



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

UNIDAD ACADÉMICA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Microemulsiones contenidas en un gel como sistema estabilizante de un extracto lipofílico con actividad cicatrizante

Tesis que presenta:

QFB. Kenia Guadalupe Felix Sagaste

Para obtener el grado de Maestría en Ciencias Biológicas

Directores de tesis:

Dr. Lorenzo Antonio Picos Corrales

Dra. Evangelina García Armenta

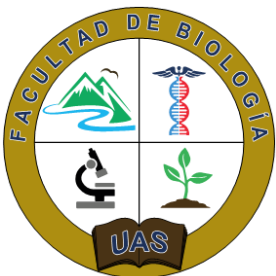
Asesores de tesis:

Dr. Edith Hilario Torres Montoya

Dr. José Marcial Zazueta Moreno

Dra. Ana María Morales Burgos

Culiacán, Sinaloa, México a 11 de junio del 2024





Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial Compartir Igual, 4.0 Internacional



DEDICATORIA

A mis padres, a mis hermanos, a mi hijo y mi esposo.

*Que son lo más valioso de mi vida y mi soporte
para cumplir cada una de mis metas personales y profesionales.*

Al concluir esta etapa maravillosa de mi vida, en donde puse todo mi esfuerzo y dedicación durante dos años para la realización de este proyecto de investigación, solo me resta dedicarle este trabajo con todo mi amor y gratitud a quienes formaron parte del proceso y me brindaron su apoyo incondicionalmente.

A mi madre Teresa Sagaste: Por darme la vida, y por estar presente siempre en cada uno de mis proyectos brindándome sus palabras de aliento en los momentos más difíciles, sobre todo cuando estaba a punto de rendirme, siempre estaba ella para recordarme que yo siempre puedo y que debía confiar más en mí misma. Mamá, no tengo las palabras adecuadas que me permitan expresarte todo lo que representas para mí y para mi hijo. Gracias por cuidarlo con todo tu amor, mientras yo trabajaba en el laboratorio o simplemente cuando tenía que pasar horas frente a la computadora. Te admiro demasiado, porque me has demostrado que siempre se puede salir adelante cuando uno se lo propone, inclusive cuando la vida te da fuertes golpes como la pérdida de papá. Te amo infinitamente.

A mi padre Rene Felix: Por enseñarme a siempre luchar por mis sueños. Papá ésta siempre es la parte más difícil de mi trabajo, tener que dedicarte mis logros hasta el cielo, ya que desafortunadamente no puedes estar presente físicamente junto a mi para celebrarlo. Todos los días, te pienso y te extraño. El recordarte me da las fuerzas necesarias para salir y conseguir mis metas. Tu sigues viviendo en mí y mientras eso suceda siempre estaré aquí para honrar tu memoria. Te amo con todo mi corazón.

A mi hijo Pedro Rene: Por ser la personita a quién más amo en esta vida. Gracias mi amorcito, por llenar mis días de alegría y ser esa fuerza que necesito para levantarme todos los días. Todo lo que he logrado y las metas futuras, siempre son por ti y para ti. Siempre me has acompañado comprensivamente, desde que estaba en la licenciatura a pesar de estar tan pequeñito, pasamos por muchos momentos difíciles, pero hoy por fin estamos viendo algunas recompensas. Eres el mejor hijo del mundo. Te amo.

A mi esposo Jose Pedro: Por ser mi compañero de vida durante este largo camino. Gracias, por estar siempre apoyándome en cada decisión que he tomado. Te dedico este trabajo, porque juntos lo hemos logrado y comparto mi felicidad contigo. Me siento orgullosa de ver que te has convertido en un excelente profesional, pero también en el mejor esposo y padre para mi hijo. Te amo.

A mis hermanos Yojan y Ximena Felix: Por apoyarme a lo largo de mi vida y convertirse en los mejores tíos para mi hijo. Gracias, por estar siempre presentes. No soy perfecta, pero intento siempre darles un buen ejemplo como la hermana mayor. Son muy especiales para mí y los amo muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de la manera más atenta y respetuosa, a todas las personas que me acompañaron durante mis estudios de maestría y colaboraron en mayor o menor grado a la realización de esta tesis. Para todas ellas mi total admiración y gratitud.

A la **Universidad Autónoma de Sinaloa**: Por ser la institución que me permitió estudiar una licenciatura y me abrió sus puertas de nuevo para realizar un posgrado.

Al **posgrado en Ciencias Biológicas**: por brindarme una oportunidad y depositar en mí la confianza para realizar un trabajo de investigación y poder obtener el grado de maestra en ciencias biológicas.

A **CONAHCYT** y **PROFAPI-UAS PRO_A2_005** y **PRO_A7_016**: Agradezco a CONAHCYT Por brindarme una beca (985631) para manutención durante dos años y a los proyectos PROFAPI por el financiamiento para la realización de este proyecto.

A la **Dra. Evangelina García Armenta**: por codirigirme en este proyecto de maestría y acompañarme durante todo mi crecimiento profesional desde que me encontraba en la licenciatura. Gracias Dra por su asesoría y por compartir conmigo un poco de su amplio conocimiento, sobre todo gracias por su confianza y por creer siempre en mí. Atesoro mucho las pláticas y buenos momentos que hemos compartido.

Al **Dr. Lorenzo Antonio Picos Corrales**: por ser mi director de tesis de maestría. Gracias Dr por todo su tiempo invertido en mí, por su confianza y su paciencia durante este largo camino. Valoro mucho todos los consejos profesionales y de la vida que me brindó durante todo este tiempo. Agradezco que siempre estuvo en la mejor disposición de ayudarme cada vez que lo necesitaba, fue un excelente director y guía para mí en esta etapa.

A el **Dr. José Marcial Zazueta Moreno**, **Dr. Edith Hilario Torres Montoya** y **Dra. Ana María Morales Burgos**: por ser mis asesores de tesis. Les agradezco todos los consejos y cuestionamientos brindados con la finalidad de mejorar cada vez más mi escrito y presentación de tesis.

A el **M.I Pedro de Jesús Bastidas Bastidas**: por todas las facilidades y asesorías proporcionadas en la técnica de GC-MS en el laboratorio de plaguicidas de CIAD Culiacán.

A el **Dr. Aldo Clemente Soto**: por enseñarme y recibirme en su laboratorio para realizar la prueba de análisis *in vitro*, siempre con la mejor de la disposición y actitud.

A la **LBG. Andrea Torres Iribe** por apoyarme con la técnica de docking molecular tan amablemente.

A mi hermano **Yojan Felix** y mi esposo **Jose Pedro**: por ayudarme con la recolección de los chapulines. Sin esa labor, mi proyecto no se hubiera llevado a cabo.

A **mi familia**: por ser parte fundamental de mi apoyo emocional. Mi eterno agradecimiento es para ustedes. Los quiero muchísimo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE CUADROS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Cicatrización de heridas.....	3
2.2 Medicina tradicional para la cicatrización de heridas.....	6
2.3 Sistemas de cicatrización novedosos	8
2.3.1 Microemulsiones.....	12
2.3.2 Hidrogeles	16
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
IV. JUSTIFICACIÓN.....	21
V. HIPÓTESIS	22
VI. OBJETIVOS.....	23
6.1 Objetivo general.....	23
6.2 Objetivos específicos	23
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24

7.1 Materiales.....	24
7.1.1 Recolección de la muestra biológica.....	24
7.2 Metodología	27
7.2.1 Obtención del extracto	27
7.2.2 Preparación de microemulsiones a base del extracto lipofílico de chapulines.....	28
7.2.2.1 Purificación del quitosano.....	28
7.2.2.2 Formación de microemulsiones	28
7.2.3 Preparación del gel físico	30
7.2.4 Técnicas de caracterización.....	32
7.2.4.1 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS).....	32
7.2.4.2 Cromatografía de gases acoplado al detector de ionización de llama (GC-FID)	32
7.2.4.3 Resonancia magnética nuclear de hidrógeno (¹ H-RMN).....	33
7.2.4.4 Determinación del peso molecular por viscosimetría	34
7.2.4.5 Propiedades físicas de las microemulsiones.....	36
7.2.4.5.1 Medición del tamaño de partícula	36
7.2.4.5.2 Potencial zeta (ζ).....	37
7.2.4.6 Propiedades físicas de los geles	37
7.2.5 Modelo <i>in silico</i> (docking molecular)	37
7.2.6 Pruebas biológicas preliminares.....	38

7.2.6.1 Cultivo celular	38
7.2.6.2 Análisis <i>in vitro</i> de las propiedades cicatrizantes	39
7.2.7 Análisis estadístico	41
7.2.8 Lugar de realización	42
7.2.9 Financiamiento	42
VIII. RESULTADOS	43
8.1 Obtención del extracto	43
8.2 Caracterización del extracto.....	43
8.2.1 Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de Masas (GC-MS).....	43
8.2.2 Cromatografía de gases acoplado al detector de ionización de llama (GC-FID).....	47
8.2.3 Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (¹ H-RMN).....	47
8.3 Caracterización de los biopolímeros.....	51
8.3.1 Determinación del peso molecular de los polímeros por viscosimetría y potencial zeta (ζ) por Electroforesis de Laser Doppler	51
8.4 Formación de microemulsiones	53
8.5 Preparación del gel físico.....	71
8.6 Docking molecular.....	77
8.7 Prueba biológica preliminar.....	81
IX. DISCUSIÓN.....	85
X. CONCLUSIONES.....	94

XI. PERSPECTIVAS.....	96
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
XIII. ANEXOS	109

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Proceso de cicatrización de heridas. Está constituido por tres fases: 1) inflamatoria, 2) proliferativa y 3) de remodelación. En cada una de ellas intervienen distintos tipos celulares, rutas de señalización, mecanismos moleculares y bioquímicos que actúan simultáneamente para reparar el daño.	4
Figura 2. Estructura química del quitosano y su mecanismo de estabilización de emulsiones. El quitosano puede interactuar electrostáticamente con otros compuestos cargados negativamente como los ácidos grasos, o bien, formar puentes de hidrógeno para crear una capa interfacial alrededor de las gotas de aceite.	11
Figura 3. Diferentes tipos de emulsiones. a) Clasificación de las emulsiones de acuerdo con la distribución de la fase oleosa acuosa. O/W (aceite en agua) y W/O (agua en aceite), b) Emulsión O/W con surfactantes, y c) Emulsión O/W libre de surfactantes.	13
Figura 4. Estrategia experimental que se realizó durante el proyecto. Se usó un extracto lipofílico obtenido de chapulines (<i>Brachystola magna</i>) y quitosanos de diferentes pesos moleculares para el desarrollo de microemulsiones, las cuales fueron utilizadas para las pruebas biológicas y se estabilizaron en un gel físico de alginato de sodio como forma farmacéutica final.	25
Figura 5. Fotografías del chapulín adulto <i>Brachystola magna</i> . (a) insecto alimentándose del tallo y hoja de planta; (b) características anatómicas distintivas de la especie (alas vestigiales redondeadas color rosáceas con puntos negros, en el pronoto se observan 3 bordes longitudinales, lisos y de color amarillo claro).	26

Figura 6. Esquema experimental de la formación de microemulsiones. a) Estudio de la variación de la concentración de quitosano y b) variación de la relación extracto-polímero sobre la estabilidad de las emulsiones.	29
Figura 7. Esquema experimental de la formación de los geles. La reticulación de las cadenas poliméricas del alginato de sodio se logra con la introducción de iones de Ca^{2+} para posteriormente ser cargados con microemulsiones.	31
Figura 8. Esquema del flujo de trabajo del ensayo de cicatrización de heridas <i>in vitro</i> . 1) Preparación de cultivos y siembra de células HeLa; 2) Realización de una “herida” por rayado con punta de micropipeta, creando un espacio vacío en la monocapa de células confluentes y aplicación de tratamientos; 3) Captura de imágenes microscópicas y medición de áreas en cada punto de tiempo; y 4) Análisis de datos.....	40
Figura 9. Extracto lipofílico obtenido de los chapulines <i>Brachystola magna</i>	44
Figura 10. Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno del extracto de chapulín. Se muestran los picos característicos de ácidos grasos.	50
Figura 11. Gráfica de la determinación de la viscosidad intrínseca (g/mol) para obtener el peso molecular de los polímeros.	52
Figura 12. Imagen microscópica a 10x del extracto lipofílico de chapulín mezclado con solución salina.	54
Figura 13. Imágenes microscópicas a 10x y gráfica de la distribución del número y tamaño de partículas correspondientes a la cinética de tiempo para la formación de emulsiones.....	55
Figura 14. Imágenes macroscópicas y microscópicas (magnificación=40x) de emulsiones a base de extracto lipofílico de chapulines y quitosano (CHB, CH56 y CHM) en distintas	

relaciones extracto-polímero y concentración fija de quitosano (10 mg/mL) a 1 hora de reposo después de la preparación.	56
Figura 15. Gráficas de distribución de tamaño (a, b y c) y número de partículas (d, e y f) mediante análisis digital de imágenes de las emulsiones con distintas relaciones de extracto-polímero y concentración fija de quitosano (10 mg/mL) a 1 hora de reposo después de la preparación.....	58
Figura 16. Gráficas de variación de la turbidez de las emulsiones con diferentes relaciones de extracto-polímero a distintos tiempos de reposo después de la preparación. Las muestras fueron diluidas con solución salina a ¼.....	62
Figura 17. Imágenes microscópicas a 40x de las emulsiones con distintas concentraciones de quitosano a 1 h de reposo después de la preparación.	63
Figura 18. Gráficas de distribución del tamaño (a, b y c) y número de partículas (d, e y f) mediante análisis digital de imágenes de las emulsiones con distintas concentraciones de quitosano a 1 hora de reposo después de la preparación.	64
Figura 19. Gráficas de variación de la turbidez de las emulsiones con diferentes concentraciones de polímero a distintos tiempos de reposo después de la preparación. Las muestras fueron diluidas con solución salina a ¼.	67
Figura 20. Imágenes microscópicas (10x de magnificación) de las emulsiones óptimas (1:10) con CHB y CH56 a 10 mg/mL.....	68
Figura 21. Gráficas de distribución de tamaño de partícula de las emulsiones óptimas obtenidas por DLS (a, b) y microscopía (c, d).	70

Figura 22. Geles con distintas concentraciones de alginato de sodio. a) 3 mg/mL; b) 5 mg/mL y c) 7 mg/mL. Las fotografías del microscopio a 40x corresponden a los geles de 5 mg/mL de alginato. Se observan partículas distribuidas en la muestra fresca y seca.	72
Figura 23. Gráfica de la variación de turbidez de los geles con distintas concentraciones de alginato de sodio cargados con emulsiones a base de extracto y distintos tipos de quitosano. El punto en la gráfica encerrado con línea punteada representa al valor de turbidez de la emulsión que precipitó totalmente.	73
Figura 24. Gráficas representativas de la cinética de pérdida de peso de los geles. Todos se secaron completamente en 4 horas a 37 °C.	75
Figura 25. Gráfica representativa de la prueba de desplazamiento máximo hasta la ruptura de los geles.	76
Figura 26. Simulación de acoplamiento de la proteína colágeno (molécula morada) y ácido linolénico (molécula naranja). El enlace polar está representando con las líneas discontinuas amarillas.	78
Figura 27. Simulación de acoplamiento de la proteína FFAR1 (molécula amarilla) y ácido linoleico (molécula azul). El enlace polar está representando con las líneas discontinuas amarillas.	79
Figura 28. Simulación de acoplamiento de la proteína FFAR1 (molécula amarilla) y ácido linolénico (molécula naranja). El enlace polar está representando con las líneas discontinuas amarillas.	80

Figura 29. Migración y proliferación de células HeLa a 0, 24, 48 y 72 h después de la aplicación de los tratamientos. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes para cada muestra a 4x.....	82
Figura 30. Efecto de las microemulsiones con extracto sobre el cierre del área de la herida a las 24, 48 y 72 horas. Los resultados se expresaron como porcentaje en relación con el área a las 0 h. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs control negativo.....	83

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Compuestos identificados en el extracto del chapulín por GC-MS.	45
Cuadro 2. Perfil de lípidos del extracto de chapulín por GC-MS.	48
Cuadro 3. Media y desviación estándar del tamaño de partícula de las microemulsiones (μm) con distintas relaciones de extracto lipofílico- quitosano a diferentes tiempos de reposo después de su elaboración.	59
Cuadro 4. Media y desviación estándar del tamaño de partícula de las microemulsiones (μm) con distintas concentraciones de quitosano a diferentes tiempos de reposo después de la preparación.	65
Cuadro 5. Valores de potencial zeta (ζ) y tamaño de partícula de las emulsiones óptimas (μm) obtenido por microscopía y DLS.	69

RESUMEN

Los hidrogeles han demostrado ser un enfoque prometedor para la curación de heridas debido a sus propiedades fisicoquímicas que permiten crear un microambiente adecuado para la migración celular. Por otra parte, las microemulsiones ayudan a encapsular extractos con compuestos cicatrizantes permitiendo una liberación controlada de estos. Además, aumentan la biodisponibilidad de los principios activos en la lesión y favorecen su protección ante una eventual degradación. Se ha reportado que ciertos componentes como los ácidos grasos de extractos de grillos y chapulines, ayudan en el tratamiento de heridas cutáneas. Así, el chapulín *Brachystola magna*, un insecto plaga de Sinaloa, al pertenecer al mismo orden taxonómico, también podría poseer dichos componentes cicatrizantes. Por ello, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una formulación a base de microemulsiones contenidas en un gel como sistema estabilizante de un extracto lipofílico de chapulín y evaluar su actividad cicatrizante. La estrategia experimental consistió en: 1) Caracterizar el extracto lipofílico de chapulines *Brachystola magna* y los polímeros (quitosano y alginato de sodio), 2) Evaluar el efecto de la concentración y tamaño del quitosano sobre la estabilidad de las emulsiones y la concentración del alginato de sodio sobre las propiedades físicas de los geles, y 3) Realizar pruebas biológicas preliminares para evaluar la aplicación potencial cicatrizante de la formulación. Como resultados se encontró que el extracto de chapulín contenía esteroides y ácidos grasos con potencial actividad cicatrizante. En el estudio *in silico* se determinó que el ácido linolénico, el cual aparece en mayor concentración en el extracto de chapulín, mostró la mejor interacción con la proteína relacionada con la cicatrización FFAR1, con una energía de afinidad de -5.4 kcal/mol. Las emulsiones con 10 mg/mL de quitosano (extracto-quitosano 1:10) lograron permanecer estables hasta las 168 h, por lo que se consideraron como óptimas. La emulsión con quitosano CHB formó partículas de un menor tamaño (1.28 μm) y un potencial zeta (ζ) mayor (+40.4 mV) en comparación con la emulsión elaborada con el quitosano CH56. Los geles con 7 mg/mL de alginato presentaron una consistencia idónea que favorece su aplicación tópica. Los geles cargados con emulsiones a base de quitosano CHM demostraron tener mayor capacidad de estiramiento y resistencia. En el estudio *in vitro* con células HeLa se observó que la emulsión a base de quitosano CHB con una concentración de extracto de 5 $\mu\text{g/mL}$ logró un cierre de herida significativo comparado con el control negativo con un porcentaje de cierre de 83.82% a las 72 h. En conclusión, el gel desarrollado a base de microemulsión cargado con extracto de chapulín podría proponerse como una estrategia alentadora para el tratamiento de heridas.

(Palabras clave: *Brachystola magna*, microemulsiones, cicatrización, gel físico).

ABSTRACT

Hydrogels have been considered as a promising alternative for wound healing due to their physicochemical properties that allow the creation of a microenvironment suitable for cell migration. On the other hand, microemulsions enable to encapsulate extracts with healing compounds, allowing a controlled release of these. In addition, they increase the bioavailability of the active ingredients in the injury and promote their protection against eventual degradation. Certain compounds, such as fatty acids from cricket and grasshopper extracts, have been reported to help treat skin wounds. Thus, the grasshopper *Brachystola magna*, a pest insect from Sinaloa, belonging to the same taxonomic order, could also possess these healing substances. Therefore, the aim of this work was to develop a formulation based on microemulsions contained in a gel as a stabilizing system of a grasshopper lipophilic extract and to evaluate its healing activity. The experimental strategy consisted of 1) Characterizing the lipophilic extract of grasshoppers *Brachystola magna* and polymers (chitosan and sodium alginate), 2) Evaluating the effect of chitosan concentration and size on emulsion stability and alginate concentration on the physical properties of gels, and 3) Performing preliminary biological tests to evaluate the potential healing application of the formulation. As results, it was found that the grasshopper extract contained sterols and fatty acids with potential healing activity. Based in the *in silico* study, the linolenic acid, which had the highest concentration in the grasshopper extract, showed the best interaction with the healing-related protein FFAR1, with a binding affinity of -5.4 kcal/mol. Emulsions with 10 mg/mL chitosan (extract-chitosan 1:10) remained stable up to 168 h, and were therefore considered the optimal system. The emulsion with chitosan CHB formed particles with a smaller size (1.28 μm) and a higher zeta potential (ζ) (+40.4 mV) compared to the emulsion prepared with chitosan CH56. The gels with 7 mg/mL of alginate presented an ideal consistency that favors their topical application. Gels loaded with CHM chitosan-based emulsions showed higher stretching capacity and resistance. In the *in vitro* study with HeLa cells, it was observed that the CHB chitosan-based emulsion with an extract concentration of 5 $\mu\text{g/mL}$ achieved significant wound closure compared to the negative control with a closure percentage of 83.82% at 72 h. In conclusion, the developed microemulsion-based gel loaded with grasshopper extract could be proposed as an encouraging strategy for wound treatment.

(Key words: *Brachystola magna*, microemulsions, healing, physical gel).

I. INTRODUCCIÓN

La piel es el órgano más grande del ser humano que actúa como la primera barrera mecánica entre el organismo y el ambiente externo, sirve para proteger al cuerpo contra agentes nocivos como microorganismos y ayuda a la regulación de agua, nutrientes, electrolitos y temperatura (Gushiken et al., 2021; M. Kumar et al., 2024). Cuando se genera una alteración a nivel morfológico o funcional en alguna de las capas de la piel, se produce una herida y el organismo inicia el proceso de cicatrización, el cual consta de tres fases fundamentales: la fase inflamatoria, la proliferativa y la fase de remodelación que tienen como finalidad prevenir la contaminación microbiana, remover tejido dañado y regenerar el tejido para ir reduciendo la herida progresivamente (Gauglitz et al., 2011). Cualquier desequilibrio en alguna de las fases puede provocar problemas y retrasos en la cicatrización.

El tipo de herida (quemadura, traumatismo, herida diabética, intervención quirúrgica) es determinante para decidir el tratamiento más adecuado, ya que no requieren los mismos cuidados. Sin embargo, existen una serie de principios activos que son de uso común en el tratamiento de estas lesiones (Laseca-Arranz et al., 2021). Desde la antigüedad, se han utilizado algunas preparaciones originadas de la medicina tradicional para la curación de heridas, incluyendo extractos de plantas e insectos (Biro et al., 2003; Buszewska-Forajta et al., 2014, 2015; Sztych, 2013). No obstante, la aplicación de algún extracto de manera cruda sobre un tejido expuesto podría empeorar la herida, por lo que se debe considerar una forma farmacéutica apropiada para su aplicación que ayude a optimizar el proceso de cicatrización. Actualmente, existen varios tratamientos para las lesiones de la piel, que comprenden procedimientos quirúrgicos, terapias no quirúrgicas y agentes farmacológicos (Gushiken et al., 2021). Dentro de las terapias no quirúrgicas se incluyen las formulaciones tópicas (hidrogeles,

cremas, suspensiones, etc.), apósitos, andamios y sustitutos de la piel. La vía de administración tópica es la más utilizada para tratar heridas cutáneas, ya que se evita el metabolismo de primer paso y los efectos secundarios sistémicos, además proporcionan una aplicación sencilla del fármaco (Gushiken et al., 2021). Es importante que las formulaciones tópicas sean estériles y utilicen compuestos biocompatibles con la piel como los biopolímeros para evitar molestias, irritación de la piel o reacciones alérgicas.

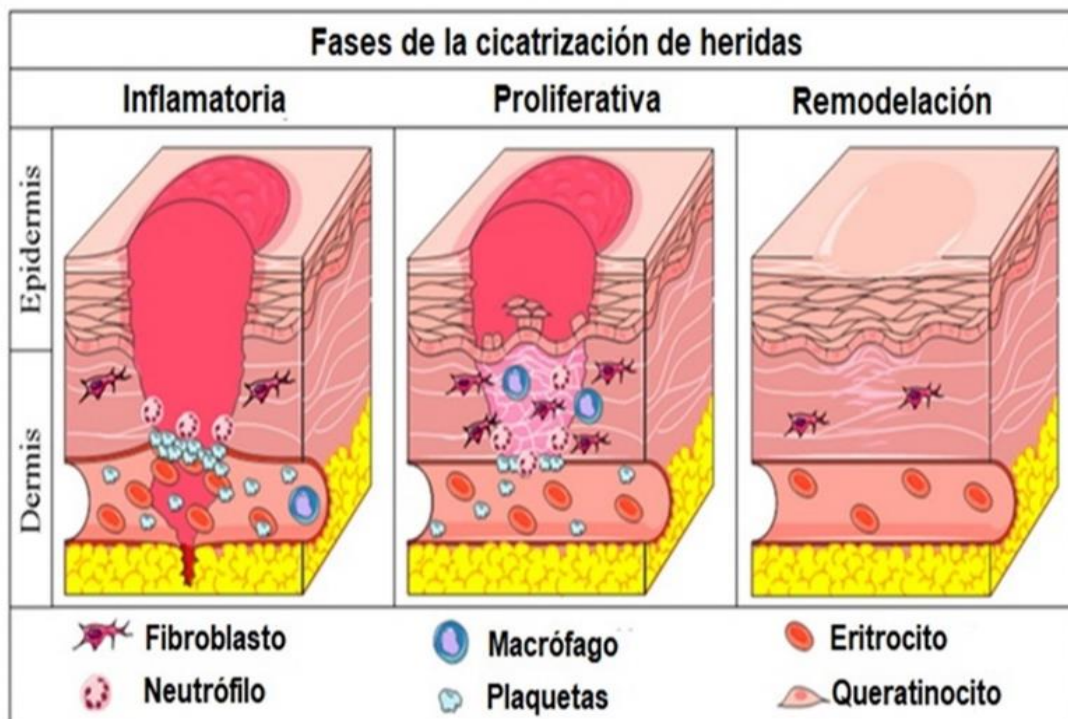
Los hidrogeles son una excelente opción terapéutica para aplicarse sobre una lesión. Estos consisten en una red tridimensional reticulada, porosa y elástica constituida por polímeros hidrófilos como el alginato de sodio (Duarte et al., 2024). Debido a sus propiedades fisicoquímicas proporcionan un ambiente húmedo en la herida que favorece la migración celular. Además, tienen una estructura similar a la matriz extracelular (MEC) lo que le permite inducir la regeneración parcial del tejido (Duarte et al., 2024). Asimismo, permiten incorporar en su estructura a otros sistemas cicatrizantes novedosos como es el caso de micelas, nanopartículas poliméricas o microemulsiones, proporcionando un soporte para su aplicación. Dichos sistemas de liberación de fármacos mejoran la estabilidad y eficacia de los tratamientos cicatrizantes y permiten una liberación controlada y dirigida de las moléculas activas presentes en extractos naturales, así como su protección de la degradación (Wang et al., 2019) dando como resultado que la cantidad total necesaria del producto sea menor para lograr un efecto terapéutico (Laseca-Arranz et al., 2021). Derivado de lo anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una formulación a base de microemulsiones contenidas en un gel como sistema estabilizante de un extracto lipofílico de chapulín y evaluar su actividad cicatrizante.

II. ANTECEDENTES

2.1 Cicatrización de heridas

Al generarse una lesión en el tejido epitelial, el organismo activa diversos procesos celulares, moleculares y bioquímicos que actúan simultáneamente para reparar el daño (M. Kumar et al., 2024). La Figura 1 ilustra las diversas fases implicadas en el proceso fisiológico de curación de heridas.

La fase inflamatoria se podría dividir en dos subfases: hemostasia-coagulación e inflamación propiamente dicha. En la primera, tras la lesión y hemorragia se activan los mecanismos de vasoconstricción, la cascada de coagulación y se activan y agregan las plaquetas con el resultado final de la formación de un coágulo de fibrina, actuando como matriz extracelular provisional (MEC) para la migración de las células sanguíneas (Gushiken et al., 2021). Luego de una vasoconstricción rápida, indispensable para la hemostasia inmediata, le sigue una fase de vasodilatación favorecida por numerosos factores como serotonina, heparina, histamina, prostanglandinas y algunos elementos de la cascada del complemento. Además, las plaquetas y células lesionadas liberan citocinas y factores de crecimiento como interleucina-1 β (IL-1 β), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que atraen leucocitos a la herida, como los neutrófilos que ayudan en la limpieza de la herida y promueven la fagocitosis de antígenos patógenos, dando inicio a la fase de inflamación propiamente dicha (Rodrigues et al., 2019; P.-H. Wang et al., 2018). Los neutrófilos a su vez liberan otras citocinas que atraen a otras células inflamatorias (queratinocitos, macrófagos, linfocitos y basófilos) y liberan factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento insulínico-1 (IGF-1) que activan la proliferación local de fibroblastos, queratinocitos y células endoteliales



01 Hemostasia-coagulación
Inflamación propiamente dicha

02 Angiogénesis
Fibroplasia
Reepitelización

03 Remodelación de MEC
Apoptosis de células
Aumento MMPs

Figura 1. Proceso de cicatrización de heridas. Está constituido por tres fases: 1) inflamatoria, 2) proliferativa y 3) de remodelación. En cada una de ellas intervienen distintos tipos celulares, rutas de señalización, mecanismos moleculares y bioquímicos que actúan simultáneamente para reparar el daño.

Adaptada de: Gushiken et al., (2021).

(Larouche et al., 2018; Reinke & Sorg, 2012a). Después de unos días del daño, los macrófagos comienzan a migrar a la herida para continuar con el desbridamiento del tejido necrótico y la fagocitosis de microorganismos patógenos, y secretan factores de crecimiento y citocinas que favorecen los siguientes mecanismos que ocurrirán en la siguiente fase (Gushiken et al., 2021).

La fase proliferativa como su nombre lo indica, se caracteriza por tener una alta proliferación y migración de distintos tipos celulares (fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos) que ayudarán a conformar la nueva matriz extracelular temporal (MEC) (Tottoli et al., 2020). En esta fase ocurren tres procesos importantes denominados como: angiogénesis, fibroplasia y reepitelización.

Cabe mencionar que la reestructuración de la vascularización en la herida, con la consecuente formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), comienza inmediatamente después de la lesión, pero tiene mayor actividad en la fase proliferativa, la cual es favorecida por algunos factores angiogénicos que estimulan la migración de células endoteliales, como VEGF y angiopoyetinas (Veith et al., 2019). Esto con la finalidad, de proporcionar al sitio afectado mayor cantidad de oxígeno y nutrientes necesarios para la migración y proliferación de las células.

En el proceso de fibroplasia los fibroblastos sintetizan proteoglicanos, glicosamingoglicanos, colágeno tipo III y fibronectina, los cuales son los elementos fundamentales de la MEC provisional (Gushiken et al., 2021; Rodrigues et al., 2019). Mientras que, en la reepitelización los queratinocitos son estimulados por factores de crecimiento en el borde de la herida o folículos pilosos para que migren, proliferen y se diferencien. Este estímulo desencadena la pérdida de moléculas de adhesión de los queratinocitos, inhibiendo el contacto físico con desmosomas y hemidesmosomas, y aumentando la migración de estas células a través de la

matriz extracelular. Todo con el propósito de cerrar la brecha epitelial y restaurar la función de barrera de la piel (Reinke & Sorg, 2012b; Tomic-Canic et al., 2018).

Finalmente, en la etapa de remodelación, diversas células como macrófagos, queratinocitos, neutrófilos y fibroblastos que migraron provisionalmente mueren por apoptosis al cumplir con sus respectivas funciones (Gushiken et al., 2021). Los fibroblastos en el tejido en remodelación sintetizan colágeno tipo I, elastina y otros compuestos de la matriz extracelular permanente, mientras que una parte de ellos son estimulados por TGF- β 1 para diferenciarse en miofibroblastos, adquiriendo un fenotipo contráctil que ayuda disminuir el área de la herida debido a los múltiples puntos de conexión de las proteínas de los miofibroblastos con las fibras de colágeno (Karppinen et al., 2019).

Por otro lado, las células locales en el sitio de la herida sintetizan metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) para degradar las proteínas de la matriz extracelular provisional y ayudar en la organización de paquetes de colágeno tipo I (Martins et al., 2013), ya que éstas producen el balance entre la degradación y la síntesis de colágeno para la formación de la matriz extracelular permanente y consecuentemente la cicatriz.

2.2 Medicina tradicional para la cicatrización de heridas

La utilización de tratamientos derivados de plantas para la cicatrización de heridas ha estado presente desde la antigüedad, lo que la hace culturalmente aprobada y confiable por un gran número de personas en el mundo. La evidencia más antigua registrada del uso de la herbolaria para la curación de heridas se encontró en textos chinos, egipcios, griegos, indios y romanos que datan al menos de hace 5,000 años (Xu et al., 2023). Actualmente, la aplicación de extractos de plantas para el tratamiento de heridas ha aumentado constantemente en todo el

mundo, ya que más del 30% de las medicinas a base de hierbas se consideran que poseen potencial cicatrizante y se utilizan para tratar varias enfermedades de la piel (Jarić et al., 2018).

Sin embargo, los extractos de plantas no son los únicos que pueden ser beneficiosos para tratar problemas en la piel. La entomoterapia, el uso de insectos y productos derivados de insectos con fines terapéuticos (Dev et al., 2020; Siddiqui et al., 2023), se practica desde hace siglos en muchos países del mundo. Los insectos se utilizan vivos, cocidos, molidos, en infusiones, emplastos, ungüentos, y de varias otras formas (Seabrooks & Hu, 2017). No obstante, estos son más conocidos para fines de alimentación y se menosprecia la posibilidad de utilizar estos insectos como una alternativa prometedora a los productos farmacéuticos tradicionales para el tratamiento de enfermedades (Siddiqui et al., 2023). Los extractos de insectos contienen compuestos con una amplia gama de importancia biológica, incluidas propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerígenas, antioxidantes, antiinflamatorias, inmunomoduladoras y cicatrizantes (Hadj Saadoun et al., 2022; Seabrooks & Hu, 2017).

El orden de insectos ortóptera ha demostrado tener especies con potencial para la curación de heridas cutáneas, por ejemplo, la secreción de saltamontes hembra *Chorthippus sp* contiene, entre otros componentes, 14 ácidos grasos y sus derivados que mejoran el proceso de curación de heridas en modelos murinos (Buszewska-Forajta et al., 2015). Mientras que, en un estudio realizado por Murugu et al., (2024) , se concluyó que los aceites provenientes de los grillos *Scapsipedus icipe* y *Gryllus bimaculatus* De Geer, un manjar común en África, tenían diversas aplicaciones en medicina, incluyendo la reparación de heridas.

De igual manera, recientemente se reportó que el perfil lipídico del chapulín *Brachystola magna*, en Sinaloa, México, presentó gran potencial para favorecer la cicatrización de heridas (Felix-Sagaste et al., 2023).

2.3 Sistemas de cicatrización novedosos

En el futuro, la entomoterapia puede convertirse en una solución sostenible y rentable para tratar diversas enfermedades, entre ellas la curación de heridas cutáneas y tiene el potencial de revolucionar la medicina moderna. Para lograrlo, se necesita desarrollar nuevos sistemas de administración de estos extractos o mejorar los existentes. Ya que, a pesar de las ventajas de la administración tópica en el tratamiento de enfermedades de la piel, las formas farmacéuticas comercializadas actualmente en el mercado enfrentan el desafío del efecto barrera de la piel, lo que conduce a una baja efectividad terapéutica y efectos secundarios indeseables (Pires et al., 2024).

Los agentes tradicionales de cicatrización de heridas incluyen formulaciones tópicas líquidas (soluciones, suspensiones y emulsiones) y semisólidas (ungüentos y cremas), así como apósitos tradicionales secos (Boateng et al., 2008). Las soluciones como la povidona yodada son más eficaces en las etapas iniciales de la cicatrización de heridas para reducir la carga bacteriana y como agentes de desbridamiento y desprendimiento para evitar la maceración del tejido sano mediante la eliminación del tejido necrótico de la herida fresca (Boateng et al., 2008). Sin embargo, el principal problema con las formas de dosificación líquidas son los cortos tiempos de permanencia en el sitio de la herida, especialmente cuando hay un grado medible de supuración (exudación) del fluido de la herida (Boateng et al., 2008).

Por otro lado, los preparados semisólidos, como la crema de sulfadiazina de plata (Hudspith & Rayatt, 2004) utilizados para tratar infecciones bacterianas, permanecen en la superficie de la

herida durante más tiempo que las soluciones. Sin embargo, para heridas con mucho exudado, las preparaciones semisólidas no son muy efectivas para permanecer en el área de la herida ya que absorben líquido rápidamente, pierden sus características reológicas y se vuelven móviles (Boateng et al., 2008), con esto se produce una mayor probabilidad de que estos medicamentos no alcancen la concentración adecuada en el sitio de la infección, debido a su alta degradación en el entorno de la herida y su dificultad para penetrar las biopelículas formadas por las bacterias. La precisión de dosificación inadecuada resultante puede potenciar los efectos tóxicos de los antisépticos en las células humanas y conducir al desarrollo de dermatitis de contacto y resistencia bacteriana causada por los antibióticos (Pires et al., 2024). Mientras que, los apósitos secos tradicionales como gasas, algodón y vendajes sintéticos no proporcionan el ambiente húmedo necesario para la cicatrización de las heridas (Pires et al., 2024).

Debido a lo anterior, se están produciendo nuevos tratamientos más eficaces y seguros para la cicatrización externa de heridas, en donde se utilizan polímeros como quitosano, almidón, fibroína de seda, agarosa, ácido hialurónico, alginato de sodio, colágeno y gelatina para el desarrollo de nanopartículas, liposomas, micelas, niosomas, hidrogeles y micro o nano emulsiones. Dichos sistemas ofrecen muchas ventajas, entre las que se destacan la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, el aumento de la viscosidad, la administración controlada, homogénea y dirigida del fármaco, el aumento de la retención del fármaco en la epidermis y la mitigación general de los efectos adversos, además de proteger a los principios activos ante una posible degradación y proporcionar una mayor estabilidad de los productos farmacéuticos (Pires et al., 2024).

El quitosano es un polisacárido de origen natural, el cual se obtiene de la desacetilación de la quitina, que se encuentra principalmente en el exoesqueleto de crustáceos e insectos. Está formado por unidades de glucosamina unidas a β -(1,4) (2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranosas) con algunas porciones de unidades de N-acetilglucosamina (2-acetamino-2-desoxi- β -D-glucopiranosas) (Figura 2) (Roy et al., 2022). Este es muy utilizado en el campo de la biomedicina y la industria farmacéutica debido a su naturaleza catiónica polimérica, propiedades antibacterianas, antifúngicas y mucoadhesivas, capacidad de gelificación y formación de película, alta propiedad de barrera al oxígeno y la presencia de grupos amino e hidroxilo activos que sirven como sitios reactivos (Guo et al., 2024).

Además, el quitosano comparte una estructura similar al glucosaminoglicano (GAG) en la matriz extracelular, una característica crucial para aplicaciones de ingeniería de tejidos (Guo et al., 2024; Tsai et al., 2014). Por otro lado, este polímero es considerado eficaz para estabilizar las emulsiones ya que muestra una propiedad gelificante cuando el pH es mayor que su pKa (~ 6.3), de modo que aumenta la viscosidad de la fase continua lo que ralentiza la difusión de gotas y flóculos y se disminuye la velocidad de formación de crema, o bien, es capaz de adsorberse a las superficies de gotas de aceite de la emulsión con cargas opuestas mediante atracción electrostática formando una capa interfacial y es apto para formar enlaces de hidrogeno con otros compuestos (Klinkesorn, 2013).

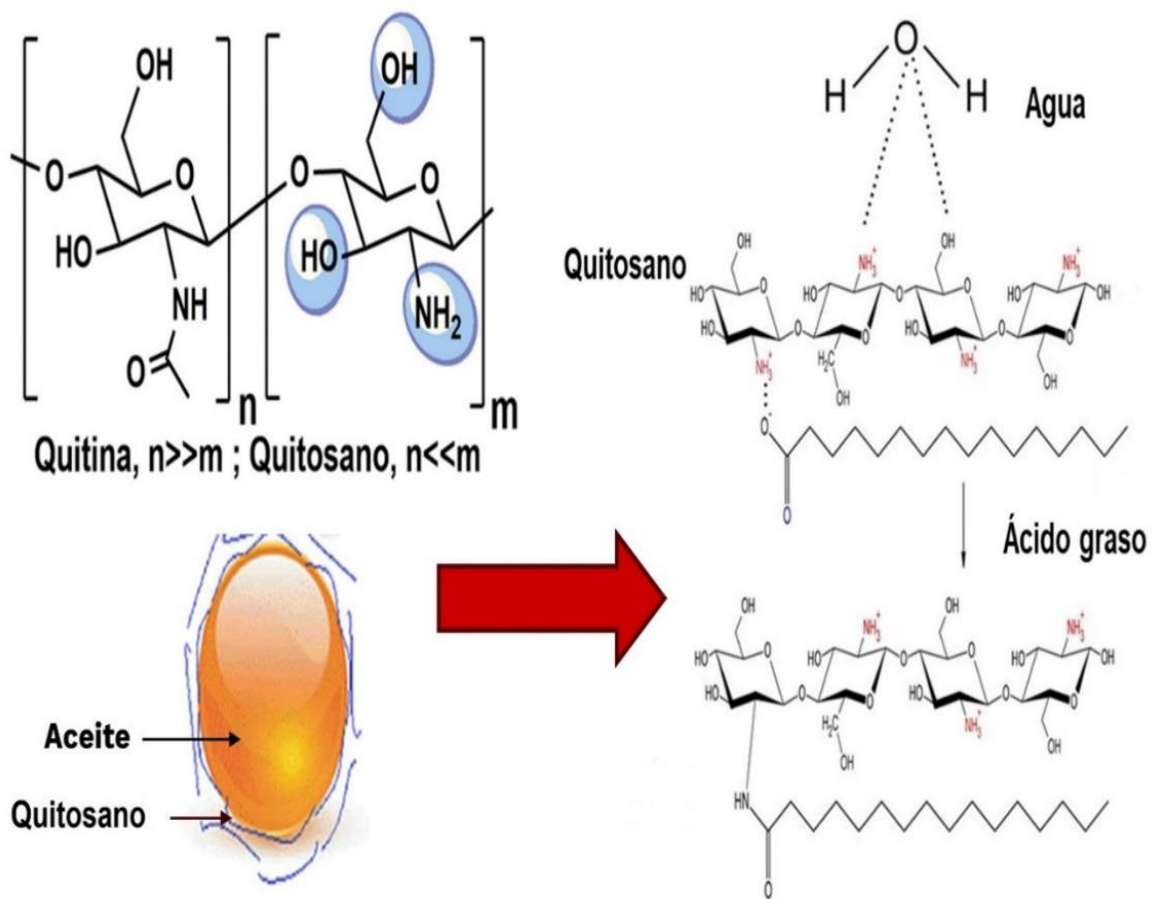


Figura 2. Estructura química del quitosano y su mecanismo de estabilización de emulsiones. El quitosano puede interactuar electrostáticamente con otros compuestos cargados negativamente como los ácidos grasos, o bien, formar puentes de hidrógeno para crear una capa interfacial alrededor de las gotas de aceite.

Por su parte, el alginato de sodio es un polisacárido aniónico natural y no tóxico que puede extraerse de las algas pardas o producirse por bacterias del suelo. Es un copolímero de bloques lineales compuestos de β -D-manurónico (M) y ácido α -1-gulurónico (G) con enlaces 1-4 y se pueden encontrar con tres tipos de bloques: alternancia de M y G, GG o MM (Song et al., 2012). Cuenta con características excelentes para ser utilizado como material de encapsulación o como material base para la formación de hidrogeles. Es biocompatible, biodegradable, tiene una alta absorción de agua, fácil administración de fármacos y fácil gelificación (J. Zhang et al., 2024; X. Zhang et al., 2023).

La gelificación y reticulación del alginato se produce primordialmente mediante el intercambio de iones de sodio de los ácidos glucurónicos (GlcA) con cationes divalentes en solución como Ca^{2+} . El ácido glucurónico bloquea de manera altamente cooperativa e induce la dimerización de las cadenas de alginato. Este proceso de gelificación es reversible. Los geles de alginato pueden volver al estado soluble después de eliminar los cationes divalentes en solución (Song et al., 2012). Otro punto interesante que considerar es que el alginato, como polímero aniónico, puede interactuar electrostáticamente con polímeros catiónicos como es el caso del quitosano, dando como resultado la formación de complejos electrostáticos (Song et al., 2012). De esta manera, podría estabilizar dentro de la red tridimensional del gel a cualquier otro sistema farmacéutico.

2.3.1 Microemulsiones

Una emulsión consiste en dos líquidos inmiscibles formando un sistema donde un líquido (fase dispersa) se encuentra disperso en el otro (fase continua), en forma de pequeñas gotas suspendidas (McClements, 2007). Las emulsiones pueden ser clasificadas de acuerdo con la distribución de la fase oleosa y acuosa (Figura 3a). Un sistema que consiste en gotas de

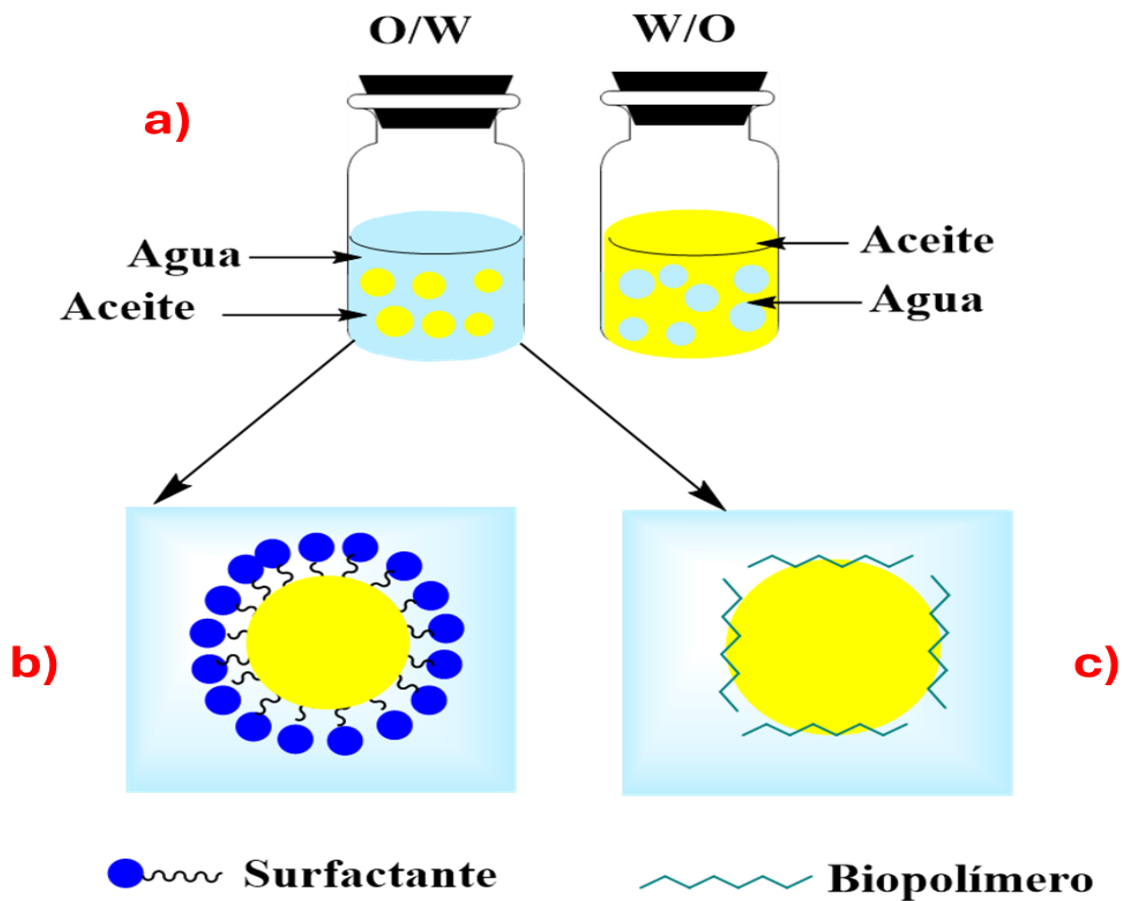


Figura 3. Diferentes tipos de emulsiones. a) Clasificación de las emulsiones de acuerdo con la distribución de la fase oleosa acuosa. O/W (aceite en agua) y W/O (agua en aceite), b) Emulsión O/W con surfactantes, y c) Emulsión O/W libre de surfactantes.

aceite dispersas en la fase acuosa es llamado “emulsión aceite en agua”. Los sistemas compuestos de gotas de agua dispersas en una fase de aceite son llamados “emulsiones agua en aceite” (McClements, 2007). De igual manera, a partir del tamaño de las gotas, las emulsiones pueden clasificarse en: nano (10 - 100 nm), micro (100 - 1000 nm) y macro emulsiones (> 1000 nm) (Tadros et al., 2004).

Por su parte, las microemulsiones son sistemas transportadores de fármacos coloidales termodinámicamente estables ampliamente utilizados para la administración eficaz de fármacos a través de la piel. Es una mezcla isotrópica espontánea de sustancias lipófilas e hidrófilas estabilizadas generalmente por un tensioactivo y un cotensioactivo adecuado (Figura 3b). Un tensioactivo tradicional es una molécula que posee cabeza(s) polar(es) y cola(s) de cadena larga apolar con un fuerte carácter anfifílico que los lleva a la interfaz entre las fases de agua y aceite para estabilizar las microemulsiones (Dantas et al., 2019; Wang & Heuzey, 2016). Pero, estos pueden llegar a ser tóxicos o irritables para la piel.

Sin embargo, las microemulsiones también pueden formarse en ausencia de los tensioactivos tradicionales, a partir de mezclas ternarias de aceite, agua y un biopolímero, y dichas microemulsiones se denominan "microemulsiones libres de tensioactivos" (SFME) (Figura 3c) (Wang & Heuzey, 2016). Por otro lado, se conoce como una emulsión de Pickering a aquella emulsión sin tensioactivos, estabilizada por diminutas partículas sólidas que actúan como “surfactantes” sin serlo propiamente (Ao et al., 2009; Pickering, 1907). En comparación con la emulsión de surfactante común, la emulsión de Pickering ofrece ventajas notables de menos espuma, baja toxicidad (por el tipo de polímero usado), baja irritación sin surfactante, alta estabilidad y reproducibilidad, etc. (Z. Li et al., 2009; Rayner et al., 2014).

Las gotas de aceite en las emulsiones al estar cubiertas con quitosano adquieren una carga positiva lo que favorece las interacciones con las membranas biológicas negativas, mejorando la capacidad de transporte y transferencia de fármacos al interior de las células (M. N. V. R. Kumar, 2000).

Las microemulsiones cargadas con distintos principios activos naturales o sintéticos han demostrado tener la capacidad de tratar problemas cutáneos. Por ejemplo, una microemulsión a base de oleato de etilo como fase oleosa, Cremophor EL como tensioactivo y etanol y propilenglicol (1:1) como cotensioactivos, cargada con benzocaína y ácido fusídico indicó un potencial de curación de heridas dependiente de la dosis con la mayor actividad de curación de heridas en las concentraciones más altas (Arpa et al., 2024).

Por otro lado, se evaluó la composición de una microemulsión a base de 5% de aceite de árbol de té cuyo principio activo es el terpinen-4-ol responsable de las propiedades antiinflamatorias (Hart et al., 2000), que además contenía diferentes concentraciones de polisorbato 80 como tensioactivo y miristato de isopropilo y alcohol isopropílico como cotensioactivos. El objetivo fue desarrollar un novedoso sistema de transporte con permeabilidad mejorada a las capas dérmicas y utilizarlo para el tratamiento de psoriasis. La investigación sugirió que el sistema de microemulsión de aceite de árbol de té resultó ser eficaz para el tratamiento de psoriasis y no provocaba irritación en la piel (Khokhra & Anupama, 2011).

Asimismo, en un trabajo realizado por Goebel et al. (2010), se preparó y evaluó una microemulsión cargada de ácido linoleico para el tratamiento de enfermedades crónicas de la piel. La microemulsión se preparó utilizando ácido linoleico, pentilenglicol (como fase oleosa), Plantacare 1200 UP (como tensioactivo) y Tegocare CG 90 (como cotensioactivo). Las microemulsiones formuladas fueron evaluadas y comparadas con una crema de ácido linoleico. Los estudios de penetración a través de la piel demostraron que la formulación en

microemulsión aumenta la penetración del fármaco a través de la piel en mayor medida (3.64%) que la crema convencional (1.12%), así como también las investigaciones sugirieron que la microemulsión cargada con ácido linoleico resultó ser un mejor sistema alternativo para minimizar la inflamación de la piel y promover los efectos antiinflamatorios (Goebel et al., 2010).

Con base a lo anterior, se determinó que la mayoría de las microemulsiones reportadas en la literatura destinadas para cicatrización de heridas se formaron en presencia de tensioactivos y, a veces, también de cotensioactivos.

2.3.2 Hidrogeles

En general, los geles se describen como sistemas semisólidos hechos de al menos dos constituyentes: un constituyente líquido inmerso en una red tridimensional (3-D) polimérica que presenta enlaces covalentes o no covalentes, en donde la menor cantidad de líquido es adecuada para asegurar las características elásticas del gel, aunque puede exceder 10 a 100 veces la cantidad de polímero (Rathod et al., 2015). Sobre la base del carácter de entrecruzamiento, los geles poliméricos se pueden clasificar en: geles físicos (interacciones electrostáticas y/o puentes de hidrogeno), geles entrecruzados covalentemente, y (3) geles de red entrelazada (Bohidar et al., 2003).

Asimismo, si el líquido que solvata las cadenas poliméricas en el gel es orgánico se conocen como organogeles, mientras que, si el responsable de la solvatación es el agua, entonces se denominan hidrogeles. Los hidrogeles tienen características bien conocidas, son hidrófilos, blandos, elásticos e insolubles en agua además de que se hinchan en presencia de ella, aumentando apreciablemente su volumen mientras mantienen la forma hasta alcanzar el

equilibrio fisicoquímico (Ahmed, 2015). Esto les aporta la propiedad de absorber, retener y liberar bajo condiciones controladas, algunos compuestos bioactivos (Ahmed, 2015).

Los hidrogeles empezaron a desarrollarse a partir del trabajo realizado por Wichterle & Lím (1960) en donde utilizaron un gel de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (PHEMA), el cual se convirtió en el primer material para lentes de contacto blandos. La biocompatibilidad de éste mismo material fue probada posteriormente durante su uso clínico como material para implantes (Voldbich et al., 1975). Actualmente, las aplicaciones de los hidrogeles sintéticos incluyen, además: materiales superabsorbentes para pañales y toallas femeninas, materiales para separación en química analítica (columnas de permeación en gel y electroforesis), materiales intermediarios para la preparación de elásticos, adhesivos y membranas y materiales para la liberación controlada de fármacos y biocidas. Por su parte, los hidrogeles son ideales para favorecer la cicatrización de heridas cutáneas debido a que pueden donar agua al sitio de la herida y de esta manera mantienen un ambiente húmedo para la migración celular, lo que acelera la cicatrización (Yoshii et al., 1999). Además, son biocompatibles, permiten la absorción de exudado, la permeabilidad a los gases y se pueden aplicar y retirar sin causar daños en la herida ni dolor, lo que los convierte en candidatos ideales para fines de curación de heridas (Duarte et al., 2024).

En la literatura se encontraron resultados favorables en términos de cicatrización, en estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando principios activos inmersos en hidrogeles. En un estudio realizado por Ehterami et al. (2019) se evaluó el potencial cicatrizante de un hidrogel a base de alginato y quitosano cargado con vitamina E para la curación de la lesión de la piel dorsal en un modelo de rata en donde se reportó que los apósitos preparados a base de hidrogel proporcionaban un mayor cierre de herida en comparación con la herida tratada con gasa (el control). Mientras que, en otro trabajo se desarrolló un apósito para heridas diabéticas

mediante la incorporación de nanopartículas de quitosano cargadas con extracto de *Fumaria officinalis* en un hidrogel de alginato de calcio. Los estudios de expresión génica mostraron que el sistema elaborado regulaba positivamente los niveles de expresión tisular de los genes de colágeno tipo 1, colágeno tipo 2, VEGF, b-FGF y TGF- β . A través de este mecanismo logró acelerar la cicatrización de heridas en modelos murinos de manera comparable con GranuGEL®, un hidrogel para el cuidado de heridas comercializado (Yang et al., 2023).

Por otra parte, en un estudio de Okur et al., (2020) se evaluó el potencial cicatrizante de un gel de alginato de sodio cargado con microemulsiones a base de quitosano y ácido fusídico para el tratamiento de heridas por quemaduras. El porcentaje del área de la herida en ratas tratadas con dicho gel osciló entre 69.30% y 41.39% en el período de 3 a 10 días. Además, presentó una buena actividad antibacteriana y estabilidad durante 3 meses.

En otro trabajo de Gong et al., (2013) se preparó y aplicó *in vivo* un gel termosensible a base de bloques poliméricos compuesto con micelas cargadas de curcumina para la reparación de heridas cutáneas. Los grupos tratados con el hidrogel mostraron un mayor contenido de colágeno, una mejor granulación, una mayor madurez de la herida, una disminución dramática del superóxido dismutasa y un ligero aumento de la catalasa en las heridas. Por lo que se consideró como un apósito muy prometedor para la cicatrización de heridas.

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las heridas se han convertido en un importante desafío sanitario nacional y mundial, las cuales aumentan la tasa de morbilidad y mortalidad en la población (Pađen et al., 2024; Secretaria de Salud, 2007). Anualmente, aproximadamente 14 millones de personas sufren heridas en todo el mundo y el 80% de ellas ocurren en países en desarrollo, como México (Gang et al., 2024). Sobre todo, el problema de salud pública radica en las heridas crónicas con una prevalencia estimada de aproximadamente 2.21 por 1000 habitantes (Pađen et al., 2024). En consecuencia, las heridas crónicas, especialmente las úlceras diabéticas, causan el 85% de todas las amputaciones y al menos 10000 de cada millón de pacientes con heridas mueren a causa de una infección microbiana a medida que la resistencia a los antibióticos ha ido aumentando (Gang et al., 2024; Rahim et al., 2017).

En México, el tratamiento de heridas implica un gran coste económico para el sector salud. En 2018, 159 unidades médicas en México reportaron 36022 casos de heridas, implicando costos directos mensuales para el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de \$46,563070.76 a nivel ambulatorio y \$1864,124436.89 por hospitalización (Vela-Anaya et al., 2018). Si bien existen muchas formas farmacéuticas destinadas para cicatrización, son de elevado costo, y sus principios activos son en su mayoría de origen sintético, menospreciando la posibilidad de utilizar un extracto con potencial cicatrizante derivado de la entomoterapia. Por otro lado, las formulaciones como geles o emulsiones cicatrizantes comercializadas generalmente se ofrecen de manera independiente, lo que les proporciona ciertas desventajas como los cortos tiempos de duración en la lesión, una disminución del porcentaje de absorción de principios activos y una vida útil corta de los medicamentos.

Las microemulsiones investigadas para cicatrización de heridas, son estabilizadas en gran medida por surfactantes sintéticos, los cuales pueden ocasionar irritabilidad en la piel y ser tóxicos para el ambiente y la salud humana.

Además, los resultados de la terapia convencional siguen siendo insatisfactorios, ya que el 50% o más de las heridas crónicas son refractarias a las terapias disponibles (Huang et al., 2020). En la necesidad de crear una nueva formulación que aporte mejores beneficios que los existentes, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿Permitirán el quitosano, el extracto lipofílico de chapulín y el alginato de sodio preparar una formulación a base de microemulsiones estabilizadas en un gel, manteniendo la actividad cicatrizante?

IV. JUSTIFICACIÓN

La utilización de productos tópicos para reparación de heridas es de gran relevancia para los humanos, ya que es por este medio que las condiciones ideales para la cicatrización pueden ser alcanzadas. El alto valor económico de las formulaciones cicatrizantes y el problema con las heridas crónicas hace necesario también el desarrollo de nuevos medicamentos. Los hidrogeles pueden resultar en sistemas ideales para tratar la cicatrización debido a su naturaleza no adhesiva y facilidad de aplicación. Además, brindan alivio del dolor a través de un efecto de enfriamiento por evaporación del calor en la lesión y crean un ambiente húmedo que alivia las terminaciones nerviosas expuestas en la piel, lo que es útil para quemaduras o heridas dolorosas, sin dejar de lado que este tipo de formulación tópica también minimiza la toxicidad o los efectos secundarios de los medicamentos y ayuda a la homogeneidad de dispersión del principio activo en toda la herida. Un sistema que contenga microemulsiones a base de extracto lipofílico de chapulines, el cual posee propiedades cicatrizantes, estabilizadas con quitosano e incorporados en un gel físico de alginato de sodio puede alargar la vida útil y garantizar la protección del extracto lipofílico reduciendo una probable degradación y aumentando su porcentaje de absorción. Por otro lado, la importancia de elaborar este gel radica en la utilización del extracto de chapulín como principio activo, contribuyendo en la disminución de esta plaga en cultivos de Sinaloa y el uso de plaguicidas tóxicos, y a su vez, elaborar un producto tecnológico con aplicación biomédica. Adicionalmente, con el desarrollo de este trabajo se evitará el uso de surfactantes tóxicos para preparar las emulsiones y se estará contribuyendo con aportar información valiosa a la Dirección de Programas Nacionales Estratégicos del Conahcyt (Pronaces), específicamente en tema de salud.

V. HIPÓTESIS

El quitosano, el extracto lipofílico de chapulines (*Brachystola magna*) y el alginato de sodio permitirán preparar una forma farmacéutica con actividad cicatrizante constituida de microemulsiones contenidas en un gel.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Desarrollar una formulación a base de microemulsiones contenidas en un gel como sistema estabilizante de un extracto lipofílico de chapulín y evaluar su actividad cicatrizante.

6.2 Objetivos específicos

1. Identificar los principales componentes del extracto lipofílico obtenido de chapulines (*Brachystola magna*) recolectados en el estado de Sinaloa, México.
2. Caracterizar los quitosanos y el alginato de sodio que serán utilizados para formar las emulsiones y los geles físicos.
3. Evaluar el efecto del tamaño del polímero y su concentración sobre la estabilidad de las emulsiones.
4. Estudiar el efecto de la relación másica de los constituyentes sobre el fenómeno de gelación.
5. Evaluar el potencial cicatrizante *in vitro* de la formulación química desarrollada.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente proyecto se utilizó un estudio de investigación del tipo experimental, ya que se manipularon las condiciones y variables de estudio y además se comprobaron los efectos de una intervención específica y se evaluó la eficacia de diferentes tratamientos. La estrategia experimental que se empleó en este trabajo de investigación se representa en la Figura 4.

7.1 Materiales

Los quitosanos de peso molecular bajo (CHB) y medio (CHM) con un grado de desacetilación (DDA) del 75-85% se adquirieron de Sigma- Aldrich. El quitosano CH56 (DDA>90%) se adquirió de FUTURE FOODS, mientras que el alginato de sodio de grado alimenticio se obtuvo de Golden Bell.

7.1.1 Recolección de la muestra biológica

Los especímenes de chapulín se recolectaron manualmente, durante la temporada de lluvias en la región (julio, agosto, septiembre) en el año 2022 en zonas silvestres del municipio de Culiacán, del estado de Sinaloa. Los insectos recolectados fueron identificados como la especie *Brachystola magna* (Girard, 1854), (Figura 5) con base a las claves taxonómicas propuestas por (James G. R. & Grant H. J., 1959) mencionadas en la ficha técnica “chapulín” del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA, 2016). Posteriormente, los chapulines fueron sacrificados por congelamiento y los cuerpos se diseccionaron manualmente, separando la cabeza, las patas y el abdomen. Se registró un peso final de muestra biológica de 1711.54 g de peso seco. Finalmente, la muestra se almacenó a 4 °C hasta los análisis.

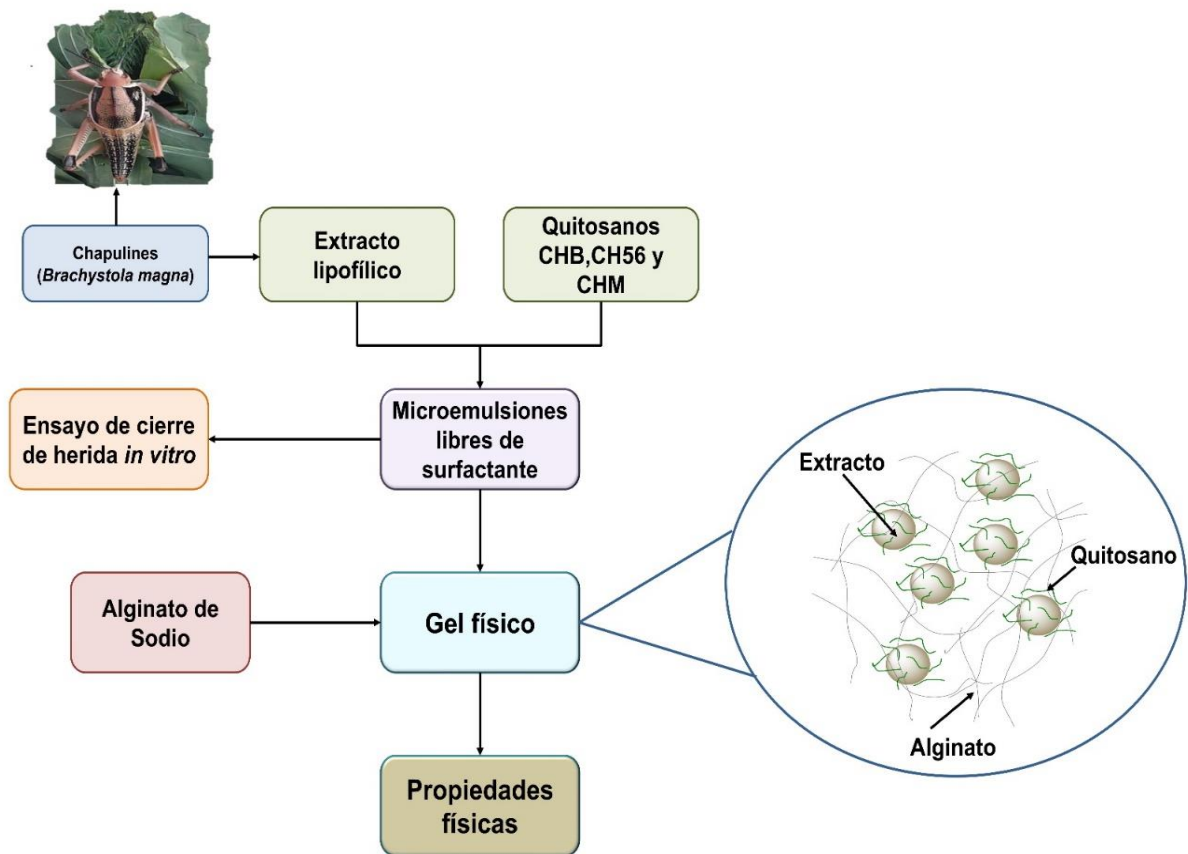


Figura 4. Estrategia experimental que se realizó durante el proyecto. Se usó un extracto lipofílico obtenido de chapulines (*Brachystola magna*) y quitosanos de diferentes pesos moleculares para el desarrollo de microemulsiones, las cuales fueron utilizadas para las pruebas biológicas y se estabilizaron en un gel físico de alginato de sodio como forma farmacéutica final.

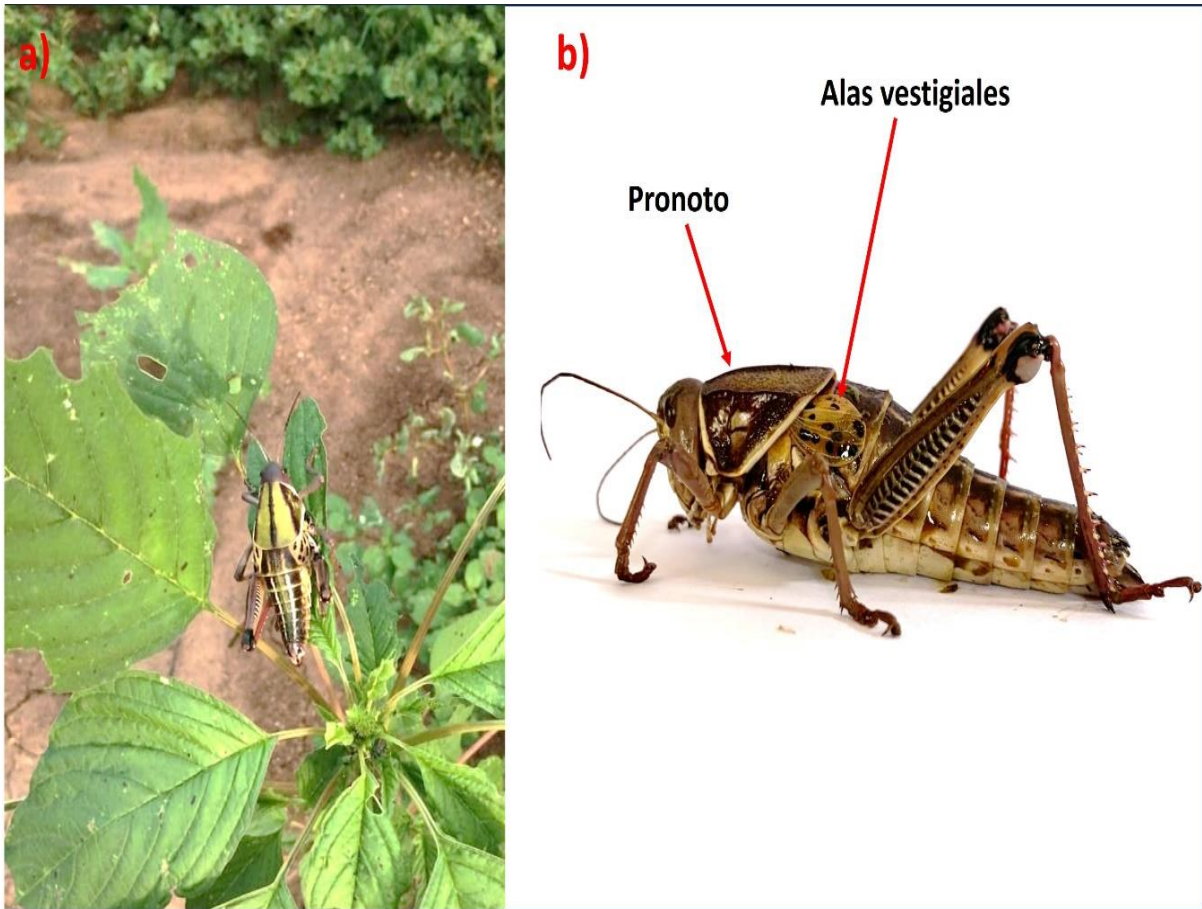


Figura 5. Fotografías del chapulín adulto *Brachystola magna*. (a) insecto alimentándose del tallo y hoja de planta; (b) características anatómicas distintivas de la especie (alas vestigiales redondeadas color rosáceas con puntos negros, en el pronoto se observan 3 bordes longitudinales, lisos y de color amarillo claro).

Los disolventes que se utilizaron para la obtención de los extractos fueron *n*-hexano, acetato de etilo y metanol (FAGALab, México). Todos los reactivos se compraron con la más alta calidad disponible y se usaron sin purificación adicional.

7.2 Metodología

7.2.1 Obtención del extracto

Para la obtención del extracto de chapulines se ajustó el método utilizado por Felix-Sagaste et al., (2023). Brevemente, se diseccionaron los chapulines y las partes se lavaron con agua corriente. La cabeza y patas se secaron en estufa (NOVATECH, México) a 40 °C durante 4 h. Posterior a esto, la muestra seca pasó por una desestructuración mecánica con ayuda de un mortero y pistilo. Los abdómenes no conllevaron proceso de secado. Ambas muestras, fueron suspendidas en conjunto en *n*-hexano durante 3 h. Transcurrido este tiempo, se filtraron con papel filtro para separar los sólidos del líquido.

Por otra parte, el líquido se desechó y el residuo sólido de chapulines se suspendió en metanol durante 2 h. Después de este tiempo, se filtraron con papel filtro con tamaño de poro de 10 µm y el sólido se introdujo en una estufa (temperatura ambiente) con el fin de evaporar el metanol embebido en el sólido. Luego la muestra sólida seca se suspendió en acetato de etilo con agitación mecánica durante 6 h. Después se procedió a filtrar con papel filtro la muestra para separar los sólidos del líquido. Finalmente, para remover el disolvente (acetato de etilo) de la muestra líquida, se colocó en un rotavapor durante 1 h a 100 rpm con una temperatura de 65 °C (Yamato SINCE 1889, Japón). Al finalizar esta operación se obtuvo el extracto lipofílico proveniente del cuerpo entero de los chapulines. El rendimiento de extracción se calculó como

el peso del material total extraído respecto al peso de la muestra inicial de insectos, y se expresó como porcentaje.

7.2.2 Preparación de microemulsiones a base del extracto lipofílico de chapulines

7.2.2.1 Purificación del quitosano

El quitosano se disolvió en una solución acuosa de ácido acético al 1% en volumen, hasta una concentración de 10 mg/mL (6 g en 600 mL); posteriormente, la mezcla se filtró a presión reducida con Büchner. El quitosano se precipitó de la solución ácida usando una solución de hidróxido de sodio 1 M (aprox. 95 mL). La suspensión alcalina de quitosano se filtró a presión reducida con un filtro de corte de partículas de 5 μ m. El quitosano se lavó con agua desionizada hasta su neutralización, se congeló y finalmente, se liofilizó (Labconco, FreeZone® 1 L, Kansas City, MI, EE. UU.).

7.2.2.2 Formación de microemulsiones

La carga se realizó con base en la metodología utilizada por Fang & Bhandari (2010) y se adaptó de la metodología reportada por Picos-Corrales et al. (2019), como se observa en la Figura 6. Brevemente, se disolvió cada quitosano (CHB, CH56 y CHM) de manera independiente en 10 mL de solución acuosa (NaCl 0.9% p/v; ácido acético al 1% v/v grado ACS 99.7%), un día previo a los análisis. Posteriormente, la solución de polímero se añadió al extracto de chapulines previamente pesado para ser agitados en vórtex analógico mixto (modelo OHAUS VXMNAL) a 3200 rpm durante 5 min. Al finalizar dicho proceso, las emulsiones se filtraron con papel filtro con tamaño de poro de 10 μ m y bomba de vacío a una presión de 25 cmHg. Se probaron distintas concentraciones de quitosano en un rango de 5 mg/mL a 15 mg/mL para el caso de CHB y CH56.

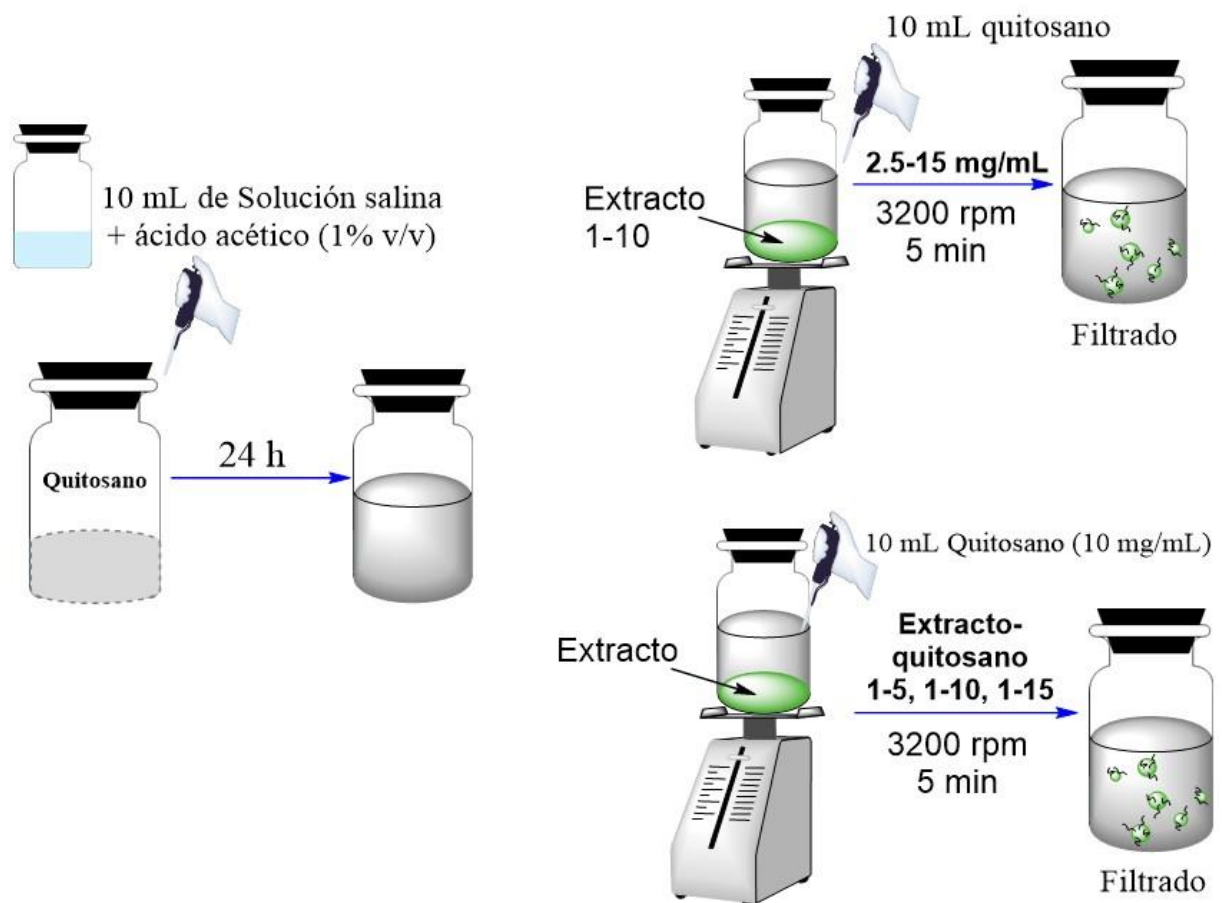


Figura 6. Esquema experimental de la formación de microemulsiones. a) Estudio de la variación de la concentración de quitosano y b) variación de la relación extracto-polímero sobre la estabilidad de las emulsiones.

Mientras que para CHM se utilizó un rango de concentraciones de 2.5 a 10 mg/mL con el propósito de evaluar la estabilidad de las emulsiones. Por otro lado, se estudió la relación de extracto-polímero (1:5, 1:10 y 1:15) utilizando cada quitosano. Al final, se obtuvieron diferentes tipos de emulsiones a base de extracto de chapulines y polímero biocompatible.

7.2.3 Preparación del gel físico

Para la preparación del gel físico se siguió la metodología empleada por Josef et al. (2010) con modificaciones (Figura 7). El alginato de sodio se disolvió en 5 mL de agua destilada un día previo a los análisis en tres diferentes concentraciones (3 mg/mL, 5 mg/mL y 7 mg/mL) y se dejaron bajo agitación magnética hasta lograr que el polímero se disolviera en su totalidad. Luego, para permitir la gelificación de cada solución de alginato se introdujo una fuente de calcio (Draget et al., 2003) en forma de solución de CaCl_2 previamente preparada (0.0075 g/mL de agua destilada), añadiendo 0.2 mL por goteo lento bajo agitación magnética a 1200 rpm. Al terminar de añadir el CaCl_2 , la mezcla viscosa se agitó durante 30 s en vórtex y se volvió a dejar bajo agitación magnética durante 10 min. A continuación, a la solución pre-gelificada anterior se le añadió por goteo lento, mientras permaneció en agitación magnética, 1 mL de microemulsión (10 mg/mL de quitosano, relación extracto-polímero de 1-10) previamente mezclada con 400 μL de NaOH para ajustar el pH hasta 5.20. Los tres geles obtenidos se dejaron en reposo a 10 °C durante 24 h para ser posteriormente usados para los análisis. Al final, se prepararon 9 tipos de geles de alginato reticulado. Tres de ellos cargados con microemulsión elaborada con extracto de chapulín y quitosano CHB, tres geles cargados con microemulsión elaborada con extracto de chapulín y quitosano CH56, y finalmente tres cargados con microemulsión elaborada con extracto de chapulín y quitosano CHM.

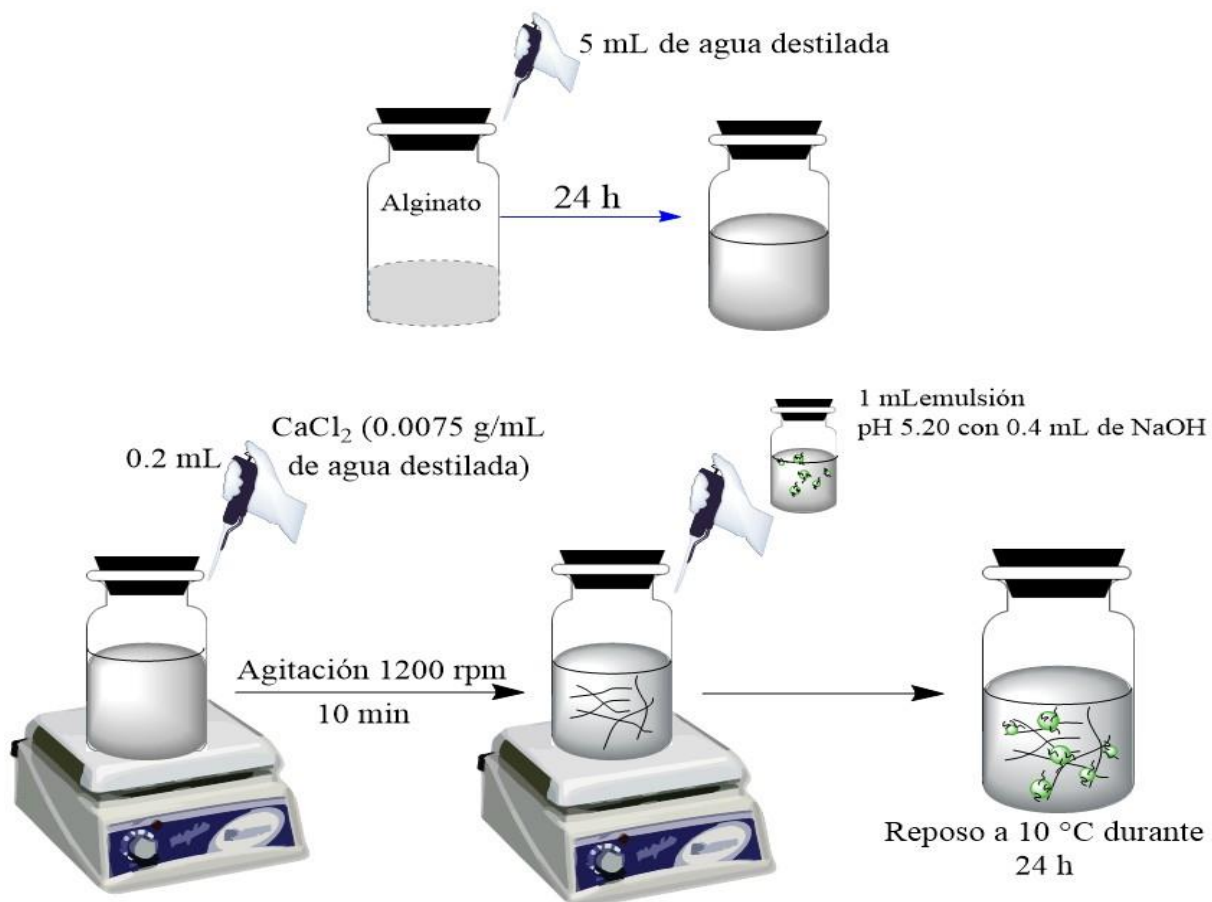


Figura 7. Esquema experimental de la formación de los geles. La reticulación de las cadenas poliméricas del alginato de sodio se logra con la introducción de iones de Ca^{2+} para posteriormente ser cargados con microemulsiones.

7.2.4 Técnicas de caracterización

7.2.4.1 Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)

Para dilucidar la estructura de los compuestos aislados del extracto de chapulines por GC-MS, se siguió la siguiente metodología. A partir del extracto, se disolvió una muestra en metanol y otra muestra en hexano de manera independiente. Posteriormente fueron inyectadas de forma automática a través de un automuestreador GC sampler 7693 de Agilent a puerto de inyección split/splitless con columna capilar HP-5 MS de 30 m x 0.25 mm x 0.25 μm en un sistema Cromatógrafo de Gases (Agilent technologies 7890 B, Estados Unidos) con analizador de triple cuadrupolo (7000D GC/TQ). Los parámetros para la detección de GC-MS consistieron en una temperatura del inyector de 280 °C en modo splitless y una temperatura inicial del horno e 60 °C durante 1 min, luego se elevó gradualmente a una temperatura de 170 °C a una velocidad de 40 °C/min durante 3.75 min, posterior a esto se aumentó a una temperatura final de 310 °C a una velocidad de 10 °C/min durante 3 min. El tiempo de corrida total de GC-MS fue de 48.007 min, utilizando helio como gas cargador, a un caudal de columna de 1 mL/min. Los espectros de MS se obtuvieron en modo de impacto electrónico con energía de ionización de 70 eV, en un rango de masa (m/z) de 50 a 550. Los componentes se identificaron por comparación con la biblioteca del equipo (NIST 20.1 Mass Spectral Library) usando la búsqueda NIST MS, o la probabilidad basada en el formato de búsqueda por coincidencia como parte de tecnologías Agilent estación de trabajo MassHunter Workstation Versión 10.2.

7.2.4.2 Cromatografía de gases acoplado al detector de ionización de llama (GC-FID)

Para realizar el perfil de lípidos del extracto de chapulines por GC-FID, se realizó una transesterificación de la muestra con base al método 969.33 de la Association of Official Analytical Chemist (William & AOAC Internacional, 2000). Para la determinación por

triplicado de ácidos grasos y su cuantificación se inyectó una dilución del extracto con una concentración de 19.340 mg/mL (muestra 1), 51.410 mg/mL (muestra 2) y 20.080 mg/mL (muestra 3) de manera independiente en el cromatógrafo de gases (Agilent technologies 7890 B, Estados Unidos) acoplado a un detector de ionización de llama (FID). La columna capilar polar fue una DB-23, la cual constó con las siguientes características: 30 m de longitud, 250 μm de diámetro y 0.25 μm de espesor de película, la cual está diseñada para la separación de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES). El inyector tuvo una temperatura de 250 °C en modo Split. El horno comenzó con una temperatura de 50 °C durante 3 min, luego aumentó la temperatura gradualmente hasta 175 °C a una velocidad de 25 °C/min durante 2 min, después continuó aumentando la temperatura hasta 200 °C a una velocidad de 5 °C/min durante 5 min y finalmente, se llegó a una temperatura de 240 °C a una velocidad de 20 °C/min y se mantuvo durante 13 min. El tiempo de corrida total para el extracto fue de 35 min, utilizando hidrógeno como gas portador, a un caudal de columna de 1.4291 mL/min. El detector FID tuvo una temperatura de 250 °C. Se utilizó el software MS Workstation versión 10.2 para el procesamiento de datos y se usó la mezcla de 37 ácidos grasos (Fames Mix C4 -C24) como estándar de referencia (18919-Supelco-Sigma Aldrich, Estados Unidos) para la identificación de los ácidos grasos presentes en las muestras.

7.2.4.3 Resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H -RMN)

El espectro de ^1H -RMN del extracto de chapulín se obtuvo utilizando un equipo Bruker AMX-400 (Bruker Corporation, Billerica, MA, EE. UU.) a 400 MHz, utilizando dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente.

7.2.4.4 Determinación del peso molecular por viscosimetría

Los pesos moleculares del alginato de sodio y los tres tipos de quitosanos, fueron determinados a partir de la viscosidad intrínseca $[\eta]$ utilizando un viscosímetro capilar UBB 25 Cannon-Ubbelohde (Koehler Instrument Company, Inc), a una temperatura ambiental de 25 °C.

Se preparó una solución madre de alginato de sodio con una concentración de 0.1 g/dL, para ello, se disolvió 50 mg de dicho polímero en un matraz aforado de 50 mL con agua destilada y 0.2922 g de NaCl. La solución obtenida se agitó manualmente hasta lograr una mezcla completamente homogénea y a partir de ella se prepararon 4 diluciones en un rango de 0.1 g/dL a 0.02 g/dL. El tiempo que tardó el nivel del líquido en fluir entre dos marcas anulares en el viscosímetro se registró para cada muestra (t_n). Dicho tiempo indicó la viscosidad de cada disolución. Mientras que, el tiempo de flujo del blanco utilizado en el viscosímetro, es decir, solamente agua destilada más NaCl se registró como (t_0). Con respecto al quitosano CHB, se preparó una solución madre con una concentración de 0.2 g/dL. Se añadió 100 mg de quitosano a un matraz aforado de 50 mL con agua destilada, 0.7305 g de NaCl y 1.43 mL de ácido acético (grado ASC 99.7%). Una vez, que el polímero fue disuelto en su totalidad se prepararon 6 diluciones establecidas en un rango de 0.2 g/dL a 0.08 g/dL. Se registraron los tiempos de flujo de las soluciones en el viscosímetro, así como también el tiempo de flujo de la solución blanco (t_0). Asimismo, la solución madre del quitosano CH56 se preparó como se detalló anteriormente para el quitosano CHB. A partir de ella, se prepararon 3 diluciones en un rango de concentraciones de 0.2 g/dL a 0.12 g/dL. Los tiempos de flujo en el capilar de cada muestra y la solución blanco (t_0) se registraron de manera independiente.

Por otro lado, la solución madre del quitosano CHM consistió en agregar y disolver 50 mg de quitosano en 50.25 mL de agua destilada, 0.2922 g de NaCl y 1.43 mL de ácido acético, para obtener una concentración final de 0.0995 g/dL. La solución madre fue agitada hasta homogeneizar los componentes y a partir de esta, se prepararon 5 diluciones en un rango de concentraciones de 0.0995 g/dL a 0.0199 g/dL. Se registraron los tiempos de flujo obtenidos en el viscosímetro para cada muestra y para el blanco (t_0).

Posteriormente, para cada polímero se calculó la viscosidad específica (η_{sp}) como se muestra en la Ecuación 1, mientras que la viscosidad reducida se determinó mediante la ecuación de Huggins (η_{sp}/C_B), la cual se obtuvo al dividir el resultado de la ecuación anterior entre cada concentración utilizada. Se usó η_{sp}/C_B para ajustar la concentración de la muestra y obtener una línea recta mediante regresión lineal (Qian et al., 2023) en los softwares Excel v. 236 y Origin v.2019b. El intercepto en la ecuación lineal representó a la viscosidad intrínseca $[\eta]$, que se sustituyó en la fórmula de Kuhn-Mark-Houwink (Ecuación 2) y se despejó (Mv) para calcular el peso molecular viscosimétrico medio del polímero (Ecuación 3).

$$nsp = \frac{tn-t0}{t0} \quad \text{Ecuación 1.}$$

$$[\eta] = K \times mv^\delta \quad \text{Ecuación 2.}$$

$$Mv = \sqrt[\delta]{\frac{[\eta]}{K}} \quad \text{Ecuación 3.}$$

En la fórmula de Mark-Houwink, K y δ son las constantes de la ecuación, las cuales están relacionadas con el tipo de solvente, polímero y temperatura. En este caso, para el alginato de

sodio se utilizaron las constantes $K=7.30 \times 10^{-5}$ y $\delta=0.92$ (Martinsen et al., 1991), mientras que para el quitosano fueron $K=2.14 \times 10^{-3}$ y $\delta=0.657$ (Elisabeth Schröder et al., 1989).

7.2.4.5 Propiedades físicas de las microemulsiones

Se midió turbidez y tamaño de partícula de las emulsiones en distintos tiempos de reposo después de la preparación (1 h, 24 h y 168 h) utilizando un turbidímetro (HACH 2100P) y un microscopio de luz (Carl Zeiss Primo Star 3), respectivamente. Las muestras fueron diluidas a $\frac{1}{4}$ con solución salina para la prueba de turbidez. La captura de las imágenes por microscopía se realizó con un teléfono celular (Samsung Galaxy A32 con 64 Mpx) adaptado al microscopio. Se capturaron 3 imágenes por cada muestra con los objetivos de 10x y 40x.

7.2.4.5.1 Medición del tamaño de partícula

El tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) de las microemulsiones se evaluaron mediante Dispersión de Luz Dinámica (DLS) empleando un analizador de tamaño de partícula (ZS90, Malvern Instrument Ltd., Reino Unido). Para la obtención de los parámetros, se tomó 1 μL de muestra y se diluyó en 10 mL de agua tipo I, se agitó manualmente y 2 mL de la dilución se colocó en una celda de plástico para su análisis. La dilución de la muestra fue necesaria para evitar colisiones entre las partículas (Bernewitz et al., 2011; Mirhosseini et al., 2008). Todas las mediciones se realizaron por triplicado. Las mediciones DLS se realizaron con ángulo de dispersión de 90° y la distribución de tamaños se calculó utilizando el software de tecnología de dispersión Malvern Instruments, basado en el análisis CONTIN y la ecuación de Stokes-Einstein para esferas.

7.2.4.5.2 Potencial zeta (ζ)

El potencial zeta (ζ) de las microemulsiones y de los quitosanos se midieron con la técnica de electroforesis de Laser-Doppler con un instrumento Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). Las medidas fueron el promedio de tres corridas realizadas a 25 °C y agua destilada.

7.2.4.6 Propiedades físicas de los geles

Los geles elaborados fueron observados utilizando el microscopio de luz (Carl Zeiss Primo Star 3) frescos y secos sobre un cubreobjetos a 10x y 40x. La turbidez se midió utilizando dicha opción en un colorímetro (HACH DR/890). De igual manera se llevó a cabo la prueba de pérdida de peso depositando una muestra del gel sobre un portaobjetos a 37 °C en una estufa y se registró el peso cada 30 min. Asimismo, se realizó una simulación de la prueba de estiramiento de geles reportada por (Sun et al., 2012) para ello se utilizaron dos placas de vidrio pegadas en un vernier digital. Se depositó una muestra de cada gel entre las placas y se midió el desplazamiento máximo vertical (mm) hasta la ruptura del gel a una velocidad de 0.030 mm/s. Se realizó cada medición por triplicado.

7.2.5 Modelo *in silico* (docking molecular)

Una vez conocidos los componentes del extracto lipofílico se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular utilizando AutoDock vina 1.1.2 (Trott & Olson, 2010). Además, se utilizó el software Pymol 2.5 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC) para analizar la respuesta de acoplamiento y el posible sitio de unión. Se realizó el primer docking molecular utilizando la estructura de la proteína de triple hélice de colágeno humano tipo III (PDB: 6A0A) con el ligando del ácido linolénico (Código Pubchem: 5280934). Antes del proceso de acoplamiento, la estructura de la proteína se preparó

agregando átomos polares de hidrógeno, eliminando moléculas de agua, agregando carga de Gasteiger y asignando el tipo de átomos como AD4 utilizando el paquete AutoDockTools. De igual manera, la preparación del ligando consistió en agregar hidrógenos polares y las cargas de Gasteiger. Se realizaron cálculos de acoplamiento con total flexibilidad del ligando dentro del sitio de unión.

Por otro lado, se realizó un redocking ciego del acoplamiento molecular reportado por Felix-Sagaste et al., (2023). Para ello, las estructuras cristalinas del receptor de ácidos grasos libres FFAR1 (código PDB: 4PHU) se obtuvieron de Protein Data Bank, y la estructura del ligando ácido linoleico (Código: 5280450) de Pubchem, de los cuales se llevó a cabo la misma preparación anterior tanto para la proteína como para el ligando. El acoplamiento fue realizado usando el ligando unido como el centroide del espacio de búsqueda. Otros parámetros de acoplamiento como la generación de la caja grid se mantuvieron en default. Por último, para la comparación de resultados se llevó a cabo un docking molecular con la misma proteína FFAR1, pero utilizando como ligando al ácido linolénico.

7.2.6 Pruebas biológicas preliminares

7.2.6.1 Cultivo celular

Se siguió el método utilizado por Kamarazaman et al. (2022) para realizar el cultivo celular. Brevemente, las células epiteliales provenientes de cáncer de cuello uterino (HeLa) se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y penicilina-estreptomicina al 1%. Las células se incubaron en una cámara con condiciones de 95% de humedad a 37 °C. Las células se subcultivaron para los experimentos cuando alcanzaron una confluencia del 80-95%.

7.2.6.2 Análisis *in vitro* de las propiedades cicatrizantes

El ensayo de cierre de herida *in vitro* en monocapas de células HeLa se llevó a cabo de acuerdo con el método descrito por Kamarazaman et al., (2022) representado en la Figura 8. Las células HeLa se sembraron a 2.25×10^5 células/pocillo en una placa de 6 pocillos.

Se permitió que las células crecieran en una incubadora hasta que alcanzaran la confluencia. Después, a partir de estas monocapas celulares se simuló una herida, al hacer un rayado con una punta estéril de micropipeta de 200 μ L en áreas diferentes de cada pocillo. A continuación, las células se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (PBS) para eliminar los restos de células. Posteriormente, las células fueron tratadas con microemulsión a base de extracto y quitosano (CHB y CH56) a distintas concentraciones de extracto (1 y 5 μ g/mL). Se utilizó alantoína a 10 μ g/mL en agua destilada como control positivo y los pozos que no estuvieron en contacto con ningún tipo de tratamiento se consideraron como control negativo.

7.2.6.3 Adquisición de imágenes

Inmediatamente tras la simulación de la herida se tomaron fotografías de las células con un microscopio invertido (NIKON TS100) adaptado con la cámara digital (Infinity1-Lumenera) con el objetivo 4x y se anotó como 0 h. A continuación, las células se incubaron y se volvieron a tomar el segundo, tercer y cuarto conjunto de imágenes de las células a las 24, 48 y 72 h.

El porcentaje de cierre de la herida se calculó comparando el área de la herida de las imágenes a las 24, 48, y 72 h con la de la imagen a las 0 h, utilizando la Ecuación 4 (Suarez-Arnedo et al., 2020).

$$\% \text{ Cierre de herida} = \frac{At_0 - At_n}{At_0} \times 100 \% \quad \text{Ecuación 4.}$$

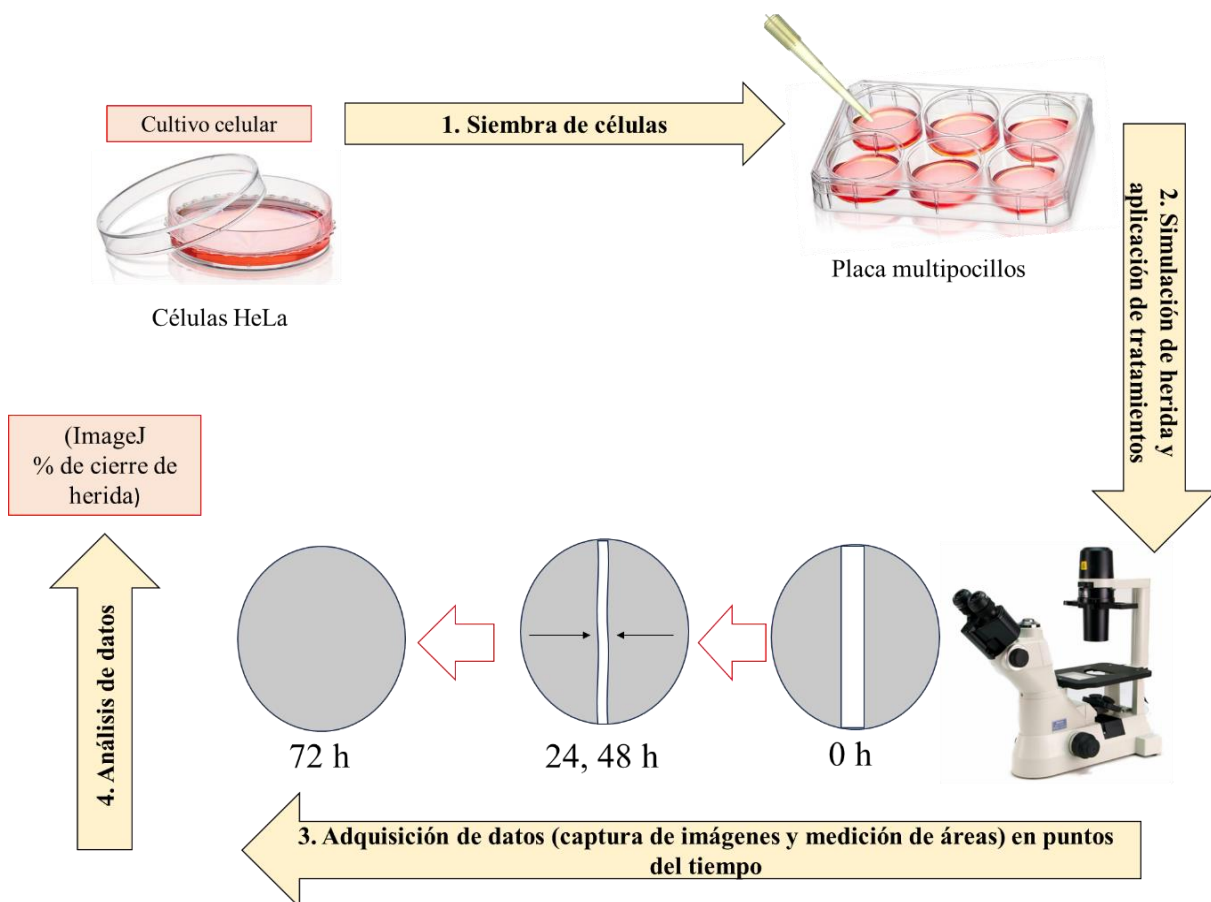


Figura 8. Esquema del flujo de trabajo del ensayo de cicatrización de heridas *in vitro*. 1) Preparación de cultivos y siembra de células HeLa; 2) Realización de una “herida” por rayado con punta de micropipeta, creando un espacio vacío en la monocapa de células confluentes y aplicación de tratamientos; 3) Captura de imágenes microscópicas y medición de áreas en cada punto de tiempo; y 4) Análisis de datos.

Adaptada de: Grada et al., (2017).

En donde A_{t_0} es el área de la herida inicial, A_{t_n} es el área de la herida después de n horas del rayado inicial, ambos en μm^2 .

7.2.6.4 Análisis digital de imágenes (ADI)

El procesamiento de las imágenes adquiridas por microscopía óptica se llevó a cabo en el software ImageJ v.1.50d (National Institute of Health, Bethesda, EUA). Para el análisis de las imágenes de las emulsiones, primeramente, las imágenes originales (color RGB) se transformaron en imágenes formato 8-bit (escala de grises), luego se ajustó el brillo y contraste automáticamente. Posteriormente, se procedió a la segmentación de las imágenes, la cual consistió en dos fases: aplicación de un algoritmo de umbral (default) y binarización de la imagen. Finalmente se calculó el parámetro Diámetro de Feret con la opción de “analyze particles” para obtener tamaño de partículas de las emulsiones (García-Armenta & Gutiérrez-López, 2022).

Para el procesamiento de las imágenes del ensayo de cierre de herida, de igual manera las imágenes originales (color RGB) se transformaron en imágenes formato 8-bit (escala de grises) y se utilizó directamente el plugin “wound healing size tool” desarrollado por Suarez-Arnedo et al., (2020) para la obtención del área en cada imagen a los distintos tiempos.

7.2.7 Análisis estadístico

El diseño de experimentos que se llevó a cabo fue completamente aleatorio y se utilizaron los softwares SPSS Statistics v.21 (IBM., EUA) y Origin v.8 (OriginLab., EUA) para el análisis de los datos. Los datos descriptivos del tamaño de las microemulsiones, como media y desviación estándar se analizaron en el software SPSS. Para la comparación de medias del tamaño de las microemulsiones se utilizó la prueba de Kruskal Wallis. Para los ensayos

biológicos, se aplicó la prueba ANOVA de una vía para la comparación de medias y la prueba post hoc de Dunnett para comparación de múltiples medias con un control. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

7.2.8 Lugar de realización

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería Culiacán de la Universidad Autónoma de Sinaloa. En el periodo de tiempo comprendido entre agosto del 2023 y julio del 2024.

7.2.9 Financiamiento

La manutención de la alumna fue cubierta por la beca CONAHCYT con el número CVU: 985631, mientras que el proyecto de investigación fue financiado por los proyectos PROFAPI con clave PRO_A2_005 y PRO_A7_016.

VIII. RESULTADOS

8.1 Obtención del extracto

El extracto lipofílico proveniente del cuerpo entero de chapulines presentó un color café verdoso de consistencia líquida y viscosa (Figura 9). Se obtuvo un peso final de 25.265 g de extracto con un porcentaje de rendimiento de extracción del 1.48%.

8.2 Caracterización del extracto

8.2.1 Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopia de Masas (GC-MS)

Los cromatogramas correspondientes al extracto del chapulín previamente disuelto en metanol y hexano se encuentran en los Anexos 1 y 2, respectivamente. Mientras que, en el Cuadro 1 se presentan los compuestos volátiles identificados representativos del extracto. Se seleccionaron aquellos compuestos que no pertenecieran al grupo de ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos, debido a que se analizaron dentro del perfil de lípidos (que es más específico), y de igual manera, sólo se contemplaron aquellos componentes que mostraron un factor de coincidencia con la librería del sistema GC-MS mayor al 80%, excepto para el grupo de los esteroides en donde se tomaron en cuenta aquellos compuestos que tuvieron un factor de especificidad mayor al 70% puesto que, en ese caso, fue posible identificar los componentes con mayor exactitud por el equipo. Dichos compuestos poseen diversas aplicaciones biológicas con potencial actividad cicatrizante.

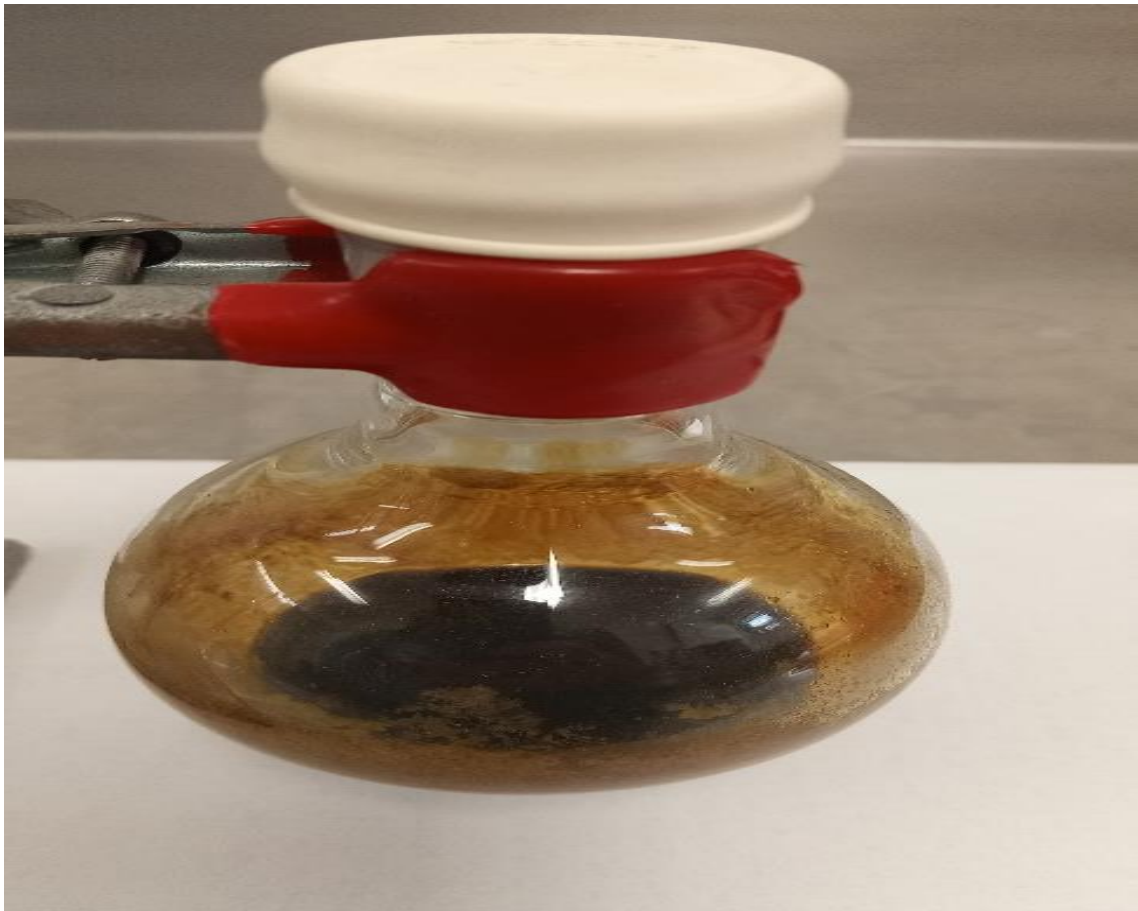
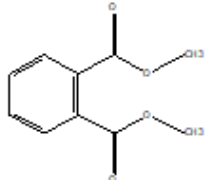
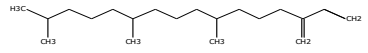
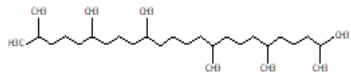
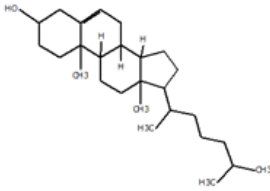
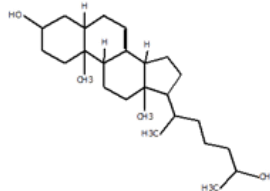
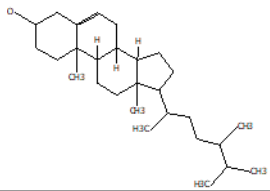


Figura 9. Extracto lipofílico obtenido de los chapulines *Brachystola magna*.

Cuadro 1. Compuestos identificados en el extracto del chapulín por GC-MS.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Factor de coincidencia con la librería (%)	Fórmula química	Estructura química
^a Ftalato de dimetilo	5.6916	95	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	
^a Neofitadieno	8.3224	83.9	C ₂₀ H ₃₈	
^{ab} Escualeno	16.1995 ^a	92.8	C ₃₀ H ₅₀	
^b Colesterol	18.4081	84	C ₂₇ H ₄₆ O	
^{ab} Latosterol	18.7108 ^b	80.9	C ₂₇ H ₄₆ O	
^a Campesterol	19.0405	75.1	C ₂₈ H ₄₈ O	

^bEstigmasterol	19.2614	79.4	$C_{29}H_{48}O$	
^{ab}γ- Sitosterol	19.6621 ^a	78.6	$C_{29}H_{50}O$	

^a compuestos identificados en el extracto disuelto en metanol

^b compuestos identificados en el extracto disuelto en hexano

8.2.2 Cromatografía de gases acoplado al detector de ionización de llama (GC-FID)

El perfil lipídico de los insectos se compone de fosfolípidos, triglicéridos, esteroides, ceras y vitaminas lipofílicas, pero principalmente están constituidos por fosfolípidos y triglicéridos (Kolobe et al., 2023). El extracto de chapulín *Brachystola magna* contiene ácidos grasos saturados e insaturados en distintas concentraciones, en el Anexo 3 se encuentra el cromatograma del perfil de lípidos de la muestra del extracto corrida por triplicado en conjunto con el estándar de referencia y en el Cuadro 2 se representan las concentraciones y tipos de ácidos grasos. El ácido graso que se encontraba en mayor proporción fue el ácido linolénico (5.59 mg/g) seguido del ácido linoleico (3.15 mg/g), ácido oleico (2.81 mg/g), ácido palmítico (2.42 mg/g), ácido esteárico (2.23 mg/g), ácido heptadecanoico (0.27 mg/g), ácido mirístico (0.14 mg/g), ácido margaroleico (0.09 mg/g), ácido palmitoleico (0.07 mg/g), ácido araquídico (0.07 mg/g), ácido pentadecanoico (0.06 mg/g) y ácido behénico (0.06 mg/g).

8.2.3 Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (^1H -RMN)

La Figura 10 muestra el espectro de Resonancia magnética Nuclear de Hidrógeno (^1H -RMN) del extracto de chapulín. Como se esperaba, aparecieron picos característicos de ácidos grasos y esteroides, los cuales ya se han reportado en la literatura. Generalmente las señales de los esteroides ($-\text{CH}_3$) aparecen entre 0 y 1 ppm. En dicha región aparecen varios picos de menor intensidad, por ejemplo, se observa una señal aproximadamente a 0.623 ppm y 0.70 ppm, las cuales son características del sitosterol y estigmasterol respectivamente (Shi et al., 2019). Las señales de los protones de la molécula del colesterol pueden aparecer entre 1-2.5 ppm ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$, $-\text{CH}_2-\text{COOH}$).

Cuadro 2. Perfil de lípidos del extracto de chapulín por GC-MS.

ÁCIDOS GRASOS SATURADOS	Tiempo de retención (min)	Concentración		Actividad Biológica
		%	mg/g	
Ácido mirístico C14:0	11.21	0.7102	0.14	Efecto bactericida y antitumoral (Chen et al., 2009)
Ácido pentadecanoico C15:0	12.198	0.286	0.06	Actividad antibacteriana y antifúngica (Galdiero et al., 2021)
Ácido palmítico C16:0	13.289	12.25	2.42	Promueve la curación de heridas (Buszewska-Forajta et al., 2015)
Ácido heptadecanoico C17:0	14.515	1.38	0.27	Potencial compuesto para tratar cáncer de piel (Kathiresan, 2020)
Ácido esteárico C18:0	16.064	11.25	2.23	Promueve la curación de heridas (Buszewska-Forajta et al., 2015)
Ácido araquídico C20:0	20.102	0.38	0.07	Antimicrobiano (Alasmary et al., 2020)
Ácido behénico C22:0	22.303	0.301	0.06	Potencial antiinflamatorio (Darwish et al., 2021)
ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS				
Ácido palmitoleico C16:1	13.680	0.387	0.07	Función analgésica suave, antioxidante, antiinflamatorio (Sánchez & Segundo, 2007)
Ácido margaroleico C17:1	14.955	0.471	0.09	No se encontró bibliografía
Ácido oleico cis C18:1	16.562	14.21	2.81	Modulador de la inflamación de la piel, acelera la cicatrización de heridas, aumenta la proliferación de neutrófilos (Buszewska-Forajta et al., 2015; Pereira et al., 2008; Pieper, 2003)
Ácido linoleico C18:2 n6	17.544	15.92	3.15	Modulador de la inflamación de la piel, aumenta la proliferación de neutrófilos y la migración de queratinocitos en las heridas (Buszewska-Forajta et al., 2015; Pereira et al., 2008)

Ácido linolénico C18:3 n3	18.950	28.23	5.59	Modulador de la inflamación de la piel, aumenta la migración de fibroblastos y promueve la diferenciación de las células epidérmicas durante la cicatrización de heridas (Buszewska-Forajta et al., 2015)
--------------------------------------	--------	-------	------	--

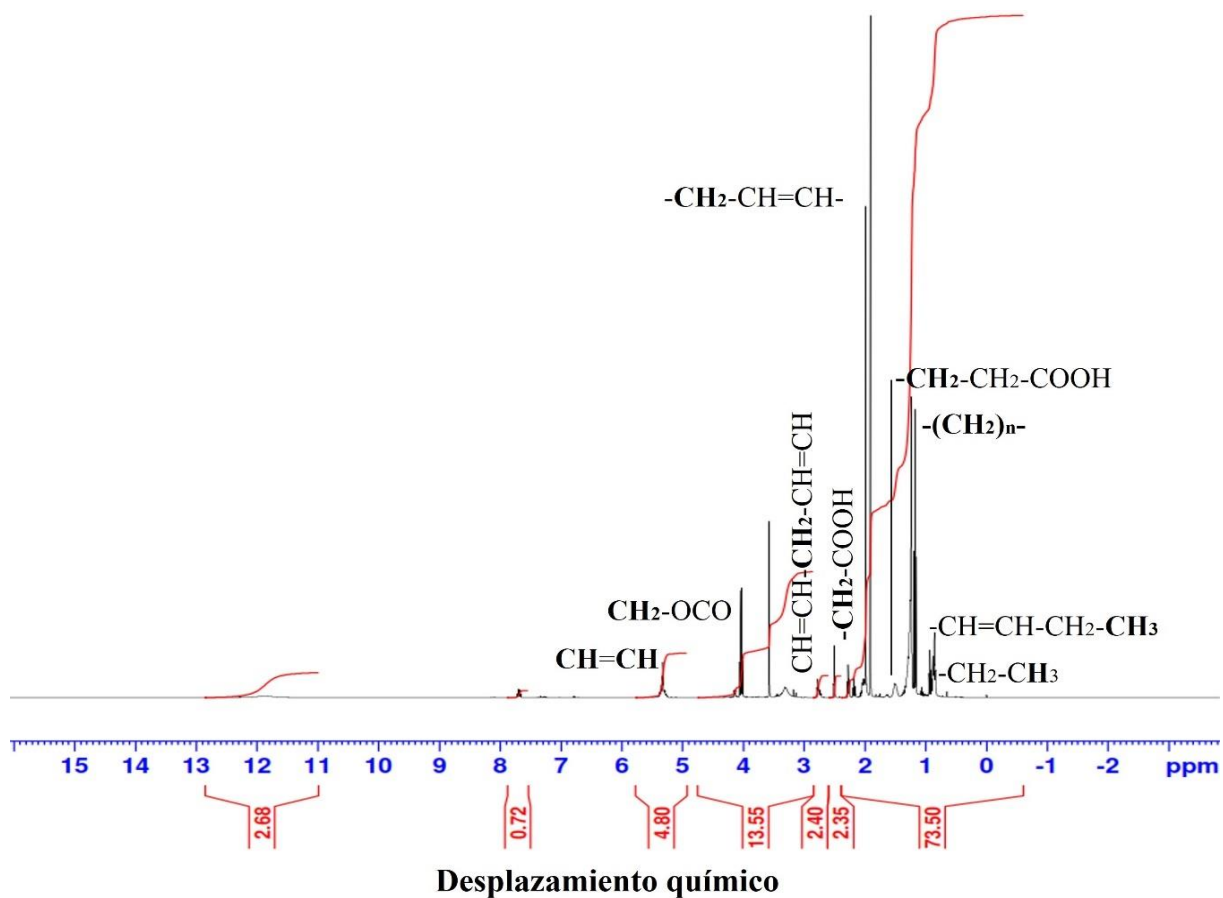


Figura 10. Espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno del extracto de chapulín. Se muestran los picos característicos de ácidos grasos.

La literatura indica que la señal del escualeno debe aparecer entre 1.70–1.67 ppm (Shi et al., 2019). Dichas señales se lograron identificar en el espectro. La señal mostrada a 0.89 ppm generalmente pertenece a los ácidos grasos ($-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), mientras que el pico observado a 0.97 ppm es característico del ácido linolénico ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$) (Siudem et al., 2022). Los picos que aparecen aproximadamente a 1.31 $-(\text{CH}_2)_n-$ y 1.61 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$) ppm pertenecen a los protones de las cadenas de acilo. De igual manera los ácidos grasos monos y poliinsaturados presentes en el extracto exhibieron la señal más fuerte del espectro cercana a 2.04 ppm ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) y otra señal de hidrógenos vinílicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$) a 5.35 ppm, mientras que las cadenas de acilo en los ácidos grasos insaturados ($-\text{CH}_2-\text{COOH}$) muestran una señal a 2.31 ppm (Siudem et al., 2022). Otros picos que son particulares de los ácidos grasos linoleico-linolénico ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) y triacilglicerol $-(\text{CH}_2-\text{OCO}-)$ se observan a 2.77 ppm y 4.27 ppm, respectivamente (Siudem et al., 2022).

8.3 Caracterización de los biopolímeros

8.3.1 Determinación del peso molecular de los polímeros por viscosimetría y potencial zeta (ζ) por Electroforesis de Lasser Doppler

Los tiempos de flujo de las muestras del quitosano CHB, CH56, CHM y del alginato en el viscosímetro estuvieron en un rango de 472 - 1093 s, 470 - 790 s, 478.5 - 1036.5 s y 446 - 1267 s, respectivamente. En la Figura 11 se muestran las gráficas lineales obtenidas para cada polímero con sus correspondientes valores de ajuste R^2 y el valor de la intersección de la ecuación lineal; es decir el valor de la viscosidad intrínseca. La pendiente de las rectas fue incrementando conforme fue aumentando el valor de la viscosidad intrínseca.

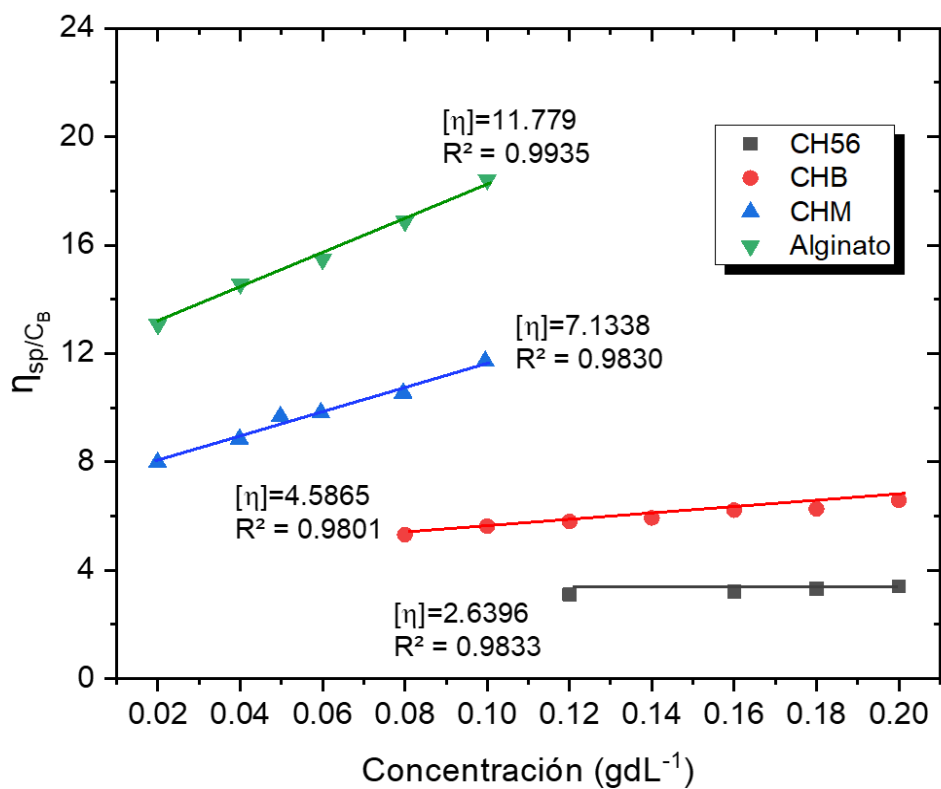


Figura 11. Gráfica de la determinación de la viscosidad intrínseca (g/mol) para obtener el peso molecular de los polímeros.

Al sustituir los datos en la ecuación de Kuhn-Mark-Houwink (Ecuación 2) utilizando las constantes para quitosano ($K=2.14 \times 10^{-3}$ y $\alpha= 0.657$) y alginato ($K=7.30 \times 10^{-5}$ y $\alpha= 0.929$), se obtuvo que el quitosano CH56 presentó el peso molecular viscosimétrico (M_v) más bajo con un valor de 50688.29 g/mol, mientras que el quitosano CHB presentó un peso molecular de 117521.72 g/mol. Asimismo, el quitosano CHM mostró un peso molecular de 230203.20 g/mol, finalmente el alginato exhibió el mayor peso molecular en comparación con los polímeros anteriores con un valor de 457758.57 g/mol. El quitosano CHB presentó un valor de potencial zeta (ζ) de +43.5 mV, mientras que el quitosano CH56 un valor de +42.8 mV y el CHM +46 mV a un pH de 4, lo que los convierte en polímeros ideales para crear una formulación estable.

8.4 Formación de microemulsiones

Previo a la formación de emulsiones, se comprobó que el quitosano efectivamente estabiliza el extracto lipofílico de chapulín. En la Figura 12 se observa que el extracto al ser agitado con solución salina sin polímero no logra formar partículas definidas y en el lapso de minutos empieza a subir a la superficie por lo que es, altamente inestable. Así como también, se corroboró que 5 minutos es un tiempo de agitación suficiente en vórtex para obtener las emulsiones (Figura 13), ya que favorece a la formación de un mayor número de partículas con un tamaño pequeño si se compara con las partículas obtenidas a 1 y 3 minutos de agitación, por otro lado, los resultados de agitación a 5 y 7 minutos fueron similares.

Se prepararon tres emulsiones con relaciones de extracto-polímero de (1:5, 1:10 y 1:15) utilizando los tres diferentes quitosanos a una concentración fija (10 mg/mL). En la Figura 14 se representan las muestras y los tamaños de partícula a 1 hora de reposo después de su preparación.

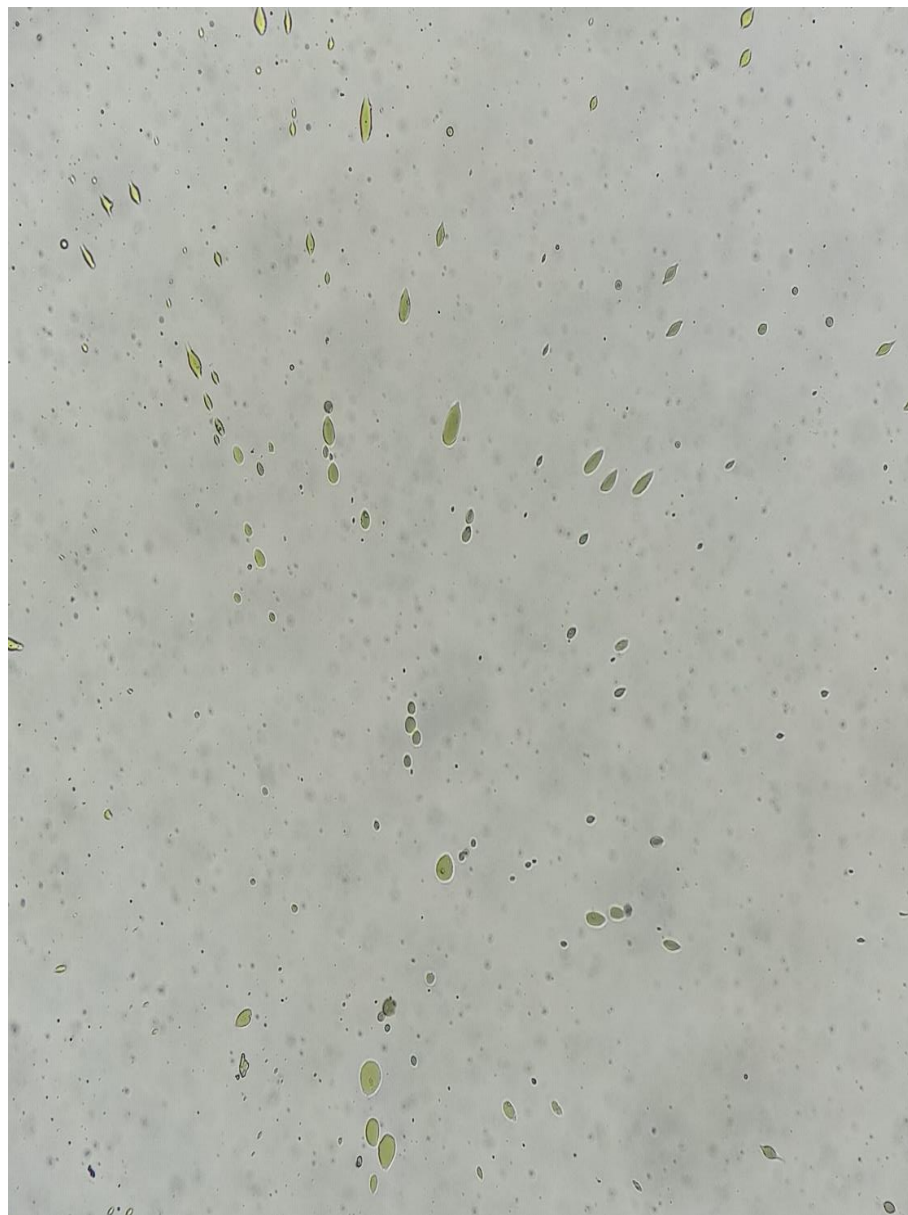


Figura 12. Imagen microscópica a 10x del extracto lipofílico de chapulín mezclado con solución salina.

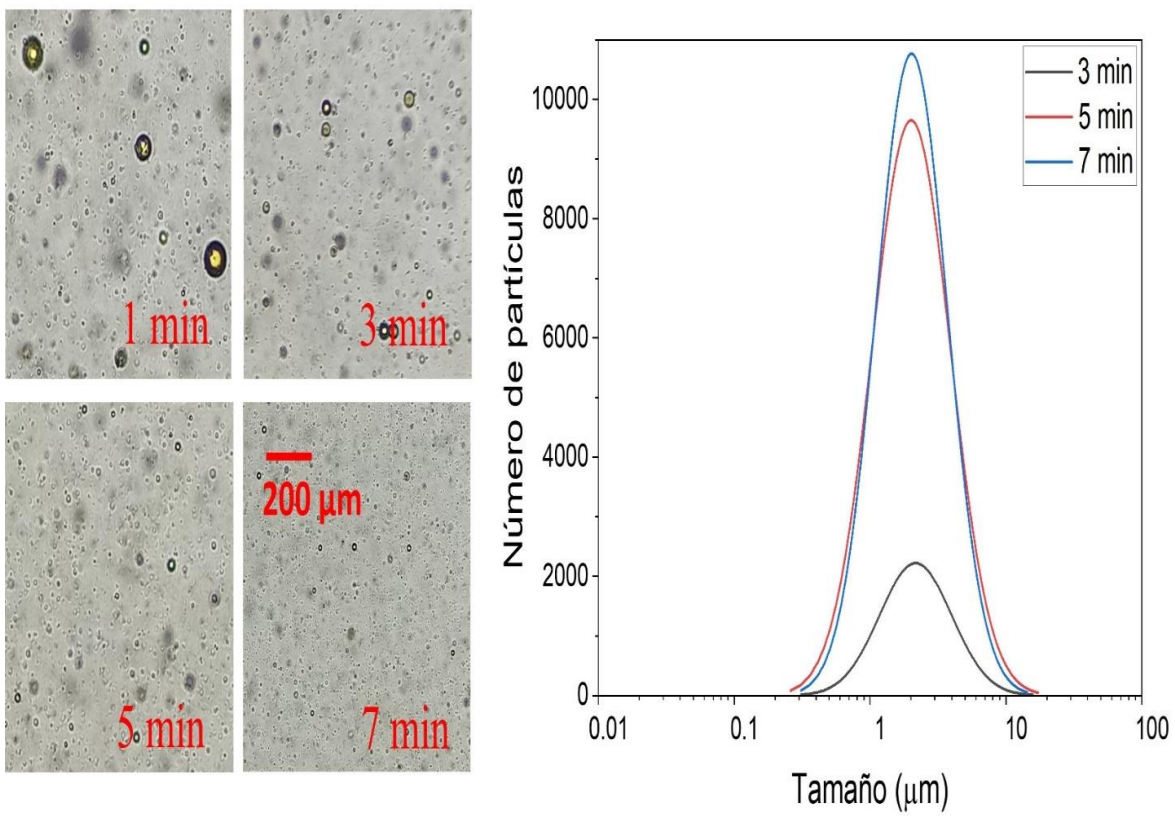


Figura 13. Imágenes microscópicas a 10x y gráfica de la distribución del número y tamaño de partículas correspondientes a la cinética de tiempo para la formación de emulsiones.

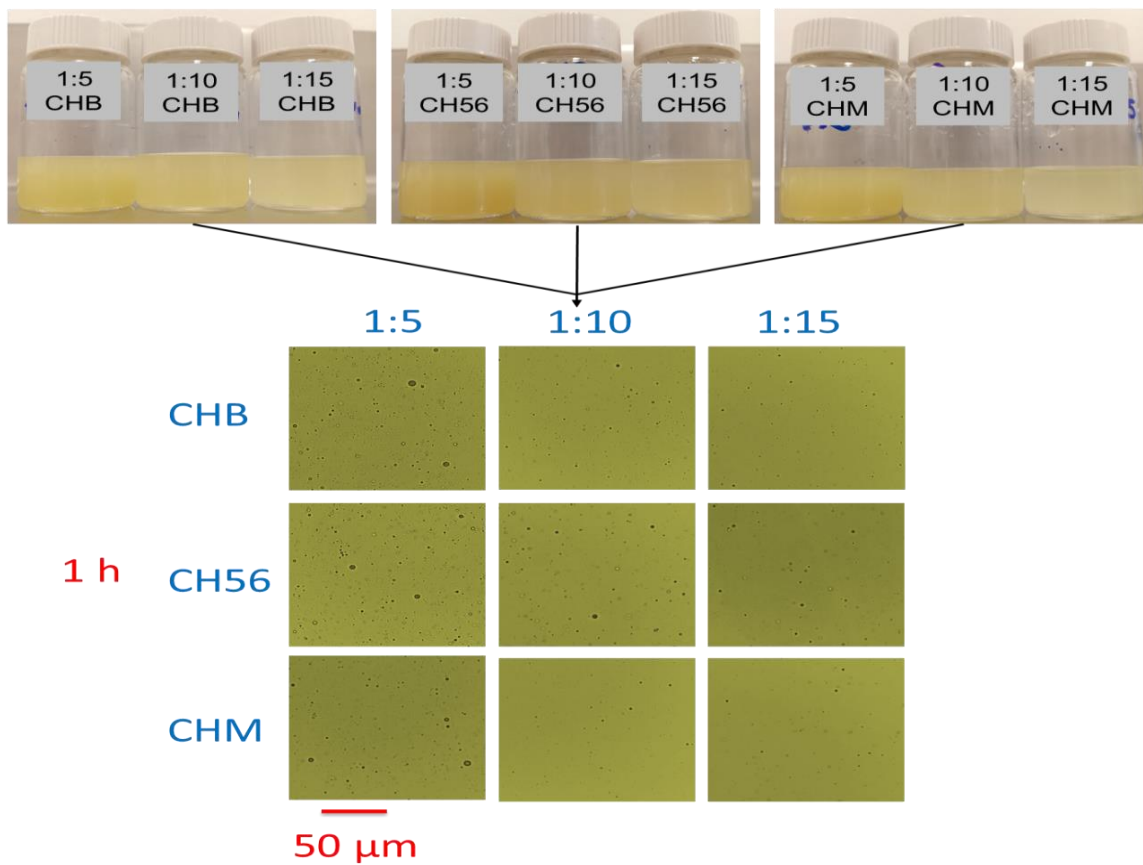


Figura 14. Imágenes macroscópicas y microscópicas (magnificación=40x) de emulsiones a base de extracto lipofílico de chapulines y quitosano (CHB, CH56 y CHM) en distintas relaciones extracto-polímero y concentración fija de quitosano (10 mg/mL) a 1 hora de reposo después de la preparación.

La intensidad del color amarillo claro fue incrementando conforme se aumentó la cantidad de extracto para todos los casos. Las emulsiones elaboradas con CHM presentaron una apariencia más viscosa que aquellas elaboradas con los quitosanos CHB y CH56.

Por otra parte, visualmente al microscopio se observó que la emulsión que contenía la mayor cantidad de aceite (1:5) presentó un mayor tamaño y número de partículas, mientras que la emulsión 1:15 contenía un menor tamaño de partículas y dispersión de estas en el campo (Figura 14). El tamaño de partícula de las emulsiones 1:10 se mostró más homogéneo al observarse al microscopio. En la Figura 15 se puede corroborar que el número de partículas aumenta conforme se utiliza una mayor cantidad de extracto para encapsular sin importar el quitosano que se utilice para la formación de la emulsión. La emulsión con quitosano CHB presentó un desplazamiento de las gráficas de frecuencia relativa más evidente en comparación con los otros quitosanos, lo que indica que el tamaño de partícula difiere desde la primera hora de formación al variar la cantidad de extracto (Figura 15a). Mientras que el desplazamiento de las gráficas de la emulsión con CH56 es casi nulo, lo que muestra que los tamaños se mantuvieron similares a ese tiempo sin importar la cantidad de extracto que se utilice (Figura 15b). En lo que corresponde a la emulsión con CHM, la gráfica de variación de extracto-polímero 1:15 presentó un mayor desplazamiento hacia la derecha, y por ende un mayor tamaño a una hora (Figura 15c).

Por otro lado, en el Cuadro 3 se observan los tamaños de partícula para cada emulsión tomando en cuenta distintos tiempos de reposo después de la preparación. La emulsión 1:5 con CHB presentó a 1 hora el mayor tamaño de partícula comparada con las otras relaciones de extracto-polímero ($p \leq 0.05$).

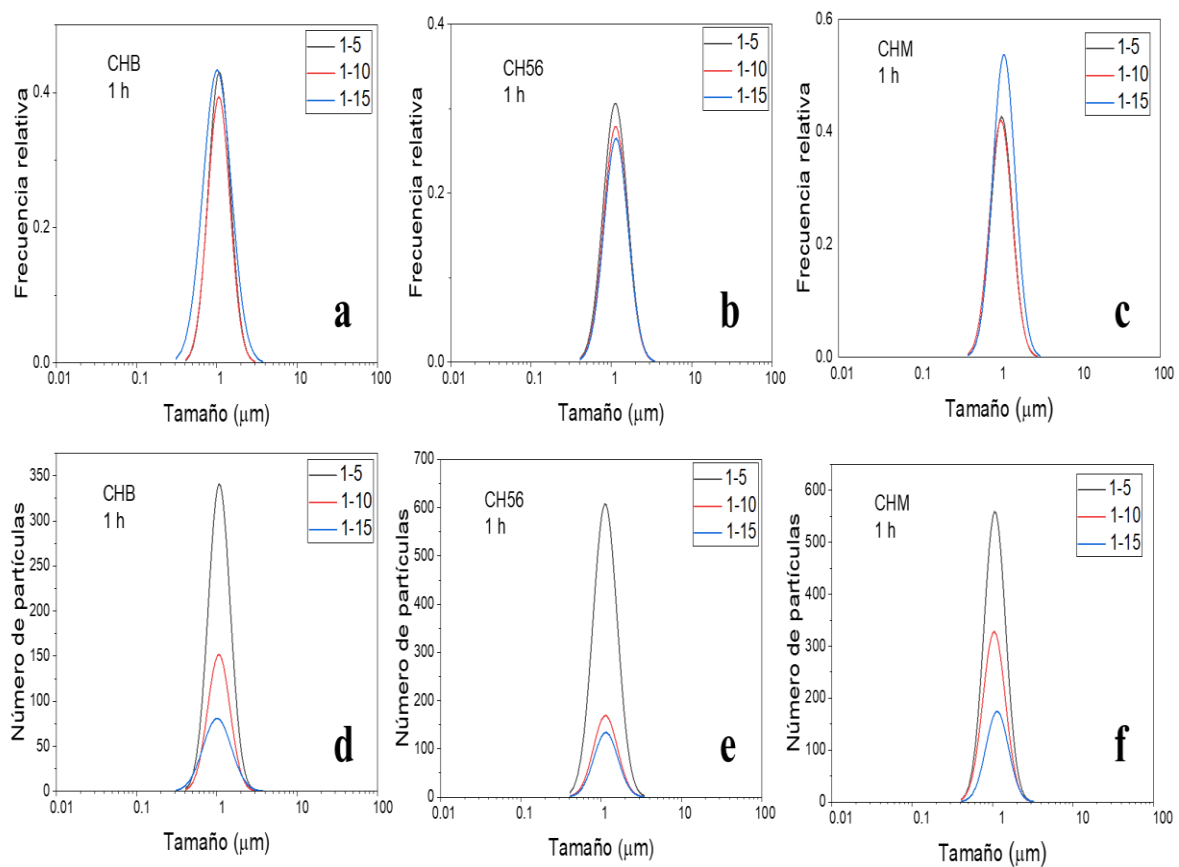


Figura 15. Gráficas de distribución de tamaño (a, b y c) y número de partículas (d, e y f) mediante análisis digital de imágenes de las emulsiones con distintas relaciones de extracto-polimero y concentración fija de quitosano (10 mg/mL) a 1 hora de reposo después de la preparación.

Cuadro 3. Media y desviación estándar del tamaño de partícula de las microemulsiones (μm) con distintas relaciones de extracto lipofílico- quitosano a diferentes tiempos de reposo después de su elaboración.

Emulsión			
CHB	1 h	24 h	168 h
1:5	1.31 \pm 0.50 ^{aB}	1.31 \pm 0.53 ^{aA}	1.35 \pm 0.61 ^{aA}
1:10	1.24 \pm 0.46 ^{aA}	1.31 \pm 0.52 ^{bA}	1.29 \pm 0.49 ^{abA}
1:15	1.23 \pm 0.45 ^{aA}	1.27 \pm 0.48 ^{aA}	1.52 \pm 0.58 ^{bB}
CH56			
1:5	1.35 \pm 0.54 ^{aA}	1.78 \pm 0.95 ^{cC}	1.45 \pm 0.63 ^{bA}
1:10	1.36 \pm 0.55 ^{aA}	1.37 \pm 0.56 ^{aA}	1.38 \pm 0.53 ^{aA}
1:15	1.37 \pm 0.55 ^{aA}	1.68 \pm 0.97 ^{bB}	1.46 \pm 0.57 ^{bB}
CHM			
1:5	1.24 \pm 0.45 ^{bA}	1.17 \pm 0.42 ^{aA}	1.34 \pm 0.66 ^{cA}
1:10	1.23 \pm 0.52 ^{aA}	1.27 \pm 0.70 ^{aA}	1.35 \pm 0.79 ^{aA}
1:15	1.35 \pm 0.74 ^{bB}	1.23 \pm 0.56 ^{aA}	1.27 \pm 0.49 ^{aA}

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en la misma fila por la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Letras mayúsculas diferentes indican diferencias significativas en la misma columna para cada quitosano por la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

Sin embargo, no mostró diferencias en los distintos tiempos, comparándose consigo misma. La emulsión CHB 1:10 solo mostró diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) en los tiempos 1-24 h.

La emulsión CHB 1:15 con un tamaño de partícula de $1.52 \mu\text{m}$ a 168 h evidenció una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) al compararse con los tamaños a 1 y 24 h. Dicho tamaño también fue el mayor comparado con las otras relaciones de extracto-polímero a la semana. Lo que indica que conforme avanzó el tiempo el tamaño de partícula de la emulsión CHB 1:15 fue aumentando probablemente por efecto de inestabilidad. Por otro lado, las emulsiones a base de extracto y quitosano CH56 a 1 hora no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$). Los tamaños de partícula de la emulsión CH56 1:5 a 1, 24 y 168 h fueron estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). Mientras que, la emulsión CH56 1:10 mantuvo los tamaños similares a través del tiempo, por lo que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) y se consideró estable hasta la semana. La emulsión CH56 1:15 mostró diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en los tamaños reportados de 1 -24 h y 1 - 168 h. De hecho, a 168 h fue la que presentó el tamaño de partícula mayor comparada con las otras emulsiones.

Finalmente, las emulsiones a base de extracto y quitosano CHM mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) solamente a 1 hora. La emulsión CHM 1:5 evidenció tamaños variables con el paso del tiempo, teniendo el mayor tamaño a 168 h. Por otra parte, la emulsión CHM 1:10 se consideró estable ya que no existió diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en el tamaño de partícula, mientras que la emulsión CHM 1:15 presentó diferencias en los tamaños de los tiempos 1 - 24 h y 1 - 168 h. En este caso, dicha

emulsión mostró el menor tamaño de partícula a 168 h comparada con las emulsiones 1:5 y 1:10, ocurriendo lo contrario con los otros quitosanos analizados.

En lo que corresponde a la turbidez presentada por las emulsiones, se demostró que a mayor cantidad de extracto mayor es la turbidez (Figura 16). Asimismo, el valor de turbidez fue disminuyendo conforme avanzó el tiempo, solamente en el caso de las emulsiones 1:5 con CH56 y CHM a las 24 h se observó un ligero aumento de turbidez.

También se elaboraron emulsiones variando la concentración de los quitosanos como se observa en la Figura 17. Al observar al microscopio las emulsiones de CHB y CH56, se notó que la emulsión que contenía 5 mg/mL de quitosano tenía pocas partículas en comparación con las otras emulsiones que contenían una concentración más alta de polímero. Lo mismo ocurrió con la emulsión de concentración menor de CHM (2.5 mg/mL), la cual mostró pocas partículas, pero a su vez de un mayor tamaño que las emulsiones con concentraciones más altas.

En la Figura 18 se aprecia que las emulsiones con CHM presentan un desplazamiento de las gráficas de frecuencia relativa más notorio que las gráficas con los otros quitosanos. Por lo que se evidenció que los tamaños eran más variados con ese polímero. A su vez, en dicha figura se observa que el número de partículas formadas está directamente relacionado también con la concentración del polímero que se utiliza. Mayor concentración de polímero, mayor número de partículas. La emulsión CHB con concentración de 10 mg/mL de polímero solo mostró diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) en los tamaños de 1-24 h (Cuadro 4). Mientras que, la emulsión de 7.5 mg/mL presentó el tamaño de partícula más grande a las 24 y 168 h, de igual manera a esa concentración de polímero se presentó la mayor variabilidad de los datos a las 24 horas con una desviación estándar de ± 0.91 .

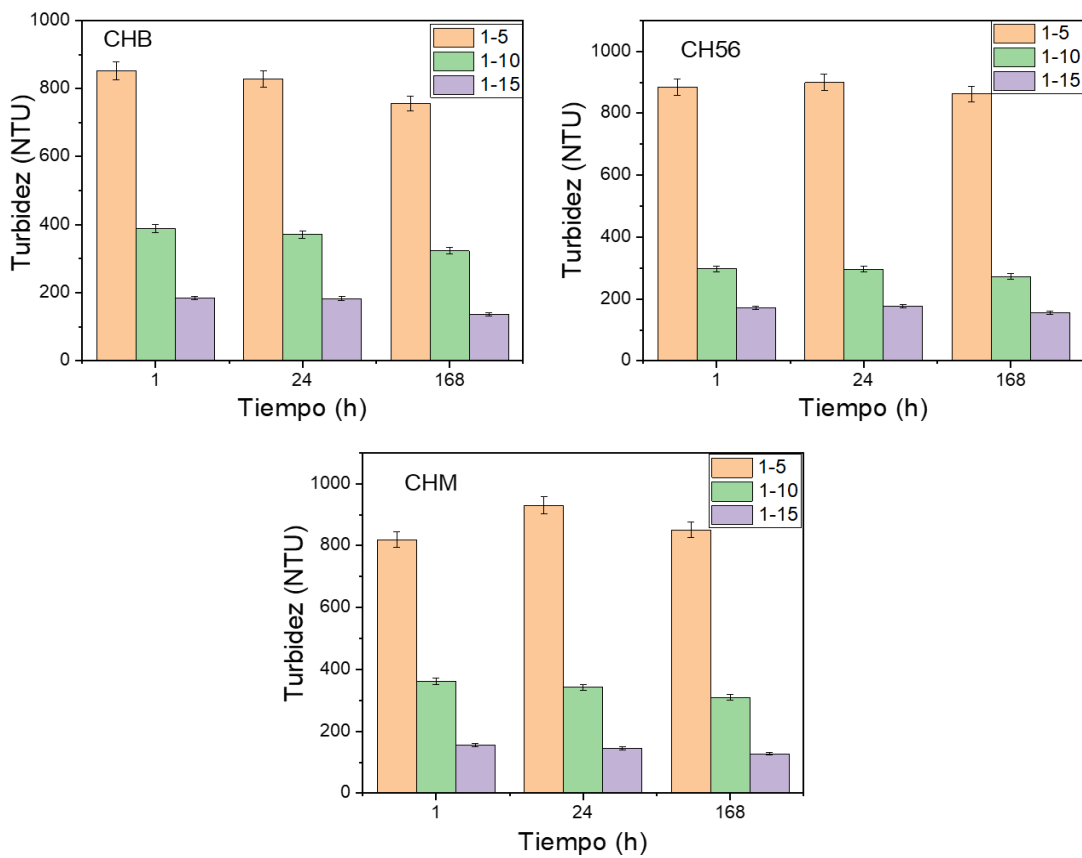


Figura 16. Gráficas de variación de la turbidez de las emulsiones con diferentes relaciones de extracto-polímero a distintos tiempos de reposo después de la preparación. Las muestras fueron diluidas con solución salina a $\frac{1}{4}$.

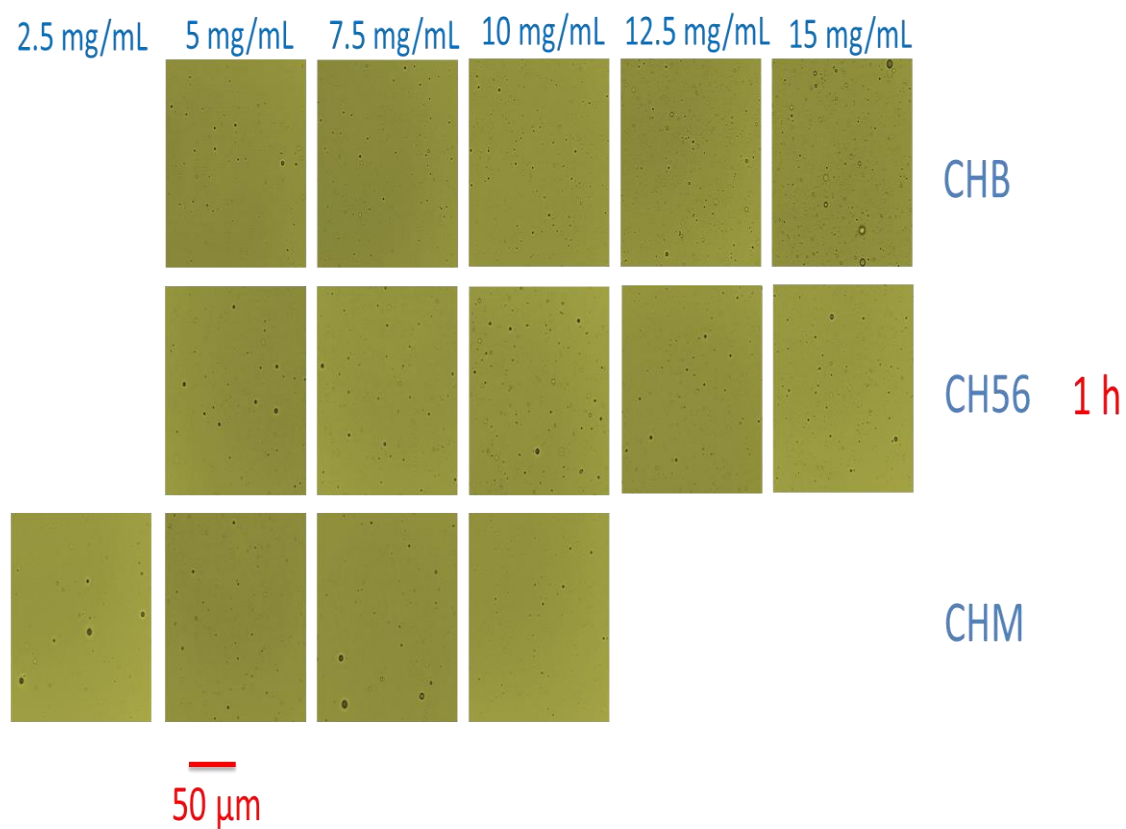


Figura 17. Imágenes microscópicas a 40x de las emulsiones con distintas concentraciones de quitosano a 1 h de reposo después de la preparación.

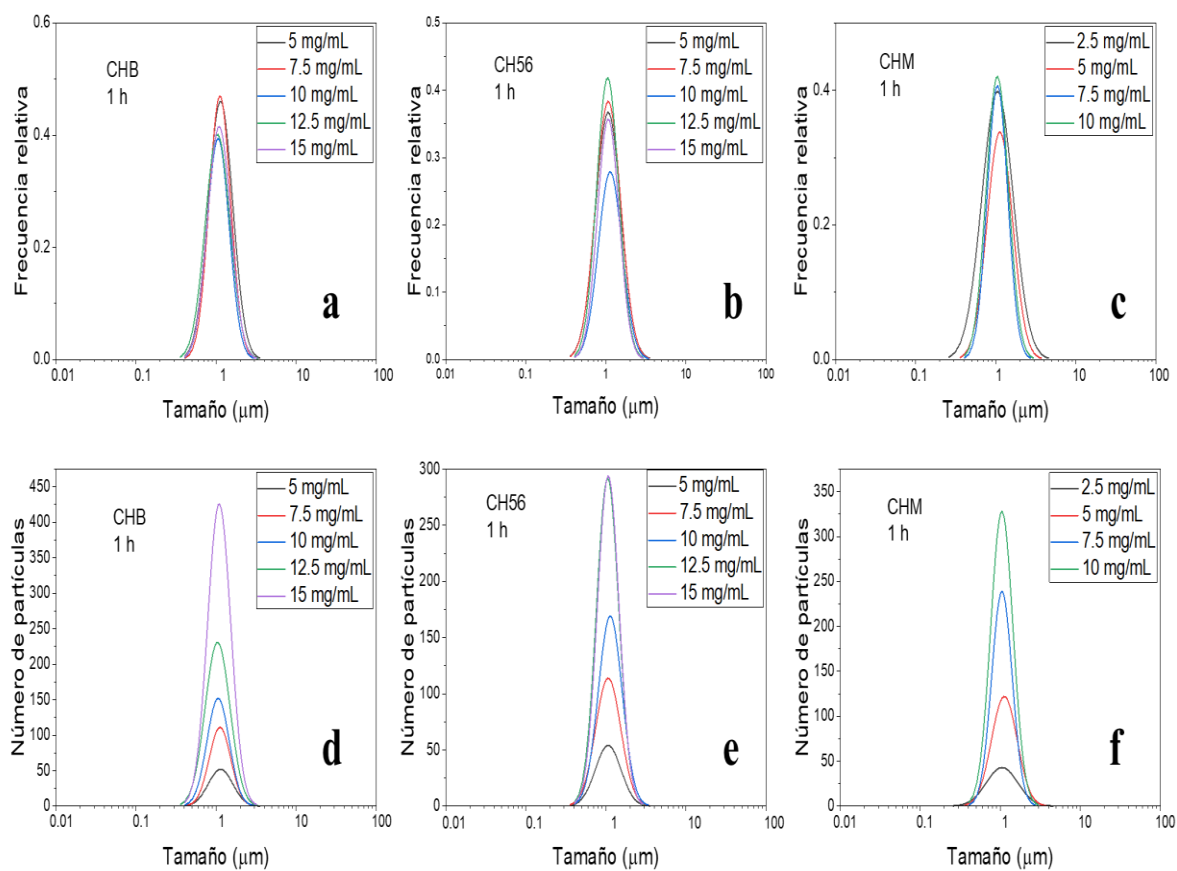


Figura 18. Gráficas de distribución del tamaño (a, b y c) y número de partículas (d, e y f) mediante análisis digital de imágenes de las emulsiones con distintas concentraciones de quitosano a 1 hora de reposo después de la preparación.

Cuadro 4. Media y desviación estándar del tamaño de partícula de las microemulsiones (μm) con distintas concentraciones de quitosano a diferentes tiempos de reposo después de la preparación.

Emulsión	1 h	24 h	168 h
CHB			
5 mg/mL	1.38 \pm 0.60 ^a	1.32 \pm 0.50 ^a	1.29 \pm 0.59 ^a
7.5 mg/mL	1.30 \pm 0.47 ^a	1.59 \pm 0.91 ^b	1.51 \pm 0.59 ^b
10 mg/mL	1.24 \pm 0.46 ^a	1.31 \pm 0.51 ^b	1.29 \pm 0.49 ^{ab}
12.5 mg/mL	1.28 \pm 0.63 ^b	1.31 \pm 0.56 ^b	1.15 \pm 0.36 ^a
15 mg/mL	1.30 \pm 0.51 ^a	1.26 \pm 0.50 ^a	1.26 \pm 0.46 ^a
CH56			
5 mg/mL	1.32 \pm 0.63 ^a	1.28 \pm 0.46 ^{ab}	1.39 \pm 0.53 ^b
7.5 mg/mL	1.31 \pm 0.60 ^a	1.21 \pm 0.43 ^a	1.39 \pm 0.57 ^b
10 mg/mL	1.36 \pm 0.55 ^a	1.37 \pm 0.56 ^a	1.38 \pm 0.53 ^a
12.5 mg/mL	1.23 \pm 0.47 ^a	1.28 \pm 0.47 ^b	1.44 \pm 0.57 ^c
15 mg/mL	1.24 \pm 0.47 ^a	1.28 \pm 0.52 ^a	1.59 \pm 0.72 ^b
CHM			
2.5 mg/mL	1.46 \pm 0.86 ^a	2.40 \pm 1.6 ^b	2.36 \pm 1.09 ^b
5 mg/mL	1.38 \pm 0.56 ^a	1.78 \pm 1.45 ^a	1.28 \pm 0.42 ^a
7.5 mg/mL	1.20 \pm 0.43 ^b	1.62 \pm 1.55 ^{ba}	1.10 \pm 0.28 ^a
10 mg/mL	1.23 \pm 0.52 ^a	1.27 \pm 0.70 ^a	1.35 \pm 0.79 ^a

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas en la misma fila por la prueba de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$.

La emulsión CH56 1:10 no presentó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) hasta las 168 horas, por lo que se considera estable hasta ese tiempo. Inclusive a la semana, dicha emulsión presentó el menor tamaño de partícula comparado con las otras concentraciones. En el caso de los quitosanos CHB y CHM, las emulsiones con mayor concentración de quitosano (15 mg/mL y 10 mg/mL, respectivamente), se mostraron estables hasta la semana, ya que no existieron diferencias ($p > 0.05$) en los tamaños de partícula. En el caso de la emulsión CH56 15 mg/mL no existieron diferencias en los tamaños de 1-24 h.

La turbidez fue cada vez mayor conforme aumentaba la concentración del polímero en las emulsiones (Figura 19). De igual forma, conforme avanzó el tiempo los valores de turbidez fueron disminuyendo para todos los casos. En la Figura 20 se representan los tamaños de partícula obtenidos por microscopía de las emulsiones con 10 mg/mL de CHB y CH56 (relación extracto-polímero 1:10), con un mayor acercamiento. La emulsión con el polímero del peso molecular más bajo (CH56) presentó tamaños de partícula más grandes obtenidos por microscopía y DLS, con valores de 1.38 y 2.30 μm , respectivamente, si se compara con el otro polímero (Cuadro 5). La emulsión con CHB presentó valores muy cercanos entre sí, al utilizar las dos técnicas distintas para obtener tamaños de partícula (microscopía y DLS), con valores promedio de 1.29 y 1.28 μm , respectivamente. No obstante, en la Figura 21 se aprecia que las gráficas de distribución de tamaños de partícula por DLS para cada polímero son similares a la gráfica obtenida por microscopía, lo que permite validar la técnica utilizada en el presente trabajo.

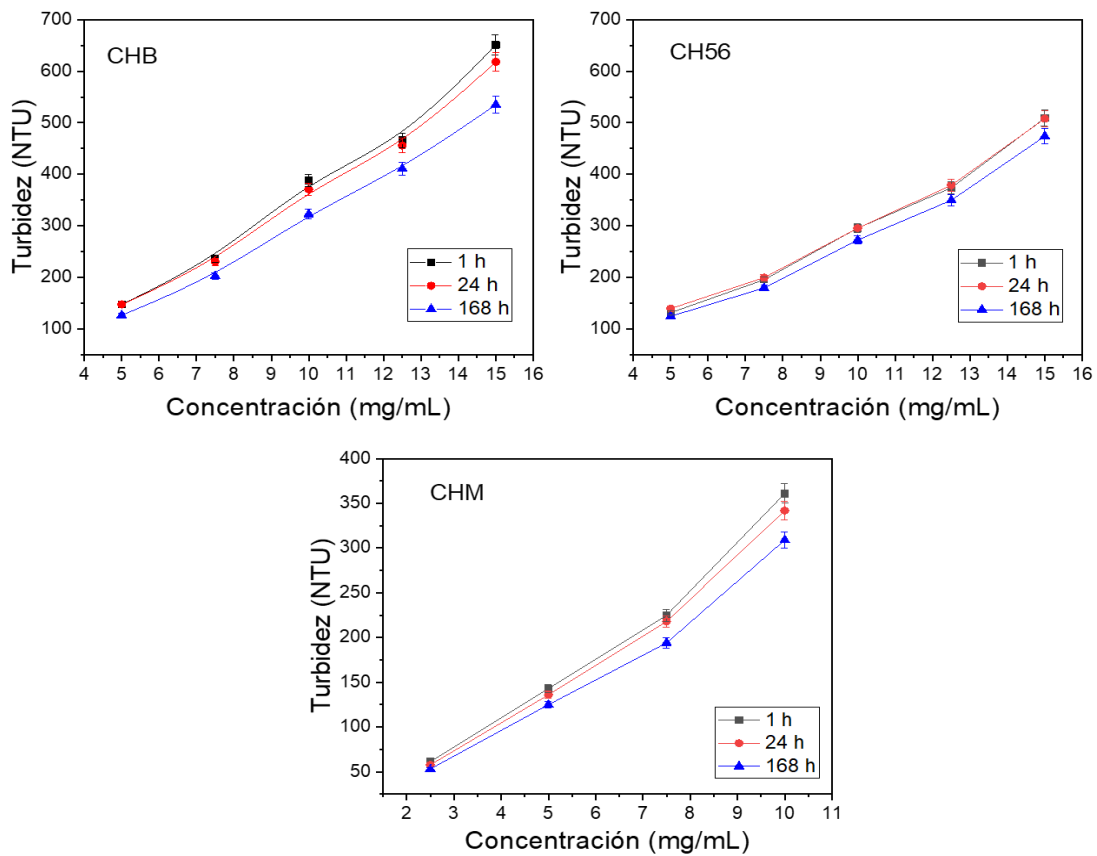


Figura 19. Gráficas de variación de la turbidez de las emulsiones con diferentes concentraciones de polímero a distintos tiempos de reposo después de la preparación. Las muestras fueron diluidas con solución salina a $\frac{1}{4}$.

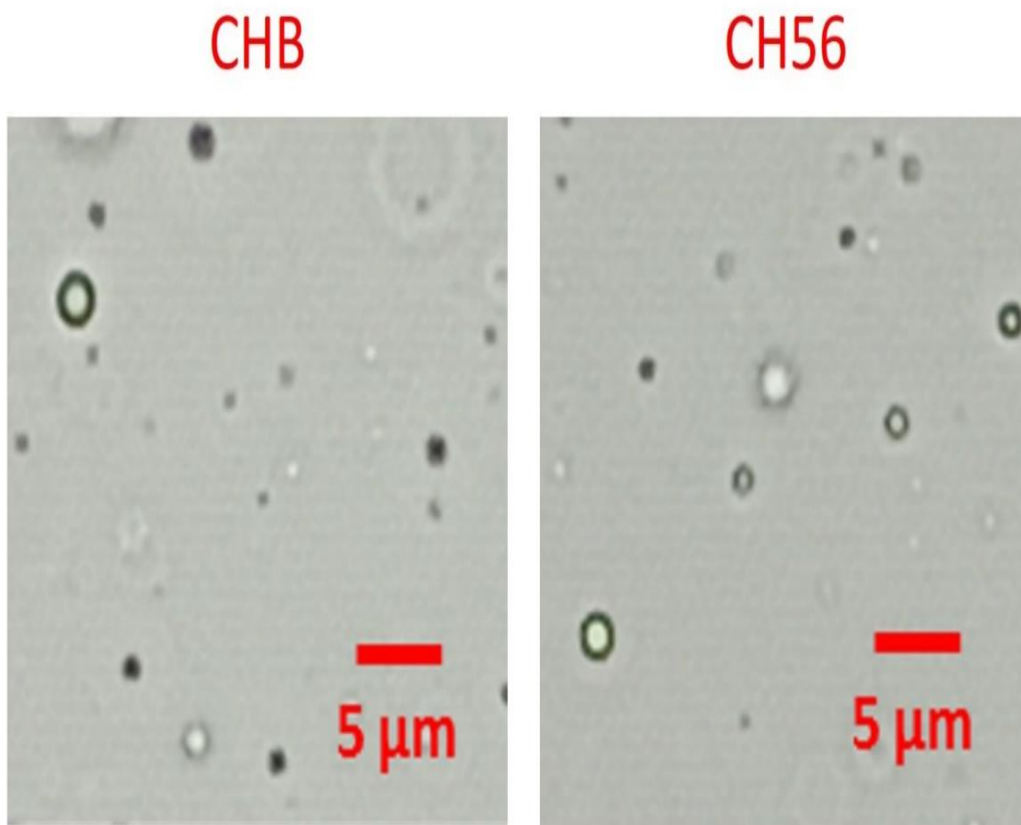


Figura 20. Imágenes microscópicas (10x de magnificación) de las emulsiones óptimas (1:10) con CHB y CH56 a 10 mg/mL.

Cuadro 5. Valores de potencial zeta (ζ) y tamaño de partícula de las emulsiones óptimas (μm) obtenido por microscopía y DLS.

Emulsión	D_h (μm) (DLS)	PDI	Potencial zeta (ζ) (mV)	D_h (μm) (Microscopía)	Coefficiente de variación
CHB	1.28 \pm 0.18	0.370	+40.4 \pm 2.0	1.29 \pm 0.49	0.38 ^a
CH56	2.30 \pm 0.64	0.217	+36.5 \pm 3.0	1.38 \pm 0.53	0.38 ^a

^a coeficiente de variación obtenido como el cociente de la desviación estándar sobre la media del tamaño de partícula obtenido por microscopía

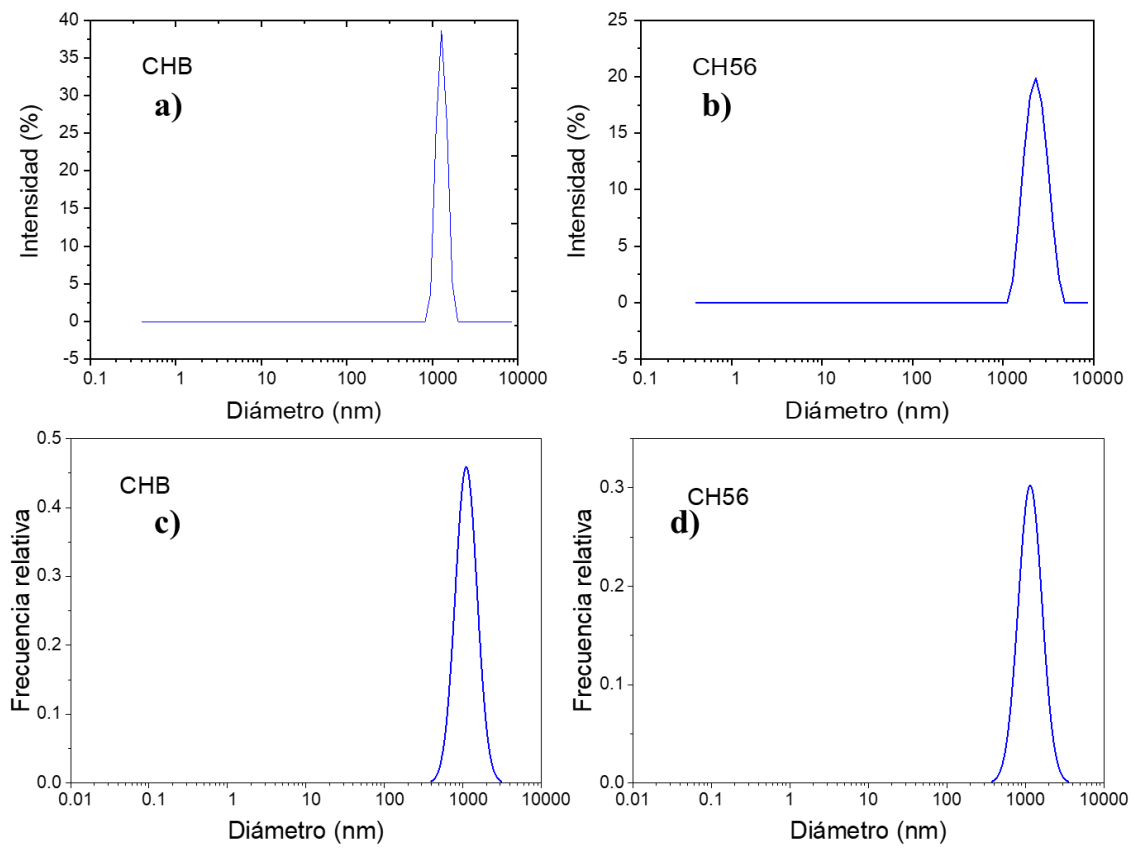


Figura 21. Gráficas de distribución de tamaño de partícula de las emulsiones óptimas obtenidas por DLS (a, b) y microscopía (c, d).

Por otro lado, la emulsión con CH56 presentó un menor índice de polidispersidad (PDI) (Cuadro 5), lo que indicó que los tamaños de partícula eran más homogéneos entre sí.

8.5 Preparación del gel físico

Los geles formados con 5 y 7 mg/mL de alginato presentaron una textura y coloración grisácea similar, sin importar la emulsión con la cual fueron cargados (Figura 22). Por otra parte, la formulación que contenía 3 mg/mL de alginato y que fue cargada con la emulsión a base de extracto y CH56, no logró gelificar y, en consecuencia, precipitó totalmente. Los geles con 3 mg/mL de alginato cargadas con emulsiones (CHB y CHM) presentaron una consistencia menos resistente que las otras. Al observar los geles al microscopio, fue posible evidenciar las partículas de la microemulsión atrapadas entre la red del gel de manera dispersa y homogénea. De igual manera, se percibió al microscopio el gel ya seco sobre un cubreobjetos y fueron notorias las partículas de la emulsión dispersas en la muestra, al igual que el extracto en algunas zonas. Por lo que, se determinó que los geles cumplen con la función de proteger las emulsiones y distribuir las partículas homogéneamente. Es importante resaltar que no se observaron aglomeraciones. Los valores de turbidez fueron disminuyendo conforme aumentaba la concentración de alginato en los geles (Figura 23). Asimismo, los geles cargados con emulsión a base de extracto y quitosano CH56 presentaron los valores de turbidez más altos, seguidos por los geles cargados con CHB y CHM. El gel de 3 mg/mL de alginato cargado con CH56 evidentemente presentó el mayor valor de turbidez, ya que estaba totalmente precipitado.

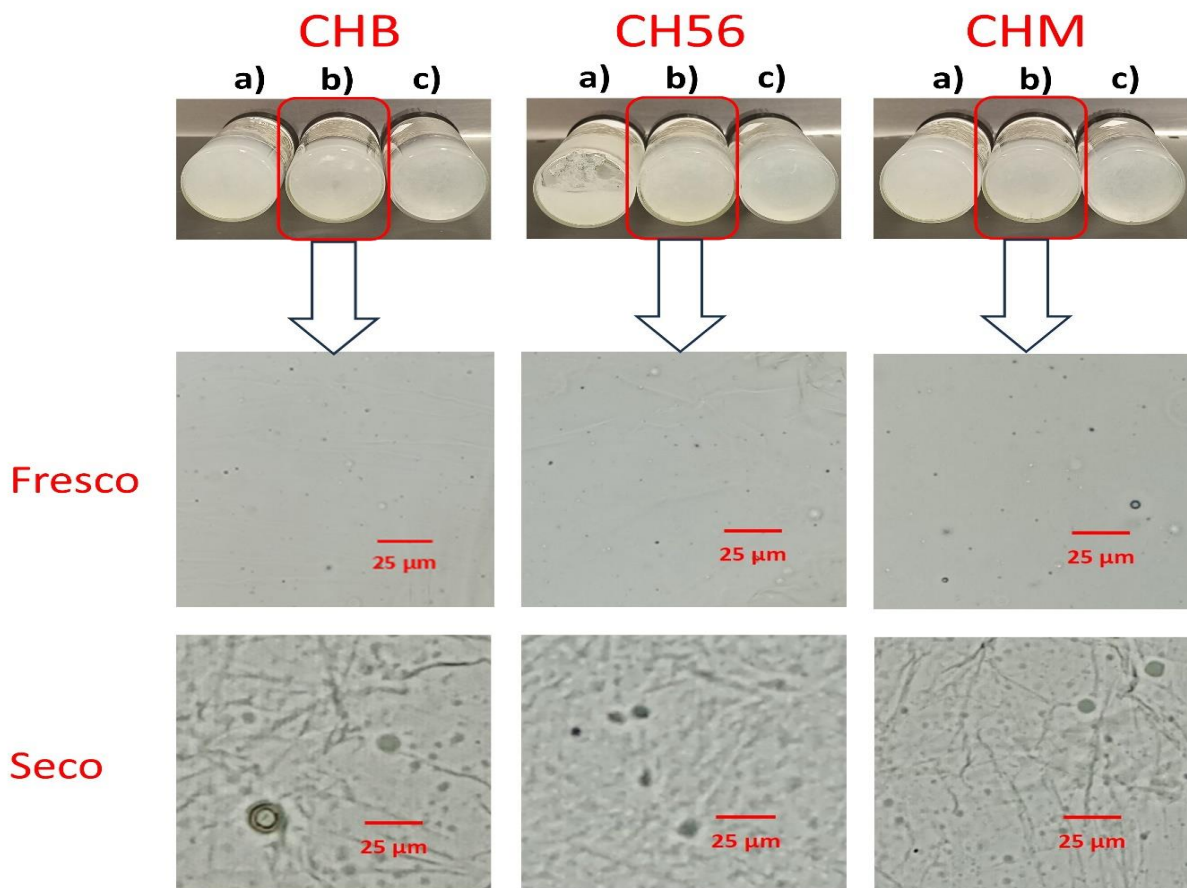


Figura 22. Geles con distintas concentraciones de alginato de sodio. a) 3 mg/mL; b) 5 mg/mL y c) 7 mg/mL. Las fotografías del microscopio a 40x corresponden a los geles de 5 mg/mL de alginato. Se observan partículas distribuidas en la muestra fresca y seca.

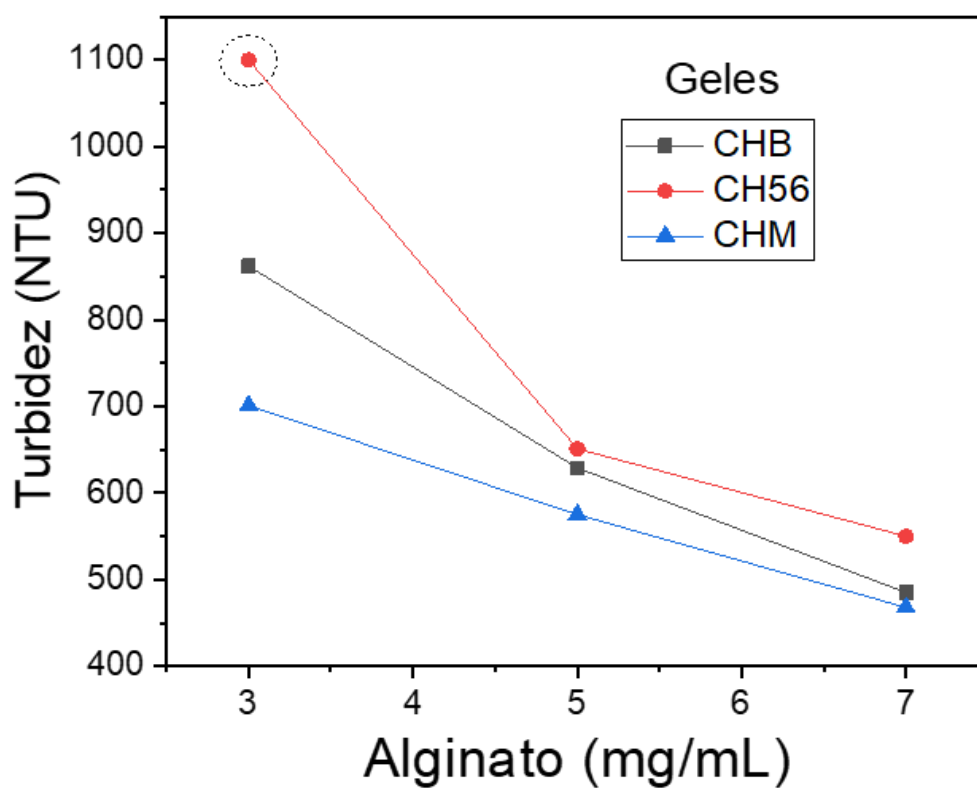


Figura 23. Gráfica de la variación de turbidez de los geles con distintas concentraciones de alginato de sodio cargados con emulsiones a base de extracto y distintos tipos de quitosano. El punto en la gráfica encerrado con línea punteada representa al valor de turbidez de la emulsión que precipitó totalmente.

Por otro lado, los geles mantuvieron un comportamiento muy parecido en la prueba de pérdida de peso (Figura 24). Todos terminaron de secarse en un máximo de 4 horas. Pero, a partir de la tercera hora el porcentaje de peso se mantuvo casi constante, con variaciones mínimas.

Otra característica importante de los geles obtenidos es que conforme aumentaba la concentración de alginato también incrementa el desplazamiento máximo hasta la ruptura, es decir, tiene una mayor flexibilidad o estiramiento (Figura 25). Los geles cargados con extracto y CHM presentaron los valores más altos, seguidos por los geles cargados con CH56 y CHB, los cuales exhibieron valores muy cercanos entre sí. Debido a esta prueba, se determinó que los geles con 7 mg/mL de alginato de sodio evidenciaron una consistencia idónea que favorece su aplicación tópica.

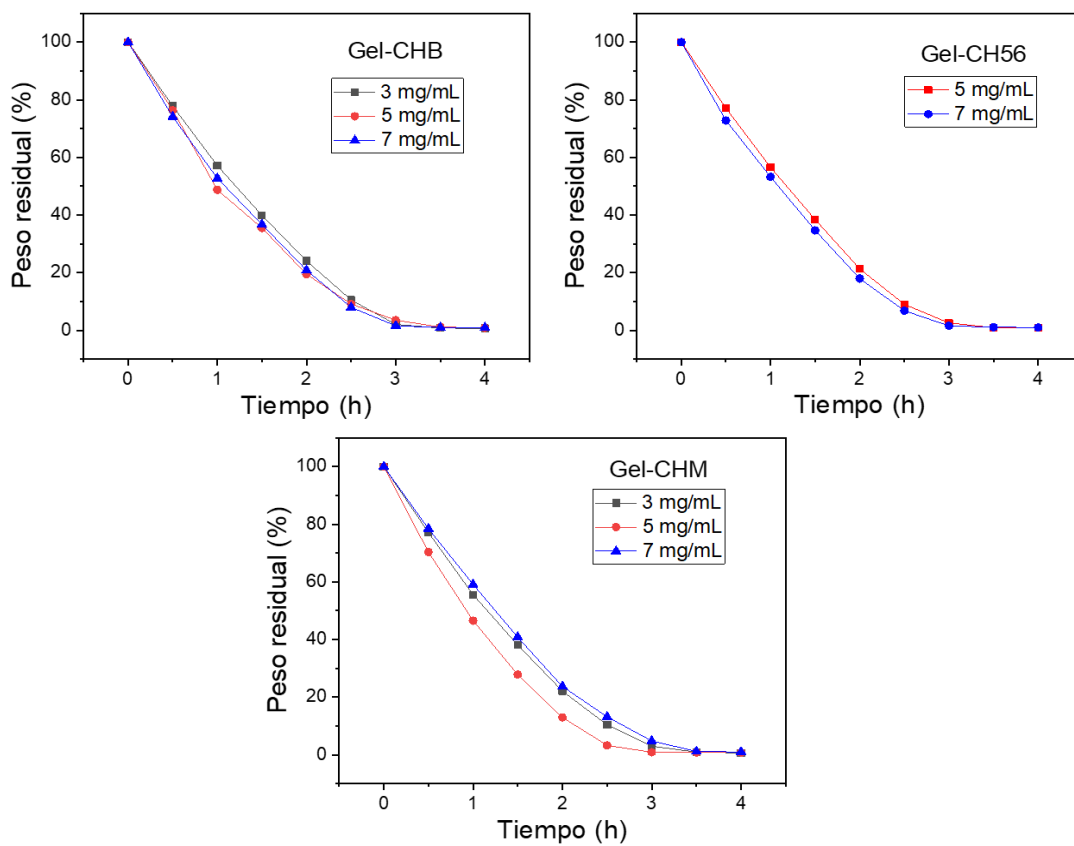


Figura 24. Gráficas representativas de la cinética de pérdida de peso de los gels. Todos se secaron completamente en 4 horas a 37 °C.

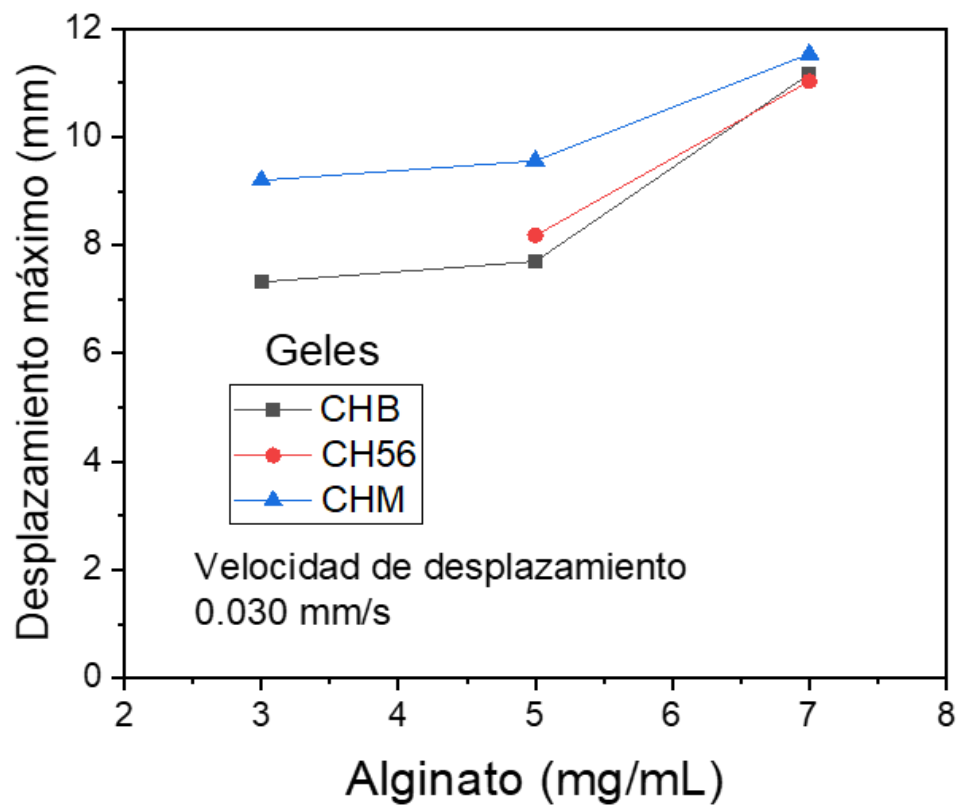


Figura 25. Gráfica representativa de la prueba de desplazamiento máximo hasta la ruptura de los geles.

8.6 Docking molecular

El acoplamiento molecular es una herramienta computacional que se utiliza para predecir los distintos tipos de unión de proteínas receptoras con sus moléculas ligando (Chaudhary et al., 2023). En el presente trabajo, se realizó un estudio de acoplamiento para investigar las interacciones de los diversos componentes de la formulación con proteínas relacionadas con la cicatrización. La evaluación de la interacción de la proteína de colágeno con el ligando del ácido linolénico obtuvo una energía de afinidad de -3.6 kcal/mol. En la Figura 26 se observa el enlace polar que se generó entre el ácido linolénico con el aminoácido Pro11 de la proteína de colágeno. Por otro lado, el redocking de la interacción del receptor 1 de ácidos grasos libres (FFAR1) y el ácido linoleico, obtuvo una energía de afinidad de -4.9 kcal/mol, lo cual representa una interacción apropiada y fuerte.

En la Figura 27 se representa el enlace polar formado entre el ácido linoleico con el aminoácido Ala2223 del receptor FFAR1. Dicho valor confirma el resultado obtenido en el trabajo de Felix-Sagaste et al., (2023). Por último, el acoplamiento molecular entre la proteína FFAR1 y el ácido linolénico mostró una mejor energía de afinidad en comparación con el anterior ácido graso con un valor de -5.4 kcal/mol. De igual manera se generó un enlace polar entre el ácido graso y el aminoácido Ser101 de la proteína (Figura 28). Lo cual indicó que el ácido graso más predominante en el extracto (ácido linolénico) tuvo la mejor interacción con la proteína relacionada con la cicatrización FFAR1.

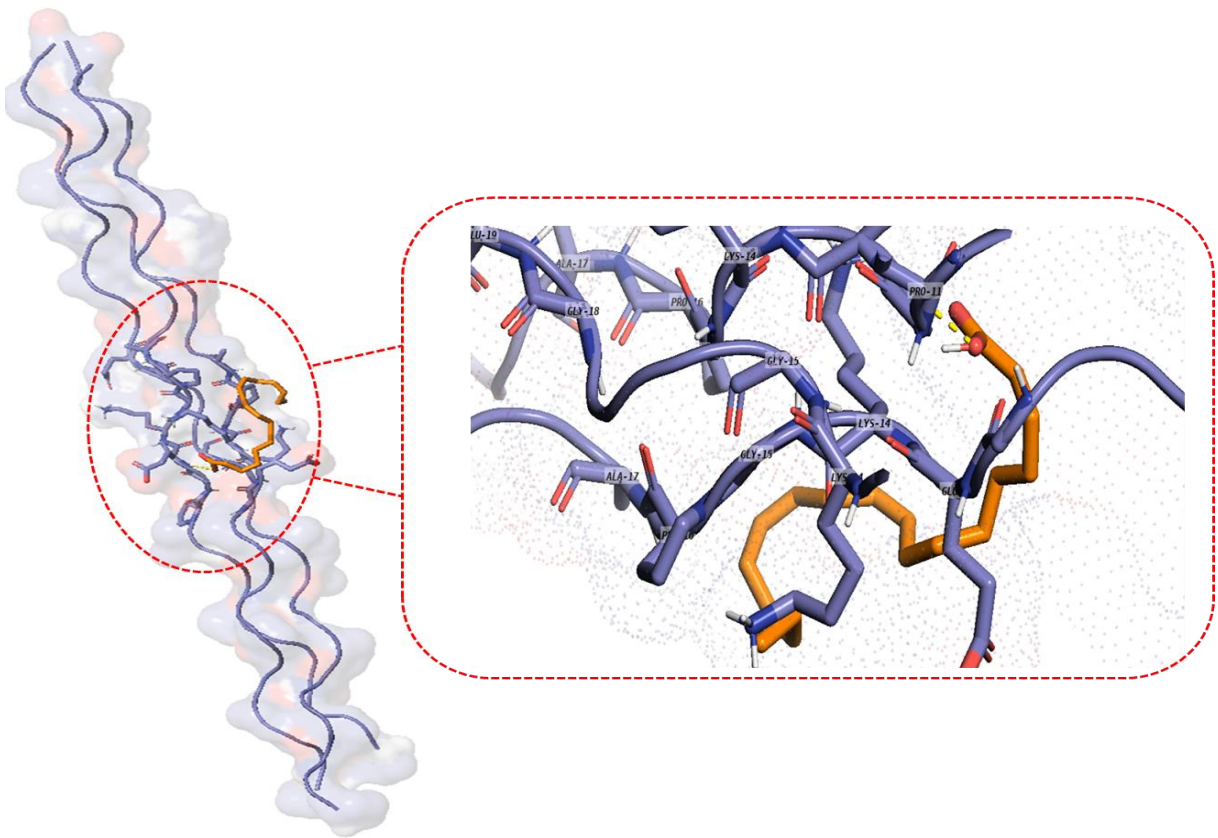


Figura 26. Simulación de acoplamiento de la proteína colágeno (molécula morada) y ácido linolénico (molécula naranja). El enlace polar está representando con las líneas discontinuas amarillas.

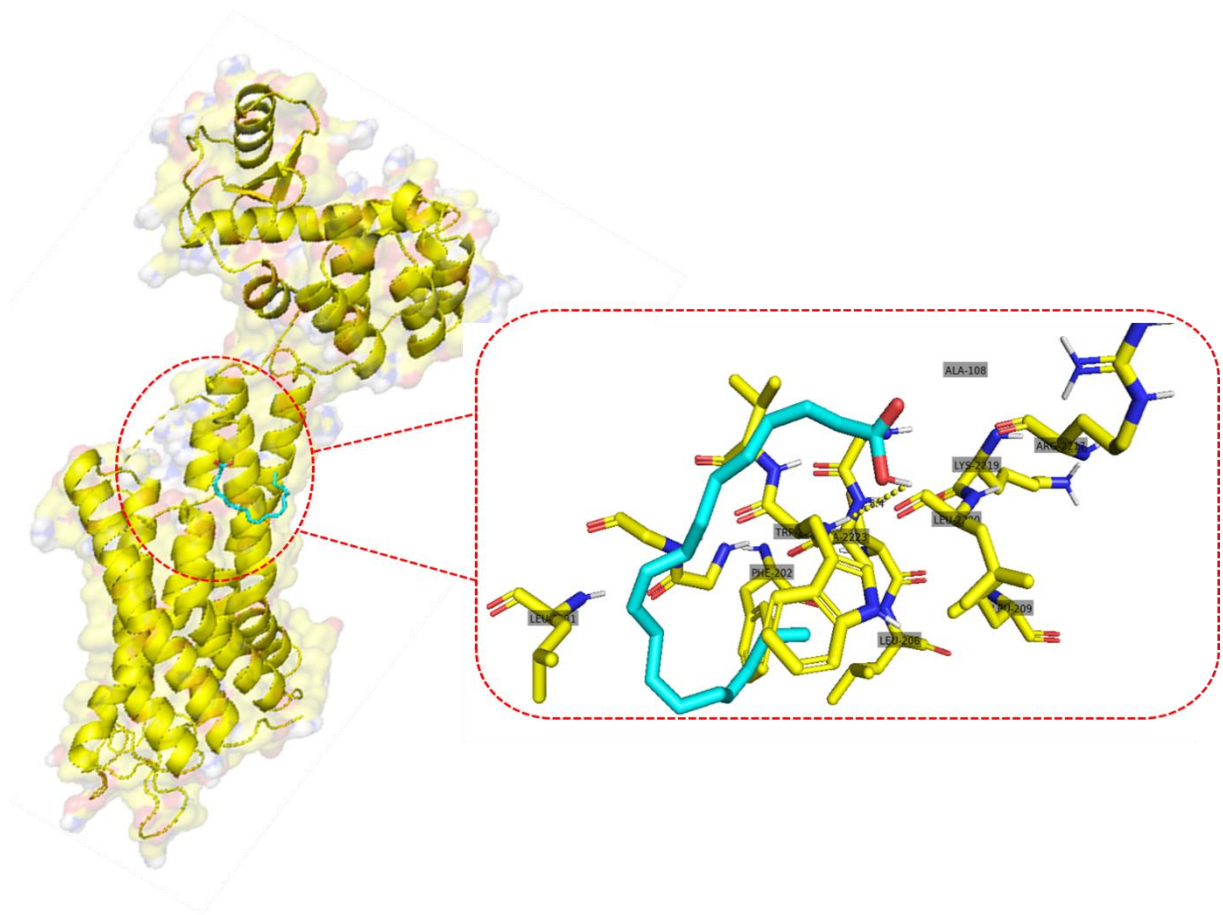


Figura 27. Simulación de acoplamiento de la proteína FFAR1 (molécula amarilla) y ácido linoleico (molécula azul). El enlace polar está representando con las líneas discontinuas amarillas.

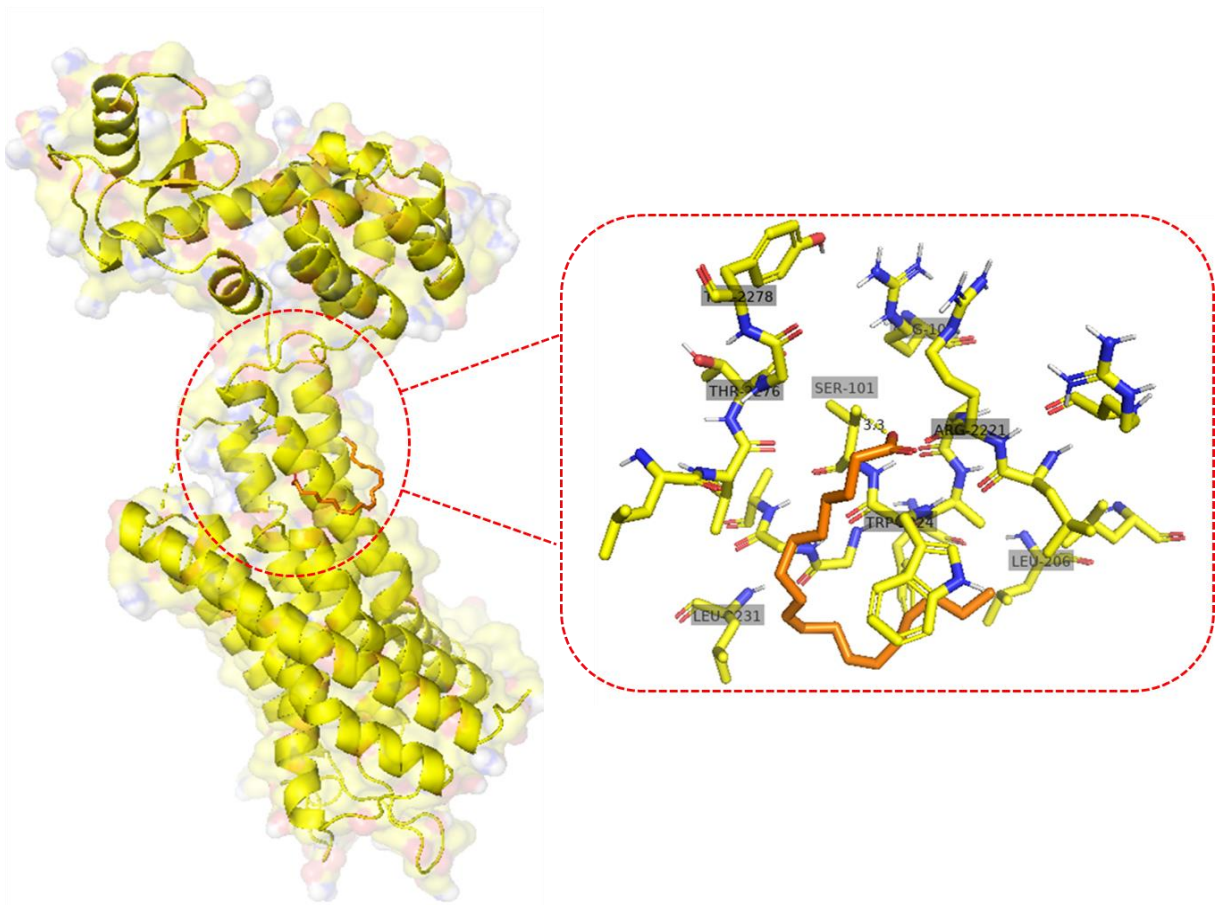


Figura 28. Simulación de acoplamiento de la proteína FFAR1 (molécula amarilla) y ácido linolénico (molécula naranja). El enlace polar está representando con las líneas discontinuas amarillas.

8.7 Prueba biológica preliminar

Las imágenes provenientes del ensayo de rayado con las células HeLa se aprecian en la Figura 29. Se puede observar, como el área inicial del rayado en la hora 0 para todos los tratamientos, disminuyó notablemente conforme avanzaba el tiempo, es decir, las células migraron y proliferaron para reparar el daño en la herida. La alantoína es un compuesto con actividad cicatrizante seleccionado como control positivo, debido a que ha demostrado que tiene la capacidad de mejorar las respuestas antiinflamatorias, estimular la síntesis de la matriz extracelular y promover la proliferación de fibroblastos, entre otros aspectos (Haki et al., 2023). Las células tratadas con dicho fármaco exhibieron visualmente al microscopio el mayor cierre de la herida en la prueba biológica, de hecho, se notaron áreas en el pozo completamente cerradas a las 72 horas como se esperaba.

A partir de las 48 horas, se observan en las imágenes un mayor número de células desprendidas de la superficie (zonas oscuras), lo que cual puede atribuirse al proceso normal de proliferación celular en donde empiezan ya a competir por el medio de cultivo, además de que ya no existe tanto espacio para crecer.

En el caso de las células tratadas con la emulsión de extracto con CHB, se determinó que solamente el tratamiento que contenía 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto y la alantoína fueron estadísticamente diferente ($p \leq 0.05$) al control negativo a las 24, 48 y 72 h (Figura 30). A 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto se produjo un cierre de herida de 41.03%, 62.60% y 83.82% a 24, 48 y 72 h respectivamente, cuyos valores son mayores a los obtenidos en el control negativo, pero también a los reportados a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

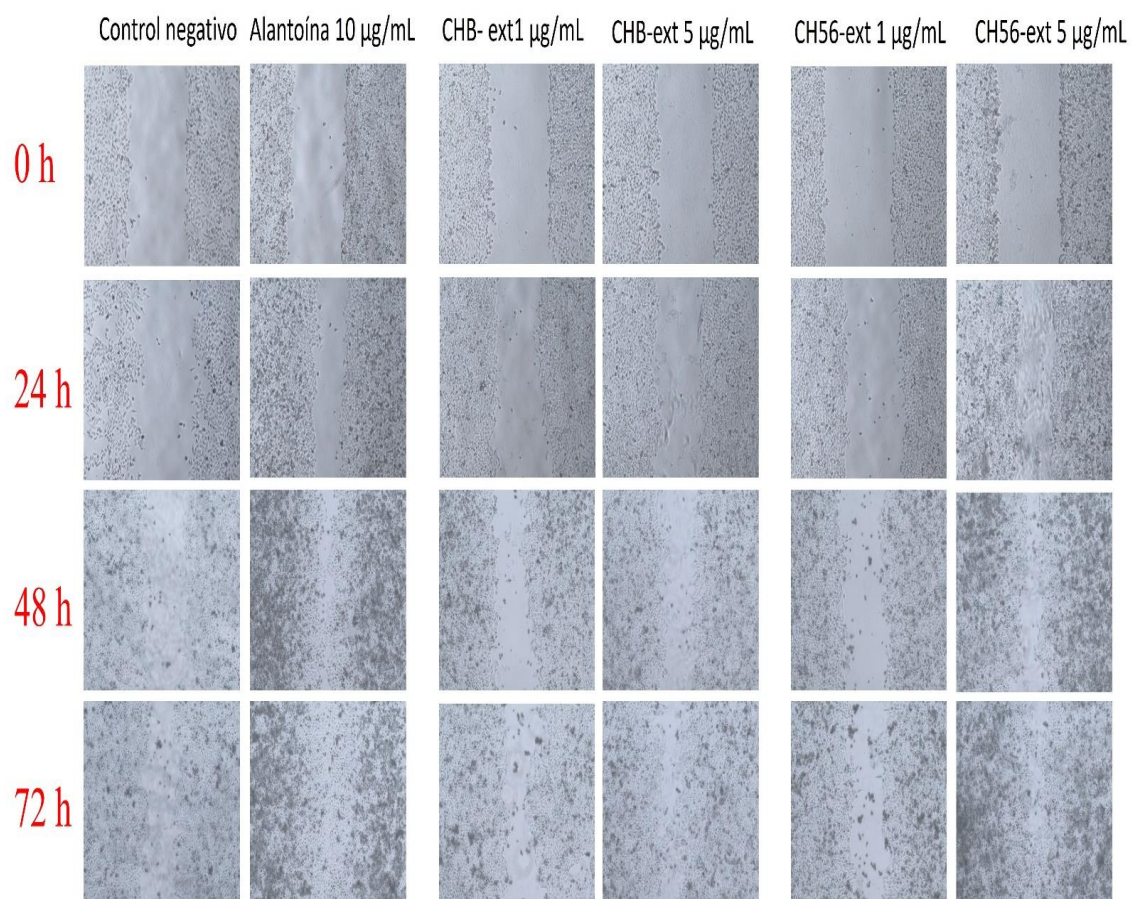


Figura 29. Migración y proliferación de células HeLa a 0, 24, 48 y 72 h después de la aplicación de los tratamientos. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes para cada muestra a 4x.

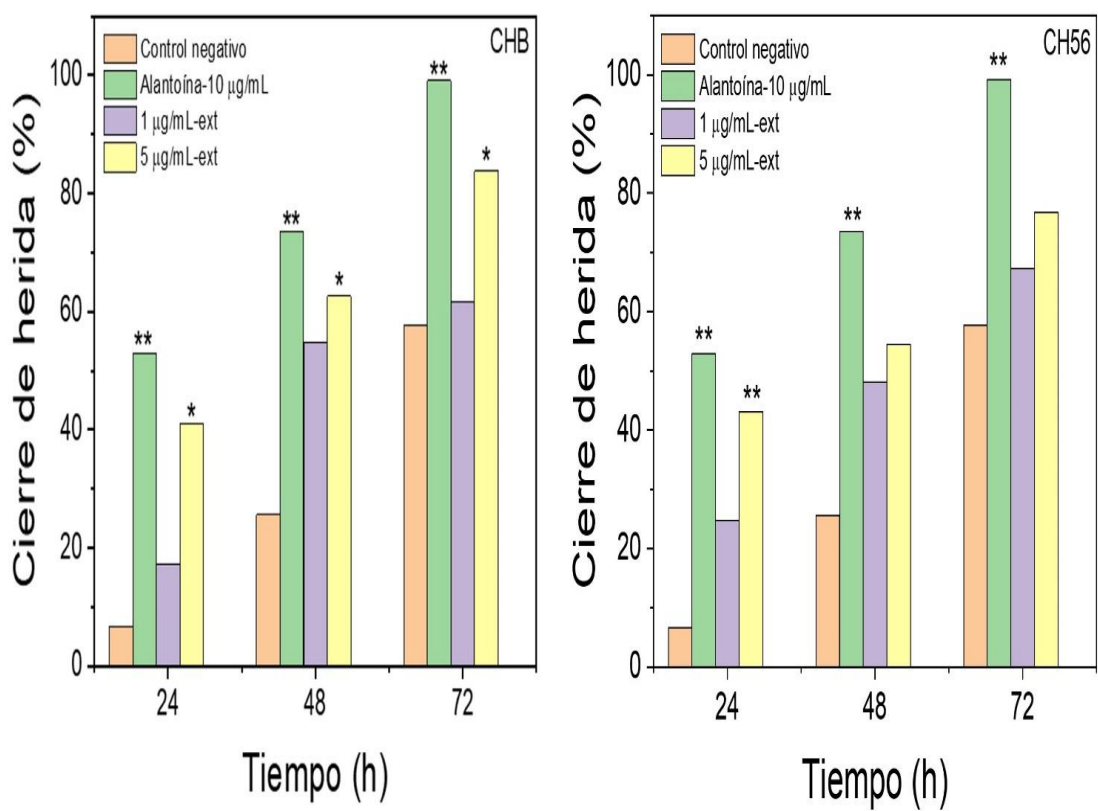


Figura 30. Efecto de las microemulsiones con extracto sobre el cierre del área de la herida a las 24, 48 y 72 horas. Los resultados se expresaron como porcentaje en relación con el área a las 0 h. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs control negativo.

Por otro lado, el tratamiento con 5 $\mu\text{g/mL}$ de extracto y CH56 en conjunto con la alantoína fueron estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$) al compararlas contra el control negativo a las 24 h de tratamiento, con porcentajes de cierre de herida 43.05 y 52.90%, respectivamente. Mientras que, a las 48 y 72 h ninguna concentración de extracto mostró una diferencia estadística contra el control negativo. Por lo que, se deduce que la emulsión con extracto y quitosano CHB presentan una mejor actividad cicatrizante *in vitro*, en este tipo de línea celular.

IX. DISCUSIÓN

El porcentaje de rendimiento de extracción (1.48%) del contenido lipídico de los chapulines (*Brachystola magna*) es menor comparado con el rendimiento de extracción del grillo *Acheta domesticus* y *Tenebrio molitor* reportado por Otero et al., (2020), cuyos valores promedio fueron cerca del 15% y 30%, respectivamente. Dicha diferencia puede atribuirse principalmente al método de extracción utilizado y a los distintos solventes que se emplearon, ya que para la extracción de *Acheta domesticus* y *Tenebrio molitor* se usó la extracción líquida presurizada y la extracción asistida por ultrasonido acompañadas de etanol puro y etanol/agua (1:1, v/v), las cuales son tecnologías novedosas con mayor eficiencia de extracción y costo si se compara con la maceración utilizando acetato de etilo usada en el presente trabajo. Cabe mencionar, que a diferencia de otros insectos los saltamontes y especies afines (Ortóptera) tienen un contenido de lípidos relativamente bajo, que oscila entre 3.8% y 5.3% (Tzompa-Sosa et al., 2014).

En la técnica de GC-MS y GC-FID se detectaron compuestos con actividad biológica con potencial para tratar heridas en la piel, como los esteroides y ácidos grasos, cuyos principales protones presentes en su estructura química también fueron identificados en RMN. El ftalato de dimetilo, se ha reportado como un compuesto antimicrobiano utilizado para tratar la enfermedad cutánea conocida como demodicidosis (Lee, 2000; Yuan et al., 2001). Asimismo, el escualeno se encontró presente en las dos muestras del extracto. Dicho terpenoide es un precursor de esteroides, hormonas y vitaminas (Bhat et al., 2023), además es un compuesto antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio, emulsificante y es un compuesto que contribuye a restablecer el equilibrio natural de la humedad de la piel (Joseph et al., 2022). Como se esperaba, el colesterol también se encontró presente, ya que forma parte de la

estructura de la membrana celular animal (Felix-Sagaste et al., 2023). En el caso de los insectos actúa como precursor de las hormonas de la muda. Dado que no puede ser sintetizado *de novo*, el chapulín lo obtiene a partir de esteroides vegetales ingeridos en la dieta como el campesterol, estigmasterol y sitosterol, lo cual explica la presencia de estos en el extracto (Tada et al., 2022).

Los ácidos grasos linoleico (15.92%) y linolénico (28.23%) fueron los predominantes en el perfil lipídico, lo cual coincide con un trabajo realizado por Paul et al., (2017) en donde se reportó al ácido linolénico como el ácido graso con mayor concentración en el extracto de saltamontes *Chorthippus parallelus* con el 38% aproximadamente. Mientras que para el extracto de grillos *Conocephalus discolor* y *Acheta domesticus* el ácido graso más predominante fue el ácido linoleico con una concentración de 52% y 41%, respectivamente (Paul et al., 2017). Por lo que, aparentemente este tipo de ácidos grasos insaturados prevalecen en mayor concentración en los ortópteros, pero su concentración puede variar en función del tipo de especie, el sexo, la etapa de reproducción, la etapa de desarrollo, la temperatura de vida, la estación, el origen geográfico y la alimentación (Kolobe et al., 2023b). Actualmente, se considera que la acción farmacológica de los ácidos grasos en la reparación de heridas implica cambios en la expresión de genes relacionados con la migración celular, la respuesta inflamatoria y la respuesta inmune a microorganismos patógenos (Broughton et al., 2006; Simopoulos, 2003). Además, han demostrado favorecer la cicatrización en heridas superficiales, en heridas inducidas quirúrgicamente y las derivadas por complicación de diabetes en modelos murinos (Ili & Sari, 2023; Ribeiro Barros Cardoso et al., 2004; Zimmer et al., 2006).

Por otra parte, los tiempos de flujo de los biopolímeros en viscosimetría estuvieron en función de su viscosidad en solución. Los polímeros que tenían un mayor tamaño y peso, como el quitosano CHM y alginato de sodio al ser más viscosos fluyeron más lento que los otros polímeros y por lo tanto sus rectas en la gráfica tuvieron una mayor pendiente. A su vez, todos los quitosanos presentaron valores de potencial zeta mayores a +40 mV a un pH de 4 los que los hace coloidalmente estables y apropiados para la formación de microemulsiones.

Las emulsiones elaboradas con CHM, al poseer un mayor peso molecular evidentemente tuvieron una mayor viscosidad que las otras emulsiones, lo que dificultó su filtración y agitación en vórtex. Sin embargo, el peso de los quitosanos y la cantidad de extracto no influyó dramáticamente en el tamaño de la media de las partículas a través del tiempo. Pero, la cantidad de extracto si influyó en la estabilidad de las formulaciones y en el número de partículas formadas, debido a que, con una mayor cantidad de este, existe mayor material para encapsularse. Asimismo, las emulsiones 1:10 utilizando CH56 y CHM se mantuvieron estables hasta las 168 horas y para CHB 1:10 solo se mostró una diferencia significativa de 1-24 h. Lo cual explica, que esa cantidad de extracto es suficiente para mantener una buena interacción electrostática con los quitosanos y proporcionar una formulación estable. Se conoce que, la estructura química, como la longitud de la cadena de los ácidos grasos, el número de insaturaciones y la configuración de la molécula, también tienen efecto en la estabilidad de la emulsión (Tabatabaei et al., 2022; Ushikubo & Cunha, 2014) y en este caso el extracto contiene gran variedad de ácidos grasos saturados e insaturados que pueden interactuar y encapsularse fácilmente con los distintos quitosanos.

En lo que corresponde a la turbidez, esta es un indicativo de estabilidad, puesto que está en función de la concentración y el tamaño de las partículas (Alade et al., 2021). A mayor

cantidad de extracto o polímero en las emulsiones mayor fue la turbidez, porque existió un mayor número de partículas en suspensión. El efecto de la disminución en los valores de turbidez con el paso del tiempo en las emulsiones con distintas relaciones extracto-polímero y distintas concentraciones de quitosano se puede atribuir principalmente a que una parte de las partículas subieron a la superficie por efecto de inestabilidad. Y en el caso, del ligero aumento de turbidez a las 24 h de la emulsión CH56 1:5 ocurrió un aumento en el tamaño de las partículas como se muestra en el Cuadro 3. Sin embargo, los valores son cercanos por lo que se infiere que las emulsiones permanecieron estables hasta una semana considerando este parámetro.

Con respecto a la variación en la concentración de quitosano, se determinó que esta no influye directamente en el tamaño de partícula de las emulsiones, pero sí tiene un efecto sobre la estabilidad de estas, ya que las emulsiones con una mayor concentración de quitosano (CHB y CHM) se mantuvieron estables hasta las 168 h. Lo cual concuerda con un estudio realizado por Calero et al., (2013), en donde se evaluó el efecto de la concentración de quitosano en la estabilidad de emulsiones O/W y se concluyó que las emulsiones que contenían concentraciones más bajas de quitosano eran más inestables que las emulsiones con concentraciones altas de polímero, ya que con concentraciones cada vez mayores de este polisacárido se forma una red de hebras finas, lo que mejora la estabilidad física de las emulsiones al retrasar la aparición de una floculación significativa de las gotas de aceite y, como consecuencia, de la formación de crema. Sin embargo, en el presente trabajo se encontró que a una concentración de polímero de 10 mg/mL en el caso de CH56 y CHM también fue posible estabilizar las partículas hasta la semana, y utilizando 10 mg/mL de CHB solo se mostró una diferencia estadísticamente significativa en los tiempos de 1-24 h, con

características físicas viables para ser cargadas a los geles de alginato y para ser utilizadas en las pruebas biológicas. La concentración de los quitosanos también está directamente relacionada con el número de partículas formadas (Figura 21). Lo cual tiene sentido, ya que a mayor concentración de quitosano existe una mayor disponibilidad de material base para la encapsulación del extracto. A su vez, las emulsiones con mayor concentración de polímero presentaron una mayor viscosidad, lo cual fue previamente reportado por Hou et al., (2012), en donde las emulsiones a base de quitosano y β -caroteno mostraron un comportamiento fluido casi newtoniano, y tanto la viscosidad como el índice de consistencia incrementaron con el aumento de la concentración de quitosano.

No obstante, el quitosano CHB que posee un grado DDA menor (75-85%) en comparación con CH56 (DDA >90%), produjo un tamaño medio de partícula más pequeño obtenido por DLS (1.28 μm) y microscopía (1.29 μm), con un valor de potencial zeta (ζ) mayor (+40.2 mV) (Cuadro 5). Lo cual es conveniente para la estabilidad de la emulsión ya que al ser un valor extremadamente positivo causa una fuerza repulsiva mayor que evita la agregación de las partículas y, en consecuencia, garantiza una fácil redispersión (Gupta & Trivedi, 2018), además los valores de potencial zeta (ζ) de las emulsiones ($+40.4 \pm 2$ mV y $+36.5 \pm 3$ mV) son semejantes a los reportados para los polímeros de manera individual, los cuales poseen alta densidad de grupos catiónicos. De manera similar, en un trabajo de Yang et al., (2023) se reportaron valores de potencial zeta positivos (ζ) mayores a +30 mV para nanopartículas de quitosano cargadas con extracto de planta con potencial cicatrizante. Por otra parte, se permitió validar la técnica de microscopía y análisis digital de imágenes para la obtención del tamaño de partícula en microemulsiones, que es una técnica mucho más económica de realizar que DLS.

En la literatura, ya se había informado previamente que el potencial zeta (ζ) y el diámetro medio de las partículas de emulsiones O/W estabilizadas por membranas de surfactante-quitosano no están fuertemente influenciadas por el peso molecular del quitosano, sin embargo, el quitosano con el DDA más bajo (40%) es capaz de formar partículas con diámetros medios más pequeños, en comparación con quitosanos con grados de DDA de 77 y 92% respectivamente (Mun et al., 2006).

Por otra parte, los geles fueron cargados con la misma cantidad de emulsión, para poder analizar el efecto de la variación de la concentración de alginato en el proceso de gelificación. Se observó que la formulación que contenía 3 mg/mL de alginato de sodio cargado con emulsión a base de CH56, no logró formar puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas lo suficientemente fuertes como para generar una red tridimensional reticulada, lo que provocó la precipitación de esta.

Asimismo, los geles que contenían una menor concentración de alginato tenían una turbidez mayor comparada con las otras concentraciones de biopolímero. Lo anterior, se puede deber a la formación de complejos electrostáticos o aglomeraciones lo suficientemente grandes como para dispersar la luz con fuerza (Zhang et al., 2016). De igual manera, los geles de 3 mg/mL tuvieron una consistencia y capacidad de estiramiento menor, lo cual tiene sentido ya que las interacciones entrecruzadas entre las cadenas poliméricas y los iones Ca^{2+} , así como la resistencia de la estructura del gel, aumentan al incrementar la concentración de alginato (Savić Gajić et al., 2023). Además, los geles cargados con emulsiones a base de CHM presentaron una mayor resistencia como se esperaba, ya que dicho polímero es más viscoso que los otros y posiblemente permitió formar enlaces de hidrogeno mucho más fuertes que los otros quitosanos.

De manera general, todos los geles mantuvieron un comportamiento semejante en la prueba de pérdida de peso, sin importar la emulsión con la que fueron cargados o la concentración de alginato de sodio, debido a que todos tenían la misma cantidad de agua y compuestos de la formulación. A la tercera hora, los pesos se mantuvieron constantes en la gráfica con pérdidas mínimas de agua. Sobre todo, los geles con 7 mg/mL de alginato se podrían utilizar fácilmente como formulación tópica debido a sus características físicas, además de que demostraron proteger el extracto ante una eventual degradación y dispersar homogéneamente las partículas en la red reticulada.

En el estudio *in silico*, cuanto más negativa sea la puntuación de unión en un resultado de acoplamiento molecular, mejor será la afinidad de unión del compuesto a la proteína diana (H. Li et al., 2023). Con base a esto, se determinó que el ácido graso más predominante en el extracto (linolénico) fue quien presentó la mejor interacción con la proteína relacionada con la cicatrización FFAR1 (-5.4 kcal/mol), proporcionando un posible mecanismo mediante el cual este tipo de ácidos grasos insaturados puede acelerar o favorecer la cicatrización. Previamente, ya se había reportado que el ácido linoleico (el segundo ácido graso más predominante en el extracto) al actuar como ligando natural de FFAR1, es capaz de promover un aumento en la migración de queratinocitos humanos (HaCaT) a través de la activación de las vías de señalización intracelular ERK1/2 y p38, las cuales están involucradas en diversas funciones celulares, como la migración y la proliferación celular (Manosalva et al., 2020). Además, ese tipo de ácidos grasos pueden producir un aumento de la actividad de la metaloproteinasa de la matriz celular (MMP-9), la cual es uno de los componentes esenciales en la migración de los queratinocitos (Jiang et al., 2014) y aumentar la expresión de IL-8 lo que puede contribuir al incremento de la quimiotaxis de los neutrófilos, favoreciendo la migración de estos durante la

fase inflamatoria (Manosalva et al., 2020). Sin dejar de lado, que el ácido linolénico también demostró tener una energía de afinidad bastante apropiada con la proteína colágeno la cual participa en la formación de la MEC permanente para la formación de la cicatriz (-3.6 kcal/mol), lo cual posiblemente permita potenciar el efecto de curación de heridas cutáneas.

En el ensayo *in vitro*, la emulsión a base de CHB demostró tener un mejor efecto cicatrizante que la emulsión a base de CH56, posiblemente por tener una mayor biocompatibilidad con las células y un menor tamaño de partícula. Solo se necesitó tomar una cantidad de la emulsión (CHB) que presentara una concentración de extracto a 5 µg/mL para lograr un efecto positivo en el cierre de la “herida”. Lo cual indica, que esa concentración de extracto en conjunto con CHB produce un efecto similar a la alantoína, inclusive, cuando esta se encuentra al doble de la concentración que el extracto (10 µg/mL). En otras investigaciones en donde utilizan extractos de plantas con potencial actividad cicatrizante directamente sobre las líneas celulares, se necesita una mayor concentración de extracto para lograr un efecto significativo. Por ejemplo, en un trabajo de Kamarazaman et al., (2022), se necesitaron concentraciones de 25 y 20 µg/mL de extracto de planta *Baekkea frutescens* para lograr una diferencia estadísticamente significativa contra el control negativo a las 6 horas en células HaCaT. Mientras que, a las 24 h todas las concentraciones lograron tener un efecto positivo, incluyendo la menor concentración probada que fue de 5 µg/mL. En el caso de los fibroblastos solo la concentración de 10 µg/mL logró un efecto significativo a las 24 horas, comparada con las otras concentraciones de 5, 2.5 y 1.25 µg/mL.

Sin embargo, en un trabajo reciente en donde se encapsuló un extracto de planta (*Hypericum linarioides*) con potencial cicatrizante en una nanoemulsión a base de ácido oleico y surfactantes, se concluyó que el tratamiento con emulsión que contenía 0.4 µg/mL de extracto

indujo significativamente la migración de fibroblastos de manera *in vitro*, lo que resultó en un cierre sustancial de la herida a las 24 y 30 h con un porcentaje de cierre de 80.30 ± 3.19 (Kaplan et al., 2024).

Debido a lo anterior, es posible deducir que la cantidad de extracto que se necesita para lograr un efecto favorable en la cicatrización de heridas es menor, si se utiliza encapsulado en una formulación en donde se encuentra en sinergia con otros polímeros biocompatibles, que garantizan su protección y dispersión. Además, la concentración óptima de un extracto en la reparación de heridas depende de varios factores, entre ellos, el origen del extracto y el tipo de compuestos que lo constituyen. Sin dejar de lado, que existen diferencias en la tasa de proliferación de los distintos tipos celulares, por lo que los tiempos necesarios para la reparación de la herida también pueden variar. Por lo menos, en lo que respecta al presente trabajo el extracto lipofílico de chapulín encapsulado a $5 \mu\text{g/mL}$ en una microemulsión con CHB parece ser prometedor para mejorar el proceso de cicatrización en células HeLa a partir de las primeras 24 horas de tratamiento.

X. CONCLUSIONES

1. El extracto de chapulín contiene compuestos con actividad biológica con potencial para ser utilizados para cicatrización de heridas, como lo son el grupo de los esteroides. El perfil lipídico del extracto demostró que el extracto contiene 7 ácidos grasos saturados y 5 ácidos grasos insaturados. El ácido graso que se encuentra en una mayor concentración es el ácido linolénico, seguido del ácido linoleico.
2. Los quitosanos utilizados cuentan con valores de potencial zeta (ζ) mayores a +40 mV, lo que los hace apropiados para estabilizar las emulsiones. El quitosano CHM presentó el mayor peso molecular (230203.20 g/mol), mientras que el quitosano CH56 mostró el menor peso (50688.29 g/mol).
3. El peso molecular del polímero no influyó en el tamaño de partícula ni en la estabilidad de las emulsiones. Por otro lado, las concentraciones de quitosano y extracto influyeron directamente en la estabilidad de la emulsión, en el número de partículas formadas y la turbidez de la emulsión. Las emulsiones más concentradas de CHB y CHM, se mantuvieron estables, al igual que las emulsiones con relación extracto-polímero 1:10. Entre mayor cantidad de aceite o mayor concentración de polímero se obtuvo un mayor número de partículas.
4. Las emulsiones que contienen 10 mg/mL de quitosano (extracto-quitosano 1:10) presentaron un tamaño de partícula, estabilidad, concentración de sustancias y viscosidad apropiadas para ser usadas en la formación de hidrogeles y para las pruebas biológicas.

5. La concentración de alginato de sodio influyó en las características físicas de los geles. A mayor concentración del polímero, menor fue la turbidez y mayor fue el desplazamiento máximo hasta la ruptura.
6. La textura, apariencia, turbidez y observación al microscopio de los geles fue similar utilizando 5 y 7 mg/mL de alginato de sodio y 1 mL de microemulsión. Los geles cumplieron con la función de estabilizar las micropartículas distribuidas homogéneamente, y ambos mantuvieron un comportamiento similar en la prueba de pérdida de peso, conservando humectación hasta por 3 horas a 37 °C. Además, la consistencia de dichas formulaciones favorece su aplicación tópica.
7. El acoplamiento molecular entre la proteína relacionada con la cicatrización (FFAR1) y el ácido linolénico (de mayor concentración en el extracto) mostró la mejor interacción con energía de afinidad de -5.4 kcal/mol.
8. En el estudio *in vitro* con células HeLa el tratamiento con la microemulsión a base de CHB y 5 µg/mL de extracto evidenció diferencias significativas contra el control negativo (pozo sin ningún tratamiento). Demostró tener actividad cicatrizante desde las 24 h de tratamiento, con un porcentaje de cierre de herida final de 83.82% a las 72 h.
9. La incorporación de una microemulsión de extracto de chapulín estabilizada con quitosano en un hidrogel de alginato de sodio resultó en un sistema estable que permitió la protección del extracto, así como una distribución homogénea de partículas con actividad cicatrizante.

XI. PERSPECTIVAS

1. Realizar un estudio *in vitro* utilizando otra línea celular que este más relacionada con el proceso de cicatrización, como queratinocitos o fibroblastos.
2. Evaluar el efecto cicatrizante del producto final en un modelo murino.
3. Realizar más pruebas de caracterización y pruebas de estabilidad a la forma farmacéutica final.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. In *Journal of Advanced Research* (Vol. 6, Issue 2, pp. 105–121). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>
- Alasmary, F. A., Awaad, A. S., Alqahtani, S. M., El-Meligy, R. M., Abdullah, D. A., & Alqasoumi, S. I. (2020). Evaluation of the chemical constituents and potential biological activities of *Cunninghamella blakesleeana*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(10), 1197–1202. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.08.009>
- Ao, Z., Yang, Z., Wang, J., Zhang, G., & Ngai, T. (2009). Emulsion-templated liquid core - Polymer shell microcapsule formation. *Langmuir*, 25(5), 2572–2574. <https://doi.org/10.1021/la804036m>
- Arpa, M. D., Çağlar, E. Ş., Güreşçi, D., Sipahi, H., & Üstündağ Okur, N. (2024). Novel Microemulsion Containing Benzocaine and Fusidic Acid Simultaneously: Formulation, Characterization, and In Vitro Evaluation for Wound Healing. *AAPS PharmSciTech*, 25(3), 53. <https://doi.org/10.1208/s12249-024-02762-5>
- Bernewitz, R., Guthausen, G., & Schuchmann, H. P. (2011). NMR on emulsions: Characterisation of liquid dispersed systems. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 49(SUPPL. 1), S93–S104. <https://doi.org/10.1002/mrc.2825>
- Bhat, M. P., Rudrappa, M., Hugar, A., Gunagambhire, P. V., Suresh Kumar, R., Nayaka, S., Almansour, A. I., & Perumal, K. (2023). In-vitro investigation on the biological activities of squalene derived from the soil fungus *Talaromyces pinophilus*. *Heliyon*, 9(11), e21461. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21461>
- Biro, K., Thac, D., Ochsendorf, F. R., Kaufmann, R., & Boehncke, W. (2003). Efficacy of dexpanthenol in skin protection against irritation: a double-blind, placebo-controlled study. *Contact Dermatitis*, 49, 80–84.
- Boateng, J. S., Matthews, K. H., Stevens, H. N. E., & Eccleston, G. M. (2008). Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. In *Journal of Pharmaceutical Sciences* (Vol. 97, Issue 8, pp. 2892–2923). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jps.21210>
- Bohidar, H., Dubin, P., & Osada, Y. (2003). *Polymer Gels: Fundamentals and Applications* (American Chemical Society, Ed.; ilustrada, Vol. 833).
- Broughton, G., Janis, J. E., & Attinger, C. E. (2006). The Basic Science of Wound Healing. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 117(SUPPLEMENT), 12S-34S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2>
- Buszewska-Forajta, M., Siluk, D., Dagher-Wojtkowiak, E., Sejda, A., Staškowiak, D., Biernat, W., & Kaliszan, R. (2015). Studies of the effect of grasshopper abdominal secretion on wound healing with the use of murine model. *Journal of Ethnopharmacology*, 176, 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.004>

- Buszewska-Forajta, M., Siluk, D., Struck-Lewicka, W., Raczak-Gutknecht, J., Markuszewski, M. J., & Kaliszczan, R. (2014). Identification of lipid fraction constituents from grasshopper (*Chorthippus* spp.) abdominal secretion with potential activity in wound healing with the use of GC-MS/MS technique. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *89*, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.10.012>
- Calero, N., Muñoz, J., Cox, P. W., Heuer, A., & Guerrero, A. (2013). Influence of chitosan concentration on the stability, microstructure and rheological properties of O/W emulsions formulated with high-oleic sunflower oil and potato protein. *Food Hydrocolloids*, *30*(1), 152–162. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.05.004>
- Chaudhary, T., Karthick, T., Chaudhary, M. K., Tandon, P., & Joshi, B. D. (2023). Computational evaluation on molecular stability and binding affinity of methyl dopa against Lysine-specific demethylase 4D Enzyme through quantum chemical computations and molecular docking analysis. *Journal of Molecular Structure*, *1286*. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2023.135518>
- Chen, X., Feng, Y., & Chen, Z. (2009). Common edible insects and their utilization in China. *Entomological Research*, *39*(5), 299–303. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2009.00237.x>
- Dantas, T. N. C., Santanna, V. C., Souza, T. T. C., Lucas, C. R. S., Dantas Neto, A. A., & Aum, P. T. P. (2019). MICROEMULSIONS AND NANOEMULSIONS APPLIED TO WELL STIMULATION AND ENHANCED OIL RECOVERY (EOR). *Brazilian Journal of Petroleum and Gas*, *12*(4), 251–265. <https://doi.org/10.5419/bjpg2018-0023>
- Darwish, R. S., Shawky, E., Nassar, K. M., Rashad ElSayed, R. M., Hussein, D. E., Ghareeb, D. A., & El Sohafy, S. M. (2021). Differential anti-inflammatory biomarkers of the desert truffles *Terfezia clavaryi* and *Tirmania nivea* revealed via UPLC-QqQ-MS-based metabolomics combined to chemometrics. *LWT*, *150*, 111965. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111965>
- Dev, S., Hassan, K., Claes, J., Mozahid, M. N., Khatun, H., & Mondal, M. F. (2020). Practices of entomophagy and entomotherapy in Bangladesh. *Journal of Insects as Food and Feed*, *6*(5), 515–524. <https://doi.org/10.3920/JIFF2020.0038>
- Draget, K. I., Stokke, B. T., Yuguchi, Y., Urakawa, H., & Kajiwara, K. (2003). Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of alginate gels. 3. Alginic acid gels. *Biomacromolecules*, *4*(6), 1661–1668. <https://doi.org/10.1021/bm034105g>
- Duarte, J., Mascarenhas-Melo, F., Pires, P. C., Veiga, F., & Paiva-Santos, A. C. (2024). Multifunctional hydrogels-based therapies for chronic diabetic wound healing. *European Polymer Journal*, *211*, 113026. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2024.113026>
- Ehterami, A., Salehi, M., Farzamfar, S., Samadian, H., Vaez, A., Ghorbani, S., Ai, J., & Sahraeyma, H. (2019). Chitosan/alginate hydrogels containing Alpha-tocopherol

- for wound healing in rat model. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.032>
- Elisabeth Schröder, L., Gert Müller, M., & Karl-Friedrich, M. (1989). *Polymer characterization* (De Gruyter, Ed.; 1era ed.).
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - A review. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 21, Issue 10, pp. 510–523). <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>
- Felix-Sagaste, K. G., García-Armenta, E., Freyre-Fonseca, V., Bastidas-Bastidas, P., Picos-Corrales, L. A., Cruz-Carrillo, M. A., & Amador-Espejo, G. G. (2023). Identification of compounds present in lipophilic extracts from *Brachystola magna* (Girard): substances with potential healing properties. *Natural Product Research*, 1–5. <https://doi.org/10.1080/14786419.2023.2180637>
- Galdiero, E., Ricciardelli, A., D'Angelo, C., de Alteriis, E., Maione, A., Albarano, L., Casillo, A., Corsaro, M. M., Tutino, M. L., & Parrilli, E. (2021). Pentadecanoic acid against *Candida albicans*-*Klebsiella pneumoniae* biofilm: towards the development of an anti-biofilm coating to prevent polymicrobial infections. *Research in Microbiology*, 172(7–8), 103880. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2021.103880>
- Gang, R., Okello, D., & Kang, Y. (2024). Medicinal plants used for cutaneous wound healing in Uganda; ethnomedicinal reports and pharmacological evidences. *Heliyon*, 10(9), e29717. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29717>
- García-Armenta, E., & Gutiérrez-López, G. F. (2022). Fractal Microstructure of Foods. *Food Engineering Reviews*, 14(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s12393-021-09302-y>
- Gauglitz, G. G., Korting, H. C., Pavicic, T., Ruzicka, T., & Jeschke, M. G. (2011). Hypertrophic scarring and keloids: Pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Molecular Medicine*, 17(1–2), 113–125. <https://doi.org/10.2119/molmed.2009.00153>
- Goebel, A. S. B., Knie, U., Abels, C., Wohlrab, J., & Neubert, R. H. H. (2010). Dermal targeting using colloidal carrier systems with linoleic acid. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(2), 162–172. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.02.001>
- Gong, C., Wu, Q., Wang, Y., Zhang, D., Luo, F., Zhao, X., Wei, Y., & Qian, Z. (2013). A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing. *Biomaterials*, 34(27), 6377–6387. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.05.005>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., & Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. In *Journal of Investigative Dermatology* (Vol. 137, Issue 2, pp. e11–e16). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>

- Guo, Y., Qiao, D., Zhao, S., Liu, P., Xie, F., & Zhang, B. (2024). Biofunctional chitosan–biopolymer composites for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, *159*, 100775. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2024.100775>
- Gushiken, L. F. S., Beserra, F. P., Bastos, J. K., Jackson, C. J., & Pellizzon, C. H. (2021). Cutaneous Wound Healing: An Update from Physiopathology to Current Therapies. *Life*, *11*(7), 665. <https://doi.org/10.3390/life11070665>
- Hadj Saadoun, J., Sogari, G., Bernini, V., Camorali, C., Rossi, F., Neviani, E., & Lazzi, C. (2022). A critical review of intrinsic and extrinsic antimicrobial properties of insects. *Trends in Food Science & Technology*, *122*, 40–48. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.02.018>
- Haki, M., Shamloo, A., Eslami, S.-S., Mir-Mohammad-Sadeghi, F., Maleki, S., & Hajizadeh, A. (2023). Fabrication and characterization of an antibacterial chitosan-coated allantoin-loaded NaCMC/SA skin scaffold for wound healing applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, *253*, 127051. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127051>
- Hart, P., Brand, C., Carson, C., Riley, T., Prager, R., & Finlay-Jones, J. (2000). Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. *Inflammation Research*, *49*, 619–626.
- Hou, Z., Zhang, M., Liu, B., Yan, Q., Yuan, F., Xu, D., & Gao, Y. (2012). Effect of chitosan molecular weight on the stability and rheological properties of β -carotene emulsions stabilized by soybean soluble polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, *26*(1), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.05.013>
- Huang, Y.-Z., Gou, M., Da, L.-C., Zhang, W.-Q., & Xie, H.-Q. (2020). Mesenchymal Stem Cells for Chronic Wound Healing: Current Status of Preclinical and Clinical Studies. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, *26*(6), 555–570. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2019.0351>
- Hudspith, J., & Rayatt, S. (2004). ABC of burns First aid and treatment of minor burns. *BMJ*, *328*, 1487–1489.
- Ili, P., & Sari, F. (2023). Egg yolk oil accelerates wound healing in streptozotocin induced diabetic rats. *Biotechnic & Histochemistry*, *98*(2), 94–111. <https://doi.org/10.1080/10520295.2022.2115554>
- James G. R., & Grant H. J. (1959). A Review of the Romaleinae (Orthoptera; Acrididae) Found in America North of Mexico. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, *111*, 109–271.
- Jarić, S., Kostić, O., Mataruga, Z., Pavlović, D., Pavlović, M., Mitrović, M., & Pavlović, P. (2018). Traditional wound-healing plants used in the Balkan region (Southeast Europe). *Journal of Ethnopharmacology*, *211*, 311–328. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.09.018>

- Jiang, X., Teng, M., Guo, X., Zhang, D., Zhang, Q., Zhang, J., & Huang, Y. (2014). Switch from $\alpha v\beta 5$ to $\alpha v\beta 6$ integrin is required for CD9-regulated keratinocyte migration and MMP-9 activation. *FEBS Letters*, 588(21), 4044–4052. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.09.027>
- Josef, E., Zilberman, M., & Bianco-Peled, H. (2010). Composite alginate hydrogels: An innovative approach for the controlled release of hydrophobic drugs. *Acta Biomaterialia*, 6(12), 4642–4649. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.06.032>
- Joseph, R., Saminathan, K., Deepthi, M. P., & Kathireswari, P. (2022). Comparative analysis on bioactive compounds presents in dung material of *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Materials Today: Proceedings*, 48, 181–185. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.457>
- Jumaa, M., Furkert, F. H., & Müller, B. W. (2022). A new lipid emulsion formulation with high antimicrobial efficacy using chitosan q. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 53, 115–123. www.elsevier.com/locate/ejphabio
- Kamarazaman, I. S., Mohamad Ali, N. A., Abdullah, F., Che Saad, N., Ali, A. A., Ramli, S., Rojsitthisak, P., & Halim, H. (2022). In vitro wound healing evaluation, antioxidant and chemical profiling of *Baekkea frutescens* leaves ethanolic extract. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(6), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103871>
- Kaplan, A. B. U., Yesilyurt, F., Guven, L., Cetin, M., Lacin, B. B., Ozkaraca, M., Yilmaz, M. A., Hacimuftuoglu, A., & Kaya, Y. (2024). Development and in vitro characterization nanoemulsion containing the methanol extract of *Hypericum linarioides* for wound healing: In vitro scratch assay. *South African Journal of Botany*, 168, 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2024.03.026>
- Karppinen, S.-M., Heljasvaara, R., Gullberg, D., Tasanen, K., & Pihlajaniemi, T. (2019). Toward understanding scarless skin wound healing and pathological scarring. *F1000Research*, 8, 787. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18293.1>
- Kathiresan, K. (2020). Bioprospecting potential of mangrove resources. In *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources* (pp. 225–241). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819532-1.00008-1>
- Khokhra, S., & Anupama, D. (2011). Microemulsion Based Transdermal Drug Delivery of Tea Tree Oil. *International Journal of Drug Development & Research*, 3(1), 191–198. <http://www.ijddr.in>
- Klinkesorn, U. (2013). The Role of Chitosan in Emulsion Formation and Stabilization. *Food Reviews International*, 29(4), 371–393. <https://doi.org/10.1080/87559129.2013.818013>
- Kolobe, S. D., Manyelo, T. G., Malematja, E., Sebola, N. A., & Mabelebele, M. (2023a). Fats and major fatty acids present in edible insects utilised as food and livestock feed. *Veterinary and Animal Science*, 22, 100312. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100312>

- Kolobe, S. D., Manyelo, T. G., Malematja, E., Sebola, N. A., & Mabelebele, M. (2023b). Fats and major fatty acids present in edible insects utilised as food and livestock feed. *Veterinary and Animal Science*, 22, 100312. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100312>
- Kumar, M., Mahmood, S., Chopra, S., & Bhatia, A. (2024). Biopolymer based nanoparticles and their therapeutic potential in wound healing – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 131335. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.131335>
- Kumar, M. N. V. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1–27. www.elsevier.com/locate/react
- Larouche, J., Sheoran, S., Maruyama, K., & Martino, M. M. (2018). Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Advances in Wound Care*, 7(7), 209–231. <https://doi.org/10.1089/wound.2017.0761>
- Laseca-Arranz, A., Sánchez-Dengra, B., Bermejo-Sanz, M., González- Álvarez, O., & González-Álvarez, M. (2021). Formulaciones para la cicatrización de heridas, presente y futuro Formulations for wound healing: present and future. *Revista Española de Ciencias Farmacéuticas*, 2(1), 1–12.
- Li, H., Komori, A., Li, M., Chen, X., Yang, A. W. H., Sun, X., Liu, Y., Hung, A., Zhao, X., & Zhou, L. (2023). Multi-ligand molecular docking, simulation, free energy calculations and wavelet analysis of the synergistic effects between natural compounds baicalein and cubebin for the inhibition of the main protease of SARS-CoV-2. *Journal of Molecular Liquids*, 374, 121253. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.121253>
- Li, Z., Ming, T., Wang, J., & Ngai, T. (2009). High internal phase emulsions stabilized solely by microgel particles. *Angewandte Chemie - International Edition*, 48(45), 8490–8493. <https://doi.org/10.1002/anie.200902103>
- Lomova, M. V., Sukhorukov, G. B., & Antipina, M. N. (2010). Antioxidant coating of micronsize droplets for prevention of lipid peroxidation in oil-in-water emulsion. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2(12), 3669–3676. <https://doi.org/10.1021/am100818j>
- Manosalva, C., Alarcón, P., González, K., Soto, J., Igor, K., Peña, F., Medina, G., Burgos, R. A., & Hidalgo, M. A. (2020). Free Fatty Acid Receptor 1 Signaling Contributes to Migration, MMP-9 Activity, and Expression of IL-8 Induced by Linoleic Acid in HaCaT Cells. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00595>
- Marei, N. H., El-Mazny, W., El-Shaer, A., Zaki, K. D., Hussein, Z. S., & Abd-El-Samie, E. M. (2017). Enhanced wound healing activity of desert locust (*Schistocerca gregaria*) vs. shrimp (*Penaeus monodon*) chitosan based scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 97, 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.01.009>

- Martins, V. L., Caley, M., & O'Toole, E. A. (2013). Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and Tissue Research*, 351(2), 255–268. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1410-z>
- Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., Zanetti, F., & Paoletti, S. (1991). Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. *Carbohydrate Polymers*, 15(2), 171–193. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(91\)90031-7](https://doi.org/10.1016/0144-8617(91)90031-7)
- McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 47, Issue 7, pp. 611–649). <https://doi.org/10.1080/10408390701289292>
- Mirhosseini, H., Tan, C. P., Hamid, N. S. A., & Yusof, S. (2008). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315(1–3), 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.07.007>
- Mun, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2006). Effect of molecular weight and degree of deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by surfactant–chitosan membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 296(2), 581–590. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2005.09.023>
- Murugu, D. K., Onyango, A. N., Ndiritu, A. K., Nyangena, D. N., Osuga, I. M., Cheseto, X., Subramanian, S., Ekesi, S., & Tanga, C. M. (2024). Physicochemical properties of edible cricket oils: Implications for use in pharmaceutical and food industries. *Future Foods*, 9, 100316. <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100316>
- Ogawa, S., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2003). Influence of environmental conditions on the stability of oil in water emulsions containing droplets stabilized by lecithin-chitosan membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(18), 5522–5527. <https://doi.org/10.1021/jf026103d>
- Okur, M. E., Ayla, Ş., Yozgatlı, V., Aksu, N. B., Yoltaş, A., Orak, D., Sipahi, H., & Üstündağ Okur, N. (2020). Evaluation of burn wound healing activity of novel fusidic acid loaded microemulsion based gel in male Wistar albino rats. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(3), 338–348. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2020.01.015>
- Otero, P., Gutierrez-Docio, A., Navarro del Hierro, J., Reglero, G., & Martin, D. (2020). Extracts from the edible insects *Acheta domestica* and *Tenebrio molitor* with improved fatty acid profile due to ultrasound assisted or pressurized liquid extraction. *Food Chemistry*, 314, 126200. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126200>
- Pađen, L., Gschwind, G., Vettorazzi, R., & Probst, S. (2024). Facilitators and barriers for nurses when educating people with chronic wounds – A qualitative interview study. *Journal of Tissue Viability*. <https://doi.org/10.1016/j.jtv.2024.04.002>

- Paul, A., Frederich, M., Megido, R. C., Alabi, T., Malik, P., Uyttenbroeck, R., Francis, F., Blecker, C., Haubruge, E., Lognay, G., & Danthine, S. (2017). Insect fatty acids: A comparison of lipids from three Orthopterans and *Tenebrio molitor* L. larvae. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(2), 337–340. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.02.001>
- Pereira, L. M., Hatanaka, E., Martins, E. F., Oliveira, F., Liberti, E. A., Farsky, S. H., Curi, R., & Pithon-Curi, T. C. (2008). Effect of oleic and linoleic acids on the inflammatory phase of wound healing in rats. *Cell Biochemistry and Function*, 26(2), 197–204. <https://doi.org/10.1002/cbf.1432>
- Pickering, S. U. (1907). CXCVI. - Emulsions. In *Journal of the Chemical Society, Transactions* (Vol. 91, pp. 2001–2021). <https://doi.org/10.1039/CT9079102001>
- Picos-Corrales, L. A., Garcia-Carrasco, M., Licea-Claverie, A., Chavez-Santoscoy, R. A., & Serna-Saldívar, S. O. (2019). NIPAAm-containing amphiphilic block copolymers with tailored LCST: Aggregation behavior, cytotoxicity and evaluation as carriers of indomethacin, tetracycline and doxorubicin. *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 56(8), 759–772. <https://doi.org/10.1080/10601325.2019.1586440>
- Pieper, B. (2003). Nontraditional wound care: A review of the evidence for the use of sugar, papaya/papain, and fatty acids. *Journal of WOCN*, 30(4), 175–183. <https://doi.org/10.1067/mjw.2003.131>
- Pires, P. C., Damiri, F., Zare, E. N., Hasan, A., Neisiany, R. E., Veiga, F., Makvandi, P., & Paiva-Santos, A. C. (2024). A review on natural biopolymers in external drug delivery systems for wound healing and atopic dermatitis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 263, 130296. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130296>
- Qian, J., Wang, X., Chen, Y., Mo, C., Liang, C., & Guo, H. (2023). The correlation of molecule weight of chitosan oligomers with the corresponding viscosity and antibacterial activity. *Carbohydrate Research*, 530, 108860. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108860>
- Rahim, K., Saleha, S., Zhu, X., Huo, L., Basit, A., & Franco, O. L. (2017). Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microbial Ecology*, 73(3), 710–721. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0867-9>
- Rathod, H., Mehta, D., Author, C., Rathod, H. J., & Mehta, D. P. (2015). A Review on Pharmaceutical Gel. *Nternational Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1(1), 33–47. <https://www.researchgate.net/publication/286451492>
- Rayner, M., Marku, D., Eriksson, M., Sjöö, M., Dejmek, P., & Wahlgren, M. (2014). Biomass-based particles for the formulation of Pickering type emulsions in food and topical applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 458(1), 48–62. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.03.053>
- Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012a). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>

- Reinke, J. M., & Sorg, H. (2012b). Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49(1), 35–43. <https://doi.org/10.1159/000339613>
- Ribeiro Barros Cardoso, C., Aparecida Souza, M., Amália Vieira Ferro, E., Favoreto, S., & Deolina Oliveira Pena, J. (2004). Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 12(2), 235–243. <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2004.012216.x>
- Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, C. A., & Gurtner, G. C. (2019). Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiological Reviews*, 99(1), 665–706. <https://doi.org/10.1152/physrev.00067.2017>
- Roy, S., Chakraborty, T., Begum, J., Hasnain, M. S., & Nayak, A. K. (2022). Chitosan: un biopolímero versátil. In *Chitosan in Biomedical Applications* (pp. 1–11). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821058-1.00005-8>
- Sánchez, P., & Segundo, M. J. (2007). Omega 7 Su papel en el cuidado de la piel y las mucosas. *OFFARM ELSEVIER*, 26, 58–64.
- Savić Gajić, I. M., Savić, I. M., & Svirčev, Z. (2023). Preparation and Characterization of Alginate Hydrogels with High Water-Retaining Capacity. *Polymers*, 15(12), 2592. <https://doi.org/10.3390/polym15122592>
- Seabrooks, L., & Hu, L. (2017). Insects: an underrepresented resource for the discovery of biologically active natural products. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 7(4), 409–426. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2017.05.001>
- Secretaria de Salud. (2007). *Programa Nacional de Salud 2007-2012 Por un México sano: construyendo alianzas para una mejor salud*.
- SENASICA. (2016). *Chapulín plaga endémica*. <https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campanas-fitosanitarias>.
- Shi, T., Zhu, M., Zhou, X., Huo, X., Long, Y., Zeng, X., & Chen, Y. (2019). ¹H NMR combined with PLS for the rapid determination of squalene and sterols in vegetable oils. *Food Chemistry*, 287, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.072>
- Siddiqui, S. A., Li, C., Aidoo, O. F., Fernando, I., Haddad, M. A., Pereira, J. A. M., Blinov, A., Golik, A., & Câmara, J. S. (2023). Unravelling the potential of insects for medicinal purposes – A comprehensive review. *Heliyon*, 9(5), e15938. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e15938>
- Simopoulos, A. P. (2003). Essential fatty acids in health and chronic diseases. *Forum of Nutrition*, 56, 67–70.
- Siudem, P., Zielińska, A., & Paradowska, K. (2022). Application of ¹H NMR in the study of fatty acids composition of vegetable oils. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 212, 114658. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114658>

- Song, E.-H., Shang, J., & Ratner, D. M. (2012). Polysaccharides. In *Polymer Science: A Comprehensive Reference* (pp. 137–155). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53349-4.00246-6>
- Suarez-Arnedo, A., Figueroa, F. T., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., & Muñoz-Camargo, C. (2020). An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLoS ONE*, *15*(7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232565>
- Sun, J. Y., Zhao, X., Illeperuma, W. R. K., Chaudhuri, O., Oh, K. H., Mooney, D. J., Vlassak, J. J., & Suo, Z. (2012). Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature*, *489*(7414), 133–136. <https://doi.org/10.1038/nature11409>
- Sztych, D. (2013). Zastosowanie środków leczniczych pochodzenia zwierzęcego w medycynie ludowej. *Życie Weterynaryjne*, *88*(2), 126–132.
- Tada, H., Kojima, N., Takamura, M., & Kawashiri, M. (2022). *Sitosterolemia* (pp. 145–169). <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2022.06.006>
- Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., & Solans, C. (2004). Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, *108–109*, 303–318. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
- Tomic-Canic, M., Wong, L. L., & Smola, H. (2018). The epithelialisation phase in wound healing: options to enhance wound closure. *Journal of Wound Care*, *27*(10), 646–658. <https://doi.org/10.12968/jowc.2018.27.10.646>
- Tottoli, E. M., Dorati, R., Genta, I., Chiesa, E., Pisani, S., & Conti, B. (2020). Skin Wound Healing Process and New Emerging Technologies for Skin Wound Care and Regeneration. *Pharmaceutics*, *12*(8), 735. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, *31*(2), 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>
- Tsai, R.-Y., Chen, P.-W., Kuo, T.-Y., Lin, C.-M., Wang, D.-M., Hsien, T.-Y., & Hsieh, H.-J. (2014). Chitosan/pectin/gum Arabic polyelectrolyte complex: Process-dependent appearance, microstructure analysis and its application. *Carbohydrate Polymers*, *101*, 752–759. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.008>
- Veith, A. P., Henderson, K., Spencer, A., Sligar, A. D., & Baker, A. B. (2019). Therapeutic strategies for enhancing angiogenesis in wound healing. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *146*, 97–125. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.09.010>
- Vela-Anaya, G., Stegensek-Mejía, E. M., & Leija-Hernández, C. (2018). Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. *Revista de Enfermería Del Instituto Mexicano Del Seguro Social*, *26*(2), 105–114.

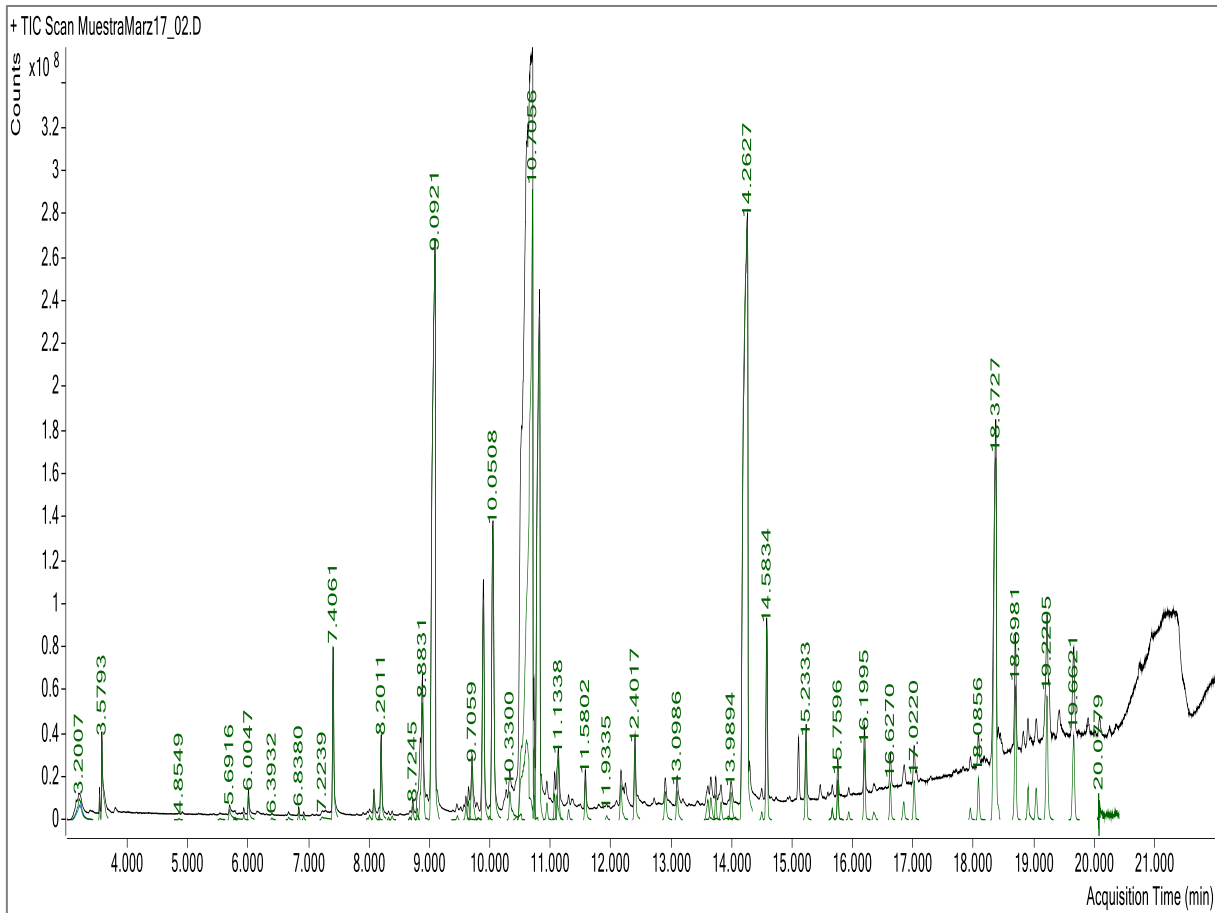
- Voldbich, Z., Tomanek, Z., Vacfk, J., & Kopecek, J. (1975). Long-Term Experience with Poly (glycol Monomethacrylate) Gel in Plastic Operations of the Nose. *Journal of Biomedical Materials Research*, 9, 675–685.
- Wang, P.-H., Huang, B.-S., Horng, H.-C., Yeh, C.-C., & Chen, Y.-J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>
- Wang, W., Lu, K. J., Yu, C. H., Huang, Q. L., & Du, Y. Z. (2019). Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. In *Journal of Nanobiotechnology: Vol. 17:82* (Issue 1, pp. 1–15). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0514-y>
- Wang, X. Y., & Heuzey, M. C. (2016). Chitosan-Based Conventional and Pickering Emulsions with Long-Term Stability. *Langmuir*, 32(4), 929–936. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03556>
- Wichterle, O., & Lím, D. (1960). Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, 185, 117–118.
- William, H., & AOAC Internacional. (2000). *Métodos Oficiales de Análisis de AOAC Internacional* (AOAC Internacional, Ed.; 17th, ilustrada ed., Vol. 1).
- Xu, Z., Dong, M., Yin, S., Dong, J., Zhang, M., Tian, R., Min, W., Zeng, L., Qiao, H., & Chen, J. (2023). Why traditional herbal medicine promotes wound healing: Research from immune response, wound microbiome to controlled delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 195, 114764. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114764>
- Yang, X., Mo, W., Shi, Y., Fang, X., Xu, Y., He, X., & Xu, Y. (2023). Fumaria officinalis-loaded chitosan nanoparticles dispersed in an alginate hydrogel promote diabetic wounds healing by upregulating VEGF, TGF- β , and b-FGF genes: A preclinical investigation. *Heliyon*, 9(7), e17704. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e17704>
- Yoshii, F., Zhanshan, Y., Isobe, K., Shinozaki, K., & Makuuchi, K. (1999). Electron beam crosslinked PEO and PEO/PVA hydrogels for wound dressing. *Radiation Physics and Chemistry*, 55, 133–138.
- Zhang, J., Zhang, S., Liu, C., Lu, Z., Li, M., Hurren, C., & Wang, D. (2024). Photopolymerized multifunctional sodium alginate-based hydrogel for antibacterial and coagulation dressings. *International Journal of Biological Macromolecules*, 260, 129428. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129428>
- Zhang, X., Liu, K., Qin, M., Lan, W., Wang, L., Liang, Z., Li, X., Wei, Y., Hu, Y., Zhao, L., Lian, X., & Huang, D. (2023). Abundant tannic acid modified gelatin/sodium alginate biocomposite hydrogels with high toughness, antifreezing, antioxidant and antibacterial properties. *Carbohydrate Polymers*, 309, 120702. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.120702>
- Zhang, Z., Zhang, R., Zou, L., & McClements, D. J. (2016). Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: Effect of pH on microgel stability, protein retention and

protein release. *Food Hydrocolloids*, 58, 308–315.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.03.015>

Zimmer, M. M., Frank, J., Barker, J. H., & Becker, H. (2006). Effect of extracts from the Chinese and European mole cricket on wound epithelialization and neovascularization: In vivo studies in the hairless mouse ear wound model. *Wound Repair and Regeneration*, 14(2), 142–151. <https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2006.00104.x>

XIII. ANEXOS

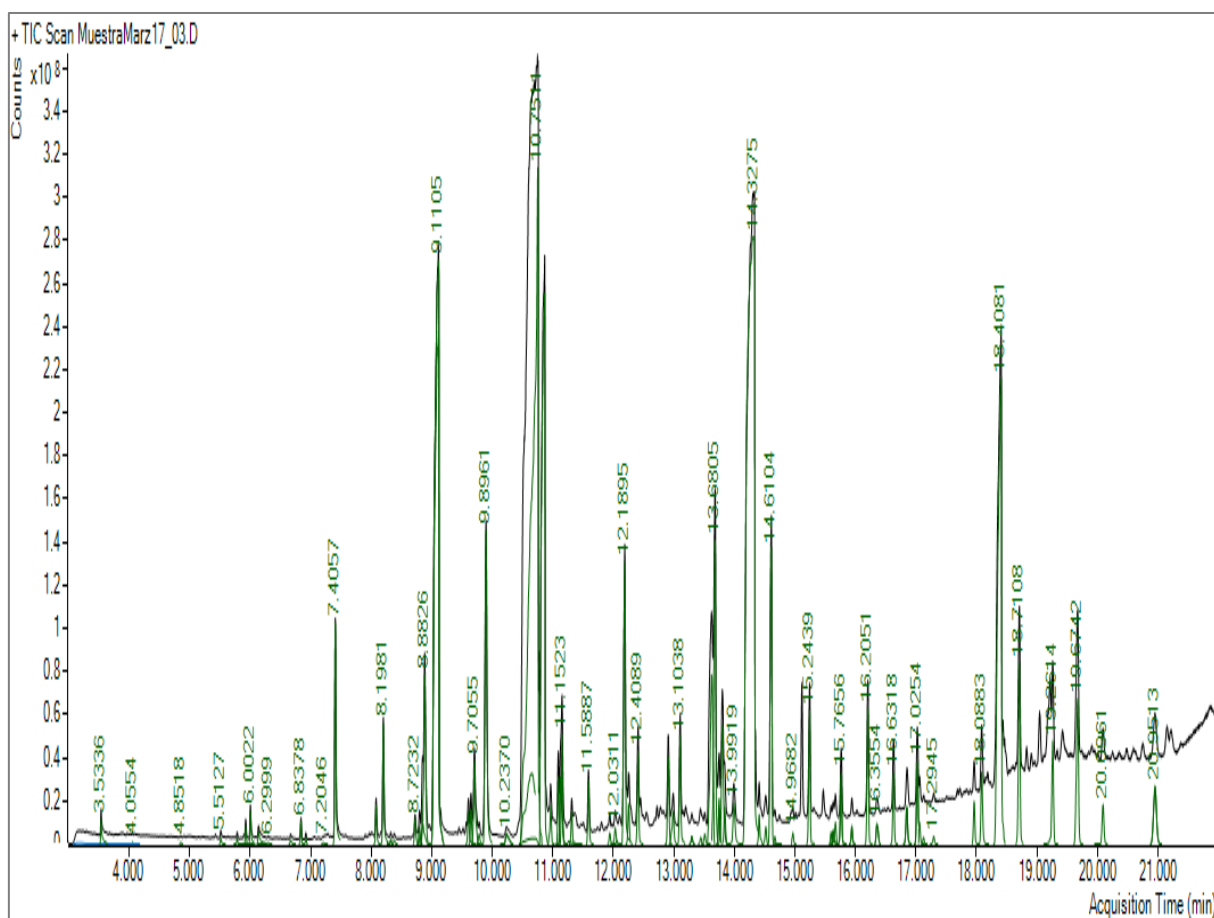
Anexo 1. Cromatograma del extracto de chapulín disuelto en metanol por GC-MS.



El cromatograma en negro representa los resultados en automático que genera el equipo.

El cromatograma en verde son los compuestos identificados finalmente por la librería. En cada pico se observa el tiempo de retención al cual apareció cada compuesto.

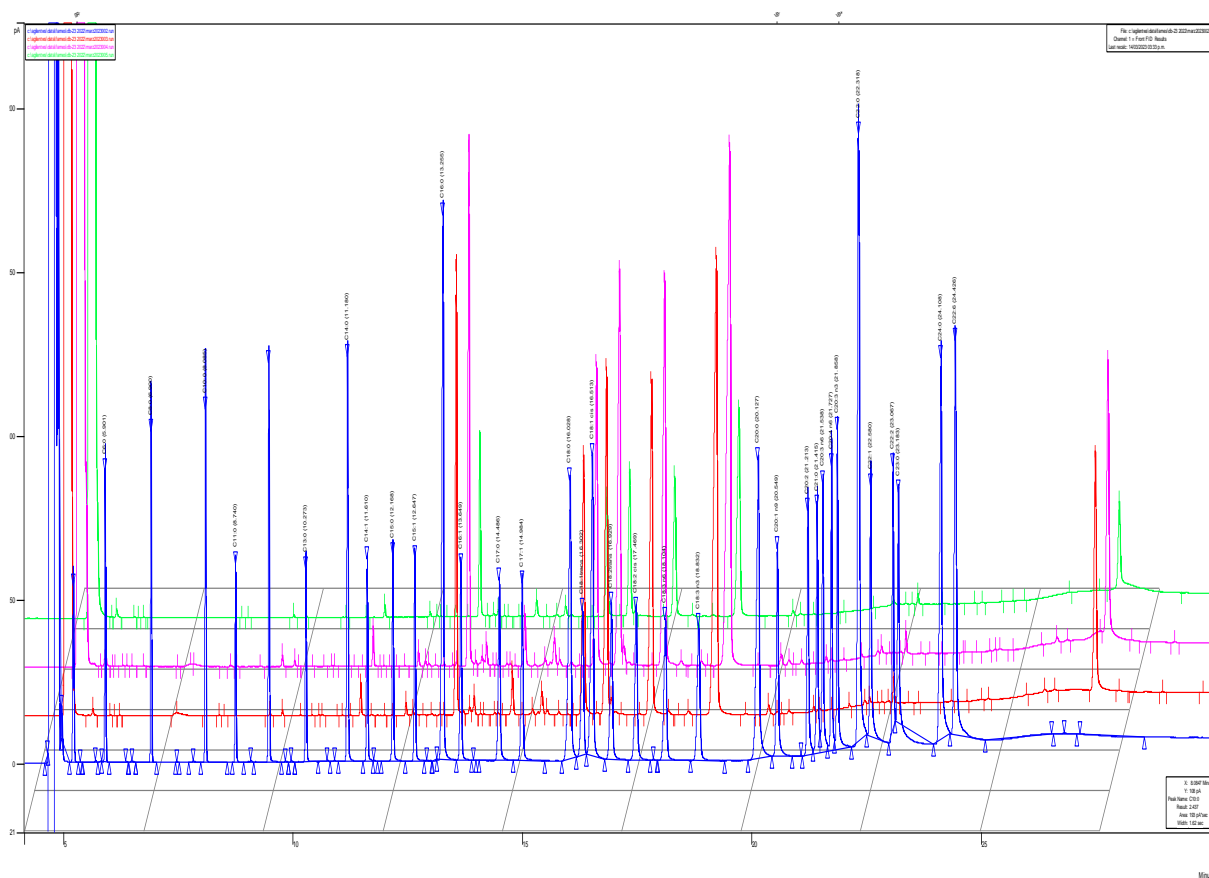
Anexo 2. Cromatograma del extracto del chapulín disuelto en hexano por GC-MS.



El cromatograma en negro representa los resultados en automático que genera el equipo.

El cromatograma en verde son los compuestos identificados finalmente por la librería. En cada pico se observa el tiempo de retención al cual apareció cada compuesto.

Anexo 3. Cromatogramas del perfil de lípidos por GC-FID del extracto de chapulín.



El cromatograma azul corresponde al estándar de referencia; el cromatograma rojo, rosa y verde corresponden a la misma muestra de chapulín corrida por triplicado.