

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



**MEMBRANAS DE ALGINATO DE SODIO – ALOE VERA (*Aloe barbadensis*) CON
POTENCIAL APLICACIÓN PARA APÓSITOS PARA TRATAMIENTO DE HERIDAS**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA

AUTOR

MARIELA ELGEGREN LITUMA

ASESOR

JAVIER NAKAMATSU KUNIYOSHI

Noviembre, 2021

RESUMEN

Los apósitos para heridas son materiales de uso muy común, aunque en su mayoría tienen características que no permiten que el tejido dañado se repare adecuadamente y que el tiempo de curado sea más extenso. Este trabajo propone la elaboración de membranas de alginato y gel de Aloe vera tridimensionales que tengan características para su potencial uso como apósito. El alginato es un biopolímero muy usado en aplicaciones biomédicas por ser biocompatible y no tóxico; mientras que el Aloe vera es una planta muy usada en la medicina tradicional por sus propiedades terapéuticas en el curado de heridas. Primero, se elaboraron membranas bidimensionales de alginato, las cuales se entrecruzaron con CaCl_2 (entre 0,5% y 5%, w/v) y se determinó que a mayor concentración de CaCl_2 disminuye la capacidad de hinchamiento del film. Asimismo, se elaboraron membranas de alginato con glicerol y de alginato con Aloe vera donde se determinó que el glicerol le otorga mayor flexibilidad al film y que la incorporación de Aloe vera aumenta el porcentaje de hinchamiento en buffer de acetato a pH 5,5 y 37,5°C. Por otro lado, se formaron micropartículas de alginato y gel de Aloe vera para formar membranas tridimensionales y se determinó el espesor, se analizó la superficie por SEM y se caracterizó por espectroscopía FT-IR. Asimismo, se evaluó su capacidad de hinchamiento en buffer acetato a pH 5,5 y 37,5°C, su carácter hidrofílico, actividad antioxidante y proceso de degradación en diferentes medios (pH 5,5; 7,5 y 8,5). Las membranas varían entre 18,42 a 25,25 μm de espesor, son de carácter hidrofílico, que, al incrementarse el contenido del gel de Aloe vera, aumenta el porcentaje de hinchamiento y que en el medio de pH a 7,5 es donde hay una menor degradación del film; sin embargo, no presentan actividad antioxidante. Por último, se elaboró un film tridimensional de alginato y extracto de uña de gato, el cual tiene una alta actividad antioxidante.



*Para Elia, mamama.
Esta vez me faltará tu abrazo y
tu emoción al concluir con esta etapa.*

AGRADECIMIENTOS

A Daniela, mi pequeñita, por enseñarme a ver las cosas desde otra perspectiva, y a Oswaldo por su amor, comprensión y soporte a lo largo de esta etapa. A mis padres, Doris y Rafael, por su constante apoyo y siempre motivarme, con su ejemplo, a seguir en mi formación profesional. A mis hermanos Alicia, Toño, Cesar y Dania por su cariño y preocupación. A mis sobrinos Cesar, Rafaela, Mikel, Gael y Tiana por su gran entusiasmo y alborotar con alegría cada rincón.

A mi asesor Javier Nakamatsu por nuevamente confiar en mi, por sus consejos y ayuda en la realización de este trabajo.

A Suyeon por impulsarme a realizar la maestría, por la confianza depositada para el desarrollo de este proyecto, por su preocupación y consejos.

A mis compañeros del Laboratorio 211, en especial a Alonso por los momentos compartidos e intercambiar dudas e ideas durante el tiempo de trabajo en el laboratorio.

A mis compañeros de la maestría Angeline y Luis por su compañía y buen humor en las clases y horas de estudio que se hacían más llevaderas.

A Betty Galarreta por su ayuda con la adquisición de las imágenes SEM y por sus sugerencias durante el desarrollo de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Concytec) Proyecto N°151-2017-FONDECYT por el financiamiento brindado.

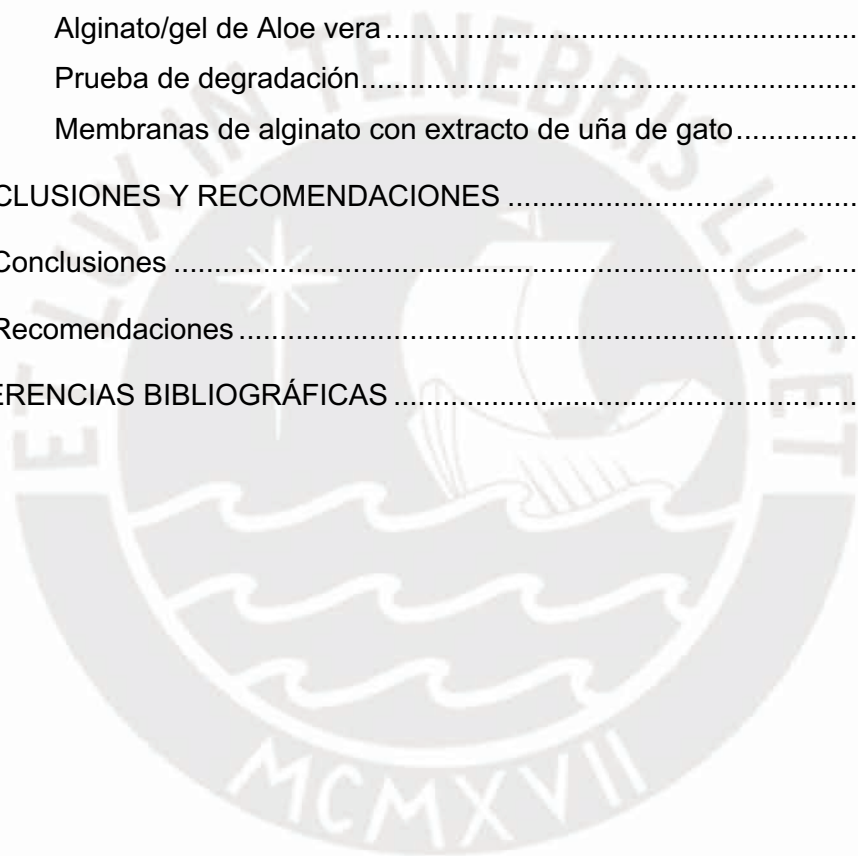
A la Dirección de Gestión de la Investigación (DGI) de la PUCP por el apoyo económico mediante el PAIP 2019.

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	viii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MARCO TEÓRICO	2
2.1 Alginato de sodio	2
2.1.1 Procedencia, composición y estructura	2
2.1.2 Propiedades y aplicaciones	4
2.2 Aloe vera.....	8
2.2.1 Clasificación y características.....	8
2.2.2 Composición química.....	9
2.2.3 Actividad biológica y aplicaciones.....	13
2.3 Uña de gato	14
2.4 Apósitos para heridas	15
2.4.1 Proceso de curado de heridas	15
2.4.2 Tipos de apósitos y características.....	17
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo general.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	19
4.1 Reactivos, Equipos y Materiales.....	19
4.1.1 Reactivos	19
4.1.2 Equipos	20
4.1.3 Materiales	21
4.2 Metodología	22
4.2.1 Caracterización de alginato de sodio.....	22
4.2.1.1 Espectroscopía UV-Vis	22
4.2.1.2 Espectroscopía infrarroja (FT-IR).....	22
4.2.1.3 Viscosimetría capilar	22
4.2.1.4 Cromatografía por permeación de gel (GPC).....	22

4.2.1.5	Goniometría – Medición del ángulo de contacto.....	23
4.2.2	Manipulación y caracterización del Aloe vera.....	23
4.2.2.1	Microscopía óptica	23
4.2.2.2	Determinación del contenido de agua del gel de Aloe vera.....	23
4.2.2.3	Extracción del gel de Aloe vera	24
4.2.2.4	Aislamiento del polisacárido mayoritario.....	24
4.2.2.5	Espectroscopía infrarroja (FT-IR).....	24
4.2.2.6	Cromatografía por permeación de gel (GPC)	25
4.2.2.7	Actividad antioxidante mediante ensayo de decoloración ABTS.....	25
4.2.3	Preparación de membranas bidimensionales.....	26
4.2.3.1	Alginato de sodio	26
4.2.3.2	Alginato y glicerol.....	26
4.2.3.3	Alginato y gel Aloe vera	26
4.2.4	Preparación de membranas tridimensionales.....	27
4.2.4.1	Alginato de sodio	27
4.2.4.2	Alginato y gel de Aloe vera	28
4.2.4.3	Alginato y extracto de uña de gato	28
4.2.5	Entrecruzamiento de membranas.....	29
4.2.6	Caracterización de membranas.....	29
4.2.6.1	Medición de espesor.....	29
4.2.6.2	Transparencia de films.....	29
4.2.6.3	Análisis por SEM.....	30
4.2.6.4	Espectroscopía infrarroja (FT-IR).....	30
4.2.6.5	Prueba de hinchamiento y degradación	30
4.2.6.6	Prueba de degradación en diferentes medios	31
4.2.6.7	Ángulo de contacto	31
4.2.6.8	Actividad antioxidante	32
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1	Caracterización de alginato de sodio.....	33
5.1.1	Espectroscopía UV-Vis	33
5.1.2	Espectroscopía infrarroja	33
5.1.3	Viscosimetría capilar.....	34
5.1.4	Cromatografía por permeación de gel (GPC).....	36
5.1.5	Ángulo de contacto	38
5.2	Aloe vera.....	39
5.2.1	Análisis de la morfología del gel fresco de Aloe vera	39

5.2.2	Extracción del gel de Aloe vera	39
5.2.3	Espectroscopía infrarroja	40
5.2.4	Cromatografía por permeación de gel (GPC)	41
5.2.5	Actividad antioxidante mediante ensayo de decoloración ABTS.....	43
5.3	Membranas bidimensionales	44
5.3.1	Análisis de entrecruzamiento de AL films con CaCl ₂	44
5.3.2	Alginato/glicerol.....	48
5.3.3	Alginato/gel de Aloe vera	50
5.4	Membranas tridimensionales	54
5.4.1	Análisis de entrecruzamiento de AL films con CaCl ₂	55
5.4.2	Alginato/gel de Aloe vera	58
5.4.3	Prueba de degradación.....	65
5.4.4	Membranas de alginato con extracto de uña de gato.....	66
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
6.1	Conclusiones	69
6.2	Recomendaciones	70
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1. Estructura química de (a) monómeros del alginato, M y G; y (b) estructura de los bloques GG, MM y MG.	3
Figura 2-2. a) Formación de interacciones entre iones Ca^{+2} con alginato y b) Representación esquemática de la interacción alginato – Ca^{+2} [8].	6
Figura 2-3. Estructura química de plastificantes para films de alginato	7
Figura 2-4. a) Planta completa, b) hoja y c) flor de Aloe vera.	9
Figura 2-5. Estructura transversal de la hoja de Aloe vera [34].	10
Figura 2-6. Estructura química de compuestos presentes en el exudado del Aloe vera.	10
Figura 2-7. Esquema del tejido parenquimático [37].	10
Figura 2-8. Estructura química del acemanano (polisacárido mayoritario del Aloe vera).	12
Figura 2-9. Uña de gato (<i>Uncaria tomentosa</i>) [79].	14
Figura 2-10. Estructura química de alcaloides oxindoles presentes en la uña de gato.	15
Figura 2-11. Componentes de la piel [84].	16
Figura 4-1. Goniómetro Ramé-Hart modelo 250.	21
Figura 4-2. Esquema general de la preparación de films bidimensionales.	26
Figura 4-3. Esquema general para la elaboración de membranas tridimensionales. ...	27
Figura 5-1. Espectro UV-Vis del film de alginato de sodio.	33
Figura 5-2. Espectro FT-IR-ATR del film de alginato de sodio al 0,5% (w/v).	34
Figura 5-3. Viscosidad intrínseca mediante los métodos de Huggins y de Kraemer para alginato de sodio en NaCl 0,1 M a 25°C.	36
Figura 5-4. Cromatograma de alginato de sodio y estándares de pululano en fase móvil Na_2SO_4 0,05 M y EDTA 0,01 M.	37
Figura 5-5. Imágenes de microscopía óptica del gel fresco de Aloe vera: (a) Magnificación 4x y (b) Magnificación 10x.	39
Figura 5-6. Espectro FT-IR por transmisión del (a) gel fresco liofilizado y del (b) polisacárido mayoritario del gel de Aloe vera en KBr.	41
Figura 5-7. Cromatograma del gel extraído de Aloe vera en fase móvil NaCl 0,1 M. ...	42
Figura 5-8. Cromatograma de acemanano aislado del gel de Aloe vera en fase móvil NaCl 0,1 M.	42
Figura 5-9. Actividad antioxidante para muestras liofilizadas de gel fresco, gel pasteurizado y acemanano aislado.	44

Figura 5-10. Films de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl ₂ (a) 0,5%, (b) 1%, (c) 3% y (d) 5% (w/v).	45
Figura 5-11. Pérdida de masa y variación de espesor de films de AL 1% entrecruzados con CaCl ₂ de diferentes concentraciones.	46
Figura 5-12. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 de films de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl ₂ de diferentes concentraciones.	47
Figura 5-13. Prueba de degradación luego de 24 horas a 37,5°C y pH 5,5 de films de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl ₂ de diferentes concentraciones.	48
Figura 5-14. Films de AL con glicerol al (a) 15% (w/w), (b) 30% (w/w) y (c) 50% (w/w).	48
Figura 5-15. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 de films de AL con glicerol 30% (w/w) entrecruzados con CaCl ₂ de diferentes concentraciones.	49
Figura 5-16. Imagen SEM para membranas de (a) AL 2D y (b) y (c) AL-AVG25 2D.	51
Figura 5-17. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 de films bidimensionales de AL-AVG entrecruzados con CaCl ₂ 1% por 5 minutos.	52
Figura 5-18. Prueba de degradación luego de 24 horas a 37,5°C y pH 5,5 de films entre AL-AVG entrecruzados con CaCl ₂ 1% por 5 minutos.	53
Figura 5-19. Ángulo de contacto para membranas bidimensionales de AL, AVG, AL-AVG10 y AL-AVG25 a diferentes condiciones de humedad relativa.	54
Figura 5-20. Film elaborado con micropartículas de AL 0,03 % (w/v).	54
Figura 5-21. Films tridimensionales de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl ₂ (a) 0,5%, (b) 1%, (c) 3% y (d) 5%.	55
Figura 5-22. Pérdida de masa y espesor de films de AL 1% entrecruzados con CaCl ₂ de diferentes concentraciones.	56
Figura 5-23. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 de films tridimensionales de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl ₂ de diferentes concentraciones.	57
Figura 5-24. Prueba de degradación a 37,5°C y pH 5,5 de films de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl ₂ de diferentes concentraciones luego de 24 horas.	58
Figura 5-25. Imágenes SEM de membranas de (a) AL-AVG10 3D y (b) AL-AVG25 3D.	60
Figura 5-26. Espectro FT-IR-ATR de (a) alginato de sodio, (b) poloxamer, (c) gel de Aloe vera y (d) membrana AL-AVG10 3D.	61
Figura 5-27. Espectro FT-IR-ATR de membrana entre AL-AVG10 3D (a) antes y (b) después de entrecruzar con CaCl ₂ 1%.	62
Figura 5-28. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 de films bidimensionales de AL-AVG entrecruzados con CaCl ₂ 1% por 5 minutos.	63

Figura 5-29. Prueba de degradación luego de 24 horas a 37,5°C y pH 5,5 de films tridimensionales entre AL-AVG entrecruzados con CaCl ₂ 1% por 5 minutos.	63
Figura 5-30. Ángulo de contacto para membranas tridimensionales de AL, AVG, AL-AVG10 y AL-AVG25 a diferentes condiciones de humedad relativa.....	64
Figura 5-31. Prueba de degradación a 37,5°C y a diferentes medios para film de AL-AVG10 3D entrecruzado con CaCl ₂ 1%.	66
Figura 5-32. Film elaborado entre AL-UT0,1 tridimensional.....	67
Figura 5-33. Imagen SEM para la membrana tridimensional entre AL-UT0,1.	67
Figura 5-34. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 del film AL-UT0,1 entrecruzado con CaCl ₂ 1% por 5 minutos.	68
Figura 5-35. Actividad antioxidante de film AL-UT0,1.	68



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Composición del alginato en diferentes especies de algas pardas [6, 11]....	3
Tabla 2-2. Compuestos reportados para el gel de Aloe vera.	11
Tabla 4-1. Codificación y proporción entre AL y AVG usada en la elaboración de membranas bidimensionales.	27
Tabla 4-2. Codificación y proporción entre AL y AVG usada en la elaboración de membranas tridimensionales.	28
Tabla 5-1. Resultados de viscosimetría capilar para alginato de sodio en NaCl 0,1 M y 25°C.	35
Tabla 5-2. Comparación de resultados de GPC para estándares de pululano y alginato de sodio.	37
Tabla 5-3. Ángulo de contacto para films de alginato preparados de diferentes concentraciones.	38
Tabla 5-4. Resultados de distribución de masas molares por GPC para estándares de pululano, gel y acemanano extraído de Aloe vera.	42
Tabla 5-5. Ángulo de contacto de films entre alginato y glicerol.	49
Tabla 5-6. Propiedades de espesor, transparencia y pérdida de masa luego de entrecruzar films entre AL-AVG bidimensionales.	50
Tabla 5-7. Espesor, transparencia y pérdida de masa luego de entrecruzar films tridimensionales de AL-AVG.	59

ABREVIATURAS

ABTS	Acido 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico)
AL	Alginato de sodio
ATR	Reflectancia total atenuada
ASTM	American Society for Testing and Materials
AVG	Gel de Aloe vera
BSA	Albúmina de suero bovino
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
FT-IR	Espectroscopía Infrarroja con transformada de Fourier
G	α -L-ácido gulurónico
Gal	Galactosa
GPC	Cromatografía por permeación de gel
Gli	Glicerol
Glu	Glucosa
HR	Humedad relativa
M	β -D-ácido manurónico
Man	Manosa
η_r	Viscosidad relativa
η_{sp}	Viscosidad específica
η_{red}	Viscosidad reducida
η_{inh}	Viscosidad inherente
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
PEG	Polietilenglicol
SEM	Microscopía electrónica de barrido
UT	Extracto de uña de gato
UV-Vis	Ultravioleta visible
v/v	Relación volumen/volumen
w/v	Relación masa/volumen
w/w	Relación masa/masa

1 INTRODUCCIÓN

La incorporación de productos naturales en el área biomédica es una práctica que se viene desarrollando desde hace ya muchos años, pues estos presentan distintas propiedades y efectos terapéuticos que pueden ser aprovechados, por ejemplo, para el desarrollo de apósitos para heridas. Una herida o lesión en la piel tiene un proceso complejo de recuperación y tarda varias semanas en completarse hasta reparar el tejido dañado. Debido a ello en la mayoría de los casos se utiliza un apósito para proteger la herida, aunque muchas veces el apósito usado no mantiene un ambiente adecuado (son muy absorbentes, poco permeables a los gases, difícil de remover de la piel o no la protegen de contaminación) y causa que la herida tarde aún más en el curado [1, 2]. Por tanto resulta importante el estudio de materiales que puedan mejorar las características de los apósitos ya existentes.

Dentro de los materiales que se vienen investigando se encuentra el alginato, el cual es un biopolímero que es biodegradable, biocompatible y no tóxico. Además, puede formar hidrogeles, esponjas, nanofibras y films [3] lo que lo hace un material muy versátil para su estudio y aplicación. Asimismo, para potenciar su uso como apósito se suele combinar con otros polímeros u otros productos que tengan propiedades terapéuticas entre los que se encuentra el Aloe vera [3]. El Aloe vera es una planta muy utilizada en la medicina tradicional, pues posee un conocido uso en la hidratación de la piel y el curado de heridas. La planta posee un gel incoloro con un contenido de aproximadamente 99% agua y el resto se compone principalmente de polisacáridos así como de enzimas, aminoácidos, vitaminas, y otras sustancias que, en conjunto, le confieren su actividad biológica [4].

El siguiente trabajo propone la elaboración de micropartículas de alginato de sodio con gel de Aloe vera en distintas proporciones para formar membranas con potencial uso como apósitos para heridas. Se evaluó su capacidad de hinchamiento, carácter hidrofílico, degradación en diferentes medios y actividad antioxidante.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Alginato de sodio

2.1.1 Procedencia, composición y estructura

El alginato es un biopolímero producido por dos especies de bacterias y por diversas especies de algas marinas pardas de la clase Phaeophyceae. Las especies de bacterias que sintetizan el alginato son *Pseudomonas* y *Azotobacter* en las cuales el alginato, si bien se sintetiza por mecanismos similares, cumplen diferentes funciones en cada especie [5]. En la especie *Pseudomonas* el alginato es usado como un componente importante para la formación de estructuras complejas que permiten que las bacterias se adhieran a una superficie sólida; mientras que en la especie *Azotobacter* el alginato se encarga de mantener la hidratación de la célula en condiciones ambientales adversas y puede actuar como barrera protectora contra metales pesados [6-8]. Por otro lado, las especies más comunes de algas pardas que producen el alginato son *Laminaria* y *Macrocystis*, donde el alginato constituye aproximadamente el 40% de la masa seca del alga y se encuentra en la pared celular [7, 8]. Su principal función es brindarle resistencia mecánica y flexibilidad a la planta, y adicionalmente, le permite el almacenamiento de agua con el fin de prevenir la deshidratación en caso el alga sea retirada del agua y quede expuesta al aire [8].

El alginato es un polisacárido compuesto aleatoriamente de dos monómeros, β -D-ácido manurónico (**M**) y su epímero C-5 α -L-ácido gulurónico (**G**), los cuales están unidos mediante enlaces glicosídicos 1 \rightarrow 4. Los monómeros pueden formar enlaces β (1 \rightarrow 4) entre unidades M (bloque M-M) que adquieren una estructura lineal y le confiere flexibilidad a esta porción de la cadena. Asimismo, los monómeros pueden formar enlaces α (1 \rightarrow 4) entre unidades G (bloque G-G) donde se genera una estructura plegada, lo que confiere rigidez a esta porción de la cadena. Adicionalmente, se forman enlaces entre las unidades M y unidades G cuyos enlaces de tipo axial-ecuatorial generan una mayor flexibilidad, incluso más que en el bloque M-M [8, 9]. La estructura química, tanto de los monómeros como de los diferentes enlaces entre las unidades del ácido alginico, se muestran en la Figura 2-1a y Figura 2-1b, respectivamente.

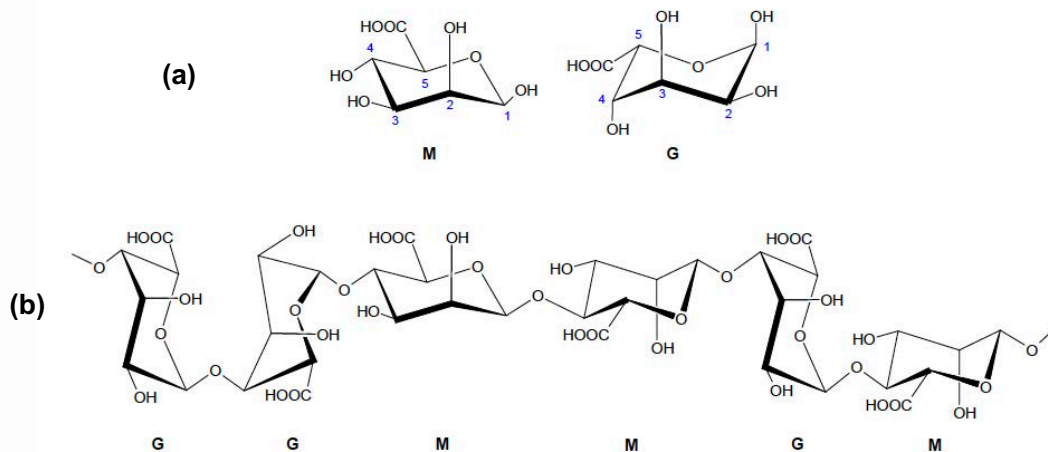


Figura 2-1. Estructura química de (a) monómeros del alginato, M y G; y (b) estructura de los bloques GG, MM y MG.

La proporción entre los monómeros M/G depende de la especie (alga o bacteria), de las condiciones de crecimiento, estación del año y parte del alga (tallo, hojas, bulbo) de donde es extraído [8, 10]. Adicionalmente, solo en el caso de las bacterias, estas presentan alginato con un cierto grado de acetilación que varía entre 11 – 30% para la especie *Azotobacter Vinelandii* y entre 4 – 57% para *Pseudomonas spp* [6]. En la Tabla 2-1, se muestran diferentes especies, tanto de algas como de bacterias, y como es la relación entre los monómeros M/G.

Tabla 2-1. Composición del alginato en diferentes especies de algas pardas [6, 11]

	Especie	M/G	%M	%G
Alga parda	<i>Laminaria hyperborea</i> (tallo)	0,45	30	70
	<i>Laminaria hyperborea</i> (hoja)	1,22	55	45
	<i>Laminaria digitata</i>	1,22	55	45
	<i>Macrocystis pyrifera</i>	1,50	60	40
	<i>Lessonia nigrescens</i>	1,50	60	40
	<i>Ascophyllum nodosum</i>	1,86	65	35
	<i>Laminaria japónica</i>	1,86	65	35
	<i>Durvillea antártica</i>	2,45	71	29
	<i>Durvillea potarum</i>	3,33	77	23
Bacteria	<i>A. Vinelandii</i>	0,79 - 5,66	-	-
	<i>Pseudomonas spp.</i>	1,50 - 5,25	-	-

Industrialmente, el alginato es extraído en su totalidad de las algas. En ellas el ácido algínico se encuentra formando sales con distintos iones como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , Sr^{+2} y Ba^{+2} . Es extraído mayoritariamente en forma de alginato de sodio debido a que esta sal es soluble en agua fría a diferencia, por ejemplo, de las sales de calcio o magnesio las cuales son insolubles en agua [12]. Por otro lado, estudios recientes buscan también realizar la extracción a partir de bacterias, puesto que al conocer la ruta sintética en estas especies se busca poder variar las condiciones y obtener alginatos con características, tanto de peso molecular como de la composición (relación entre M/G), diseñadas para un uso específico [13]. Dependiendo de la secuencia y proporción entre sus monómeros, el alginato puede presentar diversas características lo que le confiere sus propiedades y por ende sus variadas aplicaciones.

2.1.2 Propiedades y aplicaciones

En términos generales, el alginato es un material no tóxico, biodegradable y biocompatible por lo que es interesante su estudio para aplicaciones en el campo alimenticio y biomédico [14]. En el campo alimenticio, el alginato es utilizado como espesante, estabilizante para emulsiones y también en la elaboración de films para el empaque de alimentos. En el campo biomédico, el alginato es empleado para la elaboración de apósitos para el curado de heridas [15], para encapsulamiento de fármacos, impresiones dentales, así como para la regeneración de tejidos [13, 16].

En cuanto al peso molecular, se puede encontrar alginato de sodio en un rango entre 32 a 400 kDa disponible comercialmente [13]. Esta propiedad está asociada a su viscosidad, la cual, a su vez, varía de forma inversa con la variación del pH. Así a un valor de pH entre 3 a 3,5 alcanza un máximo debido a la protonación de sus grupos carboxílicos lo que causa interacciones de tipo enlace de hidrógeno que dificulta la fluidez del polímero en solución [13].

Adicionalmente, el peso molecular también está relacionado con la actividad antioxidante de este polímero. Estudios previos muestran que conforme el peso molecular del polímero disminuye, la actividad antioxidante aumenta [17-20]. En los estudios se trabajó con una muestra de alginato y mediante diferentes procesos de despolimerización (enzimática, térmica e irradiación gamma), se cortaron las cadenas del polisacárido para luego evaluar su actividad antioxidante. Para el análisis de actividad antioxidante se realizaron ensayos *in vitro* frente a radicales superóxidos e hidróxidos, así como de radicales 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) y ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS). Las muestras iniciales del alginato se encontraban en un rango de 200 a 310 kDa y se llegaron a pesos moleculares alrededor

de 70 kDa e inclusive menores a 10 kDa. Esta tendencia se debe a que al romperse las cadenas se forman nuevos grupos hidroxilos, carbonilos o carboxílicos que conjuntamente con los enlaces C-H actúan por un mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno [21]. Asimismo, también hay evidencia que se forma un doble enlace entre los carbonos C4 y C5 del anillo piranosa al observarse el aumento de absorbancia a 234 nm [19, 20, 22]. Este doble enlace actúa por un mecanismo de adición de radicales que resulta siendo más efectivo en comparación con el mecanismo de transferencia de átomos de hidrógeno para el caso de la actividad antioxidante.

Otra propiedad importante del alginato es su capacidad para la formación de geles, para lo cual se utiliza comúnmente el entrecruzamiento iónico, y puede darse mediante el método de inmersión o por mezclado [23, 24]. En el método de inmersión se elabora previamente un film de alginato de sodio y luego se entrecruza con el uso de un ion multivalente en solución; mientras que en el otro método, de mezclado, se trabaja con el alginato y el catión multivalente en solución, y seguidamente se forma el film. El estudio comparativo de Crossingham y colaboradores [23] muestra que los films obtenidos por el método de inmersión son mas densos y presentan mejores propiedades mecánicas. Esto también concuerda con el estudio de Rhim [24] quien al comparar ambos métodos observó mayores valores en la resistencia a la tracción para el caso de los films entrecruzados por inmersión.

El entrecruzamiento iónico utiliza cationes divalentes como Ca^{+2} , Mn^{+2} , Ba^{+2} , Cu^{+2} y Zn^{+2} o trivalentes como Al^{+3} y Fe^{+3} [3, 16, 25] siendo el ion Ca^{+2} el más utilizado. La investigación de Liling *et al.* [25] compara films de alginato entrecruzados con Ca^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} y Al^{+3} donde el film entrecruzado con Ca^{+2} presenta mejor resistencia a la tracción, así como una mejor transmisión de luz. La diferencia en las propiedades de los diferentes films entrecruzados se debe a la forma en como los iones interactúan con las cadenas del alginato, por ejemplo, el ion Ba^{+2} interactúa con los bloques G y M, Sr^{+2} solo con los bloques G, y Ca^{+2} con bloques G y MG (Figura 2-2a) [26]. El ion Ca^{+2} interactúa con el átomo de oxígeno de los iones carboxilato de las unidades G del polímero por lo que las propiedades mecánicas del gel dependen del contenido del bloque G, así como del peso molecular del alginato. La interacción entre Ca^{+2} y las unidades G forma una estructura en forma de diamante conocida como “egg-box” tal como se muestra en la Figura 2-2b [13, 16, 27]. Adicionalmente, los iones Ca^{+2} son importantes cuando se utiliza en aplicaciones biomédicas pues estos iones participan en la etapa de hemostasia (donde se detiene el sangrado durante una herida) intercambiándose por iones sodio que están presentes en el exudado de heridas [28, 29].

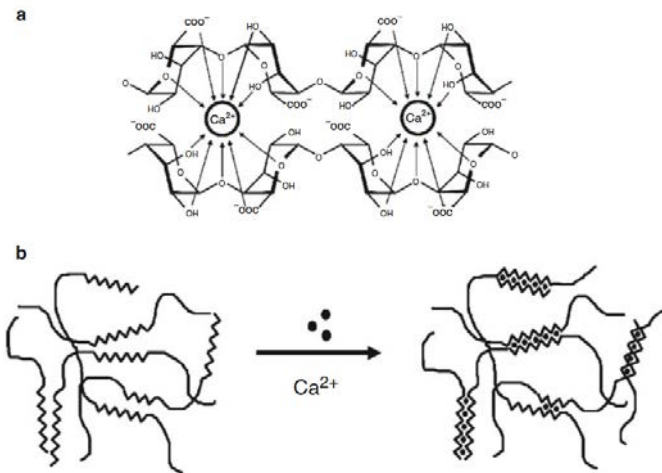


Figura 2-2. a) Formación de interacciones entre iones Ca^{+2} con alginato y b) Representación esquemática de la interacción alginato – Ca^{+2} [8].

Las películas de alginato tienen apariencia uniforme y son transparentes, a su vez, tienen la característica de ser buenas barreras para gases como oxígeno, vapor de agua y dióxido de carbono [27]. Sin embargo, por la naturaleza del alginato, éstas son solubles en agua y para evitar la disolución completa del film se realiza el entrecruzamiento de las cadenas con el uso de una solución de algún catión divalente, comúnmente iones Ca^{+2} [30, 31]. Estudios previos demuestran que al sumergir los films en solución acuosa de iones Ca^{+2} , ocurren dos reacciones en simultáneo [16, 31] la interacción entre Ca^{+2} y las unidades G del alginato (explicado anteriormente) lo que causa la insolubilidad de la superficie del film, así como la disolución de una parte del alginato. Durante este proceso es importante tanto el peso molecular como la relación M/G del polímero usado, así como la concentración de la solución de CaCl_2 y el tiempo que permanece el film sumergido en la solución [30]. El entrecruzamiento reduce la permeabilidad de vapor de agua [27, 30] y también se observa que el hinchamiento en agua del film disminuye conforme aumenta el porcentaje de la solución de CaCl_2 [16, 27]. Costa y colaboradores explican esta tendencia mencionando que al aumentar la concentración de iones Ca^{+2} habrá mayor grado de entrecruzamiento con las cadenas de alginato y por lo tanto habrá menos sitios donde las moléculas de agua se absorban [27]. Asimismo, este estudio también observó que el entrecruzamiento favorece una mejor resistencia a la tracción, pero menor alargamiento de rotura [16, 27]. En cuanto a la concentración recomendada para el entrecruzamiento, el estudio de Costa *et al.* [27] sugiere el uso de 1,5% (w/v) de CaCl_2 pues, de acuerdo con sus resultados, de este modo se obtendría una buena resistencia a la tracción y no se pierde del todo la flexibilidad. A su vez, la investigación realizada por Shahzad y colaboradores [32]

demuestra que, a concentraciones de CaCl_2 mayores a 3% (w/v), los films son muy rígidos por lo que ellos recomiendan una concentración entre 0,5 y 1% (w/v).

Otra forma de mejorar las propiedades mecánicas de los films de alginato es mediante la adición de un plastificante. Como se vio anteriormente, si bien es necesario entrecruzar con Ca^{+2} para evitar disolución del film, esto también hace que el film se vuelva frágil por lo que es necesario el uso de plastificantes. Las moléculas del plastificante ayudan a separar las cadenas del alginato y por lo tanto disminuyen la rigidez de los films [30]. Entre los plastificantes que comúnmente se usan para este fin, se encuentran el glicerol, el sorbitol, el polietilenglicol (PEG) y la fructosa, cuyas estructuras se observan en la Figura 2-3. De acuerdo con Olivas y colaboradores [30] el uso de sorbitol produce films con mayor rigidez en comparación a los obtenidos con glicerol. Por otro lado, encontraron que con el uso de sorbitol o fructosa se obtienen menores valores de permeación de vapor de agua.

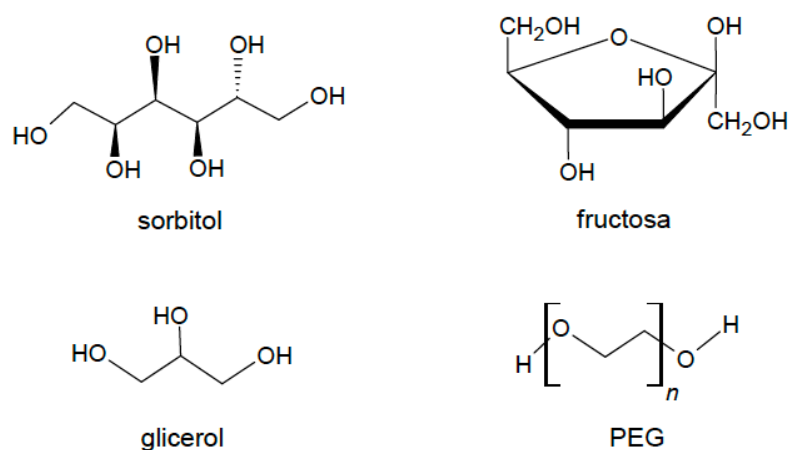


Figura 2-3. Estructura química de plastificantes para films de alginato

Por último, el alginato también puede formar micropartículas, las cuales presentan un diámetro entre 1 a 1000 μm . Entre las técnicas para la elaboración de micropartículas se encuentra la gelación iónica, en donde primero se forma una emulsión utilizando el alginato en solución acuosa junto con una fase orgánica, y luego se añade un ion en solución que interactúa con la superficie de las micropartículas. Las características de las micropartículas varían dependiendo del alginato usado (peso molecular y relación entre sus monómeros M/G) así como de su concentración y también de otros factores como las condiciones de gelificación y el uso de surfactante [33].

2.2 Aloe vera

2.2.1 Clasificación y características

Aloe es un género de plantas de la familia Xanthorrhoeaceae [34-36], aunque otros investigadores consideran que el *Aloe* pertenece a la familia Liliaceae [37-40], y otros lo colocan en su propia familia denominada Aloaceae [38, 40, 41]. El *Aloe* posee más de 400 especies [34, 36, 42] de las que se conocen 4 especies principales que tienen efectos terapéuticos: *Aloe barbadensis* Miller, *Aloe ferox*, *Aloe arborescens* y *Aloe spicata*. De estas la especie *Aloe barbadensis* Miller es la más potente por lo que ha sido utilizada desde hace muchos años en la medicina tradicional y por lo tanto es la más estudiada debido a su actividad biológica [35, 40, 43].

En cuanto a su taxonomía, el nombre oficial de esta especie es *Aloe vera* (L.) Burm. f. de acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura botánica; sin embargo, también presenta otros sinónimos como *Aloe elongata* Murray, *A. officinalis* Forsk., *A. chinensis* Bak., *A. barbadensis* Mill., entre otros, siendo este último el nombre más utilizado [44, 45]. También es conocido comúnmente como sábila, aloe de Barbados y aloe de Curazao [43, 46, 47].

El *Aloe* es una especie de planta suculenta ya que posee un tejido parenquimático en el cual se puede almacenar agua y esto a su vez le permite a la planta sobrevivir por períodos largos en terrenos áridos (planta Xerófita) [34, 35, 37]. Asimismo, esta planta puede sobrevivir a temperaturas de 40°C como también a temperaturas muy bajas [34, 44]. Esta especie es nativa de regiones áridas de África, Asia y el sur de Europa [38, 48, 49]. Luego, se cultivó para su comercialización en Aruba, Bonaire, Haití, India, África del Sur, Estados Unidos y Venezuela [34, 44].

La planta está compuesta por hojas triangulares que llegan a medir entre 60 a 100 cm de largo, se pueden agrupar entre 12 a 16 hojas formando una roseta y las hojas poseen espinas a los lados [34, 40]. Las hojas jóvenes poseen un color verde brillante con pequeñas manchas blancas y conforme alcanzan la madurez se tornan de un color verde grisáceo y desaparecen las manchas blancas [40, 43]. Además, la planta también tiene flores de forma tubular con una longitud entre 25 a 35 cm y tienen un color amarillo brillante [44]. La planta alcanza la madurez entre los 4 a 6 años y su tiempo de vida es de aproximadamente 12 años [40, 44]. Las partes de la planta se observan en la Figura 2-4.

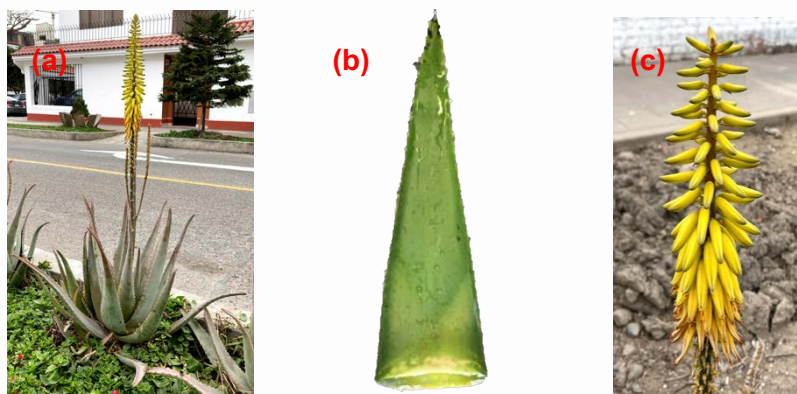


Figura 2-4. a) Planta completa, b) hoja y c) flor de Aloe vera.

Como se ha mencionado anteriormente, el Aloe vera es una planta utilizada en la medicina tradicional desde hace muchos años. Debido a ello existen diversos estudios para analizar los componentes químicos de la planta y determinar cuales de ellos son los que le confieren su actividad biológica ya conocida.

2.2.2 Composición química

En la literatura se pueden encontrar muchos estudios para determinar la composición química de la planta de Aloe vera; sin embargo, también podemos observar que muchos de ellos resultan contradictorios al asegurar la presencia o ausencia de ciertos componentes. Estas discordancias se deben a que la composición depende de factores tales como la edad de la planta, clima, tipo de la tierra de cultivo, tipo de agua usada para el riego (si es salina o no) [50], estación del año y la cantidad de radiación solar incidente [34, 40, 51-55]. Asimismo, otro factor importante es el proceso elegido para la separación e identificación de los distintos componentes [55].

En las hojas se pueden diferenciar tres partes: la cutícula o piel color verde, el exudado color amarillo y una matriz interna denominada comúnmente gel (ver Figura 2-5). La cutícula es la capa protectora, contiene células que producen carbohidratos (como celulosa y hemicelulosa) y proteínas [34, 39, 56]. En la siguiente capa se encuentra el exudado, el cual es un líquido viscoso de color amarillo que se compone de derivados de la antraquinona. Dentro de los compuestos más conocidos se encuentra un glucósido antraquinónico llamado aloína o barbaloína (mezcla de isómeros aloína A (enantiómero S) y aloína B (enantiómero R)) utilizado como laxante [4, 34, 39, 43 57, 58] y, en el estudio realizado por Saccu y colaboradores [58] encontraron adicionalmente los compuestos aloesin y aloeresin A (ver estructuras químicas en la Figura 2-6). Finalmente, en la capa interna se encuentra el tejido parenquimal donde está el gel mucilaginoso el cual se encarga de retener agua [38] y es la parte de la planta

más utilizada. Las células parénquimas tienen tres componentes – la pared celular, organelos y el gel - los cuales poseen diferente composición en cuanto a polisacáridos. En la Figura 2-7, se puede observar un esquema de esta capa interna, donde se señala que las células poseen una morfología diferente entre ellas y a su vez su composición en cuanto a polisacáridos [37].

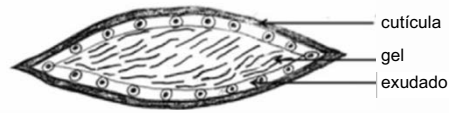


Figura 2-5. Estructura transversal de la hoja de Aloe vera [34].

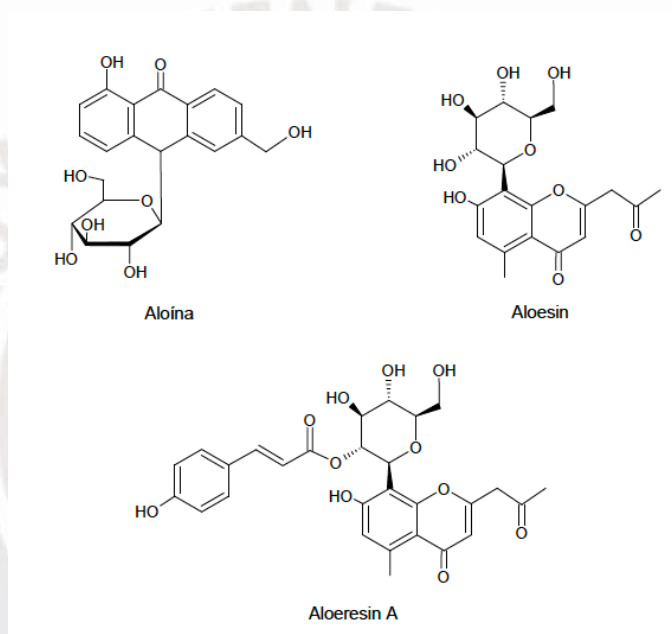


Figura 2-6. Estructura química de compuestos presentes en el exudado del Aloe vera.

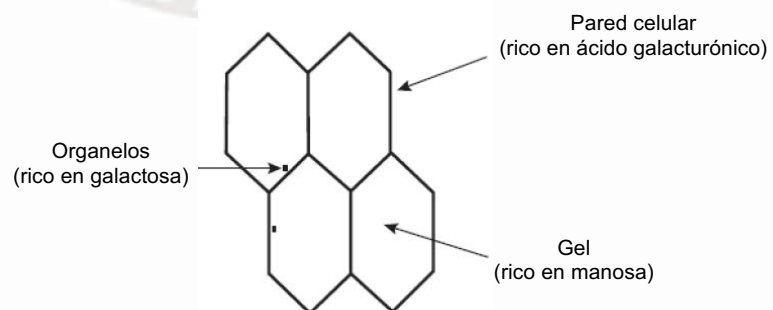


Figura 2-7. Esquema del tejido parenquimático [37].

El gel de Aloe vera tiene una textura suave, es húmedo y resbaloso. Tiene un contenido de agua entre 98,5 [59] a 99,5% [40] y el resto lo conforman más de 75 compuestos que tienen actividad biológica y le confieren sus propiedades terapéuticas. Con respecto a la masa seca del gel, se considera que este está constituido por 55% (w/w) de polisacáridos, 17% (w/w) azúcares, 16% (w/w) minerales, 7% (w/w) proteínas, 4% (w/w) lípidos y 1% (w/w) de compuestos fenólicos [60]. En la Tabla 2-2 se han colocado algunos de los componentes reportados del gel de Aloe vera.

Tabla 2-2. Compuestos reportados para el gel de Aloe vera.

Tipo de compuesto	Compuesto	Referencia
Carbohidrato	Acemanano, glucomanano y otros derivados, galactano, veracilglucano A, veracilglucano B, veracilglucano C, manosa-6-fosfato	[4, 34, 37, 61]
Enzima	Bradiquinasa, celulasa, oxidasa, catalasa, amilasa, carboxipeptidasa	[62-65]
Inorgánico (Minerales)	Cloro, potasio, sodio, calcio, magnesio, manganeso, cobre, zinc, cromo, hierro	[40, 44, 54, 63, 65]
Aminoácidos (esenciales y no esenciales)	Alanina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina, valina	[4, 65]
Lípidos	Colesterol, campesterol, lupeol, β -sitosterol	[39, 44]
Proteínas	Lectina, aloctin A	[4]
Vitaminas	A (β -caroteno), C (ácido ascórbico), E (α -tocoferol), B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), colina, B9 (ácido fólico)	[44, 60, 63, 64, 66, 67]
Otros	Cinamoil-C-glucosil-cromona (antioxidante)	[34, 68]

De todos los componentes que posee el gel, muchas investigaciones consideran que el polisacárido acemanano es el componente mayoritario y a su vez el responsable de la actividad biológica, aunque otros consideran que en realidad el efecto terapéutico se debe a la sinergia de todos sus componentes [4, 54, 69]. El acemanano es un polisacárido constituido por unidades de manosa (Man) parcialmente acetiladas, unidades de glucosa (Glu) y en menor proporción contiene unidades de galactosa (Gal) [70-72] y posee un peso molecular que varía entre 30 a 50 kDa [42, 54, 73]. Las unidades de manosa se unen mediante enlaces β -(1-4) con una unidad de glucosa y, además, en una de las unidades de manosa se encuentra una ramificación de galactosa con enlace α -(1-6) tal como se muestra en la Figura 2-8 [71].

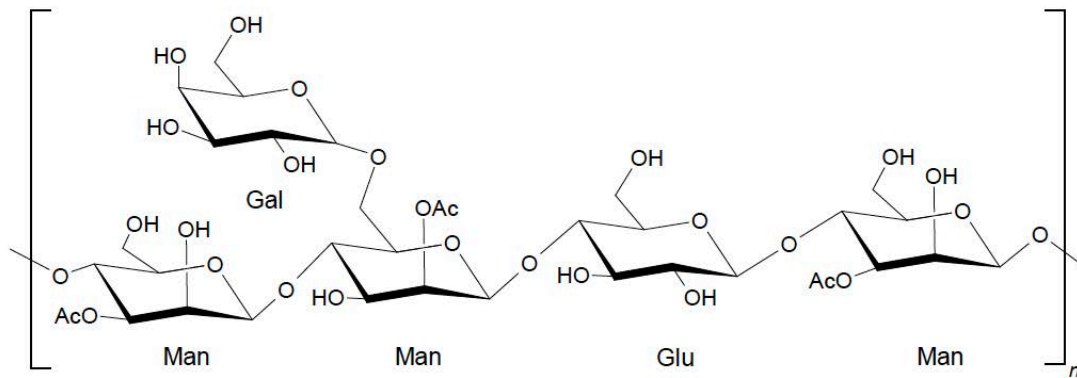


Figura 2-8. Estructura química del acemanano (polisacárido mayoritario del Aloe vera).

Por otro lado, la investigación realizada por Salah y colaboradores [49] muestra la importancia de la presencia del grupo acetilo sobre las unidades de manosa. En este estudio se realizó la extracción del polisacárido del gel fresco de Aloe vera y realizó la desacetilación en un ambiente controlado con NaBH_4 . Seguidamente, se evaluaron parámetros como el porcentaje desacetilación (entre 50 a 100% de desacetilación), el peso molecular y la actividad biológica. Ellos observaron que a mayor grado de desacetilación, disminuye la actividad antibacterial (frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* y *P. aeruginosa*). Del mismo modo, Chokboribal [72] realizó la extracción del acemanano y posteriormente la desacetilación de este mediante hidrólisis básica. Este estudio muestra que al ir disminuyendo los grupos acetilos en el acemanano, el polisacárido se vuelve más hidrofóbico (disminuye la solubilidad en agua y aumenta el ángulo de contacto). Además, este último estudio muestra que el polímero con 100% de desacetilación tiene una menor actividad biológica, pues redujo la síntesis de las proteínas colágeno tipo I y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en ingles) que están involucrados en el proceso de curación de heridas. Asimismo, se encontró que se reduce la habilidad para inducir la proliferación de células.

El gel de Aloe vera se oxida rápidamente con el aire y al descomponerse pierde su actividad biológica por lo que muchos estudios se dedicaron a establecer técnicas para su estabilización y esterilización. Entre las técnicas usadas, se pueden encontrar las que se dan en frío y otras con aplicación de calor. Las técnicas en frío incluyen el uso de enzimas para inhibir la aparición de organismos aeróbicos o el uso de luz ultravioleta y microfiltración [74, 75]; mientras que los tratamientos con calor utilizan la pasteurización [76, 77]. Este último es el más usado, pero si no se realiza adecuadamente la actividad biológica del gel disminuye [38, 40, 69].

Un estudio realizado por Rodríguez y colaboradores [38] analizó diferentes muestras del gel de Aloe pasteurizadas a temperaturas de 65°C, 75°C y 85°C por 15 y 25 minutos. Seguidamente se aisló el polisacárido acemanano y se determinó que la actividad biológica disminuye en mayor medida cuando la temperatura fue de 85°C. Debido a ello se recomiendan temperaturas de pasteurización entre 60 a 70°C por periodos cortos de tiempo (máximo 15 minutos). Otro estudio realizado por Saberian y colaboradores [69] mostró el efecto de la pasteurización del gel al conservar por 30 días, una porción a 4°C y otra a 25°C, y evaluar el contenido del polisacárido glucomanano por espectroscopía, el contenido de ácido ascórbico y la actividad antioxidante. Saberian y colaboradores encontraron que los parámetros evaluados disminuyen, y en mayor medida, si es que el gel se conserva a 25°C.

2.2.3 Actividad biológica y aplicaciones

El Aloe vera es una planta a la que se le han atribuido muchas propiedades terapéuticas asociadas a sus diversos compuestos químicos. En cuanto al gel se considera que este ayuda en el curado de heridas y los componentes reportados que participan son manosa-6-fosfato que ayuda a activar la producción de colágeno y acemanano que ayuda a estimular la regeneración del tejido en el área afectada [34, 44].

Otra propiedad que posee el gel de Aloe vera es la actividad antiinflamatoria. Se ha reportado que componentes como lupeol, β -sitosterol, veracilglucano B, veracilglucano C, bradiquinasa y C-glucosil-cromona tienen propiedad antiinflamatoria. En el caso de la bradiquinasa estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que esta enzima degrada un compuesto que causa dolor [44], y en el caso de C-glucosil-cromona bloquea la oxidación del ácido araquidónico evitando la síntesis de prostaglandina E2 sustancia responsable de inflamación [4, 44].

Por otro lado, también se ha reportado actividad antioxidante del gel. Compuestos como flavonoides y fenoles serían los responsables de este efecto en pruebas *in vitro* donde se observa la reacción con radicales superóxidos (O_2^-) y peróxido (ROO•) [4, 34].

Asimismo, algunos investigadores han encontrado actividad antimicrobiana del gel de Aloe vera frente a bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus faecalis* [34, 39]. Los carbohidratos presentes en el gel como el acemanano son los componentes que han sido estudiados contra estas bacterias. Igualmente, también se ha encontrado actividad antiviral producida por las antraquinonas presentes en el exudado frente a virus como el de herpes simple [4, 39].

Entre otras propiedades terapéuticas, se ha reportado también la actividad antidiabética para el caso de la diabetes mellitus. De acuerdo a la literatura se tiene evidencia que el gel de Aloe vera ayuda a disminuir el nivel de azúcar en sangre [39]. También se ha reportado actividad antitumoral, la cual se le atribuye a los polisacáridos presentes en el gel. Por último, también se conoce sobre el efecto laxativo debido a la presencia de antraquinonas en el exudado de la planta [44].

Debido a todas las propiedades terapéuticas descritas, el Aloe vera es usado en la industria alimentaria en la formulación de bebidas. En la industria de cosméticos y productos para el cuidado de la piel como ingrediente de shampoo, cremas, ungüentos, geles, jabones, limpiadores faciales [4, 40]. Asimismo, en el área médica es posible utilizarlo como ingrediente para el desarrollo de apósitos para el curado de heridas.

2.3 Uña de gato

Uña de gato es el nombre común de la especie *Uncaria tomentosa*. Es una planta nativa de Perú y de otras partes de América del Sur y América Central. Crece en zonas tropicales y es una planta trepadora tipo liana que puede llegar a medir 40 metros de longitud [78]. La corteza es leñosa, posee hojas ovaladas y espinas curvas como se muestra en la Figura 2-9, de las cuales la corteza y las raíces son las partes más usadas.



Figura 2-9. Uña de gato (*Uncaria tomentosa*) [79].

Esta planta es muy utilizada en la medicina tradicional por su actividad antiinflamatoria, anti asmática, anti artrítica, antiviral, entre otras. Estas propiedades terapéuticas se deben a diversos compuestos entre los que se encuentran reportados alcaloides oxindoles, esteroides, flavonoides, fenoles, de los cuales los alcaloides oxindoles son considerados los principales compuestos que le confieren sus efectos medicinales [80, 81]. Los alcaloides oxindoles se pueden clasificar en tetracíclicos, que actúan sobre el sistema inmune celular, y pentacíclicos, que actúan en el sistema

nervioso central [80, 81]. Las estructuras químicas de los alcaloides oxindoles se muestran en la Figura 2-10.

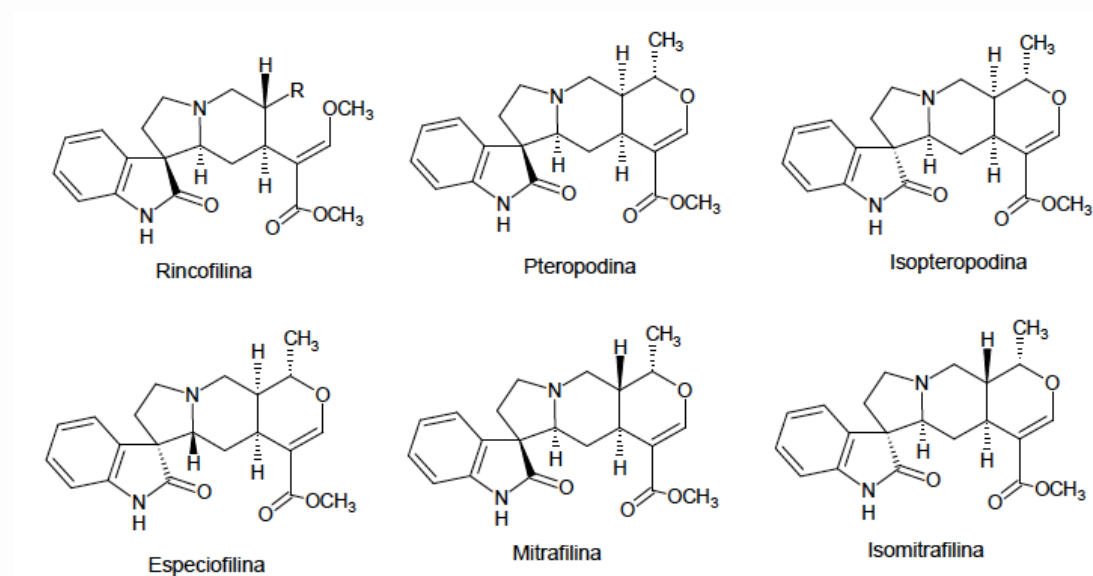


Figura 2-10. Estructura química de alcaloides oxindoles presentes en la uña de gato.

2.4 Apósitos para heridas

2.4.1 Proceso de curado de heridas

La piel es el órgano más extenso del ser humano, está conformado por tres capas principales: epidermis (externa), dermis (media) e hipodermis (interna). Dentro de cada una de ellas se encuentran los diferentes componentes (ver Figura 2-11) que permiten que cumpla sus diversas funciones [82]. Entre las funciones que cumple se encuentra que ayuda a regular la temperatura corporal, protege al cuerpo del ingreso de microorganismos, absorbe o libera sustancias y transmite señales de dolor, calor, frío, presión y vibración. Una herida ocurre cuando la piel sufre una ruptura de su estructura y se interrumpe su función [82, 83], y el proceso de curado es un proceso complejo que tarda en completarse varias semanas.

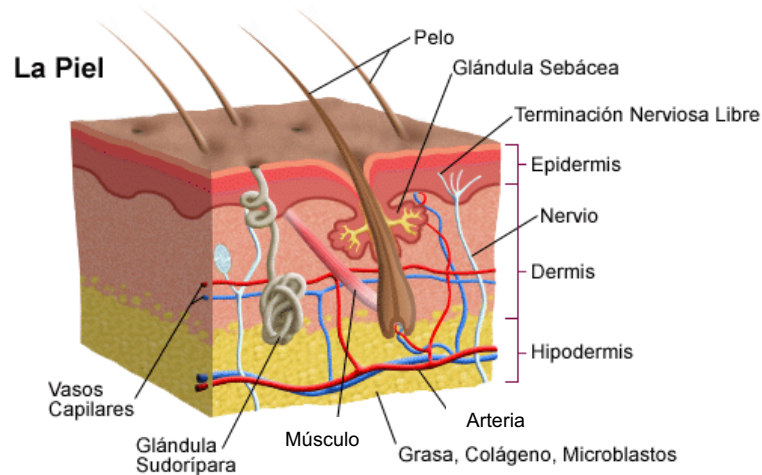


Figura 2-11. Componentes de la piel [84].

El proceso de curado de heridas es un proceso biológico que involucra 4 etapas que se superponen entre sí, las cuales son: i) hemostasia e inflamación, ii) migración, iii) proliferación y iv) remodelación. La hemostasia y la inflamación son los procesos que ocurren primero cuando se produce una herida. Durante la hemostasia se forman coágulos para detener el sangrado y estos a su vez ayudan a dar soporte a la piel y protegerla contra microorganismos. En la inflamación, que ocurre en simultáneo con la hemostasia, hay células que se encargan de limpiar la herida retirando material necrosado y preparan el sitio para la síntesis de nuevo tejido. Seguidamente, durante la migración, las células epiteliales y fibroblastos se trasladan al área afectada para luego en la proliferación iniciar la regeneración del tejido con colágeno y formar nuevos vasos sanguíneos. Finalmente, en la fase de remodelación el nuevo tejido adquiere mayor fuerza y aumento de flexibilidad [3, 85].

Las heridas pueden clasificarse en agudas cuando demoran en curar entre 8 a 12 semanas; mientras que las crónicas demoran más de 12 semanas debido a la presencia de otras enfermedades como diabetes, úlceras, infección, entre otras afecciones. Un parámetro importante que varía durante el proceso de curado es el pH. La piel sana posee un pH que varía entre 4 a 6, normalmente lo reportan con un valor de 5,5 y como consecuencia de una herida el valor de pH aumenta hasta 7,4 debido a la presencia de sangrado y otros fluidos propios de la ruptura de la piel. Inclusive si se trata de una herida grave, se ha reportado que el pH se encuentra en un rango alcalino entre 7,2 a 8,9 lo cual afecta a las reacciones que se dan en el proceso de curado. Este pH elevado puede deberse a la producción de amoníaco durante el proceso de hidrólisis de la urea por la presencia de microorganismos [86]. Es por ello por lo que resulta importante un adecuado tratamiento para las lesiones de modo que se pueden controlar

y desarrollar todas las fases de curado correctamente. Entre las prácticas más comunes para el tratamiento de heridas se encuentra el uso de apósitos, los cuales ayudan a proteger el área afectada de microorganismos y brindar un ambiente adecuado para que la piel pueda regenerar el tejido dañado.

2.4.2 Tipos de apósitos y características

Existe una gran variedad de apósitos para heridas y estos se pueden clasificar en tradicionales y modernos [1]. Los apósitos tradicionales como el algodón o las gasas presentan las desventajas de que son muy absorbentes, lo que causa que la herida no posea un ambiente húmedo adecuado. Además, pueden adherirse a la herida, y al retirarlos pueden causar un daño mayor en la piel. Entre los apósitos modernos podemos encontrar los poliméricos, y dentro de ellos los biopolímeros son de gran interés por ser biocompatibles y biodegradables [77]. Además, también pueden participar durante alguna de las fases del curado de heridas y ayudan a controlar mejor la humedad del área dañada. Asimismo, los apósitos poliméricos pueden formar diferentes estructuras como membranas, esponjas, hidrogeles e hidrocoloides [82].

Para la elaboración de apósitos se pueden utilizar biopolímeros como la quitosana, el colágeno, el ácido hialurónico, el alginato, entre otros. A su vez, también pueden formarse de la mezcla de diferentes polímeros a modo de mejorar las propiedades mecánicas del apósito y se puede incluir en su formulación fármacos para darle al apósito alguna propiedad en particular. En general, se desea que los apósitos presenten poca adherencia a la piel, de modo que sea posible retirarlo fácilmente, mantener un ambiente de humedad adecuado, que sea permeable frente a gases como vapor de agua y aire, que tengan buena protección contra microorganismos, que puedan absorber exceso de exudado y que su frecuencia de cambio sea mínima [85].

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Elaborar membranas de alginato – Aloe vera bidimensionales y tridimensionales y evaluar sus propiedades físicas y químicas para su potencial aplicación como apósitos.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el alginato de sodio (AL) mediante espectroscopía UV-visible, espectroscopía FT-IR, viscosimetría capilar, cromatografía por permeación de gel (GPC) y ángulo de contacto.
- Caracterizar el gel de Aloe vera (AVG) mediante microscopía óptica, espectroscopía FT-IR, cromatografía por permeación de gel (GPC) y actividad antioxidante.
- Elaborar membranas bidimensionales de AL-AVG y AL con glicerol por técnica de evaporación del disolvente con distintas condiciones (proporción AL/AVG y concentración de plastificante).
- Elaborar membranas tridimensionales de diferentes concentraciones de AL-AVG mediante la formación de micropartículas con uso de sonda de ultrasonido y posterior técnica de evaporación del disolvente.
- Caracterizar las membranas bidimensionales y tridimensionales mediante medida del espesor, transparencia, análisis de superficie por SEM y espectroscopía FT-IR.
- Evaluar las propiedades de absorción, degradación en diferentes medios (pH y presencia de la enzima lisozima), carácter hidrofílico/hidrofóbico mediante medición de ángulo de contacto y actividad antioxidante (ensayo de decoloración del radical ABTS) de las membranas elaboradas.
- Elaborar una membrana tridimensional de alginato con extracto de uña de gato y analizar su superficie por SEM. Evaluar la propiedad de absorción y actividad antioxidante (ensayo de decoloración del radical ABTS).

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reactivos, Equipos y Materiales

4.1.1 Reactivos

Todos los reactivos se utilizaron sin purificación previa y fueron de grado analítico, a menos que se indique lo contrario.

- **Sigma-Aldrich**
 - Sal de sodio del ácido algínico, lote 05008JA
 - Poloxamer 407
 - Acido 2, 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico), ABTS
 - Persulfato de potasio
 - Albúmina de suero bovino (BSA) $\geq 96\%$
 - Lisozima
 - Bromuro de potasio
- **Merck**
 - Cloruro de calcio anhidro
 - Hexano
 - Cloruro de sodio
 - Sal disódica del ácido etilendiamintetraacético (EDTA)
 - Sulfato de sodio anhidro
 - Tris(hidroxietil)aminometano
- **JT-Baker**
 - Etanol absoluto
- **Otros**
 - Aloe vera. Las hojas se adquirieron en el herbolario "Allhoja", San Borja.
 - Agua ultrapura (grado Milli-Q, pH 6,01 y resistividad 18,2 M Ω .cm). Obtenida de un sistema de osmosis inversa Barnstead™ Nanopure™ que cuenta con filtro de fibra hueca con 0,2 μ m de tamaño de poro.
 - Estándares de pululano PSS Polymer Standards Service GmbH (6-800 kDa).
 - Uña de gato en hilachas marca Naturandes.

4.1.2 Equipos

Todos los equipos utilizados en esta tesis se encuentran en la Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú.

- i. Viscosímetro Ubbelohde Technical glass products Inc. 1C ($K= 0,02871 \text{ mm}^2/\text{s}^2$).
- ii. Liofilizador Yamato modelo DC401.
Temperatura de enfriamiento de -45°C y presión de trabajo entre 10-20 Pa.
- iii. Centrifuga LW Scientific modelo C5.
Hasta 4000 rpm.
- iv. Espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer modelo Frontier.
Consta de una fuente de luz láser de He-Ne, detector de LiTaO_3 (tantalato de litio), una barra de carburo de silicio como fuente de radiación y un detector MCT (teluro de cadmio mercurio). Además, se utilizó el accesorio de detección por reflectancia total atenuada (Universal ATR con un cristal de diamante) en algunos casos y el análisis por transmisión en otros. El procesamiento de los espectros se realizó con el programa OriginPro 2016.
- v. Espectrofotómetro UV-Vis Genesys 50.
Cuenta con una lámpara de xenón, detector de fotodiodos dual de silicón, rango entre 190 a 1100 nm. El procesamiento de los espectros se realizó con el programa OriginPro 2016.
- vi. Cromatógrafo por permeación de gel Malvern Viscotek GPC system.
Posee un detector de índice de refracción y un *loop* de 100 μL . Se utilizó una columna para polímeros aniónicos Malvern Instruments A6000M General Mixed Aq, compuesta de polihidroximetacrilato poroso; y con dimensiones de 300 x 8 mm, tamaño de partícula de 13 μm . El procesamiento de los cromatogramas se realizó con el programa OmniSEC.
- vii. Microscopio óptico Leica, modelo DM1000 LED.
Cuenta con objetivos de magnificación de 4x, 10x, 40x y 100x. Para adquirir las imágenes se utilizó el programa Leica application Suite.
- viii. Microscopio electrónico DeLong Instruments, modelo LVEM5.
Con cañón de emisión de campo tipo Schottky con cátodo de ZrO/W [100] y sistema de ultra alto vacío que permite la magnificación de $10^5\times$ y resolver detalles de 10^{-7} mbar hasta 4 nm.
- ix. Baño de agua Memmert modelo WNE 14.
Rango de temperatura ajustable entre 10°C a 95°C (resolución $0,1^\circ\text{C}$).

- x. Goniómetro Ramé-Hart modelo 250.
Cuenta con un sistema de dispensador automático (tip de 250 μ L), cámara digital serie U4 (520 fps). Los datos se procesaron con el programa DROPImage Advance.

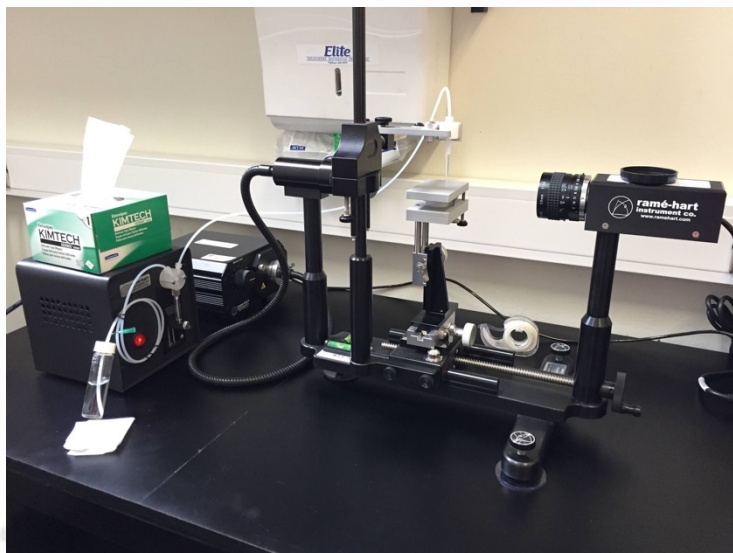


Figura 4-1. Goniómetro Ramé-Hart modelo 250.

- xi. Sonicador Sonics, Vibracell modelo VCX 750.
De 20 kHz de frecuencia. Cuenta con una sonda modelo CV 334.
- xii. Sensor de humedad y temperatura Yuwese modelo SSN-22ET.
El rango de operación para temperatura esta entre -40 a 100°C y el de humedad entre 0 a 100%. Los datos se obtenidos se descargaron en el programa Data Logger.

4.1.3 Materiales

- Placas Petri de vidrio de 9,5 cm de diámetro.
- Filtros para jeringa Merck-Millipore de membrana de nylon de 0,45 μm y 33 mm de diámetro.
- Filtro Merck-Millipore de membrana de nylon con tamaño de poro de 0,22 μm .
- Placas Petri de poliestireno ISO LAB de 9,5 cm de diámetro.
- Tubos de centrifuga ISO LAB de 50 mL con base.
- Membrana de diálisis Spectrum Labs con MWCO 12-14 kDa.
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor para UV-vis.
- Portamuestras de vidrio de 7,5 cm x 2,5 cm.

4.2 Metodología

4.2.1 Caracterización de alginato de sodio

4.2.1.1 Espectroscopía UV-Vis

Se preparó una solución de alginato al 1% (w/v), se vertieron 25 mL sobre una placa Petri y se dejó secando a 50°C por 24 horas. Luego se mantuvo a temperatura ambiente en un desecador con humedad relativa <10%. Se obtuvo el espectro UV-Vis del film en el rango de 200 a 1100 nm con un intervalo de 2 nm.

4.2.1.2 Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se preparó una solución acuosa de alginato de sodio al 0,5% (w/v). Luego se vertieron 25 mL en una placa Petri y se dejó secando a 50°C por 24 horas. Se obtuvo el espectro FT-IR-ATR con 4 barridos, una resolución de 4 cm⁻¹ y en el rango de 400 a 4000 cm⁻¹.

4.2.1.3 Viscosimetría capilar

Se preparó una solución de alginato de sodio al 0,25% (w/v) en NaCl 0,1 M como solvente y se filtró con una membrana de nylon de 0,45 µm. Se utilizó un viscosímetro Ubbelohde 1C y un baño de agua estabilizado a 25°C donde se midieron los tiempos de flujo de la solución inicial y de tres diluciones. Se midieron los tiempos cuatro veces [87].

4.2.1.4 Cromatografía por permeación de gel (GPC)

Para la determinación de masas molares del alginato de sodio se utilizó la norma ASTM F2605-16 [88]. Para ello se preparó una solución de Na₂SO₄ 0,05 M y EDTA 0,01 M en agua ultrapura como fase móvil y se filtró al vacío con filtro membrana de 0,22 µm. Asimismo, se emplearon cinco estándares de pululano con pesos moleculares entre 6 a 400 kDa y se realizó una curva de calibración convencional. Tanto la muestra de alginato como los estándares se disolvieron en la fase móvil a una concentración de 1,5 mg/mL por 24 horas y con agitación magnética constante. Luego se filtraron con filtros jeringa de 0,45 µm y se inyectó al equipo GPC 250 µL de muestra en un ciclo de 100 µL. La columna usada fue marca Viscotek modelo A6000M para

polímeros y polisacáridos neutros y aniónicos de 300 x 8 mm. La cromatografía se realizó a un flujo de 0,5 mL/min por 40 minutos en una columna a 35°C.

4.2.1.5 Goniometría – Medición del ángulo de contacto

Se prepararon soluciones de alginato de sodio en agua al 0,5%, 1% y 1,5% (w/v). Luego, se colocaron 2,5 mL de cada solución sobre portamuestras rectangulares de vidrio y se dejaron secando en estufa a 50°C por 24 horas.

Para la prueba de medición de ángulo de contacto, se utilizó la técnica de la gota sésil con 5 µL de agua ultrapura como solvente y se realizaron 50 mediciones cada 0,005 s. Se analizaron 6 puntos diferentes en cada muestra.

4.2.2 Manipulación y caracterización del Aloe vera

4.2.2.1 Microscopía óptica

Se tomó una porción del gel fresco de Aloe vera, se lavó con abundante agua destilada y se colocó sobre un portamuestras. Se obtuvieron imágenes del gel en el microscopio óptico utilizando objetivos de magnificación 4x y 10x.

4.2.2.2 Determinación del contenido de agua del gel de Aloe vera

Una vez retirada la cutícula de la planta se cortó un pedazo del gel de forma cubica de aproximadamente 1 cm de lado. Se lavó con abundante agua destilada y se secó superficialmente el exceso de agua con papel filtro. Seguidamente, se pesó el gel y luego se dejó en una estufa a 50°C hasta que se alcanzó una masa constante. Se realizó este análisis por triplicado. Se calculó el contenido de agua mediante la ecuación 1.

$$\text{Contenido de agua (\%)} = \frac{m_{gel} - m_{gel\ seco}}{m_{gel}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

m_{gel} = Masa del gel fresco

$m_{gel\ seco}$ = Masa del gel seco

4.2.2.3 Extracción del gel de Aloe vera

Se realizó el proceso de extracción del gel propuesto por Silva y colaboradores [89]. Las hojas del Aloe vera se cortaron desde la base de la planta, luego se lavaron por encima con agua destilada para retirar toda la tierra de la superficie. Seguidamente, se cortó longitudinalmente por ambos lados para retirar las espinas y se quitó toda la cutícula. El gel separado se lavó con abundante agua destilada para retirar el exudado color amarillo; se cortó en trozos más pequeños y se homogenizó con una batidora de inmersión. La solución obtenida se pasó por una malla de colador, seguidamente se centrifugó por 10 minutos a 3500 rpm y finalmente se filtró con un filtro metálico a presión. Para el proceso de pasteurización, la solución filtrada se calentó a 65°C por 15 minutos. La solución homogénea se guardó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

4.2.2.4 Aislamiento del polisacárido mayoritario

Adicionalmente, se siguió el procedimiento descrito por Salah y colaboradores [49] para aislar el polisacárido mayoritario del gel de Aloe vera. Para ello se mezcló con etanol en proporción de 1 a 3 (v/v) y se dejó por 12 horas a temperatura ambiente. Se recuperó el sólido insoluble en etanol mediante el uso de centrifuga a 3000 rpm por 20 minutos. Luego el sólido se disolvió en agua destilada a una concentración de 1,5 mg/mL y se dejó agitando a temperatura ambiente. Se volvió a centrifugar para recuperar la solución la cual se colocó en membrana de diálisis con tamaño de poro 12-14 kDa en agua ultrapura y finalmente liofilizado.

4.2.2.5 Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se tomó un pedazo de gel fresco, se lavó con agua destilada y se colocó a secar en estufa a 50°C. Luego se molió, se mezcló con KBr en una proporción en peso de 1:100 (gel seco / KBr) y se elaboró una pastilla por compresión para su análisis por FT-IR por transmisión. Para obtener el espectro se realizaron 32 barridos entre 400 a 4000 cm^{-1} con 4 cm^{-1} de resolución.

Se repitió el procedimiento con el sólido obtenido luego de aislar el polisacárido mayoritario explicado en el ítem 4.2.2.4.

4.2.2.6 Cromatografía por permeación de gel (GPC)

El procedimiento para el análisis se siguió del estudio de Turner y colaboradores [90] con algunas modificaciones. Para la fase móvil se preparó una solución acuosa de NaCl 0,2 M y luego se filtró al vacío con filtro membrana de 0,22 µm. Para la preparación de la muestra se utilizó el gel extraído, se mezcló con la fase móvil en relación de 1:1 (v/v) y luego se filtró con filtro jeringa de 0,45 µm. Se inyectó al equipo GPC 250 µL de muestra en un ciclo de 100 µL. Se emplearon cuatro estándares de pululano con pesos moleculares entre 10 a 800 kDa y se realizó una curva de calibración convencional. La cromatografía se realizó a un flujo de 0,5 mL/min por 40 minutos en una columna (marca Viscotek modelo A6000M de 300 x 8 mm) a 35°C.

Se repitió nuevamente el procedimiento esta vez con el sólido recuperado luego de aislar el polisacárido explicado en el ítem 4.2.2.4. Se preparó una solución de 1,0 mg/mL con la fase móvil NaCl 0,1 M y se filtró con filtro jeringa de 0,45 µm.

4.2.2.7 Actividad antioxidante mediante ensayo de decoloración ABTS

El experimento se realizó siguiendo las pautas descritas en el estudio de Re *et al.* [91]. Se preparó una solución concentrada de ABTS 7 M y persulfato de potasio 2,45 M en agua ultrapura. Se dejó en ausencia de luz por al menos 12 horas y luego se diluyó en etanol hasta obtener una solución con una absorbancia de 0,7 (± 0,01) a 734 nm.

Se colocaron 10 mg de muestra liofilizada en 3 mL de la solución de ABTS diluída y se midió la absorbancia a 734 nm en diferentes lapsos de tiempo. Los tiempos estudiados fueron luego de 1, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos. Se evaluaron tres muestras: gel fresco extraído del Aloe vera, gel extraído mediante el procedimiento descrito en el ítem 4.2.2.3 y el acemanano aislado del gel (ítem 4.2.2.4). El porcentaje de inhibición se calculó haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

A_{control} = Absorbancia a 734 nm del control

A_{muestra} = Absorbancia a 734 nm de la muestra

4.2.3 Preparación de membranas bidimensionales

Las membranas bidimensionales se prepararon por la técnica de evaporación del disolvente. En la Figura 4-2 se muestra el esquema general de la elaboración de este tipo de membranas.

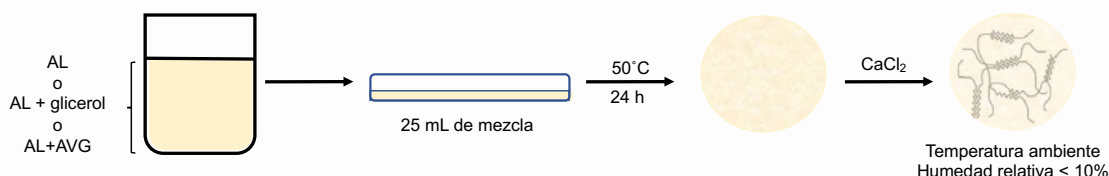


Figura 4-2. Esquema general de la preparación de films bidimensionales.

4.2.3.1 Alginato de sodio

Se preparó una solución acuosa de alginato de sodio (AL) al 1% (w/v) y se vertieron 25 mL sobre una placa Petri. Se dejó secando a 50°C por 24 horas. El film se mantuvo en desecador a temperatura ambiente y humedad relativa <10% hasta su uso.

4.2.3.2 Alginato y glicerol

Se preparó una solución de alginato al 1% (w/v) con agua ultrapura y se añadió glicerol al 15, 30 y 50% (w/w, con respecto a la masa de alginato) como plastificante. Luego se homogenizó la mezcla y se vertieron 25 mL sobre una placa Petri. Se dejó secando a 50°C por 24 horas y luego se mantuvo el film formado en un desecador a temperatura ambiente y humedad relativa <10% hasta su uso.

4.2.3.3 Alginato y gel Aloe vera

Se preparó una solución de AL 1% (w/v) y se añadió el gel de Aloe vera (extraído mediante el procedimiento explicado en la sección 4.2.2.3). Se mezcló hasta obtener una solución homogénea y se vertieron 25 mL sobre una placa Petri. Se dejó secando a 50°C por 24 horas y luego se entrecruzó con CaCl₂ al 1% de acuerdo al procedimiento descrito en el ítem 4.2.5. Los films se mantuvieron en desecador a temperatura ambiente y humedad relativa <10% hasta su uso. Las proporciones usadas entre AL y AVG junto con la codificación se detalla en la Tabla 4-1 donde los valores de 10, 15, 20 y 25 representan el porcentaje de gel de Aloe vera utilizados.

Tabla 4-1. Codificación y proporción entre AL y AVG usada en la elaboración de membranas bidimensionales.

Codificación	Solución AL al 1% (% v/v)	Gel Aloe vera (% v/v)
AL-AVG10 2D	90	10
AL-AVG15 2D	85	15
AL-AVG20 2D	80	20
AL-AVG25 2D	75	25

4.2.4 Preparación de membranas tridimensionales

Para las membranas tridimensionales se formaron micropartículas de alginato y posteriormente se prepararon las membranas por la técnica de evaporación del disolvente. En la Figura 4-3 se muestra el esquema general de la elaboración de este tipo de membranas.

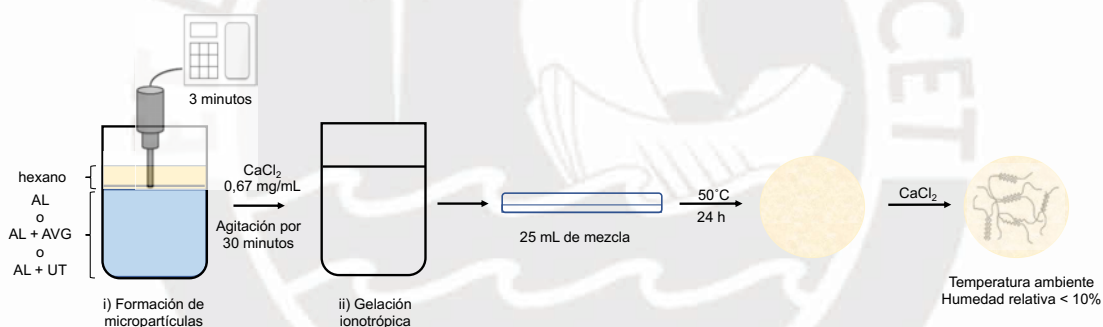


Figura 4-3. Esquema general para la elaboración de membranas tridimensionales.

4.2.4.1 Alginato de sodio

Para la formación de micropartículas de alginato, se colocaron 25 mL de alginato al 1% (w/v) con poloxamer al 0,5% (w/v, con respecto al volumen de la solución de alginato) y se añadió hexano en proporción 1:9 (v/v, hexano:solución de alginato). Se colocó en baño de hielo por 15 minutos y se aplicó energía de ultrasonido (20 kHz, 40% amplitud) por 3 minutos. Luego se añadieron 5 mL de CaCl_2 (0,67 mg/mL) y se agitó por 30 minutos. Se vertieron 25 mL de la mezcla a una placa Petri y se dejó secar a 50°C por 24 horas. Luego el film obtenido se mantuvo en desecador a temperatura ambiente y humedad relativa <10% hasta su uso.

4.2.4.2 Alginato y gel de Aloe vera

Se colocaron alginato al 1% (w/v) y gel de Aloe vera en proporción de 9:1 (v/v) junto con poloxamer al 0,5% (w/v, con respecto al volumen de la mezcla). Se añadió hexano en proporción 1:9 (v/v, hexano:volumen de mezcla). Se colocó en baño de hielo por 15 minutos y se aplicó energía de ultrasonido por 3 minutos. Luego se añadieron 5 mL de CaCl₂ (0,67 mg/mL) y se agitó por 30 minutos. Se vertieron 25 mL de la mezcla a una placa Petri y se dejó secar a 50°C por 24 horas. El film obtenido se mantuvo en desecador a temperatura ambiente y humedad relativa <10% hasta su uso.

Se repitió nuevamente el procedimiento descrito anteriormente con diferente proporción entre alginato y gel de Aloe vera. Las codificaciones de las muestras y las proporciones se detallan en la Tabla 4-2 donde los valores de 10, 15, 20 y 25 representan el porcentaje de gel de Aloe vera usados.

Tabla 4-2. Codificación y proporción entre AL y AVG usada en la elaboración de membranas tridimensionales.

Codificación	Solución AL al 1% (% v/v)	Gel Aloe vera (% v/v)
AL-AVG10 3D	90	10
AL-AVG15 3D	85	15
AL-AVG20 3D	80	20
AL-AVG25 3D	75	25

4.2.4.3 Alginato y extracto de uña de gato

Primero se realizó una extracción de hilachas de uña de gato comercial en etanol al 60% (v/v) con una concentración de 200 mg/3 mL. La extracción se realizó por 20 minutos en ultrasonido y este paso se repitió dos veces más. Se centrifugó el líquido extraído, luego se rotaevaporó y se liofilizó [80].

Se colocaron 25 mL de alginato al 1% (w/v) con poloxamer al 0,5% (w/v, con respecto al volumen de la solución de alginato) y el extracto de uña de gato (UT) al 0,1% (w/v, con respecto al volumen de alginato). Se añadió hexano en proporción 1:9 (v/v, hexano:solución de alginato) y se colocó en baño de hielo por 15 minutos. Seguidamente, se aplicó energía de ultrasonido por 3 minutos, se añadieron 5 mL de CaCl₂ (0,67 mg/mL) y se agitó por 30 minutos. Se vertieron 25 mL de la mezcla a una

placa Petri y se dejó secar a 50°C por 24 horas. Luego el film obtenido se mantuvo en desecador a temperatura ambiente y humedad relativa <10% hasta su uso.

Para este film se evaluó su capacidad de hinchamiento, el ángulo de contacto y la actividad antioxidante.

4.2.5 Entrecruzamiento de membranas

Una vez obtenido el film se sumergió en una solución de CaCl₂ y glicerol al 7% (v/v) por 5 minutos. Luego se dejó secando el film a temperatura ambiente en un desecador con silica gel.

Para el caso de los films bidimensionales (4.2.3.1) y tridimensionales (4.2.4.1) de alginato se comparó el entrecruzamiento con diferentes concentraciones de CaCl₂. Las concentraciones fueron de 0,5%, 1%, 3% y 5% (w/v) y se evaluó su capacidad de hinchamiento (procedimiento descrito más adelante en el ítem 4.2.6.5).

Asimismo, también se comparó el entrecruzamiento para el caso de las membranas bidimensionales entre alginato – glicerol 30% (w/w) las cuales se entrecruzaron con soluciones de CaCl₂ al 1 y 3% (w/v) y se evaluó su capacidad de hinchamiento.

Para el resto de las membranas bidimensionales y tridimensionales de AL-AVG se entrecruzaron con la solución de CaCl₂ al 1% (w/v).

4.2.6 Caracterización de membranas

4.2.6.1 Medición de espesor

Se midió el espesor de los films secos antes y después del entrecruzamiento con un micrómetro. Se midieron 6 puntos diferentes incluido el centro.

4.2.6.2 Transparencia de films

Para evaluar la transparencia de las membranas, se siguió el procedimiento descrito por Norajit *et al.* [92]. Para ello se midió la absorbancia del film a 600 nm (se obtuvo el promedio de seis mediciones) y luego se utilizó la siguiente ecuación:

$$T = \frac{A_{600}}{x} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

T = Transparencia

A_{600} = Absorbancia promedio a 600 nm

x = Espesor promedio del film (mm)

4.2.6.3 Análisis por SEM

El análisis de las superficies de los films se llevó a cabo mediante el uso de un microscopio electrónico de barrido (SEM). Se recortó un pedazo de film y se colocó sobre un soporte con cinta de cobre de doble contacto para luego ser analizado en el equipo a ultra alto vacío y con una energía aplicada de 5 keV.

4.2.6.4 Espectroscopía infrarroja (FT-IR)

Se evaluó el espectro FT-IR para el caso del film AL-AVG10 3D antes y después de entrecruzar con CaCl_2 1% (w/v) para lo cual se utilizó el accesorio ATR con 4 barridos, una resolución de 4 cm^{-1} y en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} .

4.2.6.5 Prueba de hinchamiento y degradación

Se cortaron trozos de film de 2 cm de lado y se mantuvieron en el deshumecedor (humedad relativa < 10%) por 24 horas. Se pesaron cada una de las muestras y luego se sumergieron en un buffer de acetato de sodio 10 mM pH 5,5 (simulación de pH de piel sana) a $37,5^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$ (temperatura corporal). Las muestras de film se dejaron sumergidas por un lapso de tiempo (20 min, 40 min, 60 min, 180 min, 300 min y 1440 min), luego del cual se retiraron de la solución, se secó la superficie con papel kimwipes y se pesaron. Seguidamente, se sumergieron nuevamente en la solución buffer para repetir nuevamente el proceso hasta completar las 24 horas. El porcentaje de hinchamiento se calculó mediante la ecuación 4 y cada tipo de film se evaluó por triplicado.

$$\text{Hinchamiento (\%)} = \frac{m_h - m_i}{m_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

m_i = masa inicial del film seco

m_h = masa del film hidratado

Para el caso de la degradación se dejó secando el film, una vez finalizada la prueba de hinchamiento, durante dos días a temperatura ambiente y en desecador (con

silica gel) y se evaluó la pérdida de masa con respecto a la masa inicial del film mediante la Ecuación 5.

$$\text{Degradación (\%)} = \frac{m_i - m_s}{m_i} \times 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

m_i = masa inicial del film seco

m_s = masa del film seco luego de prueba

4.2.6.6 Prueba de degradación en diferentes medios

Se cortó una membrana de AL-AVG10 3D en pedazos de aproximadamente 2 x 4 cm y se mantuvieron en deshumecedor (humedad relativa < 10%) por 24 horas. Se pesó el film y luego se sumergieron en un buffer de acetato de sodio 10 mM pH 5,5 a $37,5^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$. Las muestras de film se dejaron sumergidas por un lapso de tiempo, luego del cual se retiraron de la solución, se secó la superficie con papel kimwipes y se dejó secando a 50°C hasta alcanzar un peso constante. Los tiempos evaluados fueron 20 min, 40 min, 60 min, 180 min, 300 min, 480 min y 1440 min; y para cada tiempo se evaluó por triplicado. Asimismo, se repitió nuevamente el procedimiento en presencia de la enzima lisozima a concentración de 0,1 g/L. El porcentaje de degradación se calculó con la Ecuación 5.

Se repitió la prueba de degradación con una solución que simula exudado de herida y que contiene 0,02 M CaCl_2 , 0,4 M NaCl , 0,08 M tris(hidroximetil)aminometano y 2% (w/v) de albúmina de suero bovino que se ajustó a pH 7,5 de acuerdo con el procedimiento descrito por Rezvanian *et al.* [93]. En este medio también se evaluó con y sin adición de lisozima.

Por último, también se evaluó la degradación del film en un buffer de NH_3 y NH_4Cl pH 8,5 (simulación de herida grave) con y sin adición de lisozima.

4.2.6.7 Ángulo de contacto

Se prepararon las soluciones para los films bidimensionales y tridimensionales (Tabla 4-1 y Tabla 4-2) y luego se colocaron 2,5 mL de mezcla sobre un portamuestra de vidrio. Se dejó secando en estufa a 50°C por 24 horas.

Para su análisis en baja humedad relativa (HR 11%), se colocó el film formado sobre el portamuestras en un recipiente hermético con silica gel y un sensor de humedad y temperatura. Se mantuvo la muestra por 7 días y luego se realizó el experimento en

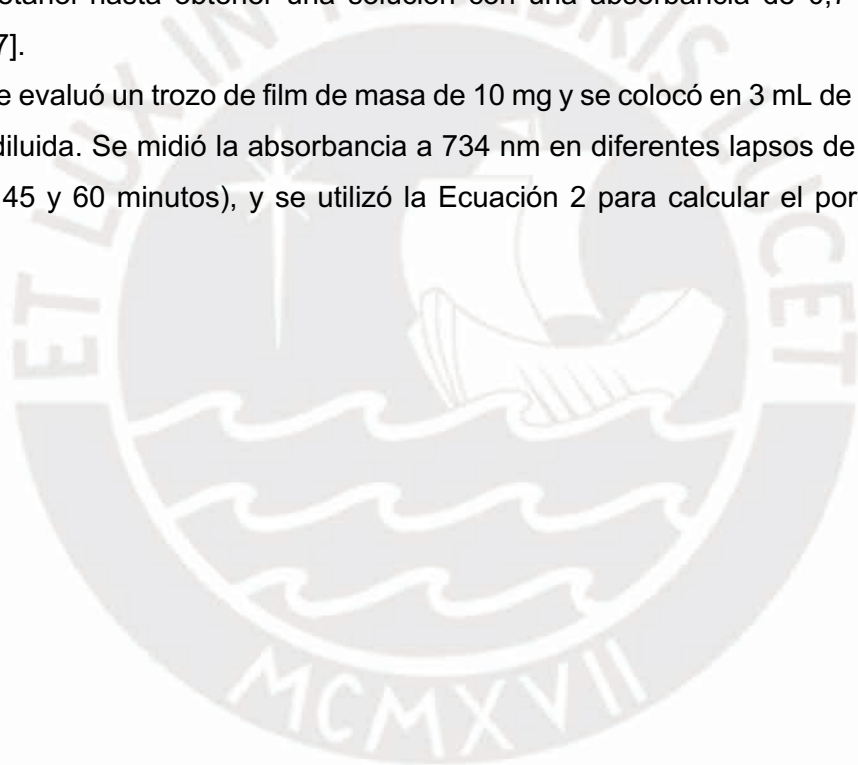
el goniómetro. Para la prueba de medición de ángulo de contacto, se utilizó la técnica de la gota sésil con 5 μ L de agua ultrapura como solvente y se realizaron 50 mediciones cada 0,005 s. Se analizaron 6 puntos diferentes en la muestra.

Se realizó nuevamente la medición de ángulo de contacto esta vez manteniendo el film en humedad relativa de 40% (HR 40%) y otra en un ambiente de humedad relativa de 100% (HR 100%) para evaluar el efecto de la humedad en el ángulo de contacto.

4.2.6.8 Actividad antioxidante

Se preparó una solución concentrada de ABTS 7 M y persulfato de potasio 2,45 M en agua ultrapura. Se dejó en ausencia de luz por al menos 12 horas y luego se diluyó en etanol hasta obtener una solución con una absorbancia de 0,7 (\pm 0,01) a 734 nm [87].

Se evaluó un trozo de film de masa de 10 mg y se colocó en 3 mL de la solución de ABTS diluida. Se midió la absorbancia a 734 nm en diferentes lapsos de tiempo (1, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos), y se utilizó la Ecuación 2 para calcular el porcentaje de inhibición.



5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Caracterización de alginato de sodio

5.1.1 Espectroscopía UV-Vis

En la Figura 5-1 se muestra el espectro UV-Vis del film de alginato en el rango de 400 a 800 nm. Se puede observar que en este rango visible, no se observa ninguna banda pronunciada, la absorbancia es muy débil, debido a que la coloración del film obtenido es muy tenue.

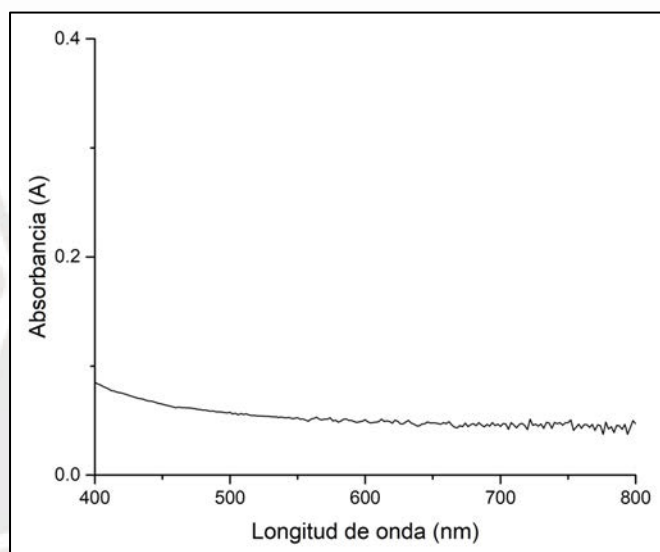


Figura 5-1. Espectro UV-Vis del film de alginato de sodio.

5.1.2 Espectroscopía infrarroja

En la Figura 5-2 se muestra el espectro FT-IR-ATR del film de alginato de sodio. En él podemos observar los picos característicos correspondientes a la estructura del alginato. La banda en 3256 cm^{-1} corresponde a la vibración de tensión del grupo -OH , mientras que el pico a 2926 cm^{-1} se debe al estiramiento de los enlaces C-H ubicados en el anillo de piranosa de las unidades M y G. Asimismo, también se observan dos señales muy pronunciadas en 1594 y 1406 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento asimétrico y a la vibración de estiramiento simétrico del enlace C-O del grupo COO^- , respectivamente. La señal a 1080 cm^{-1} muestra el estiramiento del enlace C-O en el anillo piranosa y a 1026 cm^{-1} el estiramiento asimétrico de C-O-C . Adicionalmente, podemos observar una señal débil en 950 cm^{-1} debido al enlace glicosídico 1-4 y a 816 cm^{-1} es característica de residuos de ácido manurónico [16, 20, 27, 94].

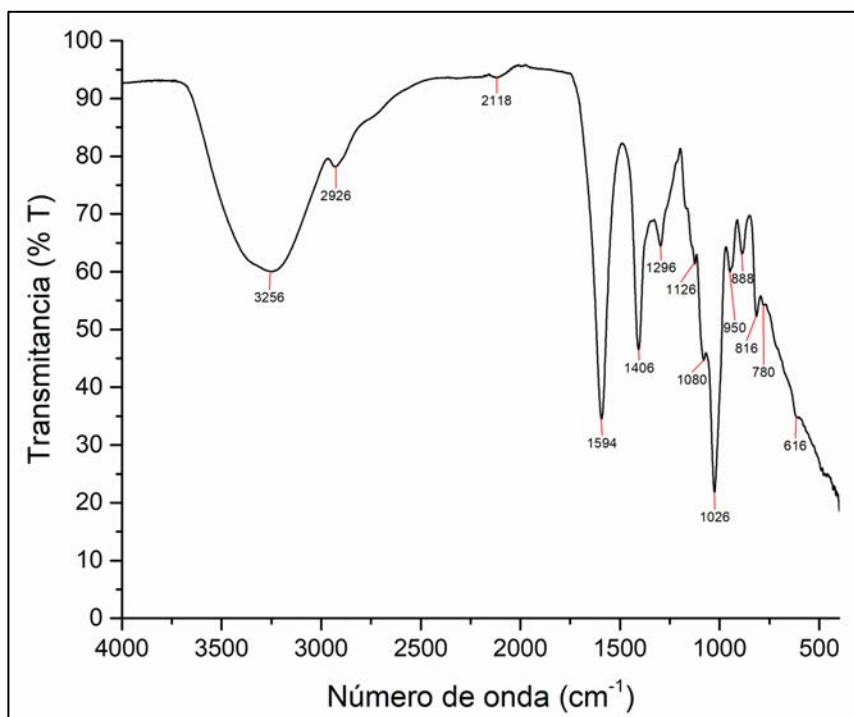


Figura 5-2. Espectro FT-IR-ATR del film de alginato de sodio al 0,5% (w/v).

5.1.3 Viscosimetría capilar

Para el análisis de la viscosidad intrínseca del alginato de sodio, se utilizaron las ecuaciones 6 – 9 con las cuales se calcularon los valores de viscosidad relativa, específica, reducida e inherente, respectivamente.

$$\text{viscosidad relativa } (\eta_r) \quad \eta_r = \frac{t}{t_0} \quad \text{Ecuación 6}$$

$$\text{viscosidad específica } (\eta_{sp}) \quad \eta_{sp} = \frac{t-t_0}{t_0} \quad \text{Ecuación 7}$$

$$\text{viscosidad reducida } (\eta_{red}) \quad \eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$\text{viscosidad inherente } (\eta_{inh}) \quad \eta_{inh} = \frac{\ln \eta_r}{c} \quad \text{Ecuación 9}$$

Los resultados para el estudio de viscosidad del alginato, así como los valores de viscosidad relativa, específica, reducida e inherente calculadas se muestran en la Tabla 5-1. Estos valores aumentan al incrementarse la concentración del polímero, lo cual siguen una tendencia esperada para el caso de polielectrolitos en solución en presencia de una sal (NaCl) [95]. Seguidamente, se realizaron las gráficas de viscosidad

reducida vs concentración y viscosidad inherente vs concentración (ver Figura 5-3) de acuerdo a los métodos de Huggins (Ecuación 10) y Kraemer (Ecuación 11), respectivamente. Se realizó una regresión lineal en ambos casos y se obtuvo la ecuación de las rectas. La viscosidad intrínseca del alginato se calculó con el promedio de los valores de los interceptos a $c \rightarrow 0$ dando un valor de $[\eta] = 218,16 \text{ mL/g}$.

$$\text{viscosidad intrínseca } [\eta] \quad [\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right) \quad \text{Ecuación 10}$$

(método de Huggins)

$$\text{viscosidad intrínseca } [\eta] \quad [\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\ln \eta_r}{c} \right) \quad \text{Ecuación 11}$$

(método de Kraemer)

Tabla 5-1. Resultados de viscosimetría capilar para alginato de sodio en NaCl 0,1 M y 25°C.

	Alginato de sodio				Solvente NaCl 0,1M
concentración x 10⁻³ (g/mL)	2,50	2,09	1,79	1,57	-
t_{promedio} (s)	65,70	59,48	55,28	52,28	36,35
Viscosidad relativa (η_r)	1,81	1,64	1,52	1,44	-
Viscosidad específica (η_{sp})	0,81	0,64	0,52	0,44	-
Viscosidad reducida (η_{red})	322,46	304,95	291,12	280,01	-
Viscosidad inherente (η_{inh})	236,39	236,00	234,36	232,21	-

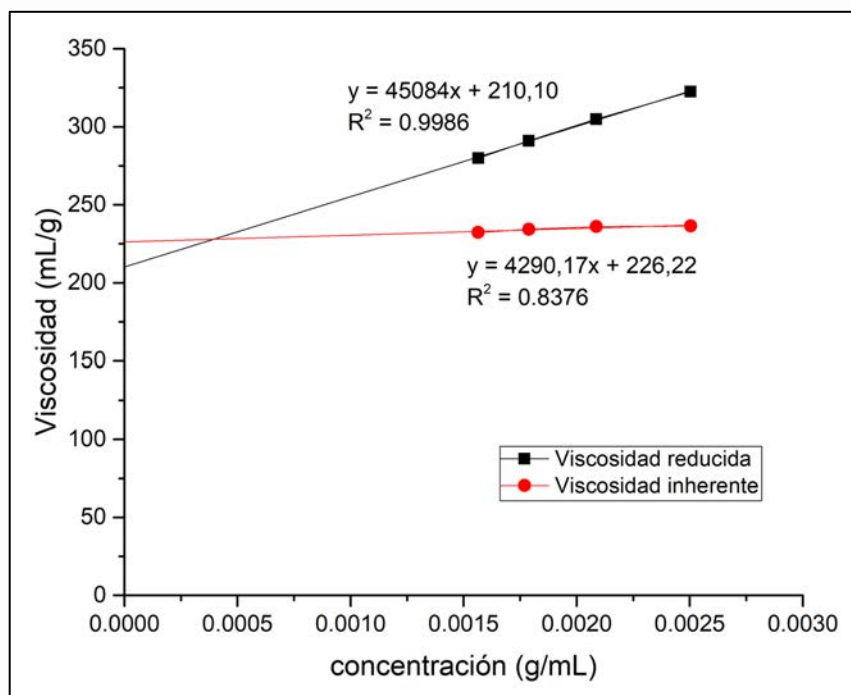


Figura 5-3. Viscosidad intrínseca mediante los métodos de Huggins y de Kraemer para alginato de sodio en NaCl 0,1 M a 25°C.

De acuerdo con la ecuación de Mark-Houwink (Ecuación 12) hay una relación entre la viscosidad intrínseca y el peso molecular donde K y α son constantes que dependen del polímero, el solvente y la temperatura a la que se realizó el estudio. Para el caso del alginato de sodio, Martinsen y colaboradores [87] encontraron que al usar NaCl 0,1 M como solvente y a 25°C las constantes K y α toman valores de 0,073 cm³/g y 0,92, respectivamente. Con ello podemos calcular que el peso molecular del alginato es de 73 219 Da. Este valor se comparará más adelante con los resultados obtenidos mediante GPC.

$$[\eta] = K \times M_v^\alpha \quad \text{Ecuación 12}$$

Donde:

$[\eta]$ = viscosidad intrínseca

$K = 0,073 \text{ cm}^3/\text{g}$

$\alpha = 0,92$

M_v = peso molecular (por viscosidad)

5.1.4 Cromatografía por permeación de gel (GPC)

Otro método para evaluar el peso molecular del alginato de sodio es mediante GPC. En este caso se utilizaron estándares de pululano, el cual es un polisacárido

conformado de unidades de maltotriosa (tres moléculas de glucosa unidas por enlace α -1-4) unidas mediante un enlace glicosídico α -(1-6). Para el análisis de la distribución de masas molares del alginato se disolvieron los estándares de pululano (6 a 400 kDa) y la muestra de alginato en la fase móvil Na_2SO_4 0,05 M y EDTA 0,01 M. Se realizó una curva de calibración con los 5 estándares seleccionados y luego se analizó la muestra del polímero. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 5-4 y en la Tabla 5-2 se observan los datos de masas molares de los estándares (reportado por el fabricante) y lo determinado para el caso del alginato. La masa molar promedio en número (M_n) es de 33 190 Da, mientras que la masa molar promedio en peso (M_w) es de 146 236 Da. El peso molecular obtenido por viscosidad es de 73 219 Da, valor que se encuentra entre los valores M_n y M_w hallados por GPC que concuerda con lo esperado.

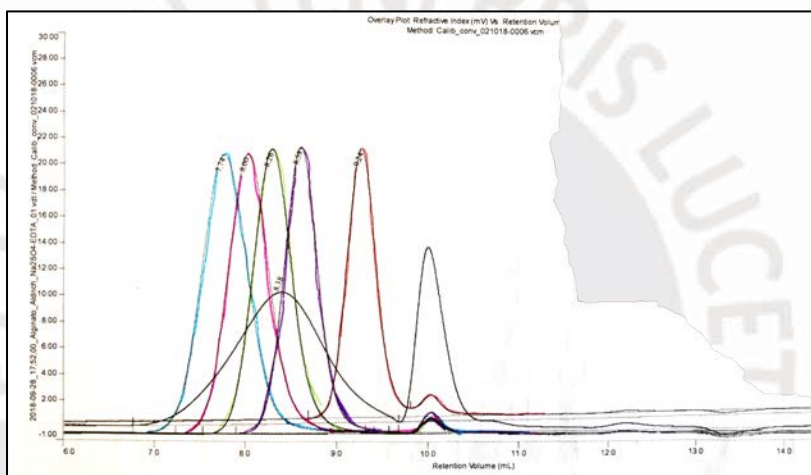


Figura 5-4. Cromatograma de alginato de sodio y estándares de pululano en fase móvil Na_2SO_4 0,05 M y EDTA 0,01 M.

Tabla 5-2. Comparación de resultados de GPC para estándares de pululano y alginato de sodio.

	Pululano 6 k	Pululano 50 k	Pululano 110 k	Pululano 200 k	Pululano 400 k	Alginato de sodio
Volumen de retención (mL)	9,24	8,58	8,26	8,00	7,74	8,38
M_n (Da)	5 900	45 500	100 000	184 000	310 000	33 190
M_w (Da)	6 200	48 800	113 000	200 000	348 000	146 236
M_p (Da)	6 100	47 100	107 000	194 000	337 000	79 768
$PDI =$ M_w/M_n	1,05	1,07	1,13	1,09	1,12	4,41

En el cromatograma se observa una relación inversa entre la masa molar y el volumen de retención debido a que, al tener un mayor tamaño, el polímero tiene una menor interacción con los poros de la columna, salen primero de la columna y pasan hacia el detector. A diferencia de los estándares, en los que el índice de polidispersión (PDI) es muy cercano a 1 (valores entre 1,05 a 1,13), en el caso del alginato se observa que el valor de PDI es de 4,41, lo que indica que hay una distribución de peso molecular amplia. Adicionalmente, se puede observar un pico con volumen de retención alrededor de 10 mL tanto para los estándares como para el alginato lo cual se debe al solvente usado.

5.1.5 Ángulo de contacto

La Tabla 5-3 muestra los resultados de medición de ángulo de contacto para films de alginato de concentraciones de 0,5; 1 y 1,5 % (w/v). Los valores obtenidos son menores a 90° lo cual indica que la superficie es de carácter hidrofílico, lo que concuerda con los grupos funcionales presentes en la estructura química del alginato como -OH y -COOH. A su vez, también se observa que no hay una relación clara entre la concentración y el ángulo medido y que no hay mucha variación entre los valores siendo un aproximado de 60°. Este valor difiere con lo reportado por el estudio de Pereira *et al.* [1] quienes reportan un ángulo de 42,2° posiblemente debido a una diferencia en las condiciones ambientales pues en el estudio no especifican la humedad relativa en donde se llevo a cabo el análisis.

Tabla 5-3. Ángulo de contacto para films de alginato preparados de diferentes concentraciones.

Concentración alginato (%) w/v	Ángulo de contacto
0,5	62,15° ± 1,75°
1,0	59,61° ± 0,45°
1,5	60,66° ± 1,33°

5.2 Aloe vera

5.2.1 Análisis de la morfología del gel fresco de Aloe vera

El gel cortado directamente de la planta de Aloe vera se pudo observar mediante el uso de un microscopio óptico. En la Figura 5-5 donde se aprecian las imágenes del tejido parenquimático que posee células con una forma hexagonal. Asimismo, en la imagen de magnificación 10x (Figura 5-5 (b)) se aprecia que las células tienen un tamaño entre 500 a 600 μm y a su vez se puede distinguir claramente la pared celular. Lo reportado concuerda con los resultados obtenidos por Ni *et al.* [37] quienes, además, encontraron que algunas células pueden tener un tamaño de más de 1000 μm .

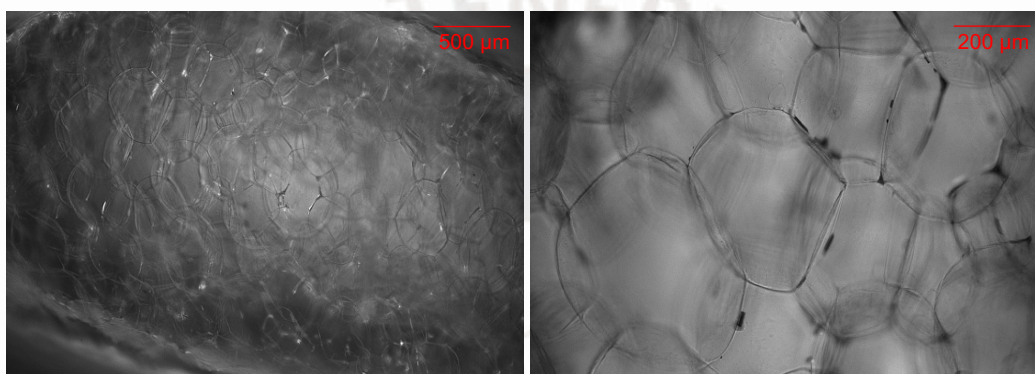


Figura 5-5. Imágenes de microscopía óptica del gel fresco de Aloe vera: (a) Magnificación 4x y (b) Magnificación 10x.

Por otro lado, también se evaluó el contenido de agua del gel. Los resultados muestran que el gel posee un contenido de agua de $99,30 \pm 0,06\%$ (w/w). Este valor está dentro del rango reportado en la literatura que es entre 98,5 a 99,5% (w/w) [4, 34, 59].

5.2.2 Extracción del gel de Aloe vera

El gel de Aloe vera extraído se presenta como una solución blanquecina y poco viscosa. El pH de la solución es ligeramente ácido con un valor de 4,5. El gel se sometió a un proceso de pasteurización a 65°C por 15 minutos, pues este tratamiento ayudaría a reducir las bacterias y otros microorganismos que degradan los compuestos con actividad biológica presentes en el gel [38]. Además, de acuerdo con el estudio de Rodríguez *et al.* [38], la temperatura adecuada para el tratamiento del gel es entre 60 a 70°C para tener una adecuada calidad del gel que mantenga su actividad biológica. Asimismo, una vez pasteurizado, el gel se mantuvo a 4°C para ampliar su tiempo de uso

pues, de acuerdo con lo estudiado por Saberian y colaboradores [69], se muestra que el contenido del polisacárido mayoritario del gel disminuye y por lo tanto la actividad biológica del gel decae considerablemente si el gel se mantiene a 25°C una vez realizada su extracción.

5.2.3 Espectroscopía infrarroja

En la Figura 5-6 (a) se muestra el espectro FT-IR por transmisión con pastilla de KBr del gel de Aloe vera. La banda en 3422 cm^{-1} corresponde a la vibración del grupo -OH y la señal en 2928 cm^{-1} se debe a la vibración de estiramiento de enlaces C-H. Ambos grupos característicos de monosacáridos reportados en la composición del gel de Aloe [1]. Adicionalmente, en 1738 cm^{-1} aparece una señal débil que corresponde a la presencia de grupos carbonilo (C=O). En 1610 y 1404 cm^{-1} se pueden observar las bandas correspondientes al estiramiento asimétrico y estiramiento simétrico del enlace C-O en el grupo funcional COO^- . Adicionalmente, se observa una señal en 1032 cm^{-1} que indica el enlace glicosídico y en 808 cm^{-1} la banda asociada a la unidad de manosa, la cual compone la estructura del acemanano (polisacárido reportado como mayoritario). El espectro coincide con los espectros reportados en los estudios de Pereira *et al.* [2, 94] quienes muestran las mismas bandas observadas.

Asimismo, luego del tratamiento de pasteurización (65°C por 15 minutos) se extrajo el polisacárido reportado como mayoritario para verificar que este se mantiene en el gel luego del tratamiento. El sólido recuperado también se analizó mediante FT-IR por transmisión con pastilla de KBr cuyo espectro se muestra en la Figura 5-6 (b). En este espectro se aprecian algunas diferencias con respecto al gel fresco liofilizado, la más notable es la señal en 1740 cm^{-1} que en este caso se observa más intensa, debido a la presencia de enlaces C=O de los grupos acetilos del acemanano. Se observa también que se mantienen las bandas en 1040 cm^{-1} y 808 cm^{-1} por el enlace glicosídico y las unidades de manosa, respectivamente. El espectro en la Figura 5-6 (b) es igual al reportado en la investigación de Chokboribal *et al.* [72] para el acemanano. Esto a su vez confirma que el polisacárido mayoritario del gel y principal responsable de la actividad biológica de esta planta se mantiene luego del tratamiento de pasteurización realizado durante la extracción del gel de Aloe vera.

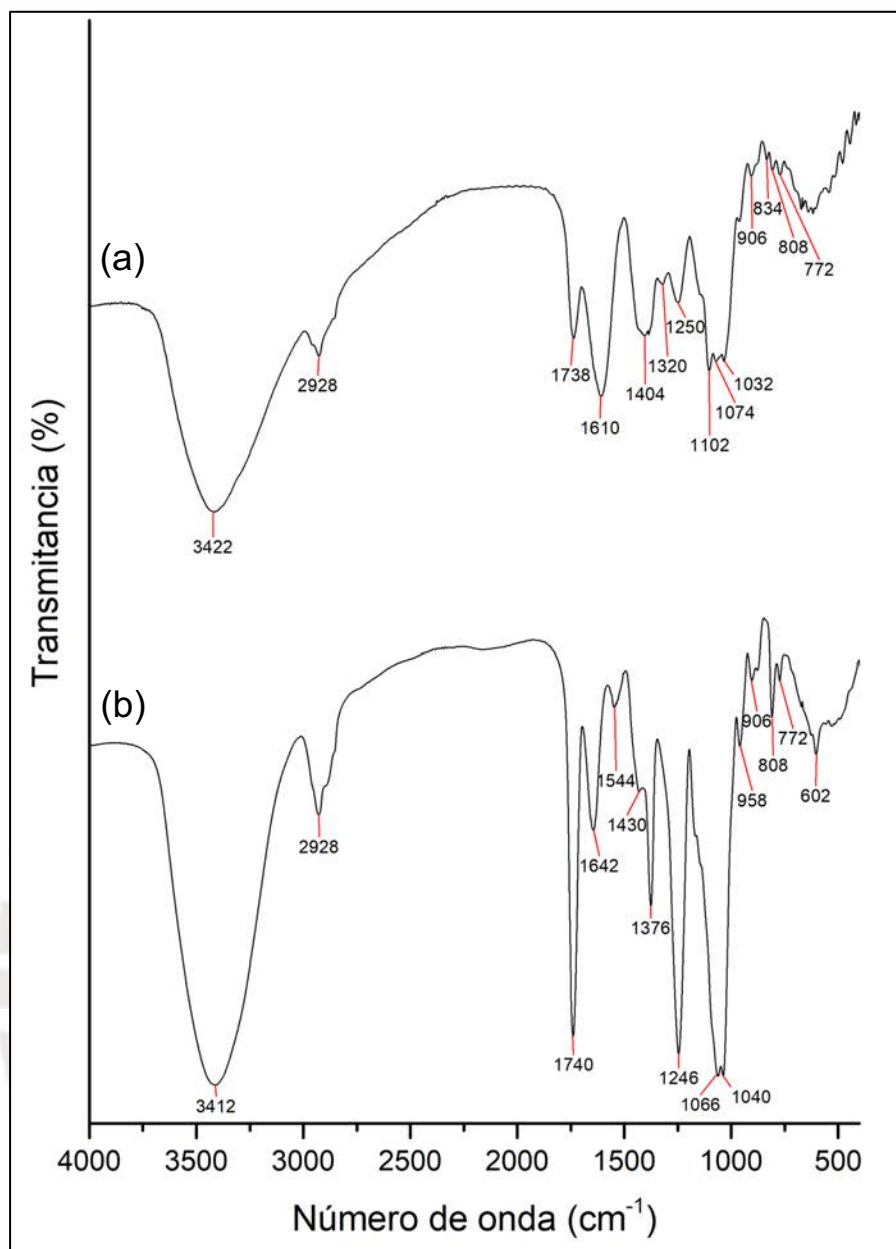


Figura 5-6. Espectro FT-IR por transmisión del (a) gel fresco liofilizado y del (b) polisacárido mayoritario del gel de Aloe vera en KBr.

5.2.4 Cromatografía por permeación de gel (GPC)

Para la caracterización del gel de Aloe vera por GPC se usaron estándares de pululano entre 10 a 800 kDa. Se realizó una curva de calibración con los 4 estándares seleccionados y luego se analizaron las muestras. Los cromatogramas obtenidos para el gel de Aloe vera y para el polisacárido acemanano extraído se muestran en la Figura 5-7 y Figura 5-8, respectivamente. Asimismo, en la Tabla 5-4 se observan los datos de masas molares de los estándares (reportados por el fabricante) y lo determinado para el caso de las muestras.

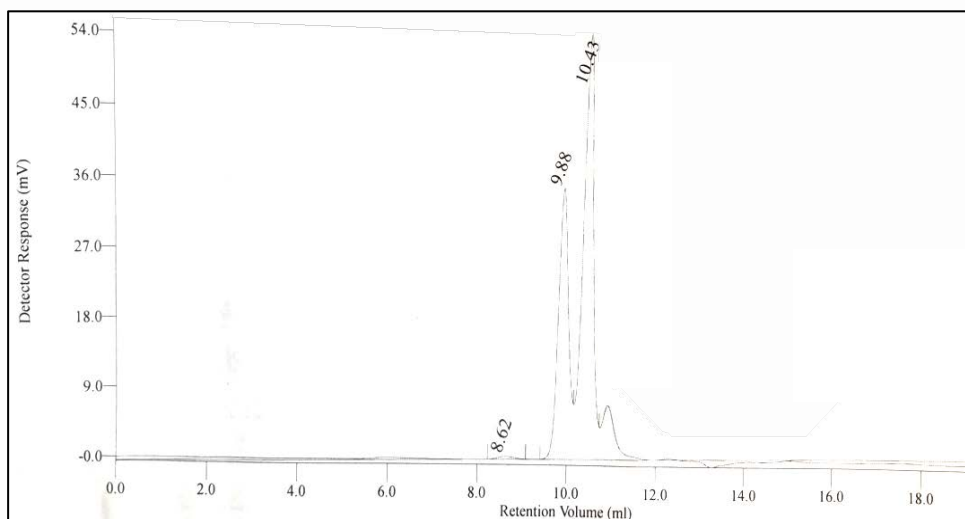


Figura 5-7. Cromatograma del gel extraído de Aloe vera en fase móvil NaCl 0,1 M.

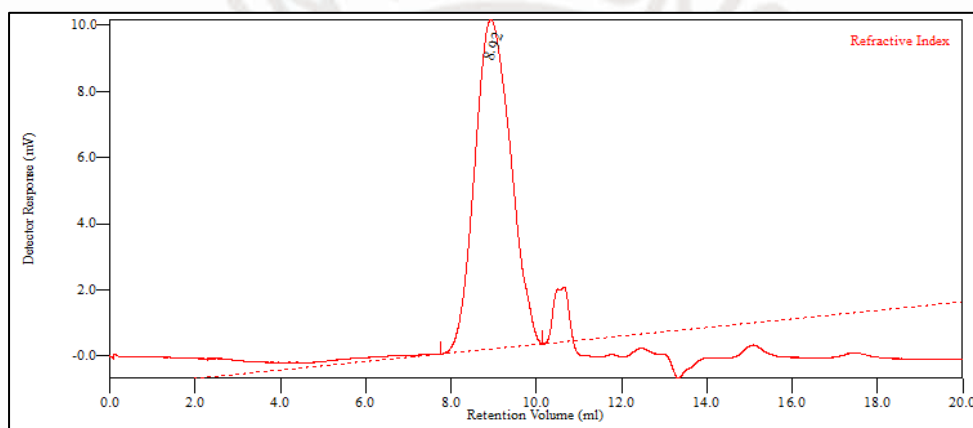


Figura 5-8. Cromatograma de acemanano aislado del gel de Aloe vera en fase móvil NaCl 0,1 M.

Tabla 5-4. Resultados de distribución de masas molares por GPC para estándares de pululano, gel y acemanano extraído de Aloe vera.

	Pululano 10 k	Pululano 100 k	Pululano 400 k	Pululano 800 k	Gel Aloe vera	Acemanano
Volumen de retención (mL)	9,07	8,24	7,70	7,34	8,62	8,92
Mn (Da)	9 200	100 000	310 000	636 000	34 680	3 250
Mw (Da)	10 000	113 000	348 000	805 000	45 325	22 198
Mp (Da)	9 600	107 000	337 000	708 000	40 594	16 209
Mw/Mn	1,09	1,13	1,12	1,27	1,31	6,83

El cromatograma obtenido para el gel de Aloe vera (Figura 5-7) es muy similar al reportado por Turner y colaboradores [90]. En él se observa un pico muy pequeño con volumen de retención de 8,62 que corresponde a moléculas con pesos moleculares alrededor de 45 kDa. También se observan picos con mayores volúmenes de retención entre 9,88 a 11 mL los cuales corresponden a moléculas pequeñas, con pesos moleculares menores a 10 kDa. Por otro lado, en el cromatograma para el acemanano aislado (Figura 5-8) se ve un pico con volumen de retención de 8,92 mL, lo cual corresponde a un peso molecular de 22 kDa y se observa que los picos con volúmenes de retención más altos han disminuido considerablemente debido a que al realizar la diálisis fueron eliminados. Estos resultados son similares a lo reportado en el estudio de Minjares *et al.* [73] quienes señalan que el acemanano posee un peso molecular de 49 kDa en el gel fresco de Aloe vera, mientras que luego de procesarlo el peso molecular disminuye a valores entre 23 a 26 kDa. La disminución del peso molecular se debe al tratamiento realizado al gel el cual incluye un periodo de calentamiento a 65°C.

5.2.5 Actividad antioxidante mediante ensayo de decoloración ABTS

Para el caso de la actividad antioxidante del gel de Aloe vera se evaluaron tres muestras mediante el método de decoloración de ABTS cuyos resultados se observan en la Figura 5-9 donde, a su vez, se han colocado barras de error con la desviación estándar. En la Figura 5-9 se observa que la actividad antioxidante del gel que ha sido pasteurizado es el que presenta mayor actividad antioxidante luego de 1 hora de análisis, el cual llega a un valor de aproximadamente 30% de inhibición. Esto concuerda con lo reportado por la investigación de Rodriguez *et al.* [38] en donde, luego de pasteurizar el gel, mejora algunas propiedades que se pueden relacionar a sus propiedades medicinales. Asimismo, se observa que el acemanano aislado del gel es el que presenta menor actividad antioxidante luego de 1 hora (aproximadamente 10% de inhibición) esto debido a que durante el proceso de purificación se realizó una diálisis lo que provoca que moléculas pequeñas se eliminen, las cuales probablemente tengan actividad antioxidante.

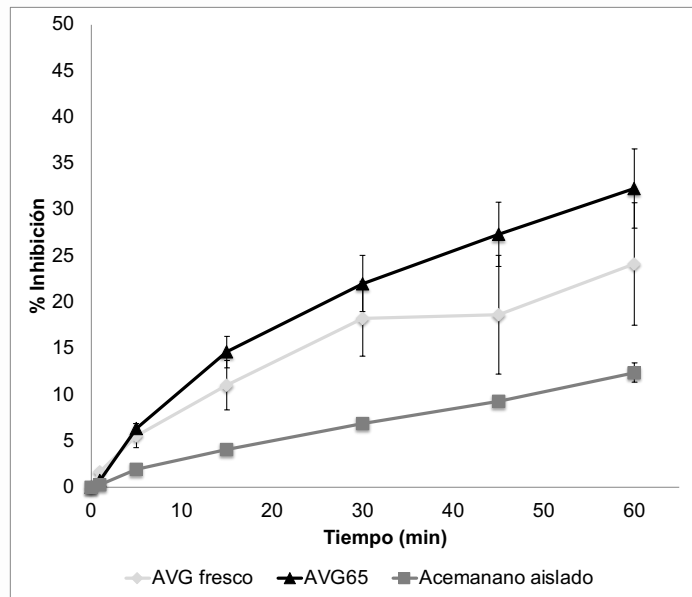


Figura 5-9. Actividad antioxidante para muestras liofilizadas de gel fresco, gel pasteurizado y acemanano aislado.

5.3 Membranas bidimensionales

5.3.1 Análisis de entrecruzamiento de AL films con CaCl_2

Primero se evaluaron films preparados a partir de una solución de alginato de sodio al 1% (w/v), entrecruzados con distintas concentraciones de CaCl_2 . En la Figura 5-10 se muestran los films secos luego del entrecruzamiento con CaCl_2 y se puede ver que en todos los casos se obtienen films transparentes. Asimismo, se puede observar que, mientras la concentración de la solución de CaCl_2 es menor, los films pierden su forma inicial, quedan contraídos y doblados por los bordes. De acuerdo a lo encontrado por Rhim y colaboradores [24], durante la inmersión del film, en la solución de CaCl_2 , ocurren dos procesos al mismo tiempo, la disolución y el entrecruzamiento del alginato. Por tanto, a concentraciones bajas de iones Ca^{+2} la disolución del alginato será el proceso dominante. Durante la hidratación de los films, las cadenas de alginato tienen mayor libertad de movimiento y tienden a cambiar su forma en mayor medida y por ello durante el secado de la membrana se pierde su forma inicial. En cambio, a mayores concentraciones de iones de Ca^{+2} el proceso de entrecruzamiento es dominante y en consecuencia los films son menos flexibles, manteniendo a las cadenas de alginato en su lugar [16, 27].

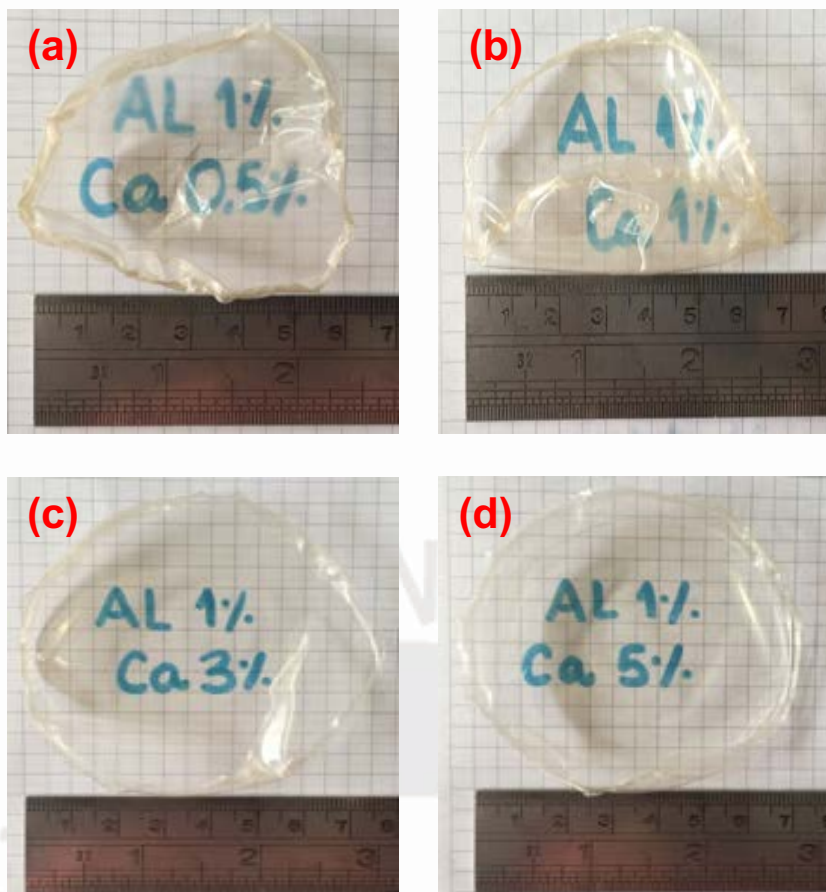


Figura 5-10. Films de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl_2 (a) 0,5%, (b) 1%, (c) 3% y (d) 5% (w/v).

Asimismo, en la Figura 5-11 se aprecia una gráfica que muestra cómo varía el espesor del film después del entrecruzamiento, así como el porcentaje de masa que se pierde por efecto del entrecruzamiento con CaCl_2 (en ambos casos se incluyen barras de error con la desviación estándar). Es importante mencionar que el film de AL tiene un espesor de $24,5 \mu\text{m} \pm 1,4 \mu\text{m}$ antes del entrecruzamiento. Se observa que al entrecruzar con CaCl_2 0,5%, la pérdida de masa es mayor y también concuerda con que el espesor disminuye en mayor medida en comparación con las mayores concentraciones de CaCl_2 . Esta tendencia se debe a lo ya explicado anteriormente, que a bajas concentraciones de iones Ca^{+2} tiende a disolverse mayor cantidad de alginato por lo que el espesor también disminuye. En cambio, a concentraciones mayores de 3% CaCl_2 no hay mucha variación en cuanto al espesor de los films puesto que el entrecruzamiento se da muy rápidamente.

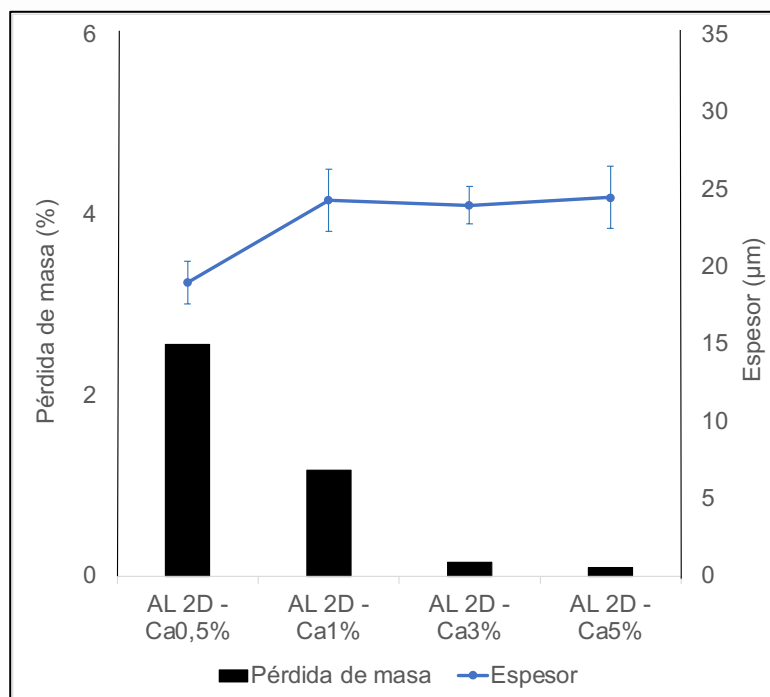


Figura 5-11. Pérdida de masa y variación de espesor de films de AL 1% entrecruzados con CaCl₂ de diferentes concentraciones.

Se evaluó la capacidad de hinchamiento de los films de AL entrecruzados con diferentes concentraciones de CaCl₂ en un buffer acetato de pH 5,5 el cual simula el pH que posee la piel sana. La propiedad de hinchamiento es muy importante para el uso de las membranas como apósitos ya que esto permitirá que el film pueda absorber el exudado de la herida evitando que este permanezca en la herida [29]. Es preciso mencionar que si el film no se entrecruza con CaCl₂, este se disuelve muy rápido en el buffer. Los resultados de la prueba de hinchamiento se pueden apreciar en la Figura 5-12, incluyendo barras de error con la desviación estándar, donde se aprecia que luego de 1 hora el hinchamiento llega al equilibrio. El porcentaje de hinchamiento del film de AL entrecruzado con CaCl₂ al 0,5% es el mayor, con aproximadamente un valor de 600% con respecto a la masa del film inicial. Estos resultados se deben a que al preparar el film con una baja concentración CaCl₂ hay un menor entrecruzamiento de las cadenas de alginato, con lo cual puede retener una mayor cantidad de agua, a diferencia de cuando se prepara con una mayor concentración de CaCl₂ en donde la densidad de entrecruzamiento es mayor y se reducen los espacios en donde se pueda absorber agua [16]. Asimismo, no se aprecia mucha diferencia entre el film que fue entrecruzado con CaCl₂ al 3% y 5% llegando a un equilibrio cercano a 100%.

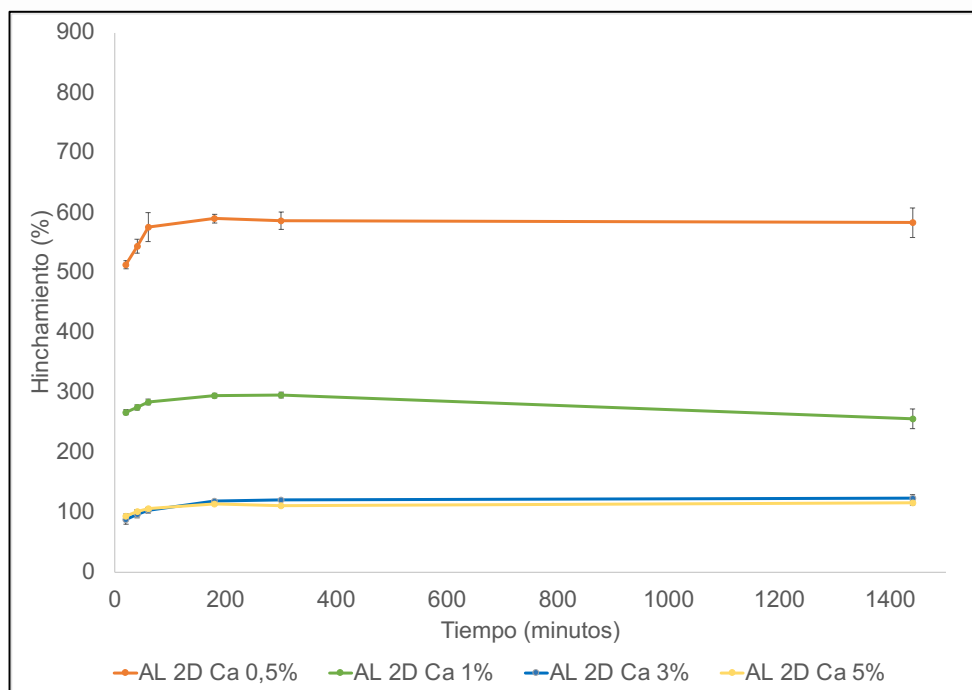


Figura 5-12. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 de films de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl₂ de diferentes concentraciones.

Por otro lado, se observan los resultados de la prueba de degradación en la Figura 5-13 junto con las barras de error con la desviación estándar. La gráfica muestra que luego de las 24 horas que el film estuvo sumergido en el buffer acetato a pH 5,5 y a 37,5°C, el film entrecruzado con la solución de CaCl₂ 0,5% (w/v) es el que más se ha degradado, es decir, el que más masa pierde con 25% de la masa inicial. Conforme aumenta la concentración de CaCl₂ el porcentaje de degradación va disminuyendo hasta un 8% para el caso del CaCl₂ 5%. Esta tendencia se debe a que al haber menor concentración de CaCl₂ hay menor entrecruzamiento de las cadenas de alginato y, por lo tanto, al estar sumergido en el buffer, el film se disuelve en mayor parte.

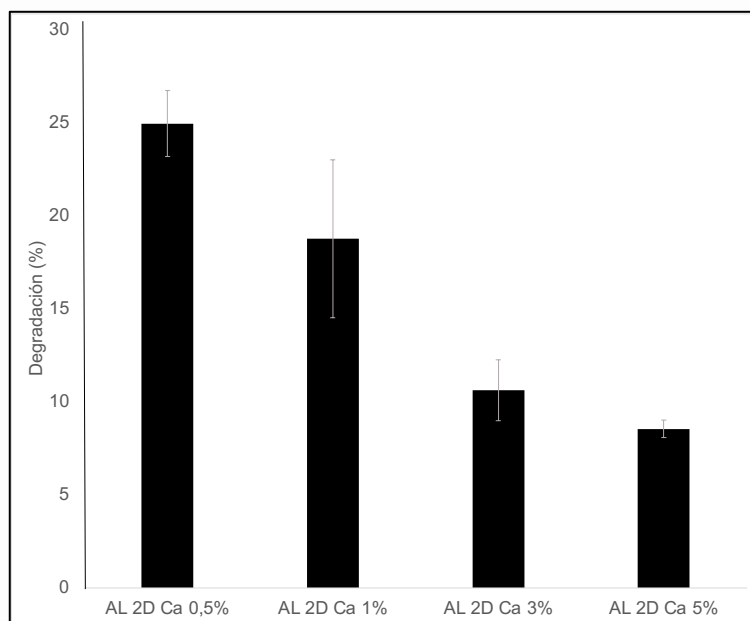


Figura 5-13. Prueba de degradación luego de 24 horas a 37,5°C y pH 5,5 de films de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl₂ de diferentes concentraciones.

5.3.2 Alginato/glicerol

En la Figura 5-14 se pueden observar los films de alginato con glicerol. Los films son homogéneos y transparentes, al manipularlo se percibe que el film con mayor concentración de glicerol es el mas flexible.

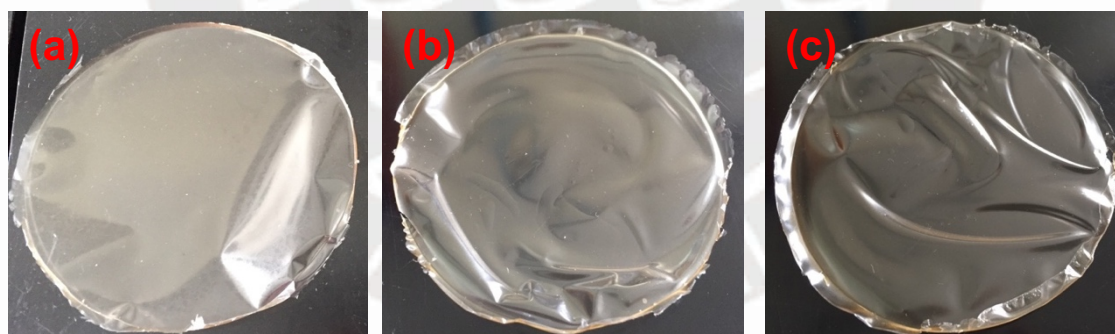


Figura 5-14. Films de AL con glicerol al (a) 15% (w/w), (b) 30% (w/w) y (c) 50% (w/w).

Se evaluó la capacidad de hinchamiento en buffer de acetato a pH 5,5 de la membrana de alginato con glicerol al 30% (w/v) entrecruzado con iones CaCl₂ al 1% (w/v) y otra a 3% (w/v) y los resultados se observan en la Figura 5-15 incluyendo las barras de error con la desviación estándar. Se puede apreciar que para el caso del film entrecruzado con CaCl₂ 1% (w/v) el porcentaje de hinchamiento mejora de 300 a 400% con respecto al film de alginato sin glicerol. Mientras que para el caso del film entrecruzado con CaCl₂ al 3% (w/v) se mantiene igual el porcentaje de hinchamiento

(aproximadamente 100%) del film que no posee glicerol (ver en Figura 5-12). De acuerdo a estos resultados y los de la prueba de hinchamiento anteriores se decidió continuar los estudios entrecruzando los films con CaCl_2 1% (w/v) por 5 minutos.

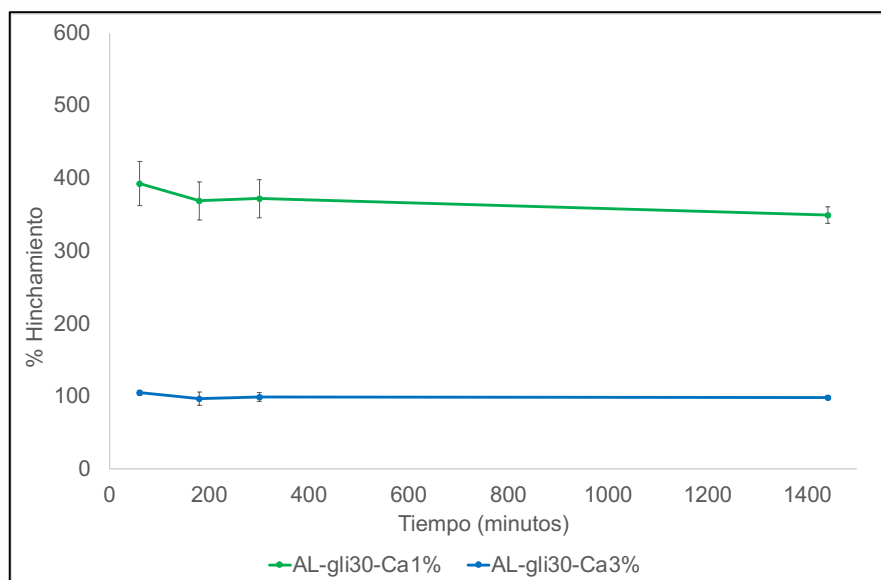


Figura 5-15. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 de films de AL con glicerol 30% (w/w) entrecruzados con CaCl_2 de diferentes concentraciones.

Otra propiedad que se evaluó fue el ángulo de contacto, el cual nos indica el carácter hidrofílico o hidrofóbico del film. En la Tabla 5-5 se muestran los resultados de esta prueba donde, en todos los casos, se ve un ángulo menor a 90° lo cual indica un carácter hidrofílico. Se observa que al incorporar el glicerol, el ángulo de contacto va disminuyendo desde 59,61° para alginato solo hasta 47,55° cuando se utiliza 50% (w/w) de glicerol en la mezcla. Esto debido a que la naturaleza del glicerol es hidrofílico lo cual hace que la superficie de la membrana vaya disminuyendo el valor del ángulo medido.

Tabla 5-5. Ángulo de contacto de films entre alginato y glicerol.

Tipo de membrana	Ángulo de contacto
AL	59,61° ± 0,45°
AL-gli 10% (w/w)	57,13° ± 2,62°
AL-gli 30% (w/w)	53,03° ± 0,82°
AL-gli 50% (w/w)	47,55° ± 1,10°

5.3.3 Alginato/gel de Aloe vera

Se elaboraron films de la mezcla de alginato con Aloe vera (AL-AVG) con diferentes proporciones. Todos ellos se entrecruzaron con solución de CaCl_2 al 1% (w/v) por 5 minutos y se evaluó el espesor y la transparencia antes y después de entrecruzar, así como el porcentaje de pérdida de masa por efecto del proceso de entrecruzado. Los resultados se muestran en la Tabla 5-6 donde se aprecia que, durante el entrecruzamiento, conforme aumenta el contenido del gel de Aloe vera hay una mayor pérdida de masa, respecto a la masa inicial del film. Los valores varían entre 4% para el caso del film AL-AVG10 hasta 12% para el caso de AL-AVG25. Esta tendencia también se ve reflejada en el espesor de los films donde el film AL-AVG10 con 28 μm de espesor presenta una ligera disminución a 27,8 μm , mientras que para el caso de AL-AVG25 hay una mayor disminución del espesor del film (de 25,1 a 23,2 μm). Estos resultados se deben a que al aumentar el contenido de AVG (y reducción de AL) se reduce el contenido de sólidos en la mezcla y por lo tanto también el espesor es menor.

Por otro lado, también podemos observar los resultados en cuanto a transparencia de los films. Esta propiedad es deseable para los apósitos para heridas pues facilitaría el monitoreo de la herida durante el proceso de curado. La transparencia se calculó con la ecuación 3 (ítem 4.2.6.2) donde a mayor valor de la proporción de la absorbancia y el espesor, indica una mayor transparencia del film. Antes del entrecruzamiento, los valores de transparencia se encuentran entre 1,78 a 2,02 y se incrementan con la incorporación de AVG, lo cual concuerda con los resultados encontrados por Pereira y colaboradores [29]. Asimismo, se observa que, en todos los casos, aumenta la transparencia luego del entrecruzamiento con CaCl_2 .

Tabla 5-6. Propiedades de espesor, transparencia y pérdida de masa luego de entrecruzar films entre AL-AVG bidimensionales.

Film	Antes de entrecruzar		Luego de entrecruzar		% Pérdida de masa por entrecruzamiento
	Espesor (μm)	Transparencia	Espesor (μm)	Transparencia	
AL-AVG10	28,00 \pm 1,01	1,78 \pm 0,03	27,83 \pm 0,71	2,24 \pm 0,27	4,39 \pm 0,40
AL-AVG15	25,42 \pm 1,06	1,98 \pm 0,09	25,17 \pm 0,94	3,03 \pm 0,22	7,24 \pm 0,11
AL-AVG20	25,92 \pm 1,06	1,95 \pm 0,11	24,23 \pm 0,82	2,57 \pm 0,48	9,60 \pm 0,10
AL-AVG25	25,11 \pm 0,42	2,02 \pm 0,03	23,22 \pm 0,92	3,08 \pm 1,17	11,99 \pm 0,39

En la Figura 5-16 se muestran las imágenes SEM obtenidas tanto para un film de alginato solo (AL 2D) como para un film elaborado con la mezcla entre alginato y gel de Aloe vera (AL-AVG25 2D). En la Figura 5-16 (a) observamos que el film de alginato tiene una superficie lisa y bastante uniforme; mientras que para el caso del film AL-AVG25 2D se aprecia que la superficie es rugosa y se pueden observar pequeños agregados debido a la incorporación del gel de Aloe.

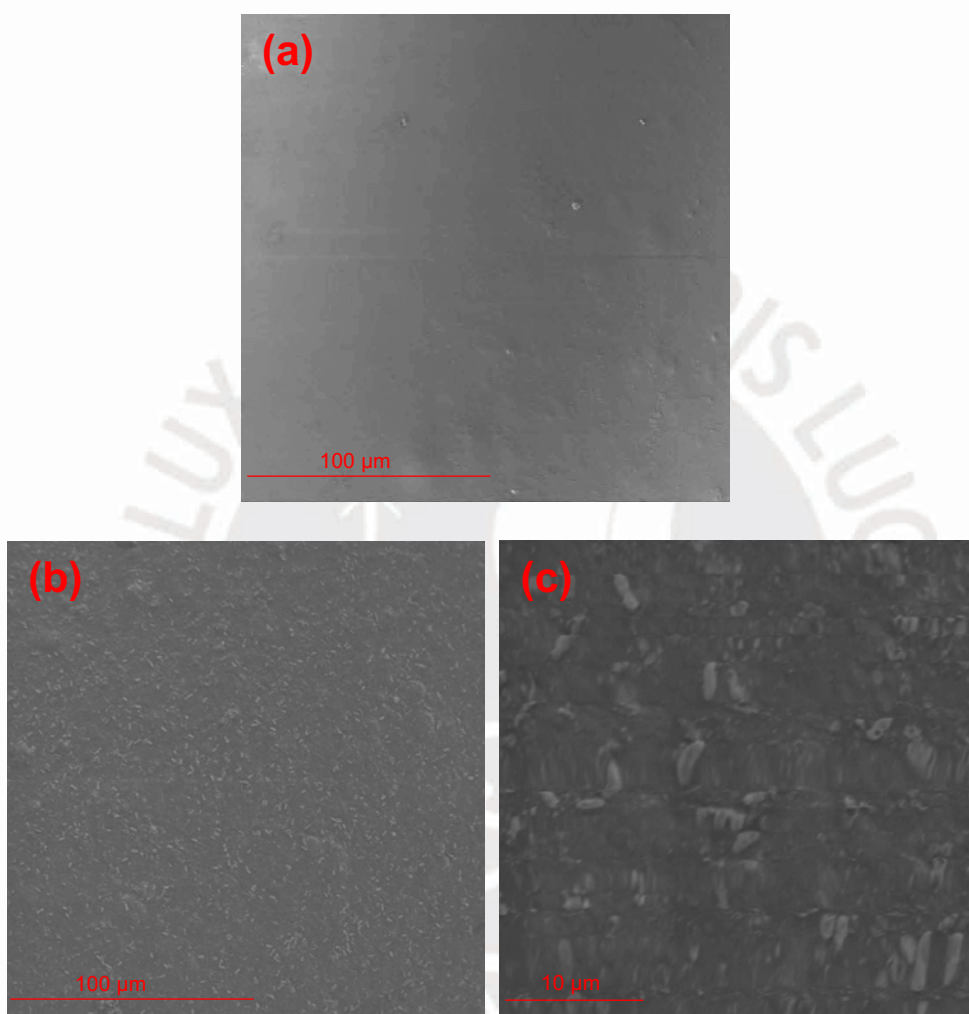


Figura 5-16. Imagen SEM para membranas de (a) AL 2D y (b) y (c) AL-AVG25 2D.

En la Figura 5-17 se muestran los resultados (incluyendo barras de error con la desviación estándar) para la prueba de hinchamiento de las membranas de AL-AVG entrecruzadas con CaCl_2 al 1% por 5 minutos. Las gráficas muestran que a medida que aumenta el contenido de AVG aumenta el porcentaje de hinchamiento de las membranas debido a que el gel de Aloe vera tiene un carácter muy hidrofílico, lo cual hace que la membrana pueda retener mayor cantidad de buffer. Es importante mencionar que solo en el caso del film AL-AVG25 no se pudo concluir con la prueba

puesto que el film se rompió y no se pudo manipular para secarlo y pesarlo por lo que solo se tienen resultados hasta las 5 horas.

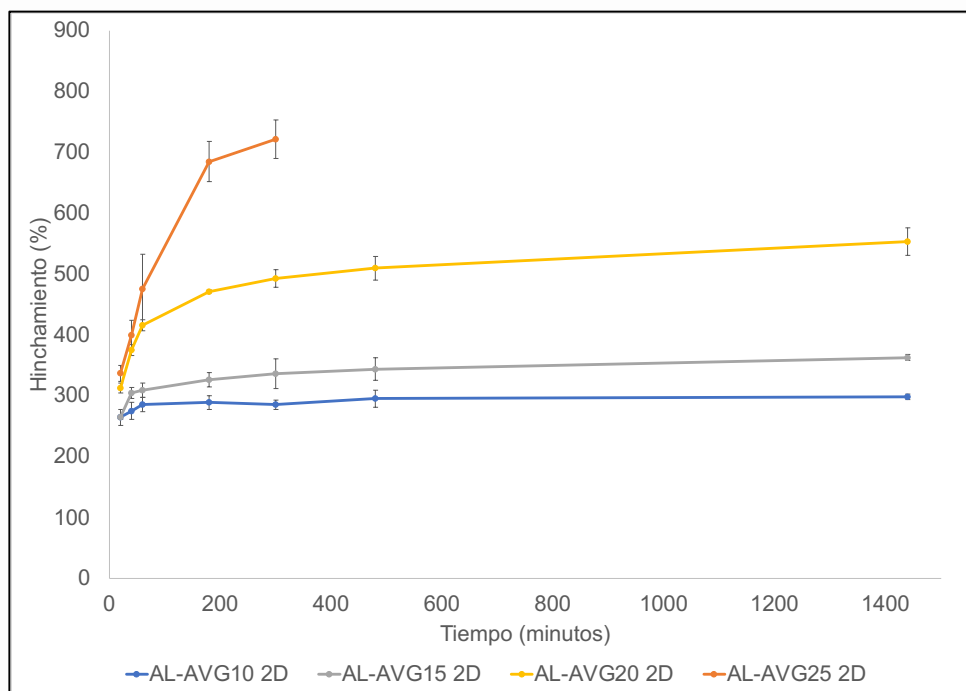


Figura 5-17. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 de films bidimensionales de AL-AVG entrecruzados con CaCl₂ 1% por 5 minutos.

Por otro lado, en la Figura 5-18, están los resultados de degradación de los films luego de la prueba de hinchamiento, los cuales presentan las barras de error con la desviación estándar. En el caso del film AL-AVG25, la muestra que estaba en el buffer se filtró y luego se pesó para determinar la masa del film remanente. Los valores varían entre un 20% de degradación para el caso del film AL-AVG10 hasta casi 40% de degradación para el caso del film AL-AVG25. Se observa una mayor degradación mientras mayor contenido de AVG tenga el film debido posiblemente a la menor cantidad de alginato presente en el film.

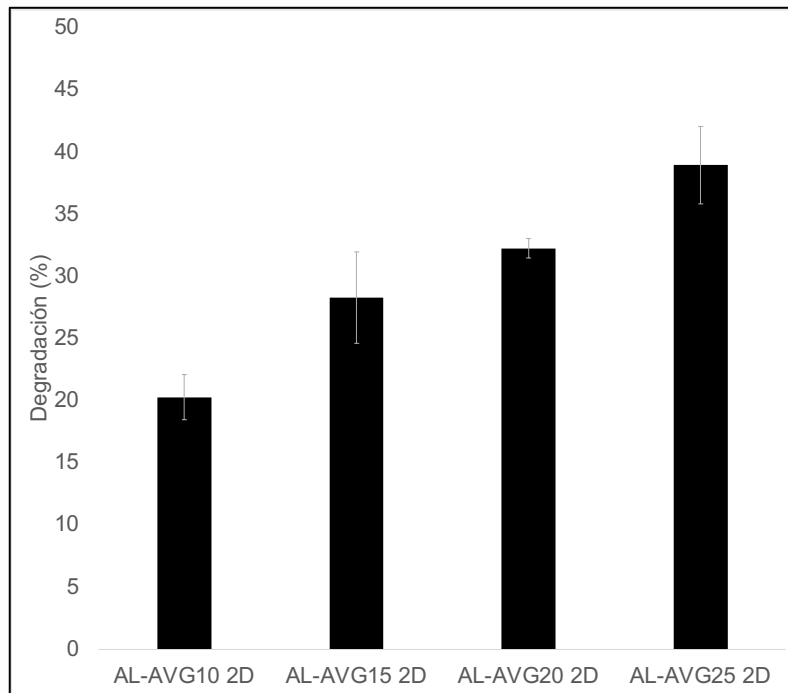


Figura 5-18. Prueba de degradación luego de 24 horas a 37,5°C y pH 5,5 de films entre AL-AVG entrecruzados con CaCl₂ 1% por 5 minutos.

Finalmente, se evaluó el carácter hidrofílico de los films elaborados con AL-AVG10 2D y AL-AVG25 2D mediante la determinación del ángulo de contacto, para lo cual se comparó un film solo de AL y otro que contiene AVG, a diferentes condiciones de humedad relativa. Los resultados se presentan en la Figura 5-19 (junto con las barras de error con la desviación estándar) donde se aprecia que, en todos los casos, los ángulos obtenidos son menores a 90° lo cual indica que las superficies son hidrofílicas. Además, el AVG es el que presenta menor ángulo de contacto a todas las condiciones (cercano a 20°). Se observa también una tendencia de que, a mayor humedad relativa, hay un menor ángulo debido a que la superficie del film se encuentra ya humedecida por vapor de agua en el ambiente. Asimismo, se observa que, al incorporar el AVG en el film de alginato, se reduce el ángulo de contacto haciendo que la membrana adquiera un carácter más hidrofílico.

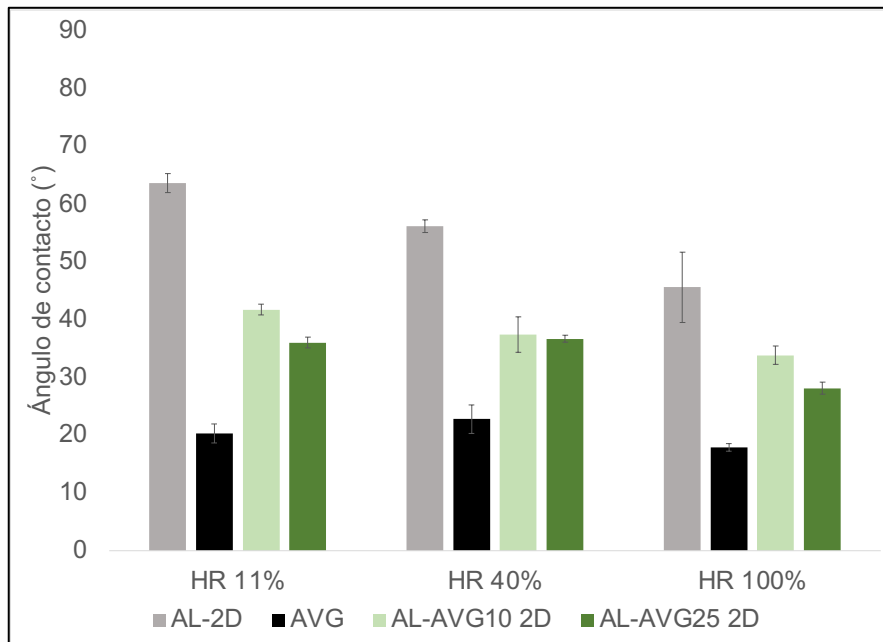


Figura 5-19. Ángulo de contacto para membranas bidimensionales de AL, AVG, AL-AVG10 y AL-AVG25 a diferentes condiciones de humedad relativa.

5.4 Membranas tridimensionales

Primero se obtuvo un film tridimensional elaborado con micropartículas de alginato a una concentración de 0,03% (w/v) la cual se muestra en la Figura 5-20. Este film era muy delgado por lo que se rompía fácilmente y no se podía despegar del Petri. Debido a ello, se decidió trabajar con una mayor concentración de alginato para obtener películas que se pudieran manipular.

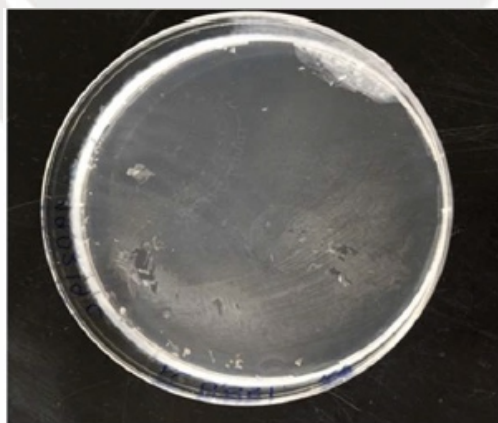


Figura 5-20. Film elaborado con micropartículas de AL 0,03 % (w/v)

5.4.1 Análisis de entrecruzamiento de AL films con CaCl_2

Similar a como se hizo para films bidimensionales de alginato, se evaluaron los films tridimensionales entrecruzados con distintas concentraciones de CaCl_2 . En la Figura 5-21 se muestran las imágenes de las membranas secas luego del entrecruzamiento con CaCl_2 . En este caso también se observa que, mientras la concentración de la solución de CaCl_2 es menor, los films pierden su forma inicial debido a los procesos de disolución y entrecruzamiento que ocurren en simultáneo.

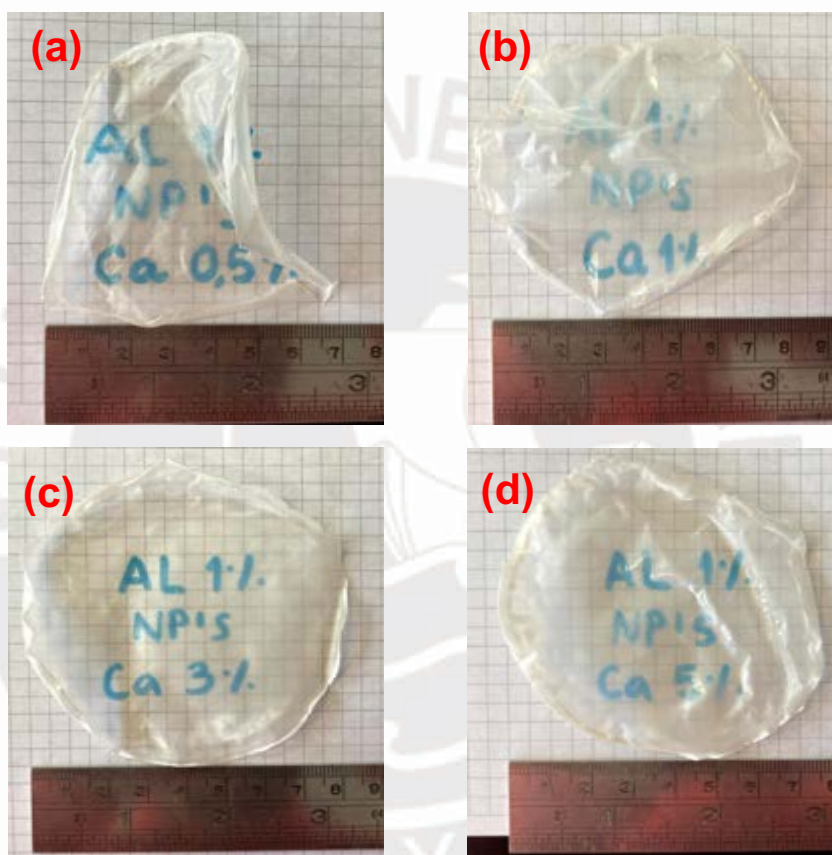


Figura 5-21. Films tridimensionales de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl_2 (a) 0,5%, (b) 1%, (c) 3% y (d) 5%.

Asimismo, en la Figura 5-22 se muestra una gráfica de la variación del espesor de los films después del entrecruzamiento y del porcentaje de masa perdido por efecto del entrecruzamiento (en ambos casos se incluyen barras de error con la desviación estándar). Es importante mencionar que el film de AL 3D tiene un espesor de $30,5 \mu\text{m} \pm 2,6 \mu\text{m}$ antes del entrecruzamiento. En este caso se observa una mayor pérdida de masa (entre 30 a 45%) en comparación con las membranas bidimensionales (Figura 5-11, ítem 5.3.1) y siguiendo una tendencia inversamente proporcional entre la concentración de la solución de CaCl_2 usada y la pérdida de masa. Esto es debido a que

a bajas concentraciones de Ca^{+2} el proceso dominante es la disolución del film, mientras que a mayor cantidad de iones Ca^{+2} el entrecruzamiento ocurre rápidamente evitando así la disolución del alginato en agua.

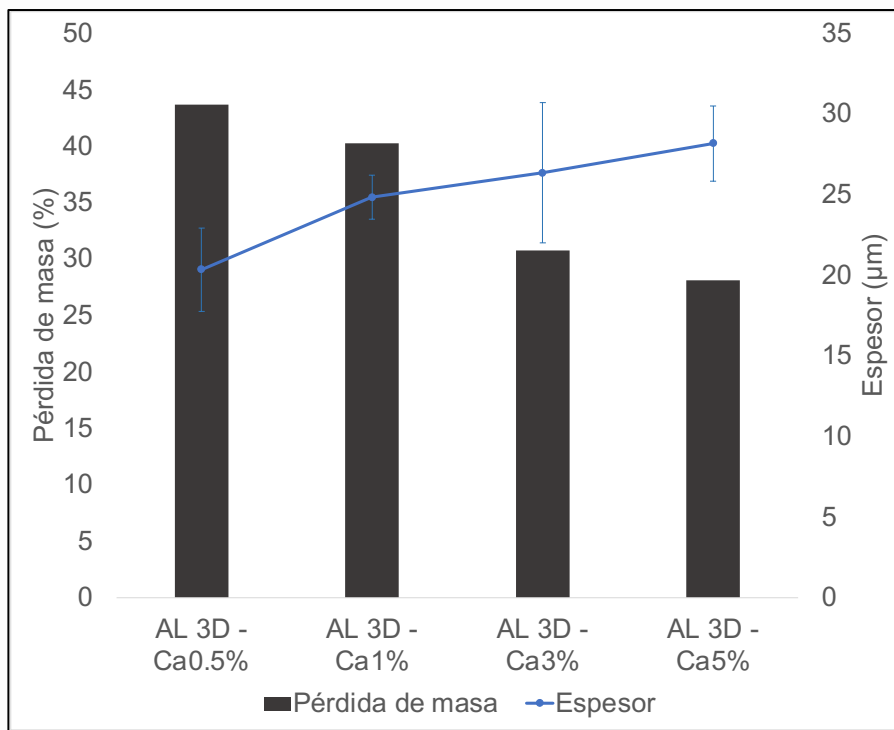


Figura 5-22. Pérdida de masa y espesor de films de AL 1% entrecruzados con CaCl_2 de diferentes concentraciones.

Por otro lado, se evaluó el hinchamiento de los films de AL 3D entrecruzados con diferentes concentraciones de CaCl_2 , cuyos resultados se observan en la Figura 5-23 con sus respectivas barras de error con la desviación estándar. En ella se aprecia que se mantiene la misma tendencia vista para las membranas de AL 2D, a menor concentración de CaCl_2 el hinchamiento aumenta debido a la menor densidad de entrecruzamiento y, por lo tanto, mayor espacio para absorber el buffer. Asimismo, se observa que los films de AL 3D tienen mayor porcentaje de hinchamiento que sus análogos bidimensionales. Esto es debido a que las membranas poseen en su formulación el poloxamer usado como surfactante, que tiene un carácter hidrofílico. Además, como se verá más adelante, los films tridimensionales poseen una superficie porosa que ayuda también a aumentar la capacidad de hinchamiento.

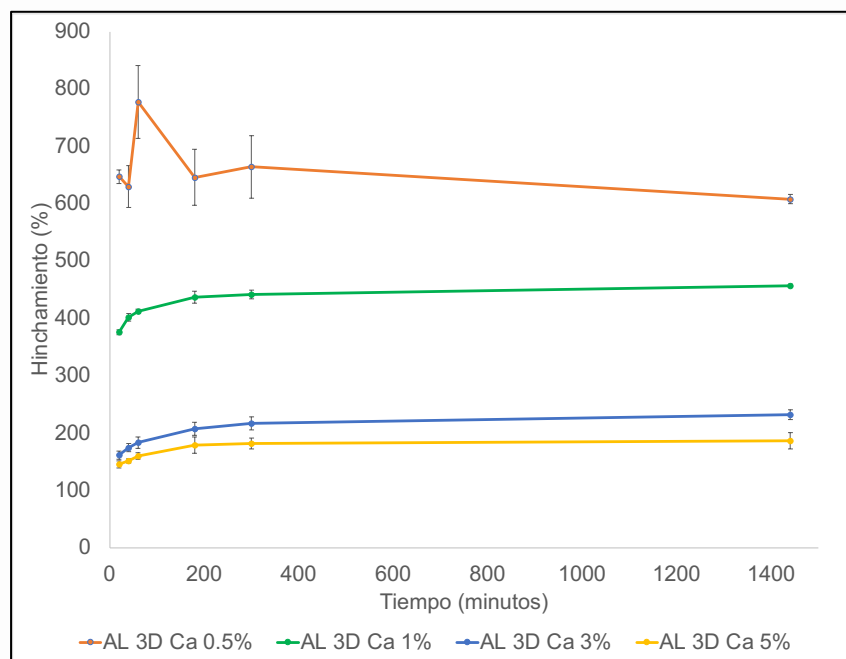


Figura 5-23. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 de films tridimensionales de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl₂ de diferentes concentraciones.

En la Figura 5-24 se observan los resultados (junto con barras de error con la desviación estándar) de la prueba de degradación luego de 24 horas en buffer de acetato (pH 5,5). La gráfica muestra que, para el caso del film entrecruzado con iones CaCl₂ a 0,5% (w/v), el porcentaje de degradación alcanza el 50%. Para el caso de las otras membranas entrecruzadas con CaCl₂ 1, 3 y 5%, la degradación es muy similar, teniendo valores cercanos a 30%. Los resultados muestran una mayor degradación para el caso de los films tridimensionales en comparación con los films bidimensionales (Figura 5-13 en ítem 5.3.1).

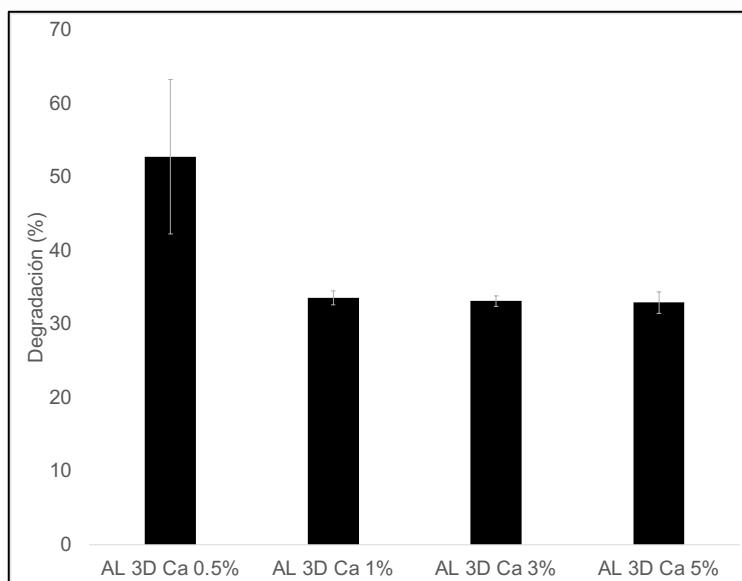


Figura 5-24. Prueba de degradación a 37,5°C y pH 5,5 de films de AL 1% (w/v) entrecruzados con CaCl_2 de diferentes concentraciones luego de 24 horas.

5.4.2 Alginato/gel de Aloe vera

Se elaboraron micropartículas entre AL y AVG en diferentes proporciones, en todos los casos se obtuvo una emulsión color blanca y luego se formaron las membranas correspondientes. Las membranas se entrecruzaron con una solución de CaCl_2 al 1% (w/v) por 5 minutos y se evaluó el espesor y la transparencia antes y después de entrecruzar, así como el porcentaje de pérdida de masa por efecto del proceso de entrecruzado. Los resultados se muestran en la Tabla 5-7 donde se ve que, a medida que aumenta la concentración de AVG, el espesor de la membrana es menor (antes de entrecruzar). En cuanto al porcentaje de pérdida de masa, éste varía entre 15,53 a 30,84%, siendo el AL-AVG10 el film que más masa pierde. Además, no se observa una tendencia en relación a la pérdida de masa o el espesor (luego de entrecruzar) con el contenido de AVG. En cuanto a la transparencia, se observa que, en general, los films tridimensionales presentan mayor transparencia en comparación a sus análogos bidimensionales. La transparencia, luego del entrecruzamiento, varía entre valores de 3,60 a 5,71, siendo el film AL-AVG10 3D el de mayor transparencia.

Tabla 5-7. Espesor, transparencia y pérdida de masa luego de entrecruzar films tridimensionales de AL-AVG.

Film	Antes de entrecruzar		Luego de entrecruzar		% Pérdida de masa por entrecruzamiento
	Espesor (μm)	Transparencia	Espesor (μm)	Transparencia	
AL-AVG10	30,11 \pm 0,84	4,30 \pm 0,25	21,39 \pm 0,25	5,71 \pm 0,62	30,84 \pm 0,91
AL-AVG15	27,92 \pm 0,12	3,97 \pm 0,33	25,25 \pm 2,24	3,60 \pm 0,22	15,53 \pm 1,46
AL-AVG20	28,58 \pm 1,06	4,53 \pm 0,02	20,08 \pm 0,59	4,56 \pm 0,25	23,23 \pm 0,34
AL-AVG25	21,83 \pm 0,47	4,34 \pm 0,03	18,42 \pm 0,35	4,17 \pm 0,03	27,90 \pm 2,67

En la Figura 5-25 se aprecian las imágenes SEM de dos tipos de films tridimensionales AL-AVG10 3D y AL-AVG25 3D. Para el caso del film AL-AVG10 3D la imagen con mayor magnificación muestra regiones con estructuras porosas (dentro de los círculos rojos en la Figura 5-25a) y también regiones donde la imagen no es nítida. Esto último ocurre debido a que la muestra no fue recubierta previamente con ningún metal lo cual hace que el polímero al ser poco conductor, después de un tiempo se cargue (por efecto del haz de electrones) y no permite ver las imágenes claras. A su vez, en el film de AL-AVG25 3D también se ve una superficie porosa, lo que no se ve en los films bidimensionales. Esto es debido a las micropartículas elaboradas previamente a la formación de la membrana.

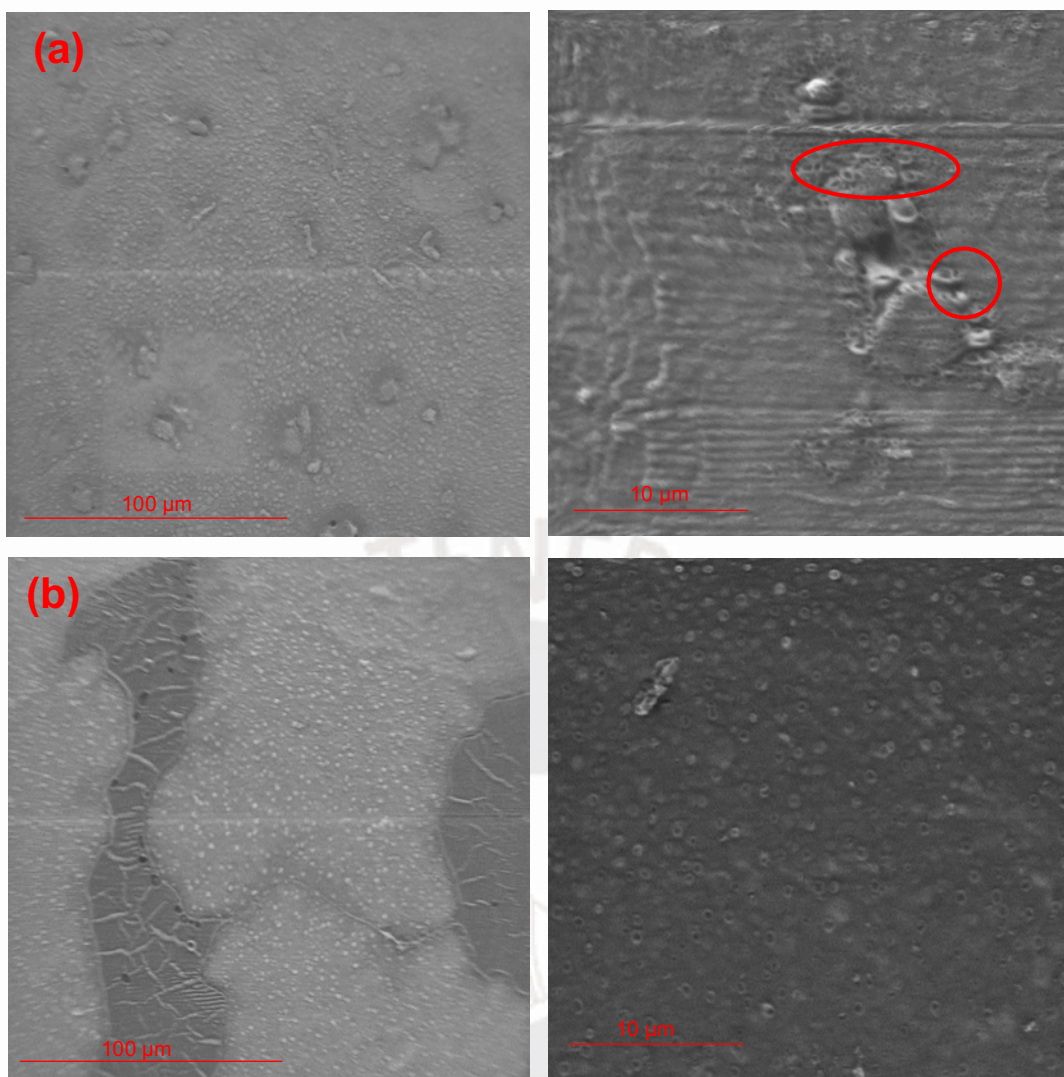


Figura 5-25. Imágenes SEM de membranas de (a) AL-AVG10 3D y (b) AL-AVG25 3D.

El espectro FT-IR-ATR del film AL-AVG10 3D se muestra en la Figura 5-26 y para su comparación se han colocado los espectros de los compuestos de partida, el alginato de sodio, el poloxamer usado como surfactante y el gel de Aloe vera. Se observa que el espectro del film es muy similar al espectro del alginato de sodio que es el compuesto en mayor proporción. Además, no se observan nuevas bandas lo cual indicaría que no hay formación de nuevos enlaces entre los componentes usados en la elaboración de las membranas. Aunque si se pueden observar ligeros cambios, en la señal en 1088 cm^{-1} , que indicarían la interacción de los componentes.

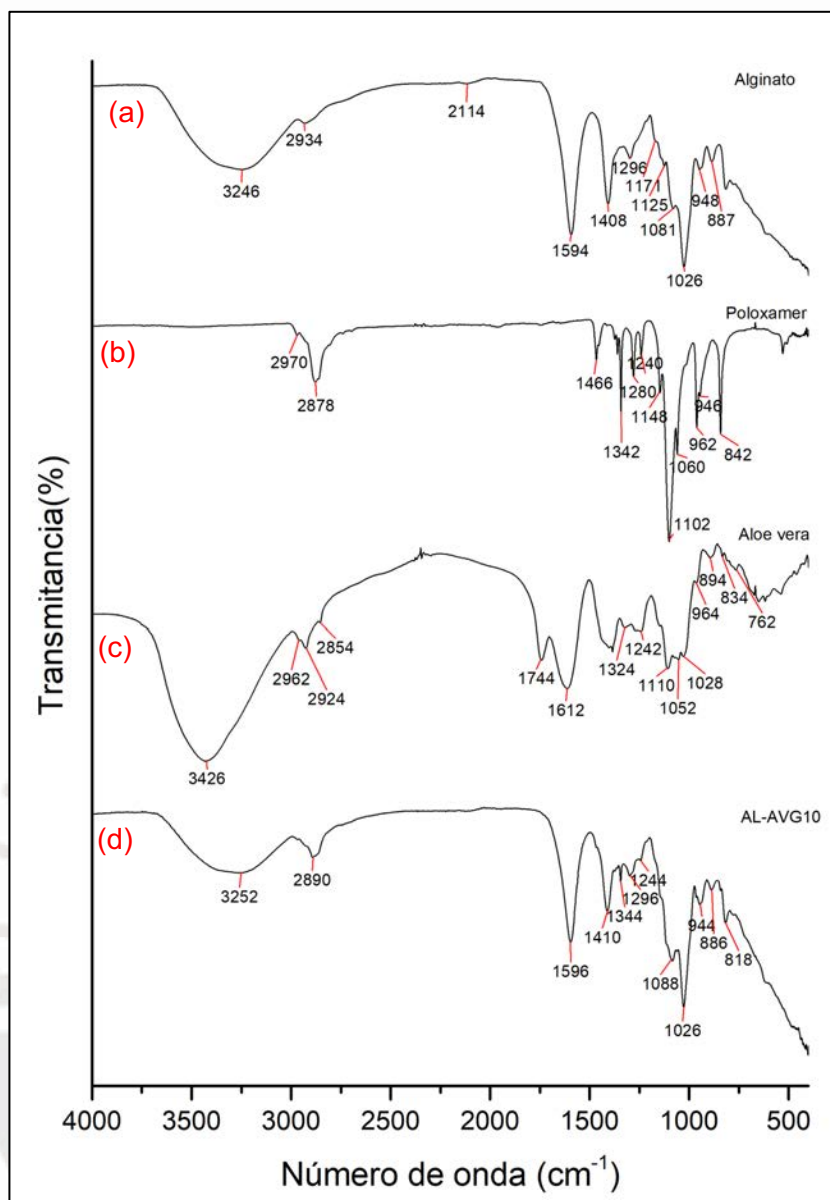


Figura 5-26. Espectro FT-IR-ATR de (a) alginato de sodio, (b) poloxamer, (c) gel de Aloe vera y (d) membrana AL-AVG10 3D.

Asimismo, en la Figura 5-27 encontramos al espectro FT-IR-ATR del film AL- AVG10 3D antes y después del entrecruzamiento con CaCl₂ 1%. En el espectro se aprecia poca variación de los picos del espectro antes del entrecruzamiento. Una de las variaciones es el desplazamiento de la señal en 1596 cm⁻¹ hacia 1590 cm⁻¹ debido a la interacción iónica entre Ca⁺² y el grupo carboxilato (-COO⁻) del alginato [16]. Asimismo, esta interacción también puede variar la proporción de las señales en 1086 cm⁻¹ y 1028 cm⁻¹.

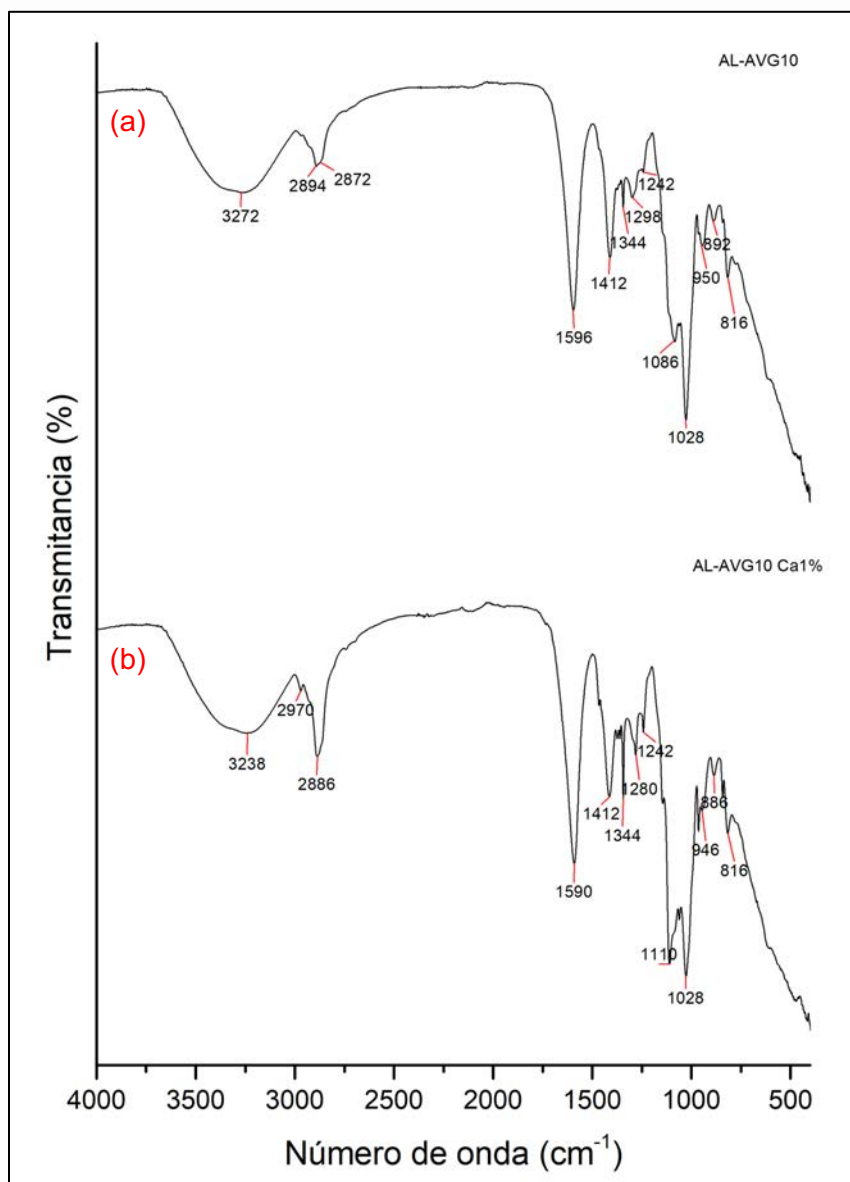


Figura 5-27. Espectro FT-IR-ATR de membrana entre AL-AVG10 3D (a) antes y (b) después de entrecruzar con CaCl_2 1%.

En la Figura 5-28 se muestran los resultados (con barras de error con la desviación estándar) de la prueba de hinchamiento de las membranas tridimensionales AL-AVG entrecruzadas con CaCl_2 al 1% por 5 minutos. En este caso se observa que, a medida que se incrementa el contenido de AVG, también aumenta el porcentaje de hinchamiento; sin embargo, solo el film AL-AVG10 3D mantiene su forma durante las 24 horas mientras que el resto de films, a partir de las 3 horas, se rompieron muy fácilmente, por lo que no se pudo llegar al final de la prueba.

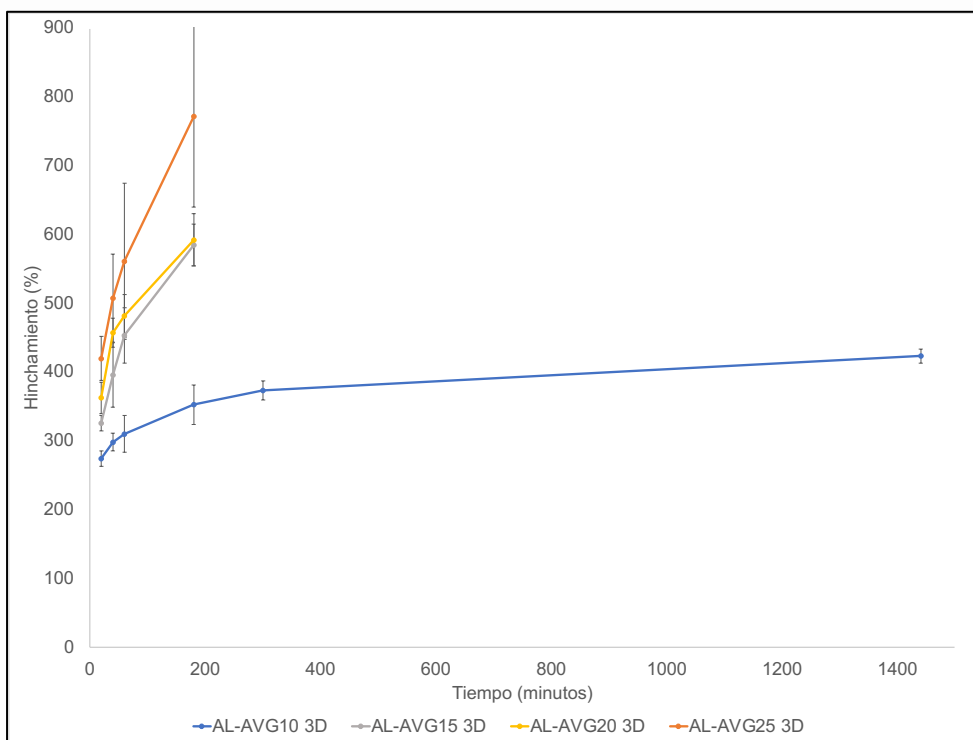


Figura 5-28. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 de films bidimensionales de AL-AVG entrecruzados con CaCl₂ 1% por 5 minutos.

En el caso de la prueba de degradación, luego de 24 horas en buffer de acetato a pH 5,5 (Figura 5-29) se observó que los films AL-AVG15, AL-AVG20 y AL-AVG25 mostraron porcentajes de degradación muy similares, de aproximadamente 60%, mientras que el film AL-AVG10 tiene una degradación de 40%.

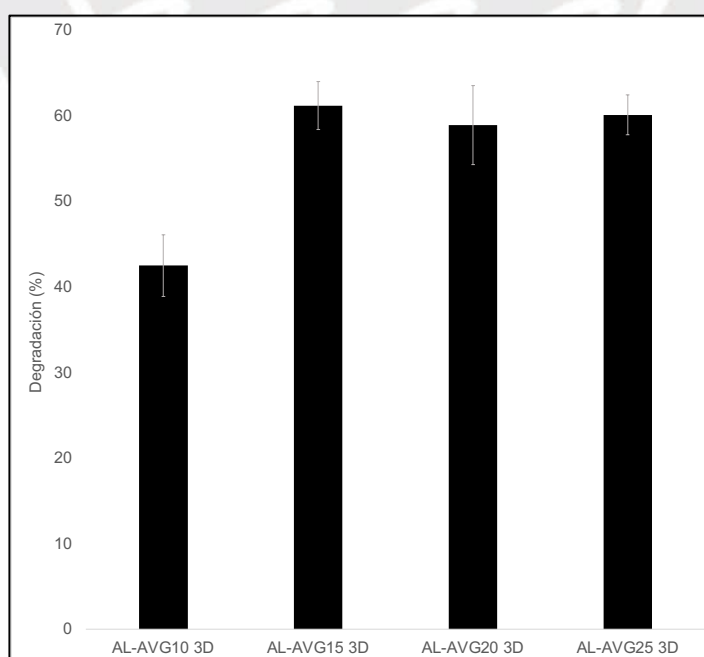


Figura 5-29. Prueba de degradación luego de 24 horas a 37,5°C y pH 5,5 de films tridimensionales entre AL-AVG entrecruzados con CaCl₂ 1% por 5 minutos.

En la Figura 5-30 se muestran los resultados (junto con barras de error con la desviación estándar) de la medición del ángulo de contacto de membranas tridimensionales de AL-AVG10 y AL-AVG25 a diferentes condiciones de humedad relativa. Adicionalmente, se han colocado los resultados para el film AL 3D y para el caso del gel de Aloe vera a modo de comparación. Los resultados muestran que en todos los casos son superficies de carácter hidrofílico (ángulo menor a 90°) y que al aumentar la concentración de AVG en el film el ángulo disminuye. Se puede observar que a una humedad relativa de 100% hay un mayor carácter hidrofílico de los films, que resulta en ángulos entre 15 a 20°.

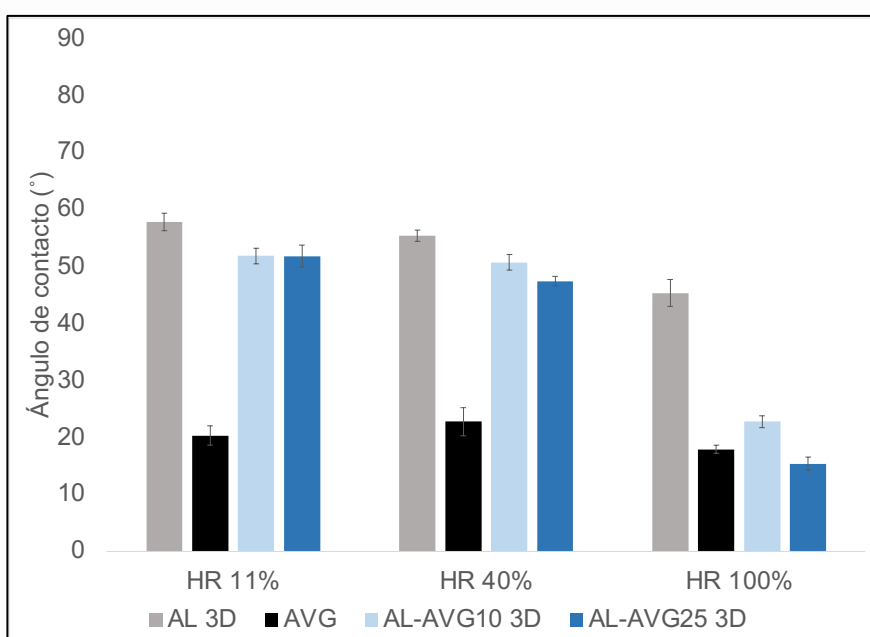


Figura 5-30. Ángulo de contacto para membranas tridimensionales de AL, AVG, AL-AVG10 y AL-AVG25 a diferentes condiciones de humedad relativa.

La evaluación de la actividad antioxidante del film de AL-AVG10 3D se realizó mediante el ensayo de decoloración de ABTS. Los resultados muestran que este film presenta muy poca inhibición, pues solo llega a 1% de inhibición luego de 45 minutos. Esto sugiere que posee muy poca actividad antioxidante debido a que el contenido de compuestos antioxidantes en el gel de Aloe vera es muy bajo a las condiciones estudiadas.

5.4.3 Prueba de degradación

Para esta prueba, solo se evaluaron films con la composición de AL-AVG10 3D y entrecruzados con CaCl_2 1% (w/v) por 5 minutos. Se evaluó la degradación en tres medios diferentes: en buffer de acetato a pH 5,5 que simula el pH de piel sana, pH 7,5 que simula el ambiente de una herida leve con exudado y finalmente en buffer de $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ a pH 8,5 por ser el pH aproximado que se registra si se tiene una herida grave. Adicionalmente, se evaluó el efecto de la presencia de la enzima lisozima producida por el sistema inmune del cuerpo humano y que tiene función bactericida [96].

En los resultados mostrados en la Figura 5-31 (junto con las barras de error con desviación estándar), se observa que, en general, a un pH básico de 8,5 el film se degrada en mayor medida a lo largo del tiempo (degradación cercana a 80%), en comparación a los otros medios de pH 5,5 y 7,5. Esto debido a que, en medio básico, la solubilidad del alginato es el proceso dominante. Esto también concuerda con lo visualizado durante la prueba, pues solo en este medio los films se rompen fácilmente mientras que en los otros casos las membranas mantienen su forma. Además, los films a pH de 7,5 son los que menos se degradan llegando a aproximadamente 25% de degradación luego de 24 horas.

En cuanto a la presencia de la enzima lisozima, el fabricante reporta [97] que el rango de pH en donde la enzima se encuentra activa es entre 6 a 9, teniendo en pH 6,2 la máxima actividad donde hidroliza los enlaces glicosídicos β -(1-4). Esto concuerda con que a pH 5,5, cercano a pH 6,2, se observa una mayor degradación que en el caso del medio a pH 7,5. Además, comparando los resultados obtenidos en el medio de pH 7,5, la degradación de los films es ligeramente mayor en presencia de lisozima en comparación con el medio de pH 7,5 sin enzima.

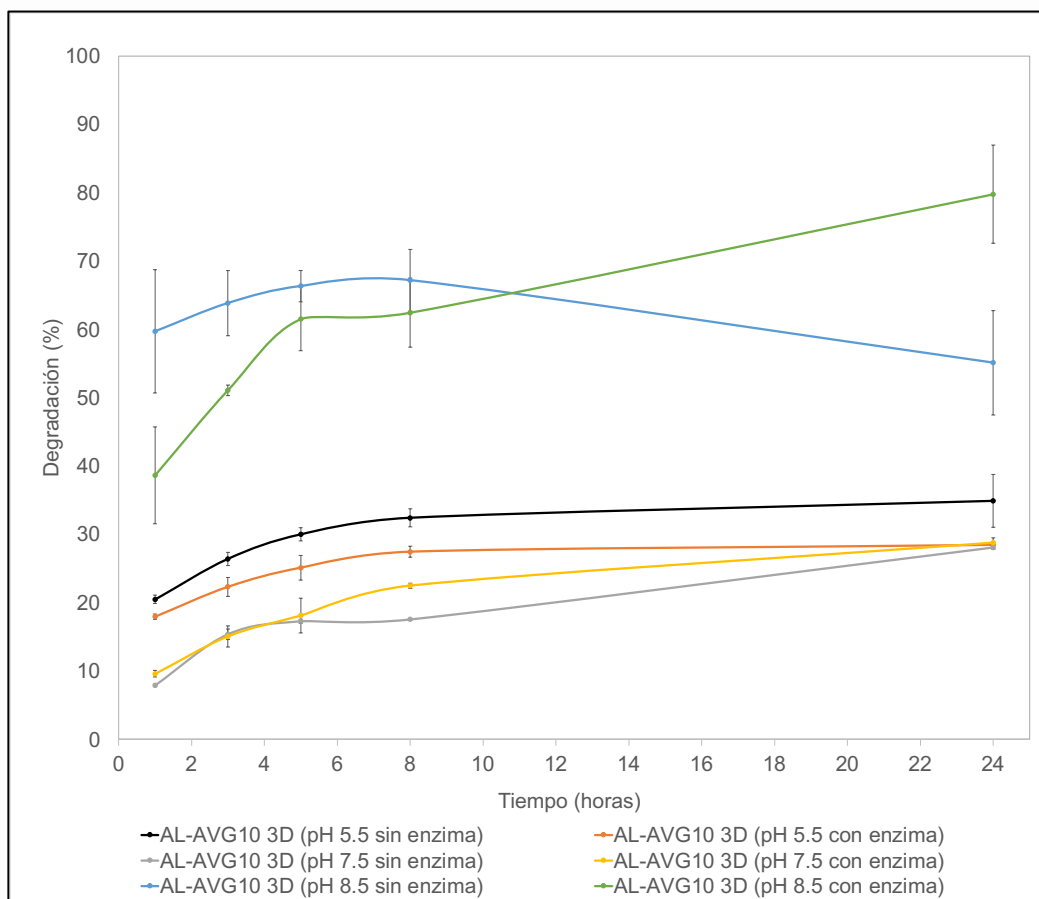


Figura 5-31. Prueba de degradación a 37,5°C y a diferentes medios para film de AL-AVG10 3D entrecruzado con CaCl₂ 1%.

5.4.4 Membranas de alginato con extracto de uña de gato

Adicionalmente a las membranas entre AL-AVG, se evaluó una membrana de alginato y extracto de uña de gato (UT). La membrana obtenida (ver Figura 5-32) era transparente y con una coloración marrón clara debido a la coloración que posee el extracto de la uña de gato. En la Figura 5-33 se encuentra la imagen SEM de la membrana, en ella se observa una superficie porosa debido a las micropartículas formadas previamente a la elaboración del film.



Figura 5-32. Film elaborado entre AL-UT0,1 tridimensional.

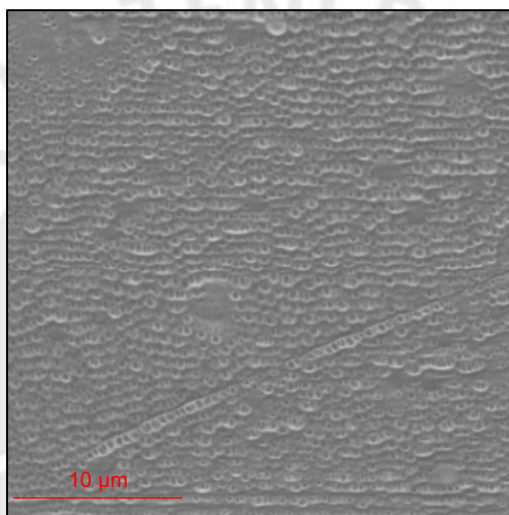


Figura 5-33. Imagen SEM para la membrana tridimensional entre AL-UT0,1.

Los resultados de la prueba de hinchamiento se muestran en la Figura 5-34 donde se han colocado, además, los resultados de un film de AL 3D a modo de comparación junto con barras de error con la desviación estándar. Se observa que el film de AL 3D llega a un equilibrio de aproximadamente 250% de hinchamiento, mientras que el film AL-UT0,1 llega a un porcentaje cercano a los 300%. El incremento en el hinchamiento se debe posiblemente a la superficie porosa de la membrana, así como la incorporación de moléculas hidrofílicas que se encuentran en el extracto de la uña de gato.

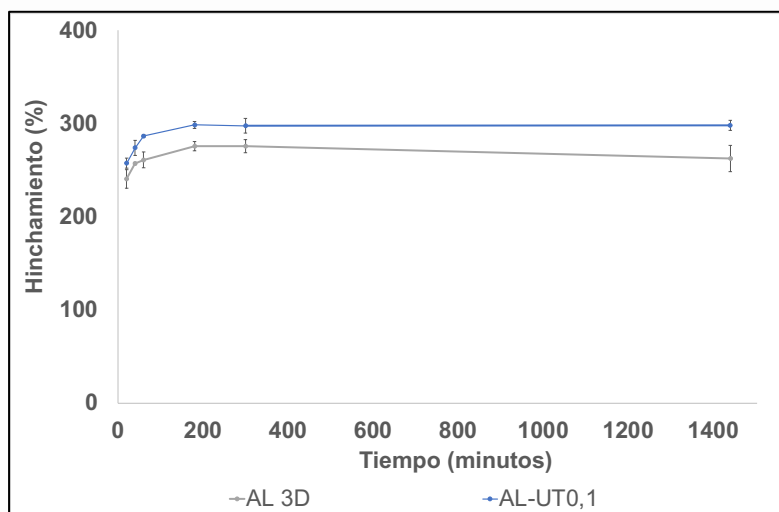


Figura 5-34. Resultados de hinchamiento a 37,5°C y pH 5,5 del film AL-UT0,1 entrecruzado con CaCl₂ 1% por 5 minutos.

En la Figura 5-35 se observa el porcentaje de inhibición del radical ABTS para evaluar la actividad antioxidante, así como las barras de error con la desviación estándar. En este caso se observa que la incorporación de la uña de gato aumenta considerablemente el porcentaje de inhibición de forma muy rápida. Luego de un minuto el porcentaje de la actividad antioxidante del film esta cerca a los 60% mientras que el film de AL 3D casi no posee actividad siendo alrededor de 2%. Esta alta actividad antioxidante se debe a la presencia de compuestos antioxidantes del extracto de uña de gato. Según lo reportado por Alvarenga y colaboradores [80] la uña de gato posee compuestos como alcaloides oxindoles, flavonoides y fenólicos que son responsables de esta actividad.

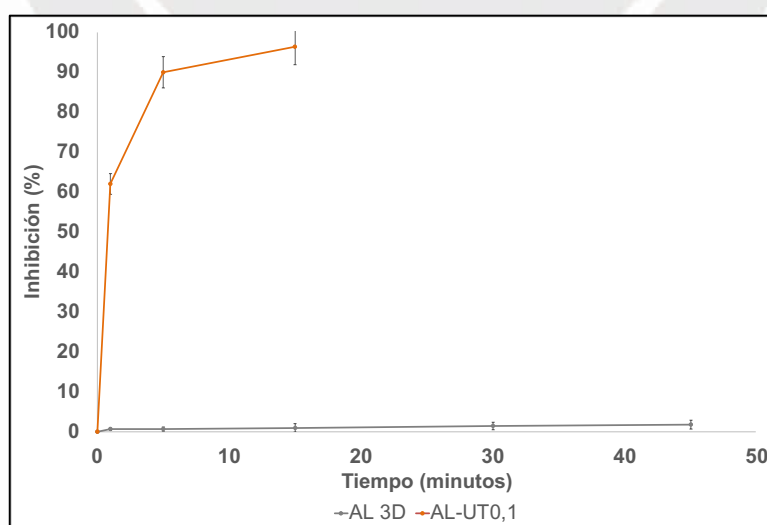


Figura 5-35. Actividad antioxidante de film AL-UT0,1.

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- Se caracterizó el alginato de sodio mediante espectroscopía UV-Vis, infrarroja, viscosimetría capilar, cromatografía por permeación en gel y goniometría.
- Se extrajo el gel de Aloe vera de la planta y se pasteurizó a 65°C por 15 minutos donde se obtuvo una solución poco viscosa color blanquecina. Además, se aisló el polisacárido mayoritario del gel de Aloe vera, el acemanano. Ambos productos se caracterizaron mediante FT-IR, GPC y se determinó su actividad antioxidante.
- Se elaboraron membranas de alginato de sodio y se entrecruzaron con CaCl₂ con concentraciones de 0,5% (w/v), 1%, 3% y 5%, donde a mayor concentración de iones Ca⁺² hay menor porcentaje de hinchamiento. Los valores de porcentaje de hinchamiento varían entre 100% a 600%.
- Se obtuvieron membranas bidimensionales transparentes de alginato con glicerol, y de alginato con gel de Aloe vera. La incorporación de glicerol le otorga una mayor flexibilidad al film, y el gel de Aloe vera mejora las propiedades de hinchamiento a pH 5,5 y 37,5°C con valores entre 280% de hinchamiento para el film AL-AVG10 2D y 500% para AL-AVG20 2D; mientras que el film AL-AVG25 2D se rompe en pedazos a las 5 horas con lo cual no se puede finalizar con la prueba.
- El espesor de los films AL-AVG 2D se encuentra entre 23,22 a 27,83 µm siendo el de menor espesor el film AL-AVG25 2D.
- Se obtuvieron micropartículas de alginato y la emulsión obtenida se utilizó para la elaboración de membranas tridimensionales, las cuales son transparentes.
- Se elaboraron membranas tridimensionales de alginato y se entrecruzaron con iones Ca⁺² en solución de concentraciones de 0,5% (w/v), 1%, 3% y 5% donde la capacidad de hinchamiento es inversa a la concentración de iones Ca⁺². Asimismo, se obtienen porcentajes de hinchamiento mayores a los films análogos bidimensionales que varían entre 150 a 800% a pH 5,5 y 37,5°C.
- Se obtuvieron films de alginato con gel de Aloe vera transparentes, se entrecruzaron con CaCl₂ al 1% y se caracterizaron mediante SEM donde se observó una superficie porosa por la formación previa de las micropartículas, un espesor entre 18,42 a 25,25 µm.
- En el caso de la capacidad de hinchamiento, solo el film AL-AVG10 3D mantiene su forma luego de 24 horas de la prueba llegando a un equilibrio de aproximadamente 400%; mientras que los otros films AL-AVG15 3D, AL-AVG20 3D y AL-AVG25 3D se rompen a las 3 horas de iniciada la prueba.

- La prueba de degradación del film AL-AVG10 3D mostro que a pH 7,5 es donde menor degradación de los films se observa, mientras que a pH 8,5 los films presentan una mayor pérdida de masa.
- No se observa actividad antioxidante mediante el ensayo de decoloración de ABTS del film de alginato y de AL-AVG-10 3D.
- Se elaboró un film tridimensional entre AL-UT0,1, del cual se analizó la superficie mediante SEM donde se observa la presencia de poros, se evaluó el hinchamiento a pH 5,5 y 37,5°C y finalmente la actividad antioxidante mediante ensayo de decoloración de ABTS donde hay una alta actividad con resultados de inhibición de mas de 90% en 15 minutos.

6.2 Recomendaciones

- Se recomienda evaluar las propiedades mecánicas (ensayo de tracción) de las membranas bidimensionales y tridimensionales tanto secas como humedecidas.
- Evaluar la permeabilidad de vapor de humedad de los films.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los films frente a bacterias gram-positivas y gram-negativas.
- Se sugiere incorporar en las membranas el gel de Aloe vera en forma sólida (por ejemplo, liofilizado) para que el contenido en el film sea mayor.
- Finalmente, se sugiere hallar el tamaño promedio, índice de polidispersión y potencial zeta de las microparticulas de alginato, alginato con gel de Aloe vera y alginato y extracto de uña de gato formadas.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pereira, R.; Carvalho, A.; Gil, M. H.; Mendes, A.; Bártolo, P. Influence of *Aloe vera* on water absorption and enzymatic *in vitro* degradation of alginate hydrogel films. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 98, 311-320.
2. Pereira, R.; Carvalho, A.; Vaz, D. C.; Mendes, A.; Bártolo, P. Development of novel alginate based hydrogel films for wound healing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, 52, 221-230.
3. Atim, B.; Buyana, B. Alginate in wound dressings. *Pharmaceutics.* **2018**, 10, 1-18.
4. Hamman, J. H. Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. *Molecules.* **2008**, 13, 1599-1616.
5. Fata, M.; Ghods, S.; Rehm, B.; Peteiro, C.; Gonzales, A.; Orive, G.; *et al.* *Alginates and their biomedical applications*, 1ra ed.; Rehm, B.; Fata, M., Ed.; Springer: Singapur, **2018**.
6. Urtuvia, V.; Maturana, N.; Acevedo, F.; Peña, C.; Diaz-Barrera, A. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World J. of Microbiol. and Biotechnol.* **2017**, 33, 1-10.
7. Hay, I.; Rehman, Z.; Moradali, M.; Wang, Y.; Rehm, B. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microb. Biotechnol.* **2013**, 6, 637-650.
8. Donati, I.; Paoletti, S.; Rehm, B.; Hashimoto, W.; Maruyama, Y.; Itoh, T.; *et al.* *Alginates: Biology and Applications*. 1ra ed.; Rehm, B., Ed.; Springer: Berlin, **2009**.
9. Yang, J.; Xie, Y. J.; He, W. Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 84, 33 - 39.
10. Chee, S.; Wong, P.; Wong, C. Extraction and characterization of alginate from brown seaweeds (Fucales, Phaeophyceae) collected from Port Dickson, Peninsular Malaysia. *J. Appl. Phycol.* **2011**, 23, 191-196.
11. ASTM F2064-17. Standard guide for characterization and testing of alginates as starting materials intended for use in biomedical and tissue engineered medical product applications. ASTM. **2017**.
12. Fertah, M. Isolation and Characterization of Alginate from Seaweed. En *Seaweed Polysaccharides: Isolation, Biological and Biomedical applications*; Venkatesan, J.; Anil, S.; Kim, S., Ed.; Elsevier: Amsterdam, **2017**; Capítulo 2, pp. 11-26.
13. Yong, K.; Mooney, D. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.* **2012**, 37, 106-126.

14. Hay, I. D.; Rehman, Z.; Fata, M.; Wang, Y.; Rehm, B. Microbial alginate production, modification and its applications. *Microb. Biotechnol.* **2013**, 6, 637-650.
15. Thomas, S. Alginate dressings in surgery and wound management – part 1. *J. Wound Care.* **2000**, 9, 56-60.
16. Li, J.; Wu, Y.; He, J.; Huang, Y. A new insight to the effect of calcium concentration on gelation process and physical properties of alginate films. *J. Mater. Sci.* **2016**, 51, 5791-5801.
17. Zhao, X.; Li, B.; Xue, C.; Sun, L. Effect of molecular weight on the antioxidant property of low molecular weight alginate from *Laminaria japonica*. *J. Appl. Phycol.* **2012**, 24, 295-300.
18. Sen, M. Effects of molecular weight and ratio of guluronic acid to mannuronic acid on the antioxidant properties of sodium alginate fractions prepared by radiation-induced degradation. *Appl. Radiat. Isot.* **2011**, 69, 126-129.
19. Kelishomi, Z.; Goliaei, B.; Mahdavi, H.; Nikoofar, A.; Rahimi, M.; Moosavi, A.; Mamashli, F.; Bigdeli, B. Antioxidant activity of low molecular weight alginate produced by thermal treatment. *Food Chem.* **2016**, 196, 897-902.
20. Falkeborg, M.; Cheong, L.; Gianfico, C.; Sztukiel, K.; Kristensen, K.; Glasius, M.; Xu, X.; Guo, Z. Alginate oligosaccharides: Enzymatic preparation and antioxidant property evaluation. *Food Chem.* **2014**, 164, 185-194.
21. Hernandez, E.; Martínez, A. Carbohydrates and their free radical scavenging capability: A theoretical study. *J. Phys. Chem. B.* **2012**, 116, 9668-9675.
22. Le, N.; Vo, H.; Tomoko, N. A study of degradation mechanism of alginate by gamma-irradiation. *Radioisotopes.* **2009**, 58, 1-11.
23. Crossingham, Y.; Kerr, P.; Kennedy, R. Comparison of selected physico-chemical properties of calcium alginate films prepared by two different methods. *Int. J. Pharm.* **2014**, 473, 259-269.
24. Rhim, J. Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate film. *LWT.* **2004**, 37, 323-330.
25. Liling, G.; Di, Z.; Jiachao, X.; Xin, G.; Xiaoting, F.; Qing, Z. Effects of ionic crosslinking on physical and mechanical properties of alginate mulching films. *Carbohydr. Polym.* **2016**, 136, 259-265.
26. Ching, S.; Bansal, N.; Bhandari, B. Alginate gel particles – A review of production techniques and physical properties. *Crit. Rev. Food.* **2017**, 57, 1133-1152.
27. Costa, M.; Marques, A.; Pastrana, L.; Teixeira, J.; Sillankorva, S.; Cerqueira, M. Physicochemical properties of alginate-based films: Effects of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. *Food Hydrocoll.* **2018**, 81, 442-448.

28. Koga, A.; Pereira, A.; Lipinski, L.; Oliveira, M. Evaluation of wound healing effect of alginate films containing Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel. *J. Biomater. Appl.* **2018**, 32, 1212-1221.
29. Pereira, R.; Mendes, A.; Bártolo, P. Alginate/Aloe vera hydrogel films for biomedical applications. *Procedia CIRP.* **2013**, 5, 210-215.
30. Olivas, G.; Barbosa, G. Alginate-calcium films: Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity. *LWT.* **2008**, 41, 359-366.
31. Pavlath, A.; Gossett, C.; Camirand, W.; Robertson, G. Ionomeric films of alginic acid. *J. Food Sci.* **1999**, 64, 61-63.
32. Shahzad, A.; Khan, A.; Afzal, Z.; Umer, M.; Khan, J.; Khan, G. Formulation development and characterization of cefazolin nanoparticles-loaded cross-linked films of sodium alginate and pectin as wound dressings. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, 124, 255-269.
33. Chan, L.; Lee, H.; Heng, P. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. *Int. J. Pharm.* **2002**, 242, 259-262.
34. Baruah, A.; Bordoloi, M.; Deka, H. Aloe vera: A multipurpose industrial crop. *Ind. Crops Prod.* **2016**, 94, 951-963.
35. Grace, O.; Dzajic, A.; Jäger, A.; Nyberg, N.; Önder, A.; Rønsted, N. Monosaccharide analysis of succulent leaf tissue in Aloe. *Phytochemistry.* **2013**, 93, 79-87.
36. The International Aloe Science Council. <https://www.iasc.org/Consumers/AloeVeraFAQ.aspx> (Consultado febrero 6, 2021).
37. Ni, Y.; Turner, D.; Yates, K. M.; Tizard, I. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *Int. Immunopharmacol.* **2004**, 4, 1745-1755.
38. Rodríguez-González, V. M.; Femenia, A.; González-Laredo, R. F.; Rocha-Guzmán, N. E.; Gallegos-Infante, J. A.; Candelas-Cadillo, M. G.; Ramírez-Baca, P.; Simal, S.; Rosselló, C. Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydr. Polym.* **2011**, 86, 1675-1683.
39. Minwuyelet, T.; Sewalem, M.; Gashe, M. Review on therapeutic uses of Aloe vera. *Glob. J. Pharmacol.* **2017**, 11, 14-20.
40. Eshun, K.; He, Q. Aloe vera: A valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries – A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2004**, 44, 91-96.

41. United States Department of Agriculture.
<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ALVE2> (Consultado Abril, 2020).
42. Boudreau, M.; Beland, F. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (Miller), *Aloe vera*. *J. Environ. Sci. Health C*. **2006**, 24, 103-154.
43. The International Aloe Science Council.
https://www.iasc.org/Portals/19/Documents/Scientific/IASC_Aloe_vera_A_Scientific_Primer.pdf?ver=2016-04-06-135903-093 (Consultado Febrero 6, 2021).
44. Sahu, P. K.; Dayal, D.; Singh, R.; Pandey, P.; Gupta, S.; Kumar, A.; Pandey, K. D. Therapeutic and medicinal uses of *Aloe vera*: A review. *Pharmacol. Pharm.* **2013**, 4, 599- 610.
45. The International Aloe Science Council.
https://www.iasc.org/Portals/19/Documents/OldSite/WHO_Aloe_Monograph.pdf (Consultado Febrero 6, 2021).
46. Grundmann, O. *Aloe vera* gel research review. *J. Nat. Med.* **2012**, 4, 1-15.
47. Morton, J. Folks uses and commercial exploitation of aloe leaf pulp. *Econ. Bot.* **1961**, 15, 311-319.
48. Agarry, O.; Olaleye, M.; Bello, C. Comparative antimicrobial activities of *Aloe vera* gel and leaf. *Afr. J. Biotechnol.* **2005**, 4, 1413-1414.
49. Salah, F.; Ghoul, Y. E.; Mahdhi, A.; Majdoub, H.; Jarroux, N.; Sakli, F. Effect of the deacetylation degree on the antibacterial and antibiofilm activity of acemannan from *Aloe vera*. *Ind. Crops Prod.* **2017**, 103, 13-18.
50. Jin, Z.; Wang, C.; Liu, Z.; Gong, W. Physiological and ecological characters studies on *Aloe vera* under soil salinity and seawater irrigation. *Process Biochem.* **2007**, 42, 710-714.
51. Paez, A.; Gebre, M.; Gonzalez, M.; Tschaplinski, T. Growth, soluble carbohydrates, and aloin concentration of *Aloe vera* plants exposed to three irradiance levels. *Environ. Exp. Bot.* **2000**, 44, 133-139.
52. Hazrati, S.; Tahmasebi, Z.; Ramezani, S. Effect of different harvest dates on growth characteristics and aloin content of *Aloe barbadensis* Miller. *Adv. Environ. Biol.* **2011**, 5, 439-442.
53. Wang, Y.; Strong, K. Monitoring physical and chemical properties of freshly harvested field-grown *Aloe vera* leaves. A preliminary report. *Phytother. Res.* **1993**, 7, S1-S4.
54. Fermentia, A.; Sánchez, E.; Simal, S.; Rosselló, C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydr. Polym.* **1999**, 39, 109-117.

55. McAnalley, B. Process for preparation of Aloe products. U. S. Patente 4,957,907, Setiembre 18, **1990**.
56. Ni, Y.; Yates, K.; Tizard, I. Aloe polysaccharides. En *Aloes. The genus Aloe*; Reynolds T., Ed.; CRC Press: Florida, **2004**; Capítulo 4.
57. Bozzi, A.; Perrin, C.; Austin, S.; Arce, F. Quality and authenticity of commercial Aloe vera gel powders. *Food Chem.* **2007**, 103, 22-30.
58. Saccu, D.; Bogoni, P.; Procida, G. Aloe exudate: Characterization by reversed phase HPLC and headspace GC-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 4526-4530.
59. Rowe, T.; Parks, L. A phytochemical study of Aloe vera leaf. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1941**, 30, 262-266.
60. Hamid, G.; El-Kholany, E.; Nahla, E. Evaluation of Aloe vera gel as antioxidant and antimicrobial ingredients in orange-carrot blend nectars. *Middle East J. Agric. Res.* **2014**, 3, 1122-1134.
61. Esua, M. F.; Rauwald, J. W. Novel bioactive maloyl glucans from Aloe vera gel: isolation, structure elucidation and in vitro bioassays. *Carbohydr. Polym.* **2006**, 341, 355- 364.
62. Meadows, T. Aloe as humectant in new skin preparations. *Cosmetics and Toiletries.* **1980**, 95, 51-56.
63. Surjushe, A.; Vasani, R.; Suple, D. Aloe vera: A short review. *Indian J. Dermatol.* **2008**, 53, 163-166.
64. Choi, S.; Chung, M. A review on the relationship between Aloe vera components and their biologic effects. *Semin. Integr. Med.* **2003**, 1, 53-62.
65. Shelton, R. Aloe vera. Its chemical and therapeutic properties. *Int. J. Dermatol.* **1991**, 30, 679-683.
66. Vega, A.; Miranda, M.; Aranda, M.; Henriquez, K.; Vergara, J.; Tabilo, G.; Pérez, M. Effect of high hydrostatic pressure on functional properties and quality characteristics of Aloe vera gel (*Aloe barbadensis* Miller). *Food Chem.* **2011**, 129, 1060-1065.
67. Ozsoy, N.; Candoken, E.; Akev, N. Implications for degenerative disorders. Antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, β -carotene and α -tocopherol in Aloe vera. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2009**, 2, 99-106.
68. Young, K.; Weintraub, S.; Pal, B. Isolation and identification of a phenolic antioxidant from *Aloe barbadensis*. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 28, 261-265.
69. Saberian, H.; Hamidi, Z.; Abbasi, S. Effect of pasteurization and storage on bioactive components of Aloe vera gel. *Nutr. Food Sci.* **2013**, 43, 175-183.

70. Chow, J.; Williamson, D.; Yates, K.; Goux, W. Chemical characterization of the immunomodulating polysaccharide of Aloe vera L. *Carbohydr. Res.* **2005**, 340, 1131-1142.
71. Talmadge, J.; Chavez, J.; Jacobs, L.; Munger, C.; Chinnah, T.; Chow, J.; Williamson, D.; Yates, K. Fractionation of Aloe vera L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. *Int. Immunopharmacol.* **2004**, 4, 1757-1773.
72. Chokboribal, J.; Tachaboonyakiat, W.; Sangvanich, P.; Ruangpornvisuti, V.; Jettanacheawchankit, S.; Thunyakitpisal, P. Deacetylation affects the physical properties and bioactivity of acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera. *Carbohydr. Polym.* **2015**, 133, 556-566.
73. Minjares-Fuentes, R.; Rodríguez-González V. M.; González-Laredo, R. F.; Eim, V.; González-Centeno, M. R.; Fermenta, A. Effect of different drying procedures on the bioactive polysaccharide acemannan from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller). *Carbohydr. Polym.* **2017**, 168, 327-336.
74. Coats, B. Method of processing stabilized Aloe vera gel obtained from the whole Aloe vera leaf. U. S. Patent 5,356,811, Octubre 18, 1994.
75. Maret, R. Process for preparing extracts of aloe vera. U.S. Patent 3,878,197, Abril 15, 1975.
76. Cerqueira, L.; Mcknight, S.; Rodriguez, S.; Turner, C. Bifurcated method to process Aloe whole leaf. E. Patent 0 966 294 B1, Febrero 3, 1998.
77. Cobble, H. Stabilized Aloe vera gel and preparation of same. U.S. Patent 3,892,853, Julio 1, 1975.
78. Elsevier. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-una-gato-13095508> (Consultado noviembre 12, 2021).
79. Medical Health Guide. <http://www.medicalhealthguide.com/herb/catsclaw.htm> (Consultado noviembre 12, 2021)
80. Alvarenga, S.; Rosales, C.; Sánchez, L.; Muñoz, R.; Aguilar, F. Seasonality effect on the composition of oxindole alkaloids from distinct organs of *Uncaria tomentosa* from the Caribbean region of Costa Rica. *Phytochemistry.* **2018**, 151, 26-31.
81. Bertol, G.; Franco, L.; Heleno, B. HPLC Analysis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa*: sample preparation and analysis optimization by factorial design. *Phytochem. Anal.* **2012**, 23, 143-151.
82. Boateng, J.; Catanzano, O. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing – A review. *J. Pharm. Sci.* **2015**, 104, 3653-3680.

83. Kamoun E. A.; Kenawy, E. S.; Chen, X. A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings. *J. Adv. Res.* **2017**, 8, 217-233.
84. WordPress. <https://pielsuave.wordpress.com/2010/12/08/las-tres-capas-de-la-piel/> (Consultado noviembre 9, 2020).
85. Boateng, J.; Matthews, K.; Stevens, H.; Eccleston, G. Wound healing dressings and drug delivery systems: A review. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 2892-2923.
86. Wallace, L.; Gwynne, L.; Jenkins, T. Challenges and opportunities of pH in chronic wounds. *Ther. Deliv.* **2019**, 10, 719-735.
87. Martinsen, A.; Skjåk, G.; Smidsrød, O. Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. *Carbohydr. Polym.* **1991**, 15, 171-193.
88. ASTM F2605-16. Standard Test Method for Determining the Molar Mass of Sodium Alginate by Size Exclusion Chromatography with Multi-angle Light Scattering Detection (SEC-MALS). ASTM. 2016.
89. Silva, S.; Caridade, S.; Mano, J.; Reis, R. Effect of crosslinking in chitosan/aloe vera-based membranes for biomedical applications. *Carbohydr. Polym.* **2013**, 98, 581-588.
90. Turner, C.; Williamson, D.; Stroud, P.; Talley, D. Evaluation and comparison of commercially available Aloe vera L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. *Int. Immunopharmacol.* **2004**, 4, 1727-1737.
91. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, 26, 1231-1237.
92. Norajit, K.; Kim, K.; Ryu, G. Comparative studies on the characterization and antioxidant properties of biodegradable alginate films containing ginseng extract. *J. Food Eng.* **2010**, 98, 377-384.
93. Rezvani M.; Ahmad, N.; Amin, M.; Ng, S. Optimization, characterization, and in vitro assessment of alginate-pectin ionic cross-linked hydrogel film for wound dressing applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 97, 131-140.
94. Pereira, R.; Tojeira, A.; Vaz, D.; Mendes, A.; Bártolo, P. Preparation and characterization of films based on alginate and Aloe vera. *Int. J. Polym. Anal. Charact.* **2011**, 16, 449-464.
95. Masuelli, M.; Illanes, C. Review of the characterization of sodium alginate by intrinsic viscosity measurements. Comparative analysis between conventional and single point methods. *Int. J. Biomater. Sci. Eng.* **2014**, 1, 1-11.

96. Tegl, G.; Rollett, A.; Dopplinger, J.; Gamerith, C.; Guebitz, G. Chitosan based substrates for wound infection detection based on increased lysozyme activity. *Carbohydr. Polym.* **2020**, 151, 260-267.
97. Merck.
<https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/product/sial/62971?context=product>
(Consultado octubre 26, 2021).

