

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE SUBPRODUCTOS
VEGETALES NANOENCAPSULADOS FRENTE A CEPAS NOSOCOMIALES DE *P.*
AERUGINOSA (SCHROETER, 1872) RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS”

POR

XAVIER ISAAC CASTELLANOS CARACHEO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA.

2026

“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE SUBPRODUCTOS
VEGETALES NANOENCAPSULADOS FRENTE A CEPAS NOSOCOMIALES DE
P. AERUGINOSA (SCHROETER, 1872) RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS”

Comité de Tesis



Dr. Eduardo Sánchez García

Presidente



Dra. Sandra Loruhamá Castillo Hernández

Secretario



Dra. Licet Villarreal Treviño

Vocal



Dra. María Porfiria Barrón Gonzáles

Vocal



Dr. Abelardo Chávez Montes

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO

Subdirectora de posgrado

AVISO DERECHOS DE AUTOR

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.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, (SECIHTI) con número de becario: 1347808

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme realizar mis estudios de posgrado.

Al Dr. Eduardo Sánchez García por aceptarme para trabajar con él con toda la disposición de apoyarme en todo momento de manera profesional y personal.

A la Dra. Sandra por siempre creer en mí y darme tantas oportunidades para poder seguir creciendo como persona y escolarmente además de recibirme siempre en su laboratorio.

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, (SECIHTI) por permitirme estar en el programa nacional de becarios y permitir el apoyo de este proyecto.

A los miembros del comité de tesis, el Dr. Abelardo, la Dra. Porfiria y la Dra. Licet por su apoyo durante la realización de este proyecto, además de que me pudieron retroalimentar y ayudar en cada dificultad que me pudiera llegar a suceder.

A todos los amigos tanto del departamento de alimentos como del laboratorio de química analítica porque no solo me apoyaron de manera escolar, me ayudaron a poder superar esta etapa en los momentos más difíciles.

Finalmente, y más especial a mi familia, en especial a mi mamá, mi papá y mi hermana los cuales siempre han creído en mí y que nunca han dejado de confiar en mí a pesar de estar lejos, por brindarme tanto amor y apoyarme en todo lo que me propongo.

DEDICATORIA

A la vida por permitirme llegar a hacer tantas cosas nuevas

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Resistencia a antibióticos	4
2.2 Enfermedades adquiridas en hospitales	5
2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2.4 Enfermedades relacionadas con <i>P. aeruginosa</i>	7
2.5 Virulencia en <i>P. aeruginosa</i>	8
2.6 Casos de <i>P. aeruginosa</i>	9
2.7 Extractos vegetales	10
2.8 Contaminación por residuos vegetales	12
2.9 Inhibición de biopelícula	14
2.10 Nanoencapsulación	14
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPÓTESIS	20
5. OBJETIVOS DEL TRABAJO	21
5.1 Objetivo general	21
5.2 Objetivos específicos	21
6. MATERIAL Y MÉTODOS	22
6.1 Colecta de subproductos	22
6.2 Preparación de los extractos de plantas	22
6.3 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	22
6.4 Ensayo de susceptibilidad a antibióticos	23
6.5 Ensayo de difusión en agar	23
6.6 Determinación de CMI y CMB	24
6.7 Prueba concentración subinhibitoria	24
6.8 Inhibición de la formación de biopelícula	25
6.9 Elaboración de nanopartículas RLPO	25
6.10 Caracterización de las nanocápsulas	26

6.11 Evaluación de las nanocápsulas	27
6.12 Análisis estadístico	27
7. RESULTADOS	28
7.1 Caracterización de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas multirresistentes de <i>P. aeruginosa</i>	28
7.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de subproductos vegetales	30
7.3 Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida de los extractos etanólicos de residuos vegetales	34
7.4 Efecto en la formación de biopelículas contra las cepas de <i>P. aeruginosa</i>	37
7.5 Condiciones óptimas de nanoencapsulación de los extractos seleccionados y hacer su caracterización	39
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIONES	52
10. PERSPECTIVAS	53
11. BIBLIOGRAFÍA	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Halo de inhibición de los diferentes antibióticos utilizados frente a las cepas de <i>P. aeruginosa</i> . (Cm)	29
2	Lista del rendimiento de los subproductos de materia vegetal en gramos por cada kilogramo de materia húmeda	31
3	Concentración de los extractos etanólicos obtenidos mediante maceración con etanol	33
4	Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos vegetales frente a las diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i>	34
5	CMI de las diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> contra los diferentes extractos vegetales	35
6	CMB de las diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> contra los diferentes extractos vegetales	36
7	Diferentes formulaciones de nanocápsulas del extracto etanólico de granada	40
8	CMI de las diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> contra el extracto etanólico de la cáscara de granada	42
9	CMB de las diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> contra el extracto etanólico de la cáscara de granada	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Prueba de resistencia contra antibióticos mediante el uso de un antibiograma. (8) 14-1298	30
2	Prueba de resistencia contra antibióticos mediante el uso de un antibiograma. (2)14-1284	30
3	Procesamiento del fruto para la obtención del extracto etanólico de los subproductos vegetales. (A) Lavado y desinfección del fruto. (B) Separación del fruto y el subproducto. (C) Secado del subproducto para su molienda.	32
4	Obtención de los extractos etanólicos vegetales. (A) Maceración de la harina obtenida del procesamiento de la muestra. (B) Filtrado del extracto posterior a la maceración. (C) Obtención del extracto concentrado	32
5	Prueba de pozo de los diferentes extractos etanólicos. (A) Cepa 14-1298. (B) Cepa 14-1285. (1:CG, 2: CP, 3:HJ, 4:CL)	34
6	Concentración Mínima Inhibitoria de la cepa 14-1285 donde no se observa crecimiento de microorganismo	36
7	Concentración Mínima Inhibitoria de la cepa 14-1298 donde no se observa crecimiento de microorganismo	37
8	Porcentaje de inhibición de biopelícula con una concentración subinhibitoria de 75% de la CMB de extracto etanólico de cáscara de granada contra diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> .	38
9	Evaluación de concentración subinhibitoria al 75% con el extracto CG frente a la cepa 14-1298	38

10	Tinción de la biopelícula para su posterior lectura mediante espectrofotómetro de la cepa 14-1298 utilizando el extracto CG donde a mayor tono de violeta se indica mayor cantidad de biopelícula	-----	39
11	Evaporación de solvente para obtención de las nanocápsulas del extracto etanólico	-----	41
12	Gráfico obtenido del tamaño de la nanocápsula con la formulación final y su PDI	-----	41
13	Evaluación de la CMB y la CMI del extracto etanólico encapsulado mediante prueba de goteo en placa	-----	43
14	Gráfica del porcentaje de inhibición de biopelícula con una concentración subinhibitoria de 75% de la CMB del extracto etanólico de cáscara de granada nanoencapsulado contra diferentes cepas de <i>P. aeruginosa</i> .	-----	44

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µL	Microlitro
°C	Grados centígrados
MHB	Caldo Mueller Hinton
MHA	Agar Mueller Hinton
g	Gramo
FAO	Food and Agriculture Organization
mg	Miligramos
mL	Mililitros
Cm	Centímetro
mm	Milímetro
O	Fase oleosa
W1	Fase acuosa 1
W2	Fase acuosa 2
PDI	Índice de polidispersidad
Eta	Etanol
DCM	Diclorometano
PVA	Alcohol polivinílico
Min	Minutos
rpm	Revoluciones por minuto
pH	Potencial de hidrógeno
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida

PDI	Índice de Polidispersidad
PLGA	poli(ácido láctico-co-glicólico)
DE	Desviación estándar

RESUMEN

La resistencia a los antibióticos ha impulsado a la comunidad científica a buscar alternativas terapéuticas para el control de enfermedades causadas por microorganismos resistentes. Una de las bacterias más importantes a nivel global es *Pseudomonas aeruginosa* ya que presenta múltiples mecanismos de resistencia frente a distintos antibióticos y está ampliamente distribuida en entornos hospitalarios. En este contexto, diversos estudios han demostrado que algunos extractos vegetales constituyen una alternativa terapéutica prometedora frente a cepas resistentes. En el presente estudio se evaluaron diferentes extractos etanólicos obtenidos a partir de subproductos vegetales, con el objetivo de determinar su actividad antimicrobiana y antibiopelícula frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a antibióticos, comparando la actividad del extracto sin procesar (crudo) con la del extracto encapsulado. El extracto etanólico de cáscara de granada fue el que mostró la mayor actividad antimicrobiana, presentando una CMI de 16.2 ± 5.8 mg/mL y una reducción significativa entre 10 y 25% (dependiendo de la resistencia contra antibióticos de la cepa) en la producción de biopelícula a una concentración subinhibitoria del 75% después de 72 horas de incubación. Durante el proceso de encapsulación se obtuvo un tamaño de partícula de 208.8 nm, con una eficiencia de encapsulación del 91.88% y un PDI de 0.035. Aunque la CMI del extracto encapsulado disminuyó, se observó una reducción más estable y sostenida en la producción de la biopelícula a lo largo del tiempo de incubación. En conclusión, el extracto encapsulado mostró mejores resultados a las 48 y 72 horas, evidenciando mayor estabilidad y un efecto de liberación prolongado, lo que pone de manifiesto su aplicación como alternativa terapéutica.

Palabras clave:

Resistencia contra antibióticos, subproductos vegetales, *Pseudomonas aeruginosa*, nanoencapsulación.

ABSTRACT

Antibiotic resistance caused the scientific community to find new therapeutic alternatives for the control of diseases caused by resistant microorganisms. One of the most important bacteria globally is *Pseudomonas aeruginosa*, as it presents multiple resistance mechanisms against different antibiotics and is widely distributed in hospital environments. In this context, various studies have shown that some plant extracts constitute a promising therapeutic alternative against resistant strains. For this reason, in recent years, their encapsulation has been proposed as a strategy to improve their stability and bioavailability. In the present study, different ethanolic extracts obtained from plant by-products were evaluated with the objective of determining their antimicrobial and antibiofilm activity against antibiotic-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*, comparing the activity of the unprocessed extract with that of the encapsulated extract. The ethanolic extract of pomegranate peel showed the highest antimicrobial activity, presenting an MIC of 16.2 ± 5.8 mg/mL and a significant reduction between 10 and 25% (depending on the antibiotic resistance of the strain) in biofilm production at a sub-inhibitory concentration of 75% after 72 hours of incubation. During the encapsulation process, a particle size of 208.8 nm was obtained, with an encapsulation efficiency of 91.88% and a PDI of 0.035. Although the MIC of the encapsulated extract decreased, a more stable and sustained reduction in biofilm production was observed over the incubation time. In conclusion, the encapsulated extract showed better results at 48 and 72 hours, demonstrating greater stability and a prolonged release effect, which highlights its application as a therapeutic alternative.

Keywords:

Antibiotic resistance, plant by-products, *Pseudomonas aeruginosa*, nanoencapsulation.

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es un tema de gran interés para la comunidad global, ya que las bacterias presentan una mayor resistencia a los antibióticos disponibles en el mercado. La OMS (2024) menciona las bacterias patógenas de más alta importancia debido a su alta resistencia a antibióticos: *Salmonella Typhi*, *Shigella spp.*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella* no tifoidea, *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* y una de las más peligrosas es *Pseudomonas aeruginosa*. Este microorganismo, es una bacteria Gram negativa, aeróbica, no esporulada. Es capaz de colonizar la piel, el sistema urinario, sanguíneo y respiratorio, es precursor de una gran variedad de infecciones tanto en huéspedes inmunocomprometidos como en los individuos inmunocompetentes. Esta bacteria presenta una gran versatilidad en los medios en los que puede colonizar y posee diversos factores de virulencia que le confieren resistencia a la mayoría de los antibióticos actuales, por lo que se ha convertido en un gran problema para la medicina moderna.

P. aeruginosa, puede encontrarse en diferentes ambientes naturales y artificiales, sin embargo, su presencia más preocupante se asocia al ámbito hospitalario, donde causa enfermedades nosocomiales. Estas infecciones se presentan con mayor frecuencia en unidades de cuidados intensivos, particularmente en sistemas relacionados con equipos de ventilación mecánica, en los sistemas de diálisis, y otros dispositivos médicos que operan en ambientes húmedos y en temperaturas relativamente altas, los cuales favorecen su proliferación.

Asimismo, este microorganismo ha sido encontrado en otros reservorios hospitalarios como crema para manos, lavabos, soluciones de limpieza, e incluso bajo uñas artificiales del personal de salud. Esta capacidad de colonizar múltiples superficies y sobrevivir en distintos nichos ambientales contribuye a su persistencia en entornos clínicos y explica su elevada relevancia clínica.

Para responder a esta problemática en aumento de la resistencia a los antibióticos y considerando que el desarrollo de nuevos antibióticos es un proceso complejo, costoso y de larga duración, se han explorado alternativas terapéuticas innovadoras. Entre estas, destacan aquellas basadas en el conocimiento acumulado a lo largo de miles de años de medicina tradicional. Diversos estudios han demostrado que a partir de materiales vegetales se pueden obtener compuestos bioactivos novedosos con potencial antimicrobiano, que pueden constituir nuevas fuentes de agentes terapéuticos eficaces frente a microorganismos resistentes.

En la naturaleza, un gran número de productos vegetales presentan elevadas concentraciones de compuestos fenólicos, como ácidos fenólicos, antocianinas y flavonoides. Estos compuestos, denominados metabolitos secundarios, han despertado gran interés debido a sus propiedades funcionales, entre las que destacan las actividades antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas y antimicrobianas. Para la obtención eficiente de estos compuestos bioactivos, se emplean métodos de extracción con solventes que solubilizan los metabolitos de interés del material vegetal.

Si bien en la última década se han reportado un número considerable de compuestos con actividad antimicrobiana obtenidos mediante maceración de productos vegetales, estudios recientes han demostrado que diversos subproductos de la industria alimentaria contienen altas concentraciones de metabolitos bioactivos y en algunos casos incluso superiores a los encontrados en la fruta original.

Anualmente, grandes cantidades de estos subproductos vegetales son desechados, lo que contribuye de forma significativa a la huella de carbono, debido a los procesos asociados a su eliminación. Es por esto, que existe un creciente interés en desarrollar metodologías eficientes para la extracción de compuestos bioactivos a partir de estos residuos para darles un valor agregado. Actualmente, la mayoría de estos desechos suelen ser incinerados, o en menor proporción, se utilizan como alimento para ganado o para adicionar como fuente de fibra adicional en algunos productos alimenticios.

Se han utilizado diversos solventes para la extracción de compuestos bioactivos a partir de subproductos vegetales, cada uno con una capacidad diferente de solubilizar metabolitos específicos. Siendo los solventes alcohólicos los que han mostrado los mejores resultados en la obtención de compuestos fenólicos y otros metabolitos de interés con actividad biológica.

Si bien, la utilización de estos extractos tiene grandes beneficios, su aplicación se ve limitada por su inestabilidad a factores ambientales como temperatura, luz, oxígeno y pH, así como por posibles interacciones con otros componentes con el medio. De igual manera, durante la digestión, pueden sufrir degradación por la acción enzimática, cambios de pH, y otras interacciones dentro del organismo, que reducen su biodisponibilidad y eficacia.

En este contexto, una alternativa novedosa consiste en la encapsulación de estos extractos en sistemas nanoestructurados que permiten mejorar su estabilidad, proteger los compuestos bioactivos frente a la degradación y favorecer una liberación controlada y más eficiente.

En el presente estudio se evaluó si existen diferencias significativas entre extractos vegetales de semilla de guayaba, cáscara de piña, cáscara de jícama, cáscara de granada y cáscara de limón sometidos a un proceso de nanoencapsulación, en comparación con los extractos no encapsulados. El estudio se centró en determinar su potencial antimicrobiano y su capacidad para disminuir la formación de biopelículas *in vitro*, con el propósito de establecer si la nanoencapsulación mejora significativamente la actividad biológica de los extractos.

2. ANTECEDENTES

2.1 Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos es definida como la capacidad de un microorganismo para sobrevivir en presencia uno o más antibióticos que normalmente inhibirían el crecimiento de microorganismos sensibles, pudiendo categorizar cada patógeno como resistente o susceptible basado en diferentes pruebas antimicrobianas de laboratorio (Frieri et al., 2017). La aparición de resistencia puede deberse a cambios genéticos en una bacteria previamente susceptible, ya sea por mutaciones en su propio material genético o por la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia horizontal de genes desde otra bacteria (Frieri et al. 2017). Se estima que para el año 2050 la resistencia a antibióticos sea la causante de alrededor de 10 millones de muertes y tenga un costo de 100 trillones de dólares de gastos médicos en hospitales para atender a toda la población afectada. (MacLean y San Millan 2019).

Los antibióticos han contribuido de manera significativa a aumentar la esperanza de vida durante las últimas décadas. Sin embargo, la resistencia bacteriana se ha convertido en un problema creciente de salud pública, derivado del uso inadecuado o excesivo de los antibióticos. Esto aunado a la falta de nuevos medicamentos desarrollados por las industrias farmacéuticas, debido a los costos elevados y a los prolongados tiempos de investigación (Ventola 2015). Otras de las causas asociadas a la resistencia es debido a los tratamientos mal implementados en los animales de granja, ya que usualmente se utilizan como factores de crecimiento para mejorar la productividad y calidad de los productos cárnicos, siendo los más comunes cerdos, ganado y aves de corral los cuales pueden acumular antibióticos lo que aumentan el riesgo de generar resistencia al ser consumidos por la población (Kim y Ahn 2022), así como de esparcir patógenos resistentes en la cadena de producción alimentaria. (Cheng et al. 2014).

2.2 Enfermedades adquiridas en hospitales

Las Infecciones Asociadas a la Atención Médica (IAAS) se definen como aquellas que son adquiridas en centros de salud u hospitales. Estas infecciones normalmente ocurren aproximadamente 48 horas después de la hospitalización. Esto representa un gran problema de salud pública ya que en países en vías de desarrollo se presentan aproximadamente del 7 al 10% de pacientes hospitalizado presentan IAAS (Cassini et al. 2019).

Tan solo en Europa, en 2013, aproximadamente 3.2 millones de pacientes se vieron afectados por IAAS. La gravedad de estas infecciones suele depender del estado inmunológico del paciente (European Centre for Disease Prevention and Control, 2013). Los pacientes que se encuentran en las cabinas de nacimiento, unidades de cuidados intensivos, trasplantes de órganos y los pacientes neonatos son los que se ven más afectados por este tipo de infecciones (Petkar et al., 2024). En regiones Subsaharianas y el sudeste asiático las IAAS son las causantes del 75% de las muertes en neonatos siendo las más comunes: las infecciones en salas quirúrgicas (2-5% de incidencia), las infecciones por catéteres en sangre (12-25% de incidencia), catéteres utilizados por vías urinarias (12% de incidencia) y los ventiladores que se utilizan para tratar pacientes con neumonía (9-27% de incidencia siendo una de las que presentan mayor problemática la bacteria *P. aeruginosa*, debido a su elevada capacidad de resistencia antimicrobiana y su asociación con infecciones nosocomiales graves (Avershina et al. 2021).

2.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa con forma de bastón que puede ser aislada de gran número de ambientes, dentro de los cuales se pueden encontrar tejidos humanos, plantas, tierra etc. Esta es una bacteria que puede sobrevivir en agua, así como también en diversos ambientes, como las superficies del equipo médico, esta supervivencia es debido a diferentes factores de adhesión como pueden ser las biopelículas, flagelos o pili (Stover et al. 2000).

2.3.1 Condiciones de crecimiento

P. aeruginosa tiene una temperatura óptima de crecimiento a 37°C pero puede sobrevivir en temperaturas desde 4°C hasta 42°C. Las temperaturas a las que crece esta bacteria pueden afectar su crecimiento donde se ha reportado que a menos de 30°C algunos factores de virulencia no están activados. Crece mejor en condiciones aeróbicas, pero es capaz de sobrevivir en condiciones anaeróbicas. (LaBauve y Wargo 2022).

2.3.2 Localización

Esta bacteria es muy adaptable y metabólicamente versátil, se encuentra en una gran variedad de localizaciones que incluyen el cuerpo humano, tierra, agua, medios contaminados, drenajes, lavabos y siendo la más peligrosa en áreas de hospital donde se ha reportado en equipos como catéteres, zonas de cuidado intensivo, respiradores, equipo para cirugías, entre otros. (Chrono et al. 2020)

2.3.3 Biopelícula

P. aeruginosa puede estar en dos estados principales: planctónica, cuando las células se encuentran libres y suspendidas en el medio y en forma sésil, cuando forman conglomerados pegajosos gracias a la secreción de una matriz adhesiva protectora que se denomina biopelícula (Vu et al. 2009). Esta biopelícula es un conjunto de células que producen una matriz extracelular para mantenerse juntas como una comunidad. Esto les permite a los microorganismos mantenerse cerca de nutrientes, protegerse de estímulos externos, así como también intercambiar material genético. Una biopelícula está compuesta de una matriz hecha por proteínas (<2%), DNA (<1%), polisacáridos (1-2%) y RNA (<1%) siendo que el resto de la matriz es agua. (Al-Wrafy et al. 2017) Las bacterias que crecen en biopelículas presentan diferencias fenotípicas en comparación de las mismas células en estado planctónico.

2.4 Enfermedades relacionadas con *P. aeruginosa*

P. aeruginosa es una bacteria que se encuentra en diferentes ambientes los cuales por lo que es normal que se encuentre presente en la piel pero tiene la ventaja de que la epidermis es relativamente resistente al ingreso de esta bacteria por lo que cuando ocurre una disrupción en la piel como puede ser una quemadura, heridas o infecciones pueden derivar en una colonización de la bacteria afectando principalmente pacientes que tengan bajas defensas derivando en enfermedades como el síndrome de uñas verdes, foliculitis cutánea, otitis maligna externa, ectima gangrenoso, entre muchas otras afecciones (Agger y Mardan 1995)

2.4.1 Tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario (UTIs) son de las principales afecciones de enfermedades nosocomiales afectando a una gran parte de la población que ingresa a los hospitales, esto debido a que al ser colocado un catéter se puede dañar la mucosa del cuerpo la cual es una barrera contra bacterias siendo una de las más importantes *P. aeruginosa* junto con *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, entre otros; *P. aeruginosa* es de los microorganismos más importantes debido a que su patogenicidad presenta una elevada morbilidad y mortalidad en comparación con otras bacterias asociadas con estas enfermedades. (Mittal et al. 2009)

2.4.2 Tracto digestivo

La mayoría de las infecciones nosocomiales relacionadas con el tracto digestivo están relacionadas con la contaminación directa de los alimentos que pueden consumir los pacientes en el hospital, las bacterias causan un desequilibrio de la flora intestinal normal causando en muchos casos la muerte; en este ámbito es especialmente mencionada *P. aeruginosa* ya que cuenta con la capacidad de adherirse al epitelio del tracto digestivo por lo que le da tiempo de colonizar las diferentes áreas (Zaborina et al. 2006). Bertrand et al. en 2001 realizó un muestreo en un área de cuidado intensivo de un hospital en Estados Unidos; se muestrearon las heces de todos los de pacientes de los cuales 50% de ellos dieron positivo a *P. aeruginosa* y de esos el 30% resultaron ser cepas multirresistentes

a antibióticos de los cuales 3 pacientes fallecieron debido a complicaciones derivadas del tracto digestivo.

2.4.3 Tracto respiratorio

De acuerdo con el Centro de control de Enfermedades y el Sistema Nacional de control de Enfermedades Nosocomiales de los Estados Unidos menciona que *P. aeruginosa* es la segunda mayor causa de neumonía nosocomial la cual es terminal en la mayoría de los casos en el deceso del paciente, esto debido a que suele ser una enfermedad severa que tiene dificultades para ser tratada gracias a la creciente resistencia de esta bacteria contra los antibióticos a disposición, pero los antibióticos más modernos no tienen un avance significativo en comparación con los antibióticos del pasado por lo que la tasa de supervivencia al adquirir esta enfermedad en el hospital dependiendo el caso suele ser baja. (El Solh y Alhajhusain 2009).

2.5 Virulencia en *P. aeruginosa*

2.5.1 Motilidad

Los flagelos son esenciales para que *P. aeruginosa* se mueva a través de las superficies, el flagelo se considera fundamental para la colonización bacteriana y posterior formación de la biopelícula. Por otro lado, el caso el pili tipo IV juega un papel importante en la adherencia de superficies mucosas para colonizarlas, este pili se retrae y contrae para poder moverse utilizando un movimiento llamado twitching. (O'Toole y Kolter 1998).

2.5.2 Resistencia a antibióticos

Su mecanismo más importante de resistencia contra antimicrobianos es la producción de las Beta-lactamasas, enzimas que son capaces de inactivar antibióticos de primera línea como las penicilinas y las cefalosporinas, además de sintetizar carbapenemasas que inactivan antibióticos carbapenémicos entre muchos otros. Estos últimos presentan el mayor reto ya que reducen en gran

medida las terapias disponibles, siendo necesario utilizar medicamentos tóxicos como los aminoglucósidos o las polimixinas (Tuon et al. 2019).

Los sistemas de bombas de expulsión (Efflux Pump systems) son responsables de expulsar antibióticos fuera de las células. Estos son los mecanismos de resistencia mejor conocidos, este sistema está reportado (Li et al. 2015) como uno de los que contribuyen en mayor medida a la resistencia de antibióticos.

2.5.3 Citotoxicidad

Algunas bacterias como *P. aeruginosa*, producen cianuro de hidrógeno (HCN), el cual es un metabolito secundario que puede llegar a inhibir muchos procesos celulares como la respiración aeróbica (Wood et al., 2023). Además, de esto, *P. aeruginosa* presenta el sistema de secreción tipo 2 (T2SS) el cual está dividido en 3 dominios estructurales y un subdominio, el dominio N terminal es el responsable de atacar las células huéspedes, el dominio medio que tiene actividades translocasas y el dominio C-terminal el cual sería el punto tóxico (exotoxina A). (El-Housseiny et al. 2013)

El color azul verdosos de *P. aeruginosa* en el medio de cultivo está relacionado con la piocianina la cual es un metabolito secundario con actividad redox. Este pigmento se ha asociado con la severidad de la infección por *Pseudomonas*, presenta propiedades inflamatorias debido a los radicales libres que genera. Además, puede incrementar las especies reactivas de oxígeno y los niveles de peróxido de hidrógeno lo que induce el estrés oxidativo dañando gran cantidad de enzimas y contribuyendo con la producción de biopelículas. (Gellatly y Hancock, 2013). Por último, se ha descubierto que la producción de piocianina puede causar disrupción epitelial causando la producción de moco y ayudando a la colonización pulmonar siendo incrementado por la síntesis del IL-8 por macrófagos alveolares (Hall et al. 2016).

2.6 Casos de *P. aeruginosa*

De acuerdo con la CDC se estima que de 51,000 infecciones nosocomiales asociadas a *P. aeruginosa*, 6000 son causadas por microorganismos multirresistentes provocando alrededor de

440 muertes por año. Internacionalmente, esta resistencia ha causado más de 2.8 millones de infecciones y más de 35,000 muertes por año entre 2012 a 2017. La OMS en 2017 reportó que sólo en los Estados Unidos *Pseudomonas* multirresistente causó un estimado de 32,600 infecciones en pacientes hospitalizados causando la muerte de aproximadamente 2700 personas. (Reynolds y Kollef 2021). A nivel global se estima que *P. aeruginosa* multiresistente es responsable de alrededor de 300,000 muertes por año. (Sastre et al., 2023).

Las personas más susceptibles son las que presentan enfermedades como la fibrosis quística, los pacientes con bronquiectasias no relacionadas con la fibrosis quística, tabaquismo, entre otras (Weimann et al. 2024). Se estima que ocurrieron alrededor de 13.7 millones de muertes relacionadas con infecciones en 2019, 7.7 millones de muertes se asociaron con 33 patógenos bacterianos tanto resistentes como susceptibles, siendo aproximadamente un 13.6% de las muertes totales y un 56.2% de las muertes relacionadas con sepsis en 2019. Los cinco patógenos que dominan esta tabla son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* las cuales son responsables del 54.9% de las muertes relacionadas con bacterias. (Ikuta et al. 2022)

2.7 Extractos vegetales

La creciente resistencia a antibióticos ha provocado en los últimos años la urgencia de desarrollar nuevos agentes antimicrobianos. La OMS estima que cerca del 80 % de la población en países en desarrollo utiliza la medicina tradicional para solucionar sus problemas de salud, por la poca accesibilidad a muchos antibióticos, por eso los remedios se elaboran con hierbas, partes de animales o de minerales. (Navarrete et al. 2020)

Gracias a la efectividad que presentan algunos remedios alternativos, se han realizado diferentes estudios orientados a la búsqueda de compuestos vegetales de interés fitoquímico y farmacológico, que pueden presentar una buena actividad antimicrobiana sobre patógenos de interés global. La evaluación biológica de extractos vegetales contra diferentes grupos de bacterias, Gram positivas y Gram negativas, procedentes de aislados clínicos, es relevante, ya que es la base para encontrar curas de enfermedades que comprometen la salud de las personas. (Mishra et al. 2017)

Sakha et al. en 2018 obtuvieron extractos etanólicos de los frutos de clavo y guayaba, donde obtuvieron resultados significativos contra *E. coli* con un halo de inhibición de 11 mm con ambos extractos mientras que contra *S. aureus* tuvo un halo de inhibición de 14 mm y 16 mm respectivamente, demostrando este efecto gracias a que estas hojas eran ricas en alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides y triterpenoides a los cuales asociaron este efecto antimicrobiano.

Oyun y Oyetayo en 2020 realizaron diferentes extractos vegetales a base de agua, aceite y metanol de *Psidium guajava*, *Camellia sinensis*, *Azadirachta indica* y *Calendula officinalis* contra diferentes especies de bacterias como *Pseudomonas spp.*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Salmonella spp.* y *S. Aureus* donde encontraron que el extracto que presentaba mejores resultados fue el de la guayaba macerado en agua contra *V. parahaemolyticus* con una zona de inhibición de 22 mm mientras que en el caso de los extractos oleosos no se observó inhibición de los microorganismos. Por otro lado, en cuanto al metanol se observó solamente con el extracto de *A. indicata* contra *V. cholerae* con un halo de inhibición de 14 mm y contra *Klebsiella spp* de 16 mm obteniendo diferentes resultados dependiendo el microorganismo y el tipo de extracción utilizada. (Farjana y Kabir 2014).

Con respecto a esto, Alam et al. en 2020 determinaron que el extracto metanólico de *Barnadesia ciliata* al 1% logró inhibir la formación de biopelículas sin afectar el crecimiento microbiano, mencionando que el efecto mencionado es debido a una gran cantidad de flavonoides lo cual causa la inhibición de la formación de biopelículas. Así mismo Datta et al. En 2016 determinaron que al utilizar el extracto etanólico de *Piper betle* se obtuvo tanto una reducción de la formación de biopelículas en *P. aeruginosa*, así como también se reportó que este extracto inhibió la producción de piocianina al utilizar concentraciones de 50 µg/mL en un 7.81%, 100 µg/mL (32.54%), 150 µg/mL (66.16%) y 200 µg/mL en un (75.35%) así como también una reducción de twitching en la presencia del extracto la cual no presentó gran diferencia siendo únicamente una disminución del 10.71% después de 24 horas a una concentración de 25 µg/mL.

2.8 Contaminación por residuos vegetales

2.8.1 Desecho de residuos

En México se han buscado alternativas relacionadas con la generación de residuos y desechos para elevar la calidad de vida de sus habitantes siendo uno de los principales puntos de interés la agroindustria, la cadena de producción y servicios, buscando alternativas para su aprovechamiento. En su mayoría los residuos agroindustriales corresponden a biomasa lignocelulósica y lipídica que puede ser difícil de degradar, esta biomasa se puede aprovechar mediante procesos físicos, químicos y/o biológicos para convertirse en una materia prima con alto potencial de tener un valor agregado. (Mejías et al. 2016)

En México se genera gran cantidad de toneladas de desechos vegetales por el tipo de dieta que se posee obteniendo alrededor de 895 toneladas de residuos por día solamente en la Central de Abastos en la Ciudad de México siendo una importante cantidad las cáscaras a las cuales no se le da un tratamiento extra, solamente se desecha, en caso de ser aprovechada sólo un mínimo se utiliza como aditivo de fibra en alimentos, pero desaprovechando su alto potencial antimicrobiano y antioxidante. (Briones 2020).

Cada año en la mayoría de las ciudades del mundo se presenta una seria problemática sobre el manejo de residuos agroindustriales creciendo cada año debido a diferentes cuestiones como son el crecimiento demográfico, la concentración de la población en ciertos puntos, desarrollo de sector industrial, etc. Los residuos agroindustriales se encuentran en estado sólido o líquido que se generan a partir de productos primarios o de un procesamiento, si bien, estos residuos no se suelen utilizar para el proceso que los generó, se pueden aprovechar por otras vías. (Gutiérrez et al. 2020)

En 2014 la producción mundial de residuos agroindustriales fue de 3,045 billones de toneladas de los cuales su mayoría tuvo que ser desechado sin poder ser aprovechado en su totalidad. Estos residuos no solo involucran un gran problema de contaminación ambiental, también se requiere un gasto adicional sin un beneficio económico. (Mejías y Galáan 2016).

2.8.2 Semillas

Cvetnic y Vladimir en 2004 encontraron que el extracto etanólico de las semillas de uvas tenía gran cantidad de flavonoides, ácido ascórbico, tocoferoles, ácido cítrico y esteroides, los cuales demostraron tener una actividad antimicrobiana muy eficiente contra 20 bacterias que fueron muestreadas siendo la que presentó mejores resultados *Salmonella enteritidis* con una CMI de 2.06 mg/mL. En 2011 Pandey & Tiwari utilizaron extractos a base de semillas de limón para poder determinar su efecto antimicrobiano, donde encontraron que el extracto etanólico de las semillas de limón presentaba el mejor resultado contra *P. aeruginosa* así mismo que el extracto acuoso y el extracto metanólico no presentaban una inhibición significativa contra ninguno de los microorganismos evaluados.

2.8.3 Cáscaras vegetales

En la producción industrial, uno de los residuos que ha tenido un gran interés por su gran potencial antioxidante y antimicrobianos son las cáscaras de los productos. Para producir jugos o su consumo, en algunos casos como el de la granada que una tonelada de fruto fresco genera 669 kg de subproducto el cual el 78% es de cáscara y el 22% es la porción de la semilla lo cual el residuo no utilizado abarca más del 50% del fruto entero el cual podría transformarse en materia prima valiosa para la obtención de diferentes subproductos de interés comercial (Singh et al., 2019). Se ha encontrado que la cáscara de granada contiene alta cantidad de polifenoles principalmente taninos hidrolizables (punicalina, punicalagina, ácido elágico y gálico) así como también flavonoides como antocianinas, catequinas, así como otras sustancias complejas. Estos compuestos demostrando tener efectos beneficiosos para la salud no solo como antimicrobianos, sino también como antiinflamatorio y antioxidante (Akhtar et al. 2015).

Se han observado además actividad antimicrobiana en diferentes frutos como el extracto etanólico de cáscara de *Citrus sinensis* en cepas de *Streptococcus mutans* obteniendo una CMI de 12 mg/mL (Shetty et al. 2016). Por otro lado, Hanafy et al. en 2021 reportaron la CMI de los extractos vegetales de cáscaras de naranja y cáscaras de plátano, donde mostraron ser efectivos para inhibir bacterias gram positivas y gram negativas, especialmente el extracto etanólico de la naranja donde

no solo generaba un halo de inhibición considerable contra las bacterias, también era efectivo contra hongos como *Aspergillus niger*.

2.9 Inhibición de biopelícula

Nikolic et al. en 2014 realizaron un estudio sobre la actividad antibiopelícula de un extracto etanólico de *Zingiber officinale* contra diferentes microorganismos, se demostró que para *Proteus mirabilis* tenía el mejor efecto con una Concentración de Inhibición de Biopelícula (BIC50) de 19 mg/mL.

Por otro lado, Wijesundara & Rupasinghe 2019 probaron diferentes extractos etanólicos obtenidos de plantas medicinales como la raíz de regaliz y de flor de *Echinacea purpurea* donde observaron que estos extractos presentaron una Concentración Mínima Inhibitoria de Biopelícula entre 31.5-250 µg/mL para cepas de *Streptococcus pyogenes* siendo estos dos los que presentaron los mejores resultados entre 14 extractos que fueron analizados.

Dolatabadi et al. en 2018 hicieron una investigación sobre diferentes extractos etanólicos a base de *Juglans regia* contra *P. aeruginosa*, donde encontraron que más del 50% de bacterias aisladas de pacientes hospitalarios presentaron ser multi-resistente a antibióticos, especialmente contra Gentamicina y el 100% presentaron formación de biopelícula; reportaron que el extracto acuoso de esta planta resultó tener mejores resultados contra las células planctónicas, mientras que los extractos metanólico y etanólico presentaron mejores resultados para inhibir la producción de biopelícula de estas cepas siendo de 65 y 51% con una concentración de 100 y 75 µg/mL respectivamente

2.10 Nanoencapsulación

Si bien se ha demostrado que los extractos alcohólicos vegetales han tenido gran efecto contra diversos patógenos de gran interés, han mostrado tener una gran cantidad de desventajas; los polifenoles son sensibles a diferentes condiciones ambientales como puede ser la luz, oxígeno, pH, entre otras cosas; por lo que investigaciones recientes han demostrado que mediante una nanoencapsulación es posible proteger los extractos para poder protegerlos de las diferentes condiciones ambientales y mejorar su efecto. (Rezaei et al. 2019)

Se ha documentado que la encapsulación de algunos compuestos con alto contenido en compuestos fenólicos mejora su potencial antimicrobiano contra diferentes bacterias patógenas tanto Gram negativas como Gram positivas. (Matouskova et al. en 2016). En otro artículo por Madureira et al. en 2015 se mencionó que nanopartículas cargadas con quitosano que contenían polifenoles extraídos por maceración tenían un mejor efecto contra algunos patógenos alimentarios (*E. coli* O157:H7 y *B. cereus*) comparados con los extractos crudos.

Lawrence & Rees en el año 2000 mencionaron que los compuestos bioactivos pueden preservar y mejorar las funciones fisicoquímicas y sobre todo mejorar la liberación de estos compuestos (Mohammadi et al. 2016). Assadpour et al. en 2016 optimizaron la nanoencapsulación de ácido fólico a través de una nanoemulsificación W/O/W y protegiendo sus nutrientes como vitaminas y componentes medicinales que normalmente son afectados por condiciones ambientales.

Además, la encapsulación logra hacer imperceptibles sabores astringentes y amargos pudiendo ser aplicados directamente en algunos alimentos para mejorar sus propiedades organolépticas para mejorar su vida de anaquel. (Fang y Bhandari 2010).

Se ha estudiado la encapsulación de diferentes extractos en alginato de calcio mostrando tener buena eficiencia de encapsulación, un tamaño adecuado, así como un efecto significativo contra diferentes tipos de microorganismos. (Najafi-Soulari et al. 2016)

Las nanoemulsiones constituyen dos líquidos inmiscibles los cuales se encuentran dispersos uno en otro, el tamaño de la gota que se obtiene puede ser desde 50 a 1000 nm. Estos sistemas coloidales permiten encapsular los compuestos bioactivos en cantidades significativas (Azón 2011). Estos compuestos lipofílicos pueden ser encapsulados en aceite en agua emulsión, mientras que los compuestos hidrofílicos pueden ser encapsulados en agua en aceite o agua en aceite en emulsión. Para poder mejorar la estabilidad de las emulsiones, se pueden utilizar surfactantes, fosfolípidos, proteínas, polisacáridos, entre otros.

Mediante el uso de nanoacarreadores se puede incrementar el potencial antimicrobiano de aceites esenciales promoviendo la interacción celular establecida con los patógenos siendo esto una manera de aumentar la actividad antimicrobianos siendo un método novedoso para combatir la resistencia a antibióticos (Pisoschi et al. 2018)

La nanoencapsulación puede ayudar a preservar las propiedades fitoquímicas, así como también puede mejorar la disponibilidad de estos. Assadpour et al. 2017 optimizaron la nanoencapsulación de ácido fólico y protegieron sus propiedades benéficas como la vitamina A, así como también sus componentes medicinales para ayudar a prevenir la pérdida de polifenoles. El alginato es un biopolímero que se utiliza comúnmente para la encapsulación de diferentes compuestos, es fácil conseguirlo, tiene un bajo costo y no presenta toxicidad. La encapsulación de diferentes extractos vegetales en alginato de calcio ha tenido muy buenos resultados. (Arriola et al. 2016)

Existen dos diferentes métodos para la preparación de nano partículas de alginato, la complejación y la emulsificación de alginato en aceite. El complejo que se forma puede ocurrir tanto en solución acuática como en la interfaz de la fase de aceite. El proceso sigue añadiendo un unificador químico como es el cloruro de calcio o mezclando alginato con un polielectrolito cargado negativamente como es el quitosano (Kavoosi et al. 2018).

2.10.1 Nanoencapsulación de extractos alcohólicos

Se ha reportado que nanopartículas de PLGA que contienen extractos etanolicos de *Campomanesia pubescens* mostró inhibición de crecimiento de *Listeria innocua* y la reducción considerable de algunas bacterias que reaccionaban al oxígeno, mostrando una reducción del 33% la CMI de *Listeria* debido a que tenía una liberación prolongada. (Pereira et al. En 2018). Oliveira et al. en 2017 realizaron la nanoencapsulación con PLGA para probar su potencial antimicrobiano, donde presentaron una mejora significativa del extracto etanólico de la fruta de la pasión contra *L. monocytogenes* y *E. coli* donde mostraron una CMI de 8000 ug/mL mientras que los extractos encapsulados mostraron una CMI de 421 µg/mL y 585 µg/mL contra *L. monocytogenes* y *E.coli* respectivamente debido a que los extractos libres tienen una baja solubilidad en agua por lo que se dificulta su interacción con los microorganismos en suspensiones acuosas.

Una de las ventajas de utilizar PLGA es que algunos compuestos hidrofóbicos o extractos tienen dificultad para acceder a las células bacterianas en un medio acuoso por lo que facilitan su distribución. (Ravichandran et al. 2011)

Por otro lado, el PLGA no solo sirve como medio para distribuir, sino, también se ha documentado que el PLGA al comenzar a degradarse produce productos ácidos lácticos (Wischke y Schwendeman 2008) que reducen el pH del medio circundante lo que aumenta la naturaleza hidrofóbica de los extractos etanólicos y permite que ingresen de manera más eficiente a través de los lípidos en la membrana celular o que se adhieran a las regiones hidrofóbicas de las proteínas de membrana. (Nazzaro et al. 2013)

Uno de los componentes principales de las nanocápsulas con PLGA es la presencia del PVA que forma la estructura de la nanocápsula, mostraron que al ser un producto con una alta bioadhesividad, pueden mejorar la adhesión y la absorción de los compuestos antimicrobianos en las células. (Stevanovic y Uskokovic 2009).

Cezarotto et al. en 2023 obtuvieron nanocápsulas de un extracto a base de *Vaccinium ashei* obteniendo nanocápsulas de 200 nm y un PDI debajo de 0.2 indicando una distribución homogéneas obteniendo un valor potencial Z aproximadamente de +8.8 mV utilizando Eudragit® RS100, usaron este polímero ya que tiene la ventaja de permanecer gran tiempo en tejidos y por lo tanto una liberación más prolongada obteniendo además una eficiencia de encapsulación del 92% utilizándolo en este caso para preservar las propiedades antioxidantes y antidepresivas de este extracto.

Rahnemoon et al. en 2021 realizaron una nanoencapsulación de cáscara de granada donde encontraron que en la prueba de difusión de agar el extracto que fue nanoencapsulado presentó un halo de inhibición mayor que el extracto etanólico sin nanoencapsular indicando que al ser nanoencapsulado el extracto aumenta su biodisponibilidad y solubilidad remarcando que la actividad antimicrobiana varía dependiendo del tipo de encapsulación, el microorganismo o el material de la encapsulación. Pero mostrando que para las bacterias Gram negativas la encapsulación resultó ser mejor que contra bacterias gram positivas indicando además que el potencial antimicrobiano de los polifenoles contra bacterias gram negativas ha presentado muy buenos resultados.

2.10.2 Nanoencapsulación contra biopelículas

Rahmani et al. 2024 realizaron un experimento para determinar la capacidad de un extracto etanólico de *Urtica dioica* donde utilizaron cristal violeta al 1% para teñir la biopelícula determinando que el extracto etanólico redujo en gran medida su formación en *Klebsiella pneumoniae* en un 78.50% así como también de *Salmonella Typhymurium* en un 73% .Vidallon y Teo en 2020 obtuvieron nanocápsulas de quitosano determinando que sus nanocápsulas actúan inhibiendo el quorum sensing de las bacterias lo que previene la formación de biopelícula y por lo tanto menor resistencia contra los tratamientos a los que se somete una bacteria. Por otro lado, Bouaouina et al. en 2022 obtuvieron nanocápsulas de carvacrol obteniendo un antimicrobiano que al ser encapsulado presentaba una MIC muy similar a la del extracto libre pero que al ser sometida a una concentración subinhibitoria mantenía mayor tiempo el efecto de reducción de biopelícula contra *Acinetobacter baumani* y *S. aureus* tanto a las 24 como las 48 horas.

Pereira et al. en 2018 realizaron la comparación de nanopartículas de PLGA cargadas con extracto etanólico de semillas de guayaba donde encontraron un tamaño de partícula de 144.8 nm y un índice de polidispersidad de 0.43 mostrando tener un mejor efecto al momento de ser colocadas disminuyendo su efecto considerablemente a las 12 horas de ser colocadas mostrando tener efecto antimicrobiano contra *L. innocua*, mientras que sin un tratamiento de nanoencapsulación no se pudo observar un efecto antimicrobiano utilizando una formulación con una relación de 50:50 de PLGA con el extracto vegetal, 2 ml de diclorometano, 0.3 g/100 ml de PVA siendo homogenizado a 13,000 rpm por 2 minutos.

3. JUSTIFICACIÓN

La creciente problemática de la resistencia antimicrobiana representa uno de los principales desafíos en salud pública a nivel mundial, debido a la disminución en la eficacia de los antibióticos convencionales y al limitado desarrollo de nuevos fármacos. En este contexto, surge la necesidad de explorar alternativas terapéuticas que contribuyan al control de microorganismos resistentes. Los extractos vegetales han demostrado un amplio potencial como agentes antimicrobianos, ya que contienen diversos metabolitos secundarios bioactivos con propiedades antibacterianas, antioxidantes y antiinflamatorias, entre otras. Particularmente, los subproductos vegetales generados por la industria agroalimentaria constituyen una fuente abundante y poco aprovechada de estos compuestos, presentando en algunos casos concentraciones superiores a las del fruto fresco. Sin embargo, dichos residuos suelen ser descartados o incinerados, generando impactos ambientales negativos. A pesar de sus beneficios, la aplicación de extractos vegetales puede verse limitada por su inestabilidad frente a factores como la temperatura, la luz y la oxidación. Por ello, la nanoencapsulación se plantea como una estrategia innovadora para mejorar la estabilidad, biodisponibilidad y eficacia de estos compuestos, permitiendo no solo potenciar su actividad antimicrobiana, sino también promover el aprovechamiento sustentable de subproductos agroindustriales y generar valor agregado dentro de un enfoque de economía circular.

4. HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos de subproductos vegetales nanoencapsulados presentarán mayor estabilidad, y una actividad antimicrobiana y antibiopelícula significativamente superior frente a *P. aeruginosa* nosocomial multirresistente a antibióticos, en comparación con los extractos no encapsulados.

5. OBJETIVOS DEL TRABAJO

5.1 Objetivo general

Caracterizar la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de subproductos vegetales nanoencapsulados en cepas de *P. aeruginosa* nosocomiales

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* mediante la técnica del antibiograma, con el fin de determinar su nivel de resistencia frente a antibióticos de uso clínico.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de diferentes subproductos vegetales mediante pruebas de difusión en agar con el fin de determinar los extractos que presenten mayor efecto inhibitorio.
3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos etanólicos de subproductos vegetales seleccionados.
4. Analizar el efecto de los extractos sobre la formación de biopelículas en cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* mediante bioensayos microbiológicos, con el fin de evaluar su potencial antibiopelícula.
5. Establecer las condiciones óptimas de nanoencapsulación del extracto seleccionado mediante un sistema de doble encapsulación determinando parámetros como tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI).
6. Comparar la actividad antimicrobiana y antibiopelícula de los nanoencapsulados frente a los extractos en forma libre contra cepas nosocomiales de *Pseudomonas aeruginosa*, a fin de determinar la existencia de diferencias significativas entre ambos tratamientos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Colecta de subproductos

Los frutos se obtuvieron de mercados locales del municipio de San Nicolás de los Garza, Nuevo León. Posteriormente fueron trasladados al laboratorio de Química Analítica de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL). En el laboratorio los frutos fueron lavados con agua corriente. Después, se retiró la cáscara de *P. granatum* y *C. limon*, así como las semillas de *P. guajava*. En el caso de las hojas de *H. sabdariffa*, estas fueron sometidas a cocción en agua hirviendo durante 10 minutos, dado que este es el tratamiento tradicional previo a su consumo como bebida. Los subproductos obtenidos se colocaron en una estufa a 55 °C hasta alcanzar peso constante. Posteriormente, cada subproducto fue triturado en un molino (Bogner BCG01, BOGNER, Munich, Alemania), empacado al vacío y colocado en oscuridad hasta su uso.

6.2 Preparación de los extractos de plantas

Los extractos se prepararon de acuerdo con el método descrito por Sanchez et al. (2016) con algunas modificaciones. Se utilizó etanol al 96% como solvente. Para ello se pesaron 100 g de cada subproducto seco en una balanza analítica y el material se colocó en frascos Erlenmeyer de 1000 mL a los cuales se les añadieron 500 mL de etanol al 96 %. Cada muestra se dejó en maceración durante 48 horas a temperatura ambiente, con agitación manual cada 24 horas. Posteriormente, los extractos se filtraron utilizando papel Whatman No.1. El solvente fue recuperado mediante evaporación mediante un rotavapor (Heidolph Rotatory Evaporator Laborota 4003, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) bajo presión reducida. Finalmente, los extractos concentrados fueron colocados en tubos protegidos de la luz y almacenados a 4 °C hasta su uso.

6.3 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en esta investigación (seis aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*) fueron proporcionadas por la Dra. Licet Villarreal Treviño del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas. Dichas cepas fueron previamente recolectadas de pacientes,

identificadas y caracterizadas en un estudio anterior; por lo tanto, en el presente trabajo, no se tuvo contacto directo con pacientes, ni con muestras clínicas. Todas las cepas se conservaron en tubos con agar Mueller-Hinton a 4 °C hasta su uso. Previo a cada ensayo, las bacterias fueron activadas sembrando una colonia en 5 mL de caldo Mueller-Hinton, incubándose durante 24 horas a 35°C $\pm$ 2°C.

6.4 Ensayo de susceptibilidad a antibióticos

La susceptibilidad bacteriana fue evaluada mediante el método de difusión en disco, de acuerdo con la técnica de Kirby-Bauer (Balfe et al., 2023). Las cepas previamente activadas fueron sembradas por extensión en placas de agar Mueller-Hinton (MH); subsecuentemente, los discos que contenían los antibióticos fueron colocados en la superficie de las placas de agar MH, incubándose a 35 °C $\pm$ 2 °C de 16 a 18 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación, los halos de inhibición fueron medidos en milímetros, utilizando una regla. (Pérez et al., 2023) Los antibióticos evaluados fueron Amikacina (AK) 30 µg, Ampicilina (AM) 30 µg, Cefalotina (CF) 30 µg, Cefotaximina (CFX) 30 µg, Dicloxacilina (DC) 1 µg, Ceftriaxona (CTX) 30 µg, Cloranfenicol (CL) 30 µg, Gentamicina (GE) 10 µg Netilmicina (NET) 30 µg, Nitrofurantoína (NF) 300 µg, Penicilina (PE) 10 U, y Sulfametaxol/Trimetoprim (STX) 25 µg.

6.5 Ensayo de difusión en agar

La actividad antimicrobiana de los extractos se determinó mediante la técnica de difusión en agar (Carrilho, 2025) Donde cada cepa fue sembrada por extensión en placas de agar MH con la ayuda de un asa de Digralsky. Posteriormente, se realizaron pozos en el agar utilizando un tubo estéril de 8 mm de diámetro. En cada pozo se depositaron 100 µL de los extractos (Cáscara de limón: 179 mg/mL, semilla de guayaba: 120 mg/mL, cáscara de piña: 130 mg/mL, cáscara de jícama 143: mg/mL y hoja de jamaica: 159 mg/mL), mientras que el control consistió en etanol al 96 %. Las placas se incubaron durante toda la noche a 35 °C $\pm$ 2 °C. Al término del periodo de incubación los halos de inhibición fueron medidos en milímetros. (Pérez et al. 2023)

6.6 Determinación de CMI y CMB

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se determinó mediante el método de dilución en microplaca (Montoya, 2025). Para ello, se evaluaron diferentes concentraciones de los extractos en caldo MH inoculado al 1% con las cepas bacterianas previamente activadas. Las placas fueron incubadas durante 18 h a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. La CMI, expresada en mg/mL, fue definida como la concentración más baja en la que no se observa crecimiento visible del microorganismo evaluado.

Para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB), se tomó una alícuota de 25 μL de cada pocillo que no presentó crecimiento visible y se sembró por goteo en placas de agar MH. Posteriormente, las placas fueron incubadas bajo las mismas condiciones antes mencionadas. La CMB se definió como concentración más baja del extracto capaz de eliminar al 99.9% de los microorganismos evaluados, evidenciado por la ausencia de crecimiento visible.

6.7 Prueba concentración subinhibitoria

Se realizó una prueba de concentraciones subinhibitorias tomando como referencia el valor obtenido de la CMB determinado previamente para cada bacteria. Para ello, se sembró 1 μL de cada cepa previamente activada en caldo MH, en un pozo de una microplaca al cual se le añadió 99 μL de caldo MH, además de concentraciones equivalentes al 75%, 50% y 25% de la CMB de cada extracto. Cada concentración se evaluó por cuadruplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados. Posteriormente, se inocularon 100 μL de cada dilución por extensión en placas con agar MH, las placas se incubaron durante 18 h a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para evaluar el efecto de las concentraciones subinhibitorias sobre el crecimiento bacteriano y la posible expresión de sus factores de virulencia. (Sánchez et al. 2016)

6.8 Inhibición de la formación de biopelícula

La inhibición de la formación de biopelículas se determinó mediante el método de microtitulación y tinción mediante cristal violeta (Molina et al., 2022). Se colocaron 180 μ l de caldo MH, a los que se les agregaron los volúmenes correspondientes de los extractos a concentraciones subinhibitorias hasta alcanzar un volumen final de 200 μ l. Las placas se incubaron durante 24 h a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se utilizaron un control positivo y un control negativo, evaluados por triplicado. Para cuantificar la inhibición de la biopelícula, la suspensión bacteriana fue retirada cuidadosamente y los pozos se lavaron tres veces con agua destilada. Posteriormente las placas fueron secadas a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, se añadió cristal violeta (0.1 %) dejando actuar por 15 minutos. El colorante fue retirado y los pozos se lavaron 5 veces con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante. Finalmente, se agregaron 200 μ l de etanol al 96 %, dejándolo reposar durante 15 minutos. La absorbancia se determinó en un lector de microplacas (Agilent BioTek Epoch Microplate Spectrophotometer) a una densidad óptica de 595 nm. La formación de biopelículas fue directamente proporcional a la absorbancia registrada, donde a mayor densidad óptica mayor formación de biopelícula.

6.9 Elaboración de nanopartículas RLPO

Las nanopartículas (NP) se obtuvieron mediante un método de doble emulsión (W1/O/W2) basado en la metodología de Chong Cerda *et al.* (2020), con algunas modificaciones.

Inicialmente, se preparó la fase acuosa incorporando 300 microlitros del extracto disuelto en etanol al 96%, a una concentración de 100 mg/mL (W1), a una fase orgánica (O) compuesta por 50 mg de EUDRAGIT® RLPO disueltos en 4 mL de diclorometano (DCM). Para preparar la emulsión primaria (W1/O), la mezcla fue homogenizada por sonicación (Ultrasonic Branson 2510MT, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) durante 5 min.

Posteriormente, la primera emulsión (W1/O) se añadió a 12.5 mL de la fase acuosa externa (W2) compuesta por 6,5 mL de un sistema disolvente (4.14 mL de etanol, 1.7 mL de agua destilada y 0.66 mL de DCM) y 6 mL de alcohol polivinílico (PVA) al 8% p/v. La emulsión W1/O/W2 se agitó a 2000 rpm durante 15 min utilizando un agitador Eurostar Power-B Ika® Werke, (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Posteriormente, se añadieron 4 mL adicionales de PVA al 8% y la mezcla se agitó a 2000 rpm durante 5 min, A continuación, se sometió a homogenización a 30,000 rpm durante 10 min dejando descansar el equipo 1 minuto por cada minuto activo dando un total de 5 min de agitación con un homogeneizador Ika® T10 basic Werke, (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Finalmente, el solvente orgánico se eliminó de la emulsión mediante evaporación a presión reducida con un rotavapor (Heidolph Rotatory Evaporator Laborota 4003, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las nanopartículas obtenidas fueron purificadas mediante agitación a 100 rpm a una temperatura de 30 °C durante 11 min.

6.10 Caracterización de las nanocápsulas

La caracterización de las nanocápsulas se realizó considerando tres parámetros principales: tamaño de partícula (nm), índice de polidispersidad (PDI) y el potencial Z para evaluar la carga superficial y la estabilidad del sistema.

Para su evaluación se tomaron 0.4 ml del lote de nanocápsulas cargadas que se diluyeron en 1 mL de agua destilada. Las muestras fueron analizadas mediante espectroscopia de correlación de fotones con un equipo Zetasizer Nano-Zs90 (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido).

Para determinar la eficiencia de encapsulación final, las formulaciones se sometieron a centrifugación a 25 000 rpm a 4 °C durante 4 horas. Posteriormente, se cuantificó el extracto encapsulado dentro de las nanocápsulas y el extracto libre presente en los sobrenadantes. El análisis cuantitativo se realizó mediante espectrofotometría UV-Vis utilizando un equipo GENESYS 10S (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

La eficiencia de encapsulación (EE%) y la carga de extracto (CE %) fueron calculadas con base en Álvarez et al. en 2025 mediante las fórmulas:

$$EE\% = \frac{EX_E}{EX_{Y_0}} \times 100$$

Donde EX_{Y_0} es la masa del extracto inicial y EX_E la masa del extracto que fue encapsulado.

$$CE\% = \frac{M_E}{M_N} \times 100$$

MN corresponde a la masa total de las nanopartículas y ME a la masa del extracto nanoencapsulado.

6.11 Evaluación de las nanocápsulas

Para evaluar el efecto de las nanocápsulas se emplearon las mismas metodologías descritas previamente para la determinación de la CMI/CMB, y la inhibición de la formación de biopelícula bajo las mismas condiciones para determinar si existe diferencia entre los tratamientos.

6.12 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos se analizaron con el software Open Stat. Con el cual, se aplicó un análisis de Varianza de un Factor (ANOVA) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos.

Cuando se detectaron diferencias estadísticamente significativas, se realizó una prueba post hoc de Tukey para determinar las diferencias específicas entre las combinaciones de los grupos analizados, En todos los casos se consideró un nivel de significancia del 95% ($p \leq 0.05\%$).

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización de la susceptibilidad antimicrobiana de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*

En la **Tabla 1** se presentan los resultados correspondientes al perfil de susceptibilidad antimicrobiana de las cepas multirresistentes de *P. aeruginosa* frente a los antibióticos incluidos en el antibiograma. Los resultados muestran la respuesta de las cepas evaluadas, lo que permite identificar los patrones de resistencia y sensibilidad observados para cada antibiótico analizado donde las cepas que presentan un halo de inhibición >22 mm indica que la bacteria es susceptible contra ese antibiótico, un halo de 18-21 mm indica resistencia intermedia y un halo de inhibición ≤ 17 mm se considera como resistente. En base a esto, las bacterias que presentaron mayor resistencia fueron la cepa 14-1298 y 41-9123 ya que de todos los antibióticos evaluados no presentaron efecto bactericida, mientras que las 4 cepas restantes 7 antibióticos fueron los que no tuvieron ningún efecto. La cepa 14-1298 presentó resistencia contra gentamicina mientras que es susceptible a la amikacina. La cepa 41-9123 presenta una resistencia tanto a la gentamicina como a la amikacina.

De las cepas que presentaron menor resistencia, la bacteria 14-1334 presentó resistencia contra GE, AK, NF y SXT mientras que presentó susceptibilidad contra CL. La bacteria 14-1284 presentó resistencia contra NF y SXT mientras una resistencia intermedia contra GE, AK y CL.

La cepa 14-1285 tuvo resistencia contra GE, AK, NF y SXT mientras que fue susceptible contra CL. Por último, la cepa 14-1422 tuvo resistencia contra GE, AK, NF y SXT mientras que presentó susceptibilidad contra CL.

Tabla 1. Diámetros de los halos de inhibición (cm) de los diferentes antibióticos utilizados frente a las cepas de *P. aeruginosa*.

Cepa	GE	AK	NF	CL	SX T	NE T	PE	AM	CFX	DC	CF	CXT
14-1298	1.7	2.2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
14-1334	1.6	1.6	1.7	2.5	1.5	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
14-1284	1.8	2	1.5	2	1.7	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
14-1285	1.6	2	1.7	2.3	1.7	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
14-1422	1.7	1.7	1.5	2.3	1.7	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
41-9123	1.8	1.6	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

NI=No inhibió

Antibióticos presentes en el antibiograma: Gentamicina (GE), Amikacina (AK), Nitrofurantoína (NF), Ampicilina (AM), Cefalotina (CF), Cefotaxima (CFX), Dicloxacilina (DC), Ceftriaxona (CTX), Cloranfenicol (CL), Netilmicina (NET), Penicilina (PE), Sulfametoxazol/Trimetoprim (SXT)

Las Figuras 1 y 2 muestran pruebas de susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco (Kirby-Bauer). En ambas figuras se puede observar el crecimiento bacteriano con discos impregnados de diferentes antibióticos lo que permite evaluar presencia o ausencia de halos de inhibición en cada disco.

La **Figura 1.** presenta halos de inhibición variable alrededor de algunos discos, lo que indica que para cada antibiótico se presenta una sensibilidad diferente para cada antimicrobiano. Sin embargo, en unos discos el crecimiento alcanza el borde del disco, lo cual sugiere una alta susceptibilidad a dichos antibióticos. Mientras que para algunos halos de inhibición se observa un pequeño halo casi indistinguible lo que significa una alta resistencia, característica de cepas multirresistentes de *P. aeruginosa*, que se caracterizan por tener una respuesta variable a diferentes tipos de antibióticos

En la **Figura 2.** se observa un patrón similar, con halos de inhibición reducidos, amplios y ausentes, por lo que se confirma un patrón de resistencia variable. La variabilidad refleja diferente eficacia de los agentes antimicrobianos frente a esta cepa específica evaluada.

Desde el punto de vista microbiológico, una reducción o ausencia de un halo de inhibición se relaciona con diferentes mecanismos de resistencia contra antimicrobianos, los cuales pueden ser producción de β -lactamasas, permeabilidad de la membrana, bombas efflux o el mecanismo que más comúnmente se menciona en la literatura la formación de una biopelícula que evita que el

antimicrobiano interactúe con las bacterias dentro de la matriz de exopolisacáridos, mecanismos comúnmente asociados a *P. aeruginosa*



Figura 1. Prueba de resistencia contra antibióticos mediante el uso de un antibiograma. (8) Cepa 14-1298

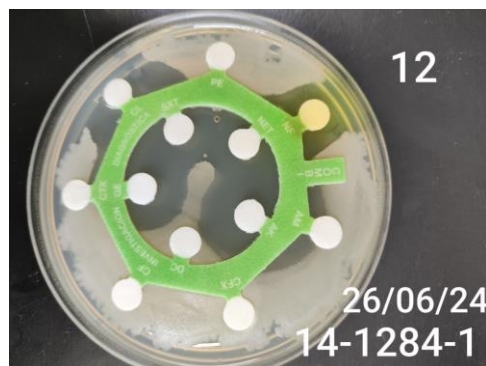


Figura 2. Prueba de resistencia contra antibióticos mediante el uso de un antibiograma. (2) 14-1284

7.2 Determinación de la actividad antimicrobiana de subproductos vegetales

Con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes subproductos de origen vegetal, se realizó la obtención de los extractos secos de cada material vegetal previo a su análisis microbiológico.

En la **Tabla 2** se presentan los rendimientos secos obtenidos de cada subproducto vegetal posterior a su proceso de lavado, corte y molienda presentando los resultados en gramos de materia seca por cada kilogramo de materia húmeda.

Tabla 2. Rendimiento seco (g/Kg de materia húmeda) de los subproductos vegetales

Subproducto vegetal	Gramos de materia seca
Cáscara de limón (CL)	225
Semilla de guayaba (SG)	880
Cáscara de granada (CG)	240
Cáscara de piña (CP)	157
Cáscara de jícama (CJ)	160
Hoja de jamaica (HJ)	210

La **Figura 3** muestra el proceso de obtención de subproductos vegetales a partir de la fruta fresca, en primer lugar, se compraron los productos en supermercados locales del estado de Nuevo León para posteriormente ser lavados y desinfectados. Posterior a esto, se separó el fruto del subproducto ya sea cáscara, semillas o bagazo se pesaron y fueron deshidratadas hasta eliminar la mayor cantidad de humedad posible realizando otro pesaje para obtener los resultados de la **Tabla 2**, donde se obtuvieron los rendimientos por kg de materia seca por cada kg de materia vegetal húmeda.

Los subproductos fueron molidos hasta obtener una harina fina la cual fue macerada por 48 horas a temperatura ambiente con agitación cada 24 horas obteniendo que la semilla de guayaba fue la que presentó mejor rendimiento perdiendo muy poca cantidad de agua seguido de los subproductos restantes los cuales no superaban la cuarta parte de peso en relación con su estado húmedo por lo que si se observa una gran concentración de humedad en estos.

Una vez que se obtuvieron los extractos macerados fueron colocados en un rotavapor donde se pudo concentrar estos extractos para que se eliminara la mayor cantidad de etanol posible y finalmente los extractos fueron colocados en refrigeración a 4°C con una cubierta de aluminio para protegerlos de la luz hasta ser utilizados como se observa en la **Figura 4**.

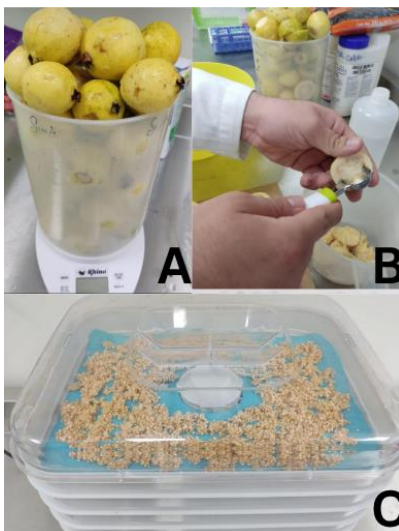


Figura 3. Procesamiento del fruto para la obtención del extracto etanólico de los subproductos vegetales. (A) Lavado y desinfección del fruto. (B) Separación del fruto y el subproducto. (C) Secado del subproducto para su molienda.

Después de obtener los extractos vegetales de los diferentes productos, se obtuvo su concentración en mg/mL como se observa en la **tabla 3**, donde se enlista la concentración de los extractos etanólicos obtenidos mediante maceración con una agitación cada 24 horas por 48 horas y su posterior evaporación mediante el uso de un rotoevaporador donde el extracto de granada fue el que presentó la mayor concentración por gramo en cada mililitro seguido de la cáscara de limón y la hoja de jamaica.



Figura 4. Obtención de los extractos etanólicos vegetales. (A) Maceración de la harina obtenida del procesamiento de la muestra. (B) Filtrado del extracto posterior a la maceración. (C) Obtención del extracto concentrado.

Tabla 3. Concentración de los extractos etanólicos obtenidos mediante maceración con etanol.

Extracto etanólico	Concentración (mg/mL)
Cáscara de limón (CL)	170
Semilla de guayaba (SG)	120
Cáscara de granada (CG)	217
Cáscara de piña (CP)	130
Cáscara de jícama (CJ)	143
Hoja de jamaica (HJ)	159

En la **Tabla 4** se muestran los diámetros de halo de inhibición (cm $\pm$ desviación estándar) que fueron obtenidos mediante la prueba de difusión en pozo para utilizando diferentes extractos etanólicos vegetales frente a seis cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Los resultados muestran diferencias significativas en la actividad antimicrobiana que depende del extracto etanólico evaluado, así como también la cepa bacteriana probada.

El extracto **HJ** fue la que presentó la mayor actividad inhibitoria global, mostrando halos de inhibición amplios en todas las cepas evaluadas (entre 1.86 y 2.76 cm), lo que sugiere una actividad antimicrobiana consistente y de amplio espectro frente a *P. aeruginosa*

El extracto **CG** también mostró actividad relevante en todas las cepas, con diámetros superiores a 1.87 cm, lo que se interpreta como una inhibición considerable.

Por su parte, el extracto **CL** presentó actividad moderada en todas las cepas, pero teniendo resultados variables entre las diferentes cepas bacterianas.

En contraste, los extractos **SG**, **CP** y **CJ** mostraron actividad inferior o selectiva, que se puede observar por la presencia de “NI” (No Inhibió) en algunas cepas, lo que indica ausencia de efecto antimicrobiano detectable bajo las condiciones del ensayo.

La variabilidad observada en el efecto inhibitorio de los antimicrobianos evaluado entre diferentes cepas de la misma bacteria se sugiere que es ocasionado por diferencias en los mecanismos de resistencia intrínseca o adquirida de *P. aeruginosa*, tales como producción de biopelícula, producción de enzimas inactivadoras, bombas de expulsión o modificación en la permeabilidad de la membrana externa.

En la **Figura 5**, correspondiente a la prueba de difusión en pozo, se observan visualmente los halos de inhibición generados por los extractos etanólicos en las cepas 14-1298 y 14-1285, confirmando macroscópicamente los resultados cuantificados en la tabla 4 con la cepa 14-1298 como

representante de las bacterias más resistentes contra 14-1285 que representa a las cepas menos resistentes como se había mencionado anteriormente.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los diferentes extractos vegetales frente a las diferentes cepas de *P. aeruginosa*
Diámetro de halo de inhibición $\pm$ desviación estándar (cm)

Extr acto	14-1334	14-1284	41-9123	14-1298	14-1422	14-1285
CL	2.03 $\pm$ 0.06	1.90 $\pm$ 0.15	1.3 $\pm$ 0.05	1.30 $\pm$ 0.17	2.67 $\pm$ 0.15	2.10 $\pm$ 0.17
SG	1.40 $\pm$ 0.17	1.60 $\pm$ 0.10	NI	NI	NI	1.50 $\pm$ 0.36
CG	2.43 $\pm$ 0.29	2.51 $\pm$ 0.27	1.87 $\pm$ 0.15	1.87 $\pm$ 0.15	1.87 $\pm$ 0.15	2.43 $\pm$ 0.15
CP	NI	1.40 $\pm$ 0.10	NI	NI	NI	NI
CJ	2.03 $\pm$ 0.06	2.06 $\pm$ 0.59	NI	NI	2.10 $\pm$ 0.17	2.06 $\pm$ 0.57
HJ	2.76 $\pm$ 0.15	2.56 $\pm$ 0.15	2.53 $\pm$ 0.12	1.90 $\pm$ 0.17	1.86 $\pm$ 0.15	2.47 $\pm$ 0.15

NI=No Inhibió

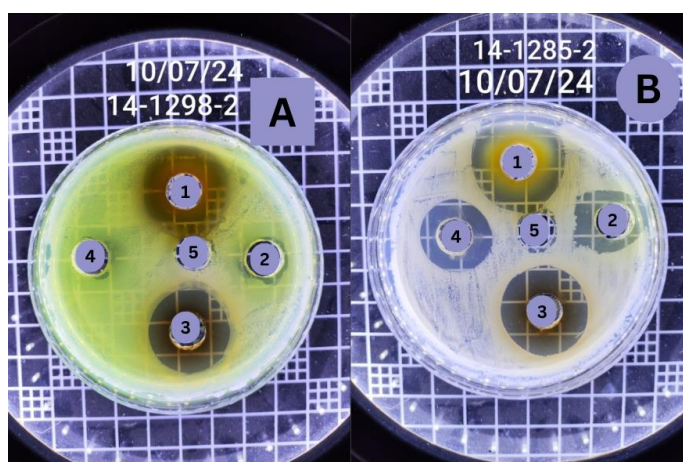


Figura 5. Prueba de pozo de los diferentes extractos etanólicos. (A) Cepa 14-1298. (B) Cepa 14-1285. (1:CG, 2: CP, 3:HJ, 4:CL)

7.3 Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Bactericida de los extractos etanólicos de residuos vegetales

En la **Tabla 5** se muestran los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI $\pm$ desviación estándar, expresada en mg/ml) de los extractos vegetales CG, CJ y HJ frente a las seis cepas clínicas evaluadas de *P. aeruginosa*. Los resultados obtenidos corroboran la eficiencia diferencial observada en las pruebas de difusión en agar, lo que permite cuantificar de manera correcta la efectividad de cada extracto la cual de igual manera presenta diferencias dependiendo del extracto y la cepa evaluada de la misma manera que la prueba de difusión en agar.

El extracto **CG** fue el que presentó la mayor potencia específica, fue el que presentó las concentraciones inhibitorias más bajas en cepas como la 14-1284 (0.49 mg/mL) y la 13-1422 (0.51 mg/mL). Mostrando una reducción de la eficacia en la cepa 41-9123 y la cepa 14-1298 lo que corresponde con las pruebas de los antibiogramas con estas cepas que fueron las más resistentes a los tratamientos.

El extracto **CJ** presentó una eficiencia heterogénea, con una CMI más elevada con relación a la **CG** presentando de igual manera resultados consistentes en relación con las cepas bacterianas más resistentes y las más susceptibles con un rango constante (1.05-1.26 mg/mL) para las cepas más susceptibles mientras que para las cepas más resistentes presentó un rango más alto (6.44-8.92 mg/mL).

El extracto **HJ** fue el que presentó el efecto más bajo que si bien es considerable, es ligeramente menos eficiente que **CJ** y aún más bajo que **CG**

La efectividad de los extractos como se observa depende en gran medida tanto del extracto utilizado como las cepas evaluadas, esto debido a que como se puede observar, presentan resultados homogéneos dependiendo el nivel de resistencia de las cepas, esto acompañado de los factores de virulencia de las bacterias que les confieren la resistencia contra los antibióticos adquirida.

Tabla 5. CMI de las diferentes cepas de *P. aeruginosa* contra los diferentes extractos vegetales
CMI $\pm$ desviación estándar (mg/ml)

Extracto	41-9123	14-1284	14-1334	14-1422	14-1285	14-1298
CG	5.27 $\pm$ 1.7 2	0.49 $\pm$ 0.0 5	0.66 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.03	1.26 $\pm$ 0.42	4.18 $\pm$ 0.29
CJ	8.92 $\pm$ 0.0 1	1.12 $\pm$ 0.0 3	1.05 $\pm$ 0.02	1.16 $\pm$ 0.08	1.26 $\pm$ 0.22	6.44 $\pm$ 0.11
HJ	9.24 $\pm$ 0.0 2	1.23 $\pm$ 0.0 1	0.94 $\pm$ 0.01	1.11 $\pm$ 0.10	1.19 $\pm$ 0.04	7.81 $\pm$ 0.10

En la **Tabla 6.** se presentan los valores de la Concentración Bactericida Mínima (CBM $\pm$ desviación estándar, mg/ml) de los extractos **CG**, **CJ** y **HJ** frente a las seis cepas de *P. aeruginosa*. Estos resultados no solo permiten determinar la capacidad de inhibir el crecimiento, sino también ver el potencial citotóxico real de los extractos vegetales sobre el patógeno.

El extracto **CG** fue el que presentó la mayor potencia bactericida de los tres extractos evaluados. Presentó valores inferiores frente a las cepas más resistentes como la cepa 41-9123 (4.47 mg/mL) que fue significativamente superior a las cepas más susceptibles como la cepa 14-1334 (0.28 mg/mL)

El extracto **CJ** si bien mostró una efectividad considerable frente a las cepas susceptibles de 1.05 mg/mL y una CMB de 8.92 mg/mL frente a la cepa 41-9123, los resultados fueron significativamente diferentes a los presentados por el extracto CG frente a las 6 cepas evaluadas.

El extracto **HJ** fue el que presentó la menor capacidad letal global frente a los otros dos extractos evaluados, mostrando diferencias significativas entre el extracto CJ y CG con resultados globales inferiores.

En la tabla 6 se presentan las CMB de diferentes extractos etanólicos vegetales contra las cepas de *P. aeruginosa*

En la **Figura 6** y **Figura 7**, corresponde a la prueba de obtención de CMB y CMI; en esta prueba se observa la inhibición bacteriana por los extractos etanólicos a diferentes concentraciones en las cepas 14-1298 y 14-1285, obteniendo la concentración a la cual el extracto es capaz de inhibir las bacterias donde no se pueda apreciar visiblemente el crecimiento. Resultados los cuales son reportados en la Tabla 5 con la cepa 14-1298 como representante de las bacterias más resistentes contra 14-1285 que representa a las cepas menos resistentes en las figuras.

Tabla 6. CMB de las diferentes cepas de *P. aeruginosa* contra los diferentes extractos vegetales
CMB $\pm$ desviación estándar (mg/ml)

Extracto	41-9123	14-1284	14-1334	14-1422	14-1285	14-1298
CG	2.54 $\pm$ 1.21	0.49 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.01	3.18 $\pm$ 0.29
CJ	4.47 $\pm$ 0.01	1.12 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.09	0.53 $\pm$ 0.03	0.52 $\pm$ 0.03	5.39 $\pm$ 0.31
HJ	7.24 $\pm$ 0.01	1.23 $\pm$ 0.03	0.95 $\pm$ 0.02	0.92 $\pm$ 0.03	0.81 $\pm$ 0.02	6.46 $\pm$ 0.01

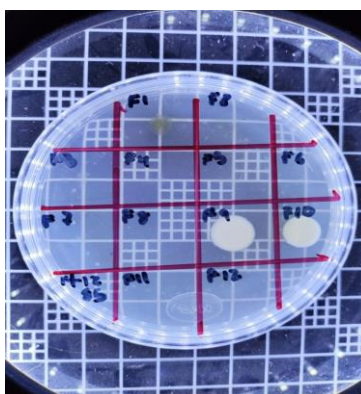


Figura 6. Concentración Mínima Inhibitoria de la cepa 14-1285 donde no se observa crecimiento de microorganismo

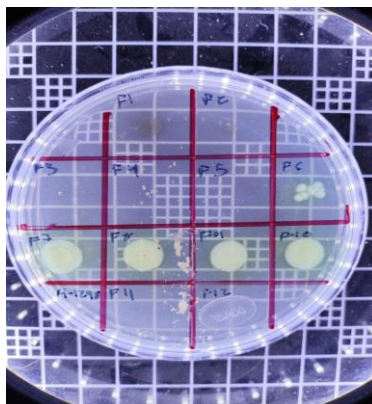


Figura 7. Concentración Mínima Inhibitoria de la cepa 14-1298 donde no se observa crecimiento de microorganismo

7.4 Efecto en la formación de biopelículas contra las cepas de *P. aeruginosa*

En la **Figura 8** se muestra el porcentaje de inhibición de biopelícula de las diferentes cepas de *P. aeruginosa* mediante la prueba de tinción de biopelícula con cristal violeta al 0.1% utilizando una concentración subinhibitoria de la CMI de 75% para cada bacteria donde se observa que de todas las cepas evaluadas, la que presentó menor reducción de la formación de biopelícula fue la cepa 14-1298 debido a su alta resistencia contra los antimicrobianos reportada anteriormente, donde a las 24 horas se pudo observar una reducción del 79% el cual fue un resultado óptimo, pero a las 48 horas hubo una diferencia significativa reduciendo hasta 63% de efectividad y por último a 48% de reducción a las 72 horas por lo que a las 72 horas disminuyó a la mitad la efectividad presentada contra esta bacteria.

Hubo diferencias significativas entre los resultados de las cepas 14-1298 frente a las otras cepas evaluadas, mientras que las cepas 14-1334, 14-1284 y 14-1285 no presentaron diferencias significativas entre sus resultados, pero si presentaron diferencias significativas entre la cepa 14-1422 y la cepa 41-9123 lo cual se atribuye a la diferencia de la producción de biopelícula dependiendo del nivel de resistencia de cada bacteria.

A diferencia de esto, si bien las bacterias restantes presentaron una reducción de la formación de biopelícula considerable (90-95%) a las 24 horas, a las 48 horas se observó una reducción considerable de este efecto y por último a las 72 horas se observó una disminución significativa por lo que esto se puede atribuir a la naturaleza del solvente utilizado siendo muy inestable a la temperatura, luz y oxígeno.

En la **Figura 9**. se observa la prueba de concentración subinhibitoria al 75% con el extracto CG donde se muestra el crecimiento bacteriano de *P. aeruginosa* que no presenta pigmentación la cual se ha relacionado con su nivel de resistencia contra antibióticos debido a su capacidad de producir

una biopelícula más resistente, esto debido a que a concentraciones subinhibitorias de 25% y 50% de la CMI se mostraba producción de piocianina en las colonias bacterianas.

La **Figura 10** muestra la tinción de la biopelícula de *P. aeruginosa* para ser cuantificada mediante un espectrofotómetro donde se logró determinar visualmente mayor cantidad de biopelícula dependiendo del nivel de pigmentación de cada pocillo, lo cual corresponde con lo esperado, donde las cepas más resistentes presentaron mayor pigmentación que las cepas más susceptibles, estas placas al ser leídas en el espectrofotómetro se pudo cuantificar la inhibición de formación de biopelícula de las diferentes cepas analizadas las cuales se muestran en la **Figura 8**.

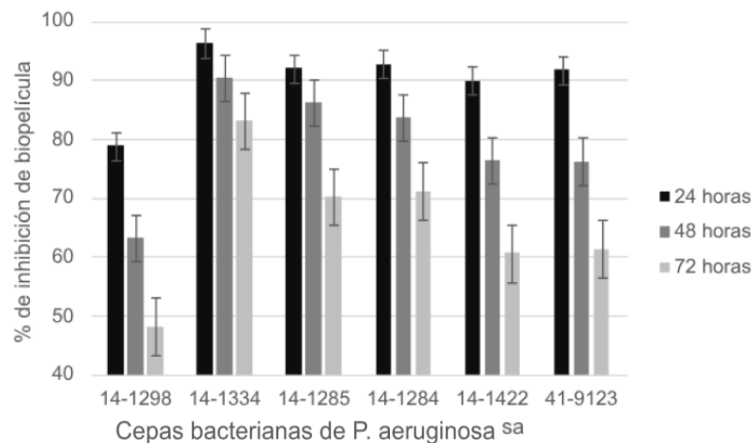


Figura 8. Porcentaje de inhibición de biopelícula con una concentración subinhibitoria de 75% de la CMB de extracto etanólico de cáscara de granada contra diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

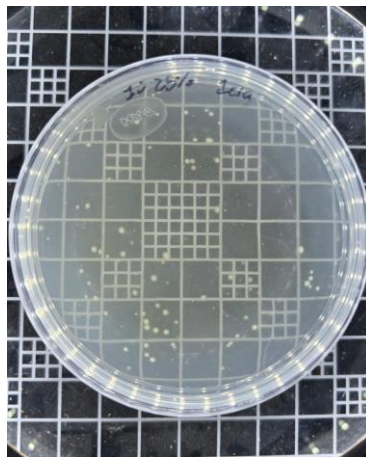


Figura 9. Evaluación de concentración subinhibitoria al 75% con el extracto CG frente a la cepa 14-1298

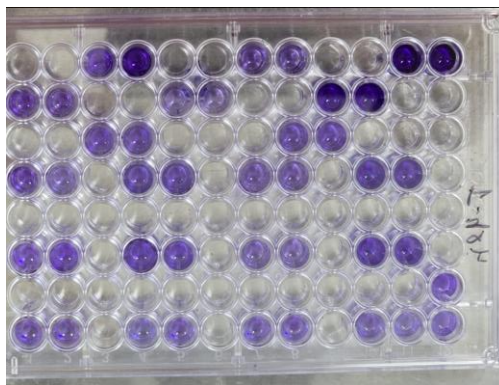


Figura 10. Tinción de la biopelícula para su posterior lectura mediante espectrofotómetro de la cepa 14-1298 utilizando el extracto CG donde a mayor tono de violeta se indica mayor cantidad de biopelícula

7.5 Condiciones óptimas de nanoencapsulación de los extractos seleccionados y hacer su caracterización

En la **tabla 7** se presentan las diferentes formulaciones (F1 a F8) desarrolladas para la encapsulación del extracto etanólico de granada utilizando EUDRAGIT® RLPO como polímero de pared. El diseño experimental se centró en evaluar el efecto de la composición del solvente, el uso de co-solventes así como la intensidad del cizallamiento sobre la formación y tamaño de las nanoestructuras.

En cuanto al núcleo y la matriz polimérica, se mantuvo constante la cantidad de extracto de granada (300 μ L) en todas las formulaciones para asegurar que los cambios observados en la eficiencia se debieran únicamente debido a las variaciones del proceso. El polímero EUDRAGIT se fijó en 50 mg, a excepción de la formulación F2. Que fue de 40 mg (con el fin de evaluar la influencia de la relación del núcleo: pared)

Para la fase orgánica y los co-solventes se observó que un punto crítico fue la transición del isopropanol (F1-F4) y agua destilada (F5-F8) en la fase acuosa/orgánica. La sustitución de isopropanol en lugar de agua en las formulaciones finales sugiere una mayor hidrofiliicidad en el sistema o una reducción de la toxicidad residual del solvente.

En cuanto a la dinámica de agitación se implementaron dos niveles de energía mecánica las cuales fueron una agitación convencional base (2000 rpm) utilizada en todas las muestras incrementando el tiempo en F3 y F7 (20 min) para mejorar la homogeneidad de la emulsión primaria. Y la agitación de alta intensidad (30,000 rpm) que se aplica únicamente a las formulaciones F4, F5 y F8 durante 5 min. Este parámetro determinó que es fundamental para la reducción del diámetro de gota, lo que teóricamente debería conducir una distribución de tamaño de partícula más homogénea y nanoscópica.

Finalmente se muestra que la formulación 8 fue la óptima ya que presentó un menor tamaño de partícula y un PDI inferior en comparación con los otros tratamientos.

En la **figura 11** se ejemplifica la encapsulación donde específicamente se muestra la evaporación de los solventes mediante evaporación en un rotavapor, mientras que en la **figura 12** se puede observar el gráfico obtenido del tamaño y PDI de las diferentes formulaciones utilizando el equipo Z sizer observando las variaciones de estos valores.

Tabla 7. Diferentes formulaciones de nanocápsulas del extracto etanólico de granada.

Formulaciones	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
EUDRAGIT RLPO (mg)	50	40	50	50	50	50	50	50
Extracto Granada (µL)	300	300	300	300	300	300	300	300
Diclorometano (O) (mL)	4	4	4	4	4	4	4	4
Tiempo de sonicación (min)	5	5	5	5	5	5	5	5
mL de etanol (mL)	4.14	4.14	4.14	4.14	0	4.14	4.14	4.14
Agua destilada	0	0	0	0	5.84	1.7	1.7	1.7
Isopropanol	1.7	1.7	1.7	1.7	0	0	0	0
PVA 8%	10	10	10	10	10	10	10	10
Agitación 2000 rpm (min)	15	15	20	15	15	15	20	15
Agitación 30000 rpm (min)	0	0	0	5	5	0	0	5
PDI	0.505	0.267	0.298	0.275	0.292	0.303	0.120	0.035
Tamaño (nm)	135.5	250.9	132.2	155.6	204.0	166.7	355.3	208.8



Figura 11. Evaporación de solvente para obtención de las nanocápsulas del extracto etanólico

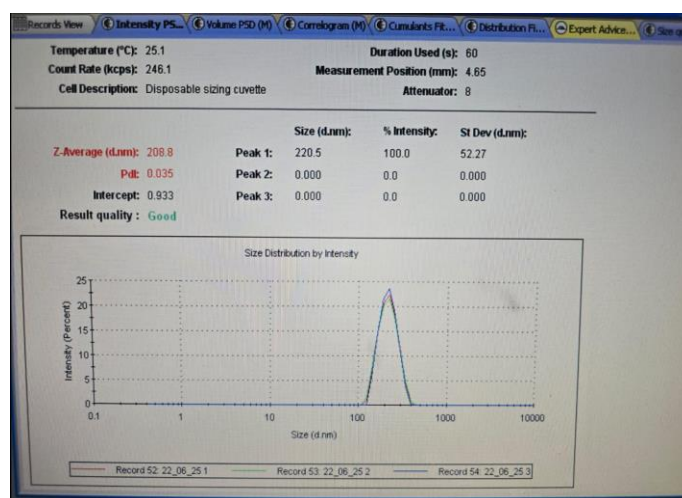


Figura 12. Gráfico obtenido del tamaño de la nanocápsula con la formulación final y su PDI

Ecuación 1. Eficiencia de encapsulación de las nanocápsulas CG

$$EE\% = \frac{221.41}{2727} \times 100$$

$$EE\% = 8.12\%$$

Eficiencia de encapsulación = 91.88%

En la **tabla 8** se presenta la CMI del extracto etanólico de la cáscara de la granada nanoencapsulado contra las diferentes cepas de *P. aeruginosa*. Los valores de CMI obtenidos muestran una variabilidad significativa dependiendo de la cepa evaluada, oscilando entre 1.96 ± 0.15 mg/ml y

9.27 $\pm$ 0.72 mg/ml. Esta diferencia en la susceptibilidad puede atribuirse a los mecanismos de resistencia propios de cada aislado clínico.

En este caso, las cepas 14-1334, 14-1284 y 14-1422 presentaron valores de CMI inferiores (entre 1.96 a 2.53 mg/ml). Estos resultados sugieren que el proceso de nanoencapsulación permite una interacción efectiva de los compuestos fenólicos del extracto (como el ácido elágico y las punicalaginas) con la membrana bacteriana, logrando de esta manera la inhibición a concentraciones relativamente bajas.

Por el contrario, las cepas 41-9123 y 14-1298 requirieron concentraciones notablemente superiores (9.27 y 8.23 mg/ml respectivamente) para inhibir su crecimiento. Esto debido a las características que se han mencionado previamente en relación con su formación de biopelícula y la presencia de bombas de flujo que evitan el efecto del antimicrobiano en los patógenos.

Tabla 8. CMI de las diferentes cepas de *P. aeruginosa* contra el extracto etanólico de la cáscara de granada encapsuladas

Cepa	CMI $\pm$ desviación estándar (mg/ml)
41-9123	9.27 $\pm$ 0.72
14-1284	2.03 $\pm$ 0.20
14-1334	1.96 $\pm$ 0.15
14-1422	2.53 $\pm$ 0.07
14-1285	2.16 $\pm$ 0.84
14-1298	8.23 $\pm$ 0.32

En la Tabla 9 se presenta la CMB del extracto etanólico de la cáscara de la granada nanoencapsulada. Mientras que la CMI (Tabla 8) indica la concentración necesaria para inhibir el crecimiento, la CMB determina la concentración necesaria para poder eliminar el 99.9% de la población bacteriana inicial lo que permite diferenciar si el extracto presenta propiedades bacteriostáticas y bactericidas.

Se puede observar que la cepa 14-1334 fue la más sensible, presentando una CMB de apenas 0.91 mg/ml. En el caso de las cepas 14-1284, 14-1334, 14-1422 y 14-1285 los valores de su CMB son muy similares al de su CMI.

Las cepas 41-9123 (7.27 mg/ml) y 14-1298 (6.27 mg/ml) mantienen la tendencia de mayor resistencia observadas en las pruebas anteriores confirmando su resistencia frente a los compuestos activos del extracto, incluso en su forma nanoencapsulada.

En la **figura 13** se puede observar la obtención de la CMB y la CMI de la cepa 14-1285 mediante técnica de goteo para conocer el efecto bactericida y bacteriostático de diferentes concentraciones del extracto nanoencapsulado.

Tabla 9. CMB de las diferentes cepas de *P. aeruginosa* contra el extracto etanólico de la cáscara de granada

Extracto	CMB $\pm$ desviación estándar (mg/mL)
41-9123	7.27 $\pm$ 0.14
14-1284	1.17 $\pm$ 0.38
14-1334	0.91 $\pm$ 0.11
14-1422	1.83 $\pm$ 0.29
14-1285	1.46 $\pm$ 0.33
14-1298	6.27 $\pm$ 0.38

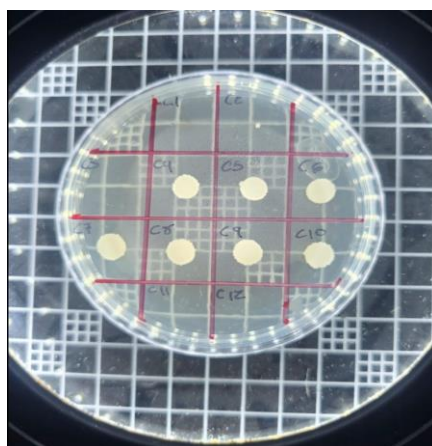


Figura 13. Evaluación de CMB y CMI del extracto etanólico encapsulado mediante prueba de goteo en placa

En la Figura 14 se muestra el porcentaje de inhibición de biopelícula a una concentración subinhibitoria del 75% contra las diferentes cepas de *P. aeruginosa* con el extracto etanólico nanoencapsulado, evaluado en tres intervalos de tiempo (24,48 y 72 horas). La capacidad de inhibir biopelícula es un indicador crucial, ya que esta estructura es la principal responsable de la resistencia contra antibióticos y la persistencia de infecciones crónicas.

Se observa una tendencia general que decrece en el porcentaje de inhibición a medida que disminuye el tiempo de incubación. Este comportamiento es esperado en los sistemas in vitro,

donde la replicación de las bacterias y la producción de los exopolisacáridos de membrana pueden eventualmente sobrepasar la concentración de fitoconstituyentes activos disponibles, en este caso en especial al ser una dosis subletal.

A pesar del descenso temporal, es notable que incluso al pasar las 72 horas, todas las cepas mantuvieron niveles de inhibición superiores al 65%, mientras que la cepa 14-1298 mostró ser la más resistente a largo plazo, descendiendo a niveles cercanos al 68%.

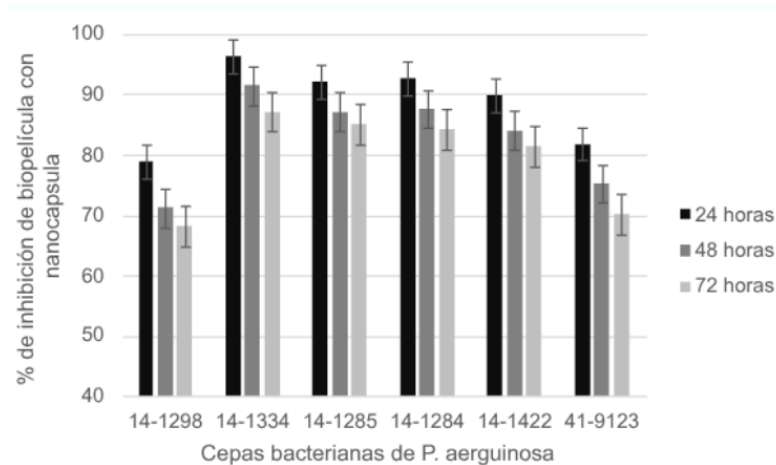


Figura 14. Gráfica del porcentaje de inhibición de biopelícula con una concentración subinhibitoria de 75% de la CMB del extracto etanólico de cáscara de granada nanoencapsulado contra diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

8. DISCUSIÓN

Se observó que las diferentes cepas de *Pseudomonas aeruginosa* presentaron variabilidad en los perfiles de resistencia frente a los antibióticos evaluados. Esta variabilidad fenotípica, puede atribuirse a la presencia de diferentes mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia antimicrobiana, presentes en este microorganismo como producción de β -lactamasas, sobreexpresión de bombas E-flux, disminución de la permeabilidad de la membrana externa y producción de biopelículas (Lambert, 2002).

Todas las cepas evaluadas mostraron resistencia frente a la Ampicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Dicloxacilina, Ceftriaxona, Netilmicina y Penicilina, lo cual coincide con el perfil de resistencia intrínseca descrito para *P. aeruginosa* frente a múltiples β -lactámicos. (Bindu & Saikumar, 2022) Asimismo, las cepas 14-1298 y 41-9123 presentaron resistencia adicional a nitrofurantoína, cloranfenicol y sulfametoxazol/trimetoprim, lo que indica un fenotipo de resistencia más amplio en comparación con las otras cuatro cepas evaluadas. (Hal-habib et al., 2015)

Los antibióticos que mostraron mayor actividad frente a las cepas evaluadas fueron la gentamicina y la amikacina. Estos resultados coinciden con lo reportado por Zhanel et al. (2012), quienes señalan que los aminoglicósidos continúan siendo una de las opciones terapéuticas para el tratamiento de infecciones causadas por *P. aeruginosa*. Particularmente en entornos hospitalarios, debido a su mecanismo de acción sobre la síntesis de proteínas.

En contraste, aunque el trimetoprim/sulfametoxazol y la nitrofurantoína pueden presentar actividad contra algunos aislados, su eficacia contra cepas nosocomiales de *P. aeruginosa* es limitada, debido al elevado nivel de resistencia intrínseca y adquirida que caracteriza a esta especie (Eliopoulos, 2021).

De acuerdo con los criterios de interpretación de los halos de inhibición descritos por Walsh et al. (2003), una cepa se considera sensible cuando el diámetro del halo es >22 mm comentan que para que una bacteria se considere sensible contra un antibiótico el halo de inhibición deberá ser de >22 mm, de sensibilidad intermedia cuando se encuentre entre 18-21 mm y se considerará resistente cuando es ≤ 17 mm. Con base en estos puntos establecidos, la cepa 14-1298 se clasifica como resistente a la gentamicina (Ge) y sensible a amikacina (AK). Lo que confirma la variabilidad en el perfil de susceptibilidad incluso dentro del mismo grupo farmacológico.

Estos hallazgos refuerzan la importancia de realizar pruebas de susceptibilidad individualizadas, ya que la respuesta antimicrobiana puede diferir significativamente entre cepas de la misma especie. (Drenkard & Ausubel, 2002)

Con base en los criterios de interpretación antes mencionados, para los diámetros de los halos de inhibición, de perfiles de susceptibilidad, los resultados evidencian una marcada heterogeneidad en los perfiles de susceptibilidad, incluso frente a antibióticos del mismo grupo farmacológico, lo que sugiere la posible participación diferencial de mecanismos como bombas de eflujo, enzimas modificadoras de aminoglucósidos o alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa (Morita et al., 2012)

Kim et al. en 2018 reportaron que la resistencia contra la amikacina y la gentamicina puede deberse a diversos mecanismos moleculares presentes en *P. aeruginosa*. Entre los más relevantes se encuentra la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (acetiltransferasas, adeniltransferasas y fosfotransferasas), las cuales inactivan el antibiótico e impiden la unión efectiva a la subunidad ribosomal 30S. Asimismo, se ha descrito la participación de proteínas asociadas a la metilación del ARN ribosomal y sistemas de eflujo que reducen la concentración intracelular del antibiótico, limitando su efecto bactericida. (Halfon et al., 2019) Por otra parte, Thi et al. en 2018 mencionan que la capacidad de formar biopelículas constituye un factor determinante en la resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa*. Dentro de la biopelícula, las bacterias quedan embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares compuestas por polisacáridos, proteínas y ADN extracelular. Esta matriz actúa como una barrera física y química que dificulta la penetración del antibiótico. En consecuencia, el tratamiento antimicrobiano puede requerir concentraciones mayores o estrategias complementarias dirigidas a la disrupción de la biopelícula para lograr la erradicación bacteriana. (Wolfmeier et al., 2018)

En la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos, los resultados obtenidos cumplieron con el supuesto de normalidad ($p > 0.05$), lo que permitió aplicar un análisis de varianza (ANOVA) de un factor lo que demostró que existe una diferencia significativa entre los tratamientos utilizados.

Dhanavade et al. en 2011 reportaron que el extracto etanólico de cáscara de limón presente efecto antimicrobiano moderado, sin embargo, señalaron que los extractos obtenidos con metanol o con acetona muestran una eficacia superior en términos de diámetro de halo de inhibición. Estos

hallazgos son consistentes con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde el extracto etanólico de cáscara de limón, aunque mostró actividad inhibitoria frente a las cepas evaluadas, no presentó diferencias estadísticamente significativas respecto a otros tratamientos. Esto podría atribuirse a la eficiencia diferencial de extracción de compuestos bioactivos, en particular de flavonoides y otros metabolitos fenólicos, dependiendo del solvente utilizado.

En cuanto a la guayaba Mahavy et al. en 2024 reportaron que los extractos etanólicos obtenidos a partir de la semilla presenta inhibición limitada, mientras que el mayor efecto inhibitorio se obtuvo mediante la maceración del fruto completo en etanol lo que permite una mayor recuperación de compuestos bioactivos. No obstante, incluso bajo estas condiciones, el efecto antimicrobiano no mostró diferencias marcadas.

Estos antecedentes respaldan los resultados observados en este estudio, donde el extracto etanólico de semilla de guayaba presentó actividad inhibitoria, pero con menor eficacia frente a cepas con mayor perfil de resistencia antimicrobiana.

En conjunto, la evidencia sugiere que la eficacia antimicrobiana de los extractos vegetales no solo depende de la especie vegetal, sino también del tipo de solvente, la fracción utilizada y la concentración de metabolitos secundarios extraídos.

El extracto etanólico de cáscara de piña ha demostrado actividad antimicrobiana frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae*; sin embargo, su efecto frente a *Pseudomonas aeruginosa* ha sido reportado como variable y dependiente del solvente utilizado para la extracción. Estudios previos indican que la maceración con acetato de etilo incrementa la eficiencia de extracción de compuestos bioactivos, alcanzando halos de inhibición de hasta 20 ± 0.12 mm frente a *P. aeruginosa* teniendo poca diferencia entre la concentración utilizada en su evaluación de 140 mg/mL frente a la concentración obtenida en esta evaluación de 130 mg/mL. Estos antecedentes respaldan los resultados obtenidos en el presente estudio, donde el extracto etanólico mostró actividad limitada, lo que sugiere que la naturaleza del solvente influye directamente en la recuperación de metabolitos con potencial antibacteriano.

En contraste, el extracto etanólico de cáscara de granada presentó los mejores resultados antimicrobianos entre los tratamientos evaluados. Habibipour et al. (2019) reportaron halos de inhibición entre 15.3 y 25.7 mm frente a diferentes cepas de *P. aeruginosa*, valores comparables a

los observados en las seis cepas analizadas en este estudio. La variabilidad en la sensibilidad entre cepas puede estar asociada a diferencias en la capacidad de formación de biopelícula y en los mecanismos intrínsecos y adquiridos de resistencia antimicrobiana.

Asimismo, se ha documentado que la cáscara de granada presenta mayor actividad antimicrobiana que el fruto completo, lo cual resulta relevante considerando que la cáscara representa aproximadamente el 40% del peso seco total del fruto. Este efecto se atribuye principalmente a su elevada concentración de compuestos fenólicos, entre los que destacan punicalina y punicalagina, metabolitos que poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Estos compuestos pueden alterar la integridad de la membrana bacteriana, generar estrés oxidativo y afectar procesos metabólicos esenciales, lo que podría explicar la mayor eficacia observada.

Los valores de la Concentración Mínima Bactericida (CMB), expresados en $\mu\text{g/mL}$ para los extractos etanólicos de cáscara de granada, hojas de jamaica y cáscara de jícama, se presentan en la Tabla 6. La CMB se determinó como la menor concentración del extracto en la que no se observó crecimiento bacteriano visible en los pocillos evaluados. La desviación estándar obtenida fue baja, lo que indica una adecuada reproducibilidad del ensayo; la ligera variación observada se atribuye a diferencias mínimas entre pocillos consecutivos en los que se evidenciaba o no crecimiento bacteriano.

Para la cepa 41-9123, el extracto que presentó la menor CMB fue el de cáscara de granada, como se observa en la Tabla 6. No obstante, las cepas con mayor perfil de resistencia antibiótica, particularmente 14-1298 y 41-9123, requirieron concentraciones más elevadas del extracto etanólico para lograr la inhibición bactericida, lo que sugiere una posible relación entre el fenotipo multirresistente y una menor susceptibilidad a compuestos fitoquímicos.

En estudios realizados con cepas clínicas, Nozohour et al. (2018) reportaron una CMB de $16.2 \pm 5.8 \text{ mg/mL}$ para extracto etanólico de cáscara de granada frente a *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que Abutayeh et al. (2024) documentaron valores menores, cercanos a 5 mg/mL . Estas diferencias pueden estar asociadas a variaciones en la concentración de compuestos fenólicos del extracto (pero de acuerdo a lo observado en esta evaluación una mayor concentración no necesariamente está relacionada con un mejor efecto), al método de extracción empleado o al nivel de resistencia intrínseca y capacidad de formación de biopelícula de las cepas evaluadas. En

particular, las cepas con mayor producción de matriz extracelular polimérica pueden presentar una menor penetración de los compuestos antimicrobianos, incrementando así la concentración requerida para alcanzar el efecto bactericida.

En conjunto, los resultados refuerzan la relevancia del extracto etanólico de cáscara de granada como alternativa con potencial antimicrobiano, aunque su eficacia puede verse modulada por el perfil de resistencia y la capacidad de formación de biopelícula de cada cepa.

Debido a que el extracto etanólico de cáscara de granada mostró la mayor actividad antimicrobiana frente a la mayoría de las cepas evaluadas, fue seleccionado para la prueba de inhibición de biopelícula. Los resultados obtenidos a las 24 horas mostraron porcentajes de inhibición entre 78.77% y 96.26%, evidenciando una marcada reducción en la formación de biofilm. Estos valores son consistentes con los reportados por Habibipour et al. (2019), quienes documentaron porcentajes de inhibición entre 68.4% y 88% utilizando extracto etanólico de granada frente a *Pseudomonas aeruginosa*, lo que respalda la reproducibilidad del efecto antibiofilm.

Asimismo, Ibrahim et al. (2025) reportaron que, a una concentración subinhibitoria equivalente al 76% de la MIC, se obtuvo una inhibición del 66% de la biopelícula a las 24 horas en una cepa con alto perfil de resistencia antibiótica. Este efecto fue atribuido a la reducción significativa en la expresión de genes reguladores del sistema de *quorum sensing*, mecanismo clave en la organización estructural y maduración del biofilm. Lo anterior sugiere que el extracto no solo actúa por daño directo a la célula bacteriana, sino también mediante interferencia en la regulación genética asociada a la virulencia.

Sin embargo, en el experimento realizado, se observó una disminución progresiva del efecto inhibitorio a las 48 y 72 horas. Este comportamiento podría explicarse por la volatilidad y degradación de compuestos fenólicos bajo condiciones de incubación prolongada, tal como lo describen Chew et al. (2011), quienes reportaron una reducción significativa en la actividad antimicrobiana de extractos vegetales tras exposiciones prolongadas a temperatura elevada.

En cuanto al efecto de la nanoencapsulación del extracto etanólico de cáscara de granada, Hashem et al. (2023) reportaron el uso de cápsulas de alginato con un tamaño de partícula promedio de 544.5 nm, mientras que otros sistemas como RLPO alcanzaron tamaños de 208.8 nm con un índice de polidispersión (PDI) de 0.593. En comparación, los valores obtenidos en el presente estudio

(Tabla 7) mostraron un tamaño de partícula inferior y un PDI de 0.035, lo que indica una distribución más homogénea y mayor estabilidad coloidal.

De manera similar, Monika (2024) reportó el uso de Eudragit® como polímero encapsulante, obteniendo tamaños de partícula cercanos a 749 nm y un PDI de 0.061. Aunque estos sistemas demostraron funcionalidad, los tamaños reportados siguen siendo mayores en comparación con los obtenidos en este estudio. De acuerdo con Abbas et al. (2015), partículas de menor tamaño y bajo PDI favorecen una mayor área superficial, incrementando el contacto con la membrana bacteriana, mejorando la penetración y potencializando el efecto antimicrobiano.

En conjunto, los resultados sugieren que tanto la composición fitoquímica del extracto como el sistema de nanoencapsulación empleado constituyen factores determinantes en la eficacia anti biopelícula y antimicrobiana, destacando la importancia del polímero utilizado y del control del tamaño de partícula para optimizar la actividad biológica.

Las nanocápsulas obtenidas presentaron valores de Concentración Mínima Bactericida (CMB) inferiores en comparación con el extracto etanólico crudo; sin embargo, el análisis estadístico mediante comparación de medias (nivel de confianza del 95%) utilizando el software OpenStat indicó que dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Esto sugiere que, en términos de efecto bactericida directo, la nanoencapsulación no modificó de manera significativa la concentración requerida para inhibir el crecimiento bacteriano.

No obstante, diferencias relevantes se observaron en el análisis de inhibición de formación de biopelícula. A las 24 horas no se detectaron diferencias significativas entre el extracto libre y el nanoencapsulado ($p > 0.05$); sin embargo, a las 48 horas se evidenció un incremento significativo en el porcentaje de inhibición en todas las cepas tratadas con las nanocápsulas, efecto que se mantuvo e incluso se acentuó a las 72 horas (Figura 14). Los valores registrados oscilaron entre 68.15% y 87.12%, en comparación con los obtenidos con el extracto no encapsulado a las 72 horas (48.15%–83%).

Este comportamiento sugiere un efecto de liberación sostenida del extracto cuando se encuentra encapsulado en el polímero RLPO, lo que podría explicar la mayor estabilidad y actividad prolongada en el tiempo. El RLPO (Eudragit® RLPO) es un copolímero ampliamente utilizado en formulaciones farmacéuticas de liberación controlada debido a su permeabilidad y

biocompatibilidad. Además de su uso en medicamentos de administración oral, Rahnemoon (2021) ha reportado aplicaciones en la industria alimentaria, donde actúa como barrera externa que permite la liberación gradual de compuestos bioactivos, aumentando la vida de anaquel de productos tratados con extractos vegetales.

El análisis comparativo entre el extracto etanólico libre de cáscara de granada y su formulación nanoencapsulada demostró que, aunque las nanocápsulas presentaron valores de Concentración Mínima Bactericida (CMB) ligeramente inferiores, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p > 0.05$; IC 95%). Esto sugiere que, en términos de actividad bactericida directa, la nanoencapsulación no modificó sustancialmente la concentración requerida para inhibir el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

Mientras que el extracto crudo presentó una reducción progresiva en su efecto antibiopelícula, probablemente asociada a degradación o volatilización de compuestos fenólicos, la formulación nanoencapsulada mantuvo e incluso potenció su actividad en el tiempo.

Este comportamiento sugiere un efecto de liberación controlada y protección estructural de los metabolitos activos dentro de la matriz polimérica. En particular, el uso de Eudragit® RLPO como polímero encapsulante favorece una mayor estabilidad fisicoquímica, lo que podría explicar la persistencia del efecto a las 72 horas. Además, el tamaño de partícula reducido y el bajo índice de polidispersión (PDI) obtenidos en este estudio favorecen una mayor área superficial y mejor interacción con la matriz del biofilm, lo que coincide con lo descrito por Abbas et al. (2015) respecto a la mejora en penetración y adhesión bacteriana en sistemas nanoestructurados.

En conjunto, los resultados indican que, aunque la nanoencapsulación no incrementa significativamente la potencia bactericida inmediata (CMB), sí mejora la eficacia antibiofilm a mediano plazo, lo cual es particularmente relevante en cepas con alta capacidad de formación de biopelícula y resistencia antimicrobiana.

9. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de cáscara de granada fue el tratamiento que presentó la mayor actividad antimicrobiana y antibiopelícula frente a las seis cepas evaluadas de *Pseudomonas aeruginosa*, con valores de Concentración Mínima Bactericida (CMB) entre 0.32 ± 0.02 y 3.18 ± 0.29 mg/mL, dependiendo de la cepa analizada. Estos resultados se atribuyen principalmente a su elevado contenido de compuestos polifenólicos, los cuales poseen propiedades antimicrobianas y moduladoras de la formación de biopelícula, posicionando a este subproducto vegetal como una alternativa prometedora frente a bacterias multirresistentes.
- Se logró la obtención de nanocápsulas con tamaño de partícula reducido y un índice de polidispersión (PDI) bajo, lo que indica una adecuada homogeneidad y estabilidad coloidal. Estas características fisicoquímicas son favorables para aplicaciones biológicas, ya que permiten una mayor área superficial de contacto y una potencial mejora en la interacción con células bacterianas y matrices de biopelícula.
- Aunque el extracto etanólico de cáscara de granada nanoencapsulado no mostró diferencias estadísticamente significativas en la CMB ni en la inhibición de biopelícula a las 24 horas ($p > 0.05$), sí evidenció una mejora significativa en la inhibición de la biopelícula a las 48 y 72 horas. Los porcentajes de inhibición oscilaron entre 68.15% y 87.12%, superiores a los observados con el extracto libre a las 72 horas (48.15%–83%). Estos hallazgos sugieren un efecto de liberación controlada y mayor estabilidad del extracto nanoencapsulado, lo que podría potenciar su aplicación en estrategias terapéuticas o preventivas frente a infecciones asociadas a biofilm.

10. PERSPECTIVAS

- **Evaluación longitudinal del efecto antibacteriano y antibiopelícula**

Se propone extender el periodo de evaluación más allá de 72 horas para determinar la cinética de liberación y la persistencia del efecto antimicrobiano del extracto nanoencapsulado en comparación con el extracto libre. Esto permitiría establecer perfiles farmacodinámicos más completos y modelar matemáticamente la liberación sostenida del compuesto activo.

- **Ampliación del espectro antimicrobiano**

Evaluar el efecto del extracto etanólico nanoencapsulado frente a otras bacterias patógenas formadoras de biopelícula, tanto Gram negativas como Gram positivas (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* o *Klebsiella pneumoniae*), con el fin de determinar su aplicabilidad como alternativa antimicrobiana de amplio espectro y su potencial en entornos clínicos y veterinarios.

- **Estudios de estabilidad y comportamiento en superficies sólidas**

Analizar la estabilidad fisicoquímica y funcional de las nanocápsulas sobre diferentes superficies (acero inoxidable, plástico grado alimenticio, vidrio), evaluando parámetros como liberación controlada, adherencia y actividad antimicrobiana en distintos intervalos de tiempo. Esto permitiría explorar aplicaciones en recubrimientos antimicrobianos y control de contaminación en superficies inertes.

- **Evaluación de biocompatibilidad y citotoxicidad**

Determinar el perfil citotóxico del extracto nanoencapsulado en líneas celulares eucariotas (por ejemplo, epiteliales o fibroblastos), con el objetivo de establecer su seguridad biológica y calcular índices terapéuticos que respalden futuras aplicaciones clínicas, veterinarias o en productos de consumo.

- **Aplicación en conservación de alimentos y extensión de vida de anaquel**

Investigar el efecto del extracto nanoencapsulado como recubrimiento activo en matrices alimentarias, comparándolo con el extracto libre, para evaluar su capacidad de inhibir crecimiento microbiano, reducir formación de biopelículas y prolongar la vida útil del producto. Este enfoque permitiría integrar la tecnología dentro del marco One Health, vinculando salud humana, animal y seguridad alimentaria.

- **Análisis mecanístico molecular**

Profundizar en los mecanismos de acción mediante estudios de expresión génica (quorum sensing, genes asociados a biofilm y resistencia antimicrobiana) para confirmar el efecto regulador observado y fortalecer la evidencia mecanística del sistema nanoencapsulado.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, S., Karangwa, E., Bashari, M., Hayat, K., Hong, X., Sharif, H. R., & Zhang, X. (2015). Fabrication of polymeric nanocapsules from curcumin-loaded nanoemulsion templates by self-assembly. *Ultrasonics sonochemistry*, 23, 81-92.
- Abutayeh, R., Ayyash, M., Alwany, R., Abuodeh, A., Jaber, K., & Al-Najjar, M. (2024). Exploring the antimicrobial potential of pomegranate peel extracts (PPEs): Extraction techniques and bacterial susceptibility. *PloS one*, 19(12), e0315173.
- Al-Habib, H. M., Al-Gerir, A. Z., & Hamdoon, A. M. (2011). Profile of *Pseudomonas aeruginosa* in burn infection and their antibiogram study. *Annals of the College Mosul*.
- Alvarez-Sandoval, J., Guillen Melendez, G. A., Pérez-Hernández, R. A., Elizondo-Luevano, J. H., Castro-Ríos, R., Kačániová, M., & Chávez-Montes, A. (2025). Antiproliferative effect of methanolic extract of *Vernonia greggii* (Asteraceae) on human tumoral HeLa Cells Nanoencapsulated into PLGA-nanoparticles. *Materials*, 18(3), 580.
- Agger, W. & Mardan, A. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* infections of intact skin. *Clinical Infectious Diseases*, 20(2), 302-308.
- Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., & Sestili, P. (2015). Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features. *Food chemistry*, 174, 417-425.
- Alam, K., Al Farraj, D., Mah-e-Fatima, S., Yameen, M., Elshikh, M., Alkufeidy, R., & Naqvi, T. (2020). Anti-biofilm activity of plant derived extracts against infectious pathogen-*Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Infection and Public Health*, 13(11), 1734-1741.
- Al-Wrafiy, F., Brzozowska, E., Górská, S., & Gamian, A. (2017). Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*-the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Advances in Hygiene & Experimental Medicine/Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej*, 71.

- Arriola, N., de Medeiros, P., Prudencio, E., Müller, C., & Amboni, R. (2016). Encapsulation of aqueous leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni with sodium alginate and its impact on phenolic content. *Food Bioscience*, 13, 32-40.
- Assadpour, E., Jafari, S. M., & Maghsoudlou, Y. (2017). Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectin-whey protein nano-capsules. *International journal of biological macromolecules*, 95, 238-247.
- Avershina, E., Shapovalova, V. & Shipulin, G. (2021). Fighting antibiotic resistance in hospital-acquired infections: current state and emerging technologies in disease prevention, diagnostics and therapy. *Frontiers in microbiology*, 12, 707330.
- Azón, C. G. (2011). Nanoemulsiones y Nanopartículas. *ACTA/CL: revista de la Asociación de Científicos y Tecnólogos de Alimentos de Castilla y León*, (45), 7-14.
- Balfe, E., Kowalski, E., & Leavitt, S. A. (2023). Kirby-Bauer disc diffusion method indicates absence of antimicrobial properties in *Ariolimax columbianus* Mucus. *Humboldt Journal of Microbiology*, 23(1), 2.
- Bindu, D., & Saikumar, C. (2022). Antibiotic Profile of *Pseudomonas aeruginosa* in a Tertiary Hospital in Chennai, India. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 16(1).
- Briones Cristerna, R. A. (2020). *Evaluación del aprovechamiento integral de los residuos sólidos de las centrales de abasto en áreas metropolitanas de Latinoamérica* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Bouaouina, S., Aouf, A., Touati, A., Ali, H., Elkhadragy, M., Yehia, H., & Farouk, A. (2022). Effect of nanoencapsulation on the antimicrobial and antibiofilm activities of algerian *Origanum glandulosum* Desf. against multidrug-resistant clinical isolates. *Nanomaterials*, 12(15), 2630.
- Cassini, A., Högberg, L., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. & Hopkins, S. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet infectious diseases*, 19(1), 56-66.

- Carrilho Boer, F. A. (2025). Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de la pasta CTZ y sus componentes sobre microorganismos estándar. *Rev. odontopediatr. latinoam*, 246701-246701.
- Cezarotto, V., Franceschi, E., Stein, A., Emanuelli, T., Maurer, L., Sari, M. & Cruz, L. (2023). Nanoencapsulation of *Vaccinium ashei* leaf extract in Eudragit® RS100-based nanoparticles increases its in vitro antioxidant and in vivo antidepressant-like actions. *Pharmaceuticals*, 16(1), 84.
- Cheng, G., Hao, H., Xie, S., Wang, X., Dai, M., Huang, L., & Yuan, Z. (2014). Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?. *Frontiers in microbiology*, 5, 217.
- Chew, K., Khoo, M., Ng, S., Thoo, Y., Aida, W., & Ho, C. (2011). Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. *International Food Research Journal*, 18(4), 1427.
- Chong-Cerda, R., Levin, L., Castro-Ríos, R., Hernández-Luna, C. E., González-Horta, A., Gutiérrez-Soto, G., & Chávez-Montes, A. (2020). Nanoencapsulated laccases obtained by double-emulsion technique. Effects on enzyme activity pH-dependence and stability. *Catalysts*, 10(9), 1085.
- Cvetnic, Z., & Vladimir-Knezevic, S. (2004). Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. *Acta Pharm*, 54(3), 243-250.
- Dhanavade, M. J., Jalkute, C. B., Ghosh, J. S., & Sonawane, K. D. (2011). Study antimicrobial activity of lemon (*Citrus lemon* L.) peel extract. *British Journal of pharmacology and Toxicology*, 2(3), 119-122.
- Dolatabadi, S., Moghadam, H. N., & Mahdavi-Ourtakand, M. (2018). Evaluating the anti-biofilm and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial pathogenesis*, 118, 285-289.

- Drenkard, E., & Ausubel, F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 416(6882), 740-743.
- Eliopoulos, G. M., & Huovinen, P. (2001). Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clinical infectious diseases*, 32(11), 1608-1614.
- El-Housseiny, G. S., Aboulwafa, M., & Hassouna, N. A. (2013). Cytotoxic activities of some *Pseudomonas aeruginosa* isolates: possible mechanisms and approaches for inhibition. *Turkish Journal of Biology*, 37(1), 69-80.
- El Solh, A. A., & Alhajhusain, A. (2009). Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(2), 229-238.
- European Centre for Disease Prevention and Control (2013). *Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals: 2011-2012*. Publications Office of the European Union.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in food science & technology*, 21(10), 510-523.
- Farjana, A., Zerin, N., & Kabir, M. S. (2014). Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4, S920-S923.
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of infection and public health*, 10(4), 369-378.
- Gellatly, S. L. & Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and disease*, 67(3), 159-173.
- Gutiérrez-Antonio, C., De Lira-Flores, J. A., Quiroz-Pérez, E., & Martínez-Guido, S. I. (2020). Conversión de residuos agroindustriales para la generación de biocombustibles, productos de valor agregado y bioenergía. *Digital ciencia@ uagro*, 13(1), 27-35.

- Habibipour, R., Moradi-Haghighi, L., & Farmany, A. (2019). Green synthesis of AgNPs@ PPE and its *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation activity compared to pomegranate peel extract. *International journal of nanomedicine*, 6891-6899.
- Hanafy, S. M., Abd El-Shafea, Y. M., Saleh, W. D., & Fathy, H. M. (2021). Chemical profiling, in vitro antimicrobial and antioxidant activities of pomegranate, orange and banana peel-extracts against pathogenic microorganisms. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 80.
- Hall, S., McDermott, C., Anoopkumar-Dukie, S., McFarland, A. J., Forbes, A., Perkins, A. V. & Grant, G. D. (2016). Cellular effects of pyocyanin, a secreted virulence factor of *Pseudomonas aeruginosa*. *Toxins*, 8(8), 236.
- Halfon, Y., Jimenez-Fernandez, A., La Rosa, R., Espinosa Portero, R., Krogh Johansen, H., Matzov, D. & Yonath, A. (2019). Structure of *Pseudomonas aeruginosa* ribosomes from an aminoglycoside-resistant clinical isolate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(44), 22275-22281.
- Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Aguilar, G. R., Sharara, F., Mestrovic, T., Gray, A. P. & Dhingra, S. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10369), 2221-2248.
- Kavoosi, G., Derakhshan, M., Salehi, M., & Rahmati, L. (2018). Microencapsulation of zataria essential oil in agar, alginate and carrageenan. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, 418-425.
- Kim, J., & Ahn, J. (2022). Emergence and spread of antibiotic-resistant foodborne pathogens from farm to table. *Food Science and Biotechnology*, 31(12), 1481-1499.
- Kim, Y. A., Park, Y. S., Youk, T., Lee, H., & Lee, K. (2018). Correlation of aminoglycoside consumption and amikacin-or gentamicin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in long-term nationwide analysis: is antibiotic cycling an effective policy for reducing antimicrobial resistance?. *Annals of laboratory medicine*, 38(2), 176-178.

- LaBauve, A. E., & Wargo, M. J. (2022). Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current protocols in microbiology*, 25(1), 6E-1.
- Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 28(2), 337-418.
- MacLean, R. C., & San Millan, A. (2019). The evolution of antibiotic resistance. *Science*, 365(6458), 1082-1083.
- Mahavy, C. E., Razanatseho, A. J., Mol, A., Ngezahayo, J., Duez, P., El Jaziri, M., & Rasamiravaka, T. (2024). Edible Medicinal Guava Fruit (*Psidium guajava* L.) Are a Source of Anti-Biofilm Compounds against *Pseudomonas aeruginosa*. *Plants*, 13(8), 1122.
- Matouskova, P., Marova, I., Bokrova, J., & Benesova, P. (2016). Effect of encapsulation on antimicrobial activity of herbal extracts with lysozyme. *Food technology and biotechnology*, 54(3), 304-316.
- Madureira, A. R., Pereira, A., Castro, P. M., & Pintado, M. (2015). Production of antimicrobial chitosan nanoparticles against food pathogens. *Journal of Food Engineering*, 167, 210-216.
- Mejías-Brizuela, N., Orozco-Guillén, E., & Galáan-Hernández, N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2(6), 27-41.
- Mishra, M. P., Rath, S., Swain, S. S., Ghosh, G., Das, D., & Padhy, R. N. (2017). In vitro antibacterial activity of crude extracts of 9 selected medicinal plants against UTI causing MDR bacteria. *Journal of King Saud University-Science*, 29(1), 84-95.
- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S., & Harjai, K. (2009). Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *Journal of infection and public health*, 2(3), 101-111.

- Mohammadi, A., Jafari, S. M., Esfanjani, A. F., & Akhavan, S. (2016). Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food chemistry*, 190, 513-519.
- Monika, P., Chandrababha, M. N., Krishna, R. H., Maanya, V., Likhitha, C., & Pooja, N. (2024). Development of targeted nanocapsules using pomegranate peel extract with enhanced bioavailability and anti-inflammatory activity for ulcerative colitis: In vitro studies. *Hybrid Advances*, 7, 100334.
- Montoya Hinojosa, E. I. (2025). *Evaluación de la actividad de antibióticos convencionales sobre la inhibición y erradicación de biopelícula de aislamientos clínicos de Achromobacter spp., Burkholderia spp. y Stenotrophomonas maltophilia de un hospital de tercer nivel de México* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).
- Molina Bertrán, S. D., Monzote, L., Cappoen, D., Escalona Arranz, J. C., Gordillo Pérez, M. J., Rodríguez-Ferreiro, A. O. & Llauradó Maury, G. (2022). Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation by seed-derived ethanol extracts from *Persea americana* mill. *Molecules*, 27(15), 5009.
- Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2012). MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in microbiology*, 3, 408.
- Najafi-Soulari, S., Shekarchizadeh, H., & Kadivar, M. (2016). Encapsulation optimization of lemon balm antioxidants in calcium alginate hydrogels. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 27(16), 1631-1644.
- Navarrete Barragán, N. A., Pita-Ospina, E. F., Sánchez Mora, R. M., Giraldo Quintero, S. E., & Bernal Lizarazú, M. C. (2020). Actividad in vitro de los extractos etanólicos de *Lantana camara* L., *Petiveria alliacea* L. y *Lippia dulcis* T. frente a bacterias patógenas. *Nova*, 18(33), 53-71.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451-1474.

- Nozohour, Y., Golmohammadi, R., Mirnejad, R., & Fartashvand, M. (2018). Antibacterial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed and peel alcoholic extracts on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from health centers. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 5(1), 32-36.
- Lambert, P. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the royal society of medicine*, 95(41), 22.
- Oliveira, D. A., Angonese, M., Ferreira, S. R., & Gomes, C. L. (2017). Nanoencapsulation of passion fruit by-products extracts for enhanced antimicrobial activity. *Food and Bioproducts Processing*, 104, 137-146.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, 30(2), 295-304.
- Oyun, J. F., & Oyetayo, V. O. (2020). Assessment of the Preservative Efficacy of *Azadirachta indica* A. Juss. and *Psidium guajava* L. Leaf Extracts on *Capsicum annuum* L. (Bell Pepper). *South Asian Journal of Research in Microbiology*, 7(2), 19-33.
- Pandey, A., Kaushik, A., & Tiwari, S. K. (2011). Evaluation of antimicrobial activity and phytochemical analysis of *Citrus limon*. *J. of Pharmaceutical and Biomedical Scie. JPBMS*, 13(13), 1-7.
- Petkar, H. M., Caseres-Chiuco, I., Al-Shaddad, A., Mohamed, M., Ahmed, I., Rao, R. & Saleh, H. (2024). Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* on a neonatal intensive care unit: lessons from a Qatari setting. *Journal of Infection Prevention*, 25(4), 103-109.
- Pereira, M. C., Oliveira, D. A., Hill, L. E., Zambiasi, R. C., Borges, C. D., Vizzotto, M. & Gomes, C. L. (2018). Effect of nanoencapsulation using PLGA on antioxidant and antimicrobial activities of guabiroba fruit phenolic extract. *Food Chemistry*, 240, 396-404.
- Pérez-Narváez, O. A., Castillo Hernández S, S. L., Leos-Rivas, C., Pérez-Hernández, R. A., Chávez-Montes, A., Verduzco-Martínez, J. A., & Sánchez-García, E. (2023). Antibacterial Effect of Ethanolic Extracts of *Dodonaea viscosa* L. Jacq. and *Mammea americana* L.

- against Staphylococci Isolated from Skin Lesions. *BioMed Research International*, 2023(1), 5584412.
- Pisoschi, A. M., Pop, A., Cimpeanu, C., Turcuş, V., Predoi, G., & Iordache, F. (2018). Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity-A critical view. *European journal of medicinal chemistry*, 157, 1326-1345.
- Rahnemoon, P., Sarabi-Jamab, M., Bostan, A., & Mansouri, E. (2021). Nano-encapsulation of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel extract and evaluation of its antimicrobial properties on coated chicken meat. *Food Bioscience*, 43, 101331.
- Rahmani, Z., Karimi, M., Saffari, I., Mirzaei, H., Nejati, M., & Sharafati Chaleshtori, R. (2024). Nanoemulsion and nanoencapsulation of a hydroethanolic extract of Nettle (*Urtica dioica*) and Wormwood (*Artemisia absinthium*): comparison of antibacterial and anticancer activity. *Frontiers in Chemistry*, 12, 1266573.
- Ravichandran, R., Ng, C. C., Liao, S., Pliszka, D., Raghunath, M., Ramakrishna, S., & Chan, C. K. (2011). Biomimetic surface modification of titanium surfaces for early cell capture by advanced electrospinning. *Biomedical materials*, 7(1), 015001.
- Reynolds, D., & Kollef, M. (2021). The epidemiology and pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections: an update. *Drugs*, 81(18), 2117-2131.
- Sánchez, E., Rivas Morales, C., Castillo, S., Leos-Rivas, C., García-Becerra, L., & Ortiz Martinez, D. M. (2016). Antibacterial and antibiofilm activity of methanolic plant extracts against nosocomial microorganisms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016(1), 1572697.
- Sakha, H., Hora, R., Shrestha, S., Acharya, S., Dhakal, D., Thapaliya, S., & Prajapati, K. (2018). Antimicrobial activity of ethanolic extract of medicinal plants against human pathogenic bacteria. *Tribhuvan University Journal of Microbiology*, 5, 1-6.
- Sastre-Femenia, M. À., Fernández-Muñoz, A., Gomis-Font, M. A., Taltavull, B., López-Causapé, C., Arca-Suárez, J. & Barrios-Andrés, J. L. (2023). *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic

- susceptibility profiles, genomic epidemiology and resistance mechanisms: a nation-wide five-year time lapse analysis. *The lancet regional health–Europe*, 34.
- Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2019). Antimicrobial potential of pomegranate peel: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(4), 959-965.
- Stevanovic, M., & Uskokovic, D. (2009). Poly (lactide-co-glycolide)-based micro and nanoparticles for the controlled drug delivery of vitamins. *Current nanoscience*, 5(1), 1-14.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J. & Olson, M. V. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406(6799), 959-96.
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 8671.
- Tuon, F. F., Rocha, J. L., & Gasparetto, J. (2019). Polymyxin B and colistin—the economic burden of nephrotoxicity against multidrug resistant bacteria. *Journal of Medical Economics*, 22(2), 158-162.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and therapeutics*, 40(4), 277.
- Vidallon, M., Yu, F., & Teo, B. (2020). Controlling the size and polymorphism of calcium carbonate hybrid particles using natural biopolymers. *Crystal Growth & Design*, 20(2), 645-652.
- Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
- Walsh, S. E., Maillard, J. Y., Russell, A. D., Catrenich, C. E., Charbonneau, D. L., & Bartolo, R. G. (2003). Development of bacterial resistance to several biocides and effects on antibiotic susceptibility. *Journal of Hospital Infection*, 55(2), 98-107.

- Weimann, A., Dinan, A. M., Ruis, C., Bernut, A., Pont, S., Brown, K. & Floto, R. A. (2024). Evolution and host-specific adaptation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 385(6704), eadi0908.
- Wijesundara, N. M., & Rupasinghe, H. V. (2019). Bactericidal and anti-biofilm activity of ethanol extracts derived from selected medicinal plants against *Streptococcus pyogenes*. *Molecules*, 24(6), 1165.
- Wischke, C. & Schwendeman, S. P. (2008). Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *International Journal of pharmaceutics*, 364(2), 298-327.
- Wolfmeier, H., Pletzer, D., Mansour, S. C., & Hancock, R. E. (2018). New perspectives in biofilm eradication. *ACS infectious diseases*, 4(2), 93-106.
- World Health Organization. (2024). *WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance, to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. World Health Organization.
- Zaborina, O., Kohler, J. E., Wang, Y., Bethel, C., Shevchenko, O., Wu, L. & Alverdy, J. C. (2006). Identification of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates that are highly disruptive to the intestinal epithelial barrier. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 5(1), 14.
- Zhanel, G. G., Lawson, C. D., Zelenitsky, S., Findlay, B., Schweizer, F., Adam, H. & Karlowsky, J. A. (2012). Comparison of the next-generation aminoglycoside plazomicin to gentamicin, tobramycin and amikacin. *Expert review of anti-infective therapy*, 10(4), 459-473.