018). Basados en este sistema, los organismos evolucionaron para desarrollar un contrasistema capaz de perturbar el QS a través de la producción de enzimas o sustancias químicas, denominado *Anti-Quorum Sensing* (Hemmati et al., 2020).

La presencia de metabolitos capaces de producir efectos inhibitorios del *Quorum Sensing* (QSI), ha sido reportada en extractos de plantas medicinales, teniendo como ejemplo a *Passiflora edulis*, *Salix tetrasperma*, *Searsia lancea*, *Searsia batophylla*, entre otros (Adeyemo et al., 2022; Mostafa et al., 2020; Venkatramanan et al., 2020). El uso de *C. integerrimum* como tratamiento contra infecciones renales sugiere un posible efecto antimicrobiano o QSI, reportando la reducción de inflamación y dolor por

poblaciones tének y náhuatl. Por otra parte, no se modifica el hecho de que esta especie vegetal es empleada sin la existencia de artículos científicos que demuestren sus efectos farmacológicos, asimismo, se desconoce si la planta presenta efectos toxicológicos por un consumo crónico, como se ha mostrado en otras plantas medicinales (Edziri *et al.*, 2020; Kahaliw *et al.*, 2018).

Dentro de los agentes toxicológicos se encuentran aquellos capaces de modificar el material hereditario de las células vivas, denominados genotóxicos (Sommer *et al.*, 2020). Actualmente, dentro de los principales estudios para medir genotoxicidad se encuentra el ensayo de micronúcleos, ensayo de aberraciones cromosómicas, ensayo de Ames y ensayo cometa. Este último se ha estandarizado y utilizado ampliamente debió a su bajo costo, versatilidad y confiabilidad en la generación de resultados (Møller, 2018; Turkez *et al.*, 2017).

Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación es realizar estudios a *Catasetum integerrimum* con el fin de corroborar las propiedades medicinales que la población le atribuye, así como estudiar posibles daños genotóxicos, ocasionados por su consumo prolongado. En este sentido, la determinación de actividad Anti-*Quorum Sensing*, pruebas antinociceptivas e inflamatorias y el ensayo cometa son importantes propuestas para la realización de estos estudios.

## CAPITULO II ANTECEDENTES

El género *Catasetum* comprende un gran número de especies, de las cuales, pocas han sido reportadas con propiedades etnofarmacológicas, entre ellas *C. integerrimum*. Los pseudobulbos de esta especie se utilizan para el tratamiento contra infecciones de vías renales y urinarias (Castillo-Pérez *et al.*, 2021), sin embargo, no llega a presentar estudios científicos que avalen una posible actividad antimicrobiana o QSI.

Para el estudio del efecto QSI, se han empleado análogos naturales (derivados de plantas) y sintéticos de N-Acil Homoserina Lactona (AHL), reportando señales antagonicas para QS. Estos análogos actúan directamente sobre importantes receptores y reguladores en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Liu *et al.*, 2003). Un ejemplo de estudio de actividad QSI *in vitro* es el de Elekhawy *et al.* (2022), en el cual probaron un extracto metanólico de *Dioon spinulosum* sobre la formación de biopelículas en *Pseudomonas aeruginosas*. Se observó que el extracto disminuye la formación de biopelículas en porcentajes del 77.1% al 34.3% en aislados de *P. aeruginosa* que formaban biopelículas fuertes y moderadamente fuertes, respectivamente. Un segundo estudio, es el del Okhee *et al.* (2018), donde probaron la actividad QSI de extractos etanólicos de 388 plantas, sobre *Chromobacterium violaceum* CV017. Mediante el ensayo de difusión en disco, se observó la disminución de violaceína utilizando los extractos de *Cornus controversa* y *Cynanchum wilfordii*.

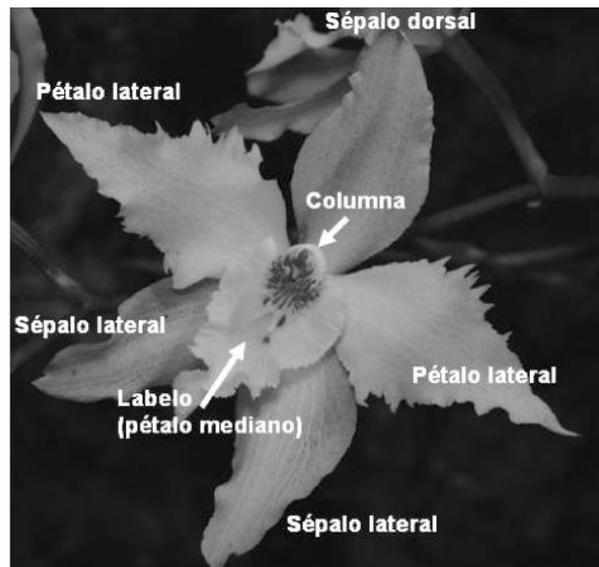
Al estudiarse el efecto de *C. integerrimum* contra infecciones renales, se tendrían presentes pruebas farmacológicas enfocadas en la actividad antimicrobiana. Sin embargo, la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria es un punto de estudio importante, siendo el dolor y la inflamación síntomas principales en estas infecciones. Actualmente se han desarrollado una gran cantidad de técnicas capaces de evaluar los efectos farmacológicos presentes en plantas, teniendo como ejemplo, la investigación de Demsie *et al.* (2019) en la que determinaron la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria de un extracto de raíz de *Cucumis fisisifolius* en ratones albinos Swiss, a través de las pruebas de contracciones inducidas por ácido acético y

formalina, para actividad antinociceptiva; y edema plantar inducido por carragenina, para actividad antiinflamatoria, obteniendo los mejores resultados en el extracto crudo metanólico de *C. fisifolius* a una dosis de 800 mg/kg, presentando un porcentaje de protección de 72.5% y 83% (fase tardía), para las pruebas de contracciones inducidas por ácido acético y formalina, respectivamente. Asimismo, el extracto presentó el mejor resultado para la prueba de edema plantar inducido por carragenina, con un 71% de inhibición de inflamación, transcurridas las 4 horas de la aplicación de la carragenina. Por otro lado, la confirmación de actividad farmacológica en plantas medicinales, no las excluye de presentar actividad toxicológica, por lo cual es necesario realizar los correspondientes estudios.

En la actualidad, se han reportado distintos extractos de plantas medicinales capaces de ocasionar toxicidad en la célula, presentando posibilidad de mutaciones genéticas y cromosómicas (Boumazza *et al.*, 2024; María *et al.*, 2022; Mert y Betül, 2021). Uno de los ensayos con sensibilidad para evidenciar el daño genotóxico es el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales o ensayo cometa. Este ensayo evalúa el daño genético causado a las células, tanto animales, como vegetales, por diferentes agentes químicos y físicos. La técnica establecida por Singh *et al.* (1988) bajo condiciones de lisis y electroforesis alcalina (pH 13) permite analizar la migración del ADN debido a rupturas en la hebra simple del ADN y a sitios álcali lábiles. Consiste principalmente en el análisis de células individuales que son lisadas y se someten a una electroforesis (Cordelli *et al.*, 2021; Fernández *et al.*, 2021). Esta técnica ha sido empleada para reportar actividad genotóxica en plantas utilizadas con fines medicinales, teniendo como ejemplo a *Pterolobium stellatum*, *Matricaria chamomilla* y *Tulbaghia violacea* (Fernández *et al.*, 2021; Kahaliw *et al.*, 2018).

## 2.1 Generalidades de las orquídeas

Las especies de la familia Orchidaceae constituyen una de las familias vegetales más diversas en el mundo. Existen alrededor de 800 géneros y 28000 especies, las cuales poseen flores de gran diversidad, exhibiendo una extraordinaria variedad de tamaños, formas y colores, cualidad que le brinda un gran potencial para la industria ornamental (Baker *et al.*, 2014). Se caracterizan por presentar una estructura floral formada por tres sépalos, y tres pétalos, uno de los cuales generalmente se encuentra modificado de forma más vistosa (Fig. 1). El pétalo modificado se denomina labelo y funciona para atraer a los polinizadores hacia las estructuras reproductoras de la flor. El labelo varía de acuerdo con la especie, algunos presentan ornamentaciones muy llamativas o funcionan como trampas con forma de recipiente, además, en la mayoría de las especies de orquídeas se encuentra también la columna, órgano donde se encuentran las partes masculinas y femeninas de la flor (Cox-Tamay *et al.*, 2016).

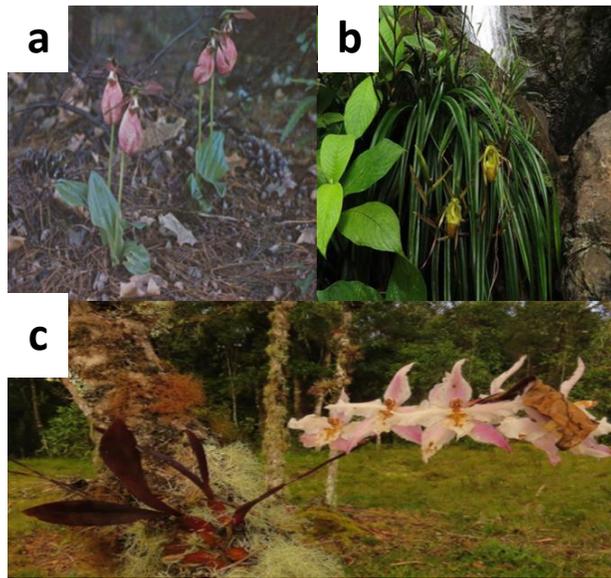


**Figura 1.** Flor de *Odontoglossum crispum* para ejemplificar la estructura floral generalizada de la familia Orchidaceae. Tomado de Singer (2009).

Generalmente, las orquídeas son de tamaño pequeño, aunque existen algunas con tallos que sobrepasan los dos metros de altura, por ejemplo, *Epistephium elatum*, *Vanilla planifolia* y *Sobralia dichotoma*. Así mismo, algunas especies de orquídeas poseen pseudobulbos, llegando a pesar varias decenas de kilos. Los pseudobulbos

ayudan a almacenar agua y nutrientes que luego pueden usar para la producción de flores o nuevos brotes (Jiménez-Machorro *et al.*, 1998). Las raíces de las orquídeas sirven para sujetarse a los troncos y ramas de los árboles, contribuyen a la absorción de agua y nutrientes gracias al desarrollo de velamen, estructura que funciona a manera de esponja para captar de forma eficiente el agua que escurre sobre las ramas y troncos, reduciendo la pérdida del líquido en momentos de baja disponibilidad, brindando protección a la raíz (Costa-Joca *et al.*, 2017).

En cuanto a su distribución, las orquídeas se encuentran presentes en todos los continentes (con excepción de regiones polares y desiertos extremos), concentrando su mayor diversidad en las regiones tropicales. Así mismo, se caracterizan por sus diversos hábitos de crecimiento, algunas se desarrollan sobre los árboles (epífitas), sobre la tierra (terrestres), o sobre las rocas (litófitas) (Hágsater *et al.*, 2006) (Fig. 2). La distribución y dominancia de sus especies dependen de las condiciones climáticas y su distribución altitudinal, comprendida entre los 100 a 4800 msnm, por lo que pueden clasificarse como orquídeas de climas cálidos y orquídeas de climas fríos. Respecto a la humedad, existen orquídeas que se desarrollan en climas muy secos y otras en climas intermedios y muy húmedos, presentando mayor abundancia y diversidad en hábitats con 2.5 m<sup>2</sup> de lluvia anual (Dressler, 1981).



**Figura 2.** Tipos de orquídeas según su hábitat: A) *Cyripedium calceolus*, terrestre; B) *Phragmipedium longifolium*, litofita; C) *Odontoglossum crispum*, epífita.

Es importante mencionar que pocas plantas presentan sistemas de supervivencia simbiótica tan específicas como las orquídeas. Por ejemplo, las semillas eliminan las reservas de nutrientes para reducir su tamaño y poder ser transportadas grandes distancias con ayuda del viento, estableciéndose en las partes más altas de los árboles o a grandes distancias de la planta madre y asociándose con hongos denominados micorrizas o con las cortezas de los árboles para la obtención de sus nutrientes. Otro ejemplo de simbiosis es el desarrollo de tallos huecos con el fin de almacenar hormigas que las protejan, produciendo néctar extrafloral como forma de ofrenda para que diversos insectos actúen en su defensa o exhibiendo increíbles polimorfismos de abeja hembra para atraer zánganos despistados (Hágsater *et al.*, 2006).

Debido a estos diversos mecanismos ecológicos, las especies de la familia Orchidaceae son consideradas como las más evolucionadas en el reino vegetal. En la actualidad, aparte de la belleza que caracteriza a sus flores, poseen diversos usos en todo el mundo, lo cual las ha convertido en plantas interesantes para su estudio científico.

## **2.2 Las orquídeas en México**

En México, la familia Orchidaceae ocupa el tercer lugar a nivel familia con un aproximado de 1,260 especies y 170 géneros, de los cuales alrededor del 60% son epifitas, además, ocupan el segundo lugar como plantas más amenazadas, solo por detrás de los cactus (Castillo Pérez, 2018; Cox Tamay, 2013), siendo un punto para destacar, dado que se estima que el 40% de las orquídeas presentes en México son endémicas del territorio nacional (Castillo-Pérez *et al.*, 2019). En cuanto a su distribución, se sabe que los bosques de neblina y las selvas tropicales húmedas del sur del país son los ecosistemas más favorables para la existencia de orquídeas. Sin embargo, se presentan en mayor concentración en los bosques tropicales perennifolios, subcaducifolios y caducifolios, pero de forma más relevante en los bosques mesófilos de montaña (o bosques de neblina) donde se alberga cerca del 50 al 60% de la orquideoflora del país, siendo Oaxaca el estado que presenta una mayor concentración de orquídeas (Hágsater *et al.*, 2006).

Cada especie de orquídea o grupos de éstas son recursos que caracterizan a las diferentes culturas y regiones del mundo, y México no es la excepción, empleándolas desde tiempos prehispánicos y cumpliendo con una amplia variedad de funciones entre las que destacan sus aplicaciones alimentarias, culturales o religiosas, ornamentales y medicinales. Esta última aplicación tiende a ser de gran importancia en la etnofarmacológica, ya que, junto con otras grandes familias de plantas, han fungido como importantes recursos terapéuticos en muchas comunidades indígenas y rurales de México hasta la actualidad, especialmente en zonas con poca infraestructura médica, siendo la principal alternativa a la medicina alopática (Aguilar *et al.*, 1994; Aguilar y Camacho, 1985).

## **2.3 Usos etnofarmacológicos de las orquídeas**

La documentación de usos medicinales de las orquídeas inicio en la publicación de los primeros volúmenes del *Herbarium Amboinense* de Eberhard Rumphius (1628 - 1702) en 1741 – 1755. Este fue el inicio de un sinfín de estudios futuros enfocados en una gran variedad de usos etnofarmacológicos, donde se han empleado todas las partes

de las orquídeas, desde hojas, tallos y flores, hasta pseudobulbos y raíces. En México, se han documentado una gran variedad de aplicaciones etnofarmacológicas de las orquídeas, destacando sus usos como antiinflamatorias, antipiréticas, antitumorales, anticancerígenas, antibacterianas, antimicrobianas, entre otras (Castillo-Pérez et al., 2024; Ponce-Hernández et al., 2023; Teoh, 2019; Castillo-Pérez, 2018). Actualmente, la Huasteca Potosina cuenta con una gran diversidad de géneros de orquídeas con aplicaciones etnofarmacológicas, teniendo como ejemplos los géneros: *Cyrtopodium*, con *C. macrobulbo* (García-Peña y Peña, 1981; Morales-Sánchez et al., 2014); *Stanhopea*, con *S. tigrina* (del Carmen Díaz-Torres et al., 2024; Castillo-Pérez et al., 2021; Teoh, 2019); *Laelia*, con *Laelia anceps* (Vergara-Galicia et al., 2013; Jimarez-Montiel, 2009); *Catasetum*, con *C. integerrimum* (Ponce-Hernández et al., 2023; Teoh, 2019; Cox Tamay, 2013; Hágater et al., 2006), destacando este último género, debido a la gran variedad de usos etnofarmacológicos distribuidos entre sus diferentes especies (Cuadro 1), en específico, *C. integerrimum*, siendo la especie con mayor número de documentaciones, presentando una gran diversidad de aplicaciones medicinales.

**Cuadro 1.** Usos etnofarmacológicos del género *Catasetum*.

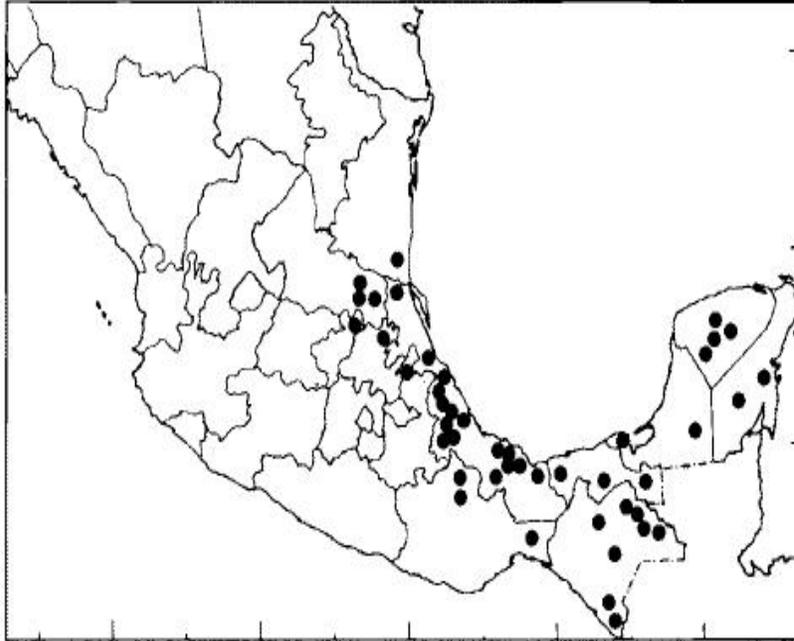
Especies de <i>Catasetum</i>	Sección de la planta usada	Vía de preparación	Usos etnofarmacológicos	País donde se utiliza	Referencias
<i>Catasetum maculatum</i> Kunth	Pseudobulbo	Emplasto	Tratamiento de inflamaciones, abscesos, llagas y verrugas	México	Kunow (1958), Cervantes-Reyes (2008)
<i>Catasetum fimbriatum</i> (Morren) Lindl.	Pseudobulbo	Infusión con rizoma de <i>Typha latifolia</i>	Reducir la fertilidad	Paraguay	Arenas y Moreno-Azorero (1977)
		Infusión	Anticonceptivo	Paraguay and Brasil	Teoh (2019)
<i>Catasetum barbatum</i> (Lindl.) Lindl.	Partes aereas	NM	Asma y lumbago	Paraguay	Shimuzu et al. (1988)
	Hoja	NM	Tratamiento de "nacidos"	México	Ankli et al. (1999)

<i>Catasetum integerrimum</i> Hook	Toda la planta	NM	Enfermedades dermatológicas		Alonso-Castro <i>et al.</i> (2011)	
	Pseudobulbo	Licuada con agua	Suplemento contra infecciones renales y urinarias		Castillo-Pérez <i>et al.</i> (2021)	
	NM	Infusión con hojas de <i>Laelia autumnalis</i>	Tratamiento de la tos		Cervantes-Reyes (2008)	
			Mordeduras de serpiente		Téllez-Valdés <i>et al.</i> (1989)	
			Cura de tumores y en el tratamiento de abscesos y heridas		Cox-Tamay (2013)	
			Quemaduras y heridas		Cruz-García <i>et al.</i> (2014)	
	Antidiarreico		Teoh (2019)			
Pseudobulbo, hoja, raíz, capsula	Infusión o licuada con agua	Tratamiento de colitis, diabetes, hipertensión, afecciones renales y cáncer		Galicia-Mendieta (2017), Hernández-Bautista y Martínez-Espinoza (2019)		
<i>Catasetum expansum</i> Rchb. f.	Tallo	Emplasto o cataplasma	Tratamiento de fracturas y roturas de huesos	Ecuador	Zambrano-Intriago <i>et al.</i> (2015)	
<i>Catasetum macroglossum</i> Rchb. f.	Pseudobulbo	Emplasto	Tratamiento de fracturas y roturas de huesos. Antiinflamatorio y antirreumático	Ecuador	Ramos <i>et al.</i> (2012), Ramos-Corrales <i>et al.</i> (2011)	

#### 2.4 Generalidades de la orquídea *C. integerrimum*

*C. integerrimum* es una especie que crece generalmente sobre madera podrida o humus en bosques tropicales caducifolios y semicaducifolios, bosques cálidos de roble y palmeral, bosques húmedos del tropical y bosques lluviosos de montaña. Su intervalo de crecimiento altitudinal inicia desde el nivel del mar hasta una altura aproximada de 1600 metros. Su periodo de floración inicia en abril y termina en noviembre. De acuerdo con su distribución global, se ha encontrado en países centroamericanos como México, Guatemala, Belice, Honduras, El Salvador y Nicaragua. Dentro del territorio nacional, esta especie se encuentra distribuida en los estados de Tamaulipas, San

Luis Potosí, Hidalgo, Veracruz, Puebla, Querétaro, Oaxaca, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Fig. 3) (Salazar, 1990).



**Figura 3.** Distribución geográfica de *C. integerrimum* en México. Tomado de Salazar (1990).

#### **2.4.1 Clasificación taxonómica de *C. integerrimum***

La clasificación taxonómica de *C. integerrimum* (Fig. 4), de acuerdo con William Jackson Hook, se describe a continuación:

**REINO:** Plantae  
**DIVISIÓN:** Magnoliophyta  
**CLASE:** Liliopsida  
**SUBCLASE:** Liliidae  
**ORDEN:** Asparagales  
**FAMILIA:** Orchidaceae  
**GÉNERO:** *Catasetum*  
**ESPECIE:** *Catasetum integerrimum*



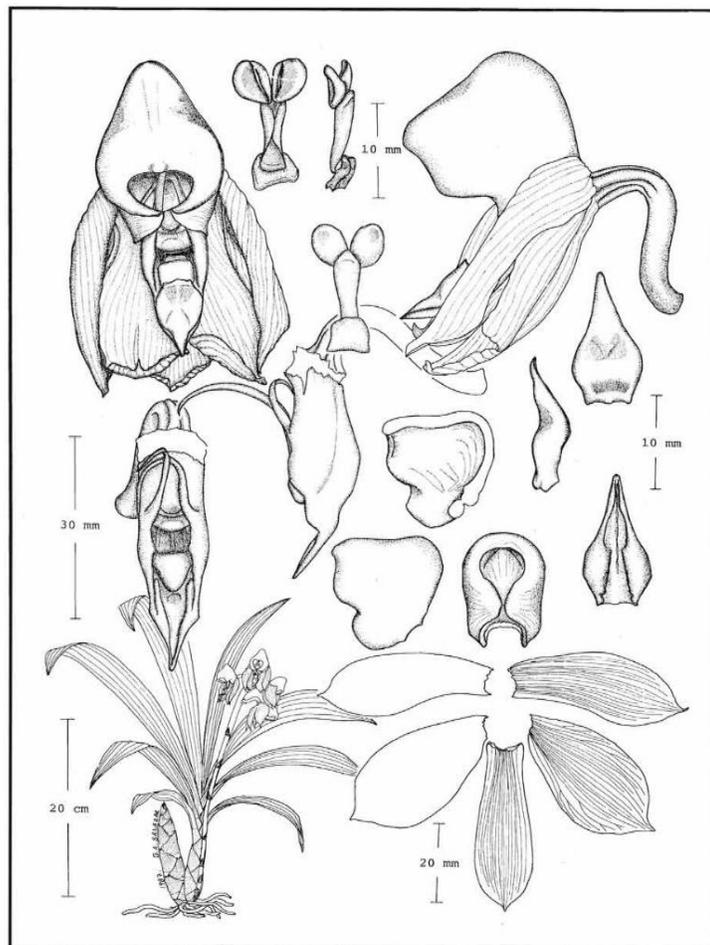
**Figura 4.** Apariencia de la flor masculina de *C. integerrimum*.

### **2.5 Descripción botánica de *C. integerrimum***

*C. integerrimum* es una orquídea epífita (Fig. 5), con un crecimiento de hasta 70 cm de alto, posee raíces carnosas, de 2 a 6 mm de grosor, con raicillas colectoras rígidas y erectas. Las hojas se presentan en cantidades de 6 a 10 por pseudobulbo, son dísticas, plicadas, se encuentran articuladas con las vainas, presentan formas oblongo-oblancooladas a elípticas, y agudas a acuminadas, con 3 a 5 venas prominentes en el envés, el tamaño puede ir de los 7 a 60 cm de largo, con 2 a 16.5 cm de ancho. Presenta pseudobulbos de varios entrenudos, ovoides a fusiformes, de 7-26 x 2.5-8 cm, cubiertos por vainas foliares papiráceas terminadas en 1 a 3 espinas.

Su inflorescencia es racemosa y erecta, apareciendo en la base del brote inmaduro. Desarrolla flores unisexuales dimórficas, no resupinadas que son poco vistosas y expelen intensas fragancias durante el día. Las flores masculinas presentan una coloración verde a verde amarillenta, están frecuentemente esfumadas y/o manchadas de rojo purpura. Sus ovarios son subcilíndricos, abruptamente curvados, y su tamaño es de 20-30 x 3.5-4.5 mm. Los sépalos y pétalos forman una capucha amplia sobre la columna, donde se encuentra un polinario recto de 11-14 mm de largo. Sus polinios están dorsiventralmente comprimidos, ovalados, sulcados y presentan una coloración

amarilla. Las flores femeninas presentan una apariencia uniforme con un labelo amarillo verdoso. Su ovario presenta una forma subcilíndrica, esta paulatinamente engrosado hacia el ápice, es sigmoide y mide 25-40 x 6.8 mm. Sus sépalos, oblongos rectangulares de 19-27 x 12-13 mm, y pétalos, elípticos rectangulares de 20x18 mm, forman una capucha amplia sobre la columna, donde se encuentra una antera y polinario vestigiales. La capsula, que se forma al polinizarse, presenta una forma elipsoide con 6 costillas, coloración glauca, péndula y con unas longitudes de 8-10 x 3-6 cm (Benzing, 1982; Salazar, 1990).



**Figura 5.** Ilustración de *C. integerrimum*. Elaborada por Gerardo A. Salazar. Tomada de Salazar (1990).

### **2.5.1 Propiedades etnofarmacológicas de *C. integerrimum***

En el género *Catasetum*, varias especies han sido reportadas con propiedades etnofarmacológicas (Cuadro 1). Un caso particular es *C. integerrimum*, orquídea cuyas aplicaciones etnofarmacológicas son documentadas desde 1989, cuando Téllez-Valdés *et al.*, (1989), reportaron su aplicación como tratamiento contra mordeduras de víboras en México. Posteriormente, Ankli *et al.*, (1999), documentaron su uso por tres comunidades Mayas del estado de Yucatán, que empleaban sus hojas para el tratamiento de “nacidos”. Asimismo, Cox-Tamay (2013), registro su aplicación en la cura de tumores, y en el tratamiento de abscesos y heridas, por comunidades de Yucatán, de igual forma, Cruz-García *et al.*, (2014), informaron su uso en el tratamiento de quemaduras y heridas. Por último, Teoh (2019) reportó su aplicación, por la población del estado de Veracruz, en el tratamiento contra la diarrea.

Dentro de su género, *C. integerrimum* cuenta con la mayor documentación de aplicaciones medicinales, presentándose con gran frecuencia el desconocimiento de la parte de la orquídea empleada, la forma de aplicación o el procedimiento de preparación, siendo Castillo-Pérez, (2023), los que documentaron con mayor detalle el uso etnofarmacológico de la especie, reportando una nueva aplicación medicinal realizada por comunidades Tének y Náhuatl del estado de San Luis Potosí, México, a través de un proceso de trituración de los pseudobulbos en presencia de poca agua y su posterior consumo de manera oral, siendo utilizada como complemento en el tratamiento de infecciones renales y de vías urinarias. Esta actividad medicinal está relacionada con los metabolitos secundarios presentes en *C. integerrimum*, brindando actividad antimicrobiana o inhibitoria de *Quorum Sensing* (QSI) presente en los pseudobulbo. Asimismo, pueden relacionarse con actividades antiinflamatorias o antinociceptivas, siendo el dolor y la inflamación síntomas comunes en las infecciones.

### **2.6 Infecciones de las vías urinarias**

Las infecciones de las vías urinarias (IVUs) son algunas de las infecciones bacterianas más comunes, afectando alrededor de 150 millones de personas por año en el mundo. Las IVUs, en su mayoría, son provocadas por bacterias Gram negativas como *E. coli*,

*P. mirabilis* y *K. pneumoniae*, presentándose en menor caso infecciones por bacterias Gram positivas, relacionadas a *S. aureus*, o provocadas por hongos, principalmente del género *Candida* (Parveen, *et al.*, 2011; Demilie *et al.*, 2012; Vasudevan, 2014).

Las IVUs pueden presentarse como sintomáticas o asintomáticas. Los síntomas clínicos de las IVUs incorporan la inflamación inducida por la infección de la uretra (uretritis), la vejiga urinaria (cistitis) y los riñones (pielonefritis) y se diagnostican por la presencia de una cantidad elevada de bacterias en la orina, bacteriuria ( $\geq 100000$  UFC/mL de orina) con síntomas concomitantes. La cistitis presenta como principales síntomas micción frecuente, disuria, molestias suprapúbicas y poliuria junto con orina turbia y maloliente (Al-Khikani *et al.*, 2019). Para activar la inflamación de la mucosa del tracto urinario, los patógenos utilizan mecanismos moleculares muy diversos. Las células epiteliales liberan mediadores inflamatorios cuando son activadas por algunas bacterias de la mucosa, mientras que otras bacterias tienen la capacidad de activar las células dendríticas y los macrófagos. Muchos síntomas y signos de infección están causados por la liberación de estos mediadores inflamatorios (Svanborg *et al.*, 1999; Najar *et al.*, 2009).

Los estudios de la última década han demostrado la importancia de una evaluación de los patógenos causantes de la infección frente a los agentes antibacterianos. La administración de un tratamiento sin la confirmación de la bacteria causante de la infección puede no ser efectivo, logrando que la bacteria desarrolle resistencia al mismo, teniendo como consecuencia la resistencia a antibióticos de amplio espectro como la ampicilina y la amoxicilina, limitando su uso (Vasudevan R., 2014).

En la Huasteca Potosina, se emplean diferentes plantas con usos medicinales relacionados al tratamiento de bacterias asociadas con las IVUs, teniendo como ejemplos a *Eysenhardtia polystachya*, *Psidium guajava* y *Hamelia patens* (Zavala *et al.*, 1997; Cockerill *et al.*, 2012; Chakraborty *et al.*, 2018). Sin embargo, en el caso del género *Orchidaceae* pocas especies han sido reportadas con este uso etnofarmacológico, siendo *C. integerrimum* una especie actualmente empleada por la etnia Tenek y Náhuatl como complemento o tratamiento para las IVUs, aplicándose a

través del consumo de sus pseudobulbos (Castillo-Pérez *et al.*, 2021). Sin embargo, no se han presentado estudios científicos que avalen una posible actividad antimicrobiana.

### **2.6.1 Alternativas contra las bacterias resistentes a antibióticos**

Actualmente, la tasa de crecimiento de la resistencia bacteriana ha superado el desarrollo de nuevos antibióticos, dando como resultado una necesidad imperante del desarrollo de terapias alternas a los antibióticos convencionales, ya sean dirigidos al patógeno o al huésped. Las principales investigaciones están enfocadas en el uso de compuestos preventivos o adyuvantes actuando en sinergia con los antibióticos actuales. Entre estos compuestos se estudian los anticuerpos, probióticos, vacunas, bacteriófagos, péptidos antimicrobianos (PAM) e QSI (Joerger, 2003; Davies y Davies, 2010; Czaplewsk *et al.*, 2016). Dentro de los principales compuestos que afectan al patógeno, se encuentran los QSI, siendo producidos por diversos organismos, desde bacterias hasta vertebrados. Los QSI actúan como atenuadores de la virulencia bacteriana siendo importante su uso en sinergia con antibióticos. Este complejo ha demostrado tener efectividad en el tratamiento de bacterias resistentes a antibióticos, logrando que importantes factores de virulencia, como la producción de biofilm, se vean disminuidos significativamente y provocando una mayor susceptibilidad a antibióticos por parte de las bacterias resistentes (Dantas y Sommer, 2014; Pletzer y Hancock, 2016).

### **2.6.2 Estudios de la QSI a través de extractos de plantas**

Para el estudio del efecto QSI, son empleados análogos naturales (derivados de plantas o insectos) y sintéticos de la N-Acil Homoserina Lactona (AHL), reportando señales antagónicas para QS. Estos análogos actúan directamente sobre importantes receptores y reguladores en bacterias Gram negativas y en algunas bacterias Gram positivas (Liu *et al.*, 2018; Ahmed *et al.*, 2019). Un ejemplo de estudio de actividad QSI *in vitro* es el de Elekhawy *et al.* (2022), en el cual probaron un extracto metanólico de *Dioon spinulosum* sobre la formación de biopelículas en *Pseudomonas aeruginosas*, a través del ensayo cristal violeta, presentando una disminución en el porcentaje de

aislamientos del 77.1% inicial al 34.3%, sobre *P. aeruginosas* que formaban biopelículas fuertes y moderadamente fuertes. Un segundo estudio, es el del Okhee *et al.* (2018), donde probaron la actividad QSI de extractos etanólicos de 388 plantas, sobre la producción de violaceína de *Chromobacterium violaceum* CV017, a través del ensayo de difusión en disco, obteniendo el mayor grado de inhibición (halos de inhibición del pigmento violeta) en los extractos de *Cornus controversa* y *Cynanchum wilfordii*.

Al estudiarse el efecto de *C. integerrimum* contra infecciones renales, se tendrían presentes pruebas farmacológicas enfocadas en la actividad antimicrobiana e QSI, siendo importante mencionar la posibilidad de que el efecto de *C. integerrimum* también puede estar asociado a la actividad antinociceptiva y antiinflamatoria, siendo un punto de estudio importante a destacar, dado que el dolor y la inflamación son síntomas importantes en estas infecciones.

## **2.7 Dolor e inflamación como síntomas**

De acuerdo con la Asociación Internacional para el estudio del dolor (IASP, por sus siglas en inglés) define al dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable, asociada con daño tisular o potencial, descrito en términos de tal daño. El dolor es un mecanismo de defensa, su función es detectar y localizar los daños que nuestro organismo recibe, con la finalidad de proteger nuestro cuerpo y mantener la homeostasis (Romera *et al.*, 2000).

El dolor se clasifica de acuerdo con diversos criterios, teniendo presente su durabilidad, origen, localización e intensidad. De acuerdo con su durabilidad, se puede dividir en 2 formas, siendo agudo cuando la respuesta sensorial del sistema nociceptivo es inmediata, asociándose con el daño tisular real o potencial y terminando cuando el proceso de reparación y cicatrización del daño ha finalizado. La segunda forma se conoce como crónica, se diferencia de la forma aguda al ser persistente y permaneciendo aun en ausencia de daños periféricos, generalmente presentando una duración mayor a 3 meses (Artacho-Cordón *et al.*, 2023).

En el caso de la clasificación por origen, se divide en tres tipos, el primero es el dolor nociceptivo, provocado por la hipersensibilización de los receptores nociceptivos periféricos o centrales, debido a lesiones mecánicas, térmicas, eléctricas o químicas en el organismo. El segundo es el dolor neuropático, derivado del nociceptivo, siendo el resultado de un daño por lesión o enfermedad sobre el sistema somatosensorial. El tercero es el dolor psicógeno, provocado por factores psicológicos como la depresión, ansiedad e hipocondría. Este dolor no se relaciona con la actividad del sistema nociceptivo (Maritza-Velasco, 2014; Del Arco, 2015).

Otro tipo de clasificación sería de acuerdo a su localización, en este caso, el dolor puede dividirse en somático, donde el daño o lesiones estimulan los receptores nociceptivos ligados a piel, músculos, articulaciones, ligamentos o huesos de forma localizada y aguda, relacionados con la zona dañada, asimismo, también dividiéndose en visceral, donde el dolor se origina en los órganos internos, caracterizándose por ser difuso, sordo, profundo y no localizado (Verri *et al.*, 2008; Valerio *et al.*, 2009).

Entre las clasificaciones del dolor, las mencionadas anteriormente se consideran las principales para su evaluación. Sin embargo, también pueden tomarse en cuenta otras clasificaciones para un mejor análisis, teniendo presente su clasificación por intensidad, dividiéndose en Leve, donde pueden realizar actividades habituales; Moderado, donde se interfiere con las actividades habituales; y Severo, donde se interfiere con el descanso (Puebla-Díaz, 2005). La clasificación del dolor es una forma de poder determinar si se presenta una mejoría o empeoramiento en el cuadro del dolor, ya que la gran cantidad de criterios con los que se clasifica el dolor representan, en cierta forma, una manera de cuantificar el estado del afectado (Montiel *et al.*, 2021).

En el caso de la inflamación, ésta se produce si las barreras naturales del cuerpo son superadas por agentes físicos, químicos o biológicos, provocando que el sistema inmunológico presente una respuesta de tipo humoral y celular conocida como respuesta inflamatoria aguda, la cual tiene como finalidad el restaurar los tejidos a su estado inicial (Schmid-Schonbein, 2006).

La respuesta inflamatoria en la inflamación aguda puede estar influenciada tanto por los procesos de inflamación aguda como por una inflamación crónica preexistente o en desarrollo. Esta respuesta inicia con la activación de las células endoteliales por estímulos externos, como la liberación de histamina, IL-1 y factor de necrosis tisular (TNF), lo que provoca la expresión de citocinas y quimiocinas, que actuarán como moléculas de adhesión, atrayendo y activando a los leucocitos polimorfonucleares (PMN) mediante la quimiotaxis, asimismo, se liberan mediadores pro inflamatorios como los eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos), sintetizados a partir del ácido araquidónico (AA) a través de 2 vías diferentes, la ciclooxigenasa, donde se produce PGE y PGI<sub>2</sub>, que favorecen la vasodilatación y aumentan el flujo sanguíneo en la microcirculación, y la lipoxigenasa, donde se sintetizan leucotrienos que participan en los procesos de inflamación crónica, aumentando la permeabilidad vascular y favoreciendo el edema de la zona afectada. La inflamación aguda también incluye la apertura reversible de uniones entre células, lo que permite la pérdida de fluidos al espacio extravascular, generando edema (Murakawa *et al.*, 2006; González-Naranjo y Molina-Restrepo, 2010). En condiciones fisiológicas los leucocitos viajan al centro del flujo sanguíneo en los vasos, no obstante, una vez que son activados por citocinas y el flujo a través del vaso disminuye como consecuencia de la pérdida de fluidos, los neutrófilos se aproximan a las paredes y experimentan adhesión intermitente (rolling) y posteriormente fuerte, lo cual culmina en trans migración a través de los espacios previamente abiertos y su acumulación en el espacio extravascular. Si los PMN logran neutralizar al agente injuriante, cesará la síntesis de mediadores proinflamatorios, frenando así el reclutamiento de leucocitos y la formación del edema, lo cual conducirá hacia la resolución de la inflamación aguda. La siguiente etapa es el aclaramiento o resolución, para ello el cuerpo dispone de diferentes rutas como recirculación sistémica o muerte local de PMN y linfocitos, seguido de su fagocitosis por macrófagos tisulares (Schmid-Schonbein, 2006).

Actualmente, se han desarrollado numerosas técnicas para evaluar los efectos farmacológicos de las plantas. Estas técnicas permiten analizar la capacidad de los

compuestos naturales presentes en las plantas, entre los que se encuentran el efecto antinociceptivo (aliviar dolor) y antiinflamatorio. Para ello, se llevan a cabo pruebas específicas, que se aplican en modelos experimentales, generalmente sobre animales. Estas pruebas son esenciales para determinar la eficacia y el potencial terapéutico de los extractos vegetales en el tratamiento de condiciones que involucran dolor o inflamación.

### **2.7.1 Pruebas antinociceptivas**

El uso de modelos de dolor está plenamente justificado para evaluar nuevos tratamientos farmacológicos destinados a aliviar el dolor. Los modelos de dolor agudo incluyen principalmente el empleo de estímulos mecánicos, térmicos y químicos, que generan respuestas temporales o breves. El propósito de estos modelos es observar y analizar la reacción del animal en estudio frente a los estímulos aplicados, lo que permite evaluar la eficacia de los tratamientos propuestos en el manejo del dolor agudo. Un punto a considerar en estas pruebas es la adaptación del modelo al entorno de trabajo sin la aplicación de algún tipo de estímulo. Esto se realiza con la finalidad de evitar falsos positivos o negativos (Diester *et al.*, 2021).

Dentro de las pruebas mecánicas, la más utilizadas son la prueba de presión en pata o cola, donde se mide el tiempo o la intensidad de presión que el modelo soporta, antes de manifestar un síntoma o reflejo por dolor. En cuanto a las pruebas por calor, se busca una respuesta nociceptiva dentro de los primeros 5-10 segundos, bajo temperaturas 10-15 °C más altas que el umbral de respuesta de los nociceptores de calor (Ankier, 1974; Jismaa *et al.*, 2005), lo que refleja el tiempo necesario para que aumente la temperatura de la piel hasta la detección del estímulo nociceptivo, y el retraso para provocar la respuesta de retirada. En el caso de las pruebas térmicas, el investigador debe recuperar inmediatamente al animal en cuanto observe la respuesta.

Finalmente, para estímulos químicos se emplea la prueba de ácido acético y el test de formalina. El modelo de dolor inducido por ácido acético es un método en el que se administra ácido acético vía intraperitoneal, donde se activan las neuronas nociceptivas periféricas a través de la activación de la enzima ciclooxigenasa (COX),

produciendo prostaglandinas (PGE y PGF<sub>2</sub>) causantes de inflamación y dolor. Este modelo es sensible a los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y narcóticos, comúnmente se utiliza para evaluar la actividad analgésica de compuestos medicinales (Gan, 2010; Kawabata, 2011). La prueba de formalina se podría considerar una prueba intermedia, dado que evalúa dolor agudo e inflamatorio. Se caracteriza por dividirse en 2 fases, la fase temprana, donde se presenta dolor agudo a través de la activación de los nociceptores por la formalina y la fase tardía, donde se refleja una inflamación local y sensibilización del SNC, provocando dolor debido a los mediadores inflamatorios y células inmunitarias (Shibata *et al.*, 1989; Rosland *et al.*, 1990; Fujimaki *et al.*, 1992; Malmberg y Yaksh, 1992). Estos dos últimos modelos son usados como primera fase para la inducción de dolor en ratones en ensayos para evaluar la actividad antinociceptiva (Ortega *et al.*, 2002).

### **2.7.2 Pruebas antiinflamatorias**

El proceso inflamatorio actúa como un mecanismo de defensa del organismo ante la presencia de agentes extraños como bacterias, parásitos o virus o ante un estímulo externo. Durante una respuesta inflamatoria aguda, los síntomas típicos incluyen enrojecimiento, aumento de temperatura, hinchazón, dolor y pérdida de función. Estos signos se deben al incremento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos, el aumento del flujo sanguíneo y la activación de las fibras nerviosas, lo cual causa hinchazón, enrojecimiento y dolor, respectivamente (Kulkarni *et al.*, 2006; Simmons, 2006). Los principales estudios para evaluar la inflamación aguda se enfocan en el uso de carragenina, xileno y 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) con la finalidad de producir irritación e inflamación vía tópica o subplantar a través de la acumulación de células inflamatorias (leucocitos) y líquido inflamatorio. La inflamación presentada se cuantifica de acuerdo con el grosor o peso del tejido, para las pruebas donde se produce un edema o inflamación cutánea, y a la cantidad de líquido inflamatorio y el recuento de células en el exudado para la prueba de peritonitis. Estas pruebas permiten estudiar la inflamación de corta duración y evaluar la efectividad de

compuestos que actúan en fases iniciales de la respuesta inflamatoria (Murakawa *et al.*, 2006; de Siqueira Patriota *et al.*, 2022).

Estas técnicas son fundamentales en la investigación preclínica de nuevos compuestos antiinflamatorios, permitiendo estudiar los efectos de los tratamientos sobre la inflamación aguda. Sin embargo, el desarrollo de fármacos a partir de fuentes naturales ha tropezado con obstáculos importantes como el aislamiento y el rendimiento en cantidades ínfimas, asimismo, la confirmación de actividad farmacológica en plantas medicinales no las excluye de que sus fitoquímicos presenten actividad toxicológica, por lo cual es necesario realizar estudios enfocados en esta área.

## **2.8 Toxicidad por consumo de plantas medicinales**

Alrededor del mundo, el uso de plantas medicinales como alternativa a tratamientos de enfermedades ha estado altamente presente en poblaciones rurales y con servicios de salud limitados, asimismo, los estudios relacionados a los efectos adversos que presenta el consumo de plantas medicinales no estudiadas han tenido poca investigación, a pesar de la documentación de importantes reportes como la presencia de compuestos nocivos en plantas con usos etnofarmacológicos (Kharchoufa *et al.*, 2018). Por otra parte, el consumo excesivo o en altas concentraciones de estas plantas también puede representar un efecto nocivo para el consumidor, dado que al no tener reportes sobre los compuestos presentes en las mismas se desconoce la farmacocinética y farmacodinamia de dichos compuestos y como afectaría su consumo en dosis elevadas en los seres humanos (Herrera y Bruguera, 2008; Ferrerira y de Vasconcelos, 2022).

Entre los estudios enfocados a evaluar el efecto toxicológico de las plantas medicinales se encuentra el realizado por Liu *et al.* (2003), en el cual demostraron que la planta *Aristolochia manshuriensis*, usada tradicionalmente para remedios renales, produce necrosis tubular y disfunción renal a partir de dosis de 4 g/día, observando proteinuria, azotemia y apoptosis de células tubulares. De igual manera, de Oliveira *et al.* (2011) reportaron que el extracto de *Smallanthus sonchifolius* usada como antidiabético

produce daños renales. Asimismo, el efecto toxicológico puede presentarse a nivel genético, como ya ha sido reportado en distintos extractos de plantas medicinales, las cuales fueron capaces de ocasionar toxicidad en nivel de célula, presentando mutaciones genéticas y cromosómicas (Mert y Betül, 2020; María *et al.*, 2022; Boumaza *et al.*, 2024).

### **2.8.1. Ensayo de electroforesis alcalina de células individuales**

Uno de los ensayos con sensibilidad para evidenciar el daño genotóxico es el ensayo de electroforesis alcalina de células individuales o ensayo cometa. Este ensayo evalúa el daño genético causado a las células, tanto animales como vegetales, por diferentes agentes químicos y físicos. La técnica establecida por Singh *et al.* (1988) bajo condiciones de lisis y electroforesis alcalina ( $\text{pH} > 13$ ) permite analizar la migración del ADN debido a rupturas en la hebra simple del ADN y a sitios álcali lábiles. Consiste principalmente en el análisis de células individuales colocadas en camas de agarosa que son lisadas y se someten a una electroforesis (Cordelli *et al.* 2021; Fernández *et al.*, 2021).

En el ensayo cometa, la evaluación del daño genotóxico se relaciona con la cantidad del ADN extendido en la cola de los núcleos dañados. Sin embargo, el parámetro exacto para medir el daño es a menudo objeto de debate. Actualmente, se presentan tres parámetros altamente empleados para medir el daño subyacente, siendo el porcentaje de ADN en cola, tail moment y olive moment. El tail momento hace referencia al producto de la longitud de la cola y el porcentaje de ADN total en la cola mientras que el olive momento hace referencia a la diferencia de media entra la cabeza y la cola, por el porcentaje de ADN en cola. Ambos parámetros presentan unidades arbitrarias, mostrando diferentes resultados entre cada sistema de análisis de imagen. Por otro lado, el porcentaje de ADN en cola presenta unidades establecidas en porcentaje, facilitando las comparaciones entre plataformas (Olive *et al.*, 1990; Gyori *et al.*, 2014).

Esta técnica ha sido empleada para reportar actividad genotóxica en plantas utilizadas con fines medicinales, teniendo como ejemplo a *Pterolobium stellatum*, *Matricaria*

*chamomilla* y *Tulbaghia violacea* (Kahaliw *et al.*, 2018; Madike *et al.*, 2019; Fernández *et al.*, 2021). Por lo anterior, es necesario realizar estudios genotóxicos que indiquen las dosis iniciales donde *C. integerrimum* podría presentar un efecto genotóxico a sus consumidores.

## **CAPITULO III**

### **OBJETIVOS**

#### **3.1 Planteamiento del problema**

La mayoría de las plantas medicinales son empleadas sin ningún ensayo toxicológico y de seguridad estándar, presentándose la hipótesis de una nula toxicidad en ellas, por parte de la población. Sin embargo, esta suposición no presenta fundamentos, siendo necesaria la aplicación de estudios toxicológicos que avalen la seguridad de su consumo. Siendo el caso de *C. integerrimum*, del cual los pseudobulbos son consumidos con fines medicinales en algunas regiones de la Huasteca Potosina, representando un posible riesgo a la salud de los consumidores. De igual forma, no se cuenta con estudios científicos que avalen las propiedades medicinales que se le han atribuido.

#### **3.2 Justificación**

El uso terapéutico de plantas medicinales para tratar o aliviar diversas enfermedades ha sido aplicado desde tiempos antiguos, pasando a través de las generaciones, denominándose “medicina tradicional” (Gallegos-Zurita, 2016; Lima-López *et al.*, 2018). En México, la Huasteca Potosina posee una fuerte cultura asociada al uso de la medicina tradicional, y donde recientemente, se documentó el uso de *C. integerrimum* en el tratamiento de infecciones renales, representando una importante alternativa de tratamiento para esta enfermedad (Castillo-Pérez *et al.*, 2022).

Por lo anterior mencionado, es necesario realizar estudios científicos que avalen las propiedades medicinales de *C. integerrimum*, siendo uno de los principales estudios la capacidad antimicrobiana, antinociceptiva y antiinflamatoria. Asimismo, al no presentar estudios científicos, el consumo excesivo del pseudobulbo de esta orquídea como tratamiento para las infecciones renales, podría provocar un efecto toxicológico en el consumidor, en particular, enfocado en la genotoxicidad. Por ello es necesario evaluar este posible efecto en el ADN de las células humanas, utilizando como medio el ensayo cometa.

### **3.3 Hipótesis y objetivos**

#### **3.3.1 Hipótesis**

Los pseudobulbos de *C. integerrimum* cuentan con actividad antimicrobiana, antinociceptiva y antiinflamatoria. No presenta efecto genotóxico por lo que son una importante alternativa para el tratamiento de infecciones renales y sus síntomas.

#### **3.3.2 Objetivo general**

Evaluar la capacidad antimicrobiana, farmacológica y el efecto genotóxico del extracto etanólico de pseudobulbos y plantas cultivadas *in vitro* de *C. integerrimum*.

#### **3.3.3 Objetivos específicos**

- Determinar la capacidad *Anti-Quorum Sensing* del extracto etanólico de pseudobulbo de *C. integerrimum* silvestre, sobre cepas de *C. violaceum*.
- Evaluar el efecto antinociceptivo y antiinflamatorio del extracto etanólico de pseudobulbo silvestre e *in vitro* de *C. integerrimum* aplicado a modelos *in vivo*.
- Evaluar el efecto genotóxico del extracto etanólico de pseudobulbo silvestre de *C. integerrimum*, mediante la determinación del daño al ADN por medio del ensayo cometa.

## **CAPITULO IV METODOLOGIA**

### **4.1 Material vegetal y elaboración del extracto etanólico**

Con la finalidad de obtener el material vegetal de interés, se colectaron pseudobulbos de plantas silvestres de *C. integerrimum* que presentaban una altura de 0.8 a 1 m, y se encontraban en 2 diferentes forófitos. Los muestreos se realizaron en los meses de mayo-junio, en el municipio de Tampacán, San Luis Potosí, México, a una altitud de 32 msnm. La recolecta se realizó empleando el protocolo del proyecto de Norma 005-SEMARNAT-2012. Las muestras de pseudobulbo fueron transportadas al Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales en la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca, asimismo, el laboratorio proporcionó orquídeas *in vitro* de entre 10 y 12 meses de edad (contados a partir de la germinación) con una altura entre 10 a 15 cm.

Los pseudobulbos y plantas *in vitro* recibieron un lavado con agua estéril para eliminar impurezas y medio, respectivamente. Enseguida, se sometieron a un secado en estufa de convección (Lindberg/Blue), durante cuatro días a 40 °C. Una vez secas, se trituraron con ayuda de un molino analítico (Ika-Werke M20) y se procedió a realizar la extracción de compuestos por maceración, empleando etanol (Reactivos Química Meyer) como solvente. La eliminación del exceso de etanol se llevó a cabo en un rotavapor (Buchi R-100). Por último, el extracto silvestre (ESCI) e *in vitro* (EICI) de *C. integerrimum* fueron almacenados a 4°C, protegidos de la luz con papel aluminio, hasta su utilización.

### **4.2 Pruebas de susceptibilidad Antimicrobiana y Anti-Quorum Sensing**

#### **4.2.1 Preparación del inóculo bacteriano**

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se prepararon inóculos de 4 bacterias de interés clínico asociadas a infecciones renales y de vías urinarias, siendo las seleccionadas *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, asimismo, para la evaluación de la QSI se preparó el inóculo de 2 cepas de *Chromobacterium violaceum*: CV026, mutante sin producción de

violaceína; y 553, cepa silvestre con producción de violaceína. Las bacterias fueron proporcionadas por el Laboratorio de Investigación en Biotecnología de la Facultad de Estudios Profesionales Zona Huasteca y el Laboratorio de microbiología del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, respectivamente.

Las bacterias de interés clínico fueron reactivadas en medios Agar Base Sangre (ABS), posteriormente, se preparó el inóculo bacteriano aislando colonias de cada bacteria a través de su siembra en una campana de flujo laminar, aplicando la técnica de tres campos en el medio. Las bacterias se cultivaron durante 24 hrs a 37 °C, posteriormente, se seleccionaron de 3 a 5 colonias aisladas y se suspendieron en 5 mL de solución salina fisiológica 0.85% estéril, hasta obtener 0.1 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, siendo equivalente al estándar 0.5 de McFarland con carga microbiana igual a  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Para las cepas de *C. violaceum* se empleó agar Luria Bertani (LB) para su reactivación, posteriormente, se preparó el inóculo bacteriano resemebrando las cepas en 5 mL de caldo LB durante toda la noche. En el caso de *C. violaceum* no se pudo realizar el estándar 0.5 de McFarland, dado que la producción de violaceína imposibilita realizar una estandarización basada en su absorbancia, por lo cual se maneja el inóculo como un cultivo de toda la noche.

#### **4.2.2 Prueba de difusión en disco**

La prueba de difusión en disco se realizó en base a la metodología expuesta por Bali *et al.* (2019). Para su realización, los discos de papel filtro estériles (6 mm de diámetro) fueron concentrados con el ESCI y EICI. Esto se realizó en una campana de flujo laminar, donde se adicionó 10 µL de cada tratamiento sobre los discos estériles, obteniendo concentraciones de 10, 100 y 1000 µg. Posteriormente, los discos con los tratamientos fueron colocados sobre las placas de ABS inoculadas en césped, con los estándares de McFarland de las cuatro bacterias de interés clínico, incubándose a 37 °C durante 24 hrs. La presencia de halos de inhibición de colonias indicará actividad antimicrobiana. La ausencia de halos de inhibición indicará que los extractos carecen de actividad antimicrobiana. Este experimento se realizó por triplicado, empleando

EtOH como control negativo y Ampicilina a una concentración de 50 µg como control positivo.

#### **4.2.3 Actividad Anti-Quorum Sensing**

La evaluación de la actividad Anti-Quorum Sensing se realizó utilizando los cultivos de toda la noche de las cepas CV026 y 553 de *C. violaceum*. Se tomó 50 µL del cultivo, de cada cepa, y se mezcló con 100 mL de agar LB fundido. En el caso de la cepa CV026 se adiciono “40 µL” de *N*-butanoil-L-homoserine lactone (C4-HSL) 10 µM. Las mezclas se vertieron inmediatamente sobre cajas Petri, las cuales se agitaron suavemente para obtener una distribución uniforme. Los discos de papel filtro estériles (6 mm de diámetro) fueron concentrados con el ESCI y EICI. Esto se realizó en una campana de flujo laminar, donde se adiciono 10 µL de cada tratamiento sobre los discos estériles, obteniendo concentraciones de 10, 100 y 1000 µg que fueron colocados en las cajas de Petri y cultivados a 28 °C durante 24 hrs. La presencia de anillos incoloros alrededor de los discos indicará actividad QSI. La presencia de colonias con pigmento violeta alrededor de los discos indicará que los extractos carecen de actividad QSI. Se empleó EtOH como control negativo. El experimento se realizó por triplicado.

#### **4.2.4 Fraccionamiento de los extractos**

Una vez realizados los extractos etanólicos, se procedió a elaborar un fraccionamiento empleando los siguientes solventes, aplicados de menor a mayor polaridad: Acetona, Etanol y Metanol. El fraccionamiento consistió en la adición de 50 mL del primer solvente, en este caso Acetona, y su posterior homogenización con cada extracto (ESCI y EICI). Una vez realizada la homogenización, se recuperó la fracción soluble y se llevó a sequedad en estufa de convección a 40 °C. Por otra parte, la fracción insoluble en Acetona (residuo) también se llevó a sequedad total, a una temperatura de 40 °C, posteriormente, se resuspendió en el siguiente solvente, repitiendo la metodología. A partir de este punto, se repitió el proceso de resuspensión, recuperación y secado, con cada una de las fracciones, hasta terminar con la fracción de metanol.

#### 4.2.5 Cromatografía en capa fina (TLC)

Se utilizaron placas de Silica gel 60 UV-254 como fase estacionaria y dos sistemas de solventes formados por *N*-butanol-acetato de etilo-agua (BAW) en relación 4:1:5 y acetato de etilo-metanol (AM) en relación 4:1. Las fracciones de ESCI y EICI fueron aplicadas a una concentración de 100 mg/mL, a un centímetro del extremo inferior de la placa, empleando un tubo capilar y repitiendo la aplicación con un máximo de 10 veces, con la finalidad de sobrecargarla. Las placas se colocaron en una cámara de vidrio con los sistemas de solventes mencionados y fueron retiradas a las 2 horas para el sistema BAW y a los 25 minutos para el sistema AM. Se dejaron secar las placas a temperatura ambiente y se asperjó vainillina-ácido sulfúrico como revelador, posteriormente, se calentaron las placas en una placa de calentamiento durante 45 segundos y finalmente, se visualizaron bajo luz UV a 254 y 365 nm. Se midió la distancia de migración de las bandas observadas, así como el frente de corrida. Con los valores obtenidos se determinaron los valores de retención (RF), utilizando la siguiente ecuación:

$$RF = \frac{\text{distancia de banda}}{\text{frente de corrida}}$$

#### 4.2.6 Microdilución en placa

Para la realización del ensayo de microdilución en placa, se utilizó el protocolo M100 propuesto por el CLSI (Coyle, 2005). Este ensayo consistió en la dilución seriada 1:1 de 1000 µg/mL de las fracciones del ESCI y EICI en cada fila de pozos de la placa, los cuales estaban adicionados con caldo Müeller-Hinton (MH). El caldo en los pozos se inoculó con 2 µL de suspensión bacteriana (*E. coli* y *S. aureus*) a turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland, asimismo, se adicionó 40 µL de aceite mineral estéril, con la finalidad de evitar la evaporación de las muestras, posteriormente, las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo, se leyó la absorbancia de cada pozo en un Multimode detector (Beckman Coulter DTX 800) a 620 nm. Al presentarse una intensa coloración por parte de las fracciones no se logró

leer la absorbancia, por lo cual se procedió con el método de goteo en placa, con la finalidad de realizar el conteo microbiano.

#### **4.2.7 Cuantificación bacteriana por goteo en placa**

Debido a que los extractos presentaban coloraciones intensas, se evaluó la actividad antimicrobiana presente en los pozos a través del método de goteo en placa 6×6. Para este método se realizaron diluciones seriadas 1:1 de ESCI y EICI en solución salina estéril al 0.85%, empezando las diluciones a una concentración de 1000 µg/mL, hasta la sexta dilución, obteniendo 6 tratamientos por fracción, posteriormente, se inoculó cada tratamiento con 30 µL de suspensión bacteriana equivalente al estándar 0.5 de McFarland de *E. coli* y *S. aureus*. Una vez inoculados los tratamientos, se realizaron diluciones seriadas de cada tratamiento, comenzando con 1/10, 1/100, 1/1000, hasta llegar a 1/10000000. Posteriormente, se tomaron 2 µL de las últimas 3 diluciones de cada tratamiento y se colocaron sobre placas de agar MH, que fueron incubadas a 37 °C durante 24 hrs. Transcurrido el tiempo de cultivo, se observaron las placas, realizando los cálculos correspondientes a partir de la primera dilución con colonias contables.

#### **4.3 Pruebas de susceptibilidad antinociceptiva y antiinflamatoria**

Para los tratamientos farmacológicos, se establecieron pruebas antiinflamatorias y antinociceptivas utilizando cepas de ratones Balb/C, criados en el bioterio de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Guanajuato, Guanajuato.

##### **4.3.1 Prueba de hot plate (Placa caliente)**

Previo al experimento, los ratones fueron colocados en un aparato de hot plate, a una temperatura de 55 °C, con la finalidad de determinar el tiempo de latencia entre el contacto con el aparato y el inicio del comportamiento de malestar (lamida de pata o salto). Diferentes grupos de ratones recibieron de forma oral solución salina (vehículo), tramadol (30 mg/kg) o ESCI (10-100 mg/kg). En un experimento adicional, los ratones fueron administrados de forma oral con naloxona (5 mg/kg) 15 minutos antes de la administración del ESCI. Siguiendo con la prueba hot plate, transcurridos 60 y 120

minutos de administrados los tratamientos, los ratones fueron colocados en el aparato de hot plate, registrando el tiempo de latencia obtenido (Koster *et al.*, 1959).

#### **4.3.2 Prueba de contorciones inducidas por ácido acético 1%**

Grupos de ratones recibieron de forma oral solución salina (vehículo), naproxeno (100 mg/kg) o ESCI (10-100 mg/kg). Transcurrida una hora, se administró vía intraperitoneal ácido acético al 1 % (10 mL/kg) a cada animal, posteriormente, se colocaron de forma individual en cilindros acrílicos, registrando el número de contorciones abdominales producidas en 30 minutos (Koster *et al.*, 1959).

#### **4.3.4 Prueba de formalina**

La prueba de formalina se realizó siguiendo el protocolo de Hunskar *et al.* 1985. Una hora antes de la administración de la formalina, los ratones recibieron por vía oral las dosis del ESCI, solución salina (vehículo) y Tramadol (control). A los ratones se les inyectó 3 µL de formalina al 3 % en la parte subplantar de la pata trasera derecha, colocándolos de forma individual en cilindros transparentes con un espejo colocado frente al observador para facilitar la observación. Se registro el tiempo de lamida de la pata durante los primeros 0-15 minutos (primera fase) y 15-45 minutos (segunda fase) después de la inyección de la formalina. En un experimento adicional, los ratones fueron administrados de forma oral con naloxona (5 mg/kg) 15 minutos antes de la administración del ESCI (50 mg/kg).

#### **4.3.5 Inflamación aguda por TPA**

Para el modelo de edema agudo auricular inducido por TPA en ratones, se administró por vía tópica 2 mg/oreja del ESCI, 1 hora antes de la aplicación del TPA. Posterior a la administración del extracto los ratones fueron tratados con 10 µL de TPA (2.5 µg disueltos en 20 µL de acetona). El ESCI y TPA fueron administrados en el pabillón auricular derecho interno y externo del ratón. Los animales reposaron 6 horas una vez aplicado el TPA y posteriormente fueron sacrificados para tomar porciones iguales de orejas derecha e izquierda (6 mm de diámetro) con la finalidad de medir el espesor y

peso de estas (Carlson *et al.*, 1985). El porcentaje de inhibición se obtuvo empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\Delta w \text{ control} - \Delta w \text{ tratamiento}}{\Delta w \text{ control}} \times 100$$

Donde  $\Delta w \text{ control}$  = Peso de la sección auricular con TPA - peso de la sección auricular sin TPA y  $\Delta w \text{ tratamiento}$  = Peso de la sección auricular con tratamiento - peso de la sección auricular sin tratamiento.

#### **4.4 Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN por ensayo cometa**

Para analizar la genotoxicidad a nivel del ADN, del ESCI, se empleó la metodología del ensayo de electroforesis alcalina de células individuales o ensayo cometa, en su variante alcalina descrita por Singh *et al.* (1988) con modificaciones menores. Se inició con la preparación de las soluciones requeridas para el ensayo y se procedió con la preparación de las muestras de estudio a partir de la elaboración de sus soluciones de uso inmediato.

La prueba inició con la preparando una solución de agarosa regular al 1% (Sigma-Aldrich®) con agua desionizada, posteriormente, la agarosa fue extendida en forma de cama sobre un portaobjetos esmerilado, que se llevó a sequedad en una estufa de convección (37 °C, 20 min) hasta su gelificación. Posteriormente, se procedió con la preparación de las muestras para el ensayo, para ello se tomó muestra sanguínea de un voluntario en un tubo Vacutainer con EDTA como anticoagulante, rotulándolo adecuadamente. De la muestra sanguínea se tomaron 15 µL con una micropipeta y se colocaron en un pozo de una placa microtituladora, donde se homogenizaron con 50 µL del ESCI (a concentraciones de 10, 50, 100, 200 y 500), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (75 µM) y DMSO (0.1%), como control positivo y negativo, respectivamente. Empleada la muestra sanguínea, se almacenó y procesó en base a la NOM-087-ECOL-SSA1-2002. Una vez realizada la homogenización de la muestra con el ESCI y los controles, se colocaron en refrigeración durante 30 minutos a 5°C. Terminada la refrigeración, las muestras fueron mezcladas con 225 µL de agarosa de bajo punto de fusión (LPM), previamente

preparada con agua desionizada. De la muestra homogenizada se tomaron 75  $\mu$ L y se colocaron sobre los portaobjetos con camas de agarosa, donde se cubrieron con un cubreobjetos de 24x50 mm. Las laminillas se llevaron a refrigeración por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se retiró el cubreobjetos y se colocó una segunda capa de agarosa LPM que fue cubierta por otro cubreobjetos, seguido de una segunda refrigeración por 5 minutos. El cubreobjetos fue retirado y las laminillas se dejaron durante 12 hora en solución de lisis (4 °C, 146.1 g NaCl, 1.21 g Trizma base, 8 g NaOH, 29.22 gr EDTA, 10% DMSO, 1% Tritón 100x) dentro de tubos Coplins. Este proceso se realizó en un tiempo máximo de 3 horas después de la toma de muestra sanguínea (tiempo de viabilidad de la muestra).

Una vez lisadas las células sanguíneas, se procedió con la electroforesis, colocando solución amortiguadora de electroforesis (pH 13, 4 °C, 50 mL NaOH 10N, 10 mL EDTA 200mM, 1.5 L agua desionizada) en la cámara hasta cubrir la plataforma, posteriormente y en oscuridad, las laminillas fueron colocadas en la solución en la cámara con ayuda de pinzas, agregando solución hasta cubrirlas, evitando que la solución se sobreponga por más de 1 cm. En este punto, las laminillas se dejaron reposar en la solución durante 25 minutos, con el objetivo de desdoblar el ADN de las muestras. Transcurrido el tiempo se inició el proceso de electroforesis (25 V, 300 mA, 25 min) y una vez terminado, las laminillas fueron retiradas, secadas y colocadas en charolas, donde se lavaron con 2 mL de solución Trizma base (pH 7.5, 0.4M Trizma base, 250 mL agua desionizada), posteriormente, se lavaron con agua desionizada y se dejaron reposar 5 min. Este proceso se repitió de 2 a 3 veces, hasta la neutralización de las laminillas.

Neutralizadas las laminillas, se procedió a aplicar una tinción con solución de bromuro de etidio 0.05 mM (BrEt) para su lectura. La tinción se realizó colocando 25  $\mu$ L de BrEt sobre la laminilla y posteriormente un cubreobjetos, continuando con su lectura en un microscopio de fluorescencia con objetivo 20X. Finalmente, se realizó un conteo y fotografiado de 60 células en cada tratamiento para determinar su viabilidad. Con las fotografías obtenidas se realizó el análisis de los cometas observados, empleando el

software CometScore, teniendo como criterios de evaluación el Tail momento y el Olive momento.

#### **4.5 Análisis estadístico**

Los valores obtenidos de la actividad antimicrobiana, antinociceptiva, antiinflamatoria y daño genotóxico, fueron sometidos a una prueba para determinar la normalidad de los datos y en base a ello se analizarán con los programas estadísticos STATISTIC 8.0 y el software SIGMAPLOT, realizando un análisis de varianza (ANOVA) para todos los datos obtenidos, así como para asegurar una diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ).

## CAPITULO VIII REFERENCIAS

- Adeyemo, R. O., Famuyide, I. M., Dzoyem, J. P., & Lyndy Joy, M. (2022). Anti-Biofilm, antibacterial, and anti-quorum sensing activities of selected south african plants traditionally used to treat diarrhoea. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/1307801>
- Aguilar, A., & Camacho, J. R. (1985). Uso popular de las plantas medicinales y su distribución por aparatos y sistemas. *Archivos de investigación médica*, 6, 13–14.
- Aguilar, A., Camacho, J. R., López, E. M., Chino, S., & Jacquez, P. (1994). *Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS): Información etnobotánica*. Instituto Mexicano del Seguro Social.
- AL-Khikani, F. O., Auda, G. A., & Ayit, A. (2019). Correlation study between urinary tract bacterial infection and some acute inflammatory responses. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 3(4), 236. [https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj\\_122\\_19](https://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_122_19)
- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945–972. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.055>
- Ankli, A., Sticher, O., & Heinrich, M. (1999). Medical ethnobotany of the Yucatec Maya: Healers' consensus as a quantitative criterion. *Economic Botany*, 53(2), 144–160. <https://doi.org/10.1007/BF02866493>
- Arenas, P., & Azorero, R. M. (1977). Plants used as means of abortion, contraception, sterilization and fecundation by Paraguayan indigenous people. *Economic Botany*, 31(3), 302–306. <https://doi.org/10.1007/BF02866880>

- Artacho-Cordón, F., Lorenzo-Hernando, E., Pereira-Sánchez, A., & Quintas-Marquès, L. (2023). Current concepts in pain and endometriosis: diagnosis and management of chronic pelvic pain. *Clinica e Investigacion en Ginecologia y Obstetricia*, 50(2), 100843. <https://doi.org/10.1016/j.gine.2023.100843>
- Baker, A., Kaviani, B., Nematzadeh, G., & Negahdar, N. (2014). Micropropagation of orchid *Catasetum*-a rare and endangered orchid. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*, 58, 197-205.
- Boumaza, A., Ergüç, A., & Orhan, H. (2024). The cytotoxic, genotoxic and mitotoxic effects of *Atractylis gummifera* extract *in vitro*. *African Health Sciences*, 24(1), 307–318. <https://doi.org/10.4314/ahs.v24i1.35>
- Cano-Asseleih, L. M., Menchaca-García, R. A., & Ruiz Cruz, S. Y. C. (2015). Ethnobotany, pharmacology and chemistry of medicinal orchids from Veracruz. *Journal of Agricultural Science and Technology A*, 5(9). <https://doi.org/10.17265/2161-6256/2015.09.006>
- Castillo-Pérez, L. J. (2018). *Aclimatación simbiótica de vitroplantas de Encyclia parviflora (Regel) Withner y Stanhopea tigrina Bateman (Orchidaceae) para su conservación ex situ* [Tesis de Maestría, Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. Repositorio Institucional de la UASLP. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/4620>
- Castillo-Pérez, L. J. (2023). *Study of the ethnopharmacological potential of Catasetum integerrimum hook. in the Huasteca Potosina* [Tesis de Doctorado, Programa Multidisciplinario de Posgrado en Ciencias Ambientales, Universidad Autónoma de San Luis Potosí]. Repositorio Institucional de la UASLP. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/handle/i/8435>
- Castillo-Pérez, L. J., Alonso-Castro, A. J., Fortanelli-Martínez, J., & Carranza-Álvarez, C. (2022). Micropropagation of *Catasetum integerrimum* Hook (Orchidaceae) through seed germination and direct shoot regeneration from pseudobulbs and

- roots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 58(2), 279–289. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10248-3>
- Castillo-Pérez, L. J., Martínez-Soto, D., Fortanelli-Martínez, J., & Carranza-Álvarez, C. (2021). Asymbiotic seed germination, *in vitro* seedling development, and symbiotic acclimatization of the Mexican threatened orchid *Stanhopea tigrina*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146(2), 249–257. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02064-9>
- Castillo-Pérez, L. J., Martínez-Soto, D., Maldonado-Miranda, J. J., Alonso-Castro, A. J., & Carranza-Álvarez, C. (2019). The endemic orchids of México: a review. *Biología*, 74(1), 1–13. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0147-x>
- Castillo-Pérez, L. J., Ponce-Hernández, A., Alonso-Castro, A. J., Solano, R., Fortanelli-Martínez, J., Lagunez-Rivera, L., & Carranza-Álvarez, C. (2024). Medicinal orchids of México: A Review. *Pharmaceuticals*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ph17070907>
- Cervantes-Reyes, M. A. (2008). *Evaluación farmacológica de Prosthechea michuacana (Orchidaceae), especie de potencial agronómico* [Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional de Santa Cruz Xoxocotlán]. Repositorio Dspace. [http://literatura.ciidiroaxaca.ipn.mx:8080/xmlui/handle/LITER\\_CIIDIROA X/59](http://literatura.ciidiroaxaca.ipn.mx:8080/xmlui/handle/LITER_CIIDIROA X/59)
- Chakraborty, S., Afaq, N., Singh, N., & Majumdar, S. (2018). Antimicrobial activity of *Cannabis sativa*, *Thuja orientalis* and *Psidium guajava* leaf extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Integrative Medicine*, 16(5), 350–357. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.07.005>
- Collins, A. R., & Gaivão, I. (2007). DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies. *Molecular Aspects of Medicine*, 28(3), 307–322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mam.2007.05.005>
- CONABIO. (2020, octubre 23). *Plantas medicinales. Biodiversidad Mexicana*. <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/medicinal/plantas>.

- Cordelli, E., Bignami, M., & Pacchierotti, F. (2021). Comet assay: A versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicology Research* 10, 68–78. <https://doi.org/10.1093/toxres/tfaa093>
- Costa-Joca, T. A., Coelho de Oliveira, D., Zotz, G., Winkler, U., & Pinheiro Moreira, A. S. F. (2017). The velamen of epiphytic orchids: Variation in structure and correlations with nutrient absorption. *Flora*, 230, 66–74. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.flora.2017.03.009>
- Cox-Tamay, L. D. (2013). Orquídeas: Importancia y uso en México. *Bioagrobiencias*, 6, 4–7. <http://chilangomex.wordpress.com/2012/10/20/>
- Cox-Tamay, L. D., Ruiz-Cruz, J. Y. S., & Pérez-García, E. A. (2016). Diversidad y uso de las orquídeas. *Bioagrobiencias*, 9, 1–6. <https://www.researchgate.net/publication/342727642>
- Cruz-García, G., Solano Gómez, R., & Lagunez Rivera, L. (2014). Documentation of the medicinal knowledge of *Prosthechea karwinskii* in a Mixtec community in Mexico. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(2), 153–158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.03.002>
- Czaplewski, L., Bax, R., Clokie, M., Dawson, M., Fairhead, H., Fischetti, V. A., Foster, S., Gilmore, B. F., Hancock, R. E. W., Harper, D., Henderson, J., Hilpert, K., Jones, B., Kadioglu, A., Knowles, D., Ólafsdóttir, S., Payne, D. J., Projan, S., & Rex, J. H. (2016). Alternatives to antibiotics – a pipeline portfolio review. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 239–251. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00466-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00466-1) PMID - 26795692
- Dantas, G., & Sommer, M. O. A. (2014). How to Fight Back Against Antibiotic Resistance. *American Scientist*, 102(1), 42–51. <https://doi.org/10.1511/2014.106.42>

- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00016-10>
- de Oliveira, R. B., de Paula, D. A. C., Rocha, B. A., Franco, J. J., Gobbo-Neto, L., Uyemura, S. A., dos Santos, W. F., & Da Costa, F. B. (2011). Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(2), 434–441. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.10.019>
- de Siqueira Patriota, L. L., Ramos, D. de B. M., Silva, M. G. E., Dos Santos, A. C. L. A., Silva, Y. A., Paiva, P. M. G., Pontual, E. V., de Albuquerque, L. P., Mendes, R. L., & Napoleão, T. H. (2022). Inhibition of Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mice by the *Microgramma vacciniifolia* Frond Lectin (MvFL). *Polymers*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/polym14081609>
- Díaz-Torres, R. C., Yáñez-Barrientos, E., Montes-Rocha, J. Á., Morales-Tirado, D. J., Alba-Betancourt, C., Gasca-Martínez, D., Gonzalez-Rivera, M. L., Juárez-Vázquez, M. C., Deveze-Álvarez, M. A., Isiordia-Espinoza, M. A., Carranza-Álvarez, C., & Alonso-Castro, A. J. (2024). Ethnomedicinal study and evaluation of the anxiolytic-like and diuretic effects of the orchid *Stanhopea tigrina* Bateman ex Lindl—(Orchidaceae). *Pharmaceuticals*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/ph17050588>
- Demilie, T., Beyene, G., Melaku, S., & Tsegaye, W. (2012). Urinary bacterial profile and antibiotic susceptibility pattern among pregnant women in north west ethiopia. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 22, 121–128.
- Demsie, D. G., Yimer, E. M., Berhe, A. H., Altaye, B. M., & Berhe, D. F. (2019). Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude root extract and solvent fractions of *Cucumis ficifolius* in mice model. *Journal of Pain Research*, 12, 1399–1409. <https://doi.org/10.2147/JPR.S193029>

- Diester, C. M., Santos, E. J., Moerke, M. J., & Negus, S. S. (2021). Behavioral battery for testing candidate analgesics in mice. I. Validation with positive and negative controls. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 377(2), 232–241. <https://doi.org/10.1124/JPET.120.000464>
- Dressler, R. (1981). *The Orchids: Natural history and classification* (2.a ed.). Harvard University Press.
- Edziri, H., Guerrab, M., Anthonissen, R., Mastouri, M., & Verschaeve, L. (2020). Phytochemical screening, antioxidant, anticoagulant and *in vitro* toxic and genotoxic properties of aerial parts extracts of *Fumaria officinalis* L. growing in Tunisia. *South African Journal of Botany*, 130, 268–273. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.014>
- Elekhrawy, E., Negm, W. A., El-Aasr, M., Kamer, A. A., Alqarni, M., Batiha, G. E. S., Obaidullah, A. J., & Fawzy, H. M. (2022). Histological assessment, anti-quorum sensing, and anti-biofilm activities of *Dioon spinulosum* extract: *in vitro* and *in vivo* approach. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03953-x>
- Fernández, S., Llanos, F., & Santa Cruz-López, C. (2021). Cytotoxicity and genotoxicity of the aqueous extract of *Matricaria chamomilla* (chamomile) on meristematic cells of *Allium cepa*. *Manglar*, 18(2), 129–133. <https://doi.org/10.17268/manglar.2021.017>
- Ferreira, A. A., & Vasconcelos, T. C. L. de. (2022). O uso irracional de plantas medicinais: uma revisão integrativa. *Research, Society and Development*, 11(8), e59711831295. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i8.31295>
- Galicia-Mendieta, E. M. (2017). *Evaluación citotóxica de compuestos fenólicos de *Catasetum integerrimum* (Orchidaceae)* [Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio Institucional de la UNAM. <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000756327>

- Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la facultad de medicina*, 77, 327–332. <https://link.gale.com/apps/doc/A491087332/IFME?u=anon~7a89c4d4&>
- Gan, T. J. (2010). Diclofenac: An update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research and Opinion*, 26(7), 1715–1731. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.486301>
- García-Peña, M. R., & Peña, M. (1981). Uso de las orquídeas en México desde la época prehispánica hasta nuestros días. *Orquídea*, 8, 59–75.
- González-Naranjo, L. A., & Restrepo-Molina, J. F. (2010). Evaluación de la inflamación en el laboratorio. *Revista colombiana de reumatología*, 17(1), 35–47.
- Hágsater, E., Soto Arenas, M. Á., Salazar Chávez, G. A., Machorro, R. J., Rosas, M. A. L., & Dressler, R. L. (2006). Las orquídeas de México. En *Acta Botanica Mexicana* (Vol. 75). Productos Farmacéuticos, S.A. de C.V.
- Hemmati, F., Salehi, R., Ghotaslou, R., Kafil, H. S., Hasani, A., Gholizadeh, P., Nouri, R., & Rezaee, M. A. (2020). *Quorum quenching*: A potential target for antipseudomonal therapy. *Infection and Drug Resistance*, 13, 2989–3005. <https://doi.org/10.2147/IDR.S263196>
- Hernández-Bautista, E. Y., & Martínez-Espinoza, L. A. F. (2019). *Aspectos ecológicos, etnobotánicos, análisis fitoquímico y cultivo in vitro de Catasetum integerrimum Hook (Orchidaceae)* [Tesis de Licenciatura, Instituto Tecnológico de Huejutla, Tecnología Nacional de México]. Repositorio Institucional del Tecnológico Nacional de México. <https://rinacional.tecnm.mx/jspui/handle/TecNM/1140>
- Herrera, S., & Bruguera, M. (2008). Hepatotoxicidad inducida por el uso de hierbas y medicamentos para perder peso. *Gastroenterología y Hepatología*, 31(7), 447–453. <https://doi.org/10.1157/13125592>

- Jiménez-Machorro, R., Sánchez-Saldaña, L. M., & García-Cruz, J. (1998). *Flora del bajo 1998 fascículo 67 familia Orchidaceae tribu maxillarieae* (Vol. 65). Instituto de Ecología A.C. <https://libros.inecol.mx/index.php/fb/article/view/65>
- Joerger, R. D. (2003). Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poultry Science*, 82(4), 640–647. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ps/82.4.640>
- Kahaliw, W., Hellman, B., & Engidawork, E. (2018). Genotoxicity study of Ethiopian medicinal plant extracts on HepG2 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12906-017-2056-x>
- Kharchoufa, L., Merrouni, I. A., Yamani, A., & Elachouri, M. (2018). Profile on medicinal plants used by the people of North Eastern Morocco: Toxicity concerns. *Toxicon*, 154, 90–113. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.09.003>
- Liu, M.C., Maruyama, S., Mizuno, M., Morita, Y., Hanaki, S., Yuzawa, Y., & Matsuo, S. (2003). The nephrotoxicity of *Aristolochia manshuriensis* in rats is attributable to its aristolochic acids. *Journal of Clinical and Experimental Nephrology*, 7(3), 186–194. <https://doi.org/10.1007/s10157-003-0229-z>
- María, M., Rojo, J., Oliveira, A. S., Gaspar, C., Palmeira-de-Oliveira, R., Goncalves, J. C., Delgado, F., Martínez-de-Oliveira, J., & Palmeria-de-Oliveira, A. (2022). Estudo da atividade mutagénica e genotóxica de extratos de plantas. *Actas Portuguesas de Horticultura*, 37, 144–152. <https://cabidigitallibrary.org>
- Mert, M., & Betül, B. (2021). Investigation of the cytotoxic and genotoxic effects of the *Euphorbia rigida* Bieb. extract. *Caryologia*, 73(4), 65–75. <https://doi.org/10.13128/caryologia-1029>
- Møller, P. (2018). The comet assay: ready for 30 more years. *Mutagenesis*, 33(1), 1–7. <https://doi.org/10.1093/mutage/gex046>
- Morales-Sánchez, V., Rivero-Cruz, I., Laguna-Hernández, G., Salazar-Chávez, G., & Mata, R. (2014). Chemical composition, potential toxicity, and quality control

procedures of the crude drug of *Cyrtopodium macrobulbon*. *Journal of Ethnopharmacology*, 154(3), 790–797.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.006>

Mostafa, I., Abbas, H. A., Ashour, M. L., Yasri, A., El-Shazly, A. M., Wink, M., & Sobeh, M. (2020). Polyphenols from *salix tetrasperma* impair virulence and inhibit *quorum sensing* of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 25(6).  
<https://doi.org/10.3390/molecules25061341>

Najar, M. S., Saldanha, C. L., & Banday, K. A. (2009). Approach to urinary tract infections. *Indian Journal of Nephrology*, 19(4), 129–139.  
<https://doi.org/10.4103/0971-4065.59333>

Okhee, C., Dong-Wan, K., Cho, S., Lee, Y., Kang, B., Bae, J., Kim, S., Lee, J. H., Lee, S. E., & Kim, J. (2018). Anti-quorum sensing and anti-biofilm formation activities of plant extracts from South Korea. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(8), 411–417. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.239429>

Olive, P. L., Banáth, J. P., & Durand, R. E. (2012). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation Research*, 178(2), 86–94. <https://doi.org/10.1667/RRAV04.1>

Parveen, K., Momen, D., Ara Begum, A., & Begum, M. (2011). Prevalence of urinary tract infection during pregnancy. *Journal of Dhaka National Medical College & Hospital*, 17(02), 8–12.

Pletzer, D., & Hancock, R. E. W. (2016). Antibiofilm peptides: Potential as broadspectrum agents. *Journal of Bacteriology*, 198(19), 2572–2578.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00017-16>

Ponce-Hernández, A., Castillo-Flores, K. A., & Castillo-Pérez, L. J. (2023). Aportes al conocimiento biotecnológico, etnofarmacológico y ecológico de las orquídeas en la Huasteca potosina. En J. J. Maldonado-Miranda, A. J. Alonso-Castro, & C.

- Carranza-Álvarez (Eds.), *Tendencias de Biotecnología, Medioambiente y Sociedad* (pp. 12–34). Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Puebla-Díaz, F. (2005). Tipos de dolor y escala terapéutica de la O.M.S. Dolor iatrogénico. *Oncología (Barcelona)*, 28(3), 33–37. [https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S037848352005000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es](https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037848352005000300006&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Ramos-Corrales, P. C., Crivos, M. A., Colares, M. N., Spegazzini, E. D., & Rosella, M. A. (2011). Relevamiento etnofarmacobotánico de plantas medicinales usadas en tres zonas diferentes del cantón Quevedo, Provincia de Los Ríos (Ecuador). *Rojasiana*, 10, 9–20. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/115486>
- Ramos, P., Colareda, G. A., Rosella, M. A., Debenedetti, S. L., Spegazzini, E. D., & Consolini, A. E. (2012). Phytochemical profile and anti-inflammatory effect of the orchid *Catasetum macroGLOSSUM*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 31(1), 62–69.
- Rehman, Z. U., & Leiknes, T. O. (2018). Quorum-quenching bacteria isolated from red sea sediments reduce biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01354>
- Romera, E., Perena, M. J., Perena, M. F., & Rodrigo, M. D. (2000). Neurofisiología del dolor. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*, 7, 11–17.
- Salazar, G. A. (1990). *Catasetum integerrimum* Hook. En E. Hágsater & G. A. Salazar (Eds.), *Orchids of Mexico Part 1 (fascículo 1, lámina 4)*. (p. 6). Asociación Mexicana de Orquideología, A.C.
- Schmid-Schönbein, G. W. (2006). Analysis of inflammation. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8(Volume 8), 93–151. <https://doi.org/https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095708>

- Simmons, D. L. (2006). What makes a good anti-inflammatory drug target? *Drug Discovery Today*, 11(5), 210–219. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(05\)03721-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1359-6446(05)03721-9)
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175(1), 184–191. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Solano-Gómez, R., Cruz Lustre, G., Martínez Feria, A., & Lagunez Rivera, L. (1996). Plantas utilizadas en la celebración de la semana santa en Zaachila, Oaxaca, México. *Polibotánica*, 29, 263–279. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-27682010000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000100012&lng=es&nrm=iso&tlng=)
- Sommer, S., Buraczewska, I., & Kruszewski, M. (2020). Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
- Svanborg, C., Godaly, G., & Hedlund, M. (1999). Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Current Opinion in Microbiology*, 2(1), 99–103. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80017-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80017-4)
- Teoh, E. S. (2019). *Orchid as aphrodisiac, medicine or food*. Springer Nature Switzerland AG.
- Turkez, H., Arslan, M. E., & Ozdemir, O. (2017). Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(10), 1089–1098. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>
- Vasudevan, R. (2014). Urinary tract infection: An overview of the infection and the associated risk factors. *Journal of Microbiology & Experimentation*, 1(2), 42–53. <https://doi.org/10.15406/jmen.2014.01.00008>

- Venkatramanan, M., Sankar Ganesh, P., Senthil, R., Akshay, J., Veera Ravi, A., Langeswaran, K., Vadivelu, J., Nagarajan, S., Rajendran, K., & Shankar, E. M. (2020). Inhibition of *quorum sensing* and biofilm formation in *chromobacterium violaceum* by fruit extracts of *Passiflora edulis*. *ACS Omega*, 5(40), 25605–25616. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02483>
- Vergara-Galicia, J., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., & Estrada-Soto, S. (2013). Vasorelaxant effect of *laelia speciosa* and *Laelia anceps*: Two orchids as potential sources for the isolation of bioactive molecules. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(7), 34–37. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2013.3707>
- Zambrano-Intriago, L. F., Buenaño-Alluaca, M. P., Mancera-Rodríguez, N. J., & Jiménez-Romero, E. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Revista Universidad y Salud*, 17, 97–111.