



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
Facultad de Ciencias Químicas
Programa de Magister en Ciencias con Mención en Química

**SÍNTESIS DE NANOCOMPUESTOS A BASE DE TIOMERO/
NANOARCILLA COMO POTENCIAL MATERIAL
MUCOADHESIVO CON PROPIEDADES DE LIBERACION
CONTROLADA DE FÁRMACOS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias químicas de la
Universidad de Concepción para optar al grado académico de
Magíster en Ciencias con mención en Química

Por: Alexander Eleazar Sepúlveda Córdova
Profesor Guía: Dr. Víctor Haroldo Campos requena
Concepción, Chile 2023

© Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

AGRADECIMIENTOS

A Dr. Víctor Campos-Requena por la oportunidad de trabajar en su proyecto, por su apoyo constante, paciencia, compromiso y conocimiento científico brindado durante el desarrollo de la tesis.

A proyecto FONDECYT 1190523 por el financiamiento.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción, por el apoyo económico durante la estadía en el programa.

A la Señora Karin Garcés, secretaria de postgrado, por su amabilidad, disponibilidad de tiempo y rapidez en proporción de información

A Mónica Uribe Sazo por su cordialidad, buena atención y ayuda de análisis de rayos X.

A Katherine Valdebenito Carvajal por su simpatía y ayuda en análisis de reología en mucoadhesión *in vitro*.

A Bernardita Salinas Neira por su simpatía y ayuda en análisis termogravimétricos

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	X
ABSTRACT	XII
1. INTRODUCCION.....	1
1.1. Biopolímeros y tíómeros	1
1.2. Alginato	3
1.3. Nanocompuestos de biopolímero/nanoarcilla	6
1.4. Nanocompuestos y liberación controlada de fármacos.....	9
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	12
3.1. Objetivo general:	12
3.2. Objetivos específicos:	12
4. MATERIALES Y METODOLOGÍA	13
4.1. Materiales.....	13
4.2. Síntesis de tíómeros de base de alginato por medio de L-cisteína	13
4.3. Caracterización del tíómero alginato/L-cisteína	14
4.3.1 Determinación de grupos tiol	14
4.3.2 Determinación de enlaces disulfuro	14
4.3.3 Análisis Infrarrojo	15
4.3.4 Análisis termogravimétrico	15
4.4. Preparación de nanocompuestos a base de alginato tiolado/nanoarcilla.....	16
4.5. Caracterización de nanocompuestos a base de alginato tiolado/nanoarcilla	18
4.5.1 Análisis termogravimétrico	18
4.5.2 Difracción de rayos X.....	19
4.6. Estudios reológicos de mucoadhesión <i>in vitro</i> en nanocompuestos a base de tíómero/nanoarcilla	19
4.7. Estudios de liberación controlada de una droga modelo desde nanocompuestos de tíómero/nanoarcilla	20

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
5.1. Síntesis de tiómero de alginato/L-cisteína	24
5.2. Caracterización del tiómero alginato/L-cisteína	25
5.2.1. Determinación de grupos tiol y disulfuro	25
5.2.2. Análisis infrarrojo	26
5.2.3 Análisis termogravimétrico	27
5.3. Obtención de nanocompuesto de alginato tiolado/nanoarcilla	28
5.4. Caracterización de nanocompuesto de alginato tiolado/nanoarcilla.....	29
5.4.1 Análisis termogravimétrico	30
5.4.2 Análisis de difracción de rayos X	32
5.5. Estudios reológicos de mucoadhesión <i>in vitro</i> de nanocompuestos a base de tiómero/nanoarcilla.....	35
5.6. Estudios de liberación de deltametrina desde nanocompuestos a base de tiómero/nanoarcilla.....	39
6. CONCLUSIONES	46
REFERENCIAS	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Formulaciones de nanocompuestos con distintas proporciones de polímero/tiómero y diferentes nanoarcillas.....	16
Tabla 2. Efecto de la concentración de montmorillonita (MMT) en los parámetros de liberación de deltametrina desde nanocompuestos de tiómero/nanoarcilla ($n = 3$).	41
Tabla 3. Efecto del tipo de organomodificador en la montmorillonita (MMT) sobre los parámetros de liberación de deltametrina desde nanocompuestos de tiómero/nanoarcilla ($n = 3$).	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de enlace disulfuro entre polímero tiolado (tímero) y capa de mucina debido a la formación de enlaces disulfuro	3
Figura 2. Características estructurales del alginato: a) monómeros del alginato, b) conformación de la cadena, c) distribución de los bloques G y M	4
Figura 3. Reacción de tiolación de alginato con L-cisteína mediada por carbodiimida).	5
Figura 4. Modelo de capas de arcilla montmorillonita.	7
Figura 5. Grado de separación de las capas de silicato respecto a la penetración del polímero al formarse nanocompuestos	8
Figura 6. “Vías tortuosas” generadas por la dispersión de la capa de silicato en la matriz del polímero	10
Figura 7. Estructura química de los agentes organomodificadores de las diferentes montmorillonitas utilizadas. (a) MMT (sódica), (b) I.31PS (con 0.5-5% aminopropiltrietoxisilano y 15-35% de octadecilamina), (c) I.28E (con 25-30% trimetilestearil amonio); (d) I.34MN (con 25-30% metil dihidroxietil sebo de amonio), (e) I.44P (con 35-45% dimetildialquil (C14-C18) amina).....	18
Figura 8. Estructura química de la deltametrina.	21
Figura 9. Muestra de tímero alginato/L-cisteína obtenido tras la síntesis, diálisis y liofilización	25
Figura 10. Determinación de grupos tiol (-SH) y grupos disulfuro (-S-S-) en muestras de tímero de alginato y alginato sin modificar ($n = 3$).	25
Figura 11. Espectros FT-IR de alginato tiolado y alginato sin modificar.	27
Figura 12. Termogramas de muestras de alginato tiolado y alginato sódico sin modificar.	28
Figura 13. Formulaciones de nanocompuestos a base de alginato (AS), tímero de alginato; MMT 5% y glicerol 10% como plastificante. (a) NC-0%TH, (b) NC-25%TH, (c) NC-50%TH, (d) NC-75%TH, (e) NC-90%TH, (f) NC-100%TH, (g) Sin MMT.	29
Figura 14. Termogramas para films de nanocompuestos con diferentes proporciones de tímero/alginato sin modificar. Nanoarcilla utilizada: MMT 5%.	30
Figura 15. Termogramas para films de nanocompuestos con proporción 0.5/0.5 de tímero/alginato de sodio y nanoarcilla al 5% con diferentes organomodificadores.	32
Figura 16. Difractograma de films de nanocompuestos tímero/nanoarcilla con diferente proporción de tímero/alginato sin modificar. Nanoarcilla utilizada: MMT 5%.	33

Figura 17. Difractograma de films de nanocompuestos tiómero/nanoarcilla con diferentes organomodificadores. Proporción 0.5/0.5 de tiómero/alginato de sodio y 5% nanoarcillas.	34
Figura 18. Viscosidad compleja (η^*) a lo largo del tiempo medida por análisis reológico de films de nanocompuestos en contacto con mucina. Evaluación de diferentes proporciones de tiómero/alginato sin modificar y utilizando MMT 5%.	36
Figura 19. Análisis reológico de mucina en contacto con films de nanocompuestos con diferentes proporciones de tiómero/alginato sin modificar y MMT 5%. (a) Módulo elástico (G'), y (b) módulo viscoso (G'') a lo largo del tiempo.	37
Figura 20. Viscosidad compleja (η^*) a lo largo del tiempo medida por análisis reológico de films de nanocompuestos en contacto con mucina. Evaluación de nanoarcilla con diferentes organomodificadores utilizando 0.5/0.5 de tiómero/alginato de sodio y MMT 5%.	37
Figura 21. Análisis reológico de mucina en contacto con film de nanocompuestos con proporción 0.5/0.5 de tiómero/alginato de sodio y MMT 5% con diferentes organomodificadores. (a) Módulo elástico (G'), y (b) módulo viscoso (G'') a lo largo del tiempo.....	38
Figura 22. Gráfico m_t/m_∞ vs tiempo ^{1/2} para la liberación de deltametrina desde films de nanocompuestos con diferente concentración de nanoarcilla ($n = 3$). (a) Gráfica para el set completo de datos con regresión exponencial ($R^2 > 0.8571$), (b) gráfica para liberación a corto plazo $m_t/m_\infty < 0.6$ con regresión lineal ($R^2 > 0.8098$).	40
Figura 23. Gráfico $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ vs tiempo para la liberación de deltametrina a largo plazo (para $m_t/m_\infty > 0.6$) desde films de nanocompuestos con diferentes concentraciones de nanoarcilla ($n = 3$). Ajuste por regresión lineal ($R^2 > 0.6330$).....	42
Figura 24. Gráfico m_t/m_∞ vs tiempo ^{1/2} para la liberación de deltametrina desde films de nanocompuestos con diferentes organomodificadores ($n = 3$). (a) Gráfica para el set completo de datos con regresión exponencial ($R^2 > 0.8588$), (b) gráfica para liberación a corto plazo $m_t/m_\infty < 0.6$ con regresión lineal ($R^2 > 0.8325$).....	43
Figura 25. Gráfico $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ vs tiempo para la liberación de deltametrina a largo plazo (para $m_t/m_\infty > 0.6$) desde films de nanocompuestos con diferentes organomodificadores ($n = 3$). Ajuste por regresión lineal ($R^2 > 0.7346$).	44
Figura 26. Representación hipotética del mecanismo de funcionamiento de un nanocompuesto mucoadhesivo a base de alginato tiolado/nanoarcilla con liberación controlada de drogas.	45

ABREVIATURAS

AS	Alginato de sodio
NC	Nanocompuesto
MMT	Montmorillonita sódica
I.31PS	0,5-5 % aminopropil tietoxisilano 15-35 % de octadecilamina
I.28E	25-30 % trimetil estearil amonio
I.34MN	25-30 % metil dihidroxietil sebo hidrogenado amonio
I.44P	35-45 % dimetil dialquil (C14-C18) amina
-SH	Grupos tiol
-S-S-	Enlaces disulfuro
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
G'	Módulo de almacenamiento
G''	Módulo de pérdida
η^*	Viscosidad compleja
mbar	milibar
mg	mili gramos
mL	mili litros
mM	mili molar
nm	nanómetros
μ L	microlitros

RESUMEN

Se prepararon nanocompuestos a base de alginato tiolado y nanoarcillas de tipo montmorillonita (MMT) por método de *film casting* con el fin de obtener un material híbrido con propiedades mucoadhesivas y liberación controlada de drogas. Primero, se modificó alginato incorporando grupos tiol a su cadena para formar el polímero tiolado. Este se caracterizó mediante FTIR y se cuantificó la cantidad de grupos tiol (–SH) y enlaces disulfuro (–S–S–) obteniéndose valores de 185.96 y 24.8 $\mu\text{mol/g}$ polímero respectivamente. Se caracterizó el alginato tiolado por FTIR y análisis termogravimétrico (TGA). Se prepararon nanocompuestos cargados con deltametrina como droga modelo utilizando diferentes cantidades de alginato tiolado y montmorillonitas con diferentes organomodificadores. Estos nanocompuestos mostraron una morfología intercalada/exfoliada mediante análisis XRD, en donde el peak característico de MMT de $7.03^\circ 2\theta$ se desplaza a menores ángulos, y el TGA muestra un aumento en la estabilidad térmica otorgada por la arcilla en la matriz del biopolímero. En los estudios reológicos de mucoadhesividad *in vitro* con mucina se observó un aumento significativo de la viscosidad y los módulos G' y G'' al aumentar la cantidad de tiómero en la formulación. Los estudios de liberación de deltametrina desde los nanocompuestos muestran la importancia de la nanoarcilla al intercalarse en la matriz polimérica y crear una estructura exfoliada que al retardo de la liberación de la droga. Se pudo comprobar que el

uso de diferentes organomodificadores en la nanoarcilla incide en el retardo de la liberación de la deltametrina debido a la naturaleza del organomodificador como al grado de intercalación/exfoliación que se alcanza.

ABSTRACT

Nanocomposites based on thiolated alginate and montmorillonite (MMT) nanoclays were prepared by film casting method in order to obtain a hybrid material with mucoadhesive properties and controlled drug release. First, alginate was modified by incorporating thiol groups into its chain to form the thiolated polymer. This was characterized by FTIR and the amount of thiol groups ($-SH$) and disulfide bonds ($-S-S-$) was quantified, obtaining values of 185.96 and 24.8 $\mu\text{mol/g}$ polymer, respectively. The thiolated alginate was characterized by FTIR and thermogravimetric analysis (TGA). Deltamethrin-loaded nanocomposites were prepared as a model drug using different amounts of thiolated alginate and montmorillonites with different organomodifiers. These nanocomposites showed an intercalated/exfoliated morphology by XRD analysis, where the characteristic MMT peak of $7.03^\circ 2\theta$ shifts to smaller angles, and TGA shows an increase in thermal stability provided by the clay in the biopolymer matrix. In rheological studies of in vitro mucoadhesiveness with mucin, a significant increase in viscosity and G' and G'' moduli was observed when increasing the amount of thiomers in the formulation. Deltamethrin release studies from nanocomposites show the importance of nanoclay by intercalating in the polymeric matrix and creating an exfoliated structure that delays drug release. It was possible to verify that the use of different organomodifiers in the nanoclay affects the delay in the release of deltamethrin due to the nature of the organomodifier as well as the degree of intercalation/exfoliation that is achieved.

1. INTRODUCCION

1.1. Biopolímeros y tiómeros

Los polímeros biodegradables provenientes de recursos renovables han atraído cada vez más atención en las últimas décadas, principalmente debido a dos razones: preocupaciones por la contaminación ambiental a causa de los polímeros derivados del petróleo, y por la limitación de los recursos petroleros (Farshi Azhar et al., 2014). Según sus diferentes orígenes, los polímeros biodegradables se clasifican en tres categorías: polímeros provenientes de recursos naturales (Sionkowska, 2011), polímeros semisintéticos (Yang et al., 2007), y polímeros producidos por microorganismos (Dutta et al., 2002).

Sus aplicaciones son variadas como el uso de películas de biopolímeros para barreras selectivas en transferencia de humedad, absorción de oxígeno, oxidación de lípidos y las pérdidas de aromas en materiales de empaque (Alboofetileh et al., 2014). De igual forma han tenido relevancia en el área farmacéutica, en donde pueden ser utilizados como portadores de fármacos para liberación a velocidad controlada y para dirigirse a una determinada ubicación en el cuerpo como por ejemplo la mucosa intestinal, donde se absorbe la mayoría de los fármacos (Khutoryanskiy, 2011).

Se ha buscado mejorar las propiedades adhesivas de estos materiales poliméricos en la mucosa a través de diversos métodos, sin embargo, la mayoría de estos sistemas basa sus propiedades mucoadhesivas en la

formación de interacciones no covalentes, como enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones iónicas entre el biopolímero y la mucosa. Estas interacciones son moderadamente débiles por lo que no se puede asegurar la localización de las formas de dosificación de manera prolongada en el tiempo en el sitio de absorción (Bernkop-Schnurch et al., 2001).

Gran atención ha tenido una nueva generación de polímeros mucoadhesivos llamados polímero tiolados o tíómeros (Bernkop-Schnurch, 2005). Estos polímeros tiolados se forman por la inmovilización de grupos tiol o sulfhidrilo ($-SH$) en sus cadenas laterales mediante reacción química con un agente ligante que los posee. Las propiedades mucoadhesivas de los tíómeros son debidas a la imitación del mecanismo natural de la mucoadhesión el cual consiste en la unión covalente del polímero tiolado a la capa mucosa mediante la formación de enlaces disulfuro ($-S-S-$) entre ambos. Estos enlaces disulfuro se producen por la reacción entre los grupos de tiol del tíómero y los tiol de los subdominios del mucus rico en cisteína, produciéndose una reacción de oxidación simple (Figura 1).

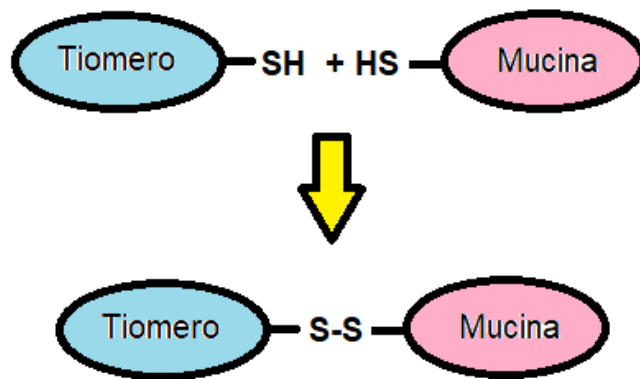


Figura 1. Formación de enlace disulfuro entre polímero tiolado (tímero) y capa de mucina debido a la formación de enlaces disulfuro (Bernkop-Schnurch, 2005).

Los tímeros en comparación con sus correspondientes polímeros no modificados proporcionan una fuerte mucoadhesión que es suficiente para garantizar la localización de polímero en el sitio blanco (Iqbal et al., 2012). Debido a esta unión de tipo covalente, las propiedades mucoadhesivas de los tímeros pueden llegar a ser hasta 140 veces mayor con respecto al polímero sin modificar (Bernkop-Schnurch, 2005). Por lo tanto, la tiolación es uno de los enfoques generalmente aceptados para mejorar la propiedad de mucoadhesión tanto de polímeros naturales como sintéticos (Naveen et al., 2018).

1.2. Alginato

El alginato es un biopolímero polisacárido proveniente de algas pardas que ha tenido gran importancia en la elaboración de productos debido a su biodegradabilidad (Tønnesen & Karlsen, 2002). Está compuesto principalmente

de unidades de ácido β -D-manurónico enlazadas y unidades de ácido α -L-gulurónico (Figura 2) (Su & Chen, 2018). Se caracteriza por poseer grupos carboxilo en cada residuo constituyente los que pueden reaccionar con compuestos que contengan en su estructura grupos amino y de esta manera formar enlaces tipo amida (Abdollahi et al., 2013).

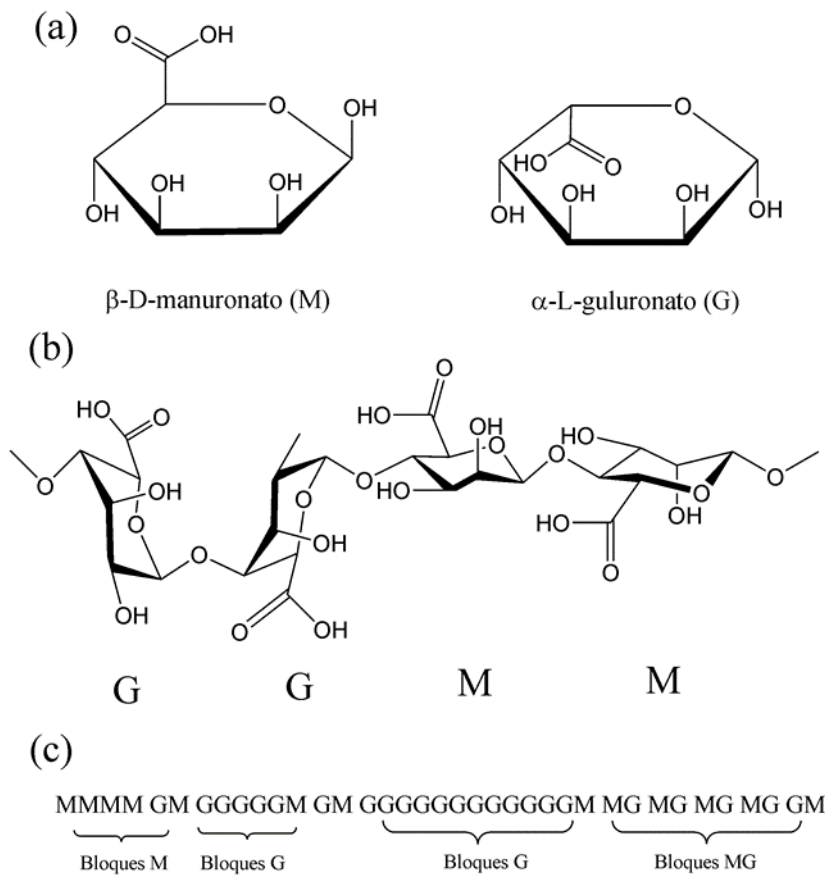


Figura 2. Características estructurales del alginato: a) monómeros del alginato, b) conformación de la cadena, c) distribución de los bloques G y M (Draget et al., 2005).

Los alginatos se utilizan como estabilizantes, espesantes y formadoras de películas para una amplia variedad de productos (Yang et al., 2011). A la vez es una alternativa eficiente para los materiales plásticos de empaque no biodegradables, ya que no es tóxico, es biodegradable y biocompatible (Alboofetileh et al., 2014). Esta multifuncionalidad ha llevado a su uso en muchas áreas, como alimentos, aditivos farmacéuticos, biología o portadores de enzimas, materiales de ingeniería de tejidos, etc. (Abdollahi et al., 2013).

Es posible desarrollar tíómeros de alginato por medio de la reacción con L-cisteína para así unir covalentemente grupos –SH (Figura 3) (Bernkop-Schnurch, 2005).

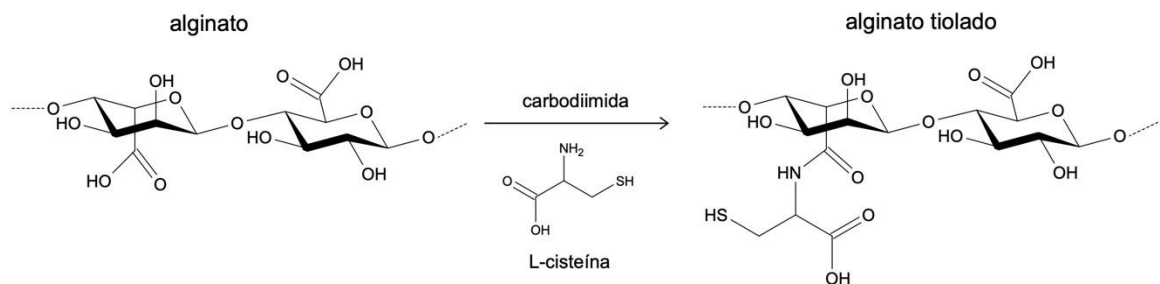


Figura 3. Reacción de tiolación de alginato con L-cisteína mediada por carbodiimida (Davidovich-Pinhas et al., 2009).

1.3. Nanocompuestos de biopolímero/nanoarcilla

En las últimas décadas los nanomateriales han penetrado en el campo de los compuestos poliméricos como una nueva generación de agentes híbridos. Están compuestos por una matriz polimérica y un relleno inorgánico como agente reforzante que aparece en la escala del nano, razón por la cual se denominan nanocompuestos (Rafiee & Shahzadi, 2019). Sus propiedades mecánicas, termorresistencia, de barrera y reológicas mejoradas en comparación con los polímeros puros los han convertido en materiales interesantes de estudio en diferentes áreas (Rhim et al., 2013).

Los nanocompuestos principalmente se basan en silicatos en capas dispersos en un polímero. Se han investigado ampliamente debido a que los materiales de arcilla son fácilmente disponibles, son respetuosos con el medio ambiente, tienen un bajo costo y se pueden modificar químicamente (Alboofetileh et al., 2014). La obtención de nanocompuestos de biopolímero/arcilla dependen de diversos factores, como la compatibilidad entre la matriz polimérica y el tipo de nanoarcilla, los métodos de preparación de nanocompuestos y el contenido de nanoarcilla (Pavlidou & Papaspyrides, 2008).

La montmorillonita (MMT) es uno de los silicatos estratificados más comúnmente utilizado como nanorelleno (Chung et al., 2010). Se caracteriza por poseer una estructura cristalina de múltiples capas y cada una de estas

formada por una lámina de alúmina octaédrica (O) intercalada entre dos láminas de sílice tetraédrica (T) (Figura 4).

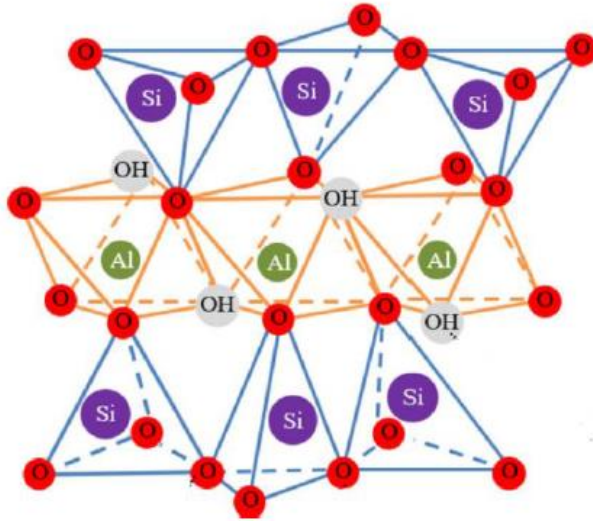


Figura 4. Modelo de capas de arcilla montmorillonita (Su & Chen, 2018).

Por otra parte, se usa ampliamente debido a su alta relación de aspecto y alta propiedad de hinchamiento en espacios polares (Rafiee & Shahzadi, 2019). Además, es muy estable tanto en medios ácidos como básicos (Kevadiya et al., 2009).

Existen tres distintas morfologías de los nanocompuestos respecto a cómo el relleno inorgánico se dispersa en la matriz polimérica. Es posible observar el grado de separación de las capas de silicato y la penetración del polímero entre ellas: (a) agregadas, (b) intercaladas y (c) exfoliadas (Figura 5). Diversos son los factores que explican las morfologías de los nanocompuestos, el método de

procesamiento, el tipo de arcilla, la modificación de la arcilla, el tipo de matriz polimérica, la fracción en peso de arcilla incorporada al polímero y la interacción entre arcilla y polímero (Rafiee & Shahzadi, 2019).

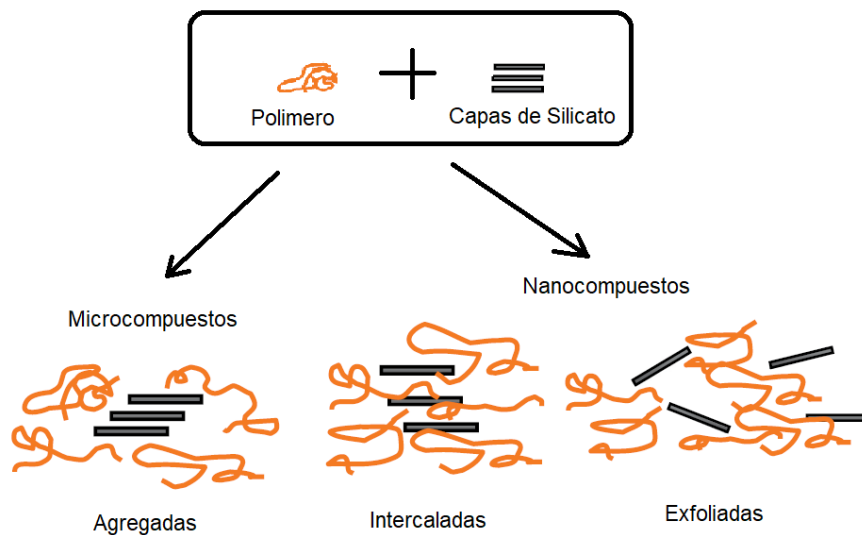


Figura 5. Grado de separación de las capas de silicato respecto a la penetración del polímero al formarse nanocompuestos (Paul & Robeson, 2008).

Muchas son las contribuciones de la MMT en relación con el área de superficie específica, su capacidad de intercambio iónico, buena propiedad de intercalación, estabilidad química y mecánica, y por su abundancia en la naturaleza, al ser utilizada en nanocompuestos es sin duda una de las mejores opciones para formulaciones de liberación controlada (Farshi Azhar et al., 2014). Se ha demostrado que se requiere una cantidad muy pequeña de nanoarcillas para reforzar los microrellenos del polímero lo que conduce a un

crecimiento significativo de las propiedades mecánicas (Rafiee & Shahzadi, 2019).

1.4. Nanocompuestos y liberación controlada de fármacos

Un gran interés ha tenido el campo de la administración de fármacos con materiales en lamina al poder desempeñarse como vehículos de agentes terapéuticos. La intercalación de moléculas de fármaco en materiales en capas proporciona una ruta útil y conveniente para preparar híbridos orgánico-inorgánicos que contengan propiedades de ambas fases en una sola matriz y se pueden utilizar como portadores de fármacos (Patel et al., 2006).

Un medicamento debe ser administrado en los sitios apropiados por un período prolongado para su correcto funcionamiento con el fin de tener la máxima actividad farmacológica. Los sistemas de liberación controlada de fármacos pretenden alcanzar concentraciones plasmáticas adecuadas del fármaco liberado que permanecen dentro del rango terapéutico, evitando concentraciones que excedan el umbral de toxicidad o descomposición al rango sub-terapéutico (Zheng et al., 2007).

Las capas de nanoarcillas se pueden separar dentro de la matriz del polímero para formar nanocompuestos de silicato exfoliado creando una dispersión de “caminos tortuosos” (Figura 6), la cual modela la difusión de drogas por la

creación de tortuosidad en la morfología de la matriz por lo que dificultaría y retardaría el paso de la droga (Vasco Calle et al., 2016).

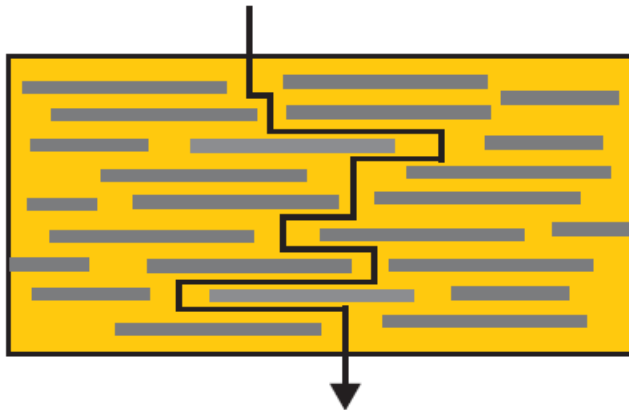


Figura 6. “Vías tortuosas” generadas por la dispersión de la capa de silicato en la matriz del polímero (Campos-Requena et al., 2015).

Una matriz polimérica con una morfología reticulada podría aumentar la retención del fármaco, y por otro lado, si el material posee además características mucoadhesivas este podría otorgar un mayor tiempo de residencia en el sitio de absorción y evitar la eliminación temprana del material (Yan et al., 2016), por lo que ambas características se pueden complementar para aumentar la eficacia de un material para transporte de drogas.

De acuerdo con lo que ha expuesto, en el presente trabajo se desarrollará un nanocompuesto a base de nanoarcillas dispersas en un polímero natural, el cual tenga propiedades mucoadhesivas dadas por la modificación química de

este polímero (tiómero) y así obtener un material con potenciales características mucoadhesivas y con liberación controlada de drogas.

2. HIPÓTESIS

La combinación de un tiómero con un nanomaterial arcilloso puede producir nanocompuestos tiolados con potencial uso en formulaciones farmacéuticas con propiedades mucoadhesivas y liberación controlada de fármacos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

Sintetizar un nanocompuesto a base de alginato tiolado y nanoarcillas de tipo montmorillonita para crear un material mucoadhesivo para transporte de fármacos con liberación controlada.

3.2. Objetivos específicos:

1. Sintetizar y caracterizar un polímero tiolado (tímero) a base de alginato con propiedades mucoadhesivas.
2. Obtener y caracterizar nanocompuestos a base de alginato tiolado con nanoarcillas a base de montmorillonita.
3. Realizar pruebas *in vitro* de mucoadhesión del nanocompuesto con mucina como simulador de mucosa intestinal utilizando reología.
4. Realizar estudios de liberación de una droga modelo desde los nanocompuestos obtenidos.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1. Materiales

Alginato de sodio (AS) (CAS W201502); L-cisteína; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato (EDAC); ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (Reactivo de Ellman); 2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanediol (TRIS); dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4); hidrogenofosfato de disodio (Na_2HPO_4); borohidruro de sodio (NaBH_4); ácido clorhídrico (HCl); peróxido de hidrógeno (H_2O_2); montmorillonita sódica (MMT); Nanomer® I.28E (MMT modificada con 25-30% trimetilestearil amonio); Nanomer® I.31PS (MMT modificada con 0,5-5% aminopropiltriétoxissilano y 15-35% de octadecilamina); Nanomer® I.34MN (MMT modificada con 25-30% metil dihidroxietil sebo de amonio); Nanomer® I.44P (MMT modificada con 35-45% dimetildialquil (C14-C18) amina); mucina de cerdo Tipo II todos adquiridos en Sigma-Aldrich (USA). Membrana tubo de diálisis MWCO (corte de peso molecular) 3.5 kDa adquirido en Milipore (USA).

4.2. Síntesis de tímeros de base de alginato por medio de L-cisteína

La unión covalente de la L-cisteína a la cadena polimérica del alginato se logró mediante la formación de enlaces amida entre el grupo amino primario del aminoácido y un grupo ácido carboxílico del polímero (Figura 3). Para su

síntesis se hidrataron 3 g del polímero en 300 mL de agua desionizada y se llevó a agitación por 1 h. Luego se ajustó el pH a 4.0 con HCl (5.0 mol/L) y se agrega 0.82 g de EDAC ajustando nuevamente el pH a 6.0 con NaOH (1.0 mol/L). Finalmente se dializó por 3 días en tubos de diálisis (MWCO 3.5 kDa) contra 1 L de agua destilada cada día, se congeló a -20°C y se liofilizó a 0.016 mbar (Christ Alpha 1–4 LSC) (Davidovich-Pinhas et al., 2009).

4.3. Caracterización del tómero alginato/L-cisteína

4.3.1 Determinación de grupos tiol

La cuantificación de grupos tiol ($-\text{SH}$) inmovilizados en la cadena polimérica se determinó espectrofotométricamente por la reacción con el reactivo de Ellman. Este reactivo se preparó disolviendo 15 mg de 5,5-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) en 50 mL de tampón de fosfato 0.5 mol/L a pH 8. Se preparó una curva de calibración de estándares de grupos tiol utilizando L-cisteína como referencia. Para las muestras se masó 2 mg de tómero y 500 μL de reactivo de Ellman, luego se incubaron durante 2 horas y se analizaron en un espectrofotómetro UV/VIS a 475 nm (Duggan et al., 2016).

4.3.2 Determinación de enlaces disulfuro

Primero se preparó una solución buffer TRIS pesando 0.788 g TRIS HCl y llevando a un volumen de 100 mL con agua destilada, ajustando el pH a 7.6.

Luego se preparó un buffer fosfato pH 8 en agua destilada. Los enlaces disulfuro se determinaron de manera indirecta transformando todos los grupos –S–S– presentes en el tiómero a grupos tiol –SH reduciéndolos con NaBH₄ (4%) (Iqbal et al., 2011). Luego se determinaron los grupos tiol totales por método de Ellman con el procedimiento de la sección 4.3.1, y a estos grupos tiol totales se les resta los grupos tiol determinados originalmente en el tiómero.

4.3.3 Análisis Infrarrojo

Los tiómeros y polímeros sin modificar liofilizados se caracterizaron utilizando la técnica de espectroscopia FTIR con un espectrómetro Nicolet iS50 FT-IR (Thermo Scientific, EE. UU.) por medio de la preparación de discos de KBr y la muestra (Campos-Requena & Gomez, 2018)

4.3.4 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó utilizando un equipo TG209 F1, Iris Equipment (Netzsch, Alemania). Las curvas de descomposición para el polímero puro y el tiómero liofilizados se obtuvieron mediante el estudio de la pérdida de masa en un rango de temperatura entre 30°C y 550°C, a una velocidad de calentamiento de 10°C min⁻¹ en nitrógeno (Campos-Requena & Gomez, 2018).

4.4. Preparación de nanocompuestos a base de alginato tiolado/nanoarcilla

Los nanocompuestos se prepararon mediante el método de *film casting* (Abdollahi et al., 2013) que consiste en disolver 1 g de polímero tiolado en 100 mL de agua destilada a 70°C con agitación durante 30 min. Después de la disolución completa, se añadió 10% de glicerol y una cantidad de nanoarcilla entre 3 y 7% sobre la mezcla, se agito vigorosamente durante 24 h a temperatura ambiente.

Luego, la mezcla se homogenizó a 9000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente utilizando un homogeneizador (Wiggen Hauser, D-500, Alemania), seguido de sonicación con un equipo de ultrasonido (Misonix, S-4000, EE. UU.) durante 5 min al 70% de amplitud. Se vertió en placas de Petri de 9 cm de diámetro y se dejó secar en un horno a 40°C durante aproximadamente 24 h.

Para la incorporación de deltametrina en el nanocompuesto, se masó 30 mg de la droga y 5 g de nanoarcilla en 50 mL de etanol, esta solución se dejó mezclando bajo agitación por 24 h. Luego se procedió a la incorporación de los otros reactivos según el procedimiento descrito anteriormente.

Tabla 1. Formulaciones de nanocompuestos con distintas proporciones de polímero/tiómero y diferentes nanoarcillas.

Nanocompuesto	Relación Alginato tiolado/alginato sin modificar	Tipo de nanoarcilla y su concentración
NC-0%TH	0/1	5% MMT
NC-25%TH	0.25/0.75	5% MMT
NC-50%TH	0.5/0.5	5% MMT
NC-75%TH	0.75/0.25	5% MMT
NC-90%TH	0.9/0.1	5% MMT
NC-100%TH	1/0	5% MMT
NC-I.31PS	0.5/0.5	5% I.31PS
NC-I.28E	0.5/0.5	5% I.28E
NC-I.34MN	0.5/0.5	5% I.34MN
NC-I.44P	0.5/0.5	5% I.44P
Sin MMT	0.5/0.5	–

Luego, los films secos resultantes se retiraron de las placas de Petri y se almacenaron en desecadores que contienen una solución saturada de nitrato de magnesio a 25°C y 52.89% de humedad relativa hasta su uso. (Abdollahi et al., 2013). La composición de cada nanocompuesto sintetizado se especifica en la (Tabla 1).

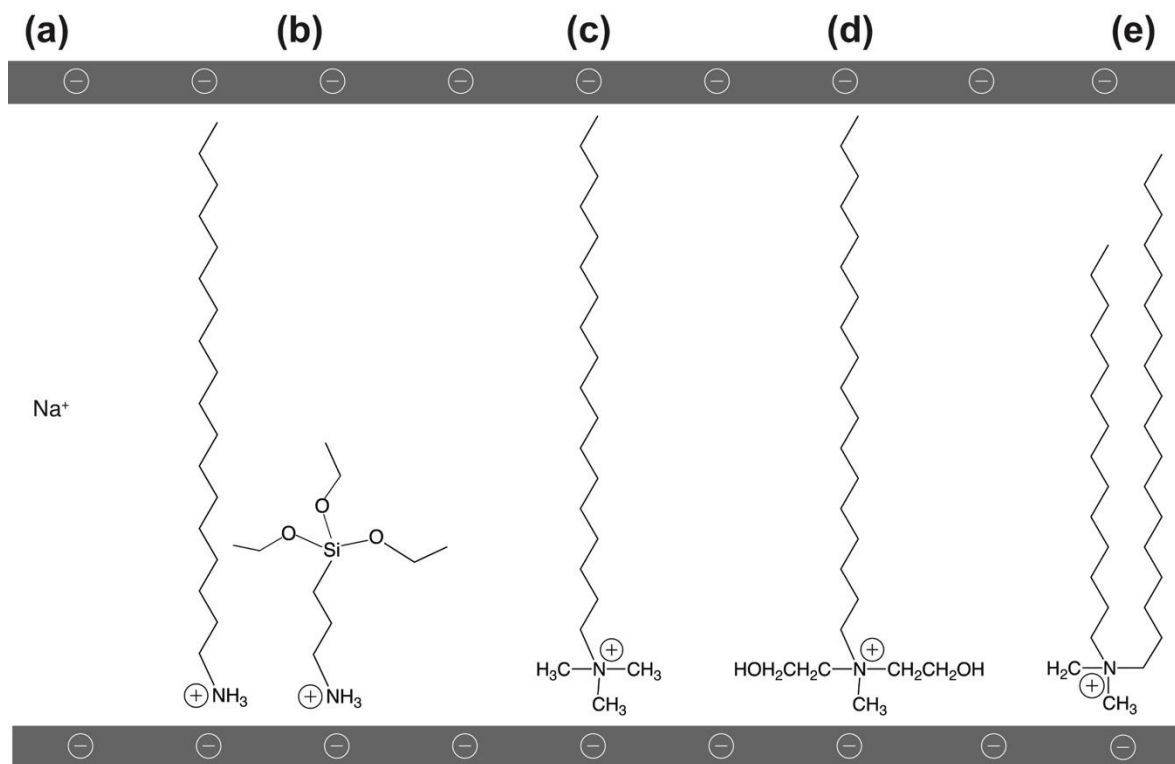


Figura 7. Estructura química de los agentes organomodificadores de las diferentes montmorillonitas utilizadas. (a) MMT (sódica), (b) I.31PS (con 0.5-5% aminopropiltrióxido de silano y 15-35% de octadecilamina), (c) I.28E (con 25-30% trimetilsteáril amonio); (d) I.34MN (con 25-30% metil dihidroxietil sebo de amonio), (e) I.44P (con 35-45% dimetildialquil (C14-C18) amina).

4.5. Caracterización de nanocompuestos a base de alginato tiolado/nanoarcilla

4.5.1 Análisis termogravimétrico

El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó en un equipo TG209 F1, Iris Equipment (Netzsch, Alemania). Las curvas de descomposición para el nanocompuesto se obtienen mediante el estudio de la pérdida de masa en un

rango de temperatura entre 30° y 550°, a una velocidad de calentamiento de 10°C min⁻¹ en nitrógeno. (Campos-Requena & Gomez, 2018).

4.5.2 Difracción de rayos X

Se cuantificó la distancia de separación entre capas de nanoarcilla en los films de nanocompuestos para estimar el grado de intercalación/exfoliación. Se obtuvo a partir de las mediciones de difracción de rayos X realizadas con un difractómetro Bruker AXS D4 Endeavor (Alemania). Los nanocompuestos se cortaron en piezas de 20 × 20 mm y se analizaron en las siguientes condiciones: radiación de Cu (40 kV, 20 mA), velocidad de barrido de 1 grado min⁻¹ entre 2 y 30° 2θ, rendija de divergencia de 12.0 mm, tamaño de paso de 0.0199 y tiempo / paso de 1 sRD. El espaciado interlaminar (d_{001}) se calcula con el peak de difracción por medio de la Ley de Braggs: $\text{sen } \theta = n\lambda/2d$ (Campos-Requena et al., 2015).

4.6. Estudios reológicos de mucoadhesión *in vitro* en nanocompuestos a base de tiómero/nanoarcilla

Las mediciones reológicas se realizaron con un reómetro cono-plato C35/28 (RotoVisco RT20, Haake GmbH, Karlsruhe, Alemania). Los films de nanocompuestos se mezclaron con 3 mL de una solución al 5%(m/v) de mucina gástrica de porcino. Después de una incubación de 20 minutos, la preparación

de nanocompuesto-mucina se dejó equilibrar en la placa del reómetro durante 3 minutos a 20°C. Las pruebas dinámicas de oscilación dentro de la región de viscoelasticidad lineal se realizaron a una frecuencia de 1 Hz. Los parámetros obtenidos fueron el módulo de almacenamiento (G'), el módulo de pérdida (G'') y la viscosidad compleja (η^*) (Leitner et al., 2003).

4.7. Estudios de liberación controlada de una droga modelo desde nanocompuestos de tiómero/nanoarcilla

Se estudió la liberación de la droga modelo deltametrina (Figura 8) desde los nanocompuestos hacia medio de liberación acuoso. Para esto se masó 1 g de este film con una medida de 6 × 6 mm y se dejó reposar sumergido en 50 mL de agua destilada sin agitación y se midió la cantidad de droga liberada al medio. Para esto se tomaron alícuotas de 1 mL del medio de liberación a tiempo 0.5, 1, 2, 3, 6, 24, 48, 72 y 96 h. En cada muestreo se reponía la misma cantidad de agua para mantener el volumen del medio de liberación constante. La cuantificación de la deltametrina en las alícuotas muestreadas a los diferentes tiempos se realizó mediante espectrometría UV-VIS contra una curva de calibración de deltametrina en *n*-hexano a una longitud de onda de 265 nm. Se evaluaron las variables que pueden influir en la liberación de la droga: nivel de intercalación del nanocompuesto, tipo y concentración de la nanoarcilla utilizada (Campos-Requena et al., 2016).

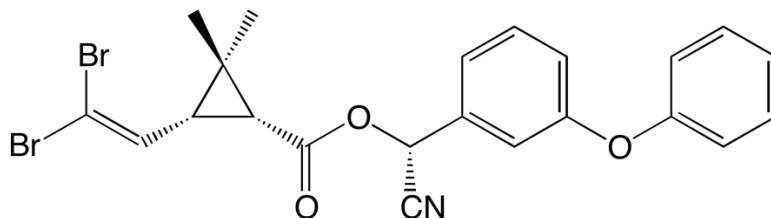


Figura 8. Estructura química de la deltametrina.

Con los datos de la cantidad de deltametrina liberada en el tiempo se llevó a cabo un análisis general del modelo cinético y de difusión de la droga desde los films de nanocompuestos de acuerdo con las ecuaciones sugeridas por Cran, Crank (Cran et al., 2010; Crank, 1979) y Kourwel (Kuorwel et al., 2013). El modelo de difusión de la deltametrina puede ser calculada a partir de la primera y segunda ley de Fick (ecuación 1).

$$\left(\frac{m_t}{m_\infty}\right) = 1 - \left(\frac{8}{\pi^2}\right) e^{\left(\frac{-\pi^2 Dt}{l^2}\right)} \quad (\text{ecuación 1})$$

donde m_t y m_∞ son la cantidad de deltametrina liberada en el medio de liberación a un tiempo t y en el equilibrio respectivamente, D es el coeficiente de difusión y l es el grosor del film de nanocompuesto. Esta ecuación puede ser reorganizada dando como resultado la ecuación 2.

$$\ln\left(1 - \frac{m_t}{m_\infty}\right) = \ln\left(\frac{8}{\pi^2}\right) - \left(\frac{\pi^2 Dt}{l^2}\right) \quad (\text{ecuación 2})$$

La migración a largo plazo ($m_t/m_\infty > 0,6$) está relacionada con el tiempo mediante un gráfico $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ versus el tiempo, obteniéndose una respuesta lineal que da como resultado una línea recta con una pendiente que representa la constante de velocidad de difusión ($k_d = -\pi^2 D/l^2$).

El coeficiente de difusión puede ser obtenido desde el modelo de migración a corto plazo ($m_t/m_\infty < 0,6$) (ecuación 3).

$$\left(\frac{m_t}{m_\infty}\right) = 4 \left(\frac{Dt}{\pi l^2}\right)^{1/2} \quad \text{(ecuación 3)}$$

Un gráfico de m_t/m_∞ en función de $t^{1/2}$ debería dar como resultado una línea recta de la cual se puede calcular D a partir de la pendiente. El análisis cinético de la liberación de deltametrina se derivó de un modelo cinético de primer orden utilizando la ecuación 4.

$$\ln\left(1 - \frac{m_t}{m_\infty}\right) = -k_1 t \quad \text{(ecuación 4)}$$

Un gráfico de $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ como función del tiempo con todo el conjunto de datos debería dar una línea recta con una pendiente igual a la constante cinética global (k_1). A partir de la ecuación 5 se puede obtener la velocidad inicial de liberación de la deltametrina (v_0).

$$v_0 = m_\infty k_1$$

(ecuación 5)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Síntesis de tómero de alginato/L-cisteína

La síntesis del tómero de alginato/L-cisteína se logró mediante la formación de enlaces amida entre grupos del ácido carboxílico de la cadena del alginato y los grupos amino primario del ligando de L-cisteína mediado por la carbodiimida EDAC (Figura 3) (Davidovich-Pinhas et al., 2009). El tómero liofilizado presentó una textura fibrosa y esponjosa de tono blanco con un muy leve olor a azufre (Figura 9).



Figura 9. Muestra de tíohero alginato/L-cisteína obtenido tras la síntesis, diálisis y liofilización

5.2. Caracterización del tíohero alginato/L-cisteína

5.2.1. Determinación de grupos tiol y disulfuro

La concentración de grupos tiol (-SH) y enlaces disulfuro (S-S) en el tíohero sintetizado se determinaron a través del ensayo de Ellman (Figura 10). La determinación de grupos tiol mostró un promedio de inmovilización de 186.0 ± 39.0 μmol de grupos -SH por gramo de polímero para el tíohero. Para los enlaces disulfuro inter y/o intramoleculares presentes en el tíohero fue de 24.8 ± 4.6 μmol de grupos S-S por gramo de polímero.

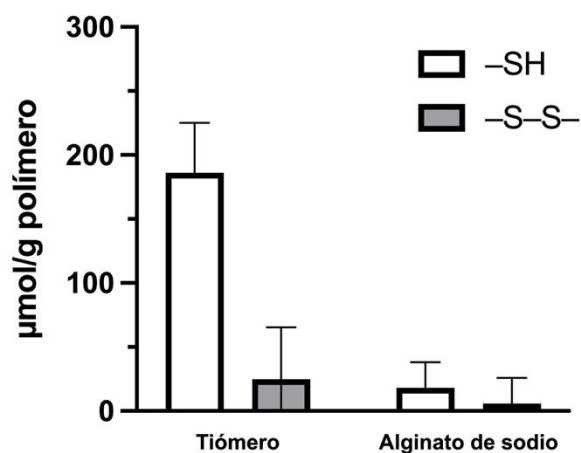


Figura 10. Determinación de grupos tiol (-SH) y grupos disulfuro (-S-S-) en muestras de tíohero de alginato y alginato sin modificar ($n = 3$).

La cantidad de enlace disulfuro en el tómero mostró no ser significativamente diferente de cero ($P > 0.05$) lo que indica un bajo grado de oxidación de los grupos tiol durante la síntesis y almacenamiento, demostrando así la eficacia de la etapa de tiolación de alginato de sodio quedando en su mayoría grupos $-SH$ disponibles no oxidados (Iqbal et al., 2012).

Por otra parte, se realizó un control con el alginato de sodio pasando por el mismo procedimiento de tiolación pero sin la adición de EDAC, siendo así una referencia de comparación con las muestras tioladas. Los resultados indican que tanto la cantidad de $-SH$ como de $-S-S-$ resultaron no ser significativamente diferente de cero ($P > 0.05$), ya que al no estar presente esta carbodiimida que actúa como intermediario para la activación de los grupos carboxilos para el acople de aminas primarias que conducen a enlaces amida, no se produce el tómero.

5.2.2. Análisis infrarrojo

Los espectros FT-IR de alginato tiolado y alginato sin modificar (referencia) se muestran en la Figura 11. El espectro FT-IR de ambas muestras mostraron el estiramiento OH característico entre $3400-3500\text{ cm}^{-1}$, mientras que a 2970 cm^{-1} se observa el estiramiento CH. La característica banda asimétrica C=O que mide aproximadamente 1646 cm^{-1} también está presente en todas las muestras. En el espectro del tómero, el enlace N-H en la amida se ve en 1557 cm^{-1} . El enlace amida aparece a 1710 cm^{-1} . Además, la señal de C-N en 1281

cm^{-1} está presente y el enlace S–H aparece en 1065 cm^{-1} . La banda elástica S–H es característicamente débil y se puede ver ligeramente a 2545 cm^{-1} . Todas estas señales sugieren una unión covalente exitosa de L-cisteína al alginato.

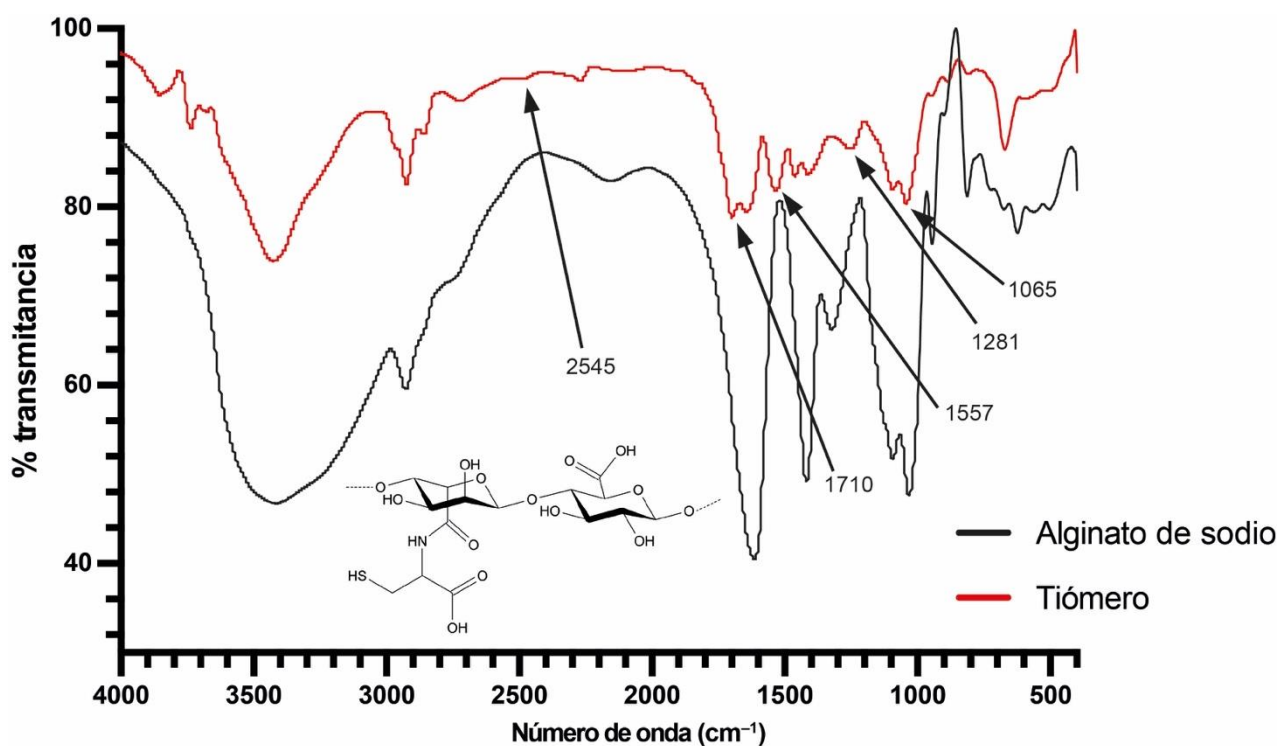


Figura 11. Espectros FT-IR de alginato tiolado y alginato sin modificar.

5.2.3 Análisis termogravimétrico

La figura 12 muestra los comportamientos de descomposición para las muestras de alginato tiolado y alginato sin modificar. La curva de descomposición térmica del tiómero muestra un primer evento térmico antes de

los 100°C, lo que se relaciona a la desorción del agua, el cual también está presente en la curva de descomposición del alginato. En un segundo evento térmico, el tíohero comienza una descomposición a los 197°C, a diferencia del alginato sin modificar que comienza a los 225°C. Este evento térmico en el tíohero muestra levemente dos etapas (peak de derivada a 219 y 264°C) que puede estar relacionado con la ruptura de los enlaces glucosídicos, descarboxilación y descarbonilación.

El alginato sin modificar presenta una pérdida de masa residual de 26.25% hasta los 550°C en comparación con el tíohero con un 44.71% a la misma temperatura esto debido a la estructura más compleja del alginato tiolado.

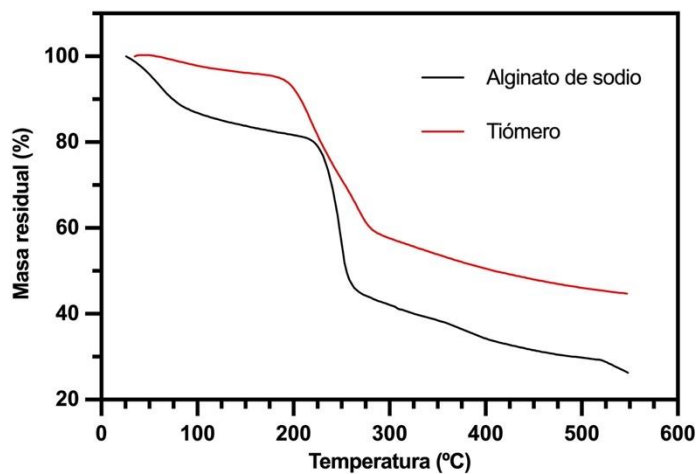


Figura 12. Termogramas de muestras de alginato tiolado y alginato sódico sin modificar.

5.3. Obtención de nanocompuesto de alginato tiolado/nanoarcilla

Los nanocompuestos presentaron una textura semielástica, insípida y de color café claro a excepción de la formulación que no posee nanoarcilla la cual mantuvo las mismas propiedades, pero siendo de color transparente (Figura 13).

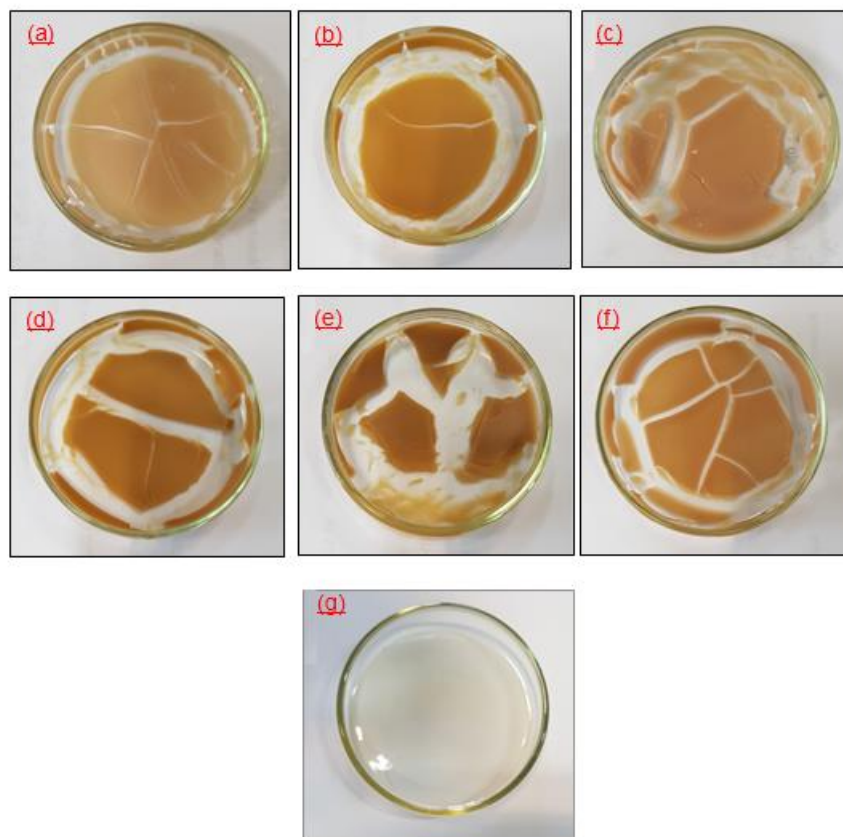


Figura 13. Formulaciones de nanocompuestos a base de alginato (AS), tíohero de alginato; MMT 5% y glicerol 10% como plastificante. (a) NC-0%TH, (b) NC-25%TH, (c) NC-50%TH, (d) NC-75%TH, (e) NC-90%TH, (f) NC-100%TH, (g) Sin MMT.

5.4. Caracterización de nanocompuesto de alginato tiolado/nanoarcilla

5.4.1 Análisis termogravimétrico

Se realizaron análisis termogravimétrico (TGA) para determinar la estabilidad térmica de los nanocompuestos con distintas concentraciones de tiómero, los que se observan en la (Figura 14).

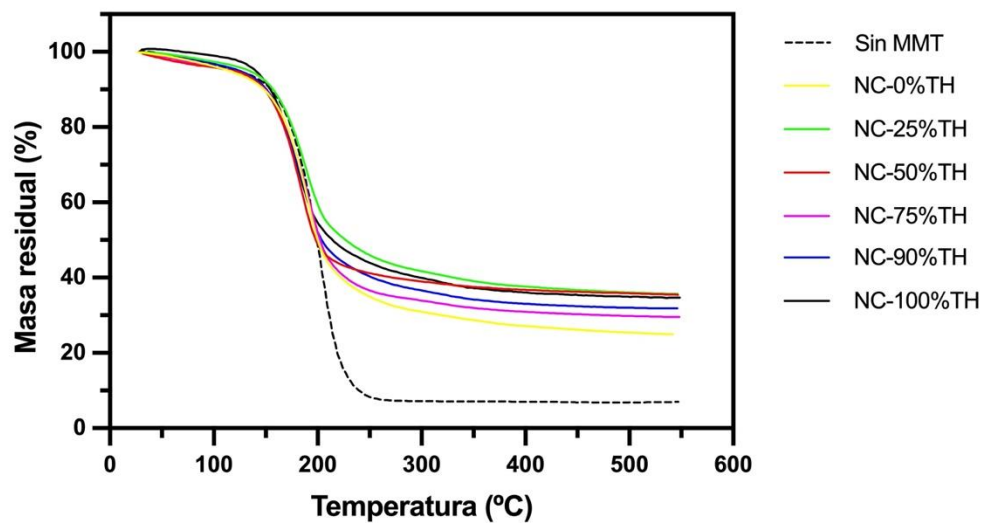


Figura 14. Termogramas para films de nanocompuestos con diferentes proporciones de tiómero/alginate sin modificar. Nanoarcilla utilizada: MMT 5%.

En las formulaciones de nanocompuestos que poseen MMT es posible observar una etapa de descomposición entre los rangos de 119-230°C que se puede relacionar con la fractura de los enlaces glucosídicos, deshidratación, descarboxilación y descarbonilación en la composición de la mezcla de alginate de sodio y tiómero.

La introducción de MMT en estos films indujo una estabilidad térmica mejorada. Esta mejora en la estabilidad térmica puede atribuirse a las inherentemente

propiedades térmicas de las arcillas inorgánicas. La intercalación del polímero en capas de arcilla evita que el calor se transmita rápidamente y limita cualquier descomposición continua adicional de los nanocompuestos. Las capas de arcilla pueden dificultar la difusión de productos de descomposición volátiles (Farshi Azhar et al., 2014).

Por el contrario, la muestra sin MMT presenta una etapa de descomposición bastante pronunciada en comparación a las formulaciones arcillosas en el mismo rango de temperatura que se fundamenta a la ausencia de la arcilla en tanto no hay estabilidad térmica quedando tan solo un 6.98% de masa residual hasta los 550°C. Además es posible apreciar que a medida que aumenta la cantidad de tiómero, aumenta la masa residual esto se puede asociar a que el tiómero muestra una fuerte afinidad a la MMT.

En la Figura 15 se observa los análisis termogravimétricos para nanocompuestos con nanoarcillas de diferentes organomodificadores, en donde es posible observar que el nanocompuesto que posee MMT sódica es el que posee mayor resistencia térmica frente a los otros. Esto puede deberse a la afinidad existente entre el alginato y la MMT por ser ambas de carácter polar produciendo un nanocompuesto con mayor grado de intercalación exfoliación que las otras nanoarcillas de carácter más apolar.

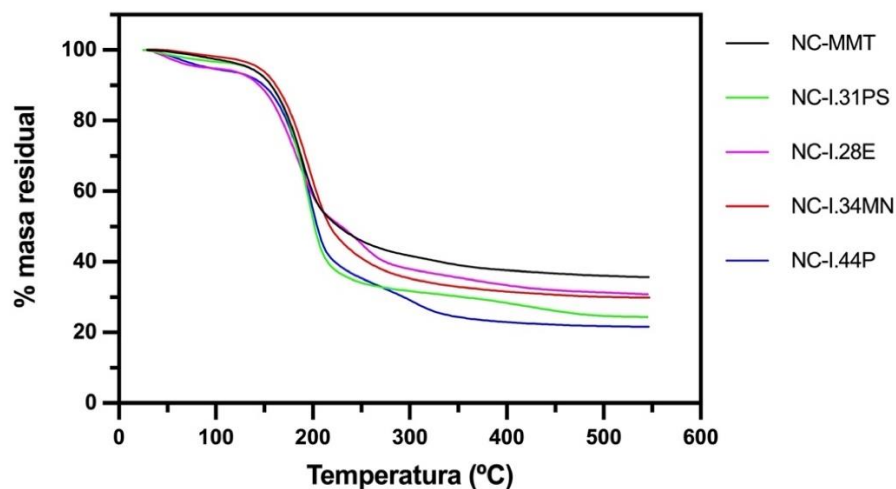


Figura 15. Termogramas para films de nanocompuestos con proporción 0.5/0.5 de tiómero/alginate de sodio y nanoarcilla al 5% con diferentes organomodificadores.

5.4.2 Análisis de difracción de rayos X

El grado de dispersión y la intercalación de las capas de nanoarcillas en las películas de nanocompuestos fueron corroboradas por XRD, lo que indica una evidencia directa de la dispersión del polímero entre las capas de la nanoarcilla (Rhim et al., 2013).

En la Figura 16 se muestra el efecto de la cantidad de tiómero usado en la formulación sobre la intercalación del nanocompuesto. La montmorillonita sódica exhibe un peak de difracción característico aproximadamente a los 6.9° dando por tanto un espacio interlamina d_{001} de 12.7 nm.

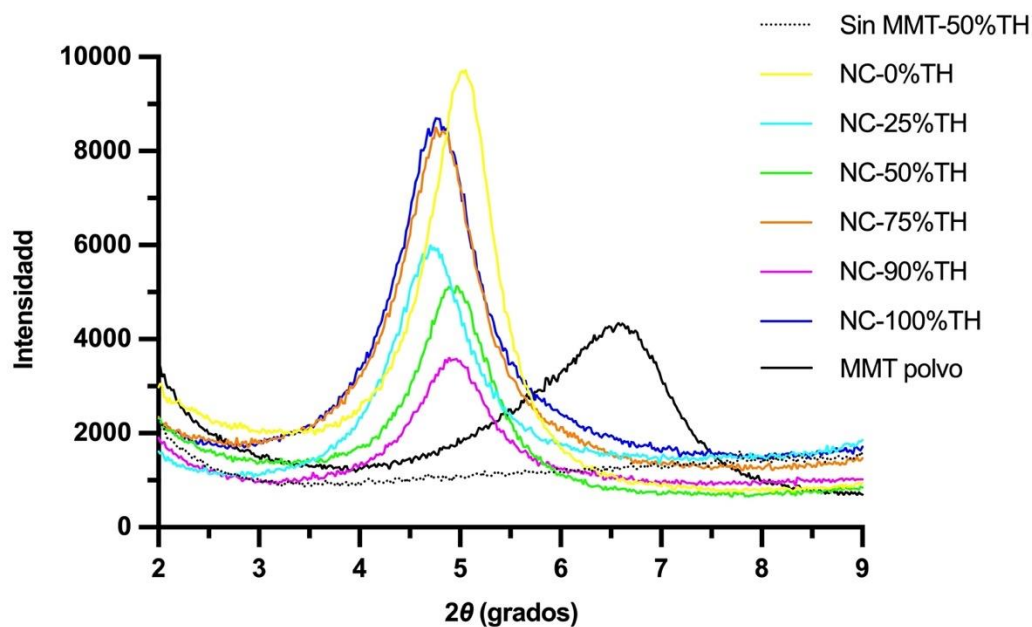


Figura 16. Diffractograma de films de nanocompuestos tíomero/nanoarcilla con diferente proporción de tíomero/alginato sin modificar. Nanoarcilla utilizada: MMT 5%.

Para los nanocompuestos se observa un corrimiento en este peak de difracción hacia ángulos menores (4.7° a 5.1°), lo que muestra un aumento en el espaciamiento basal de la MMT, indicando una intercalación del alginato en las galerías del silicato pero sin alcanzar exfoliación completa. Se observa que a medida que aumenta el porcentaje de tíomero en la formulación, el peak de difracción tiende a desplazarse levemente a ángulos más bajos. Esto podría deberse a que el tíomero tendría una mayor afinidad con la MMT.

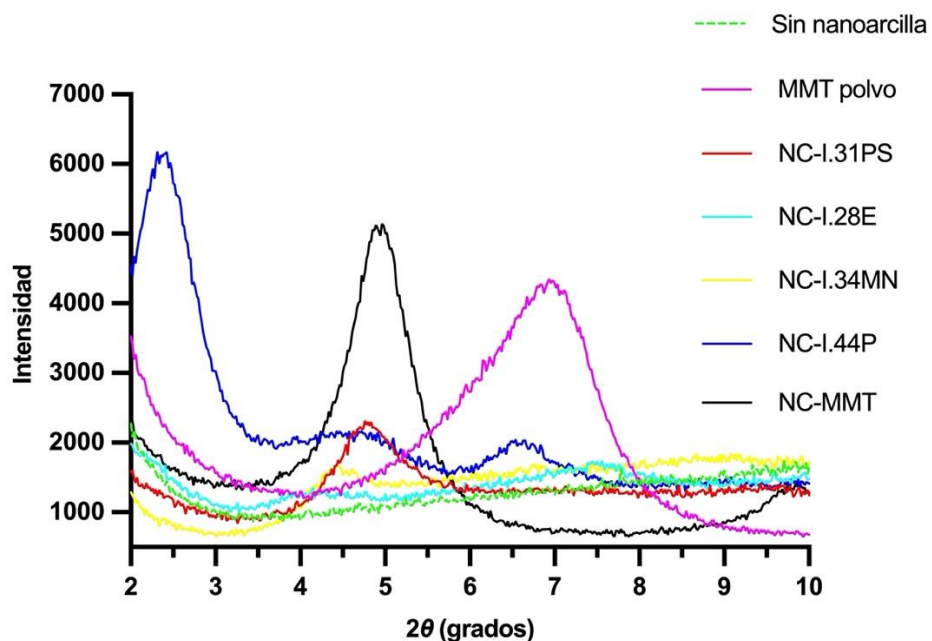


Figura 17. Difractograma de films de nanocompuestos tíomero/nanoarcilla con diferentes organomodificadores. Proporción 0.5/0.5 de tíomero/alginato de sodio y 5% nanoarcillas.

En la Figura 17 se observan los peaks de difracción para los nanocompuestos con diferentes organomodificadores en donde se distingue un notorio corrimiento hacia menores valores de 2θ . Para el nanocompuesto de MMT y I.31PS se obtiene un d_{001} de 18.1 y 18.4 nm respectivamente, lo que indica un grado importante de intercalación entre la matriz polimérica y la nanoarcilla. En el caso de la nanoarcilla I.44P el peak de difracción casi desaparece indicando un mayor grado de intercalación como un d_{001} de 36.4 nm. Para los nanocompuestos con I.34MN y I.28E el peak de difracción desaparece por tanto

se considera que han alcanzado un nivel importante de exfoliación ($d_{001} > 44.2$ nm).

5.5. Estudios reológicos de mucoadhesión *in vitro* de nanocompuestos a base de tiómero/nanoarcilla

Para evaluar las propiedades mucoadhesivas *in vitro* de los nanocompuestos se midieron las propiedades reológicas dinámicas de estos a lo largo del tiempo en contacto con mucina. En la Figura 18 se muestra el comportamiento de la viscosidad compleja con respecto al tiempo a medida que aumenta la cantidad de tiómero en la formulación de nanocompuestos. Se observa que la viscosidad puede aumentar hasta en 20 veces entre la formulación sin tiómero con respecto a las que tienen tiómero. Se observa claramente la tendencia del aumento de la viscosidad cuando se aumenta el porcentaje de tiómero en la formulación, lo que indicaría una mayor interacción del nanocompuesto con la mucina.

Este fenómeno también se observa al comparar el módulo de almacenamiento G' (porción elástica) con el módulo de pérdida G'' (porción viscosa). Los valores de G' están por encima de 4 veces su valor con respecto a G'' , lo que indica un mayor componente elástico que viscoso (Figura 19), lo cual se indicaría un mayor número de interacciones entre el nanocompuesto y la mucina, probablemente debido a la formación de enlaces disulfuro intermoleculares

entre las cadenas de los polímeros tiolados y la glucoproteína que se encuentra en la mucina.

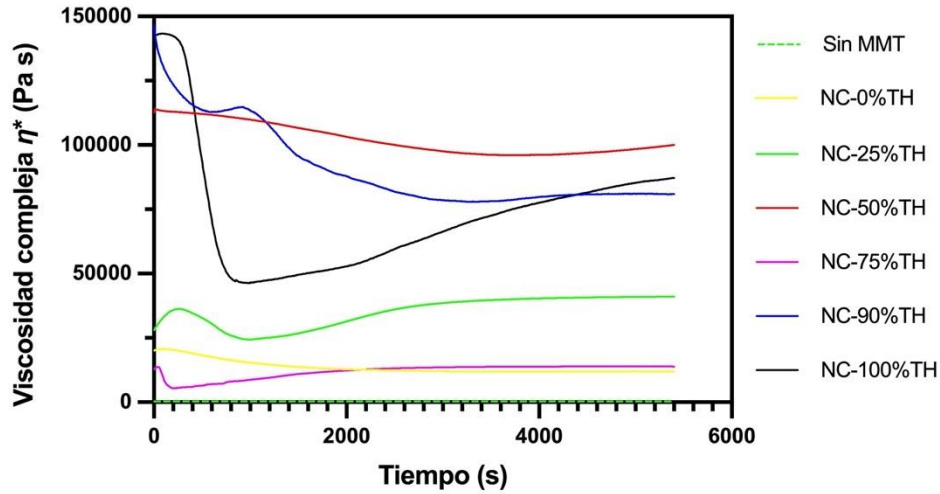


Figura 18. Viscosidad compleja (η^*) a lo largo del tiempo medida por análisis reológico de films de nanocompuestos en contacto con mucina. Evaluación de diferentes proporciones de tíohero/alginato sin modificar y utilizando MMT 5%.

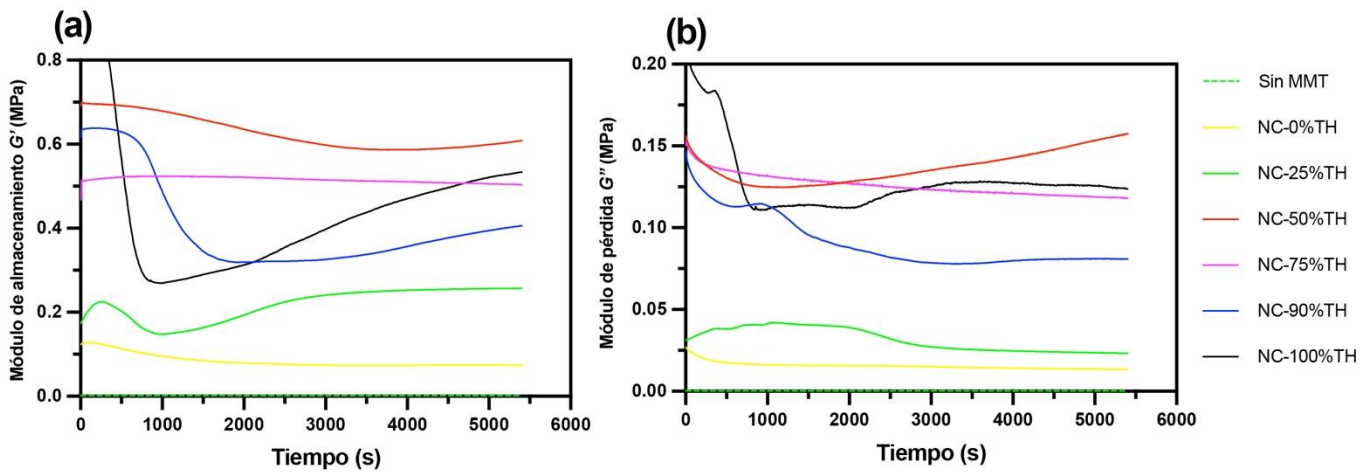


Figura 19. Análisis reológico de mucina en contacto con films de nanocompuestos con diferentes proporciones de tiómero/alginate sin modificar y MMT 5%. (a) Módulo elástico (G'), y (b) módulo viscoso (G'') a lo largo del tiempo.

El rol del tiómero en este comportamiento se condice con el aumento de G' a medida que aumenta el porcentaje de tiómero en la formulación. Estas observaciones fortalecen la aseveración de que los enlaces disulfuro aumentan potencialmente la capacidad mucoadhesiva del polímero (Davidovich-Pinhas et al., 2009).

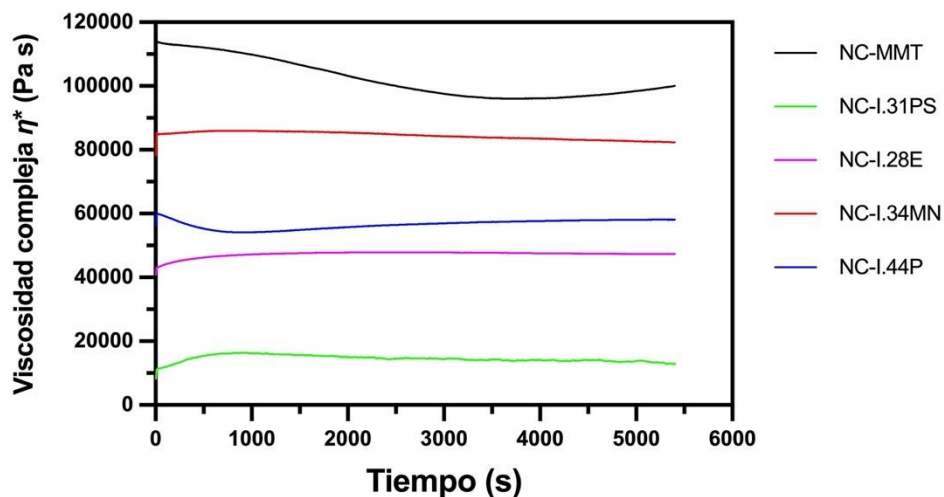


Figura 20. Viscosidad compleja (η^*) a lo largo del tiempo medida por análisis reológico de films de nanocompuestos en contacto con mucina. Evaluación de nanoarcilla con diferentes organomodificadores utilizando 0.5/0.5 de tiómero/alginate de sodio y MMT 5%.

Al momento de analizar el comportamiento reológico de nanocompuestos con una misma cantidad de tiómero, pero diferente organomodificador en la

nanoarcilla, se observa que la viscosidad compleja (Figura 20) muestra una relación estrecha con el nivel de intercalación/exfoliación presentado por los nanocompuestos con diferentes organomodificadores (Figura 17). Las formulaciones con I.28E y I.34MN que mostraron exfoliación en el análisis XRD también arrojan una alta viscosidad. En el caso de la formulación con I.31PS es la que muestra menor viscosidad, siendo también la que muestra menor corrimiento en el peak de difracción XRD. Todo esto indica que el grado de intercalación/exfoliación hace que se obtenga una matriz mas homogénea y reticulada que influye en las propiedades reológicas.

Por otra parte, en la Figura 21 también se observa que para todas las formulaciones, su módulo de almacenamiento G' (porción elástica) es mayor en comparación a su módulo de pérdida G'' (porción viscosa) lo que indica una buena interacción en la unión nanocompuesto-mucina.

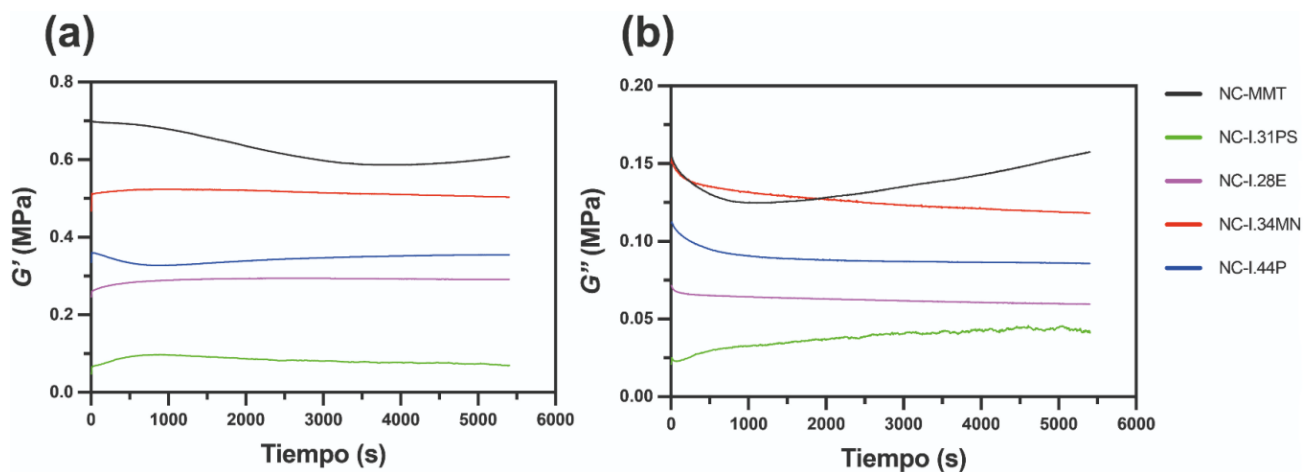


Figura 21. Análisis reológico de mucina en contacto con film de nanocompuestos con proporción 0.5/0.5 de tíoimero/alginate de sodio y MMT 5% con diferentes

organomodificadores. (a) Módulo elástico (G'), y (b) módulo viscoso (G'') a lo largo del tiempo.

5.6. Estudios de liberación de deltametrina desde nanocompuestos a base de tiómero/nanoarcilla

La liberación de deltametrina sigue una cinética de primer orden que alcanza el equilibrio para las distintas formulaciones aproximadamente a las 24 h. La difusión sigue un comportamiento de tipo fickiano, ya que los datos experimentales se ajustan a las ecuaciones de Cran, Crank y Kourwel descritas en la sección 4.7.

En la Figura 22 se observan los perfiles de liberación de deltametrina para formulaciones de nanocompuestos con diferentes concentraciones de MMT. La muestra sin MMT es la que presenta la más rápida liberación de deltametrina, mostrando una constante de velocidad total k_1 de $7.23 \pm 2.43 \text{ s}^{-1}$ (Tabla 2). Esto muestra la importancia de la presencia de nanoarcilla y el grado de reticulación de la matriz para provocar un aumento de retención de la droga por la intercalación polímero-MMT (Yan et al., 2016).

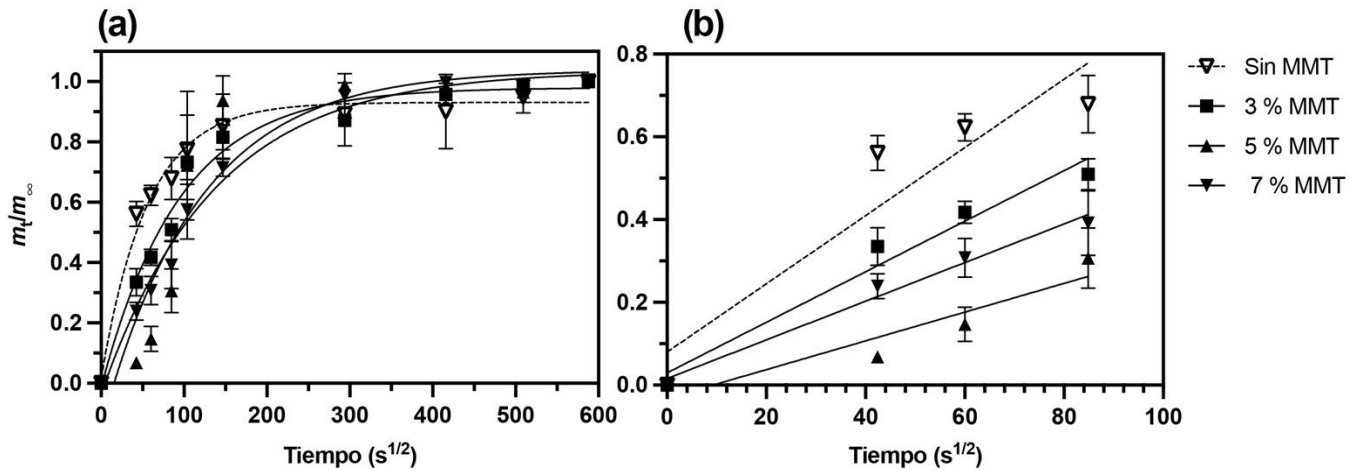


Figura 22. Gráfico m_t/m_∞ vs tiempo^{1/2} para la liberación de deltametrina desde films de nanocompuestos con diferente concentración de nanoarcilla ($n = 3$). (a) Gráfica para el set completo de datos con regresión exponencial ($R^2 > 0.8571$), (b) gráfica para liberación a corto plazo $m_t/m_\infty < 0.6$ con regresión lineal ($R^2 > 0.8098$).

Para las muestras con 3, 5, y 7% de MMT (Figura 22(b)) se ve una disminución de la pendiente, lo que indica un retardo en la liberación de la droga a medida que aumenta el % de MMT. Diversos estudios muestran que se requiere una cantidad muy pequeña de nanoarcillas para obtener nanocompuestos exfoliados lo que conduce a un crecimiento significativo de las propiedades mecánicas (Rafiee & Shahzadi, 2019), y cuando esta concentración de nanoarcilla supera un óptimo se producen aglomeraciones y tactoides que hacen que la homogeneidad y exfoliación disminuya. En el caso de la liberación de deltametrina, el máximo de retardo en la liberación se obtiene con 5% de nanoarcilla, y con un 7% ya se pierde eficiencia en el control (Figura 22(b)).

Esto también se aprecia al graficar la liberación a largo plazo (Figura 23) en donde la pendiente más pronunciada es la de la formulación con 5% MMT.

Tabla 2. Efecto de la concentración de montmorillonita (MMT) en los parámetros de liberación de deltametrina desde nanocompuestos de tiómero/nanoarcilla ($n = 3$).

Concentración de nanoarcilla	Constante de velocidad de difusión k_d $\times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	Coefficiente de difusión D $\times 10^{-14} \text{ (m}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$	Constante de velocidad total k_1 $\times 10^{-5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	Velocidad inicial de liberación v_0 $\times 10^{-7} \text{ (g s}^{-1}\text{)}$
Sin MMT	1.52 ± 1.13	3.98 ± 3.30	7.23 ± 2.43	2.18 ± 5.99
3% MMT	0.98 ± 0.32	6.93 ± 7.84	6.81 ± 1.43	7.60 ± 1.90
5% MMT	1.94 ± 1.98	3.84 ± 0.50	4.07 ± 2.14	6.96 ± 3.61
7% MMT	1.60 ± 0.90	7.84 ± 4.51	3.32 ± 2.14	5.36 ± 3.43

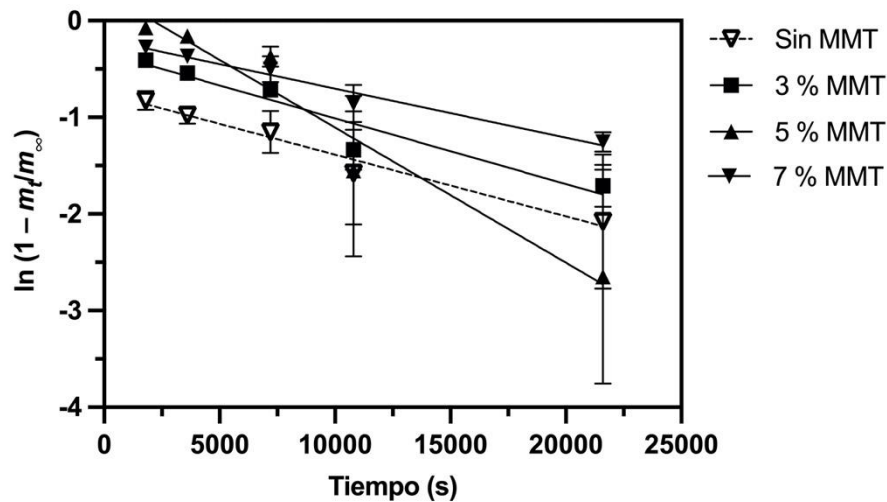


Figura 23. Gráfico $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ vs tiempo para la liberación de deltametrina a largo plazo (para $m_t/m_\infty > 0.6$) desde films de nanocompuestos con diferentes concentraciones de nanoarcilla ($n = 3$). Ajuste por regresión lineal ($R^2 > 0.6330$).

En la Figura 24 se observan los perfiles de liberación de deltametrina para formulaciones de nanocompuestos utilizando nanoarcillas con diferentes organomodificadores. La muestra con MMT sódica es la que presenta la más rápida liberación de deltametrina (Figura 24(a) y (b)), mostrando una constante de velocidad total k_1 de $4.07 \pm 2.14 \text{ s}^{-1}$ (Tabla 3).

Además se observa en la Figura 24(b) que las formulaciones con menor pendiente, o sea, con mayor control de liberación corresponden a las formulaciones que muestran exfoliación según en análisis de XRD (sección 5.4.2) las cuales corresponden a las nanoarcillas I.28E, I.34MN y I.44P. Estas formulaciones muestran además las menores constantes de velocidad total k_1 (Tabla 3). Este fenómeno puede deberse a la teoría de “vías tortuosas” en la matriz del nanocompuesto, en donde la droga tiene un camino más impedido para avanzar a lo largo de la matriz (Figura 6 y 26).

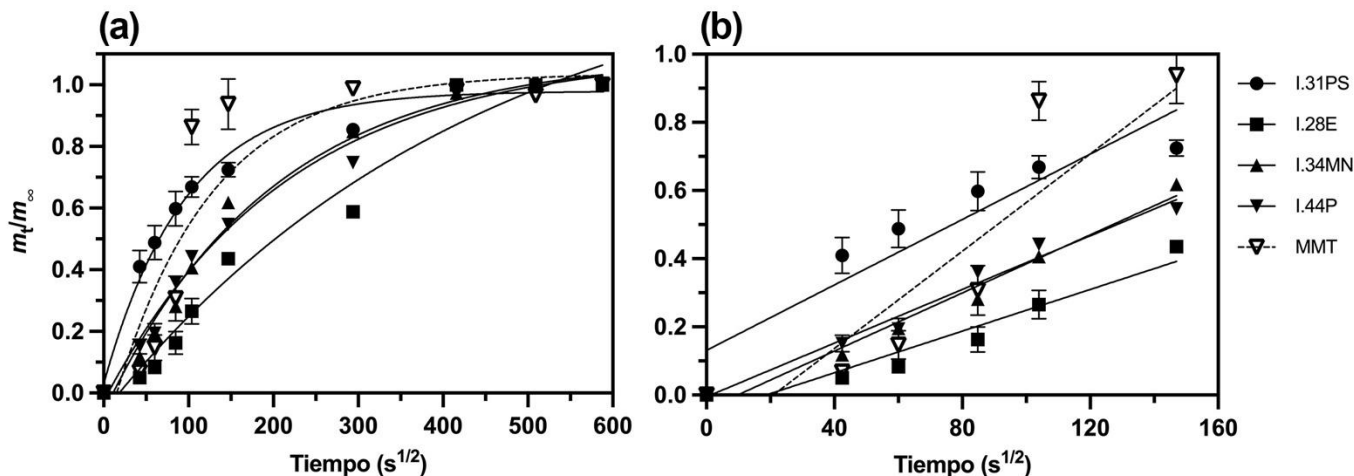


Figura 24. Gráfico m_t/m_∞ vs tiempo^{1/2} para la liberación de deltametrina desde films de nanocompuestos con diferentes organomodificadores ($n = 3$). (a) Gráfica para el set completo de datos con regresión exponencial ($R^2 > 0.8588$), (b) gráfica para liberación a corto plazo $m_t/m_\infty < 0.6$ con regresión lineal ($R^2 > 0.8325$).

Tabla 3. Efecto del tipo de organomodificador en la montmorillonita (MMT) sobre los parámetros de liberación de deltametrina desde nanocompuestos de tiómero/nanoarcilla ($n = 3$).

Tipo de nanoarcilla	Constante de velocidad de difusión k_d $\times 10^{-5} (\text{s}^{-1})$	Coefficiente de difusión D $\times 10^{-14} (\text{m}^2 \text{s}^{-1})$	Constante de velocidad total k_1 $\times 10^{-5} (\text{s}^{-1})$	Velocidad inicial de liberación v_0 $\times 10^{-7} (\text{g s}^{-1})$
MMT	1.94 ± 1.98	3.84 ± 0.50	4.07 ± 2.14	6.96 ± 3.61
I.31PS	1.16 ± 0.15	11.20 ± 2.46	3.72 ± 0.53	6.33 ± 0.95
I.28E	0.67 ± 0.07	12.70 ± 2.97	2.68 ± 0.17	2.30 ± 0.16
I.34MN	1.84 ± 0.39	16.20 ± 1.69	2.01 ± 0.30	2.86 ± 0.48
I.44P	0.76 ± 0.39	11.10 ± 1.82	3.20 ± 0.24	3.69 ± 0.24

Por otro lado, las nanoarcillas I.28E, I.34MN y I.44P (Figura 7) muestran los organomodificadores con mayores características apolares, lo cuales podrían retener la droga dentro de las galerías por tener mayor afinidad con ella (Figura 26), lo que puede estar representado en los valores de la constante de velocidad de difusión k_d , la cual se obtiene con los datos de la liberación a largo plazo (Tabla 3).

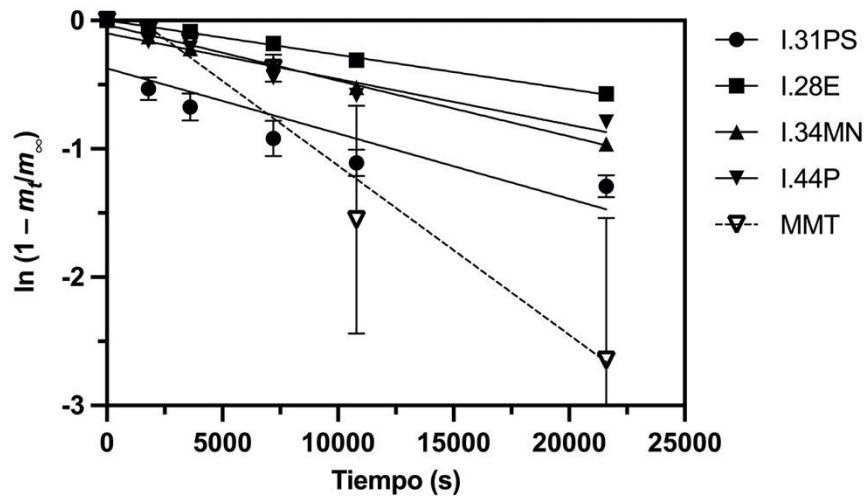


Figura 25. Gráfico $\ln(1 - m_t/m_\infty)$ vs tiempo para la liberación de deltametrina a largo plazo (para $m_t/m_\infty > 0.6$) desde films de nanocompuestos con diferentes organomodificadores ($n = 3$). Ajuste por regresión lineal ($R^2 > 0.7346$).

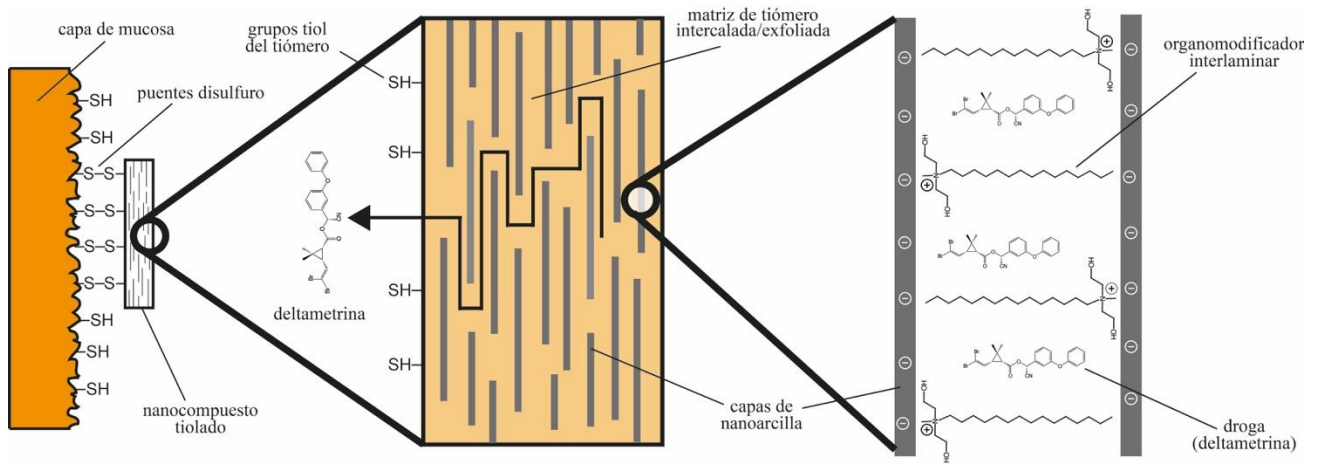


Figura 26. Representación hipotética del mecanismo de funcionamiento de un nanocompuesto mucoadhesivo a base de alginato tiolado/nanoarcilla con liberación controlada de drogas.

6. CONCLUSIONES

- Con la metodología empleada en esta investigación se logró modificar químicamente alginato utilizando L-cisteína obteniéndose un tiómero, el cual fue caracterizado por FTIR y análisis de tiol por UV-VIS.
- Los ensayos de cuantificación de grupos tiol y enlaces disulfuros indicaron que la L-cisteína adicionada al polímero fue inmovilizada en la cadena polimérica, mostrando una cantidad de enlaces tiol libres considerablemente mayor que la cantidad de grupos disulfuro.
- Se logró obtener nanocompuestos de alginato tiolado/nanoarcilla por método de *film casting* los cuales fueron caracterizados por XRD y TGA.
- Los análisis XRD en los nanocompuestos muestran la intercalación del alginato en las galerías de silicato desplazando el pico característico de MMT de $2\theta = 7.03^\circ$ a ángulos inferiores, incluso menores al mínimo detectable. Por otra parte, los análisis termogravimétricos muestran la estabilidad térmica que otorga la nanoarcilla en la matriz del biopolímero.
- Los estudios en reología *in vitro* utilizando mucina como simulador intestinal muestran un aumento significativo de interacciones entre el nanocompuesto y la mucina, lo cual va de la mano del aumentar la cantidad de

tiómero en la formulación, lo que se refleja en el aumento de la viscosidad y la gran diferencia entre G' y G'' .

- Los estudios de liberación de droga (deltametrina) realizados a los nanocompuestos muestran la importancia que tiene la presencia de la nanoarcilla al intercalarse en la matriz del polímero y crear una estructura exfoliada con mayor grado de dispersión que contribuyen a retardar la liberación de la droga.
- Si bien no fue posible realizar microscopia TEM para complementar los análisis morfológicos, se logró cuantificar la intercalación del alginato en las galerías del silicato obteniendo un producto exfoliado mediante XRD.
- Se pudo comprobar que el uso de diferentes organomodificadores en la nanoarcilla incide en el retardo de la liberación de la deltametrina, y eso se debe tanto a la naturaleza del organomodificador como al grado de intercalación/exfoliación que alcanza el nanocompuesto con esa nanoarcilla.

REFERENCIAS

- Abdollahi, M., Alboofetileh, M., Rezaei, M., & Behrooz, R. (2013). Comparing physico-mechanical and thermal properties of alginate nanocomposite films reinforced with organic and/or inorganic nanofillers [Article]. *Food Hydrocolloids*, 32(2), 416-424.
- Alboofetileh, M., Rezaei, M., Hosseini, H., & Abdollahi, M. (2014). EFFECT OF NANOCCLAY AND CROSS-LINKING DEGREE ON THE PROPERTIES OF ALGINATE-BASED NANOCOMPOSITE FILM [Article]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(4), 1622-1631.
- Bernkop-Schnurch, A. (2005). Thiomers: A new generation of mucoadhesive polymers [Review]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1569-1582.
- Bernkop-Schnurch, A., Kast, C. E., & Richter, M. F. (2001). Improvement in the mucoadhesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine [Article]. *Journal of Controlled Release*, 71(3), 277-285.
- Campos-Requena, V. H., & Gomez, S. (2018). Synthesis of thiomers: screening and optimization using chemometrics [Article]. *New Journal of Chemistry*, 42(6), 4670-4678.

- Campos-Requena, V. H., Rivas, B. L., Perez, M. A., Garrido-Miranda, K. A., & Pereira, E. D. (2015). Polymer/clay nanocomposite films as active packaging material: Modeling of antimicrobial release [Article]. *European Polymer Journal*, 71, 461-475.
- Campos-Requena, V. H., Rivas, B. L., Pérez, M. A., & Pereira, E. D. (2016). Short- and long-term loss of carvacrol from polymer/clay nanocomposite film – a chemometric approach. *Polymer International*, 65(5), 483-490.
- Chung, Y.-L., Ansari, S., Estevez, L., Hayrapetyan, S., Giannelis, E. P., & Lai, H.-M. (2010). Preparation and properties of biodegradable starch-clay nanocomposites [Article]. *Carbohydrate Polymers*, 79(2), 391-396.
- Cran, M. J., Rupika, L., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2010). Release of naturally derived antimicrobial agents from LDPE films. *Journal of food science*, 75(2), E126-E133.
- Crank, J. (1979). *The mathematics of diffusion*. Oxford university press.
- Davidovich-Pinhas, M., Harari, O., & Bianco-Peled, H. (2009). Evaluating the mucoadhesive properties of drug delivery systems based on hydrated thiolated alginate [Article]. *Journal of Controlled Release*, 136(1), 38-44.

- Draget, K. I., Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (2005). Alginates from Algae. In *Biopolymers Online*.
- Duggan, S., O'Donovan, O., Owens, E., Duggan, E., Hughes, H., & Cummins, W. (2016). Comparison of the mucoadhesive properties of thiolated polyacrylic acid to thiolated polyallylamine [Article]. *International Journal of Pharmaceutics*, 498(1-2), 245-253.
- Dutta, P. K., Ravikumar, M. N. V., & Dutta, J. (2002). CHITIN AND CHITOSAN FOR VERSATILE APPLICATIONS. *Journal of Macromolecular Science, Part C*, 42(3), 307-354.
- Farshi Azhar, F., Olad, A., & Mirmohseni, A. (2014). Development of novel hybrid nanocomposites based on natural biodegradable polymer–montmorillonite/polyaniline: preparation and characterization. *Polymer Bulletin*, 71(7), 1591-1610.
- Iqbal, J., Sarti, F., Perera, G., & Bernkop-Schnürch, A. (2011). Development and in vivo evaluation of an oral drug delivery system for paclitaxel. *Biomaterials*, 32(1), 170-175.

- Iqbal, J., Shahnaz, G., Duennhaupt, S., Mueller, C., Hintzen, F., & Bernkop-Schnuerch, A. (2012). Preactivated thiomers as mucoadhesive polymers for drug delivery [Article]. *Biomaterials*, 33(5), 1528-1535.
- Kevadiya, B. D., Joshi, G. V., Patel, H. A., Ingole, P. G., Mody, H. M., & Bajaj, H. C. (2009). Montmorillonite-Alginate Nanocomposites as a Drug Delivery System: Intercalation and In Vitro Release of Vitamin B1 and Vitamin B6. *Journal of Biomaterials Applications*, 25(2), 161-177.
- Khutoryanskiy, V. V. (2011). Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers *Macromolecular Bioscience*, 11(6), 748-764.
- Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Sonneveld, K., Miltz, J., & Bigger, S. W. (2013). Migration of antimicrobial agents from starch-based films into a food simulant. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 432-438.
- Leitner, V. M., Walker, G. F., & Bernkop-Schnurch, A. (2003). Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins [Article]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56(2), 207-214.

- Naveen, N. R., Gopinath, C., & Rao, D. S. (2018). A spotlight on thiolated natural polymers and their relevance in mucoadhesive drug delivery system [Review]. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 47-52.
- Patel, H. A., Somani, R. S., Bajaj, H. C., & Jasra, R. V. (2006). Nanoclays for polymer nanocomposites, paints, inks, greases and cosmetics formulations, drug delivery vehicle and waste water treatment [Article]. *Bulletin of Materials Science*, 29(2), 133-145.
- Paul, D. R., & Robeson, L. M. (2008). Polymer nanotechnology: Nanocomposites [Review]. *Polymer*, 49(15), 3187-3204.
- Pavlidou, S., & Papaspyrides, C. D. (2008). A review on polymer-layered silicate nanocomposites [Review]. *Progress in Polymer Science*, 33(12), 1119-1198.
- Rafiee, R., & Shahzadi, R. (2019). Mechanical Properties of Nanoclay and Nanoclay Reinforced Polymers: A Review [Review]. *Polymer Composites*, 40(2), 431-445.
- Rhim, J.-W., Park, H.-M., & Ha, C.-S. (2013). Bio-nanocomposites for food packaging applications [Review]. *Progress in Polymer Science*, 38(10-11), 1629-1652.

- Sionkowska, A. (2011). Current research on the blends of natural and synthetic polymers as new biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science*, 36(9), 1254-1276.
- Su, X., & Chen, B. (2018). Transparent, UV-proof and mechanically strong montmorillonite/alginate/Ca²⁺ nanocomposite hydrogel films with solvent sensitivity [Article]. *Applied Clay Science*, 165, 223-233.
- Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (2002). Alginate in Drug Delivery Systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6), 621-630.
- Vasco Calle, D. A., Chen, D., & Acevedo Cabello, J. (2016). Computational simulation of laminar heat convection of nanofluids in a circular tube and squared duct. *DYNA*, 83(196), 113-118.
- Yan, H., Chen, X., Feng, Y., Xiang, F., Li, J., Shi, Z., Wang, X., & Lin, Q. (2016). Modification of montmorillonite by ball-milling method for immobilization and delivery of acetamiprid based on alginate/exfoliated montmorillonite nanocomposite [Article]. *Polymer Bulletin*, 73(4), 1185-1206.
- Yang, J.-P., Yang, G., Xu, G., & Fu, S.-Y. (2007). Cryogenic mechanical behaviors of MMT/epoxy nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 67(14), 2934-2940.

Yang, J.-S., Xie, Y.-J., & He, W. (2011). Research progress on chemical modification of alginate: A review. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 33-39.

Zheng, J. P., Luan, L., Wang, H. Y., Xi, L. F., & Yao, K. D. (2007). Study on ibuprofen/montmorillonite intercalation composites as drug release system. *Applied Clay Science*, 36(4), 297-301.

