



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FORMULACIÓN A  
BASE DE QUITOSANO IRRADIADO Y ACEITE DE CANELA COMO  
TRATAMIENTO ALTERNATIVO PARA LA RESISTENCIA  
BACTERIANA EN HERIDAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ADRIANA ESTELA HERNÁNDEZ TENORIO**

**ASESOR DEL TEMA: DR. GERARDO LEYVA GÓMEZ**

**SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. MARÍA LUISA DEL PRADO AUDELO**



**Ciudad Universitaria, CD. MX., 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesora: **MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD**

**VOCAL:** Profesora: **ANDREA SAORI MAJLUF TREJO**

**SECRETARIO:** Profesor: **GERARDO LEYVA GÓMEZ**

**1er. SUPLENTE:** Profesor: **CARLOS JUÁREZ OSORNIO**

**2° SUPLENTE:** Profesor: **SERGIO ALBERTO BERNAL CHÁVEZ**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 307, EDIFICIO F DE LA FACULTAD DE QUÍMICA,  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Gerardo Leyva Gómez**

## **SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Dra. María Luisa Del Prado Audelo**

## **SUSTENTANTE:**

**Adriana Estela Hernández Tenorio**

## **FINANCIAMIENTO**

En nombre del Doctor Gerardo Leyva Gómez y de la Doctora María Luisa Del Prado Audelo, agradezco a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (Becas Posdoctorales, PAPIIT TA 200318) y a CONACYT (A1-S-15759) por la colaboración brindada al proyecto de tesis.

## CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VII
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. ANTECEDENTES.....	4
3.1. La piel.....	4
3.2. Histología.....	4
3.2.1. Funciones de la piel.....	6
3.3. Heridas.....	7
3.3.1. Cicatrización de heridas.....	7
3.3.2. Clasificación de heridas.....	12
3.3.3. Factores que afectan la cicatrización de heridas.....	12
3.3.4. Infecciones en heridas.....	16
3.3.5. Resistencia antimicrobiana.....	17
3.3.6. Biopelícula.....	18
3.3.6.1. Biopelícula de <i>Escherichia coli</i> .....	19
3.3.6.2. Biopelícula de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
3.3.6.3. Biopelícula de <i>Candida albicans</i> .....	20
3.3.6.4. Biopelícula de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
3.3.7. Tratamiento de heridas.....	21
3.4. Apósitos.....	23
3.4.1. Características de un apósito ideal para heridas.....	23
3.4.2. Apósitos tradicionales.....	24
3.4.3. Apósitos modernos.....	24
3.5. Quitosano.....	25
3.5.1. Origen y obtención del quitosano.....	25
3.5.2. Propiedades fisicoquímicas y biológicas.....	27
3.5.3. Aplicaciones del quitosano.....	29
3.5.4. Mecanismo de acción del quitosano.....	31
3.5.5. Modificación de quitosano mediante Radiación Gamma.....	32
3.6. Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).....	35

3.7.	Aceite de canela.....	35
4.	OBJETIVOS.....	37
4.1.	Objetivo General .....	37
4.2.	Objetivos particulares.....	37
5.	HIPÓTESIS.....	37
6.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	38
6.1.	Lista de equipos, materiales y reactivos empleados .....	38
6.1.1.	Equipos de laboratorio.....	38
6.1.2.	Materiales de laboratorio .....	38
6.1.3.	Reactivos.....	38
6.1.4.	Material biológico.....	39
6.1.5.	Medicamentos .....	39
6.2.	Preparación de muestras .....	39
6.2.1.	Soluciones .....	39
6.2.2.	Formulaciones .....	40
6.3.	Caracterización fisicoquímica.....	42
6.3.1.	Liofilización de las muestras.....	42
6.3.2.	Espectroscopía Infrarroja.....	43
6.3.3.	Análisis Termogravimétrico .....	43
6.3.4.	Calorimetría Diferencial de Barrido.....	43
6.4.	Evaluación antimicrobiana .....	43
6.4.1.	Prueba de difusión en agar.....	43
6.4.2.	Prueba antibiopelícula .....	45
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	46
7.1.	Descripción de las muestras .....	46
7.2.	Caracterización fisicoquímica.....	47
7.2.1.	Espectroscopía Infrarroja.....	47
7.2.2.	Análisis termogravimétrico.....	50
7.2.3.	Calorimetría diferencial de barrido.....	53
7.3.	Evaluación antimicrobiana .....	56
7.3.1.	Prueba de difusión en agar.....	56
7.3.2.	Prueba antibiopelícula .....	66

8. CONCLUSIONES .....	70
9. PERSPECTIVAS .....	71
10. BIBLIOGRAFÍA.....	72
11. ANEXOS .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
% p/v	Porcentaje peso peso
% v/v	Porcentaje volumen volumen
°C	Grados Celsius
<sup>60</sup> Co	Cobalto 60
A	Absorbancia
ARN	Ácido ribonucleico
C	Carbono
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
-C=O	Grupo carbonilo
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
CH	Enlace carbono hidrógeno
CH <sub>2</sub>	Metileno
CH <sub>3</sub>	Metilo
Chit	Quitano
cm	Centímetro
CN	Enlace carbono nitrógeno
CO	Enlace carbono oxígeno
-COOH	Grupo carboxilo
DA	Grado de acetilación
DD	Grado de desacetilación
DFU	Úlceras de pie diabético
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPS	Sustancia polimérica extracelular
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos



<b>FTIR</b>	Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier
<b>g</b>	Gramo
<b>h</b>	Hora
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua
<b>H<sub>3</sub>O<sup>+</sup></b>	Ion hidronio
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-1 β</b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>INF-β</b>	Interferón beta
<b>INF-γ</b>	Interferón gamma
<b>K<sup>+</sup></b>	Ion potasio
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>kGy</b>	Kilogray
<b>LPS</b>	Lipopolisacáridos
<b>M</b>	Molaridad
<b>mBar</b>	Milibar
<b>mg</b>	Miligramo
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	Ion magnesio
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
<b>Na<sup>2+</sup></b>	Ion sodio
<b>NH<sub>2</sub></b>	Grupo amina
<b>NH<sub>3</sub><sup>+</sup></b>	Ion amonio
<b>O</b>	Oxígeno
<b>O/O</b>	Aceite en aceite
<b>O/W</b>	Aceite en agua

<b>-OH</b>	Grupo hidroxilo
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>pka</b>	-Log ka
<b>QS</b>	Detección de quorum
<b>RAM</b>	Resistencia a los antimicrobianos
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b><i>S. aureus</i></b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SIDA</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico
<b>TGF-β1</b>	Factor de crecimiento transformante beta 1
<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>u.a.</b>	Unidades de absorbancia
<b>UFC</b>	Unidad formadora de colonias
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>W/O</b>	Agua en aceite
<b>μm</b>	Micrómetro

---

---

## 1. RESUMEN

La atención de las heridas agudas y crónicas representa diversos desafíos tanto para las personas que las desarrollan como para los sistemas de salud de todo el mundo. Una de las complicaciones durante el proceso de curación de la herida es la infección por diferentes microorganismos, así como la formación de biopelícula, lo que ocasiona que la lesión se convierta en una herida crónica. Actualmente, existen varios tratamientos para promover la cicatrización de heridas y prevenir infecciones; como apósitos y nuevos medicamentos, principalmente antibióticos y analgésicos.

El quitosano es un polímero natural, biodegradable y no tóxico con propiedades antimicrobianas que pueden ser útiles en el tratamiento de la cicatrización de heridas. Algunas propiedades, como el peso molecular y el grado de desacetilación, cambian cuando se someten a modificación por radiación gamma y pueden mejorar la actividad antimicrobiana contra algunos microorganismos.

En este proyecto de tesis, se desarrolló una formulación basada en quitosano irradiado, además, se incorporaron aceite de canela y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) disódico como agente antimicrobiano y antibiopelícula, respectivamente, con el fin de combinar los mecanismos de acción antimicrobianos y crear un nuevo tratamiento alternativo para heridas crónicas, en específico para la resistencia bacteriana.

La formulación obtenida se caracterizó por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC), Análisis Termogravimétrico (TGA) y Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR). También se demostró la actividad antimicrobiana a través de la prueba microbiológica de difusión en agar (método Kirby-Bauer) para *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Candida albicans* (*C. albicans*); además de la actividad antibiopelícula para *P. aeruginosa*. Dicha formulación podría ser una opción cuando se presenta resistencia a los antibióticos o para combinar con los mismos, por lo tanto, representa una alternativa para el tratamiento de heridas crónicas.

---

---

## 2. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano, su integridad juega un papel importante para el mantenimiento de la homeostasis fisiológica. Entre las funciones que desempeña, destaca la protección contra fuerzas mecánicas e infecciones, así como regulación térmica [1].

Una herida se define como la alteración a la integridad de la piel y su tratamiento tiene por objetivo una cicatriz funcional y estéticamente satisfactoria [2]. Existen dos tipos de heridas: agudas y crónicas; la primera pasa por las etapas del proceso de cicatrización de manera ininterrumpida, secuencial y en un periodo de tiempo predecible, lo cual conduce al cierre espontáneo de la lesión. No obstante, de permanecer estancada en alguna de estas etapas durante un periodo de tiempo que exceda los tres meses, la herida se considera crónica [3,4]

La atención de las heridas agudas y crónicas representa diversos desafíos tanto para las personas que las desarrollan como para los sistemas de salud de todo el mundo. En lo que se refiere a los pacientes, tener una herida crónica incide de manera negativa en todos los niveles de vida de la persona. En cuanto a los sistemas de salud, la atención de las heridas implica una importante inversión económica, relacionada con la formación y contratación de recursos humanos especializados en el cuidado de heridas, la adquisición de insumos de alta tecnología, el aumento de las tasas de infección, entre otras [3].

En la actualidad, existen diversos materiales llamados apósitos diseñados para evitar que la herida se deshidrate y favorecer su cicatrización; uno de ellos es el denominado apósito bioactivo, producido a partir de biomateriales que desempeñan un papel importante en el proceso de curación. Estos apósitos son conocidos por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y naturaleza no tóxica y se derivan generalmente de tejidos naturales o fuentes artificiales como colágeno, ácido hialurónico, quitosano, alginato y elastina. Los polímeros de estos materiales se utilizan solos o en combinación según la naturaleza y el tipo de herida [5].

---

---

Los apósitos a base de quitosano poseen un conjunto de propiedades únicas, incluidas hemostáticas, biodegradables y antibacterianas, las cuales son útiles para la curación de heridas. Es ampliamente usado en áreas médicas y veterinarias por su actividad antimicrobiana contra *E. coli* y *S. aureus* [6].

El presente trabajo busca desarrollar una formulación a base de quitosano modificado mediante irradiación gamma, aceite de canela y EDTA disódico con la finalidad de ser una alternativa para el tratamiento de resistencia bacteriana en heridas.

---

---

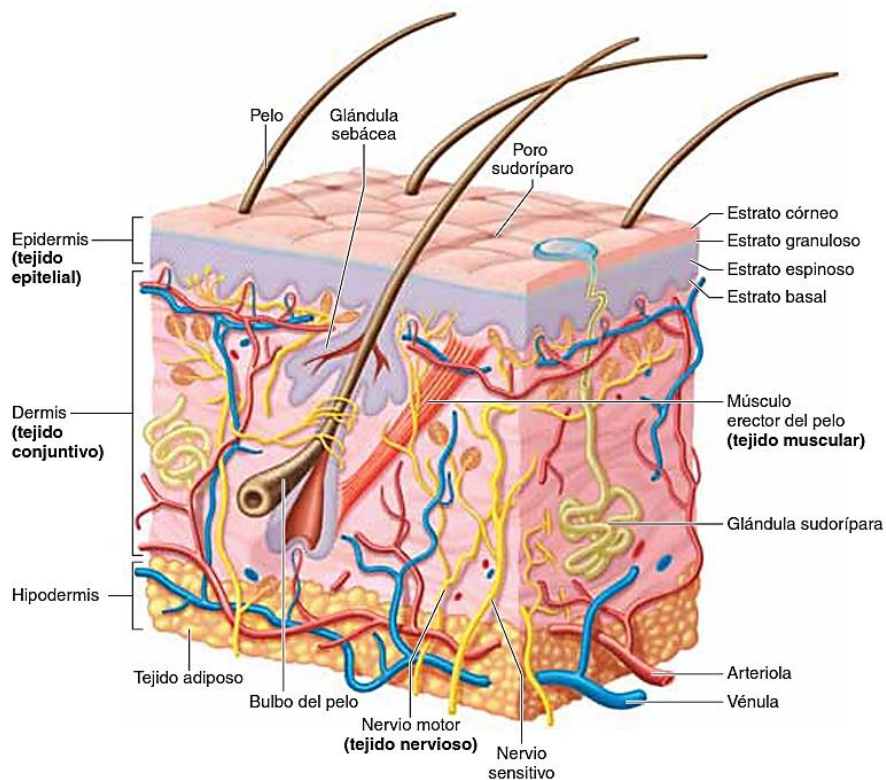
### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. La piel

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano [7], un individuo de peso y estatura medios está cubierto de 1.85 m<sup>2</sup> de piel, que equivale a aproximadamente 4 Kg, un volumen de 4000 cm<sup>3</sup> y 2.2 mm de espesor; lo que representa el 6 % del peso corporal. Su composición química es: agua (70%), minerales como sodio, potasio, calcio, magnesio y cloro; carbohidratos como glucosa; lípidos y proteínas [8].

#### 3.2. Histología

La piel está constituida por tres capas: epidermis, dermis e hipodermis (Figura 1), además de contar con anexos, los cuales son: los folículos pilosebáceos con la glándula apocrina, las glándulas ecrinas y las uñas [7].



**Figura 1.** Estructura de la piel [9].

---

---

La capa más externa de la piel, la epidermis, es un epitelio de tipo plano estratificado, constituida por cuatro tipos de células: queratinocitos (más abundante, sintetiza queratina y lleva a cabo el proceso de cornificación), melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel [7]. Está formado, del interior hacia la superficie, por cinco estratos:

- Basal o germinativo: Constituido por una hilera de queratinocitos, su proliferación comienza en este estrato. Las células de Langerhans son células presentadoras de antígenos provenientes de la médula ósea, pertenecen al sistema de macrófagos-mononucleares. Las células de Merkel forman parte del sistema celular endocrino difuso y funcionan como mecanorreceptores, también se relacionan con terminaciones nerviosas sensitivas.
- Espinoso o de Malpighi. Se compone por varias capas de células poliédricas unidas entre sí por puentes intercelulares o desmosomas.
- Granuloso. Consta de células con granulaciones de queratohialina (precursor de la queratina).
- Lúcido. Está formado por eleidina, se presenta en la piel más gruesa (palmas y planta de los pies).
- Córneo. Está integrado por células muertas aplanadas y sin núcleo, que contiene una proteína fibrilar, la queratina [8].

La siguiente capa, la dermis, es de 10 a 30 veces mayor que la epidermis [7], se clasifica en: superficial o papilar media o reticular y profunda. Se compone de tejido conjuntivo, vasos, nervios y anexos cutáneos. Están presentes tres clases de fibras proteínicas: de colágena, reticulares y elásticas; una sustancia fundamental formada por mucopolisacáridos y varios tipos de células: fibroblastos (producen colágena, sustancia fundamental y colagenasa), histiocitos, mastocitos, polimorfonucleares, eosinófilos y plasmocitos [8].

La hipodermis o tejido celular subcutáneo está formado por adipocitos, los cuales sirven como reserva energética y aislantes de calor. El complejo pilosebáceo consta del folículo piloso, el pelo, el músculo erector y la glándula sebácea [8].

---

---

En la piel también existen múltiples órganos sensitivos: los corpúsculos de Meissner (mecanorreceptores), corpúsculos de Pacini (sensibles a la presión), los de Krause (sensibles al frío) y las terminaciones nerviosas libres (que transmiten el dolor y el prurito) se sitúan más profundamente hacia la zona reticular [7].

### **3.2.1. Funciones de la piel**

La piel tiene complejas funciones, las cuales van desde las relativas a su anatomía, su estructura y su bioquímica, hasta el área emocional y como elemento estético; entre ellas destacan:

- **Función de protección.** Se deben a su constitución, a sus propiedades de elasticidad y de resistencia, lo que impide la entrada de microorganismos, es decir, actúa como una barrera mecánica. Las sustancias hidrosolubles presentes en el sudor y los ácidos grasos que se encuentran en la secreción sebácea y apocrina protegen de la humedad excesiva y de la desecación; además de salvaguardar contra la microbiota micótica y bacteriana. Es probable que el estrato córneo sea el elemento de mayor resistencia contra la entrada de microorganismos, debido a esto, la piel impide la entrada de agentes tóxicos.
- **Función de termorregulación.** La piel es un órgano en donde se pueden observar reacciones de los tejidos vascularizados, tales como inflamación, hiperemia reactiva y otras respuestas vasculares generalizadas, como las que se originan por el frío, el calor y el dolor.
- **Función metabólica.** La piel actúa como un filtro para la eliminación de agua, ya que permite que se elimine por medio de la sudoración y de la transpiración continua. Los compuestos minerales se encuentran en forma de sales, los carbohidratos en forma de glucosa, los lípidos están presentes de manera intra y extracelular; el más abundante es el colesterol. Las



---

---

proteínas, constituyentes básicos de la piel se encuentran en uñas y cabello, las principales son la colágena y queratina [7].

### **3.3. Heridas**

El término “herida” hace referencia a la disrupción de una estructura anatómica normal y de su función, que puede incluir, sólo de modo parcial o total la piel e incluso comprometer con mayor profundidad otras estructuras. Así pues, la herida se puede definir como una lesión (accidental o intencional) que involucra la pérdida de la solución de continuidad de un tejido o la separación de la piel, fascia, músculo, hueso, tendones, vasos sanguíneos o parénquima de órganos, se trata de un estado patológico en el que los tejidos están separados entre sí o destruidos, que se asocia con una pérdida de sustancia y deterioro de la función. Debido a que la piel es el órgano que mantiene la protección del organismo contra el ambiente, cualquier disrupción genera la necesidad crítica de su reparación de manera rápida y eficiente [10].

#### **3.3.1. Cicatrización de heridas**

Los procesos de regeneración y reparación de tejidos consisten en una secuencia de eventos moleculares y celulares los cuales se llevan a cabo después del inicio de una lesión tisular con la finalidad de restaurar el tejido dañado [11]. Dichos procesos ocurren simultáneamente y por lo general se dividen en tres fases principales: inflamación, proliferación y remodelación [12], cada fase resulta ser crítica para el éxito del cierre de la herida, y cualquier desviación al proceso se asocia a una curación anormal o atrasada [13].

- **Inflamación.**

La lesión ocasiona alteración del endotelio vascular y a la exposición de la lámina basal lo que conduce a la extravasación de los componentes sanguíneos y, de manera simultánea, a la activación de plaquetas [13]. Los vasos sanguíneos se contraen y la sangre comienza a coagular, éste proceso

---

---

consiste en la agregación de trombocitos y plaquetas en una red de fibrina; dicha red se encarga de restablecer la homeostasis y de organizar la matriz temporal necesaria para la migración celular, que a su vez restaura la función de la piel como barrera protectora para mantener la integridad de la piel, además de formar una barrera contra la invasión de microorganismo, la respuesta inflamatoria es muy rápida y se revela por la aparición de edema y eritema en el lugar de la herida [11].

Esta etapa se caracteriza por la llegada de leucocitos en el área de la lesión, por lo general, la respuesta celular se establece dentro de las primeras 24 horas y puede extenderse hasta dos días [11]. La presencia de neutrófilos es seguida por la de monocitos, que se activan rápidamente en macrófagos tisulares. Estas células son responsables de un mayor desbridamiento de los tejidos, secretan citocinas adicionales y factores de crecimiento que promueven la proliferación de fibroblastos, la angiogénesis y la migración de queratinocitos [13].

Durante el proceso, puede ocurrir una rápida activación de las células inmunes en el tejido, como son, mastocitos, células  $\gamma\delta$  y células de Langerhans, que se encargan de secretar quimiocinas y citocinas. Las células inflamatorias contribuyen a la liberación de enzimas lisosomales y especies reactivas de oxígeno, además de facilitar la limpieza de diversos restos celulares [11]. Como respuesta a la activación del sistema del complemento y de los productos de degradación bacteriana, la respuesta inflamatoria continúa con el reclutamiento activo de los neutrófilos, que son células primarias activadas y reclutadas que desempeñan un papel en la limpieza del tejido, además de contribuir a la muerte de agentes invasores. Los neutrófilos migran a través de las células endoteliales que están presentes en las paredes capilares que son activadas por citocinas proinflamatorias, como Interleucina 1 beta (IL-1  $\beta$ ), Factor de Necrosis Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ), e Interferón Gamma (IFN- $\gamma$ ), en la ubicación de la lesión; estas citocinas son importantes ya que promueven la expresión de moléculas de adhesión como selectinas e integrinas las cuales son un factor

---

---

determinante para la diapédesis de los neutrófilos. Una vez completada la actividad de los neutrófilos, que es eliminar bacterias contaminantes, se deben eliminar de la herida antes de avanzar a la siguiente fase de curación de manera que no se dañe el tejido o se potencie la respuesta inflamatoria. Las células se eliminan por extrusión a la superficie de la herida por apoptosis [14].

Aproximadamente 48 horas después de la lesión, se intensifica la migración de los monocitos por los vasos sanguíneos y se comienzan a diferenciar los macrófagos mediante la generación de nuevos perfiles de expresión génica. Dichos macrófagos se clasifican como M1 proinflamatorios y M2 antiinflamatorios y proangiogénicos, y son necesarios para desencadenar y propagar tejido nuevo en el área de la lesión ya que se encargan de liberar factores de crecimiento como Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), además de fagocitar desechos, así como la producción y liberación de citocinas y factores inflamatorios y fibrogénicos, y de radicales libres. Por otra parte, los macrófagos atraen otras células inflamatorias y producen prostaglandinas que funcionan como potentes vasodilatadores [11].

Una disminución en la cantidad de monocitos y macrófagos en la herida ocasiona el desbridamiento deficiente de la herida, proliferación, maduración de fibroblastos y angiogénesis retrasada lo que conduce a una inadecuada fibrosis y una herida débilmente reparada.

Los linfocitos son las últimas células en ingresar al sitio de la lesión, aproximadamente 72 h después del daño, son atraídos por acción de la interleucina-1 (IL-1), los componentes del complemento y los productos de descomposición de la Inmunoglobulina G (IgG) y son importantes debido a que participan en la regulación de la colagenasa, la cual es útil para la remodelación del colágena producción de componentes de la matriz extracelular y su degradación [14].

---

---

- Proliferación.

La reparación del tejido comienza cuando se ha logrado la hemostasia y se ha establecido la respuesta inmune con éxito, tiene lugar dentro de las primeras 48 horas y pueden desarrollarse hasta el día 14 después del inicio de la lesión. Esta etapa se caracteriza por la migración de fibroblastos y la deposición de matriz extracelular recién sintetizada, macroscópicamente se puede ver como una formación abundante de tejido de granulación. Además, se encarga del cierre de la lesión en sí, que incluye angiogénesis, fibroplasia y reepitelización.

La angiogénesis implica la proliferación celular endotelial, la ruptura y el reordenamiento de la membrana basal, la migración y asociación en estructuras tubulares y el reclutamiento de células perivasculares [11,14].

Los fibroblastos requieren un suministro de oxígeno adecuado para la producción de colágena, también se encargan de la producción de elastina y la organización de la matriz extracelular [13].

Después de 4 días de la lesión se comienza a formar el tejido de granulación a través de los siguientes mecanismos: aumento de la proliferación fibroblástica; biosíntesis colágena y elastina, que crea una red extracelular tridimensional de tejido conectivo; y la producción de factores quimiotácticos e Interferón beta (IFN- $\beta$ ) por los fibroblastos.

La fibroplasia comienza con la formación de tejido de granulación, que se caracteriza por la proliferación de fibroblastos los cuales son los agentes responsables del depósito de la nueva matriz. La colágena, que es sintetizada por los fibroblastos, es el componente principal que conforma una cicatriz madura; durante esta etapa inicial de reparación, predomina la colágena tipo III, sintetizado por fibroblastos en el tejido de granulación. Los miofibroblastos se encargan de contraer hacia el centro los bordes de la herida [11].

De manera paralela, ocurre la reepitelización, que consiste en que las células de revestimiento epitelial proliferan y migran desde los bordes de la herida con la finalidad de cerrar la lesión. La reepitelización por queratinocitos se

---

---

realiza mediante la combinación de la etapa proliferativa con la migración de células cerca de la lesión [11].

- Remodelación.

La fase de remodelación es responsable del desarrollo del nuevo epitelio y la formación final del tejido cicatricial. Esta fase tiene lugar dos o tres semanas después del inicio de la lesión, puede durar un año o más y tiene como objetivo lograr la máxima resistencia a la tracción a través de la reorganización, degradación y resíntesis de la matriz extracelular. Junto con la maduración de la matriz intracelular, los haces de colágena aumentan de diámetro y el ácido hialurónico y la fibronectina se degradan [11,14]. La colágena tipo III se degrada y aumenta la síntesis de colágena tipo I, también hay una reducción de ácido hialurónico y fibronectico (fribronectina), los cuales son degradados por metaloproteinasas celulares y plasmáticas [11]. La etapa de resolución es esencial para la restauración de la funcionalidad y la apariencia "normal" del tejido lesionado, esto es debido a que las citocinas antiinflamatorias como Interleucina 10 (IL-10) o Factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- $\beta$ 1) reducen la producción de quimiocinas; por otro lado, factores de crecimiento como TGF- $\beta$ 1 y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) influyen en la expresión génica de colágeno, de manera que regulan dicha proteína. Durante la maduración y remodelación de la herida, ocurren fenómenos de emigración, apoptosis y otros mecanismos de muerte celular lo que produce que vasos sanguíneos, fibroblastos y celular inflamatorias desaparezcan del área de la lesión. Los miofibroblastos son los principales productores de matriz extracelular durante el proceso de fibrosis, se acercan a los bordes de la herida y la contraen [11].

Como resultado de la última etapa del proceso, se obtiene una cicatriz apenas visible y una adecuada remodelación de la herida, mientras que la prolongación o las desviaciones de esta fase pueden causar cicatrices hipertróficas o queloides o heridas crónicas que no cicatrizan [13].

---

---

### **3.3.2. Clasificación de heridas**

A las heridas que cicatrizan en forma y tiempo predecibles se les llama agudas, mientras que, cuando no prosigue el proceso ordenado que conduce la integridad anatómica y funcional satisfactoria o que continúan por el proceso de reparación sin producir resultados anatómicos y funcionales adecuados, se le denomina heridas crónicas. Por lo general, a las heridas que no cicatrizan en tres meses se les consideran crónicas [4].

La interacción de varios factores pueden ocasionar que el cierre de la lesión no se lleve de manera ordenada, por ejemplo, el estado nutricional del paciente, el nivel de oxigenación de los tejidos, elevada carga bacteriana, exceso de humedad, estrés físico y emocional, además de presencia de patologías concomitantes [3].

### **3.3.3. Factores que afectan la cicatrización de heridas**

Las heridas con una cicatrización afectada debido a que no han progresado a través de las etapas normales de curación, tanto crónicas como agudas retardadas, generalmente presentan inflamación patológica. La mayoría de las heridas crónicas corresponden a úlceras asociadas con isquemia, diabetes mellitus o estasis venosa [15].

Los factores que influyen en la reparación de heridas pueden ser locales y sistémicos (Tabla 1), los cuales pueden estar relacionados entre sí. Los factores locales influyen de manera directa en las características de la lesión, mientras que los factores sistémicos se relacionan con el estado general de salud o enfermedad del paciente, éstos factores actúan a través de efectos locales que afectan la cicatrización [15].

---

---

**Tabla 1.** Factores que afectan la cicatrización de heridas [15].

---

<b>Factores locales</b>	<b>Factores sistémicos</b>
Oxigenación	Edad y género
Infecciones	Hormonas sexuales
Cuerpos extraños	Estrés
Insuficiencia venosa	Isquemia
	Enfermedades (Diabetes, queloides, fibrosis, trastornos de curación hereditarios, ictericia, uremia)
	Obesidad
	Medicamentos (glucocorticoides esteroideos, antiinflamatorios no esteroideos, quimioterapia)
	Alcoholismo y tabaquismo
	Condiciones inmunocomprometidas (cáncer, radioterapia, SIDA)
	Nutrición

---

#### Factores locales

- Oxigenación. El oxígeno induce la angiogénesis, aumenta la diferenciación de queratinocitos, la migración y reepitelización, promueve la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágena además de favorecer la contracción de la herida. A causa de la alteración vascular y alta demanda de oxígeno por las células metabólicamente activas el microambiente de la herida entra en un estado de hipoxia. Varias afecciones sistémicas, como edad avanzada y diabetes, pueden ocasionar problemas en el flujo vascular, lo que lleva a una pobre oxigenación de los tejidos. Por lo anterior, para que se logre una cicatrización óptima el nivel de oxígeno debe ser el adecuado [15].

- 
- 
- Infecciones. El daño causado al presentarse una herida brinda la oportunidad de que los microorganismos presentes en la superficie de la piel tengan acceso a tejidos subyacentes. La herida se puede clasificar como: colonizada, infección local o colonización crítica y/o propagación de infección invasiva; los estados de infección y replicación de los microorganismos determinan el tipo de infección. La contaminación consiste en la presencia de organismos no replicantes, a diferencia de la colonización, en la que existen microorganismos replicantes en la herida sin daño tisular. La etapa intermedia es la infección local o colonización crítica en donde hay replicación de microorganismos y marca el comienzo de las respuestas locales del tejido. Por último, la infección invasiva involucra la presencia de microorganismos replicantes dentro una herida con lesión posterior del huésped. Cuando no hay una correcta eliminación de los microorganismos contaminantes, se prolonga la fase de inflamación y puede causar que la herida entre en un estado crónico y no sane de manera adecuada. *P. aeruginosa* es uno de los microorganismos causantes de infecciones en heridas, debido a que forma biopelículas que impiden la actividad de los neutrófilos polimorfonucleares sobre las bacterias, lo que puede relacionarse con la poca efectividad de los antibióticos como tratamiento para heridas crónicas [15–17].

#### Factores sistémicos

- Edad. En adultos mayores sanos, el efecto del envejecimiento causa un retraso temporal en la cicatrización de la herida, sin embargo, no ocasiona un deterioro real en términos de la calidad de la curación. La cicatrización tardía de la herida en los ancianos se asocia con una respuesta inflamatoria alterada, como la infiltración tardía de células T en el área de la herida con alteraciones en la producción de quimiocinas y capacidad fagocítica de macrófagos reducida [15].



- 
- 
- Hormonas sexuales. El estrógeno interviene en el proceso de cicatrización ya que regula una variedad de genes asociados con la regeneración, producción de matriz, inhibición de la proteasa, función epidérmica y genes asociados principalmente con la inflamación. También se ha demostrado que los andrógenos regulan de manera negativa la cicatrización [15].
  
  - Estrés. El estrés da como resultado la desregulación del sistema inmune lo que provoca un retraso en la curación de heridas al disminuir los niveles de citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en el sitio de la herida, también reduce la expresión de IL-1 $\alpha$  e IL-8 que funcionan como quimioatrayentes necesarios en la fase inflamatoria [15].
  
  - Diabetes. Aproximadamente el 15 % de las personas diabéticas son propensas a desarrollar úlceras de pie diabético (DFU) que en el 84 % de los casos conduce a amputaciones de pierna. Las DFU siempre van acompañadas de hipoxia, lo cual altera el procedimiento normal de cicatrización de heridas al aumentar la respuesta inflamatoria temprana, prolongando así la lesión al aumentar los niveles de radicales de oxígeno [15].
  
  - Medicamentos. Muchos medicamentos que interfieren con la formación de coágulos, la función plaquetaria, las respuestas inflamatorias y/o la proliferación celular tienen la capacidad de afectar la cicatrización de heridas [15].
  
  - Obesidad. La obesidad puede aumentar el riesgo de desarrollar un mal proceso de cicatrización al incrementar el riesgo de infecciones, formación de hematoma, úlceras venosas y úlceras por presión. Muchas de estas complicaciones pueden ser el resultado de una relativa hipoperfusión e isquemia que ocurre en el tejido adiposo subcutáneo, también, la obesidad

---

---

puede relacionarse con estrés, ansiedad y depresión lo que va de la mano con daño en la respuesta inmune [15].

- Nutrición. Los pacientes con heridas crónicas que experimentan deficiencia nutricional a menudo requieren nutrientes especiales. La energía, los carbohidratos, las proteínas, las grasas, las vitaminas y el metabolismo mineral pueden afectar el proceso de curación [15].

#### **3.3.4. Infecciones en heridas**

Los eventos fisiológicos que se llevan a cabo durante el proceso de cicatrización ocurren generalmente de una manera ordenada en individuos sanos y/o en condiciones normales. Cuando estos eventos se retrasan por diversos factores (retorno venoso insuficiente, afecciones fisiológicas o metabólicas, etc.) el resultado es una herida difícil de curar o crónica. En la mayoría de los casos éstas heridas suelen estar infectadas lo que hace que se retrase la curación [18].

De acuerdo con Bjarnsholt, et. al, las heridas crónicas parecen estar en la fase de inflamación, caracterizada por una afluencia continua de neutrófilos los cuales liberan enzimas citotóxicas, radicales libres de oxígeno y mediadores inflamatorios que causan daño colateral al tejido del paciente, esto ocasiona que los procesos curativos y destructivos no se encuentren en un balance [17].

En la piel existe una microbiota que no representa un problema clínico, sin embargo, cuando los microorganismos proliferan, invaden los tejidos y provocan una respuesta inflamatoria que puede retrasar la cicatrización. Desde el punto de vista microbiológico, una infección en heridas se refiere a la presencia de microorganismos replicantes en el sitio de la lesión que abrumen el sistema inmune del huésped, también existe una liberación de toxinas que retrasa la curación [12,18].

Generalmente las heridas se encuentran infectadas por más de un tipo de microorganismos patógenos, los cuales se encuentran en la piel adyacente. En

---

---

las primeras etapas de una herida crónica predomina la presencia de bacterias Gram positivo, como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En las etapas posteriores predominan bacterias Gram negativo, principalmente *Pseudomonas* las cuales invaden las capas más profundas de la herida causando daños significativos en los tejidos [18].

Las heridas crónicas tienen diversos orígenes, sin embargo, se pueden dividir en varios grupos, principalmente úlceras venosas en piernas, úlceras en pie diabético y úlceras por presión [17].

### **3.3.5. Resistencia antimicrobiana**

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se define como la resistencia de los microorganismos a un antimicrobiano contra el cual fueron originalmente sensibles. Esta respuesta es un fenómeno evolutivo natural, el cual se puede acelerar por el mal uso de los medicamentos antimicrobianos y las malas prácticas de control de infecciones [19]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce la problemática y declara que la RAM pone en peligro la eficacia de la prevención y el tratamiento de una serie cada vez mayor de infecciones por virus, bacterias, hongos y parásitos, además de ser una amenaza cada vez mayor para la salud pública mundial y requiere medidas por parte de todos los sectores del gobierno y la sociedad [20]. Actualmente, la RAM amenaza la prevención y el tratamiento efectivo de una gama de infecciones que cada vez es mayor. Es una amenaza cada vez más grave para la salud pública a nivel mundial que requiere una acción inmediata [21].

La resistencia presentada por el microorganismo se puede dividir en dos niveles:

- Resistencia a nivel celular

Incluye mecanismos clásicos como: inactivación de fármacos por hidrólisis o modificación; alteración de los blancos del fármaco dentro de las células, haciéndolos irreconocibles para el fármaco, evitando el acceso de medicamentos al blanco; y el flujo de salida activo de fármacos fuera de la célula

---

---

a través de transportadores de flujo de salida unidos a la membrana. El desarrollo de resistencia celular ocurre como resultado de mutaciones en genes endógenos, y a través de la transferencia lateral de genes de determinantes de resistencia de otros microorganismos

- Resistencia a nivel comunitario

Se refiere a que las comunidades bacterianas pueden exhibir tolerancia al estrés ambiental que las células individuales no pueden; dicha tolerancia puede extenderse para incluir una mayor resistencia a los antibióticos. La resistencia a nivel comunitario se suma a la de nivel celular, mejorando así en gran medida la resistencia a los antibióticos de la comunidad microbiana. En sus hábitats naturales, los microorganismos viven predominantemente en comunidades: biopelículas compuestas de agregados celulares fuertemente empaquetados encerrados dentro de una matriz secretada que incluye polisacáridos, fibras amiloides y ADN extracelular.

La biopelícula, además de proporcionar resistencia a nivel comunitario, también puede promover la resistencia a nivel celular debido a que tienen una tasa de mutación mejorada, lo que conduce a un desarrollo más rápido de células mutantes resistentes a los antibióticos. Además, la proximidad de varios organismos microbianos dentro de los agregados de biopelícula y la abundancia de ADN extracelular podrían facilitar la transferencia horizontal de genes [21].

### **3.3.6. Biopelícula**

Se le denomina biopelícula al agregado organizado de microorganismos que se encuentran dentro de una matriz polimérica extracelular y están adheridos a superficies naturales, artificiales o a sí mismas; las biopelículas pueden estar formadas por una o más especies bacterianas [22–24]. La matriz, en la que están embebidos los microorganismos se conforma de diferentes tipos de biopolímeros conocidos como sustancias poliméricas extracelulares (EPS) los cuales se encargan de dar la forma tridimensional a la biopelícula, también son

---

---

responsables de la adhesión a las superficies. Las EPS inmovilizan y mantienen cerca las células de la biopelícula entre sí, lo que permite una mayor comunicación célula-célula [25].

Se sabe que cuando las células existen en una biopelícula, pueden volverse hasta 1000 veces más resistentes a los efectos de los agentes antimicrobianos. Los mecanismos de tolerancia a los antibióticos incluyen la falla de estos para penetrar la biopelícula, la tasa de crecimiento lenta, metabolismo alterado, células persistentes, gradientes de oxígeno y la matriz extracelular de las biopelículas. Además, después del desbridamiento o limpieza de la herida, la biopelícula puede reformarse debido al crecimiento de fragmentos que quedan, la propagación de bacterias liberadas de la biopelícula restante y el crecimiento de ésta por nuevos microorganismos. Por lo anterior las biopelículas tienen un impacto en la medicina ya que se pueden formar en muchos dispositivos médicos como catéteres, lentes de contacto y caderas artificiales; también se relacionan con enfermedades como colitis, vaginitis y uretritis [23,24,26].

#### **3.3.6.1. Biopelícula de *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es una bacteria Gram negativa de naturaleza anaerobia facultativa. Es el principal microorganismo que causa infecciones en el tracto urinario, y su biopelícula se asocia a las infecciones en dispositivos médicos como sondas uretrales e intravasculares, prótesis articulares y con infecciones intestinales. La formación de biopelículas por *E. coli* contribuye al desarrollo de infecciones, además de que dificulta su erradicación [27].

#### **3.3.6.2. Biopelícula de *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa*, una bacteria Gram negativa, es un patógeno oportunista para los seres humanos, es capaz de infectar tractos pulmonares y urinarios, heridas y quemaduras [28]. La capacidad de *P. aeruginosa* para formar biopelículas encapsuladas en EPS es una de las principales estrategias para

---

---

sobrevivir en ambientes hostiles. Las EPS pueden contener polisacáridos, alginato, DNA extracelular, proteínas y lípidos; el alginato mejora la estructura tridimensional de la biopelícula, elimina los radicales libres de oxígeno y previene la fagocitosis [17]. Las biopelículas de *P. aeruginosa* influyen en la curación de heridas crónicas, entre las que destacan las úlceras en pie diabético las cuales, debido a la mala circulación y pérdida, ocasiona que la respuesta inmune se minimice y la curación se retrase [29].

Esta bacteria presenta una alta resistencia a los antibióticos, lo que hace que su tratamiento se dificulte [30].

### **3.3.6.3. Biopelícula de *Candida albicans***

Las especies de *Candida* se encuentran en la microbiota normal, en el tracto gastrointestinal, cavidad oral, mucosa vaginal y piel; es la especie fúngica más comúnmente asociada a la formación de biopelículas [31]. Las infecciones por *Candida spp* suelen ser el primer síntoma clínico del estado prediabético o diabético y debe ser seguido por diagnósticos adicionales por parte del médico. Las infecciones por hongos en pies y uñas de los pies crean un portal de entrada por medio de las fisuras para una infección bacteria, además, si no se tratan a tiempo puede aumentar el riesgo de desarrollar úlceras en el pie. *Candida spp* son las levaduras que más comúnmente se aíslan de las úlceras de pie diabético (DFU) [32].

La formación de biopelículas de *Candida* genera repercusiones clínicas debido a su mayor resistencia a la terapia antimicótica y a la capacidad de los microorganismos, que, al estar dentro de la biopelícula, pueden resistir la respuesta inmune del huésped [31].

---

---

#### **3.3.6.4. Biopelícula de *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es una bacteria Gram positivo [33]. Este microorganismo es conocido por causar infecciones crónicas debido a su capacidad para resistir el tratamiento terapéutico mediante la formación de biopelículas, principalmente en dispositivos médicos [34]. Este microorganismo es el más comúnmente aislado de infecciones de heridas crónicas y su biopelícula se asocian a los casos como úlceras del pie diabético, úlceras por estasis venosa y úlceras por presión, lo que retrasa la reepitelización y la cicatrización [33]. Puede expresar factores bacterianos y proteínas que afectan la respuesta inmune del huésped al adherirse a los tejidos [30].

#### **3.3.7. Tratamiento de heridas**

La atención de heridas agudas y crónicas representa diversos desafíos para los sistemas de salud a nivel mundial y para los propios pacientes. Vivir con una herida crónica repercute de manera negativa en la vida de los pacientes, conlleva la presencia de dolor constante, incomodidad, limitaciones de la movilidad, etc., además de que se pueden manifestar sentimientos de ansiedad, depresión, frustración y alteraciones en la imagen corporal [4].

Se han desarrollado varios enfoques no quirúrgicos (Tabla 2), así como nuevos fármacos para ayudar al tratamiento de heridas. Algunos medicamentos más usados son:

- Pentoxifilina. Es una metilxantina que mejora la perfusión de los lechos vasculares, se usa para el tratamiento de úlceras. Disminuye la viscosidad de la sangre por lo que mejora la microcirculación capilar y reduce la agregación plaquetaria.
- Antimicrobianos. Incluyen preparaciones a base de yodo y plata que se utilizan para tratar heridas infectadas. Los agentes antimicrobianos atacan a las bacterias en varios niveles (membrana celular, organelo citoplásmico y ácido nucleico), minimizando así la resistencia bacteriana. Se pueden usar solos o en combinación con antibióticos sistémicos. Además del efecto

---

---

bactericida de la plata sobre los contaminantes comunes de las heridas, la plata también puede ser eficaz contra el resistente a la metilina (MRSA).

- Analgésicos. Pueden ir desde analgésicos simples hasta opiáceos, son ampliamente usados para el tratamiento de úlceras [35].

**Tabla 2.** Efecto de algunos fármacos de uso común para curación de heridas [35].

<b>Clasificación y medicamento</b>	<b>Efecto</b>
Antiinflamatorios no esteroideos Ibuprofeno	Actúa en la fase inflamatoria al inhibir la producción de ciclooxigenasa.
Colchicina	Actúa en la fase proliferativa al disminuir la proliferación de fibroblastos; degrada la matriz extracelular recién formada en la fase de remodelación.
Corticosteroides Prednisolona	Disminuye la adhesión plaquetaria en la fase de hemostasia y en la fase de remodelación reduce la actividad de los fibroblastos e inhibe la síntesis de colágeno.
Antiplaquetarios Aspirina	Inhibir la agregación plaquetaria en la fase de hemostasia e inhibe la inflamación mediada por metabolitos del ácido araquidónico.
Anticoagulantes Heparina	Actúa en la fase de hemostasia por su efecto sobre la formación de fibrina
Warfarina	Actúa en la fase de hemostasia por su efecto sobre la formación de fibrina



---

---

### **3.4. Apósitos**

El principal objetivo de los apósitos es proporcionar el ambiente ideal para la cicatrización de la herida, estos deben facilitar los principales cambios que ocurren durante el proceso de curación a fin de producir una cicatrización óptima. El apósito, al recubrir el sitio de la lesión, simula la función de barrera del epitelio y evita un daño mayor. La oclusión que brinda el material ayuda a la cicatrización al controlar el grado de hidratación y oxigenación, también ayuda a la síntesis de colágeno dérmico y la migración de células epiteliales, y limita la desecación del tejido. La compresión proporciona hemostasia y limita el edema, asimismo, permite la transferencia de gases y vapor de agua de la superficie de la herida a la atmósfera [4].

Los apósitos se clasifican en primarios y secundarios, el primero se coloca directamente en la herida y puede absorber líquidos y evitar desecación, infección y adherencia de un apósito secundario. El apósito secundario es el que se coloca sobre el apósito primario para mayor protección, absorción, compresión y oclusión [4]. Existen otras clasificaciones de apósitos dependiendo de la función que desempeñen en la herida (desbridamiento, antibacteriano, oclusivo, absorbente, adherencia), el tipo de material empleado para producir el apósito (por ejemplo, hidrocoloide, alginato, colágena) y la forma física del apósito (ungüento, película, espuma, gel) [36].

#### **3.4.1. Características de un apósito ideal para heridas**

En función del tipo de herida, se debe utilizar un apósito adecuado. La selección del apósito debe basarse en su capacidad para:

- Proporcionar o mantener un ambiente húmedo.
- Mejorar la migración epidérmica.
- Promover la angiogénesis y la síntesis de tejido conectivo.
- Permitir el intercambio de gases entre el tejido herido y el medio ambiente.

- 
- 
- Mantener la temperatura apropiada del tejido para mejorar el flujo de sangre al lecho de la herida y mejora la migración epidérmica.
  - Proporcionar protección contra la infección bacteriana.
  - No adherirse a la herida y ser fácil de extraer después de la cicatrización.
  - Debe proporcionar una acción de desbridamiento para mejorar la migración de los leucocitos y apoyar la acumulación de enzima.
  - Debe ser no tóxico y no causar alergias [5].

### **3.4.2. Apósitos tradicionales**

Los apósitos tradicionales incluyen algodón, vendajes y gasas, sin embargo, estos tratamientos no proporcionan un ambiente húmedo para la herida; pueden ser primarios, secundarios o formar parte de un compuesto de varios apósitos en el que cada uno realiza una función específica. Las gasas pueden proporcionar cierta protección bacteriana, pero dicha función se pierde cuando la superficie externa del apósito se humedece, ya sea por exudado de la herida o por fluidos externos. Además, los vendajes de gasa tienden a volverse más adherentes a las heridas a medida que disminuye la producción de líquido y son dolorosos al momento de retirarlos, también proporcionan poca oclusión y permiten la evaporación de la humedad, lo que resulta que el sitio de la lesión se deshidrate. Se ha sugerido que los apósitos tradicionales deben emplearse solo para heridas limpias y secas o usarse como apósito secundario para absorber exudados y proteger la herida [36].

### **3.4.3. Apósitos modernos**

Han sido diseñados para favorecer el proceso de cicatrización y no solo para cubrir la herida, están enfocados en evitar que la herida se deshidrate. Por lo general se basan en polímeros sintéticos y se clasifican como productos pasivos, interactivos y bioactivos. Los apósitos pasivos no son oclusivos y se usan para cubrir la herida y restaurar su función por debajo. Los apósitos interactivos son semi oclusivos u oclusivos, disponibles en forma de películas, espuma, hidrogel e hidrocoloides.

---

---

Estos apósitos actúan como una barrera contra la penetración de bacterias en el entorno de la herida. El apósito bioactivo se produce a partir de biomateriales que desempeñan un papel importante en el proceso de curación de heridas, son conocidos por su biocompatibilidad, biodegradabilidad y naturaleza no tóxica y se derivan generalmente de tejidos naturales o fuentes artificiales como colágena, ácido hialurónico, quitosano, alginato y elastina. Los polímeros de estos materiales se utilizan solos o en combinación según la naturaleza y el tipo de herida. Los apósitos biológicos a veces se incorporan con factores de crecimiento y antimicrobianos para mejorar el proceso de curación de heridas. Los apósitos están disponibles en forma de películas, espuma, hidrogel, membranas, espumas, fibras, entre otros. Estos apósitos actúan como una barrera contra la penetración de bacterias en el ambiente de la herida [5,37].

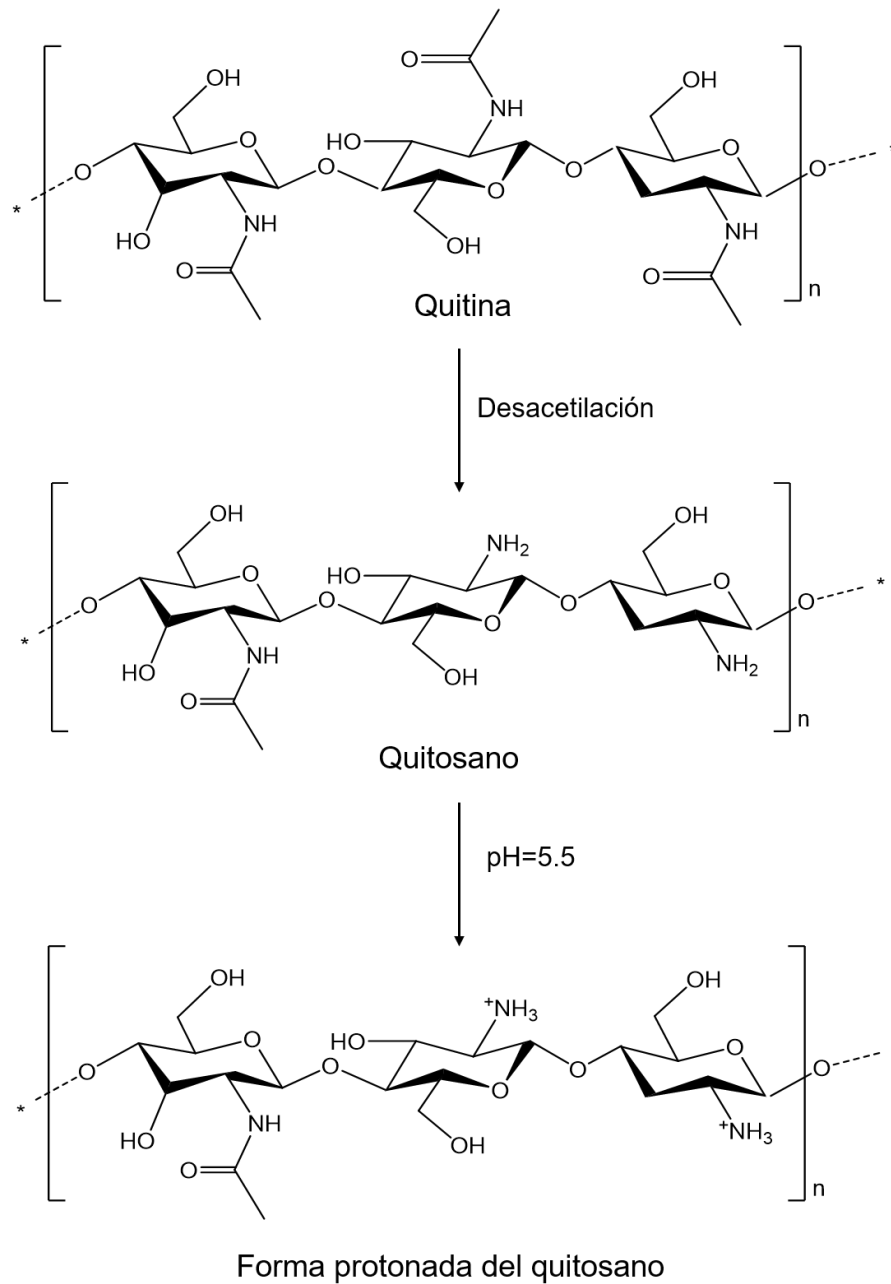
Existen diferentes materiales que pueden ser utilizados como apósitos modernos, entre ellos se encuentra el quitosano, el cual ha sido ampliamente estudiado y se ha reportado que puede favorecer la cicatrización de heridas, ya que mejora la actividad de las células inflamatorias como leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y fibroblastos; además de que puede aumentar la resistencia a la tracción de las heridas [38]. También se ha reportado la actividad del quitosano y sus derivados contra bacterias y hongos [39].

### **3.5. Quitosano**

#### **3.5.1. Origen y obtención del quitosano**

El quitosano es un copolímero de *D*-glucosamina y *N*-acetil-*D*-glucosamina unidos mediante enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$  [40]. Fue descubierto en los hongos por el químico francés Henri Braconnot en 1811 [6], años más tarde se encontró quitina en crustáceos y en el esqueleto externo de insectos. Desde su descubrimiento el estudio y aplicación del polímero ha tomado diversas formas, descubriendo nuevos usos para la quitina y quitosano [38].

El quitosano se obtiene mediante la desacetilación de la quitina (Figura 2) el cual es el segundo biopolímero más abundante, después de la celulosa y el principal componente del exoesqueleto de crustáceos marinos como camarones y cangrejos. La quitina es un biopolímero que se encuentra como microfibrillas cristalinas ordenadas y brinda uniformidad en la estructura y protección [40–42].



**Figura 2.** Desacetilación de la quitina y forma protonada del quitosano. Modificado de Sahariah y Másson [41].

Para comercialarlo, se obtiene por medio del aislamiento de la quitina presente en desechos de mariscos el cual consiste en desproteización (extracción y/o eliminación de proteínas), desmineralización y despigmentación [43].

### 3.5.2. Propiedades fisicoquímicas y biológicas

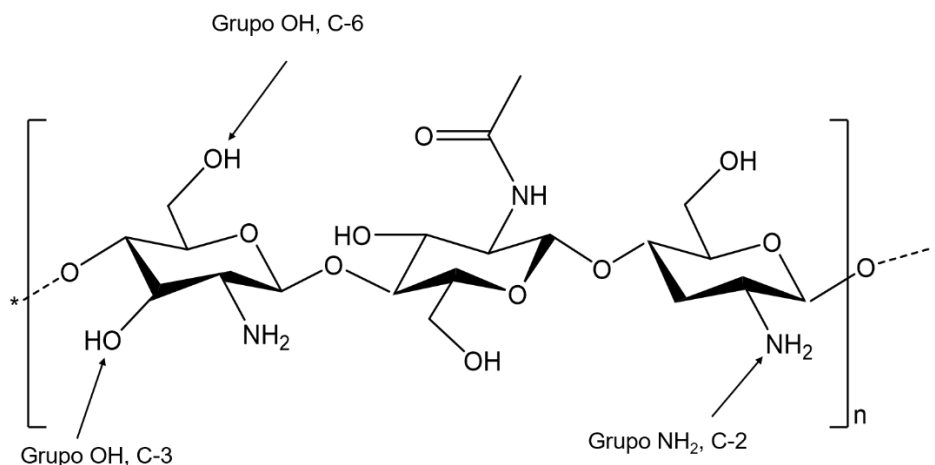
En la tabla 3 se resumen las principales propiedades del quitosano, las cuales son útiles para la creación de un apósito.

**Tabla 3.** Propiedades del quitosano [44].

<p><b>Propiedades químicas y físicas</b></p>	<p>Amino polisacárido lineal con alto contenido de nitrógeno.  Estructura rígida de <i>D</i>-glucosamina  Base débil; el grupo amino desprotonado actúa como un potente nucleófilo (pKa 6.3)  Puede formar puentes de hidrógeno  Consta de grupos reactivos útiles la reticulación y la activación química  Insoluble en agua y solventes orgánicos; soluble en soluciones acuosas ácidas  Forma sales con ácidos orgánicos e inorgánicos  Propiedades quelantes y complejantes  Conductividad iónica</p>
<p><b>Polielectrolito (a pH ácido)</b></p>	<p>Biopolímero catiónico con alta densidad de carga (una carga positiva por residuo de glucosamina)  Agente floculante; interactúa con moléculas cargadas negativamente  Propiedades de atrapamiento, adsorción, filtración y separación</p>

	Capacidad de formación de película; adhesividad
<b>Propiedades biológicas</b>	Biocompatible No tóxico Biodegradable Bioactivo Actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y virus) Antiácido, antiulceroso y antitumoral Anticoagulante Actividad hipolipidémica

El quitosano es una base débil soluble en soluciones ácidas (pH 6.5) e insoluble en agua y solventes orgánicos. Tiene tres tipos de grupos funcionales nucleofílicos: NH<sub>2</sub> en el carbono secundario 2, OH en el carbono secundario 3 y en el carbono primario 6 otro grupo OH (Figura 3). Los derivados del quitosano se han modificado químicamente en alguno de sus grupos funcionales con la finalidad de producir compuestos más hidrofílicos o hidrofóbicos [41]. En ambientes fisiológicos, varias enzimas, como la quitosanasa y la lisozima, degradan el quitosano.



**Figura 3.** Estructura química del quitosano. Modificado de Sahariah y Másson [41].

---

---

Los principales factores que influyen en las propiedades fisicoquímicas del quitosano son peso molecular y el grado de desacetilación, que representan la proporción de unidades desacetiladas [45], el aumento esta propiedad mejora la biocompatibilidad del quitosano [46]. La solubilidad, biodegradabilidad y reactividad del quitosano dependen de la extensión de los grupos amino protonados en la cadena del polímero [43].

El quitosano es conocido por ser biocompatible, lo que permite su uso en diversas aplicaciones médicas como la aplicación ocular, tópica, implantes o inyecciones. Es metabolizado por ciertas enzimas presentes en el cuerpo humano, especialmente la lisozima, por lo que se considera biodegradable. También promueve la curación de heridas y tiene efectos bacteriostáticos, es muy abundante en la naturaleza, y su producción es de bajo costo [45]. Se ha investigado ampliamente el quitosano como material de apósito para heridas porque puede funcionar como promotor de la proliferación, agente antibacteriano y activador de macrófagos. El quitosano despolimeriza gradualmente a *N*-acetil-*D*-glucosamina, lo que inicia la proliferación de fibroblastos, ayuda en la deposición ordenada de colágeno y estimula el aumento de la síntesis de ácido hialurónico natural en el sitio de la herida. Es un agente hemostático, que ayuda a promover la coagulación natural de la sangre y bloquea las terminaciones nerviosas para reducir el dolor. Recientemente, los materiales basados en quitosano se han preparado como fibras, hidrogeles, membranas, esponjas y andamios para aplicaciones de vendajes para heridas [47].

### **3.5.3. Aplicaciones del quitosano**

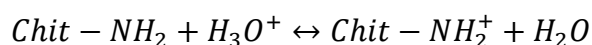
El quitosano ha sido utilizado en una amplia variedad de campos industriales como biomedicina, cosmetología, fabricación de papel, tratamiento de aguas residuales, agricultura, farmacéuticas, entre otros [48]. Se ha empleado como vehículo para formulaciones de liberación sostenida de fármacos por vía oral y como matriz en sistemas de liberación de fármacos en forma de perlas o gránulos. Las diversas aplicaciones del quitosano como biomaterial se basan en sus propiedades de bioactividad, actividad antimicrobiana, inmunoestimulación, acción quimiotáctica,

---

---

mucoadhesión, biodegradabilidad enzimática y permeabilidad epitelial, que refuerzan la adhesión y proliferación de diferentes tipos de células. Ha sido ampliamente estudiado principalmente en dos campos biomédicos; el primero, se ha empleado simultáneamente con quitina en el tratamiento de heridas, úlceras y quemaduras, debido a sus características hemostáticas y su acelerando el efecto de curación de heridas. En segundo lugar, debido a su afinidad celular y biodegradabilidad, se ha empleado en la regeneración y restauración de tejidos, incluida su utilización en perspectiva como material estructural en la ingeniería de tejidos [42].

En el área de tratamiento de heridas, el quitosano, como apósito biológico semipermeable, mantiene un exudado de herida estéril debajo de una costra seca, evitando así la deshidratación y contaminación de la herida para optimizar las condiciones de curación. Se ha descubierto que los apósitos de quitosano provocan reacciones adversas mínimas. Además, es un polímero con varios grupos amino básicos y, por lo tanto, posee una carga catiónica general, especialmente a pH ácido. Esto se debe a la presencia de aminas primarias en la molécula que se unen a los protones de acuerdo con la ecuación 1 [6,38].



**Ecuación 1.** Protonación del quitosano [38].

El quitosano interactúa en varias etapas del proceso de cicatrización de heridas, en la primera fase de cicatrización promueve la infiltración y migración de neutrófilos y macrófagos, además de funcionar como agente hemostático, esto permite limpiar la herida de cuerpos extraños y permite la formación de tejido fibroso y reepitelización. También induce la proliferación de fibroblastos y por lo tanto promueve la migración de neutrófilos polimorfonucleares y la granulación. En la fase de remodelación, cuando hay una producción excesiva de colágena en la herida, el quitosano puede disminuir el tejido cicatricial y permitir que se lleve a cabo un buen proceso de



---

---

reepitelización. El quitosano influye en la expresión de factores de crecimiento para favorecer la cicatrización de la lesión [6].

La importancia del quitosano como agente antimicrobiano ha sido ampliamente estudiada, su capacidad para inhibir el crecimiento microbiano se observa principalmente en medio ácido donde el polímero es soluble y tiene una carga neta positiva, lo cual limita mucho el uso del polímero y ha llevado a derivatizarlo con el objetivo de mejorar la solubilidad en medio acuoso y al mismo tiempo incrementar las propiedades antimicrobianas [41]. La actividad antimicrobiana se ve influenciada por diversos factores intrínsecos, como el grado de polimerización, huésped, composición de nutrientes naturales, composición química de los sustratos y las condiciones ambientales [49].

#### **3.5.4. Mecanismo de acción del quitosano**

El mecanismo exacto de la acción antimicrobiana del quitosano aún se desconoce, pero se han propuesto diferentes mecanismos los cuales se basan en la interacción de la carga positiva en el carbono 2 del monómero de glucosamina con la membrana celular de las bacterias, lo que ocasiona la fuga de los constituyentes proteicos y otros componentes intracelulares [49].

- Bacterias Gram positivo

El quitosano se une de forma no covalente a los ácidos teicoicos presentes en la capa de peptidoglucano, los cuales son importantes para la división celular, protección contra estrés ambiental, control de la actividad enzimática y concentración catiónica en la envoltura celular, además de participar en la unión de la célula a receptores y superficies. Por lo tanto, es probable que la interacción electrostática interrumpa diferentes funciones lo que conduce a la muerte celular. El peso molecular del polímero es un factor importante que influye en la permeabilidad a través de la membrana celular [50].

---

---

- Bacterias Gram negativo

Existen dos mecanismos que se cree que actúan en la membrana externa de las bacterias Gram negativo. El primero está relacionado con el efecto de la quelación del polímero con diferentes cationes, lo cual puede interrumpir la integridad de la pared celular y perturbar la absorción de nutrientes fundamentales ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ). El segundo se basa en la interacción electrostática del quitosano con las partes aniónicas del lipopolisacárido en la membrana externa. Debido a los mecanismos antes mencionados, el quitosano perturba la membrana interna lo que ocasiona la fuga de material intracelular, también puede pasar a través de la membrana celular e interferir con la síntesis de Ácido desoxirribonucleico (ADN) y Ácido ribonucleico (ARN), además de interrumpir la síntesis de proteínas. El quitosano tiene mejores propiedades antimicrobianas a pH menores que su pKa debido a la presencia de los grupos amino protonados [50].

- Hongos

El quitosano afecta la membrana celular a través de las interacciones electrostáticas con los fosfolípidos, posteriormente la membrana celular se rompe y el polímero puede ingresar a la célula y ocasionar la interrupción de síntesis de proteínas e inhibición de la síntesis de ADN y ARN, además de ocasionar la fuga de material intracelular [50].

Se ha informado que la actividad antimicrobiana del quitosano depende de su peso molecular y del grado de desacetilación [51].

### **3.5.5. Modificación de quitosano mediante Radiación Gamma**

El proceso de radiación fue utilizado un en principio para la modificación de polímeros. La radiación de materiales poliméricos con radiación ionizante (rayos gamma, rayos X, electrones acelerados, haces de iones) conduce a la formación de intermediarios muy reactivos, radicales libres, iones y estados excitados. Estos intermediarios pueden seguir varias rutas de reacción que resultan en desproporción, extracción de hidrógeno, arreglos y/o formación de nuevos enlaces.

---

---

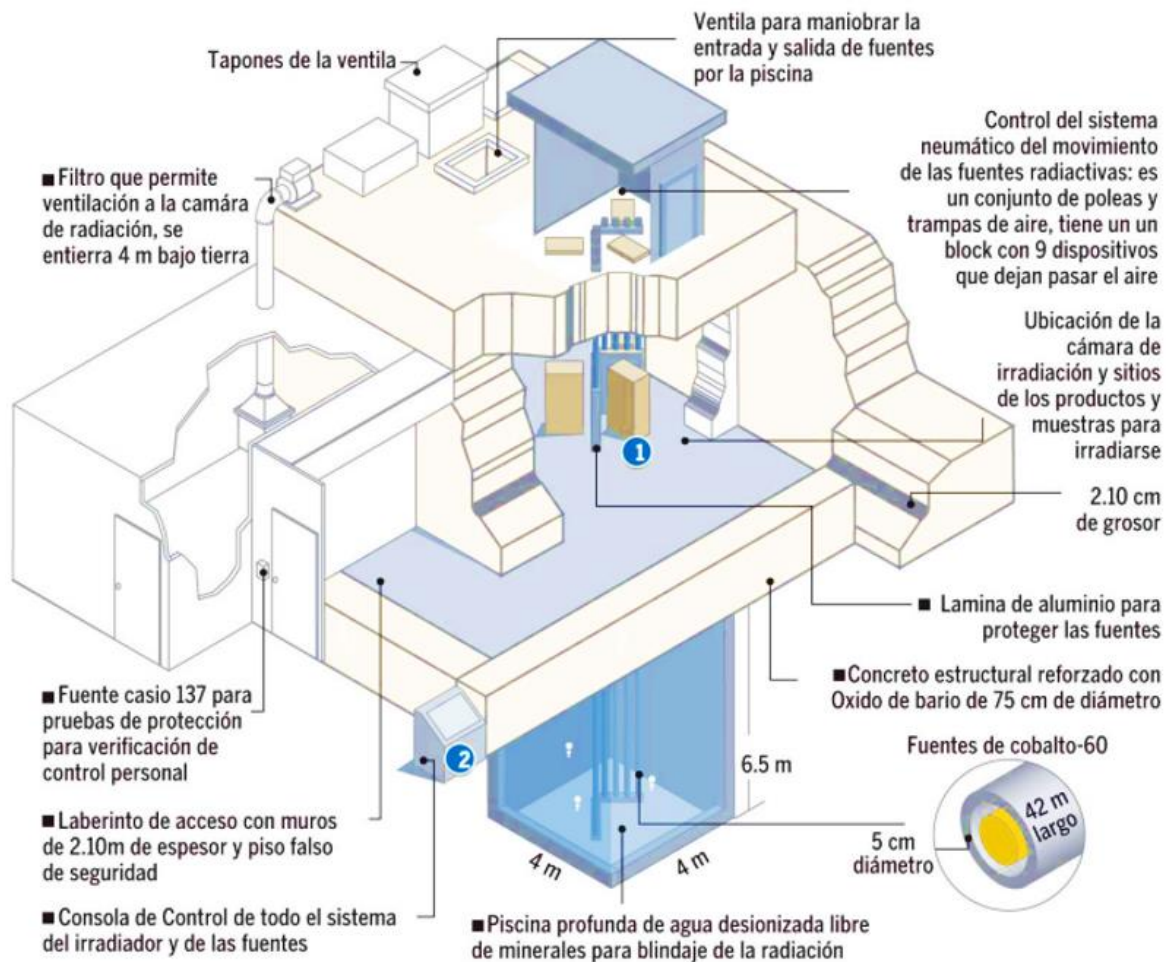
El grado de estas transformaciones depende de la estructura del polímero y de las condiciones de tratamiento antes, durante y después de la radiación. Este proceso se refiere al aumento del peso molecular por la reticulación inducida por la radiación, o la disminución del peso molecular por la degradación a causa de la escisión, o ambas [52].

El procesamiento de polímeros por radiación gamma permite producir nuevos materiales con mejores propiedades que los obtenidos por los métodos químicos. La radiación puede producir un acortamiento de la cadena, promover la polimerización, formar copolimerizaciones o generar entrecruzamiento entre las diferentes cadenas. El tamaño, forma o estructura química de los polímeros favorece uno de estos fenómenos. Además, los materiales obtenidos de esta manera quedan esterilizados facilitando su aplicación en biomedicina. Aplicaciones potenciales de estos nuevos materiales en biomedicina y biotecnología incluyen tratamientos locales, implantes, dispositivos de liberación controlada, inmovilización de enzimas y matrices para cultivo celular [53].

La radiación puede modificar el peso molecular, hidrofiliidad y las propiedades mecánicas del quitosano [52].

El Instituto de Ciencias Nucleares de la UNAM cuenta con un irradiador Gammabeam 651 PT tipo alberca profunda (Figura 4), el cual es utilizado para esterilización de productos industriales y para investigación en cambios de propiedades químicas y físicas de muestras sólidas y acuosas [54,55].

Las fuentes de  $^{60}\text{Co}$  del irradiador Gammabeam 651 PT se encuentran sumergidas en la alberca que contiene agua deionizada, las muestras en general se colocan alrededor del mismo y forman un triángulo en el piso del bunker. Las fuentes suben mediante un sistema neumático desde el fondo de la alberca hacia una posición determinada en la cámara de irradiación donde se irradian las muestras por el tiempo requerido. El tiempo es predeterminado usando el software de la computadora del irradiador [55].



**Figura 4.** Esquema de las partes que componen al Irradiador Gammabeam 651 PT  $^{60}\text{Co}$  [56].

Carhuapoma et al [53] obtuvieron que al irradiar quitosano en medio ácido con rayos gamma, el peso molecular disminuía 80 % con una dosis de 1kGy y que al aumentar la dosis, disminuía la viscosidad.

En un estudio realizado por Matsushashi et al [57] se demostró que la irradiación de quitosano a 100 kGy en condiciones secas fue eficaz para aumentar la actividad antimicrobiana e inhibió el crecimiento de *E. coli* usando una concentración de 3 mg/L; además, el peso molecular del polímero disminuyó significativamente con el aumento de la dosis de irradiación.

---

---

### 3.6. Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

El EDTA y sus sales se usan ampliamente en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, ya que funcionan como agentes quelantes; también se usan para tratar el envenenamiento por metales pesados y reducir el colesterol en la sangre [58]. El EDTA es un agente antimicrobiano para el cuidado de la piel y las heridas. Se ha demostrado que el EDTA previene la formación de biopelículas ya que a bajas concentraciones (0.1 mmol) es capaz de inhibir la adhesión de bacterias. Los agentes antibiopelícula pueden alterar la estructura de la biopelícula en la que están involucrados los microorganismos y, por lo tanto, aumentar los efectos terapéuticos de los antimicrobianos. La aplicación tópica de estos compuestos en las heridas es el tratamiento más directo para infecciones crónicas [59].

El EDTA interactúa con los iones  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  de la pared celular exterior de las bacterias Gram negativo y liberando moléculas de lipopolisacáridos (LPS) y exponiendo los fosfolípidos de la membrana interna, de esta manera se puede mejorar la eficacia de otros agentes antimicrobianos [60].

### 3.7. Aceite de canela

En los últimos años, los aceites esenciales han sido investigados debido a la posible disminución de la resistencia a los antimicrobianos convencionales [61]. Los aceites esenciales se definen como metabolitos secundarios volátiles de las plantas, los cuales otorgan un olor y/o sabor distintivo. Generalmente se obtienen mediante hidrodestilación, destilación por arrastre de vapor o destilación seca [62].

El aceite de canela es un aceite vegetal esencial extraído de la corteza, ramas y hojas del árbol de canela *Cinnamomum verum*. Se compone principalmente de cinamaldehído, o-metoxi-cinamaldehído, benzaldehído, feniletanol, borneol, eugenol, cumarina y ácido cinámico [62]. Tiene aplicaciones en diversos campos, como cosméticos, biomedicina, alimentos, pesticidas y fragancias, debido a su actividad antibacteriana de amplio espectro, repelente de insectos y antioxidante

---

---

[19]. El aceite de canela tiene varias funciones biológicas, entre las que destacan sus propiedades antimicrobianas y sus efectos antioxidantes [63].

Se ha demostrado que el aceite de canela tiene diversas funciones biológicas, como efectos antimicrobianos, antioxidantes y antidiabéticos. Ha sido utilizado en tratamientos para artritis, alteración de la circulación sanguínea, dispepsia, gastritis y enfermedades inflamatorias. También tiene acción ansiolítica, antiulcerogénica, antipirética, analgésica, antitrombótica, antiespática, antiulcerosa y antialérgica [64].

El cinamaldehído presente en el aceite de canela puede tener un efecto sobre la membrana plasmática e inhibir la actividad de la ATPasa unida a la membrana, lo que interfiere con la transferencia de electrones [65]. También, la actividad antimicrobiana del aceite de canela se asocia con una disrupción a la membrana celular que ocasiona la fuga de  $K^+$  intracelular es cual es importante para diversas funciones esenciales, también se inhibe la actividad respiratoria y hay pérdida de actividad enzimática, lo que conduce a la muerte celular [66].

---

---

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo General

Desarrollar una formulación a base de quitosano irradiado, aceite de canela y EDTA disódico como alternativa para el tratamiento a la resistencia bacteriana en heridas.

### 4.2. Objetivos particulares

- Realizar la modificación estructural del quitosano por medio de irradiación gamma.
- Caracterizar fisicoquímicamente el quitosano, quitosano irradiado y EDTA disódico, así como las formulaciones que contienen quitosano y quitosano irradiado.
- Evaluar la actividad antimicrobiana y antibiopelícula contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *S. aureus* de las formulaciones preparadas.

## 5. HIPÓTESIS

La modificación del quitosano mediante radiación gamma incrementará sus propiedades antimicrobianas y al combinarlo con aceite de canela y EDTA disódico, se obtendrá una formulación que integre los mecanismos de acción de sus componentes y se logre un efecto antimicrobiano, útil para el tratamiento de heridas que presentan resistencia bacteriana.

---

---

## **6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

### **6.1. Lista de equipos, materiales y reactivos empleados**

#### **6.1.1. Equipos de laboratorio**

Liofilizadora (Labconco)

Espectrofotómetro de infrarrojo (FTIR Nicolet 6700 (Thermo Fischer Scientific®, USA)

Calorímetro (Q5000, TA Instruments Delaware, USA)

Calorímetro (Q2000, TA Instruments Delaware, USA)

Potenciómetro PHS 3-C

Balanza analítica (Precisa Gravimetrics AG, Suiza)

Campana de flujo unidireccional Clase II (NuAire®)

#### **6.1.2. Materiales de laboratorio**

Papel filtro Whatman®, 70 mm (diámetro), 0.20 µm (poro)

#### **6.1.3. Reactivos**

Quitosano de bajo peso molecular (Aldrich Chemistry, quitina desacetilada poli (D-glucosamina), Lote SLBJ5775V

Ácido acético glacial (Farmacia París)

Ácido etilendiaminoacético (Farmacia Cosmopolita)

Aceite de canela (Farmacia Cosmopolita)

Polisorbato 80 (Farmacia París)

Hidróxido de sodio



---

---

Agua inyectable

#### **6.1.4. Material biológico**

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Staphylococcus aureus* ATCC 2913

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

*Candida albicans*

#### **6.1.5. Medicamentos**

Sulfadiazina de plata (Argentafil® suspensión 1 %, spray, Lote 224691)

### **6.2. Preparación de muestras**

#### **6.2.1. Soluciones**

- Solución de ácido acético glacial 0.5 % v/v.

Se agregó ácido acético glacial a un matraz volumétrico con agua inyectable y se llevó al volumen deseado.

- Solución de hidróxido de sodio 1 M

Se pesó el NaOH necesario y se disolvió con agua inyectable, se llevó a un matraz volumétrico y se aforó al volumen deseado.

- Solución de quitosano 2 % p/v

Se pesó el quitosano y se disolvió en una solución de ácido acético 0.5 %, se agitó hasta homogeneidad.

- 
- 
- Solución de quitosano irradiado 2 % p/v, pH 5.04

Se disolvió el quitosano en una solución de ácido acético glacial al 0.5 % y se agitó hasta disolver por completo el polímero. Posteriormente la solución se sometió a una dosis de 25 kGy de irradiación gamma. La modificación de la solución de quitosano se llevó a cabo en un irradiador Gammabeam 651 PT.

- Solución de quitosano irradiado 2 % p/v, pH 7.08

Se disolvió el quitosano en una solución de ácido acético glacial al 0.5 % y se agitó hasta disolver por completo el polímero. Posteriormente la solución se sometió a una dosis de 25 Kgy de irradiación gamma. La solución se neutralizó con NaOH 1M.

- Solución EDTA 2.0 % p/v

Se pesó EDTA disódico y se agregó agua inyectable para obtener la concentración deseada, posteriormente se agitó con agitador magnético hasta homogeneidad.

- Aceite de canela 1.0 %

A una alícuota de tween 80, se añadió aceite de canela y se agitó en vortex. Posteriormente se añadió ácido acético al 0.5 % v/v hasta obtener la concentración deseada y se agitó en vortex hasta homogeneidad.

### **6.2.2. Formulaciones**

Se planteó comparar las formulaciones que tuvieran quitosano irradiado y no irradiado, además de observar el efecto que se tenía al neutralizar el pH del medio. También se propuso realizar formulaciones sin EDTA disódico con la finalidad de descartar la posibilidad de que el quitosano reaccionara con este componente y por lo tanto disminuyera el efecto antimicrobiano.

---

---

- Formulación A

Se disolvió EDTA disódico en la solución de ácido acético 0.5 %, posteriormente se agregó el quitosano y la mezcla de tween 80 y aceite de canela y se agitó hasta homogeneidad.

- Formulación B, pH 5.04

Se disolvió EDTA disódico en la solución de quitosano irradiado al 2.0 %, se agitó con agitador magnético hasta disolver por completo el EDTA disódico, posteriormente se agregó la mezcla de tween 80 y aceite de canela y se agitó hasta homogeneidad. Por último, se midió pH con un potenciómetro.

- Formulación C, pH 7.18

Se disolvió EDTA disódico en la solución de quitosano irradiado al 2.0 %, se agitó con agitador magnético hasta disolver por completo el EDTA disódico, posteriormente se agregó la mezcla de tween 80 y aceite de canela y se agitó hasta homogeneidad. Posteriormente se neutralizó con NaOH con ayuda de un potenciómetro.

- Formulación D

Se disolvió quitosano en solución de ácido acético 0.5 %, posteriormente se agregó la mezcla de tween 80 y aceite de canela y se agitó hasta homogeneidad.

- Formulación E, pH 5.04

Se agregó la mezcla de tween 80 y aceite de canela en la solución de quitosano irradiado al 2.0 %, se agitó con agitador magnético hasta homogeneidad. Por último, se midió pH con un potenciómetro.

- Formulación F, pH 7.18

Se agregó la mezcla de tween 80 y aceite de canela en la solución de quitosano irradiado al 2.0 %, se agitó con agitador magnético hasta homogeneidad. Posteriormente se neutralizó con NaOH con ayuda de un potenciómetro.

En la tabla 4 se muestran las concentraciones de los excipientes utilizados en las formulaciones desarrolladas.

**Tabla 4.** Concentraciones de las formulaciones.

Formulación	Concentración					
	Quitosano % p/v	Quitosano irradiado % p/v	EDTA disódico % p/v	Aceite de canela % v/v	Tween 80 % v/v	Ácido acético 0.5 % v/v
<b>A</b>	2.03	.	2.04	1.00	5.00	89.93
<b>B</b>	-	1.85	1.86	0.93	4.63	90.73
<b>C</b>	-	1.85	1.87	0.92	4.63	90.73
<b>D</b>	2.01	-	-	1.00	5.00	91.99
<b>E</b>	-	1.89	-	0.94	4.72	92.45
<b>F</b>	-	1.89	-	0.94	4.72	92.45

### 6.3. Caracterización fisicoquímica

#### 6.3.1. Liofilización de las muestras

La solución de quitosano irradiado 2 % y las formulaciones A y B se liofilizaron a -49 °C, 0.05 mBar, durante 24 h.

Las muestras liofilizadas se utilizaron para las pruebas de caracterización fisicoquímica.

---

---

### **6.3.2. Espectroscopía Infrarroja**

Se utilizó la Espectroscopia Infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para determinar los grupos funcionales presentes en las formulaciones A y B, así como en las materias primas quitosano, quitosano irradiado y EDTA disódico. Se utilizó aproximadamente 3 mg de cada muestra. El análisis se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, con mediciones realizadas en un intervalo de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  y una rampa de resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$ , por triplicado.

### **6.3.3. Análisis Termogravimétrico**

El análisis se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM. Las muestras se analizaron por triplicado, usando un intervalo de 0-800 °C bajo atmósfera de nitrógeno.

### **6.3.4. Calorimetría Diferencial de Barrido**

Las muestras se analizaron por triplicado en el Instituto de Investigaciones en Materiales, UNAM. Se usó un intervalo de temperatura de 20-350 °C y una rampa de calentamiento de 10 °C/min.

## **6.4. Evaluación antimicrobiana**

### **6.4.1. Prueba de difusión en agar**

Esta prueba se llevó a cabo en el Anexo del Departamento de Microbiología de la Facultad de Química, UNAM. Se utilizó la técnica de Bauer y Kirby para evaluar la actividad antimicrobiana. Para esto, se impregnaron discos de papel de filtro estéril (5 mm, diámetro) con cada una de las muestras, los discos se colocaron en placas con agar Müeller-Hinton; que fueron previamente inoculados con diferentes cepas microbianas a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. Posteriormente, las placas

---

---

se incubaron a 37 °C durante 24 y 48 horas. Después del tiempo de incubación, se midieron las zonas de inhibición con un vernier digital.

Como control positivo se utilizó sulfadiazina de plata Argentafil®, suspensión al 1% y como control negativo, agua inyectable. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado, para cada una de las cepas microbianas utilizadas.

Las muestras que se usaron para la prueba antes mencionada se describen en la siguiente tabla:

**Tabla 5.** Muestras evaluadas en la prueba de difusión en agar.

<b>Muestra</b>	<b>Especificaciones</b>
<b>1</b>	Solución de ácido acético 0.5 %
<b>2</b>	Solución quitosano no irradiado 2.0 %
<b>3</b>	Solución quitosano irradiado 2.0 % pH 5
<b>4</b>	Solución quitosano irradiado 2.0 % pH 7
<b>5</b>	Solución EDTA en agua 2.0 %
<b>6</b>	Aceite de canela concentrado
<b>7</b>	Aceite de canela 1.0 %
<b>8</b>	Formulación A
<b>9</b>	Formulación B
<b>10</b>	Formulación C
<b>11</b>	Formulación D
<b>12</b>	Formulación E
<b>13</b>	Formulación F
<b>C (+)</b>	Control positivo: sulfadiazina de plata Argentafil®
<b>C (-)</b>	Control negativo: agua inyectable

---

---

#### 6.4.2. Prueba antibiopelícula

El ensayo se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Rehabilitación de la Ciudad de México. Para determinar la actividad antibiopelícula de las formulaciones se utilizó el método de difusión en disco, para cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* se utilizó agar Müller-Hinton, y para *S. aureus* y *C. albicans* el agar Müller-Hinton se suplementó con sangre de oveja al 5 %. Como control positivo se utilizó sulfadiazina de plata Argentafil® suspensión al 1% y como control negativo, agua inyectable. Para la formación de biopelículas, cada placa de agar se inoculó con los microorganismos a una concentración de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL y se incubó a 37 °C durante 24 horas. Posteriormente, los discos impregnados con la formulación y los controles negativos y positivos se colocaron en las placas y se incubaron durante 12 horas a 37 °C. Después de la incubación, se midió la cantidad de biopelícula erradicada por la formación de halos transparentes; que reflejan la eliminación de microorganismos. Finalmente, se midieron los halos de inhibición con un vernier digital. El experimento se realizó tres veces en ensayos independientes.

---

---

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Descripción de las muestras

Con la finalidad de comparar las muestras con quitosano y quitosano irradiado, en la Tabla 6 se comparan las características físicas de algunas muestras.

**Tabla 6.** Características físicas de muestras con quitosano irradiado y no irradiado.

<b>Muestra</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Coloración</b>	<b>Olor</b>
<b>Solución de quitosano 2 % p/v</b>	Semilíquido	Sin color	Ligero olor a ácido acético
<b>Solución de quitosano irradiado 2 % p/v</b>	Líquido	Ámbar	Ligero olor a ácido acético
<b>Formulación A</b>	Semilíquido	Sin color	Canela
<b>Formulación B</b>	Líquido	Ámbar	Canela

La solución de quitosano cambia notoriamente su aspecto físico después de la modificación mediante rayos gamma. Después de la irradiación, la solución pasa de ser transparente a tener un tono ámbar y la viscosidad se ve disminuida.

En un estudio realizado por Zaino, et al. (2009), se irradió quitosano usando diferentes dosis (10, 25, 50 y 100 kGy) y se observó que la intensidad de color de las soluciones era mayor al aumentar la dosis de exposición de rayos gamma, lo cual se podría asociar al aumento de la concentración de enlaces C=O en la solución de quitosano debido a la reacción de escisión de la cadena [67].



---

---

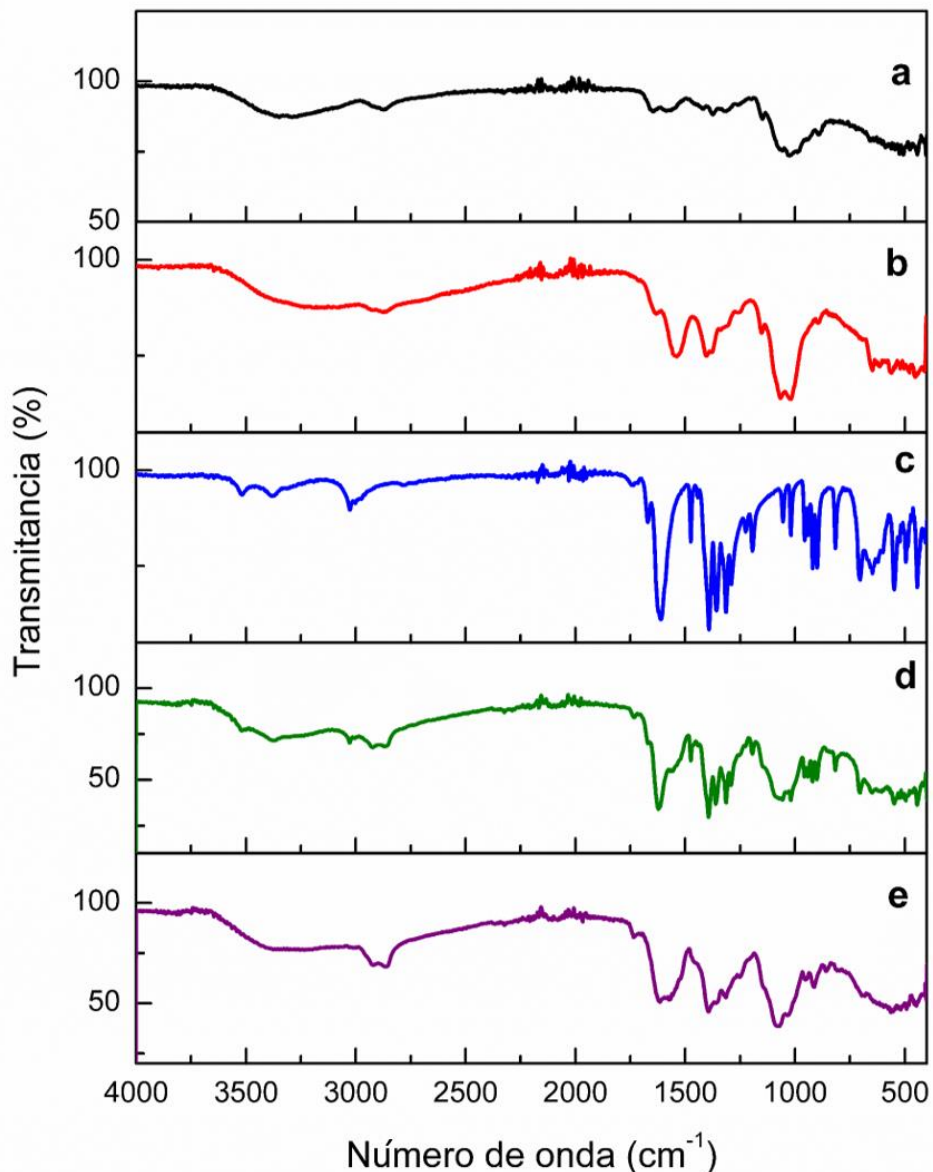
## 7.2. Caracterización fisicoquímica

### 7.2.1. Espectroscopía Infrarroja

La Figura 5 ilustra los espectros de FTIR, para el quitosano y el quitosano irradiado (a y b, respectivamente), en donde aparece una banda en  $3358\text{ cm}^{-1}$  y  $3347\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a las vibraciones de los grupos OH, en  $2872\text{ cm}^{-1}$  y  $2865\text{ cm}^{-1}$  se aprecian las vibraciones asociadas con los grupos  $\text{CH}_3$ . Las bandas en  $1650\text{ cm}^{-1}$  y  $1632\text{ cm}^{-1}$  se deben a la presencia de grupos amida. La vibración asimétrica de CO se observa en las bandas  $1147\text{ cm}^{-1}$  y  $1151\text{ cm}^{-1}$ , estas son el resultado de la desacetilación del quitosano [68]. Comparando los espectros de quitosano y quitosano irradiado, las bandas de los principales grupos funcionales se ven claramente en ambos, sin embargo, los picos en el intervalo de  $1650\text{ cm}^{-1}$  a  $800\text{ cm}^{-1}$  son más pronunciados para el quitosano irradiado, lo que podría estar asociado con la presencia de un mayor número de grupos funcionales (amida,  $\text{C}=\text{O}$ ) debido a la despolimerización, lo que provoca una mayor señal en los espectros [67,68]. También se observa que la banda asociada a los grupos OH ( $3358\text{ cm}^{-1}$  y  $3347\text{ cm}^{-1}$ ) es más amplia en la muestra de quitosano irradiado, lo cual se asocia a que contenía una mayor cantidad de agua debido a que el polímero es higroscópico [69].

El espectro FTIR del EDTA disódico se muestra en la Figura 5c, en donde los enlaces de CO están representados en la banda que se presenta en  $1674\text{ cm}^{-1}$ , mientras que el estiramiento de  $\text{CH}_2$  y OH se muestran a  $1476$  y  $1390\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Además, el pico en  $1020\text{ cm}^{-1}$  representa el enlace CN [70].

Comparando los espectros 5d y 5e, que corresponden a las formulaciones A y B, respectivamente, se aprecia que coinciden en la mayoría de las bandas, que corresponden a las observadas en la materia prima. Además, hay bandas que no se ven en los espectros que corresponden a los excipientes utilizados (5a, 5b y 5c) que pueden estar asociadas con los otros componentes de la formulación los cuales no se caracterizaron fisicoquímicamente (aceite de canela y tween 80).



**Figura 5.** Espectro de FTIR de quitosano (a), quitosano irradiando (b), EDTA disódico (c), formulación A (d) y formulación B (e).

Una manera de calcular el grado de acetilación (DA) o desacetilación (DD) del quitosano es a partir del análisis de Espectroscopía Infrarroja, mediante el uso de diversas ecuaciones descritas en la literatura, dichas ecuaciones se derivaron de curvas de calibración en donde el DD se determinó por métodos como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [71].

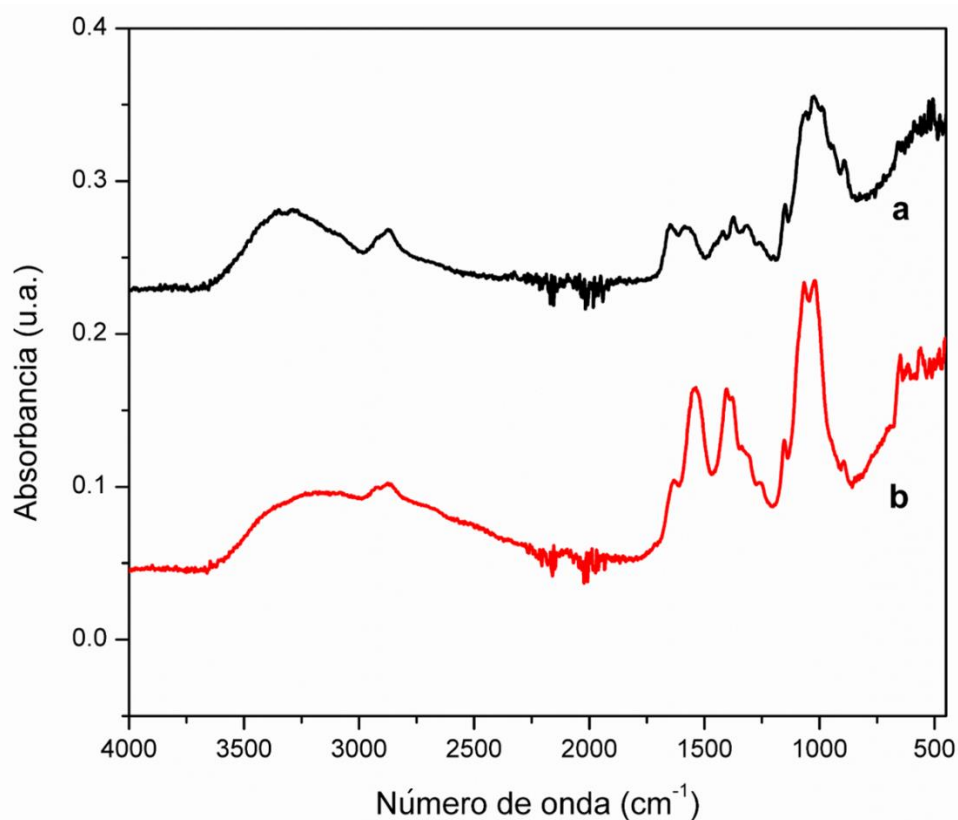
---

---

La ecuación 2 se usó para determinar el grado de acetilación debido a que relaciona la absorbancia de las bandas asociadas a los enlaces C=O (perteneciente a la amida primaria) y a CH.

$$\% DA = \left( \frac{A_{C=O}}{A_{CH}} \right) * \left( \frac{100}{1.33} \right)$$

**Ecuación 2.** Porcentaje del grado de acetilación [71] [72].



**Figura 6.** Espectro de FTIR de quitosano (a) y quitosano irradiado (b).

Las bandas fueron seleccionadas de la Figura 6, en donde las absorbancias para los enlaces C=O y CH son las siguientes para quitosano y quitosano irradiado, respectivamente.

$$A_{C=O} = A_{1647} = 0.04878$$

$$A_{CH} = A_{2872} = 0.04601$$

---

---

$$A_{C=O} = A_{1632} = 0.06489$$

$$A_{CH} = A_{2873} = 0.06380$$

Aplicando la Ecuación 2, se obtuvo que el % DA es de 79.71 % para quitosano y 76.47 % para quitosano irradiado. A pesar de que se obtuvo un % DA mayor para el quitosano sin modificar, la diferencia es muy poca entre los dos valores, por lo que no se considera un valor que refleje por completo la pérdida del grupo acetilo a causa de la modificación mediante radiación gamma.

Se sabe que el peso molecular, el grado de polimerización y el grado de desacetilación del quitosano son los principales factores que modulan sus actividades biológicas [73] por lo que al incrementar el grado de desacetilación a causa de la modificación mediante irradiación gamma, se podría mejorar la actividad antimicrobiana del polímero.

La técnica de Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier puede ayudar a estimar un valor aproximado de grado de desacetilación del quitosano, sin embargo, se pueden tener problemas asociados con la reproducibilidad, la absorbancia de los picos puede estar influenciada por la humedad de las muestras, además de que el equipo y su manejo puede influir en los resultados [71]. Por lo anterior, se recomienda comparar y complementar dichos resultados con otras técnicas, como RMN, Espectrometría UV, técnicas potenciométricas, entre otras, en donde se realicen curvas de calibración para que el resultado obtenido sea más confiable.

### **7.2.2. Análisis termogravimétrico**

En la Figura 7a y 7b, entre 40 °C y 150 °C se observa una ligera pérdida de masa relacionada con la humedad de las muestras, entre 270 °C y 310 °C se aprecia un evento térmico para el quitosano el cual se relaciona con las principales reacciones

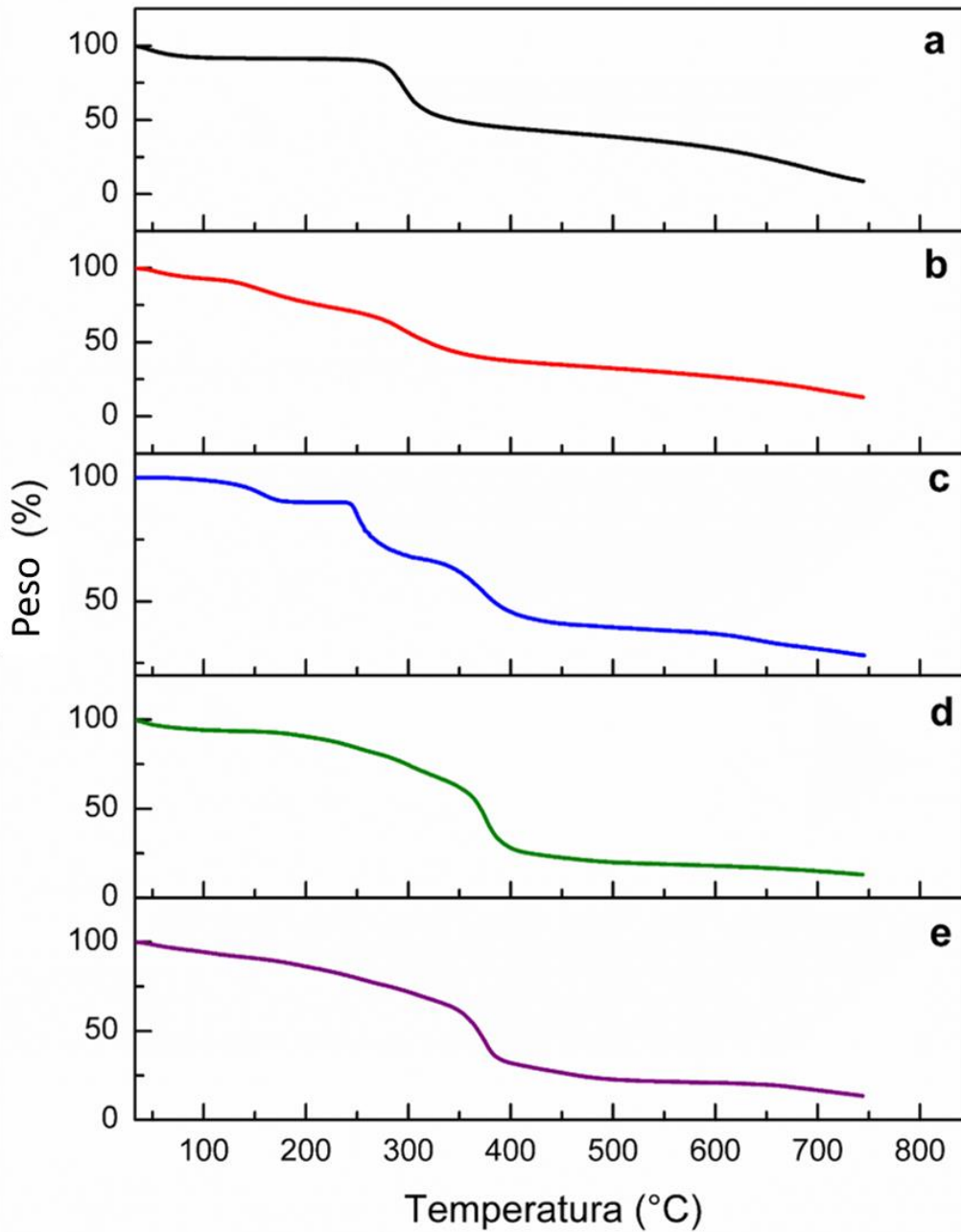
---

---

de degradación del polímero. Para el quitosano irradiado, las reacciones de degradación se llevan a cabo bajo una menor temperatura ya que empiezan alrededor de 130 °C y terminan en 360 °C, lo que sugiere que el peso molecular es menor en comparación con el quitosano no irradiado, ya que requiere una menor energía para degradarse [68], también sugiere que la estabilidad térmica de la molécula de quitosano disminuye cuando se modifica, en este caso, por la radiación gamma [74]. En este primer evento térmico se pierde aproximadamente el 60 % de la masa para ambas muestras. Posteriormente, tanto para el quitosano como para el quitosano irradiado, entre 370 °C y 570 °C se presenta una ligera meseta en donde la pérdida de peso es de aproximadamente 10 %. Por último, a partir de 660 °C y 730 °C se presenta el último evento térmico, en donde se llega al 10 % de la muestra inicial.

La Figura 7c muestra la degradación térmica del EDTA disódico, donde, entre 40 °C y 180 °C hay una pérdida del 10 % de peso, lo que se podría asociar a la evaporación de agua. Después, el mayor porcentaje de degradación se encuentra en el intervalo de 228 °C a 454 °C, pasando del 90% al 40% de peso. Por último, hay una pérdida de peso de 40 % a 27 % la cual ocurre de manera lenta entre 470 °C y 745 °C.

Comparando los termogramas de las formulaciones A y B (7d y 7e, respectivamente), se observa que en general el comportamiento de la degradación térmica es bastante parecido, entre 38 °C y 115 °C hay una pérdida de masa del 7% aproximadamente, relacionado a la evaporación del agua presente en las muestras. De 115 °C a 450 °C se pierde aproximadamente el 70 % de la masa, por lo que es en este intervalo de temperatura en donde se pueden llevar a cabo la mayoría de las reacciones de degradación de los componentes. Existe una ligera diferencia en el intervalo de temperatura de 80 °C -380 °C en el que el sistema con quitosano irradiado se degrada un poco más rápido que el sistema con quitosano no irradiado, esto podría asociar que en la formulación irradiada contiene quitosano con menor peso molecular, por lo que se necesita menos energía para degradarlo



**Figura 7.** Espectro de TGA de quitosano (a), quitosano irradiado (b), EDTA disódico (c), formulación A (d) y formulación B (e).

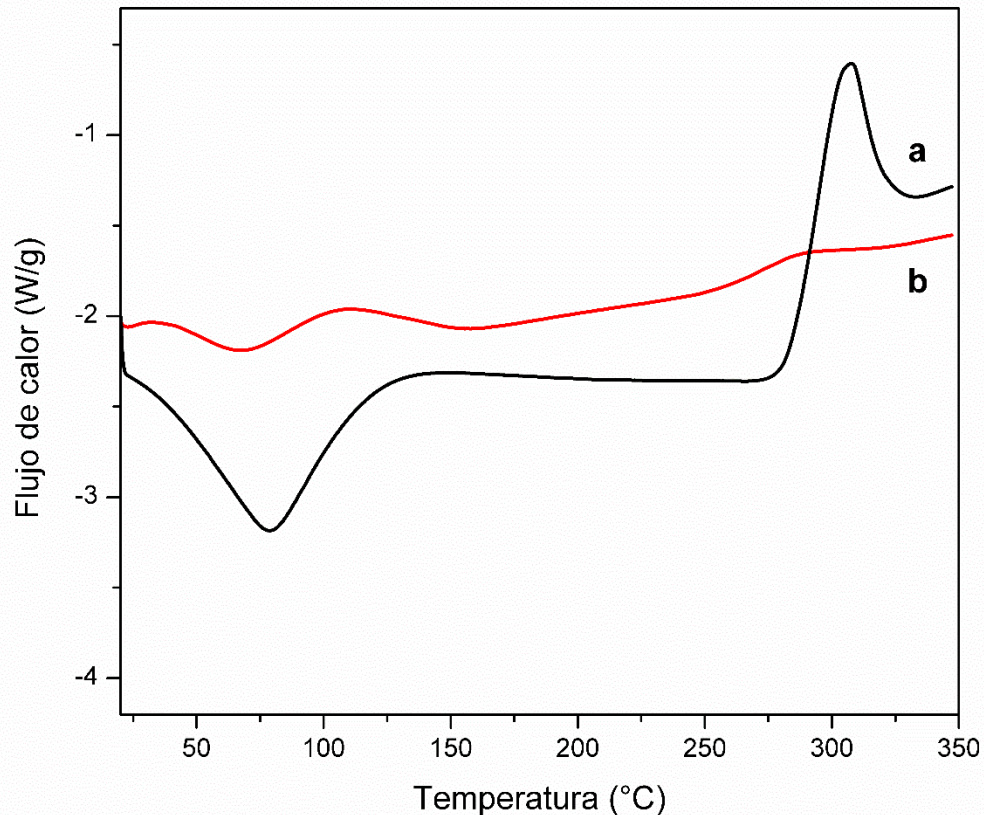
---

---

### 7.2.3. Calorimetría diferencial de barrido

La Figura 8 muestra entre 20 °C y 130 °C el primer evento térmico para quitosano y quitosano irradiado (a y b, respectivamente) que corresponde a un pico endotérmico que está asociado con la pérdida de agua relacionado con los grupos hidrofílicos de quitosano, se sugiere que el quitosano irradiado se encuentra más hidratado debido a que estaba previamente en una solución de ácido acético y posteriormente se liofilizó, en cambio el quitosano sin irradiar se encontraba en forma sólido. Para la muestra de quitosano (8a) entre 130 y 270 °C existe una meseta en donde no se aprecian eventos térmicos, posteriormente, en 270 °C empieza un pico exotérmico que alcanza un mayor flujo de calor en 306 °C, el cual está relacionado con la degradación térmica de la molécula, en específico a la deshidratación de los monómeros, escisión del enlace glucosídico y a la descomposición de las aminas presentes en la muestra [75–77] este evento térmico concuerda con el presentado en el análisis termogravimétrico (Figura 7), en donde se pierde la mayor cantidad de masa del polímero.

En el espectro de DSC de la muestra de quitosano irradiado (Figura 8b) se presenta un pico endotérmico entre 30 y 90 °C; posteriormente se aprecia un pico exotérmico que termina en 150 °C aproximadamente, dicho pico no se aprecia en la muestra de quitosano (Figura 8a), esto podría deberse a que al despolimerizar al quitosano mediante la radiación gamma, se necesita una menor energía para degradarlo. Posteriormente, entre 155 °C y 300 °C el cambio del flujo de calor parece ser constante al aumentar la temperatura, y no se aprecia por completo un pico exotérmico que indica la degradación de la muestra, a diferencia del espectro de quitosano.



**Figura 8.** Espectro de DSC de quitosano (a) y quitosano irradiado (b).

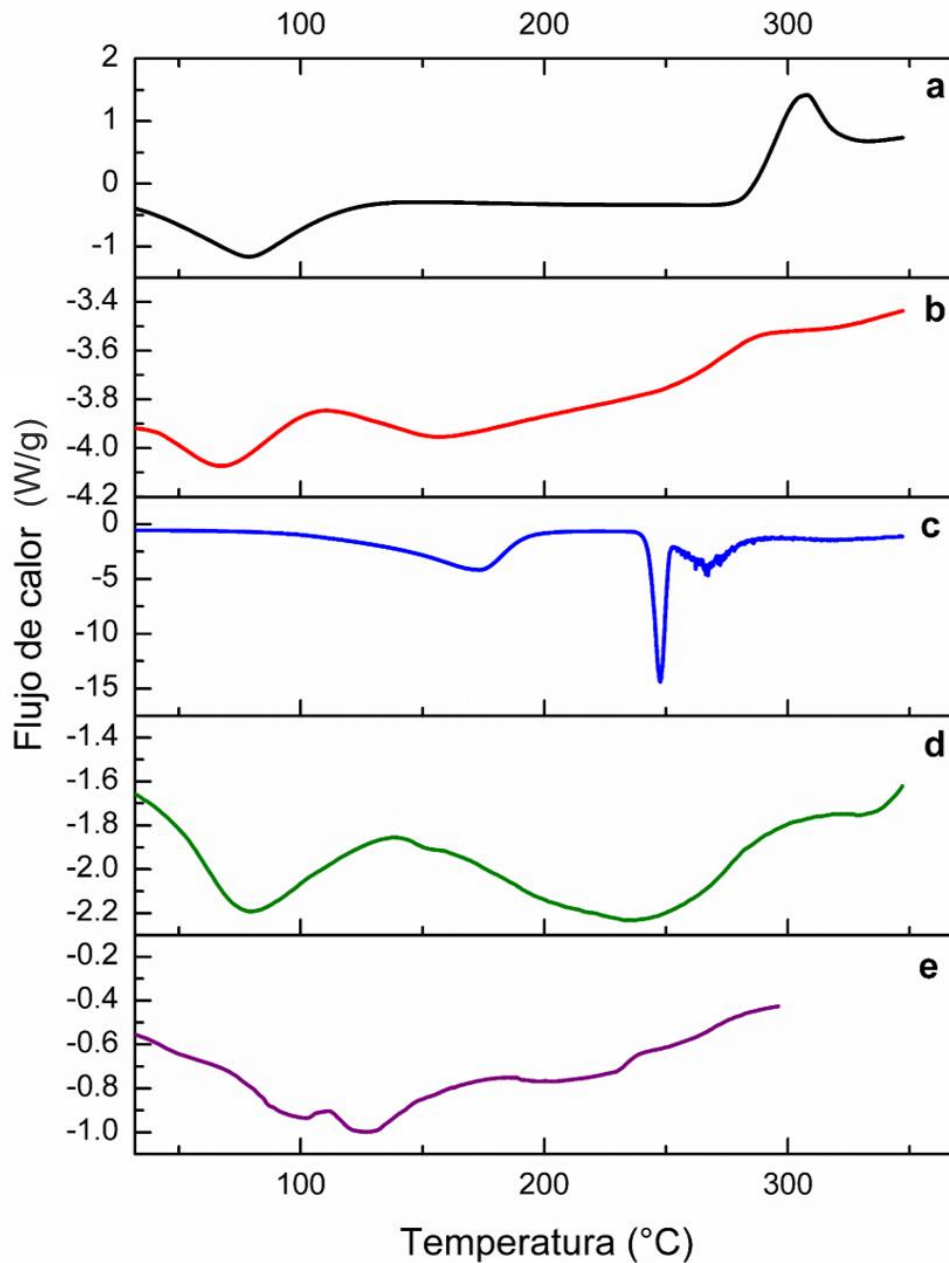
En la Figura 9c se observan 3 eventos endotérmicos, el pico entre 86 °C y 200 °C indica la fusión del EDTA disódico. Además, los eventos térmicos coinciden con los reportados en la literatura [70,78,79]. El segundo pico endotérmico se encuentra entre 235 °C y 255 °C y el tercero se aprecia inmediatamente después de éste.

En la Figura 9d se muestra el espectro de DSC que corresponde a la formulación A, en donde entre 7 °C y 145 °C se encuentra el primer pico endotérmico, seguido de un segundo pico endotérmico que termina en 320 °C. La Figura 9e indica el perfil térmico de la formulación B, en donde, al igual que se observó en el perfil de TGA, los eventos térmicos de los excipientes se mezclan debido a la interacción de ellos en el proceso de obtención de la formulación.

Comparando las líneas d y e de la Figura 9, se puede observar que existen cambios que se puede asociar a la despolimerización del quitosano. En la línea se muestra



el perfil térmico de la formulación debido a que los eventos térmicos de los excipientes se mezclan debido a la interacción de ellos en el proceso de obtención de la formulación.



**Figura 9.** Espectro de DSC de quitosano (a), quitosano irradiado (b), EDTA disódico (c), formulación A (d) y formulación B (e).

---

---

### 7.3. Evaluación antimicrobiana

#### 7.3.1. Prueba de difusión en agar

Para determinar la capacidad antimicrobiana de las muestras, se realizaron pruebas de inhibición en cuatro de las cepas características como oportunistas en la cicatrización de heridas. Los halos de inhibición obtenidos se midieron a las 24 h y a las 48 h después de incubar a 37 °C, para realizar el análisis se eligieron los resultados de 48 h debido a que los halos se apreciaban mejor. Con la finalidad de comparar el efecto antimicrobiano de las muestras, se realizó un análisis estadístico de medias utilizando el programa Statgraphics.

Primero, se observó que la solución de ácido acético 0.5 % (muestra 1) presenta por sí sólo un efecto antimicrobiano para 3 de las 4 cepas evaluadas, lo que indica que juega un papel importante en conjunto con los demás componentes de la formulación. Posteriormente se comparó la actividad antimicrobiana del quitosano y la del quitosano irradiado (muestras 2 y 3, respectivamente), encontrando que el quitosano en solución de ácido acético presenta inhibición para las 4 cepas evaluadas, mientras que el quitosano irradiado sólo presenta actividad antimicrobiana para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*, encontrando sólo diferencia significativa para *P. aeruginosa* entre ambas muestras. Se esperaba un comportamiento contrario, en el que el quitosano modificado tuviera mayor actividad antibacteriana y antifúngica; sin embargo, este resultado puede deberse a que la dosis de radiación gamma no fue suficiente para despolimerizar a un mayor grado al quitosano, por lo que en la solución de polímero irradiado se tendría una mezcla con quitosano con diferentes pesos moleculares.

Para observar el efecto del pH del medio sobre la actividad del quitosano, se compararon las muestras 3 y 4, las cuales difieren en el valor de pH; la muestra 3 tiene un valor de pH=5 y la muestra 4 es de pH=7. Se encontró que al neutralizar el medio no había inhibición para *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans*; mientras que el efecto para *E. coli* se mantuvo sin cambios, de modo que, al aumentar el pH del medio por encima del pKa del quitosano irradiado, pierde significativamente sus propiedades antimicrobianas, lo cual radica en que cuando el polímero se encuentra

---

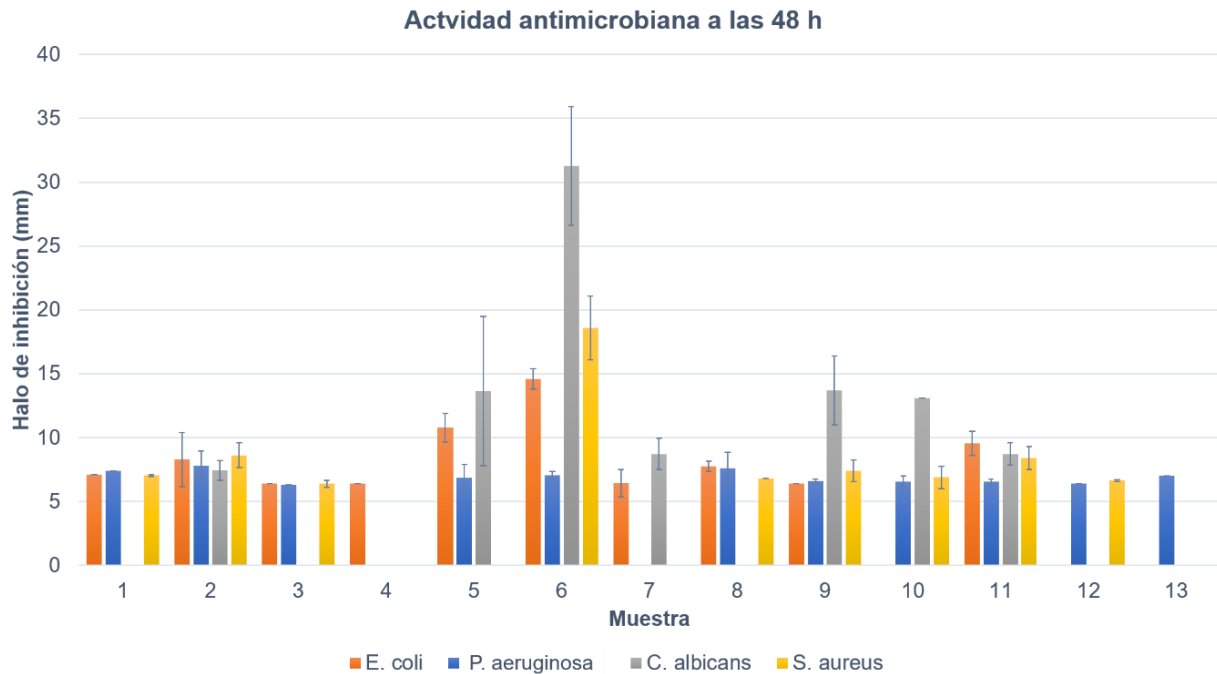
---

en un medio con pH por encima de su pka, está desprotonado y por lo tanto no hay cargas positivas que puedan interactuar con la membrana celular de los microorganismos. La influencia del pH del medio también pudo observarse entre las muestras 9 y 10, además de las muestras 12 y 13; en donde la diferencia radicaba en el valor de pH y se obtuvo que al neutralizar el medio se perdía el efecto antimicrobiano y antifúngico.

Las muestras 5, 6 y 7 se evaluaron para comprobar la actividad antimicrobiana y antifúngica que tienen el EDTA disódico y el aceite de canela por sí solos. El aceite de canela concentrado mostró una mayor actividad que el EDTA disódico al presentar inhibición para las 4 cepas, en donde, para *E. coli* y *S. aureus*, no hubo diferencias significativas con respecto al control positivo; pero al disminuir la concentración se perdió actividad contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*, sin embargo, al considerar que se pasa de una concentración de 100 % a 1 % aproximadamente, la actividad antimicrobiana no disminuye radicalmente.

En la muestra 8 se observa que la formulación que contiene quitosano sin irradiar, aceite de canela y EDTA disódico no presenta actividad antifúngica contra *C. albicans*, mientras que al modificar el quitosano (muestra 9) sí se presenta inhibición para dicha cepa. Además, para la muestra 9 se obtuvo que no existe una diferencia significativa con respecto al tratamiento contra *C. albicans* entre la formulación desarrollada y el 1% de sulfadiazina de plata, utilizada como control positivo.

Para verificar la influencia del EDTA disódico en la formulación, se compararon dos formulaciones con quitosano irradiado en las que una de ellas no tenía EDTA (muestras 9 y 12) y se obtuvo que en esta formulación el efecto se perdió para *E. coli* y *C. albicans*, mientras que para *P. aeruginosa* y *S. aureus*, el efecto antibacteriano se mantuvo igual que la formulación que contiene dicho excipiente. El quitosano al estar protonado puede unirse a las cargas negativas, mientras que el EDTA disódico, al tener cargas negativas, podría interactuar con el polímero y disminuir su efecto antimicrobiano; sin embargo, se observó que la interacción entre estas moléculas no afecta su mecanismo de acción contra bacterias y hongos.



**Figura 10.** Actividad antimicrobiana contra las cepas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *S. aureus* de las muestras de solución de ácido acético 0.5 % (1), solución quitosano no irradiado 2.0 % (2), solución quitosano irradiado 2.0 % pH 5 (3), solución quitosano irradiado 2.0 % pH 7 (4), solución EDTA en agua 2.0 % (5), aceite de canela concentrado (6), aceite de canela 1 % (7), formulación A (8), formulación B con pH 5 (9), formulación C con pH 7 (10), formulación D (11), formulación E con pH 5 (12), formulación F pH 7 (13).

Se obtuvo que la muestra 9 (Figura 10), la cual contiene quitosano irradiado, EDTA disódico y aceite de canela, presenta inhibición contra las cuatro cepas evaluadas. El porcentaje de inhibición de la formulación con respecto al control positivo fue: 43.64% para *E. coli*, 42.86% para *P. aeruginosa*, 80.27% para *C. albicans* y 42.31% para *S. aureus*. Esta formulación combina los mecanismos antimicrobianos de sus componentes.

Como control positivo, se eligió la sulfadiazina de plata porque es un tratamiento ampliamente utilizado para la curación de heridas [80]; funciona, por un lado, inhibiendo la síntesis de ADN por la sulfadiazina, y por otro lado, los iones de plata reaccionan con los grupos sulfhidrilo de las enzimas bacterianas y el ADN [81].

---

---

La formulación combina los mecanismos antimicrobianos de EDTA disódico, quitosano irradiado en medio ácido y aceite de canela. Todos estos componentes presentan actividad antimicrobiana, por lo que la combinación de ellos hace que la formulación sea una potente opción natural. El control positivo mostró una inhibición más alta que la formulación, debe tenerse en cuenta que la formulación no es un antibiótico.

El mayor porcentaje de inhibición usando la formulación B, se obtuvo con la cepa de *C. albicans*, esto podría estar relacionada con la presencia de EDTA, debido a que este agente tiene un potencial antifúngico. La propiedad quelante de EDTA tiene un papel crítico en la morfogénesis y la patogénesis de *C. albicans* [82]. La inhibición de diferentes cepas por la canela en aceite ya se ha investigado mostrando resultados interesantes. Seenivasan Prabuseenivasan et al. [83] investigaron sobre la inhibición de diferentes tipos de aceites naturales, para el aceite de canela la inhibición frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* fue de 13.7 mm, 21 mm y 21 mm, respectivamente. Estos valores son más altos que los valores de inhibición de formulación (7.3, 6.6 y 6 mm); sin embargo, la concentración utilizada de aceite de canela fue de 1:20, mientras que para nuestra experimentación fue de 1: 100, lo que demuestra que el nivel de inhibición está relacionado con la dosis. Sara Carvalhinho et al. [84] analizaron la inhibición del aceite de canela (15 µl), obteniendo un halo de 35 mm. Estos resultados mostraron que es necesaria una alta concentración de aceite de canela para obtener una inhibición notable; sin embargo, las altas concentraciones de este aceite esencial natural podrían generar efectos de citotoxicidad en los fibroblastos [85].

Por otro lado, un mecanismo propuesto en donde se usa una baja concentración de quitosano sugiere que el polímero se une a la membrana celular por medio de los grupos amino, esto produce el desplazamiento de  $K^+$  unido a la superficie y altera el equilibrio que resulta en el flujo de salida los iones, posteriormente se produce una hiperpolarización de la membrana plasmática debido a la salida de iones  $K^+$ , lo que conduce a un aumento en la absorción de  $Ca^{2+}$  y, posteriormente, la respiración y la fermentación se ven afectadas [86]. El grupo amino con carga catiónica también

---

---

puede combinarse con componentes aniónicos como el ácido N-acetilmurámico, el ácido siálico y el ácido neuramínico, en la superficie celular, y puede suprimir el crecimiento bacteriano al deteriorando los intercambios con el medio, quelando iones de metales de transición e inhibiendo enzimas [86–88].

La actividad antifúngica contra *C. albicans* es mayor cuando el peso molecular es bajo y el grado de desacetilación es alto, el quitosano interactúa con la pared celular debido a la presencia de ácido siálico en él, lo que causa una alteración en la permeabilidad y, en consecuencia, la filtración de componentes intracelulares que pueden inhibir la síntesis de ADN y ARN [89].

Por lo tanto, la actividad combinada de EDTA, quitosano y aceite de canela se probó frente a *C. albicans*. El efecto inhibitorio de la formulación sobre *C. albicans* es de gran importancia para el tratamiento de heridas crónicas, como las úlceras del pie diabético debido a que se ha informado que los miembros del género *Candida spp.* son las levaduras más comúnmente aisladas de estas infecciones [32].

Para las bacterias Gram positivo (*S. aureus*) y Gram negativo (*E. coli* y *P. aeruginosa*), el porcentaje de inhibición no fue tan alto con respecto al control positivo, sin embargo, se observó el efecto antimicrobiano con la inhibición halos.

Se ha informado que *C. albicans* es altamente resistente a la acción de agentes antimicrobianos como la anfotericina B, la clorhexidina, la nistatina y el fluconazol [90]. Por esta razón, es necesario encontrar nuevas formulaciones que puedan atacar esta cepa. Hay varios factores que afectan la actividad biológica del quitosano, como el peso molecular, el grado de polimerización y el grado de desacetilación [73]. Estos elementos están relacionados con la modificación realizada al quitosano, por lo que las condiciones de radiación gamma pueden influir en la actividad del polímero. Además, la formulación evaluada contiene EDTA disódico y aceite de canela, que contribuyen a la actividad antimicrobiana. El quitosano tiene grupos amino que se protonan fácilmente en un medio ácido, lo que conduce a la interacción electrostática de compuestos aniónicos, entre ellos aniones metálicos [91], por lo tanto, el quitosano puede interactuar con EDTA y con el  $\text{Na}^{2+}$ ,

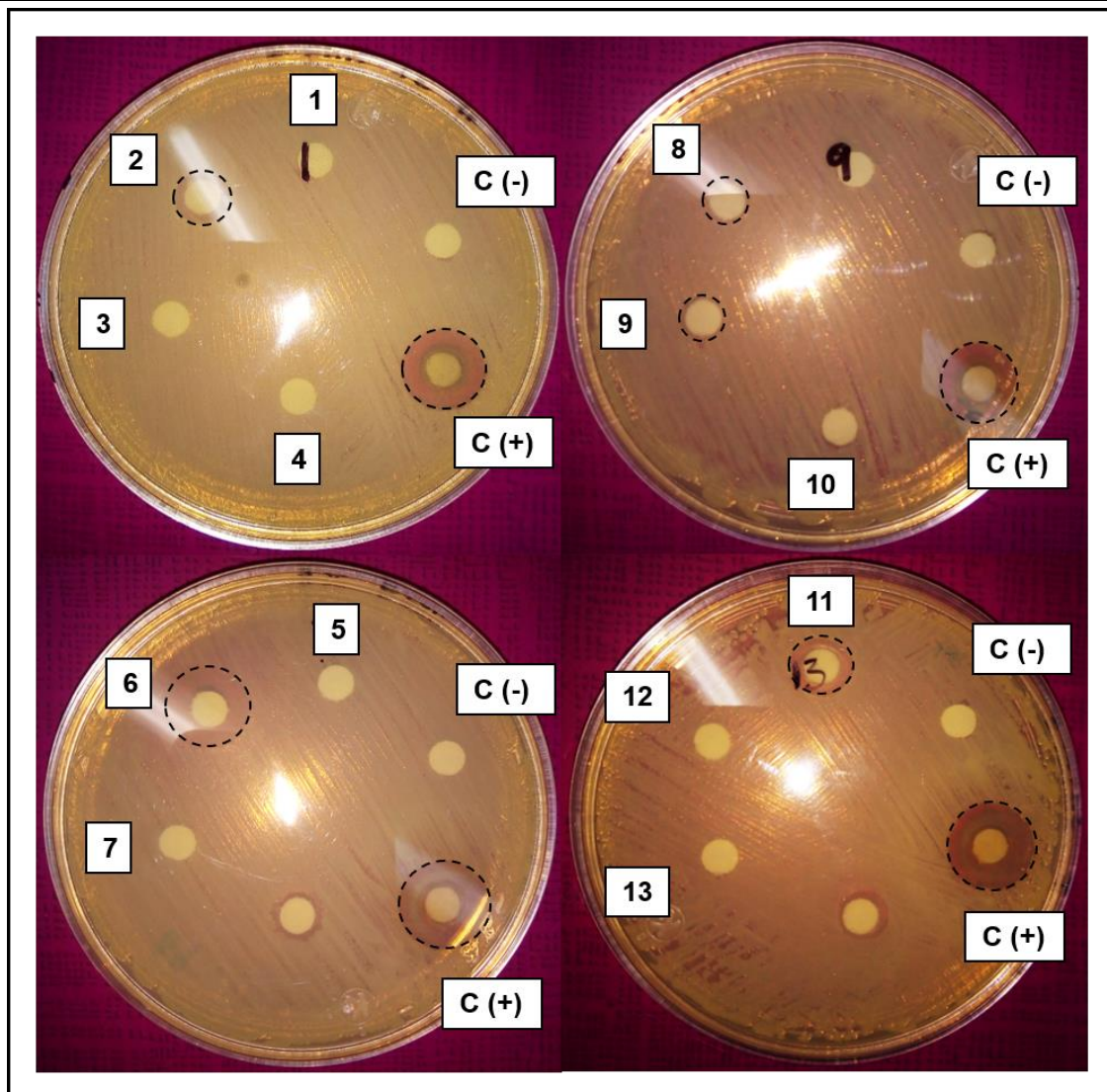
---

---

lo que causaría una disminución de la actividad antimicrobiana al disminuir la interacción de quitosano y EDTA disódico con la membrana celular.

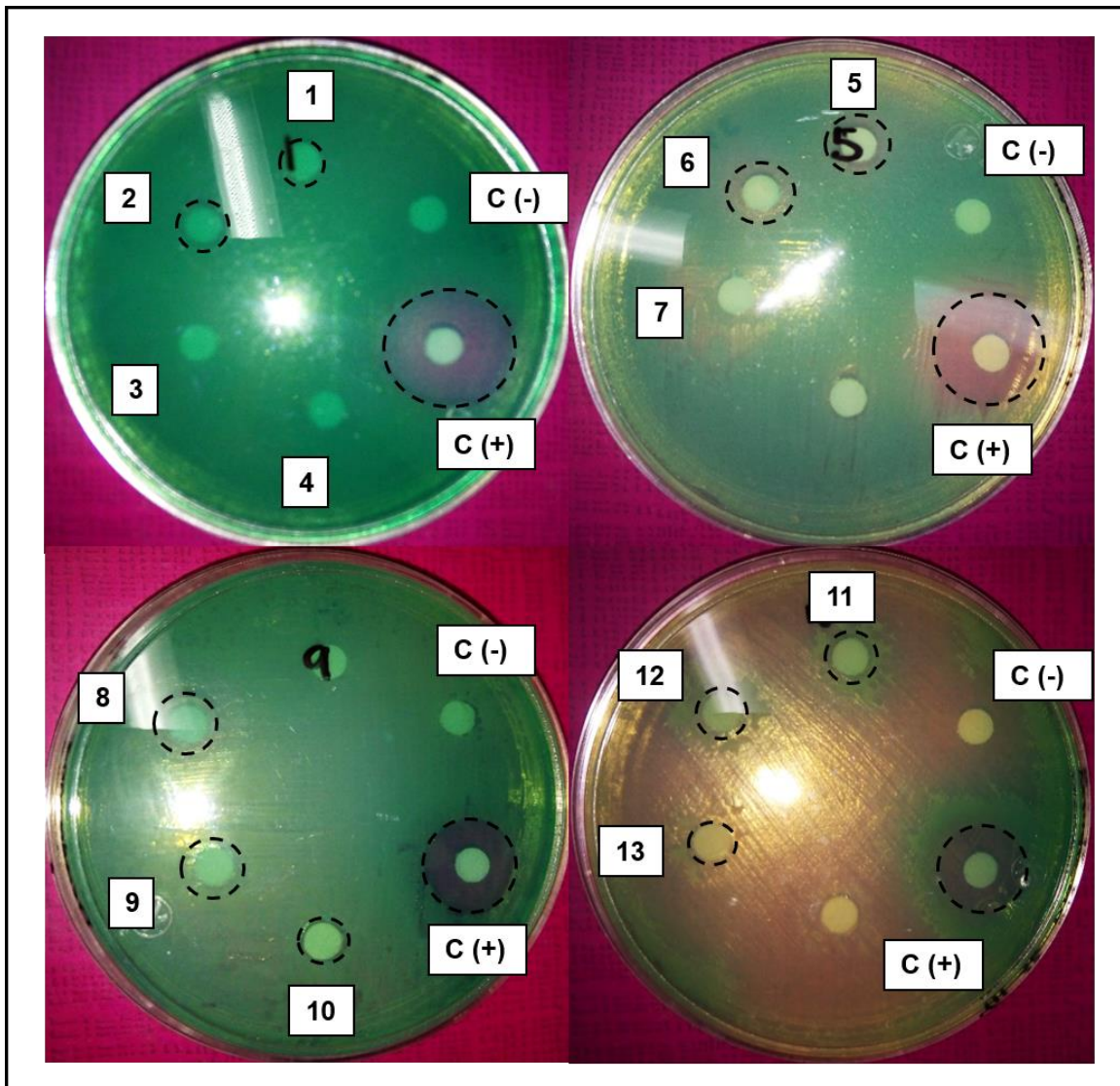
La actividad antimicrobiana y antifúngica obtenida se puede comparar con otros estudios recientes. Peña et al [86] recomiendan que para obtener un efecto antifúngico y no solo fungistático del quitosano, se deben usar concentraciones superiores a 1,0 mg/ml. El uso de quitosano también podría usarse junto con otro medicamento antimicótico y ser un tratamiento prometedor para las infecciones por hongos en humanos[92]. Lo que sugiere que la formulación desarrollada podría ser uno de estos tratamientos ya que combina el mecanismo antibacteriano y antifúngico de otros elementos, además de la modificación del quitosano.

En las Figuras 11, 12, 13 y 14 se observan los halos de inhibición que se presentaron después del tratamiento con las muestras utilizadas después de 48 h de incubación. Por cada caja Petri se usó un control positivo y un control negativo, además el ensayo se realizó por triplicado.

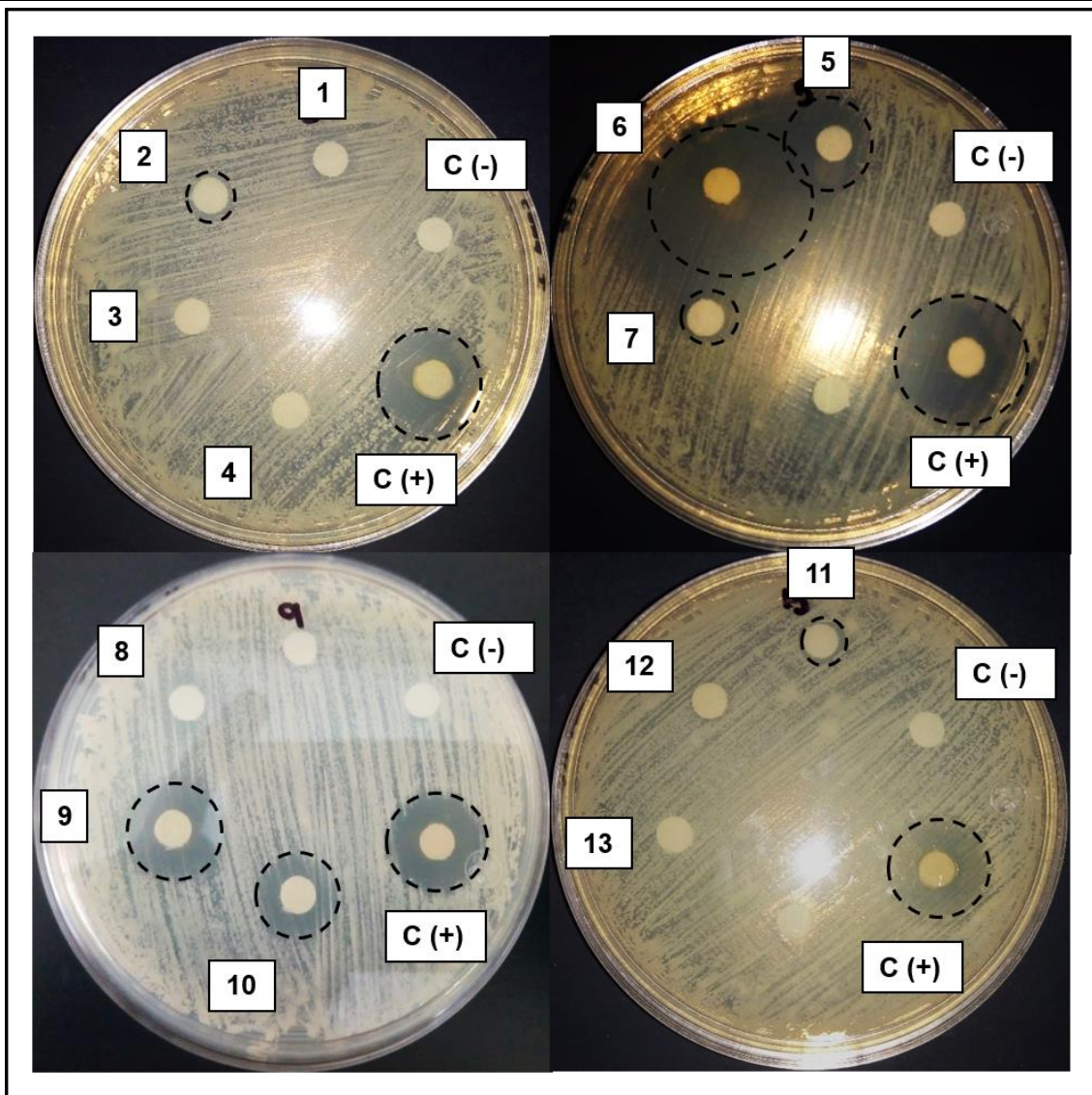


**Figura 11.** Halos de inhibición contra la cepa *E. coli* de las muestras de solución de ácido acético 0.5 % (1), solución quitosano no irradiado 2.0 % (2), solución quitosano irradiado 2.0 % pH 5 (3), solución quitosano irradiado 2.0 % pH 7 (4), solución EDTA en agua 2.0 % (5), aceite de canela concentrado (6), aceite de canela 1 % (7), formulación A (8), formulación B con pH 5 (9), formulación C con pH 7 (10), formulación D (11), formulación E con pH 5 (12), formulación F pH 7 (13), solución de sulfadiazina de plata como control positivo (C +) y agua estéril como control negativo (C -).

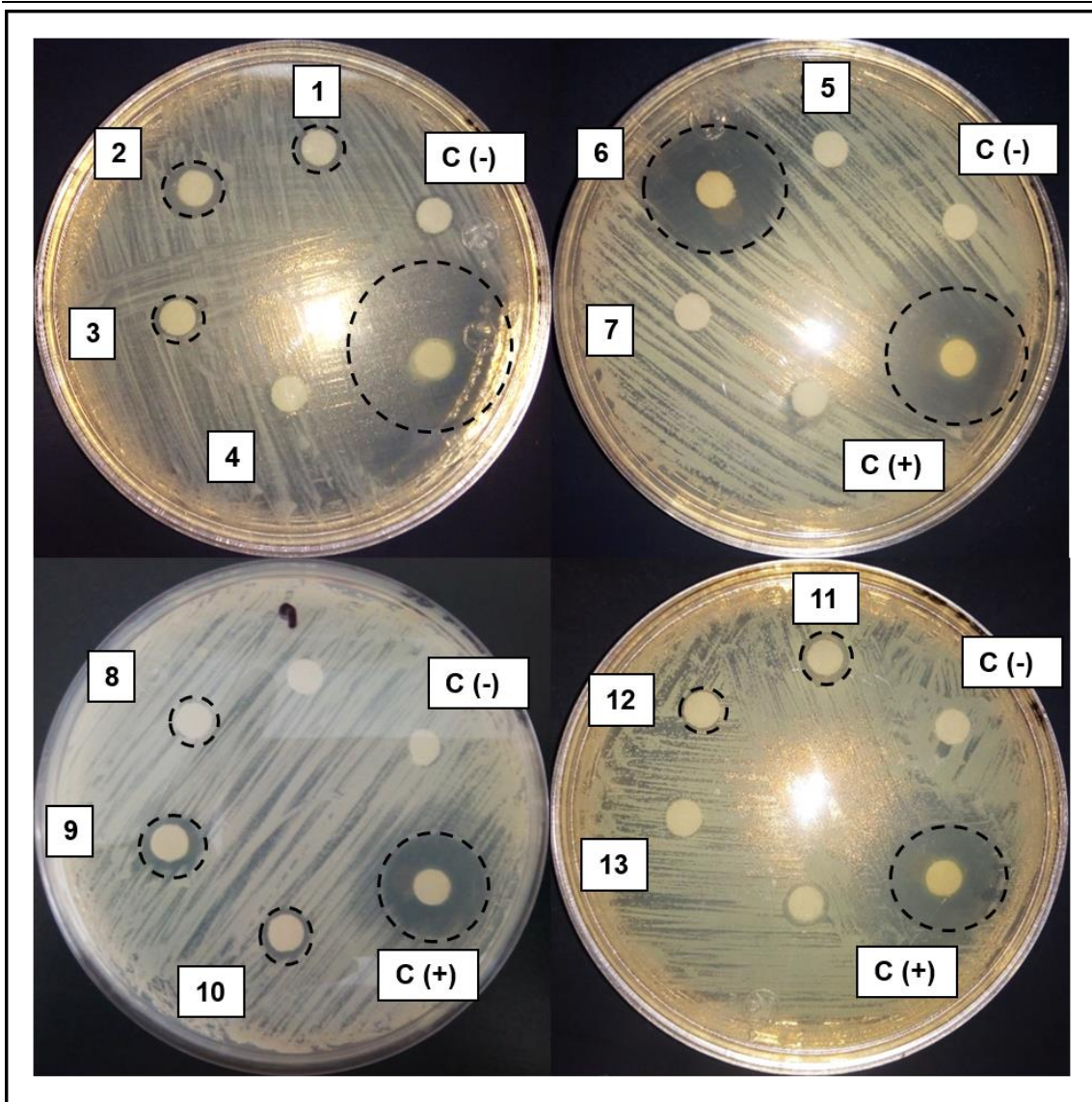




**Figura 12.** Halos de inhibición contra la cepa *P. aeruginosa* de las muestras de solución de ácido acético 0.5 % (1), solución quitosano no irradiado 2.0 % (2), solución quitosano irradiado 2.0 % pH 5 (3), solución quitosano irradiado 2.0 % pH 7 (4), solución EDTA en agua 2.0 % (5), aceite de canela concentrado (6), aceite de canela 1 % (7), formulación A (8), formulación B con pH 5 (9), formulación C con pH 7 (10), formulación D (11), formulación E con pH 5 (12), formulación F pH 7 (13), solución de sulfadiazina de plata como control positivo (C +) y agua estéril como control negativo (C -).



**Figura 13.** Halos de inhibición contra la cepa *C. albicans* de las muestras de solución de ácido acético 0.5 % (1), solución quitosano no irradiado 2.0 % (2), solución quitosano irradiado 2.0 % pH 5 (3), solución quitosano irradiado 2.0 % pH 7 (4), solución EDTA en agua 2.0 % (5), aceite de canela concentrado (6), aceite de canela 1 % (7), formulación A (8), formulación B con pH 5 (9), formulación C con pH 7 (10), formulación D (11), formulación E con pH 5 (12), formulación F pH 7 (13), solución de sulfadiazina de plata como control positivo (C +) y agua estéril como control negativo (C -).



**Figura 14.** Halos de inhibición contra la cepa *S. aureus* de las muestras de solución de ácido acético 0.5 % (1), solución quitosano no irradiado 2.0 % (2), solución quitosano irradiado 2.0 % pH 5 (3), solución quitosano irradiado 2.0 % pH 7 (4), solución EDTA en agua 2.0 % (5), aceite de canela concentrado (6), aceite de canela 1 % (7), formulación A (8), formulación B con pH 5 (9), formulación C con pH 7 (10), formulación D (11), formulación E con pH 5 (12), formulación F pH 7 (13), solución de sulfadiazina de plata como control positivo (C +) y agua estéril como control negativo (C -).

---

---

### 7.3.2. Prueba antibiopelícula

Como se mencionó, las biopelículas son estructuras complejas que involucran diferentes especies de microorganismos, incrustadas en una matriz polisacárida. Debido a su estructura, las biopelículas son resistentes a los desinfectantes o detergentes y provocan complicaciones en muchos campos, como la industria alimentaria y en la cirugía médica. Se han utilizado diferentes métodos para prevenir la formación de biopelículas; sin embargo, generalmente son antibióticos. Según la Organización Mundial de la Salud [93], la necesidad de nuevas estrategias para minimizar el uso de antibióticos aumenta ampliamente debido a que muchos organismos se están volviendo más resistentes a todos los tipos de antibióticos. La importancia de los agentes antibiopelícula radica en combatir la resistencia a los antibióticos permitiendo una mayor difusión del antibiótico o antimicrobiano a través de la matriz de las biopelículas y disminuyendo la interacción con los componentes de la matriz [65]. Por esta razón, los nuevos compuestos naturales han sido probados como tratamiento contra la biopelícula. La actividad antibiopelícula de la formulación B se evaluó para la cepa *P. aeruginosa*. Esta bacteria patógena oportunista es responsable del 10-15% de las infecciones nosocomiales en todo el mundo. Con frecuencia, estas infecciones son difíciles de tratar debido a la resistencia natural de la especie, así como a su notable capacidad de adquirir mecanismos adicionales de resistencia a los agentes antimicrobianos. En la Figura 15 se pudo observar la actividad antibiopelícula de la formulación B y el control positivo. Curiosamente, la formulación presentó un promedio de 13 mm de halo de inhibición, mientras que el control positivo, el cual es ampliamente usado para el tratamiento de heridas crónicas, no presentó actividad antibiopelícula.

Se ha informado que el aceite de corteza de canela y el cinamaldehído poseen una alta actividad bactericida contra los aislados de *P. aeruginosa* [94]. El cinamaldehído tiene características electronegativas, por lo que puede interferir en la transferencia de electrones al inhibir la actividad ATPasa unida a la membrana celular, del mismo modo, puede interactuar y alterar la estructura de las proteínas, lo que conduce a la pérdida de la integridad de la proteína [65]. Además, los autores han expuesto que

---

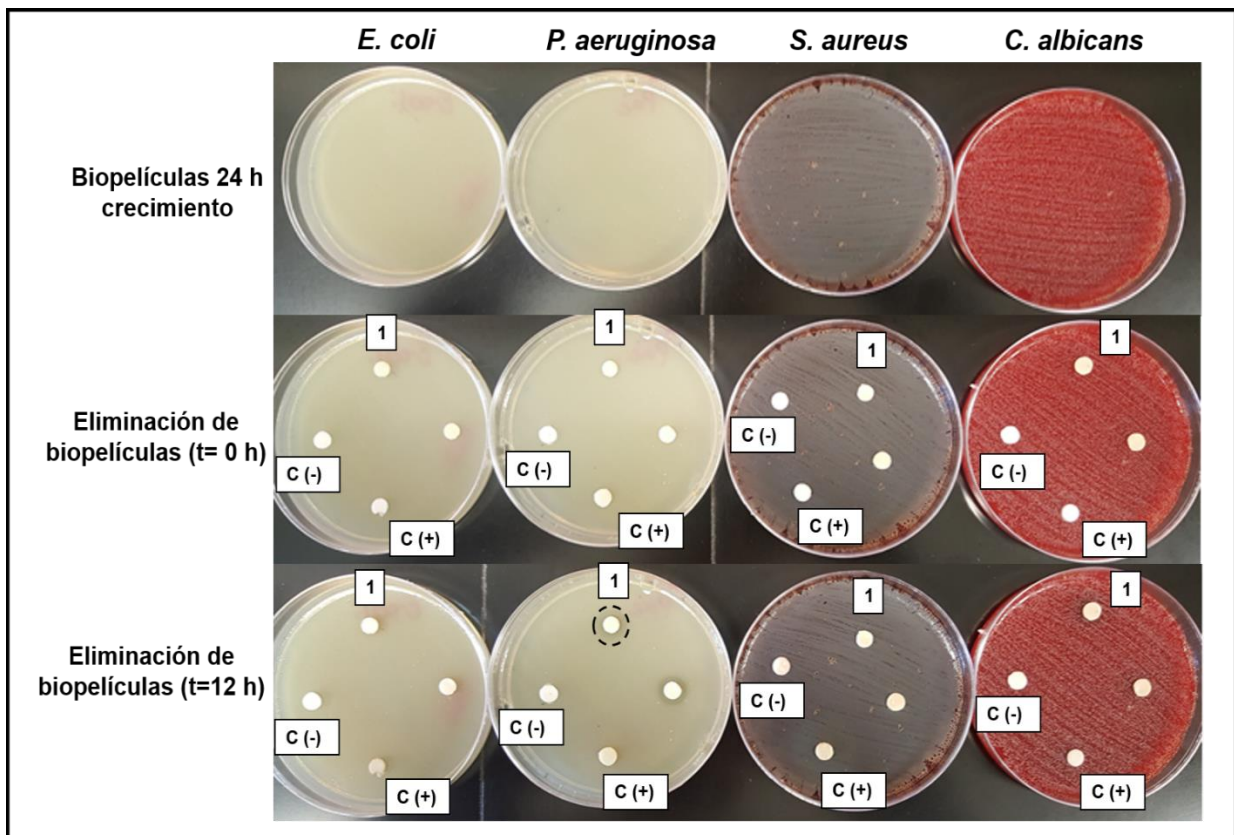
---

el quitosano y sus derivados presentan una fuerte actividad antibacteriana contra bacterias resistentes como *P. aeruginosa* [87], debido a que el quitosano tiene la capacidad de alterar las membranas celulares cargadas negativamente tan pronto como los microorganismos se depositan en la superficie.

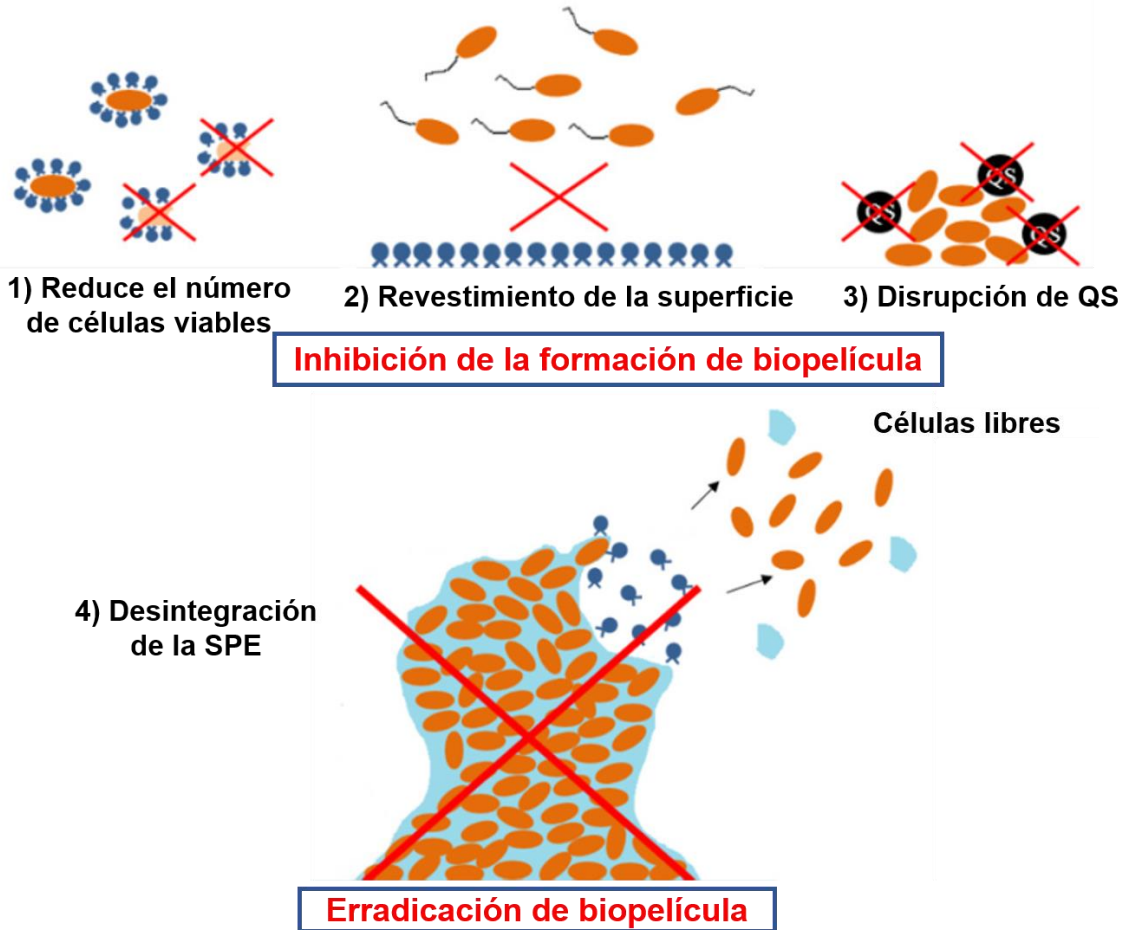
Por otro lado, el pH ácido, debido a la presencia de ácido acético en la formulación, podría estar involucrado en el efecto antibiopelícula. El pH interno es, para las bacterias neutrofílicas, típicamente alrededor de 7.6. El ácido acético internalizado se disocia, desencadenando la acidificación del citoplasma, causando daños en la membrana y el ADN [95,96]. Se ha informado que el ácido acético podría erradicar las biopelículas maduras de *P. aeruginosa*, incluso a bajas concentraciones, como 0,5% [95]. Además, los autores informaron que el ácido acético a diferentes valores de pH (4,33 a 6) era completamente bacteriostático, matando a todas las bacterias analizadas.

Adicionalmente, los agentes quelantes como el EDTA son capaces de desestabilizar las biopelículas que secuestran hierro, zinc, magnesio y calcio [97].

Finalmente, la formulación obtenida representa una alternativa para el tratamiento de biopelículas de *P. aeruginosa*, al usar los mecanismos de los componentes se obtiene un efecto combinado antimicrobiano, el cual podría actuar en distintas fases de la formación de la biopelícula (Figura 16) y así ayudar en el tratamiento de heridas.



**Figura 15.** Halos de inhibición de prueba antibiopelícula contra las cepas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *C. albicans* de la formulación B con pH 5 (1), solución de sulfadiazina de plata como control positivo (C +) y agua estéril como control negativo (C -).



**Figura 16.** Estrategias para combatir las biopelículas bacterianas. Las moléculas antibiopelícula pueden actuar por efectos bacteriostáticos y bactericidas, lo que reduce la cantidad de células viables capaces de formar biopelícula (1). El recubrimiento de superficies puede obstruir la adhesión bacteriana (2). Los compuestos de antibiopelícula pueden ejercer efectos inhibitorios sobre las señales de detección de quórum (QS) (3). La biopelícula madura puede ser destruida por moléculas que pueden penetrar la matriz de la misma y causar su desintegración, liberando células libres (4). Modificado de Moura et al [98].

---

---

## 8. CONCLUSIONES

Los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos son un problema grave en todo el mundo y las alternativas farmacológicas siguen siendo limitadas. Especialmente durante el progreso de la curación de heridas graves, la vida del paciente se vuelve crítica debido a procesos infecciosos. En este trabajo se desarrolló una formulación a base de quitosano irradiado, aceite de canela y EDTA disódico la cual mostró, mediante un análisis antimicrobiano y antibiopelícula, tener actividad contra bacterias Gram positivo (*S. aureus*), bacterias Gram negativo (*E. coli* y *P. aeruginosa*) y hongos (*C. albicans*). Además, se demostró su actividad antibiopelícula contra *P. aeruginosa*. Dichos microorganismos se caracterizan por ser oportunistas durante el proceso de cicatrización de heridas y los resultados indicaron un porcentaje de efectividad entre 40 % y 80 % para los mismos.

Este estudio abordó una estrategia de aceite de canela diluido para reducir los efectos tóxicos en el tejido dañado el cual actúa junto con EDTA disódico y quitosano. Se sugiere que la formulación tiene un efecto combinado antimicrobiano al integrar los mecanismos de sus componentes. Esta nueva propuesta es una alternativa biocompatible y de interés clínico porque también puede erradicar las biopelículas.

Adicionalmente, es posible que la formulación se pueda usar como vehículo al añadir un fármaco destinado a favorecer la cicatrización de heridas, ya que, al tener dos fases (una acuosa y otra oleosa) hace más fácil la incorporación de otra molécula.



---

---

## 9. PERSPECTIVAS

- Realizar análisis complementarios de caracterización fisicoquímica como RMN, con la finalidad de comparar con mayor detalle el quitosano antes y después de la modificación mediante radiación gamma.
- Probar la actividad antimicrobiana y antifúngica con otras cepas que también presenten resistencia bacteriana en heridas.
- Evaluar el efecto tóxico que podría causar la formulación en las células mediante estudios citotóxicos.
- Determinar si la formulación favorece el proceso de cicatrización de heridas mediante una evaluación *in vivo*.

---

---

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Sorg, H.; Tilkorn, D.J.; Hager, S.; Hauser, J.; Mirastschijski, U. Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *Eur Surg Res* **2017**, *58*, 81–94.
2. Kujath, P.; Michelsen, A. Wounds – From Physiology to Wound Dressing. *Dtsch. Arztebl. Int.* **2008**, *105*, 239–248.
3. Vela-Anaya, G.; Stegensek-Mejía, E.M.; Leija-Hernández, C. Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Rev Enferm Inst Mex Seguro Soc* **2018**, *26*, 105–114.
4. Brunicardi, C.; Andersen, D.K.; Billiar, T.R. *Schwartz: principios de cirugía*; 10th ed.; McGraw-Hill Interamericana, 2015; 241-268.
5. Dhivya, S.; Padma, V.V.; Santhini, E. Wound dressings - a review. *BioMedicine* **2015**, *5*, 24–28.
6. Patrulea, V.; Ostafe, V.; Borchard, G.; Jordan, O. Chitosan as a starting material for wound healing applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2015**, *97*, 417–426.
7. Magaña García, M.; Cazarín Barrientos, J.; Magaña Lozano, M. Dermatología. In; Editorial Médica Panamericana, 2011; pp. 4–18.
8. Arenas Guzmán, R. Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento. In; McGraw- Hill, 2015; pp. 1–6.
9. Fox, S.I. Fisiología humana. In; Interamericana, M.-H., Ed.; 2014; p. 19.
10. Asociación Mexicana de Cirugía General, A.C.; Asociación Mexicana de Colegios de Especialistas en Cirugía General, A.C. Tipo de cierre de heridas. In *Tratado de Cirugía General*; Juan Carlos Arana Reyes, Juan Arturo Castellanos Hernández, F.C.L., Ed.; Manual Moderno: México, D.F., 2016; p. 2268 ISBN 139786074485912.

- 
- 
11. Gonzalez, A.C. de O.; Costa, T.F.; Andrade, Z. de A.; Medrado, A.R.A.P. Wound healing - A literature review. *An. Bras. Dermatol.* **2016**, *91*, 614–620.
  12. Han, G.; Ceilley, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv. Ther.* **2017**, *34*, 599–610.
  13. Janis, J.E.; Harrison, B. Wound healing: Part I. basic science. *Plast. Reconstr. Surg.* **2016**, *138*, 9–17.
  14. Velnar, T.; Bailey, T.; Smrkolj, V. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. *J. Int. Med. Res.* **2009**, *37*, 1528–1542.
  15. Guo, S.; Dipietro, L.A. Factors affecting wound healing. *J. Dent. Res.* **2010**, *89*, 219–29.
  16. Ruth Edwards, K.G.H. Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis* **2004**, *17*, 91–96.
  17. Bjarnsholt, T.; Kirketerp-Møller, K.; Jensen, P.Ø.; Madsen, K.G.; Phipps, R.; Kroghfelt, K.; Høiby, N.; Givskov, M. Why chronic wounds will not heal: A novel hypothesis. *Wound Repair Regen.* **2008**, *16*, 2–10.
  18. Sarheed, O.; Ahmed, A.; Shouqair, D.; Boateng, J. Antimicrobial Dressings for Improving Wound Healing. In *Wound Healing - New insights into Ancient Challenges*; InTech, 2016.
  19. Jindal, B.A.K.; Pandya, M.K.; Khan, M.I.D. Antimicrobial resistance: A public health challenge. *Med. J. Armed Forces India* **2015**, *71*, 178–181.
  20. Resistencia a los antimicrobianos Disponible en línea: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antimicrobianos>. Consultado 03-enero-2020
  21. Penesyan, A.; Gillings, M.; Paulsen, I.T. Antibiotic discovery: Combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules* **2015**, *20*, 5286–5298.

- 
- 
22. Jamal, M.; Ahmad, W.; Andleeb, S.; Jalil, F.; Imran, M.; Nawaz, M.A.; Hussain, T.; Ali, M.; Rafiq, M.; Kamil, M.A. Bacterial biofilm and associated infections. *J. Chinese Med. Assoc.* **2018**, *81*, 7–11.
  23. Syder, R.J.; Bohn, G.; Hanft, J.; Harkless, L.; Kim, Pa.; Lavery, L.; Schultz, Gr.; Wolcott, R. Wound Biofilm: Current Perspectives and Strategies on Biofilm Disruption and Treatments. *Wounds* **2017**, 1–17.
  24. Mah, T.-F.C.; Toole, G.A.O. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **2001**, *9*, 34–39.
  25. Flemming, H.C.; Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 623–633.
  26. Olsen, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *34*, 877–886.
  27. Sharma, G.; Sharma, S.; Sharma, P.; Chandola, D.; Dang, S.; Gupta, S.; Gabrani, R. *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *121*, 309–319.
  28. Kavanaugh, N.L.; Ribbeck, K. Selected Antimicrobial Essential Oils Eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* Biofilms. **2012**, *78*, 4057–4061.
  29. Mulcahy, L.R.; Isabella, V.M.; Lewis, K. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms in Disease. *Microb. Ecol.* **2014**, *68*, 1–12.
  30. Serra, R.; Grande, R.; Butrico, L.; Rossi, A.; Settimio, U.F.; Caroleo, B.; Amato, B.; Gallelli, L.; de Franciscis, S. Chronic wound infections: the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2015**, *13*, 605–613.
  31. Ramage, G.; Saville, S.P.; Thomas, D.P.; López-Ribot, J.L. Candida Biofilms: an Update. *Eukaryot. Cell* **2005**, *4*, 633–638.
  32. Kalan, L.; Grice, E.A. Fungi in the Wound Microbiome. *Adv. Wound Care* **2018**,

---

---

7, 247–255.

33. Archer, N.K.; Mazaitis, M.J.; William Costerton, J.; Leid, J.G. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence* **2011**, *2*, 445–459.
34. Moormeier, D.E.; Bayles, K.W. Staphylococcus aureus biofilm: a complex developmental organism. *Mol. Microbiol.* **2017**, *104*, 365–376.
35. Enoch, S.; Grey, J.E.; Harding, K.G. ABC of wound healing Non-surgical and drug treatments. *Br. Med. J.* **2006**, *332*, 900–903.
36. Boateng, J.S.; Matthews, K.H.; Stevens, H.N.E.; Eccleston, G.M. Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review. *J. Pharm. Sci.* **2008**, *97*, 2892–2923.
37. Jayakumar, R.; Prabakaran, M.; Sudheesh Kumar, P.T.; Nair, S.V.; Tamura, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol. Adv.* **2011**, *29*, 322–337.
38. Dai, T.; Tanaka, M.; Huang, Y.-Y.; Hamblin, M.R. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **2011**, *9*, 857–79.
39. Bano, I.; Arshad, M.; Yasin, T.; Ghauri, M.A.; Younus, M. Chitosan: A potential biopolymer for wound management. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *102*, 380–383.
40. Hong, S.-C.; Yoo, S.-Y.; Kim, H.; Lee, J. Chitosan-Based Multifunctional Platforms for Local Delivery of Therapeutics. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 1–16.
41. Sahariah, P.; Má, M. Antimicrobial Chitosan and Chitosan Derivatives: A Review of the Structure–Activity Relationship. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 3846–3868.
42. Zargar, V.; Asghari, M.; Dashti, A. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. *ChemBioEng*

---

---

*Rev.* **2015**, 2, 204–226.

43. Ahmed, S.; Ikram, S. Chitosan & its derivatives: A review in recent innovations. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2015**, 6, 14–30.
44. Thakur, V.K.; Thakur, M.K. Recent advances in graft copolymerization and applications of chitosan: A review. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2014**, 2, 2637–2652.
45. Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt, O.; Peppas, N.A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 57, 19–34.
46. Giri, T.K.; Thakur, A.; Alexander, A.; Ajazuddin; Badwaik, H.; Tripathi, D.K. Modified chitosan hydrogels as drug delivery and tissue engineering systems: present status and applications. *Acta Pharm. Sin. B* **2012**, 2, 439–449.
47. Charernsriwilaiwat, N.; Rojanarata, T.; Ngawhirunpat, T.; Opanasopit, P. Electrospun chitosan/polyvinyl alcohol nanofibre mats for wound healing. *Int. Wound J.* **2014**, 11, 215–222.
48. Muxika, A.; Etxabide, A.; Uranga, J.; Guerrero, P.; de la Caba, K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 105, 1358–1368.
49. Rabea, E.I.; E-T Badawy, M.; Stevens, C. V; Smagghe, G.; Steurbaut, W. Reviews Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **2003**.
50. Verlee, A.; Mincke, S.; Stevens, C. V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr. Polym.* **2017**, 164, 268–283.
51. Qin, C.; Li, H.; Xiao, Q.; Liu, Y.; Zhu, J.; Du, Y. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydr. Polym.* **2006**, 63, 367–374.
52. Chmielewski, A.G.; Haji-Saeid, M.; Ahmed, S. Progress in radiation

---

---

processing of polymers. *Adv. Polym. Process.* **2005**, 236, 44–54.

53. Carhuapoma, W.; Santiago, J. Caracterización de hidrogeles de quitosano-alcohol polivinílico obtenidos por radiación gamma. *Rev. Iberoam. Polímeros* **2005**, 6, 333–346.
54. Alcérreca Sánchez, M.I. Situación actual en infraestructura y tecnología de irradiadores gamma en América Latina. **2009**, 12–23.
55. Albarrán, G.; Mendoza, E.; Cruz-Zaragoza, E. Dosimetría Química de irradiadores gamma de 60 Co y 137 Cs de uso semi-industrial e investigación. *Nov. Sci.* **2017**, 9, 113–133.
56. Alcérreca Sánchez, M.I. América Latina, situación actual y plantas de irradiación en México. **2009**.
57. Matsushashi, S.; Kume, T. Enhancement of Antimicrobial Activity of Chitosan by Irradiation. *J. Sci. Food Agric.* **1997**, 73, 237–241.
58. Lanigan, R.S.; Yamarik, T.A. Final Report on the Safety Assessment of EDTA, Calcium Disodium EDTA, Diammonium EDTA, Dipotassium EDTA, Disodium EDTA, TEA-EDTA, Tetrasodium EDTA, Tripotassium EDTA, Trisodium EDTA, HEDTA, and Trisodium HEDTA 1. *Int. J. Toxicol.* **2002**, 21, 95–142.
59. Anjum, A.; Sim, C.-H.; Ng, S.-F. Hydrogels Containing Antibiofilm and Antimicrobial Agents Beneficial for Biofilm-Associated Wound Infection: Formulation Characterizations and In vitro Study. *AAPS PharmSciTech* **2018**, 19, 1219–1230.
60. Finnegan, S.; Percival, S.L. EDTA: An Antimicrobial and Antibiofilm Agent for Use in Wound Care. *Adv. wound care* **2015**, 4, 415–421.
61. Lee, C.-J.; Chen, L.-W.; Chen, L.-G.; Chang, T.-L.; Huang, C.-W.; Huang, M.-C.; Wang, C.-C. Correlations of the components of tea tree oil with its antibacterial effects and skin irritation. *J. Food Drug Anal.* **2013**, 21, 169–176.
62. Wińska, K.; Mączka, W.; Łyczko, J.; Grabarczyk, M.; Czubaszek, A.; Szumny,

- 
- 
- A. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative? *Molecules* **2019**, *24*, 1–21.
63. Wang, J.; Li, Y.; Gao, Y.; Xie, Z.; Zhou, M.; He, Y.; Wu, H.; Zhou, W.; Dong, X.; Yang, Z.; et al. Cinnamon oil-loaded composite emulsion hydrogels with antibacterial activity prepared using concentrated emulsion templates. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *112*, 281–289.
64. Ghosh, V.; Saranya, S.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2013**, *13*, 114–22.
65. Topa, S.H.; Subramoni, S.; Palombo, E.A.; Kingshott, P.; Rice, S.A.; Blackall, L.L. Cinnamaldehyde disrupts biofilm formation and swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2018**, *164*, 1087–1097.
66. Bouhdid, S.; Abrini, J.; Amensour, M.; Zhiri, A.; Espuny, M.J.; Manresa, A. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *109*, 1139–1149.
67. Zainol, I.; Akil, H.M.; Mastor, A. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the physical and mechanical properties of chitosan powder. *Mater. Sci. Eng. C* **2009**, *29*, 292–297.
68. García, M.A.; de la Paz, N.; Castro, C.; Rodríguez, J.L.; Rapado, M.; Zuluaga, R.; Gañán, P.; Casariego, A. Effect of molecular weight reduction by gamma irradiation on the antioxidant capacity of chitosan from lobster shells. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **2015**, *8*, 190–200.
69. Kasaai, M.R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *71*, 497–508.
70. Singh, K.; Suri, R.; Tiwary, A.K.; Rana, V. Chitosan films: crosslinking with EDTA modifies physicochemical and mechanical properties. *J. Mater. Sci.*
- 
-



71. Czechowska-Biskup, R.; Jarosińska, D.; Rokita, B.; Ulański, P.; Rosiak, J.M. Determination of degree of deacetylation of chitosan - Comparison of methods. *Prog. Chem. Appl. Chitin its Deriv.* **2012**, *17*, 5–20.
72. Khan, T.A.; Peh, K.K.; Ch'ng, H.S. Reporting degree of deacetylation values of chitosan: The influence of analytical methods. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2002**, *5*, 205–212.
73. Asli, A.; Brouillette, E.; Line Ster, C.; Ghinet, M.G.; Brzezinski, R.; Lacasse, P.; Jacques, M.; Ois Malouin, F. Antibiofilm and antibacterial effects of specific chitosan molecules on *Staphylococcus aureus* isolates associated with bovine mastitis. *PLoS One* **2017**, *12*, 1–23.
74. El-Nesr, E.M.; Raafat, A.I.; Nasef, S.M.; Soliman, E.A.; Hegazy, E.-S.A. Radiation Synthesis and Characterization of N,O-Carboxymethyl Chitosan/poly(vinylpyrrolidone) Copolymer Hydrogel. *Arab J. Nucl. Sci. Appl.* **2014**, *47*, 14–27.
75. Chandra Dey, S.; Al-Amin, M.; Ur Rashid, T.; Zakir Sultan, M.; Ashaduzzaman, M.; Sarker, M.; Md Shamsuddin, S. Performance evaluation of Chitosan as an adsorbent for remazol red. *Int. J. Latest Res. Eng. Technol.* **2016**, *2*, 52–62.
76. Corazzari, I.; Nisticò, R.; Turci, F.; Faga, M.G.; Franzoso, F.; Tabasso, S.; Magnacca, G. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polym. Degrad. Stab.* **2015**, *112*, 1–9.
77. Jana, S.; Kumar Trivedi, M.; Tallapragada, R.M.; Branton, A.; Trivedi, D.; Nayak, G.; Mishra, R.K. Characterization of Physicochemical and Thermal Properties of Chitosan and Sodium Alginate after Biofield Treatment. *Pharm. Anal. Acta* **2015**, *6*, 1–9.
78. Stevulova, N.; Cigasova, J.; Estokova, A.; Terpakova, E.; Geffert, A.; Kacik, F.; Singovszka, E.; Holub, M. Properties Characterization of Chemically

---

---

Modified Hemp Hurds. *Materials (Basel)*. **2014**, 7, 8131–8150.

79. Singh, K.; Tiwary, A.K.; Rana, V. Ethylenediaminediacetic acid bis(carbido amide chitosan): Synthesis and evaluation as solid carrier to fabricate nanoemulsion. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 95, 303–314.
80. Mohseni, M.; Shamloo, A.; Aghababaei, Z.; Vossoughi, M.; Moravvej, H. Antimicrobial Wound Dressing Containing Silver Sulfadiazine With High Biocompatibility: In Vitro Study. *Artif. Organs* **2016**, 40, 765–773.
81. El-Feky, G.S.; Sharaf, S.S.; El Shafei, A.; Hegazy, A.A. Using chitosan nanoparticles as drug carriers for the development of a silver sulfadiazine wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **2017**, 158, 11–19.
82. Sen, B.H.; Akdeniz, B.G.; Denizci, A.A. The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on *Candida albicans*. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2000**, 90, 651–655.
83. Prabuseenivasan, S.; Jayakumar, M.; Ignacimuthu, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med.* **2006**, 6, 1–8.
84. Carvalhinho, S.; Costa, A.M.; Coelho, A.C.; Martins, E.; Sampaio, A. Susceptibilities of *Candida albicans* Mouth Isolates to Antifungal Agents, Essentials Oils and Mouth Rinses. *Mycopathologia* **2012**, 174, 69–76.
85. Serra, E.; Hidalgo-Bastida, L.A.; Verran, J.; Williams, D.; Malic, S. Antifungal activity of commercial essential oils and biocides against *Candida albicans*. *Pathogens* **2018**, 7, 1–12.
86. Peña, A.; Sánchez, N.S.; Calahorra, M. Effects of chitosan on *Candida albicans*: conditions for its antifungal activity. *Biomed Res. Int.* **2013**, 2013, 15.
87. Balicka-Ramisz, Aleksandra Wojtasz-Pajak, Anna Pilarczyk, B.; Alojzy, R.; Laurans, L. Antibacterial and antifungal activity of chitosan. *Int. Soc. Sustain. Anim. Husb. Conf.* **2005**, 2, 191–193.

- 
- 
88. Cheng, C.Y.; Li, Y.-K. An *Aspergillus* chitosanase with potential for large-scale preparation of chitosan oligosaccharides. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2000**, *32*, 197.
  89. Tayel, A.A.; Moussa, S.; El-Tras, W.F.; Knittel, D.; Opwis, K.; Schollmeyer, E. Anticandidal action of fungal chitosan against *Candida albicans*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47*, 454–457.
  90. Mukherjee, P.K.; Chandra, J.; Kuhn, D.M.; Ghannoum, M.A. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: Phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect. Immun.* **2003**, *71*, 4333–4340.
  91. Roosen, J.; Binnemans, K. Adsorption and chromatographic separation of rare earths with EDTA- and DTPA-functionalized chitosan biopolymers. *J. Mater. Chem. A* **2014**, *2*, 1530–1540.
  92. Shih, P.-Y.; Liao, Y.-T.; Tseng, Y.-K.; Deng, F.-S.; Lin, C.-H. A Potential Antifungal Effect of Chitosan Against *Candida albicans* Is Mediated via the Inhibition of SAGA Complex Component Expression and the Subsequent Alteration of Cell Surface Integrity. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1–14.
  93. Fakuda, K. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. *World Heal. Organ.* **2014**.
  94. Utcharyakiat, I.; Surassmo, S.; Jaturanpinyo, M.; Khuntayaporn, P.; Chomnawang, M.T. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complement. Altern. Med.* **2016**, *16*, 1–7.
  95. Bjarnsholt, T.; Alhede, M.; Jensen, P.Ø.; Nielsen, A.K.; Johansen, H.K.; Homøe, P.; Høiby, N.; Givskov, M.; Kirketerp-Møller, K. Antibiofilm Properties of Acetic Acid. *Adv. Wound Care* **2015**, *4*, 363–372.
  96. Halstead, F.D.; Rauf, M.; Moiemien, N.S.; Bamford, A.; Wearn, C.M.; Fraise, A.P.; Lund, P.A.; Oppenheim, B.A.; Webber, M.A. The antibacterial activity of

---

---

acetic acid against biofilm-producing pathogens of relevance to burns patients. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–15.

97. Roy, R.; Tiwari, M.; Donelli, G.; Tiwari, V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* **2018**, *9*, 522–554.
98. Moura, M.; Napoleão, T.; Paiva, P.; Coelho, L.C. Bacterial biofilms: the structure, development and potential of plant compounds for alternative control. In; 2017; pp. 1–34.

## 11. ANEXOS

### Evaluación antimicrobiana

Tabla 7. Resultados de los halos de inhibición presentados a las 48 h.

	Halo de inhibición (mm)			
	E. coli	P. aeruginosa	C. albicans	S. aureus
<b>Caja petri 1</b>				
<b>M1</b>	7.1	7.4	0	7.05 ± 0.07
<b>M2</b>	8.3 ± 2.12	7.8 ± 1.15	7.45 ± 0.78	8.63 ± 0.99
<b>M3</b>	6.4	6.3	0	6.4 ± 0.28
<b>M4</b>	6.4	0	0	0
<b>C (+)</b>	15.33 ± 1.22	16.96 ± 1.59	16.4 ± 1.24	21.1 ± 2.32
<b>C (-)</b>	0	0	0	0
<b>Caja petri 2</b>				
<b>M5</b>	10.8 ± 1.13	6.85 ± 1.06	13.67 ± 5.84	0
<b>M6</b>	14.6 ± 0.82	7.07 ± 0.32	31.27 ± 4.64	18.6 ± 2.48
<b>M7</b>	6.45 ± 1.06	0	8.73 ± 1.21	0
<b>C (+)</b>	15.47 ± 0.96	17.07 ± 1.32	21.6 ± 0.55	19.17 ± 1.17
<b>C (-)</b>	0	0	0	0
<b>Caja petri 3</b>				
<b>M8</b>	7.76 ± 0.40	7.6 ± 1.28	0	6.8
<b>M9</b>	6.4	6.6 ± 0.17	13.7 ± 2.69	7.43 ± 0.85
<b>M10</b>	0	6.57 ± 0.45	13.1	6.9 ± 0.87
<b>C (+)</b>	14.67 ± 1.30	15.4 ± 1.27	17.07 ± 2.10	17.57 ± 1.95
<b>C (-)</b>	0	0	0	0
<b>Caja petri 4</b>				
<b>M11</b>	9.56 ± 0.93	6.55 ± 0.21	8.73 ± 0.87	8.4 ± 0.90
<b>M12</b>	0	6.4	0	6.65 ± 0.07
<b>M13</b>	0	7	0	0
<b>C (+)</b>	14.06 ± 1.40	14.4 ± 1.01	16.03 ± 1.61	17.47 ± 1.85
<b>C (-)</b>	0	0	0	0

## Pruebas estadísticas

**Tabla 8.** Comparación de medias de la prueba antimicrobiana.

<b>Prueba t para comparar medias</b>		
<b>Hipótesis nula: media1 = media2</b>		
<b>Hipótesis Alt.: media1 &lt;&gt; media2</b>		
<b><math>\alpha=0.05</math></b>		
<b><i>E. coli</i></b>		
Comparación de muestras	Valor De P	Conclusión
M6 vs M7	P = 0.00222527	Se rechaza la hipótesis nula
M8 vs M9	P = 0.00424024	Se rechaza la hipótesis nula
M9 vs Control positivo (C+)	P = 0.000387725	Se rechaza la hipótesis nula
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
	Valor De P	Conclusión
M8 vs M9	P = 0.250019	No se rechaza la hipótesis nula
M9 vs M10	P = 0.910624	No se rechaza la hipótesis nula
M9 vs (C+)	P = 0.000181063	Se rechaza la hipótesis nula
<b><i>C. albicans</i></b>		
	Valor De P	Conclusión
M6 vs M7	P = 0.00123492	Se rechaza la hipótesis nula

M9 vs (C+)	P = 0.162366	No se rechaza la hipótesis nula
<b>S. aureus</b>		
	<b>Valor De P</b>	<b>Conclusión</b>
M1 vs M2	P = 0.120661	No se rechaza la hipótesis nula
M1 vs M3	P = 0.0875789	No se rechaza la hipótesis nula
M2 vs M3	P = 0.0587589	No se rechaza la hipótesis nula
M9 vs M10	P = 0.490402	No se rechaza la hipótesis nula
M11 vs M12	P = 0.0800481	No se rechaza la hipótesis nula
M9 vs (C+)	P = 0.00118771	Se rechaza la hipótesis nula