

## ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD DE COMPÓSITO EN GEL DE *ALOE VERA* Y NANOPARTÍCULAS DE $\text{TiO}_2$ PARA USO DÉRMICO

**Iván Cortes-Priego<sup>1</sup>, Francisco Rodríguez-González<sup>1</sup>,  
Jesús Santa Olalla-Tapia<sup>2</sup>, Argelia López-Bonilla<sup>1</sup>,  
Antonio Ruperto Jiménez-Aparicio<sup>1</sup>, Luz Arcelia García-Serrano<sup>3</sup>,  
Brenda Hildeliza Camacho-Díaz<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Instituto Politécnico Nacional, Yautepec, Morelos, México.

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, México.

<sup>3</sup>Centro Interdisciplinario de Investigaciones y Estudios sobre Medio Ambiente y Desarrollo, Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México.

ivi\_390@hotmail.com, frrodriguezg@ipn.mx, jsa@uaem.mx,  
arjaparicio@gmail.com, draluzg81ds@gmail.com, bcamacho@ipn.mx

<https://doi.org/10.3926/oms.401.5>

Cortes-Priego, I., Rodríguez-González, F., Santa Olalla-Tapia, J., Jiménez-Aparicio, A. R., García-Serrano, L. A., & Camacho-Díaz, B. H. (2020). Estudios de biocompatibilidad de compósito en gel de aloe vera y nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  para uso dérmico. En E. San Martín Martínez, M. A. Ramírez Salinas (Eds.). *Avances de investigación en Nanociencias, Micro y Nanotecnologías*. Barcelona, España: OmniaScience. 133-152.

## Resumen

En la actualidad se busca la aplicación y desarrollo de materiales que sean de origen natural y que cumplan con características de calidad y su función no se vea afectada o reducida en comparación con los materiales sintéticos ya existentes.

Cualquier sustancia aplicada sobre la piel enfrenta tres rutas diferentes de penetración: intercelular, transcelular y a través de los apéndices de la piel, como los folículos pilosos, las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas.

La *Food and Drug Administration* afirma que los riesgos para los consumidores de materiales a escala nanométrica son bajos, dado que no hay evidencia de que las nanopartículas contenidas en productos de aplicación tópica o en este caso textiles penetren la piel adulta intacta, esta afirmación es cierta para la mayoría de nanopartículas; aunque, también es importante notar que existen pocos estudios publicados en cuanto a penetración dérmica de estos materiales

En cuanto a materia de seguridad, una de las mayores preocupaciones es la toxicología de las nanopartículas ya que muchas de ellas poseen propiedades redox o son fotocatalíticas; por ejemplo, las nanopartículas de dióxido de titanio presentes en bloqueadores solares, además de que la exposición al sol genera radicales libres que podrían degradar a los componentes del producto o bien atacar a las células de la piel. Actualmente ya está demostrado que el dióxido de titanio en nanopartículas, presentes en cosméticos y bloqueadores solares, generan radicales libres y pueden ocasionar daños al ADN de las células de la piel, provocando desde una simple inflamación de tejidos hasta tumores.

Por otro lado, cuando la función de barrera de la piel se ve comprometida, como en los casos de piel envejecida o que presente alguna patología como lo es una herida, puede haber un potencial incremento en la penetración de nanopartículas. Por lo tanto, la penetración dérmica de los materiales a escala nanométrica es un tema de debate, debido al creciente número de estudios que se están llevando a cabo a este respecto. Las mayores preocupaciones consisten en la posibilidad de penetración y acumulación de materiales a afirmación mediante estudios recientes.

Por lo tanto, el presente estudio propone el estudio del daño oxidativo celular y la genotoxicidad producida por las partículas nanométricas inorgánicas, sobre células dérmicas. A través de un análisis de absorción UV y pruebas de citotoxicidad del gel.

**Palabras clave:** Aloe vera; biocompatibilidad; nanopartículas; dióxido de titanio.

## 1. Introducción

En la actualidad se busca la aplicación y desarrollo de materiales que sean de origen natural y que cumplan con características de calidad para sus diferentes usos. Por lo que se estudian e investigan nuevos componentes que puedan ser considerados como alternativa para el desarrollo de materiales biodegradables y que su función no se vea afectada o reducida a materiales sintéticos ya existentes [1].

Un material compuesto o “composite” es un sistema material integrado por una combinación de dos o más micro o macro estructuras que difieren en forma y composición química y que son esencialmente insolubles entre sí. Los compósitos conservan, al menos parcialmente, las propiedades de sus sistemas constituyentes y se diseñan para que presenten la combinación de propiedades más favorable. Por lo general, estos se dividen en tres tipos por su composición, como: Compósitos de partículas, de fibra, laminares y naturales o biocompositos [2].

Los biocompositos se conocen porque sus componentes son polímeros biodegradables como matriz, generalmente polímeros de origen lignocelulósico debido a que provienen de fuentes naturales, renovables, bajo costo y diferentes propiedades que dependen de la aplicación al que se vaya a dirigir [3].

Los biopolímeros o polímeros naturales son aquellos producidos por un organismo vivo, lo cual los hace renovables y biodegradables, algunos de los cuales ya son producidos y extraídos a gran escala para múltiples productos [4]. Los biopolímeros naturales provienen de cuatro grandes fuentes: origen animal (colágeno/gelatina), origen marino (quitina/quitosan), origen agrícola (lípidos y grasas e hidrocoloides –proteínas y polisacáridos) y origen microbiano (ácido poliláctico –PLA– y polihidroxialcanoatos –PHA) [5].

Hasta hace poco, la mayoría de las fuentes de *Aloe* colocan en la familia de los lirios (*Liliaceae*), pero de acuerdo con Grindlay y Reynolds [6], ahora se ha designado su propia familia, conocida como *Aloaceae*. Reynolds describió 314 especies en sus monografías clásicas; ahora hay más de 360 especies [6]. La nomenclatura de *A. vera* ha sido muy confusa, y la planta ha sido conocida bajo una variedad de nombres. Hay por lo menos cuatro especies principales que tienen propiedades medicinales: *Aloe Barbadosensis* Miller, *Aloe perryi* Baker, *Aloe ferox* y *Aloe arborescens*.

La mayoría de las plantas de *Aloe* no son tóxicas, pero algunas son extremadamente tóxicas pues contienen algunas sustancias nocivas. *Aloe Barbadosensis* Miller

es considerada como la más potente con propiedades medicinales y, por lo tanto, es la más popular. El *aloe vera* es una planta suculenta perenne con rosetas basales formada de hojas gruesas. En las plantas jóvenes, las hojas aparecen a nivel del suelo, pero el tallo puede crecer hasta 25 cm en las plantas más viejas. En la planta puede haber de 12 a 16 hojas, al centro las jóvenes más o menos erguidas y hojas inferiores mayores de más amplia difusión. La planta es madura cuando tiene alrededor de 4 años de edad y tiene una vida útil de unos 12 años. Cuando están bien desarrollados, las hojas individuales pueden alcanzar una altura de 60-90 cm de largo y 5-10 cm de ancho, la base va disminuyendo hasta un punto con dientes similares a una sierra a lo largo de sus márgenes. Una sección transversal de la hoja revela un aspecto ligeramente cóncavo en la superficie adaxial, mientras que la superficie abaxial inferior es notablemente convexa. En las plantas jóvenes y en las ventosas, que crecen desde la base de la planta, las hojas son de un color verde brillante, con manchas blanquecinas irregulares en ambos lados. A medida que maduran las rosetas, hojas sucesivas tienen menos puntos, y hojas completamente maduras son de un color gris verdoso impecable [7].

El *Aloe Barbadosis Miller* pertenece al género de aloe herbácea, arbustiva, suculentas xerófilas perennes. De acuerdo con el USDA *Aloe vera* pertenece a la familia de las liliáceas [8]. El gel de aloe vera mostró muchas actividades fisiológicas y biológicas tales como la capacidad de curación de quemaduras en la piel, lesiones cutáneas, acné, la psoriasis, la anemia, anti-cáncer, el agente anti-viral, protector UV efecto profiláctico contra las radiaciones nucleares accidentales, agente antiinflamatorio, analgésico, antioxidante y también puede ser utilizado como pesticida natural [9]. El gel de aloe vera contiene una fracción importante de polisacáridos que representan cerca del 20 % de los sólidos totales del parénquima mucilaginoso de las hojas y aproximadamente 20 glicoproteínas asociadas con estos polisacáridos que contribuyen a actividad farmacológica de *aloe vera* en la estimulación de la proliferación celular y sus otras actividades biológicas [10]. Estos carbohidratos están formados principalmente de mananos altamente acetilados y polisacáridos pécticos. La composición de los carbohidratos de la pulpa ha sido descrita en numerosos reportes e incluyen manosa, galactosa, arabinosa, ácidos glucorónico y galacturónico [8]. La composición total del gel de *aloe vera* comprende polisacáridos, proteínas, minerales y lípidos. Las hojas de *Aloe vera* se componen de tres distintas regiones morfológicas: exocarpio piel, conductos de aloína o acíbar, pulpa o tejido parenquimático que es el mucílago incoloro que comprende el grueso de la hoja [11].

Su actividad depende de varios parámetros estructurales tales como el grado de acetilación, el peso molecular, tipo de azúcar, y ramificación glucosídica [12]. El constituyente y la estructura de los polisacáridos cambian con los cambios del entorno de crecimiento y condiciones de cultivo de *Aloe Barbadensis Miller*. Son pocos los informes que se ocupan de los polisacáridos de la piel de *Aloe Barbadensis Miller* [13].

El dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), es un material de gran importancia tecnológica por sus propiedades fisicoquímicas: es un semiconductor tipo n sensible a la luz que absorbe radiación electromagnética, principalmente en la región UV; además, es un óxido anfótero muy estable químicamente [14]. Se utiliza en grandes cantidades como pigmento en pintura y alimentos, recubrimiento anticorrosivo, sensor de gases, de manera general en la industria de la cerámica, aditivos, farmacéuticos y absorbente de rayos UV en productos cosméticos [15].

Las nanopartículas de dióxido de titanio han sido obtenidas utilizando diversos métodos, entre los que se destacan la síntesis química en fase vapor, hidrotermal, precipitación controlada, sol-gel y precursor polimérico (Pechini); de estos métodos dependerá el control del tamaño de partícula y pureza química [16].

La química de la superficie de óxidos metálicos se controla directamente por la estructura de la superficie, en la que los lados ácido-básico crean cationes metálicos y aniones de oxígeno. Las nanopartículas de dióxido de titanio tienen tres fases metaestables, que son conocidos como rutilo, anatasa y brookita. La estructura de rutilo es la fase regular para el dióxido de este metal, la mayoría de las nanopartículas de dióxido de titanio comerciales son una mezcla de anatasa, rutilo y anatasa [17].

Aunque se definen sus propiedades más importantes como no tóxicas, compatibles con las mucosas y la piel, estudios recientes han demostrado que las nanopartículas de dióxido de titanio inducen daño en el ADN y el aumento del riesgo de cáncer y el mecanismo podrían relacionarse con el estrés oxidativo y a su alta exposición. Las nanopartículas de dióxido de titanio han sido clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) como posible carcinógeno para los seres humanos [15].

Estudios que utilizaron un modelo de ratón demostraron que la sonda oral de TiO nanosized causó efectos genotóxicos y citotóxicos a través de la inflamación y el estrés oxidativo in vivo. Estudios in vitro en células de pulmón humano

de los efectos genotóxicos y oxidativo inducido por la generación oxidante de  $\text{TiO}_2$ , revelaron inflamación y la apoptosis en las células epiteliales del pulmón; encontrado una caída de 15 % en la viabilidad y la activación de la autofagia en queratinocitos primarios humanos tratados con 10 ppm de nano- $\text{TiO}_2$  [18].

La primera definición oficial de biocompatibilidad fue dada en 1987 como: “La capacidad de un material para llevar a cabo una respuesta huésped apropiada en una aplicación específica.” [19].

Aunque posteriormente se definió de una manera más adecuada como: “Habilidad de un biomaterial para llevar a cabo una función deseable con respecto a una terapia médica, sin producir efectos indeseables locales o sistémicos en el recipiente o beneficiario de esta terapia, generando una respuesta celular o tisular apropiadamente benéfica en una situación específica y optimizando el rendimiento clínicamente para esta terapia” [20].

Esta última definición destaca los impactos que tiene la interacción de los biomateriales con los tejidos vivos, no sólo el efecto negativo que puede llegar a tener, sino como responsables de promover el proceso de crecimiento celular [19].

A su vez, un biomaterial se distingue por su capacidad de estar en contacto con tejidos del cuerpo humano cumpliendo alguna función o remplazando un tejido sin causar un daño inaceptable, que pueden proceder de una fuente biológica o no biológica; lo que puede resumirse como cualquier material farmacológicamente inerte diseñado para ser implantado o incorporado a un sistema vivo [19 y 20].

En la actualidad, debido al desarrollo científico y tecnológico del mundo moderno y al uso no racional de la explotación de los recursos se ha propiciado la contaminación del ambiente, lo que ha causado un deterioro en la capa de ozono. Por tal motivo el hombre actual se encuentra expuesto a diferentes tipos de radiación solar [21]. La luz solar produce daño cutáneo porque las radiaciones ultravioletas son absorbidas por el ADN, ARN, proteínas, lípidos de membranas y organelos celulares presentes en la epidermis y la dermis, incluyendo el sistema vascular. Los efectos de los rayos UV son acumulativos y dosis-dependientes y están en relación a la duración, frecuencia e intensidad de la radiación; como efecto inmediato conducen a producir una inflamación y, como efecto tardío, cáncer de piel. El 95 % de radiaciones que inciden sobre nuestra piel son Infrarrojos ( $>760$  nm) y luz visible (400-760 nm). Sólo el 5 % es radiación UV de la

cual el 2 % corresponde a la UVB (290-320 nm) y el 98 % a la UVA (320-400 nm) la que puede dividirse en UVA largos o UVA-I (340-400 nm) y UVA cortos o UVA-II (320-340 nm) [22].

La exposición prolongada a la radiación UVB es responsable del cáncer de piel dado que penetra superficialmente en la piel afectando la epidermis en donde daña directamente el ADN celular. Por su parte, la radiación UVA penetra más profundamente, afectando la dermis, destruyendo las fibras elásticas y colágenas y condicionando envejecimiento, inmunosupresión, reacciones fotoalérgicas y reacciones fototóxicas [23].

Para una mejor protección solar lo más recomendable sería el evitar el sol, pero eso imposible debido a las actividades diarias de las personas [24]. Hoy en día contamos con un número considerable de fotoprotectores o bloqueadores solares con muy alto factor de protección solar, disponibles para su recomendación o prescripción. De los cuales sus principios activos responsables de la actividad de fotoprotección son comunmente avobenzona, bemotrinizol, bisoctrizol y dióxido de titanio [25].

Por lo tanto, resulta interesante caracterizar matrices microestructuradas a partir de la interacción de agentes bioactivos y poliméricos de origen vegetal para incrementar la biocompatibilidad de las nanopartículas al contacto con tejido dérmico por exposición al compuesto o a las radiaciones UV.

## 2. Materiales y métodos

Se realizó la extracción de mucílago de *Aloe Barbadensis* Miller de acuerdo con la metodología de Femenia et al. (1999) [8]. Se recolectaron hojas de 30 a 50 centímetros de largo de plantas mayores de 4 años de edad; se lavaron con agua destilada para eliminar cualquier tipo de suciedad; se cortaron las espinas y se retiró la piel para solamente recolectar el mucílago; se trituró por 30 segundos y se filtró para retirar rastros de fibras y partículas de gran tamaño y, posteriormente, se liofilizó para su uso.

Se utilizaron nanopartículas de la empresa *Sensient Colors Latin America*, ubicada en el Estado de México. De ellas se determinaron grupos funcionales por espectrometría de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) y tamaño de partícula por microscopía electrónica de barrido.

## ***2.1 Caracterización fisicoquímica de mucílago de *Aloe Barbadensis* Miller y nanopartículas de dióxido de titanio***

Se realizó el análisis químico proximal del mucílago en polvo de *Aloe Barbadensis* Miller mediante los métodos oficiales de la norma del AOAC del 2012 [26]. Haciendo uso de estos métodos se determinó el porcentaje de humedad, porcentaje de cenizas, porcentaje de extracto etéreo o lípidos y porcentaje de nitrógeno total. También, se determinó el porcentaje de carbohidratos totales de *Aloe Barbadensis* Miller, esta última determinación se realizó por diferencia de porcentaje de las cantidades anteriores.

## ***2.2 Cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC)***

Para la identificación de los diferentes monosacáridos en las muestras de mucílago del *Aloe Barbadensis* Miller, se utilizó la técnica de cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, por sus siglas en inglés), según a la metodología propuesta por Mancilla-Margalli y López en el 2006 [27], se utilizó una placa de sílica gel 60 F254 con soporte de aluminio (marca Merck) con dimensiones de 20x10 cm<sup>2</sup>. En ésta se aplicaron muestras de 3 µL de soluciones estándar de diferentes azúcares en diferentes carriles: arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, sacarosa, ramnosa, xilosa, fucosa, manosa y soluciones de ácido como el galacturónico, glucurónico y poligalacturónico, todos los estándares se prepararon a una concentración de 3 mg/mL con agua desionizada. También, en la placa se aplicaron 15 µL de la solución elaborada con el mucílago *Aloe Barbadensis* Miller, ésta a una concentración de 6 mg/mL con agua desionizada. La fase móvil estuvo compuesta de butanol, propanol y agua desionizada a una concentración de 3:12:4 v/v/v, respectivamente. Como revelador se utilizó una solución constituida de difenilamina, anilina, acetona y ácido fosfórico a una concentración de 0.4: 0.4:16:3 w/v/v/v, respectivamente. Finalmente, la placa se calentó a 120 °C durante 1 minuto y se observó la separación de los compuestos mediante bandas de diferentes colores. Por otro lado, la identificación de los carbohidratos presentes en cada una de las muestras se realizó comparando sus factores de retención (Rf), los cuales se obtuvieron a partir de la siguiente ecuación (Ec. 1), con los Rf de los estándares.

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida de la muestra}}{\text{Distancia recorrida por el disolvente}} \dots\dots\dots(\text{Ec. 1})$$

### **2.3 Espectroscopia de infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

Para la determinación de los grupos funcionales del mucílago de *Aloe Barbadensis* Miller se utilizó un equipo de espectroscopia con transformada de Fourier modelo IRAffinity-1 de la marca Shimadzu, este equipo nos permitió colocar la muestra sin ningún tipo de procesamiento previo y el intervalo del espectro que se usó fue de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup> [12].

### **2.4 Caracterización por microscopía fotónica, MEB y MET del biocomposito**

Para la determinación de la distribución de las partículas de dióxido de titanio se utilizó un microscopio óptico Nikon 80i, Japón; se realizó un frotis de los gels, y se observó y capturó con micrografías a un aumento óptico de 4X Y 20X.

Para la determinación de la microestructura y distribución de partículas del biocomposito con o sin nanopartículas de dióxido de titanio, se utilizó un equipo de microscopia electrónica de barrido (MEB) de la serie EVO LS 10 de la marca Carl Zeiss. Este equipo nos permitió someter la muestra sin una preparación previa y a una presión ambiental para un mejor análisis; las condiciones de trabajo se ajustaron de acuerdo a la muestra. Se hizo uso de microscopia electrónica de transmisión (MET) con el fin de caracterizar la morfológica del biocomposito y tamaño de las micro y nanopartículas de dióxido de titanio.

### **2.5 Determinación de color**

Para la determinación de color se utilizó un Colorímetro Milton Roy mod. Color mate, el cual está provisto de un iluminante D65 y un ángulo de observación de 10°. Fue colocada una muestra del gel de mucílago de *Aloe Barbadensis* Miller con y sin nanopartículas de dióxido de titanio en cubas de cristal del equipo para muestras líquidas o semisólidas. Los datos obtenidos se analizaron mediante el sistema CIELAB donde L\* correspondió a la coordenada de luminosidad, a\*(+rojos, -verdes) y b\*(+amarillos,-azules) corresponden a coordenadas de cromaticidad y H° tono. Se utilizaron las siguientes ecuaciones (2-4) [28].

Sistema CIELAB.

$$L^* = 116 \cdot (Y/Y_n)^{1/3} - 16 \dots \dots \dots (Ec.2)$$

$$a^* = 500 [(X/X_n)^{1/3} - (Y/Y_n)^{1/3}] \dots \dots \dots (Ec.3)$$

$$b^* = 200 [(Y/Y_n)^{1/3} - (Z/Z_n)^{1/3}] \dots \dots \dots (Ec.4)$$

Con estándares del modelo colorímetro Milton Roy.  $X_n = 95.05$   $Y_n = 100$   $Z_n = 100.91$

## ***2.6 Adsorción de rayos UV***

Para la determinación de la adsorción de rayos UV de la muestra del biocomposito se utilizó un luxómetro modelo EA30 de la marca EXTECH INSTRUMENT para medir la cantidad de luz que atraviesa la muestra con una lámpara UV modelo UVLMS-38 de 8 vatios. Se sometió la muestra a diferentes longitudes de onda UV de 254, 302 y 365 nm que abarcaron el espectro de ese tipo de radiación (similar al los emitidos por las radiaciones solares), la muestra se colocó en medio de un portaobjeto (marca LEUKA de 26.4x76.2 mm con un espesor de 1.2 mm) y un cubreobjetos (marca Deltalab de 24x50 mm) con un grosor de 0.5 mm de tal manera que cubriera el detector del equipo con una distancia de 24 centímetros de la lámpara de luz UV en el interior de una caja para eliminar el ruido del exterior.

## ***2.7 Biocompatibilidad in vitro***

Se usaron dos tipos de líneas celulares: una, de fibroblastos y, la otra, de queratinocitos; ambas células epidermales. Las cuales se cultivarán en medio Dulbecco con antibiótico, factores de crecimiento y suero fetal bobino al 10 % definidos para cada línea celular. Se harán subcultivos en cajas de 24 pozos con una densidad de  $10 \times 10^3$  células para su evaluación de citotoxicidad con sulforodamina B la cual se evaluará por espectrofotometría a una longitud de onda de 570nm en un lector de ELISA Synergy2 con el programa Gen5 Data Analysis Subcultivos.

Se acondicionan los reactivos a utilizar media hora antes de usar a baño maría a 37 °C, se esteriliza campana de flujo laminar por 30 minutos en luz UV. Se limpian con sanitas y etanol al 70 % los reactivos y equipos a utilizar para llevar a cabo el subcultivo. Se sacan las cajas Petri con células de la incubadora y se observan en el microscopio para observar asegurar que tengan una confluencia mayor al 90 % y se realiza un registro fotográfico para el seguimiento de la morfología celular de la propagación. Se introducen las cajas Petri de las células y se les retira el medio de cultivo mediante una pipeta Pasteur y una bomba de vacío teniendo cuidado de no rasgar la monocapa formada por las células; se le agregan 8 ml de medio Dulbecco/F12 para realizar un lavado para eliminar restos celulares y volver a retirar el medio con la pipeta Pasteur; se agregan 2 ml de tripsiana al

0.25 % e incubar por 5 minutos para despegar las células de la caja; se inactiva la tripsina con 2 ml de medio de inactivación; se disgregan las células mediante una micropipeta de 1 ml aspirando y vertiendo el medio por toda la caja este paso se repite unas 30 veces; se transfieren las células a un tubo Falcón de 15 ml y se centrifuga a 400 g durante 5 min a 24 °C; se retira el sobrenadante teniendo cuidado de no tomar el pellet (pastilla celular) y se resuspende de 1 a 3 ml dependiendo del tamaño del pellet y se dispersa el pellet con una pipeta de 1 ml.

## ***2.8 Conteo celular***

Se colocó en un tubo Eppendorf (0.5 ml) 10 µl de azul de triptófano 0.4 % y 10 µl de medio con células resuspendidas y se mezcló por unas 10 veces; se colocaron 10 µl de la mezcla en una cámara de Neubauer para realizar el conteo.

Las células vivas se vieron redondas mientras que las muertas eran azules, después de contar los cuadrantes, el número de células vivas se determinó mediante la siguiente Ecuación (Ec. 5):

$$\text{Células vivas totales} = \frac{(\text{Sumatoria células vivas})(20000)(\text{vol.de medio usado})}{5}$$

....(Ec.5)

Se calculó la cantidad de células necesarias y medio para subcultivar fibroblastos (Para 50 ml de medio Dulbeco's modified Eagle's médium Ham's F12 nutrient mixture con 43.95 ml a 4 °C, Suero fetal bovino 10 % 5 ml, Antibiotic-antimicótico Penicilina: 100 µg/µl, Estreptomicina: 100 µg/µl, Fungizona: 0.25 µg/µl -20 ° 500 µl, Piruvato sódico 500 µl y glutamax 500 µl a 4 °C.

Como medio de inactivación: Dulbeco's modified Eagle's médium Ham's F12 nutrient mixture 1x a 4 °C en 45 ml, Suero fetal bovino 10 % 5 ml, Tripcina 0.25 % para 10 ml, Tripcina 2.5 % -20 °C 1 ml) en la caja de 24 pozos (500 µl por pozo) para incubar a 37 °C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5 % y llevó a cabo la evaluación citotóxica con sulforodamida B.

## ***2.9 Evaluación citotóxica***

Tras haber transcurrido 24 horas se tomó registro fotográfico de las células de las placas y se retiró el medio agitando enérgicamente la caja en una sola dirección solo una vez; se fijaron las células colocando por capilaridad a cada pozo 500 µl

de ácido tricloroacético al 10 % y se dejó reposar por una hora a 4 °C; transcurrido el tiempo de fijación se realizaron 5 lavados con 500 µl de agua destilada a 4 °C; al finalizar el lavado se dejó secar a temperatura ambiente durante toda la noche; pasado el tiempo de secado se colocaron 200 µl de sulforodamida B y se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente; posteriormente, se realizaron cinco lavados con 500 µl de ácido acético al 1 %; al término de los lavados se colocó la placa boca abajo sobre una toalla de papel para retirar el resto del líquido y se colocó en la campana de extracción para secar durante una hora y media.

Por último, se agregaron 200 µl de tris-Base (10 Mm, pH 10) por pozo para solubilizar el colorante y se midió densidad óptica a 570 nm utilizando el lector de placas ELISA, para determinar el porcentaje de citotoxicidad, mediante la siguiente Ecuación (Ec. 6):

$$\% \text{ de citotoxicidad} = \left[ \frac{(DO \text{ células tratadas}) - (DO \text{ día cero})}{(DO \text{ células sin tratamiento}) - (DO \text{ día cero})} * 100 \right]$$

.....(Ec.6)

Este ensayo midió la cantidad de SRB fijada a las proteínas celulares en placas de cultivo previamente fijadas con ácido tricloroacético. Dado que la unión de la SRB es estequiométrica, la densidad óptica que se observó fue proporcional a la masa celular [29].

### 3. Resultados

Se hizo la determinación química de los componentes presentes en el mucílago de *Aloe vera* liofilizado, para lo cual se obtuvo en una mayor proporción carbohidratos (60.78 %), de acuerdo con lo esperado. Así como una gran proporción de minerales (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica del *aloe barbadensis* miller.

Determinación química <i>Aloe Barbadensis</i> Miller	
humedad	9.19931054
cenizas	22.3829179
lipidos	4.2647776
proteina	3.4242773
carbohidratos	60.7287166

Los azúcares disueltos que se pudieron observar por el RF de las bandas en la Figura 1, obtenidas de la muestra, con respecto a los estándares, fueron glucosa, rhamnosa y ácidos poligalacturónicos. Se hace notar que se está corriendo una placa con hidrolizados del mucílago para detectar la presencia del resto de los estándares.

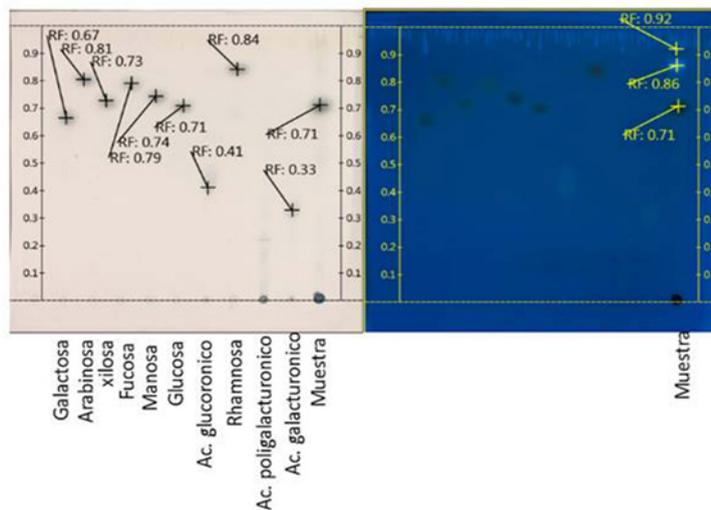


Figura 1. Azúcares encontrados en el mucílago por medio de una placa de cromatografía en capa fina.

A su vez se utilizó el densitómetro de HPTLC marca CAMAG, Suiza, para comparar las bandas de los estándares con el barrido de los hidrolizados.

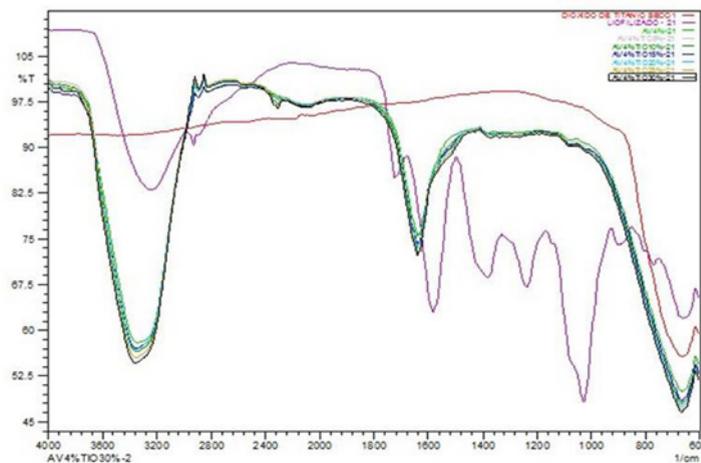


Figura 2. Espectros de geles de aloe vera con dióxido de titanio a diferentes concentraciones.

Con respecto a los espectros de FTIR (Figura 2) se observaron absorciones características para grupos OH (alcohólicos, ácidos y/o fenólicos) entre 3550 y 3200  $\text{cm}^{-1}$ , señal un poco desplazada con respecto a los OH libres (3650-3584  $\text{cm}^{-1}$ ), para grupos carbonilo se observan en la región de 1870 y 1540  $\text{cm}^{-1}$  que podrían corresponder a grupos carbonilo de: cetonas, aldehídos, ácidos o ésteres [30], de entre los cuales destacó el de ácido galacturónico que se encuentra 1745  $\text{cm}^{-1}$ , glucomananos 1720  $\text{cm}^{-1}$ , grupos C-O-C Y CH<sub>3</sub> (1407  $\text{cm}^{-1}$  y 1254  $\text{cm}^{-1}$ ) [31], residuos de monosacáridos (1070  $\text{cm}^{-1}$  - 1043  $\text{cm}^{-1}$ ), rhamnogalacturanos (1100  $\text{cm}^{-1}$  -1017  $\text{cm}^{-1}$ ) [12]. Los picos representativos del dióxido de titanio se encontraron uno a 511  $\text{cm}^{-1}$  característica de la fase inorgánica presente en la muestra y concretamente estaría relacionada con los enlaces Ti-O y Ti-OH, otra banda localizada (400 y 650  $\text{cm}^{-1}$ ), banda que se pudo asociar a uno de los modos vibracionales del Ti-O [16].

Como se puede observar en las imágenes (Figura 3), el aumento de la presencia de nanopartículas de dióxido de titanio por la concentración de dióxido de titanio se destacó la formación de aglomerados de las partículas debido a que su interacción se ve incrementada por la concentración, notándose a pesar de ello una distribución homogénea en el gel.

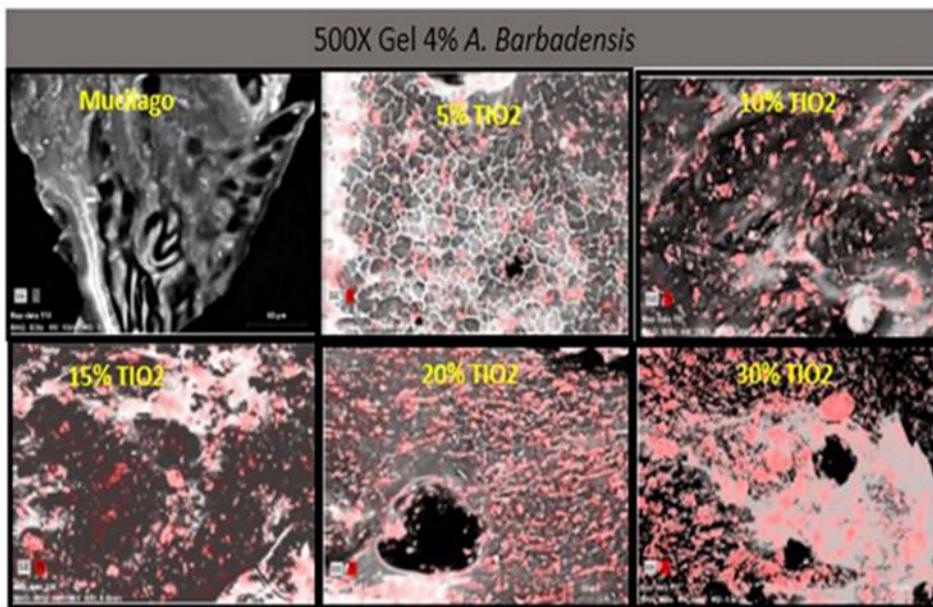


Figura 3. Identificación de dióxido de titanio mediante de rayos X con microscopia electrónica de barrido.

Como se pudo observar en las micrografías de liofilizados de los geles se notó una superficie rugosa con poca presencia de poros y conforme se fue aumentando la concentración de dióxido de titanio se incrementó la cantidad de poros; con el análisis de rayos X se identificó la presencia de dióxido de titanio en el gel, así como su distribución.

Como se pudo observar en las gráficas a longitudes de ondas de 366 a 254 (Figuras 4 y 5) que cubren los extremos del espectro de luz UV, se observó que por sí solo los geles mucílago son capaces de impedir el paso de rayos UV que va desde un 30 % un 40 % con respecto a la concentración de mucílago que va de un 4 a 6 %, respectivamente.

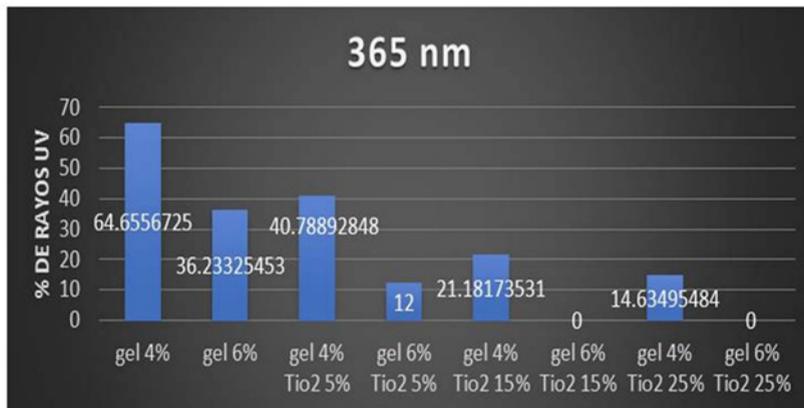


Figura 4. Porcentaje de adsorción de rayos UV a 366 nm.

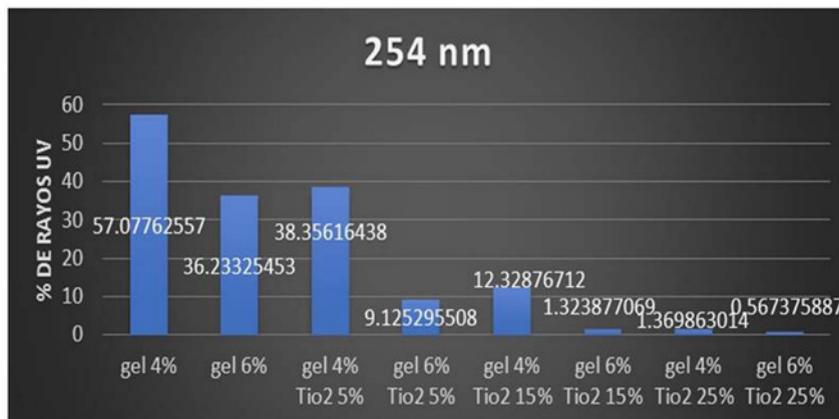


Figura 5. Porcentaje de adsorción de rayos UV a 254 nm.

Al incrementarse la cantidad de partículas de dióxido de titanio el paso de rayos se vio disminuido hasta en un 98 % y 99 % con respecto a la concentración de mucílago a una longitud de onda de 254 nm, en un 85 y 100 % en la longitud de onda de 366 nm.

Se evaluaron los geles de mucílago al 4 % con y sin partículas de  $\text{TiO}_2$ . Como se muestra en la Figura 6, no se observó visualmente un efecto citotóxico con el gel puro después de una hora de incubación, ya que las células permanecen pegadas a la superficie de la placa y con una morfología alargada.

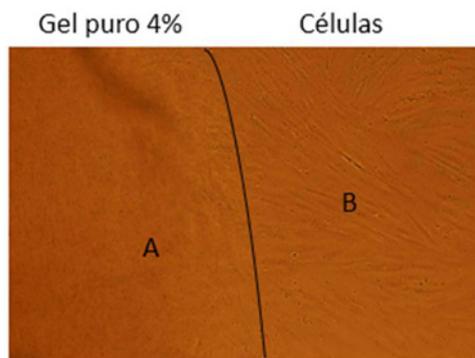


Figura 6. Tratamiento con gel A) Células cubiertas con gel al 4 % aloe vera B) Monocapa de células.

De lo contrario, a partir de las 24 horas se observó un desprendimiento de las células y tomarían una forma circular y flotaría en el medio, se cuantificó este efecto mediante una evaluación de sulforodamida B durante 24 horas de exposición, con los resultados mostrados en la Figura 7:

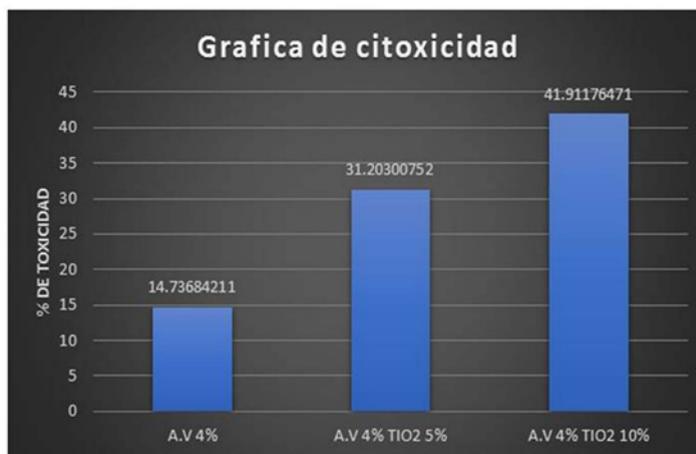


Figura 7. Efecto citotóxico con respecto a la concentración de  $\text{TiO}_2$ .

Como se puede apreciar, se cuantificó (Figura 7) un efecto citotóxico que se va incrementando conforme se aumenta la concentración de dióxido de titanio; se obtuvo que el gel sin partículas de dióxido de titanio tuvo un efecto citotóxico, lo cual puede deberse que al retirar el gel de la placa se haya llevado junto con el gel cierta cantidad de células, ya que se cubrió completamente los pozos con el gel y éste se retiró para su tratamiento con sulforodamida B. Se planteó solamente usar 150  $\mu\text{l}$  de gel por pozo para evitar el arrastre de las células y así evitar un falso negativo.

#### 4. Conclusión

El Gel de Aloe fue un vehículo seguro y compatible para acarrear nanopartículas de Dióxido de Titanio a la piel. Sin embargo, dada la fuerte reticulación de este Gel principalmente constituido por Xilanas, fue necesario definir una cantidad menor a la prevista para formar la matriz (biocomposito nanoestructurado). Por otro lado, fue evidente que al aumentar la concentración de nanopartículas, que aunque se distribuyeron homogéneamente, se dio lugar a la formación de aglomerados que cambiaron físicamente el color del compósito.

Finalmente, el efecto de absorción de rayos UV se presentó en una relación exponencial con respecto a la concentración de nanopartículas utilizadas. Además del aumento en la citotoxicidad de las nanopartículas en los cultivos de células a altas concentraciones en el sistema *in vitro*.

El principal impacto de este trabajo lo constituyó la generación de conocimiento de la relación existente entre la conformación de biocompósitos, su caracterización y las pruebas de biocompatibilidad ante radiaciones UV. Lo que dio como resultado un sistema seguro para el manejo de nanopartículas de dióxido de titanio al contacto con la piel en posible uso como bloqueador solar del gel de *Aloe vera*.

#### Referencias

1. Arroyo, K. (2009). *Biocompósitos de almidón termoplástico con microfibras de celulosa*. Tesis de Doctorado, IPN, Altamira, Tamps. México, 2009.
2. Pilato, L. A., & Michno, M. J. (1994). *Advanced composite materials*. New York, Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-35356-1>

3. Soulestin, J., Quiévy, N., Sclavons, M., & Devaux, J. (2007). Polyolefins-biofibre composites: A new way for an industrial production. *Polymer Engineering & Science*, 47(4), 467-476. <https://doi.org/10.1002/pen.20706>
4. Borschiver, S., Almeida, L. F., & Roitman, T. (2008). Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 18(3), 256-261. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282008000300012>
5. Villada, H. S., Acosta, H. A., & Velasco, R. J. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas agrarios*, 12(2). <https://doi.org/10.21897/rta.v12i2.652>
6. Grindlay, D., & Reynolds, T. (1986). The Aloe vera phenomenon: a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. *Journal Ethnopharmacol.*, 16, 117-151. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(86\)90085-1](https://doi.org/10.1016/0378-8741(86)90085-1)
7. Eshun, K., & He, Q. (2004). Aloe vera: A valuable ingredient for the food, pharmaceutical and cosmetic industries-a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(2), 91-96. <https://doi.org/10.1080/10408690490424694>
8. Femenia, A., Sánchez, E. S., Simal, S., & Rosselló, C. (1999). Compositional features of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissues. *Carbohydrate polymers*, 39(2), 109-117. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00163-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00163-5)
9. Lobo, R., Prabhu, K. S., Shirwaikar, A., Ballal, M., Balachandran, C., & Shirwaikar, A. (2010). A HPTLC densitometric method for the determination of aloeverose in Aloe vera gel. *Fitoterapia*, 81(4), 231-233. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2009.09.001>
10. Mejía-Terán, A. L. (2012). *Efecto de la deshidratación por radiación infrarroja sobre algunas características fisicoquímicas de interés comercial del Aloe Vera (aole barbadensis)*. Tesis Maestría, Unisabana, Colombia.
11. Domínguez-Fernández, R. N., Arzate-Vazquez, I., Chanona-Perez, J. J., Welti-Chanes, J. S., Alvarado-González, J. S., Calderon-Dominguez, G., & Gutierrez-Lopez, G. F. (2012). El gel de Aloe vera: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. *Revista mexicana de ingeniería química*, 11(1), 23-43.
12. Chun-hui, L., Chang-hai, W., Zhi-liang, X., & Yi, W. (2007). Isolation, chemical characterization and antioxidant activities of two polysaccharides from the gel and the skin of Aloe barbadensis Miller irrigated with sea water. *Process Biochemistry*, 42(6), 961-970. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.03.004>
13. Galleguillos, M. A., & Da Silva, R. F. (2013). Aplicación terapéutica del Aloe vera L. en Odontología. *Autoridades de la facultad de ciencias de la salud*, 33.

14. Parra, R., Góes, M. S., Castro, M. S., Longo, E., Bueno, P.R., & Varela, J. A. (2007). Reaction pathway to the synthesis of anatase via the chemical modification of titanium isopropoxide with acetic acid. *Chemistry of Materials*, 20(1), 143-150. <https://doi.org/10.1021/cm702286e>
15. Shi, Z., Niu, Y., Wang, Q., Shi, L., Guo, H., Liu, Y., & Zhang, R. (2015). Reduction of DNA damage induced by titanium dioxide nanoparticles through Nrf2 in vitro and in vivo. *Journal of hazardous materials*, 298, 310-319. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.05.043>
16. Urbano, M. A. V., Muñoz, Y. H. O., Fernández, Y. O., Mosquera, P., Páez, J. E. R., & Amado, R. J. C. (2011). Nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, fase anatasa, sintetizadas por métodos químicos. *Ingeniería & Desarrollo. Universidad del Norte*, 29(2), 186-201.
17. Bet-moushoul, E., Mansourpanah, Y., Farhadi, K., & Tabatabaei, M. (2016). TiO<sub>2</sub> nanocomposite based polymeric membranes: a review on performance improvement for various applications in chemical engineering processes. *Chemical Engineering Journal*, 283, 29-46. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.06.124>
18. Liu, Z., Zhang, M., Han, X., Xu, H., Zhang, B., Yu, Q., & Li, M. (2016). TiO<sub>2</sub> nanoparticles cause cell damage independent of apoptosis and autophagy by impairing the ROS-scavenging system in *Pichia pastoris*. *Chemico-biological interactions*, 252, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.029>
19. Garzon, A., Aguirre, N., & Olaya, J. (2013). Estado del arte en biocompatibilidad de recubrimientos. *Visión Electrónica: algo más que un estado sólido*, 7(1), 160-177.
20. Williams, D. F. (2008). On the mechanics of biocompatibility”, *Biomaterials*, 29, 2941-2953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>
21. González-Púmariega, M., Tamayo, M. V., & Sánchez-Lamar, A. (2009). La radiación ultravioleta. Su efecto dañino y consecuencias para la salud humana. *Theoria*, 18(2), 69-80.
22. Rollano, F. (2003). Radiación Ultravioleta y la piel. *La radiación Ultravioleta en Bolivia*, 57-75.
23. Sordo, C., & Gutiérrez, C. (2013). Cáncer de piel y radiación solar: experiencia peruana en la prevención y detección temprana del cáncer de piel y melanoma. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 30(1), 113-117. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342013000100021>
24. Camacho, F. (2001). Antiguos y nuevos aspectos de fotoprotección. *Dermocosmética*, 4(7), 441-448.
25. Cázares, J. P. C., Álvarez, B. T., González G. V., & Pérez, A. E. (2013). Evaluación in vitro de la protección uva de los bloqueadores solares para prescripción en México. *Gaceta Médica de México*, 149, 292-8.

26. AOAC (2012). *Official Methods of analysis of the association of the official analytical chemists* (17th Ed). The Association, Arlington, Texas, Estados Unidos de América.
27. Mancialla-Margalli, N. A., & López, M. G. (2006). Water-soluble carbohydrates and fructan structure patterns from Agave and Dasyliirion species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7832-7839. <https://doi.org/10.1021/jf060354v>
28. Artigas, J. M., Perea, P. C., & Ramo, J. P. (2002). *Tecnología del color* (58). Universitat de valencia, España.
29. Houghton, J. Morozov, A. Smirnova, I., & Wang, T. C. (2007). Stem cells and cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 17(3), 191-203. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2006.04.003>
30. León, E. A. V., Ibarra, J. R. V., Rosas., J. C., Mayorga, M. E. J., & Aldapa. C. A. G. (2015). Estudio de los extractos polares de Aloe vera con fines de microencapsulación. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 1(1). <https://doi.org/10.29057/icap.v1i1.980>
31. Ibargüen, Á. O., Magda Pinzón, F., & Arias, L. M. A. (2015). Elaboración y caracterización de películas comestibles a base del gel de aloe vera (Aloe barbadensis Miller L.). *Alimentos Hoy*, 23(36), 133-149.

## Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico de los proyectos SIP del Instituto Politécnico Nacional y CONACyT CB y BEIFI - IPN por las becas otorgadas.