

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ELABORACIÓN DE UN APÓSITO DE KEFIRÁN CON GENTAMICINA Y ÁCIDO
ASCÓRBICO PARA EL CONTROL DE *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomonas*
aeruginosa

Por

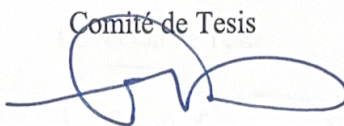
KARLA KATIUSHKA SOLÍS ARÉVALO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

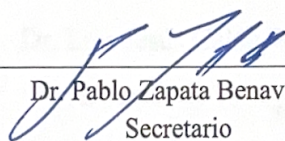
2026

ELABORACIÓN DE UN APÓSITO DE KEFIRÁN CON GENTAMICINA Y ÁCIDO
ASCÓRBICO PARA EL CONTROL DE *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomonas*
aeruginosa

Comité de Tesis



Dr. Luis Jesús Galán Wong
Presidente



Dr. Pablo Zapata Benavides
Secretario



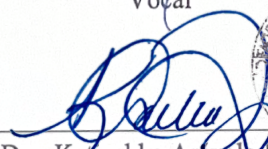
Dra. Verónica Almaguer Cantú
Vocal



Dra. Myriam Elías Santos
Vocal



Dra. Diana Guzmán Zárate Triviño
Vocal



Dra. Katiushka Arcevale Niño
Subdirectora de Posgrado



**SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO**

ELABORACIÓN DE UN APÓSITO DE KEFIRÁN CON GENTAMICINA Y ÁCIDO
ASCÓRBICO PARA EL CONTROL DE *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomonas*
aeruginosa

Dirección de Tesis



Dr. Luis Jesús Galán Wong

Director de Tesis

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al SECIHTI por el apoyo brindado mediante la beca de manutención otorgada durante el desarrollo de mis estudios doctorales, la cual hizo posible la realización de este proyecto.

Al Dr. Luis J. Galán Wong, por sus enseñanzas, su tiempo y dedicación a este proyecto.

A la Dra. Katiushka Arévalo Niño por todo su apoyo, guía, enseñanza, consejos, dedicación y tiempo a este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, institución donde cursé mis estudios de doctorado, por mi formación académica y profesional a lo largo de esta etapa.

A mi comité de tesis y especialmente al Laboratorio L1 y a todos sus integrantes, por haberme brindado el espacio, apoyo y acompañamiento necesarios para el desarrollo experimental de esta tesis.

Al Instituto de Biotecnología, sede del laboratorio, por facilitar las instalaciones y recursos utilizados durante esta investigación.

DEDICATORIA

A mi madre, Katiushka Arévalo Niño, por ser siempre mi ejemplo de fortaleza, dedicación y amor incondicional. Porque en cada etapa de mi vida has estado presente guiándome, apoyándome y enseñándome a nunca rendirme. Gracias por creer en mí incluso cuando yo dudaba, por escucharme, aconsejarme y acompañarme siempre. Todo lo que soy también es gracias a ti. Te amo mucho mamá.

A mi padre, Carlos Solís Rojas, por enseñarme a enfrentar la vida con valentía, humor y determinación. Porque siempre has sabido sacarme una sonrisa aun en los momentos difíciles y me has demostrado que los límites muchas veces solo existen en nuestra mente. Gracias por cada enseñanza, cada consejo y cada momento compartido. Te amo papá.

A mi esposa Alejandra Ortiz, por acompañarme con amor, paciencia y comprensión durante todo este camino. Gracias por estar a mi lado en los días más difíciles y también en los más felices, por impulsarme a seguir adelante cuando el cansancio parecía vencerme y por celebrar conmigo cada pequeño logro. Tu apoyo incondicional hizo esta etapa mucho más llevadera y significativa. Gracias por tu amor y por compartir tu vida conmigo, te amo para siempre.

A mi familia, por siempre estar presente, por sus enseñanzas, apoyo y cariño a lo largo de mi vida. Gracias por cada palabra de aliento y por todos los momentos compartidos.

A todos mis compañeros y ex compañeros del L1, especialmente Eugenia, Isabel, Valeria, y demás por hacer del laboratorio un lugar lleno de aprendizaje, apoyo y buenos momentos. Gracias por las experiencias compartidas, las enseñanzas y las amistades que siempre llevo conmigo.

A todos mis maestros de la Facultad de Ciencias Biológicas, por compartir sus conocimientos y contribuir a mi formación académica y profesional.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	VII
1. RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Biopolímeros	4
3.1.1 Biopolímeros microbianos.....	5
3.1.2 Consorcios microbianos.....	6
3.2 Kéfir.....	6
3.2.1 Kefirán	6
3.3 Infecciones asociadas a la atención de la salud en México	7
3.3.1 Microorganismos que afectan piel.....	8
3.4 Biomateriales en biomedicina	9
3.4.1 Electrohilado.....	11
3.5 Ensayos biológicos	12
3.5.1 Actividad antimicrobiana.....	12
3.5.2 Citotoxicidad.....	13
4. JUSTIFICACIÓN	14
5. HIPÓTESIS	15
6. OBJETIVOS	15
6.1 Objetivo general	15
6.2 Objetivos específicos.....	15
7. MATERIAL Y MÉTODOS	16
7.1 Identificación de microorganismos presentes en el consorcio microbiano kéfir	16
7.2 Producción y obtención de kefirán.....	17
7.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de la gentamicina.....	17
7.4 Elaboración de membranas por electrohilado	18
7.4.1 Preparación de las soluciones poliméricas	18
7.4.2 Características de las soluciones poliméricas	19
7.4.3 Electrohilado.....	19
7.5 Caracterización fisicoquímica de las membranas	20

7.5.1 Morfología de las fibras	20
7.5.2 Hidrofilicidad de las fibras	20
7.5.3 Análisis por espectroscopía infrarroja	20
7.6 Evaluación de actividad antimicrobiana de las membranas contra <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>	20
7.7 Evaluación de citotoxicidad	21
7.8 Análisis estadístico	22
8. RESULTADOS	22
8.2 Extracción de kefirán.....	25
8.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de gentamicina.....	25
8.4 Condiciones de electrohilado	26
8.5 Caracterización fisicoquímica de las membranas	27
8.5.1 Morfología de las fibras.....	27
8.5.2 Hidrofilicidad de las fibras	28
8.5.3 Análisis por espectroscopía infrarroja	29
8.6 Actividad antimicrobiana de las membranas.....	30
8.7 Evaluación de citotoxicidad de las membranas.....	31
9. DISCUSIÓN	34
9.1 Identificación de microorganismos presentes en el consorcio microbiano kéfir....	34
9.2 Extracción de kefirán.....	36
9.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI).....	36
9.4 Condiciones de electrohilado	37
9.5 Caracterización fisicoquímica de las membranas	38
9.5.1 Morfología de las fibras.....	38
9.5.2 Hidrofilicidad de las fibras	39
9.5.3 Análisis por espectroscopía infrarroja	40
9.6 Actividad antimicrobiana de las membranas.....	41
9.7 Evaluación de citotoxicidad de las membranas.....	41
10. CONCLUSIONES	43
11. PERSPECTIVAS	44
12. BIBLIOGRAFÍA.....	45
13. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición de las soluciones poliméricas y las membranas electrohiladas correspondientes.....	19
Tabla 2.	Resultados con solución SPKS-GA a diferentes condiciones probadas	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Índice de riqueza Chao1 de las muestras kéfir (Kef) y leche fermentada con kéfir (KefirMlk).....	23
Figura 2.	Índice de diversidad Shannon de las muestras kéfir (Kef) y leche fermentada con kéfir (KefirMlk).....	23
Figura 3.	Abundancia relativa de los principales phyla identificados en las muestras Kef y KefirMlk.....	24
Figura 4.	Abundancia relativa de los principales géneros/especies identificados en las muestras Kef y KefirMilk.....	24
Figura 5.	Morfología de fibras de MP a 5,000 aumentos y distribución de diámetro de fibras	27
Figura 6.	Morfología de fibras de MPKS a 5,000 aumentos y distribución de diámetro de fibras	27
Figura 7.	Morfología de fibras de MPKS-GA a 5,000 aumentos y distribución de diámetro de fibras	28
Figura 8.	Ángulo de contacto de membrana a) MP, b) MPKS y c) MPKS-GA	28
Figura 9.	Espectro FTIR de a) MPKS-GA (rojo), b) MPKS (azul) y MP (verde)	29
Figura 10.	Halos de inhibición presentados por a) MPKS-GA y b) SPKS-GA contra <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. aureus</i>	31
Figura 11.	Efecto de MP, MPKS y MPKS-GA en la viabilidad celular de la línea HDFn a 24 h	32
Figura 12.	Efecto de MP, MPKS y MPKS-GA en la viabilidad celular de la línea HDFn a 48 h.....	33
Figura 13.	Efecto de MP, MPKS y MPKS-GA en la viabilidad celular de la línea HDFn a 72 h.....	34

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

AN:	Agar nutritivo
ANOVA:	Análisis de varianza
ATR:	Reflectancia total atenuada
ATCC:	American Type Culture Collection
CMI:	Concentración mínima inhibitoria
CN:	Caldo nutritivo
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DO:	Densidad óptica
EPS:	Exopolisacárido
FTIR:	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
HDFn:	Fibroblastos dérmicos humanos neonatales
HM:	Método de extracción con agua caliente
IAAS:	Infecciones asociadas a la atención de la salud
LPS:	Lipopolisacárido
MP:	Membrana de PVA
MPKS:	Membrana de PVA/schizophyllan/kefirán
MPKS-GA:	Membrana de PVA/schizophyllan/kefirán con gentamicina y ácido ascórbico
MTT:	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
OTUs:	Unidades taxonómicas operacionales
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PVA:	Alcohol polivinílico
SEM:	Microscopía electrónica de barrido
SP:	Solución polimérica de PVA
SPKS:	Solución polimérica de PVA/schizophyllan/kefirán
SPKS-GA:	Solución polimérica de PVA/schizophyllan/kefirán con gentamicina y ácido ascórbico

1. RESUMEN

Las infecciones asociadas a la atención de la salud representan un problema frecuente en pacientes con heridas cutáneas y quemaduras, donde los apósitos convencionales pueden ocasionar daño adicional al tejido durante su remoción. Por ello, las membranas electrohiladas elaboradas con materiales biodegradables y biocompatibles han surgido como una alternativa prometedora para aplicaciones en regeneración cutánea y cuidado de heridas. El objetivo de este estudio fue desarrollar y evaluar una membrana electrohilada compuesta de alcohol polivinílico (PVA), kefirán y schizophyllan, incorporada con gentamicina y ácido ascórbico, con potencial aplicación como apósito para heridas. El kefirán fue obtenido a partir de kéfir con un rendimiento de extracción de 0.61 %. Posteriormente, las soluciones poliméricas fueron procesadas mediante electrohilado, obteniéndose membranas con fibras libres de perlas. Las fibras obtenidas tuvieron diámetros promedio cercanos a 400 nm. La actividad antimicrobiana de las membranas fue evaluada frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, observándose halos de inhibición de 16.4 ± 2.2 mm contra *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que no presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus*. Además, los ensayos de citotoxicidad realizados en fibroblastos humanos HDFn demostraron ausencia de efectos citotóxicos significativos. Los resultados obtenidos indican que las membranas desarrolladas poseen propiedades estructurales, antimicrobianas y de biocompatibilidad adecuadas, por lo que presentan potencial para su futura aplicación como apósitos para heridas.

ABSTRACT

Healthcare-associated infections represent a frequent problem in patients with skin wounds and burns, where conventional dressings may cause additional tissue damage during removal. For this reason, electrospun membranes made from biodegradable and biocompatible materials have emerged as a promising alternative for wound care and skin regeneration applications. The aim of this study was to develop and evaluate an electrospun membrane composed of polyvinyl alcohol (PVA), kefir, and schizophyllan loaded with gentamicin and ascorbic acid, with potential application as a wound dressing. Kefir was obtained from kefir with an extraction yield of 0.61%. The polymeric solutions were processed by electrospinning, obtaining beadless fibers. These fibers had average fiber diameters close to 400 nm. The antimicrobial activity of the membranes was evaluated against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, showing inhibition halos of 16.4 ± 2.2 mm against *Pseudomonas aeruginosa*, whereas there was no antimicrobial activity observed against *Staphylococcus aureus*. In addition, cytocompatibility assays performed on HDFn human fibroblasts demonstrated the absence of significant cytotoxic effects. The obtained results indicate that the developed membranes possess suitable structural, antimicrobial, and biocompatibility properties, demonstrating their potential for future application as wound dressings.

2. INTRODUCCIÓN

La cicatrización crónica de heridas, un proceso prolongado que puede extenderse hasta 12 semanas, enfrenta desafíos significativos debido a la susceptibilidad a infecciones bacterianas (causadas por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*), lo que afecta negativamente el sistema inmunológico (Avizheh *et al.*, 2019). Estas infecciones, comunes en heridas quirúrgicas y otros tipos de lesiones en piel, retrasan la curación e incrementan los costos médicos. Los antibióticos, administrados tópicamente, oralmente o por vía intravenosa, pueden reducir la colonización bacteriana y acelerar la cicatrización (Heal *et al.*, 2016; Trilla, 2018).

Los apósitos avanzados, que incorporan fármacos o agentes biológicos, son efectivos para proteger heridas, aliviar el dolor y optimizar la regeneración al interactuar con células y agentes infecciosos (Ambekar & Kandasubramanian, 2019). Entre los antibióticos destacados, la gentamicina, con actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y negativas, presenta una baja resistencia bacteriana, lo que la hace adecuada para apósitos externos (Huang *et al.*, 2020; Oesterreicher *et al.*, 2018).

El electrohilado, una tecnología clave para producir nanofibras con alta superficie específica y porosidad, ha sido ampliamente investigado para la administración de compuestos activos (Bhardwaj & Kundu, 2010). Los polisacáridos, como el kefirán, son materiales prometedores por su biodegradabilidad y propiedades antimicrobianas, antioxidantes y cicatrizantes (Dailin *et al.*, 2016; Egea *et al.*, 2020). Por su parte, el ácido ascórbico actúa como antioxidante y estimula la síntesis de colágeno, crucial para la reparación de tejidos y reducción de lesiones por estrés oxidativo (Pielesz *et al.*, 2017).

Este proyecto tuvo como objetivo desarrollar un apósito electrohilado a base de kefirán, schizophyllan y PVA incorporado con gentamicina y ácido ascórbico, evaluando sus propiedades fisicoquímicas, su actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*, así como su citocompatibilidad en fibroblastos humanos HDFn.

3. ANTECEDENTES

3.1 Biopolímeros

Los biopolímeros son sustancias orgánicas presentes en fuentes naturales. El término biopolímero se origina de la raíz griega *bíos* que significa “vida” y *polus meros* que significa “muchas partes” (Baranwal *et al.*, 2022). Según la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada), los biopolímeros se derivan de la biomasa o se producen a partir de monómeros de su derivación (Pereira de Mesquita *et al.*, 2022). Por otro lado, la definición de la Asociación Europea de Bioplásticos considera como biopolímeros tanto a las macromoléculas sintetizadas a partir de al menos un monómero procedente de recursos sostenibles como a los polímeros que son biodegradables independientemente del origen de sus materias primas (De Luca *et al.*, 2023).

Los biopolímeros pueden clasificarse por la fuente de donde provienen como polímeros naturales o sintéticos (Jabeen & Atif, 2024). Los biopolímeros naturales pueden derivarse de fuentes biológicas como plantas, animales y microorganismos, mientras que los sintéticos pueden elaborarse a partir de materiales naturales como azúcar, almidón, aceites y grasas (Sinha, 2024).

Algunas de las ventajas de los biopolímeros sintéticos son la biocompatibilidad, buena reproducibilidad, buena estabilidad mecánica y química. Asimismo, las ventajas de los biopolímeros naturales incluyen la biocompatibilidad, baja o nula toxicidad, bioadhesión, biodegradabilidad, son renovables biológicamente y biofuncionales (Baranwal *et al.*, 2022).

Otra clasificación de los polímeros es gracias a su estructura y funciones, las cuales dividen a los biopolímeros en polinucleótidos, polipéptidos y polisacáridos (Fatehi *et al.*, 2023).

Los polinucleótidos son formados por monómeros de nucleótidos, por ejemplo, ADN y ARN. En cambio, los polipéptidos son formados por monómeros de aminoácidos, por ejemplo, el colágeno. Finalmente, los polisacáridos son aquellos que contienen

estructuras de carbohidratos, por ejemplo, almidón, celulosa y goma arábica, entre otros (Hudiyanti *et al.*, 2022).

Debido a que los biopolímeros son biocompatibles y biodegradables, esto los hace útiles en diferentes aplicaciones, como recubrimientos comestibles, emulsiones, materiales de embalaje en la industria alimentaria y como vehículos de transporte de medicamentos, implantes médicos como órganos, cicatrización de heridas, andamios de tejidos y apósitos en industrias farmacéuticas (Baranwal *et al.*, 2022).

3.1.1 Biopolímeros microbianos

Los microorganismos son capaces de sintetizar una amplia gama de biopolímeros que cumplen diversas funciones biológicas. Dependiendo de su naturaleza, se diferencian de los polímeros sintéticos convencionales por propiedades clave específicas, como la biofuncionalidad (estereoselectividad), la biocompatibilidad y la biodegradabilidad, lo que los hace muy útiles o incluso irremplazables en muchas áreas. Estos biocompuestos se pueden utilizar para la producción de productos químicos básicos (productos de gran volumen y bajo valor) y productos químicos especiales (productos de bajo volumen y alto valor) (Paul *et al.*, 2020).

Los biopolímeros microbianos como poliésteres, poliamidas y polisacáridos se producen con éxito a partir de cultivos puros, mutantes seleccionados del laboratorio u organismos modificados genéticamente. Los biopolímeros van desde fluidos viscosos hasta bioplásticos. La masa molecular y la composición del biopolímero deciden sus propiedades físicas. (Verma *et al.*, 2020).

Los biopolímeros se obtienen a partir de una amplia gama de microorganismos. Los polímeros microbianos se producen por fermentación o por polimerización química de monómeros. Los materiales plásticos sintéticos no biodegradables se pueden sustituir por una fuente renovable, biodegradable y respetuosa con el medio ambiente que se puede transformar en productos diferentes, como los productos bioquímicos obtenidos por fermentación del azúcar. Los microorganismos producen biopolímeros mediante la acumulación de compuestos extracelulares como los exopolisacáridos (EPS) y se utilizan en las industrias alimentaria, química, cosmética y de embalajes como adhesivos, absorbentes y lubricantes (Verma *et al.*, 2020).

3.1.2 Consorcios microbianos

En la naturaleza, los microorganismos viven en forma de una comunidad compleja llamada “consorcio” que les permite realizar tareas que son imposibles para un solo microorganismo. Imitando a los consorcios naturales, los científicos e ingenieros están realizando esfuerzos continuos para construir sistemas de cocultivo artificial con fines biotecnológicos. Muchos estudios sobre cocultivo microbiano han presentado sus ventajas sobre el cultivo puro en términos de productividad y economía de procesos (Bhatia *et al.*, 2018).

3.2 Kéfir

El kéfir tiene su origen en las montañas del Cáucaso, Tibetano o Mongolia, donde antes del 2000 a.C. los granos ya se pasaban tradicionalmente de generación en generación entre las tribus del Cáucaso, considerándose una fuente de riqueza familiar.

El kéfir se diferencia de otros productos fermentados porque se produce a partir de granos de kéfir que comprenden una mezcla específica y compleja de bacterias productoras de ácido láctico y ácido acético, y levaduras fermentadora y no fermentadoras de lactosa, que viven en una asociación simbiótica (Rosa *et al.*, 2017).

Los principales ingredientes del kéfir son el ácido láctico, el etanol y el CO₂. Se elabora a partir de la fermentación de formas tradicionales y comerciales de granos de kéfir con cualquier tipo de leche pasteurizada semidesnatada o desnatada (cabra, oveja, vaca, camello, búfalo). Los granos de kéfir están compuestos por diferentes microflora que se acumulan en la matriz de polisacáridos y proteínas, incluyendo bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parabuchneri* y *Acetobacter lovaniensis*) y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*. Las bacterias convierten la lactosa en ácido láctico, disminuyendo el pH de la leche y las levaduras producen etanol y CO₂ a partir del ácido láctico (Sharifi *et al.*, 2017).

3.2.1 Kefirán

El kefirán es un polisacárido extracelular con muchos grupos hidroxilo, obtenido de los microorganismos presentes en los granos de kéfir y producido por varias especies de *Lactobacillus*, entre ellas: *L. kefiranofaciens*, *L. kefirgranum*, *L. parakefir*, *L. kefir* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Este biopolímero comestible, un glucogalactano ramificado soluble en agua con cantidades aproximadamente iguales de D-glucosa y D-galactosa en una cadena secuencial, ha atraído recientemente muchas atenciones debido a sus características únicas como comportamiento reológico, biodegradabilidad, biocompatibilidad, seguridad, efecto emulsionante, efecto estabilizador, resistencia a la hidrólisis, propiedades de barrera y mecánicas, y permeabilidad al vapor de agua (Moradi & Kalanpour, 2019).

Se han reportado características del kefirán, como propiedades antibacterianas, antifúngicas y antitumorales. El polímero obtenido de los granos de kéfir es una alternativa prometedora para varias aplicaciones biomédicas (Radhouani *et al.*, 2018).

3.3 Infecciones asociadas a la atención de la salud en México

Las infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) se definen como infecciones localizadas o sistémicas que ocurren en un paciente durante el proceso de atención en un hospital y que no estaban presente o en incubación en el momento del ingreso (Tolera *et al.*, 2020). El término “infección asociada a la atención de la salud” ha reemplazado al término “infección nosocomial” o “adquirida en el hospital”, debido a que, como los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) enfatizan, las IAAS pueden surgir del uso de dispositivos médicos, complicaciones de procedimientos quirúrgicos y transmisión entre pacientes y trabajadores de la salud (Sydnor & Perl, 2011). La mayoría de las infecciones asociadas a la atención médica se manifiestan a las 48 horas o más después del ingreso. La infección también puede prevalecer después del alta porque el paciente ha sido colonizado o infectado mientras estaba en el hospital, pero el período de incubación del patógeno excede la estadía del paciente en el hospital (Tolera *et al.*, 2020).

Los tipos comunes de IAAS son la infección del sitio quirúrgico (21.8%), la neumonía (21.8%), las infecciones sistémicas (0.2%), las infecciones gastrointestinales (17.1%), la infección del tracto reproductivo (0.6%), las infecciones cardiovasculares (1.2%), las infecciones del sistema nervioso central (0.8%), las infecciones de la piel y los tejidos blandos (3.2%), las infecciones de los huesos y las articulaciones (1.0%), las infecciones de la boca (5.6%), las infecciones del tracto respiratorio inferior (4.0%), las

infecciones primarias del torrente sanguíneo (9.9%), las infecciones de ojos, oídos, nariz, garganta e infecciones urinarias (12.9%) (Ikramullah *et al.*, 2023).

Debido al inadecuado uso de antimicrobianos, los patógenos nosocomiales han dejado de ser microorganismos fácilmente tratables y son ahora altamente resistentes, lo cual representa un problema de gran importancia para la prevención y el control de las IAAS (Rincón León & Navarro Fuentes, 2016).

En México, según la OMS, se calcula que 450 mil casos de infección relacionada con la atención sanitaria causan 32 muertes por cada 100 mil habitantes por año (cuyo costo de atención anual se aproxima a los 1,500 millones) (Rodríguez Salgado, 2018).

En febrero de 2017, la OMS publicó una lista de microorganismos resistentes a los antibióticos para los que se considera urgente el desarrollo de nuevos tratamientos antimicrobianos. Esta lista incluye microorganismos del grupo ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. Este grupo de microorganismos es de gran relevancia debido a su intrínseca y extensa resistencia a los antibióticos, además de ser capaces de adquirir múltiples genes que les confieren resistencia a múltiples fármacos (Álvarez-Ainza *et al.*, 2024). Aunado a esto, se consideran la causa de la mayoría de las infecciones asociadas a la atención médica (IAAS), especialmente en pacientes gravemente enfermos e inmunodeprimidos (Ayobami *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2020).

En México, se identificó que entre los principales microorganismos aislados en 48,377 infecciones asociadas a la atención de la salud en hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social se encontraban *P. aeruginosa* (10.9 %) y *S. aureus* (9.8 %) (Arias Flores *et al.*, 2016).

3.3.1 Microorganismos que afectan piel

Entre los microorganismos del grupo ESKAPE, se encuentran algunos que pueden causar infecciones en piel, como lo son *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Staphylococcus spp., son cocos Gram positivos de 0.5 a 1.5 µm de diámetro, se agrupan en racimos, son inmóviles, anaerobios facultativos, fermentadores de glucosa,

catalasa positivo y oxidasa-negativo con contenido de G+C del 30 a 39% y se consideran oportunistas (García *et al.*, 2019). *S. aureus* es la bacteria más común que causa infecciones dentro y fuera de los hospitales. Es responsable de millones de muertes cada año en todo el mundo. El tratamiento de infecciones por *S. aureus* se volvió más difícil y costoso debido a la creciente tasa de cepas resistentes a la meticilina, que ahora son responsables de muchas infecciones adquiridas en hospitales y en la comunidad (Gaifer *et al.*, 2021).

En México, la vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas con la atención de la salud está a cargo de la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE). Esta plataforma reportó un total de 61,969 casos notificados de infecciones asociadas con la atención de la salud en México durante 2015. De igual manera, notificó que la mortalidad en pacientes infectados con *S. aureus* varió de 5-70% (Torres *et al.*, 2020).

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram-negativa formadora de biopelículas frecuentemente detectada en heridas de la piel, especialmente en regiones más profundas de los lechos de las heridas. Las heridas infectadas por este microorganismo se caracterizan por grandes áreas de lesión y un proceso de curación tardío. Esto, asociado con el hecho de que *P. aeruginosa* presenta resistencia intrínseca y adquirida a antibióticos, hace que el manejo clínico de heridas infectadas por este patógeno sea un gran desafío. (Ferro *et al.*, 2019)

Pseudomonas aeruginosa posee muchos factores de virulencia como pili, lipopolisacárido (LPS), enzimas extracelulares, exotoxinas, flagelo y cinco tipos de sistemas de secreción (TSSs). Esta bacteria tiene un solo flagelo polar que es crucial para la motilidad, quimiotaxis y adhesión (García *et al.*, 2018).

3.4 Biomateriales en biomedicina

Según la Sociedad Europea de Biomateriales, un biomaterial se define como una sustancia distinta de un fármaco o una combinación de varias sustancias (de origen sintético o natural) que puede utilizarse en cualquier momento como parte de un órgano, para tratar, mejorar o restaurar funciones corporales. Es un grupo de materiales con diferentes composiciones, estructuras y propiedades que afectan su aceptación por el

cuerpo y la capacidad de conectarse y regenerar tejidos humanos. Los biomateriales desempeñan un papel importante en el mercado mundial de dispositivos médicos, estimado en 400 mil millones de dólares (Oleksy *et al.*, 2023).

Además de la biodegradabilidad, estos materiales revelaron algunas ventajas destacadas como buena procesabilidad, estabilidad química, bajo costo de producción y conductividad eléctrica, lo que permitió que estos materiales se utilizaran en numerosos campos de la ingeniería (Jadoun *et al.*, 2021).

Las dos formas más comunes de clasificar los biomateriales se basan en su estructura química (metal, cerámica, polímero y compuestos) y en su grado de interacción con el entorno biológico (inerte, bioactivo, bioreabsorbible) (Marin *et al.*, 2020).

De igual manera, los biomateriales naturales se derivan de animales, microbios o plantas. Estos biomateriales son típicamente similares a las sustancias macromoleculares que están sintetizadas para las rutas metabólicas. Como resultado, disminuyen los problemas de toxicidad y de reacciones inflamatorias crónicas provocadas por muchos polímeros sintéticos.

El proceso de cicatrización de heridas se divide en inflamación, proliferación y remodelación. El objetivo del tratamiento de la herida es curar la herida en el menor tiempo posible para prevenir infecciones y minimizar el dolor, la incomodidad y las cicatrices. El tratamiento exitoso de una herida debe asegurar que la cantidad de tejido necrótico se reduzca y que se evite la invasión microbiana.

Los polisacáridos son biopolímeros naturales que son económicos y la mayoría de ellos son fácilmente degradables. Los biomateriales basados en polisacáridos utilizados para el cuidado de heridas pueden clasificarse en varias categorías: neutros (β -glucanos, dextranos, celulosa), ácidos (ácido algico, ácido hialurónico), básicos (quitina, quitosano) o sulfatados (heparina, heparán sulfato, sulfato de condroitina, dermatán sulfato, queratán sulfato) (Aramwit, 2016).

Un apósito es cualquier material empleado para cubrir, proteger y curar heridas de un tejido dañado (Valencia Gomez *et al.*, 2016). Los materiales para apósitos en heridas deben actuar como barrera física semipermeable a la humedad y el oxígeno, protegiendo

a esta contra la presencia de microorganismos causantes de infecciones (Mogoşanu & Grumezescu, 2014). Los apósitos para heridas juegan un papel importante en la gestión de la cicatrización, en particular, los apósitos elaborados con polímeros se utilizan ampliamente para heridas exudativas; ya que, por lo general, estos apósitos son biodegradables, biocompatibles y no tóxicos para la piel (Valencia Gomez *et al.*, 2016).

Los apósitos de celulosa modificada para heridas pueden incorporar moléculas activas como enzimas, factores de crecimiento, agentes antimicrobianos, antioxidantes, hormonas, vitaminas y otros agentes que pueden beneficiar en el proceso de cicatrización (Aramwit, 2016).

3.4.1 Electrohilado

De acuerdo a registros antiguos, desde la época de los griegos y los romanos se utilizaban fibras con fines biomédicos. Ellos utilizaban la seda de araña para curar heridas entre los siglos IX y I a.C., pero la evidencia registrada más antigua proviene de las obras de Plinio el Viejo, que señaló que las telarañas estimulaban los procesos de curación de las heridas de la piel (Marin *et al.*, 2020). Hoy en día, se utilizan diferentes métodos para sintetizar fibras de tamaño micrométrico o nanométrico para su aplicación en biomedicina.

El electrohilado es un proceso electrohidrodinámico que utiliza la extrusión y elongación de finos filamentos provenientes de soluciones poliméricas mediante una fuerza eléctrica. Los elementos clave de un sistema de electrohilado incluyen un inyector, un colector y una fuente de alto voltaje. El mecanismo de inyección generalmente consiste en una aguja metálica conectada a una jeringa que contiene una solución polimérica disuelta en un solvente (conocida como solución de electrohilado). Al aplicar un voltaje en el rango de 5–60 kV entre la aguja y un colector metálico conectado a tierra, se inducen cargas eléctricas en la superficie de la gota de polímero situada en la punta de la aguja. Esta gota se deforma y adopta una forma cónica, denominada cono de Taylor. Si la fuerza eléctrica excede la tensión superficial del líquido, se produce la extrusión de un filamento polimérico desde la punta del cono de Taylor, el cual es atraído hacia el colector. Durante esta etapa, el

filamento se estira aún más y el solvente se evapora, resultando en una red de fibras no tejidas sobre el colector (Zhang et al., 2017).

La técnica de electrohilado se ha utilizado con éxito en la fabricación de membranas porosas dentro del ámbito de la ingeniería de tejidos. Las membranas y los andamios obtenidos mediante electrohilado presentan una amplia variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo la liberación de fármacos, apósitos para heridas e injertos vasculares, entre otras. (Trinca *et al.*, 2017).

3.5 Ensayos biológicos

La palabra “biocompatibilidad” tiene dos raíces: bio-, que significa “vida” y compatibilidad, “capaz de existir en armonía” (del latín *compatibilis*). Vida implica “vivo” y armonía implica una coexistencia mutuamente beneficiosa (Crawford *et al.*, 2021).

En función de su comportamiento en contacto con tejidos vivos, los biomateriales poliméricos se pueden dividir en categorías bioestables, bioadsorbibles (degradables o reabsorbibles) y parcialmente bioadsorbibles. Aquellos biomateriales que tienen contacto directo con tejido humano o animal, requieren de ensayos biológicos que permitan medir la actividad biológica deseada en base al agente adicionado para la activación del dispositivo, así como de pruebas que aseguren la biocompatibilidad del mismo. (Bernard *et al.*, 2018).

3.5.1 Actividad antimicrobiana

Los agentes antimicrobianos incluyen antibióticos, compuestos de amonio cuaternario, iones/óxidos metálicos y péptidos antimicrobianos (AMP).

El desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, como materiales avanzados en forma pura o híbrida, capaces de prevenir y tratar infecciones resistentes a múltiples fármacos, es cada vez más necesario (Martí *et al.*, 2018).

La evaluación de la actividad biológica de los antibióticos es crucial para determinar la susceptibilidad a estos agentes, y también resulta fundamental para identificar nuevos antimicrobianos. Los productos naturales, ya sean compuestos puros o extractos de origen vegetal, ofrecen amplias posibilidades para desarrollar aditivos innovadores y tratamientos farmacológicos adecuados, gracias a su vasta

diversidad química. En la actualidad, existen múltiples métodos para evaluar su actividad antimicrobiana. Dado que estos métodos no se basan en los mismos principios, los resultados pueden variar en función del método empleado, los microorganismos seleccionados y las características del proceso de extracción o la solubilidad de cada compuesto en estudio.

Los sistemas de prueba de antimicrobianos deberían ser idealmente simples, rápidos, reproducibles, económicos y maximizar el rendimiento de la muestra para hacer frente a un número variado de extractos y fracciones. El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) estandarizó el método de dilución de agar para la determinación cuantitativa de antibióticos. CLSI también recomienda métodos de dilución de caldo para la determinación inhibitoria, utilizando diferentes principios para evaluar el crecimiento microbiano o su inhibición (Klančnik *et al.*, 2010).

3.5.2 Citotoxicidad

El proceso de curación de heridas es conocido por su complejidad e interacción de diferentes tipos de células con componentes de la matriz que actúan juntos para restablecer la estructura 3D y las funciones del tejido dañado (Miguel *et al.*, 2017).

Los ensayos de citotoxicidad *in vitro* se incluyen en los estudios de la primera fase de evaluación de los biomateriales y equipos médicos implantables. Una evaluación de citotoxicidad *in vitro* de ciertos dispositivos médicos puede mostrar cambios en la morfología celular, proliferación y diferenciación, así como la interacción entre las células y el material (Vidal & Granjeiro, 2017).

Para los materiales en contacto con la piel, el uso de fibroblastos es relevante y adecuado, ya que se informa que proporcionan resultados reproducibles y una buena correlación con las pruebas en animales, además de su papel fisiológico en el proceso de curación de heridas alrededor de los dispositivos implantados (Bernard *et al.*, 2018).

4. JUSTIFICACIÓN

Las heridas crónicas y las lesiones severas de la piel representan un importante problema de salud debido a su alta susceptibilidad a infecciones, las cuales pueden retrasar el proceso de cicatrización, prolongar la estancia hospitalaria e incrementar los costos asociados al tratamiento. Entre los principales microorganismos involucrados en estas infecciones se encuentran *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, cuya presencia puede comprometer significativamente la recuperación del tejido afectado. Además, la creciente aparición de cepas resistentes a los antimicrobianos ha impulsado la búsqueda de nuevas estrategias para el manejo local de heridas.

Los apósitos avanzados obtenidos por electrohilado constituyen una alternativa prometedora a los tratamientos convencionales, ya que pueden actuar como barreras protectoras y sistemas de liberación de compuestos bioactivos. Asimismo, presentan alta área superficial y porosidad, características favorables para aplicaciones en el tratamiento de heridas.

Por otra parte, existe un creciente interés en el empleo de biopolímeros para el desarrollo de biomateriales. El kefirán y schizophyllan, son exopolisacáridos producidos por microorganismos. Estos han demostrado propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y potencial bioactividad, características que los convierten en posibles candidatos para su incorporación en sistemas destinados a la regeneración de tejidos. Sin embargo, debido a sus limitaciones para formar fibras estables por sí solos, es necesaria su combinación con polímeros sintéticos biocompatibles como el PVA, ampliamente utilizado en procesos de electrohilado por su capacidad de formar fibras homogéneas y reproducibles.

La incorporación de gentamicina proporciona actividad antimicrobiana frente a microorganismos asociados a infecciones de heridas, mientras que el ácido ascórbico favorece procesos relacionados con la cicatrización. Por lo anterior, el desarrollo de membranas electrohiladas de PVA/kefirán/schizophyllan incorporadas con estos compuestos bioactivos representa una estrategia prometedora para la obtención de apósitos avanzados. La evaluación de sus propiedades fisicoquímicas, actividad antimicrobiana y citocompatibilidad permitirá determinar su potencial aplicación en regeneración de tejidos.

5. HIPÓTESIS

Una membrana electrohilada de kefirán incorporada con gentamicina y ácido ascórbico presentará actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* sin inducir efectos citotóxicos en células HDFn.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Elaborar un apósito a base de kefirán adicionado con gentamicina y ácido ascórbico por electrohilado, con actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y sin efecto citotóxico en fibroblastos humanos HDFn.

6.2 Objetivos específicos

1. Producir y extraer el exopolisacárido (EPS) kefirán a partir de un consorcio de microorganismos (Kéfir)
2. Optimizar los parámetros para el proceso de electrohilado
3. Elaborar membranas por electrohilado incorporando el agente antimicrobiano (gentamicina) y el agente antioxidante (ácido ascórbico)
4. Caracterizar físicoquímicamente las membranas obtenidas
5. Evaluar la actividad antimicrobiana de las membranas contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*
6. Evaluación de citotoxicidad y proliferación celular de las membranas en fibroblastos humanos HDFn

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Identificación de microorganismos presentes en el consorcio microbiano kéfir

La caracterización molecular de las comunidades microbianas presentes en las muestras de kéfir y leche fermentada con kéfir (KefirMlk) se realizó mediante secuenciación de amplicones del gen 16S rRNA, específicamente de la región V4–V5, utilizando tecnología Illumina paired-end.

El ADN genómico total fue extraído de las muestras y utilizado como molde para la amplificación por PCR empleando cebadores específicos con *barcodes*. Los productos de PCR obtenidos fueron verificados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% para confirmar el tamaño esperado de los amplicones. Posteriormente, los productos amplificados fueron purificados y cuantificados, realizándose la preparación de bibliotecas mediante reparación de extremos, adición de adenina en el extremo 3' (A-tailing) y ligación de adaptadores Illumina.

La calidad y concentración de las bibliotecas fueron evaluadas mediante Qubit, PCR en tiempo real y bioanalizador. Las bibliotecas cuantificadas fueron agrupadas y secuenciadas en una plataforma Illumina paired-end para generar lecturas crudas de 250 pb.

Los datos obtenidos fueron sometidos a control de calidad bioinformático, incluyendo ensamblaje de lecturas (reads merging), filtrado de calidad y eliminación de secuencias quiméricas, con el fin de obtener secuencias efectivas para el análisis posterior. Las secuencias fueron agrupadas en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) y posteriormente anotadas taxonómicamente para determinar la composición y abundancia relativa de la microbiota presente en cada muestra.

El análisis ecológico microbiano incluyó la estimación de diversidad α mediante los índices Chao1 y Shannon para evaluar riqueza y diversidad microbiana. Asimismo, se realizó el análisis de abundancia relativa a nivel de phylum y género/especie.

7.2 Producción y obtención de kefirán

Los granos de kéfir, que fueron utilizados como cultivo iniciador fueron adquiridos de una casa comercial en Monterrey, Nuevo León. El inóculo iniciador “starter” se obtuvo cultivando los granos de kéfir en leche entera pasteurizada a diferentes concentraciones al 5%, 10%, 15% y 20% (p / v), renovándose diariamente durante 7 días (Blandón *et al.*, 2018). Se determinó el peso húmedo inicial de los granos. La conservación del consorcio se llevó a cabo en recipientes dentro de un gabinete cerrado, realizando cambios de medio (leche entera) por medio fresco cada 48 h.

Al final del proceso, los granos de kéfir se recuperaron mediante filtración, se lavaron con agua destilada fría y se secaron cuidadosamente con papel de filtro. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción del kefirán de los granos y se calcularon dos respuestas: el aumento de la biomasa (Zajšek *et al.*, 2013) a través de la siguiente fórmula para calcular el aumento de biomasa:

$$\% \text{ Incremento de biomasa} = \frac{P_f - P_i}{P_i} \times 100 \quad (1)$$

Donde P_i y P_f son los pesos inicial y final, respectivamente. Los experimentos se realizaron por triplicado.

La extracción se llevó a cabo mediante dos procedimientos. En el primer método, los granos de kéfir se sumergieron en un vaso conteniendo agua caliente a 100 °C en una placa de calentamiento con agitación magnética. Se utilizó una proporción de 10:1 (agua-kéfir) y dichos granos se agitaron durante 1 h (Eda Ondul & Mahmut, 2021).

En el segundo procedimiento, se utilizó un tratamiento con agua caliente y ultrasonido en donde los granos de kéfir se sumergieron primero en un vaso de precipitados que contenía agua caliente a 50 °C en una proporción de 10:1 (agua-kéfir) y luego, se colocaron dentro de un baño ultrasónico con una frecuencia de 34 kHz y durante 10 min (Hasheminya & Dehghannya, 2020).

7.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de la gentamicina

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de la gentamicina se evaluó mediante el método de microdilución en placa. Primeramente, se inocularon las cepas de *S. aureus*

BAA-44 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 en caldo nutritivo (CN) por 16 h a 37 °C. Posteriormente, la concentración celular de los inóculos se ajustó a 0.5 en la escala de McFarland utilizando un espectrofotómetro UV/Visible DU 650 (Beckman Coulter) a 625 nm (Ardekani *et al.*, 2019).

Se añadieron 20 µL de un cultivo de 10^8 UFC mL⁻¹ a una placa estéril de 96 pocillos. La gentamicina se diluyó en caldo nutritivo (CN) y se añadieron a los pocillos para dar concentraciones finales de antibiótico de 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 mgmL⁻¹. Los pocillos de control positivo contuvieron el medio líquido correspondiente y células antibiótico, mientras que los pocillos de control negativo contuvieron solo el medio líquido correspondiente. La densidad óptica (DO) se midió a 595 nm utilizando un lector de microplacas EZ Read 2000 (Biochrom) y se leyó nuevamente después 24 h de incubación a 37 °C. La CMI se determinó como la concentración antibiótico más baja a la que la DO a las 24 h del inóculo permaneció igual o disminuyó en comparación con la lectura inicial (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021; Syal *et al.*, 2017).

7.4 Elaboración de membranas por electrohilado

7.4.1 Preparación de las soluciones poliméricas

Se realizaron dos preparaciones como control para el proceso de electrohilado. La primera solución polimérica se preparó con un 8 % de alcohol polivinílico (PVA) en agua destilada; esta solución se utilizó como control del polímero guía y se denominó SP. La segunda solución polimérica consistió en una preparación de 8 % de PVA, 1 % de schizophyllan y 1 % de kefirán en agua destilada; esta se denominó SPKS.

Finalmente, se preparó una solución de 8 % de PVA, 1 % de schizophyllan y 1 % de kefirán en agua destilada y se añadió una concentración de 30.42 µM de ácido ascórbico. Por último, se añadió una cantidad seis veces mayor que la CMI de gentamicina determinada previamente. Esto se debió a estudios previos en los que se observó una pérdida de actividad tras el proceso de electrohilado. Esta última solución se denominó SPKS-GA. Las soluciones poliméricas y las membranas obtenidas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de las soluciones poliméricas y las membranas electrohiladas correspondientes.

Código de solución	Composición polimérica	Aditivos	Código de la membrana electrohilada
SP	8% w/v PVA en agua destilada	-	MP
SPKS	8% w/v PVA, 1% w/v schizophyllan, 1% w/v kefirán en agua destilada	-	MPKS
SPKS-GA	8% w/v PVA, 1% w/v schizophyllan, 1% w/v kefirán en agua destilada	Ácido ascórbico y gentamicina (6x CMI)	MPKS-GA

7.4.2 Características de las soluciones poliméricas

Se registraron los valores de conductividad con un conductímetro (Corning Pinnacle 542), viscosidad (Koehler K447-BR) y pH con un potenciómetro (Beckman 390pH), en condiciones ambiente.

7.4.3 Electrohilado

Se probaron las principales condiciones que influyen en el proceso del electrohilado en un equipo Standard Unit NEU-01 (Shenzhen Tong Li Tech Co). Para esto, se aplicó un Diseño factorial 2^3 con punto central para poder determinar los parámetros de electrohilado efectivos (Solis Arevalo *et al.*, 2019). En este diseño factorial se varió lo siguiente: velocidad de flujo ($0.5\text{-}2.0\text{ mLh}^{-1}$), distancia a colector (10-20 cm), voltaje aplicado (5-20 kv) de acuerdo con lo reportado en la literatura para obtener membranas con fibras de diámetro en escala nano o micrométrico con las soluciones elaboradas en el punto 7.4.1. Posteriormente, se descartaron aquellas en donde no se obtuvieran las características de fibras con superficies lisas sin presencia de gotas o “perlas”, las cuales son la morfología deseada.

Las membranas obtenidas de la SP, SPKS y SPKS-GA se denominaron MP, MPKS y MPKS-GA, respectivamente, como se mencionó en la Tabla 1.

7.5 Caracterización fisicoquímica de las membranas

7.5.1 Morfología de las fibras

Se realizó una evaluación primaria de la morfología de las membranas elaboradas mediante microscopia óptica. Posteriormente, a las membranas seleccionadas se les determinó su morfología mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio EVO MA25 (Zeiss) a 15 kV. Los diámetros medios de las fibras se calcularon midiendo al menos 100 fibras aleatorias de 10 imágenes utilizando el software Image J.

7.5.2 Hidrofilicidad de las fibras

Para la determinación de la hidrofilia de las membranas obtenidas se determinó el ángulo de contacto, el cual es la medida de un material a humectarse. Éste se midió mediante un sistema de ángulo de contacto modelo OCA 15 Plus (Dataphysics), empleando el software SCA 20 para el cálculo de las mediciones.

7.5.3 Análisis por espectroscopía infrarroja

Se realizó el análisis del kefirán y las membranas por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) en un rango de 4000 a 400 cm^{-1} utilizando el Nicolet iS10 (Thermo Scientific) con un aditamento de ATR a una resolución de 4 cm^{-1} a 64 scans con ajuste de línea base.

7.6 Evaluación de actividad antimicrobiana de las membranas contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las membranas se llevó a cabo mediante la técnica difusión en agar frente a *S. aureus* BAA-44 y *P. aeruginosa* ATCC 27853. Primeramente, los microorganismos se activaron en CN y se incubaron a 37 °C por 16 h. Transcurrido el tiempo de incubación, el inóculo se leyó a 625 nm y se ajustó a la escala de Mc Farland. Posteriormente, se inoculó 0.1 mL de cada bacteria en cajas Petri con AN. Se colocaron círculos de las membranas obtenidas en el punto 7.4.3 de 6 mm de diámetro, así como papel filtro Whatman no. 40 estéril de 6 mm de diámetro cargados con 30 μg de antibiótico (gentamicina) como control positivo, respectivamente, y agua destilada como control negativo. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h y se midió el halo de inhibición (Balouiri *et al.*, 2016).

7.7 Evaluación de citotoxicidad

La línea de fibroblastos dérmicos de tejido neonatal (HDFn) fue obtenida cultivada en medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM), suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico/antimicótico (Penicilina, estreptomicina y anfotericina B). Las células fueron mantenidas bajo las siguientes condiciones: 37°C, humedad relativa del $\approx 85\%$ y a una atmosfera de 95% aire con 5% de CO₂.

Se utilizaron 3 placas de 96 pocillos para evaluar si existía citotoxicidad en la línea celular HDFn al ser expuestas a diferentes concentraciones de la membrana: una placa para las 24 horas de exposición, otra para las 48 y la última para 72 horas. Se colocaron 5,000 células por pozo y previo al ensayo se dejaron las células 24 horas para permitir la adherencia de las células al pozo. Las membranas se esterilizaron por 15 min en luz UV, posteriormente se colocaron en los respectivos pocillos en una placa de cultivo celular. Se trabajó con diferentes concentraciones de la membrana, en todos los tratamientos, siendo:

1. 25%: $\frac{1}{4}$ de membrana.
2. 50%: $\frac{1}{2}$ de membrana.
3. 75%: $\frac{3}{4}$ de membrana.
4. 100%: 1 membrana.

En todos los tratamientos se trabajó con el control (Células sin tratamiento) para tomarlo como referencia de viabilidad, todos los ensayos se realizaron por triplicado para determinar diferencias significativas en la viabilidad.

Pasado el tiempo de los tratamientos (24, 48 y 72 horas para cada placa), se agregaron 20 μL del reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a cada pozo, se dejó incubando durante 2 horas. Pasado el tiempo, se removió el medio de cultivo con los tratamientos incluyendo MTT y se agregaron 100 μL de dimetil sulfóxido (DMSO), el cual se dejó incubando durante 4 minutos. Después, las muestras fueron leídas a 570 nm en un lector de microplaca para determinar la absorbancia. (Kumar *et al.*, 2018)

7.8 Análisis estadístico

Se llevará a cabo un análisis estadístico realizando análisis de varianzas (ANOVA) de una vía utilizando el software SPSS Statistics 24 (IBM). Las diferencias se consideran significativas si $P < 0.05$. En caso de que los datos presenten diferencia significativa, se realizará un análisis post-hoc mediante la prueba de Tukey. Si los datos tienen un comportamiento no normal, se utilizará la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

8. RESULTADOS

8.1 Identificación de microorganismos presentes en el consorcio microbiano kéfir

El análisis metagenómico de las muestras de kéfir (Kef) y leche fermentada con kéfir (KefirMlk) permitió caracterizar la composición y diversidad de las comunidades microbianas presentes. Los análisis de diversidad α mostraron diferencias entre ambas muestras en términos de diversidad y distribución de los microorganismos.

El índice Chao1 corresponde a un estimador no paramétrico de riqueza, utilizado para estimar el número de especies presentes en una muestra a partir de la detección de taxones raros, como aquellos observados una o dos veces (Kalamaki & Angelidis, 2020). Este índice mostró que ambas muestras alcanzaron valores similares de riqueza microbiana, cercanos a 7 OTUs, conforme aumentó el número de secuencias analizadas (Figura 1). Las curvas de rarefacción tendieron a una meseta en ambas muestras, indicando que la profundidad de secuenciación fue suficiente para detectar la mayor parte de los taxones presentes. Aunque la muestra Kef presentó un incremento más rápido en las etapas iniciales de secuenciación, ambas muestras exhibieron una riqueza microbiana comparable.

Por otro lado, el índice de Shannon corresponde a una medida de diversidad basada en entropía, la cual considera tanto la riqueza como la distribución relativa de las especies dentro de la comunidad microbiana (Kalamaki & Angelidis, 2020). Este índice presentó valores mayores en KefirMlk en comparación con Kef (Figura 2), lo que indica una comunidad microbiana más diversa y con una distribución más equilibrada de los microorganismos presentes. En contraste, la muestra Kef mostró una menor diversidad, sugiriendo el predominio de pocos taxones dominantes dentro de la comunidad microbiana.

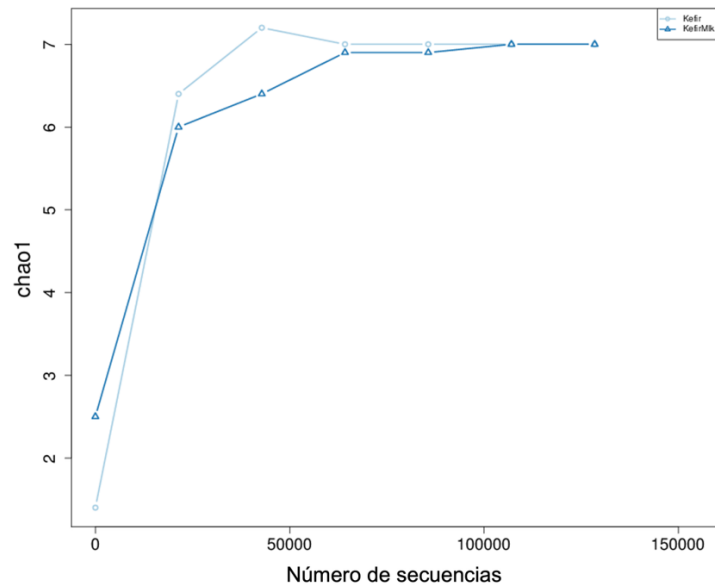


Figura 1. Índice de riqueza Chao1 de las muestras kéfir (Kef) y leche fermentada con kéfir (KefirMlk).

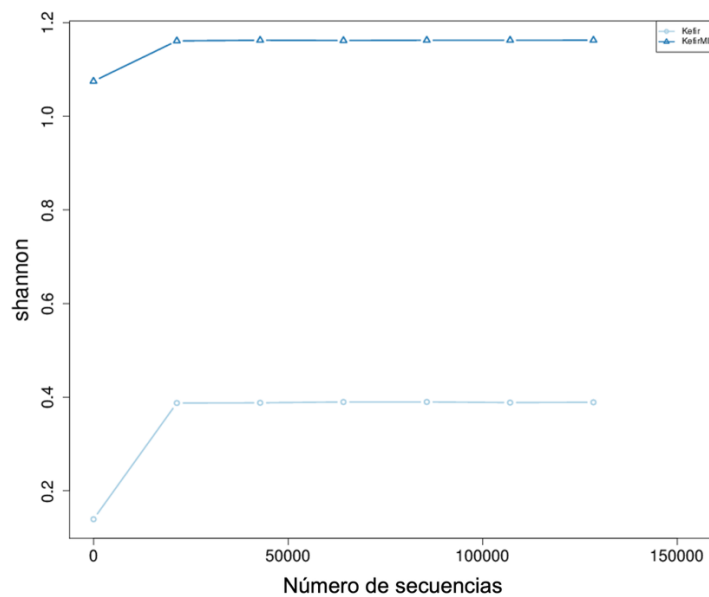


Figura 2. Índice de diversidad Shannon de las muestras kéfir (Kef) y leche fermentada con kéfir (KefirMlk).

A nivel taxonómico, ambas muestras estuvieron dominadas principalmente por bacterias pertenecientes al phylum Firmicutes; sin embargo, la muestra KefirMlk presentó un incremento relativo de Proteobacteria en comparación con Kef (Figura 3). Actinobacteria se detectó únicamente en bajas proporciones en ambas muestras.

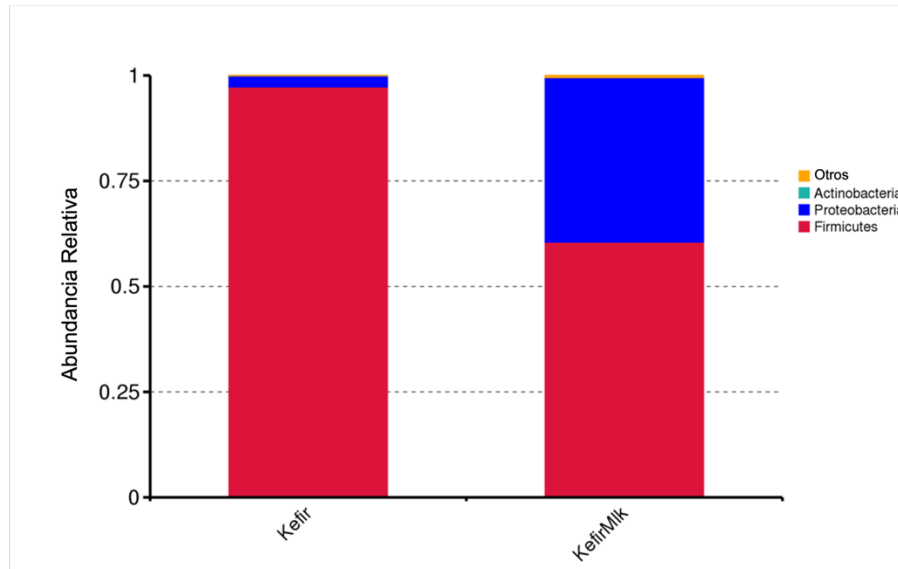


Figura 3. Abundancia relativa de los principales phyla identificados en las muestras Kef y KefirMlk.

El análisis a nivel de género/especie mostró que *Lactobacillus kefiranofaciens* fue el microorganismo predominante en ambas muestras, representando la mayor abundancia relativa en Kef. En contraste, la muestra KefirMlk presentó una disminución relativa de *L. kefiranofaciens* y un incremento en la abundancia de *Acetobacter orientalis*. Adicionalmente, se detectaron en menor proporción *Anoxybacillus flavithermus* y *Cutibacterium acnes* (Figura 4).

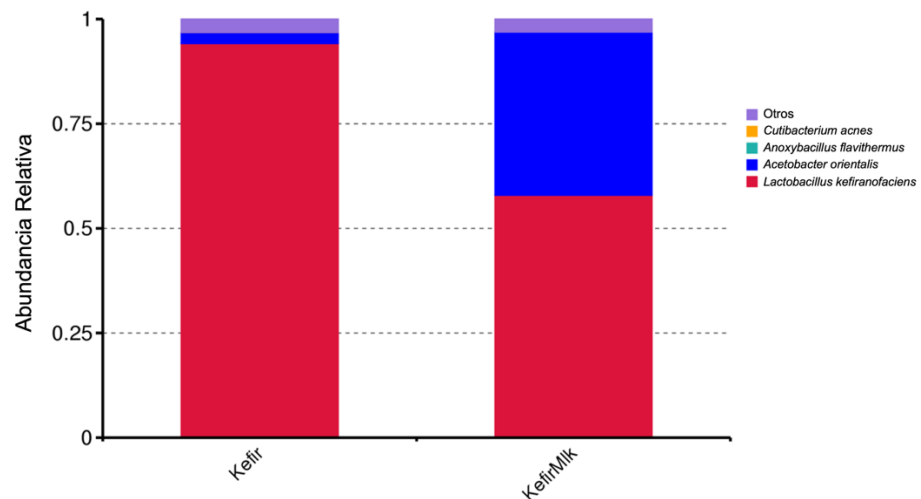


Figura 4. Abundancia relativa de los principales géneros/especies identificados en las muestras Kef y KefirMilk.

8.2 Extracción de kefirán

Para las dos metodologías de extracción utilizadas, el rendimiento de kefirán con el método de extracción a 100 °C (HM) fue de 0.39%. Mientras que el rendimiento utilizando el método de extracción a 50 °C y ultrasonido (UM) fue de 0.61%. El polímero obtenido fue liofilizado y almacenado en un gabinete desecador hasta su uso.

El efecto de estas metodologías fue estudiado previamente, donde se observó que las extracciones de kefirán utilizando los métodos HM y UM dieron un rendimiento de 1.77% y 4.32% de polímero, respectivamente. De igual manera, varios otros autores informaron diferentes métodos de extracción con rendimientos que van desde el 3.65 al 17.17% (Correia *et al.*, 2022).

Sin embargo, los rendimientos de extracción pueden variar dependiendo del área superficial de los granos de kéfir, los solventes utilizados, duración y temperatura de extracción, como también la cantidad de lavados y centrifugación para la purificación. En este caso, otro factor es el tratamiento de ultrasonido, ya que otros autores reportan los tratamientos de ultrasonido con frecuencias que oscilan desde 24 hasta 37 kHz (Becker *et al.*, 2019; Hasheminya & Dehghannya, 2020; Muatasim *et al.*, 2018). Mientras tanto, la frecuencia utilizada en este estudio fue de 50 kHz.

Aunque el rendimiento de extracción fue menor a otros reportados en la literatura, en este proceso los granos de kéfir no se destruyeron, lo cual le dio una ventaja a dicho proceso. En este caso, la morfología macroscópica de los granos de kéfir cambió después de la extracción, ya que los granos se volvieron gelatinosos y perdieron su forma esférica. Sin embargo, la morfología macroscópica de los granos volvió a su forma original después de 2 días de colocarlos en medio fresco.

8.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) de gentamicina

La concentración inhibitoria mínima de gentamicina frente a *S. aureus* BAA-44 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 se determinó con el método de microdilución en caldo. La CMI de gentamicina para *S. aureus* fue de 100 µg/mL y 200 µg/mL para *P. aeruginosa*. La concentración más alta obtenida (200 µg/mL) se aumentó seis veces en las soluciones de

polímero electrohilado. Esto debido a que, en trabajos previos similares, se observó una pérdida de actividad antimicrobiana con el proceso de electrohilado debido al alto voltaje utilizado.

8.4 Condiciones de electrohilado

Conforme al diseño de experimentos, se realizaron las pruebas que se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados con solución SPKS-GA a diferentes condiciones probadas

Prueba	Flujo (mLh ⁻¹)	Distancia (cm)	Voltaje (kV)	Formación de fibras
1	0.5	10	5	No
2	0.5	10	12.5	No
3	0.5	10	20	Sí con perlas
4	1.2	10	5	No
5	1.2	10	12.5	No
6	1.2	10	20	Sí con perlas
7	2.0	10	5	No
8	2.0	10	12.5	No
9	2.0	10	20	Sí con perlas
10	0.1	20	22	Sí
11	0.2	20	22	Sí con perlas
12	0.3	20	22	Sí con perlas

En dichos experimentos, se pudo obtener fibras mediante el método de electrohilado con las condiciones de 0.5 mLh⁻¹ de flujo, 12.5 kV y 10 cm entre aguja y colector, 1.2 mLh⁻¹, 20 kV y 10 cm entre aguja-colector, 2.0 mLh⁻¹, 12.5 kV y 10 cm entre aguja-colector, así como 2.0 mLh⁻¹, 20 kV y 10 cm entre aguja-colector. De estos experimentos mencionados anteriormente, a pesar de que hubo colección de fibras, lo cual se corroboró con microscopía óptica, hubo una presencia de perlas muy abundante, y esto se le atribuyó al flujo y la distancia utilizadas, por lo que se realizaron pruebas posteriores utilizando una distancia fija de 20 cm y un voltaje fijo de 22 kV, variando el flujo de 0.1 a 0.3 mLh⁻¹, los cuales son indicados como experimentos 10-12 en la Tabla 1. De los últimos 3 experimentos mencionados, el que presentó fibras con una poca cantidad de perlas presentes fue el flujo de 0.1 mLh⁻¹.

8.5 Caracterización fisicoquímica de las membranas

8.5.1 Morfología de las fibras

Como se puede observar en las Figuras 5-7, la morfología de las membranas MP, MPKS y MPKS-GA indicó un proceso de electrohilado adecuado, ya que no había presencia de “perlas” o cúmulos de solución en las mismas fibras.

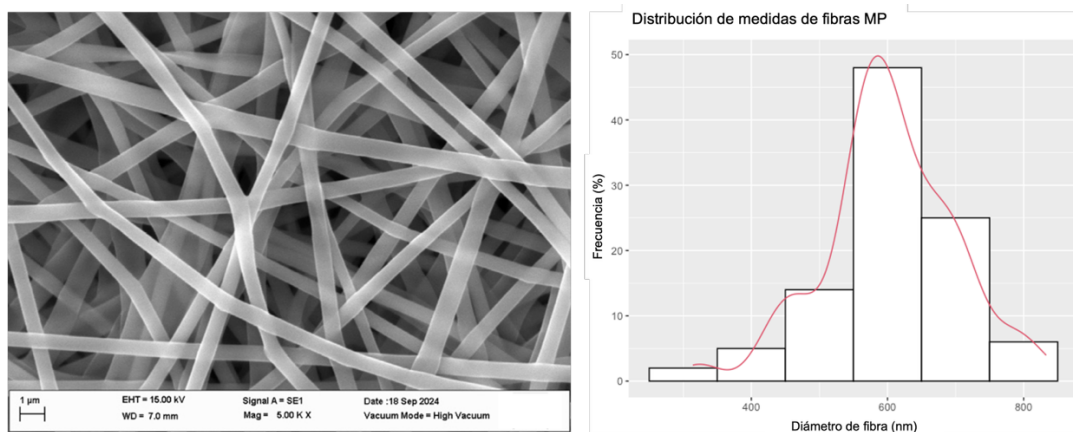


Figura 5. Morfología de fibras de MP a 5,000 aumentos y distribución de diámetro de fibras

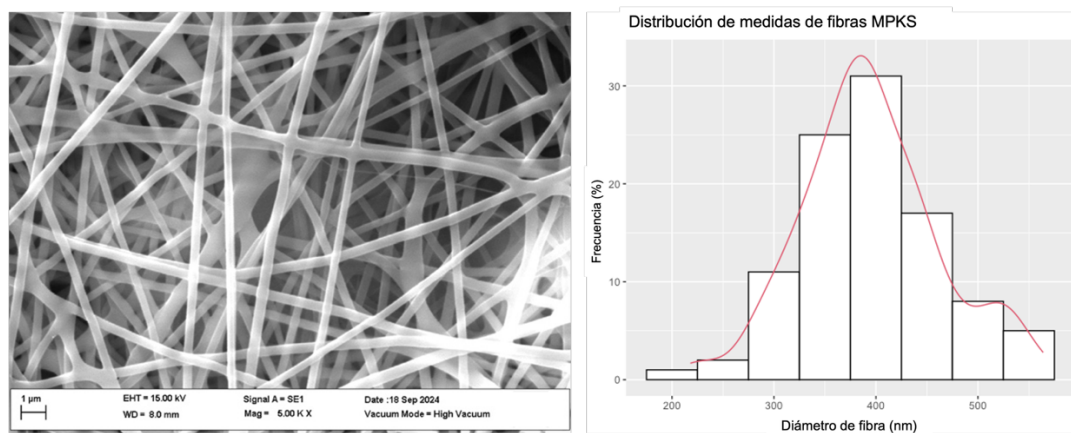


Figura 6. Morfología de fibras de MPKS a 5,000 aumentos y distribución de diámetro de fibras

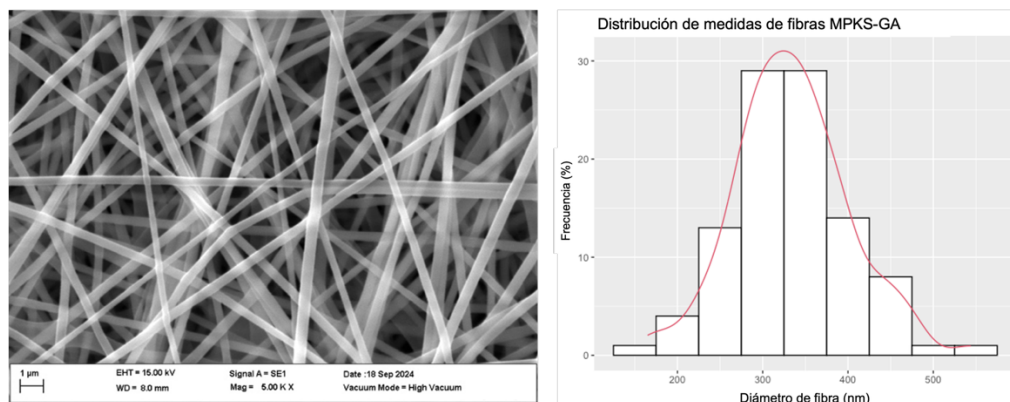


Figura 7. Morfología de fibras de MPKS-GA a 5,000 aumentos y distribución de diámetro de fibras

El grosor de las fibras de MP fue de 603 ± 97 nm, mientras que el grosor de las fibras de MPKS fue de 394 ± 68 nm. Sin embargo, las fibras que tuvieron menor grosor fueron las de MPKS-GA con diámetro de 334 ± 67 nm.

8.5.2 Hidrofilicidad de las fibras

El análisis de ángulo de contacto se determinó para ver la hidrofilicidad o hidrofobicidad de las membranas electrohiladas. El ángulo de MP fue de $89.9 \pm 28.61^\circ$ de lado izquierdo y $89.76 \pm 28.47^\circ$ del lado derecho. La MPKS tuvo un ángulo de $88.12 \pm 8.76^\circ$ de lado izquierdo y $88.12 \pm 8.76^\circ$ de lado derecho. Finalmente, el ángulo de las membranas MPKS-GA fue de $53.61 \pm 6.64^\circ$ del lado izquierdo y $53.64 \pm 6.83^\circ$ del lado derecho. Estos ángulos pueden observarse en las Figura 8.

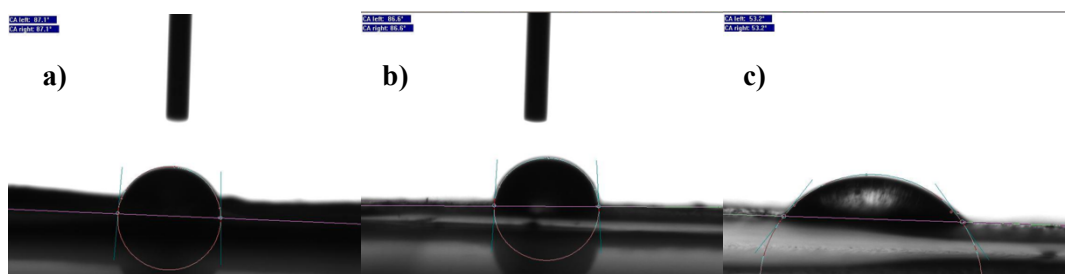


Figura 8. Ángulo de contacto de membrana a) MP, b) MPKS y c) MPKS-GA

8.5.3 Análisis por espectroscopía infrarroja

Los espectros FTIR de las membranas MP, MPKS y MPKS-GA (Figura 9) mostraron diferencias que pueden ser atribuidas a la incorporación de los polisacáridos y de los compuestos bioactivos.

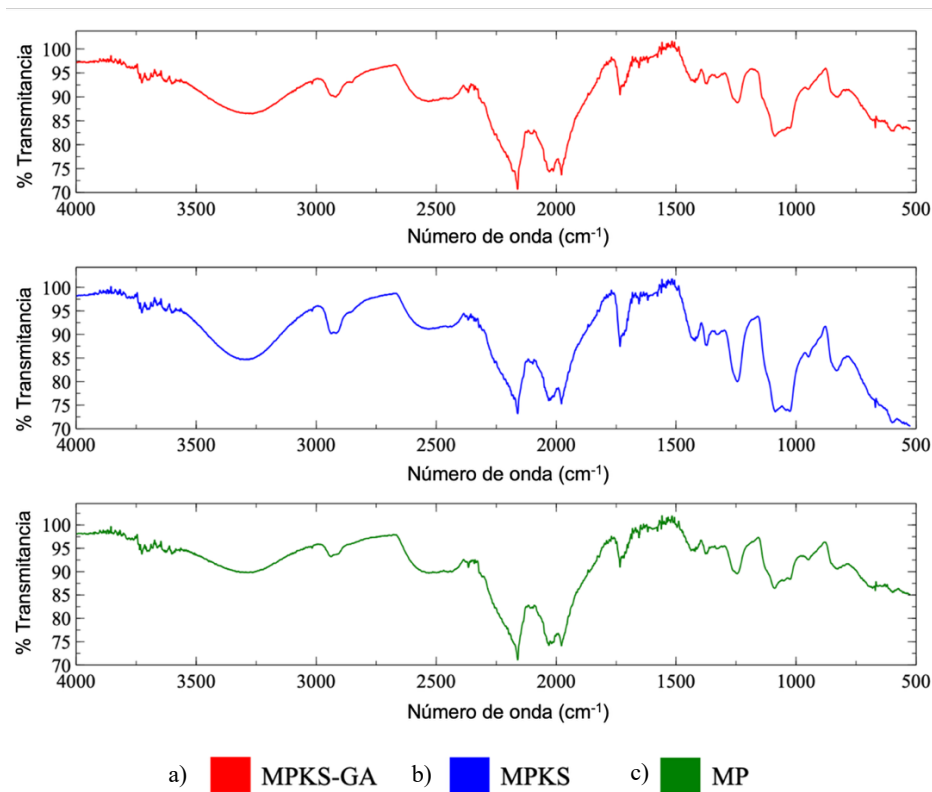


Figura 9. Espectro FTIR de a) MPKS-GA (rojo), b) MPKS (azul) y MP (verde)

En la muestra MP se identificó una banda ancha en la región 3200–3400 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de los grupos hidroxilo ($-\text{OH}$), característica del PVA y asociada a enlaces de hidrógeno. También se observaron señales alrededor de $\sim 2900 \text{ cm}^{-1}$ atribuibles al estiramiento C–H y bandas en la región 1000–1200 cm^{-1} correspondientes a vibraciones C–O y C–O–C del esqueleto polimérico.

En la muestra MPKS se mantuvo la banda ancha de $-\text{OH}$, con ligeras variaciones en su intensidad y forma respecto a MP. Asimismo, se observó un incremento en la intensidad de las bandas en la región 1000–1100 cm^{-1} , asociadas a vibraciones C–O–C características de enlaces glucosídicos, confirmando la incorporación del kefirán y del schizophyllan en la matriz de PVA.

Por su parte, la membrana MPKS-GA presentó cambios adicionales en comparación con MPKS. Se observaron modificaciones en la región 1600–1750 cm^{-1} , asociadas a vibraciones de grupos carbonilo (C=O) y/o amida, así como variaciones en la intensidad de la banda –OH y en la región 1000–1200 cm^{-1} . Estas diferencias indican la presencia e interacción de la gentamicina y el ácido ascórbico dentro de la matriz polimérica.

8.6 Actividad antimicrobiana de las membranas

Se investigó la actividad antimicrobiana de las membranas elaboradas frente a *S. aureus* BAA-44 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer.

En el caso de *S. aureus*, MPKS-GA no tuvo efecto antimicrobiano, sin embargo, este tratamiento sí presentó halos de inhibición sobre *P. aeruginosa* de 16.4 ± 2.2 mm.

Para ambos microorganismos, MP, MPKS, SP y SPKS no tuvieron efecto antimicrobiano. Sin embargo, para *S. aureus*, los tratamientos SPKS-GA presentaron halos de inhibición de 5.3 ± 4 mm. De igual forma, para *P. aeruginosa*, los tratamientos SPKS-GA presentaron halos de inhibición de 27.2 ± 0.6 mm. Estos halos de inhibición se pueden observar en la Figura 10.

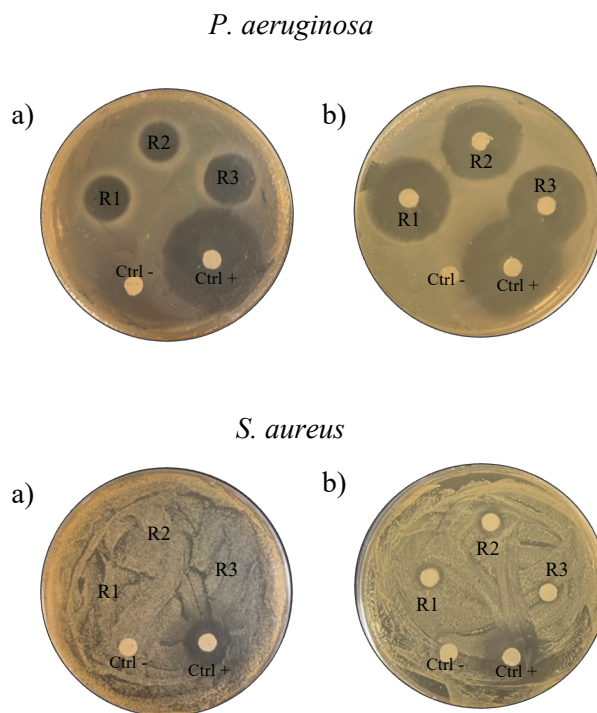


Figura 10. Halos de inhibición presentados por a) MPKS-GA y b) SPKS-GA contra *P. aeruginosa* y *S. aureus*

Se analizó la influencia del tipo de microorganismo (*S. aureus* y *P. aeruginosa*) y tipo de tratamiento (MPKS-GA, MPKS, MP, SPKS-GA, SPKS y SP) sobre la actividad antimicrobiana mediante un ANOVA de una vía. Los resultados mostraron que sí existe diferencia significativa entre el diámetro de los halos de inhibición debido al tipo de microorganismo ($F_{1,107} = 280.722$, $P < 0.01$), el tipo de tratamiento ($F_{6,107} = 122.974$, $P < 0.01$) y la interacción entre ambos factores ($F_{6,107} = 33.871$, $P < 0.01$).

8.7 Evaluación de citotoxicidad de las membranas

En la Figura 11 se puede observar el efecto de las membranas en la viabilidad celular de la línea HDFn a partir de las 24 h. Se puede apreciar un incremento significativo en las células HDFn tras la exposición a una membrana completa de MPKS, todos los tratamientos con la membrana MPKS-GA indujeron un incremento significativo en la viabilidad celular, por lo que no se observó citotoxicidad en respuesta a ninguna membrana.

Ensayo de Viabilidad en Células HDFn a 24h

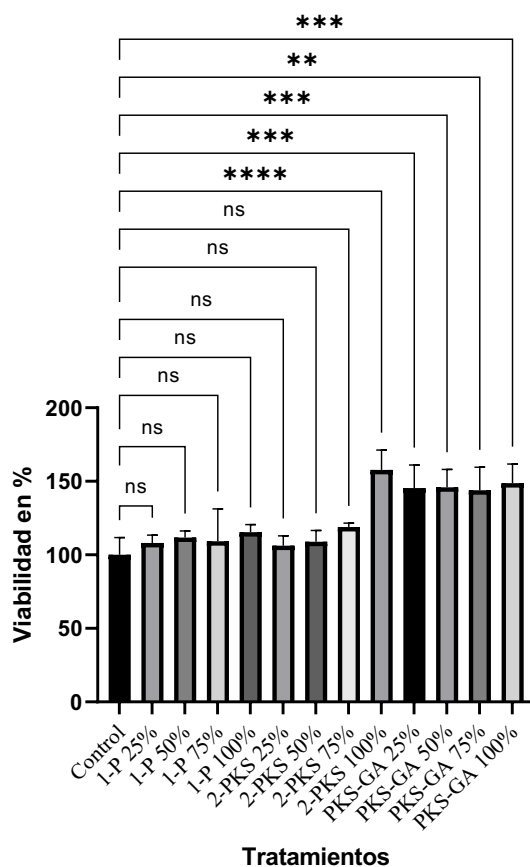


Figura 11. Efecto de MP, MPKS y MPKS-GA en la viabilidad celular de la línea HDFn a 24 h. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA seguido de la prueba post hoc de Tukey ($P < 0.05$), “ns” indica una diferencia no significativa.

En la Figura 12 se puede observar el efecto de las membranas en la viabilidad celular de la línea HDFn a partir de las 48 h, donde ningún tratamiento demostró tener un efecto significativo en las células HDFn tras este tiempo de exposición.

Ensayo de Viabilidad en Células HDFn a 48h

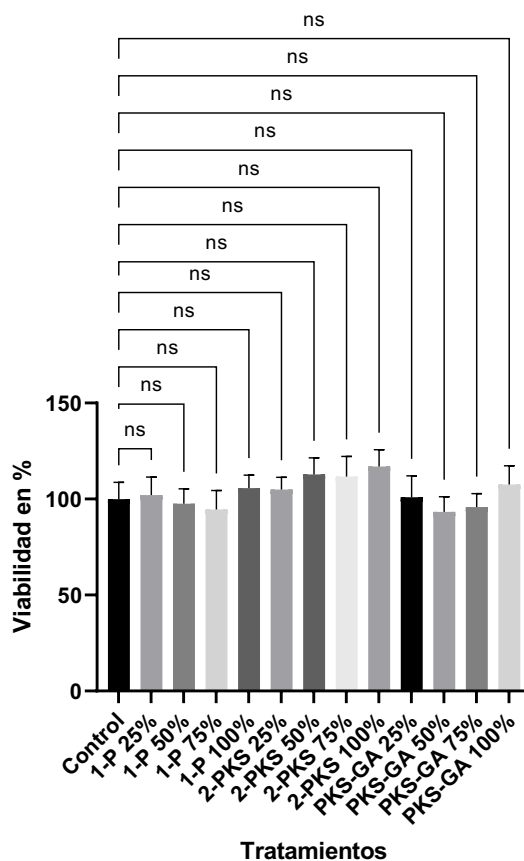


Figura 12. Efecto de MP, MPKS y MPKS-GA en la viabilidad celular de la línea HDFn a 48 h. Se realizó análisis estadístico de los resultados mediante ANOVA seguido de la prueba post hoc de Tukey ($P < 0.05$), “ns” indica una diferencia no significativa.

En la Figura 13 se puede observar el efecto de las membranas en la viabilidad celular de la línea HDFn a partir de las 72 h. Con los tratamientos utilizados, se pudo observar que las membranas MP tienen efecto de incremento en la viabilidad celular cuando se utilizan $\frac{3}{4}$ de membrana y la membrana completa durante 72 horas. De igual manera, este efecto se presenta en las membranas MPKS cuando se utiliza $\frac{1}{2}$ de membrana. Finalmente, el tratamiento con la MPKS-GA incrementó de forma significativa la viabilidad celular de la línea HDFn en todas las concentraciones probadas.

Ensayo de Viabilidad en Células HDFn a 72h

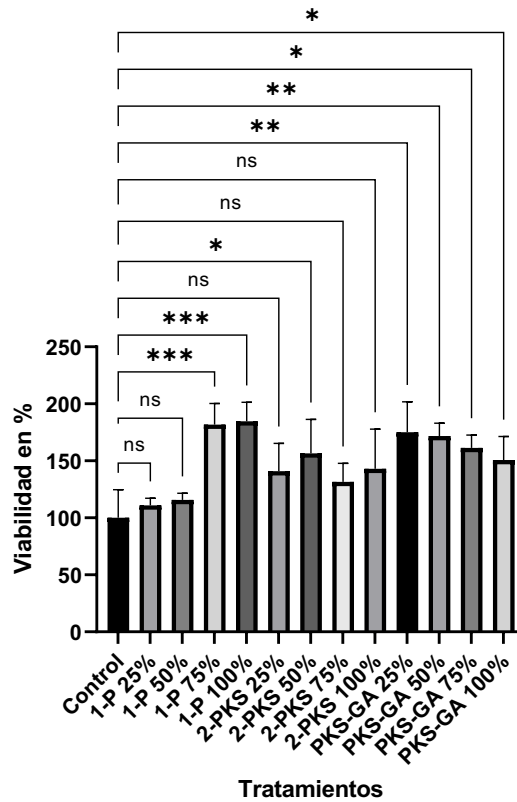


Figura 13. Efecto de MP, MPKS y MPKS-GA en la viabilidad celular de la línea HDFn a 72 h. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante ANOVA seguido de la prueba post hoc de Tukey ($P < 0.05$), “ns” indica una diferencia no significativa.

9. DISCUSIÓN

9.1 Identificación de microorganismos presentes en el consorcio microbiano kéfir

Los resultados obtenidos confirman que las muestras analizadas presentan una microbiota característica de sistemas fermentativos de kéfir, dominada principalmente por bacterias ácido-lácticas pertenecientes al phylum Firmicutes (Figura 3). La predominancia de este grupo microbiano ha sido ampliamente reportada en fermentaciones tradicionales de kéfir (Chen et al., 2008; Kalamaki & Angelidis, 2020; Sumarmono *et al.*, 2023) debido a su participación en la producción de ácido láctico, metabolitos bioactivos y polisacáridos extracelulares asociados con propiedades funcionales y biotecnológicas (Liu *et al.*, 2015).

La elevada abundancia relativa de *Lactobacillus kefiranofaciens* observada en ambas muestras (Figura 4) es particularmente relevante, ya que esta especie ha sido descrita como uno de los principales microorganismos productores de kefirán (González-Orozco *et al.*, 2023; Kalamaki & Angelidis, 2020; Nejati *et al.*, 2020; Radhouani *et al.*, 2018; Sumarmono *et al.*, 2023), un exopolisacárido relacionado con propiedades antimicrobianas, antioxidantes e inmunomoduladoras. La mayor abundancia de *L. kefiranofaciens* en la muestra Kef sugiere que los granos de kéfir conservan una comunidad microbiana más especializada y dominada por bacterias ácido-lácticas productoras de polisacáridos.

Por otro lado, el incremento relativo de Proteobacteria y de *Acetobacter orientalis* en KefirMlk (Figuras 3 y 4) indica una mayor participación de bacterias acéticas durante la fermentación en leche. Estas bacterias participan en la oxidación de metabolitos generados por otros miembros de la comunidad microbiana, contribuyendo al equilibrio ecológico del sistema fermentativo y a la formación de compuestos asociados con las propiedades organolépticas y funcionales del kéfir (Han *et al.*, 2018; Nejati *et al.*, 2020; Plessas *et al.*, 2017).

El análisis de diversidad α mostró diferencias importantes entre riqueza y diversidad microbiana en ambas muestras (Figuras 1 y 2). Los valores del índice Chao1 alcanzaron una meseta similar en Kef y KefirMlk, indicando que ambas muestras presentan una riqueza microbiana comparable y que la profundidad de secuenciación fue suficiente para detectar la mayor parte de los taxones presentes. Sin embargo, el índice de Shannon fue considerablemente mayor en KefirMlk, lo que sugiere una comunidad microbiana más diversa y con una distribución más equilibrada de los microorganismos. En contraste, la muestra Kef presentó una menor diversidad, posiblemente asociada con el predominio de unos pocos taxones dominantes, principalmente bacterias ácido-lácticas productoras de kefirán.

Estos resultados sugieren que el medio lácteo favorece interacciones microbianas más complejas entre bacterias ácido-lácticas y bacterias acéticas, promoviendo una comunidad más heterogénea durante la fermentación. La coexistencia de diferentes grupos

microbianos dentro del sistema fermentativo es de especial interés debido a su posible contribución a la producción de metabolitos bioactivos con potencial biotecnológico.

9.2 Extracción de kefirán

Los rendimientos de extracción pueden variar en función de la superficie de los granos de kéfir, los disolventes utilizados, la duración y la temperatura de la extracción, así como la cantidad de lavado y centrifugación para la purificación. En este caso, otro factor es el tratamiento con ultrasonidos, ya que otros autores informan de tratamientos con ultrasonidos con frecuencias que van desde los 24 a los 37 kHz (Becker *et al.*, 2019; Hasheminya & Dehghannya, 2020; Muatasim *et al.*, 2018). Mientras tanto, la frecuencia utilizada en este estudio fue de 50 kHz.

Se ha descubierto que diferentes condiciones de ultrasonificación pueden afectar la cantidad de rendimiento de extracción de polisacáridos (Muatasim *et al.*, 2018), sin embargo, el mecanismo por el cual esto ocurre aún no se ha dilucidado.

Aunque el rendimiento de extracción fue menor a otros reportados en la literatura, en este proceso los granos de kéfir no se destruyeron. Esto le dio una ventaja a dicho proceso ya que, a pesar que la morfología macroscópica de los granos de kéfir cambió después de la extracción, donde los granos se volvieron gelatinosos y perdieron su forma esférica, estos volvieron a su forma original después de 2 días de colocarlos en medio fresco. Esto minimiza el consumo de granos de kéfir, lo que facilita la realización de extracciones incluso cuando se cuenta con biomasa limitada.

9.3 Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI)

Según el perfil de susceptibilidad proporcionado para *S. aureus* BAA-44, se trata de una cepa de MRSA, que también se incluye como resistente a la gentamicina. La concentración mínima inhibitoria de gentamicina fue estudiada para esta cepa, donde una concentración de 150 μ M de gentamicina no inhibió el crecimiento de *S. aureus* a menos que se le agregara un compuesto de 2-aminoimidazol. Esta mezcla tuvo un efecto sinérgico que permitió la inhibición de esta cepa (Rogers *et al.*, 2010).

De manera similar, en otro estudio informaron una concentración de 0.002 mg/mL de gentamicina para inhibir el crecimiento de *S. aureus* ATCC 12600 utilizando un sistema de administración de microesferas de PLA cargadas con gentamicina (Sabee *et al.*, 2019). Sin embargo, cabe señalar que esta última cepa mencionada no es un MRSA. En otra investigación, observaron el efecto de la gentamicina en otra cepa de MRSA (*S. aureus* ATCC 43300) y obtuvieron una CMI de 1 mgmL⁻¹ para la inhibición de esta cepa (Al-Shuneigat *et al.*, 2020).

Por otro lado, varios otros autores informaron una CMI de gentamicina para la inhibición del crecimiento de *P. aeruginosa* ATCC 27853 que oscila entre 0.031 µgmL⁻¹ (Pourmoslemi *et al.*, 2021) y 0.500 mgmL⁻¹ (Al-Shuneigat *et al.*, 2020).

9.4 Condiciones de electrohilado

Las condiciones de electrohilado óptimas determinadas fueron 0.1 mLh⁻¹, 22 kV y 20 cm de distancia aguja-colector. Esto nos permitió obtener fibras con una morfología deseada.

En diversos estudios se encontraron soluciones formadoras de composición parecida, sin embargo, los componentes de las soluciones afectan las condiciones de electrohilado. Podemos observar un ejemplo donde se utiliza kefirán, en una investigación donde elaboraron membranas electrohiladas de fibras tipo core-shell de ácido poliláctico con el biopolímero anteriormente mencionado al 1%. Para obtener fibras con la morfología deseada, utilizaron las condiciones de el proceso de electrohilado se llevó a cabo utilizando los siguientes parámetros: flujo de 1 mLh⁻¹; distancia entre la punta de la aguja y el colector de 13 cm, voltaje suministrado de 15 kV, temperatura de 25 °C y humedad relativa de 40% (Lopresti *et al.*, 2021).

Más específicamente, un estudio realizó membranas electrohiladas con PVA y kefirán, donde se prepararon soluciones con los polímeros anteriores al 8% y 6% p/p, respectivamente. El kefirán se mezcló con la solución de PVA en diferentes proporciones: 70:30, 60:40, 50:50, 40:60 y 30:70. Sin embargo, se obtuvieron nanofibras con morfología deseada en la mezcla 40:60. Para esto, se utilizaron las condiciones de 1 mLh⁻¹, 20 cm entre aguja-colector y 18 kV de voltaje (Ziyadi *et al.*, 2021).

Por otro lado, en un estudio realizado en 2019 donde se hizo una mezcla de PVA al 10% y schizophyllan al 1.5% para obtener fibras electrohiladas, se utilizaron los parámetros de 0.3 mLh⁻¹ de flujo, 15 cm de distancia entre aguja-colector y 27 kV de voltaje aplicado (Safae-Ardakani *et al.*, 2019).

Basándonos en los estudios anteriormente mencionados, podemos observar que las condiciones óptimas obtenidas en esta investigación están en un rango comparable. Igualmente, considerando que en la mayoría de los estudios se utilizan concentraciones mayores de PVA (hasta un 10%) como polímero guía, esto debido a que es un polímero que cuenta con las características necesarias para un proceso adecuado de electrohilado, el presente estudio utiliza una concentración menor del 8%. Esto, aparte de ser efectivo en cuanto a costos, asegura que los polímeros naturales utilizados estén presente en mayor cantidad del material obtenido. De igual manera, el flujo utilizado fue más bajo que los reportados en literatura, lo que reduce aún más los costos por la obtención de la membrana electrohilada, haciéndolo una buena alternativa a apósitos funcionalizados del mercado.

Considerando los costos de materias primas, medios de cultivo, solventes utilizados durante la extracción, consumibles y el consumo eléctrico asociado al uso de equipos de laboratorio y al proceso de electrohilado, se estimó que el costo de producción de cada membrana electrohilada fue aproximadamente de MX\$4–5 por unidad. Este valor es considerablemente menor en comparación con los apósitos bioactivos comerciales disponibles actualmente en el mercado, cuyos costos pueden variar desde cientos hasta miles de pesos mexicanos dependiendo de su composición y funcionalidad. Estos resultados sugieren que la membrana desarrollada representa una alternativa prometedora y económicamente accesible para aplicaciones futuras en el tratamiento y cuidado de heridas.

9.5 Caracterización fisicoquímica de las membranas

9.5.1 Morfología de las fibras

Las fibras electrohiladas obtenidas tuvieron una morfología homogénea y sin presencia de perlas. La diferencia en los componentes de las soluciones poliméricas utilizadas influyó en el tamaño de fibra obtenidos, ya que las fibras MPKS-GA fueron las que menor diámetro obtuvieron, teniendo un tamaño 1.8 veces menor a las del

control MP. Esto se puede atribuir a la adición del antioxidante, ya que se ha reportado en literatura que la adición de ácido ascórbico a soluciones poliméricas disminuye el diámetro de fibra al pasar por el proceso de electrohilado. En un trabajo donde se elaboraron membranas electrohiladas con poli(ácido L-láctico)-co-poli-(ϵ -caprolactona), fibroína de seda, hidrocloreuro de tetraciclina y ácido ascórbico, se pudo reducir el tamaño de fibra de 315 ± 45 nm en la formulación que no tenía ácido ascórbico, hasta 265 ± 97 nm en la formulación que sí incluía el antioxidante (Sridhar *et al.*, 2015).

De igual manera, las fibras de MPKS obtenidas tienen un diámetro comparable o más pequeño a las de composición similar reportadas en literatura. En un estudio, obtuvieron fibras de PVA y kefirán con un diámetro desde 305 ± 35 hasta 766 ± 43 nm (Ziyadi *et al.*, 2021). De igual manera, en otra investigación se obtuvieron fibras de PVA y schizophyllan con diámetros desde 353 ± 84 hasta 589 ± 84 nm (Safae-Ardakani *et al.*, 2019). Esto puede deberse a que se realizó un diseño de experimentos que ayudó a encontrar mejores parámetros de electrohilado para los componentes presentes.

9.5.2 Hidrofilicidad de las fibras

La naturaleza hidrofílica obtenida de las membranas era algo esperado debido a los componentes de la misma. En otros estudios donde han determinado ángulo de contacto de fibras con componentes similares, se han obtenido ángulos que describen fibras hidrofílicas. Por ejemplo, en un estudio donde se realizaron fibras de poliacrilonitrilo/kefirán, se obtuvo un ángulo de contacto de $12.3^\circ \pm 1.13^\circ$ (Jenab *et al.*, 2020).

De igual manera, en varios estudios donde se utilizó PVA como componente en las membranas electrohiladas, se obtuvieron ángulos de contacto menores a 50° , lo que indica una naturaleza hidrofílica (Razmgar *et al.*, 2019; Tahir *et al.*, 2023).

Asimismo, la reducción aún mayor del ángulo de contacto que presentaron las membranas que tenían el antibiótico y antioxidante en su composición, puede deberse en su mayoría al ácido ascórbico. Esto se puede observar en estudios donde se reportó

que la incorporación de ácido ascórbico en estructuras electrohiladas basadas en ácido poliláctico y fibroína de seda resultó en una mayor hidrofilicidad, esto relacionado a una disminución en el ángulo de contacto (Sridhar *et al.*, 2015).

La interacción entre el ácido ascórbico y la matriz polimérica puede conducir a una estructura de superficie más compleja, que puede influir aún más en el ángulo de contacto. Por ejemplo, la rugosidad de las fibras electrohiladas puede mejorar la hidrofobicidad cuando se trata o modifica la superficie, pero en el caso del ácido ascórbico, es probable que la superficie resultante sea más hidrofílica debido a la naturaleza polar del compuesto.

El hecho de que haya habido un aumento en la hidrofilicidad no es algo que necesariamente se vea como desventaja, debido a que la afinidad de la membrana por el agua en cierta medida es esencial para promover la adhesión y proliferación celular en aplicaciones biomédicas.

9.5.3 Análisis por espectroscopía infrarroja

Las variaciones observadas en los espectros FTIR sugieren la formación de un sistema polimérico multicomponente con interacciones entre los diferentes constituyentes de la membrana. En la muestra MPKS, los cambios en la forma e intensidad de la banda ancha correspondiente a los grupos hidroxilo (-OH) respecto a MP indican posibles interacciones por puente de hidrógeno entre el PVA y los polisacáridos kefirán y schizophyllan, lo que favorece la compatibilidad entre los componentes de la matriz. Asimismo, el incremento observado en la región de $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ se asocia con vibraciones C-O-C características de enlaces glucosídicos presentes en ambos polisacáridos (Correia *et al.*, 2022; Pop *et al.*, 2021).

En la membrana MPKS-GA se observaron modificaciones adicionales en la región de $1600\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$, atribuibles a grupos carbonilo relacionados con el ácido ascórbico y a señales asociadas con grupos funcionales presentes en la gentamicina. De igual manera, las variaciones en la banda de -OH sugieren la presencia de interacciones intermoleculares entre los compuestos bioactivos y la matriz polimérica, principalmente mediante enlaces de hidrógeno. Los cambios observados

en los espectros probablemente se relacionan con interacciones físicas entre los componentes más que con la formación de nuevos enlaces covalentes.

En conjunto, estos resultados confirman la incorporación de los polisacáridos y de los agentes bioactivos dentro de la matriz de PVA, así como la existencia de interacciones entre sus componentes, las cuales podrían influir en propiedades como el hinchamiento, la estabilidad estructural y el comportamiento de liberación de los compuestos activos.

9.6 Actividad antimicrobiana de las membranas

En cuanto a las nanofibras, varios estudios reportan el uso de diferentes polímeros cargados con gentamicina para la liberación de fármacos y su efecto sobre los microorganismos mencionados anteriormente. En un trabajo similar, se reportó (Cesur et al., 2023) un andamio compuesto de PVA 13%/Gelatina 0.5%/Gentamicina 0.5% en peso. Obtuvieron halos de inhibición del crecimiento de 16 mm para *S. aureus* y 26 mm para *P. aeruginosa* (Cesur et al., 2023).

Hasta donde sabemos, no existe información en la literatura respecto a la elaboración de un andamio compuesto de PVA/Kefirán/Schizophyllan, lo que convierte a esta construcción en un material novedoso para la liberación de fármacos, como lo demuestran los resultados mencionados.

9.7 Evaluación de citotoxicidad de las membranas

La exposición de las células HDFn a las membranas durante 24, 48 y 72 horas no mostró un efecto citotóxico, por el contrario, en algunos casos se observó un incremento en la viabilidad celular de forma altamente significativa. Esto pudo deberse a las características individuales de los componentes presentes en la membrana electrohilada.

Varios estudios en la literaturan indican que el kefirán podría mejorar la adhesión y proliferación de células, lo cual es vital para aplicaciones de ingeniería de tejidos (Radhouani et al., 2018). Esto sugiere que el kefirán no solo puede proteger a las células HDFn del daño oxidativo, sino que también promueve activamente su crecimiento y función, lo que lo convierte en un candidato prometedor para aplicaciones en medicina

regenerativa. En otro estudio, se exploró la combinación del pretratamiento con plasma y el recubrimiento con kefirán sobre estructuras electrohiladas de PLA (ácido poliláctico) puede aumentar la adhesión y proliferación de células fibroblastos y la producción de colágeno (Lopresti *et al.*, 2021).

De igual manera, las características estructurales del schizophyllan, como su conformación de triple hélice, pueden contribuir a su actividad biológica. En un estudio exploraron las propiedades moleculares del biopolímero y sugirieron que su estructura única podría desempeñar un papel en su interacción con las células, influyendo potencialmente en su comportamiento. Este aspecto estructural puede mejorar su eficacia en la promoción de las actividades de los fibroblastos, incluida la síntesis de colágeno, que es vital para la integridad y reparación de la piel (Yoshida *et al.*, 2002). En otra investigación, incorporaron schizophyllan a nanofibras de alcohol polivinílico (PVA), promueve significativamente la proliferación y migración de fibroblastos. El estudio descubrió que las membranas de schizophyllan/PVA, particularmente en una relación de volumen de 20:80, proporcionaron un entorno adecuado para el crecimiento de fibroblastos, lo que los convierte en materiales prometedores para aplicaciones de curación de heridas (Safae-Ardakani *et al.*, 2019). Esto sugiere que el schizophyllan puede mejorar las capacidades funcionales de los fibroblastos, que son fundamentales para la reparación eficaz de los tejidos.

10. CONCLUSIONES

La fermentación de granos de kéfir en leche entera a 25 °C durante 48 h permitió obtener las condiciones óptimas para la producción de biomasa, identificándose un consorcio microbiano dominado por bacterias Gram positivas, principalmente *Lactobacillus kefiranofaciens*. Asimismo, el método de extracción asistida por ultrasonido (UM) resultó ser el más eficiente para la obtención de kefirán, alcanzando un rendimiento de 4.32%.

Se desarrollaron exitosamente membranas electrohiladas de PVA/kefirán/schizophyllan cargadas con gentamicina y ácido ascórbico, obteniéndose fibras homogéneas y libres de perlas bajo condiciones optimizadas de electrohilado. La incorporación de los compuestos bioactivos favoreció la formación de fibras de menor diámetro y mantuvo propiedades fisicoquímicas adecuadas para su potencial aplicación biomédica.

Las membranas desarrolladas presentaron actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y promovieron significativamente la viabilidad de fibroblastos humanos HDFn sin efectos citotóxicos. En conjunto, estos resultados demuestran el potencial de las membranas electrohiladas de PVA/kefirán/schizophyllan cargadas con gentamicina y ácido ascórbico como una alternativa prometedora para aplicaciones biomédicas como en apósitos para heridas en piel.

11. PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos, se obtuvo un material con potencial aplicación para uso en heridas en piel. Sin embargo, es necesario explorar la escalabilidad del proceso de electrohilado y la producción de kefirán en condiciones industriales.

La homogeneidad y morfología obtenida de las fibras observadas en SEM fueron adecuadas, pero sería relevante evaluar sus propiedades mecánicas, como resistencia al corte y elasticidad, para determinar su utilidad en escenarios clínicos específicos.

La disminución del ángulo de contacto en las membranas sugiere una mejora en la hidrofiliidad, lo cual es favorable para aplicaciones en tejidos húmedos. Sin embargo, se podría evaluar su comportamiento en condiciones fisiológicas más complejas, como simulaciones de fluidos corporales.

El que las membranas solo presentaran actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa* destaca la necesidad de investigar estrategias para ampliar su espectro antimicrobiano. Esto podría lograrse mediante la adición de otros agentes activos o incluso la optimización de las concentraciones de gentamicina para que no haya pérdida de actividad después del proceso de electrohilado.

Finalmente, aunque los resultados *in vitro* son prometedores, sería esencial avanzar hacia estudios *in vivo* para confirmar la seguridad y eficacia de las membranas en modelos animales, estableciendo un fundamento más confiable para su eventual aplicación en tratamientos clínicos en humanos.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Shuneigat, J. M., Al-Sarayreh, S. A., Al-Qudah, M. A., & Al-Saraireh, Y. M. (2020). Antibacterial and antibiofilm activity of essential oil of *Achillea biebersteinii* and its mode of action. *Journal of Pharmacy and Pharmacognosy Research*, 8(2), 155–166.
- Álvarez-Ainza, M. L., Fong-Coronado, P. A., Ruiz-Bustos, E., Castellón-Campaña, L. G., Quintero-Reyes, I. E., Duarte-Zambrano, L. A., & Bolado-Martínez, E. (2024). Antibiotic resistance of ESKAPE group-microorganisms in health institutions from Hermosillo and Ciudad Obregón, Sonora, México. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14(March), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1348093>
- Ambekar, R. S., & Kandasubramanian, B. (2019). Progress in the Advancement of Porous Biopolymer Scaffold: Tissue Engineering Application. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 58(16), 6163–6194. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.8b05334>
- Aramwit, P. (2016). Wound Healing Biomaterials Volume 2: Functional Biomaterials. In *Wound Healing Biomaterials Volume 2: Functional Biomaterials* (pp. 3–12). <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-456-7.00023-4>
- Ardekani, N. T., Khorram, M., Zomorodian, K., Yazdanpanah, S., Veisi, H., & Veisi, H. (2019). Evaluation of electrospun poly (vinyl alcohol)-based nanofiber mats incorporated with *Zataria multiflora* essential oil as potential wound dressing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 125, 743–750. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.085>
- Arias Flores, R., Rosado Quiab, U., Vargas Valerio, A., & Grajales Muñoz, C. (2016). Los microorganismos causantes de infecciones nosocomiales en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 54(1), 20–24.
- Avizheh, L., Peirouvi, T., Diba, K., & Fathi-Azarbayjani, A. (2019). Electrospun wound dressing as a promising tool for the therapeutic delivery of ascorbic acid and caffeine. *Therapeutic Delivery*, 10(12), 757–767. <https://doi.org/10.4155/tde-2019-0059>

- Ayobami, O., Brinkwirth, S., Eckmanns, T., & Markwart, R. (2022). Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Emerging Microbes and Infections*, 11(1), 443–451. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2030196>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Baranwal, J., Barse, B., Fais, A., Delogu, G. L., & Kumar, A. (2022). Biopolymer: A Sustainable Material for Food and Medical Applications. *Polymers*, 14(983), 1–22.
- Becker, M. M., Nunes, G. S., Ribeiro, D. B., Silva, F. E. P. S., Catanante, G., & Marty, J. L. (2019). Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(5), 1108–1114. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190003>
- Bernard, M., Jubeli, E., Pungente, M. D., & Yagoubi, N. (2018). Biocompatibility of polymer-based biomaterials and medical devices – Regulations, *In Vitro* Screening and Risk-Management. *Biomaterials Science*, 6(8), 2025–2053. <https://doi.org/10.1039/C8BM00518D>
- Bhardwaj, N., & Kundu, S. C. (2010). Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, 28(3), 325–347. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.004>
- Bhatia, S. K., Bhatia, R. K., Choi, Y. K., Kan, E., Kim, Y. G., & Yang, Y. H. (2018). Biotechnological potential of microbial consortia and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(8), 1209–1229. <https://doi.org/10.1080/07388551.2018.1471445>
- Blandón, L. M., Nosedá, M. D., Islán, G. A., Castro, G. R., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2018). Optimization of culture conditions for kefir production in whey: The structural and biocidal properties of the resulting polysaccharide. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 16(January), 14–21.

<https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2018.02.001>

- Cesur, S., İlhan, E., Tut, T. A., Kaya, E., Dalbayrak, B., Bosgelmez-Tinaz, G., Arisan, E. D., Gunduz, O., & Kijeńska-Gawrońska, E. (2023). Design of Cinnamaldehyde- and Gentamicin-Loaded Double-Layer Corneal Nanofiber Patches with Antibiofilm and Antimicrobial Effects. *ACS Omega*, 8(31), 28109–28121. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c00914>
- Chen, H. C., Wang, S. Y., & Chen, M. J. (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology*, 25(3), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.01.003>
- Correia, S., Gonçalves, C., Oliveira, J. M., Radhouani, H., & Reis, R. L. (2022). Impact of Kefiran Exopolysaccharide Extraction on Its Applicability for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Pharmaceutics*, 14(8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081713>
- Crawford, L., Wyatt, M., Bryers, J., & Ratner, B. (2021). Biocompatibility Evolves: Phenomenology to Toxicology to Regeneration. *Advanced Healthcare Materials*, 10(11), 1–21. <https://doi.org/10.1002/adhm.202002153>
- Dailin, D. J., Elsayed, E. A., Othman, N. Z., Malek, R., Phin, H. S., Aziz, R., Wadaan, M., & El Enshasy, H. A. (2016). Bioprocess development for kefir production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in semi industrial scale bioreactor. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(4), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.003>
- De Luca, S., Milanese, D., Galichi-Nottiani, D., Cavazza, A., & Sciancalepore, C. (2023). Poly (lactic acid) and Its Blends for Packaging Application : A Review. *Clean Technologies*, 5, 1304–1343.
- Eda Ondul, K., & Mahmut, I. (2021). Physicochemical Properties of Polysaccharide Kefiran Isolated from Kefir Grains Biomass. *International Journal of Biotechnology and Biomaterials Engineering*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.35840/2633-8920/8805>
- Egea, M. B., Santos, D. C. dos, Oliveira Filho, J. G. de, Ores, J. da C., Takeuchi, K. P., & Lemes, A. C. (2020). A review of nondairy kefir products: their characteristics and

- potential human health benefits. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1844140>
- Fatehi, H., Ong, D., Yu, J., & Chang, I. (2023). Debris flow mitigation by using biopolymers as a soil stabilizer. *E3S Web of Conferences*, 415, 10–13. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202341506005>
- Ferro, T. A. F., Souza, E. B., Suarez, M. A. M., Pereira, D. M. S., Mendes, S. J. F., Gonzaga, L. F., Bomfim, M. R. Q., Arbiser, J. L., & Fernandes, E. S. (2019). Topical Application of Cinnamaldehyde Promotes Faster Healing of Skin Wounds Infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecules*, 24(1627), 1–17.
- Gaifer, Z., Youssouf, T., Aljehani, B. H., Ismail, A., & Abdelaziz, A. (2021). Comparison of Outcomes of Community and Hospital-Acquired Methicillin- Susceptible and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. *International Journal on Infectious Disease and Epidemiology*, 2(1), 0–5. <https://doi.org/10.51626/ijide.2021.02.00004>
- García, A., Martínez, C., Juárez, R. I., Téllez, R., Paredes, M. A., Herrera, M. del R., & Giono, S. (2019). Resistencia a meticilina y producción de biopelícula en aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa* negativa en México. *Biomédica*, 39(3).
- Garcia, M., Morello, E., Garnier, J., Barrault, C., Garnier, M., Burucoa, C., Lecron, J. C., Si-Tahar, M., Bernard, F. X., & Bodet, C. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* flagellum is critical for invasion, cutaneous persistence and induction of inflammatory response of skin epidermis. *Virulence*, 9(1), 1163–1175. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1480830>
- González-Orozco, B. D., García-Cano, I., Escobar-Zepeda, A., Jiménez-Flores, R., & Álvarez, V. B. (2023). Metagenomic analysis and antibacterial activity of kefir microorganisms. *Journal of Food Science*, 88(7), 2933–2949. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16614>
- Han, X., Zhang, L. J., Wu, H. Y., Wu, Y. F., & Zhao, S. N. (2018). Investigation of

- microorganisms involved in kefir biofilm formation. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 111(12), 2361–2370. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1125-6>
- Hasheminya, S. M., & Dehghannya, J. (2020). Novel ultrasound-assisted extraction of kefiran biomaterial, a prebiotic exopolysaccharide, and investigation of its physicochemical, antioxidant and antimicrobial properties. *Materials Chemistry and Physics*, 243(January), 122645. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2020.122645>
- Heal, C. F., van Driel, M. L., Lepper, P. D., & Banks, J. L. (2016). Topical antibiotics for preventing surgical site infection in wounds healing by primary intention. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2016(11). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011426>
- Huang, N. C., Teng, K. W., Huang, N. C., Kang, L. Y., Fu, K. Y., Hsieh, P. S., Dai, L. G., & Dai, N. T. (2020). Evaluation of Polycaprolactone/Gelatin/Chitosan Electrospun Membrane for Peritoneal Adhesion Reduction. *Annals of Plastic Surgery*, 84(1S Suppl 1), S116–S122. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000002199>
- Hudiyanti, D., Al Khafiz, M. F., Anam, K., Siahaan, P., & Christa, S. M. (2022). *In Vitro* Evaluation of Curcumin Encapsulation in Gum Arabic Dispersions under Different Environments. *Molecules*, 27(12), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules27123855>
- Ikramullah, Shah, A., Mehmood, D., Alam, S., Alam, A., Ullah, B., & Ali, W. (2023). Knowledge and Infection Control practices Regarding Healthcare-Associated Infection among Healthcare Workers. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*, 17(6), 92–95. <https://doi.org/10.53350/pjmhs202317692>
- Jabeen, N., & Atif, M. (2024). Polysaccharides based biopolymers for biomedical applications: A review. *Polymers for Advanced Technologies*, 35(1), 1–23. <https://doi.org/10.1002/pat.6203>
- Jadoun, S., Riaz, U., & Budhiraja, V. (2021). Biodegradable conducting polymeric materials for biomedical applications: a review. *Medical Devices & Sensors*, 4(1), 1–

13. <https://doi.org/10.1002/mds3.10141>

- Jenab, A., Roghanian, R., Ghorbani, N., Ghaedi, K., & Emtiazi, G. (2020). The efficacy of electrospun PAN/Kefiran nanofiber and kefir in mammalian cell culture: Promotion of PC12 cell growth, anti-MCF7 breast cancer cells activities, and cytokine production of PBMC. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 717–728. <https://doi.org/10.2147/IJN.S232264>
- Kalamaki, M. S., & Angelidis, A. S. (2020). High-throughput, sequence-based analysis of the microbiota of Greek kefir grains from two geographic regions. *Food Technology and Biotechnology*, 58(2), 138–146. <https://doi.org/10.17113/FTB.58.02.20.6581>
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81(2), 121–126. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 1–21. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 469–471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Liu, W., Zheng, Y., Kwok, L. Y., Sun, Z., Zhang, J., Guo, Z., Hou, Q., Menhe, B., & Zhang, H. (2015). High-throughput sequencing for the detection of the bacterial and fungal diversity in Mongolian naturally fermented cow's milk in Russia. *BMC Microbiology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0385-9>
- Lopresti, F., Campora, S., Tirri, G., Capuana, E., Carfi Pavia, F., Brucato, V., Ghersi, G., & La Carrubba, V. (2021). Core-shell PLA/Kef hybrid scaffolds for skin tissue engineering applications prepared by direct kefir coating on PLA electrospun fibers optimized via air-plasma treatment. *Materials Science and Engineering C*, 127(June), 112248. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112248>

- Ma, Y. X., Wang, C. Y., Li, Y. Y., Li, J., Wan, Q. Q., Chen, J. H., Tay, F. R., & Niu, L. N. (2020). Considerations and Caveats in Combating ESKAPE Pathogens against Nosocomial Infections. *Advanced Science*, 7(1). <https://doi.org/10.1002/advs.201901872>
- Marin, E., Boschetto, F., & Pezzotti, G. (2020). Biomaterials and biocompatibility: An historical overview. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 108(8), 1617–1633. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36930>
- Martí, M., Frígols, B., & Serrano-Aroca, A. (2018). Antimicrobial characterization of advanced materials for bioengineering applications. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(138), 1–10. <https://doi.org/10.3791/57710>
- Miguel, S. P., Ribeiro, M. P., Coutinho, P., & Correia, I. J. (2017). Electrospun polycaprolactone/Aloe Vera_Chitosan nanofibrous asymmetric membranes aimed for wound healing applications. *Polymers*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/polym9050183>
- Mogoşanu, G. D., & Grumezescu, A. M. (2014). Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*, 463(2), 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.015>
- Moradi, Z., & Kalanpour, N. (2019). Kefiran, a branched polysaccharide: Preparation, properties and applications: A review. *Carbohydrate Polymers*, 223(March). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115100>
- Muatasim, R., Ma, H., & Yang, X. (2018). Effect of multimode ultrasound assisted extraction on the yield of crude polysaccharides from *Lycium Barbarum* (Goji). *Food Science and Technology (Brazil)*, 38, 160–166. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.14417>
- Nejati, F., Junne, S., Kurreck, J., & Neubauer, P. (2020). Quantification of Major Bacteria and Yeast Species in Kefir Consortia by Multiplex TaqMan qPCR. *Frontiers in Microbiology*, 11(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01291>
- Oesterreicher, Z., Lackner, E., Jäger, W., Höferl, M., & Zeitlinger, M. (2018). Lack of

- dermal penetration of topically applied gentamicin as pharmacokinetic evidence indicating insufficient efficacy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(10), 2823–2829. <https://doi.org/10.1093/jac/dky274>
- Oleksy, M., Dynarowicz, K., & Aebisher, D. (2023). Advances in Biodegradable Polymers and Biomaterials for Medical Applications—A Review. *Molecules*, 28(17), 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules28176213>
- Paul, E., Bessière, Y., Dumas, C., & Girbal-Neuhauser, E. (2020). Biopolymers Production from Wastes and Wastewaters by Mixed Microbial Cultures: Strategies for Microbial Selection. *Waste and Biomass Valorization*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01252-6>
- Pereira de Mesquita, P. J., Soares Alves, T., & Barbosa, R. (2022). Development and characterization of green polyethylene/clay/antimicrobial additive nanocomposites. *Polimeros*, 32(2), 2–9. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.20210097>
- Pielesz, A., Biniaś, D., Bobiński, R., Sarna, E., Paluch, J., & Waksmańska, W. (2017). The role of topically applied L-ascorbic acid in *ex-vivo* examination of burn-injured human skin. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 185, 279–285. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.05.055>
- Plessas, S., Nouska, C., Mantzourani, I., Kourkoutas, Y., Alexopoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2017). Microbiological exploration of different types of Kefir grains. *Fermentation*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.3390/fermentation3010001>
- Pop, C. R., Coldea, T. E., Salanță, L. C., Nistor, A. L., Borșa, A., Fărcaș, A. C., Florian, V. C., & Rotar, A. M. (2021). The effect of extraction conditions on the barrier and mechanical properties of kefir films. *Coatings*, 11(5), 1–12. <https://doi.org/10.3390/coatings11050602>
- Pourmoslemi, S., Moradkhani, S., Tamri, P., & Foroughinia, S. (2021). Evaluation of Synergistic Antibacterial Effect of Combined *Scrophularia striata* Extract and Antibiotics Against *Pseudomonas aeruginosa* and Methicillin -Resistant *Staphylococcus aureus*. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(2), 219–224.

<https://doi.org/10.31351/vol30iss2pp219-224>

- Radhouani, H., Gonçalves, C., Maia, F. R., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2018). Kefiran biopolymer: Evaluation of its physicochemical and biological properties. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 33(5), 461–478. <https://doi.org/10.1177/0883911518793914>
- Razmgar, K., Saljoughi, E., & Mousavi, S. M. (2019). Preparation and characterization of a novel hydrophilic PVDF/PVA/Al₂O₃ nanocomposite membrane for removal of As(V) from aqueous solutions. *Polymer Composites*, 40(6), 2452–2461. <https://doi.org/10.1002/pc.25115>
- Rincón León, H. A., & Navarro Fuentes, K. R. (2016). Tendencias de resistencia antimicrobiana en patógenos aislados de infecciones nosocomiales. *Revista Médica Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, 54(1), 32–41.
- Rodríguez Salgado, M. (2018). *Frecuencia de infecciones asociadas a la atención de la salud en los principales sistemas de información de México*.
- Rogers, S. A., Huigens, R. W., Cavanagh, J., & Melander, C. (2010). Synergistic effects between conventional antibiotics and 2-aminoimidazole-derived antibiofilm agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 2112–2118. <https://doi.org/10.1128/AAC.01418-09>
- Rosa, D. D., Dias, M. M. S., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Peluzio, M. D. C. G. (2017). Milk kefir: Nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition Research Reviews*, 30(1), 82–96. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000275>
- Sabee, M. M. S. M., Awang, M. S., Bustami, Y., & Abdul Hamid, Z. A. (2019). Antimicrobial activity evaluation for gentamicin loaded PLA microspheres. *Materials Today: Proceedings*, 16, 2060–2066. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.092>
- Safae-Ardakani, M. R., Hatamian-Zarmi, A., Sadat, S. M., Mokhtari-Hosseini, Z. B., Ebrahimi-Hosseinzadeh, B., Rashidiani, J., & Kooshki, H. (2019). Electrospun

- Schizophyllan/polyvinyl alcohol blend nanofibrous scaffold as potential wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 27–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.256>
- Sharifi, M., Moridnia, A., Mortazavi, D., Salehi, M., Bagheri, M., & Sheikhi, A. (2017). Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. *Medical Oncology*, 34(11), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s12032-017-1044-9>
- Sinha, S. (2024). An overview of biopolymer-derived packaging material. *Polymers from Renewable Resources*, 15(2), 193–209. <https://doi.org/10.1177/20412479241226884>
- Solis Arevalo, K. K., Garza Gonzalez, M. T., Lopez Calderon, H. D., Solis Rojas, C., & Arevalo Nino, K. (2019). Electrospun Membranes Based on Schizophyllan-PVOH and *Hamamelis Virginiana* Extract: Antimicrobial Activity against Microorganisms of Medical Importance. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 18(4), 522–527. <https://doi.org/10.1109/TNB.2019.2924166>
- Sridhar, S., Venugopal, J. R., & Ramakrishna, S. (2015). Improved regeneration potential of fibroblasts using ascorbic acid-blended nanofibrous scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 103(11), 3431–3440. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35486>
- Sumarmono, J., Kusuma, R. J., Rahayu, N., Sukarno, A. S., & Wulansari, P. D. (2023). Metagenomic analysis of the microbial community in kefir grains from different milk sources. *Biodiversitas*, 24(10), 5302–5308. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d241011>
- Syal, K., Mo, M., Yu, H., Iriya, R., Jing, W., Guodong, S., Wang, S., Grys, T. E., Haydel, S. E., & Tao, N. (2017). Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests. *Theranostics*, 7(7), 1795–1805. <https://doi.org/10.7150/thno.19217>
- Sydnor, E. R. M., & Perl, T. M. (2011). Hospital epidemiology and infection control in acute-care settings. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 141–173. <https://doi.org/10.1128/CMR.00027-10>
- Tahir, R., Albargi, H. B., Ahmad, A., Qadir, M. B., Khaliq, Z., Nazir, A., Khalid, T., Batool, M., Arshad, S. N., Jalalah, M., Alsareii, S. A., & Harraz, F. A. (2023).

- Development of Sustainable Hydrophilic *Azadirachta indica* Loaded PVA Nanomembranes for Cosmetic Facemask Applications. *Membranes*, 13(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/membranes13020156>
- Tolera, M., Marami, D., Abate, D., & Dheresa, M. (2020). Are Invasive Procedures and a Longer Hospital Stay Increasing the Risk of Healthcare-Associated Infections among the Admitted Patients at Hiwot Fana Specialized University Hospital, Eastern Ethiopia? *Advances in Preventive Medicine*, 2020, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2020/6875463>
- Torres, D., Núñez, N., Villalobos, R., & Durán, M. (2020). Características de las infecciones asociadas con la atención de la salud en un hospital de tercer nivel de Yucatán, México. *Med Int Méx*, 36(4), 451–459.
- Trilla, A. (2018). Guía para el control de infecciones asociadas a la atención en salud: Infecciones de la piel y tejidos blandos. In *International Society for Infectious Diseases*.
- Trinca, R. B., Westin, C. B., da Silva, J. A. F., & Moraes, Â. M. (2017). Electrospun multilayer chitosan scaffolds as potential wound dressings for skin lesions. *European Polymer Journal*, 88, 161–170. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.021>
- Valencia Gomez, L. E., Martel Estrada, S. A., Vargas Requena, C. L., Rodriguez González, C. A., & Olivas Armendariz, I. (2016). Apósitos de polímeros naturales para regeneración de piel. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 37(3), 235–249.
- Verma, M. L., Kumar, S., Jeslin, J., & Dubey, N. K. (2020). Microbial production of biopolymers with potential biotechnological applications. In *Biopolymer-Based Formulations: Biomedical and Food Applications* (Vol. 1, pp. 105–137). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816897-4.00005-9>
- Vidal, M. N. P., & Granjeiro, J. M. (2017). Cytotoxicity Tests for Evaluating Medical Devices: An Alert for the Development of Biotechnology Health Products. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 10(9), 431–443.
- Yoshida, K., Ishino, T., Teramoto, A., Nakamura, N., Miyazaki, Y., Sorai, M., Wang, Q.,

- Hayashi, Y., Shinyashiki, N., & Yagihara, S. (2002). Ordering in aqueous polysaccharide solutions. II. Optical rotation and heat capacity of aqueous solutions of a triple-helical polysaccharide schizophyllan. *Biopolymers*, 63(6), 370–381. <https://doi.org/10.1002/bip.10129>
- Zajšek, K., Goršek, A., & Kolar, M. (2013). Cultivating conditions effects on kefiran production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chemistry*, 139(1–4), 970–977. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.142>
- Zhang, W., Ronca, S., & Mele, E. (2017). Electrospun Nanofibres Containing Antimicrobial Plant Extracts. *Nanomaterials*, 7(2), 1–17. <https://doi.org/10.3390/nano7020042>
- Ziyadi, H., Baghali, M., Bagherianfar, M., Mehrali, F., & Faridi-Majidi, R. (2021). An investigation of factors affecting the electrospinning of poly (vinyl alcohol)/kefiran composite nanofibers. *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 4(3), 768–779. <https://doi.org/10.1007/s42114-021-00230-3>

13. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO

Karla Katiushka Solís Arévalo

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con Orientación en Biotecnología

Tesis:	ELABORACIÓN DE UN APOSITO DE KEFIRÁN CON GENTAMICINA Y ACIDO ASCÓRBICO PARA EL CONTROL DE <i>Staphylococcus aureus</i> Y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Campo de Estudio:	Ciencias de la Salud
Datos Personales:	Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 23 de septiembre de 1995. Hija de Katiushka Arévao Niño y Carlos Solís Rojas.
Educación:	Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Grado obtenido Licenciada en Química Industrial en 2018 y Maestra en Ciencias con Orientación en Microbiología en 2020, con mención honorífica.
Experiencia Profesional:	Maestra de Asignatura en la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 2022.