



Libерación y actividad antimicrobiana de extracto de limón adsorbido en matrices de PVA/PDMS

María Luján García Fernández¹, Ivana Karina Levy¹, Débora Salustro¹, Daniel Horacio Murgida^{2,3}, Ricardo Martín Negri^{1,3}, María Lelia Saleh Medina^{1,3*}

1. Laboratorio de Materiales Compuestos y Energía (LAMCE), INQUIMAE-CONICET, FCEN-UBA.
2. Laboratorio de Espectroscopía Raman INQUIMAE-CONICET, FCEN-UBA
3. Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, FCEN, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160, CABA, C1428, Argentina.

*E-mail: lmedina@qi.fcen.uba.ar

PALABRAS CLAVES

Encapsulación
Macroporos
Antimicrobianos
Polímeros

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es obtener plataformas para la encapsulación de extracto acuoso de cáscaras de limón que sean no tóxicas y biocompatibles. Los materiales obtenidos ("esponjas") se caracterizaron mediante análisis termogravimétrico (TGA), espectroscopía infrarroja (ATR-FTIR), calorimetría diferencial de barrido (DSC) y determinaciones de las isoterms de adsorción de N₂. Las investigaciones comprenden estudios cinéticos de liberación de los compuestos encapsulados, analizando los efectos de la composición del material y el medio de liberación. También se evalúa la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de limón encapsulado mediante espectroscopía Raman, cristal violeta y espectroscopía UV-visible. Los materiales obtenidos resultaron no tóxicos, presentando estabilidad en agua y a temperaturas moderadas. Además, el extracto de limón encapsulado evidenció la acción antimicrobiana del mismo, previniendo el crecimiento de biofilms. Finalmente, la liberación del mismo depende del tipo y cantidad de entrecruzante empleado.

Release and antimicrobial activity of lemon extract adsorbed on PVA/PDMS matrixes

KEYWORDS

Encapsulation
Macropores
Antimicrobial agents
Polymers

ABSTRACT

The objective of the present work is to obtain platforms for the encapsulation of aqueous lemon peel extract that are non toxic and biocompatible. The obtained materials (sponges) were characterized by thermogravimetric analysis (TGA), infrared spectroscopy (ATR-FTIR), differential scanning calorimetry (DSC) and N₂ isotherm adsorption isotherms. The studies includes kinetic release measurements of the encapsulated compounds, analyzing the effects of matrix composition and release media. The antimicrobial activity of the encapsulated lemon peel extract was evaluated using Raman spectroscopy, violet crystal and UV-Vis spectroscopy. The obtained materials are non-toxic, are stable in water and at moderated temperatures. In addition, the encapsulated lemon extract presented antimicrobial activity, preventing biofilm growing. The release of the extract depend on the type and amount of crosslinker.

1. Introducción

Las cáscaras de cítricos, generadas a nivel domiciliario o industrial, son tratadas principalmente como desechos a nivel mundial. Sin embargo, presentan actividad antimicrobiana y antioxidante, que señalan

un potencial interés en su recuperación para aplicaciones en microbiología y ciencias de materiales (Abdel-Naeem et al., 2022). Los extractos de cáscaras de limón contienen compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales son sensibles a radiación UV, pH y temperatura, entre otros factores. Por esta razón, se requiere su

encapsulamiento para protegerlos de las condiciones ambientales. Siguiendo los lineamientos de la química verde (George et al., 2020; Morales et al., 2021), se buscan preparar matrices de encapsulamiento que sean biocompatibles y no tóxicas. El ácido polivinilalcohólico (PVA) es un buen candidato que cumple con tales requisitos. Con el fin de aumentar su estabilidad, se suelen agregar entrecruzantes. El entrecruzante más ampliamente empleado es el glutaraldehído, pero presenta algunos problemas de toxicidad. Una alternativa es emplear ácidos carboxílicos que reaccionen con los grupos -OH de distintas cadenas, uniéndolas. Si bien el entrecruzamiento provoca un aumento de la estabilidad en agua, para poder aumentar aún más la vida útil se lo puede recubrir con un polímero hidrofóbico como polidimetilsiloxano (PDMS). El PDMS es no tóxico y posee buenas propiedades mecánicas. Por lo tanto, en el presente estudio se busca encapsular extracto acuoso de limón en esponjas de PVA, incorporando agentes entrecruzantes verdes y PDMS con el fin de aumentar la estabilidad de las esponjas, y analizar el efecto antimicrobiano utilizando *Pseudomonas protegens* como sistema modelo (denominada previamente *P. fluorescens*). Esta bacteria se eligió por poder desarrollar biofilm tanto en superficies abióticas como bióticas (O'Toole y Kolter, 1998; Ueda y Saneoka, 2015). Si bien se ha demostrado el efecto antimicrobiano de extracto de limón sobre algunas cepas de *P. fluorescens*, no se ha explorado el efecto del extracto encapsulado en matrices.

2. Materiales y métodos

Materiales

Alcohol polivinílico (30-70 kDa, 87% hidrolizado PVA) fue adquirido en Sigma-Aldrich. Hexano, ácido cítrico

y ácido málico son de Biopack (Argentina). Los limones se adquirieron en tiendas comerciales de Buenos Aires, Argentina. La base y el entrecruzante de PDMS Sylgard 184 se obtuvieron de Dow Corning Corporation. Todas las soluciones acuosas fueron preparadas en agua bidestilada.

Preparación de extracto de limón

Las cáscaras de limón se lavaron con agua corriente y se secaron. 40 g de las mismas se añadieron a 100 mL de agua bidestilada. La mezcla se hirvió durante 3 horas a presión atmosférica. El extracto acuoso amarillo obtenido se filtró y congeló a -20 °C hasta su uso.

Preparación de esponjas

La preparación de las esponjas de PVA está basada en el trabajo de Nisola et al. (2015). Inicialmente, el PVA se disolvió en agua o extracto de limón a 90 °C en concentración 6% m/m durante 6 horas. La solución obtenida se llevó a temperatura ambiente y se agregaron ácido cítrico o málico en concentración 10, 30 and 50 %m/m respecto a PVA. La solución obtenida se agitó hasta obtener una espuma estable. Finalmente, se llevó la misma a criodesecación en un equipo Christ Alpha 1-2 durante 24 horas.

Recubrimiento de las esponjas con PDMS

Por cada 0.3 g de esponja se sumergieron en 2 g de una mezcla hexano/agente entrecruzante/base (PDMS) en la relación másica (2:10:1). Luego, se dejaron durante 4 h en vacío. Las esponjas se escurrieron y secaron a 60 °C durante 3 horas para favorecer el entrecruzamiento de las cadenas de PDMS. Un esquema del procedimiento general se muestra en la Figura 1.

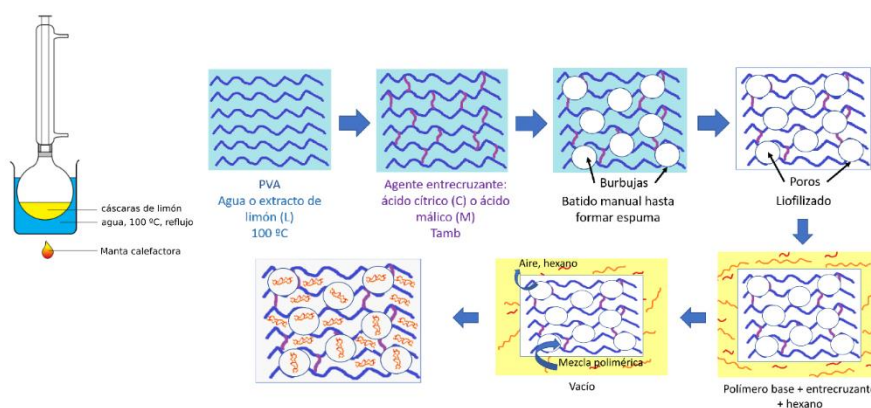


Figura 1. Esquema de la preparación de las esponjas de PVA recubiertas con PDMS

Código de muestras

Tabla 1. Código de muestras indicando los componentes de cada una de las esponjas recubiertas con PDMS

Código	Ácido carboxílico	Extracto de limón
PVAR	-	-
PVALR	-	✓
CXR	Ácido cítrico	-
CLXR	Ácido cítrico	✓
MXR	Ácido málico	-
MLXR	Ácido málico	✓

Caracterización

Las muestras se caracterizaron por ATR-FTIR (Nicolet 8700) acoplado a un accesorio Smart Orbit con cristal de diamante y reflexión simple horizontal. Se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido (SEM, Quanta 250 FEI). Los análisis termogravimétricos se obtuvieron en un TGA Shimadzu TGA-51. El ángulo de contacto de una gota de agua sobre la superficie (WCA) se determinó en un analizador Krüss DSA25E. Las isothermas de adsorción-desorción de N₂ se midieron en un sortómetro ASAP 2020 (Micromeritics). Se estudió la cinética de desorción de los compuestos adsorbidos mediante espectrofotometría UV-Vis en un equipo Shimadzu 3100.

Cinéticas de liberación del extracto

Se cortaron prismas de (0.5 x 0.5 x 0.1) cm (0.3 g) de esponjas con extracto de limón recubiertas con PDMS y se sumergieron en 20 ml de agua bidestilada. Se tomaron alícuotas a 1, 2, 6 y 24 horas y se midió el espectro en el rango 250-600 nm. El porcentaje de liberación de extracto de limón (“% Release”) se calculó según la ecuación 1:

$$\% \text{ Release} = 100 \times \frac{A_{\lambda_{max}}^C(t)}{A_{\lambda_{max}}^{NC}(24 h)} \quad (1)$$

donde $A_{\lambda_{max}}^C(t)$ es el máximo de absorbancia a tiempo t a 317 nm de la solución en contacto con esponja con extracto de limón recubierta con PDMS, mientras que $A_{\lambda_{max}}^{NC}$ corresponde al máximo valor de absorbancia a 317 nm medido luego de 24 horas de contacto de la solución con la esponja sin recubrimiento de PDMS.

Para la cinética de liberación se empleó el modelo Korsmayer-Peppas (Peppas y Sahlin, 1989):

$$\% \text{ Release} = A \times t^n \quad (2)$$

donde el parámetro A , corresponde a la constante cinética relacionada con las propiedades del sistema de liberación y de la sustancia encapsulada y n es el exponente de liberación difusional que depende del tipo de transporte, geometría y polidispersión del soluto (Bhagya Raj y Dash, 2022; Rezaei et al., 2016).

Evaluación de actividad antimicrobiana

Se realizaron ensayos de prevención colocando los materiales (0,5 x 0,5 x 0,1 cm) con 1 ml de medio de cultivo LB en presencia de inóculo (OD 0,1) durante 24 h a temperatura ambiente. La acción antimicrobiana se evaluó por la técnica de cristal violeta (CV) y por espectroscopía Raman. Mediante CV se pudo determinar el porcentaje de prevención (%BP) observado en los materiales con el extracto, respecto al material sin el extracto de cáscaras de limón:

$$\%BP = \left(1 - \frac{A_{LI} - A_{LLB}}{A_{BI} - A_{BLB}}\right) \times 100 \quad (3)$$

donde ALI es el máximo de absorbancia de la muestra con esponja que contiene extracto de limón e inóculo, $ALLB$ es el máximo correspondiente la misma muestra, pero en ausencia de inóculo. Por su parte, ABI es la absorbancia de muestra sin extracto de limón y con inóculo y $ABL B$ es de la muestra sin extracto y sin inóculo.

La técnica de espectroscopía Raman se empleó para analizar cualitativamente la superficie de las esponjas. Además, se midió la densidad óptica a 600 nm en el medio en el cual se sumergieron las esponjas.

3. Resultados y Discusión

Los resultados presentados en este trabajo es parte del estudio más completo realizado por García Fernández y colaboradores (2024).

Caracterización

Los espectros ATR-FTIR permitieron confirmar la presencia del entrecruzante y el recubrimiento con

PDMS (Figura 2). Se observó una banda ancha a $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a grupos -OH que pueden formar puentes de hidrógeno, la cual disminuye en intensidad al agregar entrecruzante, indicando que los mismos reaccionan con los grupos carboxilo de los ácidos agregados.

Simultáneamente, se observó un aumento de la señal a $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo C=O (Kačuráková et al., 2002).

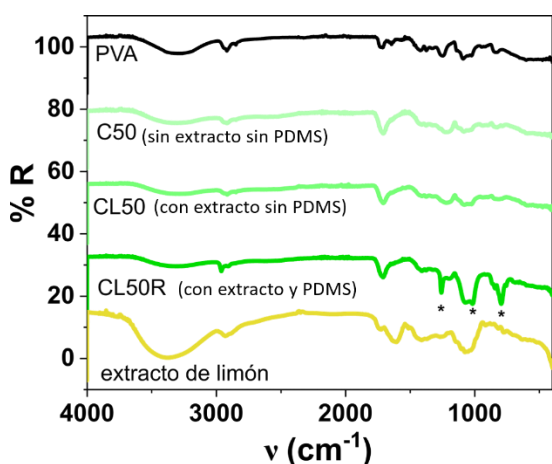


Figura 2. Espectros ATR-FTIR de las esponjas. Los códigos se encuentran detallados en la Tabla 1 y aclarados entre paréntesis en los casos que requieran mayor clarificación.

Las imágenes de SEM (Figura 3) muestran que la superficie de las esponjas que contienen únicamente PVA presenta poros irregulares y rugosidad. Aquellas con PVA y ácido cítrico parecen tener menor rugosidad, pero los poros son similares a los de PVA. Por otra parte, el agregado de extracto de limón aumentó el número y el tamaño de los poros presentes. El recubrimiento con PDMS generó una superficie mucho más lisa y gran parte de los poros se observan obstruidos. Mediante la aplicación del modelo BET a las isotermas de adsorción de N_2 se determinó que las esponjas presentaban macroporos.

Mediante TGA se determinó que las muestras sin recubrir con PDMS presentaron un porcentaje de masa remanente de aproximadamente 3-4 % a $800\text{ }^\circ\text{C}$ (Tabla 2). La adición de ácido málico o cítrico estabiliza la estructura por formación de enlaces éster, dando lugar a mayores porcentajes de masa remanente. El recubrimiento con PDMS incrementó

aún más la masa remanente, dado que quedan restos de SiO_2 .

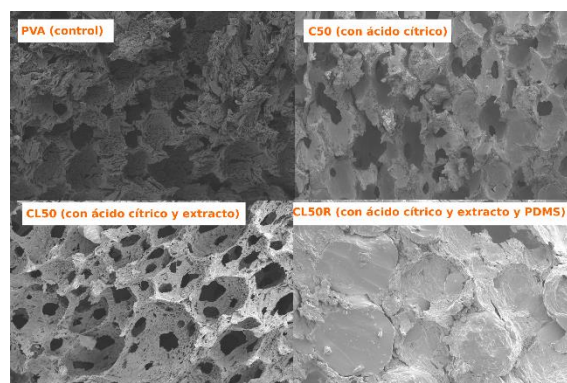


Figura 3. Imágenes SEM de esponjas con distintos tratamientos. Los códigos se encuentran detallados en la Tabla 1 y aclarados entre paréntesis en los casos que requieran mayor clarificación.

La incorporación de extracto de limón genera una disminución en el WCA en esponjas recubiertas con PDMS de cualquier composición (Tabla 2). Esto implica que la cobertura con PDMS no es completa y que parte de los componentes hidrofílicos del extracto de limón quedan en la superficie.

Tabla 2. WCA de esponjas PVA-PDMS

Muestra	WCA
PVAR	91
PVALR	63
C10R	110
CL10R	101
C30R	118
CL30R	111
C50R	89
CL50R	73
M10R	87
ML10R	64
M30R	110
ML30R	59
M50R	106
ML50R	89

La temperatura de transición vítrea (T_g), obtenida por DSC disminuyó con la adición de ácido cítrico en comparación con PVA prístino. La incorporación del ácido cítrico y el extracto de limón disminuyeron aún

más la T_g (Tabla 3). Esta disminución en T_g está relacionada con la disminución de los grupos OH libres debido a interacciones de puente de hidrógeno y formación de enlaces éster, dando como resultado un empaquetamiento de las cadenas de PVA menos eficiente (Liu et al., 2010; Park et al., 2001). La mayor disminución de la cantidad de grupos OH libres en presencia del extracto de limón es una evidencia de que los ácidos carboxílicos del PVA interactúan con los componentes del extracto, como también se observa en el ATR-FTIR (Figura). Las muestras recubiertas con PDMS presentaron un incremento en los valores de T_g con respecto a las no recubiertas, indicio de la mayor estabilidad de las esponjas recubiertas.

Tabla 3. Valores de masa remanente y temperatura de transición vítrea para una serie representativa de muestras.

Muestra	Masa remanente a 800 °C (%)	T_g (°C)
PVA	4	75-110 (Yu et al., 2007; Zulkifli et al., 2019)
C50	13	54
CL50	9	46
CL50R	19	59

Cinética de liberación del extracto

Al estudiar la cinética de desorción de los compuestos encapsulados se observó, por un lado, un aumento del porcentaje de liberación con la disminución de la concentración de ácido cítrico. Por otro lado, se obtuvo una disminución del porcentaje de liberación al emplear un ácido tricarbóxico (cítrico) en comparación con un dicarbóxico (málico) (García Fernández et al., 2024). Al aumentar la concentración de ácido cítrico se favorece la formación de enlaces entre el entrecruzante y las cadenas de PVA frente a los enlaces PVA-compuestos del extracto de limón. De esta forma los compuestos quedan adheridos físicamente a la

esponja de PVA, favoreciendo su liberación. En el caso del ácido málico, al ser un ácido con dos grupos carboxilo (a diferencia del cítrico que tiene tres) la cantidad de grupos carboxilo disponibles para reaccionar con PVA es menor, con lo cual deja más grupos OH de PVA libres para formar enlaces con los compuestos del extracto de limón. De esta forma no se observa una dependencia clara en la velocidad y cantidad de extracto de limón liberado al medio.

Por lo tanto, cuanto mayor sea el valor de A en el modelo Korsmeyer-Peppas (Ecuación 2), mayor será la contribución del modelo difusional de liberación frente al fenómeno de hinchamiento de la esponja. Los valores de n fueron en promedio cercanos o mayores a 0.5, lo que indica que el transporte es puramente de Fick o transporte anómalo (contribución del hinchamiento del polímero a la liberación del soluto) (Peppas y Sahlin, 1989).

Tabla 4. Parámetros obtenidos de las cinéticas de liberación con el ajuste de Korsmeyer-Peppas

Muestra	A	n	R ²
PVALR	3.6 ± 0.1	0.56 ± 0.020	0.9884
CL10R	6.92 ± 0.04	0.513 ± 0.003	0.9999
CL30R	4.90 ± 0.09	0.642 ± 0.006	0.9998
CL50R	11.00 ± 1.00	0.51 ± 0.040	0.9894
ML10R	6.00 ± 0.60	0.56 ± 0.040	0.9944
ML30R	8.00 ± 4.00	0.5 ± 0.200	0.8658
ML50R	4.90 ± 0.30	0.54 ± 0.020	0.9981

Ensayos antimicrobianos

Las señales de espectroscopía Raman correspondientes al biofilm se vieron aumentadas sobre la superficie de las esponjas que no contienen extracto de limón (Figura 4). Al mismo tiempo, las señales de PDMS también se ven incrementadas en la superficie de las esponjas que contienen extracto de limón, por lo que el crecimiento de biofilm sobre este tipo de esponjas es menor.

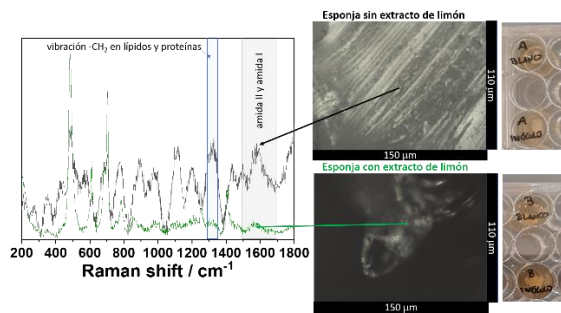


Figura 4. Espectro Raman de esponjas con y sin extracto de limón

Además, en las muestras que contienen 50% de ácido cítrico se observa en dichas muestras una clara baja de la absorbancia a 600 nm en solución, señalando disminución de la concentración de bacterias planctónicas (Figura 5). Esto puede relacionarse con el hecho de que el mayor porcentaje de liberación ocurre en este tipo de muestras.

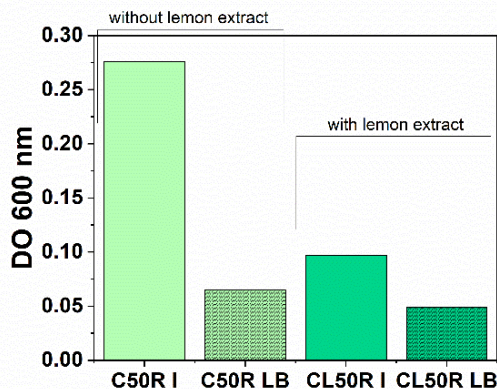


Figura 5. Densidad óptica a 600 nm del medio de cultivo en contacto con esponjas con y sin extracto de limón.

Consistentemente con la caracterización mediante espectroscopía Raman (Figura 6), se observó una disminución en la señal de biofilm en el ensayo de CV en los wells (prevención superior al 95%).

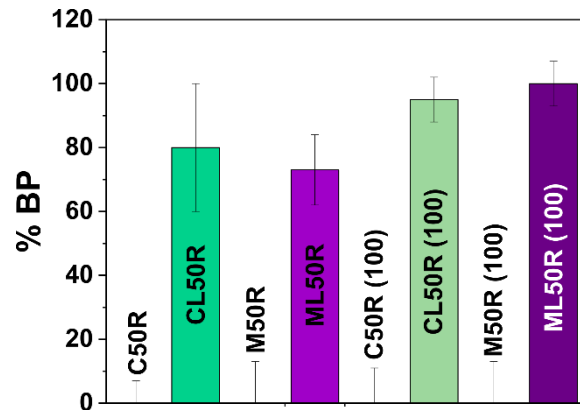


Figura 6. Porcentajes de prevención de crecimiento de biofilm

Los tres análisis (Raman, turbidez y CV) indicaron la acción preventiva antimicrobiana del extracto, tanto de bacterias planctónicas como en el biofilm.

4. Conclusiones

Se obtuvieron esponjas a partir de materiales no tóxicos que presentan estabilidad en agua y a temperaturas moderadas (100 °C). El extracto de limón encapsulado en matrices PVA-PDMS tiene acción antimicrobiana, disminuyendo la concentración de bacterias planctónicas en el medio y previniendo el crecimiento de biofilm. Por otra parte, las características específicas de la cinética de liberación dependen del tipo y proporción del entrecruzante empleado.

5. Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo y colaboración de diversas instituciones y personas. Agradecemos a UBA, CONICET y MinCyT por el financiamiento. Queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a María Claudia Marchi de CMA-FCEN-UBA por la toma de las imágenes de microscopía electrónica y a María Luz Martínez Ricci de INQUIMAE-FCEN-UBA por el acceso al equipo de ángulo de contacto.

6. Referencias

Abdel-Naeem, H. H. S., Elshebrawy, H. A., Imre, K., Morar, A., Herman, V., Pașcalău, R., & Sallam, K. I. (2022). Antioxidant and Antibacterial Effect of Fruit Peel

- Powders in Chicken Patties. *Foods*, 11(3),301. <https://doi.org/10.3390/foods11030301>
- Bhagya Raj, G. V. S., & Dash, K. K. (2022). Microencapsulation of betacyanin from dragon fruit peel by complex coacervation: Physicochemical characteristics, thermal stability, and release profile of microcapsules. *Food Bioscience*, 49, 101882. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101882>
- García Fernández, M. L., Levy, I. K., Salustro, D., Negri, R. M., & Saleh Medina, L. M. (2024). Use of Lemon Peel Extract as Antimicrobial Supported on Eco-friendly Polyvinyl Alcohol/Polydimethylsiloxane Sponges. *Journal of Polymers and the Environment*. <https://doi.org/10.1007/s10924-023-03148-7>
- George, A., Sanjay, M. R., Srisuk, R., Parameswaranpillai, J., & Siengchin, S. (2020). A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 329–338. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.120>
- Kačuráková, M., Smith, A. C., Gidley, M. J., & Wilson, R. H. (2002). Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 337(12). [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(02\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(02)00102-7)
- Liu, Y., Geever, L. M., Kennedy, J. E., Higginbotham, C. L., Cahill, P. A., & McGuinness, G. B. (2010). Thermal behavior and mechanical properties of physically crosslinked PVA/Gelatin hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 3(2), <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2009.07.001>
- Morales, A., Labidi, J., Gullón, P., & Astray, G. (2021). Synthesis of advanced biobased green materials from renewable biopolymers. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 29, 100436. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.100436>
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x>
- Park, J.-S., Park, J.-W., & Ruckenstein, E. (2001). On the viscoelastic properties of poly(vinyl alcohol) and chemically crosslinked poly(vinyl alcohol). *Journal of Applied Polymer Science*, 82(7). <https://doi.org/10.1002/app.2023>
- Peppas, N. A., & Sahlin, J. J. (1989). A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. *International Journal of Pharmaceutics*, 57(2). [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(89\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(89)90306-2)
- Rezaei, A., Nasirpour, A., Tavanai, H., & Fathi, M. (2016). A study on the release kinetics and mechanisms of vanillin incorporated in almond gum/polyvinyl alcohol composite nanofibers in different aqueous food simulants and simulated saliva. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(6),442-447.
- Ueda, A., & Saneoka, H. (2015). Characterization of the Ability to Form Biofilms by Plant-Associated *Pseudomonas* Species. *Current Microbiology*, 70(4), 506–513. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0749-7>
- Yu, H., Xu, X., Chen, X., Lu, T., Zhang, P., & Jing, X. (2007). Preparation and antibacterial effects of PVA-PVP hydrogels containing silver nanoparticles. *Journal of Applied Polymer Science*, 103(1), 125-133. <https://doi.org/10.1002/app.24835>
- Zulkifli, F. H., Hussain, F. S. J., Harun, W. S. W., & Yusoff, M. M. (2019). Highly porous of hydroxyethyl cellulose biocomposite scaffolds for tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122,562–571. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.156>