

Integración de celulosa bacteriana y *Triticum Vulgare* para la creación de materiales bioactivos
con alta biocompatibilidad

Daniel Alfonso Quintero Parra

Trabajo de investigación para optar al título de Magíster en ingeniería de materiales

Directora:

Marianny Yajaira Combariza Montanez

Química, PhD

Codirectores:

Mabel Juliana Quintero Silva

Bacterióloga, M.Sc

Heider Carreño García

PhD (C) Ciencias Básicas Biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Físicoquímicas

Escuela de Ingeniería Metalúrgica

Maestría en ingeniería de materiales

Bucaramanga

2024

Dedicatoria

A Dios y a la Virgen, por darme la fortaleza y la tenacidad, y por guiarme con su luz en cada paso de este camino.

A mi mamá, Luz Fanny, la persona más importante en mi vida. En los momentos difíciles, sus manos en mi espalda me impulsan con el alma, y sus palabras siempre llegan cuando más las necesito. El amor incondicional y la persona que mi super heroína. Quien es el pilar firme en quien puedo apoyarme. Gracias a ella, soy quien soy.

A mis ángeles en el cielo: mi padrino Luis Miguel y mis nonitos Luis y Amelia, quienes me acompañan a cada instante y me protegen en cada decisión. Siento su presencia en cada logro y en cada desafío.

A mis hermanos Magda, Iván, Néstor, Javier y, en especial, a Juliana, quienes siempre han estado a mi lado cuando más los he necesitado. A Juli, mi mentora y guía no solo en el ámbito académico, sino en la vida, a quien admiro profundamente.

A mis otras mamás: mis tías Tato, Tina, Esperanza, Amelia y Mariela. Seres mágicos que me han tomado de la mano y jamás me dejan caer. Quienes siempre están para apoyar a mi mamá y a mí.

A mi familia, toditos, quienes han sido una parte vital en mi formación como ser humano, y en quienes encuentro el refugio seguro de mi vida. Son el tesoro brillante y valioso que me dio la vida.

A Vanessa, cuya luz y sabiduría me abrazan e inspiran profundamente, y con quien quiero seguir compartiendo y construyendo hermosos capítulos en esta vida.

A mis amigos, compañeros de alegrías y batallas, con quienes tengo no solo una amistad, sino una hermandad. Quienes siempre logran arrancarme una sonrisa y recordar el valor de la verdadera amistad.

A mis ahijados Luciana, José, María Juliana y María Gabriela. Espero poder ser esa palabra motivadora e inspirarlos y acompañarlos en cada paso de su camino de vida.

A Minervita, cuya compañía desinteresada y amor absoluto, ha brindado tranquilidad y paz en mi camino desde su llegada a mi vida.

Y a la Ciencia y la Investigación, por impulsarme a explorar, descubrir y expandir mis conocimientos, regalándome momentos de aprendizaje y alegría.

Agradecimientos

A mis codirectores, Heider Carreño y Mabel Quintero, por compartir generosamente su conocimiento, tiempo y sabiduría en cada etapa de esta investigación. Su apoyo fue fundamental para el desarrollo de este trabajo. Infinitas gracias.

A mi directora, Marianny Combariza, cuya experiencia, conocimiento y guía fueron la brújula en este camino de investigación.

A mis evaluadoras, la profesora Silvia Becerra y la profesora Viviana Güiza, por sus valiosas aportaciones y por la retroalimentación oportuna que ayudó a concretar este proyecto en el tiempo estipulado.

A la Doctora Patricia Escobar, quien me abrió las puertas de su grupo de investigación, brindándome un espacio invaluable para desarrollar gran parte de mi trabajo.

A la Escuela de Ingeniería Metalúrgica, que me recibió con calidez y profesionalismo, haciéndome sentir en casa durante todo el proceso. Espero poder regresar algún día.

Al profesor Óscar y a Yaddy, incansables en su apoyo y colaboración a lo largo de la maestría. Su dedicación y constante interés fueron una motivación constante en mi proceso formativo.

Al grupo de investigación CEIAM y a todos sus miembros, por el respaldo, el espacio y los recursos que facilitaron la realización de esta investigación.

Al centro de investigación CINTROP y a cada uno de sus miembros, por su apoyo y por brindarme el ambiente y los recursos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

A la Universidad Industrial de Santander, mi alma mater y mi segundo hogar, por ser el espacio que ha nutrido mi crecimiento profesional y ha fortalecido mi vocación.

A todos mis compañeros y colegas, con quienes he compartido no solo desafíos, sino también momentos de camaradería, construyendo juntos una comunidad con propósito.

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	14
1. Formulación del problema	15
2. Objetivos	16
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. Marco Teórico.....	16
3.1 Celulosa Bacteriana (CB)	18
3.2 Piel y características óptimas para cicatrización.....	19
3.3 Aplicaciones de la CB en apósitos para cicatrización	21
3.4 <i>Triticum vulgare</i> (TV).....	22
3.5 Nanocristales de Celulosa Bacteriana (NCCB)	23
4. Metodología	26
4.1 Etapa 1	26
4.1.1 Biosíntesis y purificación de Celulosa Bacteriana a partir de <i>Gluconacetobacter Xylinum</i>	26
4.1.2 Preparación de material compuesto de CB/TV-NCCB	28
4.1.2.1 Preparación de membranas de celulosa bacteriana (CB).....	28
4.2.2.2 Preparación de emulsiones para la absorción del extracto de <i>Triticum vulgare</i> (TV) (estudio preliminar).....	29
4.1.2.3 Síntesis de Nanocristales de Celulosa Bacteriana NCCB.....	30
4.1.2.4 Selección de la concentración óptima de TV y preparación de emulsiones finales	

(emulsiones pickering O/W).....	32
4.1.2.5 Caracterización de las Emulsiones de TV-NCCB.	32
4.1.2.5.1 Microscopía de Polarización.....	33
4.1.2.5.2 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).....	33
4.1.2.6 Impregnación de membranas de CB y creación del material compuesto CB/TV-NCCB.	33
4.1.2.6.1 Metodología por inmersión.....	34
4.1.3 Determinación de la Cinética de Liberación de TV mediante Espectrofotometría UV	35
4.1.3.1 Identificación del Punto de Absorción.....	35
4.1.3.2 Construcción de la Curva de Calibración.	35
4.1.3.3 Ensayo de Liberación.....	36
4.2. Etapa 2	36
4.2.1 Preparación de cultivo celular.....	36
4.2.1.1 Ensayo de viabilidad celular.	37
4.2.1.2 Adhesión cualitativa de células en la superficie de los materiales mediante epifluorescencia.	38
5. Resultados y Discusión.....	39
5.1 Etapa 1	39
5.1.1 Preparación de membranas de celulosa bacteriana (CB).....	39
5.1.2 Preparación de material compuesto de CB/TV-NCCB	40
5.1.2.1 Preparación de emulsiones para la absorción del extracto de <i>Triticum vulgare</i> (TV) (estudio preliminar).....	40
5.1.2.2 Síntesis de Nanocristales de Celulosa Bacteriana (NCCB).	44
5.1.2.3 Selección de la concentración óptima de TV y preparación de emulsiones finales	

(emulsiones pickering O/W con NCCB).	45
5.1.2.4 Caracterización de las Emulsiones de TV-NCCB.	46
5.1.2.4.1 Microscopía de Polarización.....	46
5.1.2.4.2 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS).....	47
5.1.2.5 Impregnación de membranas de CB y creación del material compuesto CB/TV-NCCB.	48
5.1.3 Determinación de la Cinética de Liberación de TV mediante Espectrofotometría UV	51
5.1.3.1 Construcción de la Curva de Calibración.	51
5.1.3.2 Ensayo de Liberación.....	52
5.2 Etapa 2	54
5.2.1 Preparación de cultivo celular.....	54
5.2.1.1 Ensayo de viabilidad celular.	54
5.2.1.2 Adhesión cualitativa de células en la superficie de los materiales mediante epifluorescencia.	55
6. Conclusiones.....	57
7. Recomendaciones	58
Referencias Bibliográficas	60

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Análisis DLS de emulsiones pickering TV-NCCB: tamaño promedio y PDI promedio.	47
Tabla 2. Porcentaje promedio de rehidratación, porcentaje promedio de emulsión absorbida dentro del parche de CB y cantidad promedio de TV absorbido por los parches de CB.....	49

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Estructura química de la glucosa y la celulosa.....	18
Figura 2. Proceso de síntesis de CB desde las microfibras hasta la formación de la película 3D	19
Figura 3. Estructura de la piel.....	20
Figura 4. Diagrama de flujo de la metodología estructurada.....	26
Figura 5. Biosíntesis de Celulosa Bacteriana a partir de Gluconacetobacter Xylinum.	27
Figura 6. Preparación de las membranas de CB	28
Figura 7. Preparación de emulsiones para la absorción del extracto de Triticum vulgare (TV): A) Prueba preliminar I, emulsiones preparadas usando suspensión de CB+TV, B) Prueba preliminar II, emulsiones preparadas usando NFCB+TV, C) Emulsiones finales con las que se impregnaron las películas de CB, preparadas usando NCCB a concentraciones de 0,3%, 0,6% y 0,9% + TV.	30
Figura 8. Síntesis y purificación de nanocristales de celulosa bacteriana (NCCB).....	32
Figura 9. Impregnación de membranas de CB y creación del material compuesto CB/TV-NCCB	34
Figura 10. Cultivo celular y ensayo de viabilidad celular usando células Vero.....	38
Figura 11. Parche de CB de 2mm de grosor y 20 mm de diámetro.....	40
Figura 12. Fase 1 y 2 de emulsiones de TV. A) Emulsiones de suspensión de CB y TV (15% y 20%), B) Emulsión de suspensión de CB y TV 10%, C) Emulsiones de suspensión de NFCB y TV (5% y 10%) y D) Microscopía emulsión de NFCB y TV 10%.....	41
Figura 13. Tipos de emulsiones según sus componentes.....	42
Figura 14. Microscopía electrónica de barrido (SEM): A) CB y B) NCCB.....	45

Figura 15. Preparación de emulsiones pickering con NCCB (0.3%, 0.6%, 0.9%)..... 46

Figura 16. Microscopías de emulsiones pickering de TV y NCCB a distintas concentraciones:
 A) 0,3% B) 0,6% y C) 0,9%. 47

Figura 17. Curvas de calibración para determinar las concentraciones en el ensayo de liberación usando emulsiones pickering de TV-NCCB a diferentes concentraciones 51

Figura 18. Curvas de liberación de TV del material compuesto a diferentes concentraciones de NCCB..... 52

Figura 19. Viabilidad celular de BC, el TV, y los NCCB y emulsiones de NCCB-TV, usando células Vero 55

Figura 20. Microscopías de fluorescencia de tinción nuclear de células Vero: A) Control, B) CB/0.3%NCCB-TV, C) CB/0.6%NCCB-TV y D) CB/0.9%NCCB-TV. 57

Resumen

Título: Integración de celulosa bacteriana y *triticum vulgare* para la creación de materiales bioactivos con alta biocompatibilidad*.

Autor: Daniel Alfonso Quintero Parra**

Palabras clave: Celulosa bacteriana (CB), *Triticum vulgare* (TV), nanocristales de celulosa bacteriana (NCCB).

Descripción:

Los biomateriales han emergido como un campo clave en la investigación médica, especialmente en la regeneración y curación de tejidos. A lo largo de las últimas décadas, la introducción de diversos materiales y medicamentos ha impulsado avances significativos en este ámbito. La celulosa bacteriana (CB), sintetizada por bacterias como *Gluconacetobacter xylinus*, es uno de los materiales con mayor potencial debido a sus propiedades de biocompatibilidad, no toxicidad y capacidad para retener humedad, lo que la posiciona como una excelente candidata para apósitos destinados al tratamiento de heridas. Por su parte, el *Triticum vulgare* (TV), un extracto natural del germen de trigo, ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional por su capacidad para acelerar la cicatrización de tejidos.

Este estudio se enfoca en la síntesis de un material compuesto basado en CB y TV (CB/TV), combinando las propiedades estructurales y protectoras de la celulosa bacteriana con las propiedades cicatrizantes del *Triticum vulgare*. La CB se sintetizó utilizando *Gluconacetobacter xylinus* en un medio con mucílago de cacao como fuente de carbono. Para optimizar la integración del TV en la matriz de CB, se prepararon emulsiones de Pickering (O/W) utilizando nanocristales de celulosa bacteriana (BCNC) como agentes estabilizantes y TV como fase oleosa. La estabilidad de las emulsiones se evaluó con concentraciones variables de BCNC (0,3 %, 0,6 % y 0,9 % p/v). El material compuesto CB/TV se obtuvo mediante la reducción controlada de humedad en discos de CB, seguido por la impregnación con las emulsiones de TV. La viabilidad celular se evaluó mediante ensayos de reducción de MTT con células *Vero* de riñón de mono verde africano durante 72 horas, mostrando una viabilidad celular superior al 80% tanto en los materiales individuales como en el material compuesto. Estos resultados sugieren que el compuesto CB/TV tiene un alto potencial como biomaterial para aplicaciones en la cicatrización de heridas, contribuyendo a la mejora en los tratamientos de regeneración tisular.

* Trabajo de Investigación

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica. Directora: Marianny Yajaira Combariza, Química, PhD. Co-directores: Mabel Juliana Quintero Silva, Bacterióloga, M.Sc y Heider Carreño García, Bacteriólogo, PhD (C).

Abstract

Title: Integration of Bacterial Cellulose and Triticum Vulgare for the Creation of Bioactive Materials with High Biocompatibility*

Author: Daniel Alfonso Quintero Parra**

Keywords: Bacterial cellulose (BC), Triticum vulgare (TV), bacterial cellulose nanocrystals (BCN).

Description:

Biomaterials have emerged as a key field in medical research, particularly in tissue regeneration and healing. Over the past decades, the introduction of various materials and pharmaceuticals has driven significant advances in this area. Bacterial cellulose (BC), synthesized by bacteria such as *Gluconacetobacter xylinus*, is one of the most promising materials due to its biocompatibility, non-toxicity, and moisture-retaining capacity, making it an excellent candidate for wound dressing applications. On the other hand, *Triticum vulgare* (TV), a natural extract from wheat germ, has been widely used in traditional medicine for its ability to accelerate tissue healing.

This study focuses on the synthesis of a composite material based on BC and TV (BC/TV), combining the structural and protective properties of bacterial cellulose with the wound-healing properties of *Triticum vulgare*. BC was synthesized using *Gluconacetobacter xylinus* in a medium containing cacao mucilage as a carbon source. To optimize the integration of TV into the BC matrix, Pickering emulsions (O/W) were prepared using bacterial cellulose nanocrystals (BCNC) as stabilizing agents and TV as the oil phase. Emulsion stability was evaluated at varying BCNC concentrations (0.3%, 0.6%, and 0.9% w/v).

The BC/TV composite material was produced by controlled moisture reduction in BC discs, followed by impregnation with TV emulsions. Cell viability was assessed using MTT reduction assays with Vero cells from African green monkey kidney over a 72-hour period, showing cell viability above 80% for both the individual materials and the composite. These results suggest that the BC/TV composite holds great potential as a biomaterial for wound healing applications, contributing to advancements in tissue regeneration treatments.

* Research Work

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Metalúrgica. Directora: Marianny Yajaira Combariza, Química, PhD. Co-directores: Mabel Juliana Quintero Silva, Bacterióloga, M.Sc y Heider Carreño García, Bacteriólogo, PhD (C).

Introducción

Los biomateriales han captado la atención de la comunidad científica y médica debido a su potencial para resolver una amplia gama de desafíos en la medicina. Uno de los aspectos más destacados dentro de este campo es la cicatrización de heridas, una área de investigación continua que ha dado lugar a numerosos avances y productos innovadores destinados a mejorar los procesos de curación y recuperación del paciente.

Investigaciones recientes han identificado que el vendaje ideal para tratar quemaduras, promover la regeneración y facilitar la sustitución temporal de la piel debe cumplir con criterios específicos: mantener la humedad en la herida, permitir el intercambio de oxígeno, absorber el exudado, reducir el dolor, el tiempo de cicatrización y el riesgo de infecciones (Voineskos et al., 2009).

En este contexto, la celulosa bacteriana (CB), sintetizada por bacterias no patógenas como *Komagateibacter*, *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*, ha surgido como un material prometedor. La CB exhibe biocompatibilidad, no toxicidad y una excepcional capacidad para retener la humedad, características que la convierten en un apósito ideal para proteger tejidos lesionados (Khalid et al., 2017; Li et al., 2015). Paralelamente, el *Triticum vulgare* (TV), un extracto natural derivado del trigo, ha sido reconocido en la medicina tradicional por sus propiedades que favorecen la reparación y la regeneración de la piel, siendo utilizado en el tratamiento de diversas condiciones como úlceras, quemaduras y retrasos en la cicatrización (Sanguigno et al., 2015).

En este trabajo, se ha desarrollado un apósito basado en CB producida por *Gluconacetobacter xyrius*, enriquecida con TV como agente cicatrizante. Con este enfoque se

exploran nuevas posibilidades para mejorar significativamente los estándares de cuidado y recuperación en pacientes con lesiones cutáneas y condiciones médicas relacionadas.

1. Formulación del problema

Las lesiones por quemaduras y otras heridas en la piel requieren tratamientos eficaces que promuevan la cicatrización y minimicen el riesgo de complicaciones como infecciones o retrasos en la regeneración. A pesar de los avances en biomateriales, los apósitos disponibles en el mercado aún presentan limitaciones en cuanto a la capacidad para mantener un ambiente húmedo adecuado, absorber exudados y acelerar la cicatrización de la piel lesionado. En este contexto, la celulosa bacteriana (CB), producida por bacterias del género *Gluconacetobacter*, ha demostrado ser un material prometedor para su uso como apósito debido a sus propiedades de biocompatibilidad, no toxicidad, alta porosidad y capacidad para retener la humedad. Sin embargo, aún existe la necesidad de optimizar este biomaterial para mejorar su capacidad cicatrizante y hacerlo más efectivo en la reparación de tejidos dañados.

Dado el desafío de optimizar los apósitos para mejorar la cicatrización de heridas, este estudio se propone desarrollar un apósito avanzado basado en celulosa bacteriana (CB) producida por *Gluconacetobacter xylinus*, utilizando mucílago de cacao como fuente de carbono. Además, se evaluará la incorporación de extracto de *Triticum vulgare*. Este trabajo busca ofrecer una solución innovadora para el tratamiento de heridas cutáneas, contribuyendo al desarrollo de biomateriales más eficaces en el ámbito de la medicina regenerativa.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Desarrollar un biocompuesto basado en celulosa bacteriana y *Triticum vulgare* mediante un proceso de impregnación, con pruebas de viabilidad y adhesión celular en un modelo *In Vitro* que determinen su biocompatibilidad.

2.2 Objetivos específicos

Sintetizar un biocompuesto que integre membranas de celulosa bacteriana (CB) como matriz y *Triticum vulgare* (TV) como agente bioactivo.

Determinar la cinética de liberación de *Triticum vulgare* del biocompuesto.

Evaluar la biocompatibilidad del material compuesto mediante pruebas de viabilidad y adhesión celular en un modelo *In Vitro*.

3. Marco Teórico

Los biomateriales han sido un objetivo central en numerosas investigaciones dentro del campo de la medicina, debido a su capacidad para ofrecer soluciones innovadoras a diversos

problemas clínicos. Estos materiales buscan reducir el tiempo de recuperación y minimizar la intervención quirúrgica necesaria, lo que a su vez reduce el riesgo de complicaciones y mejora la calidad de vida de los pacientes. Dentro de este amplio campo, la cicatrización de la piel ha sido un área de estudio crucial durante décadas. Este interés ha llevado al desarrollo de una variedad de materiales y medicamentos destinados a mejorar las condiciones de cicatrización, promoviendo una recuperación más rápida y efectiva.

La cicatrización de heridas es un proceso complejo que involucra múltiples etapas, desde la coagulación inicial y la inflamación hasta la proliferación celular y la remodelación del tejido. Un apósito ideal para el tratamiento de quemaduras, regeneración y sustituciones temporales de piel debe cumplir con varios criterios: mantener la humedad en la herida, permitir el intercambio de oxígeno, absorber el exudado, acelerar el cierre de la herida, reducir el dolor, el tiempo de cicatrización y prevenir infecciones (Voineskos et al., 2009).

La celulosa bacteriana (CB), un biomaterial de gran potencial, se obtiene a partir de bacterias no patógenas pertenecientes a los géneros *Komagateibacter*, *Acetobacter* y *Gluconacetobacter*. Este material destaca por su biocompatibilidad, no toxicidad y excelente capacidad para retener humedad, características que lo hacen ideal para apósitos utilizados en la rehabilitación de heridas (Khalid et al., 2017; Li et al., 2015; Portela et al., 2019).

Paralelamente, el *Triticum vulgare* (TV), un extracto natural del trigo, es conocido en la medicina tradicional por su capacidad para acelerar la reparación de la piel. Su aplicación en productos para el tratamiento de úlceras, llagas, quemaduras, cicatrización lenta, enfermedades distróficas y problemas de reepitelización es bien documentada (Sanguigno et al., 2015).

Este estudio se enfocó en desarrollar un innovador sistema de liberación, combinando CB producida por *Gluconacetobacter xylinus* con TV, para crear un apósito que actúe como agente

cicatrizante, promoviendo la curación de heridas. Esta integración de CB y TV ofrece una prometedora solución en el ámbito de los biomateriales, contribuyendo significativamente al avance en el tratamiento de heridas.

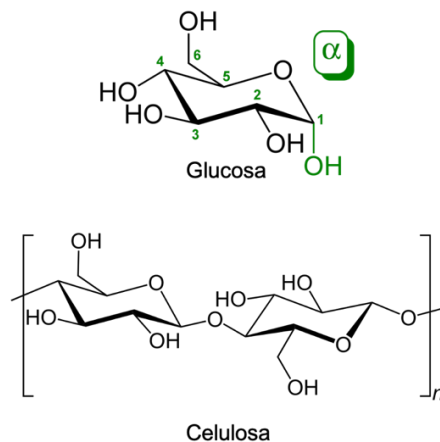
3.1 Celulosa Bacteriana (CB)

La celulosa es un homopolímero lineal compuesto por unidades de glucosa unidas por enlaces β -(1-4)-glucosídicos, formando así el dímero de celobiosa, la unidad fundamental de la celulosa (Figura 1) (Suhas et al., 2016). La celulosa es producida naturalmente por plantas y algunas bacterias.

En el caso de la celulosa bacteriana, las bacterias como *Komagateibacter*, *Acetobacter* y *Gluconacetobacter* secretan cadenas de celulosa a través de sus paredes celulares. Estas cadenas se organizan en nanofibras y luego en microfibrillas, formando una red tridimensional estable caracterizada por una alta resistencia mecánica (Figura 2) (Chawla et al., 2009).

Figura 1.

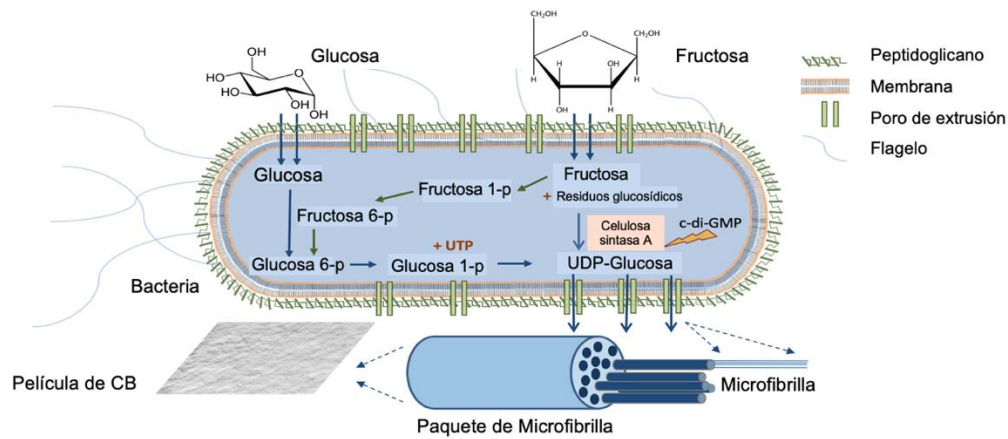
Estructura química de la glucosa y la celulosa



Las propiedades únicas de la celulosa bacteriana incluyen una alta capacidad de retención de agua, alta resistencia mecánica en estado húmedo, baja densidad, biocompatibilidad, no toxicidad y biodegradabilidad. Estas características hacen de la CB un material excepcional para aplicaciones tecnológicas en biomedicina, tanto para el cuidado de heridas como para la regeneración de tejido dañado (Czaja et al., 2007).

Figura 2.

Proceso de síntesis de CB desde las microfibras hasta la formación de la película 3D



Nota. Tomada y modificada de (Portela et al., 2019).

3.2 Piel y características óptimas para cicatrización

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y está compuesta por tres capas principales: la epidermis, la dermis y la hipodermis (Figura 3). La epidermis es la capa más externa y su función principal es mantener la homeostasis del entorno interno del cuerpo y protegerlo del entorno externo. La dermis contiene vasos sanguíneos, nervios, folículos pilosos y glándulas

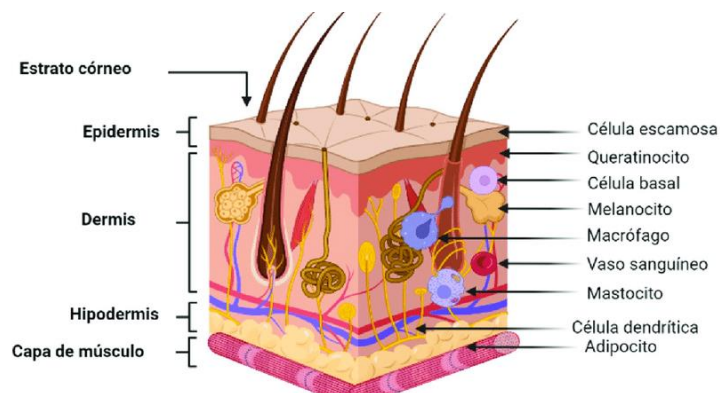
sebáceas y sudoríparas. La hipodermis, o capa subcutánea, está compuesta principalmente por grasa y tejido conectivo (Formulación et al., 2022).

Cuando una persona sufre daños graves en grandes áreas de la piel, como en el caso de quemaduras, se expone a una disminución de la función local, deshidratación e infecciones, lo que puede llevar a la pérdida de extremidades o incluso a la muerte. La cicatrización de heridas es un proceso que comprende una serie compleja de eventos biológicos destinados a restaurar la función de barrera cutánea. Este proceso incluye fases de coagulación, inflamación, proliferación y remodelación, cada una con sus propios requisitos y desafíos (Rowan et al., 2015).

Para que un apósito sea efectivo en la cicatrización de heridas, debe cumplir con varios requisitos: mantener un ambiente húmedo, permitir el intercambio de oxígeno, absorber el exudado, reducir el dolor, disminuir el tiempo de cicatrización y prevenir infecciones. Los apósitos tradicionales a menudo no cumplen con todos estos criterios, lo que ha impulsado la investigación y desarrollo de materiales avanzados como la CB (Voineskos et al., 2009).

Figura 3.

Estructura de la piel



Nota. Tomada de (Formulación et al., 2022).

3.3 Aplicaciones de la CB en apósitos para cicatrización

Los polímeros de origen natural presentan varias ventajas sobre los sintéticos en la aplicación como apósitos debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad y actividad biológica. La alta porosidad, capacidad de retención de agua y resistencia mecánica de la CB la catapultan como un material ideal para aplicaciones en el cuidado de heridas y regeneración de tejidos (Czaja et al., 2007).

La capacidad de la CB para absorber y retener agua permite cargar medicamentos líquidos y compuestos bioactivos en el material, mejorando su eficiencia como apósito para heridas. Mantener la humedad evita la deshidratación del apósito, lo que previene que se adhiera a la herida y protege el tejido de la exposición a agentes externos, reduciendo el dolor durante el cambio de vendaje (Ovington, 2007).

Estudios han demostrado que la incorporación de gel de aloe vera en la estructura de la CB, en contenidos inferiores al 30%, aumenta la capacidad de retención de agua en 1.5 veces comparado con la CB sin modificar y mejora la permeabilidad del vapor de agua (Saibuatong & Phisalaphong, 2010). Además, la modificación de la CB con glicerina ha mostrado mejorar la hidratación de la piel y la biocompatibilidad, lo que la hace adecuada para el tratamiento de heridas secas (Almeida et al., 2014).

Las nanopartículas de plata pueden sintetizarse dentro de la estructura porosa tridimensional de la CB, permaneciendo unidas químicamente a las superficies de la fibra. Este material compuesto se conserva en un ambiente húmedo, favoreciendo la cicatrización de heridas y proporcionando propiedades antimicrobianas (Pal et al., 2017). La combinación de CB con polímeros biodegradables como la agarosa y el poliácido láctico ha demostrado mejorar las

propiedades mecánicas, la capacidad de absorción de agua y la estabilidad térmica, lo que los hace adecuados como materiales de apósito para heridas (Awadhiya et al., 2017; Foong et al., 2018).

3.4 *Triticum vulgare* (TV)

El *Triticum vulgare* (TV) ha sido utilizado ampliamente en la medicina tradicional debido a su contenido de malto-oligosacáridos que contribuyen a acelerar la regeneración de tejidos (Sanguigno et al., 2015). Históricamente, la medicina tradicional iraní ha utilizado TV como producto de belleza para la piel, hidratación y reparación de poros (Mikaili et al., 2012).

Productos que contienen TV son utilizados en el tratamiento de úlceras, llagas, quemaduras, retrasos en la cicatrización y enfermedades distróficas. TV ha demostrado contribuir significativamente en los procesos de reparación tisular, estimulando la quimiotaxis y aumentando el índice fibroblástico, factores cruciales en la cicatrización de heridas (Sanguigno et al., 2015).

En el contexto de la aplicación farmacéutica para cicatrización de heridas, el extracto de *Triticum vulgare* (trigo) aporta varios componentes beneficiosos. Las proteínas, como el gluten y las albuminas, pueden formar una película protectora y apoyar la regeneración celular (Khalid et al., 2023). Los ácidos grasos insaturados, como el linoleico y oleico, mejoran la integridad de la piel y reducen la inflamación (Calder, 2017). Las vitaminas del complejo B y la vitamina E son cruciales para la reparación celular y la protección antioxidante (Beydoun et al., 2020; Fiedor & Burda, 2014). Minerales como el zinc y el hierro facilitan la síntesis de colágeno y el aporte de oxígeno a los tejidos, respectivamente. Además, los fenoles y flavonoides del trigo ofrecen propiedades antioxidantes que favorecen un entorno óptimo para la cicatrización (Lin et al., 2017; Melguizo-Rodríguez et al., 2021). Estos componentes trabajan en sinergia para mejorar la

reparación de tejidos y reducir la inflamación, promoviendo así una cicatrización más efectiva (Melguizo-Rodríguez et al., 2021). Sin embargo, TV por sí solo no puede actuar como un apósito protector de la herida.

3.5 Nanocristales de Celulosa Bacteriana (NCCB)

La celulosa bacteriana (CB) ha surgido como un biomaterial versátil y prometedor en diversas aplicaciones biomédicas y tecnológicas. Los nanocristales de CB (NCCB), derivados de la descomposición controlada de fibras de CB, destacan por su alta área superficial y estructura cristalina que confieren propiedades mecánicas y superficiales excepcionales (Nechporchuk et al., 2016).

En emulsiones Pickering, los nanocristales de celulosa bacteriana actúan como emulsionantes sólidos al adsorberse en la interfaz aceite-agua. Esta capacidad permite reducir la energía interfacial entre las fases, evitando la coalescencia de las gotas de aceite. Por ejemplo, en una emulsión formada por NCCB y aceite de oliva (aceite en agua O/W), la afinidad de dichos nanocristales por el aceite se debe a interacciones específicas como enlaces de hidrógeno y fuerzas de dispersión, facilitando una adsorción efectiva en la interfaz (Arserim-Uçar et al., 2021; Yan et al., 2017).

A la hora de identificar el tipo de emulsión, el análisis mediante microscopía óptica o microscopía electrónica puede ayudar a observar la distribución de las gotas de la fase dispersa (aceite o agua) en la fase continua (Tadros et al., 2004). En una emulsión O/W, las gotas de aceite estarán dispersas en el agua, mientras que en una W/O, el agua estará dispersa en el aceite. También por dilución es posible determinar el tipo de emulsión pickering. Esta prueba consiste en diluir la

emulsión con agua o aceite. Si la emulsión se diluye con agua sin separarse, es probable que sea una emulsión O/W, ya que el agua es la fase continua. Si se diluye mejor con aceite, indica que es una emulsión W/O (Binks, 2002; Gonzenbach et al., 2006).

En una emulsión O/W, una mayor proporción de las partículas estabilizadoras se encuentra en la fase acuosa, mientras que en una emulsión W/O, una mayor fracción de las partículas se localiza en la fase oleosa. Esto refleja la afinidad diferencial de las partículas por las fases continuas y dispersas en cada tipo de emulsión (Kedzior et al., 2021).

Los NCCB han demostrado ser eficaces como agentes activos de superficie en emulsiones Pickering, las cuales se estabilizan mediante partículas sólidas en lugar de surfactantes convencionales, ofreciendo ventajas significativas en términos de estabilidad y sostenibilidad ambiental (Chen et al., 2018). Estos nanocristales se adsorben en las interfaces líquido-líquido, reduciendo la tensión interfacial y estabilizando la emulsión mediante la formación de una barrera física (Kalashnikova et al., 2011). Químicamente, los nanocristales de celulosa bacteriana están compuestos principalmente por cadenas de celulosa con grupos hidroxilo (-OH) en su superficie, facilitando la interacción con el aceite a través de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals, lo cual favorece la formación de una capa monomolecular que estabiliza la emulsión. Además, la estructura cristalina ordenada de los nanocristales de celulosa bacteriana proporciona una alta estabilidad estructural a la interfaz, mejorando así la resistencia de la emulsión a la coalescencia y separación (Arserim-Uçar et al., 2021; Chen et al., 2018; Kalashnikova et al., 2011).

La capacidad de los NCCB para formar emulsiones Pickering se ha aplicado en diversas industrias, incluyendo cosméticos, alimentos funcionales y formulaciones farmacéuticas. En este caso particular, la incorporación de NCCB en emulsiones que contienen extracto oleoso de TV (*Triticum vulgare*) para crear una emulsión (Aceite en agua O/W), donde el extracto es la fase

dispersa, el agua es la fase continua y las partículas sólidas (NCCB) estabilizan las gotas de extracto en el agua, además de protegerlo de la fácil oxidación y deterioro (Y. Wang et al., 2024), lo que puede mejorar la liberación controlada de compuestos bioactivos, mejorando así su eficacia en aplicaciones de cuidado de la piel y cicatrización de heridas (Freire et al., 2011).

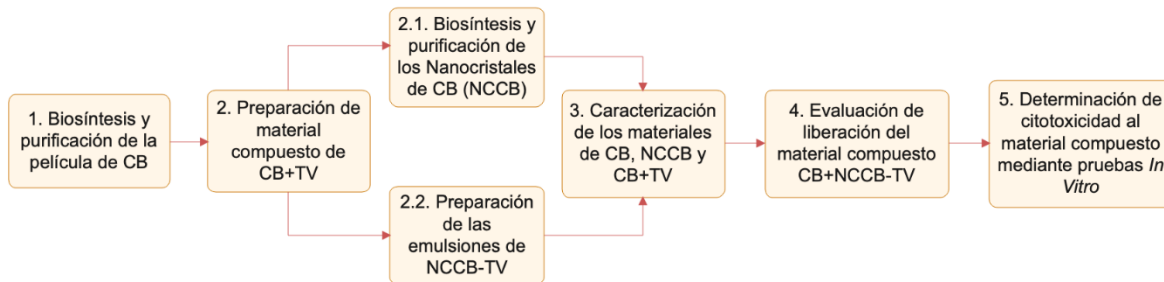
Este marco teórico destaca la relevancia de los biomateriales, especialmente la CB y TV, en la cicatrización de heridas. La CB, con sus propiedades de biocompatibilidad, alta capacidad de retención de agua y resistencia mecánica, se presenta como un material ideal para apósitos. Por otro lado, TV acelera la regeneración tisular, contribuyendo significativamente a la reparación de heridas.

La integración de NCCB y TV en formulaciones combinadas representa una oportunidad innovadora en la ciencia de biomateriales. Esta combinación facilita la absorción y posterior liberación de compuestos bioactivos, mejorando la eficiencia y efectividad del tratamiento de heridas. Este enfoque interdisciplinario promete avances significativos en el desarrollo de soluciones biomédicas para la cicatrización de heridas, beneficiando tanto a pacientes como a profesionales de la salud.

4. Metodología

Figura 4.

Diagrama de flujo de la metodología estructurada.



4.1 Etapa 1

4.1.1 Biosíntesis y purificación de Celulosa Bacteriana a partir de *Gluconacetobacter Xylinum*

Para la activación de la cepa bacteriana *Gluconacetobacter xylinum*, se tuvo en cuenta el volumen del medio fermentativo y para esto, se determinó que el preinóculo equivalía al 10% del volumen total. Primero, se llevó a cabo la activación la bacteria *Gluconacetobacter xylinum* (ATCC® 23768™) la cual estaba criopreservada, en 100 mL de medio Hestrin-Schramm (HS) con las siguientes proporciones: 20 g/L glucosa, 5 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura, 2,7 g/L fosfato de disodio [Na₂HPO₄], 1,15 g/L ácido cítrico, pH 5,5. De allí se llevó a incubar utilizando un agitador orbital a 150 rpm y 30°C durante 3 días (Hestrin & Schramm, 1954). Pasado este periodo de tiempo, se determinó que el preinóculo estaba listo cuando se observó la concentración máxima de biomasa apreciable, en forma de “grumos” o “bolas de algodón” blancas

(Saavedra-Sanabria et al., 2021). El volumen total de fermentación fue de 3 litros, por tal motivo, por lo que se repitió el paso anterior tres veces para completar el volumen requerido de 300 mL.

Posteriormente, se prepararon 2700 mL de medio de fermentación modificado con exudado de mucílago de cacao (MCD) para la producción de celulosa bacteriana (CB), el cual contenía 18,9 g de ácido ascórbico, 34,6 g de extracto de levadura, 19,7 g de citrato de sodio, 1350 mL de agua destilada y 1350 mL de mucílago de cacao esterilizado como fuente de carbono. Este medio de cultivo se esterilizó térmicamente antes de inocularlo utilizando un equipo autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos (Hestrin & Schramm, 1954; Saavedra-Sanabria et al., 2021).

Figura 5.

*Biosíntesis de Celulosa Bacteriana a partir de *Gluconacetobacter Xylinum*.*



A continuación, se adicionó al medio de cultivo el preinóculo previamente preparado (300 mL) para completar el volumen de 3 L. El proceso se llevó a cabo bajo estrictas medidas de bioseguridad, en una cabina con flujo laminar. La celulosa bacteriana se sintetizó en reactores con un volumen de operación de 200 mL de cuello largo y diámetro reducido (50 mm), para procurar obtener películas de un grosor superior a 30 mm que facilitarían su manipulación. Luego de sellar los reactores se dejaron en la incubadora durante 30 días a 30 °C. Después de este período, se obtuvieron películas de 33 mm (grosor promedio) de CB húmeda (Saavedra-Sanabria et al., 2021).

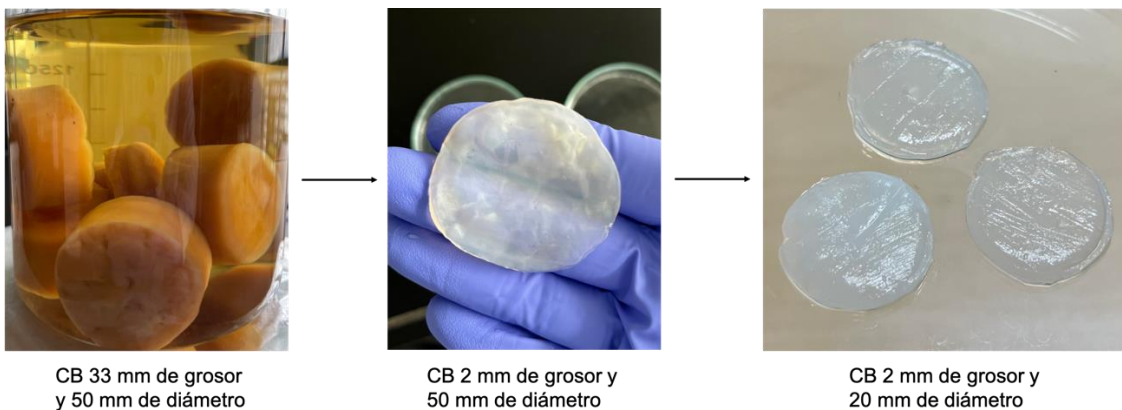
La CB obtenida se limpió con agua desionizada, para luego llevarla a una solución de NaOH al 0.1N a 100°C por 1 hora, este ciclo se repitió 4 veces. Finalmente se limpió con agua desionizada, se limpió nuevamente con agua desionizada pH=7 y se guardó en agua desionizada a 4°C hasta la experimentación (Figura 5) (Wu et al., 2014).

4.1.2 Preparación de material compuesto de CB/TV-NCCB

4.1.2.1 Preparación de membranas de celulosa bacteriana (CB). Las membranas de celulosa bacteriana (CB) fueron sintetizadas y posteriormente purificadas siguiendo la metodología anterior. Una vez purificadas, las membranas con dimensiones iniciales de 33 mm de grosor y 50 mm de diámetro, se cortaron a 2 mm de grosor utilizando un equipo con disco de acero inoxidable, luego se cortaron a 20 mm diámetro usando un bisturí quirúrgico (Figura 6).

Figura 6.

Preparación de las membranas de CB

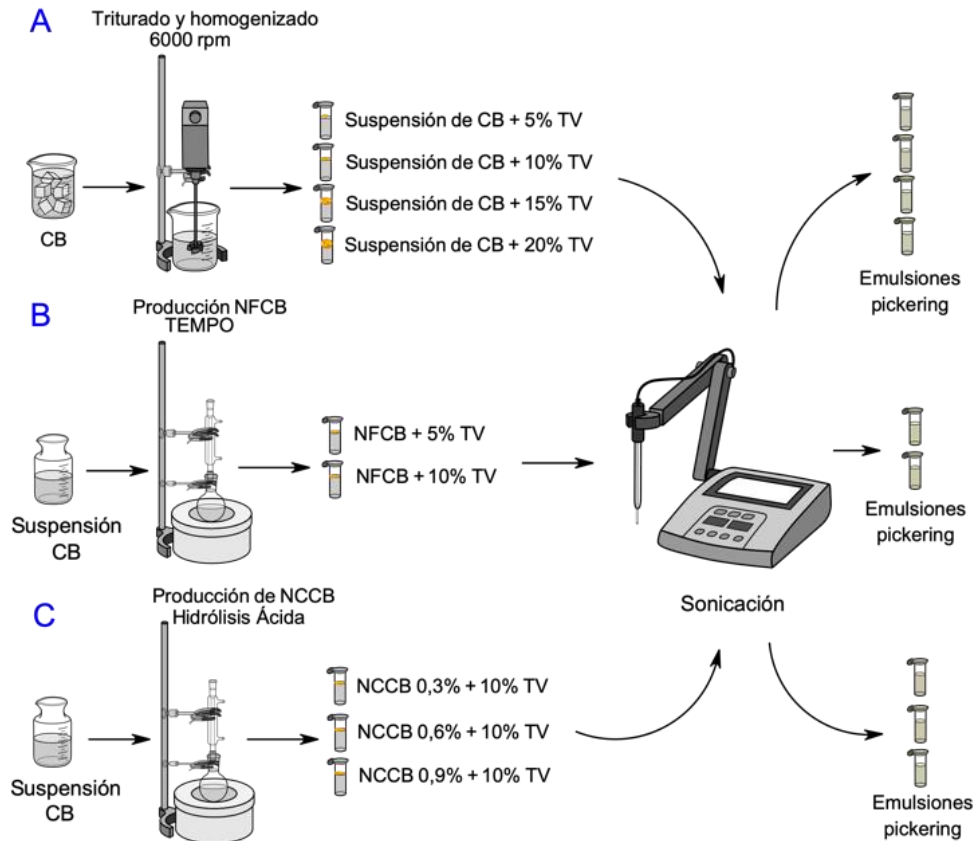


4.2.2.2 Preparación de emulsiones para la absorción del extracto de *Triticum vulgare* (TV) (estudio preliminar). Para incorporar el extracto de *Triticum vulgare* (TV) (Naissance, wheatgerm virgin oil No 239, UK) el cual es de naturaleza oleosa a las películas de CB y obtener el material compuesto (CB+TV), se realizaron pruebas preliminares basadas en la metodología de (Yan et al., 2017b). En esta primera prueba se prepararon emulsiones pickering aceite/agua (O/W), usando el aceite de TV a diversas concentraciones de TV (5%, 10%, 15% y 20%) y una suspensión de CB triturada y homogenizada mediante un ultraturrax (IKA-T25) a 6000 rpm durante 1 hora (0,9% CB / 99,1% agua). Estas emulsiones fueron preparadas utilizando una punta de ultrasonido, aplicando pulsos de sonicación hasta la formación visible de la emulsión (4 pulsos de 5 segundos) (Figura 7A). Esta primera prueba se realizó para evaluar la CB como agente activo de superficie y la estabilidad de las emulsiones de TV.

Con el objetivo de evaluar la influencia de las nanopartículas de celulosa como agentes activos de superficie dentro de las emulsiones, se realizó una segunda prueba, donde se usó una suspensión acuosa de nanofibras de celulosa (NFCB) (0,9%) obtenidas mediante el procedimiento de oxidación TEMPO, donde se realiza la conversión eficiente y selectiva de grupos hidroxilo alcohólicos a grupos aldehídos, cetonas y carboxilo en condiciones suaves (Tang et al., 2024). Estas NFCB fueron proporcionadas por un miembro del grupo de investigación. Con estas NFCB se prepararon emulsiones Pickering O/W utilizando las concentraciones de TV que mostraron mejor estabilidad en la primera prueba (5% y 10%) (Figura 7B).

Figura 7.

*Preparación de emulsiones para la absorción del extracto de *Triticum vulgare* (TV): A) Prueba preliminar I, emulsiones preparadas usando suspensión de CB+TV, B) Prueba preliminar II, emulsiones preparadas usando NFCB+TV, C) Emulsiones finales con las que se impregnaron las películas de CB, preparadas usando NCCB a concentraciones de 0,3%, 0,6% y 0,9% + TV.*



4.1.2.3 Síntesis de Nanocristales de Celulosa Bacteriana NCCB. La producción de nanocristales de celulosa bacteriana (NCCB) se realizó mediante hidrólisis con ácido sulfúrico, siguiendo una metodología modificada basada en los estudios de Mo et al., 2015; Zhang et al., 2012. Inicialmente, se dispersaron el equivalente a 5,0 g de celulosa bacteriana (CB) seca (aproximadamente 250 g de CB húmeda), manteniéndola en estado hidratado para evitar la

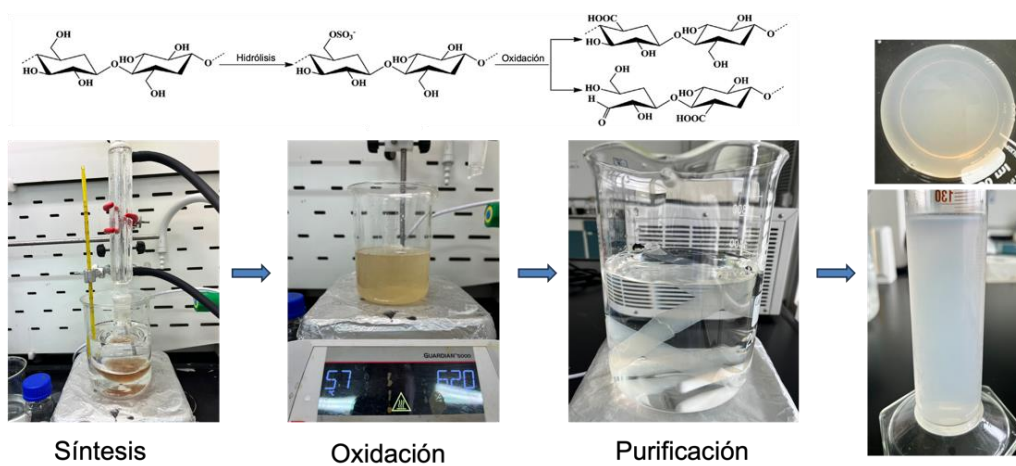
degradación brusca al contacto con el ácido concentrado. La suspensión hidratada de CB se refrigeró a 4 °C para amortiguar el choque ácido (Chen et al., 2018; Yan et al., 2017a).

Por otro lado, se prepararon 80 mL de una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) con una concentración del 50% en peso, ajustando el volumen total con el agua de la suspensión de CB, y también se refrigeró a 4 °C. La mezcla en frío de la suspensión de CB y el H_2SO_4 preparado se realizó en un balón de destilación, empleando agitación magnética vigorosa. Inmediatamente, se montó un sistema de reflujo para llevar a cabo la reacción de hidrólisis a 45 °C durante 3 horas (Chen et al., 2018; Yan et al., 2017a).

Una vez finalizada la reacción, se añadieron 400 mL de agua destilada (a 4 °C) para detener la hidrólisis. Luego, se agregaron 8 mL de peróxido de hidrógeno al 30% en peso para blanquear y oxidar los NCCB. Posteriormente, la suspensión obtenida se centrifugó a 9000 rpm durante 15 minutos para separar los cristales. Estos cristales se trataron mediante ultrasonido con pulsos de 5:2 durante 15 minutos para eliminar el exceso de ácido. Finalmente, la suspensión concentrada de NCCB se dializó contra agua desionizada durante 8 días (cambiando el agua cada 12h), utilizando una membrana de diálisis con un límite de peso molecular de 3500, para eliminar el ácido sulfúrico residual y posibles impurezas de bajo peso molecular (Figura 8). La suspensión concentrada de NCCB resultante se almacenó a 4 °C para su uso posterior (Chen et al., 2018; Yan et al., 2017a).

Figura 8.

Síntesis y purificación de nanocristales de celulosa bacteriana (NCCB)



4.1.2.4 Selección de la concentración óptima de TV y preparación de emulsiones finales (emulsiones pickering O/W). Con base en los resultados obtenidos en las pruebas preliminares I y II (Figuras 7A-7B), se determinó que la concentración óptima de *Triticum vulgare* (TV) para la preparación de emulsiones Pickering O/W era del 10%. Esta concentración fue seleccionada por su idoneidad para incorporar eficazmente el extracto de TV en el medio polar de la celulosa bacteriana (CB) en forma de parches. Siguiendo la metodología establecida por (Arserim-Uçar et al., 2021; Yan et al., 2017b), se prepararon las emulsiones Pickering finales utilizando un 10% de extracto de TV y nanocristales de CB (NCCB) sintetizados previamente a concentraciones variables (0,3%, 0,6% y 0,9%), con el objetivo de evaluar la influencia de la concentración de estas nanopartículas como agentes surfactantes (Figura 7C).

4.1.2.5 Caracterización de las Emulsiones de TV-NCCB. Para la caracterización de las emulsiones pickering O/W de *Triticum vulgare* (TV) y nanocristales de celulosa bacteriana

(NCCB), se utilizaron técnicas de microscopía de polarización vertical y dispersión dinámica de la luz (DLS) (Dudefoi et al., 2022; Xu et al., 2024; Yan et al., 2017a).

4.1.2.5.1 Microscopía de Polarización. Las emulsiones preparadas con TV y suspensiones de NCCB a diferentes concentraciones (0,3%, 0,6%, 0,9%) se analizaron utilizando un microscopio Leica DM4 P con un aumento de 40X. Se depositaron 5 μ L de cada emulsión en portaobjetos y se dejaron estabilizar durante 2 minutos antes del análisis. Las imágenes obtenidas permitieron determinar los tamaños de las gotas de la fase dispersa (TV) (Dudefoi et al., 2022; Xu et al., 2024).

4.1.2.5.2 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS). Luego de preparadas las emulsiones realizó el seguimiento de estas mediante observación por microscopía de polarización y así determinar los cambios en la emulsión a través del tiempo (si había coalescencia y separación). Transcurrido un mes desde la preparación de las emulsiones, se tomaron 20 μ L de cada emulsión y se diluyeron en 2 mL de agua para su análisis mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS). Este análisis permitió evaluar la estabilidad de las emulsiones y determinar el tamaño promedio de las gotas de la fase dispersa (TV) (Dudefoi et al., 2022; Xu et al., 2024).

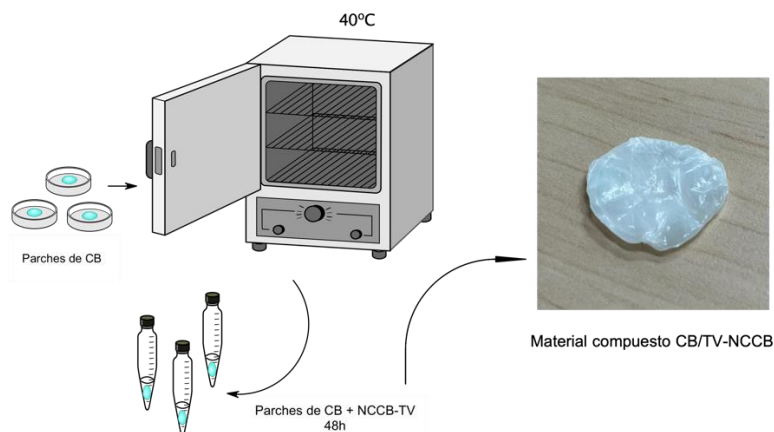
4.1.2.6 Impregnación de membranas de CB y creación del material compuesto CB/TV-NCCB. Las emulsiones preparadas se incorporaron a las membranas de CB mediante la técnica de inmersión descrita por Shao et al. (2016), con el objetivo de crear el material compuesto CB/TV-NCCB.

4.1.2.6.1 Metodología por inmersión. Las membranas de celulosa bacteriana (CB) fueron tomadas y se determinó su peso en estado húmedo. A partir de estos valores, se redujo el peso de las membranas a la mitad (50%) mediante deshidratación en un horno a 40 °C. Posteriormente, las membranas deshidratadas se colocaron en tubos Falcon de 15 mL y se les adicionaron 0,3 mL de las emulsiones pickering (TV-NCCB) preparadas a diferentes concentraciones de NCCB (0,3%, 0,6% y 0,9%). Las membranas se dejaron impregnar durante 48 horas a una temperatura de 4 °C. Los materiales fueron preparados por triplicado para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

Cabe destacar que tanto las membranas de CB, las emulsiones y los materiales compuestos se esterilizaron antes de su preparación. Todas las operaciones se realizaron en un ambiente estéril dentro de una cabina con flujo laminar para prevenir contaminación y posibles interferencias en los ensayos posteriores (Liu et al., 2020; Shao et al., 2016) (Figura 9).

Figura 9.

Impregnación de membranas de CB y creación del material compuesto CB/TV-NCCB



4.1.3 Determinación de la Cinética de Liberación de TV mediante Espectrofotometría UV

Se empleó la técnica de espectrofotometría ultravioleta (UV) para determinar la concentración de TV a lo largo del tiempo, con el fin de estudiar la cinética de liberación. El procedimiento se realizó de la siguiente manera:

4.1.3.1 Identificación del Punto de Absorción. Inicialmente, se identificó el punto de absorción del extracto de TV dentro de la emulsión Pickering realizando un barrido del espectro electromagnético en el rango de 200 a 1100 nm. El punto de absorción identificado fue 208 nm (Ambika & Nambi, 2016; Starýchová et al., 2014).

4.1.3.2 Construcción de la Curva de Calibración. Basándose en la cantidad de emulsión aplicada en cada membrana de CB para preparar el material compuesto CB/TV-NCCB, se construyó una curva de calibración con cuatro puntos de concentración diferentes:

- I. 1,2 μL TV/mL
- II. 0,48 μL TV/mL
- III. 0,192 μL TV/mL
- IV. 0,0384 μL TV/mL

Se determinó el coeficiente de determinación (R^2) superior a 0,9 y se identificó la ecuación de la recta para cada emulsión Pickering a diferentes concentraciones de NCCB (0,3%, 0,6%, 0,9%) (Ambika & Nambi, 2016; Starýchová et al., 2014).

4.1.3.3 Ensayo de Liberación. Para el ensayo de liberación, se colocaron triplicados de los diferentes materiales CB/TV-NCCB en vasos de precipitado conteniendo 40 mL de agua destilada, manteniendo una agitación constante de 150 rpm. Se tomaron muestras en los siguientes intervalos de tiempo para construir la curva de liberación de TV, utilizando las ecuaciones de la recta previamente obtenidas para calcular las distintas concentraciones (Starýchová et al., 2014):

- 1 min
- 2 min
- 3 min
- 4 min
- 5 min
- 10 min
- 20 min
- 30 min
- 40 min

4.2. Etapa 2

4.2.1 Preparación de cultivo celular

Para los ensayos de viabilidad y adhesión celular se utilizó la línea celular epitelial de riñón de mono verde africano *Vero* (CCL-81 ATCC). Las células se cultivaron en cajas de cultivo con medio RPMI 1640 (Gibco, Brasil) suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (Gibco, USA) y 1% de penicilina/estreptomicina. Las condiciones de cultivo incluyeron una atmósfera con

5% de CO₂, 95% de humedad y una temperatura de 37 °C. Cada vez que las células alcanzaban un 90% de confluencia (aproximadamente cada 3 días en cultivo), se realizaba un subcultivo con 5×10^4 células/mL. Para ello, las células se desprendían de la superficie de cultivo mediante la adición de tripsina-EDTA.

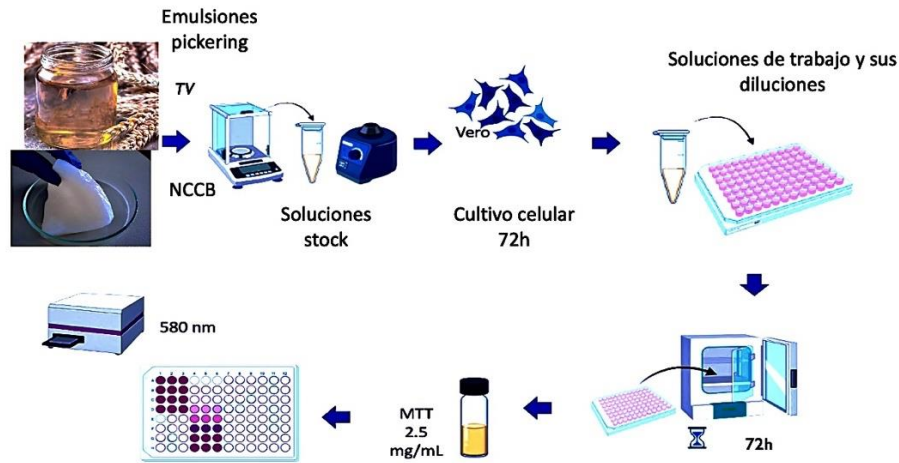
4.2.1.1 Ensayo de viabilidad celular. Para evaluar la viabilidad celular, las células *Vero* en fase de crecimiento exponencial, a una concentración de 3×10^4 células/mL, se colocaron en placas de 96 pozos e incubaron durante 72 horas. Estas células fueron tratadas con diluciones seriadas 1:2, de las emulsiones pickering de TV con NCCB a distintas concentraciones (0,3%, 0,6% y 0,9%) y sus componentes por separado (NCCB y TV). Tras el tratamiento, la viabilidad celular se midió mediante el ensayo colorimétrico de reducción del MTT. En este ensayo, las mitocondrias de las células epiteliales reducen el MTT a cristales insolubles de formazán, los cuales se solubilizan mediante dimetilsulfóxido (DMSO). Para estos ensayos se adicionó 20 µL de MTT de una concentración de 2,5 mg/mL PBS a cada uno de los pozos que contenían previamente el cultivo celular junto con la dilución de la emulsión pickering, los NCCB o el TV y se dejó en incubación durante 4 horas. La densidad óptica (DO) se determinó por espectrofotometría a 580 nm utilizando un lector de microplacas Multiskan (Figura 10). El porcentaje de viabilidad celular se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ viabilidad} = 100 - \left(100 \times \frac{DO \text{ grupo control} - DO \text{ grupo tratado}}{DO \text{ grupo control}} \right)$$

Como control de crecimiento se utilizaron células sin tratamiento (control positivo), control positivo no se usó debido a que se quería evaluar la viabilidad celular.

Figura 10.

Cultivo celular y ensayo de viabilidad celular usando células Vero.



4.2.1.2 Adhesión cualitativa de células en la superficie de los materiales mediante epifluorescencia. Las características cualitativas de la adhesión celular a los materiales se observaron mediante microscopía de epifluorescencia. Para ello, células en fase de crecimiento exponencial (3×10^4 células/mL) se colocaron sobre la superficie de los materiales e incubaron durante 72 horas. Tras la incubación, las células se tiñeron con Hoechst 33342 para observar los núcleos celulares. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2%. Antes y después de cada proceso, se lavaron con PBS (pH = 7.2) para eliminar restos de reactivos. Las muestras se examinaron en un microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS BX43F) utilizando filtros UV2A (Ex=330-380, DM=400, BA=420).

5. Resultados y Discusión

5.1 Etapa 1

5.1.1 Preparación de membranas de celulosa bacteriana (CB)

Se emplearon dos metodologías para la obtención de películas de celulosa bacteriana. La primera metodología consistió en la extracción de las películas, determinando su grosor basándose en criterios visuales y el tiempo de fermentación. No obstante, este enfoque no garantizaba la homogeneidad de las películas obtenidas.

Para asegurar la homogeneidad, se adoptó una segunda estrategia. Se utilizaron reactores de cuello largo (15 cm) y diámetro reducido (6 cm), lo que permitió la formación de películas de celulosa bacteriana de 33 mm (promedio) de grosor. Posteriormente, mediante una cortadora de disco de acero inoxidable, estas películas se seccionaron en unidades de 2 mm de grosor, garantizando así la uniformidad deseada. Finalmente, haciendo uso de un bisturí quirúrgico, se cortaron los parches de CB en circunferencias de 20 mm de diámetro (Imagen 11).

Es importante señalar que la limpieza de las películas de 30 mm de espesor con hidróxido de sodio no fue completamente efectiva. Por tanto, las películas de 2 mm de grosor fueron sometidas a un último lavado con hidróxido de sodio y agua destilada, asegurando así su completa limpieza y preparación para su uso posterior.

Figura 11.

Parche de CB de 2mm de grosor y 20 mm de diámetro.

**5.1.2 Preparación de material compuesto de CB/TV-NCCB**

El cumplimiento de este objetivo se hizo en varias etapas. Inició con la síntesis de la celulosa bacteriana (CB) a emplear, seguida de la preparación de los parches de CB.

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio detallado de las distintas emulsiones necesarias para la incorporación del extracto de *Triticum vulgare* (TV) y finalmente, se logró la obtención del material compuesto CB/TV-NCCB. Este proceso garantizó la integración adecuada del extracto en la matriz de celulosa bacteriana.

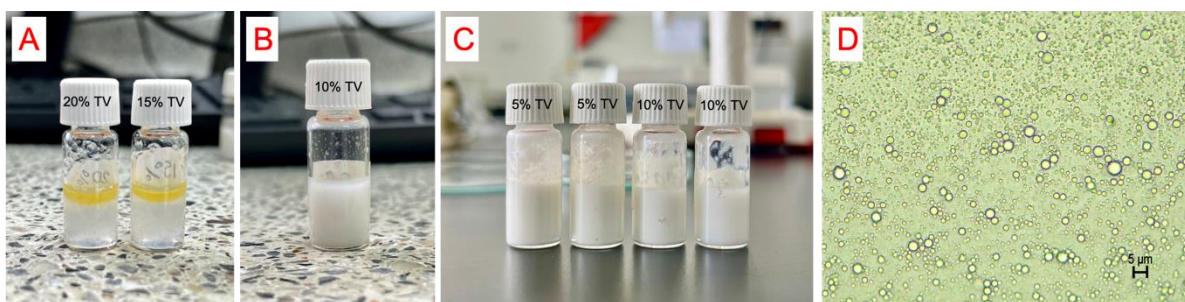
5.1.2.1 Preparación de emulsiones para la absorción del extracto de *Triticum vulgare* (TV) (estudio preliminar). Tomando como base en el estudio de Yan et al., 2017a, se llevaron a cabo diversas pruebas para identificar y seleccionar la emulsión que permitiera la incorporación del TV a la membrana de celulosa. Estas pruebas fueron esenciales para garantizar que el material cumpliera con los requisitos necesarios para promover la cicatrización de heridas.

Dichas pruebas consistieron en un estudio preliminar para evaluar la capacidad de la CB y las nanopartículas de CB como agentes activos de superficie en la preparación de emulsiones

pickering O/W (Figura 13F). El primer grupo de emulsiones se preparó usando como agente activo de superficie la CB en una suspensión acuosa homogenizada (0,9% CB / 99,1% agua) y variando la concentración de TV (5%, 10%, 15% y 20%), esto usando una punta de sonicación con pulsos de 5 segundos hasta la formación de la emulsión. Pasados 15 días y realizando una inspección visual y microscópica de este primer grupo de emulsiones, se encontró que las emulsiones con mayor concentración de TV (15% y 20%) tendían a romperse ya que se observó que las gotas de extracto dispersas incrementaron su tamaño hasta separar las fases totalmente a los 30 días (Figura 12A). De este primer grupo de emulsiones se pudo concluir que las emulsiones con mejores características de estabilidad (tendencia baja a la coalescencia de la fase dispersa) contenían 5% y 10% de TV (Figura 12B).

Figura 12.

Fase 1 y 2 de emulsiones de TV. A) Emulsiones de suspensión de CB y TV (15% y 20%), B) Emulsión de suspensión de CB y TV 10%, C) Emulsiones de suspensión de NFCB y TV (5% y 10%) y D) Microscopía emulsión de NFCB y TV 10%.

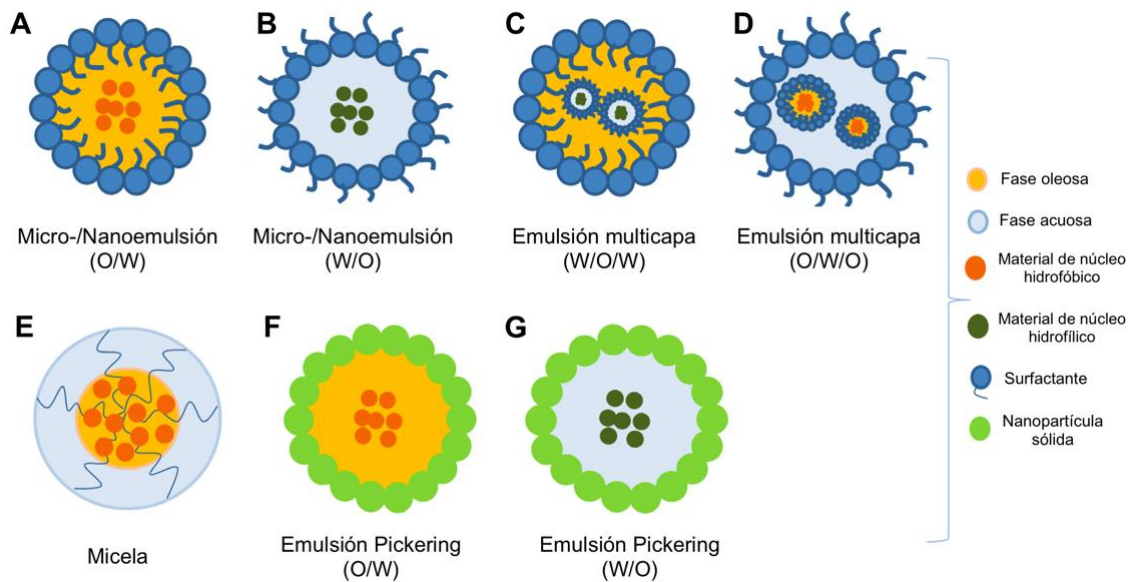


Basado en los hallazgos anteriores, se preparó un segundo grupo de emulsiones, con el objetivo de evaluar la influencia de las nanopartículas de celulosa como agentes activos de superficie y estabilizantes de las emulsiones. En este caso se optó por utilizar nanofibras de

celulosa NFCB (0,9%) en suspensión acuosa, proporcionadas por personal del laboratorio y se tomaron las concentraciones de TV que presentaron mejor estabilidad en las emulsiones anteriormente mencionadas (5% y 10%). Tras realizar inspecciones periódicas de las emulsiones cada 5 días, hasta el día 15 mediante microscopía, se observó que el uso de NFCB resultó en una mayor estabilidad. Específicamente, las gotas de TV dispersas presentaron un tamaño más reducido, mantuvieron una distribución homogénea y permanecieron establemente dispersas a lo largo del tiempo. (Imagen 12C y 12D).

Figura 13.

Tipos de emulsiones según sus componentes.



Nota. Tomada y modificada de (W. Deng et al., 2022)

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se puede decir que la estabilidad de las emulsiones pickering preparadas con suspensiones de celulosa bacteriana (CB) + TV y

nanopartículas de celulosa + TV, se ven influenciadas por los siguientes factores químicos relacionados con sus propiedades estructurales y funcionales:

Estructura química: La celulosa bacteriana y los nanocristales de celulosa tienen una estructura química rica en grupos hidroxilo (-OH) y carboxilo (-COOH) (Figura 1 y 8) (Dankovich & Gray, 2011; Lindman et al., 2010). Estos grupos funcionales pueden interactuar con el agua y el aceite, afectando la tensión interfacial y la capacidad de los emulsionantes para estabilizar las gotas de emulsión (Paximada, Dimitrakopoulou, et al., 2016; W. Wang et al., 2016; Yan et al., 2017a).

Hidrofobicidad e hidrofiliidad: La relación entre las propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas de la CB y los NCCB es crucial. La presencia de grupos hidrofílicos permite que estas estructuras se dispersen en la fase acuosa, mientras que su capacidad para interactuar con la fase oleosa ayuda a formar una barrera en la interfaz, lo que mejora la estabilidad de la emulsión (Kalashnikova et al., 2012; Paximada, Tsouko, et al., 2016; Wen et al., 2014).

Carga superficial: Los NCCB pueden presentar grupos funcionales aniónicos debido a la sulfatación durante el proceso de hidrólisis. Esta carga superficial influye en la repulsión electrostática entre las partículas, lo que puede ayudar a prevenir la coalescencia de las gotas de emulsión al aumentar la estabilidad electrostática (Kalashnikova et al., 2012; W. Wang et al., 2016; Wen et al., 2014).

Tamaño y forma de las partículas: El tamaño y la forma de los NCCB afectan su capacidad para adsorberse en la interfaz aceite-agua. Partículas más pequeñas y con una forma adecuada pueden proporcionar una mayor área de superficie para la adsorción, lo que mejora la cobertura de la interfaz y, por ende, la estabilidad de la emulsión (Binks & Whitby, 2005).

Interacciones intermoleculares: Las interacciones como enlaces de hidrógeno entre las moléculas de celulosa y el agua pueden contribuir a la formación de una red estable en la emulsión (Hu et al., 2015). Estas interacciones ayudan a mantener la integridad de la emulsión y a prevenir la separación de fases (W. Wang et al., 2016).

Concentración de emulsionante: La concentración de CB y NCCB en la emulsión afecta la cobertura de la interfaz. A concentraciones más altas, se forma una película más robusta que protege las gotas de emulsión contra la coalescencia, mejorando así la estabilidad (Hu et al., 2015; Tzoumaki et al., 2011; W. Wang et al., 2016).

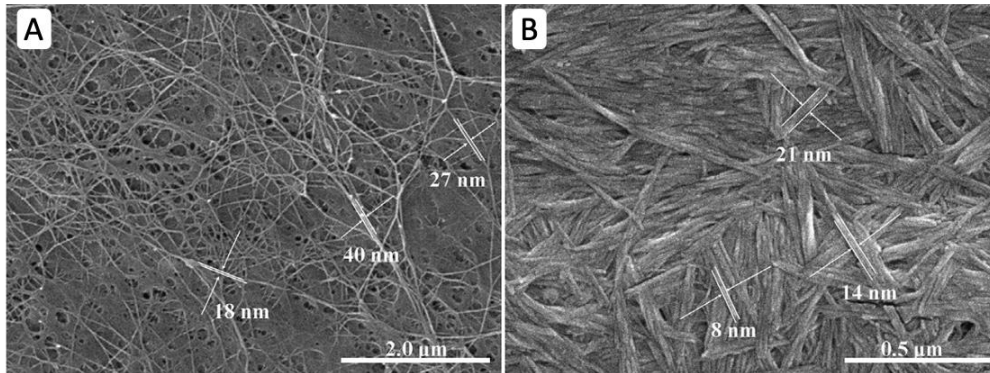
Estos factores químicos son fundamentales para entender cómo la celulosa bacteriana y los nanocristales de celulosa influyeron eficazmente como estabilizantes en emulsiones.

5.1.2.2 Síntesis de Nanocristales de Celulosa Bacteriana (NCCB). La CB fue sometida a un proceso de hidrólisis mediante el ataque con ácido sulfúrico. En este tratamiento se eliminaron las regiones amorfas de la celulosa, aislando la parte cristalina. Posteriormente, los NCCB obtenidos fueron sometidos a un proceso de oxidación utilizando peróxido de hidrógeno donde los grupos semiéster de sulfato aniónico (tensioactivos aniónicos) en la superficie de los nanocristales, se hidrolizan dando paso a grupos carboxilato, mejorando así su dispersión en soluciones acuosas y aumentando la estabilidad como agentes emulsionantes (Figura 8) (Abdul Khalil et al., 2014; Paximada, Dimitrakopoulou, et al., 2016).

Para confirmar el tamaño de los cristales y caracterizar su estructura a escala nanométrica, se obtuvieron imágenes tanto de la CB como de los NCCB mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). En estas imágenes se observan cristales con tamaños que varían entre 8 nm y 21 nm (Figura 14B), clasificándolos como nanopartículas.

Figura 14.

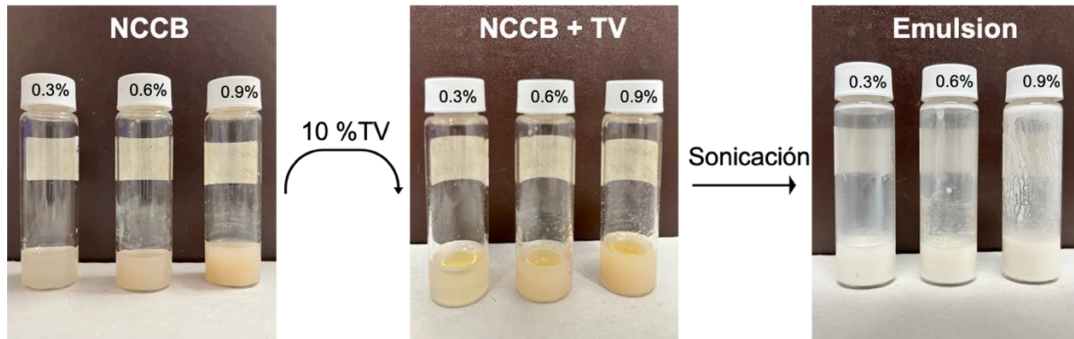
Microscopía electrónica de barrido (SEM): A) CB y B) NCCB.



5.1.2.3 Selección de la concentración óptima de TV y preparación de emulsiones finales (emulsiones pickering O/W con NCCB). Después de obtener los resultados con las NFCB, se llevó a cabo a una tercera y etapa definitiva que inició con la síntesis de los NCCB. A partir de estos NCCB, se prepararon emulsiones Pickering O/W variando su concentración en la suspensión (0.3%, 0.6%, 0.9%), manteniendo constante la concentración de TV (10%). El objetivo de esta fase fue evaluar la influencia del aumento en la concentración de NCCB sobre la estabilidad de las emulsiones y determinar cuál presenta las características óptimas, incluyendo una adecuada absorción por parte de la CB (parche) (Figura 15).

Figura 15.

Preparación de emulsiones pickering con NCCB (0.3%, 0.6%, 0.9%).

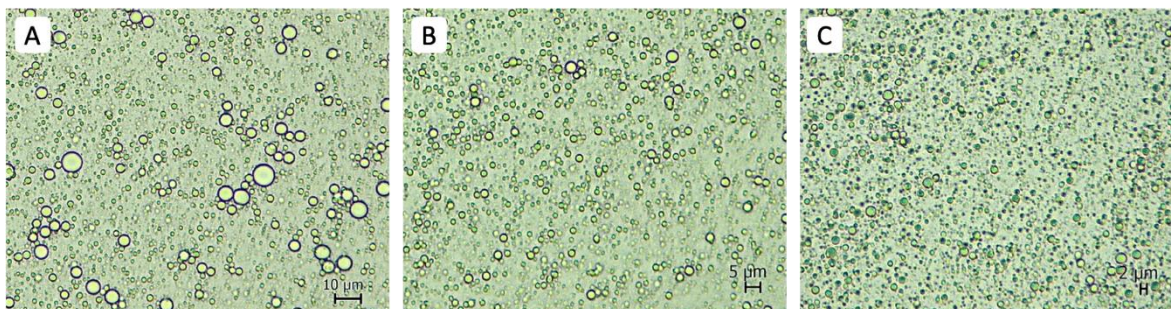


5.1.2.4 Caracterización de las Emulsiones de TV-NCCB. Al cabo de un mes de la preparación de las emulsiones Pickering (TV-NCCB), se observó que la estabilidad de estas era permanente a través del tiempo y no presentaba tendencia a la coalescencia de las partículas del extracto de TV. La caracterización de estas emulsiones se realizó mediante la implementación de las técnicas de microscopía de polarización y la dispersión dinámica de luz (DLS).

5.1.2.4.1 Microscopía de Polarización. Se evaluó la estabilidad de las emulsiones Pickering mediante microscopía de luz polarizada, realizando mediciones cada dos días durante un periodo de un mes. Al finalizar este periodo, se determinó que las emulsiones permanecieron estables. Además, se confirmó que, al incrementar la concentración de NCCB, el tamaño de la fase dispersa (extracto de TV) disminuye y se vuelve considerablemente más uniforme (Figura 16).

Figura 16.

Microscopías de emulsiones pickering de TV y NCCB a distintas concentraciones: A) 0,3% B) 0,6% y C) 0,9%.



5.1.2.4.2 Dispersión Dinámica de la Luz (DLS). Las emulsiones fueron evaluadas mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DLS), corroborando los resultados obtenidos por microscopía. Se determinó que, con el aumento de la concentración de NCCB, el tamaño de las partículas y su desviación disminuyen. Además, el índice de polidispersidad se reduce, lo que indica una mayor resistencia a la coalescencia de la fase dispersa (TV) (Tabla 1).

Tabla 1.

Análisis DLS de emulsiones pickering TV-NCCB: tamaño promedio y PDI promedio.

Concentración de NCCB en la emulsión [%]	Tamaño promedio [nm]	Índice de polidispersidad (PDI) Promedio
0,3	3134,5 ± 302,1	0,460 ± 0,280
0,6	2297,3 ± 146,2	0,135 ± 0,037
0,9	1503,3 ± 30,5	0,112 ± 0,021

Los resultados obtenidos sugieren que la emulsión compuesta por un 0,9% de NCCB y un 10% de TV muestra características superiores en términos de estabilidad y capacidad para formar el material compuesto CB/TV-NCCB. No obstante, se optó por desarrollar materiales con las tres

emulsiones a diferentes concentraciones de NCCB (0,3%, 0,6% y 0,9%) para evaluar su absorción en las membranas de CB utilizadas en los parches (Kalashnikova et al., 2011; Yan et al., 2017a).

El uso de NCCB en lugar de CB convencional ofrece varias ventajas clave. La estructura nanométrica y mayor área superficial de los NCCB permite una mejor estabilidad coloidal, interactuando de manera eficaz con las interfaces aceite-agua. Además, su sensibilidad a cambios de pH y fuerza iónica facilita su adaptación a diversas condiciones ambientales, lo que es altamente beneficioso en aplicaciones industriales como la cosmética, la farmacéutica y la alimentación, donde se prefieren emulsiones sin surfactantes sintéticos (Arserim-Uçar et al., 2021; Hestrin & Schramm, 1954; Yan et al., 2017b, 2017a). Asimismo, la biodegradabilidad de los NCCB contribuye a crear formulaciones más sostenibles (Hestrin & Schramm, 1954).

Un aumento en la concentración de NCCB refuerza aún más la estabilidad de las emulsiones. Esto se debe a una mayor cobertura de la interfaz aceite-agua, lo que forma una capa robusta que previene la coalescencia (Kedzior et al., 2021). Además, una mayor cantidad de NCCB reduce la tensión interfacial, promoviendo la formación de gotas más pequeñas y uniformes (Yan et al., 2017a, 2017b). Las interacciones electrostáticas entre las NCCB cargadas negativamente mantienen las gotas separadas, lo que mejora significativamente la estabilidad bajo condiciones de estrés y variaciones ambientales. Estos factores, en conjunto, explican por qué las emulsiones con mayores concentraciones de NCCB exhiben mejores características en la formulación del material compuesto CB/TV-NCCB.

5.1.2.5 Impregnación de membranas de CB y creación del material compuesto CB/TV-NCCB. Dentro del proceso de impregnación, se optó por deshidratar la celulosa bacteriana (CB), reduciendo su peso a la mitad de manera controlada para favorecer la absorción

de las emulsiones. Tras impregnar la CB con las diversas emulsiones de TV-NCCB, se determinó un porcentaje promedio de rehidratación del $28,19\% \pm 4,24$ a las 48 horas.

$$\%Rehidratación = \frac{g \text{ emulsión absorbida } 48h \times 100}{g \text{ parche de CB inicial sin deshidratar}}$$

Pasadas 72 horas, el porcentaje de reabsorción se mantuvo similar al observado a las 48 horas. Esto sugiere que el tiempo óptimo de impregnación para la CB es de 48 horas, ya que logra absorber una cantidad significativa en un medio acuoso. No obstante, aunque los parches de CB mantienen la capacidad de absorción, no recuperan completamente su estado inicial de hidratación (Tabla 2).

Tabla 2.

Porcentaje promedio de rehidratación, porcentaje promedio de emulsión absorbida dentro del parche de CB y cantidad promedio de TV absorbido por los parches de CB.

Material [% NCCB]	% Rehidratación	% de emulsión	µL TV
0,3	35,8	41,7	13,5
0,6	24,9	33,2	15,4
0,9	26,6	34,7	9,4

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, la razón por la que la CB no debe deshidratarse en exceso es que al perder agua de manera gradual y prolongada, las moléculas internas del material tienden a agruparse de forma irreversible. Esto porque durante la deshidratación, los enlaces de hidrógeno intermoleculares que normalmente conectan distintas moléculas de celulosa, se transforman en enlaces de hidrógeno intramoleculares dentro de la misma molécula de celulosa. Este proceso genera una estructura interna altamente compacta y

fuertemente unida, lo que dificulta que la CB vuelva a absorber agua de manera eficiente (L. Deng et al., 2024; Solhi et al., 2023).

En la CB, la rehidratación se basa en la capacidad de las moléculas de celulosa para volver a formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua. Sin embargo, una vez que los enlaces intramoleculares se establecen, la estructura del material se vuelve rígida y resistente, limitando su capacidad de expansión y reabsorción de agua. Como resultado, el material ya no puede regresar a su estado original hidratado, y su capacidad de hinchamiento se reduce considerablemente (L. Deng et al., 2024; Sinquefield et al., 2020).

Por lo tanto, es esencial evitar una deshidratación excesiva de la celulosa bacteriana (CB) para prevenir la formación de enlaces irreversibles, ya que su capacidad de rehidratación es clave para conservar sus propiedades funcionales. Tras deshidratar los parches de CB al 50%, se concluye que un porcentaje de rehidratación cercano al 30% es un resultado favorable al evaluar la capacidad del material para retener las emulsiones Pickering. Este nivel de rehidratación indica una adecuada interacción entre la CB y las emulsiones, sin embargo, es posible mejorar esta interacción con algún componente como en su trabajo lo hace L. Deng et al., 2024, que en lugar de únicamente CB (parche), usan quitosano cuaternizado (QCS) fusionalizado con CB, de tal manera que mejora su estructura inicial (Parche) y permite una mejor rehidratación. Dicho esto, esta propuesta confiere a este tipo de biomateriales compuestos el potencial para ser usados en aplicaciones relacionadas con cicatrización de heridas (L. Deng et al., 2024; Sinquefield et al., 2020; Solhi et al., 2023).

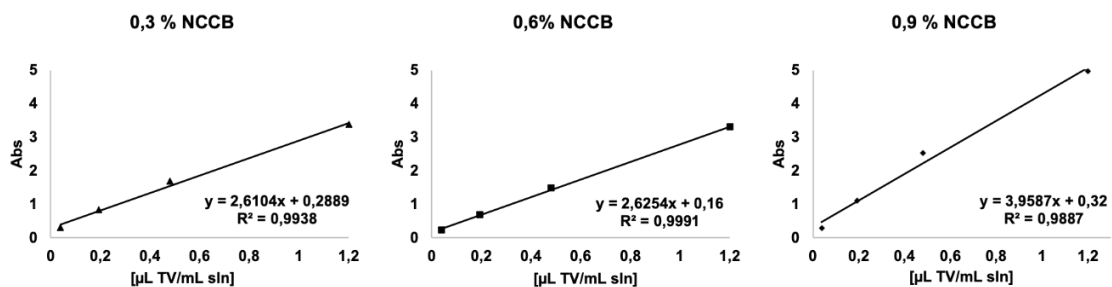
5.1.3 Determinación de la Cinética de Liberación de TV mediante Espectrofotometría UV

Para determinar la cinética de liberación del TV, primero se identificó el pico de absorción mediante un barrido espectral en el rango de 200-1100 nm, observándose un pico de absorción a 208 nm. A partir de esto, se construyeron las curvas de calibración específicas para cada emulsión. Tras obtener curvas de calibración con un coeficiente de correlación (R^2) superior a 0.98, se realizó el ensayo de liberación por triplicado, considerando los tiempos establecidos para la recolección de alícuotas.

5.1.3.1 Construcción de la Curva de Calibración. Las curvas de calibración se construyeron a partir de cuatro puntos, utilizando las distintas emulsiones. Se aseguraron coeficientes de correlación (R^2) superiores a 0.98. Posteriormente, se determinaron las ecuaciones de las rectas correspondientes, las cuales fueron empleadas para el cálculo de las concentraciones en el ensayo de liberación (Figura 17).

Figura 17.

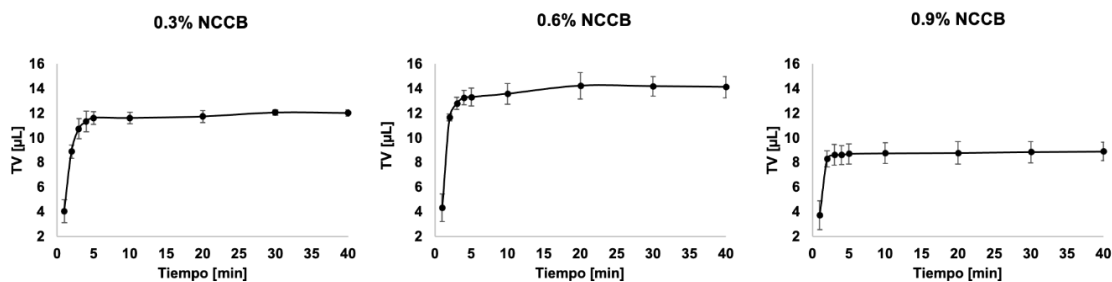
Curvas de calibración para determinar las concentraciones en el ensayo de liberación usando emulsiones pickering de TV-NCCB a diferentes concentraciones



5.1.3.2 Ensayo de Liberación. El ensayo de liberación, las curvas revelan que entre los primeros 5 y 20 minutos se libera en promedio el 94% del TV presente en el material compuesto (Figura 18). Este tiempo sugiere que, alrededor de los 30 minutos, el TV se libera por completo del material, lo que proporciona una estimación preliminar del tiempo de aplicación potencial en el tratamiento de heridas para un uso futuro.

Figura 18.

Curvas de liberación de TV del material compuesto a diferentes concentraciones de NCCB



Considerando los estudios de liberación realizados en esta investigación, se observa que la rápida liberación del extracto de TV impide un control prolongado sobre el proceso de liberación. No obstante, tomando como referencia el trabajo de L. Deng et al., 2024, donde se desarrolla un hidrogel deshidratado de celulosa bacteriana dialdehído/quitosano cuaternizado (DBC/QCS) impregnado con pirfenidona (PFD), que favorece la deposición de colágeno y acelera la cicatrización de heridas previniendo la formación de cicatrices, surge una posible estrategia a futuro. Se plantea la posibilidad de combinar la celulosa bacteriana (CB) con quitosano cuaternizado (QCS), lo que conferiría al material la capacidad de hinchamiento repetido y propiedades antibacterianas significativas.

Bajo esta propuesta, el material (parche) podría deshidratarse completamente sin perder su capacidad de rehidratación al 100%. Esto aumentaría considerablemente la cantidad de emulsión pickering y, por ende, de extracto de TV absorbido en el biomaterial compuesto. Tal enfoque permitiría prolongar el tiempo de liberación del extracto, ya que la estructura formada por enlaces covalentes proporcionaría mayor estabilidad y capacidad de carga de la emulsión pickering, facilitando una liberación más gradual y eficiente del ingrediente activo (L. Deng et al., 2024).

En el estudio realizado por (Sedans et al., 2024), se desarrolló una película de celulosa catiónica modificada con bromuro de 1-(5-carboxifentil)piridin-1-io, la cual mostró una notable mejora en su humectabilidad, evidenciada por un ángulo de contacto de 26.6° , y una capacidad de retención de agua del 2714.37%. Esta estructura fue complementada con oxacilina, un agente antibiótico utilizado en el tratamiento de infecciones por bacterias grampositivas. La película modificada demostró una capacidad efectiva para retener oxacilina, y durante las pruebas de liberación, la encapsulación liposomal facilitó una liberación sostenida del agente activo a lo largo de un periodo de 11 días.

Este análisis resalta la importancia de los sistemas de liberación rápida y lenta en función de su aplicación terapéutica. La liberación rápida es crucial para proporcionar un control inmediato de infecciones, siendo particularmente adecuada en situaciones que requieren una acción antibiótica rápida en el sitio de la herida. Por otro lado, los sistemas de liberación lenta, como el propuesto en este estudio, permiten mantener una concentración prolongada del agente activo, lo que resulta beneficioso en el tratamiento de heridas que presentan cicatrización lenta. Este enfoque no solo reduce la necesidad de aplicaciones frecuentes, sino que también minimiza el riesgo de infecciones recurrentes (X. Wang et al., 2024; Zilberman et al., 2015; ZILBERMAN & ELSNER, 2008).

Considerando las ventajas de implementar un sistema de liberación controlada, es imperativo que estudios futuros se enfoquen en la modificación de la estructura de los parches de celulosa bacteriana que incorporan la emulsión Pickering con el agente activo (TV). Este enfoque debería dirigirse a incrementar la humectabilidad y la capacidad de retención de agua, facilitando así una liberación sostenida de TV en el medio.

5.2 Etapa 2

5.2.1 Preparación de cultivo celular

Para evaluar la citotoxicidad y viabilidad celular de la BC, el TV, los NCCB de manera individual, así como de las emulsiones y el material compuesto CB/BCNC-TV, se utilizó un lote replicado de células *Vero* epiteliales de riñón de mono verde africano, empleadas en ensayos de toxicidad renal, ampliamente utilizados en farmacología. Del mismo modo, para el ensayo de adhesión celular al material compuesto CB/BCNC-TV, se utilizaron células *Vero* del mismo cultivo.

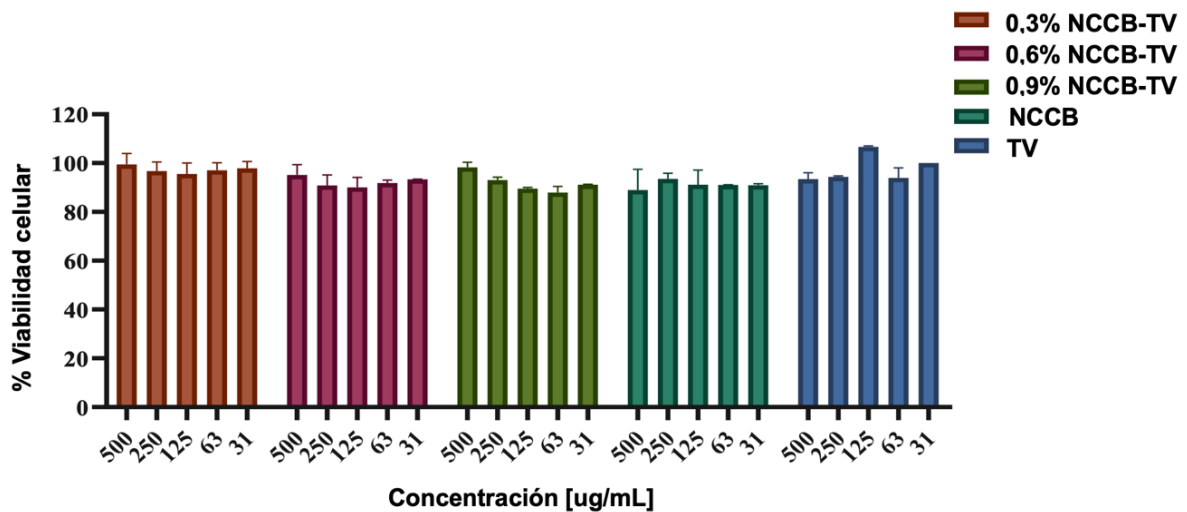
5.2.1.1 Ensayo de viabilidad celular. Mediante el ensayo colorimétrico de reducción de MTT con células *Vero* (International Organization for Standardization, 2009), se determinó que la BC, el TV, y los NCCB, tanto de manera individual como en emulsiones y en el material compuesto CB/BCNC-TV, no son tóxicos, incluso en altas concentraciones. Se observó una viabilidad celular superior al 80% en todos los casos (Figura 19), lo que sugiere que estos

materiales son seguros para aplicaciones donde existe contacto celular como es este caso, estos resultados preliminares podrían conformar la base para estudios posteriores en modelos in vivo.

En la línea celular evaluada, los resultados de viabilidad obtenidos son especialmente relevantes, ya que sugieren una baja probabilidad de efectos citotóxicos. Estos hallazgos son comparables con los reportados por L. Deng et al., 2024, quienes observaron niveles de viabilidad celular superiores al 90% utilizando fibroblastos de ratón (L929), en cultivos realizados por 48h sobre materiales celulósicos. En su estudio, los autores demostraron la baja toxicidad de los materiales, lo que respalda su potencial para aplicaciones como tratamiento cicatrizante.

Figura 19.

Viabilidad celular de BC, el TV, y los NCCB y emulsiones de NCCB-TV, usando células Vero



5.2.1.2 Adhesión cualitativa de células en la superficie de los materiales mediante epifluorescencia. En la figura se observan los núcleos de las células adheridos a la superficie de los materiales. Al compararse con la adhesión observada en el control (vidrio) (Figura 20A), no se aprecian diferencias significativas en la adherencia celular a la superficie de los materiales

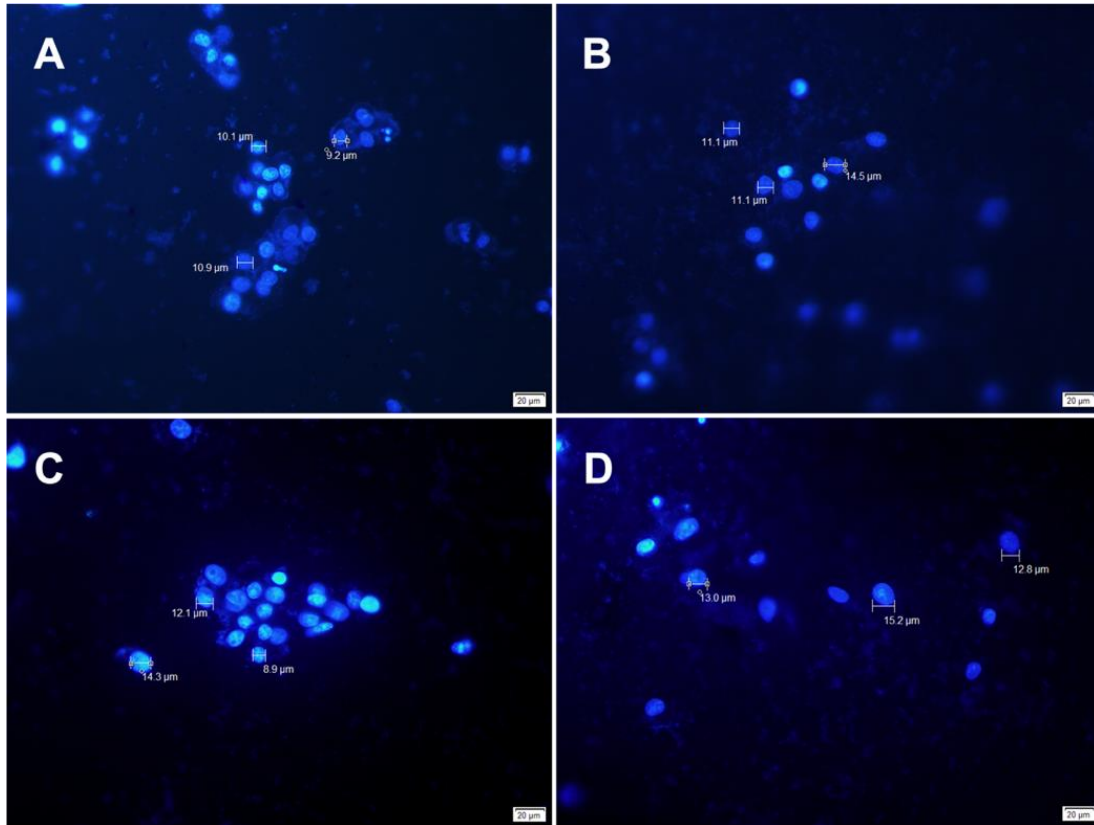
compuestos. La adhesión celular ocurre principalmente en la superficie de los mismos (Figuras 20B, 20C y 20D), aunque también se identifican núcleos en su interior. Estos núcleos aparecen desenfocados debido a que se encuentran en distintos planos de enfoque, lo que refleja la porosidad de los materiales compuestos. Los resultados obtenidos son coherentes con los hallazgos reportados por L. Deng et al., 2024, quienes evidenciaron una buena adhesión de la línea celular L929 a los materiales modificados de CB evaluados en un cultivo de 48h, lo que indica una baja toxicidad y su potencial aplicación en apósitos para la cicatrización de heridas. Asimismo, estos hallazgos son comparables a los del estudio llevado a cabo por X. Wang et al., 2024, en el cual se utilizó una línea celular preosteoblástica derivada de la calvaria de un embrión de ratón (MC3T3-E1) para evaluar materiales de celulosa bacteriana (CB) y sus modificaciones en cultivos durante 24, 48 y 72 horas. En este contexto, se observó que las células MC3T3-E1 mostraron una adecuada adhesión a los hidrogeles analizados.

Finalmente, los núcleos de las células vero se observan íntegros, sin evidencia de fragmentaciones del ADN (Figura 20), signo que podría indicar procesos de muerte celular como la apoptosis.

Figura 20.

Microscopías de fluorescencia de tinción nuclear de células Vero: A) Control, B)

CB/0.3%NCCB-TV, C) CB/0.6%NCCB-TV y D) CB/0.9%NCCB-TV.



6. Conclusiones

El material biocompuesto desarrollado, que combina membranas de celulosa bacteriana (CB) como matriz y emulsiones de *Triticum vulgare* (TV) con nanocristales de celulosa bacteriana (NCCB), ha demostrado una buena estabilidad coloidal y uniformidad en el tamaño de las partículas determinados mediante microscopia de polarización y ensayo DLS, al igual que una

óptima retención del ingrediente activo tras 48 horas de impregnación. Estos resultados sugieren que el biocompuesto tiene un gran potencial para aplicaciones en ingeniería biomédica.

El biocompuesto CB/BCNC-TV mostró una liberación rápida del extracto de *Triticum vulgare* en medios acuosos, con una eficiencia de liberación del 94% independientemente de la concentración de nanocristales de celulosa bacteriana (BCNC). Sin embargo, la liberación no puede considerarse controlada, ya que ocurre en un periodo breve de tiempo (20 minutos), lo que limita su aplicación en sistemas de liberación sostenida.

La biocompatibilidad del biocompuesto CB/BCNC-TV, respaldada por su baja toxicidad y alta viabilidad celular (>80%), junto con la adhesión efectiva de células Vero, refuerza su potencial para aplicaciones en cicatrización de heridas. Estos resultados sugieren que el material es un candidato prometedor para futuras evaluaciones *in vivo*.

7. Recomendaciones

Se recomienda emplear el material compuesto en cultivos de replicación de queratinocitos y síntesis de colágeno para validar las propiedades del *Triticum vulgare* expuestas en este estudio. Además, sería conveniente ampliar la evaluación de viabilidad celular a otras líneas celulares, como fibroblastos y células hepáticas, con el fin de obtener una visión más integral de su comportamiento. Finalmente, se sugiere llevar a cabo investigaciones adicionales que exploren la capacidad de las células para producir metabolitos relacionados con el proceso de cicatrización,

tales como interleucinas, factores de crecimiento y colágeno, con el objetivo de profundizar en el entendimiento de los mecanismos involucrados en la regeneración tisular.

Se recomienda evaluar la incorporación de un compuesto como el QCS en la matriz de CB para optimizar sus capacidades de deshidratación y rehidratación. Adicionalmente, se sugiere llevar a cabo un análisis de liberación sostenida del compuesto activo (TV) tras la modificación de dicha estructura. Finalmente, a pesar de que la carga de *Triticum vulgare* (TV) en el material es del 10%, en comparación con productos comerciales como la fitostimoline, que contiene un 15% de TV, se sugiere incrementar la concentración de NCCB en la emulsión Pickering. Este ajuste podría mejorar la carga del compuesto activo (TV), lo que potencialmente incrementaría el efecto cicatrizante del material debido al aumento en la concentración del extracto.

Se recomienda evaluar la toxicidad cutánea *in vivo* de los apósitos y realizar pruebas piloto para analizar la cicatrización y evolución de las lesiones comparadas con un control y un blanco, acompañado de un análisis histológico de la piel tras la cicatrización.

Referencias Bibliográficas

- Abdul Khalil, H. P. S., Davoudpour, Y., Islam, Md. N., Mustapha, A., Sudesh, K., Dungani, R., & Jawaid, M. (2014). Production and modification of nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydrate Polymers*, 99, 649–665. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.08.069>
- Almeida, I. F., Pereira, T., Silva, N. H. C. S., Gomes, F. P., Silvestre, A. J. D., Freire, C. S. R., Sousa Lobo, J. M., & Costa, P. C. (2014). Bacterial cellulose membranes as drug delivery systems: An in vivo skin compatibility study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 86(3), 332–336. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.08.008>
- Ambika, S., & Nambi, I. M. (2016). Optimized synthesis of methanol-assisted nZVI for assessing reactivity by systematic chemical speciation approach at neutral and alkaline conditions. *Journal of Water Process Engineering*, 13, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.08.011>
- Arserim-Uçar, D. K., Korel, F., Liu, L. S., & Yam, K. L. (2021). Characterization of bacterial cellulose nanocrystals: Effect of acid treatments and neutralization. *Food Chemistry*, 336. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127597>
- Awadhiya, A., David Kumar, •, Rathore, •, Kalpana, Bushara Fatma, •, & Vivek Verma, •. (2017). Synthesis and characterization of agarose-bacterial cellulose biodegradable composites. *Polym. Bull*, 74, 2887–2903. <https://doi.org/10.1007/s00289-016-1872>
- Beydoun, M. A., Canas, J. A., Fanelli-Kuczmariski, M. T., Maldonado, A. I., Shaked, D., Kivimaki, M., Evans, M. K., & Zonderman, A. B. (2020). Association of Antioxidant Vitamins A,

- C, E and Carotenoids with Cognitive Performance over Time: A Cohort Study of Middle-Aged Adults. *Nutrients*, 12(11), 3558. <https://doi.org/10.3390/nu12113558>
- Binks, B. P. (2002). Particles as surfactants—similarities and differences. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 7(1–2), 21–41. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(02\)00008-0](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(02)00008-0)
- Binks, B. P., & Whitby, C. P. (2005). Nanoparticle silica-stabilised oil-in-water emulsions: improving emulsion stability. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 253(1–3), 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.10.116>
- Calder, P. C. (2017). Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochemical Society Transactions*, 45(5), 1105–1115. <https://doi.org/10.1042/BST20160474>
- Chawla, P. R., Bajaj, I. B., Survase, S. A., & Singhal, R. S. (2009). *Microbial Cellulose: Fermentative Production and Applications*.
- Chen, W., Yu, H., Lee, S.-Y., Wei, T., Li, J., & Fan, Z. (2018). Nanocellulose: a promising nanomaterial for advanced electrochemical energy storage. *Chemical Society Reviews*, 47(8), 2837–2872. <https://doi.org/10.1039/C7CS00790F>
- Czaja, W. K., Young, D. J., Kawecki, M., & Brown, R. M. (2007). The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications. In *Biomacromolecules* (Vol. 8, Issue 1, pp. 1–12). <https://doi.org/10.1021/bm060620d>
- Dankovich, T. A., & Gray, D. G. (2011). Contact Angle Measurements on Smooth Nanocrystalline Cellulose (I) Thin Films. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 25(6–7), 699–708. <https://doi.org/10.1163/016942410X525885>

- Deng, L., Li, F., Han, Z., Qu, X., Li, J., Zhou, Z., Chen, S., Wang, H., & Lv, X. (2024). Bacterial cellulose-based hydrogel with regulated rehydration and enhanced antibacterial activity for wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 267, 131291. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131291>
- Deng, W., Li, Y., Wu, L., & Chen, S. (2022). Pickering emulsions stabilized by polysaccharides particles and their applications: a review. In *Food Science and Technology (Brazil)* (Vol. 42). Sociedade Brasileira de Ciencia e Tecnologia de Alimentos, SBCTA. <https://doi.org/10.1590/fst.24722>
- Dudefoi, W., Dhuiège, B., Capron, I., & Sèbe, G. (2022). Controlled hydrophobic modification of cellulose nanocrystals for tunable Pickering emulsions. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 3, 100210. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2022.100210>
- Fiedor, J., & Burda, K. (2014). Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients*, 6(2), 466–488. <https://doi.org/10.3390/nu6020466>
- Foong, C. Y., Hamzah, M. S. A., Razak, S. I. A., Saidin, S., & Nayan, N. H. M. (2018). Influence of Poly(lactic acid) Layer on the Physical and Antibacterial Properties of Dry Bacterial Cellulose Sheet for Potential Acute Wound Healing Materials. *Fibers and Polymers*, 19(2), 263–271. <https://doi.org/10.1007/s12221-018-7850-7>
- Formulación, L. A., Fotoprotectores, D. E., Aclaradores, Y., & Zambrano, N. A. (2022). *NUEVA ERA COSMETOLÓGICA: MICROORGANISMOS Y SUS METABOLITOS EN*. <https://orcid.org/0000-0002-3526-5303>
- Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., Neto, C. P., & Belgacem, M. N. (2011). Controlled release systems based on renewable resources: The next essential oils challenge. *Macromolecular Bioscience*, 11(11), 1667–1687.

- Gonzenbach, U. T., Studart, A. R., Tervoort, E., & Gauckler, L. J. (2006). Ultrastable Particle-Stabilized Foams. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(21), 3526–3530. <https://doi.org/10.1002/anie.200503676>
- Hestrin, S., & Schramm, M. (1954). Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Biochemical Journal*, 58(2), 345–352. <https://doi.org/10.1042/bj0580345>
- Hu, Z., Ballinger, S., Pelton, R., & Cranston, E. D. (2015). Surfactant-enhanced cellulose nanocrystal Pickering emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 439, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.10.034>
- International Organization for Standardization. (2009). *Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Cathala, B., & Capron, I. (2011). New Pickering Emulsions Stabilized by Bacterial Cellulose Nanocrystals. *Langmuir*, 27(12), 7471–7479. <https://doi.org/10.1021/la200971f>
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Cathala, B., & Capron, I. (2012). Modulation of Cellulose Nanocrystals Amphiphilic Properties to Stabilize Oil/Water Interface. *Biomacromolecules*, 13(1), 267–275. <https://doi.org/10.1021/bm201599j>
- Kedzior, S. A., Gabriel, V. A., Dubé, M. A., & Cranston, E. D. (2021). Nanocellulose in Emulsions and Heterogeneous Water-Based Polymer Systems: A Review. *Advanced Materials*, 33(28). <https://doi.org/10.1002/adma.202002404>
- Khalid, A., Hameed, A., & Tahir, M. F. (2023). Wheat quality: A review on chemical composition, nutritional attributes, grain anatomy, types, classification, and function of seed storage

- proteins in bread making quality. *Frontiers in Nutrition*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnut.2023.1053196>
- Khalid, A., Khan, R., Ul-Islam, M., Khan, T., & Wahid, F. (2017). Bacterial cellulose-zinc oxide nanocomposites as a novel dressing system for burn wounds. *Carbohydrate Polymers*, 164, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.061>
- Li, Y., Jiang, H., Zheng, W., Gong, N., Chen, L., Jiang, X., & Yang, G. (2015). Bacterial cellulose-hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(17), 3498–3507. <https://doi.org/10.1039/c4tb01819b>
- Lin, P.-H., Sermersheim, M., Li, H., Lee, P. H. U., Steinberg, S. M., & Ma, J. (2017). Zinc in Wound Healing Modulation. *Nutrients*, 10(1), 16. <https://doi.org/10.3390/nu10010016>
- Lindman, B., Karlström, G., & Stigsson, L. (2010). On the mechanism of dissolution of cellulose. *Journal of Molecular Liquids*, 156(1), 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2010.04.016>
- Liu, W., Du, H., Zhang, M., Liu, K., Liu, H., Xie, H., Zhang, X., & Si, C. (2020). Bacterial Cellulose-Based Composite Scaffolds for Biomedical Applications: A Review. In *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* (Vol. 8, Issue 20, pp. 7536–7562). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c00125>
- Melguizo-Rodríguez, L., de Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Illescas-Montesa, R., Costela-Ruiz, V. J., & García-Martínez, O. (2021). Potential Effects of Phenolic Compounds That Can Be Found in Olive Oil on Wound Healing. *Foods*, 10(7), 1642. <https://doi.org/10.3390/foods10071642>
- Mikaili, P., Sarahroodi, S., Shayegh, J., & Sharifi, M. (2012). Pharmacological Properties of Herbal Oil Extracts Used In Iranian Traditional Medicine Antisecretory Effect of

- Hydrogen Sulfide on Gastric Acid Secretion and the Involvement of Nitric Oxide View project editing and proofreading View project Corresponding Author Pharmacological Properties of Herbal Oil Extracts Used In Iranian Traditional Medicine 1. *Advances in Environmental Biology*, 6(1), 153–158.
<https://www.researchgate.net/publication/231167802>
- Mo, Y., Guo, R., Liu, J., Lan, Y., Zhang, Y., Xue, W., & Zhang, Y. (2015). Preparation and properties of PLGA nanofiber membranes reinforced with cellulose nanocrystals. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 132, 177–184.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.029>
- Nechporchuk, O., Belgacem, M. N., & Bras, J. (2016). Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products*, 93, 2–25.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.016>
- Ovington, L. G. (2007). Advances in wound dressings. *Clinics in Dermatology*, 25(1), 33–38.
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.09.003>
- Pal, S., Nisi, R., Stoppa, M., & Licciulli, A. (2017). Silver-Functionalized Bacterial Cellulose as Antibacterial Membrane for Wound-Healing Applications. *ACS Omega*, 2(7), 3632–3639.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.7b00442>
- Paximada, P., Dimitrakopoulou, E. A., Tsouko, E., Koutinas, A. A., Fasseas, C., & Mandala, I. G. (2016). Structural modification of bacterial cellulose fibrils under ultrasonic irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 150, 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.04.125>
- Paximada, P., Tsouko, E., Kopsahelis, N., Koutinas, A. A., & Mandala, I. (2016). Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions. *Food Hydrocolloids*, 53, 225–232.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.003>

- Portela, R., Leal, C. R., Almeida, P. L., & Sobral, R. G. (2019). Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. In *Microbial Biotechnology* (Vol. 12, Issue 4, pp. 586–610). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13392>
- Rowan, M. P., Cancio, L. C., Elster, E. A., Burmeister, D. M., Rose, L. F., Natesan, S., Chan, R. K., Christy, R. J., & Chung, K. K. (2015). Burn wound healing and treatment: Review and advancements. In *Critical Care* (Vol. 19, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0961-2>
- Saavedra-Sanabria, O. L., Durán, D., Cabezas, J., Hernández, I., Blanco-Tirado, C., & Combariza, M. Y. (2021). Cellulose biosynthesis using simple sugars available in residual cacao mucilage exudate. *Carbohydrate Polymers*, 274. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118645>
- Saibuatong, O. ard, & Phisalaphong, M. (2010). Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 455–460. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.08.039>
- Sanguigno, L., Minale, M., Vannini, E., Arato, G., Riccio, R., Casapullo, A., Monti, M. C., Riccio, R., Formisano, S., Di Renzo, G., & Cuomo, O. (2015). Oligosaccharidic fractions derived from *Triticum vulgare* extract accelerate tissutal repairing processes in in vitro and in vivo models of skin lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, 159, 198–208. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.051>
- Sedans, K. A., Stiegler Jurkevicz, C., Silva, B. C. C., Blener Lopes, V., Lopes, G. F. M., Schmitt, E. F. P., Portes, D. B., Fronza, M., Endringer, D. C., Tischer, C. A., Cabeça, L. F., Ferreira, J. M. S., & Ribeiro-Viana, R. M. (2024). Development of a cationic bacterial cellulose film loaded with anionic liposomes for prolonged release of oxacillin in wound dressing

- applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 665, 124649.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2024.124649>
- Shao, W., Liu, H., Wang, S., Wu, J., Huang, M., Min, H., & Liu, X. (2016). Controlled release and antibacterial activity of tetracycline hydrochloride-loaded bacterial cellulose composite membranes. *Carbohydrate Polymers*, 145, 114–120.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.02.065>
- Sinquefield, S., Ciesielski, P. N., Li, K., Gardner, D. J., & Ozcan, S. (2020). Nanocellulose Dewatering and Drying: Current State and Future Perspectives. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(26), 9601–9615.
<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c01797>
- Solhi, L., Guccini, V., Heise, K., Solala, I., Niinivaara, E., Xu, W., Mihhels, K., Kröger, M., Meng, Z., Wohler, J., Tao, H., Cranston, E. D., & Kontturi, E. (2023). Understanding Nanocellulose–Water Interactions: Turning a Detriment into an Asset. *Chemical Reviews*, 123(5), 1925–2015. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00611>
- Starýchová, L., Žabka, M., Špaglová, M., Čuchorová, M., Vítková, M., Čierna, M., Bartoníková, K., & Gardavská, K. (2014). In Vitro Liberation of Indomethacin from Chitosan Gels Containing Microemulsion in Different Dissolution Mediums. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 103(12), 3977–3984. <https://doi.org/10.1002/jps.24213>
- Suhas, Gupta, V. K., Carrott, P. J. M., Singh, R., Chaudhary, M., & Kushwaha, S. (2016). Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. In *Bioresource Technology* (Vol. 216, pp. 1066–1076). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.106>

- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108–109, 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
- Tang, Z., Lin, X., Yu, M., Mondal, A. K., & Wu, H. (2024). Recent advances in TEMPO-oxidized cellulose nanofibers: Oxidation mechanism, characterization, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 259, 129081. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.129081>
- Tzoumaki, M. V., Moschakis, T., Kiosseoglou, V., & Biliaderis, C. G. (2011). Oil-in-water emulsions stabilized by chitin nanocrystal particles. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1521–1529. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.008>
- Voineskos, S. H., Ayeni, O. A., McKnight, L., & Thoma, A. (2009). Systematic review of skin graft donor-site dressings. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 124(1), 298–306. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181a8072f>
- Wang, W., Zhu, G., Li, L., Tan, S., Wu, K., Zhang, X., & Yang, Y. (2016). Facile hydrothermal synthesis of flower-like Co–Mo–S catalysts and their high activities in the hydrodeoxygenation of p-cresol and hydrodesulfurization of benzothiophene. *Fuel*, 174, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2016.01.074>
- Wang, X., Yang, X., Xiao, X., Li, X., Chen, C., & Sun, D. (2024). Biomimetic design of platelet-rich plasma controlled release bacterial cellulose/hydroxyapatite composite hydrogel for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 269, 132124. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.132124>
- Wang, Y., Teng, H., Bai, S., Li, C., Wang, Y., Ma, L., Zhang, Y., & Chen, L. (2024). Pickering emulsion of camellia oil stabilized by Octenyl succinic acid starch: Interaction, lipid

- oxidation and digestibility. *International Journal of Biological Macromolecules*, 279, 135108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135108>
- Wen, C., Yuan, Q., Liang, H., & Vriesekoop, F. (2014). Preparation and stabilization of d-limonene Pickering emulsions by cellulose nanocrystals. *Carbohydrate Polymers*, 112, 695–700. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.06.051>
- Wu, J., Zheng, Y., Wen, X., Lin, Q., Chen, X., & Wu, Z. (2014). Silver nanoparticle/bacterial cellulose gel membranes for antibacterial wound dressing: Investigation in vitro and in vivo. *Biomedical Materials (Bristol)*, 9(3). <https://doi.org/10.1088/1748-6041/9/3/035005>
- Xu, G., Onyianta, A. J., Eloi, J.-C., Harniman, R. L., Laverock, J., Bond, I., Diejomaoh, O. A., Koev, T. T., Khimyak, Y. Z., & Eichhorn, S. J. (2024). Self-Healing Composite Coating Fabricated with a Cystamine Cross-Linked Cellulose Nanocrystal-Stabilized Pickering Emulsion. *Biomacromolecules*, 25(2), 715–728. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00915>
- Yan, H., Chen, X., Song, H., Li, J., Feng, Y., Shi, Z., Wang, X., & Lin, Q. (2017a). Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. *Food Hydrocolloids*, 72, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.044>
- Yan, H., Chen, X., Song, H., Li, J., Feng, Y., Shi, Z., Wang, X., & Lin, Q. (2017b). Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. *Food Hydrocolloids*, 72, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.044>

Zhang, J., Li, L., Wang, J., Sun, H., Xu, J., & Sun, D. (2012). Double Inversion of Emulsions Induced by Salt Concentration. *Langmuir*, 28(17), 6769–6775.

<https://doi.org/10.1021/la300695v>

Zilberman, M., Egozi, D., Shemesh, M., Keren, A., Mazor, E., Baranes-Zeevi, M., Goldstein, N., Berdicevsky, I., Gilhar, A., & Ullmann, Y. (2015). Hybrid wound dressings with controlled release of antibiotics: Structure-release profile effects and in vivo study in a guinea pig burn model. *Acta Biomaterialia*, 22, 155–163.

<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.04.029>

ZILBERMAN, M., & ELSNER, J. (2008). Antibiotic-eluting medical devices for various applications. *Journal of Controlled Release*, 130(3), 202–215.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.05.020>