



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



Evaluación de una emulsión a base de quitosano como agente antibacteriano

Tesis Individual
Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciada en Microbiología

Presenta:
Ariadna Fernanda Martínez Ávila

Dirigido por:
M. en C. Tonantzi Pérez Moreno

SINODALES

M. en C. Tonantzi Pérez Moreno
Presidente

Dra. Beatriz Liliana España Sánchez
Secretario

Dra. Angelina Rodríguez Torres
Vocal

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Vocal

Dr. Fausto Arellano Carbajal
Vocal

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
5 de abril de 2024
México



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Evaluación de una emulsión a base de quitosano
como agente antibacteriano

por

Ariadna Fernanda Martínez Ávila

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNLIN-252951



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



Evaluación de una emulsión a base de quitosano como agente
antibacteriano

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciada en Microbiología

Presenta:

Ariadna Fernanda Martínez Ávila

Dirigido por:

M. en C. Tonantzi Pérez Moreno

SINODALES

M. en C. Tonantzi Pérez Moreno

Presidente

Dra. Beatriz Liliana España Sánchez

Secretario

Dra. Angelina Rodríguez Torres

Vocal

Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Vocal

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Vocal

Centro Universitario

Querétaro, Qro.

5 de abril 2024

México



Evaluación de una emulsión a base de quitosano como agente antibacteriano

Presenta:

Ariadna Fernanda Martínez Ávila



**FACULTAD
DE INGENIERÍA**



1 Resumen

La resistencia a antibióticos es un problema de relevancia en salud pública ya que ha influenciado que las infecciones bacterianas en heridas crónicas sean difíciles de erradicar, por ello se han propuesto nuevas terapias a base de biomateriales los cuales tienen como características principales la biocompatibilidad y propiedades antimicrobianas.

El siguiente trabajo consistió en la elaboración de una emulsión agua-aceite con partículas a base de quitosano/miel, se probó una concentración mínima con 12% miel y una máxima con 20% miel elaboradas mediante el método de gelación iónica con tripolifostato de sodio (TPP) para la obtención de partículas de quitosano cargadas con miel, posteriormente se caracterizó cada componente y los productos obtenidos mediante espectroscopia infrarroja mostrando como resultado una interacción electrostática entre el quitosano y la miel, en la forma farmacéutica de emulsión se observaron señales correspondientes a grupos C-H.

El análisis microbiológico de cada componente (quitosano, miel y ácido oleico) no mostró efecto bactericida, pero en conjunto la formulación de emulsión base quitosano cargado con miel (12%, 20%) demostró alta eficacia bactericida a 24h de contacto contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Así mismo, como control experimental se evaluó en forma de película obteniendo el efecto antibacteriano máximo a 24h sobre ambas bacterias, en el caso de *S. aureus* comenzó a tener efecto a desde de la primera hora de exposición, lo cual demuestra que el material presenta propiedades bactericidas al contacto con patógenos comunes en heridas crónicas por infecciones bacterianas.

Posteriormente se realizó una prueba de tolerancia de 10 pases con *P. aeruginosa* obteniendo un efecto máximo a 24h y un efecto bactericida en la concentración máxima de miel (20%). Finalmente se hizo un ensayo de citotoxicidad celular mediante el método de MTT, las muestras no mostraron efecto citotóxico en las primeras 24h, sin embargo, la muestra con menor concentración de miel (12%) sí mostró una disminución de la viabilidad celular a 72h, lo cual indica que la formulación posee propiedades biocompatibles y no tóxicas en la dosis adecuada.

Con base en los resultados se puede decir que la emulsión a base de partículas de quitosano cargadas con miel es un candidato prometedor como tratamiento antibiótico contra infecciones bacterianas de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, además de ayudar a la proliferación celular del tejido lesionado disminuyendo la probabilidad de sufrir una reacción adversa en comparación con los ungüentos antibióticos convencionales.

2 Summary

Antibiotic resistance is a significant public health issue as it has led to bacterial infections in chronic wounds becoming difficult to eradicate. Therefore, new therapies based on biomaterials with key characteristics such as biocompatibility and antimicrobial properties have been proposed.

The following study involved the preparation of a water-oil emulsion with particles based on chitosan/honey. Two concentrations were tested: a minimum with 12% honey and a maximum with 20% honey, prepared using the ionic gelation method with sodium tripolyphosphate (TPP) to obtain chitosan particles loaded with honey. Subsequently, each component and the products obtained were characterized using infrared spectroscopy, revealing an electrostatic interaction between chitosan and honey. In the emulsion pharmaceutical form, signals corresponding to C-H groups were observed.

Microbiological analysis of each component (chitosan, honey, and oleic acid) did not show bactericidal effects individually. However, the chitosan-based emulsion formulation loaded with honey (12%, 20%) demonstrated high bactericidal efficacy after 24 hours of contact against *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Additionally, as an experimental control, a film form was evaluated, showing maximum antibacterial effect after 24 hours against both bacteria. In the case of *S. aureus*, the effect began within the first hour of exposure, demonstrating that the material possesses bactericidal properties upon contact with common pathogens in chronic wounds due to bacterial infections.

Subsequently, a tolerance test of 10 passages with *P. aeruginosa* was performed, showing maximum effect after 24 hours and bactericidal effect at the maximum

honey concentration (20%). Finally, a cell cytotoxicity assay was conducted using the MTT method. The samples showed no cytotoxic effect within the first 24 hours. However, the sample with the lower honey concentration (12%) did show a decrease in cell viability at 72 hours, indicating that the formulation possesses biocompatible and non-toxic properties at the appropriate dose.

Based on the results, it can be concluded that the emulsion based on chitosan particles loaded with honey is a promising candidate for antibiotic treatment against bacterial infections caused by *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Additionally, it aids in cell proliferation in injured tissue, reducing the likelihood of adverse reactions compared to conventional antibiotic ointments.

3 Agradecimientos

En memoria de Blanca Leticia mi madre quien me hizo la persona que soy ahora y me dio alas para volar y al Dr. Eduardo quién me dio la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, compartirme su conocimiento y enseñarme que a veces es necesario darse un respiro para continuar.

A Tonantzi mi directora, por tenerme paciencia, escucharme y guiarme durante el proceso; a la Dra. Lili por escucharme, mostrarme lo bello que es la vida y contagiarme ese amor por la investigación.

A mi papá, hermana y abuelos por apoyarme y ayudarme, por siempre estar conmigo incluso a la distancia y alegrar mis días, a mis gatitos Kaya y Khunder por acompañarme en las noches de estudio.

A Charlie quien me tuvo paciencia y comprensión y a mis roomies (Pablo y Jimena) que se convirtieron en mi segundo hogar. A mis amigos (Ana, Edo, Monse, Gabi y Raúl) quienes estuvieron en el camino y me sacaron más de una sonrisa, a Sara y Dámaris que fueron mi soporte y me escucharon cuando más lo necesitaba. A mis compañeros y amigos de laboratorio quienes hicieron que trabajar fuese más ameno. A Zaira que más que mi compañera se convirtió en mi hermana y estuvo ahí para apoyarme; a Miriam que me ayudo a encontrar un balance en la vida.

A mis sinodales el Dr. Cervantes, el Dr. Fausto y la Dra. Angelina, por compartir sus conocimientos, brindarme su apoyo y asesorías.

A mis entrenadores Toño y Nath quienes me enseñaron que siempre debe existir un equilibrio entre lo académico y lo deportivo, y a la maestra Liz que siempre me alentó a seguir y no rendirme.

Índice

1	Resumen	3
2	Summary	5
3	Agradecimientos	7
4	Índice de figuras	12
5	Índice de tablas.....	14
6	Abreviaturas.....	15
7	Introducción	16
8	Antecedentes.....	18
8.1	Resistencia a antibióticos: problema de relevancia médica en heridas crónicas.....	18
8.1.1	Antibióticos y resistencia bacteriana.....	18
8.1.2	Tolerancia a antibióticos	19
8.2	Tratamientos de biomateriales con potencial para uso antibiótico	20
8.3	Emulsiones.....	22
8.3.1	Emulsiones Pickering	22
8.3.2	Aplicaciones de las emulsiones	23
8.4	Quitosano y sus propiedades.....	24
8.4.1	Usos medicinales del quitosano	25
8.4.2	Mecanismo antibacterial del quitosano.....	25

8.5	Miel y sus propiedades.....	29
8.5.1	Mecanismo antibacterial de la miel.....	29
9	Hipótesis.....	31
10	Objetivos	32
11	Justificación.....	33
12	Materiales y Métodos	34
12.1	Elaboración de películas a base de quitosano con miel mediante gelificación iónica.....	34
12.1.1	Preparación de quitosano.....	35
12.1.2	Preparación de TPP y miel.....	35
12.1.3	Preparación de soluciones de miel.....	35
12.1.4	Preparación de películas/hidrogeles.....	36
12.2	Elaboración de una emulsión de Pickering	37
12.3	Caracterización química.....	37
12.4	Evaluación antibacteriana	38
12.4.1	Pruebas en cámara húmeda	38
12.4.2	Método de dilución.....	40
12.5	Prueba de tolerancia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
12.6	Prueba de antibiograma	42
12.7	Prueba de citotoxicidad	43
12.7.1	Lavado y preparación de membranas	43
12.7.2	Preparación de medio.....	44

12.7.3	Pase de células	44
12.7.4	Preparación de experimento.....	44
12.7.5	Experimento de citotoxicidad	45
13	Resultados y discusión.....	47
13.1	Análisis de espectroscopia de FTIR.....	47
13.2	Evaluación antibacteriana de películas de quitosano/miel	52
13.3	Evaluación antibacteriana de la miel	56
13.4	Evaluación antibacteriana de la emulsión	60
13.5	Prueba de tolerancia	65
13.6	Prueba de antibiograma	69
13.7	Prueba de citotoxicidad	70
14	Conclusiones	74
15	Perspectivas futuras	76
16	Referencias	77

4 Índice de figuras

Figura 1. Estructura del quitosano (Ardean et al., 2021; Hu & Luo, 2021).	24
Figura 2. Esquema representativo de la actividad antibacteriana del quitosano, ilustración tomada de (Simões et al., 2018).	28
Figura 3. Esquema representativo de la actividad antibacteriana de la miel de abeja, ilustración tomada de (Simões et al., 2018).....	30
Figura 4. Interacción electrostática entre el quitosano y TPP (Mndlovu et al., 2020).	35
Figura 5 Diagrama ilustrativo de los pasos de la norma ASTM E2149-Actividad antimicrobiana de antimicrobianos inmovilizados en superficies irregulares con modificaciones.....	40
Figura 6. Esquema alusivo al arreglo de placa para la evaluación de citotoxicidad; película de quitosano+ TPP (Q), Q + 12% mie (12%)l y Q + 20% miel (20%).	45
Figura 7. Evaluación FTIR de las películas base quitosano y miel pura.	47
Figura 8. Evaluación FTIR de la miel pura, Q, y AO (A); AO, Q 12% + AO y Q 20% + AO (B).	51
Figura 9. Actividad antibacteriana de las películas a base quitosano/miel evaluadas contra <i>P. aeruginosa</i>	54
Figura 10. Actividad antibacteriana de las películas a base quitosano/miel evaluadas contra <i>S. aureus</i>	55
Figura 11. Actividad antibacteriana de la miel evaluada a dos concentraciones 12% y 20%, contra <i>P. aeruginosa</i>	57

Figura 12. Representación visual del crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> contra la miel pura.....	58
Figura 13. Actividad antibacteriana de la miel evaluada a dos concentraciones 12% y 20%, contra <i>S. aureus</i>	59
Figura 14. Representación visual del crecimiento de <i>S. aureus</i> contra la miel pura.....	60
Figura 15. Actividad antibacteriana del ácido oleico (A), la emulsión con 12% (B) y 20% miel (C) contra <i>P. aeruginosa</i>	62
Figura 16. Actividad antibacteriana del del ácido oleico (A), la emulsión con 12% (B) y 20% miel (C) contra <i>S. aureus</i>	64
Figura 17. Representación gráfica de la actividad antibacteriana contra <i>P. aeruginosa</i> presentada contra las películas base quitosano/miel, Q, Q + 12% y Q + 20%1 hora A), 3 horas B) y 24 horas C), a 10 pases.	68
Figura 18. Representación visual de los antibiogramas contra <i>P. aeruginosa</i> (línea superior), <i>S. aureus</i> (línea inferior).....	70
Figura 19. Ensayo de citotoxicidad con células 3T3-L1 en contacto con las películas base quitosano/miel y un control positivo, a 24h y 72h.	72
Figura 20. Imágenes de los fibroblastos 3T3-L1 en presencia de las películas base quitosano y quitosano/miel 12% y 20%; tomadas con un microscopio óptico.....	73

5 Índice de tablas

Tabla 1. Tabla Daño que causa el quitosano por peso molecular.....	27
Tabla 2. Señales obtenidas del quitosano, miel y las muestras con 12% y 20% miel.....	48
Tabla 3. Señales obtenidas del ácido oleico y las muestras base quitosano con 12% y 20% miel.....	51
Tabla 4. Tabla con las medidas del diámetro promedio que presentó <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i>	69

6 Abreviaturas

TPP	Tripolifosfato de sodio
Q	Quitosano + TPP
AO	Ácido oleico
FTIR	Espectroscopia infrarroja trasformada de Fourier
LB	Luria Bertani
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
MTT	Tetrazolio
DMSO	Dimetilsulfóxido
12%	12% miel
20%	20% miel
Cfx	Ciprofloxacino

7 Introducción

Las heridas crónicas afectan alrededor de 20 millones de personas en todo el mundo. En particular, se considera una herida crónica cuando no se tiene un progreso favorable en la etapa de cicatrización o bien, hay presencia de recaídas. Además, existen diversos factores que influyen el retraso de la cicatrización como son las enfermedades metabólicas, insuficiencia vascular, defectos neurológicos, deficiencia nutricional, envejecimiento e infecciones por microorganismo, siendo estas las de mayor relevancia (Li et al., 2021; Sen, 2021) puesto que las infecciones bacterianas están asociadas a la resistencia a antibióticos y formación de biopelículas (McLoone et al., 2020).

La resistencia a antibióticos ocurre por diversos mecanismos, entre ellos la adquisición de genes de resistencia mediante mutación, por transformación genética, transducción y conjugación de genes (Darby et al., 2023; Eisenreich et al., 2022). En cambio, una biopelícula son un conjunto de bacterias adheridas a una superficie que forma una matriz extracelular que tiene como función principal proteger a las células bacterianas; las bacterias de interés clínico que poseen esta capacidad son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (Camplin & Maddocks, 2014; McLoone et al., 2020; Schilcher & Horswill, 2020).

Las heridas crónicas por infecciones son tratadas con antibióticos, sin embargo, en los últimos años se ha visto una disminución de la eficacia para erradicar las infecciones debido a las estrategias de resistencia que han adquirido las

bacterias (Darby et al., 2023; Mohammed et al., 2022; Sen, 2021), por ello se han buscado alternativas de antibióticos de origen sintético o natural.

Entre los candidatos de antibióticos se encuentran algunos metales como la plata, el oro, zinc, cobalto, titanio, entre otros; también biopolímeros como quitosano, celulosa, elastina, alginato, gelatina, colágeno y fibrina los cuales se pueden encontrar adicionados con halógenos, heparina, dendrímeros, derivados del fósforo y azufre, polietilamina de amonio, polimetacrilato y guanilato (Alven & Aderibigbe, 2020; Matica et al., 2019; Sarhan et al., 2016). Entre los compuestos naturales con propiedades antibacteriales se encuentran los aceites esenciales de plantas como *Allium sativum*, *Cleome droserifolia*, *Castanea sativa*, entre otras, además se ha propuesto el uso de miel de manuka y kanuka, puesto que también tiene la capacidad de estimular las células inmunes y promover la formación de vasos sanguíneos (Bucekova et al., 2018; McLoone et al., 2020; Sarhan et al., 2016).

Dado esto se busca que la emulsión elaborada a base de partículas de quitosano cargadas con miel ayude al proceso de regeneración del tejido dañado gracias a que conservan un ambiente húmedo, ayuda a la eliminación de especies reactivas de oxígeno y aporta los nutrientes necesarios para la síntesis del colágeno y deposición de fibroblastos los cuales son procesos esenciales para la cicatrización de heridas (Şalva et al., 2023).

8 Antecedentes

8.1 Resistencia a antibióticos: problema de relevancia médica en heridas crónicas

Las heridas crónicas son un problema de salud que afecta a 20 millones de personas alrededor del mundo y se caracterizan por un retraso en el proceso de cicatrización, lo cual ocurre por diversos factores, entre ellos las enfermedades metabólicas crónicas como diabetes, insuficiencia vascular, anemia, defectos neurológicos, inmunocomprometidos, adultos mayores e infecciones bacterianas siendo estas las de mayor relevancia en la persistencia de las heridas (Akrawi et al., 2020; Li et al., 2021). Se estima que un 70% de heridas crónicas son causadas por infecciones bacterianas, la persistencia de la infección puede darse por diversos factores como la resistencia a antibióticos o a la formación de biopelículas. Si la infección no es controlada puede causar sepsis, inflamación en órganos, amputación de alguna extremidad y en casos de mayor gravedad llega a causar la muerte (McLoone et al., 2020; Sen, 2021)

8.1.1 Antibióticos y resistencia bacteriana

La forma más común de tratar infecciones bacterianas es con antibióticos, los antimicrobianos se han usado desde hace 2000 años, con los griegos y egipcios como pioneros quienes utilizaron compuestos extraídos de plantas para tratar diversas infecciones. Posteriormente, se hicieron nuevos descubrimientos con potencial antimicrobiano, entre ellos el primer antibiótico descubierto por Alexander Fleming en 1928, la penicilina. Desde entonces se han creado una gran variedad de fármacos con diferentes mecanismos de acción como la ruptura de la membrana celular, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (ADN/ARN),

regulación enzimática de la biosíntesis de la pared celular, inhibición de la síntesis de proteínas y la inhibición de la síntesis de ácido fólico (Matica et al., 2019; Sarhan et al., 2016). No obstante, estos tratamientos han perdido eficacia por las estrategias de supervivencia que han desarrollado las bacterias, como la formación de biopelículas, la cual es una estructura compuesta de proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, en conjunto estos agregados bacterianos les brinda mayor resistencia a condiciones ambientales adversas y la adquisición de genes de resistencia a antibióticos (Darby et al., 2023; Eisenreich et al., 2022; McLoone et al., 2020; Sarhan et al., 2016).

8.1.2 Tolerancia a antibióticos

La tolerancia a los antibióticos es una estrategia presente en bacterias patógenas para sobrevivir en ambientes hostiles, un ejemplo es *P. aeruginosa* una bacteria presente en fibrosis quística, quemaduras y heridas en pacientes inmunocomprometidos, que, a pesar de ser tratada con antibióticos como ciprofloxacino, tobramicina, penicilina, entre otros, persisten causando infecciones crónicas (Boeck, 2023; Fan et al., 2019; Murakami et al., 2017). En la tolerancia las bacterias sobreviven temporalmente en la concentración mínima inhibitoria (CMI) pero no crecen en presencia de antibióticos por encima de dicha concentración, además, en la tolerancia las bacterias no sufren mutación alguna (Boeck, 2023; Brauner et al., 2016; Murakami et al., 2017).

8.2 Tratamientos de biomateriales con potencial para uso antibiótico

En los últimos años las bacterias han ido desarrollando mecanismos de resistencia a los antibióticos, por lo cual resulta complicado erradicarles convirtiéndose en un problema de salud pública de gran relevancia (McLoone et al., 2020; Sarhan et al., 2016). Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos antibióticos, ya sea de origen sintético o natural, entre los cuales se propone el uso de algunos metales, entre ellos la plata y el pastel debido a las propiedades antimicrobianas que poseen, sin embargo, presenta un problema al no ser amigable con el tejido ya que puede causar un daño mayor en la piel lesionada (Sarhan et al., 2016), otras opciones que se han llegado a considerar como antibióticos son los halógenos, heparina, dendrímeros, derivados del fósforo y el azufre, polietilamina de amonio, polimetacrilato y guanilato en combinación con polímeros como quitosano cuya característica principal son sus propiedades antibacterianas (Matica et al., 2019), la miel de abeja y los aceites esenciales de algunas plantas también se han propuesto para uso antibiótico y el tratamiento de heridas o quemaduras puesto que se ha visto que ayuda a prevenir infecciones bacterianas y formación de biopelículas bacterianas (McLoone et al., 2020). Todos los materiales y compuestos mencionados anteriormente tienen un potencial como futuros antimicrobianos, ya que de acuerdo con el diccionario médico Merriam-Webster un antimicrobiano es un agente que evita y detiene el crecimiento de microorganismos patógenos e inclusive tiene la capacidad de causarles la muerte (Matica et al., 2019) y estos cumplen con dicha característica. Por ello, en los últimos años se han utilizado nano y micropartículas en la industria farmacéutica para la elaboración de

medicamentos, acarreadores, pomadas, cremas, ungüentos, hidrogeles, emulsiones y apósitos (Cárdenas-Escudero et al., 2023; El-Didamony et al., 2022; Fresco-Cala & Cárdenas, 2022a; Ho et al., 2022; Hu & Luo, 2021; Wang et al., 2020; Wu & Ma, 2016).

8.3 Emulsiones

Una emulsión es una dispersión coloidal bifásica compuesta por dos líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles. Se conforma de dos fases, una fase polar también conocida como fase acuosa y una fase no polar que usualmente es un aceite. Así mismo existen dos tipos principales de emulsiones, la primera es agua en aceite (W/O) donde la fase dispersa es la fase polar; la segunda es la emulsión aceite en agua (O/W) donde la fase dispersa es la fase no polar.

Para conservar la estabilidad de las emulsiones se utilizan biopolímeros anfifílicos, partículas y tensoactivos de bajo peso molecular (Fresco-Cala & Cárdenas, 2022b; Ho et al., 2022), no obstante, estos llegan a causar efectos secundarios como reacciones hipersensibilidad y daño a las membranas celulares (Wu & Ma, 2016).

8.3.1 Emulsiones Pickering

Las emulsiones de Pickering son emulsiones tanto de agua (w/o) en aceite como aceite en agua (o/w) que contienen partículas sólidas (micropartículas o nanopartículas) como sustituto de un tensoactivo cuya función es brindarle estabilidad, por lo que se conservan las propiedades de las emulsiones clásicas y se reduce el riesgo de que la persona presente efectos secundarios como reacciones de hipersensibilidad, irritación, neurotoxicidad y daño a membranas celulares (Chevalier & Bolzinger, 2013). Entre las ventajas destaca una alta estabilidad, alta permeabilidad y casi nula toxicidad además de una mayor coalescencia ya que tiene la capacidad de adsorberse en regiones interfaciales de la fase (Ho et al., 2022; Wu & Ma, 2016).

8.3.2 Aplicaciones de las emulsiones

Las emulsiones se han utilizado principalmente en la industria farmacéutica para la administración de fármacos de forma controlada, elaboración de cremas, ungüentos, lociones, entre otros. En la industria alimentaria para la protección y liberación de compuestos bioactivos; recientemente se han utilizado en la elaboración de cosméticos y materiales para la construcción (Fresco-Cala & Cárdenas, 2022b; Ho et al., 2022; Wu & Ma, 2016). En investigaciones recientes las micro y nano partículas que se han utilizado en este tipo de emulsiones se han hecho a base de biopolímeros como quitosano, celulosa, ácido poli láctico entre otros, de los cuales su propiedad principal es la biocompatibilidad y bioactividad (Araya-Hermosilla et al., 2022; Meng et al., 2022; Parajuli & Ureña-Benavides, 2022).

8.4 Quitosano y sus propiedades

El quitosano es un polisacárido lineal catiónico derivado de la des acetilación parcial o total de la quitina, molécula que forma parte del exoesqueleto de insectos y crustáceos (Hu & Luo, 2021; Kosimaningrum et al., 2020; Wang et al., 2020). El primer indicio de la existencia del quitosano fue en 1859 cuando Rouget observó por primera vez que al colocar la quitina a fuego en un medio ácido el resultado fue un material soluble en ácidos orgánicos, pero no fue nombrado hasta 1894 por Hoppe Seyler quien le dio el nombre que conocemos hoy en día, quitosano. Su estructura fue conocida hasta 1950 (Ardean et al., 2021).

El quitosano se obtiene de la des acetilación de quitina, en dicha reacción se eliminan los grupos acetilo de la cadena de la quitina formando los grupos amino que caracterizan al quitosano. Dado esto, puede clasificarse como un copolímero compuesto por unidades 2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranososa (glucosamina) y 2-acetamida-2-desoxi- β -D-glucopiranososa (N-acetilglucosamina) unidos por enlaces glicosídicos $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 1) (Ardean et al., 2021; Hu & Luo, 2021).

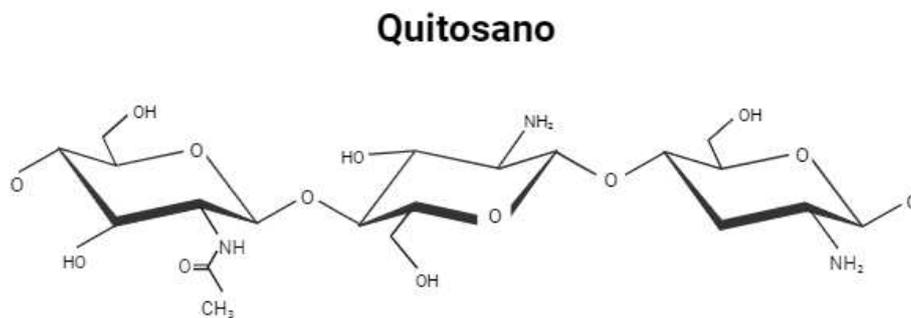


Figura 1. Estructura del quitosano (Ardean et al., 2021; Hu & Luo, 2021).

El quitosano es un biopolímero biocompatible, biodegradable, bioactivo y no tóxico, además de poseer propiedades bactericidas, antivirales, anticancerígenas y antioxidantes. También se ha visto que en células humanas tiene la capacidad de promover procesos celulares como la inducción de la agregación de los eritrocitos, activar el sistema del complemento, promover la activación de las plaquetas y ayudar en el proceso de coagulación, además, puede reducir el dolor bloqueando las terminaciones nerviosas y acelerar el proceso de cicatrización mediante la estimulación de la producción de células inflamatorias, macrófagos y fibroblastos (El-Didamony et al., 2022; Kosimaningrum et al., 2020; Matica et al., 2019; Wang et al., 2020).

8.4.1 Usos medicinales del quitosano

El quitosano es un polímero aprobado por la United States Food and Drug Administration (FDA) para su uso en compuestos dietéticos, ingeniería de tejidos y como acarreador para medicamentos, adyuvantes y vacunas. Además, se ha considerado como un antimicrobiano de nueva generación y se utiliza en la elaboración de nanocomplejos, nanopartículas auto ensambladas, nano emulsiones, nanotubos, nanocompuestos, nanofibras, hidrogeles, micro esferas y micelas (El-Didamony et al., 2022; Hu & Luo, 2021; Wang et al., 2020).

8.4.2 Mecanismo antibacterial del quitosano

La acción antimicrobiana se ve influenciada por diferentes factores intrínsecos como, la fuente del quitosano ya sea si proviene de crustáceos, insectos u hongos; la concentración, el peso molecular, el grado de polimerización, el grado de des acetilación y factores extrínsecos como el pH, el tipo y sensibilidad del

microorganismo, la composición química del sustrato, entre otros, (Ardean et al., 2021).

8.4.2.1 Daño por interacción de cargas

El mecanismo antibacterial del quitosano se ve influenciado por los grupos amino presentes en la cadena principal del polímero, los cuales se protonan y le otorgan una carga positiva, así las cargas positivas interactúan con las cargas negativas de los compuestos que conforman la membrana de las bacterias Gram-negativas y las Gram-positivas, principalmente los residuos carboxílicos y de fosfato (Ardean et al., 2021; Matica et al., 2019). Cuando se da esta interacción el quitosano experimenta un fenómeno de precipitación, lo que ocasiona que se quede sobre la superficie de la membrana bacteriana generando el bloqueo de los canales iónicos, afectando la permeabilidad de la membrana y dificultando la entrada de nutrientes y moléculas esenciales para el metabolismo bacteriano (Figura 2), así como la salida de desechos de los componentes intracelulares, lo cual lleva a la bacteria a lisis celular y posteriormente la muerte (Ardean et al., 2021; Matica et al., 2019; Verlee et al., 2017).

8.4.2.2 Efecto quelante del quitosano

En medios ácidos el quitosano tiene una alta afinidad por algunos iones metálicos como Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , sin embargo, su objetivo principal y por los iones que tienen mayor afinidad son el Ca^{2+} y Mg^{2+} , los cuales se encuentran principalmente en los canales de intercambio iónico (Figura 2). Este fenómeno ocurre porque los grupos amino de la cadena compiten con los cationes divalentes, como lo son el Ca^{2+} y Mg^{2+} , el hecho de que el quitosano forme complejos con estos iones metálicos causa permeabilidad en la membrana

y un desequilibrio de cargas, dando como resultado una lisis de la célula bacteriana (Ardean et al., 2021; Matica et al., 2019).

8.4.2.3 Daño por peso molecular

Algunos estudios han reportado que existe una correlación entre el peso molecular del quitosano y el daño que causa sobre la bacteria (Tabla 1) (Ardean et al., 2021).

Tabla 1. Daño que causa el quitosano por peso molecular.

kDa	Mecanismo
BAJO PESO MOLECULAR (< 50 kDa)	Tiene la capacidad de penetrar la célula bacteriana y llegar hasta el núcleo e inhibir la síntesis del mRNA y de las proteínas (Matica et al., 2019).
MEDIO PESO MOLECULAR (50 kDa AND 250 kDa)	Se une a la membrana bacteriana por interacción de cargas y modifica la permeabilidad (Verlee et al., 2017).
ALTO PESO MOLECULAR (250 kDa)	Se aglomera en la superficie bacteriana e impide el intercambio iónico y el paso de nutrientes provocando una lisis celular (Ardean et al., 2021; Matica et al., 2019).

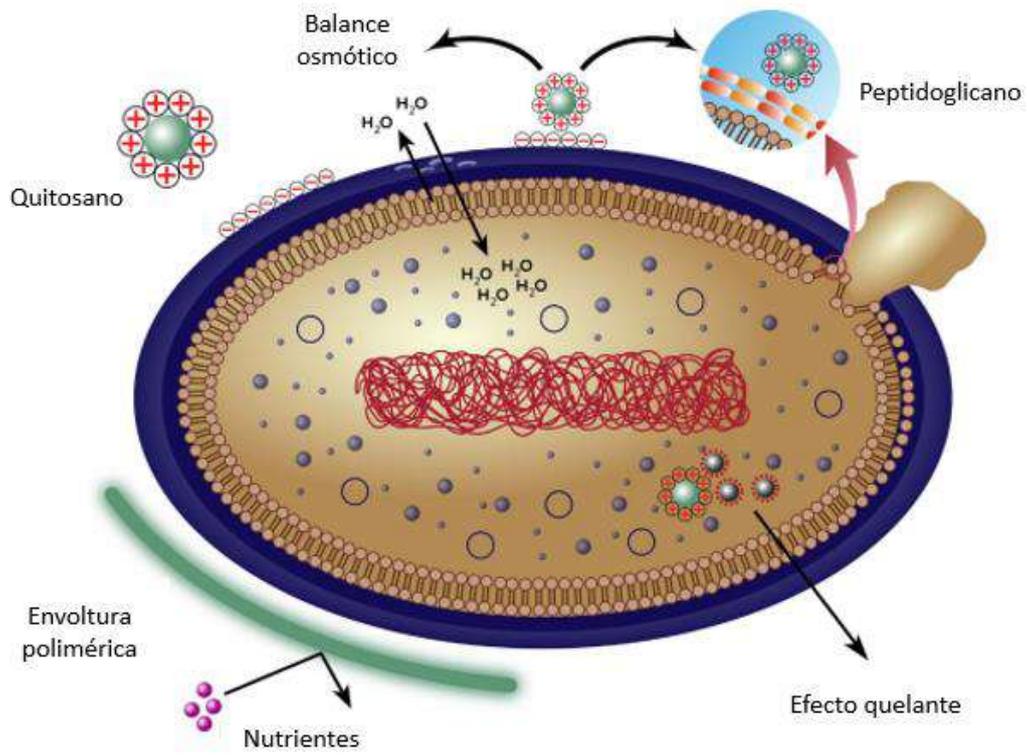


Figura 2. Esquema representativo de la actividad antibacteriana del quitosano, ilustración tomada de (Simões et al., 2018).

8.5 Miel y sus propiedades

La miel es una sustancia de consistencia viscosa que se obtiene a partir del néctar recolectado por las abejas, de ellas la especie principal es *Apis mellifera* (Liu et al., 2014). La miel está compuesta por 38.2% de fructosa, 31.3% glucosa, 17% agua y 1% de sacarosa, además de una menor proporción de algunos ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales, enzimas y pigmentos; de los cuales destacan los ácidos fenólicos y los flavonoides que se caracterizan por sus propiedades antioxidantes, mismas que ayudan a la eliminación de radicales libres y la disminución de la respuesta inflamatoria, así mismo tiene propiedad analgésicas ya que tiene la capacidad de estimular células del sistema inmune como lo son los monocitos y posteriormente inducir la producción de citocinas (El-Kased et al., 2017; Oliveira et al., 2018)

Se ha reportado que la miel también posee propiedades antibacterianas, tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas (El-Kased et al., 2017), antiparasitarias y antifúngicas, esto gracias a su alto contenido en azúcar, una alta osmolaridad, un pH bajo entre 3.4-4.5 y la producción de peróxido de hidrógeno (El-Didamony et al., 2022; Kosimaningrum et al., 2020; Lu et al., 2019; Masoura et al., 2020).

8.5.1 Mecanismo antibacterial de la miel

Las propiedades antibacterianas de la miel no solo son debido a su composición basal, se ha reportado que las mieles con alto contenido de azúcares tienen una tendencia a producir mayor cantidad de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) reacción catalizada mediante la enzima glucosa oxidasa (Oliveira et al., 2018), otra forma

en la que se produce H_2O_2 es mediante los polifenoles o la reducción de los grupos Fe (III) a Fe (II) lo cual estimula la producción de H_2O_2 y otras especies reactivas de oxígeno, causando peroxidación lipídica en la membrana así como en proteínas de la célula y ADN bacteriano (Figura 3) (Masoura et al., 2020).

Si bien la producción de peróxido de hidrógeno es el mecanismo principal, la acción antibacteriana de la miel también se asocia a la presencia de metilglioxal, un subproducto de la glucólisis que tiene la capacidad de unirse al ribosoma e interrumpir la traducción (Figura 3) (Simões et al., 2018; Yupanqui Mieles et al., 2022), así como a la presencia del péptido antibacteriano defensina 1 (Def -1) el cual altera la producción de sustancias poliméricas extracelulares y evita la adhesión bacteriana (Bucekova et al., 2018; Yupanqui Mieles et al., 2022).

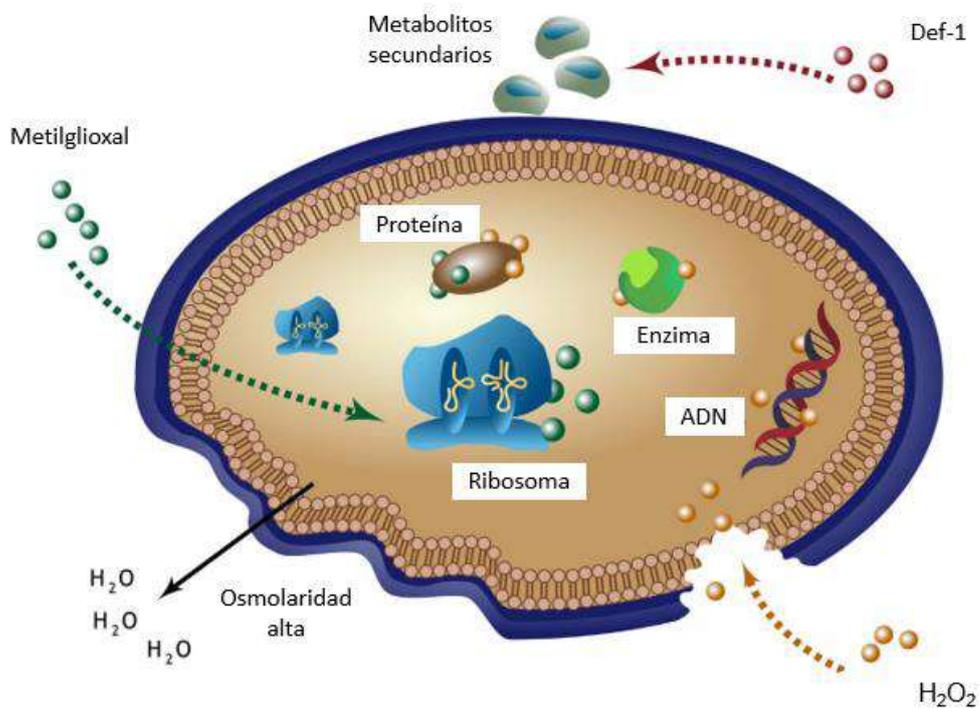


Figura 3. Esquema representativo de la actividad antibacteriana de la miel de abeja, ilustración tomada de (Simões et al., 2018).

9 Hipótesis

Las micropartículas de miel encapsuladas en quitosano dispersadas en una emulsión tienen un efecto antibacteriano contra *P.aeruginosa* y *S. aureus*, además son biocompatibles en tratamientos dérmicos.

10 Objetivos

General

Elaborar una emulsión agua/aceite con micropartículas de quitosano cargadas con miel que presente propiedades antibacterianas y biocompatibles.

Particular

- Encapsular miel en quitosano mediante el método de gelificación iónica.
- Caracterizar la emulsión en estado sólido por espectroscopía de infrarrojo.
- Realizar pruebas antibacterianas de los componentes de la emulsión y obtener la concentración mínima inhibitoria con *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
- Hacer la prueba de tolerancia bacteriana con una cepa ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Realizar pruebas de citotoxicidad con la línea celular 3T3-L1 de fibroblastos.

11 Justificación

Las heridas crónicas son un problema de salud que afecta aproximadamente a 20 millones de personas en el mundo, afecta principalmente a personas con morbilidades como diabetes, insuficiencia vascular, anemia e inmunocomprometidos ya que en ellos el proceso de cicatrización es lento y son más propensos a adquirir infecciones en la piel lesionada. El tratamiento clásico para infecciones son los antibióticos, sin embargo, con el surgimiento de la resistencia bacteriana se ha vuelto complicado erradicarlas y ha incrementado la persistencia de bacterias patógenas en el tejido lesionado, además el tratamiento puede resultar agresivo en este tipo de pacientes. Las tendencias en el desarrollo de materiales de curación van enfocadas a la producción de sistemas biocompatibles y de bajo costo, que presenten la misma eficacia bactericida que los antimicrobianos convencionales, sin que represente un riesgo para la salud. En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo proponer un nuevo tratamiento a base de componentes naturales y biocompatibles con un efecto antimicrobiano y farmacológico.

12 Materiales y Métodos

12.1 Elaboración de películas a base de quitosano con miel mediante gelificación iónica

La gelificación iónica es una técnica utilizada para la síntesis de micro o nanopartículas basado en la interacción de cargas, con la finalidad de reticular grupos amino de carga positiva con moléculas polianiónicas como dextranos, glioxal, tripolifosfato, genipina, sulfato y glutaraldehído; la reticulación forma un complejo que se usa para transportar y encapsular fármacos, el complejo le brinda protección y ayuda a la liberación controlada (Hoang et al., 2022; Jhaveri et al., 2021; Mikušová et al., 2021). El reticulante comúnmente utilizado para quitosano es el tripolifosfato de sodio (TPP), ya que la interacción del grupo NH_2 del quitosano con grupos aniónicos del TPP como lo es el O^- permite la formación de complejos electrostáticos de $-\text{COO}^-$ $^+\text{NH}_3$ – (Figura 4) (Hoang et al., 2022; Mndlovu et al., 2020).

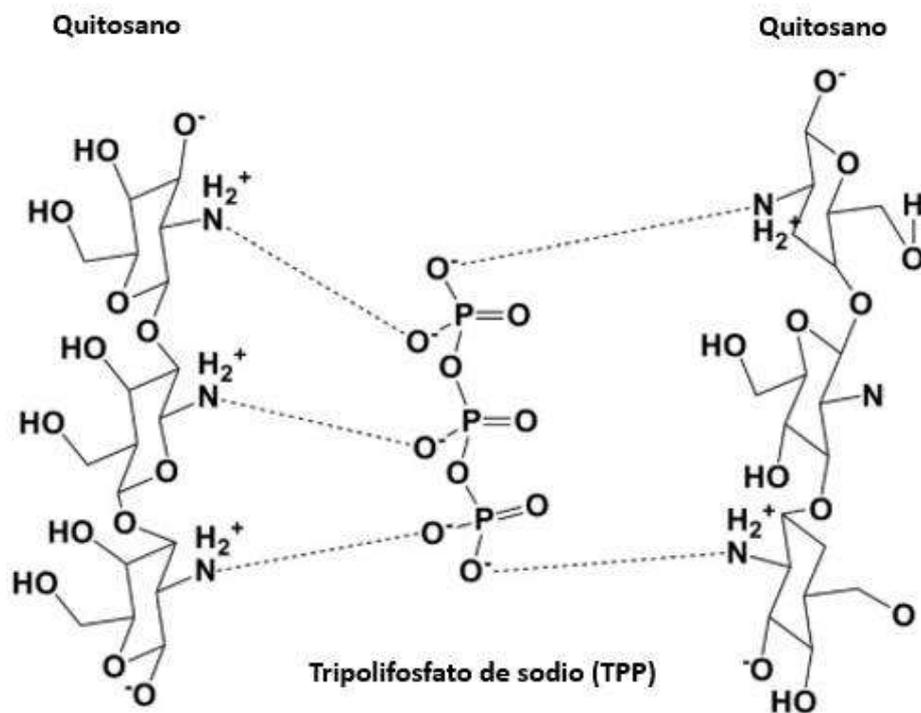


Figura 4. Interacción electrostática entre el quitosano y TPP (Mndlovu et al., 2020).

12.1.1 Preparación de quitosano

Para disolver 50 mL de quitosano, se pesaron 0.25 g de quitosano de medio peso molecular y se disolvió en 50 mL de ácido acético al 0.5 %, se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 24h

12.1.2 Preparación de TPP y miel

Se preparó una solución de tripolifosfato de sodio (TPP) al 0.2% para lo cual se disolvieron 0.04 g de TPP en agua desionizada hasta aforar a 20 ml

12.1.3 Preparación de soluciones de miel

- La miel se disolvió en relación 1:1 miel: agua destilada (g/mL) (Kosimaningrum et al., 2020).

- Miel 12%: 1.2 mL de miel y 2.8 mL TPP
- Miel 20%: 2 mL de miel y 2.6 mL de TPP

12.1.4 Preparación de películas/hidrogeles

Se utilizó una relación 1:3 (TPP – quitosano), es decir, se añadió 1 mL de TPP por 3 mL de quitosano.

12.1.4.1 Película de quitosano

A 10 mL de la solución de quitosano se agregaron 3.3 mL de TPP en agitación constante mediante la técnica de goteo con ayuda de una jeringa y una bomba programada a 150 μ L/min.

12.1.4.2 Películas de miel

Las soluciones de miel al 12% y 20% + TPP 0.2% se agregaron a la solución de quitosano por medio de la técnica de goteo, la bomba se programó a un goteo constante de 150 μ L/min, dado que el TPP se agregó en relación 1:3, para la película con 12% miel se utilizaron 8.8 mL de quitosano y 8 mL para la película con 20% miel.

12.1.4.3 Precipitación de partículas y secado

Una vez homogenizados todos los componentes, la solución se vertió a tubos cónicos de 50 mL, se agregó un volumen equivalente de etanol de la solución final, obteniendo una relación 1:1 solución quitosano + miel/TPP: etanol para llevar a cabo la precipitación de partículas, posteriormente se centrifugó durante 30 min a 8000 rpm. Posteriormente se vertió en placas Petri de 6 cm, se dejó secando a temperatura ambiente durante 3 a 5 días para la obtención de una película.

12.2 Elaboración de una emulsión de Pickering

Se utilizó el mismo procedimiento que en la elaboración de películas de quitosano, quitosano miel al 12% y 20%, sin embargo, una vez centrifugadas las soluciones, se decantó la fase líquida y la fase en suspensión se transfirió a un vaso de precipitado, a la cual se le añadió por goteo ácido oleico (AO) al 1M en relación 1:10 (AO:quitosano).

12.3 Caracterización química

Se utilizó la técnica de Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) la cual proporciona información estructural de la muestra analizada, visualizando componentes orgánicos e inorgánicos, además se necesita una cantidad mínima de muestra y el resultado del análisis se obtiene de forma inmediata (Chen et al., 2015; Tiernan et al., 2020). Es una técnica basada en vibraciones de enlaces moleculares, vibraciones que se originan como resultado de la excitación con radiación infrarroja llevando a la molécula a un mayor estado de energía. Así, de acuerdo a la absorción de energía se produce una señal que puede indicar la información de los grupos funcionales presentes en la muestra (C–H, O–H, C=O, etc.) (Barnes et al., 2023; Chen et al., 2015; Rohman et al., 2020). Las vibraciones moleculares dependen de la estructura química y de la interacción de los elementos del entorno, ya que a mayor absorción de energía la señal se observará con un pico bajo y a menor absorción las señales serán más altas, igualmente la posición de la señal está asociado a un grupo funcional determinado por el número de onda (Baiz et al., 2020; Chen et al., 2015), la región infrarroja de la radiación electromagnética está cubierta por números de onda que se pueden dividir en tres regiones, cercano ($14\ 000$ a 4000 cm^{-1}), medio

(4000–400 cm^{-1}) y lejano (400–50 cm^{-1}), de los cuales el infrarrojo medio es el que se utiliza para observar la estructura vibratoria y rotacional de una muestra (Rohman et al., 2020).

12.4 Evaluación antibacteriana

Se utilizaron cepas ATCC una de una bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* 13388 y una Gram-positiva *Staphylococcus aureus* 6538, las cepas se trabajaron bajo condiciones de esterilidad.

12.4.1 Pruebas en cámara húmeda

12.4.1.1 Preparación del inóculo

Con un asa bacteriológica se tomó una muestra del estriado en placa de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, la muestra se inoculó en medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB), se incubaron a 37 °C por 18 horas aproximadamente. Posteriormente, se midió la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro, se estandarizó a una densidad de 0.1 lo cual es equivalente a la concentración inicial de 1×10^8 , a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas en medio líquido LB-PBS relación 1:5 hasta llegar a una concentración final de 10^5 (Hernández-Orozco et al., 2022).

Las pruebas se realizaron con base en la norma *ASTM E2149-Actividad antimicrobiana de antimicrobianos inmovilizados en superficies irregulares* con algunas modificaciones.

12.4.1.2 Preparación de cámara húmeda

El sistema consta de una caja Petri con dos trozos de papel filtro, en el centro una muestra de 1cm x 1cm de la película a evaluar y un cubreobjetos sobre de esta, todos los materiales se esterilizaron en luz UV durante 20 minutos (Figura 3).

Una vez esterilizado el sistema, el papel filtro se humedeció con agua desionizada estéril, sobre la película se colocaron 20 µL de inóculo bacteriano a una concentración de 10×10^8 , se colocó el cubre objetos sobre las bacterias. Como control positivo se utilizó una cámara húmeda con 20 µL de inóculo bacteriano (Figura 3). Se incubó en tiempos de 1h, 3h y 24h con las películas de quitosano como blanco, quitosano-miel al 12% y quitosano-miel al 20%.

12.4.1.3 Lavado de cámara húmeda

Pasado el tiempo de incubación se lavó la cámara húmeda, se retiró el papel filtro y se agregaron 2 mL de PBS+ Tween 80 al 0.5% posteriormente se agitó suavemente en círculos hasta separar la película del cubreobjetos, se tomó una alícuota de 50 µL y se plaqueó en una placa de medio sólido LB por el método de dispersión con perlas de vidrio. El procedimiento de lavado se realizó a todas muestras evaluadas en los tiempos correspondientes (Figura 5).

Posteriormente se incubaron a 37 °C por 18 horas aproximadamente, finalmente se contaron las colonias y se obtuvo el porcentaje (%) de actividad antibacterial, la cual se calculó con la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC\ Control\ (+) - UFC\ Muestra\ X}{UFC\ Control\ (+)} \times 100 = \% \% AA$$

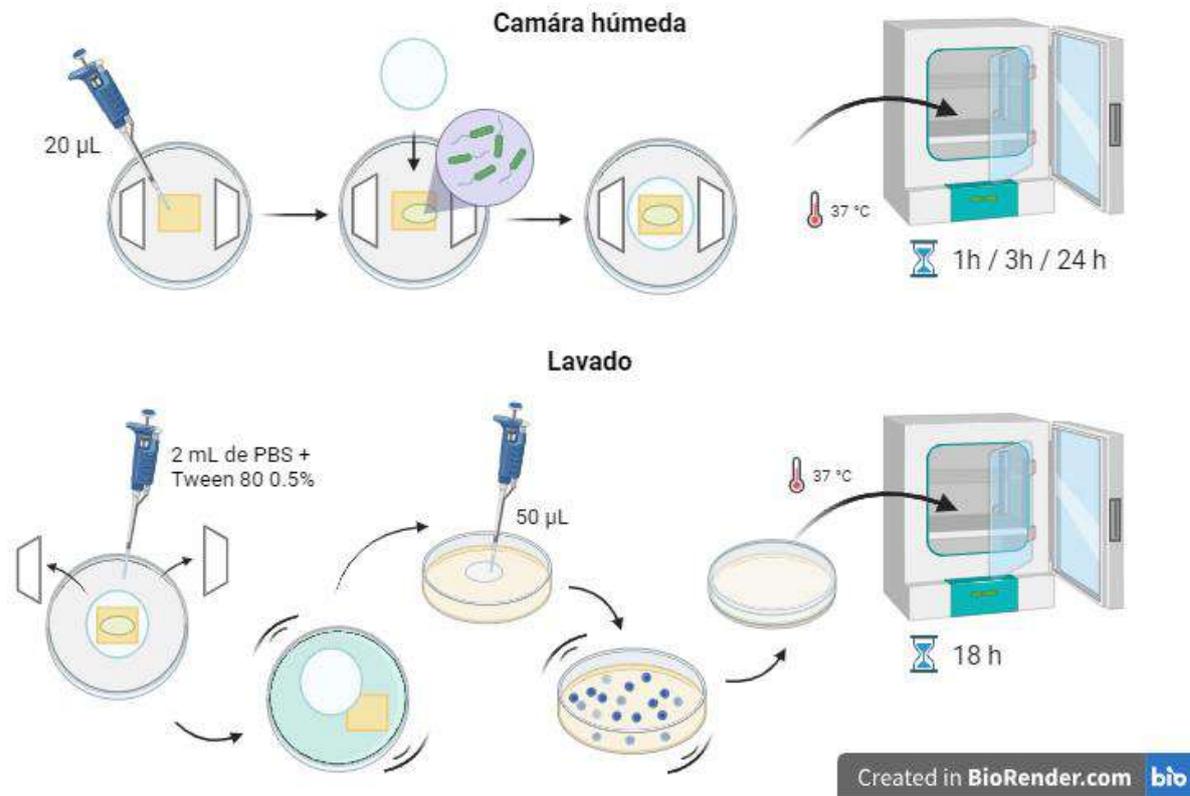


Figura 5 Diagrama ilustrativo de los pasos de la norma *ASTM E2149-Actividad antimicrobiana de antimicrobianos inmovilizados en superficies irregulares con modificaciones.*

12.4.2 Método de dilución

12.4.2.1 Evaluación de la miel pura

Para la evaluación de la miel, se realizó un stock en PBS con las respectivas concentraciones 12% y 20% en 1 mL de PBS.

En un tubo plástico de 1.5 mL se agregaron 500 µL de cada stock + 500 µL de inóculo de bacterias ajustado a 1×10^5 UFC, como control positivo se agregaron 500 µL del inóculo bacteriano + 500 µL de medio de cultivo líquido LB, posteriormente se incubó 1h, 3h y 24h, pasado el tiempo se tomó una alícuota de 50 µL y se dispersó con perlas de vidrio en agar sólido LB, se incubó a 37 °C

por 18 horas. El experimento se realizó por triplicado con *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Finalmente se contaron las colonias y se calculó el porcentaje (%) de actividad antibacteriana con la fórmula anteriormente mencionada.

12.4.2.2 Evaluación de la emulsión

La evaluación se realizó por el método de dilución seriada en una placa de 96 pozos, donde en el pozo A1 se colocaron 125 μ L de ácido oleico, en el A2 125 μ L de ácido oleico + 125 μ L de PBS, se homogenizó y se transfirieron 125 μ L al pozo A2; se siguió el mismo procedimiento para la emulsión con 12% en la línea B y 20% miel en la línea C respectivamente; finalmente se agregaron 125 μ L del inóculo bacteriano 10×10^8 , como control positivo en un pozo se colocaron 125 μ L del inóculo bacteriano + medio líquido LB, se incubó por 1h, 3h y 24 h a 37 °C, pasado el tiempo se tomó una alícuota de 50 μ L de cada pozo y se plaqueó en agar sólido LB, se incubó a 37 °C por 18 horas, se contaron la colonias y se calculó el porcentaje (%) de la actividad antibacteriana. El experimento se realizó por triplicado con *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

Stock	Dilución 1	Dilución 2	Control (+)
AO (125 μ L) + bacterias (125 μ L)	AO/PBS (125 μ L) + bacterias (125 μ L)	AO/PBS (125 μ L) + bacterias (125 μ L)	Bacterias (125 μ L) + medio líquido LB (125 μ L)

12.5 Prueba de tolerancia de *Pseudomonas aeruginosa*

La exposición de *P. aeruginosa* fue realizada a tiempos específicos en el principio activo, en este caso las partículas de quitosano/miel las cuales se rescataron en forma de película (véase procedimiento en elaboración de películas). La prueba se realizó con el sistema de cámara húmeda con el procedimiento descrito anteriormente (Figura 3).

Una vez calculado el porcentaje de actividad bactericida, se realizó una resiembra por estriado de las colonias de la película que mostró una inhibición igual o mayor a 80%, se incubó a 37 °C por 18 horas, placa rotulada como Pase 0, de la cual se tomó una muestra y se preparó el inóculo como se describe anteriormente (Hernández-Orozco et al., 2022).

Se montó el experimento en cámara húmeda (Figura 5), se analizaron los resultados y se siguió el mismo procedimiento descrito el párrafo anterior, solo que este estriado en fue el pase 1. Se repitió el mismo procedimiento hasta completar 10 pases, cada pase se realizó por duplicado.

12.6 Prueba de antibiograma

Se realizó una prueba de antibiograma para observar la susceptibilidad de *P. aeruginosa* y *S. aureus* al tratamiento antimicrobiano en este caso a la emulsión (Simner et al., 2022).

Las pruebas de antibiogramas se realizaron en medio LB en palcas de 6 cm de diámetro, se realizaron tres réplicas con *P. aeruginosa* y *S. aureus*, en la placa con agar sólido LB se hizo un tapete bacteriano por dispersión con perlas de vidrio con las respectivas bacterias, para ello se utilizaron 50 µL del inóculo

bacteriano previamente realizado como se describe en el apartado Preparación del inóculo, posteriormente se colocó un disco de papel filtro estéril de 0.5 mm de diámetro y un grosor de 0.2 mm; al disco se le agregaron 20 µl de la emulsión con miel al 12% y 20% respectivamente. Se incubaron durante 24h, se utilizó un control negativo al cual se le agregó agua desionizada estéril sobre el disco y un control positivo que fue un disco de ciprofloxacino Finalmente se midió el diámetro de inhibición (El-Kased et al., 2017).

12.7 Prueba de citotoxicidad

Se realizó una prueba de citotoxicidad con la finalidad de observar si el material elaborado tiene efectos adversos en las células, especialmente en los fibroblastos, ya que en esencia las pruebas de citotoxicidad ayudan a observar cualquier alteración en las funciones celulares básicas que pueda causar un tratamiento o nanomaterial emergente hacia una problemática específica, por ello la prueba se realiza en líneas celulares específicas (Kus-liśkiewicz et al., 2021).

La evaluación se realizó con base en el Cell Viability Assays - Assay Guidance Manual con algunas modificaciones (Riss et al., 2013).

12.7.1 Lavado y preparación de membranas

Se lavaron las películas elaboradas anteriormente para eliminar los residuos de ácido acético, para ello se utilizaron tres soluciones, una de NAOH al 0.1M, agua desionizada y etanol, las películas se expusieron a las soluciones durante 5 minutos en cada una, primero se pasó la película por NAOH al 0.1M, después agua desionizada y por último etanol, posteriormente la película se trasladó a cajas petri de 8 cm y se dejaron secando a temperatura ambiente.

Una vez secas, se cortaron en cuadrados de aproximadamente 5 mm x 5 mm y se esterilizaron con luz UV durante 20 min.

12.7.2 Preparación de medio

Se preparó 1L de medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) en polvo, al cual se le añadieron 3.7 g de carbonato sodio, se disolvió en agua desionizada estéril. Posteriormente se filtró con una bomba de vacío y se agregó 5% de penicilina como antibiótico. Se separó en alícuotas en tubos cónicos de 50 mL, el medio se suplementó con 10% de suero fetal bovino del volumen total (Ibrahim et al., 2021).

Se utilizó la línea celular ATCC 3T3-L1 de fibroblastos de ratón.

12.7.3 Pase de células

Una vez que se observó la confluencia del 80% se realizó el pase de células; primero se retiró el medio DMEM suplementado, después se añadió 1 mL de tripsina, se dejó incubar durante 5 minutos a 37 °C con 5% de CO₂, posteriormente se añadió medio suplementado con suero fetal bovino para inactivar la tripsina en relación 1:1, se homogenizó cuidadosamente y se vertió en tubos cónicos de 15 mL, se centrifugó a 800 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se homogenizó la pastilla de células en 1 mL de medio suplementado, después se dividió en dos cajas T a las cuales se les añadieron 0.5 mL de células y 4.5 mL de medio DMEM suplementado, finalmente se dejó en incubación a 37 °C con 5% de CO₂.

12.7.4 Preparación de experimento

Se utilizó una placa de 24 pozos estéril a la cual se le colocaron cuadrados de 0.5 mm c 0.5 mm de las películas a evaluar, sobre las películas se agregaron 2000 células 3T3-L1 de fibroblastos y medio de cultivo DMEM suplementado con suero. Se utilizó un control positivo, al cual solo se colocaron 2000 células por pozo de fibroblastos previamente cultivadas, se incubaron durante 24h y 72h, cada muestra se realizó por triplicado (Figura 6).

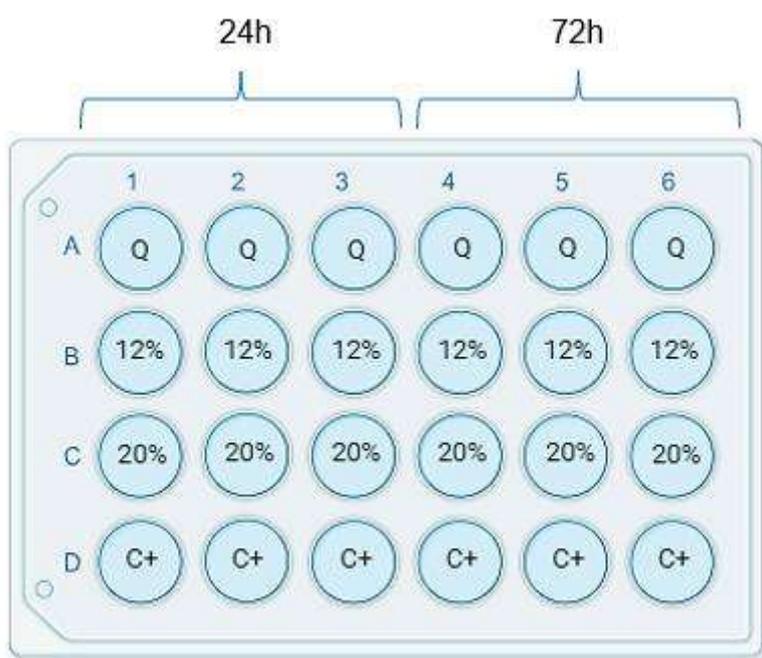


Figura 6. Esquema alusivo al arreglo de placa para la evaluación de citotoxicidad; película de quitosano+ TPP (Q), Q + 12% mie (12%)l y Q + 20% miel (20%).

12.7.5 Experimento de citotoxicidad

Luego de 24h de incubación se retiró el medio de las películas y el control, a cada pocillo se le colocaron 90 µL de medio + 10 µL de tetrazolio (MTT), posteriormente se incubó por 4h a 37 °C con 5% de CO₂. Una vez pasado el tiempo de 4h se retiró el medio y el MTT, después se agregaron 100 µL de

dimetilsulfóxido (DMSO) a cada pocillo, los 100 μ L se trasladaron a una placa de 96 pozos, una vez que todas las muestras se trasladaron a la placa se leyó en un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de 595 nm (Sarhan et al., 2016; Swellam et al., 2003).

Se obtuvo el porcentaje (%) de células metabólicamente activas con la siguiente fórmula (Bhattamisra et al., 2020):

$$\frac{DO \text{ muestra}}{DO \text{ control}(+)} \times 100 = \% \% \text{ Viabilidad celular}$$

13 Resultados y discusión

13.1 Análisis de espectroscopia de FTIR

En la siguiente figura se observó el enlace OH de la miel en 3306 cm^{-1} , mismo que también se observó en las muestras con quitosano; 2926 cm^{-1} de C-H, 1647 cm^{-1} de C-C y la señal más significativa de 1015 cm^{-1} que presentó mayor intensidad en la muestra de miel que representa enlaces C-O y estiramientos de enlaces C-H (Figura 7) dichas señales son características de la miel debido a la alta presencia de agua y azúcares en su composición (Tabla 2) (Cárdenas-Escudero et al., 2023).

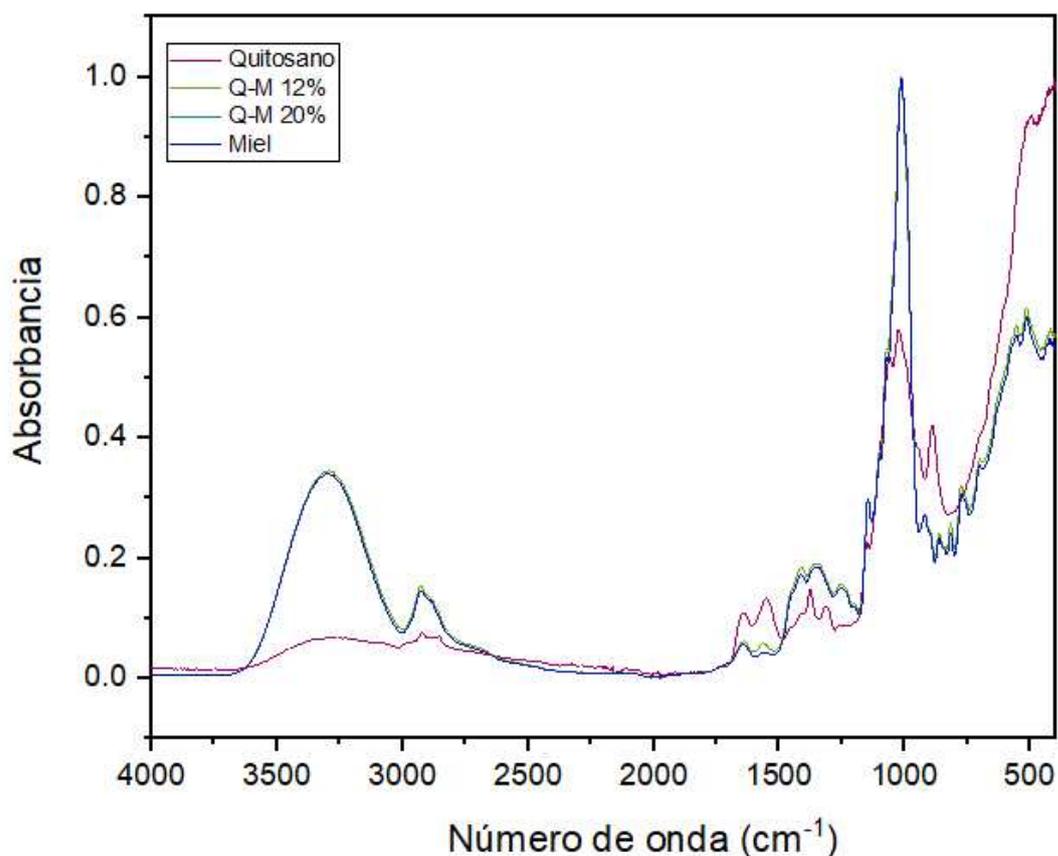


Figura 7. Evaluación FTIR de las películas base quitosano y miel pura.

Después de agregarse al quitosano, la intensidad de las señales disminuyó, el enlace en 2854 cm^{-1} de C-H del quitosano se perdió después añadir la miel y el enlace en 1647 cm^{-1} de C=O, 1026 cm^{-1} de OH y 819 cm^{-1} de un grupo amino disminuyeron la intensidad al contrario de los enlaces en 1376 cm^{-1} de CH_3 y 1316 cm^{-1} de O-H aumentaron de intensidad y mostraron mayor absorbancia (Tabla2), por lo que dado los resultados se puede inferir que los enlaces que se conservaron fueron grupos OH y C-H tanto de la miel como del quitosano aunque no en la misma intensidad, por lo que se especula absorben mayor energía (Cárdenas-Escudero et al., 2023; Chen et al., 2015; Kosimaningrum et al., 2020; Manimaran et al., 2022).

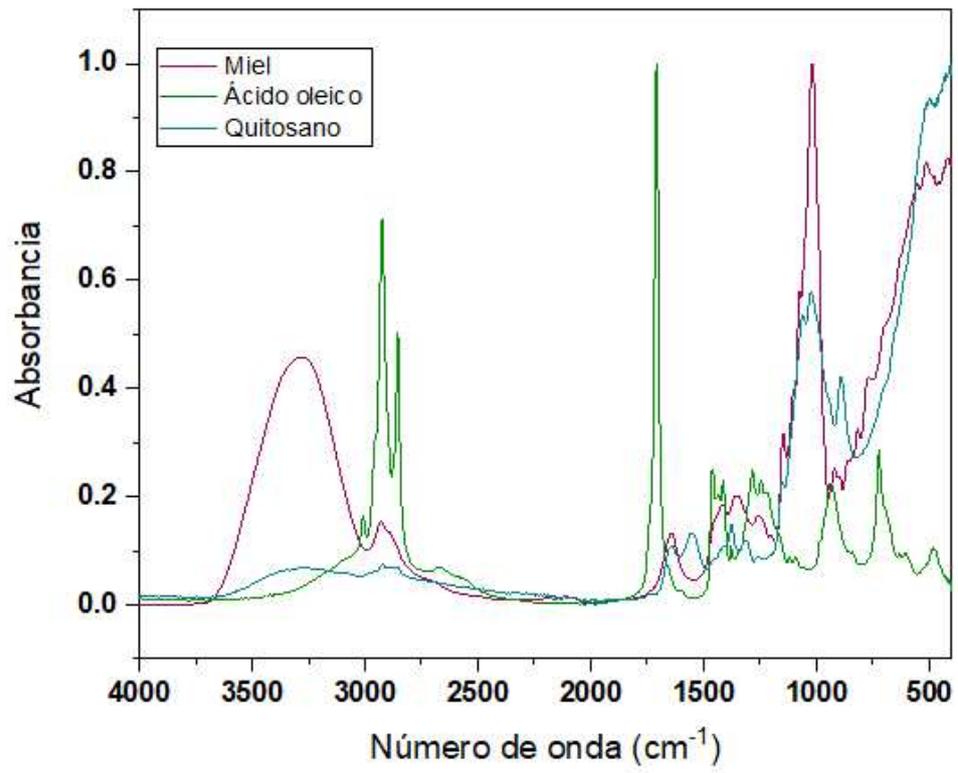
Tabla 2. Señales obtenidas del quitosano, miel y las muestras con 12% y 20% miel.

	Quitosano	Q-M 12%	Q-M 20%	Miel
OH		3306	3306	3306
C-H	2926	2926	2926	2926
	2854			
C=O	1647	1647	1647	
C-C				1641
COO	1560	1562	1562	1562
CH₂		1416	1416	1416
CH₃	1376			
	1316			
OH	1152			

C-O / C-H	1026	1015	1015	1015
C-H aromático		921	921	921
N-H	819	818	818	
H aromático		863	863	863
C≡C		700	700	700
C		517	517	517

En Figura 8 A se observaron las señales representativas de la miel, ácido oleico y quitosano, respecto al ácido oleico se observaron los enlaces característicos en 3011 cm^{-1} de C-H, 2924 cm^{-1} y 2854 cm^{-1} de C-H además, fue visible el doble enlace de C=O en 1705 (Vizcarra-Pacheco et al., 2021).

A)



B)

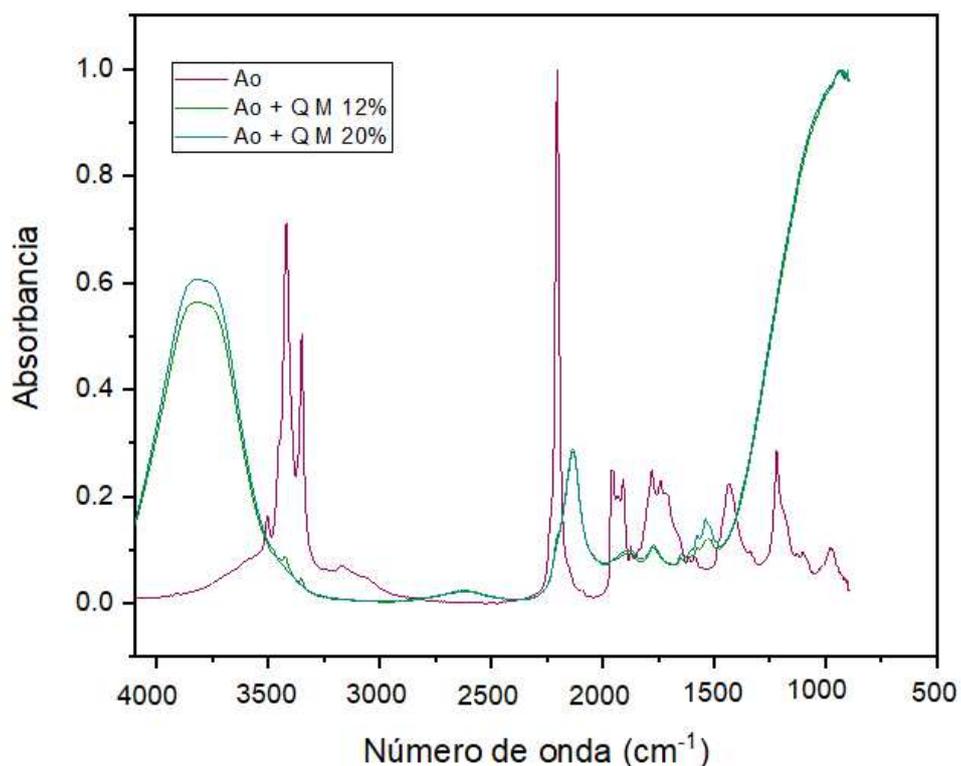


Figura 8. Evaluación FTIR de la miel pura, Q, y AO (A); AO, Q 12% + AO y Q 20% + AO (B).

Después de agregarse las partículas de quitosano/miel se observó la pérdida de las señales por debajo de 1284 cm^{-1} en el ácido oleico, el quitosano perdió la señal en 819 cm^{-1} correspondiente al grupo amino, la miel perdió la señal del grupo OH en 3306 cm^{-1} y grupos C-H por debajo de 1800 cm^{-1} , además, apareció una señal en 1891 cm^{-1} , tres señales entre 2840 cm^{-1} y 2960 cm^{-1} en ambas muestras con quitosano/miel lo cual indica la presencia de C-H (Tabla 2, Tabla 3). Los picos correspondientes a dichas señales son bajos, por lo que se infiere que existió una mayor absorción de energía (Imagen 8 B) (Cárdenas-Escudero et al., 2023; Manimaran et al., 2022; Vizcarra-Pacheco et al., 2021).

Tabla 3. Señales obtenidas del ácido oleico y las muestras base quitosano con 12% y 20% miel.

	Ácido oleico	Ao + Q-M 12%	Ao + Q-M 20%
C-H	3011	2970	2959
	2924	2923	2923
	2854	2849	2849
	2676		
C=O	1705		
C-H alifático		1891	1891
OH	1284		
	1245		
C-H	937		
	724		

13.2 Evaluación antibacteriana de películas de quitosano/miel

El efecto o actividad antibacteriana es un fenómeno que está asociado al crecimiento bacteriano por ello entre mayor sea el porcentaje del efecto o actividad antibacteriana significa que el crecimiento de la bacteria fue mínimo o nulo en presencia de algún material con propiedades antibacterianas (Hernández-Orozco et al., 2022)

En *P. aeruginosa* el efecto antibacteriano de las películas de quitosano + TPP 0.2% fue mínimo, en 1h fue de 25% y en 24h de 40%, el efecto máximo se observó a las 3h con un 62.7% de actividad lo cual es indicio de que el crecimiento bacteriano se redujo; así mismo, las películas de quitosano miel, mostraron mayor efecto antibacteriano ya que la película de quitosano + TPP 0.2% + 12% de miel tuvo un efecto mayor al 90% en los tres tiempos evaluados, la película de quitosano + TPP 0.2% + 20% de miel tuvo efecto bactericida a 24h de contacto por ello se puede inferir que cuanto mayor fue el tiempo de contacto entre la bacteria y la película mayor es el porcentaje de actividad antibacteriana (Figura 9), además es posible que la muerte bacteriana se le atribuyera a las propiedades intrínsecas del quitosano, principalmente la interacción de cargas con la pared bacteriana y la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por parte de la miel (Kosimaningrum et al., 2020; Yupanqui Mieles et al., 2022).

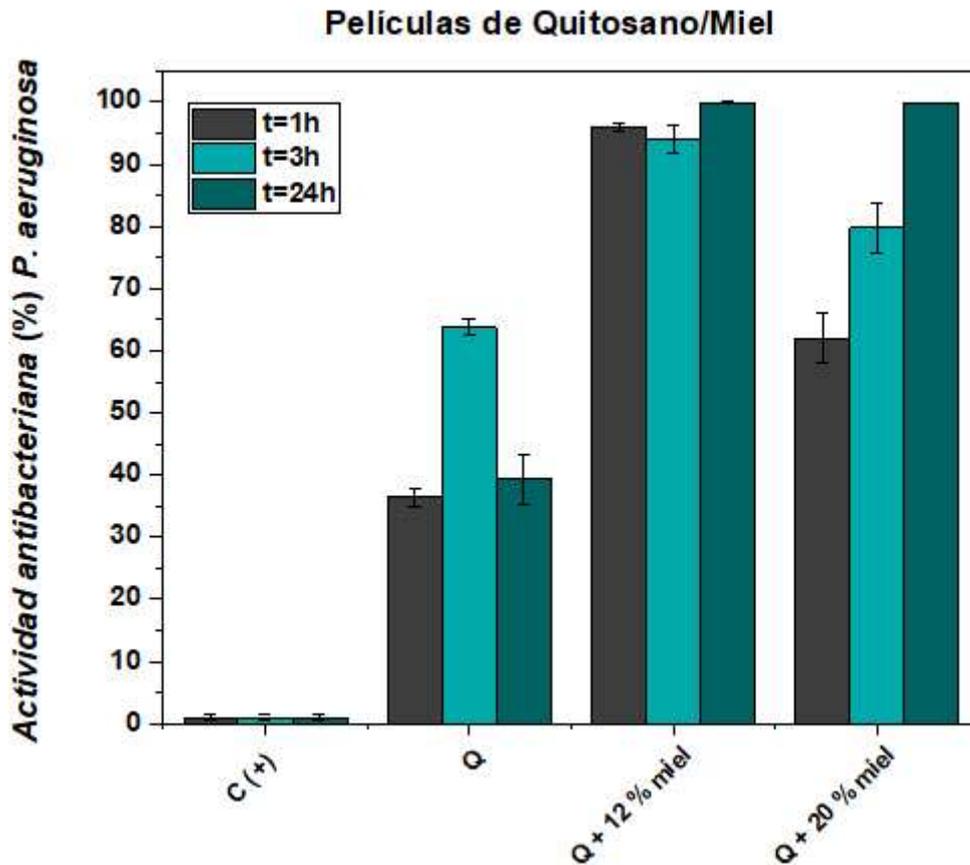


Figura 9. Actividad antibacteriana de las películas a base quitosano/miel evaluadas contra *P. aeruginosa*.

En las gráficas se pudo observar que el efecto antibacteriano aumentó cuando la miel es recubierta por quitosano (Figura 9, figura 10), contra *S. aureus* se logró identificar un efecto bactericida aproximadamente del 99.9% en los tres tiempos, sin embargo, en la película de quitosano + TPP se vio que a las 3h el efecto disminuyó al 89%. Los resultados obtenidos tienen un comportamiento similar al experimento realizado por Wessam A y colaboradores donde se probó una combinación de miel quitosano la cual mostró una inhibición total del crecimiento y formación de biopelículas de bacterias Gram-positivas, principalmente de *S. aureus* y *S. aureus* resistente a meticilina (Sarhan et al., 2016)

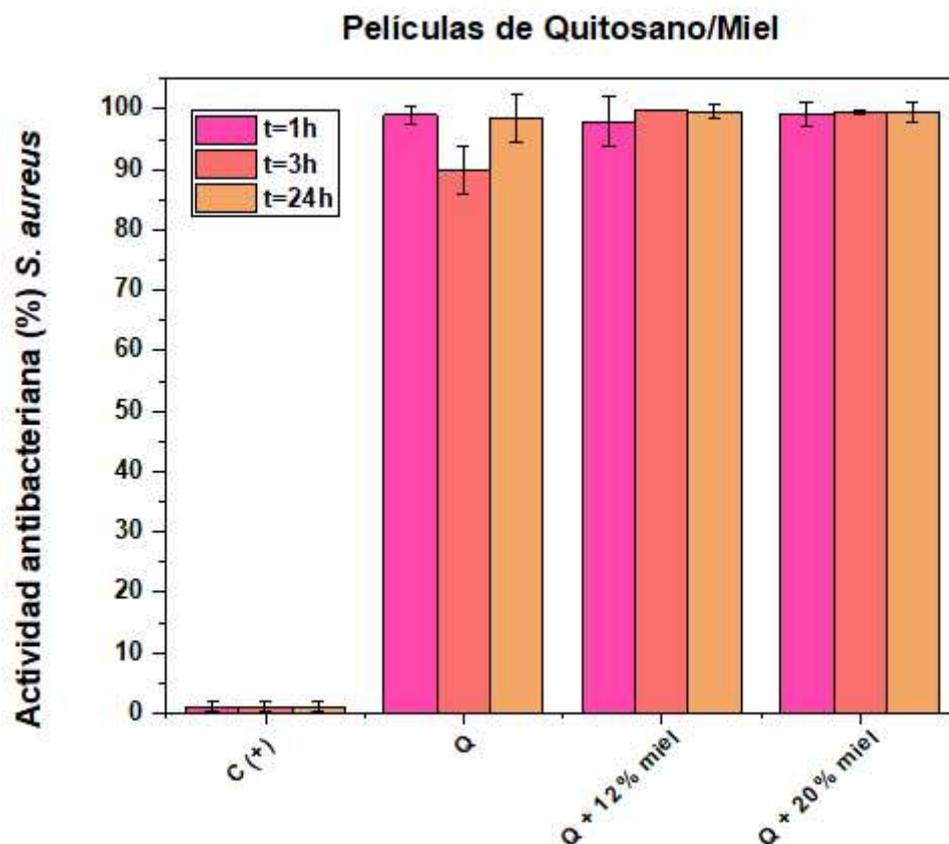


Figura 10. Actividad antibacteriana de las películas a base quitosano/miel evaluadas contra *S. aureus*.

El comportamiento de las bacterias contra el material es diferente debido a que *P. aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa, la cual posee una membrana externa con propiedades hidrofílicas y una membrana citoplasmática compuesta por fosfolípidos, lipoproteínas y lipopolisacáridos (Matica et al., 2019). Por otro lado, *S. aureus* es una bacteria Gram-positiva, que tiene una pared compuesta principalmente de peptidoglicanos; estas diferencias influyen en cómo interactúa la película a base de quitosano con la membrana bacteriana (Ardean et al., 2021)

En las bacterias Gram-negativas el daño se le puede atribuir a los componentes aniónicos presentes en la membrana extracelular y los grupos amino protonados del quitosano que afectan la permeabilidad de la membrana externa y

posteriormente a la membrana interna. Por otro lado, en las bacterias Gram-positivas la interacción con el quitosano forma una membrana polimérica en la superficie sobre la membrana de peptidoglucanos, por ello al tener solo una membrana sin importar el grosor el quitosano es capaz de bloquear las bombas de flujo, impidiendo el paso de nutrientes (Ardean et al., 2021).

13.3 Evaluación antibacteriana de la miel

En la gráfica se observó que la concentración más efectiva fue la de miel al 20% ya que aumentó de 46% en 1h a 83% en 3h de exposición (Figura 11), sin embargo, a 24h disminuyó el efecto hasta un 5.6%; en la concentración de 12% se vio una actividad de 51% y 64%, en exposición de 1h y 3h respectivamente pero a las 24h se redujo a 17%, esto debido a que la miel presenta mayor actividad en tiempos cortos, después de ese tiempo la bacteria posiblemente comenzó a recuperarse del daño y siguió con la replicación bacteriana (Combarros-Fuertes et al., 2020).

En un estudio realizado por Jing Lu y colaboradores, se observó el crecimiento y la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* en presencia de diferentes concentraciones de miel de Manuka, donde se observó que a partir de una concentración de miel al 8% se comenzó a ver un efecto bactericida y una reducción del crecimiento, además en una concentración de 32% la formación de biopelículas y crecimiento bacteriano se redujo en su totalidad (Lu et al., 2019)

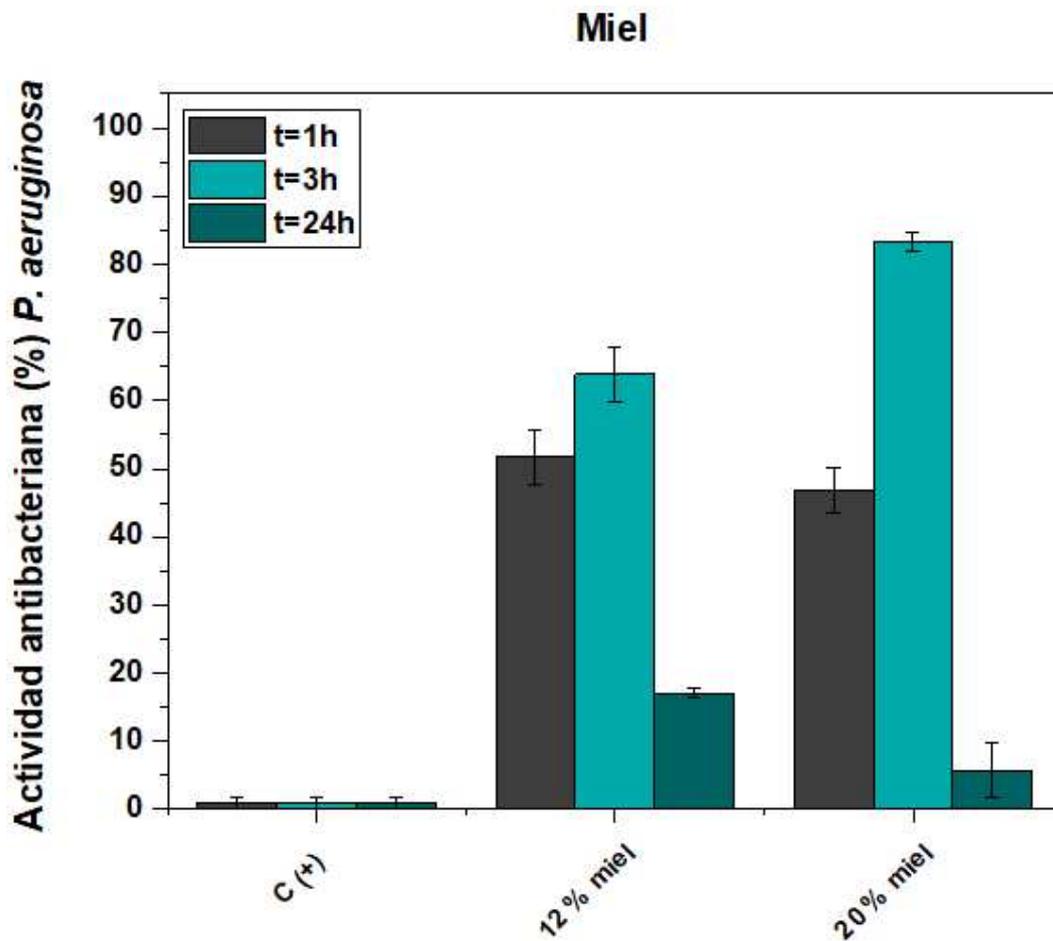


Figura 11. Actividad antibacteriana de la miel evaluada a dos concentraciones 12% y 20%, contra *P. aeruginosa*.

También se puede resaltar que desde los primeros 30 minutos de exposición contra la miel, la bacteria comenzó a sufrir alteraciones en la pared bacteriana y fue perdiendo integridad por ello desde la primera hora se vio un crecimiento menor al 50% (Figura 11) además se observó que a las 3h de exposición contra la miel pura alcanzó su efecto máximo, pasado ese tiempo la bacteria tuvo una recuperación y comenzó a tener mayor crecimiento (Combarros-Fuertes et al., 2020).

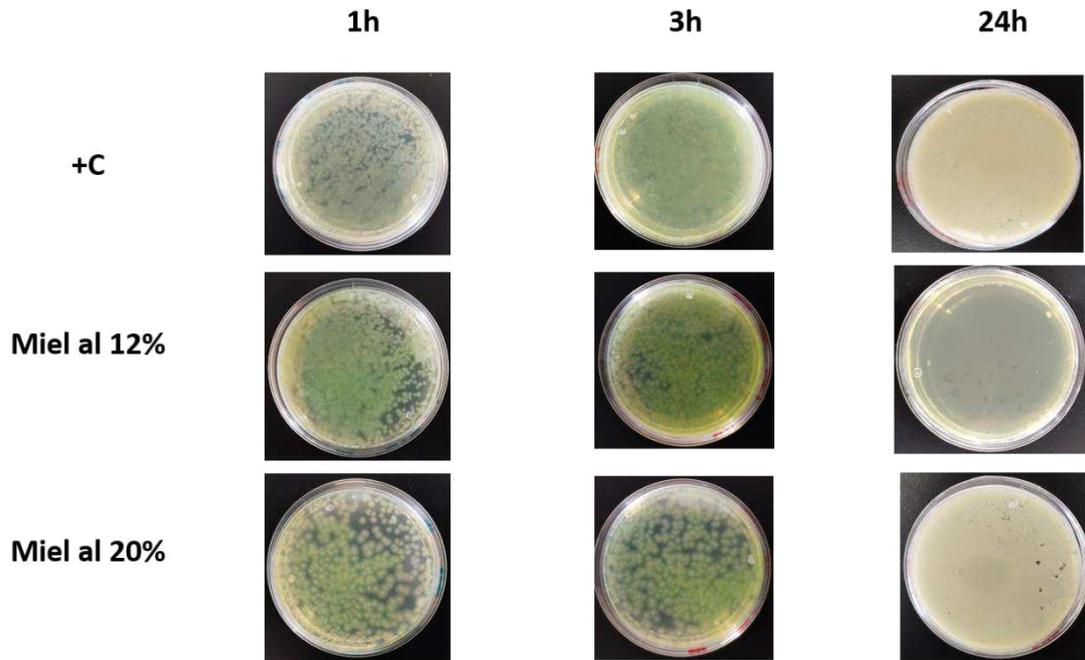


Figura 12. Representación visual del crecimiento de *P. aeruginosa* contra la miel pura.

En la figura 12 se puede observar el crecimiento de *P. aeruginosa*, donde a 1h y 3h las colonias presentaron pigmentación verdosa, la cual es un indicio de la presencia de piocianina, una feniacina producida por esta bacteria como respuesta al estrés oxidativo producido por H_2O_2 , en cambio, a 24h no fue visible la presencia de piocianina lo cual indica que la miel ya no causó estrés sobre la bacteria (Thees et al., 2021), en un estudio realizado por Auliya Amly y colaboradores se reportó que 12% de miel indujo a una mayor producción de piocianina (Amly et al., 2021), fenómeno que se observó al exponer a la bacteria en contacto con la miel a 1h y 3h (Figura 12).

En la gráfica se observó que la miel no posee actividad contra *S. aureus* en una concentración de 12%, en cambio con 20% la actividad aumentó de 26.3% en

1h a 75% a 3h, sin embargo, la actividad disminuyó a las 24h a un 10% (Figura 12).

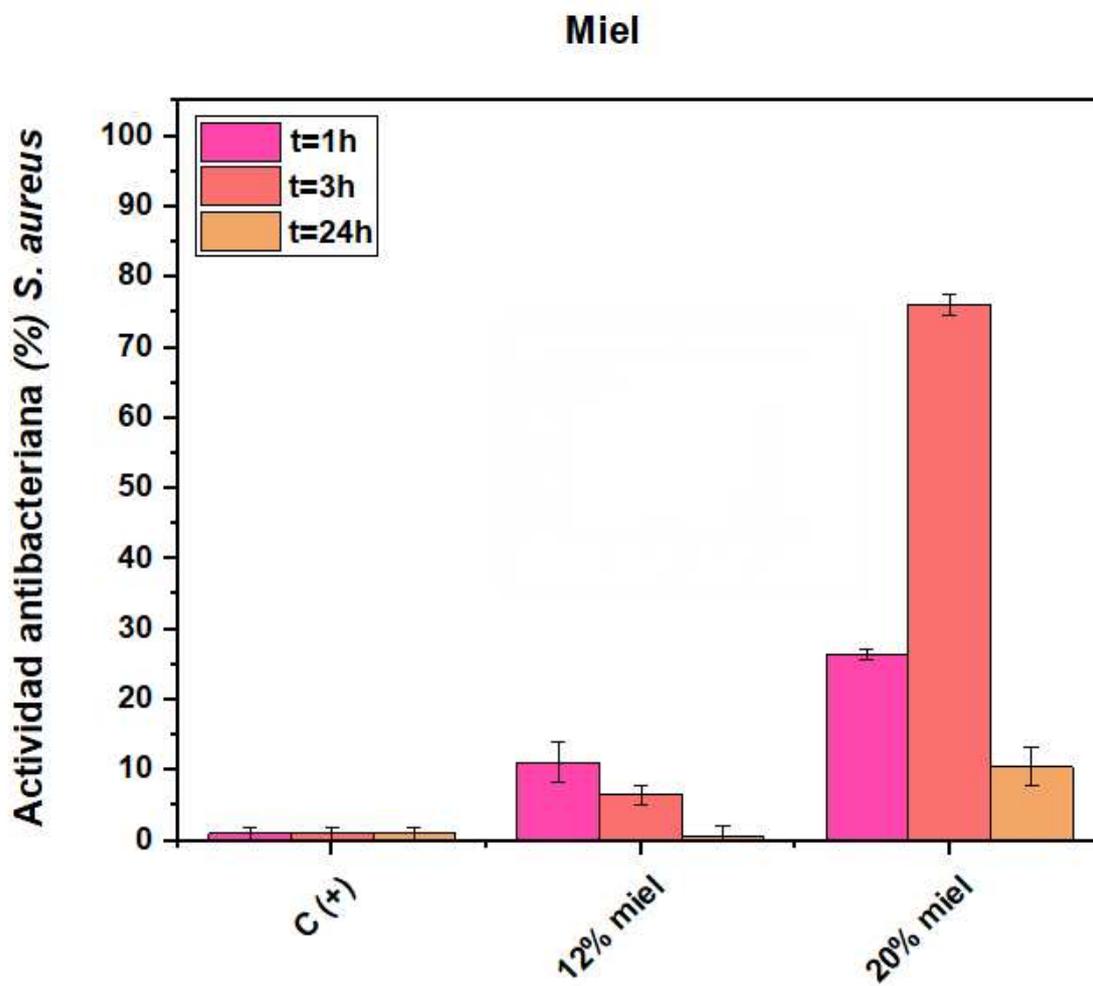


Figura 13. Actividad antibacteriana de la miel evaluada a dos concentraciones 12% y 20%, contra *S. aureus*.

Con base en los resultados obtenidos se observó que la miel si es capaz de causar daño a la pared bacteriana, en la figura 14 se puede observar el crecimiento de *S. aureus*, cuando la bacteria se expuso a la miel por un periodo de 3h la miel tuvo efecto en la disminución del crecimiento en concentraciones entre 10% a 20%, no obstante, la bacteria fue capaz recuperase de ese daño a

24h, según lo reportado por Combarros y colaboradores (Combarros-Fuertes et al., 2020).

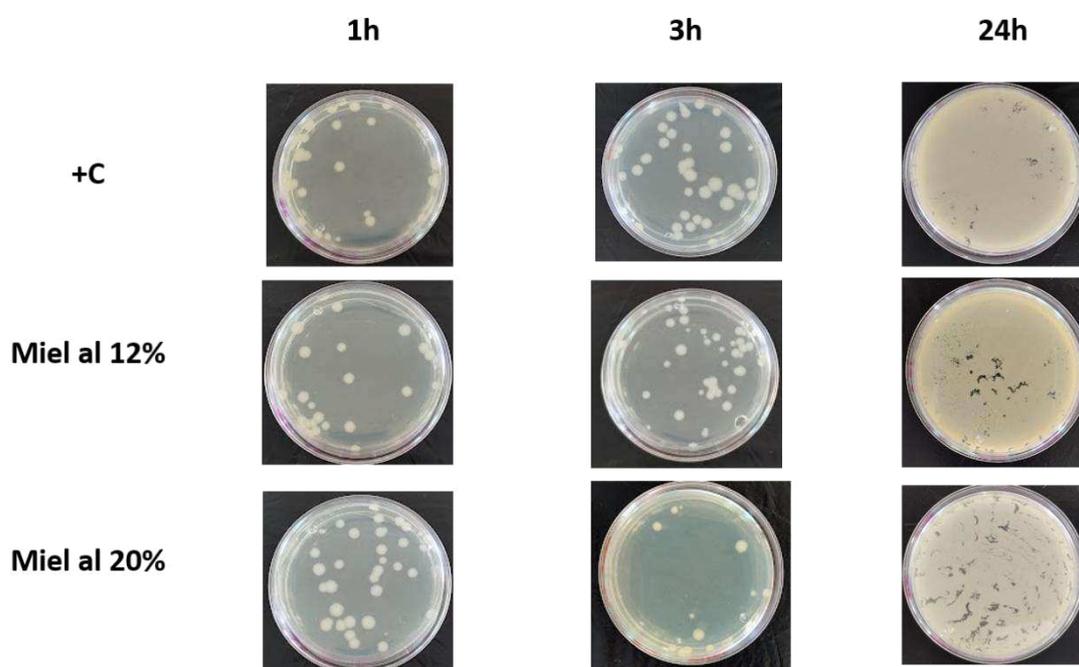
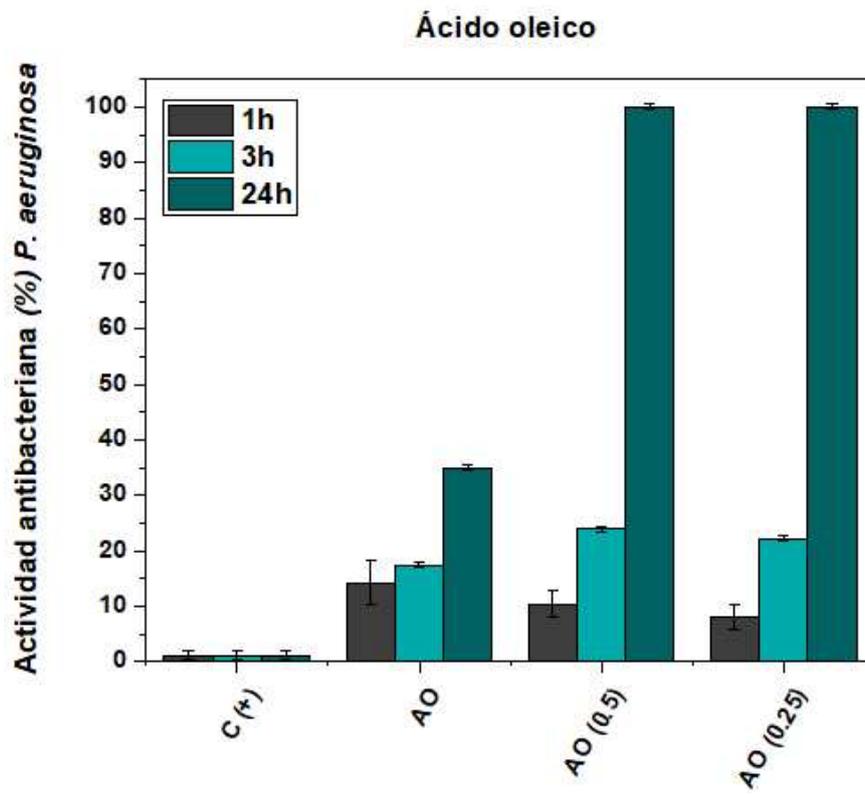


Figura 14. Representación visual del crecimiento de *S. aureus* contra la miel pura.

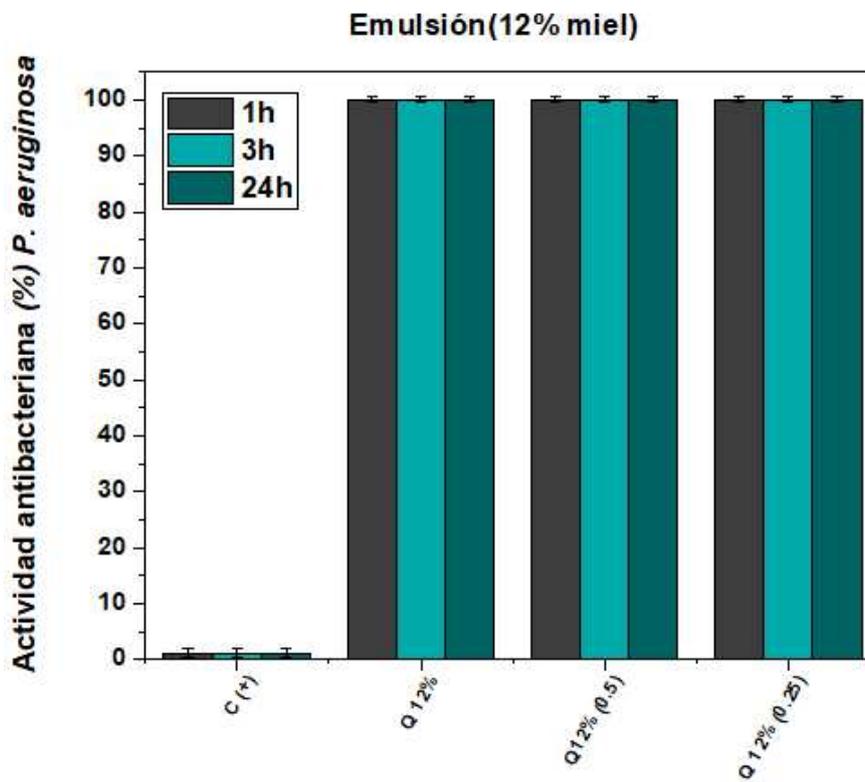
13.4 Evaluación antibacteriana de la emulsión

Con el sistema de emulsión la actividad antibacteriana aumentó (Figura 15), sin embargo el ácido oleico puro en la concentración más alta presentó una actividad por debajo del 35% en los tres tiempos contra *P. aeruginosa* (Figura 15 A), en la concentración 0.5 y 0.25 presentó actividad mayor a 24h ya que no se observó crecimiento alguno debido a que el ácido oleico interfiere con la permeabilidad de la membrana (Figura 15 B, C), así mismo, es capaz de separar los compartimentos citoplasmáticos en la pared celular (Figura 13 A) (Borboa-Flores et al., 2010; Castañón-Viveros et al., 2019).

A)



B)



c)

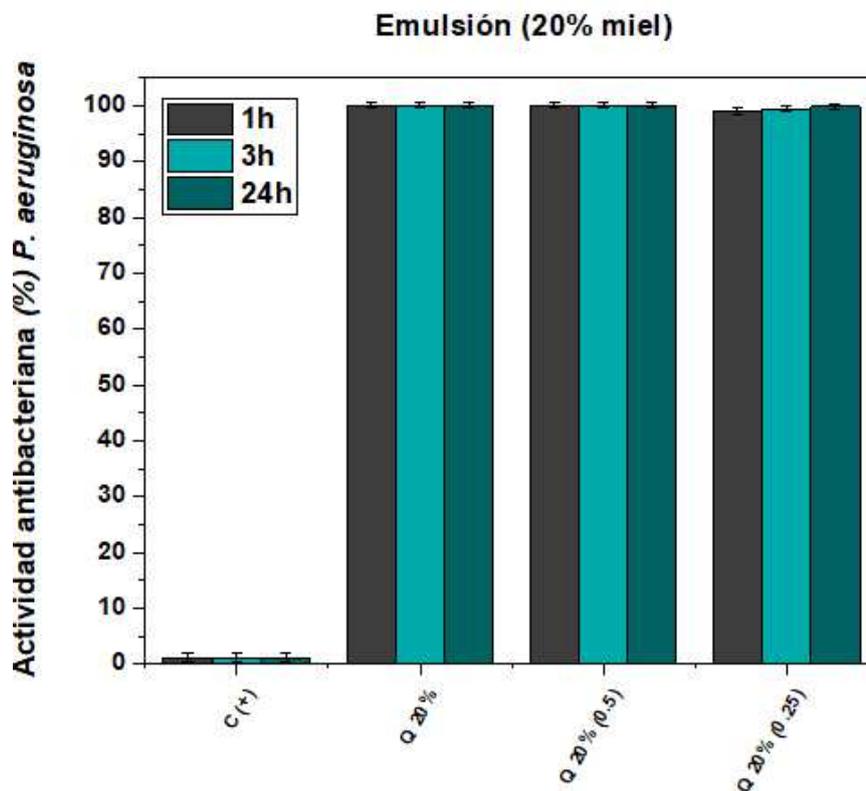
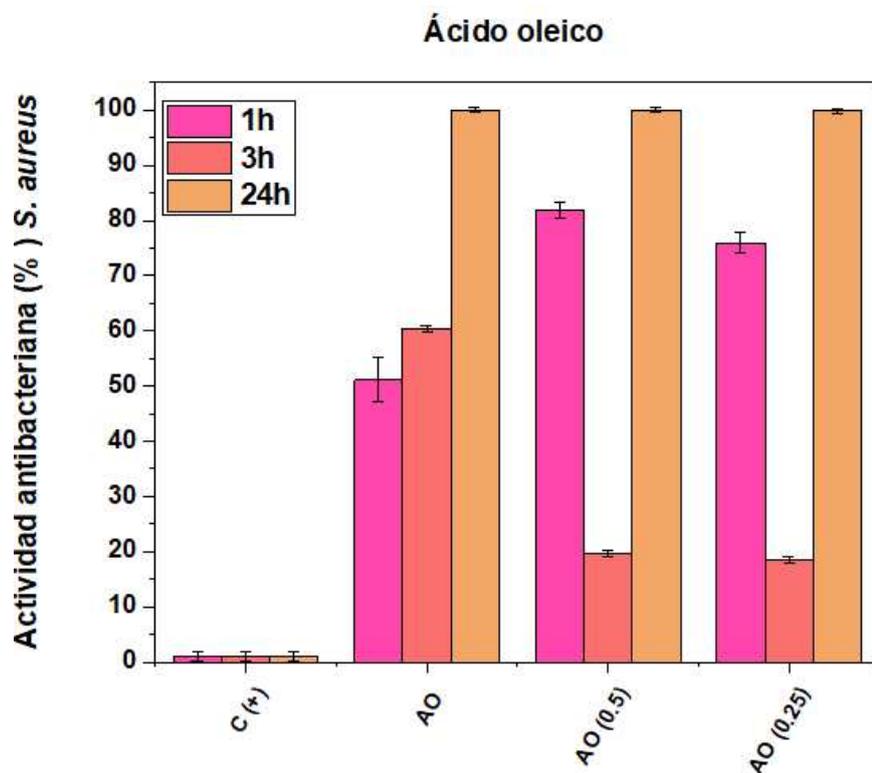


Figura 15. Actividad antibacteriana del ácido oleico (A), la emulsión con 12% (B) y 20% miel (C) contra *P. aeruginosa*.

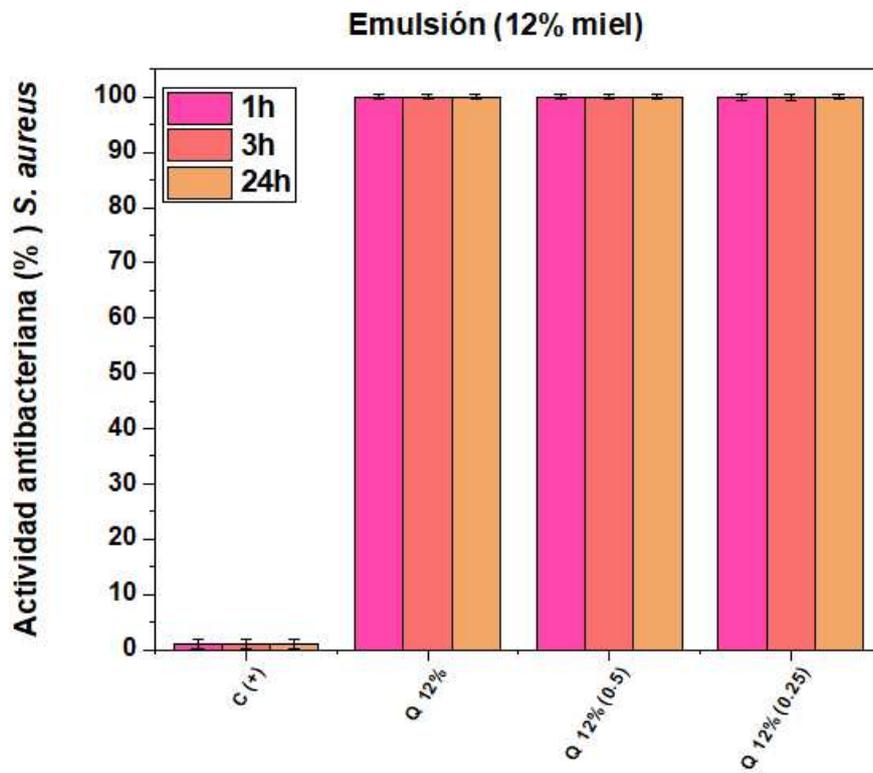
Como se observa en la figura 15 (B,C), en conjunto el ácido oleico y las partículas base de quitosano-/miel en concentraciones de 12% y 20% respectivamente tuvieron una efectividad bactericida del 99.9% en los tiempos tres tiempos evaluados y en las concentración de 1%, la dilución de 0.5% y 0.25% este efecto puede ser debido a las interacciones del quitosano/miel y ácido oleico con la pared bacteriana ya que pueden llegar a causa alteraciones en la pared de ambas bacterias y membrana externa en el caso de *P. aeruginosa* causando disfunción en la permeabilidad y la integridad de la bacteria (Ardean et al., 2021; Castañón-Viveros et al., 2019; Masoura et al., 2020; Verlee et al., 2017).

Particularmente en *S. aureus* el sistema de emulsión tuvo una efectividad del 99.9%, el crecimiento bacteriano se inhibió en los tres tiempos evaluados con 12% y 20% de miel respectivamente (Figura 16 B,C) e inclusive el ácido oleico perseo después de 24h mostró 98% de actividad después del contacto con la bacteria (Figura 16 A), este efecto fue reportado por Castañón-Viveros y colaboradores, donde observaron que *S. aureus* tiene mayor susceptibilidad al ácido oleico ya que modifica el ambiente y lo hace hidrofóbico, por lo que al tener solo la pared bacteriana compuesta principalmente de peptidoglicanos es más susceptible a sufrir daños, también observaron que el ácido oleico puede separar los compartimentos citoplasmáticos (Borboa-Flores et al., 2010).

A)



B)



C)

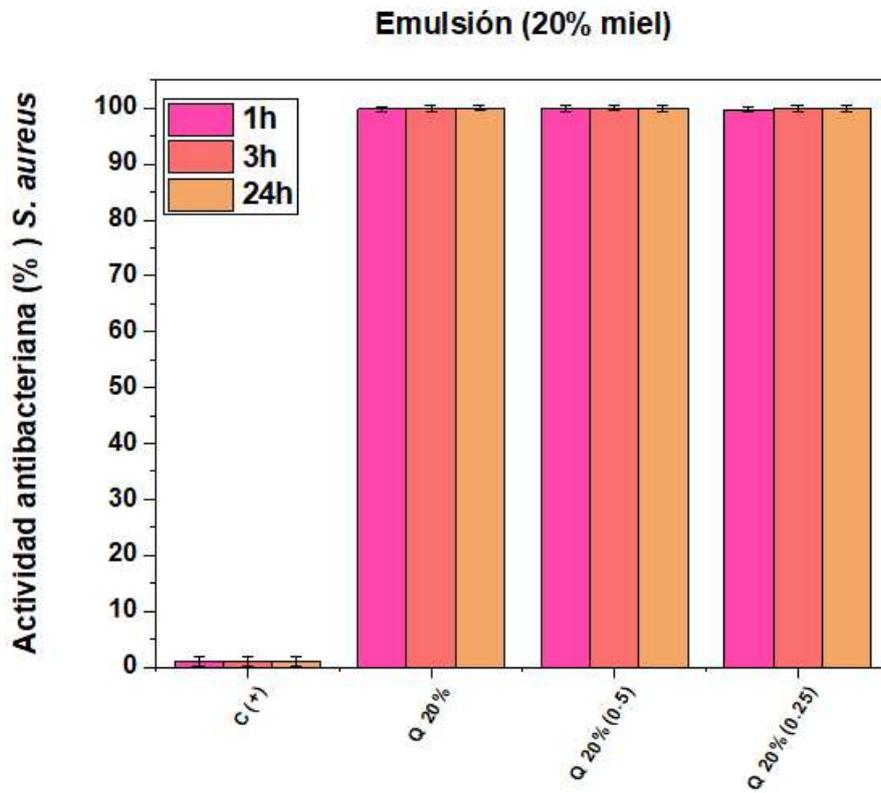


Figura 16. Actividad antibacteriana del del ácido oleico (A), la emulsión con 12% (B) y 20% miel (C) contra *S. aureus*.

13.5 Prueba de tolerancia

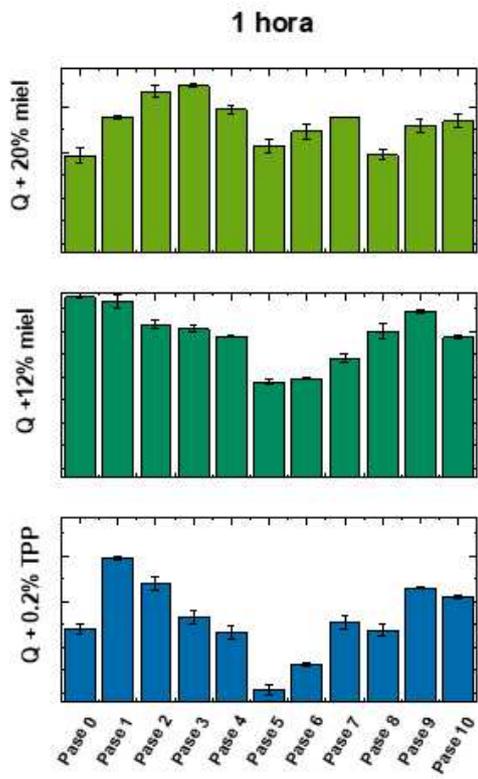
Se observó que del pase 0 al pase 2, el quitosano solo mostró una actividad antibacteriana entre 36% y 76% a 1h de exposición, en 3h de 60% a 80% (Figura 17 A, B), a partir del pase 3 la actividad fue decreciendo en la exposición de 1h y 3h, a 24h la actividad del quitosano contra la bacteria fue baja desde los primeros pases (Figura 17), las fluctuaciones en la eficacia de quitosano contra la bacteria se le puede atribuir a la interacción de cargas, carga positiva por parte del quitosano y carga negativa de la membrana externa de *P. aeruginosa* (Ardean et al., 2021; Verlee et al., 2017). sin embargo, en el pase 4 se vio un aumento de la actividad lo cual indica que la bacteria sufrió daño en la membrana, dado que el quitosano tiene la capacidad de bloquear los canales iónicos y afectar la permeabilidad de la membrana causando a la bacteria lisis celular (Ardean et al., 2021; Matica et al., 2019).

En la evaluación de las películas de quitosano/miel al 12% en una exposición de 1h el pase 0 y pase 1 mostraron la actividad bactericida más alta de 97.5% y 95.1% respectivamente, posteriormente disminuyó presentando el porcentaje más bajo en el pase 5 con 49%, fenómeno que se le puede atribuir a que la bacteria posiblemente se recuperó del daño (Combarros-Fuertes et al., 2020), finalmente en el pase 10 presentó una actividad del 74.5% (Figura 17 A). A 3h se observó que la actividad tuvo una tendencia constante puesto que fue en aumento del pase 0 al pase 4, no obstante, en el pase 5 se presentó una disminución de 95.4% a 77.1%, aumentó nuevamente en el pase 6 a 90.8% y a partir del pase 7 hubo aumentos y descensos de la actividad (Figura 17 B), lo cual se le puede atribuir a que la bacteria comenzaba a generar tolerancia, dado

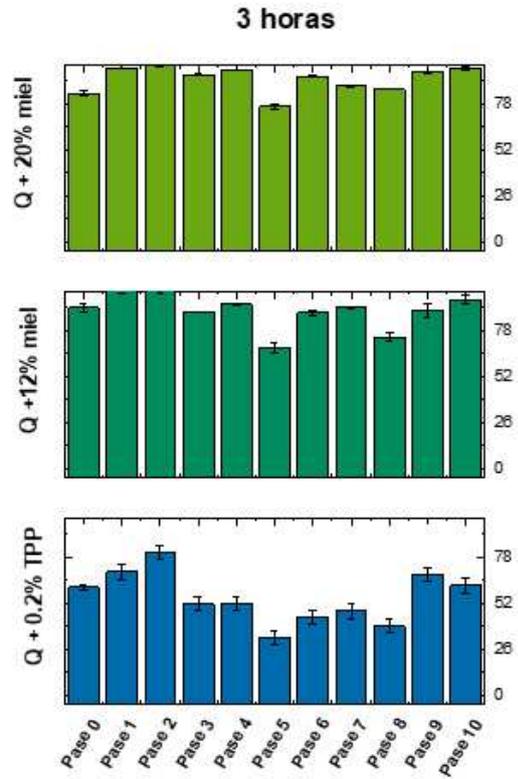
que la tolerancia se define como la habilidad de sobrevivir con un mínimo de crecimiento en presencia de antibióticos (Murakami et al., 2017).

En 24h sucedió un fenómeno similar al que se presentó a 1h y 3h, puesto que los primeros pases tuvieron una actividad alta por encima del 90% en la muestra con miel al 20%, en el pase 5 hubo una ligera disminución a 82.8% de la actividad pero en el pase 6 incrementó a un 93.5% y se mantuvo constante hasta el pase 10 donde alcanzó una actividad bactericida del 99.9% (Figura 17 C), con ello se puede inferir que la bacteria comenzaba a generar mayor tolerancia hasta el pase 6 (Boeck, 2023), no obstante, después del pase 7 la bacteria sufrió mayor daño gracias a las propiedades antibacterianas que posee el quitosano afectando la permeabilidad de la pared por medio de la interacción de cargas y la miel debido a la generación de especies reactivas de oxígeno por medio de la formación de H₂O₂ (Ardean et al., 2021; Masoura et al., 2020; Oliveira et al., 2018). En las muestras con 12% de miel, se observó que el pase 5 y pase 7 mostraron una actividad antibacterial menor en comparación de los demás, ya que fueron del 77% y 68.3% respectivamente lo que es posible que ocurra porque la bacteria tuvo una recuperación o comenzaba a generar mayor tolerancia al material (Boeck, 2023; Combarros-Fuertes et al., 2020), sin embargo, en los demás pases la actividad fue mayor a 90% siendo el pase 9 y 10, el que mostró mayor efectividad contra *P. aeruginosa*, lo cual es un indicio de que a la bacteria sigue siendo susceptible al tratamiento de quitosano/miel (Murakami et al., 2017).

A)



B)



C)

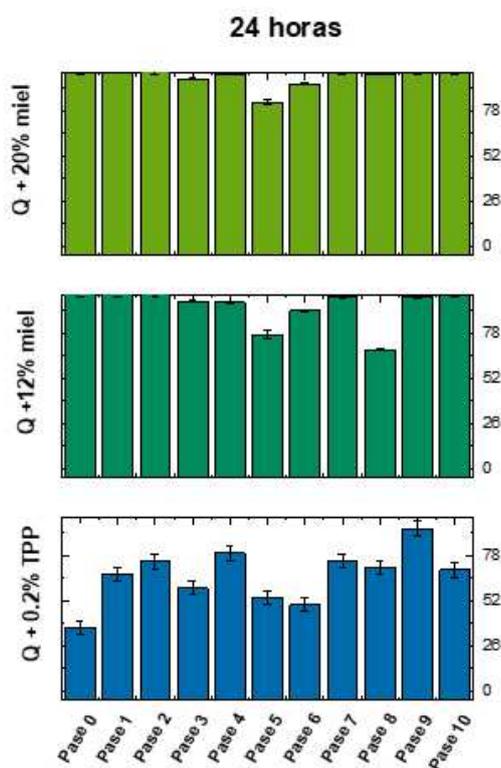


Figura 17. Representación gráfica de la actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* presentada contra las películas base quitosano/miel, Q, Q + 12% y Q + 20%1 hora A), 3 horas B) y 24 horas C), a 10 pases.

En lo reportado en la literatura por Jing Lu y colaboradores se observó que la miel de Manuka en concentraciones de 16% y 32% ayuda a prevenir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* después de la exposición de 24h (Lu et al., 2019), sin embargo, en combinación con el quitosano el efecto antibacteriano puede aumentar e inhibir el crecimiento de la bacteria, que por ende evita la formación de biopelículas efecto que se observó en la exposición de la bacteria contra las películas elaboradas con quitosano/miel al 12% y 20%, sin embargo, después de una exposición de 10 pases la bacteria puede llegar a generar tolerancia en concentraciones de miel por debajo del 20% (Murakami et al., 2017).

13.6 Prueba de antibiograma

Se midió el halo de inhibición que presentaron *P. aeruginosa* y *S. aureus* contra el sistema de emulsión quitosano/miel + ácido oleico. El halo en *S. aureus* fue de 11 mm para el sistema con 12% miel y 12.3 mm para el de 20%. En *P. aeruginosa* el halo presentó un diámetro mayor en la concentración con 12% miel el halo fue de 14.3 mm y con 20% de miel presentó un halo de 15.6 mm, el diámetro del halo en ambas concentraciones de miel fue menor al que presentaron con el control positivo de antibiótico (ciprofloxacino) (Figura 18).

Tabla 4. Tabla con las medidas del diámetro promedio que presentó *P. aeruginosa* y *S. aureus*.

	Ciprofloxacino	Q + TPP 0.2% + 12% miel + Ac. Oleico 1%	Q + TPP 0.2% + 20% miel + Ac. Oleico 1%
<i>P. aeruginosa</i>	± 42 mm	± 14.3 mm	± 15.6 mm
<i>S. aureus</i>	± 28 mm	± 11 mm	± 12.3 mm

Se pudo observar que ambas cepas son susceptibles al tratamiento a base quitosano/miel + ácido oleico, en ambos casos las bacterias presentaron mayor susceptibilidad con la emulsión que tiene mayor porcentaje de miel (Tabla 4). Por ello se infiere que las propiedades de la miel aumentaron la eficacia antibacteriana del quitosano puesto que por sí solo el quitosano, presentó una

actividad menor que en conjunto, además la capacidad del ácido oleico de modificar el ambiente y volverlo hidrofóbico ayudó a inhibir el desarrollo de la bacteria (Castañón-Viveros et al., 2019; Hedayatyanfard et al., 2019; Kosimaningrum et al., 2020; Matica et al., 2019).

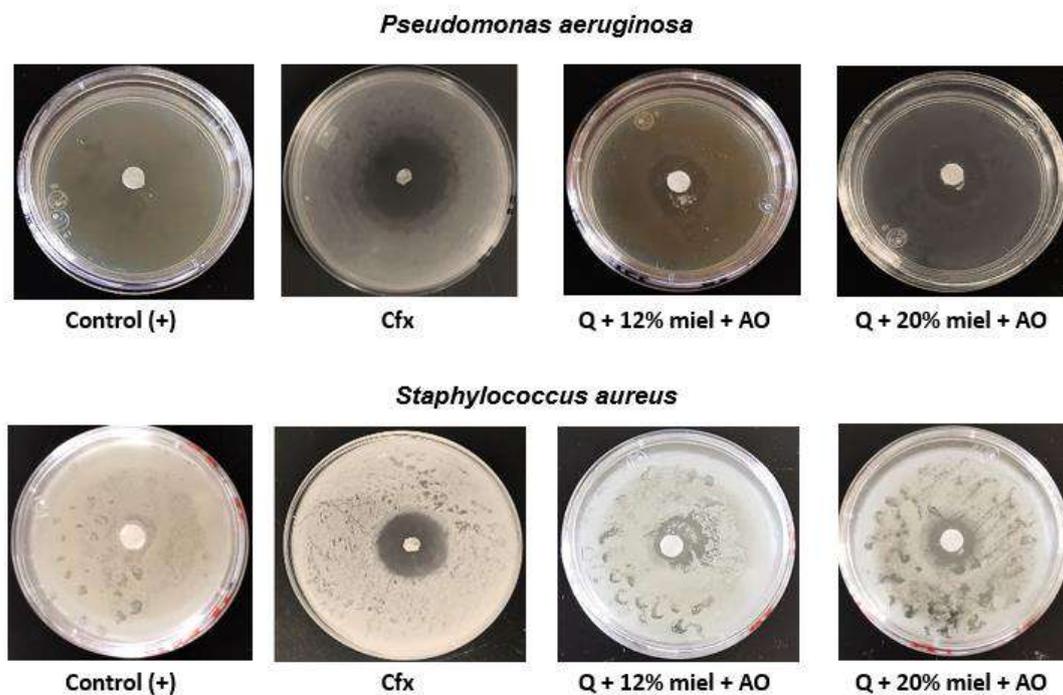


Figura 18. Representación visual de los antibiogramas contra *P. aeruginosa* (línea superior), *S. aureus* (línea inferior).

13.7 Prueba de citotoxicidad

Las células metabólicamente activas tienen la capacidad de reducir MTT a formazán, por ende, cuando las células mueren pierden esa capacidad (Riss et al., 2013), dado esto, en la siguiente gráfica se observó que las células vivas fueron metabólicamente activas a 24h de exposición a las películas de quitosano obteniendo un 65.85% de células vivas (Figura 19). La película de quitosano/miel 12% mostró un 63.15% lo cual indica que ambas películas son

biocompatibles y no tienen efecto tóxico sobre las células, sin embargo, la película de quitosano/miel 20% presentó mayor porcentaje de células vivas en comparación al control positivo, ya que fue de 116.22%, en este caso se puede inferir que el material fue biocompatible y además promovió la proliferación celular, fenómeno que fue reportado por Salva y colaboradores, donde especulan que la proliferación fue el resultado de la concentración de miel contenida en la película, puesto que a mayor concentración de miel observaron proliferación celular, dicho fenómeno también se puede atribuir a los nutrientes presentes en la miel, su alto contenido en agua y azúcares (Figura 19) (Ibrahim et al., 2021; Şalva et al., 2023; Yupanqui Mieles et al., 2022).

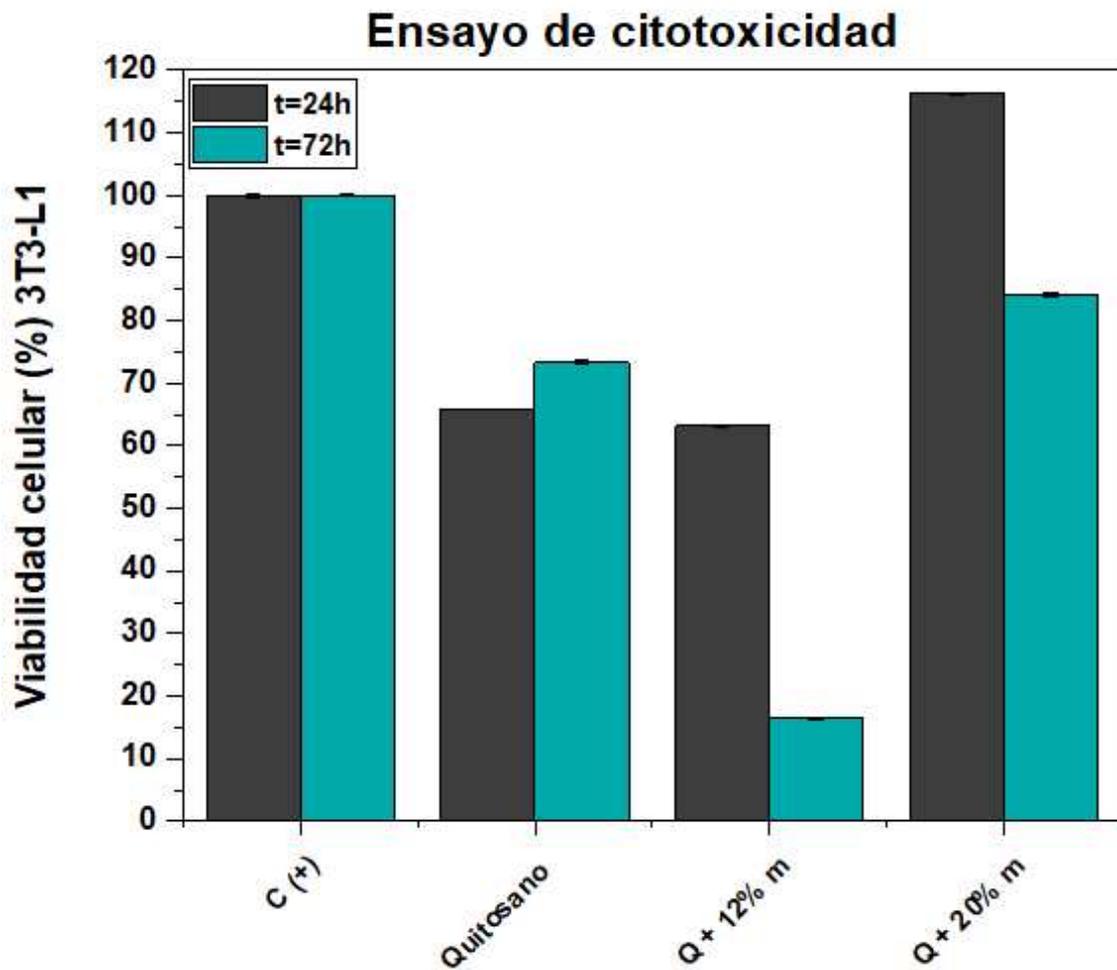


Figura 19. Ensayo de citotoxicidad con células 3T3-L1 en contacto con las películas base quitosano/miel y un control positivo, a 24h y 72h.

A 72h se observó la morfología característica de los fibroblastos, la presencia de células aumentó en el control positivo y en las que estaban expuestas a la película de quitosano (Figura 20), en la imagen se observó que algunos fibroblastos migraron hacia la película quitosano y quitosano/miel 20% los cuales se adhirieron a la superficie, dado esto se puede decir que ambas películas siguen siendo biocompatibles y no tóxicos después de 72h (Ibrahim et al., 2021; Şalva et al., 2023; Sarhan et al., 2016), sin embargo, en la película con quitosano/12% miel se presentó una disminución de células vivas puesto que se

encontró una cantidad mayor de células muertas en comparación de la película de quitosano y la suplementada con 20% de miel, obteniendo un 16.44% de células vivas considerándose como citotóxico (Figura 19) (Yupanqui Miele et al., 2022).

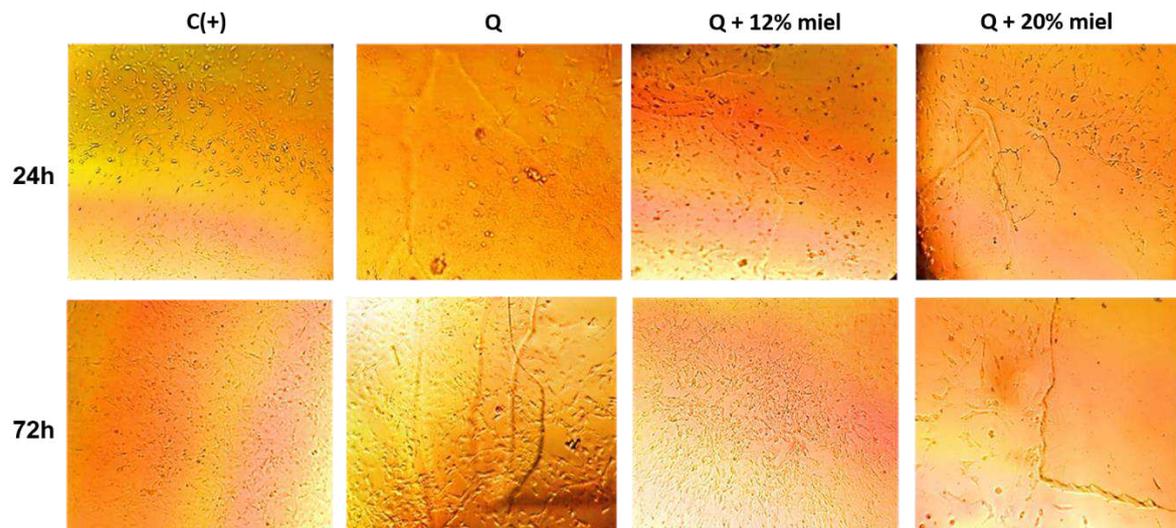


Figura 20. Imágenes de los fibroblastos 3T3-L1 en presencia de las películas base quitosano y quitosano/miel 12% y 20%; tomadas con un microscopio óptico.

En las películas enriquecidas con miel al 12% y 20% se observó que a 72h la presencia de la película fue casi imperceptible porque parecía haberse desintegrado, no obstante, se infiere que al tener un porcentaje alto en azúcares los fibroblastos lo tomaron como sustrato, lo cual contribuyó a la estabilidad celular y proliferación en la muestra con 20% miel (Ibrahim et al., 2021; Sergi et al., 2020; Yupanqui Miele et al., 2022).

14 Conclusiones

Se logró encapsular la miel en el quitosano de medio peso molecular mediante gelificación iónica con trifosfato de sodio (TPP) por la afinidad que tiene por sus grupos aminos para entrecruzar el polímero.

En las películas se observó que las señales características de la miel se conservaron. Al agregar el ácido oleico se perdieron las señales de OH de la miel y el N-H del quitosano.

Con base en los resultados la miel pura careció de efecto bactericida, solo tuvo efecto a 3h en una concentración del 20%, a 24h el efecto fue nulo en las dos bacterias. El efecto aumentó con la miel encapsulada, ya que ambas bacterias mostraron susceptibilidad a las películas siendo *S. aureus* la bacteria más susceptible, *P. aeruginosa* presentó mayor susceptibilidad a 24h contra las dos películas suplementadas con miel. En la forma de emulsión, se observó una actividad bactericida del 99.9% desde la primera hora de exposición contra ambas bacterias. Los antibiogramas ayudaron a confirmar que *P. aeruginosa* y *S.aureus* sí muestran susceptibilidad a la fórmula.

En la prueba de tolerancia se observó que a 1h y 3h, las bacterias parecerían tener mayor tolerancia a las películas enriquecidas con miel, sin embargo, a 24h las 10 generaciones de bacterias mostraron mayor susceptibilidad puesto que el efecto antibacteriano se conservó, no obstante, en los pases 8, 9 y 10 posiblemente tuvo un efecto bactericida.

La línea celular de fibroblastos 3T3-L1 presentó proliferación con la película de quitosano y la película adicionada con 20% miel en 24h y 72h, por ello son

biocompatibles y no tóxicas. La película con 12% miel presentó menor crecimiento celular a 72h, por lo que es biocompatible a 24 pero a 72 horas tiene efecto citotóxico.

Las micropartículas de quitosano cargadas con miel presentaron propiedades antibacterianas contra *P. aeruginosa* y *S. aureus* en forma de película y dispersas en la emulsión mostraron efecto bactericida, la evaluación de citotoxicidad demostró que son biocompatibles, no obstante, solo la concentración de 12% miel mostró un efecto citotóxico a 72 h. Con base a ello se acepta la hipótesis, dado que las partículas sí presentan propiedades antibacterianas y biocompatibles.

15 Perspectivas futuras

Se buscaría probar el tratamiento en modelos de estudio animal y observar la eficacia del tratamiento en la prevención de infecciones bacterianas. Además, se buscaría que el tratamiento promueva proliferación celular y reparación del tejido, aunado a ello se haría una comparación entre las formas farmacéuticas (emulsión y película) y se haría comparación entre los resultados obtenidos.

16 Referencias

- Akrawi, S. H., Gorain, B., Nair, A. B., Choudhury, H., Pandey, M., Shah, J. N., & Venugopala, K. N. (2020). Development and optimization of naringenin-loaded chitosan-coated nanoemulsion for topical therapy in wound healing. *Pharmaceutics*, *12*(9), 1–23. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090893>
- Alven, S., & Aderibigbe, B. A. (2020). Chitosan and cellulose-based hydrogels for wound management. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 24, pp. 1–30). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21249656>
- Amy, D. A., Hajardhini, P., Jonarta, A. L., Yulianto, H. D. K., & Susilowati, H. (2021). Enhancement of pyocyanin production by subinhibitory concentration of royal jelly in *Pseudomonas aeruginosa*. *F1000Research*, *10*, 14. <https://doi.org/10.12688/f1000research.27915.1>
- Araya-Hermosilla, R., Dervillé, F., Cohn-Inostroza, N., Picchioni, F., Pescarmona, P. P., & Poortinga, A. (2022). Pickering Emulsions and Antibubbles Stabilized by PLA/PLGA Nanoparticles. *Langmuir*, *38*(1), 182–190. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c02320>
- Ardean, C., Davidescu, C. M., Nemeș, N. S., Negrea, A., Ciopec, M., Duteanu, N., Negrea, P., Duda-seiman, D., & Musta, V. (2021). Factors influencing the antibacterial activity of chitosan and chitosan modified by functionalization. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 14). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms22147449>

Baiz, C. R., Błasiak, B., Bredenbeck, J., Cho, M., Choi, J. H., Corcelli, S. A., Dijkstra, A. G., Feng, C. J., Garrett-Roe, S., Ge, N. H., Hanson-Heine, M. W. D., Hirst, J. D., Jansen, T. L. C., Kwac, K., Kubarych, K. J., Londergan, C. H., Maekawa, H., Reppert, M., Saito, S., ... Zanni, M. T. (2020). Vibrational Spectroscopic Map, Vibrational Spectroscopy, and Intermolecular Interaction. In *Chemical Reviews* (Vol. 120, Issue 15, pp. 7152–7218). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00813>

Barnes, M., Sulé-Suso, J., Millett, J., & Roach, P. (2023). Fourier transform infrared spectroscopy as a non-destructive method for analysing herbarium specimens. *Biology Letters*, 19(3). <https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0546>

Bhattamisra, S. K., Shak, A. T., Xi, L. W., Safian, N. H., Choudhury, H., Lim, W. M., Shahzad, N., Alhakamy, N. A., Anwer, M. K., Radhakrishnan, A. K., & Md, S. (2020). Nose to brain delivery of rotigotine loaded chitosan nanoparticles in human SH-SY5Y neuroblastoma cells and animal model of Parkinson's disease. *International Journal of Pharmaceutics*, 579. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119148>

Boeck, L. (2023). Antibiotic tolerance: targeting bacterial survival. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 74). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102328>

Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, ; E O, Acedo-Félix, ; E, Ponce, ; J F, Cruz-Villegas, ; M, García-Hernández, J. L., & Ortega-Nieblas, M. M. (2010). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE ACEITES ESENCIALES CONTRA *Clavibacter michiganensis*

subespecie michiganensis [EVALUATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY IN VITRO OF ESSENTIAL OILS VS *Clavibacter michiganensis* subespecie michiganensis]. In *Tropical and Subtropical Agroecosystems* (Vol. 12).

Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 14, Issue 5, pp. 320–330). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>

Bucekova, M., Buriova, M., Pekarik, L., Majtan, V., & Majtan, J. (2018). Phytochemicals-mediated production of hydrogen peroxide is crucial for high antibacterial activity of honeydew honey. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27449-3>

Camplin, A. L., & Maddocks, S. E. (2014). Manuka honey treatment of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* results in the emergence of isolates with increased honey resistance. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1476-0711-13-19>

Cárdenas-Escudero, J., Galán-Madruga, D., & Cáceres, J. O. (2023). Rapid, reliable and easy-to-perform chemometric-less method for rice syrup adulterated honey detection using FTIR-ATR. *Talanta*, 253. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123961>

Castañón-Viveros, S. A., Salas-Marcial, C., Ramos-García, M. D. L., Hernández-Romano, J., & Guillén-Sánchez, D. (2019). Efecto de formulaciones de ácido oleico y quitosano sobre el desarrollo in vitro de *Clavibacter michiganensis*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican*

Journal of Phytopathology, 37(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1903-6>

- Chen, Y., Zou, C., Mastalerz, M., Hu, S., Gasaway, C., & Tao, X. (2015). Applications of micro-fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) in the geological sciences—A Review. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 12, pp. 30223–30250). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms161226227>
- Chevalier, Y., & Bolzinger, M. A. (2013). Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 439, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.054>
- Combarros-Fuertes, P., Estevinho, L. M., Teixeira-Santos, R., Rodrigues, A. G., Pina-Vaz, C., Fresno, J. M., & Eugenia Tornadijo, M. (2020). Antibacterial action mechanisms of honey: Physiological Effects of Avocado, Chestnut, and Polyfloral Honey upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Molecules*, 25(5). <https://doi.org/10.3390/molecules25051252>
- Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 21, Issue 5, pp. 280–295). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
- Eisenreich, W., Rudel, T., Heesemann, J., & Goebel, W. (2022). Link Between Antibiotic Persistence and Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.900848>

- El-Didamony, S. E., Kalaba, M. H., El-Fakharany, E. M., Sultan, M. H., & Sharaf, M. H. (2022). Antifungal and antibiofilm activities of bee venom loaded on chitosan nanoparticles: a novel approach for combating fungal human pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(12). <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03425-y>
- El-Kased, R. F., Amer, R. I., Attia, D., & Elmazar, M. M. (2017). Honey-based hydrogel: In vitro and comparative in vivo evaluation for burn wound healing. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08771-8>
- Fan, Z., Xu, C., Pan, X., Dong, Y., Ren, H., Jin, Y., Bai, F., Cheng, Z., Jin, S., & Wu, W. (2019). Mechanisms of RsaL mediated tolerance to ciprofloxacin and carbenicillin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Genetics*, 65(1), 213–222. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0863-3>
- Fresco-Cala, B., & Cárdenas, S. (2022a). Advanced polymeric solids containing nano- and micro-particles prepared via emulsion-based polymerization approaches. A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 1208). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339669>
- Fresco-Cala, B., & Cárdenas, S. (2022b). Advanced polymeric solids containing nano- and micro-particles prepared via emulsion-based polymerization approaches. A review. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 1208). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339669>
- Hernández-Orozco, M. M., Castellanos-Espinoza, R., Hernández-Santos, N. A., Ramírez-Montiel, F. B., Álvarez-Contreras, L., Arellano-Arreola, V. M., Padilla-Vaca, F., Arjona, N., & España-Sánchez, B. L. (2022). Antibacterial and electrochemical evaluation of electrospun

polyethersulfone/silver composites as highly persistent nanomaterials.

Polymer Composites, 44(3), 1711–1724.

<https://doi.org/10.1002/pc.27199>

Ho, T. M., Razzaghi, A., Ramachandran, A., & Mikkonen, K. S. (2022).

Emulsion characterization via microfluidic devices: A review on interfacial tension and stability to coalescence. In *Advances in Colloid and Interface Science*

(Vol. 299). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102541>

Hoang, N. H., Thanh, T. Le, Sangpueak, R., Treekoon, J., Saengchan, C.,

Thepbandit, W., Papatthoti, N. K., Kamkaew, A., & Buensanteai, N. (2022).

Chitosan Nanoparticles-Based Ionic Gelation Method: A Promising Candidate for Plant Disease Management. In *Polymers* (Vol. 14, Issue 4).

MDPI. <https://doi.org/10.3390/polym14040662>

Hu, Q., & Luo, Y. (2021). Chitosan-based nanocarriers for encapsulation and

delivery of curcumin: A review. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 179, pp. 125–135). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.216>

Ibrahim, A., Moodley, D., Uche, C., Maboza, E., Olivier, A., & Petrik, L. (2021).

Antimicrobial and cytotoxic activity of electrosprayed chitosan nanoparticles against endodontic pathogens and Balb/c 3T3 fibroblast

cells. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04322-4>

Jhaveri, J., Raichura, Z., Khan, T., Momin, M., & Omri, A. (2021). Chitosan

Nanoparticles-Insight into Properties, Functionalization and Applications

- in Drug Delivery and Theranostics. *Molecules*, 26(2), 272.
<https://doi.org/10.3390/molecules26020272>
- Kosimaningrum, W. E., Barleany, D. R., Sako, V. N., & Ristiyanti, R. (2020). Preparation of gelatin-chitosan-honey-based hydrogel for potential active material of wound care dressing application. *Materials Science Forum*, 988 MSF, 162–168.
<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/msf.988.162>
- Kus-liśkiewicz, M., Fickers, P., & Ben Tahar, I. (2021). Biocompatibility and cytotoxicity of gold nanoparticles: Recent advances in methodologies and regulations. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 20). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222010952>
- Li, S., Renick, P., Senkowsky, J., Nair, A., & Tang, L. (2021). Diagnostics for Wound Infections. In *Advances in Wound Care* (Vol. 10, Issue 6, pp. 317–327). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/wound.2019.1103>
- Liu, M., Lu, J., Müller, P., Turnbull, L., Burke, C. M., Schlothauer, R. C., Carter, D. A., Whitchurch, C. B., & Harry, E. J. (2014). Antibiotic-specific differences in the response of *Staphylococcus aureus* to treatment with antimicrobials combined with manuka honey. *Frontiers in Microbiology*, 5(DEC). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00779>
- Lu, J., Cokcetin, N. N., Burke, C. M., Turnbull, L., Liu, M., Carter, D. A., Whitchurch, C. B., & Harry, E. J. (2019). Honey can inhibit and eliminate biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54576-2>
- Manimaran, D., Elangovan, N., Mani, P., Subramanian, K., Ali, D., Alarifi, S., Palanisamy, C. P., Zhang, H., Rangasamy, K., Palanisamy, V., Mani, R.,

- Govarthanan, K., Aruni, W., Shanmugam, R., Srinivasan, G. P., & Kalirajan, A. (2022). Isolongifolene-loaded chitosan nanoparticles synthesis and characterization for cancer treatment. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23386-4>
- Masoura, M., Passaretti, P., Overton, T. W., Lund, P. A., & Gkatzionis, K. (2020). Use of a model to understand the synergies underlying the antibacterial mechanism of H₂O₂-producing honeys. *Scientific Reports*, *10*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74937-6>
- Matica, M. A., Aachmann, F. L., Tøndervik, A., Sletta, H., & Ostafe, V. (2019). Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 23). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20235889>
- McLoone, P., Tabys, D., & Fyfe, L. (2020). Honey combination therapies for skin and wound infections: A systematic review of the literature. In *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology* (Vol. 13, pp. 875–888). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/CCID.S282143>
- Meng, X., Liu, H., Dong, X., Wang, Q., Xia, Y., & Hu, X. (2022). A soft Pickering emulsifier made from chitosan and peptides endows stimuli-responsiveness, bioactivity and biocompatibility to emulsion. *Carbohydrate Polymers*, *277*. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118768>
- Mikušová, V., Mikuš, P., & Piozzi, A. (2021). *Molecular Sciences Advances in Chitosan-Based Nanoparticles for Drug Delivery*. <https://doi.org/10.3390/ijms2217>

- Mndlovu, H., Du Toit, L. C., Kumar, P., Choonara, Y. E., Marimuthu, T., Kondiah, P. P. D., & Pillay, V. (2020). Bioplatfrom fabrication approaches affecting chitosan-based interpolymmer complex properties and performance as wound dressings. *Molecules*, *25*(1). <https://doi.org/10.3390/molecules25010222>
- Mohammed, S. J., Al-Musawi, A. T., Al-Fraji, A. S., & Kareem, H. S. (2022). Comparison of three culture media in assessing the sensitivity of antibiotics to common foodborne microorganisms. *Journal of Medicine and Life*, *15*(5), 645–649. <https://doi.org/10.25122/jml-2021-0404>
- Murakami, K., Ono, T., Noma, Y., Minase, I., Amoh, T., Irie, Y., Hirota, K., & Miyake, Y. (2017). Explorative gene analysis of antibiotic tolerance-related genes in adherent and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Infection and Chemotherapy*, *23*(5), 271–277. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2017.01.004>
- Oliveira, A., Sousa, J. C., Silva, A. C., Melo, L. D. R., & Sillankorva, S. (2018). Chestnut honey and bacteriophage application to control *pseudomonas aeruginosa* and *escherichia coli* biofilms: Evaluation in an ex vivo wound model. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01725>
- Parajuli, S., & Ureña-Benavides, E. E. (2022). Fundamental aspects of nanocellulose stabilized Pickering emulsions and foams. *Advances in Colloid and Interface Science*, *299*, 102530. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102530>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., & Niles, A. L. (2013). *Cell Viability Assays*.

- Rohman, A., Ghazali, M. A. B., Windarsih, A., Irnawati, Riyanto, S., Yusof, F. M., & Mustafa, S. (2020). Comprehensive Review on Application of FTIR Spectroscopy Coupled with Chemometrics for Authentication Analysis of Fats and Oils in the Food Products. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES25225485>
- Şalva, E., Akdağ, A. E., Alan, S., Arısoy, S., & Akbuğa, F. J. (2023). Evaluation of the Effect of Honey-Containing Chitosan/Hyaluronic Acid Hydrogels on Wound Healing. *Gels*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/gels9110856>
- Sarhan, W. A., Azzazy, H. M. E., & El-Sherbiny, I. M. (2016). Honey/Chitosan Nanofiber Wound Dressing Enriched with *Allium sativum* and *Cleome droserifolia*: Enhanced Antimicrobial and Wound Healing Activity. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 8(10), 6379–6390. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b00739>
- Schilcher, K., & Horswill, A. R. (2020). *Staphylococcal Biofilm Development: Structure, Regulation, and Treatment Strategies*. <https://doi.org/10>
- Sen, C. K. (2021). Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates. In *Advances in Wound Care* (Vol. 10, Issue 5, pp. 281–292). Mary Ann Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/wound.2021.0026>
- Sergi, R., Bellucci, D., Salvatori, R., & Cannillo, V. (2020). Chitosan-based bioactive glass gauze: Microstructural properties, in vitro bioactivity, and biological tests. *Materials*, 13(12), 1–17. <https://doi.org/10.3390/ma13122819>
- Simões, D., Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Coutinho, P., Mendonça, A. G., & Correia, I. J. (2018). Recent advances on antimicrobial wound dressing:

A review. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (Vol. 127, pp. 130–141). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.02.022>

Swellam, T., Miyanaga, N., Onozawa, M., Hattori, K., Kawai, K., Shimazui, T., & Akaza, H. (2003). Antineoplastic activity of honey in an experimental bladder cancer implantation model: In vivo and in vitro studies. *International Journal of Urology*, 10(4), 213–219. <https://doi.org/10.1046/j.0919-8172.2003.00602.x>

Thees, A. V., Pietrosimone, K. M., Melchiorre, C. K., Marden, J. N., Graf, J., Lynes, M. A., & Maltz-Matyschsyk, M. (2021). PmtA Regulates Pyocyanin Expression and Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.789765>

Tiernan, H., Byrne, B., & Kazarian, S. G. (2020). ATR-FTIR spectroscopy and spectroscopic imaging for the analysis of biopharmaceuticals. In *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* (Vol. 241). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118636>

Verlee, A., Mincke, S., & Stevens, C. V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. In *Carbohydrate Polymers* (Vol. 164, pp. 268–283). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>

Vizcarra-Pacheco, M., Ley-Flores, M., Matrecitos-Burrueal, A. M., López-Esparza, R., Fernández-Quiroz, D., Lucero-Acuña, A., & Zavala-Rivera, P. (2021). Synthesis and characterization of a bioconjugate based on oleic acid and l-cysteine. *Polymers*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/polym13111791>

- Wang, W., Meng, Q., Li, Q., Liu, J., Zhou, M., Jin, Z., & Zhao, K. (2020). Chitosan derivatives and their application in biomedicine. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21020487>
- Wu, J., & Ma, G. H. (2016). Recent Studies of Pickering Emulsions: Particles Make the Difference. In *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* (Vol. 12, Issue 34, pp. 4633–4648). <https://doi.org/10.1002/sml.201600877>
- Yupanqui Mieles, J., Vyas, C., Aslan, E., Humphreys, G., Diver, C., & Bartolo, P. (2022). Honey: An Advanced Antimicrobial and Wound Healing Biomaterial for Tissue Engineering Applications. In *Pharmaceutics* (Vol. 14, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081663>