

Preparación y caracterización de películas de quitosano con extractos naturales para aplicaciones biomédicas.

K. Maldonado-Lara¹, A. Rodríguez-Herrera¹, F. G. Vázquez-Álvarez¹, C. Hernández-Navarro^{1,2*}, J.F. Louvier Hernández.

¹ Departamento de Ingeniería Biomédica, Universidad de Celaya, Carretera Panamericana km 269, C.P. 38080, Celaya, Guanajuato, México.

² Departamento de Ingeniería Mecánica, Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Celaya, Antonio García Cubas Pte. 600 esq. Av. Tecnológico, Celaya, Guanajuato.

³ Departamento de Ingeniería Química, Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Celaya, Antonio García Cubas Pte. 600 esq. Av. Tecnológico, Celaya, Guanajuato.

Resumen— En este trabajo se presenta la metodología para la preparación de películas a base de los extractos naturales (EN) *Allium sativum* (ajo) y *Aloe vera* (sábila) incorporados a quitosano (QS), que funciona como matriz polimérica del material. Se combinan las características curativas, medicinales y antimicrobianas del ajo y el aloe con las propiedades biológicas y funcionales del biopolímero natural para su uso en aplicaciones biomédicas. Se describe la metodología de la extracción del *Allium sativum* y del *Aloe vera*, así como su incorporación a la solución de quitosán. Las técnicas de caracterización utilizadas para la evaluación del material fueron FTIR y DRX. Se analizan las propiedades fisicoquímicas de los extractos naturales en interacción con el quitosán y de manera individual.

Palabras clave—Quitosán, películas, extractos naturales.

I. INTRODUCCIÓN

La transición de lo sintético a lo natural es una tendencia que en los últimos años se va haciendo realidad. El desarrollo de materiales y biomateriales para aplicaciones médicas, industriales y agrícolas están adoptando una cultura cada vez más ambiental. El uso de biopolímeros y extractos naturales (EN), gracias a sus propiedades funcionales es actualmente una de las opciones más prometedoras para el desarrollo de materiales para aplicaciones biomédicas.

El quitosán es un biopolímero compuesto principalmente por unidades de glucosamina, que es la forma desacetilada de la quitina, la cual es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza, después de la celulosa (Fig. 1) [1]. Generalmente, la quitina se obtiene por un tratamiento químico de exoesqueletos de crustáceos, alas de insectos, paredes celulares de hongos y algas [2]. La quitina con una desacetilación igual o mayor al 50% se considera quitosano [3].

Las propiedades funcionales del quitosán (QS) han provocado el interés para su aplicación en numerosos campos de estudio, como alimentos, agricultura, industria textil, medicina, farmacología, procesos químicos, bioquímicos, de ingeniería ambiental y para la obtención de materiales compuestos con distintas funciones de biodegradabilidad,

respuesta a cambios ambientales, autoreparación, biocompatibilidad, y toxicidad nula [4].

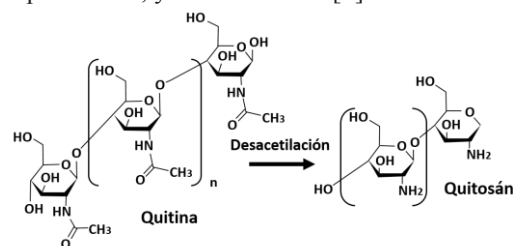


Fig. 1. Estructura química de la quitina y el quitosán.

La incorporación de extractos naturales con diferentes propiedades fisicoquímicas, a polímeros naturales conlleva a la posibilidad de combinar e incrementar sus propiedades. Desde la antigüedad se ha utilizado aloe vera y ajo debido a los beneficios que tiene sobre la salud y sus propiedades medicinales y terapéuticas.

La planta de aloe vera es originaria de la península de Arabia y se conoce también con el nombre de sábila. En la actualidad, se usa en la medicina moderna para tratar múltiples enfermedades, además de ser utilizada en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria [5,6]. El aloe es un efectivo acelerador de la cicatrización de pequeñas heridas y quemaduras debido a su efecto antimicrobiano y la acción epitelizante sobre el tejido de la piel dañada [7], tiene propiedades antiinflamatorias y antivirales, funciona como regulador de glucosa y contiene una gran cantidad de aminoácidos y enzimas [8]. Los beneficios para la salud asociados al aloe se han atribuido a la heterogeneidad de composición, que contiene, es decir, derivados de pectinas, celulosa, hemicelulosa, glucomanano, acemanano y manosa, aminoácidos, enzimas, vitaminas, polisacáridos y otras sustancias de bajo peso molecular [9]. El exudado de sábila, además conocido como zumo o látex, se obtiene al cortar las hojas de la roseta de la planta en su base y permitiendo que escurra, recolectándose en un recipiente. El exudado obtenido se somete a evaporación y, cuando alcanza la consistencia adecuada, se deja endurecer, conformándose la denominada pasta de sábila o acíbar, también conocido como áloe o áloes.

Este exudado es un líquido amarillo y de sabor amargo. Dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo, puede contener entre un 5 a 30% p/p de barba - loína (aloína) (Fig. 2); componente principal de interés comercial, medicinal y farmacológico.

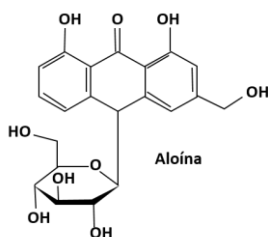


Fig. 2. Estructura química de la aloína

Por otro lado, el ajo también es una planta que se usa desde la antigüedad por sus efectos medicinales, se cree que es originaria de Asia occidental. Una amplia gama de microorganismos incluyendo bacterias, hongos, protozoos y virus han demostrado ser sensibles a las preparaciones de ajo. Además, es capaz de reducir los lípidos en la sangre y combatir el cáncer. Los análisis químicos de dientes de ajo han demostrado que existe una concentración inusual de compuestos que contienen azufre como la aliína. Esta sustancia, que en realidad no huele, en contacto con el oxígeno del aire, se convierte en alicina (Fig. 3), responsable de su característico y penetrante olor [10,11]. Las propiedades antimicrobianas del ajo han sido reportadas por diferentes autores describiendo un amplio espectro de actividad antibacteriana contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluyendo especies de *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, y *Clostridium*; incluso las bacterias ácido-resistentes tales como *Mycobacterium* han demostrado ser sensibles al ajo [12].

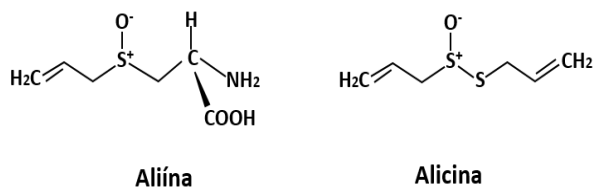


Fig. 3. Estructura química de la alicina y la aliína

En el presente trabajo de investigación se reporta la síntesis de películas de quitosán (QS) con los extractos naturales (EN) de aloe vera (AL) y extracto de ajo (AJ) en diferentes concentraciones para formar composites biodegradables. Además se presenta la caracterización de los materiales para evaluar sus propiedades fisicoquímicas para su posible aplicación en ingeniería biomédica.

II. METODOLOGÍA

1) *Materiales*: Quitosán con grado de desacetilación de 92% y peso molecular bajo ($C_{12}H_{24}N_2O_9$, $M_v = 5 \times 10^4$, Sigma Aldrich), ácido acético (CH_3COOH , 99.8%), etanol (C_2H_6O) y agua desionizada, se utilizaron como se recibieron. Además de hierbas de clavo para extraer el ingrediente activo.

2) *Obtención de la solución del extracto de ajo (AJ)*: Se emplearon dientes de ajo (*Allium sativum*) de la variedad de ajo blanco. Se usaron 30g de dientes de ajo lavados con agua destilada. Posteriormente se mortajaron estos 30g de ajo agregando gotas de agua destilada para facilitar el mortajado, y posteriormente este fue destilado por una técnica convencional. Finalmente se recolectó el extracto de ajo en frascos de vidrio, y estos a su vez envueltos en papel de aluminio para evitar que la luz solar degrade la sustancia.

3) *Extracción del gel de aloe vera (AL)*: La hoja completa del aloe vera de 20 cm, fue lavada con agua destilada para remover la suciedad de la superficie. La piel fue separada cuidadosamente de la parenquima utilizando un escalpelo filoso. Los cortes fueron lavados extensivamente con agua destilada para remover los exudados de la superficie. La masa obtenida de AL fue estabilizada a 65°C por 20 min y posteriormente fue mantenida en refrigeración a 4°C antes de su utilización.

2) *Obtención de películas de Quitosán-Ajo (QS-AJ)*: En 50 ml de agua destilada se incorporaron 2 ml de ácido acético y 0.5 gramos de quitosán, para obtener una solución de quitosán al 1% v/w. Dicha solución se dejó en agitación por 24 horas y una vez que el quitosán quedó completamente solubilizado se dividieron los 50 ml en dos partes iguales. A 25 ml de solución de quitosán se le agregaron 500 µl de extracto de ajo para obtener una dilución de baja concentración (QS-AJ01). A los 25 ml restantes se le incorporó 1000 µl de extracto de ajo para obtener una dilución de alta concentración (QS-AJ02). Ambas soluciones permanecieron en agitación magnética durante 24 horas, y posteriormente se mantuvieron en reposo sin observar precipitados.

3) *Obtención de películas de Quitosán-Aloe (QS-AL)*: El gel obtenido de aloe se colocó en un vaso de precipitado y se incorporaron 50 ml de agua destilada para poner en agitación magnética 24 horas a 90 grados. Una vez que se obtuvo el extracto de aloe, el resto del procedimiento es similar a las películas con ajo. Se prepararon 50 ml de una solución de QS al 1% v/w, de la cual, 25 ml son para la dilución de baja concentración y los 25 ml restantes se utilizaron para crear la dilución de alta concentración de aloe. A los primeros 25 ml de solución de quitosán se le agregó 500 µl de extracto de aloe (QS-AL01) y a los otros 25 ml se le agregó 1000 µl del extracto de aloe previamente preparado (QS-AL02). Ambas soluciones permanecieron en agitación durante 24 horas, y posteriormente se mantuvieron en reposo sin observar precipitados.

5) *Obtención de películas*: Se utilizaron cajas Petri de plástico de 10 cm de diámetro. A cada una se le adicionaron

20 ml de cada una de las soluciones: QS, QS-AJ01, QS-AJ02, QS-AL01 y QS-AL02. Es sabido que las películas a base de quitosán se pueden desprender fácilmente de moldes de plástico o teflón, debido a que la superficie de moldes de vidrio contiene silicatos con carga negativa (-), en las terminaciones Si-O- los cuales tienen unas interacciones muy fuertes con los grupos aminos protonados (+) del quitosán, lo que dificulta su desprendimiento. En cambio los polímeros tienen grupos funcionales olefinicos C = C y no tienen afinidad con el quitosán, lo que facilita su desprendimiento. Las cajas Petri se mantuvieron durante 48 hrs en un horno a una temperatura de 60°C para eliminar el solvente y de esta forman las películas. A las películas formadas se les caracterizó por métodos físicos y químicos.

6) *Caracterización:* El pH de las soluciones fue monitoreados con un pHmetro Laqua Horiba. Se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo (FTIR) Nicolet iS5 con ATR acoplado. Los espectros obtenidos se utilizaron para determinar la posible interacción entre los grupos funcionales del quitosán con extracto de ajo y aloe. El espesor de las películas fue medido con un micrómetro Mitutoyo modelo Digimatic con una resolución de 0.001 mm. Las películas se midieron en 5 puntos y fue considerado el valor promedio. Un estudio para la identificación de fases se realizó mediante difracción de rayos-X (DRX) utilizando un Difractómetro TNX Technologies Modelo EasyX600 con radiación Cu-K α operando a 40kV y 30mA, en un rango de 2 θ de 5° a 50° a una velocidad de 0.02 θ /min.

III. RESULTADOS

La Tabla 1 muestra el comportamiento del pH en las soluciones de QS y de los compositos de QS-EN. De manera general se puede observar un aumento del pH con la adición de los extractos de ajo (QS-AJ) y de aloe (QS-AL). El pH mayor se observa en QS-AJ02 con 3.40. El menor espesor se obtuvo para la película de QS (0.00086 in), mientras que el mayor espesor se obtuvo para la películas de QS-AJ01 (0.00250 in). Se puede observar que un aumento en la concentración del EN, favorece el incremento en el espesor de las películas.

TABLA I
CARACTERÍSTICAS DE LOS ESPECÍMENES DE QS Y QS-EN.

Especimen	pH (Solución)	Espesor [in] (Película)
QS	3.34	0.00086 \pm 0.00012
QS-AJ01	3.35	0.00150 \pm 0.00063
QS-AJ02	3.40	0.00194 \pm 0.00056
QS-AL01	3.37	0.00098 \pm 0.00026
QS-AL02	3.37	0.00128 \pm 0.00018

Las películas obtenidas de QS y de los compositos QS-AJO01 (2%wt), QS-AJO02 (4%wt), QS-AL01 (2%wt), QS-AL02 (4%wt) mostraron una apariencia transparente de un color amarillo claro y brillantes (Fig 4). Las películas obtenidas presentaron algunas rugosidades relacionadas al efecto de la protonación incompleta de los grupos aminos interiores con el ácido acético presente en el medio durante la síntesis producen las rugosidades en los filmes, además de la interacción con el material acrílico de la placa de Petri.

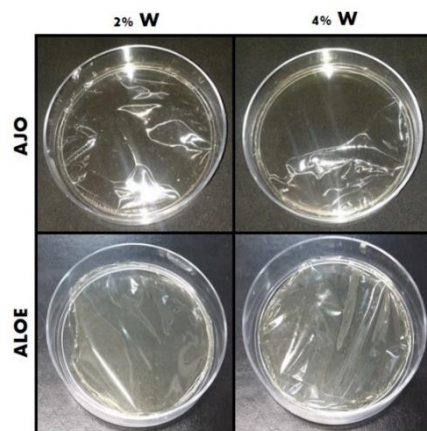


Fig. 4. Fotografías de las películas obtenidas.

La Fig. 5 muestra los espectros FTIR de las soluciones de ajo (a) y aloe (b). En el espectro de FTIR correspondiente a la solución del extracto de ajo, se puede observar la banda característica del O-H a 3328 cm⁻¹ mientras que el pico a 1635 cm⁻¹ corresponde a las bandas de carbonilo y carboxilo (C=O). Otras bandas a 1130 cm⁻¹ y a 1017 cm⁻¹ pueden ser atribuidos a la absorción de sulfóxidos (S=O) y vibraciones de estiramiento de aminas primarias (C-N) respectivamente, las cuales son atribuidas a compuestos azufrados como la aliína y sus derivados. Por otro lado, el espectro de la solución de extracto de aloe, muestra una banda característica a 3322 cm⁻¹ correspondiente a la vibración del grupo funcional hidroxilo (O-H). Se puede observar además una banda a 1610 cm⁻¹ es característico de las vibraciones del grupo funcional carbonilo en cetonas, aldehídos y ácidos carboxílicos.

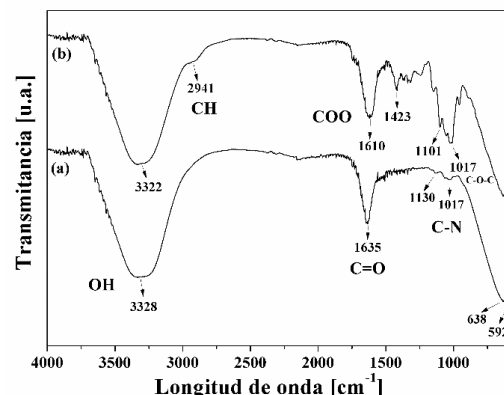


Fig. 5. Espectros FTIR de las soluciones de los extractos naturales de (a) ajo y (b) aloe.

Un estudio de FTIR fue realizado para estudiar la interacción del quitosán con los extractos naturales incorporados. En el espectro FTIR de la Fig. 6 se observan las bandas de los grupos funcionales característicos de la molécula de quitosán. Se aprecian las bandas correspondientes a los estiramientos O-H y N-H ($3086 - 3557 \text{ cm}^{-1}$), característicos de alcoholes, aminas y amidas. Se observa que esta banda está centrada en 3300 cm^{-1} producto de la sobreposición de las bandas originadas por los alargamientos y tensiones de los grupos O-H y N-H presentes. En el espectro se observan también bandas del estiramiento C-H a 2979 cm^{-1} . Se puede observar que la banda característica del grupo C=O a 1641 cm^{-1} relacionada con el grupo amido (I) y la asignada a 1389 cm^{-1} se debe a un grupo amido (II). El AL presenta bandas de absorción a 1600 cm^{-1} (C=O) y 3369 cm^{-1} (OH fenólico), las antraquinonas de la cutícula a 1623 cm^{-1} y 3398 cm^{-1} , las del gel a 1629 cm^{-1} y 3408 cm^{-1} , respectivamente [13].

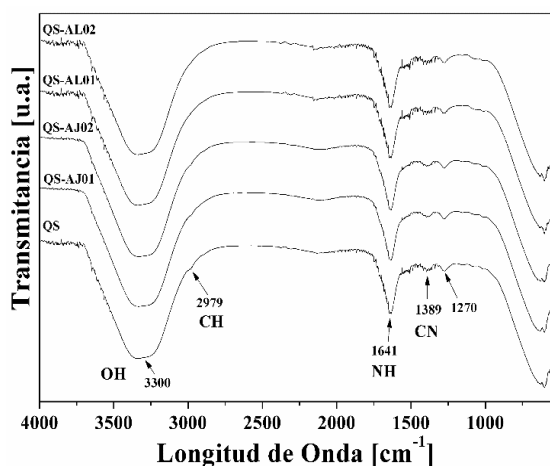


Fig. 6 Espectros de FTIR del QS y los composites de QS-EN en forma de solución.

La interacción entre el ácido acético y el quitosán en el momento de elaboración de las películas formó un acetato de quitosán, esta reacción aporta un cambio de los picos de los grupos funcionales como se observa en los espectros de FTIR de la Fig. 7. Los espectros de las películas de QS y QS-EN muestran picos similares entre sí. Esto indica que no existe un cambio estructural mayor en el QS. El espectro FTIR de las películas revela bandas centradas en 3300 cm^{-1} atribuidas a O-H. Las bandas a $1640 - 1539 \text{ cm}^{-1}$ fueron asignadas a las vibraciones de estiramiento de C=O, que se traslapan con las vibraciones de flexión del NH. Sin embargo, la vibración alrededor de 2925 cm^{-1} para las películas de QS-AL01 y QS-AL02, lo cual puede implicar una incidencia en la interacción intermolecular entre el QS y el AL.

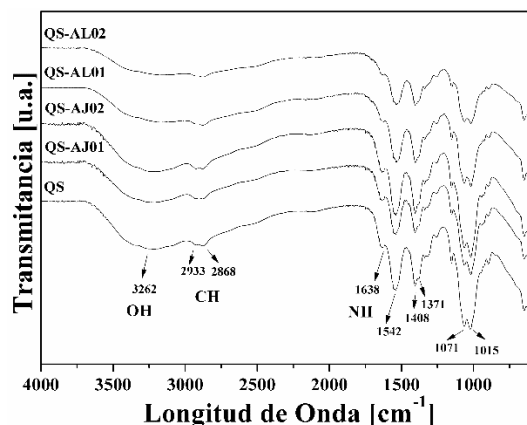


Fig. 7. Espectros FTIR del QS y los composites de QS-EN en forma de películas

La técnica de DRX se utilizó para analizar la cristalinidad de las películas de QS-EN. La Fig. 8 muestra el patrón de DRX para las películas de QS y los composites de QS-EN. Los patrones de DRX muestran el carácter amorfo de las películas, excepto para la película de QS-AL01 que muestra un carácter semicristalino, por lo tanto, estos cambios en los patrones de difracción indican algún tipo de interacción. El QS se caracteriza por un pico claro a 2θ igual a 20° , el AJ presenta un pico alrededor de 19° , mientras que el AL presenta un 16° .

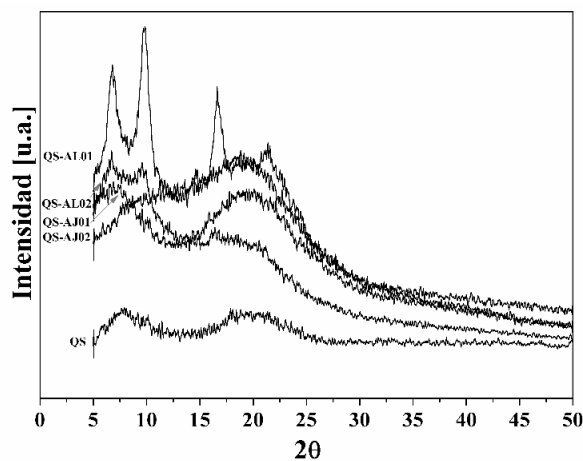


Fig. 8. Difractograma de las películas de QS y QS-EN en diferentes concentraciones.

IV. CONCLUSIÓN

Se obtuvieron películas transparentes de quitosán (QS) con dos extractos naturales (EN), ajo y aloe, en diferentes concentraciones con la finalidad de combinar sus propiedades antimicrobianas y curativas a las propiedades biocompatibles y biofuncionales del quitosán. Los materiales fueron sometidos a diferentes pruebas de caracterización para

determinar sus características fisicoquímicas. La incorporación de EN en el QS, favorece el aumento en el espesor de las películas. Los espesores de las películas se encuentran entre 0.0086 in y 0.00150 in. La incorporación del extracto de ajo al QS, permitió la obtención de un espesor de película mayor al obtenido para las películas con aloe. Sin embargo, es necesario realizar un análisis por microscopia electrónica de barrido para soportar que los fitoquímicos utilizados pudieran formar un enlace intermolecular para adherirse a la molécula de QS.

De acuerdo a los resultados, la interacción entre polisacáridos como quitosán, con fitoquímicos, puede representar una estrategia para estudiar y crear una gran cantidad de materiales útiles en diversas áreas de estudio como en la industria alimenticia para el desarrollo de biopacking obteniendo un material con las características deseables para actuar como una barrera física y antimicrobial para la contaminación de comida; o para aplicaciones biomédicas para la elaboración de materiales para vendajes para heridas, útiles para la reparación de la piel.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen al equipo de trabajo del Laboratorio de Biomateriales y Biopolímeros del Instituto Tecnológico de Celaya, así como al Ing. Isidro Montes Zavala por su apoyo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. N. R. Kumar, "A review of chitin and chitosan applications," *Reactive and functional polymers.*, vol. 46, no.1, pp. 1-27, 2000.
- [2] M. Rinaudo, "Chitin and chitosan: properties and applications," *Progress in polymer science.*, vol. 31, no.7, pp. 603-632, 2006.
- [3] D. K. Kweon, S. B. Song, and Y. Y. Park, "Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator," *Biomaterials.*, vol. 24, no. 9, pp. 1595-1601, 2003.
- [4] M. Ishihara, K. Nakanishi, K. Ono, M. Sato, M. Kikuchi, Y. Saito, A. Kurita, "Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process," *Biomaterials.*, vol. 23, no. 3, pp. 833-840, 2002.
- [5] R. Pereira, Mendes, A., P. Bártolo, "Alginate/Aloe vera hydrogel films for biomedical applications," *Procedia CIRP.*, vol. 5, no. 1, pp. 210-215, 2013.
- [6] S.S. Silvia, M.B. Oliveira, J.F., R. L. Reis, "Bio-inspired Aloe vera sponges for biomedical applications," *Carbohydrate polymers.*, vol. 112, no.1, pp. 264-270, 2014.

- [7] M. C. Kang, S. Y. Kim, Y. T. Kim, E. A. Kim, S. H. Lee, S. C. Ko, H. S. Jang, "In vitro and in vivo antioxidant activities of polysaccharide purified from aloe vera (*Aloe barbadensis*) gel," *Carbohydrate polymers.*, vol. 99, no. 1, pp. 365-371, 2014.
- [8] S. S. Silva, E. G. Popa, M. E. Gomes, M. Cerqueira, A. P. Marques, S. G. Caridade, R. L. Reis, "An investigation of the potential application of chitosan/aloe-based membranes for regenerative medicine," *Acta biomaterialia.*, vol. 9, no. 6, pp. 6790-6797, 2013.
- [9] S. Khoshgozaran-Abras, M. H. Azizi, Z. Hamidy, N. Bagheripoor-Fallah, "Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation," *Carbohydrate Polymers.*, vol. 87, no. 3, pp. 2058-2062, 2012.
- [10] S. Ankri, D. Mirelman, "Antimicrobial properties of allicin from garlic," *Microbes and infection.*, vol. 1, no. 2, pp. 125-129, 1999.
- [11] E. Block, "The chemistry of garlic and onion," *Sci Am.*, vol. 251, no. 3, pp. 114-9, 1985.
- [12] Y. Pranoto, S. K. Rakshit, V. M. Salokhe, "Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin," *LWT-Food Science and Technology.*, vol. 38, no. 8, pp. 859-865, 2005.
- [13] F. Saavedra Nizama, N. Ale Borja, G. Gordillo Rocha, "Análisis por espectroscopía uv y fir de macerados acuosos y alcohólicos de miller. interacción con sales inorgánicas," *Sociedad Química de Perú.*, vol. 76, no. 3, pp 242-260, 2010.