



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN COMPOSITO
MONTMORILLONITA/MICROPARTÍCULAS CON ACCIÓN COMBINADA PARA
REDUCCIÓN DE COLESTEROL**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. EN C. PERLA GARCÍA GUZMÁN

DR. OCTAVIO MANERO BRITO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MATERIALES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. NOVIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (No. 240051)

Al Programa de posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM

Al Dr. Octavio Manero Brito

Al Dr. Luis Medina Torres

Al Dr. Fausto Calderas

A los miembros del comité tutor Dra. María Josefa Bernad Bernad y Dr. David Quintanar Guerrero

Al Dr. José Correa Basurto (Escuela superior de medicina, IPN)

A la Dra. Xelhua Marcos

A los miembros del jurado

DEDICATORIA

Porque de tal manera amó Dios al mundo, que ha dado a su Hijo unigénito, para que todo aquel que en él cree, no se pierda, más tenga vida eterna. Porque no envió Dios a su Hijo al mundo para condenar al mundo, sino para que el mundo sea salvo por él. Juan 3:16-17

“El primer sorbo de la copa de la ciencia te vuelve ateo, pero en el fondo del vaso Dios te está esperando”. Werner Heisenberg

A mi Padre Dios y a mi señor Jesús, la luz de este mundo, por darme la fe, esperanza, amor, propósito, perdón y la salvación.

A mi esposo Luis Ángel por acompañarme cada día con amor, apoyo y comprensión.

A mi padre Adolfo, hermanos, sobrinos y al hermoso recuerdo de mi madre Leticia Benita.

A la Dra. Josefa Bernad y Dr. Jesús Gracia por su apoyo incondicional y amistad.

Al Dr. Luis Medina por su apoyo y dirección.

A mis colegas y amigos que trabajaron junto a mí enriqueciendo cada vez más este proyecto: Alfredo, Yutzine, Jesica, Rebeca, Arturo y Sharon.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de farmacia y L100 de inorgánica.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero

VOCAL: Dr. David Quintanar Guerrero

VOCAL: Dr. Emilio Bucio Carrillo

VOCAL: Dra. Luz María Melgoza Contreras

SECRETARIO: Dr. Rene Miranda Ruvalcaba

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO

Laboratorio de reología, Instituto de investigaciones en materiales, UNAM

*Laboratorio de sistemas de liberación de fármacos, Facultad de química,
UNAM*

*Laboratorio de modelado molecular, bioinformática y diseño de fármacos,
Escuela superior de medicina, IPN*

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

XXXVII Encuentro nacional de la academia mexicana de investigación y docencia en ingeniería química (AMIDIQ), 3-6 de mayo de 2016, Puerto Vallarta, Jalisco, México, ***“Estudio de la interacción fisicoquímica del colesterol con arcillas”***.

XXXIX Encuentro nacional de la academia mexicana de investigación y docencia en ingeniería química (AMIDIQ), 1-4 de mayo de 2018, San José del Cabo, Baja California sur, México, ***“Caracterización de micropartículas híbridas/compositos de arcilla montmorillonita para liberación controlada de atorvastatina”***.

XXXI Congreso nacional de la sociedad polimérica de México (SPM), 14-18 de octubre de 2018 Puebla, Puebla, México, ***“Rheology and characterization of hybrid microparticles/Montmorillonite composite with raspberry-like morphology for Atorvastatin controlled release”***.

PUBLICACIONES

P. Garcia-Guzman, L. Medina-Torres, F. Calderas, M.J. Bernad-Bernad, J. Gracia-Mora, B. Mena, O. Manero, ***Characterization of hybrid microparticles/Montmorillonite composite with raspberry-like morphology for Atorvastatin controlled release***, Colloids Surf. B. Biointerfaces. 167 (2018) 397–406.

ÍNDICE GENERAL

Índice de ecuaciones.....	III
Índice de figuras.....	IV
Índice de tablas.....	VI
ABSTRACT	1
RESUMEN	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES	7
2.1 El colesterol y su metabolismo	7
2.2 Inhibición de la síntesis de colesterol.....	11
2.3 Inhibición de absorción intestinal de colesterol	12
2.4 Liberación controlada de fármacos	14
2.5 Acarreadores híbridos lípido-polímero	15
2.6 Materiales compuestos (compositos).....	20
2.7 Propiedades reológicas de las arcillas.....	30
2.8 Adsorción en arcillas.....	32
2.9 Isotermas de adsorción.....	33
2.9.1 Isoterma de Langmuir.....	33
2.9.2 Isoterma de Freundlich	34
2.10 Mucoadhesión.....	35
III. JUSTIFICACIÓN.....	38
IV. HIPÓTESIS	38
V. OBJETIVOS.....	39
5.1 Objetivo general.....	39
5.2 Objetivos particulares	39
VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	41
6.1 Materiales	41
6.2 Caracterización de montmorillonitas (MMT) y bentonitas (BEN).....	41
6.2.1 Tamaño de partícula y potencial Z (ξ).....	41
6.2.2 Determinación de capacidad de intercambio catiónico (CIC)	41
6.2.3 Determinación de área superficial BET (S_{BET}) y porosidad.....	42
6.2.4 Espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).....	42
6.2.5 Difracción de rayos X de polvos (XRD)	43

6.2.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	43
6.2.7 Isotherma de adsorción de azul de metileno (AM).....	43
6.2.8 Isotherma de adsorción de colesterol.....	44
6.3 Preparación de micropartículas híbridas lípido-polímero (MP).....	44
6.4 Preparación del material compuesto micropartículas híbridas/ montmorillonita (MP/MMT).....	46
6.5 Caracterización de las micropartículas híbridas (MP) y material compuesto (MP/MMT)	46
6.5.1 Determinación de la eficiencia de entrappe (%) de MP	46
6.5.2 Tamaño de partícula y potencial Zeta (ξ).....	47
6.5.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	47
6.5.4 Difracción de rayos X de polvos (XRD)	47
6.5.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	48
6.5.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	48
6.6 Caracterización reológica.....	48
6.7 Estudios de liberación de <i>in vitro</i>	49
6.8 Evaluación de citotoxicidad	51
6.9 Evaluación de mucoadhesión.....	52
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
7.1 Caracterización de montmorillonita (MMT) y bentonita (BEN).....	53
7.1.1 Isotherma de adsorción de azul de metileno (AM).....	60
7.1.2 Isotherma de adsorción de colesterol.....	62
7.2 Preparación y caracterización de micropartículas híbridas lípido-polímero (MP).....	65
7.2.1 Eficiencia de entrappe de MP (%)	70
7.3 Preparación y caracterización del material compuesto micropartículas híbridas/ montmorillonita (MP/MMT).....	71
7.3.1 Determinación de potencial Zeta (ξ) en función del pH.....	71
7.3.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)	73
7.3.3 Difracción de rayos X de polvos (XRD)	74
7.3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	77
7.3.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	78
7.4 Caracterización reológica.....	79
7.5 Estudios de liberación <i>in vitro</i>	84
7.6 Evaluación de citotoxicidad	87
7.7 Evaluación de mucoadhesión.....	91

VIII. CONCLUSIONES	96
IX. REFERENCIAS	97
X. ANEXOS.....	103
ANEXO I. CARACTERIZACIÓN DE ARCILLAS MONTMORILLONITAS Y BENTONITAS	104
ANEXO II. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MP.....	128
ANEXO III. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MP/MMT	132
ANEXO IV. PERFILES DE LIBERACIÓN.....	133
ANEXO V. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD	141
ANEXO VI. PUBLICACIÓN	147

Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Ley de Bragg	25
Ecuación 2. Viscosidad.....	30
Ecuación 3. Módulo complejo (G^*)	31
Ecuación 4. Módulo elástico (G'), ecuación 5.módulo viscoso (G'') y ecuación 6. módulo complejo (G^*) en función de G' y G''	31
Ecuación 7. Modelo de Langmuir	33
Ecuación 8. Linearización del modelo de Langmuir.....	34
Ecuación 9. Factor de separación o parámetro de equilibrio.....	34
Ecuación 10. Modelo de Freundlich.....	34
Ecuación 11. Linearización del modelo de Freundlich.....	35
Ecuación 12. Sinergismo reológico en función de G' y Ecuación 13. Sinergismo reológico en función de G''	37
Ecuación 14. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	42
Ecuación 15. Capacidad de adsorción al equilibrio	44
Ecuación 16. Eficiencia de entrapamiento.....	47
Ecuación 17. Modelo de Korsmeyer-Peppas	50
Ecuación 18. Viabilidad celular	51

Índice de figuras

Figura 1. Principales causas de muerte en el mundo (OMS, 2016) [1].....	3
Figura 2. Incidencia de EC en el mundo de acuerdo a la OMS 2016(OMS, 2016) [1]	3
Figura 3. Placa de ateroma en arterias del corazón [2]	4
Figura 4. Composición y estructura de una lipoproteína y relación en tamaño vs densidad [16]	7
Figura 5. Homeostasis del colesterol en el organismo. HDL=lipoproteínas de alta densidad, rLDL=receptor para lipoproteínas de baja densidad (LDL), QM= quilomicrones, VLDL=lipoproteínas de muy baja densidad [17]	8
Figura 6. Biosíntesis de Colesterol [18].....	9
Figura 7. Proceso de absorción intestinal de colesterol (fase luminal, mucosa e intracelular). ACAT=acil coenzima A-colesterol acil transferasa, apo=apolipoproteína, MTP=proteína de transferencia de triglicéridos microsomales, NPC1L1=Niemann-Pick C1-like proteína, QM=quilomicrones, TG=Triglicéridos [19]	10
Figura 8. Estructura de atorvastatina [20].....	11
Figura 9. Estructura química de la ezetimiba [29].....	14
Figura 10. Estructura general de partículas híbridas lípido-polímero [34]	16
Figura 11. Partículas híbridas lípido-polímero a base de liposomas recubiertos por polímeros[10].....	17
Figura 12. Métodos de preparación de partículas híbridas lípido polímero (a) método en dos pasos (b) método en un solo paso [33].....	18
Figura 13. Estructura y tipos gelatina y su obtención a partir del colágeno[37]	19
Figura 14. Estrategias de formación de materiales compuestos a base de polímeros y partículas inorgánicas [32]	22
Figura 15. Mecanismos de formación de materiales compuestos por interacciones electrostáticas [32].....	23
Figura 16. Método de heterocoagulación por interacciones electrostáticas [32].....	23
Figura 17. Estructuras de materiales compuestos arcilla-polímeros [44].....	24
Figura 18. Métodos de preparación de materiales compuestos a base de arcilla y polímeros A- Intercalación-adsorción de polímeros a partir de una solución, B- Intercalación de polímeros a partir de fusión, C- Intercalación por polimerización in situ [45]	26
Figura 19. Estructuras de materiales compuestos a base de acarreadores y arcillas [46]	26
Figura 20. Estructura de una montmorillonita [50].....	28
Figura 21. Asociaciones de partículas de arcilla: A-dispersas, B-cara a cara (FF), C-borde a cara (EF) y D-borde a borde (EE) [50].....	29
Figura 22. Influencia del pH en las interacciones borde-cara (EF) [50]	29
Figura 23. Tipos de fluidos.....	30
Figura 24. Método de bolsa de diálisis.....	50
Figura 25. Difractogramas de arcillas BEN y MMT	57
Figura 26. Espectros de FT-IR de arcillas BEN y MMT	58
Figura 27. Micrografías de SEM de MMT Nanoclay® (a-b), MMT K30® (c-d), MMT K10® (e-f),	59
Figura 28. Estructura de azul de metileno (AM).....	60
Figura 29. Gráfica de ajuste de adsorción de AM a ecuación lineal de Langmuir	62

Figura 30. Gráfica de ajuste a ecuación lineal del modelo de Freundlich de adsorción de colesterol.....	64
Figura 31. Respuesta de tamaño de partícula y PDI de MP para el diseño Taguchi.....	67
Figura 32. Respuesta de potencial Z de MP para el diseño Taguchi	68
Figura 33. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para tamaño de partícula y PDI de MP	69
Figura 34. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para potencial Z de MP	70
Figura 35. Gráfica de potencial Z en función del pH de MP y MMT.....	72
Figura 36. Espectroscopía FT-IR de los sistemas preparados MP, material compuesto MP/MMT y componentes individuales.....	74
Figura 37. Difractogramas de MMT y MP/MMT	75
Figura 38. Efecto del pH en la preparación de MP/MMT	76
Figura 39. Micrografías en SEM de MP (a), MP/MMT pH=3.0 (b-c) y MP/MMT pH=7.0 (d)	78
Figura 40. Termogramas de DSC de MP, MP/MMT y AC	79
Figura 41. Efecto del pH en la viscosidad de las MP, prueba de cizalla simple a diferentes valores de pH (3.0, 4.8 y 7.0).....	80
Figura 42. Efecto del pH en la viscosidad compleja del material compuesto MP/MMT a diferentes valores de pH (3.0, 4.8 y 7.0).....	81
Figura 43. Estructura “house of cards” o casa de naipes formada por asociaciones de la arcilla	81
Figura 44. Efecto del pH en G’ del material compuesto MP/MMT a diferentes valores de pH (3.0, 4.8 y 7.0).....	83
Figura 45. Caracterización reológica de MP y MP/MMT en función del pH en cizalla oscilatoria	83
Figura 46. Perfiles de liberación y ajuste a modelo Korsmeyer-Peppas para MP y MP/MMT en FAS (a) y FED (b).....	86
Figura 47. Conversión de MTT en formazán	87
Figura 48. Gráficas de viabilidad celular a diferentes concentraciones en 24 h de MMT(a), MP (b) y MP/MMT (c).....	88
Figura 49. Células NIH3T3T3 fibroblastos con MMT (A-control, B-0.252, C-1.20, D-2.52, E-8.064, F-16.128, G-24.192, H-60.48, I-141.12, J-241.92, K-2400, L-4850 µg/mL)	89
Figura 50. Células NIH3T3T3 fibroblastos con MP (A-control, B-0.5, C-2.4, D-5.0, E-16.1, F-32.3, G-48.4, H-121.0, I-282.2, J-483.8, K-4800, L-9700 µg/mL)	90
Figura 51. Células NIH3T3T3 fibroblastos con MP/MMT composito (A-control, B-0.71, C-3.39, D-7.06, E-22.58, F-45.16, G-67.4, H-169.34, I-395.14, J-677.38, K-6720, L-13580 µg/mL	90
Figura 52. Efecto de pH en potencial Z de muestras para mucoadhesión.....	92
Figura 53. Evaluación de las propiedades viscoelásticas en la interacción con mucina	95
Figura 54. Difractograma de MMT Nanoclay.....	105
Figura 55. Difractogramas de (a) MMT K30 (b) MMT K10(c) BEN-AC (d) BEN-LYS	106
Figura 56. Modelo ajustado a regresión lineal para azul de metileno (n=3)	107
Figura 57. Ajuste adsorción de AM-MMT Nanoclay a modelo lineal de Langmuir (n=3)	108
Figura 58. Ajuste adsorción de AM-MMT K30 a modelo lineal de Langmuir (n=3).....	109
Figura 59. Ajuste adsorción de AM-MMT K10 a modelo lineal de Langmuir (n=3).....	110
Figura 60 Ajuste adsorción de AM-MMT BEN-AC a modelo lineal de Langmuir (n=3).....	111
Figura 61. Ajuste adsorción de AM- BEN-LYS a modelo lineal de Langmuir (n=3)	112

Figura 62. Ajuste adsorción de AM- MMT Nanoclay a modelo lineal de Freundlich (n=3).....	114
Figura 63. Ajuste adsorción de AM- MMT K30 a modelo lineal de Freundlich (n=3)	115
Figura 64. Ajuste adsorción de AM- MMT K10 a modelo lineal de Freundlich (n=3)	116
Figura 65. Ajuste adsorción de AM- BEN-AC a modelo lineal de Freundlich (n=3)	117
Figura 66. Ajuste adsorción de AM- BEN-LYS a modelo lineal de Freundlich (n=3)	118
Figura 67. Modelo ajustado a regresión lineal para colesterol (n=3).....	119
Figura 68. Ajuste adsorción de colesterol -MMT Nanoclay a modelo lineal de Langmuir (n=3)	121
Figura 69. Ajuste adsorción de colesterol -MMT K30 a modelo lineal de Langmuir (n=3)	122
Figura 70. Ajuste adsorción de colesterol -MMT K10 a modelo lineal de Langmuir (n=3)	123
Figura 71. Ajuste adsorción de colesterol -MMT Nanoclay a modelo lineal de Freundlich (n=3)	125
Figura 72. Ajuste adsorción de colesterol -MMT K30 a modelo lineal de Freundlich (n=3)...	126
Figura 73. Ajuste adsorción de colesterol -MMT K10 a modelo lineal de Freundlich (n=3)..	126
Figura 74. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en metanol (n=3).	131
Figura 75. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en buffer pH 1.6 (n=3)	133
Figura 76. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en buffer pH 5.0 (n=3)	134
Figura 77. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en buffer pH 5.8 (n=3)	134
Figura 78. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en buffer pH 6.5 (n=3)	135
Figura 79. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en buffer pH 7.0 (n=3)	136
Figura 80. Gráfica de medias de % liberados.....	139
Figura 81. Modelo ajustado a regresión lineal (n=12) para MMT 24 h.....	143
Figura 82. Modelo ajustado a regresión lineal (n=12) para MP 24 h.....	144
Figura 83. Modelo ajustado a regresión lineal (n=12) para AT/MP/MMT 24 h.....	145

Índice de tablas

Tabla 1. Tipos y composición de lipoproteínas	8
Tabla 2. Niveles de factores para arreglo ortogonal L8 2x6	45
Tabla 3. Arreglo ortogonal L8 2x6	45
Tabla 4. Condiciones de pH para medio de liberación	49
Tabla 5. Arcillas MMT y bentonitas caracterizadas para selección.....	53
Tabla 6. Caracterización de arcillas MMT y BEN	54
Tabla 7. Caracterización de arcillas mediante método de BET.....	55
Tabla 8. Ajuste y parámetros de modelos de Langmuir y Freundlich para adsorción de AM ...	61
Tabla 9. Ajuste y parámetros de modelos de Langmuir y Freundlich para adsorción de colesterol.....	64
Tabla 10. Variables de respuesta para el diseño de experimentos.....	67

Tabla 11. Optimización de respuestas para la preparación de MP	70
Tabla 12. Potencial Z de MP y MMT en función del pH	72
Tabla 13. Desplazamiento de ángulo 2θ y apertura del espacio basal (d) en función del pH....	76
Tabla 14. Liberación acumulada de atorvastatina (%) y parámetros de ajuste a modelo Korsmeyer-Peppas (* FAS y ** FED diferencia significativa ($p < 0.05$))	86
Tabla 15. Sinergismo Reológico en función del pH.....	94
Tabla 16. Resultados de tamaño de partícula, PDI y potencial Z (n=3) para cada arcilla.....	104
Tabla 17. Resultados de determinación de CIC con AM.....	104
Tabla 18. Bandas de FT-IR para arcillas.....	104
Tabla 19. Principales picos en XRD	105
Tabla 20. Curvas de calibración de azul de metileno (n=3)	107
Tabla 21. ANOVA de calibración de azul de metileno.....	107
Tabla 22. Absorbancias para adsorción de AM con arcillas MMT y bentonitas.....	108
Tabla 23. Adsorción de AM con arcilla MMT Nanoclay (n=3).....	108
Tabla 24. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir adsorción AM-MMT Nanoclay	109
Tabla 25. Adsorción de AM con arcilla MMT K30 (n=3).....	109
Tabla 26. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir adsorción AM-MMT K30	110
Tabla 27. Adsorción de AM con arcilla MMT K10 (n=3).....	110
Tabla 28. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir adsorción AM-MMT K10	110
Tabla 29. Adsorción de AM con arcilla BEN-AC (n=3).....	111
Tabla 30. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir adsorción AM-BEN-AC.....	111
Tabla 31. Adsorción de AM con arcilla BEN-LYS (n=3).....	112
Tabla 32. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir adsorción AM-BEN-LYS.....	112
Tabla 33. Parámetros de ajuste a modelo lineal de Langmuir (n=3)	113
Tabla 34. Calculo de R_L	113
Tabla 35. Adsorción de AM con arcilla MMT Nanoclay (n=3)	113
Tabla 36. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich adsorción AM-MMT Nanoclay.....	114
Tabla 37. Adsorción de AM con arcilla MMT K30 (n=3).....	114
Tabla 38. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich adsorción AM-MMT K30.....	115
Tabla 39. Adsorción de AM con arcilla MMT K10 (n=3).....	115
Tabla 40. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich adsorción AM-MMT K10.....	116
Tabla 41. Adsorción de AM con arcilla BEN-AC (n=3).....	116
Tabla 42. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich adsorción AM-BEN-AC.....	117
Tabla 43. Adsorción de AM con arcilla BEN-LYS (n=3).....	117
Tabla 44. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich adsorción AM-BEN-LYS.....	118
Tabla 45. Parámetros de ajuste a modelo lineal Freundlich (n=3).....	118
Tabla 46. Curvas de calibración de colesterol (n=3).....	119
Tabla 47. Parámetros de ajuste de curva de calibración de colesterol	119
Tabla 48. ANOVA de curva de calibración de colesterol.....	119
Tabla 49. Áreas para adsorción de colesterol con arcillas MMT	120
Tabla 50. Adsorción de colesterol con arcilla MMT Nanoclay (n=3).....	120
Tabla 51. Parámetros de ajuste de MMT Nanoclay.....	121
Tabla 52. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir MMT Nanoclay	121
Tabla 53. Adsorción de colesterol con arcilla MMT K30 (n=3)	121
Tabla 54. Parámetros de ajuste de MMT K30	122
Tabla 55. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir MMT K10	122

Tabla 56. Adsorción de colesterol con arcilla MMT K10 (n=3)	122
Tabla 57. Parámetros de ajuste de MMT K10	123
Tabla 58. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir MMT K10	123
Tabla 59. Parámetros de ajuste a modelo lineal de Langmuir (n=3)	123
Tabla 60. Determinación de RL para arcilla Nanoclay, MMT K30 y MMT K10	124
Tabla 61. Adsorción de AM con arcilla MMT Nanoclay (n=3)	124
Tabla 62. Parámetros de ajuste de MMT Nanoclay.....	125
Tabla 63. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich MMT Nanoclay	125
Tabla 64. Adsorción de AM con arcilla MMT K30 (n=3).....	125
Tabla 65. Parámetros de ajuste de MMT K30	126
Tabla 66. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich MMT K30.....	126
Tabla 67. Adsorción de AM con arcilla MMT K10 (n=3).....	126
Tabla 68. Parámetros de ajuste de MMT K10	127
Tabla 69. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich MMT K10.....	127
Tabla 70. Parámetros de ajuste a modelo lineal Freundlich (n=3).....	127
Tabla 71. Diseño de experimentos Taguchi L82x6.....	128
Tabla 72. Resultados de los 8 experimentos Taguchi.....	128
Tabla 73. ANOVA para tamaño (nm) (n=6).....	129
Tabla 74. ANOVA para PDI (nm) (n=6).....	129
Tabla 75. ANOVA para potencial Zeta (nm) (n=6)	130
Tabla 76. Optimización de las respuestas.....	130
Tabla 77. Factores establecidos óptimos.....	130
Tabla 78. Curva de calibración de atorvastatina cálcica en metanol (n=3).....	131
Tabla 79. ANOVA de atorvastatina cálcica en metanol (n=3).....	131
Tabla 80. Parámetro de ajuste a regresión lineal simple de atorvastatina cálcica en metanol (n=3)	131
Tabla 81. Tabla. determinación de EE de MP (n=3)	131
Tabla 82. Determinación de potencial z de MP y MMT en función de pH.....	132
Tabla 83. Determinación de tamaño de partícula y PDI de MP y MP/MMT.....	132
Tabla 84. Curvas de calibración de atorvastatina cálcica en buffer pH 1.6 (n=3).....	133
Tabla 85. ANOVA de atorvastatina cálcica en buffer pH 1.6 (n=3).....	133
Tabla 86. Curvas de calibración de atorvastatina cálcica en buffer pH 5.0 (n=3).....	133
Tabla 87. ANOVA de atorvastatina cálcica en buffer pH 5.0 (n=3).....	134
Tabla 88. Curvas de calibración de atorvastatina cálcica en buffer pH 5.8 (n=3).....	134
Tabla 89. ANOVA de atorvastatina cálcica en buffer pH 5.8 (n=3)	135
Tabla 90. Curvas de calibración de atorvastatina cálcica en buffer pH 6.5 (n=3).....	135
Tabla 91. ANOVA de atorvastatina cálcica en buffer pH 6.5 (n=3).....	135
Tabla 92. Curvas de calibración de atorvastatina cálcica en buffer pH 7.0 (n=3).....	136
Tabla 93. ANOVA de atorvastatina cálcica en buffer pH 7.0 (n=3).....	136
Tabla 94. Parámetro de ajuste a regresión lineal simple de atorvastatina cálcica en soluciones buffer a diferentes valores de pH.....	136
Tabla 95. Perfil de liberación de micropartículas (MP) FAS (n=3)	137
Tabla 96. Perfil de liberación de micropartículas (MP) FED (n=4).....	137
Tabla 97. Perfil de liberación de material compuesto (MP/MMT) FAS (n=3)	138
Tabla 98. Perfil de liberación de material compuesto (MP/MMT) FED (n=3).....	138
Tabla 99. Resumen perfiles de liberación FAS y FED	138

Tabla 100. ANOVA entre sistemas y medios.....	139
Tabla 101. Método: 95.0 porcentaje LSD entre sistemas y medios.....	139
Tabla 102. Ajuste a modelo de Korsmeyer-Peppas de MP y MP/MTT en condiciones FAS y FED	140
Tabla 103. Resultados de viabilidad celular para MP 24 h.....	141
Tabla 104. Resultados de viabilidad celular para MMT 24 h.....	141
Tabla 105. Resultados de viabilidad celular para MP/MMT 24 H.....	142
Tabla 106. Determinación de IC50 de MMT 24 h.....	143
Tabla 107. ANOVA para IC50 de MMT 24.....	143
Tabla 108. Determinación de IC50 de MP 24 h.....	144
Tabla 109. ANOVA para IC50 de MP 24 h.....	144
Tabla 110. Determinación de IC50 de MP/MMT 24 h.....	145
Tabla 111. ANOVA para IC50 de MP/MMT 24 h.....	145
Tabla 112. Parámetros de regresión lineal de MMT, MP y MP/MMT para 24 h.....	146

ABSTRACT

A novel composite was prepared based on gelatin lipid-polymer hybrid carriers and montmorillonite (MMT), to analyze its viability as a system to lower blood cholesterol levels through the combination of mechanisms; such as controlled release of atorvastatin and cholesterol adsorption at the intestine. The work included the study of the properties of adsorption of cholesterol by clay using adsorption isotherm models, in addition to the development of the hybrid carrier (MP) through an experimental design using a Taguchi orthogonal arrangement. Finally, the preparation and characterization of the composite material (MP/MMT) according to its rheological properties, morphology (SEM), particle size, powder X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy with Fourier transform (FT-IR), differential scanning calorimetry (DSC), etc. The *in vitro* drug release profile was evaluated, as well as the pH effect on the properties of the composite. A new MP/MMT composite material with a *raspberry-like* or armor morphology was reported, in which the pH has an important effect on the final structure, by means of pH, defined morphologies were obtained with entrapment efficiencies of up to 67%. The pH controlled the release mechanism from the MP/MMT composite, restricting the release of the drug under conditions similar to the stomach and favoring the intestinal condition. In addition, cytotoxicity was evaluated through a cell viability study proving to be a safe material. Finally, the capacity of mucoadhesion was evaluated by rheological tests of oscillatory shear and rheological synergism, demonstrating mucoadhesive properties dependent on pH. Since this system was designed for oral administration, these results showed that the MP / MMT composite represents an attractive alternative system in cholesterol lowering therapy.

RESUMEN

Se preparó un material compuesto (composito) novedoso basado en acarreadores híbridos lípido-polímero de gelatina y montmorillonita (MMT), para analizar su viabilidad como sistema para disminuir los niveles de colesterol en sangre mediante la combinación de mecanismos; como la liberación controlada de atorvastatina y adsorción de colesterol a nivel intestinal. El trabajo incluyó el estudio de las propiedades de adsorción de colesterol mediante arcillas empleando modelos de isotermas de adsorción, además del desarrollo del acarreador híbrido (MP) mediante un diseño de experimentos empleando un arreglo ortogonal Taguchi. Finalmente, la preparación y caracterización del material compuesto (MP/MMT) de acuerdo a sus propiedades reológicas, morfología (SEM), tamaño de partícula, difracción de rayos X de polvos (XRD), espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), calorimetría diferencial de barrido (DSC), etc. Se evaluó el perfil de liberación del fármaco in vitro, así como el efecto del pH en las propiedades del material compuesto. Se reportó un nuevo material compuesto novedoso MP/MMT con una morfología tipo frambuesa o armadura, en el que el pH tiene un efecto importante sobre la estructura final, mediante pH se obtuvieron morfologías definidas con eficiencias de entrapamiento de hasta 67%. El pH controló el mecanismo de liberación a partir del material compuesto MP/MMT, restringiendo la liberación del fármaco en condiciones similares al estómago y favoreciendo la condición intestinal. Además, se evaluó la citotoxicidad mediante un estudio de viabilidad celular demostrando ser un material seguro. Finalmente, se evaluó la capacidad de mucoadhesión mediante pruebas reológicas de cizalla oscilatoria y sinergismo reológico, demostrando propiedades mucoadhesivas dependientes del pH. Ya que este sistema fue diseñado para una administración por vía oral, estos resultados evidenciaron que el material compuesto MP/MMT representa una alternativa atractiva como sistema para la terapia de disminución de colesterol.

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (EC) como la cardiopatía isquémica y los accidentes cerebrovasculares son la primera causa de muerte en todo el mundo, estas se han mantenido en primer lugar durante los últimos 15 años y han aumentado en el número de casos llegando hasta 15.2 millones de muertes en el año 2016 [1] (*figura 1*).

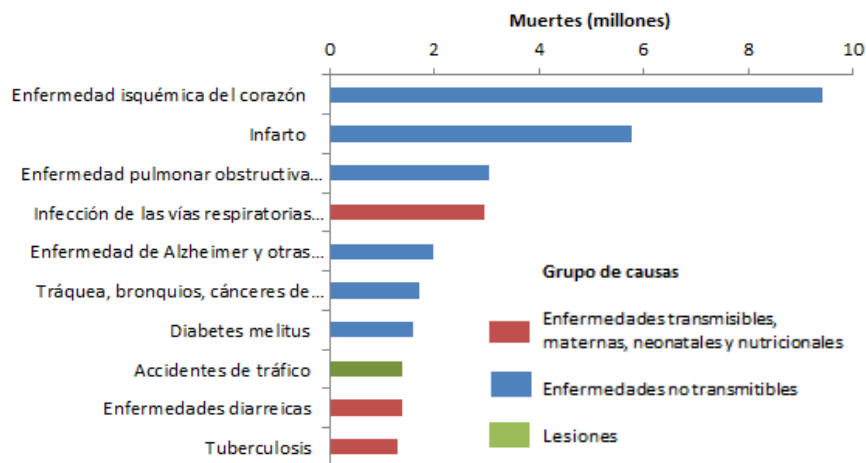


Figura 1. Principales causas de muerte en el mundo (OMS, 2016) [1]

Globalmente más del 75% de las defunciones por EC se producen en los países de ingresos bajos y medios. En general se observa una fuerte división entre este-oeste en las tasas de mortalidad por EC, y en la mayor parte de América latina, estas tasas son moderadas (*figura 2*) [1].

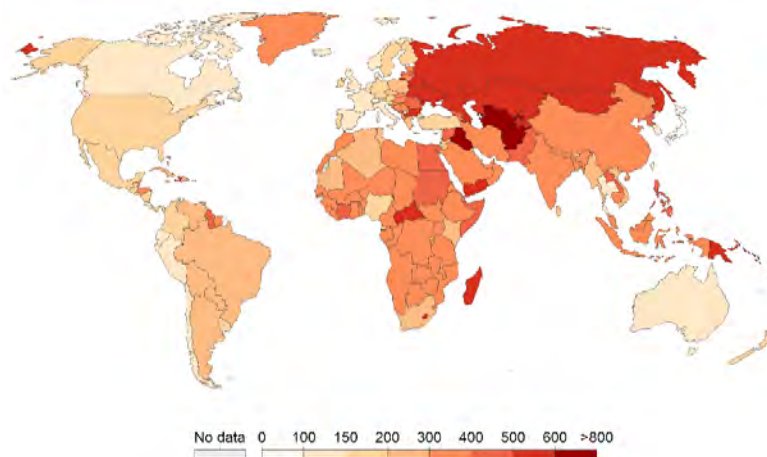


Figura 2. Incidencia de EC en el mundo de acuerdo a la OMS 2016(OMS, 2016) [1]

Entre los factores de riesgo que existen para el desarrollo de EC se encuentra la **hipercolesterolemia** o **dislipidemia**, que consiste en la elevación en sangre de la concentración

de **colesterol total y/o lipoproteína de baja densidad (LDL-colesterol)**. La hipercolesterolemia favorece la acumulación de lípidos en las paredes de las arterias coronarias encargadas de la irrigación del miocardio (tejido muscular), lo que se conoce como placas de ateroma lo que, finalmente, lleva a la enfermedad de las arterias coronarias (**figura 3**). Los altos niveles de colesterol en sangre resultan de una combinación de factores que pueden ser genéticos como mutaciones en genes de la apolipoproteína-B (APOB) o el receptor de LDL (LDL-R) y factores ambientales como una dieta rica en colesterol, ácidos grasos saturados, ácidos grasos trans y obesidad [2].

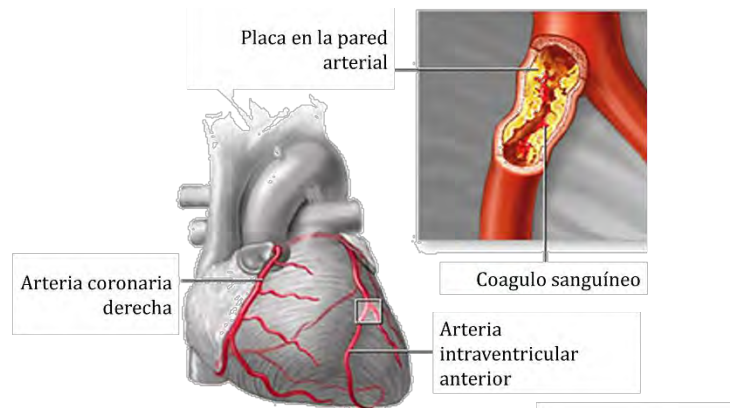


Figura 3. Placa de ateroma en arterias del corazón [2]

A manera de prevención y tratamiento de hipercolesterolemia y EC, se han desarrollado terapias farmacológicas con el objetivo de reducir los niveles de colesterol en sangre, entre los cuales se encuentran las estatinas. Las estatinas son una familia de fármacos inhibidores competitivos de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG-CoA reductasa) que cataliza la conversión de HMG-CoA en mevalonato, paso limitante en la biosíntesis de colesterol en el hígado. La inhibición de la enzima HMG-CoA reductasa resulta en la disminución de la biosíntesis de colesterol y lipoproteína de baja densidad (LDL). Mediante un mecanismo de autorregulación, se aumenta la expresión de receptores para LDL (rLDL) en el hígado, lo que resulta en una disminución de los niveles de colesterol circundante en el torrente sanguíneo. Entre las estatinas se encuentra la **atorvastatina (AC)**, la cual es el fármaco más vendido en todo el mundo. Administrado por vía oral la AC se absorbe rápidamente ($t_{\max}=1-2h$) sin embargo, tiene una baja absorción (30%) y baja biodisponibilidad (12%). Debido a esto la terapia con AC requiere de tiempos prolongados y dosis altas (máximo 80 mg/día), lo que conlleva el riesgo de efectos adversos como miopatías, rabdomiolisis, daño en hígado y riñones, etc., además la AC es sensible a la degradación en las condiciones gástricas [2].

En el cuerpo humano el colesterol tiene dos fuentes principales la biosíntesis hepática y la absorción intestinal. En el intestino existe absorción de colesterol proveniente de la alimentación (300-500 mg), excreción biliar (800-1200 mg) y descamación celular (300 mg). Debido a esto ha despertado un gran interés la búsqueda de inhibidores de absorción de colesterol a nivel intestinal, que puedan administrarse en terapia combinada junto con las estatinas a fin de reducir los niveles de colesterol en sangre más eficazmente [3].

Durante las últimas décadas se ha incrementado el interés en el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos capaces de mejorar el desempeño de los principios activos a través de modificar la velocidad de liberación, el sitio de liberación o mediante la combinación de mecanismos en un mismo sistema para lograr un efecto sinérgico. Un ejemplo de este tipo de sistema son los **materiales compuestos o compositos (composites)**, que consisten en materiales híbridos de componentes orgánicos e inorgánicos como arcillas minerales y biopolímeros. Estos son capaces de combinar las propiedades de ambos materiales como capacidad de hinchamiento, adsorción, propiedades mecánicas, comportamiento térmico, bioadhesión, etc. Diversos estudios han reportado el desarrollo de materiales compuestos o compositos como sistemas liberación de fármacos a base de arcillas y biopolímeros, ya sea por formación directa de micropartículas y nanopartículas o por intercalación del polímero entre las láminas de la arcilla, así como la intercalación directa de moléculas de interés [4-6].

Las arcillas son un componente fundamental en las formulaciones farmacéuticas, tanto como excipientes, así como principio activo. En el grupo de las esmectitas se encuentra la arcilla **montmorillonita (MMT)** la cual es un material ampliamente estudiado por sus diversas propiedades como (i) capacidad de adsorción, (ii) capacidad de hinchamiento, (iii) baja o nula toxicidad, (iv) gran área superficial interna, (v) gran capacidad de adsorción, (vi) intercambio catiónico y (vii) liberación controlada de fármacos. Además, algunos grupos de investigación han reportado que la MMT administrada por vía oral es capaz de lograr una disminución de los niveles de colesterol en sangre [7,8].

Otro tipo de sistema híbrido son los acarreadores lípido-polímero, las cuales combinan los atributos mecánicos de los acarreadores de fármacos de tipo poliméricos y de los liposomas. Este tipo de sistemas ha sido ampliamente reportado ya sea con una estructura de núcleo polimérico recubierto por fosfolípidos, o un núcleo lipídico que permite encapsular fármacos de baja solubilidad, el cual es estabilizado por un componente polimérico [9,10].

Se ha reportado la preparación de materiales compuestos a base de GEL y MMT mediante la intercalación directa de cadenas de GEL puras en las láminas de la arcilla [11], sistemas hidrogel

[12] y nanopartículas cargadas con arcilla en su interior [13]. Sin embargo, se ha reportado que la adición de MMT dentro de los acarreadores de GEL como micro y nanopartículas reduce la eficiencia de entrapamiento y la capacidad de carga del fármaco [13–15].

Sin embargo, no ha sido reportada la preparación de materiales compuestos a base de acarreadores híbridos lípido-polímero y arcillas, debido a esto la preparación de un sistema de liberación modificada consistente en un material compuesto a base de micropartículas híbridas lípido-polímero y arcilla montmorillonita resulta atractivo para la liberación de atorvastatina para mejorar su desempeño en vía oral, eficiencia de entrapamiento y liberación.

Además, en las décadas anteriores se consideraba que los excipientes debían ser materiales inertes para asegurar la estabilidad, seguridad y eficacia de los medicamentos, sin embargo mediante los materiales híbridos y compuestos es posible diseñar un sistema de liberación de fármacos con una posible actividad dual, en este caso empleando la capacidad de adsorción de la arcilla MMT, para conseguir reducir los niveles de colesterol en sangre mediante la combinación de mecanismos a nivel hepático e intestinal.

II. ANTECEDENTES

2.1 El colesterol y su metabolismo

El colesterol es un lípido esteroide derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno, es un componente de vital importancia para la estructura y la función de la membrana celular, así como el crecimiento tisular. Además, los metabolitos del colesterol, tales como las sales biliares, las hormonas esteroideas y los oxisteroles realizan funciones biológicas importantes. En los mamíferos, el colesterol puede obtenerse a través de la absorción de colesterol de la dieta (vía exógena) o mediante a síntesis de novo en las células del organismo (vía endógena). El hígado es el órgano responsable de la regulación del proceso de homeostasis del colesterol, entre sus funciones están: sintetizar colesterol, sintetizar y secretar lipoproteínas de alta densidad (HDL), segregar colesterol y sales biliares a la bilis, y participar en el transporte reverso del colesterol. El colesterol es transportado mediante lipoproteínas, para lo cual se une a fosfolípidos y proteínas para formar las lipoproteínas que son agregados polimoleculares esféricos con una capa externa hidrosoluble que contiene fosfolípidos, colesterol libre y proteínas denominadas apolipoproteínas y una parte interna con triglicéridos y ésteres de colesterol. Existen 5 grandes grupos de lipoproteínas en función de su densidad: quilomicrones (QM), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL), que tienen un tamaño y una composición química diferente (*ver figura 4*) (*ver tabla 1*) [16].

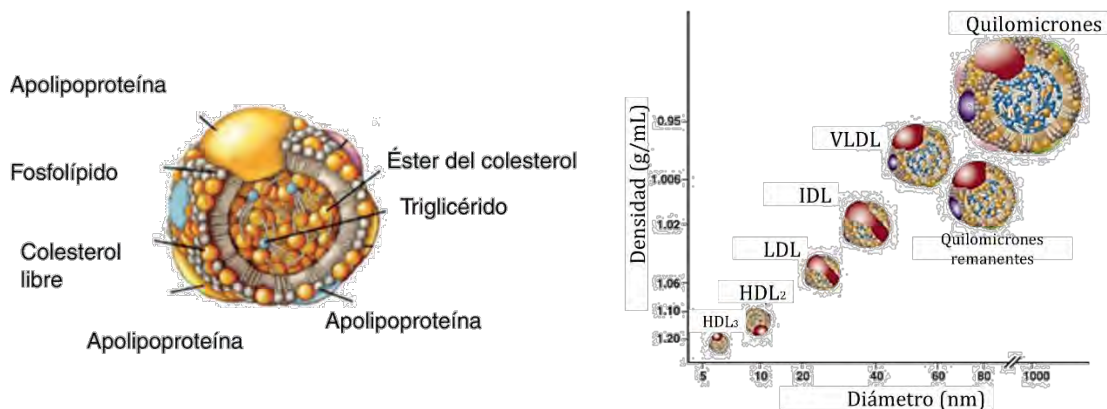


Figura 4. Composición y estructura de una lipoproteína y relación en tamaño vs densidad [16]

Tabla 1. Tipos y composición de lipoproteínas

	QM	VLDL	IDL	LDL	HDL
Diámetro (nm)	500	43	27	26-27	6.5-9.5
Densidad (g mL⁻¹)	<1.006	0.95-1.006		1.006-1.063	1.063-1.210
Composición (% masa total)					
Proteína	2	10	18	25	55
Triglicéridos	85	50	26	10	4
Colesterol	4	20	34	37	17
Fosfolípidos	9	20	22	20	24

Existen 3 vías para la obtención de colesterol: (i) entrada de colesterol de la dieta a través de los remanentes de quilomicrones, (ii) captación de LDL que contienen colesterol circulante y de tejidos extra hepáticos mediante los receptores a LDL (rLDL), y captación del colesterol en forma de HDL y de remanentes de VLDL por receptores específicos y (iii) síntesis a partir de la acetil-CoA bajo el control de la enzima limitante 3-hidroximetil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (**figura 5**). Prácticamente todas las células de mamíferos sintetizan colesterol, en la mayoría de animales gran parte se sintetiza en los órganos extra hepáticos, en el humano el hígado contribuye en un 10% a la síntesis total de colesterol (10 mg/kg/día) [17].

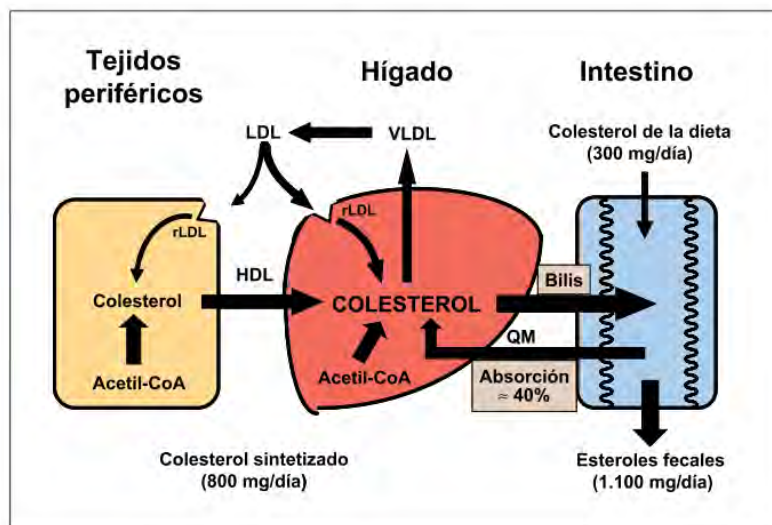


Figura 5. Homeostasis del colesterol en el organismo. HDL=lipoproteínas de alta densidad, rLDL=receptor para lipoproteínas de baja densidad (LDL), QM= quilomicrones, VLDL=lipoproteínas de muy baja densidad [17]

De forma general la síntesis de colesterol se puede ver en cuatro etapas, la primera consiste en la condensación de 3 unidades de acetato (CH₃-COO⁻) de Acetil-CoA para formar el intermediario de 6 carbonos mevalonato, la segunda etapa consiste en la conversión de mevalonato en unidades de isopreno activado por grupos fosfatos provenientes de moléculas de ATP. Posteriormente en la tercera etapa se da la polimerización de 6 unidades de isopreno para formar la molécula lineal de 30 carbonos escualeno. Finalmente, la última etapa

comprende la ciclación del escualeno para obtener el núcleo esteroideo con posteriores reacciones de oxidación, remoción o migración de grupos metilo se obtiene el colesterol (*figura 6*) [18].

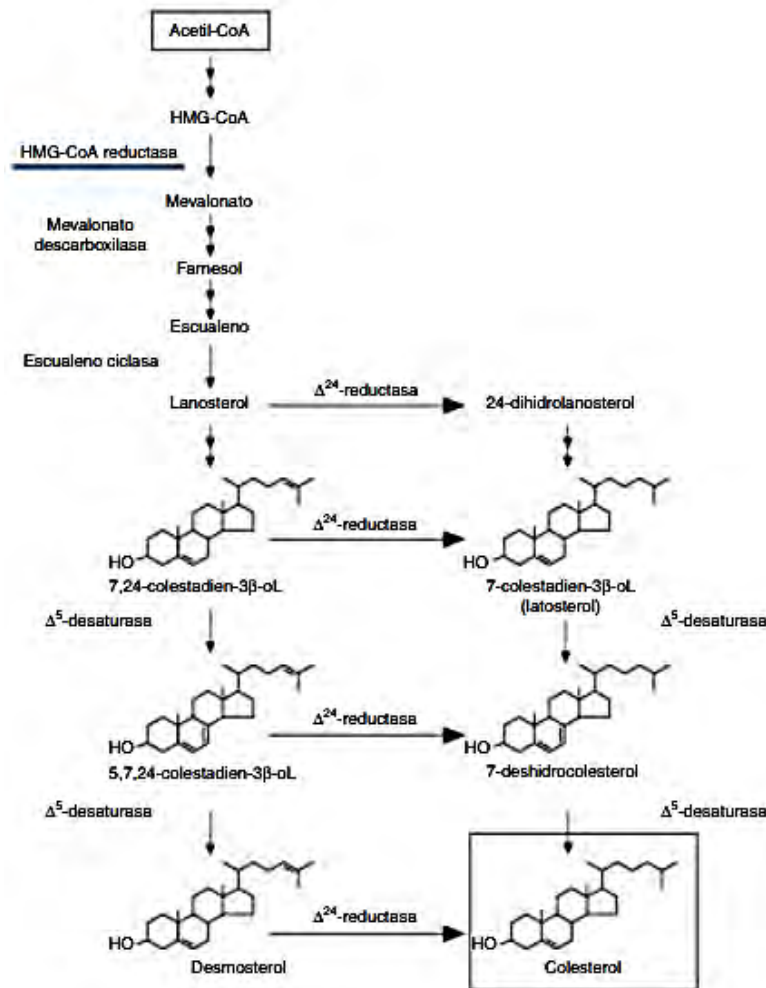


Figura 6. Biosíntesis de Colesterol [18]

La homeostasis del colesterol en el organismo se mantiene mediante el equilibrio de la síntesis endógena, la absorción intestinal y con la secreción biliar de ácidos biliares y colesterol. Sin embargo, cada vez es más conocido el impacto del intestino sobre la homeostasis del colesterol a nivel de su reabsorción, excreción fecal y síntesis de novo [17]. El colesterol es una molécula insoluble, por lo que su absorción intestinal tiene una cierta complejidad y precisa procesos de emulsificación, hidrólisis del enlace éster (cuando está esterificado) por una hidrolasa pancreática específica, solubilización micelar, absorción en el yeyuno proximal, re esterificación en el citoplasma de los enterocitos y transporte a la linfa en los QM [16].

La absorción intestinal de colesterol se puede dividir en tres fases (*figura 7*):

- I. **Fase Intraluminal:** El colesterol esterificado proveniente de la dieta y bilis, es hidrolizado por la lipasa pancreática carboxil éster para obtener el colesterol libre. La formación de micelas por los ácidos biliares permite el transporte de lípidos insolubles en el medio acuoso intestinal (del mismo modo que las lipoproteínas en la sangre). La solubilización micelar es indispensable para que el colesterol pueda difundirse a través de la barrera de mucosa que recubre la superficie de las microvellosidades intestinales. Las micelas se desagregan en esta localización, tras lo cual el colesterol está disponible para ser captados por el enterocito.
- II. **Fase Mucosa:** comprende el paso de las moléculas de colesterol desde el lumen al citoplasma de los enterocitos a través del ribete en cepillo.
- III. **Fase intracelular:** el colesterol que ha sido captado por los enterocitos y no ha sido devuelto al lumen (vía ABCG5/8) difunde al retículo endoplásmico, donde es re esterificado por la enzima acil CoA: colesterol aciltransferasa-2 (ACAT2). El paso final es la incorporación del colesterol re esterificado, junto con una pequeña proporción de colesterol libre, a los quilomicrones nacientes, en asociación con triglicéridos y apo B48, y su secreción a la linfa. El ensamblaje de los quilomicrones es un proceso complejo en el cual es indispensable la acción de la enzima proteína de transferencia de triglicéridos microsomales (MTP)⁴⁰ [19].

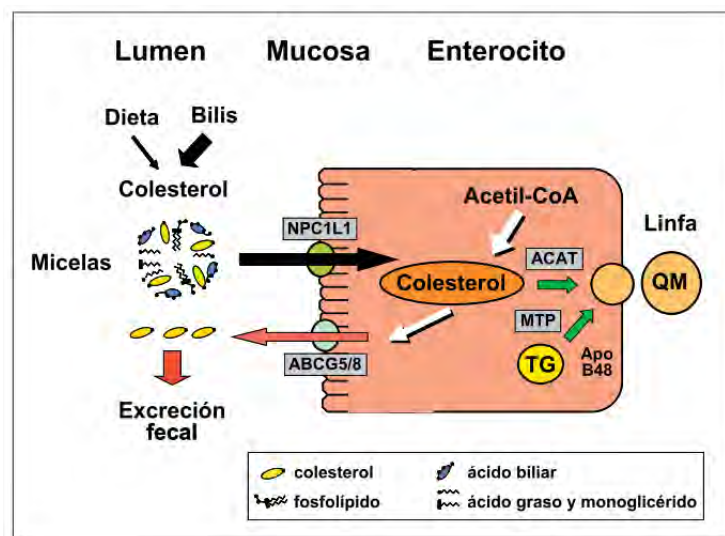


Figura 7. Proceso de absorción intestinal de colesterol (fase luminal, mucosa e intracelular). ACAT=acil coenzima A-colesterol acil transferasa, apo=apolipoproteína, MTP=proteína de transferencia de triglicéridos microsomales, NPC1L1=Niemann-Pick C1-like proteína, QM=quilomicrones, TG=Triglicéridos [19]

La regulación de la absorción intestinal del colesterol es importante porque la eficiencia de este proceso determina tanto la excreción fecal como la cantidad que llega al hígado con los

remanentes de QM. La masa de colesterol excretada en las heces depende enteramente de la eficiencia de su absorción intestinal (del colesterol biliar y dietético a la vez) y, por esto, la regulación de la absorción intestinal del colesterol tiene un interés creciente como diana terapéutica para reducir las cifras de colesterol [17].

2.2 Inhibición de la síntesis de colesterol

Las estatinas son un grupo de fármacos de origen natural en sus inicios y posteriormente de origen sintético, son inhibidores de la enzima HMG-CoA reductasa, las cuales se han utilizado con éxito desde finales de 1980 para inhibir la síntesis de colesterol y reducir la mortalidad cardiovascular. La atorvastatina (ácido (3''R'',5''R'')-7-[2-(4-fluorofenil)-3-fenil-4-(fenilcarbamoil) -5-propan-2-ilpirrol-1-il]-3,5-dihidroxiheptanoico) (AC) (**figura 8**) pertenece a la segunda generación de estatinas, es un inhibidor reversible sintético de la enzima microsomal HMG-CoA reductasa. Todas las estatinas contienen un resto de tipo HMG que se une al dominio catalítico de la enzima HMG-CoA reductasa, por su parte la atorvastatina contiene además un grupo fenol fluorado y otros restos en la estructura de la base que proporcionan sitios para la unión con la enzima. La AC (peso molecular: 546g/mol, pKa 4.46) se administra oralmente en la forma de sal cálcica, en un intervalo de 10 a 80 mg/día [20].

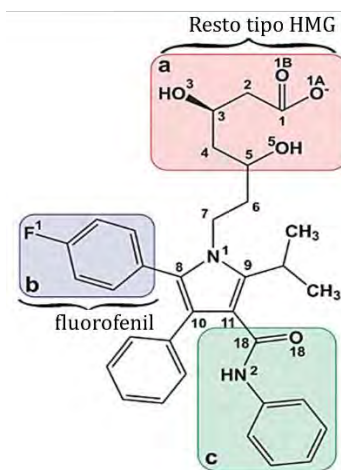


Figura 8. Estructura de atorvastatina [20]

La AC se absorbe principalmente en el intestino y, en menor medida, en el estómago, y el metabolismo pre-sistémico es la principal causa de la escasa biodisponibilidad, ya que se absorbe solo un 30% y tiene una biodisponibilidad del 12% atribuida a la inestabilidad en el medio ácido del estómago, su naturaleza cristalina, baja solubilidad acuosa y alto metabolismo hepático de primer paso. Por lo general, es necesaria una administración de dosis altas y

terapias prolongadas, aunque esta se relaciona con efectos adversos, en particular, la miopatía que se manifiesta como dolor muscular, sensibilidad o debilidad, rabdomiólisis, anomalías hepáticas e insuficiencia renal. Además estudios recientes han demostrado una mayor incidencia de diabetes mellitus causada por el tratamiento con altas dosis de estatinas independientemente del tipo de estatina [21]. La atorvastatina ha demostrado ser un fármaco capaz en la disminución en los niveles de colesterol en la sangre, sin embargo su desempeño se ve limitado por las formas farmacéuticas actuales en su mayoría sistemas de liberación convencional, debido a esto se han desarrollado diversos enfoques con el objetivo de mejorar la biodisponibilidad y eficacia de AC mediante sistemas de liberación modificada, especialmente con acarreadores de fármacos como micro y nanopartículas obtenidas a partir de sistemas autoemulsificables [22], nanopartículas poliméricas empleando polímeros de origen natural y sintético como ácido poli láctico-co-glicólico (PLGA) [23], poli-ε-caprolactona (PCL) [24], eudragit [25] quitosan, albumina sérica bovina (BSA) [26], además otras técnicas como la preparación de dispersiones sólidas, y nuevas formas cristalinas de solvatos [27] entre otros.

2.3 Inhibición de absorción intestinal de colesterol

El tratamiento con estatinas no es suficiente para prevenir el riesgo de enfermedad cardiovascular en una proporción sustancial de individuos. Para aumentar la eficacia del tratamiento han despertado considerable interés las intervenciones dietéticas y farmacológicas que inhiben la absorción intestinal de colesterol. El intestino, junto con el hígado, desempeña un papel central en el control del metabolismo lipídico en todo el cuerpo y el plasma. Los inhibidores de la absorción intestinal disminuyen la absorción del colesterol que proviene de los alimentos, pero aún más importante es que reducen la reabsorción del colesterol biliar, que representa la mayor parte del colesterol en el intestino. Se sabe que varios componentes alimenticios reducen los niveles de colesterol LDL entre los cuales se encuentran principalmente las fibras solubles, fitoesteroles, saponinas, y fosfolípidos. Estos compuestos inhiben la absorción del colesterol mediante diversos mecanismos al afectar la solubilización del colesterol en la luz intestinal, interfiriendo con la difusión del colesterol luminal al epitelio intestinal y/o inhibiendo los mecanismos moleculares responsables de la absorción de colesterol por el enterocito. El contenido de colesterol de los quilomicrones intestinales se reduce por lo cual se transporta menos colesterol al hígado dentro de los QM,

por consiguiente se incrementa la actividad hepática del receptor de LDL y se disminuyen los niveles plasmáticos de colesterol LDL [28].

- I. **Fibras solubles**, se refiere a polisacáridos como goma guar, pectina y psyllium de las plantas que son resistente a la digestión y absorción en el intestino delgado y posteriormente se someten a una fermentación completa o parcial en el intestino grueso. Aunque el mecanismo exacto no se ha definido claramente, se ha propuesto que las fibras solubles se pueden unir directamente al colesterol en la luz intestinal y así reducir la emulsificación biliar del colesterol y retrasar su difusión desde el lumen hasta las células epiteliales del intestino.
- II. **Fitoesteroles**, se refiere a esteroides y estanoles vegetales, son compuestos no nutritivos que tienen una estructura química similar al colesterol. El mecanismo probable es que los esteroides vegetales compiten con el colesterol para la solubilización en micelas dentro de la luz intestinal, reduciendo así la cantidad de colesterol disponible para la absorción. Otra posibilidad es que los esteroides afecten a los transportadores intestinales de colesterol.
- III. **Saponinas**, su naturaleza anfipática, es decir, las regiones polares y no polares, les dan a estos compuestos propiedades similares a los tensoactivos. Se sabe desde hace muchos años que tienen el potencial de reducir los niveles de colesterol en plasma debido a su capacidad de interferir con la absorción intestinal de colesterol. Los posibles mecanismos incluyen su capacidad para: (i) formar complejos insolubles con colesterol, (ii) afectar la formación de micelas, (iii) interferir con el metabolismo de los ácidos biliares, o (iv) perturbar las características de la membrana de los enterocitos debido a sus propiedades anfipáticas.
- IV. **Fosfolípidos**, especialmente la fosfatidilcolina es importante para la emulsificación y solubilización de los lípidos de la dieta. Juega un papel esencial para facilitar la emulsificación y el transporte micelar de colesterol a las células que recubren la pared intestinal. La absorción del colesterol intestinal depende de cantidades adecuadas de fosfolípidos en la luz intestinal, sin embargo, un exceso de fosfolípido conduce a la supresión de la absorción de colesterol. Se han propuesto tres posibles mecanismos de su efecto inhibitorio: (i) el exceso de fosfolípidos interfiere con la hidrólisis micelar fosfolípida eficiente, que es un requisito previo para la absorción eficiente de colesterol en la mucosa, (ii) excedente el fosfolípido altera las propiedades fisicoquímicas de las micelas mixtas (es decir, su tamaño, composición y / o

características biológicas) que resulta en una absorción reducida de colesterol, o (iii) el fosfolípido actúa sobre las características de membrana de los enterocitos o específicamente sobre los transportadores de colesterol.

Por otro lado también existen fármacos empleados en la inhibición de absorción de colesterol entre los cuales destaca la ezetimiba (**figura 9**), la cual pertenece a una clase novedosa de agentes hipolipemiantes desde el punto de vista estructural y funcional. La inhibición específica de la absorción de colesterol, ya sea de origen biliar o dietético, se realiza por la unión de ezetimiba al transportador NPC1L1, bloqueando la internalización del complejo NPC1L1/colesterol. La terapia combinada de ezetimiba con estatinas ha demostrado un efecto sinérgico en la reducción de colesterol en sangre mediante combinación de mecanismos, sin embargo así como las estatinas, la ezetimiba al ser un fármaco también requiere el control posológico, así mismo dado que es absorbido por el organismo conlleva sus propios efectos adversos como miopatía y elevación de transaminasas [29].

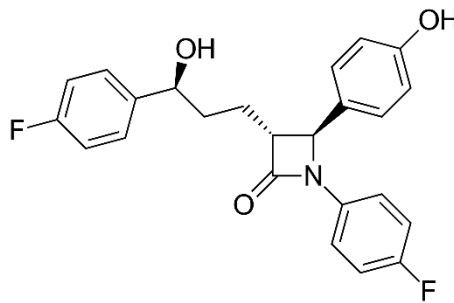


Figura 9. Estructura química de la ezetimiba [29]

2.4 Liberación controlada de fármacos

Un **sistema de liberación controlada** se puede definir como un dispositivo o una formulación que es capaz de introducir una sustancia terapéutica en el cuerpo de una manera que mejora su seguridad y eficacia sobre los métodos convencionales. La eficacia mejorada puede deberse a una mayor localización del fármaco, una mayor biodisponibilidad del fármaco o una duración sostenida de la acción. Un sistema de liberación que es capaz de lograr un efecto terapéutico prolongado mediante la liberación lenta de la sustancia terapéutica durante una duración prolongada (días o meses) después de la administración de una dosis única se denomina **sistema de liberación prolongada**. Los sistemas de liberación prolongada tienen varias ventajas que incluyen: (i) menor frecuencia en la administración, (ii) reducción de

efectos secundarios, (iii) niveles de absorción de fármaco estables en plasma, (iv) mejor cumplimiento del paciente en la terapia [30].

2.5 Acarreadores híbridos lípido-polímero

Dentro de los sistemas de liberación de fármacos diversos tipos de acarreadores han sido reportados empleando una gran variedad de materiales en su preparación entre los cuales se encuentran los polímeros (nanopartículas poliméricas, micelas poliméricas, dendrímeros, etc.), lípidos (liposomas, nanopartículas lipídicas sólidas) y metales (oro, plata, sílica, etc.), etc. Las propiedades de dichos acarreadores pueden ser modificadas para obtener un comportamiento específico en las condiciones *in vivo*, como: (i) modificar el tiempo de permanencia en la circulación sistémica así como su estabilidad, (ii) vectorización para reconocimiento y liberación en sitios específicos, (iii) propiedades de estímulo-respuesta y (iv) capacidad de diagnóstico y tratamiento, este último considerado como sistemas teragnósticos [31].

Entre los diferentes tipos de acarreadores los más estudiados han sido los acarreadores poliméricos y los liposomas, debido a sus características que presentan con grandes ventajas en su aplicación como sistemas de liberación de fármacos. Las nanopartículas y micropartículas poliméricas presentan una alta integridad estructural, estabilidad, y liberación controlada. Este tipo de sistemas presentan una gran versatilidad debido a la amplia cantidad de polímeros con las que pueden ser preparadas, ya sean de origen natural (quitosano, gelatina, albumina etc.) o sintéticos (ácido poli-láctico co-glicólico (PLGA), ácido láctico (PLA), eudragit, etc.). Sin embargo, entre las principales limitaciones de este tipo de sistemas se encuentran el uso de solventes tóxicos en su preparación, baja capacidad de entrapamiento con fármacos hidrofílicos, citotoxicidad y fugas del fármaco antes de llegar al sitio de acción. Por otro lado, los liposomas han sido considerados por muchos autores como un sistema ideal para liberación de fármacos debido a su alta biocompatibilidad ya que por sus componentes su estructura es básicamente análoga a las membranas biológicas presentes en los organismos. Además, los liposomas pueden ser preparados empleando fosfolípidos de origen natural o sintético. Entre sus ventajas se sabe que los liposomas son biocompatibles y biodegradables, no tóxicos, flexibles, no inmunogénicos, etc. Sin embargo, los liposomas son fácilmente eliminados por RES lo que conlleva a una baja biodisponibilidad, además tienen limitaciones en cuanto a su estabilidad física, química y baja reproducibilidad de lote a lote.

A fin de mitigar las limitaciones de los acarreadores poliméricos y de los liposomas, en los últimos años surgió una nueva generación de acarreadores denominados acarreadores **híbridos lípido-polímero**. Este tipo de sistemas han sido desarrollados para combinar las características de las nanopartículas poliméricas y liposomas, como las propiedades biomiméticas de los lípidos y la arquitectura proporcionada por los polímeros. Así estos sistemas son partículas submicrónicas compuestas por al menos dos componentes: polímero y lípido. Las partículas híbridas lípido-polímero tienen la capacidad de entrapar, adsorber, o unir covalentemente diversos tipos de compuestos de interés como fármacos, genes, proteínas y ligandos para vectorización. Se han reportado diversos sistemas empleando polímeros biodegradables como PLGA, policaprolactona (PCL), dextrán, albumina, quitosano y gelatina. Por otro lado, los lípidos empleados pueden ser de carácter catiónico, aniónico, neutros o zwitterionicos como lecitina de soya, 1, 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dipalmitoil-3-trimetilamonio-propano (DPTAP), etc. [10,31–33].

Las nano o micropartículas híbridas se pueden clasificar por los diversos tipos de estructuras formadas, dependiendo del arreglo entre el polímero y los lípidos en el sistema híbrido [10], se puede encontrar el tipo matriz monolítica o tipo I y las estructuras tipo capsulares o tipo II que corresponden a arreglos tipo núcleo y capa (*core-shell*). La matriz monolítica o tipo I consiste generalmente en complejos fármaco-polímero, formados por interacciones iónicas u otras interacciones, que se distribuyen homogéneamente a lo largo de la fase lipídica. Las estructuras tipo II se dividen en dos subtipos en función de su nano estructura, (i) núcleo lipídico/capa de polímero y (ii) núcleo polimérico/capa lipídica. Los híbridos de núcleo lipídico/capa de polímero consisten en un núcleo lipídico rodeado por una cubierta polimérica, que permite la carga de fármacos hidrófobos en el núcleo lipídico y de fármacos hidrófilos en el recubrimiento polimérico. Las partículas de núcleo polimérico/capa lipídica están diseñados principalmente para encapsular fármacos anticancerígenos en el núcleo de polímero, que luego se recubre con una capa o bicapa lipídica para mejorar la absorción celular y la estabilidad coloidal [34] (**figura 10**).

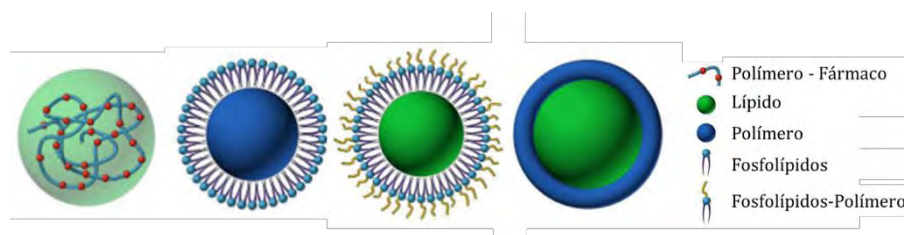


Figura 10. Estructura general de partículas híbridas lípido-polímero [34]

Otra variedad considera los liposomas recubiertos por polímeros, que consiste en estructuras formadas por polímeros adsorbidos (A), anclados (B) o injertados (C) en la superficie de liposomas a fin de estabilizarlos [10] **(figura 11)**.

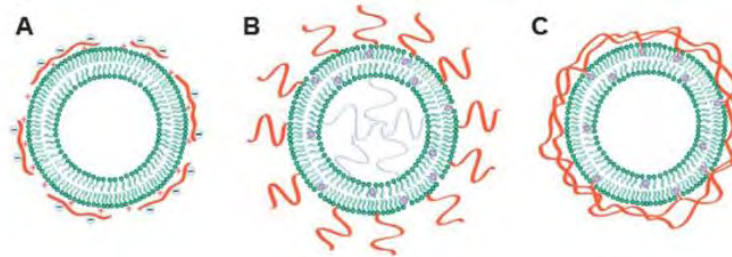


Figura 11. Partículas híbridas lípido-polímero a base de liposomas recubiertos por polímeros[10]

En general existen dos tipos de metodologías para la preparación de partículas híbridas lípido-polímero, la primera se denomina método en dos pasos, la cual era la más común en los inicios del desarrollo de este tipo de sistemas. El método convencional de preparación en dos pasos consiste en mezclar micro o nanopartículas poliméricas preformadas con vesículas lipídicas preformadas. En este caso las vesículas lipídicas son adsorbidas en las partículas poliméricas mediante fuerzas electrostáticas. En esta estrategia, el núcleo polimérico puede ser preformado mediante la gran variedad de métodos disponibles como emulsión-difusión, emulsión-evaporación, homogenización a alto corte, nanoprecipitación etc. Por su parte los liposomas también pueden prepararse mediante la metodología deseada como sonicación o extrusión. Con todo, el que los componentes del sistema tengan que ser preformados representa la principal desventaja de esta técnica ya que se considera poco eficiente en términos de tiempo y gasto de energía. Debido a esto, se desarrolló una nueva metodología denominada método de un solo paso, la cual no requiere que los componentes sean preformados individualmente, sino que consiste en mezclar las soluciones de cadenas polimérica y lipídicas para que se auto ensamblen para formar las partículas híbridas, las cuales posteriormente se precipitan mediante diversos métodos como nanoprecipitación o evaporación del disolvente. En este caso el lípido actúa además como agentes estabilizante de la partícula, por lo que no se requiere la adición de algún surfactante de tipo iónico o no iónico como PVA o poloxámero, los cuales se emplean para la fabricación de partículas poliméricas convencionales [31] **(figura 12)**.

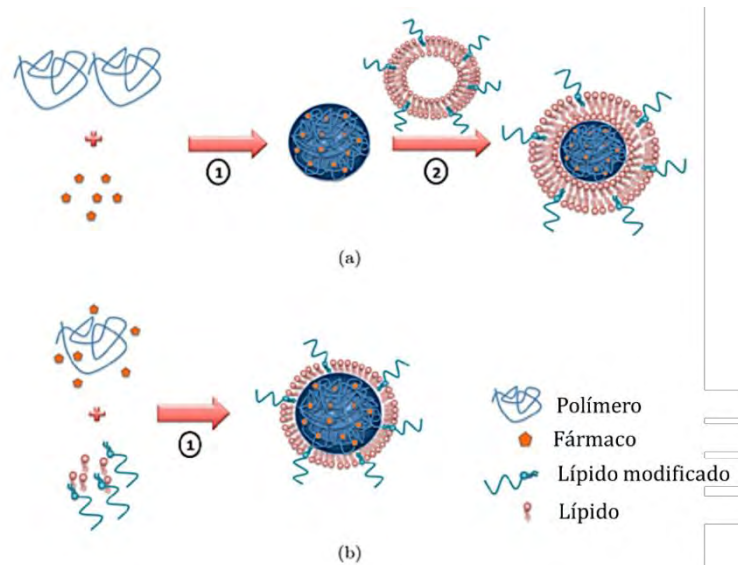


Figura 12. Métodos de preparación de partículas híbridas lípido polímero (a) método en dos pasos (b) método en un solo paso [33]

Diversos autores han reportado el uso de acarreadores híbridos lípido-polímero como micro y nanopartículas con estructuras tipo *core-shell* lípido-polímero a base de poli- ϵ -caprolactona y DESPE para la liberación de paclitaxel [35], nanopartículas híbridas a base de gelatina y lecitina para la liberación de anfotericina B [9], nanopartículas de PLGA y diversos aceites como aceite de oliva para la liberación de resveratrol [36].

Por otro lado, en las últimas décadas ha habido un considerable interés en desarrollar acarreadores basados en materiales biodegradables ya sean de origen natural, sintéticos o semi sintéticos. Los polímeros de origen natural usualmente se derivan de proteínas como la gelatina. La gelatina (GEL) es un biopolímero derivado del colágeno con amplias aplicaciones en farmacia y medicamentos debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad en entornos fisiológicos, bajo costo, fácil disponibilidad y baja antigenicidad. La GEL está compuesta por 18 aminoácidos con cargas positivas y negativas. El comportamiento catiónico se debe a los residuos de lisina (LYS) y arginina (ARG). La GEL se obtiene a través de un proceso de desnaturalización del colágeno mediante un tratamiento ácido o básico, lo que da lugar a dos tipos de GEL, la tipo A con un punto isoeléctrico (PI) de 6-9 y tipo B con un PI de 4.7-5.4. El tratamiento básico hidroliza los grupos amida de los residuos de asparagina y glutamina, dando como resultado una gelatina con alta densidad en grupos carboxilo, disminuyendo su PI. En contraste el tratamiento ácido no afecta significativamente los grupos amida. Así, la GEL presenta carga positiva por debajo de su PI vía protonación de los grupos amino, con una mayor densidad catiónica para la gelatina ácida que para la básica. La GEL es considerada por

la FDA como un excipiente seguro, GRAS (*Generally Recognized As Safe*), además es barata comparada con otros polímeros biodegradables y de gran abundancia, ya que se obtiene de origen animal, por lo general la GEL tipo A es de origen porcino, mientras que la tipo B generalmente es de origen bovino [37] (*figura 13*).

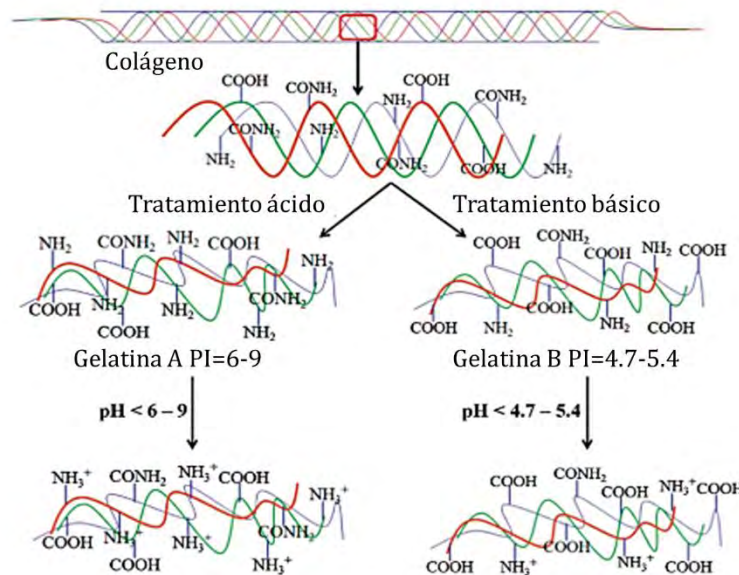


Figura 13. Estructura y tipos gelatina y su obtención a partir del colágeno[37]

Además, debido a sus propiedades de formación de gel, la GEL se ha estudiado ampliamente en relación con la preparación de micro y nanoacarreadores, como las nanopartículas hinchables para la liberación controlada de cloroquina [38] e insulina [39].

Las propiedades de la GEL pueden ajustarse fácilmente por pH, fuerza iónica y temperatura sin realizar ninguna funcionalización compleja adicional. De hecho, seleccionando el tratamiento alcalino o ácido, el PI se puede adaptar para maximizar la eficacia de carga del fármaco en función de las propiedades electrostáticas de la molécula del fármaco deseado. Además, la cinética de liberación de la gelatina depende de la degradación del acarreador, que puede ajustarse ya sea variando el peso molecular de la gelatina o el grado de entrecruzamiento durante la preparación del sistema [37,40].

Entre los métodos reportados para preparación de micro y nanopartículas de gelatina se encuentran: **(i) coacervación, (ii) desolvatación, (iii) emulsificación- evaporación, (iv) nanoprecipitación, (v) microemulsión en fase inversa, y (vi) auto ensamblaje**, etc.

El método de desolvatación se basa en la adición de un agente de desolvatación como alcohol o acetona, a una solución de gelatina para inducir la precipitación mediante un cambio en la

conformación. Sin embargo, el uso de gelatina nativa produce partículas con distribución de tamaño muy amplia debido a presencia de cadenas de diversos pesos moleculares. Así, la adición de un segundo paso de desolvatación permite la obtención de partículas con un tamaño más controlable y una menor distribución de tamaño de partícula. Posteriormente, se realiza un proceso de entrecruzamiento, el cual es necesario para dar estabilidad y forma, alargando el tiempo de vida reduciendo la solubilización de la partícula en agua, mejorar la estabilidad térmica y mecánica del acarreador en condiciones fisiológicas, así como controlar la velocidad de degradación *in vivo* [41].

Se han descrito dos tipos de métodos fundamentales de entrecruzamiento para la gelatina: físicos y químicos. Los métodos físicos incluyen la radiación UV y el tratamiento deshidrotérmico, aunque estos son ineficaces y dificultan el control de la densidad entrecruzamiento de la matriz de gelatina. Los agentes de entrecruzamiento químicos se divide en dos tipos: *non-zero length* y *zero-length*. Los entrecruzantes ***non-zero length*** son bifuncionales o polifuncionales y operan formando enlaces con residuos de ácido carboxílico libres o grupos amina entre moléculas de proteínas adyacentes. Ejemplos de estos incluyen aldehídos como formaldehído, glutaraldehído, gliceraldehído, etc. Los agentes de entrecruzamiento ***zero-length*** activan los residuos de ácido carboxílico para reaccionar directamente con grupos amina en cadenas de proteínas adyacentes. No se introducen moléculas intermedias entre los residuos entrecruzados, por lo que este proceso puede lograr el entrecruzamiento de la matriz de gelatina sin integrar moléculas extrañas en la red. Los agentes entrecruzantes en esta categoría incluyen acil azidas y carbodiimidias solubles en agua. Por mucho el glutaraldehído (GLU) es el entrecruzante más estudiado y empleado para uso con la GEL debido a su bajo costo y alta eficiencia, mediante la reacción con grupos amino de los residuos de lisina y hidroxilisina [42].

2.6 Materiales compuestos (compositos)

La hibridación de materiales para la obtención de materiales compuestos o compositos (composite) se ha convertido en un tema popular en los últimos años, sin embargo, no es un concepto nuevo. Las propiedades finales de los compuestos híbridos a menudo no son una simple adición de las propiedades de los componentes independientes, sino un resultado único debido a un efecto sinérgico. Actualmente se desarrollan materiales compuestos con aplicación en áreas muy diversas, que incluyen recubrimientos, catálisis, óptica, optoelectrónica y aplicaciones biomédicas. Los materiales compuestos o nanocompuestos

consisten en matrices de diferentes materiales, que puede ser polímero, metal o cerámico, y a lo que se agrega la carga, por ejemplo, nanotubos de carbono de pared múltiple, carbón activado, óxido de grafeno reducido, arcillas naturales, materiales similares a grafeno, etc., que le da nuevas propiedades al material, lo que ayuda a una aplicación específica. Diversos estudios demostraron que la mezcla íntima de materiales poliméricos con partículas inorgánicas a escala nanométrica puede dar como resultado propiedades inusuales, se han reportado materiales compuestos o nanocompuestos, que están formados por núcleos orgánico poliméricos recubierto o encapsulado con nanopartículas inorgánicas [43]. En términos muy generales, el componente polimérico normalmente tiene funciones estructurales y puede ajustar las características mecánicas y la procesabilidad de los materiales finales, mientras que el componente inorgánico puede introducir funcionalidades específicas (actividad catalítica, luminiscencia, magnetismo, etc.) y/o reforzar las propiedades mecánicas y propiedades térmicas del polímero [32].

Se pueden distinguir cuatro posibles estrategias en la formación de materiales compuestos polímero / nanopartículas inorgánicas (**figura 14**):

- I. La formación de componentes poliméricos e inorgánicos tiene lugar **ex situ**, y la nanopartícula híbrida está formada por su combinación. Se pueden diferenciar dos casos: (i) aquellos en los que las cadenas de polímero están unidas a partículas inorgánicas; y (ii) aquellos en los que las nanopartículas de polímero y las nanopartículas inorgánicas se combinan juntas. En ambos casos, ya sea con cadenas de polímeros o con partículas, la unión de los componentes puede ser de tipo covalente o no covalente.
- II. El componente inorgánico (típicamente nanopartículas inorgánicas) se forma **ex situ** y, luego, la polimerización del componente orgánico tiene lugar en su presencia.
- III. El polímero o las partículas de polímero se forman **ex situ** y la precipitación/cristalización del componente inorgánico tiene lugar **in situ**.
- IV. El polímero como los componentes inorgánicos se forman simultáneamente **in situ**, durante la formación de nanopartículas híbridas [32].

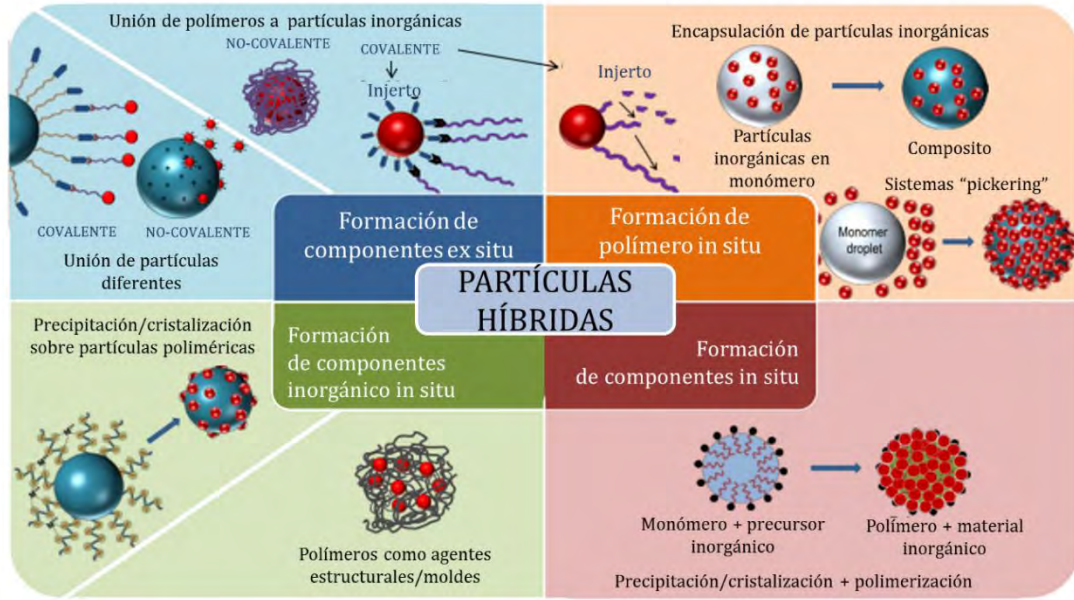


Figura 14. Estrategias de formación de materiales compuestos a base de polímeros y partículas inorgánicas [32]

En el caso de la formación de los componentes poliméricos e inorgánicos *ex situ*, la unión de polímeros a nanopartículas inorgánicas puede realizarse por medios físicos mediante interacciones de tipo no covalentes o covalentes.

En cuanto a interacciones no covalentes se pueden encontrar las interacciones de tipo electrostáticas con las que la formación de materiales híbridos se puede dar en 3 mecanismos diferentes: *(i) adición directa; (ii) desalting y (iii) autoensamble capa por capa (layer by layer) (figura 15)*. La adición directa consiste en la mezcla de ambos componentes para formar agregados de las dos especies de carga opuesta. Por otro lado, en un proceso de desalting, tanto las partículas inorgánicas como los polímeros se dispersan dentro de un medio y se estabilizan para que no interactúen con la presencia de iones de sales, la eliminación de los iones permite una agregación ordenada. Finalmente, la deposición capa por capa (LbL) permite la formación de recubrimientos altamente controlados, que pueden producir morfologías jerárquicas atractivas, pero a través de un proceso que lleva bastante tiempo [32].

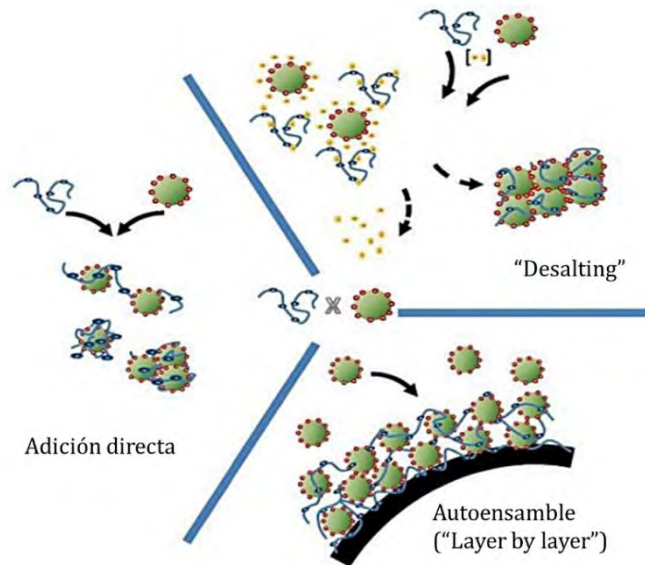


Figura 15. Mecanismos de formación de materiales compuestos por interacciones electrostáticas [32]

Una forma adicional de lograr la interacción entre dos materiales de naturalezas completamente diferentes es modificar sus superficies y luego usar la técnica denominada heterocoagulación (**figura 16**). La heterocoagulación implica la interacción y agregación de partículas de diferente naturaleza para formar un producto híbrido. Algunos autores han reportado la obtención de partículas con morfología **tipo frambuesa (raspberry-like)** por heterocoagulación por interacciones electrostáticas de mezclas binarias de partículas con carga opuesta [32].

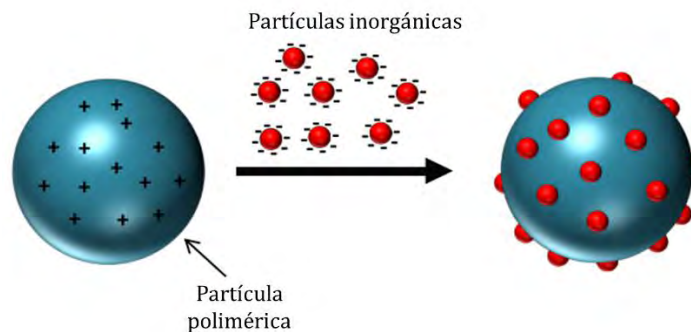


Figura 16. Método de heterocoagulación por interacciones electrostáticas [32]

De esta forma los materiales compuestos empleando arcillas como partículas inorgánicas y las mezclas con polímeros han propuesto como sistemas híbridos de liberación de fármacos interesantes. Las arcillas tienen un papel importante en las formulaciones farmacéuticas pues se emplean tanto como excipientes como principios activos. Las arcillas pueden interactuar

directamente con moléculas de fármacos y otros componentes de formulaciones tales como polímeros para obtener materiales compuestos.

En los materiales compuestos la adición de arcillas a los polímeros puede mejorar las propiedades que influyen en su desempeño en sistemas de liberación controlada de fármacos como: hinchamiento, erosión, biodegradación, estabilidad térmica, estabilidad mecánica y disolución. Además, hay varios tipos de interacciones entre arcillas y polímeros tales como puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, enlaces covalentes, interacciones electrostáticas e intercambio de cationes, dependiendo del tipo de polímero y el pH del medio [11].

Dependiendo de la naturaleza de los componentes utilizados (silicato estratificado, catión orgánico y polímero matriz) y el método de preparación, se pueden obtener tres tipos principales de materiales compuestos cuando una arcilla se asocia con un polímero (**figura 17**). Cuando el polímero no puede intercalarse entre las láminas de silicato se obtiene **microcompuestos** cuyas propiedades se mantienen en el mismo rango que los compuestos tradicionales. Más allá de esta familia clásica de compositos, se pueden obtener dos tipos de nanocompuestos. Compuestos o compositos con una **estructura intercalada** en la que una única (y a veces más de una) cadena polimérica extendida está intercalada entre las capas de la arcilla dando como resultado una morfología multicapa bien ordenada construida con capas poliméricas e inorgánicas alternantes. Cuando las capas de silicato se dispersan completa y uniformemente en una matriz polimérica continua, se obtiene una **estructura exfoliada o deslaminada** [44].

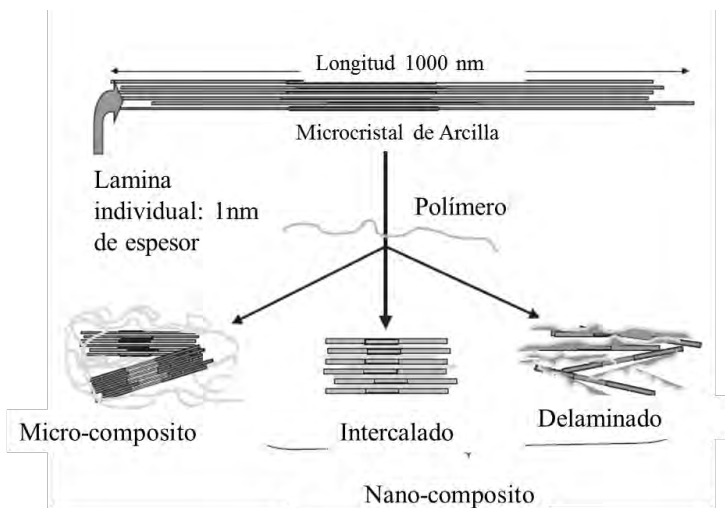


Figura 17. Estructuras de materiales compuestos arcilla-polímeros [44]

La intercalación de las cadenas poliméricas entre las láminas de arcilla generalmente aumenta el espaciamiento de la capa intermedia (**espaciamiento d**), lo que se puede evaluar mediante la técnica de **difracción de rayos X de polvos (XRD)**, ya que dicho incremento conduce a un desplazamiento del pico de difracción hacia valores de ángulo (2θ) inferiores. Los valores de espaciado entre capas y ángulo de difracción (2θ) se relacionan a través de la **Ley de Bragg (ecuación 1)**, donde λ corresponde a la longitud de onda de la radiación de rayos X utilizada en el experimento de difracción, d es la separación entre planos de la red y θ es el ángulo de difracción medido o el ángulo de desviación, de esta manera es posible determinar el tipo de estructura obtenida [44].

$$\lambda = 2d\sin\theta$$

Ecuación 1. Ley de Bragg

Así, las estructuras dependerán de las características fisicoquímicas de los componentes, además del método de fabricación. Los materiales compuestos a base de arcilla y polímeros se pueden preparar por varios métodos (**figura 18**), en particular:

- I. **Intercalación-adsorción de polímeros a partir de una solución:** la arcilla se exfolia en capas simples usando un disolvente en el que el polímero es soluble. El polímero luego se adsorbe sobre las capas delaminadas y cuando el solvente se evapora (o la mezcla precipita), las láminas se vuelven a ensamblar, intercalando el polímero para formar, una estructura multicapa ordenada.
- II. **Intercalación de polímeros a partir de fusión:** la arcilla se mezcla con el polímero fundido. En estas condiciones y si las superficies de la capa son suficientemente compatibles con el polímero elegido, el polímero puede introducirse en el espacio interlamina y formar un nanocompuesto intercalado o exfoliado. En esta técnica, no se requiere solvente.
- III. **Intercalación por polimerización in situ:** la arcilla es dispersada en un medio líquido en presencia de un monómero para que la formación del polímero pueda ocurrir entre las láminas intercaladas. La polimerización puede iniciarse mediante calor, radiación, o mediante la difusión de un iniciador adecuado [45].

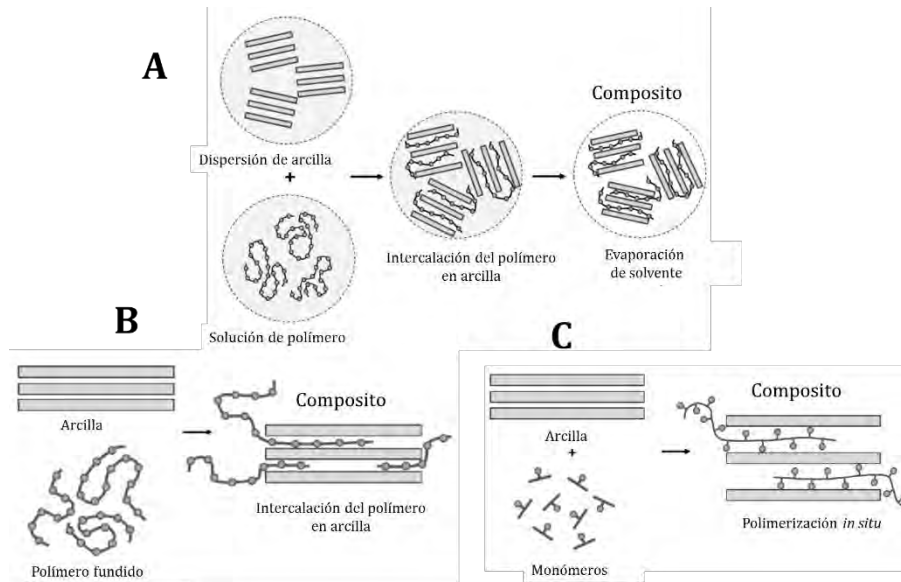


Figura 18. Métodos de preparación de materiales compuestos a base de arcilla y polímeros A- Intercalación-adsorción de polímeros a partir de una solución, B- Intercalación de polímeros a partir de fusión, C- Intercalación por polimerización *in situ* [45]

Durante los últimos años, se ha desarrollado la búsqueda de nuevas estructuras de materiales compuestos a base de arcillas y polímero, mediante la interacción de diversas arcillas con acarreadores coloidales poliméricos como micro y nanopartículas [46].

Así, en la búsqueda de nuevos materiales compuestos se han obtenido diversas estructuras y combinaciones en las que la arcilla puede encontrarse en el exterior (**figura 19-A**) o en el interior del acarreador (**figura 19-B y C**), dependiendo del método de preparación así como las posibles interacciones entre la arcilla y el polímero. Más allá de los métodos clásicos de preparación de materiales compuestos, han surgido métodos que permiten la formación de micro o nano partículas poliméricas, que pueden combinarse con las arcilla de forma *in situ* durante el proceso de polimerización o ensamble como los métodos de emulsión o mini emulsión o mediante una interacción posterior a la síntesis como adsorción o heterocoagulación [46].

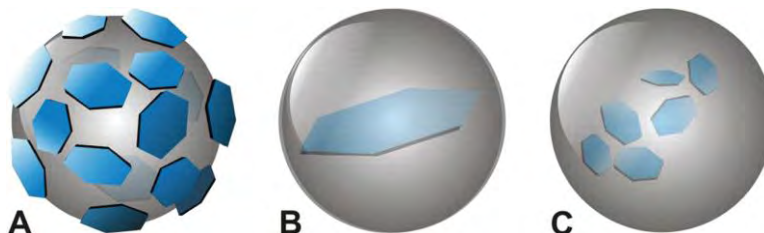


Figura 19. Estructuras de materiales compuestos a base de acarreadores y arcillas [46]

En la literatura, varios autores han reportado sobre la preparación de materiales compuestos a base de acarreadores coloidales y arcillas para la liberación controlada de fármacos, como

la preparación de nanopartículas de PLGA y arcilla montmorillonita mediante el método de emulsificación- evaporación decoradas con anticuerpos para vectorización en el tratamiento de cáncer de mama. En este sistema la arcilla no solo contribuye en la liberación controlada del fármaco, sino que a su vez actúa como un principio activo al disminuir los efectos adversos relacionados a la quimioterapia como náuseas, vómito y diarrea [47].

Otro ejemplo es la preparación de compositos de PLGA y arcilla montmorillonita mediante el método de doble emulsión y evaporación de disolvente, para la liberación controlada de clorhidrato de propranolol. La arcilla además de favorecer la liberación controlada del fármaco es capaz de brindar *mucoadhesividad* para permitir el paso de las nanopartículas a través de la barrera del tracto gastrointestinal [48].

Diversas arcillas han sido estudiadas en la preparación de materiales compuestos y sistemas de liberación de fármacos como caolinita, hidrotalcita, brucita, laponita, etc. Sin embargo, la montmorillonita (MMT) se ha vuelto prominente entre otras arcillas debido a sus diversas propiedades, abundancia, inocuidad al medio ambiente y química bien estudiada. La montmorillonita fue descubierta en 1847 en Montmorillon en la provincia de Vienne en Francia, sin embargo, la presencia de minerales arcillosos tiene un origen natural; por lo tanto, se encuentran en todo el mundo con variaciones en su naturaleza y composición [49]. La MMT es un material natural con gran área de superficie interna, alta capacidad de intercambio catiónico (CIC), alta capacidad de adsorción, capacidad de hinchamiento, baja o nula toxicidad, buena biocompatibilidad y es considerado como un material "generalmente reconocido como seguro" (GRAS) por la FDA. MMT es un silicato de aluminio hidratado estratificado que pertenece al grupo esmectita de los filosilicatos, es un mineral arcilloso poroso, constituye el principal componente de la bentonita. El grosor de la capa de cada plaqueta es del orden de 1 nm y la dimensión lateral es de aproximadamente 200 a 600 nm. Estas plaquetas están compuestas de una lámina Al-octaédrica (O) intercalada entre dos láminas de Si-tetraédrica (T). La sustitución de Si⁴⁺ en la lámina Si-tetraédrica por Al³⁺ y la sustitución de Al³⁺ en la lámina Al-octaédrica por Mg²⁺ produce una carga neta negativa que usualmente es compensada por la adsorción de cationes como Li⁺, Na⁺ y Ca²⁺ ubicados entre las láminas. Dichos cationes pueden ser fácilmente reemplazados mediante intercambio catiónico con cationes de tipo orgánico o inorgánico. Estos cationes también se conocen como cationes intercambiables y la cantidad total de cationes adsorbidos en la arcilla, expresada en miliequivalentes por cien gramos de arcilla seca, se denomina *capacidad de intercambio catiónico (CIC)* [50].

La estructura de lámina triple se apila en capas unidas por fuerzas de Van der Waals en una configuración 2: 1 (T-O-T). Las capas se apilan juntas cara a cara para formar lo que se conoce como red cristalina y la distancia entre el plano en una capa y el plano correspondiente en la siguiente capa se denomina **espaciado basal** o **espacio-c d(001)** [50] (**figura 20**).

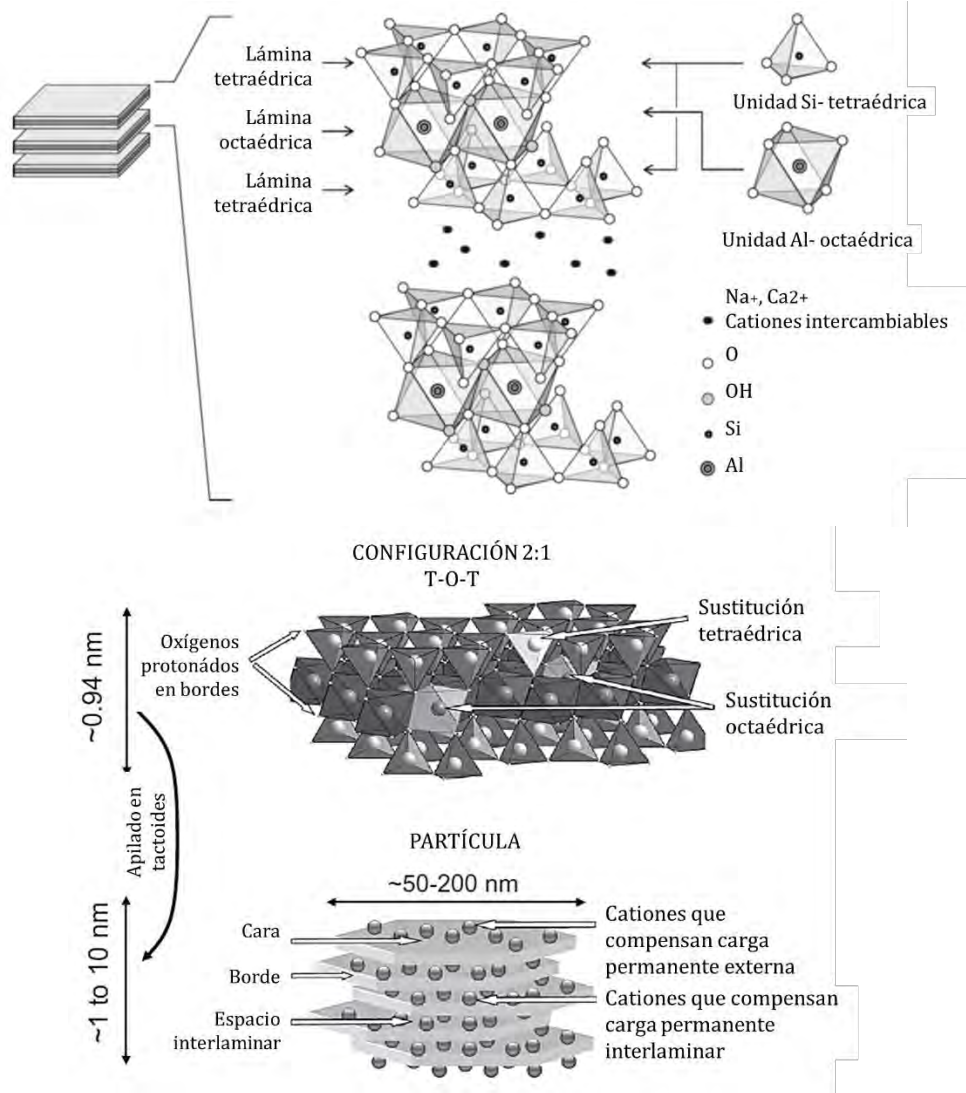


Figura 20. Estructura de una montmorillonita [50]

Además, la MMT posee una carga dependiente del pH en sus bordes (E), la cual se ha reportado posee un punto isoeléctrico (PI) entre 5.0 y 7.0. Esto permite que haya interacciones entre las caras de las láminas (FF), interacciones de borde a cara (EF) y de borde a borde (EE) que conducen a la formación de diferentes arreglos estructurales de partículas como **"casa de naipes"** (**"house of cards"**) a pH <7.0, que son responsables de propiedades reológicas interesantes tales como la viscosidad y la respuesta viscoelástica [11,51,52] (**figura 21**).

La asociación de caras de las láminas FF conduce a morfologías como hojuelas o escamas gruesas y grandes, y la asociación de EF y EE conduce a estructura tridimensional de "casa de naipes". Este tipo de asociaciones también conduce el comportamiento de las arcillas a los fenómenos de agregación y floculación. La agregación se describe mejor por la asociación FF, y se refiere a la formación de agregados en forma de plaquetas paralelas, en este caso disminuye la estructura tipo gel porque reduce el número de unidades disponibles para construir estructuras y la superficie disponible para la interacción de partículas. El fenómeno opuesto a la agregación se conoce como dispersión. Por su parte, la floculación de suspensiones de arcilla ha sido referida como una consecuencia de asociaciones EF y EE, responsables de la estructura continua de tipo gel en las suspensiones de arcilla MMT. Además, se han propuesto otras teorías que sugieren que las propiedades del gel de las dispersiones de arcillas son la consecuencia de las interacciones de largo alcance entre las caras de las partículas [50].

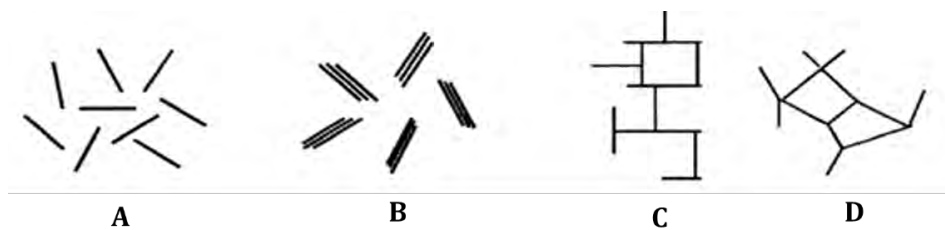


Figura 21. Asociaciones de partículas de arcilla: A-dispersas, B-cara a cara (FF), C-borde a cara (EF) y D-borde a borde (EE) [50]

Además, diversos autores han reportado que dependiendo de las condiciones de pH y la concentración de sales, se pueden formar diferentes arreglos de tipo EE y EF entre partículas de arcilla. Cuando los bordes son positivos, las plaquetas se flexionan hacia una cara negativa. Cuando los bordes son negativos, las plaquetas se ven forzadas a adoptar una orientación de tipo más paralela. Por esta razón, el pH del medio es un parámetro importante relacionado con la estructura del gel de las dispersiones de arcillas (**figura 22**) [50].

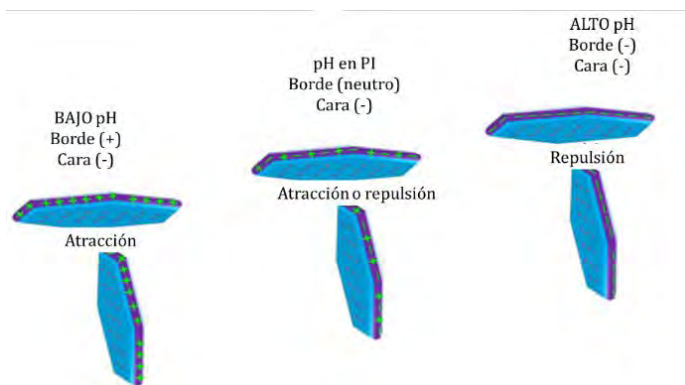


Figura 22. Influencia del pH en las interacciones borde-cara (EF) [50]

2.7 Propiedades reológicas de las arcillas

La agregación de las partículas de arcilla bajo condiciones variables de pH y electrolitos conduce a fuertes variaciones de las propiedades de flujo.

Las propiedades reológicas y, en particular, las propiedades viscoelásticas son factores importantes en diferentes áreas de procesos farmacéuticos. Las mediciones viscoelásticas son herramientas valiosas para el control de calidad de ingredientes y productos finales. La viscoelasticidad afecta los procesos de fabricación como la mezcla, el bombeo, la agitación, el llenado y la esterilización. Además, tiene influencia en la liberación de fármacos desde sistemas de interés que pueden investigarse mediante mediciones viscoelásticas.

El comportamiento al flujo de cualquier sistema se describe en términos de la relación entre el esfuerzo de corte (**shear stress**) (τ) y la velocidad de corte (**shear rate**) ($\dot{\gamma}$). La velocidad de corte se define como el cambio de posición de un elemento de volumen por unidad de tiempo, y el esfuerzo de corte es la fuerza tangencial aplicada por unidad de área. La relación de tensión de corte (τ) y la velocidad de corte, se llama **viscosidad** (η) que es la medida de la resistencia al flujo de un fluido (**ecuación 2**) [50].

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Ecuación 2. Viscosidad

La curva de flujo de esfuerzo de corte en función de la velocidad de corte se denomina curva de consistencia, donde se pueden distinguir cuatro tipos de flujo: **newtoniano**, **adelgazante al flujo o pseudoplástico**, **plástico de Bingham** y **engrosante al flujo o dilatante** (**figura 23**). Cuando el esfuerzo de corte es directamente proporcional a la velocidad de corte, el fluido es **newtoniano** y muestra una viscosidad constante. En los otros tipos de comportamiento de flujo, la viscosidad varía con la velocidad de corte y estos se denominan **fluidos no newtonianos**.

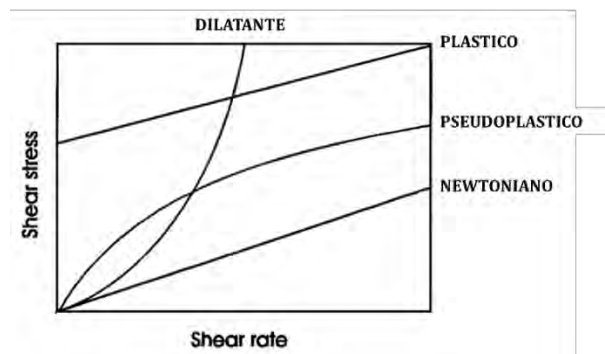


Figura 23. Tipos de fluidos

Se ha reportado que las dispersiones de arcillas pueden presentar comportamientos no newtonianos del tipo adelgazante al flujo y comportamiento de flujo dependiente del tiempo, conocido como tixotropía. Después de mezclar una suspensión de arcillas, la viscosidad disminuye, además, cuando la dispersión de arcilla se somete a una velocidad de cizallamiento constante, la viscosidad disminuye con el tiempo a medida que la estructura tridimensional tipo gel se destruye, hasta que se alcanza una viscosidad de equilibrio. En general, se ha reportado que las propiedades de flujo de las arcillas son dependientes de parámetros como pH, concentración de arcilla, concentración de sales, tipo de sales, etc. Por otra parte para investigar la estructura, estabilidad, floculación y propiedades de flujo de las dispersiones de arcillas es a través de mediciones de sus propiedades viscoelásticas.

Los métodos de medición de las propiedades viscoelásticas se puede realizar mediante una prueba de cizalla oscilatoria, que miden la respuesta de los materiales viscoelásticos a la cizalla oscilatoria de baja amplitud de deformación. En la cizalladura oscilatoria, se define un módulo complejo G^* a través de la **ecuación 3**:

$$\tau(t) = G^*(\omega)\gamma(t)$$

Ecuación 3. Módulo complejo (G^*)

Donde G^* está en función de la frecuencia (ω), t es el tiempo lag de la frecuencia

$$\begin{aligned} G' &= |G^*| \cos \delta \\ G'' &= |G^*| \sin \delta \\ G^* &= G' + iG'' \end{aligned}$$

Ecuación 4. Módulo elástico (G'), ecuación 5. módulo viscoso (G'') y ecuación 6. módulo complejo (G^*) en función de G' y G''

Donde $i = \sqrt{-1}$, G' y G'' representan el **módulo elástico** y **módulo viscoso** respectivamente (**ecuación 4,5 y 6**). El **módulo elástico (G')** es la parte del módulo que está en fase con la deformación, y es una medida de la energía almacenada elásticamente durante un ciclo de deformación. El **módulo viscoso (G'')** es la parte del módulo que está desfasada y da una medida de la energía disipada en un ciclo, representa el componente viscoso [50].

Se ha reportado que en la preparación de materiales compuestos la incorporación de arcilla en el polímero puede mejorar significativamente sus propiedades reológicas y por ende su respuesta viscoelástica, dependiendo de las características fisicoquímicas del polímero y la arcilla. Se ha observado que la adición de arcillas produce un aumento en la viscosidad e induce cambios en el comportamiento de flujo newtoniano a no newtoniano adelgazante al flujo con tixotropía. Dichos cambios se han atribuido a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos silanol de la arcilla y los grupos cargados de los polímeros [45].

Así mediante estudios reológicos de las propiedades viscoelásticas como la determinación de los **módulos G' y G''** es posible evaluar la estructura interna de las dispersiones de materiales compuestos así como las posibles interacciones entre arcillas y polímeros.

2.8 Adsorción en arcillas

Una de las principales características de las arcillas es su gran capacidad de adsorción por la cual han sido ampliamente utilizadas en diversas aplicaciones como la remoción en efluentes o aguas residuales de contaminantes como colorantes [53], fármacos [54] y desechos industriales [55]. Además también se han empleado para la preparación de sistemas de liberación de uso terapéutico mediante adsorción de moléculas de interés como fármacos [56] e incluso ácidos nucleicos [57].

Se conoce como adsorción al proceso que ocurre cuando un soluto (adsorbato) ya sea un gas o líquido se acumula en la superficie de un sólido o un líquido (adsorbente), formando una película molecular o atómica. Generalmente, el adsorbente tiene una captación total fija, donde un soluto particular es reemplazado por otro como en procesos de intercambio iónico. Cuando un adsorbente se pone en contacto con un líquido que contiene un soluto adsorbible, se produce la adsorción hasta que se alcanza el equilibrio o cuando la superficie de un adsorbente se satura con el adsorbato. El proceso de adsorción se puede dividir en dos tipos principales, quimisorción que implica interacciones mediante enlaces químicos y fisorción que se refiere a interacciones moleculares débiles como fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrogeno, electrostáticas, dipolo-dipolo, etc. [58]. En las arcillas, la capacidad de adsorción depende de varios factores como la carga negativa que favorece la adsorción de cationes, porosidad y área superficial que generalmente es directamente proporcional a la capacidad de adsorción, por lo cual también se ha buscado mediante diversos métodos aumentar el área superficial a fin de aumentar la adsorción. Por otro lado, el tamaño de las partículas de las arcilla juega un papel indispensable en las interacciones interfásicas que incluyen procesos de intercambio iónico y adsorción, ya que un menor tamaño de partículas favorece el equilibrio y una capacidad de adsorción casi máxima al reducir la difusión interna y la limitación en transferencia de masa en la penetración del adsorbato dentro del adsorbente [58].

Debido a esto es de gran importancia la caracterización de las propiedades de adsorción de las arcillas mediante técnicas instrumentales, así como un análisis descriptivo del proceso de adsorción mediante modelos matemáticos como las isotermas.

2.9 Isotermas de adsorción

Las isotermas de adsorción describen el mecanismo o proceso de interacción entre moléculas de adsorbato con sustratos que son materiales adsorbentes, en el cual se establece un equilibrio cuando la cantidad de adsorbato que está siendo adsorbido es igual a la cantidad desorbida, de manera que la concentración de la solución al equilibrio permanece constante. Al graficar la concentración en la fase sólida en función de la concentración en la fase líquida representa la isoterma de adsorción al equilibrio.

Existe una gran variedad de teorías de adsorción y modelos disponibles para el análisis y descripción del fenómeno de adsorción incluyendo Langmuir, Freundlich, BET, Tempkin, entre otros. Sin embargo, las ecuaciones empleadas más frecuentemente son Langmuir y Freundlich [59].

2.9.1 Isoterma de Langmuir

El modelo de Langmuir (Langmuir, 1918) se desarrolló originalmente para describir la adsorción de gases a una superficie, sin embargo ha sido usado ampliamente para describir la adsorción de todo tipo de solutos. La isoterma de Langmuir parte de las hipótesis que la adsorción se da en monocapa (la capa adsorbida tiene el espesor de una molécula de adsorbato) y tiene lugar en sitios homogéneos y específicos dentro del adsorbente. Una vez que se ocupa un sitio, no puede haber más adsorción en ese sitio; y la energía de adsorción es constante y no depende del grado de ocupación de los centros activos de un adsorbente. Además, la fuerza de atracción intermolecular disminuye con la distancia y el adsorbente tiene una capacidad finita para el adsorbato, por consiguiente, en el equilibrio, se alcanza un punto de saturación donde no puede ocurrir más adsorción. Finalmente, el adsorbente es estructuralmente homogéneo, es decir todos los sitios son idénticos y energéticamente equivalentes, además considera que no hay interacción entre moléculas adsorbidas y los sitios vecinos [59]. El modelo de Langmuir se representa mediante la **ecuación 7**:

$$q_e = \frac{K_L C_e}{1 + a_L C_e}$$

Ecuación 7. Modelo de Langmuir

Donde C_e ($mg L^{-1}$) y q_e ($mg g^{-1}$) son la concentración de la solución al equilibrio, y la cantidad de adsorbato por gramo de adsorbente, es decir las concentraciones del adsorbato en la fase

líquida y sólida respectivamente. K_L ($L g^{-1}$) y a_L ($L mg^{-1}$) son las constantes de Langmuir; a_L se relaciona a la energía libre o a la entalpía neta de adsorción ($a_L \propto e^{-\Delta H/RT}$), mientras que K_L es la constante de equilibrio de Langmuir. Además, la constante Q ($mg g^{-1}$) (K_L/a_L) que se define como la capacidad de saturación de la monocapa que representa la capacidad de adsorción máxima de un adsorbato en un adsorbente [53].

La linearización de la ecuación de Langmuir (**ecuación 8**) permite calcular los valores de las constantes:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \frac{a_L}{K_L} C_e$$

Ecuación 8. Linearización del modelo de Langmuir

La forma de la isoterma se puede expresar en términos de R_L , una constante adimensional denominada factor de separación o parámetro de equilibrio que se define en relación a a_L y C_0 (concentración inicial) (**ecuación 9**):

$$R_L = \frac{1}{1 + a_L C_0}$$

Ecuación 9. Factor de separación o parámetro de equilibrio

El valor de R_L indica el tipo de isoterma en términos del tipo de interacción siendo (i) no favorable ($R_L > 1$), (ii) lineal ($R_L = 1$), (iii) favorable ($0 < R_L < 1$) e irreversible ($R_L = 0$) [53].

2.9.2 Isoterma de Freundlich

El modelo de Freundlich (**ecuación 10**), es esencialmente una ecuación empírica, y es la relación conocida más antigua que describe el proceso de adsorción. La isoterma supone que los sitios de la superficie del adsorbente tienen un espectro de diferentes energías de enlace [53]. Esta isoterma se emplea para describir un proceso de adsorción con la formación de multicapas con interacciones entre las moléculas adsorbidas. El modelo predice que la adsorción aumentara en relación directa al aumento de la concentración en la fase líquida, ya que no tiene la restricción de una monocapa. El modelo se aplica a la adsorción en superficies heterogéneas y adsorción reversible. La aplicación de la ecuación de Freundlich sugiere que la energía de adsorción disminuye exponencialmente al completarse los centros de adsorción de un adsorbente. La isoterma de Freundlich se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$q_e = K_F C_e^{1/n_F}$$

Ecuación 10. Modelo de Freundlich

Donde C_e ($mg L^{-1}$) y q_e ($mg g^{-1}$) son la concentración de la solución al equilibrio, y la cantidad de adsorbato por gramo de adsorbente, es decir las concentraciones del adsorbato en la fase líquida y sólida respectivamente. K_F ($L^{-1}g$) es la constante de capacidad de adsorción de Freundlich y $1/n_F$ es el factor de heterogeneidad, estas son constantes empíricas que dependen de las condiciones ambientales de la adsorción. El valor de $1/n_F$ se presenta en un intervalo entre 0 y 1 e indica el grado de linealidad entre la concentración de la fase líquida y la cantidad de adsorción, de manera que la relación puede ser lineal ($1/n_F=1$), mediante adsorción química ($1/n_F<1$), o mediante un proceso físico ($1/n_F>1$), mientras más heterogénea sea la superficie del adsorbente el valor de $1/n_F$ será más cercano a 0 [59].

La linearización de la ecuación de Freundlich permite calcular los valores de las constantes de acuerdo a la siguiente **ecuación 11**:

$$\log q_e = \ln K_F + \frac{1}{n_F} \log C_e$$

Ecuación 11. Linearización del modelo de Freundlich

2.10 Mucoadhesión

La bioadhesión se puede definir como el estado en el cual dos materiales, al menos uno de los cuales es de naturaleza biológica, se mantienen unidos durante largos períodos de tiempo por fuerzas interfaciales. Cuando la adhesión es a una membrana de mucosa, el fenómeno se conoce como **mucoadhesión** [60].

Las mucosas son la superficie húmeda que recubren las paredes de diversas cavidades corporales, como el tracto gastrointestinal y respiratorio. El moco está compuesto principalmente de agua (~95.0%), otras moléculas pequeñas (~2.0%) como sales, lípidos, ácidos grasos, fosfolípidos, etc. y glicoproteínas de alto peso molecular (>106) conocidas como mucinas (~3.0%), que son responsables de sus propiedades viscoelásticas y de la formación de estructuras tipo gel. Las mucinas se componen de un esqueleto polipeptídico lineal con cadenas de oligosacáridos con dominios glicosilados que están enriquecidos con residuos de serina y treonina, mientras que los dominios no glicosilados contienen cisteína y otros aminoácidos cargados. El carácter electrostático de la mucina está controlado por residuos de aminoácidos como ácido aspártico (pKa~4), ácido siálico (pKa~2.6) y grupos sulfato (pKa~1), lo que demuestra la importancia del efecto del pH sobre el comportamiento de la mucina [61–63]. La teoría de la mucoadhesión se introdujo en el área de los sistemas de liberación modificada a principio de la década de 1980. Este fenómeno tiene el potencial de optimizar la

liberación controlada de fármacos a través de ventajas como lograr una distribución localizada mediante la colocación espacial por ejemplo dentro del tracto gastrointestinal (TGI) o como en la administración sistémica manteniendo la formulación en contacto íntimo con tejidos o células en el sitio de absorción como en el caso de la vía nasal y vaginal. Además, permite alcanzar una mayor absorción prolongando el tiempo de residencia en el sitio de absorción, como en la vía oral actuando como un mecanismo gastro-retentivo [64].

Actualmente, el fenómeno de mucoadhesión se puede explicar por seis teorías: electrónica, adsorción, humectabilidad, difusión, fractura y mecánica. Sin embargo, de manera general el mecanismo de mucoadhesión se divide en dos pasos: (i) etapa de contacto y (ii) etapa de consolidación. La primera etapa se caracteriza por el contacto entre el material mucoadhesivo y la mucosa, con la propagación e hinchamiento de la formulación, iniciando su contacto profundo con la capa de moco. En la etapa de consolidación los materiales mucoadhesivos se activan por la presencia de humedad, la cual plastifica el sistema, permitiendo que las moléculas cadenas se relajen y se entrelacen mediante interacciones débiles como puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. Básicamente, hay dos teorías que explican el paso de la consolidación: la teoría de la difusión y la teoría de la deshidratación. Según la teoría de la difusión, los materiales mucoadhesivos y las glicoproteínas del moco interactúan mediante la interpenetración de sus cadenas y la formación de enlaces secundarios, lo cual se ve favorecido con materiales con grupos funcionales para formar puentes de hidrogeno (-OH, -COOH), una carga superficial aniónica, alto peso molecular, cadenas flexibles entre otras. De acuerdo con la teoría de la deshidratación, los materiales que son capaces de gelificar fácilmente en un ambiente acuoso, cuando se pone en contacto con el moco pueden causar su deshidratación debido a la diferencia de la presión osmótica. El gradiente de concentración atrae el agua al material mucoadhesivo hasta alcanzar el equilibrio osmótico. El movimiento del agua conduce a la consolidación del enlace adhesivo, pero no una interpenetración de cadenas [65].

En particular, se ha reportado la adición de MMT a polímeros para obtener materiales compuestos a base de arcillas y polímeros para aplicaciones como sistemas de liberación de fármacos, ha demostrado mejorar la captación celular, pero también mejorar la biodisponibilidad oral por un mecanismo de mucoadhesión [48,66]. Algunos autores han informado que la MMT posee una buena bioadhesividad debido a su gran área superficial, propiedades hidrofílicas, carga negativa y posiblemente a la interacción debida a puentes de hidrogeno y fuerzas de Van Der Waals entre los grupos hidroxilo de MMT y las células mucosas

[13]. Se han propuesto varias estrategias *in vitro* para estudiar la mucoadhesión de los sistemas de liberación de fármacos, como mediciones con texturómetros para evaluar la fuerza necesaria para romper las uniones adhesivas, o para evaluar la cantidad de partículas de polímero adheridas a un tejido de la mucosa como elipsometría y reología [67]. Un método reológico *in vitro* que implica el uso de mucinas aisladas del tejido mucoso, fue propuesto por primera vez por Hassan y Gallo (1990), con un ensayo viscosimétrico que expone que la mezcla de polímeros bioadhesivos y una dispersión de mucina mostraron una mayor respuesta reológica que la suma de los valores de los componentes individuales, es decir el polímero y la mucina, lo cual se denominó **sinergismo reológico**. Más tarde, el método se adaptó a pruebas de cizalla oscilatoria para evitar la destrucción de la red polímero-mucina [64,68].

En general, se ha reportado que el entrecruzamiento físico en las cadenas, el cambio conformacional y las interacciones químicas (como puentes de hidrógeno y Van der Waals), que ocurren entre un polímero mucoadhesivo y la mucina (o moco), pueden producir cambios en el comportamiento reológico. Por eso el sinergismo reológico se ha propuesto como un parámetro para determinar las propiedades mucoadhesivas de los materiales *in vitro*. Un valor mayor de sinergismo reológico se relaciona con una interacción más fuerte entre los componentes [69]. El método reológico también se ha empleado para analizar las interacciones de mucina con acarreadores coloidales de fármacos como nanopartículas para la evaluación de la mucoadhesión en nanopartículas de quitosano para liberación de fármacos por vía ocular [70] y nanopartículas que penetran las capas de mucosa [71].

El sinergismo reológico se puede determinar en función de los módulos dinámicos elástico (G') y viscoso (G'') (**ecuación 12 y 13**) que reflejan el comportamiento tipo sólido y tipo líquido respectivamente. El sinergismo reológico o interacción entre el polímero y mucina ($\Delta G'$ y $\Delta G''$) es la diferencia entre las propiedades viscoelásticas de la mezcla sistema-mucina (G'_{mezcla} y G''_{mezcla}) y la suma las propiedades viscoelásticas del sistema ($G'_{sistema}$ y $G''_{sistema}$) y la mucina (G'_{mucina} y G''_{mucina}) [72,73].

$$\Delta G' = G'_{mezcla} - (G'_{sistema} + G'_{mucina})$$

$$\Delta G'' = G''_{mezcla} - (G''_{sistema} + G''_{mucina})$$

Ecuación 12. Sinergismo reológico en función de G' y Ecuación 13. Sinergismo reológico en función de G''

III. JUSTIFICACIÓN

- Frecuentemente la inhibición hepática de síntesis de colesterol, así como los medicamentos convencionales para el tratamiento de la hipercolesterolemia y las enfermedades cardiovasculares, resultan en tratamientos prolongados de baja eficiencia y relacionados a efectos adversos.
- Es necesario el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos que por medio de la combinación de diversos mecanismos disminuyan la concentración del colesterol en sangre para prevención y tratamiento de hipercolesterolemia y enfermedades cardiovasculares.
- Los materiales compuestos (compositos) a base de micropartículas híbridas poliméricas biodegradables y montmorillonita representan una alternativa interesante y prometedora para liberación controlada de atorvastatina cálcica y lograr una disminución del colesterol en la sangre mediante mecanismos combinados.

IV. HIPÓTESIS

- Un nuevo material compuesto (composito) a base de montmorillonita y micropartículas híbridas lípido-polímero acarreadoras de atorvastatina disminuirá las concentraciones plasmáticas de colesterol mediante la combinación de mecanismos de inhibición a nivel hepático e intestinal.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Desarrollar y caracterizar un material compuesto (composito) a base de micropartículas híbridas (lípidο-polímero) y arcilla (montmorillonita) como sistema de liberación controlada de atorvastatina cálcica para disminuir los niveles de colesterol en sangre mediante mecanismos combinados.

5.2 Objetivos particulares

- Seleccionar la arcilla montmorillonita o bentonita (MMT y BEN) para la preparación del composito a través de su caracterización mediante tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI), potencial Z, espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), difracción de rayos X de polvos (XRD), capacidad de intercambio catiónico (CIC), microscopía electrónica de barrido (SEM) y determinación de área superficial y porosidad por el método de BET (S_{BET}).
- Evaluar la capacidad de adsorción de las arcillas mediante isothermas de adsorción de azul de metileno y colesterol.
- Preparar micropartículas híbridas (lípidο-polímero) cargadas con atorvastatina cálcica (AC), empleando el diseño de experimentos mediante un arreglo ortogonal Taguchi.
- Caracterizar las micropartículas mediante diversas técnicas como potencial Z, tamaño de partícula, PDI, eficiencia de entrappe, FT-IR y SEM.
- Preparar el material compuesto (composito) a base de micropartículas híbridas y arcilla seleccionada MMT.
- Caracterizar el sistema preparado, mediante diversas técnicas como FT-IR, XRD, tamaño de partícula, PDI, potencial Z, calorimetría diferencial de barrido (DSC) y SEM.

- Evaluar el perfil de liberación mediante estudios *in vitro* por el método de bolsa de diálisis en diferentes medios simulando condiciones del TGI para las micropartículas híbridas y material compuesto.
- Caracterización de las propiedades reológicas de las micropartículas y material compuesto, mediante pruebas de cizalla simple y oscilatoria, además evaluar el efecto del pH en las propiedades reológicas.
- Realizar estudios *in vitro* de citotoxicidad mediante la determinación de viabilidad celular en cultivo de fibroblastos línea NIH3T3 durante 24 h.
- Evaluar la capacidad de mucoadhesión de las micropartículas y material compuesto mediante pruebas reológicas de cizalla oscilatoria y determinación del sinergismo reológico.

VI. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

6.1 Materiales

Montmorillonita Nanoclay hidrophilic bentonite Nanomer® de Nanocor corporation, montmorillonita K10® y montmorillonita K30® (Sigma-Aldrich), bentonita Tonsil® tratada con H₂SO₄, bentonita Tonsil® modificada con lisina (Süd-Chemie), azul de metileno polvo (Sigma-Aldrich) y colesterol (Central de Drogas S.A de C.V). Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄), hidróxido de sodio (NaOH), ácido clorhídrico (HCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄), cloruro de potasio (KCl) se compraron de J.T. Baker.

Gelatina (tipo B, gel strength ~225 g Bloom), lecitina de soya (*L*- α -Phosphatidylcholine from egg yolk, ~60% TLC), atorvastatina cálcica trihidratada (AC) (Sigma-Aldrich). Glutaraldehído (GA) grado I (25% v/v) (Merck). Bolsas para diálisis de celulosa regenerada (MWCS 12-14 kDa) (Spectra/Por, USA). Se empleó agua ultra pura con 18.2 M Ω cm a 25.0 \pm 1°C obtenida a partir de agua destilada con un equipo Barnstead nanopure diamond system. Todas las soluciones amortiguadoras fueron preparadas de acuerdo a la USP30-NF25. El bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT) y dimetilsulfóxido (DMSO) se compraron de J.T Baker. El medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, glucosa alta, *L*-glutamina, rojo fenol y piruvato de sodio), suero fetal bovino (SFB) y tripsina-EDTA se obtuvieron de Biowest.

6.2 Caracterización de montmorillonitas (MMT) y bentonitas (BEN)

6.2.1 Tamaño de partícula y potencial Z (ξ)

Se determinó el diámetro hidrodinámico, índice de polidispersión (PDI) y potencial Z (ξ) para MMT y BEN mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) usando un equipo Zetasizer Zen3600 (Malvern Instruments) a 25.0 \pm 1.0°C con un ángulo de detección de 173° a una dispersión de cada arcilla en agua desionizada (1mg mL⁻¹) (n=3).

6.2.2 Determinación de capacidad de intercambio catiónico (CIC)

La determinación de CIC (*ecuación 14*) de las arcillas se realizó de acuerdo con el método de prueba estándar para índice de azul de metileno de arcilla (ASTM C 837-81). Se colocó una

cantidad de arcilla (2.0 g) en un vaso de precipitados; se añadió agua desionizada (300.0 mL) y suficiente ácido sulfúrico (H_2SO_4) (5.0 N) para llevar el pH en un intervalo de 2.5 a 3.8. Después de ajustar el pH, se agregó a una bureta una solución de azul de metileno (0.1 meq mL^{-1}) y se añadió (5.0 mL) a la suspensión de arcilla con agitación magnética durante 1 a 2 minutos. Finalmente, se colocó una gota de la suspensión en un papel filtro. La solución de azul de metileno se adicionó en incrementos de 1.0 mL bajo agitación magnética constante. Después de cada adición se añadió una gota de la suspensión de arcilla sobre papel filtro. El punto final se observó por la formación de un halo azul claro alrededor de la gota [74].

$$\text{CIC} = \frac{E \cdot V}{W} 100$$

Ecuación 14. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)

En la **ecuación 14**, **CIC** es la capacidad de intercambio catiónico en equivalentes 100 g^{-1} de arcilla, **E** son equivalentes de azul de metileno por mililitro, **V** son los mililitros de solución de azul de metileno requeridos para la titulación y **W** son los gramos de arcilla seca. Se realizaron determinaciones por triplicado ($n=3$) y se presentan los datos como media \pm DE.

6.2.3 Determinación de área superficial BET (S_{BET}) y porosidad

El área superficial (S_{BET}) Brunauer-Emmett-Teller (BET), volumen total de poro y tamaño promedio de poro se obtuvieron a partir de isotermas de adsorción-desorción de gas nitrógeno (N_2) a 77 K en un equipo Nova 2200e (QuantaChrome Instruments). Las muestras de arcillas ($\sim 0.2 \text{ g}$) se desgasificaron mediante vacío y calentamiento a $120.0 \pm 1^\circ \text{ C}$ durante 24 h, empleando celdas de vidrio de 9.0 mm de tallo largo sin bulbo a una presión relativa de $P/P_0 \sim 0.30$.

6.2.4 Espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

Las montmorillonitas y bentonitas se caracterizaron mediante FT-IR. Los espectros se registraron con un espectrofotómetro Spectrum 400 FTIR/FIR (Perkin-Elmer). Los espectros infrarrojos de las muestras se midieron en un intervalo de longitud de onda de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$.

6.2.5 Difracción de rayos X de polvos (XRD)

Se realizó la caracterización mediante difracción de rayos X de polvos (XRD) de las montmorillonitas y bentonitas, dentro del intervalo del ángulo de dispersión de $2\theta = 2-70$ a una velocidad de $0.01^\circ \text{ s}^{-1}$. Los difractogramas de XRD se obtuvieron con un difractómetro de rayos x, modelo d8 Advance Davinvi y se analizaron con el software Match! 3®.

6.2.6 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se determinó la morfología de las montmorillonitas de estudio como polvo seco, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) empleando un microscopio JSM-35 CF, JEOL a 20.0 kV con recubrimiento de oro.

6.2.7 Isotherma de adsorción de azul de metileno (AM)

Se construyeron isotermas de adsorción de azul de metileno (AM) como catión modelo por triplicado. Se colocó una cantidad conocida de cada arcilla (0.05 mg) mediante una solución stock en contacto con una solución de AM en concentraciones crecientes de 2.0 a 6.5 mg L⁻¹. Se mantuvo en agitación magnética constante a 200.0 rpm durante 30 minutos y posteriormente se centrifugo a 14000 rpm durante 10 minutos (Sorvall Biofuge Primo R). Se analizó el sobrenadante mediante espectrofotometría UV-VIS a la longitud de máxima absorbancia ($\lambda_{\text{max}} = 665.0 \text{ nm}$) empleando un espectrofotómetro S2000 utilizando una fuente de luz de deuterio DT1000, con una interfaz SAD500 (Ocean Optics, Inc.), con una celda de cuarzo de 10 mm de longitud (Prolab). Se determinó la concentración de AM libre mediante una curva de calibración de 9 puntos en un intervalo de concentración de 0.0005 a 0.0065 mg mL⁻¹ (n=3). Los resultados obtenidos se ajustaron a la ecuación lineal de los modelos de Langmuir y Freundlich y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el software Statgraphics Centurion XVIII®.

Se emplearon las ecuaciones lineales de los modelo de Langmuir y Freundlich:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L} + \frac{a_L}{K_L} C_e$$

Ecuación 8. Linearización del modelo de Langmuir

$$\log q_e = \ln K_F + \frac{1}{n_F} \log C_e$$

Ecuación 11. Linearización del modelo de Freundlich

Donde K_L es la constante de Langmuir ($L \text{ mg}^{-1}$), q_{max} es la capacidad de adsorción máxima (mg g^{-1}), que corresponde a la capacidad de adsorción al equilibrio (mg g^{-1}) que se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{M}$$

Ecuación 15. Capacidad de adsorción al equilibrio

Donde C_0 es la concentración inicial de AM (mg L^{-1}), C_e es la concentración de AM al equilibrio (mg L^{-1}), V es el volumen de la solución (L) y M es la masa de la arcilla (g) [55].

6.2.8 Isotherma de adsorción de colesterol

Se construyeron isotermas de adsorción de colesterol como molécula de interés por triplicado. Se colocó una cantidad conocida de cada arcilla (100.0 mg) la cual se dispersó mediante agitación magnética durante 30 minutos en etanol. Posteriormente, se adicionaron concentraciones crecientes de colesterol en el intervalo de 60 a 600 mg L^{-1} mediante una solución stock (3.0 g L^{-1}). Se mantuvo en agitación magnética constante a 150.0 rpm durante 4 horas a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugo a 14000 rpm durante 10 minutos (Sorvall Biofuge Primo R). Se analizó el sobrenadante mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) con una columna de 30 m, con DI 0.320 μm , grosor de 0.25 μm de (5%-fenil)-metilpolisiloxano. Se determinó la concentración de colesterol libre mediante una curva de calibración de 7 puntos en un intervalo de concentración de 0.1-0.5 mg mL^{-1} ($n=3$). Los resultados obtenidos se ajustaron a la ecuación lineal de los modelos de Langmuir y Freundlich y se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con el software Statgraphics Centurion XVIII®.

6.3 Preparación de micropartículas híbridas lípido-polímero (MP)

Se prepararon micropartículas híbridas a base de lípidos y polímeros (MP) mediante el método de desolvatación en dos pasos previamente reportado en la literatura con algunas modificaciones [9,41]. Se disolvió la gelatina (GEL) en agua desionizada a $40.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ con agitación magnética constante a 250 rpm. Se adicionó acetona como agente de desolvatación para precipitar las cadenas de GEL de alto peso molecular (HMW). El sobrenadante se eliminó por decantación y el precipitado se redisolvió en agua desionizada a $40.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$, posteriormente la solución de GEL se ajustó a un pH de 3.0 ± 0.1 con HCl 0.2 M. Por otro lado, se

disolvió atorvastatina cálcica (AC) y lecitina de soya (100.0 mg) en metanol a temperatura ambiente y mediante agitación magnética constante. La solución de AC/lecitina se añadió gota a gota con bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson) a la solución de GEL manteniendo agitación magnética constante. El metanol se evaporó a temperatura ambiente durante 12 h y se añadió acetona gota a gota con agitación constante para precipitar las MP híbridas. Finalmente, se añadió una solución acuosa de glutaraldehído (2.0 % v/v) como agente entrecruzante y se mantuvo en agitación magnética constante durante 12 h.

A fin de optimizar la metodología de obtención de MP se investigó el efecto de diversas condiciones en la fabricación de las MP evaluando el efecto de la velocidad de agitación (rpm), cantidad inicial de atorvastatina (mg), volumen de adición del fármaco (metanol, mL), volumen del agente de desolvatación (acetona, mL), concentración de la solución de gelatina (mg mL⁻¹) y volumen del agente entrecruzante (2.0 % v/v, µL) (**tabla 2**).

Se empleó un diseño de experimentos con un arreglo ortogonal Taguchi L8 2x6 para estudiar el efecto de 6 factores con dos niveles (-1.0 y 1.0). Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos con el software Statgraphics Centurion XVIII®, evaluando 3 variables respuesta: tamaño de partícula (nm), PDI y potencial Z (mV) para 6 repeticiones cada uno (n=6) (**tabla 3**).

Tabla 2. Niveles de factores para arreglo ortogonal L8 2x6

	Factor	Nivel bajo (-1)	Nivel alto (1)
A	Velocidad de agitación (rpm)	500	750
B	Cantidad de atorvastatina (mg)	10	20
C	Volumen de metanol (mL),	5	10
D	Volumen del agente de desolvatación (acetona, mL)	5	10
E	Concentración de gelatina (mg mL ⁻¹)	10	20
F	Cantidad de agente entrecruzante (glutaraldehído 2% v/v, µL)	25	50

Tabla 3. Arreglo ortogonal L8 2x6

Experimento	Factores					
	A	B	C	D	E	F
E1	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0	-1.0
E2	-1.0	-1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
E3	1.0	1.0	-1.0	-1.0	1.0	1.0
E4	1.0	1.0	1.0	1.0	-1.0	-1.0
E5	-1.0	1.0	-1.0	1.0	-1.0	1.0
E6	-1.0	1.0	1.0	-1.0	1.0	-1.0
E7	1.0	-1.0	-1.0	1.0	1.0	-1.0
E8	1.0	-1.0	1.0	-1.0	-1.0	1.0

6.4 Preparación del material compuesto micropartículas híbridas/montmorillonita (MP/MMT)

A fin de determinar las condiciones de preparación del material compuesto, se determinó el potencial Zeta (ξ) de las MP (formulación final) y la arcilla seleccionada mediante la técnica de movilidad electroforética a diferentes valores de pH ($n=3$). La carga superficial se determinó con una dispersión de cada muestra (100.0 μ L) diluida a 1.5 mL con solución de NaCl 10 mM ajustando el pH a valores entre 3.0 ± 0.1 y 8.0 ± 0.1 , empleando HCl 0.2 M o NaOH 0.2 M. La solución de NaCl se empleó para compensar el efecto de la conductividad resultante de la adición de HCl o NaOH [75].

Posteriormente el material compuesto (MP/MMT) se preparó mediante el método de exfoliación/adsorción y evaporación previamente reportado en la literatura con ligeras modificaciones [76]. Se dispersó una cantidad de arcilla MMT (50.0 mg) en agua desionizada y se ajustó a un valor de pH de 3.0 ± 0.1 (2.0 mL) con HCl 0.2 M y se sonicó durante 30 minutos a temperatura ambiente con una frecuencia de 42.0 kHz (Cole-Parmer 8890). Se añadió una dispersión de MP (5.0 mL), previamente ajustada a un pH de 3.0 ± 0.1 , gota a gota con bomba peristáltica (Minipuls 3, Gilson) a la dispersión de arcilla MMT y se mantuvo en agitación magnética constante durante 1.0 h a 750 rpm en condiciones ambientales. La dispersión del material compuesto MP/MMT se vertió en una caja de Petri y se secó a temperatura ambiente durante 12 h.

6.5 Caracterización de las micropartículas híbridas (MP) y material compuesto (MP/MMT)

6.5.1 Determinación de la eficiencia de entrapamiento (%) de MP

Se determinó la eficiencia de entrapamiento (%) mediante la cuantificación espectrofotométrica UV-VIS de la atorvastatina cálcica contenida en la dispersión de MP ($n=3$). Se colocó una alícuota de 0.5 mL de MP y se mezcló con 1.0 mL de acetona, posteriormente se sonicó durante 1.0 h a temperatura ambiente con una frecuencia de 42.0 kHz (Cole-Parmer 8890) y se centrifugó (Biofuge Primo R) a 14000 rpm durante 1.0 h. Se determinó la absorbancia del sobrenadante a la longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\max}=243.43$ nm) con un espectrofotómetro S2000 utilizando una fuente de luz de deuterio DT1000, con una interfaz SAD500 (Ocean Optics, Inc.), empleando una celda de cuarzo de 10 mm de longitud (Prolab). Se preparó una curva de

calibración de atorvastatina cálcica en metanol en un intervalo de 0.5 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de un stock de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (n=3) y se evaluó la linealidad de los resultados mediante un análisis de varianza (ANOVA) empleando el software Statgraphics Centurion XVIII®.

La eficiencia de entrapamiento (**ecuación 16**) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Eficiencia de entrapamiento (\%)} = \frac{\text{Cantidad de AC en micropartículas}}{\text{Cantidad total de AC}} \times 100$$

Ecuación 16. Eficiencia de entrapamiento

6.5.2 Tamaño de partícula y potencial Zeta (ξ)

Se determinó el diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersión (PDI) para las MP y el material compuesto (MP/MMT) utilizando la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) con un equipo Zetasizer Zen3600 (Malvern Instruments) a $25.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ con un ángulo de detección de 173° (n=3). Además, se determinó el potencial Z (ξ) de una dispersión de MP y MP/MMT mediante una dilución de 100 μL en 1.5 mL de agua desionizada (n=3).

6.5.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Las MP, el material compuesto (MP/MMT) y los componentes individuales (gelatina, lecitina de soya y AC) se caracterizaron mediante FT-IR. Los espectros se registraron con un espectrofotómetro Spectrum 400 FT-IR (Perkin-Elmer). Los espectros infrarrojos de las muestras se midieron en un rango de longitud de onda de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

6.5.4 Difracción de rayos X de polvos (XRD)

Se realizó la caracterización del material compuesto (MP/MMT) mediante difracción de rayos X de polvos (XRD) dentro del intervalo del ángulo de dispersión de $2\theta = 2\text{-}70$ a una velocidad de 0.01° s^{-1} con un difractómetro de rayos x, modelo d8 Advance Davinvi. Para evaluar el efecto del pH sobre la interacción entre MMT y MP en la preparación del material compuesto, se preparó el material compuesto de acuerdo a la metodología del punto 5.4 empleando un ajuste del pH a diferentes valores; 1.6, 3.0, 5.0, 6.5 y 7.0, usando HCl 0.2 M o NaOH 0.2 M. Los difractogramas se registraron posterior a un proceso de secado a temperatura ambiente durante 12 h y se analizaron con el software Match! 3®.

6.5.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se determinó la morfología de los sistemas preparados (MP y MP/MMT) mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) (JSM-35 CF, JEOL) con 20 kV. Se depositó una gota de la dispersión MP o material compuesto MP/MMT, la cual se secó al aire en condiciones ambientales y se recubrió con oro para obtener una superficie conductora, finalmente, la muestra se analizó al vacío. Además, se evaluó el efecto del pH sobre la morfología final del material compuesto (MP/MMT), mediante SEM, la cual se analizó en MP/MMT preparado de acuerdo a la metodología del punto 5.4, en diferentes condiciones de pH ($\text{pH} = 3.0 \pm 0.1$ y 7.0 ± 0.1) ajustado con HCl 0.2 M o NaOH 0.2 M.

6.5.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para evaluar el comportamiento térmico de los sistemas preparados, se realizaron análisis mediante DSC calentando las muestras de AC, MP y MP/MMT en un intervalo de temperatura de 0.0°C a 300.0°C con una velocidad de calentamiento de $10.0^\circ\text{C min}^{-1}$ bajo una atmósfera de nitrógeno en un calorímetro (TA Instruments).

6.6 Caracterización reológica

Se realizó la caracterización reológica de los sistemas preparados empleando un reómetro de esfuerzos controlados modelo Discovery HR3® (TA Instruments) con una geometría de cilindros concéntricos (21.96 mm de diámetro exterior, 20.38 mm de diámetro interno, 59.90 mm de altura y 500 μm de gap).

Donde, para analizar el efecto del pH sobre el comportamiento reológico, las MP y el material compuesto (MP/MMT) (10 mg mL^{-1}) fueron resuspendidos en agua desionizada a $25.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$, posteriormente se ajustó el $\text{pH} \pm 0.1$ a 3.0, 4.8 y 7.0 usando HCl 0.2 M o NaOH 0.2 M. Las muestras se caracterizaron mediante pruebas de cizalla simple en un intervalo de flujo de 1 a 100 s^{-1} , y de cizalla oscilatoria en el régimen viscoelástico lineal, previamente determinado para cada condición experimental ($\gamma < 50\%$) a $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ (baño de agua circulante Cole Parmer Polystat y Peltier AR-G2). Las frecuencias angulares (ω) de las pruebas variaron de 1 a 100 rad s^{-1} a $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$. Los módulos G' (elástico) y G'' (viscoso) se determinaron para analizar el comportamiento viscoelástico de las muestras [77].

6.7 Estudios de liberación de *in vitro*

El perfil de liberación de los sistemas preparados se evaluó mediante el método de bolsa de diálisis para lo cual se colocó una cantidad conocida de las MP o el material compuesto (MP/MMT) en una bolsa de diálisis de celulosa regenerada (MWCS 12-14 kDa, Spectra/Por) previamente hidratada en agua desionizada a temperatura ambiente durante 12.0 h. La bolsa de diálisis se suspendió en el medio de liberación (100.0 ml) a $37.0 \pm 1^\circ\text{C}$ en un vaso de precipitados cerrado con agitación magnética constante (250.0 rpm) (**figura 24**). El estudio se llevó a cabo utilizando diferentes medios para simular las condiciones de pH de tracto gastrointestinal (TGI) dado que es un sistema diseñado para vía oral, considerando el tiempo de tránsito y el efecto de la ingesta de alimentos sobre el pH [78]. Para evaluar el estado de ayuno (FAS), es decir la ausencia de alimentos en el TGI, la bolsa de diálisis se colocó en el fluido gástrico simulado (FGS), el cual consistió en una solución amortiguadora de ácido clorhídrico (HCl) pH 1.6 ± 0.1 (FAS-FGS) y se mantuvo con agitación magnética constante durante 2.0 h. Posteriormente, la bolsa se transfirió a fluido intestinal simulado (FIS) (100.0 ml) consistente en una solución amortiguadora de fosfato de potasio pH 6.5 ± 0.1 (FAS-FIS) y se mantuvo durante 6.0 h. Finalmente, la bolsa se extrajo y se sumergió en fluido colónico simulado (FAS-FCS) (100.0 ml), el cual consistió en una solución amortiguadora de fosfato de potasio pH 7.0 ± 0.1 (FAS-SCF) durante 40 h. Para el estado de alimentación, es decir considerando el cambio de pH debido a la ingesta de alimentos (FED), se usó una solución amortiguadora de acetatos a pH 5.0 ± 0.1 (FED-FGS), una solución amortiguadora de fosfatos con un pH de 5.8 ± 0.1 (FED-FIS) y un pH de 7.0 ± 0.1 (FED-FCS) (**tabla 4**). A intervalos de tiempo determinados, se extrajo un volumen del medio de liberación y se analizó mediante un método espectrofotométrico UV-VIS. Se realizó la reposición del medio añadiendo una cantidad igual de medio fresco, que se precalentó a $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$, después de cada toma de muestra para mantener las condiciones sink. Se realizó la cuantificación espectrofotométrica UV-VIS de la AC a la longitud de onda de máxima absorbancia ($\lambda_{\text{max}}=243.43$ nm). El análisis se realizó en un espectrómetro S2000 utilizando una fuente de luz de deuterio DT1000, puerto SAD500 (Ocean Optics, Inc.) con una celda de cuarzo de 10 mm de longitud (Prolab).

Tabla 4. Condiciones de pH para medio de liberación

Región TGI	Estado de ayuno (FAS)	Estado alimentado (FED)	Tiempo (h)
Fluido Gástrico	1.6	5.0	2.0
Fluido Intestinal	6.5	5.8	6.0
Fluido Colónico	7.0	7.0	40.0

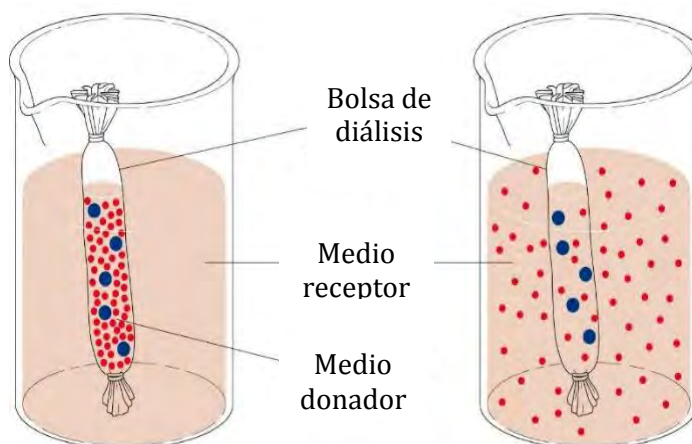


Figura 24. Método de bolsa de diálisis

Para la cuantificación de AC se construyeron curvas de calibración para cada valor de pH de 6 puntos cada una, en un intervalo de concentración de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$ ($n=3$). La linealidad de los resultados se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA). Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo. El procesamiento de datos se realizó empleando el software estadístico Statgraphics Centurion® XVIII.

Los resultados obtenidos de perfiles de liberación de AC a partir de las micropartículas híbridas y el material compuesto (MP/MMT) en las diferentes condiciones, se ajustaron al modelo matemático de liberación de Korsmeyer-Peppas (1983-1985). Dicho modelo consiste en una ecuación semi-empírica desarrollada para describir la liberación de fármacos de sistemas poliméricos (**ecuación 17**):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

Ecuación 17. Modelo de Korsmeyer-Peppas

Donde, M_t / M_∞ es la fracción de fármaco liberada en el tiempo t , k es la constante de velocidad de liberación y n es el exponente de liberación. El valor de n se usa para caracterizar diferentes mecanismos de liberación, de modo que $n = 0.5$ corresponde a la difusión de Fick, los valores de n entre 0.5 y 1.0 corresponden a un transporte no Fickiano (anómalo) y $n = 1.0$ corresponde al transporte del Caso II (relajamiento). Generalmente, este modelo se usa para analizar la liberación de fármacos a partir de formulaciones poliméricas cuando el mecanismo no es bien conocido o cuando podría estar involucrado más de un tipo de mecanismo de liberación. El análisis del ajuste se realizó mediante la determinación del coeficiente R-cuadrado (R^2) [79].

6.8 Evaluación de citotoxicidad

Se realizó un estudio de citotoxicidad, para lo cual se empleó un cultivo celular de fibroblastos de la línea NIH3T33T3 en medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, glucosa alta, L-glutamina, rojo fenol y piruvato de sodio) complementado con 10.0% de suero fetal bovino (SFB) y penicilina-estreptomicina al 1.0% a 37.0 ± 1.0 °C en una incubadora con una atmosfera de 5.0% de CO₂. El medio se renovó cada dos días y las células se subcultivaron después de alcanzar la confluencia. Las células se recogieron por tripsinización usando una solución de tripsina al 0.25%.

La citotoxicidad se determinó evaluando la viabilidad celular (*ecuación 18*) de cultivos expuestos a una dispersión de MP, MMT Nanoclay®, y material compuesto de MP/MMT cargados con AC mediante el ensayo con MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro). Se sembraron células de fibroblastos NIH3T33T3 en placas de 96 pozos a una densidad de 5000 células por pozo y se cultivaron en una incubadora con una atmosfera de CO₂ al 5.0% a 37.0 ± 1.0 °C en medio DMEM, complementado con 10.0% de SFB. Después de que las células formaron la monocapa, el medio se reemplazó y se agregó la dispersión acuosa de diferentes concentraciones de MP (0.50 a 9.7×10^3 $\mu\text{g mL}^{-1}$), MMT (0.25 a 4.85×10^3 $\mu\text{g mL}^{-1}$), MP/MMT (0.71 - 13.58×10^3 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Después de 24.0 h, se eliminó el medio y los pozos se lavaron con PBS. Se añadió la solución de MTT (100 μL , 0.5 mg mL^{-1}) a cada pozo y se incubó durante 4.0 h con 5.0% de CO₂ y 37.0 ± 1.0 °C. Posteriormente se eliminó la solución del cultivo, y el precipitado de cristales de formazán se disolvió en DMSO (100.0 μL) y se analizó mediante espectrofotometría UV-VIS (Multiskan Ex Thermo Scientific) con una medida de absorbancia a una longitud de onda de máxima absorción ($\lambda_{\text{max}}=570.0$ nm) después de agitar vigorosamente durante 60 s. La viabilidad celular se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia control}} \times 100$$

Ecuación 18. Viabilidad celular

Se determinó la IC₅₀, que es la concentración con inhibición del 50.0% del crecimiento celular en comparación con el grupo control, y se calculó a partir de la viabilidad celular frente a la concentración en una gráfica semi logarítmica. Se tomaron medidas de 12 repeticiones y los datos se presentaron en media \pm DE. Todas las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA), donde un valor de ($p < 0.05$) se consideró

estadísticamente significativo. El procesamiento de datos se realizó mediante el software estadístico Statgraphics Centurion® XVIII.

6.9 Evaluación de mucoadhesión

Finalmente, se prepararon dispersiones de mucina de estómago de cerdo (tipo II, ácido siálico, $\leq 1.2\%$) en fluido gástrico simulado (FGS) utilizando una solución amortiguadora de ácido clorhídrico (HCl) a pH 1.6 ± 0.1 y fluido intestinal simulado (FIS) el cual consistió en una solución amortiguadora de fosfato de pH 6.5 ± 0.1 . La mucina seca se dispersó con agitación magnética suave durante 3.0 h a temperatura ambiente para producir una concentración final de 5.0% p/p. La dispersión de Mucina obtenida se mezcló con una dispersión de cada sistema, es decir, MMT, MP o MP/MMT recién preparada y dispersada en el mismo medio de estudio con agitación magnética durante 30 minutos. Los componentes individuales (mucina, MMT, MP o MP/MMT) y las mezclas de sistema+mucina (MMT+mucina, MP+mucina o MP/MMT+mucina) se caracterizaron mediante pruebas de cizalla oscilatoria en el régimen viscoelástico lineal a $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ (baño de agua circulante Cole Parmer Polystat y Peltier AR-G2) para simular la temperatura fisiológica. Los módulos G' (elástico) y G'' (viscoso) se determinaron para analizar el comportamiento viscoelástico de las muestras individuales y sus posibles interacciones. Todas las mediciones reológicas se realizaron en un reómetro de esfuerzos controlados modelo Discovery HR3® (TA Instruments) con una geometría de cilindros concéntricos (21.96 mm de diámetro exterior, 20.38 mm de diámetro interno, 59.90 mm de altura y 500 μm de gap). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Se determinó el sinergismo reológico ($\Delta G'$) en función del módulo elástico (G') de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Delta G' = G'_{\text{mezcla}} - (G'_{\text{sistema}} + G'_{\text{mucina}})$$

Ecuación 12. Sinergismo reológico

Donde G'_{sistema} se refiere al módulo elástico de las dispersiones individuales de MP, MMT y MP/MMT, G'_{mucina} es el valor de la mucina individual y G'_{mezcla} corresponde al módulo elástico de las mezcla mucina+sistema (mucina+MP, mucina+MMT, y mucina+MP/MMT) a los diferentes valores de pH.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de montmorillonita (MMT) y bentonita (BEN)

Se partió de un grupo de 5 arcillas de las cuales se emplearon 3 tipos de montmorillonitas (MMT) disponibles comercialmente y 2 tipos de bentonitas (BEN) modificadas, a fin de seleccionar la arcilla para la preparación del material compuesto (*tabla 5*).

Tabla 5. Arcillas MMT y bentonitas caracterizadas para selección

Nombre	Proveedor	Clave
Arcilla montmorillonita Nanoclay hidrophilic bentonite Nanomer®	Nanocor Corporation	MMT Nanoclay®
Arcilla montmorillonita K10®	Aldrich	MMT K10®
Arcilla montmorillonita K30®	Fluka	MMT K30®
Bentonita Tonsil® tratada con H₂SO₄	Süd-Chemie	BEN- AC
Bentonita Tonsil® modificada con Lisina	Süd-Chemie	BEN-LYS

Usualmente, una combinación de diversas técnicas instrumentales se emplea para caracterizar las arcillas en cuanto a estructura, pureza, propiedades superficiales, cristalinidad, etc. de acuerdo a las aplicaciones deseadas. Las arcillas se caracterizaron a través de la determinación de tamaño de partícula y PDI mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS), potencial Z mediante la movilidad electroforética, área superficial (S_{BET}) y porosidad por el método de BET, difracción de rayos X de polvos (XRD), espectroscopía infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR), capacidad de intercambio catiónico (CIC) por el método de titulación con AM y microscopía electrónica de barrido (SEM). Posteriormente, se realizaron isotermas de adsorción de AM y colesterol.

Es bien sabido que las propiedades de las arcillas dependen de su estructura y composición, sin embargo, se ha reportado que las condiciones de mezclado y la duración afectan en gran medida las propiedades finales de las dispersiones de arcilla. Por lo tanto, una dispersión adecuada de la arcilla puede ser un paso crítico para mejorar la interacción entre partículas de arcilla y partículas de interés para la formación de materiales compuestos [80].

Se ha reportado que las partículas de MMT y BEN, consisten en agregados de láminas, las cuales pueden variar de tamaño de 0.1 a 2.0 μm de diámetro con un tamaño promedio de $\sim 0.5 \mu\text{m}$ y un espesor de 1-2 nm. Mediante DLS se confirmó que todas las arcillas se dispersaron adecuadamente ya que presentaron una talla nanométrica posterior a un proceso de agitación

magnética y sonicación alcanzando un tamaño alrededor de los 500nm (**tabla 6**). Los resultados obtenidos coinciden con valores previamente reportados en la literatura, indicando que las arcillas se encontraban formando una dispersión coloidal [81,82]. En cuanto a PDI se observó que los resultados se encontraron en un intervalo de ~0.3 a 0.7, estas diferencias en la uniformidad de sus dispersiones se puede deber principalmente a sus diferencias estructurales y de origen, ya que son de proveedores diferentes. Entre las arcillas estudiadas sobresale la MMT Nanoclay®, la cual presentó los valores más bajos de tamaño de partícula y PDI (~0.3) indicando una dispersión de tamaño de partícula pequeño y uniforme lo cual es una característica de gran interés en el desarrollo de sistemas de liberación modificada.

Otra de las características importantes de las arcillas es la carga superficial negativa, esta es de gran interés en la preparación de materiales compuestos, ya que las arcillas pueden interactuar con diversas moléculas mediante diferentes tipos de fuerzas, entre las cuales destacan las interacciones electrostáticas. Por lo cual se determinó el potencial Z mediante la movilidad electroforética, con lo que se observó la carga superficial negativa presente en la cara de las láminas (F), por la sustitución isomórfica en la estructura T-O-T (**tabla 6**).

Todas las arcillas presentaron potencial Z negativo, sin embargo, las MMT Nanoclay® y MMT K30® presentaron los valores más bajos de potencial ($\xi \leq -30$ mV), mientras que las BEN presentaron los valores más altos ($\xi \sim -12$ mV).

Tabla 6. Caracterización de arcillas MMT y BEN

Arcilla	Tamaño de partícula <i>d</i> (nm) ±DE (n=3)	PDI ±DE (n=3)	Potencial Z (mV) ±DE (n=3)	CIC (meq/100g) ±DE (n=3)
MMT Nanoclay®	478.70±24.38	0.39±0.01	-38.20±0.50	75.77±2.39
MMT K30®	577.66±19.86	0.70±0.18	-24.07±0.96	50.5 ± 1.374
MMT K10®	563.67±67.57	0.68±0.17	-33.07±1.40	53.2 ± 3.055
BEN-AC	570.67±83.70	0.43±0.13	-12.80±0.36	54.9 ± 0.088
BEN-LYS	571.00±103.01	0.51±0.20	-12.23±0.64	49.8 ± 0.066

Uno de los principales atributos de las arcillas es su gran área superficial disponible, la cual se determinó por el método de BET. Se encontró que la MMT K10® y K30® presentaron los valores más altos de área superficial (~240 m²/g) valores muy cercanos a lo reportados por el proveedor (220-270 m²/g), mientras que la MMT Nanoclay presentó el valor más bajo con 54.94 m²/g (**tabla 6**). La MMT K10® y MMT K30® son de origen natural, disponibles comercialmente las cuales han sido modificadas mediante un tratamiento ácido (H₂SO₄) a fin de incrementar el área superficial, sin embargo, dicho tratamiento también produce cambios

significativos en la estructura de la arcilla pues los cationes interlaminares son intercambiados por protones del ácido. Además, los protones pueden atacar los bordes de las láminas produciendo su disgregación o ruptura generando materiales amorfos o de fases poco cristalinas y altamente porosas. En el caso de BEN-LYS el valor obtenido es similar a otros reportados previamente en la literatura ($\sim 82 \text{ m}^2/\text{g}$). Mientras que para BEN-AC también se observó una mayor área superficial debido al tratamiento ácido [83] (**tabla 7**).

También se determinó la CIC, si bien existen una gran variedad de métodos para su determinación, la titulación con azul de metileno (AM) es un método rápido y ampliamente utilizado, el cual consiste en la adsorción de moléculas de AM en la superficie de la arcilla mediante un proceso de intercambio catiónico (**tabla 6**).

La disposición de cationes de AM en la superficie y el área cubierta por cada molécula depende de la carga de la superficie. Al realizar una titulación de una arcilla dispersa en agua, se asume la formación de una capa de AM en la superficie hasta que se alcanza un punto específico cuando se detectan trazas de AM libre en la solución, lo cual se confirma con la tinción en papel filtro. A concentraciones bajas de AM todo el colorante es adsorbido por la arcilla y solo fluiría agua de la gota. Si se excede en la cantidad máxima el AM libre se puede observar como un halo azul alrededor de la gota de dispersión de arcilla.

De acuerdo a la literatura la MMT presenta una CIC de 70 a 130 meq 100g^{-1} [84], pero los resultados obtenidos van de ~ 49 a 75 meq/100g. En general se observó que las MMT presentaron valores más altos respecto a las BEN, sin embargo, es importante mencionar que la CIC y el área superficial no presentaron una relación directamente proporcional, ya que las arcillas MMT K30® y MMT K10® a pesar de que presentaron los valores más altos de área superficial tuvieron valores bajos de CIC respecto a MMT Nanoclay®. Diversos autores han reportado que la modificación estructural de las arcillas con tratamiento ácido tiene un impacto reduciendo la CIC en función de la concentración, tiempo y tipo de ácido. Los valores de CIC dependen de la cantidad de sustituciones isomórficas en sitios octaédricos, por lo que con el tratamiento ácido se ven reducidos por una lixiviación de cationes de Mg y Fe sustituidos en las láminas octaédricas [85,86]

Tabla 7. Caracterización de arcillas mediante método de BET

Arcilla	Área superficial (S_{BET}) (m^2/g)	Volumen total de poro (cc/g)	Radio promedio de poro (Å)
MMT Nanoclay®	54.94	2.76e-02	10.06
MMT K30®	242.75	1.21e-01	9.99
MMT K10®	241.37	1.19e-01	9.89

BEN-AC	179.88	8.984e-02	9.98
BEN-LYS	82.70	4.048e-02	9.79

En cuanto a porosidad, de acuerdo a la IUPAC los materiales porosos se clasifican conforme al tamaño del poro, si el tamaño de poro es inferior a 2 nm se denominan microporos (Mi), poros entre 2 y 50 nm se denominan mesoporos (Me), y poros de más de 50 nm se consideran macroporos (Ma).

En la MMT natural predominan los poros de tipo Me y Mi con un diámetro de ~3 nm. Sin embargo, el tratamiento con ácido conduce a la aparición de poros, sin bien no hay un aumento significativo en el tamaño medio de poro se ha reportado un aumento del volumen total de poro, lo cual concuerda con los resultados obtenidos ya que se observó que todas las arcillas presentaron valores similares de radio promedio de poro ~10 Å, por lo que de acuerdo a la IUPAC se consideran microporos, las arcillas tratadas con ácido (MMT K10®, MMT K30® y BEN-AC) presentaron los valores más altos de volumen total de poro [86,87] (*tabla 7*).

Posteriormente se realizó la caracterización mediante XRD en un intervalo de 2θ a 70θ . Se observaron los picos característicos de la MMT alrededor de 6θ (001), 17θ (003), 19θ (020-110), 34θ (130-200) y 61θ (060-033) (*figura 25*).

También se observaron picos correspondientes a impurezas de cuarzo (C) alrededor de 20θ (100) y 26θ (101), mientras que en 23θ (102) y 29θ (104) se observaron los picos característicos de impurezas de dolomita (D). En general, se observó que las BEN presentaron una mayor cantidad de señales de impurezas respecto a las MMT, siendo la MMT Nanoclay® la de mayor pureza, mientras que las MMT K10 y K30 presentaron intensas señales alrededor de 26θ que corresponden a la señal de Cuarzo.

En el caso de MMT K10® y K30® la señal correspondiente al plano (001) se ve disminuida, mientras que para las bentonitas desaparece por completo.

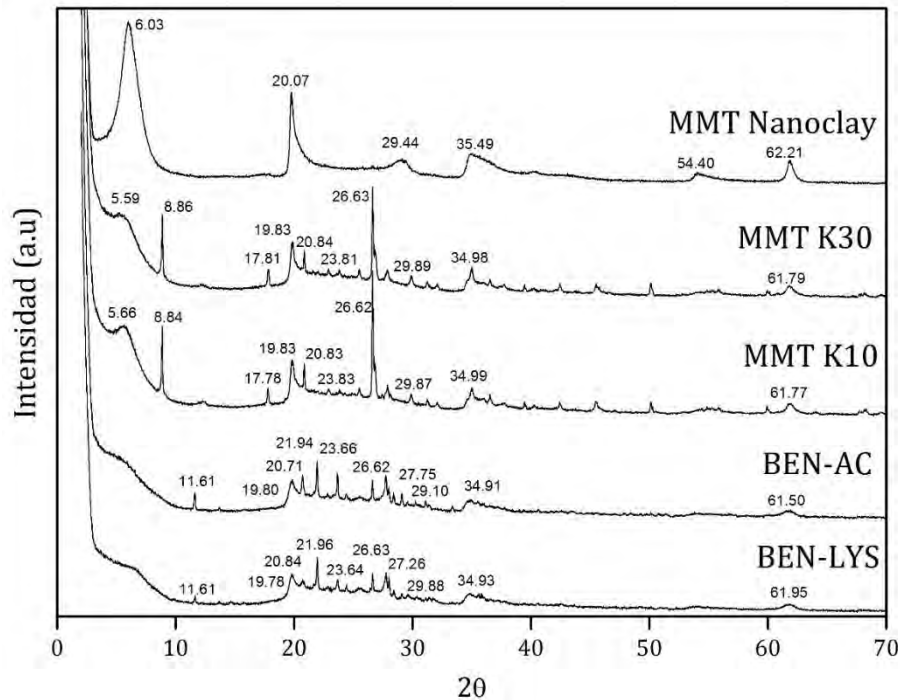


Figura 25. Difractogramas de arcillas BEN y MMT

En espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) se observó que las vibraciones de los grupos (-OH) se presentaron en la región de $3700\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, mientras que las bandas correspondientes a estiramientos de los grupos funcionales silanol (Si-O) en la región de $1300\text{-}440\text{ cm}^{-1}$. En todas las arcillas se observó una banda característica alrededor de $3613\text{-}3621\text{ cm}^{-1}$, debido a la vibración de grupos hidroxilo (-OH) coordinados con cationes Al^{3+} (Al-Al-OH). La amplitud de la banda de $\sim 3600\text{ cm}^{-1}$ muestra el grado de sustitución isomórfica en la lámina octaédrica de Al^{3+} por Fe^{2+} (Al-Fe-OH) o Mg^{2+} (Al-Mg-OH) [88]. Únicamente en la MMT Nanoclay® se observaron las bandas en 914 y 841 cm^{-1} que confirmaron la presencia de grupos (-OH) coordinados a los cationes octaédricos de Al (Al-Al-OH) y Mg (Al-Mg-OH) respectivamente, las demás arcillas no presentaron dichas bandas; diversos estudios han reportado una disminución en dichas bandas como pérdida en la estructura debido a la lixiviación de cationes (Mg y Fe) durante el tratamiento con H_2SO_4 . La banda ancha alrededor de 3400 cm^{-1} corresponde al estiramiento del grupo hidroxilo (-OH) de moléculas de agua adsorbidas en los espacios interlaminares de la arcilla. La banda intensa alrededor de 1026 cm^{-1} se atribuye al enlace (Si-O) correspondiente a la lámina tetraédrica y las bandas alrededor de 521 y 406 cm^{-1} se asignaron de igual forma al grupo (Si-O) característico de la familia de las esmectitas (figura 26)[85]. También se observaron bandas correspondientes a fases no relacionadas con esmectitas, como la banda alrededor de $\sim 690\text{ cm}^{-1}$ que se atribuyó a la presencia de cuarzo,

además, se observó la banda correspondiente a la impureza de tridimita (Si-O-Si) alrededor de $\sim 790 \text{ cm}^{-1}$ excepto en la MMT Nanoclay[®], que confirma su mayor grado de pureza [87].

En el caso de la bentonita modificada con lisina (BEN-LYS) se observaron además las bandas características de los aminoácidos alrededor de $\sim 3200 \text{ cm}^{-1}$ correspondiente al grupo amino ($-\text{NH}_3^+$) y las bandas de ~ 1300 a 1500 cm^{-1} que corresponden a las vibraciones simétricas y anti simétricas de la forma desprotonada del grupo carboxilo ($-\text{COO}^-$), finalmente la banda en $\sim 1300 \text{ cm}^{-1}$ que se atribuyó al estiramiento del enlace ($-\text{CH}$) [89].

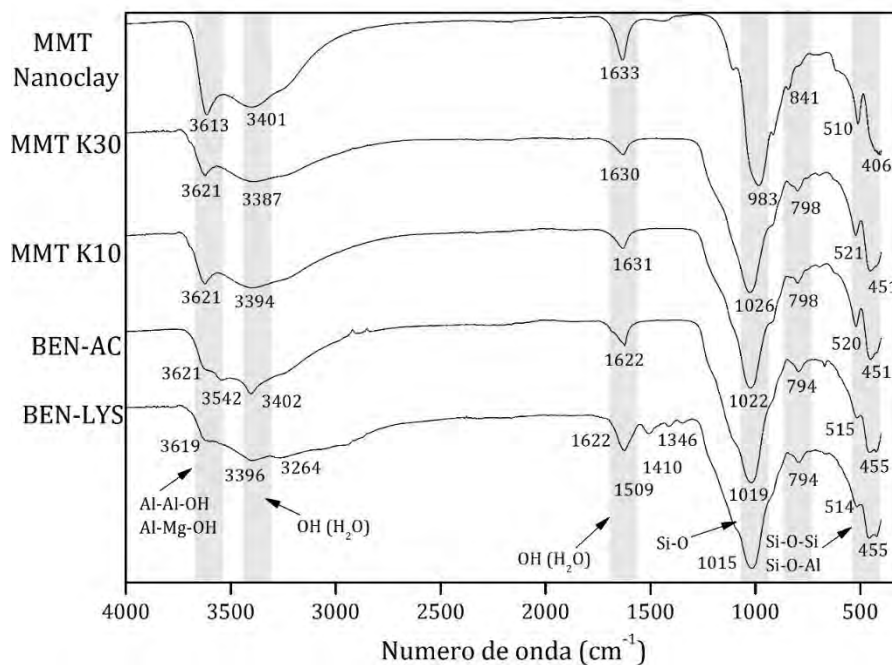


Figura 26. Espectros de FT-IR de arcillas BEN y MMT

Mediante las determinaciones anteriores las arcillas BEN-AC y BEN-LYS se descartaron para posteriores determinaciones, ya que presentaron los valores más bajos de CIC, potencial Z y menor pureza.

Macroscópicamente las arcillas presentaron una apariencia de polvo fino de color variable que va de gris-blanco, amarillo, ligeramente rosa, etc. Se evaluó la morfología de las partículas de MMT Nanoclay[®], MMT K30[®] y MMT K10[®] mediante SEM. En la **figura 27** se presentan las micrografías de las arcillas (aumento X4000) en las cuales se observó que las partículas de MMT Nanoclay[®] se ensamblaron formando agregados densos y compactos de tamaño micrométrico de forma esférica en multicapas de láminas apiladas (**figura 27-a y b**). Por otro lado, la MMT K30[®] y MMT K10[®] (**figura 27 c-f**) se observaron como agregados amorfos o irregulares y

porosos, dicha apariencia se puede deber al tratamiento ácido al cual son sometidas de manera industrial.

Al entrar en contacto con agua las partículas de MMT tiende a formar una dispersión coloidal de manera espontánea disminuyendo así el tamaño de partícula de los agregados, al obtenerse láminas aisladas (exfoliación) debido a la solvatación de los cationes interlaminares; dicho proceso se favoreció mediante agitación magnética constante y sonicación lo cual se confirmó a través de la determinación de tamaño de partícula mediante DLS. Así mismo, SEM permitió observar la morfología de las partículas en la dispersión acuosa de MMT Nanoclay® presentando partículas con morfología tipo láminas, hojuelas o plaquetas delgadas ligeramente flexionadas que se agregan aleatoriamente formando poros (*figura 27 g y h*) [6,90,91].

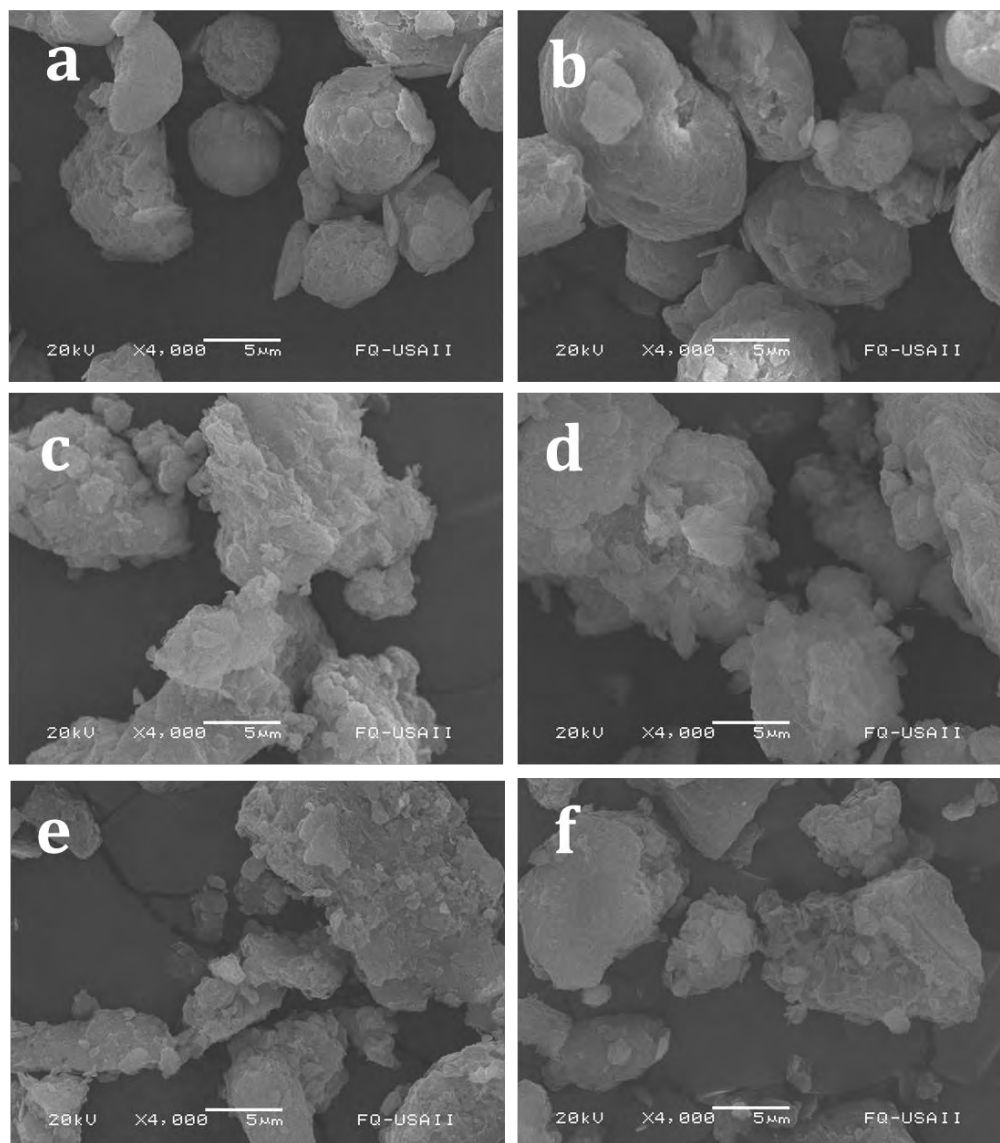


Figura 27. Micrografías de SEM de MMT Nanoclay® (a-b), MMT K30® (c-d), MMT K10® (e-f),

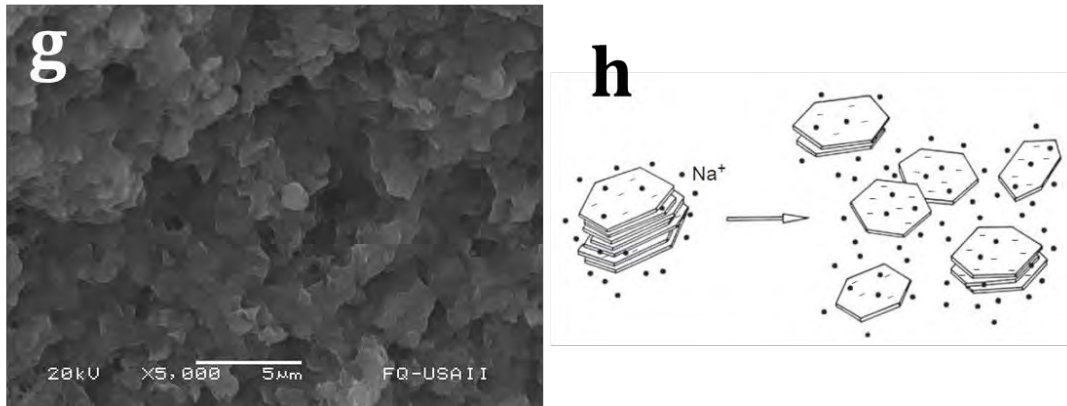


Figura 27-2.MMT Nanoclay® (Dispersión acuosa) (g), esquema de apertura de arcilla en medio acuoso (h)

7.1.1 Isotherma de adsorción de azul de metileno (AM)

Se realizaron estudios de adsorción para lo cual se empleó el AM (cloruro de metiltionina) (*figura 28*) como molécula modelo, ya que ha sido largamente usado para evaluar o caracterizar la adsorción de cationes orgánicos en soluciones acuosas mediante el uso de arcillas. El AM es un colorante básico de tipo tiazina, de carácter catiónico debido a la carga positiva que se origina en el nitrógeno o azufre presentes en el anillo central de la estructura [53].

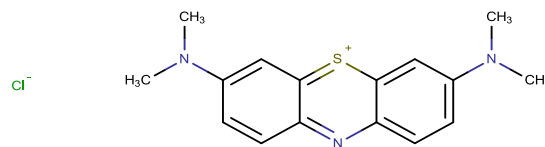


Figura 28. Estructura de azul de metileno (AM)

La interacción entre la arcilla y AM es un proceso instantáneo en el que los cationes orgánicos reemplazan los cationes intercambiables en el espacio interlaminar y en las superficies externas de las láminas [92]. Dicha interacción se puede explicar mediante diferentes modelos propuestos en la literatura como (i) la formación de un complejo neutro AM-arcilla mediante una unión electrostática entre AM con un sitio negativo en la arcilla, (ii) posteriormente una segunda molécula de AM puede unirse al complejo neutro arcilla-AM por interacciones hidrofóbicas y (iii) la formación de un complejo cargado arcilla-AM por la interacción de una molécula de AM con un sitio neutro [93]. La capacidad de adsorción de las arcillas es de gran interés ya que está relacionada con la densidad de carga presente en las láminas, por lo que una mayor densidad de carga puede favorecer la interacción con macromoléculas como polímeros e incluso acarreadores para la formación de materiales compuestos (compositos).

Las isotermas de adsorción ayudan a describir como las moléculas del adsorbato se distribuyen en la fase sólida cuando se alcanza el equilibrio, además proveen información acerca de homogeneidad o heterogeneidad de las superficies del adsorbente mediante el uso de modelos. Se construyeron isotermas de adsorción en un intervalo de 2.0 a 6.5 mg L⁻¹ y se colocó una cantidad conocida de cada arcilla, se mantuvo en agitación magnética constante durante 30 minutos y posteriormente se separó por centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos y se analizó espectrofotométricamente a λ_{max} . Los resultados obtenidos se ajustaron a la ecuación lineal del modelo de Langmuir y Freundlich ya que son modelos ampliamente usados para describir las isotermas y la obtención de parámetros para la predicción de la capacidad de adsorción [53].

La **Tabla 8** presenta los parámetros de ajuste y las constantes de los modelos, se observó que todas las arcillas presentaron un mejor ajuste al modelo de Langmuir ($R^2= 0.89-0.95$), indicando que el proceso de adsorción de AM en las arcillas estudiadas puede ser explicado por un modelo en monocapa saturable hasta alcanzar la capacidad máxima (Q).

Tabla 8. Ajuste y parámetros de modelos de Langmuir y Freundlich para adsorción de AM

Arcilla	MMT Nanoclay®	MMT K30®	MMT K10®	BEN-AC	BEN-LYS
MODELO DE LANGMUIR					
Pendiente (m)	0.0042	0.0060	0.0067	0.0095	0.0097
Intercepto (b)	0.0034	0.0017	0.0019	0.00196	0.0022
Capacidad máxima de adsorción (Q) (mg g⁻¹)	236.2977	167.3976	148.9079	105.6099	103.2586
K_L (L g⁻¹)	295.8134	604.4451	526.4710	510.6861	462.4299
a_L (L mg⁻¹)	1.2519	3.6108	3.5355	4.8356	4.4784
R_L	0.2854- 0.1094	0.4925- 0.7168	0.3648- 0.2830	0.3618- 0.4223	0.3816- 0.3459
R²	0.9189	0.9224	0.9321	0.9526	0.8934
MODELO DE FREUNDLICH					
Pendiente (m)	0.2845	0.1178	0.0432	0.0525	0.0484
Intercepto (b)	2.1291	2.1267	2.2280	2.08949	1.9614
K_f (L⁻¹g)	134.6201	133.8597	169.0246	122.8825	91.4956
n_F	0.2845	0.1178	0.0432	0.0525	0.0484
R²	0.7222	0.2451	0.4385	0.6064	0.3218

La **figura 29** muestra el ajuste de los resultados obtenidos a la ecuación lineal de Langmuir. En cuanto a la capacidad máxima se observó la siguiente tendencia: MMT Nanoclay® > MMT K30® > MMT K10® > BEN-AC > BEN-LYS, la cual es congruente con los resultados obtenidos de CIC, lo que indica que la arcilla MMT Nanoclay® presenta la mayor capacidad de adsorción, debido a la densidad de carga en su estructura que se refleja en los valores altos de potencial Z y CIC,

además, puede favorecer su alto grado de pureza lo cual se observó en XRD así como su tamaño de partícula pequeño que favorece las interacciones interfaciales.

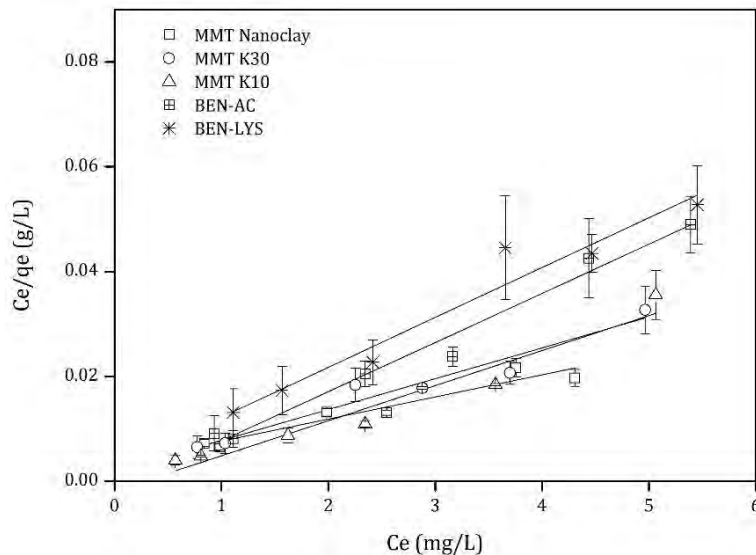


Figura 29. Gráfica de ajuste de adsorción de AM a ecuación lineal de Langmuir

Además, se determinó el parámetro de equilibrio R_L el cual describe la isoterma según el grado de reversibilidad, que brinda una evaluación cualitativa de la interacción entre AM y la arcilla. Todas las arcillas presentaron intervalos de valores de R_L en el rango favorable ($0 < R_L < 1$), sin embargo, la arcilla MMT Nanoclay® presentó los valores más bajos de R_L , por lo tanto más cercanos a 0 que indica un proceso irreversible, lo que puede sugerir que dicha arcilla puede presentar una mejor interacción con moléculas catiónicas, que las demás arcillas.

Los resultados obtenidos son similares a lo reportado en la literatura como Almeida *et al.*, (2009) que reportan una Q de 289.12 (mg g^{-1}) con AM para MMT [53], sin embargo las propiedades de superficie de cada arcilla dependen de muchos factores incluyendo la composición química, pureza, tipos de átomos superficiales (oxígeno e hidrógeno principalmente), tipo de carga, y tipo de cationes intercambiables.

7.1.2 Isotherma de adsorción de colesterol

De las 5 arcillas disponibles se seleccionaron las MMT Nanoclay®, MMT K30® y MMT K10® para su evaluación ya que fueron las que presentaron los mejores resultados en las caracterizaciones previas.

Ibrahim *et al.*, (2013), Cohn *et al.*, (2010); Gershkovich *et al.*, (2009) han reportado que la montmorillonita administrada por vía oral disminuye la absorción intestinal del colesterol lo

cual explican se puede deber a un mecanismo de adsorción en la superficie de la arcilla o mediante una competencia con el colesterol para la incorporación dentro de micelas y vesículas biliares [7,28,94]. Sin embargo, no se encuentra reportado en la literatura la descripción de la adsorción de colesterol por arcillas a través de modelos de isoterma, por lo cual se llevó a cabo este estudio con el propósito de tener un acercamiento al posible proceso de adsorción del colesterol mediante arcillas.

Se realizaron estudios variando la concentración de colesterol en un intervalo de 60 a 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir de una solución stock (3mg mL^{-1}). Se mantuvo con agitación magnética constante a 150.0 rpm a temperatura ambiente, en contenedores de vidrio color ámbar durante un periodo de 4.0 h, posteriormente se centrifugo a 14000 rpm por 5 minutos y se analizó el sobrenadante, mediante cromatografía de gases. Los datos obtenidos se analizaron en base a los modelos de adsorción Langmuir y Freundlich a fin de encontrar el adecuado para el fenómeno de adsorción (**Tabla 9**).

Las arcillas estudiadas presentaron un mejor ajuste al modelo de Freundlich ($R^2= 0.8738-0.9659$), que explica un proceso de adsorción en multicapas con adsorbentes de superficie heterogénea. La constante de Freundlich (K_F) representa la capacidad de adsorción y se observó la siguiente tendencia: MMT K10®>MMT K30®>MMT Nanoclay® (**figura 30**).

Las tres arcillas presentaron adsorción de la molécula del colesterol, a pesar de ser una molécula altamente hidrofóbica y estar en un medio de baja polaridad, si bien en las arcillas se favorece la interacción con cationes, se ha reportado que pueden interactuar con diferentes especies tanto iónicas, como no iónicas. Las MMT pueden presentar interacciones hidrofóbicas, así como fuerzas de Van der Waals con moléculas sin carga, no polares. Además, los grupos (-Si-O-Si-) son sitios hidrofóbicos en la superficie de las láminas tetraédricas que pueden contribuir a la interacción entre arcillas y compuestos orgánicos. Sin embargo, los complejos de arcillas con moléculas aniónicas o no iónicas presentan interacciones débiles y cinéticas de desorción rápidas [95,96].

Se observó que la arcilla MMT K10® presentó una capacidad de adsorción del doble respecto de la MMT Nanoclay®, lo cual se puede deber a la diferencias significativas de área superficial y porosidad, ya que en el caso del colesterol al ser una molécula neutra no se ve atraída por la densidad electrónica de la superficie, sino que se adsorbe por interacciones hidrofóbicas y nuevas moléculas de colesterol pueden interactuar con las moléculas ya adsorbidas formando multicapas e interactuando entre ellas de acuerdo al modelo de Freundlich.

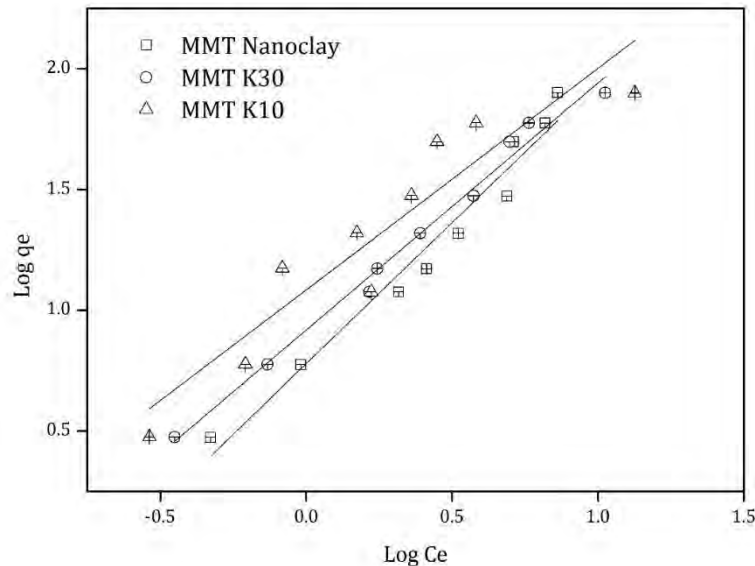


Figura 30. Gráfica de ajuste a ecuación lineal del modelo de Freundlich de adsorción de colesterol

Tabla 9. Ajuste y parámetros de modelos de Langmuir y Freundlich para adsorción de colesterol

Arcilla	MMT Nanoclay®	MMT K30®	MMT K10®
MODELO DE LANGMUIR			
Pendiente (m)	-0.0106	-0.0002	0.0061
Intercepto (b)	0.1834	0.1200	0.0741
Capacidad máxima de adsorción (Q) (mg g⁻¹)	94.3396	5000.0000	163.9344
K_L (L g⁻¹)	5.4526	8.3333	13.4953
a_L (L mg⁻¹)	0.0578	0.0017	0.0823
R_L	0.2238-0.0107	0.9074- 0.2686	0.1684- 0.0075
R²	0.6106	0.0333	0.3924
MODELO DE FREUNDLICH			
Pendiente (m)	1.1665	1.0232	0.9147
Intercepto (b)	0.7793	0.9182	1.0848
K_f (L⁻¹mg)	6.0159	8.2832	12.1563
n_F	0.8573	0.9773	1.0933
R²	0.9659	0.9885	0.8738

La MMT K10® presentó la mayor adsorción de colesterol, sin embargo, en general se observó que la arcilla Nanoclay® presentó los mejores resultados en todas las determinaciones realizadas, y dado que el proceso de adsorción de colesterol requiere de condiciones más complejas para ser estudiadas con precisión se seleccionó la MMT Nanoclay® para la preparación del material compuesto por su potencial interacción mediante cargas electrostáticas.

7.2 Preparación y caracterización de micropartículas híbridas lípido-polímero (MP)

Se prepararon micropartículas híbridas lípido-polímero mediante el método de desolvatación en dos pasos. Inicialmente se adicionó acetona como agente de desolvatación, para realizar la primera desolvatación, en la cual se separaron las cadenas de alto peso molecular al inducir su precipitación, para lograr una distribución de tamaño adecuada y reproducibilidad. Posteriormente se realizó un ajuste a un pH de 3.0 ± 0.1 debido a que la GEL (PI= 4.8-5.0), presenta una carga positiva por la protonación de los grupos amino (NH_3^+) de los residuos de lisina, lo cual evita la aglomeración incontrolada de las cadenas de GEL, además se favorece la interacción con la lecitina de soya, la cual es una mezcla de fosfolípidos zwitteriónicos y aniónicos [97].

Al evaporarse el disolvente (metanol) puede inducir el arreglo de la lecitina en agregados con la cadena hidrofóbica hacia el centro y la cabeza hidrofílica expuesta al medio acuoso, lo que permite interactuar con la AC a través de la región hidrofóbica, además de interactuar con la gelatina mediante su región hidrofílica.

El agente desolvatación (acetona) se empleó para deshidratar las cadenas de GEL e inducir cambios conformacionales en su estructura y posteriormente inducir la precipitación de las MP [41]. Finalmente, se usó GA como agente entrecruzante para estabilizar la estructura de las MP a fin de evitar su rápida disolución en medios acuosos y una rápida liberación del fármaco a temperatura corporal. El GA es un agente entrecruzante que ha sido ampliamente estudiado con proteínas, ya que reacciona fácilmente a temperatura ambiente con la formación simultánea de enlaces aldimina ($-\text{CH} = \text{N}-$) entre los grupos amino de las proteínas.

Además, es altamente soluble en agua y se sabe que puede generar enlaces covalentes inter/intra particulares. Además, el GA se ha utilizado ampliamente con GEL para preparar nanoacarreadores para la administración de insulina [39], andamios de reparación de tejido óseo [98], nanopartículas para administración oral de fármacos [97,99], terapia intravesical de cáncer [100] y vectorización magnética [101].

El desarrollo de nuevos materiales y sistemas de liberación de fármacos consume frecuentemente mucho tiempo y requiere altos costos para alcanzar una formulación optimizada, además se ha reportado que diversas condiciones del proceso de fabricación influyen en las características finales de las micropartículas, por lo que se utilizó el diseño de experimentos ortogonal Taguchi L8 2x6 para optimizar el tiempo de producción y reducir el

número de experimentos requeridos para obtener una formulación con las características deseadas. Se realizó la evaluación de los siguientes factores de estudio o variables independientes: velocidad de agitación (rpm) durante la fabricación, cantidad de atorvastatina inicial (mg), volumen de adición del fármaco (metanol, mL), volumen del agente de desolvatación (acetona, mL), concentración de la gelatina (mg/mL) y cantidad de agente entrecruzante (volumen de glutaraldehído 2%, μL).

Se realizaron 8 experimentos con 6 repeticiones evaluando como variables de respuesta el tamaño de partícula, PDI y potencial Z (Zetasizer Zen3600 Malvern Instruments). En la **tabla 10** se reportan los resultados obtenidos en las variables de respuesta expresados como media \pm DE (n=6). Es bien sabido que el tamaño de partícula de los sistemas de administración de fármacos influye en su estabilidad, eficiencia de entrapamiento, perfil de liberación del fármaco, biodistribución, acumulación en tejidos, mucoadhesión y captación celular, entre otros procesos fisiológicos. Especialmente en la captación celular y la internalización, el tamaño es de gran interés para vías de administración como la pulmonar, transdérmica, liberación a cerebro, etc., ya que la endocitosis mediante mecanismos como vía caveolina o pinocitosis son favorecidos por partículas pequeñas, mientras que la fagocitosis por células del sistema inmune como los neutrófilos, macrófagos y células dendríticas son favorecidas en partículas $\geq 1.0 \mu\text{m}$. [102]. Así mismo en la vía oral, la captación celular por los enterocitos es dependiente del tamaño, sin embargo dado que el material compuesto preparado fue diseñado para la liberación en el intestino, el tamaño de partícula nanométrico no es una limitante.

De acuerdo a las recomendaciones de terminología de la IUPAC se considera en el término micropartícula a aquellas partículas con dimensiones en el intervalo de 1×10^{-7} a 1×10^{-4} m [103] sin embargo, algunos autores consideran que 1000 nm corresponde a la definición de nanopartículas [104].

Se estableció el tamaño de partícula como respuesta a fin de obtener partículas de talla micrométrica, para favorecer la interacción con las partículas de arcilla, así como lograr un perfil de liberación más lento respecto a nanopartículas. El tamaño de partícula se determinó mediante la técnica de DLS, se observó que con las diferentes variables estudiadas se obtuvieron tanto nanopartículas como micropartículas, con valores de tamaño en un intervalo de alrededor de 520 a 2300 nm, con valores de PDI en un intervalo de 0.28 a 0.52 (**figura 31**).

Tabla 10. Variables de respuesta para el diseño de experimentos

Experimento	Tamaño (nm) \pm DE (n=6)	PDI \pm DE (n=6)	Potencial Z (mV) \pm DE (n=6)
E1	648.27 \pm 16.21	0.36 \pm 0.04	30.07 \pm 0.40
E2	1650.83 \pm 84.33	0.44 \pm 0.03	26.65 \pm 0.38
E3	2364.00 \pm 148.84	0.52 \pm 0.03	19.58 \pm 0.24
E4	525.55 \pm 13.87	0.36 \pm 0.05	27.08 \pm 0.60
E5	798.82 \pm 32.80	0.32 \pm 0.05	23.43 \pm 0.94
E6	1833.33 \pm 98.32	0.46 \pm 0.04	15.53 \pm 0.53
E7	1345.00 \pm 56.77	0.28 \pm 0.03	22.42 \pm 0.86
E8	703.60 \pm 8.40	0.30 \pm 0.04	27.62 \pm 0.38

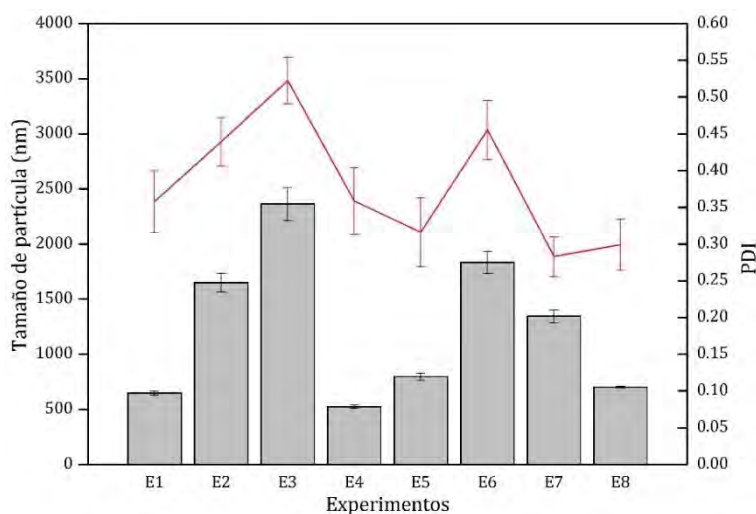


Figura 31. Respuesta de tamaño de partícula y PDI de MP para el diseño Taguchi

Los experimentos E2, E6 y E7 presentaron valores de tamaño de alrededor de 1.3-1.8 μ m que se consideraron adecuados, ya que se prefirió la talla superior a los 1000 nm respecto de la nanométrica para favorecer la adsorción de las partículas de arcilla cuyo tamaño (\sim 500 nm) se confirmó previamente mediante la misma técnica.

El índice de polidispersión (PDI) es un parámetro indicativo de la calidad de los sistemas preparados, que expresa el grado de uniformidad en una distribución de tamaño de partícula [102]. El valor numérico de PDI varía de 0.0 (para una muestra perfectamente uniformes con respecto al tamaño de partícula) a 1.0 (para una muestra altamente polidispersa con múltiples poblaciones de tamaño de partícula). En general, los valores de $PDI \leq 0.2$ se consideran aceptables para acarreadores a base de polímeros, mientras que los sistemas lipídicos como formulaciones de liposomas, se considera que un $PDI \leq 0.3$ es aceptable e indica una población homogénea. Dado que MP consiste en un acarreador híbrido lípido-polímero en el cual el polímero empleado es de origen natural se estableció como parámetro deseado $PDI \leq 0.3$ [102].

En la **tabla 10** se observó que el experimento E3 presentó los valores más altos de tamaño y PDI, lo cual indica que tiene una amplia distribución de tamaño, mientras que los experimentos E1, E4, E5, E7 y E8 cumplen con la especificación deseada de $PDI \leq 0.3$. En general se observaron valores de PDI bajos lo cual se logra mediante la primera desolvatación del proceso, seleccionando las cadenas de alto peso molecular.

Por otro lado, el potencial Z se determinó a fin de evaluar la carga superficial de las partículas, ya que en el diseño del sistema se consideró que el carácter positivo es apropiado en las partículas debido a que puede favorecer la interacción con la arcilla montmorillonita mediante interacciones electrostáticas, ya que esta presenta un potencial negativo (ξ -38.0 a -12.0 mV) debido a la carga negativa permanente en la cara de las láminas. Se observó que todas las partículas preparadas presentaron valores de potencial positivo, lo cual puede indicar la presencia de la capa de gelatina en la superficie de las partículas, dado que dicho biopolímero es de naturaleza catiónica. Además el potencial Z se considera como un indicativo de la estabilidad, ya que las partículas con bajo potencial Z eventualmente se agregarán debido interacciones como a fuerzas de Van der Waals. Se ha reportado en la literatura que valores de $\xi = 10-20$ mV, $\xi = 20-30$ mV y $\xi > 30$ mV se consideran relativamente estable, moderadamente estable y muy estable respectivamente (**figura 32**) [105].

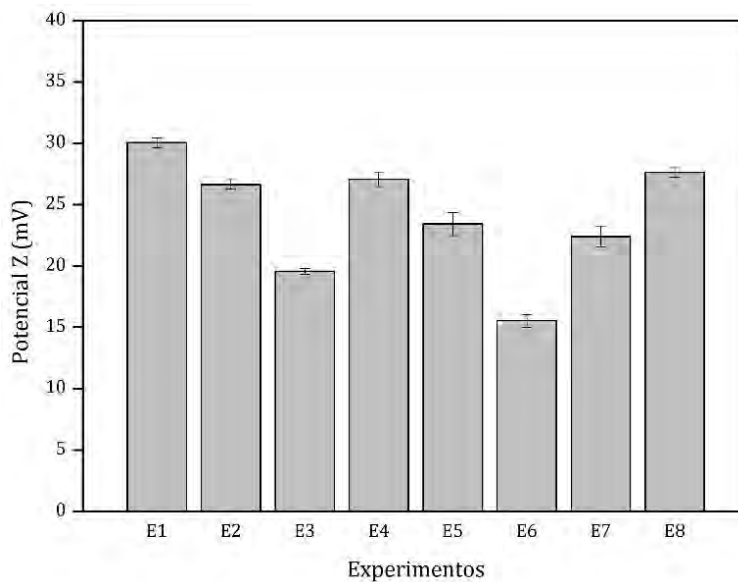


Figura 32. Respuesta de potencial Z de MP para el diseño Taguchi

Sin embargo, se observó que únicamente en el experimento E1 se alcanzó un potencial $\xi \geq 30$ mV, siendo el valor más bajo de $\xi = 15.53$ mV en el experimento E6. Se observó que los valores más altos de potencial Z corresponden a los valores más bajos de tamaño, lo cual muestra que la presencia de la carga superficial reduce la agregación de las partículas durante su formación.

En el diseño de experimentos el diagrama de Pareto permite visualizar los factores en orden decreciente de significancia sobre la respuesta. Se graficaron los efectos estimados para los factores estudiados, así como el nivel, mientras que el gráfico de efectos principales muestra el impacto de cada factor en la respuesta. Se realizó una ANOVA para probar la significancia estadística de los efectos observando que los factores que tienen un valor-P menor que 0.05 son estadísticamente significativos con un nivel de confianza del 95.0%.

En cuanto al tamaño de partícula y PDI se observó que el principal factor que puede afectar estas respuestas es la concentración de la gelatina, ya que al existir una mayor concentración de este biopolímero en el medio favorece la agregación, así los 4 experimentos con el nivel alto presentaron un tamaño mayor. Para ambas respuestas los siguientes factores fueron la cantidad de atorvastatina, volumen del agente de desolvatación y el entrecruzante (*figura 33*). Además, el volumen del glutaraldehído (2% v/v), el cual es el agente entrecruzante que permite no solo la formación de enlaces intra-partículas sino también inter-partículas, por lo que puede haber agregación no solo por interacciones de tipo Van der Waals sino también mediante enlaces covalentes.

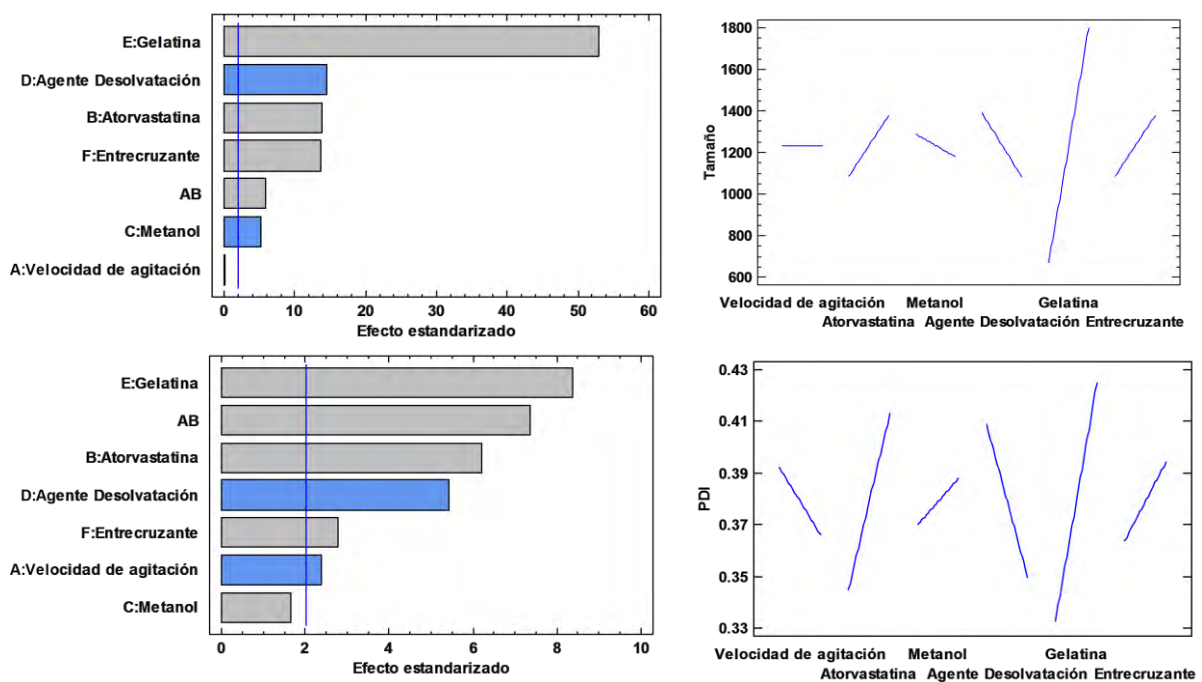


Figura 33. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para tamaño de partícula y PDI de MP

Respecto al potencial Z se observó que los principales factores que influyeron fueron la concentración de la gelatina en su nivel bajo, debido a que este biopolímero se encuentra en la

superficie de las micropartículas y por su naturaleza catiónica les brinda una carga positiva, además de la cantidad del fármaco en su nivel bajo (*figura 34*).

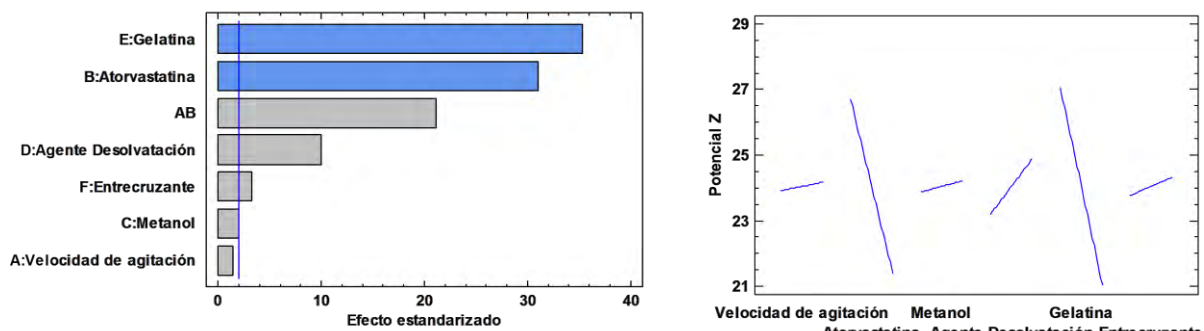


Figura 34. Diagrama de Pareto y gráfico de efectos principales para potencial Z de MP

Mediante el análisis estadístico se realizó la optimización de las variables de respuesta, con lo cual se establecieron las condiciones de proceso para obtener las MP con las características deseadas (*tabla 11*).

Tabla 11. Optimización de respuestas para la preparación de MP

	Factor	Optimización	Nivel
A	Velocidad de agitación (rpm)	1	750
B	Cantidad de atorvastatina (mg)	-1	10
C	Volumen de metanol (mL),	-1	5
D	Volumen del agente de desolvatación (acetona, mL)	1	10
E	Concentración de gelatina (mg/mL)	1	20
F	Cantidad de agente entrecruzante (glutaraldehído 2% v/v, µL)	-1	25

7.2.1 Eficiencia de entrapamiento de MP (%)

Una vez determinadas las condiciones de fabricación para tamaño, PDI y potencial Z, se determinó la eficiencia de entrapamiento del sistema obtenido.

En medio de varios tipos de materiales, los acarreadores a base de gelatina (GEL) han ganado mucha atención debido a su seguridad y capacidad para transportar eficientemente moléculas de fármacos de diferente naturaleza a través de las membranas biológicas, además de su alta disponibilidad, bajo costo y una gran cantidad de grupos funcionales sobre la superficie para facilitar el entrecruzamiento y su funcionalización. Aunque, la GEL ofrece varias ventajas, presenta una baja capacidad de carga o eficiencia de entrapamiento de fármacos debido a su naturaleza hidrofílica [106].

La capacidad de entrapamiento de fármacos hidrofóbicos en acarreadores a base de GEL podría explicarse teniendo en cuenta la localización preferencial del fármaco dentro de un núcleo del acarreador, que es menos hidrofílico que el ambiente acuoso externo [41].

Sin embargo, en los últimos años los acarreadores híbridos de tipo lípido-polímero se han empleado con éxito para la administración de fármacos poco solubles en agua y naturaleza lábil a los ácidos en medios biológicos, por ejemplo la anfotericina B [9] y resveratrol [36].

Dado que la AC es un fármaco BSC clase II de carácter hidrofóbico, se seleccionó este tipo de sistema híbrido para favorecer la eficiencia de entrapamiento mediante la interacción con la lecitina de soya. La eficiencia de entrapamiento se determinó mediante un método directo cuantificando la cantidad de AC contenida dentro de las MP y se encontró un valor de $67.30\% \pm 2.65$ ($n=3$), que es un EE% mayor respecto de otros trabajos con sistemas de nanopartículas poliméricas de PLGA (EE 34-37%) [107]. Recientemente, se reportó la preparación de nanopartículas híbridas de gelatina-ácido esteárico cargadas con AC, pero con menor eficiencia (EE 18-58%) que la de nuestros sistemas de estudio [106].

7.3 Preparación y caracterización del material compuesto micropartículas híbridas/ montmorillonita (MP/MMT)

7.3.1 Determinación de potencial Zeta (ξ) en función del pH

Para la preparación del material compuesto se empleó el método de intercalación en el cual se consideró que la posible interacción entre la arcilla y las micropartículas se lleva a cabo mediante cargas electrostáticas, pues ha sido ampliamente reportado la interacción entre arcillas y moléculas de interés, así como acarreadores coloidales mediante este tipo de fuerzas como interacciones electroatrativas entre nanopartículas catiónicas de quitosano y arcilla MMT [108]. Por lo cual se realizó la determinación de potencial Z de las MP y MMT en función del pH, para encontrar el valor de pH en el que ambos materiales pudieran presentar cargas opuestas para favorecer su interacción. La *figura 35* y *tabla 12* presentan los valores de potencial Z obtenidos en el intervalo de pH estudiados ($n=3$). En el caso de MP se observó que al aumentar el pH, el potencial Z disminuyó, debido a la ionización de los grupos funcionales de la gelatina presente en la superficie de las micropartículas, por lo cual a pH ácido se atribuye un potencial positivo debido a la protonación de los grupos amino (NH_3^+), mientras que a pH básico los grupos carboxilo (COO^-) proveen un potencial negativo ya que se encuentran desprotonados, además claramente se observó alrededor de pH 4.8 que la carga de las partículas es cercana a cero debido a que se alcanza el punto isoeléctrico (PI) de la gelatina tipo B empleada en la fabricación de MP, lo cual coincide con lo reportado previamente en la literatura [75]. Por otro lado, se evaluó el potencial Z de una dispersión de la arcilla seleccionada

MMT Nanoclay® (5 mg mL⁻¹) en función del pH, con lo cual se confirmó que la arcilla presenta un potencial negativo en todos los valores de pH estudiados debido a la carga negativa permanente de las láminas, sin embargo se observa una ligera disminución del potencial de -20 a -27 mV conforme aumenta el pH debido a que a pH ácido existe una protonación de los grupos funcionales presentes en los bordes de las láminas de arcilla [109].

Tabla 12. Potencial Z de MP y MMT en función del pH
Potencial Z (ξ) (mV) \pm DE (n=3)

pH	MP	MMT Nanoclay®
3.0	18.87 \pm 0.25	-20.50 \pm 0.30
4.0	12.03 \pm 0.71	-25.83 \pm 0.75
5.0	-1.57 \pm 0.05	-22.83 \pm 0.25
6.5	-6.44 \pm 0.65	-27.77 \pm 0.42
7.0	-11.93 \pm 0.49	-26.60 \pm 0.40
8.0	-15.47 \pm 1.27	-27.90 \pm 0.17

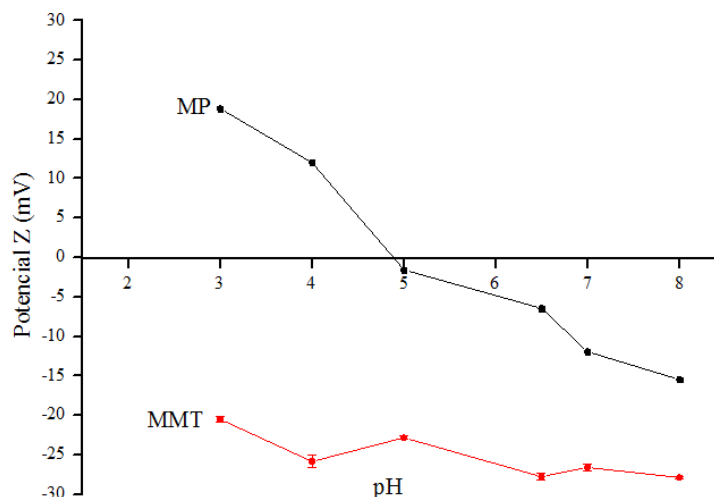


Figura 35. Gráfica de potencial Z en función del pH de MP y MMT

Con la evaluación del potencial Z se encontró que a pH ácido los sistemas presentan cargas opuestas, por lo cual la intercalación se realizó a pH = 3.0 \pm 0.1, que consistió en la adsorción de MMT Nanoclay® con carga negativa (ξ =-20.5 \pm 0.30 mV) en la superficie de MP con carga positiva (ξ =18.87 \pm 0.25 mV), por lo que el proceso es impulsado por una fuerte atracción electrostática. La preparación de materiales compuestos que usan interacciones electrostáticas entre polímeros y nanopartículas inorgánicas se ha reportado anteriormente mediante el método de adición directa, que consiste en mezclar ambos componentes para formar agregados de los dos materiales cargados opuestamente. Después de la evaporación del agua, la dispersión se vuelve a ensamblar produciendo estructuras exfoliadas y/o intercaladas. Sin embargo, también una

proporción de las capas puede apilarse nuevamente en paralelo volviendo a formar los tactoides [32].

Al caracterizar el material compuesto MP/MMT obtenido se observó que el potencial zeta disminuye ($\xi 11.10 \pm 0.64$ mV) respecto MP, lo que indica que las partículas híbridas MP estaban parcialmente cubiertas por la arcilla MMT. Este resultado corrobora la adsorción electrostática entre la arcilla MMT en la superficie de MP. Además, se observó un aumento en el tamaño de partícula a 5.77 ± 0.60 μm ($n=3$) con un PDI de 0.28 ± 0.03 lo cual también confirma la adición de las láminas de arcilla a las MP, este aumento en el tamaño de partícula indica la formación de una estructura diferente de MP o MMT solos. Otros autores han reportado resultados similares con diferentes sistemas, por ejemplo, Xu *et al.* (2014) mencionó que las distribuciones de partículas son más amplias y los tamaños son más grandes en compositos a base de partículas poliméricas y arcillas, respecto a las partículas de polímero puro, debido a la presencia de la arcilla MMT [110].

7.3.2 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

Los sistemas sistema MP y MP/MMT obtenidos junto con los componentes individuales (GEL, AC, LEC, MMT) fueron caracterizados mediante FT-IR en el intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , con lo cual se observaron las bandas características de los grupos funcionales de cada componente. La **figura 36** presenta los espectros obtenidos por FT-IR.

En el espectro de AC se observó una banda en 3365.52 cm^{-1} de grupos hidroxilo (-OH), 3234.60 cm^{-1} para el grupo aromático (-NH), 2972.75 cm^{-1} para (-CH₃), 1649.58 cm^{-1} para carbonilo (C=O), 1579.08 cm^{-1} (C-N) y 1432.66 cm^{-1} (C-C). En el espectro de la GEL se observan las bandas características de 3306.64 cm^{-1} que corresponde a la amida A (N-H), 3071.91 cm^{-1} de la amida B, 1636.41 cm^{-1} de la amida I (C=O), 1534.15 cm^{-1} de la amida II (N-H). En cuanto a la lecitina de soya se observa la presencia de bandas en 1737.12 cm^{-1} de la señal vibracional del grupo carbonilo (C=O) y bandas en 1227, 1060 y 824 cm^{-1} de (PO₂), que corresponden a las bandas características de fosfolípidos fosfatidilcolina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina presentes en la lecitina de soya [111].

En el espectro de las MP cargadas con AC, se observan las bandas en 3309.74 cm^{-1} correspondientes a la amida A (N-H), 3074.24 cm^{-1} correspondientes a la amida B, 1548.09 cm^{-1} de la amida II (N-H), indicativos de la presencia de la gelatina, sin embargo se observa también la aparición de una nueva banda en 1452.03 cm^{-1} que corresponde al enlace aldimina (R-CH=N-R') el cual confirma el entrecruzamiento de los grupos amino de los residuos de lisina presentes

en la gelatina con el glutaraldehído (-CHO). Además, se observan las bandas en 2927, 2857 cm^{-1} con menor intensidad, que confirman la presencia de lecitina en el sistema. En cuanto al fármaco las bandas alrededor de 3300 cm^{-1} se ven ocultas por las bandas características de la amida A y amida B de la gelatina, sin embargo, se observan las bandas alrededor de 1645 y 1548 cm^{-1} que se pueden atribuir a los enlaces (C=O) y (C-N) respectivamente.

En el material compuesto MP/MMT se observaron las bandas alrededor de 3320 y 1634 cm^{-1} de amida A y B de la gelatina, y la banda característica de aldimina de entrecruzamiento en 1452 cm^{-1} , las bandas de lecitina en 2900-2800 cm^{-1} correspondiente a MP, además de bandas de MMT alrededor de 512 cm^{-1} que confirman su composición.

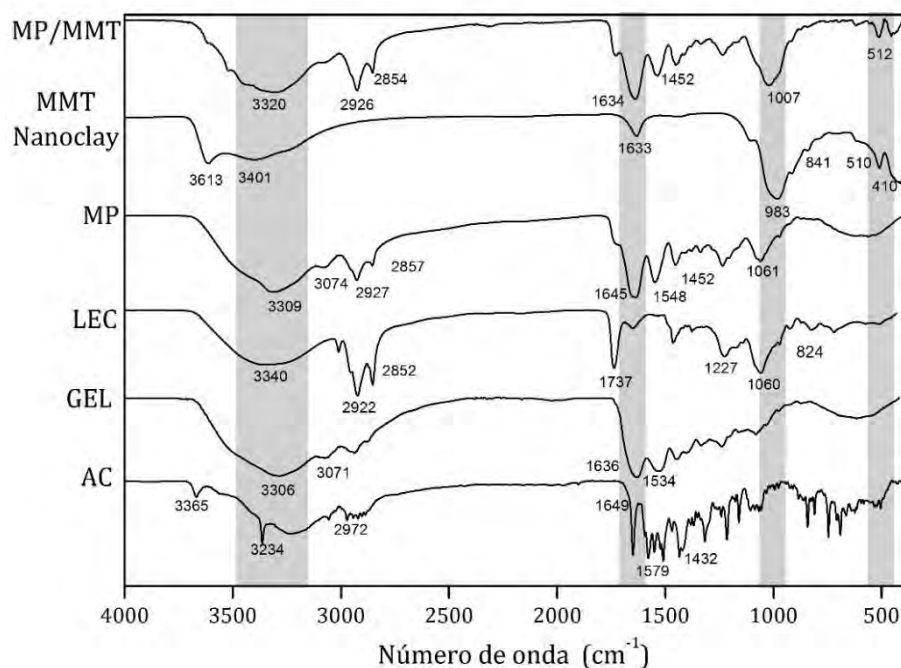


Figura 36. Espectroscopía FT-IR de los sistemas preparados MP, material compuesto MP/MMT y componentes individuales

7.3.3 Difracción de rayos X de polvos (XRD)

La **figura 37** presenta la caracterización de la MMT Nanoclay® y el material compuesto MP/MMT preparado a $\text{pH}=3.0\pm 0.1$ mediante XRD de polvos en un intervalo de 2 a 70 θ . Las difracciones d001, d003, d020-110, d130-200 y d060 corresponden a las señales características de la MMT y en el caso de la MMT Nanoclay® se presentaron en los valores de 6.03, 19.80, 34.80 y 61.75 (2θ). Además, se observó un pico de un componente no arcilloso denominado dolomita (D) que corresponde a la señal en 29.05 (2θ) [84]. La reflexión de MMT a $2\theta = 6.03$ corresponde a la difracción de d001 el cual indica el espacio basal de 14.65Å.

En el caso del material compuesto MP/MMT se observó la señal que corresponde al plano de difracción d001 presentó un desplazamiento a un ángulo de difracción inferior de $2\theta = 4.98$, respecto a la MMT sola, lo cual confirma una expansión del espacio cristalográfico de hasta 17.74 \AA . El aumento en el espacio basal proporciona evidencia de la interacción entre la GEL en la MMT Nanoclay® para la obtención del material compuesto mediante una estructura intercalada.

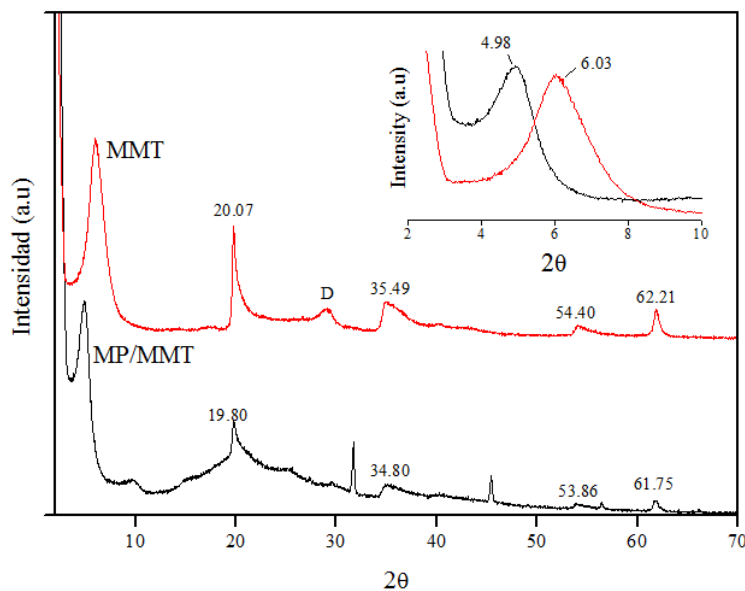


Figura 37. Difractogramas de MMT y MP/MMT

Los patrones de XRD permiten investigar el efecto del pH en la preparación del material compuesto MP/MMT y mediante la ley de Bragg es posible determinar el **espacio cristalográfico (d)**. Se mezcló la arcilla MMT Nanoclay® y la dispersión de MP previamente caracterizada, ajustando el pH con HCl 0.2 M o NaOH 0.2 M hasta alcanzar diferentes valores de pH, a fin de observar una posible interacción de atracción o repulsión entre la arcilla y las partículas debido a los cambios en la carga superficial de los sistemas por el medio ácido o alcalino. Posteriormente, las mezclas realizadas se secaron mediante la técnica de “*solution casting*” en el cual el material preparado se vertió en una caja Petri y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

La **figura 38** ilustra el efecto del pH ($\text{pH} \pm 0.1 = 1.6, 3.0, 5.0, 6.5$ y 7.0) en los patrones de difracción de XRD en el material compuesto MP/MMT. La interacción se pudo observar por la aparición del pico alrededor de $2\theta = 4.69^\circ$ a 5.08° (**espacio d** de $18.85 - 17.74 \text{ \AA}$) cuyo valor **d** aumenta a medida que el pH disminuye, excepto en valores de pH cercanos al PI. Estos

resultados pueden explicarse de acuerdo con las interacciones existentes de la superficie de la MP con la arcilla MMT (*tabla 13*).

Es bien sabido que la gelatina posee propiedades anfóteras, por lo que a valores de pH de 1.6 y 3.0 (pH <PI), tiene una carga superficial positiva debido a la protonación de grupos NH_3^+ , por lo que se promueve la interacción con caras negativas de la MMT, dando los máximos aumentos en el espacio d de 18.85 y 17.74 Å, respectivamente.

Por otro lado, a pH = 6.5 y 7.0 (pH > PI) las MP tienen una carga superficial negativa debido los grupos carboxilo (COO^-) los cuales se coordinan con las láminas de MMT, pero con un nivel de interacción más bajo lo que se refleja en un menor aumento del espacio d (17.55 y 17.51 Å).

A pH > PI, la interacción entre gelatina y MMT ocurre a través de la carga de los bordes, la cual es dependiente del pH. Adicionalmente, también existen interacciones de puentes de hidrógeno entre grupos carbonilo de la gelatina y grupos hidroxilo de la MMT. Sin embargo, a un pH de 5.0 (pH ~ PI), el grado de ionización de la gelatina es menor, lo que lleva al menor incremento del espaciamiento d a 17.39 Å.

pH	Angulo 2θ	Espacio d (Å)
1.6 (d)	4.69	18.85
3.0 (c)	4.98	17.74
5.0 (e)	5.08	17.39
6.5 (b)	5.03	17.55
7.0 (a)	5.05	17.51

Tabla 13. Desplazamiento de ángulo 2θ y apertura del espacio basal (d) en función del pH

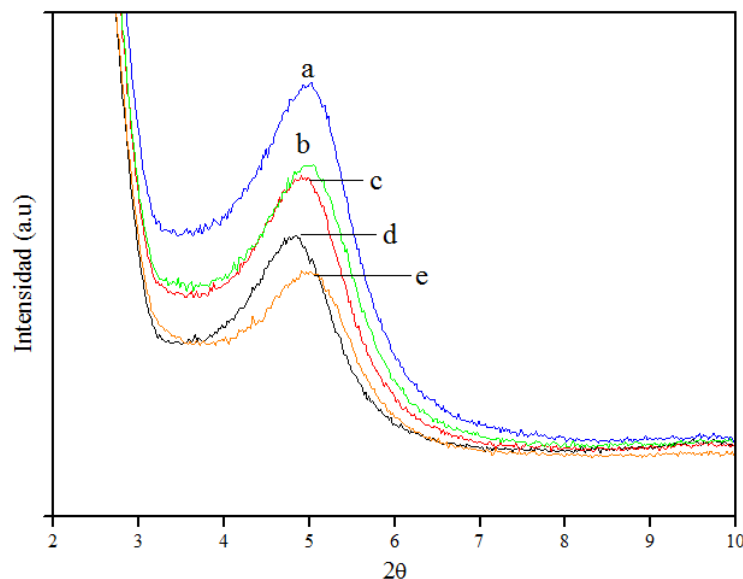


Figura 38. Efecto del pH en la preparación de MP/MMT

7.3.4 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La forma y la morfología de la superficie de los sistemas preparados se determinaron mediante SEM. La **figura 39-a**, muestra las MP que se obtuvieron con morfología esférica y superficie lisa, sin grietas ni heterogeneidades. Por otro lado, la micrografía del material compuesto MP/MMT **figura 39-b** revela partículas de la arcilla MMT como láminas adsorbidas aleatoriamente sobre la superficie de MP, que resultan en una superficie rugosa e irregular, pero manteniendo la forma esférica del sistema original [13].

El compuesto obtenido mostró una morfología que se ha denominado de **tipo frambuesa o armadura (“raspberry-like”)** que consiste en núcleos orgánicos recubiertos con partículas inorgánicas [43]. Esta morfología ha sido reportada previamente en sistemas tales como materiales compuestos de plata/polipirroles unidos a la superficie de esferas de sílice [112] y compuestos de poliestireno/laponita [113].

Varios autores han reportado la preparación de materiales compuestos a base de GEL y montmorillonita como sistemas de liberación controlada de fármacos, como la intercalación de cadenas de gelatina puras en la arcilla, sistemas tipo hidrogel [114] y nanopartículas [13]. Sin embargo, hasta el momento no se han reportado estructuras tipo **raspberry-like o frambuesa**, por lo que el sistema preparado resultó novedoso en cuanto a la estructura y morfología obtenida.

Por otro lado, se ha reportado, que en la obtención de materiales compuestos mediante la adición de arcilla MMT en el interior del acarreador de gelatina reduce la eficiencia de entrapamiento y la capacidad de carga del fármaco. En el sistema MP/MMT, este efecto se pudo evitar mediante la localización de la arcilla MMT en el exterior del acarreador, en la superficie de la MP, sin reducir el atrapamiento del fármaco en el interior del acarreador y aprovechando las propiedades de liberación controlada que brinda la MMT [13–15].

Finalmente, para evaluar el efecto del pH sobre la morfología, mediante SEM se analizó el material compuesto preparado a pH inferior (pH 3.0) y superior (pH 7.0) al PI de la gelatina, a fin de observar el efecto de la carga superficial de la MP en la morfología final del material compuesto. A pH 3.0, la **figura 39-c** ilustra la estructura de tipo frambuesa o raspberry-like antes mencionada debido a la adsorción de láminas de MMT cargadas negativamente sobre la superficie de la MP por atracción electrostática. Mientras que a pH 7.0, la **figura 39-d** ilustra que las MP conservaron su superficie lisa, ya que tanto la MMT como las MP tienen carga negativa, lo que impide la adsorción de las láminas de MMT en la superficie MP debido a repulsiones electrostáticas.

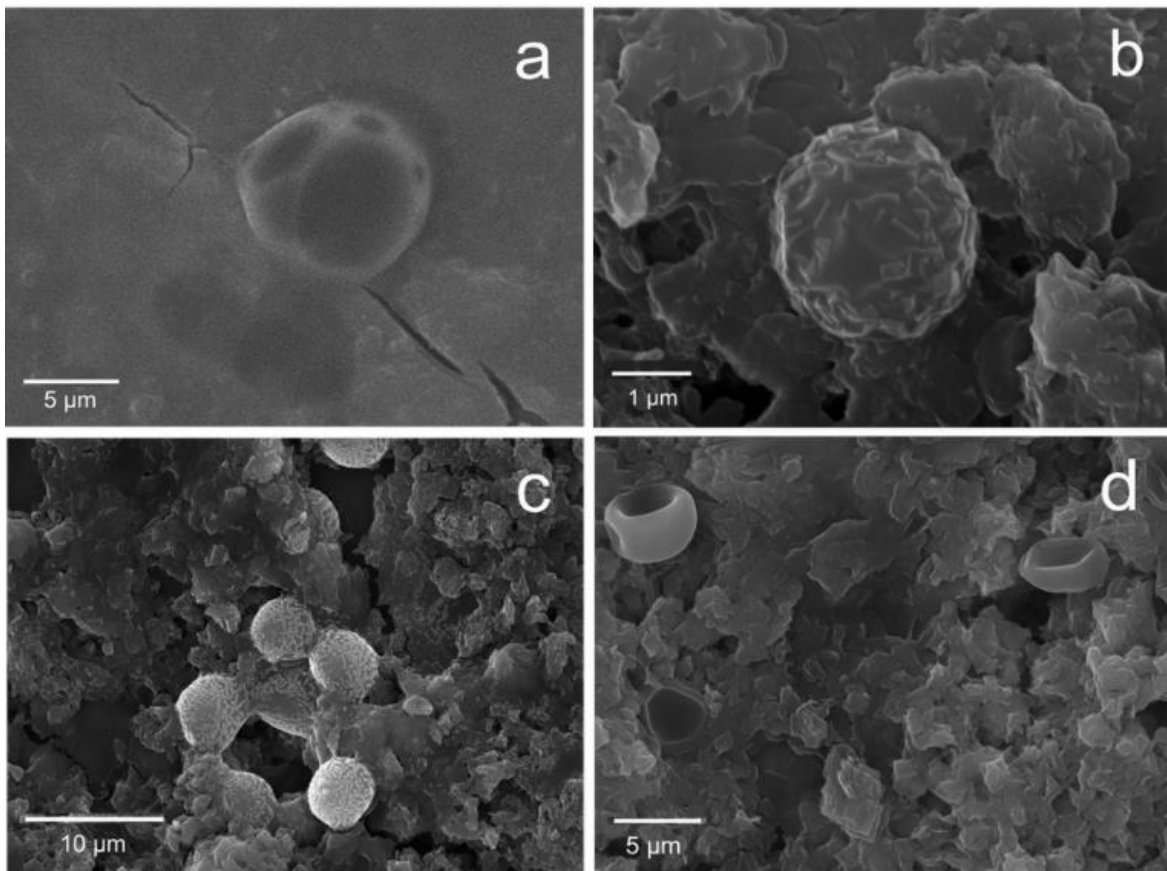


Figura 39. Micrografías en SEM de MP (a), MP/MMT pH=3.0 (b-c) y MP/MMT pH=7.0 (d)

7.3.5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Es bien sabido que en los materiales compuestos las arcillas mejoran las propiedades térmicas de los polímeros, como la estabilidad al aumentar la temperatura de degradación y descomposición debido a las excelentes propiedades de barrera. Por lo que otros grupos de investigación han evaluado la mejora de las propiedades térmicas en materiales compuestos a base de GEL y MMT, por ejemplo en películas preparadas para materiales de envase [115,116].

Los termogramas de los sistemas preparados MP, MP/MMT y el fármaco AC, se muestran en la **figura 40**. En el termograma de la AC se observó una endoterma ancha alrededor de 80-120°C, que se atribuyó a la pérdida de moléculas de agua de la sal trihidratada. También se observó un pico endotérmico alrededor de 155°C que se atribuyó al punto de fusión del fármaco confirmando que muestra su naturaleza cristalina. La ausencia de estas señales en los termogramas de MP y MP/MMT confirma el atrapamiento adecuado del fármaco, indicando una condición amorfa debido a la dispersión molecular o al estado de la solución sólida dentro del sistema lípido-polímero (MP) [25].

Para la GEL, se ha reportado en la literatura una transición vítrea (T_g) en 80-90°C atribuida a la movilidad de las regiones amorfas, seguida de una transición endotérmica de primer orden (T_m) alrededor de 110-115°C como resultado de la fusión de las uniones cristalinas y otra transición alrededor de 170°C debido a la isomerización de enlaces peptídicos (T_i) [117]. En el termograma del sistema MP, la T_g se observó alrededor de 80°C, no se pudo observar T_m indicando una disminución en la cristalinidad de GEL y la transición T_i se desplazó a alrededor de 190°C, lo que se ha reportado es característico de la GEL entrecruzada [118]. Este resultado confirma el entrecruzamiento realizado por el glutaraldehído durante la preparación del sistema MP. Por otro lado, en el material compuesto MP/MMT las transiciones T_m y T_i desaparecieron por la adición de arcilla, lo cual se puede deber a un aumento en restricciones de movilidad de las cadenas de GEL por las láminas de MMT [76], además, también se observó un aumento su T_g a 85°C respecto a MP, lo cual se observa a menudo en materiales compuestos a base de polímeros y arcilla [119]. En general, la mejora de la estabilidad térmica se atribuye a la resistencia térmica de MMT, y a la fuerte interacción electrostática entre MP y MMT que actúa como entrecruzamiento físico [76].

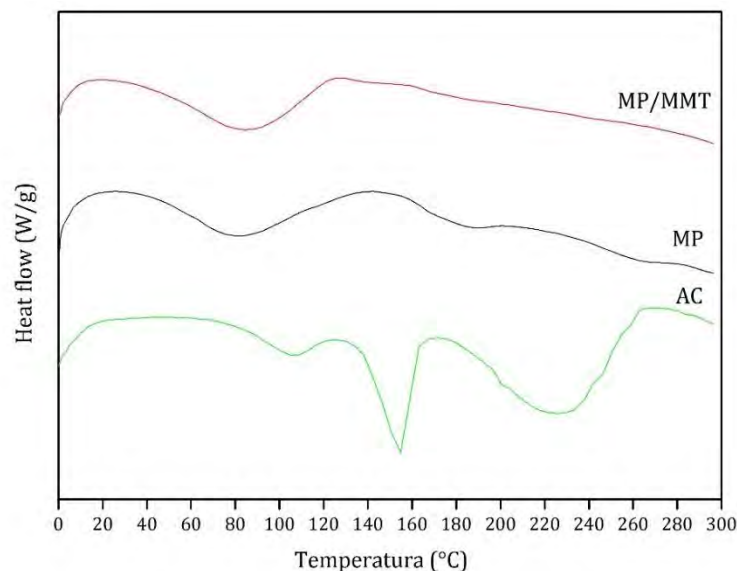


Figura 40. Termogramas de DSC de MP, MP/MMT y AC

7.4 Caracterización reológica

Se realizó la caracterización reológica de las MP en dispersión acuosa así como del material compuesto MP/MMT a diferentes valores de pH a fin de evaluar el efecto en sus propiedades reológicas. Para lo cual se realizaron pruebas de cizalla simple y cizalla oscilatoria, empleando

un sistema reométrico de cilindros concéntricos, ya que esta es apropiada para la caracterización de fluidos de baja viscosidad, además mantiene homogéneo el sistema, la temperatura y previene la evaporación. Todas las determinaciones reométricas fueron realizadas a $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ con la finalidad de simular la temperatura corporal.

En las pruebas de cizalla simple se observó que las dispersiones de MP presentaron un comportamiento newtoniano, en el cual la viscosidad (η) es dependiente del pH, observando la siguiente relación: $\eta 3.0 \pm 0.1$ ($\text{pH} < \text{PI}$) $> \eta 7.0 \pm 0.1$ ($\text{pH} > \text{PI}$) $> \eta 4.8 \pm 0.1$ ($\text{pH} = \text{PI}$) (**figura 41**). A valores de pH por encima y por debajo del PI, las cargas positivas o negativas fuertes de los grupos amino y carboxilo, producen repulsión electrostática entre las cadenas de gelatina, lo que permite la relajación y el aumento de la captación de agua, con un aumento de la viscosidad (η) [76,120].

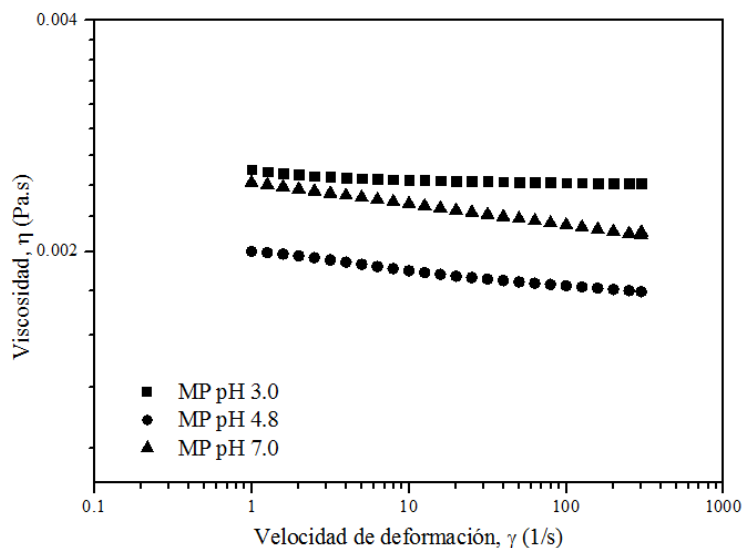


Figura 41. Efecto del pH en la viscosidad de las MP, prueba de cizalla simple a diferentes valores de pH (3.0, 4.8 y 7.0)

Así pues, en pruebas de flujo oscilatorio el comportamiento newtoniano está relacionado con la interacción débil entre las partículas esféricas observadas en el análisis SEM. La adición de arcilla para la obtención del compuesto induce un aumento significativo en la viscosidad compleja (η^*) respecto a su estructura, exhibiendo un comportamiento no newtoniano de tipo aldegazante al flujo ($n < 1$) para el material compuesto MP/MMT (**figura 42**), ya que la viscosidad compleja disminuye con el aumento en la frecuencia (ω). El comportamiento no newtoniano es causado por la presencia de la arcilla que se asocia para formar estructuras que son susceptibles a los cambios inducidos por el flujo (**figura 43**). La η^* depende del pH, como resultado de las interacciones entre las MP y MMT, con un máximo de η^* a $\text{pH} = \text{PI}$. Las

viscosidades complejas siguen el orden en función del pH: $\eta^*_{4.8}$ (pH = PI) > $\eta^*_{7.0}$ (pH > PI) > $\eta^*_{3.0}$ (pH < PI).

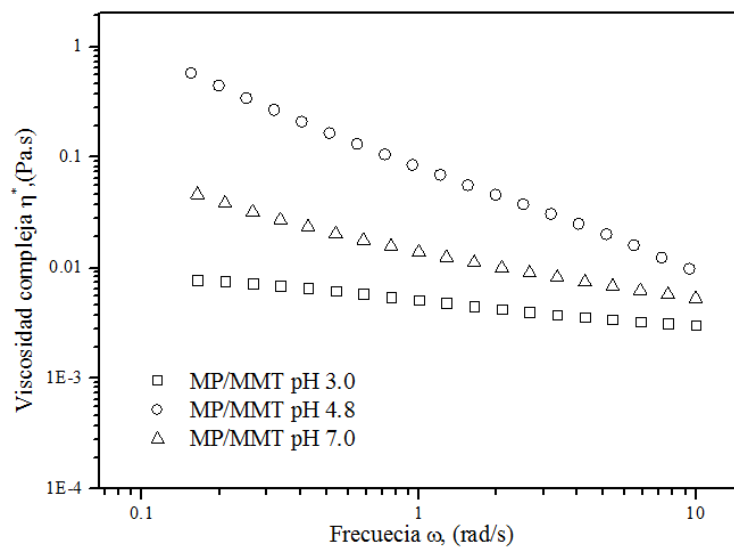


Figura 42. Efecto del pH en la viscosidad compleja del material compuesto MP/MMT a diferentes valores de pH (3.0, 4.8 y 7.0)

Se conoce que la carga del borde de la lámina de MMT es dependiente del pH, la cual permite diferentes modos de asociación entre las partículas tales como cara a cara (face-face, F-F), borde a borde (Edge-Edge, E-E) y borde a cara (edge-face, E-F). A pH ácido (por debajo del PI), se observa la formación de estructuras debido principalmente a la atracción electrostática entre las caras cargadas negativamente y los bordes cargados positivamente (E-F). Por lo tanto, las partículas de MMT se asocian en la estructura llamada *"casa de naipes"* o *"house of cards"* [121]. En el material compuesto preparado, la estructura de casa de naipes se debilita por la presencia de las MP con carga positiva. Por lo tanto, a pH 3.0, en el que las MP se encuentran cargadas positivamente se observó el valor de la viscosidad compleja η^* más bajo correspondiente al comportamiento menos dependiente de la frecuencia (del tipo adelgazante).

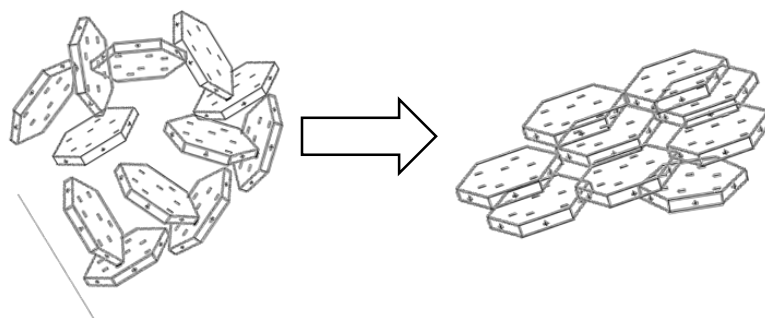


Figura 43. Estructura "house of cards" o casa de naipes formada por asociaciones de la arcilla

Por el contrario, a valores de pH altos (por encima del PI), los bordes y las caras de la MMT tienen carga negativa. Aquí, la formación de la estructura se debió a la repulsión electrostática de largo alcance (E-E y F-F). Además, a este pH (7.0), las MP están cargadas negativamente, lo que permitió una estructura de "casa de naipes" fuerte, con una mayor viscosidad compleja y un comportamiento pronunciado dependiente de la frecuencia (**figura 42**).

Además, en los espectros mecánicos dinámicos de pequeña amplitud de deformación la interacción entre MMT y MP revelaron un comportamiento tipo "*solid like*" (**figura 42**) es decir, se observó un comportamiento viscoso dominante ($G'' > G'$) pero con una meseta independiente de la frecuencia, presente a bajas frecuencias (tiempos grandes).

En el PI (pH 4.8), las MP son neutras y no interfieren en la asociación de partículas de MMT, por lo que permiten asociaciones (E-F), que conducen a la estructura más fuerte de "casa de naipes", observada en la **figura 42**, por lo que a este pH la estructura tuvo la mayor viscosidad η^* , lo que indica la poca interacción entre la arcilla MMT y las MP a este pH, lo cual coincide con los resultados de XRD que confirman la menor interacción en valores cercanos al PI.

En la **figura 44** se muestran los resultados de las pruebas oscilatorias en la zona viscoelástica lineal.

El recuadro representa el módulo elástico G' en función del pH a la frecuencia de $\omega = 1 \text{ rad s}^{-1}$. Se observó que G' alcanza un máximo en el PI (pH = 4.8) seguido de una disminución al alejarse el pH del PI (pH 3.0 y 7.0) (**figura 44**). Estos resultados muestran que la elasticidad del material compuesto MP/MMT depende del pH, y que a pH=PI el compuesto presenta una estructura altamente elástica basada en una red continua ("*casa de naipes*" o "*house-of-cards*") que se relaja a medida que el sistema se aleja del PI [51,52]. Es importante mencionar que a pH 3.0 y 7.0, el carácter viscoso domina a lo largo de todo el intervalo de frecuencias ($G'' > G'$), pero a pH 4.8 domina el carácter elástico ($G' > G''$) correspondiente a un comportamiento semisólido (**figura 45**).

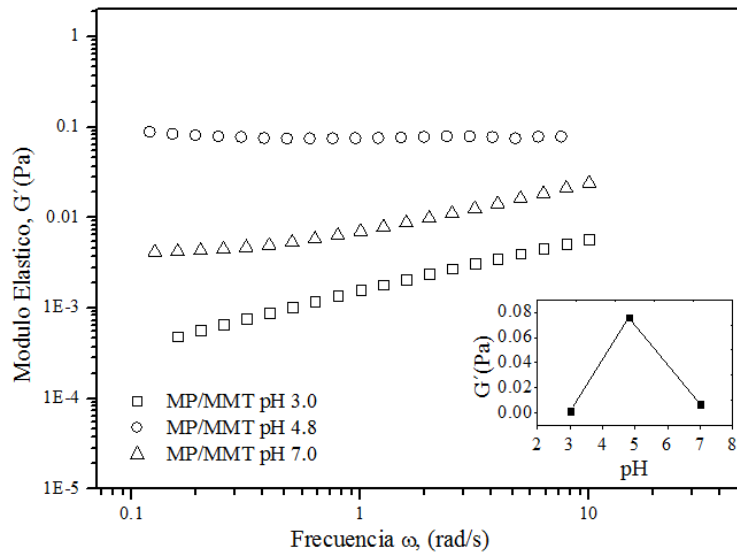


Figura 44. Efecto del pH en G' del material compuesto MP/MMT a diferentes valores de pH (3.0, 4.8 y 7.0)

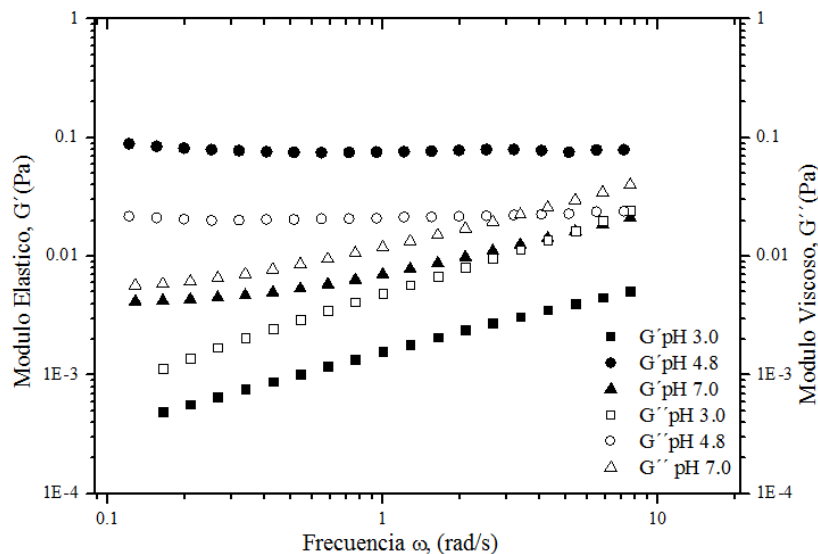


Figura 45. Caracterización reológica de MP y MP/MMT en función del pH en cizalla oscilatoria

El compuesto MP/MMT obtenido se formó dentro de las respectivas dispersiones, es por eso que el comportamiento es diferente en cada valor de pH, y se observó en diferentes resultados variando el pH en reología (dispersión en agua), SEM (estado sólido) y XRD (estado sólido).

En el caso de las MP, las propiedades de la gelatina influyen en el comportamiento reológico de acuerdo con el punto isoeléctrico de la gelatina y el pH del medio, ya que el pH modifica la carga de la partícula y por ende las interacciones entre partículas.

Consecuentemente también la carga superficial de las MP regula la interacción con la arcilla MMT, esta interacción modifica el comportamiento reológico de la dispersión del compuesto, es

decir estos resultados mostraron una relación entre MP y MMT fuertemente dependiente del pH, ya que el pH modifica las interacciones entre partículas. Finalmente, dado que este sistema fue desarrollado para liberación de fármacos resulta de gran relevancia evaluar el efecto del pH en la liberación de AC.

7.5 Estudios de liberación *in vitro*

Se realizaron estudios *in vitro* a fin de evaluar la liberación de la AC desde las MP y como la presencia de la arcilla modifica la liberación mediante la interacción con la GEL. La vía oral sigue siendo la más utilizada sin embargo presenta un reto en el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos. Cuando las formulaciones se administran por vía oral, pasan a través de diferentes regiones a lo largo del tracto gastrointestinal donde están expuestas a diferentes condiciones de pH. Para tener en cuenta dicha ruta, la liberación *in vitro* de AC se evaluó en diversos medios de pH que simulaban el entorno del TGI y el tiempo de tránsito a la temperatura corporal ($37.0^{\circ}\text{C}\pm 1.0^{\circ}\text{C}$).

El perfil de liberación *in vitro* del sistema MP y el material compuesto MP/MMT se examinaron durante 48 h con el método de la bolsa de diálisis en condiciones gástrica, intestinal y colónica considerando los estados de ayuno (FAS) (**figura 46-a**) y la ingesta de alimentos (FED) (**figura 46-b**). Se observó una liberación en condiciones gástricas del 14.89% para el estado FAS (pH 1.6) y 5.24% con el estado FED (pH 5.0) en un tiempo de 2 horas. En condiciones intestinales, se pudo observar que la liberación acumulada fue de 40.60% para FAS (pH 6.5) y 17.84% para FED (pH 5.8) durante 6 h. El perfil de liberación mostró un período inicial de liberación rápida durante 12 horas, seguido de una velocidad de liberación más lenta hasta las 48 horas. El patrón bifásico de liberación del fármaco observado es similar al reportado por otros autores [106]. Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) a las 48 horas del estudio, el % acumulado de liberación de AC en estado FAS (pH 7.0) es 66.13%, que fue más grande y más rápido que el estado FED (pH 7.0) con 54.99%. Shilpi *et al.*, (2017) reportó nanopartículas hibridas cargadas con AC para administración oral con liberación de 58.77 a 73.4% en 24 h.

La liberación de fármacos desde acarreadores a base de GEL implica diversos mecanismos como la desorción, difusión y biodegradación. Además, se ha reportado que el grado de entrecruzamiento tiene un impacto significativo en la liberación de los fármacos. Cuando las MP cargadas con AC entran en contacto con el medio de liberación, las moléculas de disolvente difunden a la red de la micropartículas y existe un proceso de relajación de las cadenas de GEL. Posteriormente las moléculas de AC se disuelven en el medio y se liberan a través de los canales.

La diferencia significativa ($p < 0.05$) en la liberación de MP del perfil de FAS y FED puede deberse al papel del pH en la regulación de la absorción de agua e hinchamiento de las MP en función del PI de la GEL. En pH ácido ($pH < PI$, es decir, 1.6 ± 0.1) o pH básico ($pH > PI$, es decir, 5.8 ± 0.1 , 6.5 ± 0.1 y 7.0 ± 0.1) el hinchamiento de las MP aumentó por las repulsiones electrostáticas de los grupos funcionales ya sea amino o carboxilo, alcanzando el valor mínimo en el punto isoeléctrico ($pH \sim PI$ es decir, 5.0 ± 0.1) [13]. Sin embargo, uno de los efectos más importantes que brindan las arcillas a los polímeros, es la mejora de las propiedades de barrera. En el material compuesto MP/MMT, se observó una liberación retardada con respecto al MP solas. La presencia de MMT modificó la liberación de AC a través de dos mecanismos básicos. El primero consiste en la mejora de las propiedades de barrera mediante el incremento en la tortuosidad, debido a la creación de un camino tortuoso por la presencia de las láminas de arcilla que retarda la difusión de moléculas de fármaco desde el interior de las MP y así mismo disminuye la penetración o absorción del medio disolvente. El otro mecanismo consiste en limitar el hinchamiento de la GEL por atracción electrostática con la arcilla, lo que crea un tipo de entrecruzamiento físico [45,76,120]. Tanto las MP como el material compuesto MP/MMT sostuvieron la liberación de AC durante largos períodos (48 h) incluso en las condiciones de pH más extremas. Este resultado sugirió que el compuesto MP/MMT permitió el máximo % de liberación de AC en las regiones intestinal y colónica donde el fármaco se puede absorber de manera más eficiente.

A $pH = 1.6 \pm 0.1$ ($pH < IEP$) la superficie de MP con carga positiva atrae las láminas de arcilla reduciendo la capacidad de hinchamiento, reduciendo la liberación de 14.89% en casi un 50% respecto de las MP a solo un 6.67% de fármaco liberado desde el material compuesto MP/MMT, lo que indicó que en la liberación en estómago estaría restringida por la presencia de la arcilla [120]. En la condición gástrica de FED a $pH = 5.0 \pm 0.1$ ($pH \sim IEP$), la superficie de MP es neutral por lo que la interacción con la MMT es mínima, lo cual se confirmó mediante XRD y reología, y dió como resultado valores similares ($p > 0.05$) de porcentaje de liberación acumulado entre MP y el material compuesto MP/MMT (7.26 y 6.02% respectivamente). En estas condiciones, a pesar de la presencia de la arcilla solo la estructura de las MP controla la liberación del fármaco, por lo cual se observaron valores iguales, debido a la poca interacción con MMT. A $pH = 5.8 \pm 0.1$, 6.5 ± 0.1 y 7.0 ± 0.1 ($pH > IEP$) las MP se encuentran con carga negativa por lo que puede existir repulsión con la MMT permitiendo la liberación del fármaco debido a la poca interacción con la arcilla, así como al hinchamiento por la presencia de las cargas en las cadenas de GEL. Se observó que el mayor porcentaje liberado corresponde a la porción intestinal y colónica con lo

cual se puede aumentar la biodisponibilidad del fármaco administrado al protegerlo de la degradación en las condiciones gástricas.

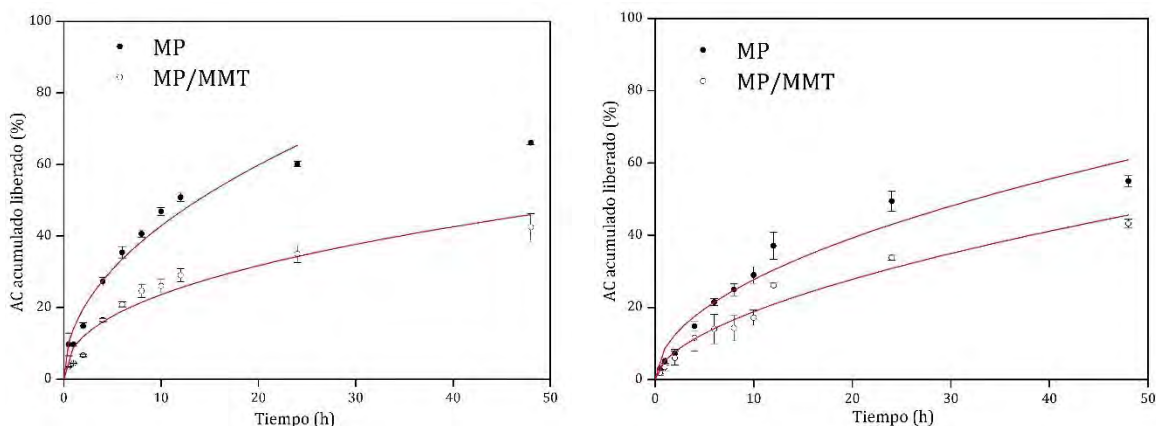


Figura 46. Perfiles de liberación y ajuste a modelo Korsmeyer-Peppas para MP y MP/MMT en FAS (a) y FED (b)

Los perfiles de liberación de los sistemas preparados se ajustaron al modelo de Korsmeyer-Peppas con un buen ajuste ($R^2 = 0.91-0.97$), y la **tabla 14** resume los parámetros obtenidos. La velocidad de liberación del material compuesto siguió diferentes cinéticas y fue dependiente del pH del medio de liberación, siendo controlado por la interacción entre MP y MMT. Por lo cual se observó una disminución en la velocidad de liberación (kKP) con la presencia de la MMT. Tanto MP como MP/MMT tienen valores de n correspondientes a una liberación de difusión Fickiana en FAS, mientras que para el estado de FED, se encuentra una liberación anómala (no Fickiana), en este caso, la liberación implica un mecanismo complejo que puede incluir mecanismos de difusión y erosión.

Finalmente, se observó un aumento en los valores de n para el material compuesto MP/MMT con respecto a las MP lo cual indicó un aumento en la restricción en la liberación del fármaco por la presencia de MMT [122].

Tabla 14. Liberación acumulada de atorvastatina (%) y parámetros de ajuste a modelo Korsmeyer-Peppas (* FAS y ** FED diferencia significativa ($p < 0.05$))

Parámetros	MP FAS	MP/MMT FAS	MP FED	MP/MMT FED
SGF (n=3) ± DE	14.89 ± 0.89*	6.67 ± 0.34*	7.26 ± 1.14	6.02 ± 1.90
SIF (n=3) ± DE	40.60 ± 0.95*	22.26 ± 1.09*	22.54 ± 1.85**	14.10 ± 3.62**
SCF (n=3) ± DE	66.13 ± 0.53*	42.53 ± 3.71*	54.99 ± 0.57**	43.29 ± 1.50**
kKP (n=3) ± DE	15.75 ± 0.43	7.96 ± 0.34	7.21 ± 1.03	4.78 ± 1.74
n (n=3) ± DE	0.41 ± 0.005	0.47 ± 0.02	0.57 ± 0.04	0.60 ± 0.12
R ²	0.9140	0.9741	0.9467	0.9483

7.6 Evaluación de citotoxicidad

La citotoxicidad se evaluó mediante ensayo de reducción de MTT Tetrazolio, el cual es un método colorimétrico simple, no radiactivo que permite evaluar citotoxicidad, viabilidad o proliferación celular [41]. El MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazolio bromuro] es degradado únicamente por células viables con metabolismo activo y el estudio se basa en la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales que convierten el MTT en formazán, un compuesto de color púrpura con un máximo de absorbancia cercano a 570 nm, por consiguiente la cantidad de MTT convertido en formazán es directamente proporcional al número de células [123] (**figura 47**).

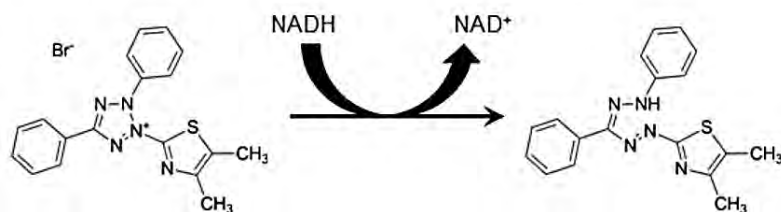


Figura 47. Conversión de MTT en formazán

La citotoxicidad del material compuesto MP/MMT se evaluó durante 24 h, así como sus componentes individuales, es decir, MP, MMT y AC en once concentraciones crecientes manteniendo la relación proporcional con respecto al material compuesto final y un grupo control al cual no se le aplicó ningún estímulo que corresponde al 100% de viabilidad celular. La **figura 48-a** mostró la citotoxicidad de la arcilla MMT donde se puede observar que hasta $\sim 240 \mu\text{g mL}^{-1}$ no hubo diferencia significativa con el grupo control ($p < 0.05$), este resultado es similar a lo reportado por Sarmah *et al.*, (2015) que en un ensayo de MTT en linfocitos encontró que con $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ la viabilidad celular varió de 80 a 90% durante 8 h [13], sin embargo, en nuestro estudio se incluyeron mayores concentraciones y tiempo de incubación. El valor calculado de IC_{50} durante 24 h fue de $1281 \mu\text{g mL}^{-1}$. Baek *et al.*, (2012) reportó la citotoxicidad MMT de $565.50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en células intestinales normales humanas, y señaló que la citotoxicidad de la MMT puede estar relacionada con el efecto del tamaño micrométrico de las partículas de la arcilla que en el cultivo cubren la superficie de las células interfiriendo en la proliferación celular al unirse a la membrana plasmática [124]. Además, respecto a la MMT y otras arcillas, algunos autores han sugerido que altas cantidades de partículas de arcilla podrían bloquear la mayoría de los canales en las membranas celulares, causando la muerte celular [125].

Por otro lado, en la literatura varios autores han reportado previamente que los acarreadores de fármacos preparados a base de GEL como nanopartículas o micropartículas, son

biocompatibles, no tóxicos y seguros para su uso en la administración de fármacos [41]. Acerca de la citotoxicidad de las MP preparadas, la **figura 48-b** mostró que hasta $16.12 \mu\text{g mL}^{-1}$ no hubo diferencia significativa con el grupo de control ($p < 0.05$) y la IC_{50} calculada fue de $992 \mu\text{g mL}^{-1}$ a las 24 h. Finalmente, la IC_{50} del material compuesto MP/MMT calculado fue $264 \mu\text{g mL}^{-1}$, la **figura 48-c** mostró que hasta $\sim 67 \mu\text{g mL}^{-1}$ no hubo diferencia significativa del grupo control ($p < 0.05$). Aunque el sistema MP presentó un valor de IC_{50} mayor respecto al material compuesto (MP/ MMT), se observó que el compuesto final mostró menos citotoxicidad que las MP solas (sin arcilla), ya que las concentraciones empleadas mantuvieron la relación proporcional entre MP y MMT en el compuesto final, es decir las concentraciones de MP/MMT contienen las misma cantidad total de MP. Dichos resultados pueden deberse a que las láminas de la arcilla MMT decoraron o recubrieron la superficie de las MP creando un camino tortuoso que dificultó y retardo la liberación del fármaco, como se observó en los estudios de liberación *in vitro* [13]. Resultados similares fueron reportados previamente con nanopartículas de gelatina [13], películas de quitosano [126] y microcompositos o micro materiales compuestos de poli (L-lactida) que indican que el MMT proporciona una protección celular significativa. El MMT, MP y MP/MMT no redujeron significativamente la viabilidad celular, lo que puede indicar una buena biocompatibilidad para estos materiales [127].

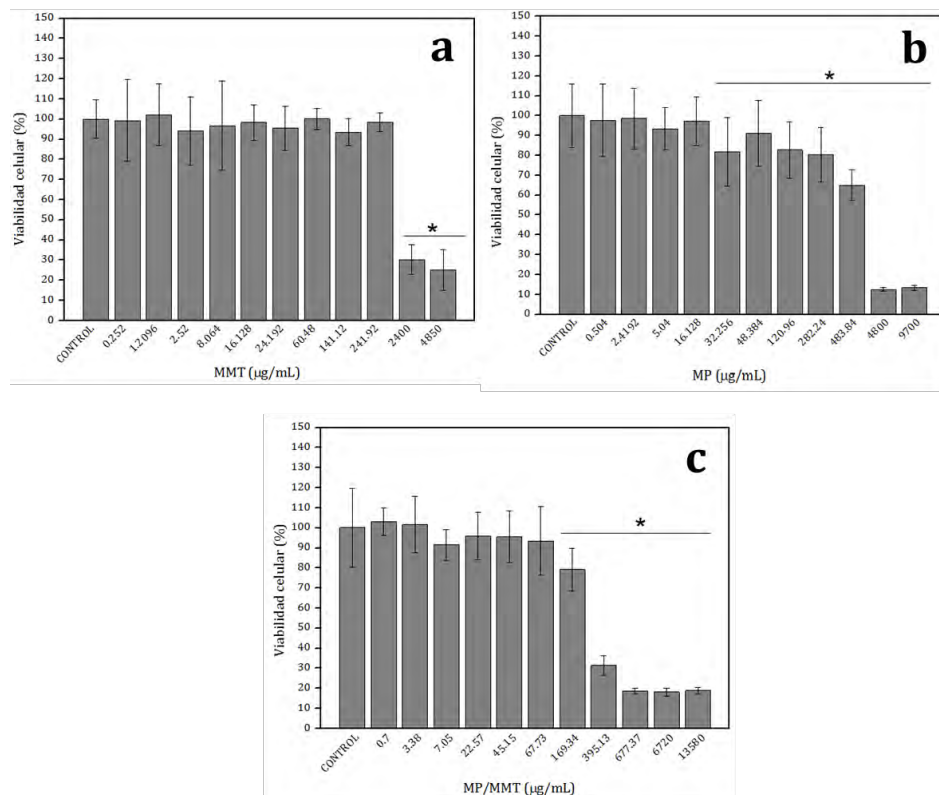


Figura 48. Gráficas de viabilidad celular a diferentes concentraciones en 24 h de MMT(a), MP (b) y MP/MMT (c)

La evaluación de la morfología celular mediante microscopía óptica, mostró que las células sobrevivieron y crecieron en el fondo de los pozos. Las **figuras 49,50 y 51** muestran las fotografías con microscopio óptico con aumento 10x de células de fibroblastos 3T3NIH cultivadas y expuestas a los diferentes tratamientos de MMT, MP y material compuesto MP/MMT. Se observó que las células NIH3T3T3 mostraron la morfología característica de la línea para fibroblastos no comprometidos, sin embargo en algunos se observaron células con morfología redonda, lo que fue indicativo de toxicidad en altas concentraciones.

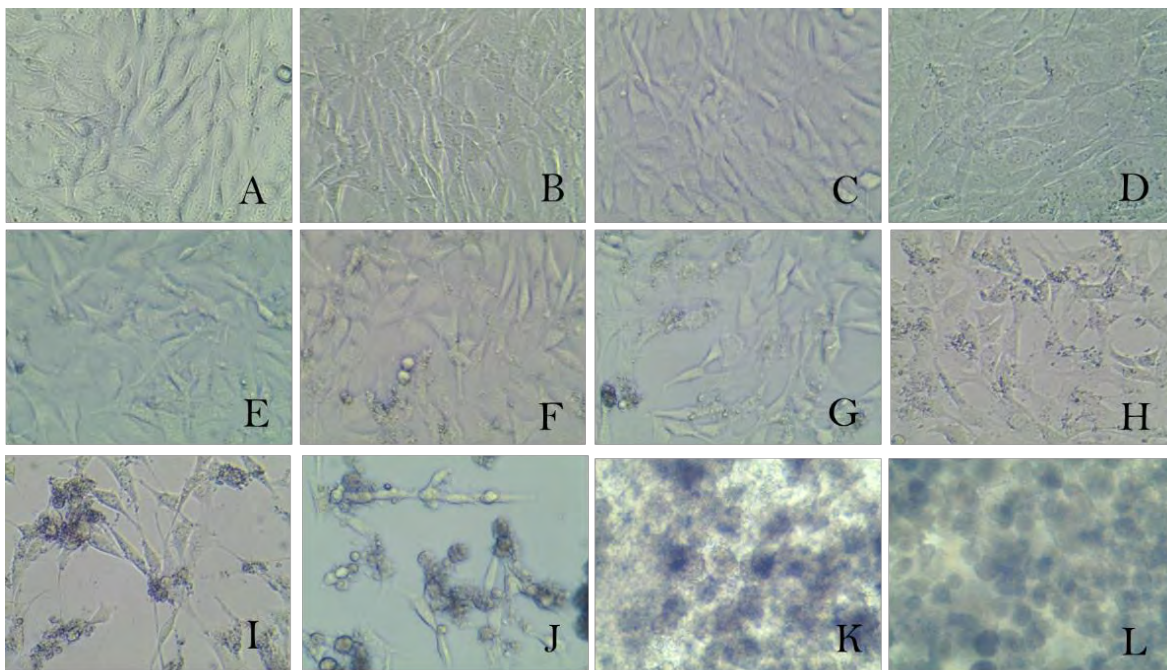


Figura 49. Células NIH3T3T3 fibroblastos con MMT (A-control, B-0.252, C-1.20, D-2.52, E-8.064, F-16.128, G-24.192, H-60.48, I-141.12, J-241.92, K-2400, L-4850 µg/mL)

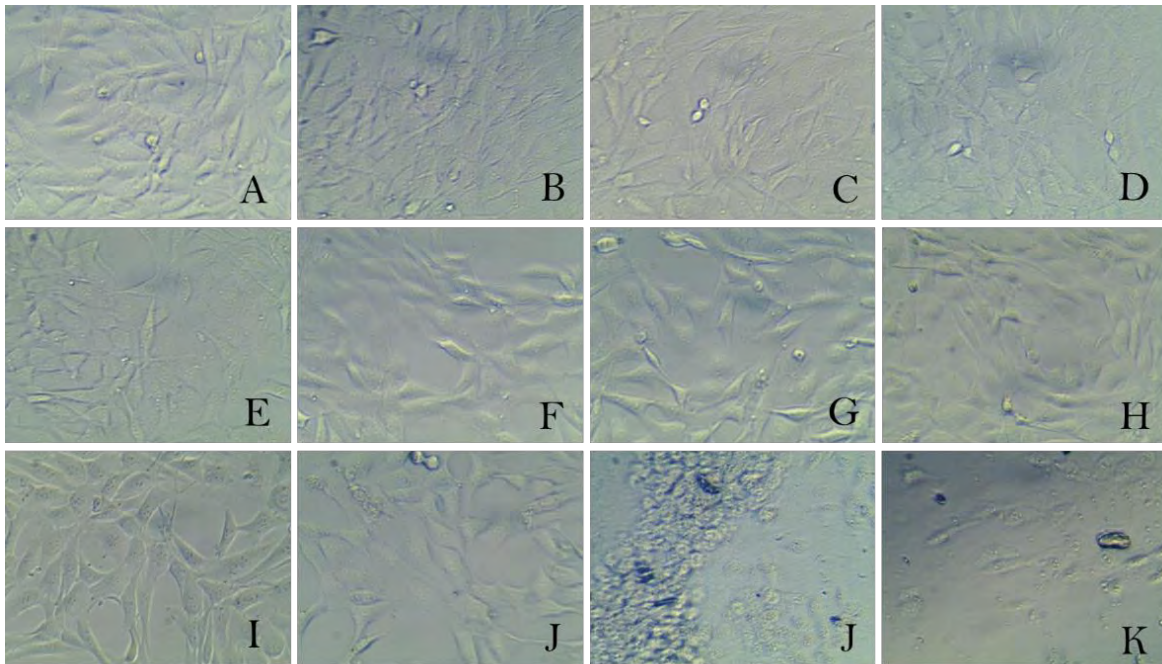


Figura 50. Células NIH3T3T3 fibroblastos con MP (A-control, B-0.5, C-2.4, D-5.0, E-16.1, F-32.3, G-48.4, H-121.0, I-282.2, J-483.8, K-4800, L-9700 µg/mL)

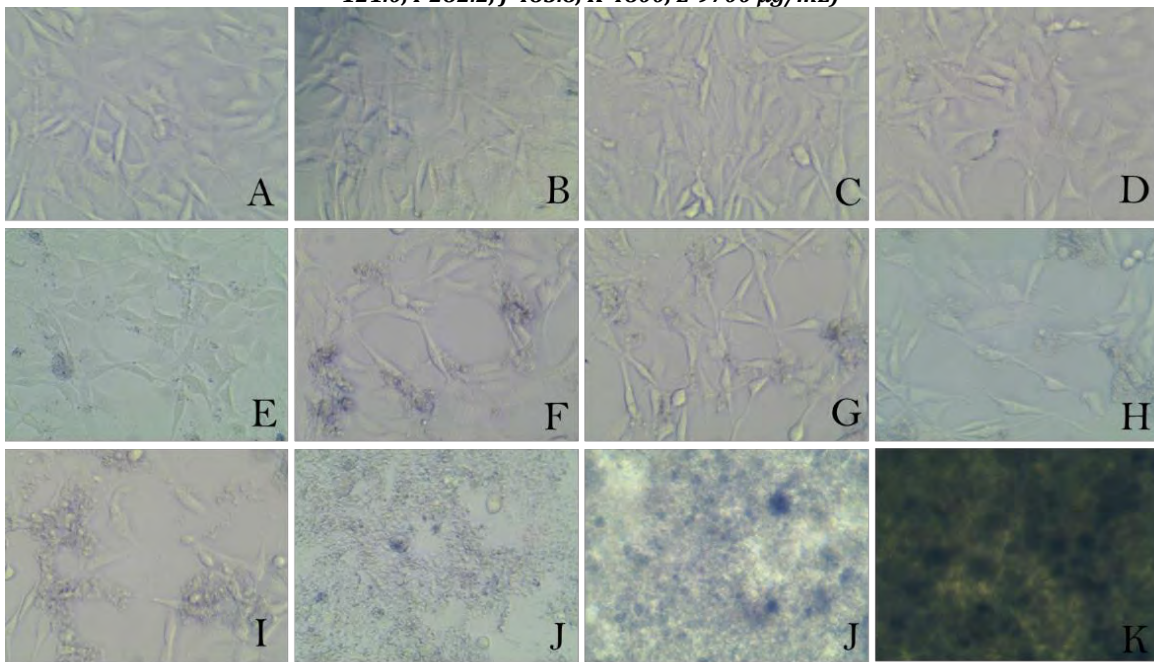


Figura 51. Células NIH3T3T3 fibroblastos con MP/MTT compuesto (A-control, B-0.71, C-3.39, D-7.06, E-22.58, F-45.16, G-67.4, H-169.34, I-395.14, J-677.38, K-6720, L-13580 µg/mL)

7.7 Evaluación de mucoadhesión

Como un estudio previo a la evaluación de mucoadhesión se determinó el potencial Z de los sistemas preparados y de la mucina en un intervalo de pH de 1.6 ± 0.1 a 6.5 ± 0.1 como se muestra en la **figura 52** para MMT, MP, el material compuesto MP/MMT y una dispersión de mucina gástrica de cerdo (5% p/p).

Como se mencionó anteriormente en el potencial zeta de la arcilla MMT se observó la carga negativa permanente característica para MMT debido a la sustitución isomórfica en la estructura en todos los pH estudiados ($\xi = -17.5$ a -27.76 mV). Las MP mostraron el cambio de carga positiva a negativa ($\xi = 19.3$ a -6.44) debido a la presencia de grupos NH_3^+ y COO^- y el punto isoeléctrico (PI) de la gelatina tipo B alrededor de $\text{pH}=4.8$ [128]. En el caso del material compuesto MP/MMT, se observó un comportamiento similar a las MP con un cambio de potencial Z de positivo a negativo, en el pH por debajo del PI de la gelatina ($\text{pH} = 1.6 \pm 0.1$) se observó un cambio a valores inferiores de potencial zeta respecto a las MP debido a la adsorción de partículas MMT en la superficie de las MP impulsadas por atracción electrostática, sin embargo, a pH por encima del PI de la gelatina ($\text{pH} = 6.5 \pm 0.1$) el potencial Z ($\xi = -9.02$) fue muy cercano a las MP ($\xi = -6.44$). A pH 6.5, el sistema MP y la arcilla MMT se cargaron negativamente lo que podría inducir repulsión electrostática entre ambos materiales y finalmente su separación.

Por otro lado, respecto a la muestra de mucina, se sabe que en la cadena principal del polipéptido de mucina existen residuos de ácido glutámico y ácido aspártico ($\text{pK}_a \sim 4$), además, de en las cadenas de oligosacáridos hay residuos de ácido siálico ($\text{pK}_a \sim 2.6$) y grupos sulfato ($\text{pK}_a \sim 1$) que determinan las propiedades electrostáticas y sus propiedades únicas de formación de gel [129]. Sin embargo, la mucina mostró un PI asintótico ya que las moléculas permanecieron cargadas negativamente en todos los valores de pH estudiados, dicho comportamiento ya ha sido previamente reportado [130].

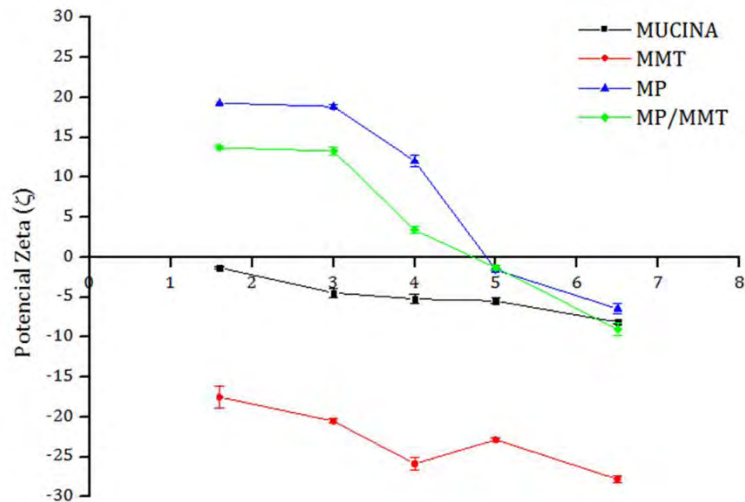


Figura 52. Efecto de pH en potencial Z de muestras para mucoadhesión

En la administración oral de fármacos, la mucoadhesión es proporcionada por la formación de enlaces no covalentes como puentes de hidrógeno e interacciones iónicas o la adhesión física entre la capa de moco y los materiales mucoadhesivos [64].

Los resultados de perfiles de liberación, morfología mediante SEM y las propiedades viscoelásticas evaluadas mediante reología demostraron que las características del material compuesto de MP/MMT se ven fuertemente afectadas por el pH que es capaz de regular la interacción entre la arcilla MMT y las MP, por lo cual se decidió evaluar la mucoadhesión mediante determinaciones reológicas en diferentes valores de pH: pH 1.6 ± 0.1 y pH 6.5 ± 0.1 para simular las condiciones gástricas (FGS) e intestinales (FIS) del tracto gastrointestinal (TGI) a temperatura corporal $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ [78].

La **figura 53** muestra los resultados de las pruebas de evaluación de las propiedades viscoelástica para los tres sistemas estudiados MP, MMT y el material compuesto MP/MMT. Se pudo observar un aumento en magnitud de los módulos elástico y viscoso, G' y G'' respectivamente en la mezcla de sistema-mucina (MMT+Mucina (**figura 53 a y b**), MP+Mucina (**figura 53 c y d**), MP/MMT+Mucina (**figura 53 e y f**)) en comparación con los componentes individuales, es decir las curvas de la dispersión de mucina y la dispersión de los sistema individuales (MMT, MP o MP/MMT).

Mediante la determinación del potencial Z se buscó elucidar las posibles interacciones entre la mucina y los sistemas estudiados. A pH 1.6 ± 0.1 (**figura 53 a**) la arcilla MMT ($\xi = -17.5$ mV) y la mucina ($\xi = -1.31$ mV) se cargaron negativamente, sin embargo, a pH ácido los carboxilatos son protonados permitiendo el despliegue de las cadenas de mucina con un cambio en la conformación a estructura tipo varilla que puede permitir la interacción con MMT por puentes

de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals [63]. A pH neutro = 6-7 (**figura 53 b**), las cadenas de mucina adquieren una conformación de espiral con dominios hidrofóbicos plegados por puentes entre carboxilatos y grupos amino cargados positivamente, esta conformación puede limitar la interacción con la arcilla. Estos cambios en la conformación de mucina pueden explicar las diferencias en el sinergismo reológico para la arcilla MMT ($\Delta G'_{1.6} > \Delta G'_{6.5}$) (**figura 53 a y b**) (**tabla 15**). Hasta donde sabemos, no hay reportes previos en la literatura sobre la determinación del sinergismo reológico de la MMT, pero es necesario realizar más caracterizaciones ya que la mucoadhesión es un fenómeno muy complejo.

Por otro lado, la gelatina es un biopolímero catiónico bien estudiado, incluyendo su comportamiento mucoadhesivo en diversos sistemas como micropartículas mucoadhesivas para la administración de fármacos, como microesferas de gelatina para la erradicación de *H. pylori* [131] y microesferas de gelatina para administración por vía rectal [132]. En general, se sabe que el primer paso de la mucoadhesión consiste en el contacto íntimo entre los materiales mucoadhesivos y la superficie del moco, seguido del entrelazamiento mecánico con fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno y otras fuerzas. Dado que la mucina está cargada negativamente, una carga positiva podría facilitar el proceso mucoadhesivo [131,133]. A pH=1.6±0.1, la carga superficial de las MP fue positiva ($\xi = 19.3$ mV) (**figura 53 c**), como se mencionó anteriormente debido a los grupos NH_3^+ , lo cual puede conducir a la interacción con las cadenas de mucina ($\xi = -1.31$ mV) por atracción electrostática. Sin embargo, el sinergismo reológico calculado fue negativo, este resultado puede deberse a la adsorción de cadenas de mucina negativa en la superficie positiva de las MP que dió lugar a un **“complejo soluble”** por atracción electrostática, es decir un sistema disperso con comportamiento similar al del sistema individual, este resultado es similar a otros estudios como nanopartículas de quitosano cargadas positivamente con sinergismo reológico negativo determinado por mediciones de viscosidad [70]. Este tipo de resultados han demostrado que una interacción mucoadhesiva no da lugar automáticamente a un sinergismo reológico positivo ya que una interacción en una mezcla puede dar lugar a propiedades viscoelásticas más débiles que la suma de los componentes individuales [134].

También se observó que en ambos valores de pH el carácter viscoso domina a lo largo de todo el rango de frecuencias ($G'' > G'$), pero a pH ácido se reveló un comportamiento tipo **“sólido like”** (comportamiento viscoso dominante $G'' > G'$ pero con una meseta independiente de la frecuencia) principalmente observada a bajas frecuencias, que confirma la interacción entre la MP (carga positiva) y la mucina (carga negativa).

A $\text{pH}=6.5\pm 0.1$ las MP ($\xi = -6.44 \text{ mV}$) y la mucina ($\xi = -8.12 \text{ mV}$) (**figura 53 d**) presentaron carga negativa, sin embargo, probablemente el principal mecanismo de interacción es mediante puentes de hidrógeno debido a su rica composición en grupos hidrofílicos como OH, COOH y NH_2 lo que condujo a un valor positivo de sinergismo reológico.

Finalmente, a $\text{pH } 1.6\pm 0.1$ el material compuesto MP/MMT (**figura 53 e**) mostró valores positivos y superiores de sinergia que son atribuibles a un entrecruzamiento físicos entre cadenas de mucina (carga negativa), partículas de MP (carga positiva) y la MMT (carga negativa), a esta condición de pH se observó el valor más alto de sinergismo reológico que correspondió al material compuesto. A diferencia de las MP solas, la presencia de arcilla favorece la formación de una nueva estructura tipo red, la cual es dependiente del pH pues se ve debilitada a pH cercano a la neutralidad (**figura 53 f**).

Tabla 15. Sinergismo Reológico en función del pH

Sistema	$\Delta G'$	
	1.6	6.5
<i>MMT</i>	0.07	0.039
<i>MP</i>	-0.06	0.001
<i>MP/MMT</i>	0.26	0.001

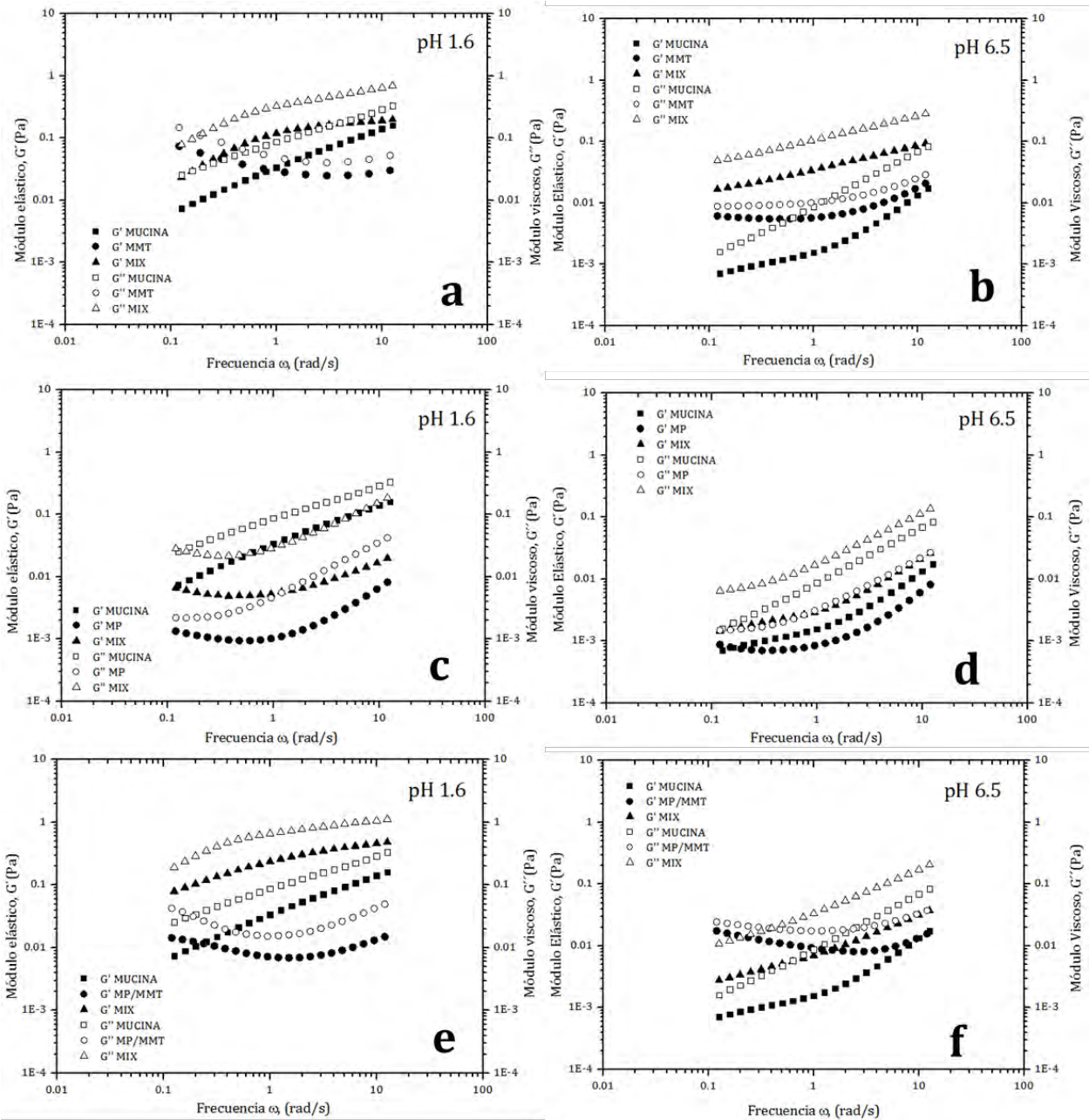


Figura 53. Evaluación de las propiedades viscoelásticas en la interacción con mucina

VIII. CONCLUSIONES

- Se realizó la caracterización de diferentes arcillas, además de su capacidad de adsorción. Se seleccionó la MMT Nanoclay[®] ya que presentó los valores más altos de CIC, potencial Z y Q para AM, así como buena adsorción de colesterol.
- Se preparó un nuevo material compuesto a base de micropartículas híbridas lípido-polímero (MP/MMT) con alta eficiencia de entrapamiento de atorvastatina (>60%) y se caracterizó mediante diversas técnicas. El grado de interacción entre la arcilla MMT y MP se estimó mediante experimentos de XRD, y se encontró que los resultados eran fuertemente dependientes del pH. Además, la MMT modificó las propiedades reológicas, térmicas, morfológicas y perfil de liberación del acarreador (MP).
- El composito preparado es un sistema novedoso con una estructura de tipo frambuesa o *“raspberry-like”* en la que la MMT se adsorbió en la superficie de las MP principalmente por atracción electrostática, además el composito presentó un comportamiento reológico no newtoniano dependiente del pH.
- Los sistemas preparados micropartículas (MP) y composito (MP/MMT) presentaron una liberación controlada de AC durante 48 horas con un mecanismo de liberación y velocidad dependiente del pH. Este nuevo compuesto es un sistema de administración de fármacos sencillo y de bajo costo que puede ser destinado a la liberación controlada intestinal-colónica. Además mediante isoterma de adsorción se confirmó la capacidad de adsorción de colesterol de las arcillas empleadas, por lo que este sistema puede ser un sistema que actúe mediante mecanismos combinados para la reducción de colesterol en sangre.
- El estudio de citotoxicidad mostró que los sistemas preparados son seguros y no tóxicos. Además en el composito la adición de MMT redujo la toxicidad.
- La evaluación de mucoadhesión mediante el sinergismo reológico sugiere una posible actividad mucoadhesiva de los sistemas preparados MP y MP/MMT mediante una administración por vía oral, la cual es dependiente del pH.

IX. REFERENCIAS

- [1] Organización Mundial de la Salud, Informe sobre la situación mundial de las enfermedades no transmisibles, Who. (2016) 1–18. doi:ISBN: 978 92 4 156422 9.
- [2] V. Tiwari, M. Khokhar, Mechanism of action of anti-hypercholesterolemia drugs and their resistance, *Eur. J. Pharmacol.* 741 (2014) 156–170. doi:10.1016/j.ejphar.2014.07.048.
- [3] C. Robin Ganellin, Discovery of the cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, Elsevier Ltd, 2013. doi:10.1016/B978-0-12-397176-0.00015-7.
- [4] J. V. Natarajan, C. Nugraha, X.W. Ng, S. Venkatraman, Sustained-release from nanocarriers: A review, *J. Control. Release.* 193 (2014) 122–138. doi:10.1016/j.jconrel.2014.05.029.
- [5] E. Ruiz-Hitzky, M. Darder, F.M. Fernandes, B. Wicklein, A.C.S. Alcântara, P. Aranda, Fibrous clays based bionanocomposites, *Prog. Polym. Sci.* 38 (2013) 1392–1414. doi:10.1016/j.progpolymsci.2013.05.004.
- [6] R.I. Iliescu, E. Andronescu, G. Voicu, A. Ficai, C.I. Covaliu, Hybrid materials based on montmorillonite and citostatic drugs: Preparation and characterization, *Appl. Clay Sci.* 52 (2011) 62–68. doi:10.1016/j.clay.2011.01.031.
- [7] O. Sivak, J. Darlington, P. Gershkovich, P.P. Constantinides, K.M. Wasan, Protonated nanostructured aluminosilicate (NSAS) reduces plasma cholesterol concentrations and atherosclerotic lesions in Apolipoprotein E deficient mice fed a high cholesterol and high fat diet, *Lipids Health Dis.* 8 (2009) 30. doi:10.1186/1476-511X-8-30.
- [8] K. Gershkovich, Pavel Sivak, Olena Contretas-Whitney, Susana Darlington, Jerald Wasan, Assessment of Cholesterol Absorption Inhibitors Nanostructured Aluminosilicate and Cholestyramine Using In Vitro Lipolysis Model, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 291–300. doi:10.1002/jps.22770.
- [9] S. Jain, P.U. Valvi, N.K. Swarnakar, K. Thanki, Gelatin Coated Hybrid Lipid Nanoparticles for Oral Delivery of Amphotericin B, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 2542–2553. doi:10.1021/mp300320d.
- [10] B. Mandal, H. Bhattacharjee, N. Mittal, H. Sah, P. Balabathula, L.A. Thoma, G.C. Wood, Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9 (2013) 474–491. doi:10.1016/j.nano.2012.11.010.
- [11] S. Jayrajsinh, G. Shankar, Y.K. Agrawal, L. Bakre, Montmorillonite nanoclay as a multifaceted drug-delivery carrier: A review, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 39 (2017) 200–209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.03.023>.
- [12] B.D. Kevadiya, S.S. Chettiar, S. Rajkumar, H.C. Bajaj, H. Brahmabhatt, J.C. Chaudhari, R.P. Thumbar, D. Jhala, M. V. Rao, Evaluation of Montmorillonite/Poly (L-Lactide) microcomposite spheres as ambidextrous reservoirs for controlled release of Capecitabine (Xeloda) and assessment of cell cytotoxic and oxidative stress markers, *Compos. Sci. Technol.* 90 (2014) 193–201. doi:10.1016/j.compscitech.2013.11.003.
- [13] M. Sarmah, N. Banik, A. Hussain, A. Ramteke, H.K. Sharma, T.K. Maji, Study on crosslinked gelatin-montmorillonite nanoparticles for controlled drug delivery applications, *J. Mater. Sci.* 50 (2015) 7303–7313. doi:10.1007/s10853-015-9287-3.
- [14] S. Jain, M. Datta, Montmorillonite-PLGA nanocomposites as an oral extended drug delivery vehicle for venlafaxine hydrochloride, *Appl. Clay Sci.* 99 (2014) 42–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2014.06.006>.
- [15] S. Lal, M. Datta, In vitro prolonged gastric residence and sustained release of atenolol using novel clay polymer nanocomposite, *Appl. Clay Sci.* 114 (2015) 412–421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2015.06.017>.
- [16] M. Cofan Pujol, Mecanismos básicos. Absorción y excreción de colesterol y otros esteroides, *Clin. e Investig. En Arterioscler.* 26 (2014) 41–47. doi:10.1016/j.arteri.2013.10.008.
- [17] E. Ros, Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática, *Rev. Española Cardiol.* 6 (2006) 52–62. doi:10.1016/S1131-3587(06)75329-8.
- [18] D.E. Vance, J.E. Vance, Cholesterol biosynthesis, *Biochem. Lipids, Lipoproteins Membr. Edn.* (2002).
- [19] E. Ros, Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk, *Atherosclerosis.* 151 (2000) 357–379. doi:10.1016/S0021-9150(00)00456-1.
- [20] R.F. Da Costa, V.N. Freire, E.M. Bezerra, B.S. Cavada, E.W.S. Caetano, J. De, L. Filho, E.L. Albuquerque, Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 1389–1398. doi:10.1039/c1cp22824b.
- [21] S. Lim, P.C. Oh, I. Sakuma, K.K. Koh, How to balance cardiorenometabolic benefits and risks of statins, *Atherosclerosis.* 235 (2015) 644–648. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.06.001.
- [22] R. Chouksey, H. Pandey, A.K. Jain, H. Soni, G.K. Saraogi, Preparation and evaluation of the self emulsifying drug delivery system containing Atorvastatin HMG-COA inhibitor, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 3 (2011) 147–152. doi:10.5138/ijaps.2010.0976.1055.01028.
- [23] Z. Li, W. Tao, D. Zhang, C. Wu, B. Song, S. Wang, T. Wang, M. Hu, X. Liu, Y. Wang, Y. Sun, J. Sun, The studies of PLGA nanoparticles loading atorvastatin calcium for oral administration in vitro and in vivo, *Asian J. Pharm. Sci.* 12 (2017) 285–291. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2016.08.006>.

- [24] N. Kumar, S. Chaurasia, R.R. Patel, G. Khan, V. Kumar, B. Mishra, Atorvastatin calcium loaded PCL nanoparticles: development, optimization, in vitro and in vivo assessments, *RSC Adv.* 6 (2016) 16520–16532. doi:10.1039/c5ra26674b.
- [25] N. Kumar, S. Chaurasia, R.R. Patel, G. Khan, B. Mishra, Atorvastatin calcium encapsulated eudragit nanoparticles with enhanced oral bioavailability, safety and efficacy profile, *Pharm. Dev. Technol.* 22 (2017) 156–167. doi:http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2015.1108983.
- [26] S. Sripriyalakshmi, C.H. Anjali, C. George Priya Doss, B. Rajith, A. Ravindran, BSA nanoparticle loaded atorvastatin calcium - A new facet for an old drug, *PLoS One.* 9 (2014) 1–11. doi:10.1371/journal.pone.0086317.
- [27] Y.S. Jin, J. Ulrich, New crystalline solvates of atorvastatin calcium, *Chem. Eng. Technol.* 33 (2010) 839–844. doi:10.1002/ceat.200900571.
- [28] J.S. Cohn, A. Kamili, E. Wat, R.W.S. Chung, S. Tandy, Reduction in intestinal cholesterol absorption by various food components: Mechanisms and implications, *Atheroscler. Suppl.* 11 (2010) 45–48. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.04.004.
- [29] M. Florentin, E.N. Liberopoulos, M.S. Elisaf, Ezetimibe-associated adverse effects: What the clinician needs to know, *Int. J. Clin. Pract.* 62 (2008) 88–96. doi:10.1111/j.1742-1241.2007.01592.x.
- [30] K. Park, Controlled drug delivery systems: Past forward and future back, *J. Control. Release.* 190 (2014) 3–8. doi:10.1016/j.jconrel.2014.03.054.
- [31] K. Hadinoto, A. Sundaresan, W.S. Cheow, Lipid – polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: A review, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 427–443. http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.002.
- [32] M.A. Hood, M. Mari, R. Muñoz-Espí, Synthetic strategies in the preparation of polymer/inorganic hybrid nanoparticles, *Materials (Basel).* 7 (2014) 4057–4087. doi:10.3390/ma7054057.
- [33] L. Zhang, L. Zhang, Lipid–Polymer Hybrid Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Applications, *Nano Life.* 01 (2010) 163–173. doi:10.1142/S179398441000016X.
- [34] M.C. Teixeira, C. Carbone, E.B. Souto, Beyond liposomes: Recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery, *Prog. Lipid Res.* 68 (2017) 1–11. doi:10.1016/j.plipres.2017.07.001.
- [35] K. Linhua, Zhang Dunwan, Zhu Xia, dong Hongfan, Sun Cunxian Song Chun, Wang Deling, Folate-modified lipid – polymer hybrid nanoparticles for targeted paclitaxel delivery, *Int. J. Nanomedicine.* 10 (2015) 2101–2114. doi:10.2147/IJN.S77667.
- [36] S. Kumar, P. Sangwan, V. Lather, D. Pandita, Biocompatible PLGA-oil hybrid nanoparticles for high loading and controlled delivery of resveratrol, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 30 (2015) 54–62. doi:10.1016/j.jddst.2015.09.016.
- [37] S.K. Samal, M. Dash, S. Van Vlierberghe, D.L. Kaplan, E. Chiellini, C. van Blitterswijk, L. Moroni, P. Dubruel, Cationic polymers and their therapeutic potential, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7147–7194. doi:10.1039/c2cs35094g.
- [38] A.K. Bajpai, J. Choubey, Design of gelatin nanoparticles as swelling controlled delivery system for chloroquine phosphate, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 345–358. doi:10.1007/s10856-006-8235-9.
- [39] S. Goswami, J. Bajpai, A.K. Bajpai, Designing Gelatin Nanocarriers as a Swellable System for Controlled Release of Insulin: An In-Vitro Kinetic Study, *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* 47 (2009) 119–130. doi:10.1080/10601320903458556.
- [40] M. Santoro, A.M. Tataru, A.G. Mikos, Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering, *J. Control. Release.* 190 (2014) 210–218. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.014.
- [41] A.O. Elzoghby, Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research, *J. Control. Release.* 172 (2013) 1075–1091. http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.019.
- [42] S. Young, M. Wong, Y. Tabata, A.G. Mikos, Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules, *J. Control. Release.* 109 (2005) 256–274. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.023.
- [43] M. Agrawal, S. Gupta, M. Stamm, Recent developments in fabrication and applications of colloid based composite particles, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 615–627. doi:10.1039/c0jm02631j.
- [44] M. Alexandre, P. Dubois, Polymer-layered silicate nanocomposites: Preparation, properties and uses of a new class of materials, *Mater. Sci. Eng. R Reports.* 28 (2000) 1–63. doi:10.1016/S0927-796X(00)00012-7.
- [45] C. Viseras, C. Aguzzi, P. Cerezo, M.C. Bedmar, Biopolymer–clay nanocomposites for controlled drug delivery, *Mater. Sci. Technol.* 24 (2008) 1020–1026. doi:10.1179/174328408X341708.
- [46] M. Pavlovic, P. Rouster, E. Bourgeat-Lami, V. Prevot, I. Szilagy, Design of latex-layered double hydroxide composites by tuning the aggregation in suspensions, *Soft Matter.* 13 (2017) 842–851. doi:10.1039/C6SM02608G.
- [47] B. Sun, B. Ranganathan, S.S. Feng, Multifunctional poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite (PLGA/MMT) nanoparticles decorated by Trastuzumab for targeted chemotherapy of breast cancer, *Biomaterials.* 29 (2008) 475–486. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.09.038.
- [48] S.M. Datta, Clay-polymer nanocomposites as a novel drug carrier: Synthesis, characterization and controlled release study of Propranolol Hydrochloride, *Appl. Clay Sci.* 80–81 (2013) 85–92. doi:10.1016/j.clay.2013.06.009.
- [49] F. Uddin, Clays, nanoclays, and montmorillonite minerals, *Metall. Mater. Trans. A Phys. Metall. Mater. Sci.* 39 (2008) 2804–2814. doi:10.1007/s11661-008-9603-5.

- [50] P.F. Luckham, S. Rossi, Colloidal and rheological properties of bentonite suspensions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 82 (1999) 43–92. doi:10.1016/S0001-8686(99)00005-6.
- [51] J.D.G. Durán, M.M. Ramos-Tejada, F.J. Arroyo, F. González-Caballero, Rheological and Electrokinetic Properties of Sodium Montmorillonite Suspensions, *J. Colloid Interface Sci.* 229 (2000) 107–117. doi:10.1006/jcis.2000.6956.
- [52] F. Karimi, N. Taheri Qazvini, R. Namivandi-Zangeneh, Fish gelatin/Laponite biohybrid elastic coacervates: A complexation kinetics-structure relationship study, *Int. J. Biol. Macromol.* 61 (2013) 102–113. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.06.054.
- [53] C.A.P. Almeida, N.A. Debacher, A.J. Downs, L. Cottet, C.A.D. Mello, Removal of methylene blue from colored effluents by adsorption on montmorillonite clay, *J. Colloid Interface Sci.* 332 (2009) 46–53. doi:10.1016/j.jcis.2008.12.012.
- [54] Z.B. Molu, K. Yurdakoc, Preparation and characterization of aluminum pillared K10 and KSF for adsorption of trimethoprim, *Microporous Mesoporous Mater.* 127 (2010) 50–60. doi:10.1016/j.micromeso.2009.06.027.
- [55] A. Alshameri, H. He, J. Zhu, Y. Xi, R. Zhu, L. Ma, Q. Tao, Adsorption of ammonium by different natural clay minerals: Characterization, kinetics and adsorption isotherms, *Appl. Clay Sci.* (2017). doi:10.1016/j.clay.2017.11.007.
- [56] I. Calabrese, G. Cavallaro, C. Scialabba, M. Licciardi, M. Merli, L. Sciascia, M.L. Turco Liveri, Montmorillonite nanodevices for the colon metronidazole delivery, *Int. J. Pharm.* 457 (2013) 224–236. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.09.017.
- [57] L. Sciascia, M.L. Turco Liveri, M. Merli, Kinetic and equilibrium studies for the adsorption of acid nucleic bases onto K10 montmorillonite, *Appl. Clay Sci.* 53 (2011) 657–668. doi:10.1016/j.clay.2011.05.021.
- [58] T. Ngulube, J.R. Gumbo, V. Masindi, A. Maity, An update on synthetic dyes adsorption onto clay based minerals: A state-of-art review, *J. Environ. Manage.* 191 (2017) 35–57. doi:10.1016/j.jenvman.2016.12.031.
- [59] F. Gimbert, N. Morin-Crini, F. Renault, P.M. Badot, G. Crini, Adsorption isotherm models for dye removal by cationized starch-based material in a single component system: Error analysis, *J. Hazard. Mater.* 157 (2008) 34–46. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.12.072.
- [60] J.D. Smart, The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 (2005) 1556–1568. doi:10.1016/j.addr.2005.07.001.
- [61] A. Maleki, G. Lafitte, A.L. Kjøniksen, K. Thuresson, B. Nyström, Effect of pH on the association behavior in aqueous solutions of pig gastric mucin, *Carbohydr. Res.* 343 (2008) 328–340. doi:10.1016/j.carres.2007.10.005.
- [62] J.P. Celli, B.S. Turner, N.H. Afdhal, R.H. Ewoldt, G.H. McKinley, R. Bansil, S. Erramilli, S. Erramilli, Rheology of gastric mucin exhibits a pH-dependent sol-gel transition, *Biomacromolecules.* 8 (2007) 1580–1586. doi:10.1021/bm0609691.
- [63] R. Bansil, B.S. Turner, Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11 (2006) 164–170. doi:10.1016/j.cocis.2005.11.001.
- [64] S. Mansuri, P. Kesharwani, K. Jain, R.K. Tekade, N.K. Jain, Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system, *React. Funct. Polym.* 100 (2016) 151–172. doi:10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011.
- [65] F.C. Carvalho¹, M.L. Bruschi², M.P.D.G. , Raul Cesar Evangelista^{1, 3}, Mucoadhesive drug delivery systems, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 46 (2010) 1–17. doi:10.3109/03639049709148498.
- [66] Y. Dong, S.S. Feng, Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs, *Biomaterials.* 26 (2005) 6068–6076. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.03.021.
- [67] C. Woertz, M. Preis, J. Breitzkreutz, P. Kleinebudde, Assessment of test methods evaluating mucoadhesive polymers and dosage forms: An overview, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 843–853. doi:10.1016/j.ejpb.2013.06.023.
- [68] E.E. Hassan, J.M. Gallo, A Simple Rheological Method for the in Vitro Assessment of Mucin-Polymer Bioadhesive Bond Strength, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* 7 (1990) 491–495. doi:10.1023/A:1015812615635.
- [69] J. Griesinger, S. Dünnhaupt, B. Cattoz, P. Griffiths, S. Oh, S.B.I. Gómez, M. Wilcox, J. Pearson, M. Gumbleton, M. Abdulkarim, I. Pereira De Sousa, A. Bernkop-Schnürch, Methods to determine the interactions of micro- and nanoparticles with mucus, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 96 (2015) 464–476. doi:10.1016/j.ejpb.2015.01.005.
- [70] M.M. Silva, R. Calado, J. Marto, A. Bettencourt, A.J. Almeida, L.M.D. Gonçalves, Chitosan nanoparticles as a mucoadhesive drug delivery system for ocular administration, *Mar. Drugs.* 15 (2017) 1–16. doi:10.3390/md15120370.
- [71] S. Köllner, S. Dünnhaupt, C. Waldner, S. Hauptstein, I. Pereira De Sousa, A. Bernkop-Schnürch, Mucus permeating thiomers nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 97 (2015) 265–272. doi:10.1016/j.ejpb.2015.01.004.
- [72] P. Sriamornsak, N. Wattanakorn, Rheological synergy in aqueous mixtures of pectin and mucin, *Carbohydr. Polym.* 74 (2008) 474–481. doi:10.1016/j.carbpol.2008.03.021.
- [73] F. Madsen, K. Eberth, J.D. Smart, A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: The effect of mucoadhesive type and concentration, *J. Control. Release.* 50 (1998) 167–178. doi:10.1016/S0168-3659(97)00138-7.

- [74] American Society for testing materials, Standard Test Method for Methylene Blue Index of Clay C837-09, (2012).
- [75] S. Azarmi, Y. Huang, H. Chen, S. McQuarrie, D. Abrams, W. Roa, W.H. Finlay, G.G. Miller, R. Löbenberg, Optimization of a two-step desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9 (2006) 124–132.
- [76] J.P. Zheng, P. Li, Y.L. Ma, K. De Yao, Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. I. Preparation and properties, *J. Appl. Polym. Sci.* 86 (2002) 1189–1194.
- [77] L. Medina-Torres, E.E. García-Cruz, F. Calderas, R.F. González Laredo, G. Sánchez-Olivares, J.A. Gallegos-Infante, N.E. Rocha-Guzmán, J. Rodríguez-Ramírez, Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*), *LWT - Food Sci. Technol.* 50 (2013) 642–650. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.038>.
- [78] M.R.C. Marques, R. Loebenberg, M. Almukainzi, Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing, *Dissolution Technol.* 18 (2011) 15–28.
- [79] P. Costa, Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001) 123–133.
- [80] C. Aguzzi, C. Viseras, P. Cerezo, S. Rossi, F. Ferrari, A. López-Galindo, C. Caramella, Influence of dispersion conditions of two pharmaceutical grade clays on their interaction with some tetracyclines, *Appl. Clay Sci.* 30 (2005) 79–86. doi:10.1016/j.clay.2005.03.007.
- [81] C.H.C. Flaker, R. V. Lourenço, A.M.Q.B. Bittante, P.J.A. Sobral, Gelatin-based nanocomposite films: A study on montmorillonite dispersion methods and concentration, *J. Food Eng.* 167 (2015) 65–70. doi:10.1016/j.jfoodeng.2014.11.009.
- [82] G. Lagaly, S. Ziesmer, Colloid chemistry of clay minerals: The coagulation of montmorillonite dispersions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 100–102 (2003) 105–128. doi:10.1016/S0001-8686(02)00064-7.
- [83] C.N.H. Thuc, A.C. Grillet, L. Reinert, F. Ohashi, H.H. Thuc, L. Duclaux, Separation and purification of montmorillonite and polyethylene oxide modified montmorillonite from Vietnamese bentonites, *Appl. Clay Sci.* 49 (2010) 229–238. doi:10.1016/j.clay.2010.05.011.
- [84] B. Caglar, B. Afsin, A. Tabak, E. Eren, Characterization of the cation-exchanged bentonites by XRPD, ATR, DTA/TG analyses and BET measurement, *Chem. Eng. J.* 149 (2009) 242–248. doi:10.1016/j.cej.2008.10.028.
- [85] Z. Tomic, S. Antic-Mladenovic, B. Babic, V. Poharc-Logar, A. Djordjevic, S. Cupac, Modification of smectite structure by sulfuric acid and characteristics of the modified smectite, *J. Agric. Sci. Belgrade.* 56 (2011) 25–35. doi:10.2298/JAS1101025T.
- [86] V. Krupskaya, S. Zakusin, E. Tyupina, O. Dorzhieva, A. Zhukhlistov, P. Belousov, M. Timofeeva, Experimental Study of Montmorillonite Structure and Transformation of Its Properties under Treatment with Inorganic Acid Solutions, *Minerals.* 7 (2017) 49. doi:10.3390/min7040049.
- [87] M. Hayati-Ashtiani, Characterization of nano-porous bentonite (Montmorillonite) particles using FTIR and BET-BJH analyses, *Part. Part. Syst. Charact.* 28 (2012) 71–76. doi:10.1002/ppsc.201100030.
- [88] M. Hayati-Ashtiani, Use of FTIR spectroscopy in the characterization of natural and treated nanostructured bentonites (montmorillonites), *Part. Sci. Technol.* 30 (2012) 553–564. doi:10.1080/02726351.2011.615895.
- [89] J. Cuadros, L. Aldega, J. Vetterlein, K. Drickamer, W. Dubbin, Reactions of lysine with montmorillonite at 80 °C: Implications for optical activity, H⁺ transfer and lysine-montmorillonite binding, *J. Colloid Interface Sci.* 333 (2009) 78–84. doi:10.1016/j.jcis.2009.01.031.
- [90] V.C. Kelessidis, C. Tsamantaki, P. Dalamarinis, Effect of pH and electrolyte on the rheology of aqueous Wyoming bentonite dispersions, *Appl. Clay Sci.* 38 (2007) 86–96. doi:10.1016/j.clay.2007.01.011.
- [91] V.C. Kelessidis, Yield Stress of Bentonite Dispersions, *Rheol. Open Access.* 1 (2017) 1–12. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.12.050.
- [92] M. Pentrák, A. Czímerová, J. Madejová, P. Komadel, Changes in layer charge of clay minerals upon acid treatment as obtained from their interactions with methylene blue, *Appl. Clay Sci.* 55 (2012) 100–107. doi:10.1016/j.clay.2011.10.012.
- [93] A. Gürses, Ç. Doğar, M. Yalçın, M. Açıkyıldız, R. Bayrak, S. Karaca, The adsorption kinetics of the cationic dye, methylene blue, onto clay, *J. Hazard. Mater.* 131 (2006) 217–228. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.09.036.
- [94] F. Ibrahim, O. Sivak, C. Wong, P. Hopkins, A. Midha, J. Gordon, J.W. Darlington, K.M. Wasan, Impact of co-administration of protonated nanostructured aluminum silicate (cholesterol absorption inhibitor) on the absorption of lipid soluble vitamins D3 and K1: An assessment of pharmacokinetic and in vitro intraluminal processing, *Eur. J. Pharm. Sci.* 49 (2013) 125–132. doi:10.1016/j.ejps.2013.02.008.
- [95] C. Aguzzi, P. Cerezo, C. Viseras, C. Caramella, Use of clays as drug delivery systems: Possibilities and limitations, *Appl. Clay Sci.* 36 (2007) 22–36. doi:10.1016/j.clay.2006.06.015.
- [96] N. An, C.H. Zhou, X.Y. Zhuang, D.S. Tong, W.H. Yu, Immobilization of enzymes on clay minerals for biocatalysts and biosensors, *Appl. Clay Sci.* 114 (2015) 283–296. doi:10.1016/j.clay.2015.05.029.
- [97] S. Jain, P.U. Valvi, N.K. Swarnakar, K. Thanki, Gelatin coated hybrid lipid nanoparticles for oral delivery of Amphotericin B, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 2542–2553. doi:10.1021/mp300320d.
- [98] M. Kazemzadeh, Fabrication of porous hydroxyapatite-gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering, *Iran. Biomed. J.* 10 (2006) 215–223.

- [99] M.H. El-Shabouri, Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 101–108.
- [100] Z. Lu, T. Yeh, M. Tsai, J.L. Au, M.G. Wientjes, Paclitaxel-Loaded Gelatin Nanoparticles for Intravesical Bladder Cancer Therapy, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 7677–7684.
- [101] B. Gaihre, M.S. Khil, D.R. Lee, H.Y. Kim, Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: Drug loading and in vitro drug release study, *Int. J. Pharm.* 365 (2009) 180–189. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.08.020.
- [102] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems, *Pharmaceutics*. 10 (2018) 1–17. doi:10.3390/pharmaceutics10020057.
- [103] M. Vert, Y. Doi, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, F. Schué, Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012), *Pure Appl. Chem.* 84 (2012) 377–410. doi:10.1351/PAC-REC-10-12-04.
- [104] A. des Rieux, V. Fievez, M. Garinot, Y.J. Schneider, V. Pr at, Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach, *J. Control. Release.* 116 (2006) 1–27. doi:10.1016/j.jconrel.2006.08.013.
- [105] S. Bhattacharjee, DLS and zeta potential - What they are and what they are not?, *J. Control. Release.* 235 (2016) 337–351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017.
- [106] D. Shilpi, V. Kushwah, A.K. Agrawal, S. Jain, Improved Stability and Enhanced Oral Bioavailability of Atorvastatin Loaded Stearic Acid Modified Gelatin Nanoparticles, *Pharm. Res.* 34 (2017) 1505–1516. doi:10.1007/s11095-017-2173-8.
- [107] A.K. Meena, D.V. Ratnam, G. Chandraiah, D.D. Ankola, P.R. Rao, M.N.V.R. Kumar, Oral nanoparticulate atorvastatin calcium is more efficient and safe in comparison to lipicure in treating hyperlipidemia, *Lipids*. 43 (2008) 231–241. doi:10.1007/s11745-007-3142-5.
- [108] T.S. Anirudhan, S. Sandeep, Synthesis, characterization, cellular uptake and cytotoxicity of a multi-functional magnetic nanocomposite for the targeted delivery and controlled release of doxorubicin to cancer cells, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 12888. doi:10.1039/c2jm31794j.
- [109] E. Tomb acz, M. Szekeres, Colloidal behavior of aqueous montmorillonite suspensions: The specific role of pH in the presence of indifferent electrolytes, *Appl. Clay Sci.* 27 (2004) 75–94. doi:10.1016/j.clay.2004.01.001.
- [110] G.Z. Xu Jingshui, Ke Yangchuan, Qian Zhou, Xianglong Hu, Zijuan Tan, Liyan Yang, Youzhi Song, Yangyang Zhao, Preparation, Structure, and properties of Poly(vinyl acetate-co-methyl methacrylate) Nanocomposite Microspheres with exfoliated Montmorillonite Through using two-stage in situ suspension polymerization, *Polym. Compos.* 35 (2014) 1106–1116. doi:10.1002/pc.22758.
- [111] J.M. Nzai, A. Proctor, Determination of phospholipids in vegetable oil by fourier transform infrared spectroscopy, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 1281–1289.
- [112] T. Yao, C. Wang, J. Wu, Q. Lin, H. Lv, K. Zhang, K. Yu, B. Yang, Preparation of raspberry-like polypyrrole composites with applications in catalysis, *J. Colloid Interface Sci.* 338 (2009) 573–577. doi:10.1016/j.jcis.2009.05.001.
- [113] Y.J. Kim, Y.D. Liu, H.J. Choi, S.J. Park, Facile fabrication of Pickering emulsion polymerized polystyrene/laponite composite nanoparticles and their electrorheology, *J. Colloid Interface Sci.* 394 (2013) 108–114. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.12.040.
- [114] B.D. Kevadiya, S. Rajkumar, H.C. Bajaj, S.S. Chettiar, K. Gosai, H. Brahmabhatt, A.S. Bhatt, Y.K. Barvaliya, G.S. Dave, R.K. Kothari, Biodegradable gelatin-ciprofloxacin-montmorillonite composite hydrogels for controlled drug release and wound dressing application, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 122 (2014) 175–183. http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.051.
- [115] M. Galimberti, V.R. Cipolletti, M. Coombs, *Applications of Clay-Polymer Nanocomposites*, 2nd ed., Elsevier Ltd., 2013. doi:10.1016/B978-0-08-098259-5.00020-2.
- [116] J.F. Martucci, A. V azquez, R.A. Ruseckaite, Nanocomposites based on gelatin and montmorillonite: Morphological and thermal studies, *J. Therm. Anal. Calorim.* 89 (2007) 117–122. doi:10.1007/s10973-006-7454-0.
- [117] I. Mukherjee, M. Rosolen, Thermal transitions of gelatin evaluated using DSC sample pans of various seal integrities, *J. Therm. Anal. Calorim.* 114 (2013) 1161–1166. doi:10.1007/s10973-013-3166-4.
- [118] R. Cortesi, C. Nastruzzi, S.S. Davis, Sugar cross-linked gelatin for controlled release: Microspheres and disks, *Biomaterials.* 19 (1998) 1641–1649. doi:10.1016/S0142-9612(98)00034-9.
- [119] Y.Q. Rao, Gelatin-clay nanocomposites of improved properties, *Polymer (Guildf).* 48 (2007) 5369–5375. doi:10.1016/j.polymer.2007.06.068.
- [120] P. Li, J.P. Zheng, Y.L. Ma, K. De Yao, Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. II. Swelling behavior, *J. Appl. Polym. Sci.* 88 (2003) 322–326.
- [121] E. G unister, S. I sçi, N.  ztekin, F.B. Erim,  .I. Ece, N. G ung r, Effect of cationic surfactant adsorption on the rheological and surface properties of bentonite dispersions, *J. Colloid Interface Sci.* 303 (2006) 137–141. doi:doi:10.1016/j.jcis.2006.07.021.

- [122] R.A. Bini, M.F. Silva, L.C. Varanda, M.A. da Silva, C.A. Dreiss, Soft nanocomposites of gelatin and poly(3-hydroxybutyrate) nanoparticles for dual drug release, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 157 (2017) 191–198. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.051>.
- [123] I. Salcedo, G. Sandri, C. Aguzzi, C. Bonferoni, P. Cerezo, R. Sánchez-Espejo, C. Viseras, Intestinal permeability of oxytetracycline from chitosan-montmorillonite nanocomposites, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 117 (2014) 441–448. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.11.009.
- [124] M. Baek, J.A. Lee, S.J. Choi, Toxicological effects of a cationic clay, montmorillonite in vitro and in vivo, *Mol. Cell. Toxicol.* 8 (2012) 95–101. doi:10.1007/s13273-012-0012-x.
- [125] I. Salcedo, C. Aguzzi, G. Sandri, M.C. Bonferoni, M. Mori, P. Cerezo, R. Sánchez, C. Viseras, C. Caramella, In vitro biocompatibility and mucoadhesion of montmorillonite chitosan nanocomposite: A new drug delivery, *Appl. Clay Sci.* 55 (2012) 131–137. doi:10.1016/j.clay.2011.11.006.
- [126] V. Ambrogio, D. Pietrella, M. Nocchetti, S. Casagrande, V. Moretti, S. De Marco, M. Ricci, Montmorillonite-chitosan-chlorhexidine composite films with antibiofilm activity and improved cytotoxicity for wound dressing, *J. Colloid Interface Sci.* 491 (2017) 265–272. doi:10.1016/j.jcis.2016.12.058.
- [127] S. Maisanaba, S. Pichardo, M. Puerto, D. Gutiérrez-Praena, A.M. Cameán, A. Jos, Toxicological evaluation of clay minerals and derived nanocomposites: A review, *Environ. Res.* 138 (2015) 233–254. doi:10.1016/j.envres.2014.12.024.
- [128] P. Garcia-Guzman, L. Medina-Torres, F. Calderas, M.J. Bernad-Bernad, J. Gracia-Mora, B. Mena, O. Manero, Characterization of hybrid microparticles/Montmorillonite composite with raspberry-like morphology for Atorvastatin controlled release., *Colloids Surf. B. Biointerfaces*. 167 (2018) 397–406. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.04.020.
- [129] N. Nikoogorgos, N.J. Patil, B. Zappone, S. Lee, Interaction of porcine gastric mucin with various polycations and its influence on the boundary lubrication properties, *Polym. (United Kingdom)*. 100 (2016) 158–168. doi:10.1016/j.polymer.2016.08.030.
- [130] G.E. Yakubov, A. Papagiannopoulos, E. Rat, T.A. Waigh, Charge and interfacial behavior of short side-chain heavily glycosylated porcine stomach mucin, *Biomacromolecules*. 8 (2007) 3791–3799. doi:10.1021/bm700721c.
- [131] J. Wang, Y. Tabata, D. Bi, K. Morimoto, Evaluation of gastric mucoadhesive properties of aminated gelatin microspheres, *J. Control. Release*. 73 (2001) 223–231. doi:10.1016/S0168-3659(01)00288-7.
- [132] K.C. Ofokansi, M.U. Adikwu, V.C. Okore, Preparation and evaluation of mucin-gelatin mucoadhesive microspheres for rectal delivery of ceftriaxone sodium, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33 (2007) 691–700. doi:10.1080/03639040701360876.
- [133] J. Wang, Y. Tauchi, Y. Deguchi, K. Morimoto, Y. Tabata, Y. Ikada, Positively charged gelatin microspheres as gastric mucoadhesive drug delivery system for eradication of *H. pylori*, *Drug Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents*. 7 (2000) 237–243. doi:10.1080/107175400455173.
- [134] H. Hågerström, K. Edsman, Limitations of the rheological mucoadhesion method: The effect of the choice of conditions and the rheological synergism parameter, *Eur. J. Pharm. Sci.* 18 (2003) 349–357. doi:10.1016/S0928-0987(03)00037-X.

X. ANEXOS

ANEXO I. CARACTERIZACIÓN DE ARCILLAS MONTMORILLONITAS Y BENTONITAS

Tabla 16. Resultados de tamaño de partícula, PDI y potencial Z (n=3) para cada arcilla

Arcilla	Tamaño (nm)	Media (nm)	Desviación Estándar	PDI	Media	Desviación Estándar	Potencial Zeta (mV)	Media (mV)	Desviación Estándar (mV)
MMT Nanoclay	498.8	478.70	24.38	0.405	0.39	0.01	-37.6	38.20	0.50
	451.6			0.389			-38.5		
	485.8			0.378			-38.4		
MMT K10	498	563.67	67.57	0.864	0.68	0.17	-33.00	33.07	1.40
	633			0.527			-31.70		
	560			0.660			-34.50		
MMT K30	562	577.66	19.86	0.675	0.70	0.17	-25.10	24.07	0.96
	571			0.888			-23.20		
	600			0.537			-23.90		
BEN-AC	480	570.67	83.70	0.426	0.43	0.13	-12.90	12.80	0.36
	587			0.564			-13.10		
	645			0.299			-12.40		
BEN-LYS	689	571.00	103.01	0.639	0.51	0.20	-12.50	12.23	0.64
	525			0.619			-12.70		
	499			0.282			-11.50		

Tabla 17. Resultados de determinación de CIC con AM

Arcilla	Masa (g)	Volumen de AM (mL)	CIC (meq/100g)	CIC Media (meq/100g)	Desviación Estándar
MMT Nanoclay	208.9	15.8	75.634	75.77	2.39
	201.9	15.6	77.266		
	202.9	15.1	74.421		
MMT K30	0.202	10.0	49.579	50.50	1.37
	0.202	10.5	52.083		
	0.201	10.0	49.850		
MMT K10	0.202	10.0	49.628	53.15	3.05
	0.200	11.0	55.000		
	0.201	11.0	54.835		
BEN-AC	0.200	11.0	54.918	54.85	0.08
	0.200	11.0	54.890		
	0.201	11.0	54.754		
BEN-LYS	0.201	10.0	49.850	49.78	0.06
	0.201	10.0	49.751		
	0.201	10.0	49.727		

Tabla 18. Bandas de FT-IR para arcillas

Grupos Funcionales	Arcillas				
	MMT Nanoclay	MMT K30	MMT K10	BEN-LYS	BEN-AC
Estiramiento OH (Al-Al-OH, Al-Mg-OH)	3613	3621	3621	3619	3621
Estiramiento OH (Agua)	3401	3387	3394	3396	3402
-NH ₃ (Lisina)	NA	NA	NA	3264	NA
Flexión OH (Agua)	1633	1630	1631	1622	1622
-NH ₃ (Lisina)	NA	NA	NA	1509	NA
-COO ⁻ (Lisina)	NA	NA	NA	1410	NA
-C-H (Lisina)	NA	NA	NA	1346	NA
Estiramiento Si tetraédrico (Si-O-Si)	983	1026	1022	1015	1019
Flexión (Al-Al-OH)	914				
Flexión (Al-Mg-OH)	841				
O-Si-O (Tridimita)		798	798	794	794

O-Si-O (Cuarzo)	695	693	693	658	668
Vibración Al octaédrico (Al-Si-O)	510	521	520	514	515
Flexión (Si-O-Si)	406	451	451	455	455

Tabla 19. Principales picos en XRD

Plano de Difracción	MMT Nanoclay	MMT K30	MMT K10	BEN-AC	BEN-LYS
(001)	6.03	5.59	5.66		
(003)		17.81	17.78		
020-110	19.78	19.83	19.83	19.80	19.78
cuarzo (100)		20.84	20.83	20.71	20.84
dolomita (102)		23.81	23.83	23.66	23.64
cuarzo (101)		26.63	26.62	26.62	26.63
dolomita (104)	29.82	29.89	29.87	29.10	29.88
130-200	35.02	34.98	34.99	34.91	34.93
060-033	61.85	61.79	61.77	61.50	61.95

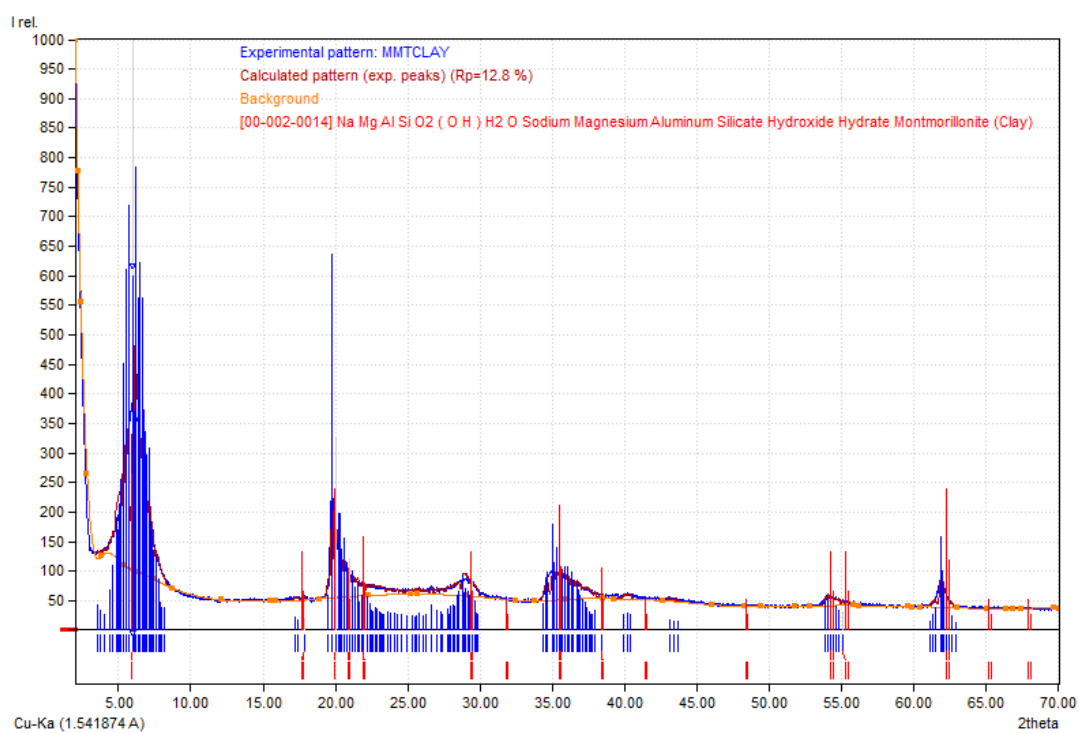


Figura 54. Difractograma de MMT Nanoclay

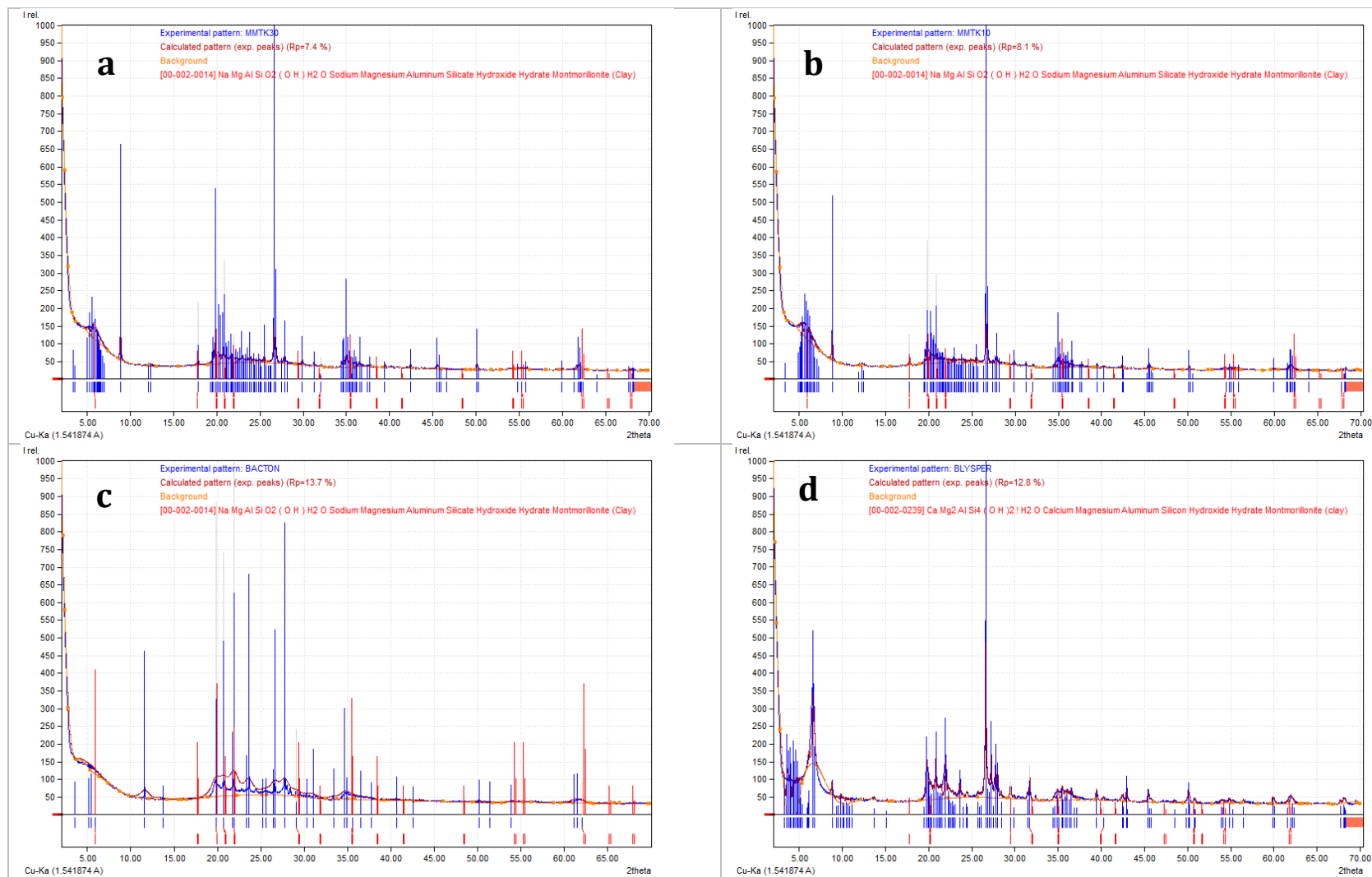


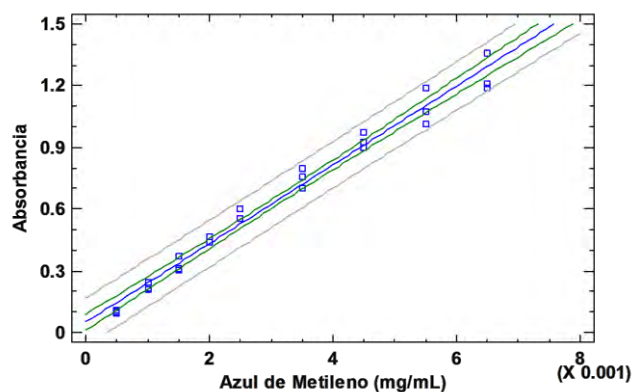
Figura 55. Difractogramas de (a) MMT K30 (b) MMT K10(c) BEN-AC (d) BEN-LYS

Isoterma de azul de metileno (AM)

Se preparó una curva de calibración de 9 puntos de azul de metileno (AM) en agua desionizada en un intervalo de concentraciones de 0.0005 a 0.0065 mg/mL por triplicado a partir de una solución stock de 0.025 mg/mL.

Tabla 20. Curvas de calibración de azul de metileno (n=3)

Concentración AM (mg/ml)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Media	Desviación estándar
0.0005	0.1090	0.0950	0.1010	0.1017	0.0070
0.001	0.2460	0.2110	0.2150	0.2240	0.0192
0.0015	0.3710	0.3050	0.3100	0.3287	0.0367
0.002	0.4640	0.4380	0.4400	0.4473	0.0145
0.0025	0.5990	0.6010	0.5550	0.5850	0.0260
0.0035	0.7550	0.7940	0.7000	0.7497	0.0472
0.0045	0.9280	0.9760	0.9000	0.9347	0.0384
0.0055	1.0750	1.1870	1.0100	1.0907	0.0895
0.0065	1.2070	1.3550	1.1900	1.2507	0.0908



Coeficiente de Correlación = 0.990555
 R-cuadrada = 98.1199 %
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98.0447 %
 Error estándar del est. = 0.0539396
 Error absoluto medio = 0.0436908
 Estadístico Durbin-Watson = 0.475011
 (P=0.0000)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.720977

Figura 56. Modelo ajustado a regresión lineal para azul de metileno (n=3)

Tabla 21. ANOVA de calibración de azul de metileno

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	3.79614	1	3.79614	1304.75	0.0000
Residuo	0.072737	25	0.00290948		
Total (Corr.)	3.86887	26			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre la Absorbancia y la concentración de azul de metileno (mg/mL) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 98.1199% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0.990555, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Se construyó una Isoterma de adsorción con 6 concentraciones crecientes de AM en un intervalo de 2 a 6.5 mg/mL con 0.00005 g de arcilla MMT o bentonita.

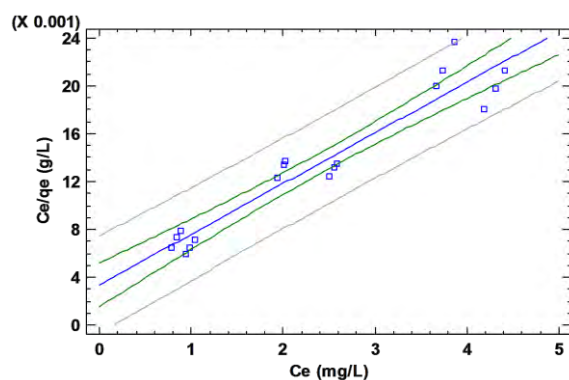
Tabla 22. Absorbancias para adsorción de AM con arcillas MMT y bentonitas

AM(mg/L)	MMT Nanoclay			MMT K30			MMT K10			BEN-AC			BEN-LYS		
2	0.2020	0.2130	0.2200	0.1700	0.2300	0.1980	0.1440	0.1770	0.1590	0.2130	0.2670	0.2090	0.2960	0.2300	0.2650
2.5	0.2300	0.2400	0.2500	0.2170	0.2800	0.2500	0.2040	0.2030	0.2100	0.2850	0.2390	0.2670	0.3800	0.3519	0.3200
3.5	0.4380	0.4340	0.4200	0.5040	0.4910	0.4500	0.3800	0.3280	0.3760	0.5050	0.5140	0.4790	0.5420	0.4986	0.4980
4.5	0.5450	0.5280	0.5400	0.6010	0.6040	0.5990	0.5100	0.4890	0.4980	0.6440	0.6710	0.6510	0.7780	0.7500	0.7200
5.5	0.7660	0.7510	0.7890	0.7580	0.7820	0.7330	0.7350	0.7310	0.7290	0.9000	0.9270	0.8690	0.9180	0.8920	0.9030
6.5	0.8950	0.8500	0.8760	0.9640	1.0280	1.0050	0.9920	1.0470	1.0150	1.0580	1.0866	1.0970	1.1170	1.0710	1.0900

ISOTERMA DE LANGMUIR

Tabla 23. Adsorción de AM con arcilla MMT Nanoclay (n=3)

Co (mg/L)	Ce (mg/L)			qe (mg/g)			ce/qe (g/L)			Media (qe)	DE	Media (Ce)	DE	Media (Ce/qe)	DE
2	0.7889	0.8465	0.8832	121.1105	115.3483	111.6815	6.51E-03	7.34E-03	7.91E-03	116.0468	4.7532	0.8395	0.0475	0.0073	0.0007
2.5	0.9356	0.9880	1.0403	156.4432	151.2048	145.9665	5.98E-03	6.53E-03	7.13E-03	151.2048	5.2383	0.9880	0.0524	0.0065	0.0006
3.5	2.0251	2.0042	1.9309	147.4856	149.5809	156.9146	1.37E-02	1.34E-02	1.23E-02	151.3270	4.9511	1.9867	0.0495	0.0131	0.0007
4.5	2.5856	2.4966	2.5595	191.4353	200.3405	194.0545	1.35E-02	1.25E-02	1.32E-02	195.2768	4.5767	2.5472	0.0458	0.0131	0.0005
5.5	3.7433	3.6647	3.8638	175.6679	183.5254	163.6197	2.13E-02	2.00E-02	2.36E-02	174.2710	10.0261	3.7573	0.1003	0.0216	0.0018
6.5	4.4191	4.1833	4.3195	208.0932	231.6658	218.0461	2.12E-02	1.81E-02	1.98E-02	219.2684	11.8337	4.3073	0.1183	0.0197	0.0016



Coeficiente de Correlación = 0.958584
 R-cuadrada = 91.8883 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 91.3814 por ciento
 Error estándar del est. = 0.00173236
 Error absoluto medio = 0.00136565
 Estadístico Durbin-Watson = 3.2527 (P=0.9980)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.662463

Figura 57. Ajuste adsorción de AM-MMT Nanoclay a modelo lineal de Langmuir (n=3)

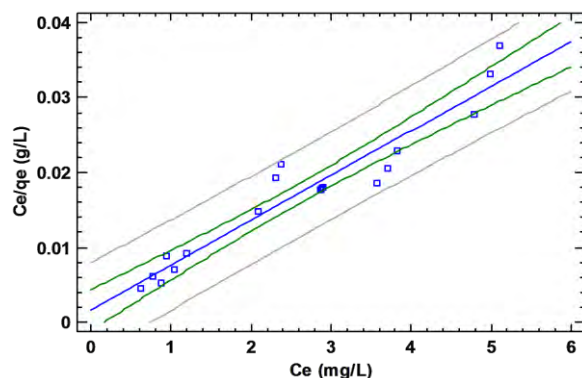
Tabla 24. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir adsorción AM-MMT Nanoclay

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.000543933	1	0.000543933	181.25	0.0000
Residuo	0.000048017	16	0.00000300106		
Total (Corr.)	0.00059195	17			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre C_e/q_e (g/L) y C_e (mg/L) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 91.8883% de la variabilidad en C_e/q_e (g/L). El coeficiente de correlación es igual a 0.958584, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Tabla 25. Adsorción de AM con arcilla MMT K30 (n=3)

Co (mg/L)	C_e (mg/L)			q_e (mg/g)			ce/q_e (g/L)			Media (qe)	DE	Media (C_e)	DE	Media (C_e/q_e)	DE
2	0.6213	0.9356	0.7679	137.8732	106.4432	123.2059	0.0045	0.0088	0.0062	122.5074	15.7267	0.7749	0.1573	0.0065	0.0022
2.5	0.8675	1.1975	1.0403	163.2530	130.2514	145.9665	0.0053	0.0092	0.0071	146.4903	16.5070	1.0351	0.1651	0.0072	0.0019
3.5	2.3709	2.3028	2.0880	112.9125	119.7224	141.1996	0.0210	0.0192	0.0148	124.6115	14.7637	2.2539	0.1476	0.0183	0.0032
4.5	2.8790	2.8947	2.8685	162.1006	160.5291	163.1482	0.0178	0.0180	0.0176	161.9260	1.3183	2.8807	0.0132	0.0178	0.0002
5.5	3.7014	3.8271	3.5705	179.8586	167.2865	192.9544	0.0206	0.0229	0.0185	180.0332	12.8348	3.6997	0.1283	0.0207	0.0022
6.5	4.7805	5.1158	4.9953	171.9487	138.4233	150.4715	0.0278	0.0370	0.0332	153.6145	16.9823	4.9639	0.1698	0.0327	0.0046



Coeficiente de Correlación = 0.960433
 R-cuadrada = 92.2432 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 91.7584 por ciento
 Error estándar del est. = 0.00268943
 Error absoluto medio = 0.00200908
 Estadístico Durbin-Watson = 2.25119 (P=0.6665)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.141389

Figura 58. Ajuste adsorción de AM-MMT K30 a modelo lineal de Langmuir (n=3)

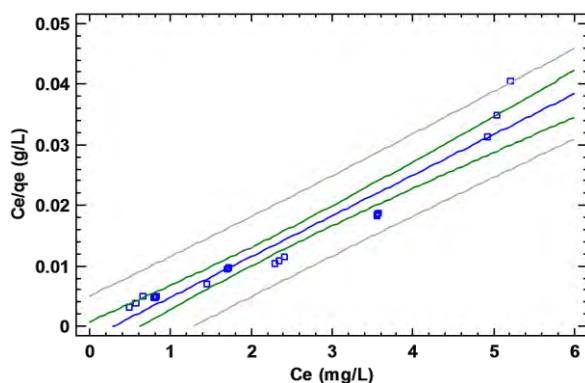
Tabla 26. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir adsorción AM-MMT K30

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00137624	1	0.00137624	190.27	0.0000
Residuo	0.000115729	16	0.00000723303		
Total (Corr.)	0.00149197	17			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre C_e/q_e (g/L) y C_e (mg/L) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-cuadrada indica que el modelo ajustado explica 92.2432% de la variabilidad en C_e/q_e (g/L). El coeficiente de correlación es igual a 0.960433, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Tabla 27. Adsorción de AM con arcilla MMT K10 (n=3)

Co (mg/L)	Ce (mg/L)			qe (mg/g)			ce/qe (g/L)			Media (qe)	DE	Media (Ce)	DE	Media (Ce/qe)	DE
2	0.4851	0.6579	0.5636	151.4929	134.2064	143.6354	0.0032	0.0049	0.0039	143.1116	8.6552	0.5689	0.0866	0.0040	0.0009
2.5	0.7994	0.7941	0.8308	170.0629	170.5867	166.9199	0.0047	0.0047	0.0050	169.1898	1.9832	0.8081	0.0198	0.0048	0.0002
3.5	1.7213	1.4489	1.7004	177.8680	205.1074	179.9633	0.0097	0.0071	0.0094	187.6462	15.1580	1.6235	0.1516	0.0087	0.0014
4.5	2.4023	2.2923	2.3394	209.7695	220.7700	216.0555	0.0115	0.0104	0.0108	215.5317	5.5189	2.3447	0.0552	0.0109	0.0005
5.5	3.5809	3.5600	3.5495	191.9068	194.0021	195.0498	0.0187	0.0184	0.0182	193.6529	1.6003	3.5635	0.0160	0.0184	0.0002
6.5	4.9272	5.2153	5.0477	157.2813	128.4704	145.2331	0.0313	0.0406	0.0348	143.6616	14.4696	5.0634	0.1447	0.0356	0.0047



Coeficiente de Correlación = 0.965463
 R-cuadrada = 93.2118 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 92.7875 por ciento
 Error estándar del est. = 0.00303388
 Error absoluto medio = 0.00227589
 Estadístico Durbin-Watson = 1.66884 (P=0.2057)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.12742

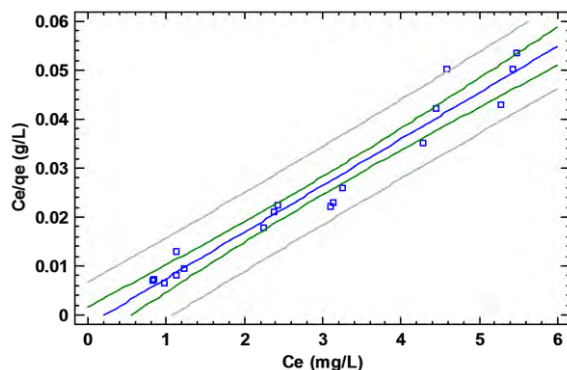
Figura 59. Ajuste adsorción de AM-MMT K10 a modelo lineal de Langmuir (n=3)**Tabla 28. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir adsorción AM-MMT K10**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00202223	1	0.00202223	219.70	0.0000
Residuo	0.00014727	16	0.0000092044		
Total (Corr.)	0.0021695	17			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre C_e/q_e (g/L) y C_e (mg/L) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 93.2118% de la variabilidad en C_e/q_e (g/L). El coeficiente de correlación es igual a 0.965463, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Tabla 29. Adsorción de AM con arcilla BEN-AC (n=3)

Co (mg/L)	Ce (mg/L)			qe (mg/g)			ce/qe (g/L)			Media (qe)	DE	Media (Ce)	DE	Media (Ce/qe)	DE
2	0.8465	1.1294	0.8256	115.3483	87.0613	117.4437	0.0073	0.0130	0.0070	106.6178	16.9688	0.9338	0.1697	0.0091	0.0033
2.5	1.2237	0.9827	1.1294	127.6323	151.7287	137.0613	0.0096	0.0065	0.0082	138.8074	12.1427	1.1119	0.1214	0.0081	0.0016
3.5	2.3761	2.4233	2.2399	112.3887	107.6742	126.0084	0.0211	0.0225	0.0178	115.3571	9.5207	2.3464	0.0952	0.0205	0.0024
4.5	3.1042	3.2457	3.1409	139.5757	125.4322	135.9089	0.0222	0.0259	0.0231	133.6389	7.3399	3.1636	0.0734	0.0237	0.0019
5.5	4.4453	4.5867	4.2829	105.4741	91.3305	121.7129	0.0421	0.0502	0.0352	106.1725	15.2032	4.4383	0.1520	0.0425	0.0075
6.5	5.2729	5.4227	5.4772	122.7082	107.7266	102.2787	0.0430	0.0503	0.0536	110.9045	10.5790	5.3910	0.1058	0.0490	0.0054



Coeficiente de Correlación = 0.976013
 R-cuadrada = 95.2602 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 94.9639 por ciento
 Error estándar del est. = 0.00366649
 Error absoluto medio = 0.00266895
 Estadístico Durbin-Watson = 2.48035 (P=0.8193)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.275515

Figura 60 Ajuste adsorción de AM-MMT BEN-AC a modelo lineal de Langmuir (n=3)

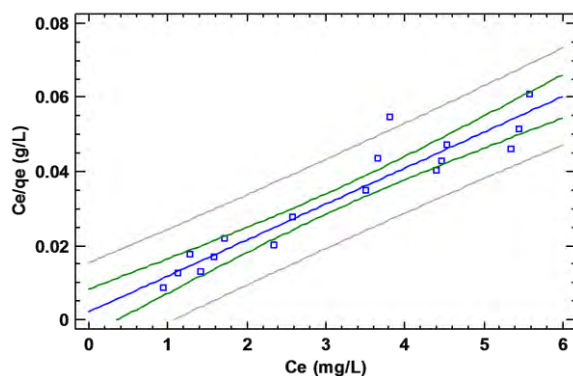
Tabla 30. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir adsorción AM-BEN-AC

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00432284	1	0.00432284	321.56	0.0000
Residuo	0.00021509	16	0.0000134431		
Total (Corr.)	0.00453793	17			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre C_e/q_e (g/L) y C_e (mg/L) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 95.2602% de la variabilidad en C_e/q_e (g/L). El coeficiente de correlación es igual a 0.976013, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Tabla 31. Adsorción de AM con arcilla BEN-LYS (n=3)

Co (mg/L)	Ce (mg/L)			qe (mg/g)			ce/qe (g/L)			Media (qe)	DE	Media (Ce)	DE	Media (Ce/qe)	DE
2	1.2813	0.9356	1.1189	71.8701	106.4432	88.1090	0.0178	0.0088	0.0127	88.8074	17.2971	1.1119	0.1730	0.0131	0.0045
2.5	1.7213	1.5741	1.4070	77.8680	92.5877	109.2981	0.0221	0.0170	0.0129	93.2513	15.7255	1.5675	0.1573	0.0173	0.0046
3.5	2.5699	2.3426	2.3394	93.0068	115.7412	116.0555	0.0276	0.0202	0.0202	108.2679	13.2174	2.4173	0.1322	0.0227	0.0043
4.5	3.8062	3.6595	3.5024	69.3819	84.0492	99.7643	0.0549	0.0435	0.0351	84.3985	15.1942	3.6560	0.1519	0.0445	0.0099
5.5	4.5395	4.4034	4.4610	96.0450	109.6647	103.9026	0.0473	0.0402	0.0429	103.2041	6.8367	4.4680	0.0684	0.0435	0.0036
6.5	5.5820	5.3410	5.4405	91.8020	115.8984	105.9455	0.0608	0.0461	0.0514	104.5486	12.1088	5.4545	0.1211	0.0527	0.0075



Coeficiente de Correlación = 0.945221
 R-cuadrada = 89.3442 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 88.6783 por ciento
 Error estándar del est. = 0.00552731
 Error absoluto medio = 0.0038416
 Estadístico Durbin-Watson = 1.7491 (P=0.2572)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.102605

Figura 61. Ajuste adsorción de AM- BEN-LYS a modelo lineal de Langmuir (n=3)

Tabla 32. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir adsorción AM-BEN-LYS

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00409855	1	0.00409855	134.15	0.0000
Residuo	0.000488819	16	0.0000305512		
Total (Corr.)	0.00458737	17			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Ce/qe (g/L) y Ce (mg/L) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 89.3442% de la variabilidad en Ce/qe (g/L). El coeficiente de correlación es igual a 0.945221, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Se determinaron los parámetros del ajuste al modelo de Langmuir:

Tabla 33. Parámetros de ajuste a modelo lineal de Langmuir (n=3)

Arcilla	m	b	Capacidad de adsorción máxima (Q) (mg/g)	K _L (L/g)	a _L (K) (L/mg)	R	R ²
MMT Nanoclay	0.0042	0.0034	236.2977	295.8134	1.2519	0.9586	0.9189
MMT K30	0.0060	0.0017	167.3976	604.4451	3.6108	0.9604	0.9224
MMT K10	0.0067	0.0019	148.9079	526.4710	3.5355	0.9655	0.9321
BEN-AC	0.0095	0.00196	105.6099	510.6861	4.8356	0.9760	0.9526
BEN-LYS	0.0097	0.0022	103.2586	462.4299	4.4784	0.9452	0.8934

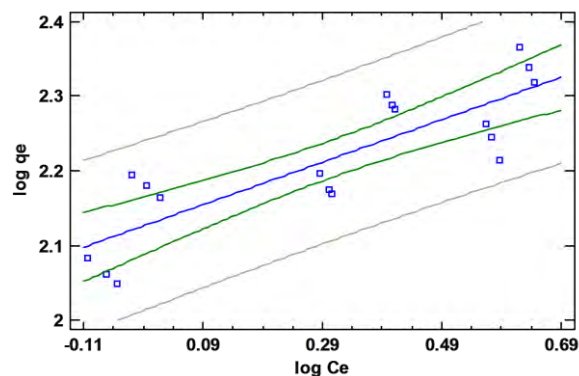
Tabla 34. Cálculo de R_L

Concentración inicial AM (mg/L)	R _L MMT Nanoclay	R _L MMT K30	R _L MMT K10	R _L BEN-AC	R _L BEN-LYS
2	0.2854	0.4925	0.3648	0.3618	0.3816
2.5	0.2421	0.5335	0.3465	0.3738	0.3740
3.5	0.1858	0.5985	0.3209	0.3919	0.3630
4.5	0.1507	0.6475	0.3040	0.4048	0.3555
5.5	0.1268	0.6859	0.2920	0.4146	0.3500
6.5	0.1094	0.7168	0.2830	0.4223	0.3459

ISOTERMA DE FREUNDLICH

Tabla 35. Adsorción de AM con arcilla MMT Nanoclay (n=3)

Co (mg/L)	Log C _e			Log q _e			Media (log C _e)	DE	Media (log q _e)	DE
2	-0.1030	-0.0724	-0.0539	2.0832	2.0620	2.0480	-0.0764	0.0248	2.0644	0.0177
2.5	-0.0289	-0.0053	0.0172	2.1944	2.1796	2.1643	-0.0057	0.0231	2.1794	0.0151
3.5	0.3065	0.3019	0.2857	2.1687	2.1749	2.1957	0.2980	0.0109	2.1798	0.0141
4.5	0.4126	0.3973	0.4081	2.2820	2.3018	2.2879	0.4060	0.0078	2.2906	0.0101
5.5	0.5733	0.5640	0.5870	2.2447	2.2637	2.2138	0.5748	0.0116	2.2407	0.0252
6.5	0.6453	0.6215	0.6354	2.3183	2.3649	2.3385	0.6341	0.0120	2.3406	0.0234



Coeficiente de Correlación = 0.849858
 R-cuadrada = 72.2259 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 70.49 por ciento
 Error estándar del est. = 0.0503449
 Error absoluto medio = 0.042992
 Estadístico Durbin-Watson = 3.52176 (P=0.9999)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.77439

Figura 62. Ajuste adsorción de AM- MMT Nanoclay a modelo lineal de Freundlich (n=3)

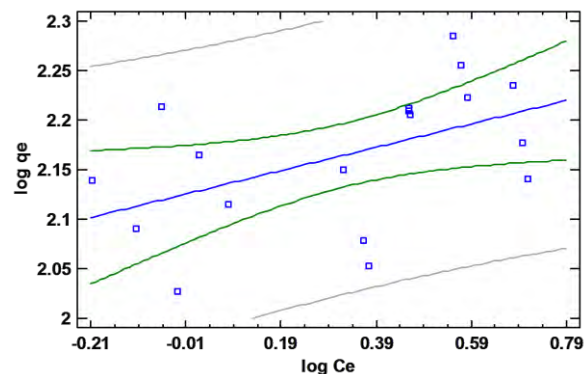
Tabla 36. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich adsorción AM-MMT Nanoclay

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.105459	1	0.105459	41.61	0.0000
Residuo	0.0405537	16	0.00253461		
Total (Corr.)	0.146013	17			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre log qe y log Ce con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 72.2259% de la variabilidad en log qe. El coeficiente de correlación es igual a 0.849858, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables.

Tabla 37. Adsorción de AM con arcilla MMT K30 (n=3)

Co (mg/L)	Log Ce			Log qe			Media (log Ce)	DE	Media (log qe)	DE
2	-0.2067	-0.0289	-0.1147	2.1395	2.0271	2.0906	-0.1168	0.0889	2.0857	0.0563
2.5	-0.0617	0.0783	0.0172	2.2129	2.1148	2.1643	0.0112	0.0702	2.1640	0.0490
3.5	0.3749	0.3623	0.3197	2.0527	2.0782	2.1498	0.3523	0.0289	2.0936	0.0503
4.5	0.4592	0.4616	0.4577	2.2098	2.2056	2.2126	0.4595	0.0020	2.2093	0.0035
5.5	0.5684	0.5829	0.5527	2.2549	2.2235	2.2855	0.5680	0.0151	2.2546	0.0310
6.5	0.6795	0.7089	0.6986	2.2354	2.1412	2.1775	0.6956	0.0149	2.1847	0.0475



Coeficiente de Correlación = 0.4951
 R-cuadrada = 24.5124 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 19.7944 por ciento
 Error estándar del est. = 0.0644405
 Error absoluto medio = 0.0515466
 Estadístico Durbin-Watson = 2.26343
 (P=0.6707)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.149572

Figura 63. Ajuste adsorción de AM- MMT K30 a modelo lineal de Freundlich (n=3)

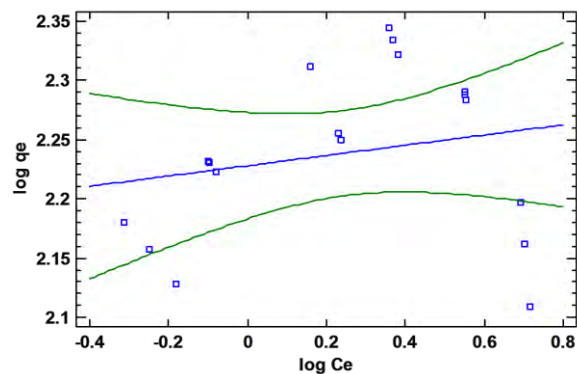
Tabla 38. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich adsorción AM-MMT K30

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0215748	1	0.0215748	5.20	0.0367
Residuo	0.0664413	16	0.00415258		
Total (Corr.)	0.0880161	17			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre $\log q_e$ y $\log C_e$ con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 24.5124% de la variabilidad en $\log q_e$. El coeficiente de correlación es igual a 0.4951, indicando una relación relativamente débil entre las variables.

Tabla 39. Adsorción de AM con arcilla MMT K10 (n=3)

Co (mg/L)	Log Ce			Log qe			Media (log Ce)	DE	Media (log qe)	DE
2	-0.3142	-0.1818	-0.2490	2.1804	2.1278	2.1573	-0.2483	0.0662	2.1551	0.0264
2.5	-0.0973	-0.1001	-0.0805	2.2306	2.2319	2.2225	-0.0926	0.0106	2.2284	0.0051
3.5	0.2359	0.1610	0.2305	2.2501	2.3120	2.2552	0.2092	0.0417	2.2724	0.0344
4.5	0.3806	0.3603	0.3691	2.3217	2.3439	2.3346	0.3700	0.0102	2.3334	0.0111
5.5	0.5540	0.5514	0.5502	2.2831	2.2878	2.2901	0.5519	0.0019	2.2870	0.0036
6.5	0.6926	0.7173	0.7031	2.1967	2.1088	2.1621	0.7043	0.0124	2.1558	0.0443



Coeficiente de Correlación = 0.209397
 R-cuadrada = 4.3847 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = -1.59126 por ciento
 Error estándar del est. = 0.0721691
 Error absoluto medio = 0.0550689
 Estadístico Durbin-Watson = 1.31873 (P=0.0522)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.278178

Figura 64. Ajuste adsorción de AM- MMT K10 a modelo lineal de Freundlich (n=3)

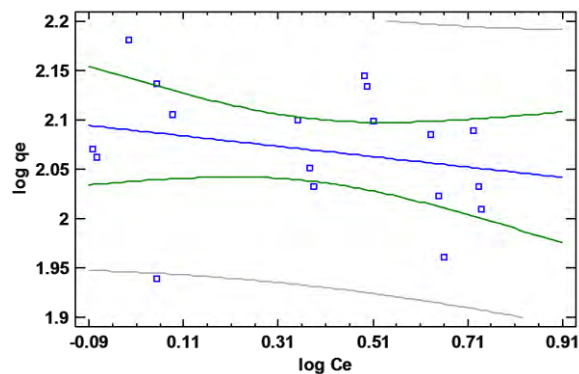
Tabla 40. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich adsorción AM-MMT K10

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00382151	1	0.00382151	0.73	0.4043
Residuo	0.0833341	16	0.00520838		
Total (Corr.)	0.0871556	17			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es mayor o igual a 0.05, no hay una relación estadísticamente significativa entre $\log q_e$ y $\log C_e$ con un nivel de confianza del 95.0% o más. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 4.3847% de la variabilidad en $\log q_e$. El coeficiente de correlación es igual a 0.209397, indicando una relación relativamente débil entre las variables.

Tabla 41. Adsorción de AM con arcilla BEN-AC (n=3)

Co (mg/L)	Log Ce			Log qe			Media (log Ce)	DE	Media (log qe)	DE
2	-0.0724	0.0528	-0.0832	2.0620	1.9398	2.0698	-0.0343	0.0756	2.0239	0.0729
2.5	0.0877	-0.0076	0.0528	2.1060	2.1811	2.1369	0.0443	0.0482	2.1413	0.0377
3.5	0.3759	0.3844	0.3502	2.0507	2.0321	2.1004	0.3702	0.0178	2.0611	0.0353
4.5	0.4920	0.5113	0.4971	2.1448	2.0984	2.1332	0.5001	0.0100	2.1255	0.0242
5.5	0.6479	0.6615	0.6317	2.0231	1.9606	2.0853	0.6470	0.0149	2.0230	0.0624
6.5	0.7221	0.7342	0.7386	2.0889	2.0323	2.0098	0.7316	0.0086	2.0437	0.0407



Coeficiente de Correlación = -0.246257
 R-cuadrada = 6.06426 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 0.193278 por ciento
 Error estándar del est. = 0.0632137
 Error absoluto medio = 0.0494126
 Estadístico Durbin-Watson = 2.83653 (P=0.9588)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.439022

Figura 65. Ajuste adsorción de AM- BEN-AC a modelo lineal de Freundlich (n=3)

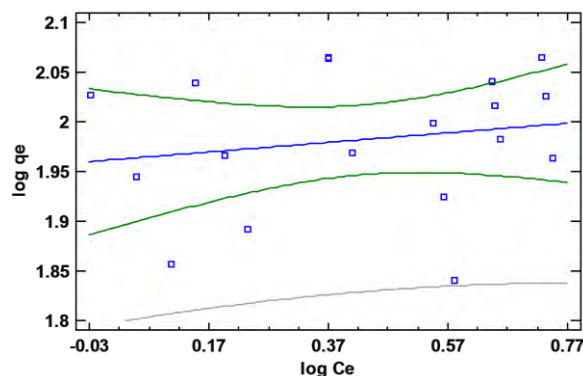
Tabla 42. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich adsorción AM-BEN-AC

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00412753	1	0.00412753	1.03	0.3246
Residuo	0.0639356	16	0.00399597		
Total (Corr.)	0.0680631	17			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es mayor o igual a 0.05, no hay una relación estadísticamente significativa entre $\log q_e$ y $\log C_e$ con un nivel de confianza del 95.0% o más. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 6.06426% de la variabilidad en $\log q_e$. El coeficiente de correlación es igual a -0.246257, indicando una relación relativamente débil entre las variables.

Tabla 43. Adsorción de AM con arcilla BEN-LYS (n=3)

Co (mg/L)	Log Ce			Log qe			Media (log Ce)	DE	Media (log qe)	DE
2	0.1077	-0.0289	0.0488	1.8565	2.0271	1.9450	0.0425	0.0685	1.9429	0.0853
2.5	0.2359	0.1970	0.1483	1.8914	1.9666	2.0386	0.1937	0.0439	1.9655	0.0736
3.5	0.4099	0.3697	0.3691	1.9685	2.0635	2.0647	0.3829	0.0234	2.0322	0.0552
4.5	0.5805	0.5634	0.5444	1.8412	1.9245	1.9990	0.5628	0.0181	1.9216	0.0789
5.5	0.6570	0.6438	0.6494	1.9825	2.0401	2.0166	0.6501	0.0066	2.0131	0.0290
6.5	0.7468	0.7276	0.7356	1.9629	2.0641	2.0251	0.7367	0.0096	2.0173	0.0511



Coeficiente de Correlación = 0.179395
 R-cuadrada = 3.21825 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = -2.83061 por ciento
 Error estándar del est. = 0.0701789
 Error absoluto medio = 0.0538943
 Estadístico Durbin-Watson = 1.5589 (P=0.1445)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.138607

Figura 66. Ajuste adsorción de AM- BEN-LYS a modelo lineal de Freundlich (n=3)

Tabla 44. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich adsorción AM-BEN-LYS

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00262035	1	0.00262035	0.53	0.4763
Residuo	0.0788013	16	0.00492508		
Total (Corr.)	0.0814217	17			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es mayor o igual a 0.05, no hay una relación estadísticamente significativa entre $\log q_e$ y $\log C_e$ con un nivel de confianza del 95.0% o más. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 3.21825% de la variabilidad en $\log q_e$. El coeficiente de correlación es igual a 0.179395, indicando una relación relativamente débil entre las variables.

Tabla 45. Parámetros de ajuste a modelo lineal Freundlich (n=3)

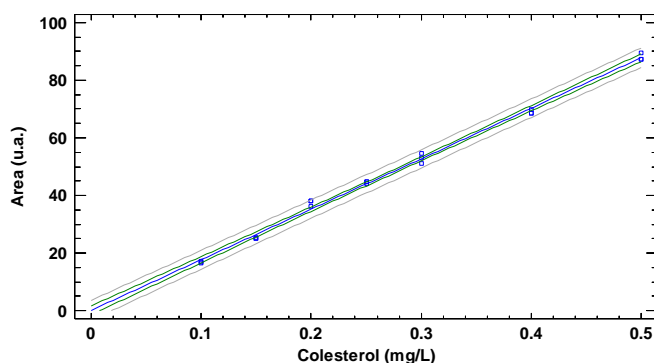
Arcilla	m	b	Capacidad de adsorción de Freundlich (Kf) (mg/g (L/mg) ^{1/n})	Recíproco de orden de reacción (1/n)	R	R ²
MMT Nanoclay	0.2845	2.1291	134.6201	0.2845	0.8498	0.7222
MMT K30	0.1178	2.1267	133.8597	0.1178	0.4951	0.2451
MMT K10	0.0432	2.2280	169.0246	0.0432	0.2094	0.4385
BEN-AC	0.0525	2.08949	122.8825	0.0525	-0.2463	0.6064
BEN-LYS	0.0484	1.9614	91.4956	0.0484	0.1794	0.3218

ANEXO I. ESTUDIO DE ADSORCIÓN DE COLESTEROL

Se preparó una curva de calibración de 7 puntos de colesterol en etanol en un intervalo de concentraciones de 0.010 a 0.050 g/L por triplicado a partir de una solución stock de 500 µg/mL

Tabla 46. Curvas de calibración de colesterol (n=3)

Colesterol (mg/L)	Área 1 (u.a)	Área 2 (u.a)	Área 3 (u.a)	Media(u.a)	Desviación estándar (u.a)
0.1	17.247	16.392	16.9194	16.853	0.431
0.15	25.291	25.121	25.216	25.209	0.085
0.2	38.152	36.047	37.9993	37.399	1.174
0.25	44.908	44.233	44.8702	44.670	0.380
0.3	51.219	54.684	52.98145	52.961	1.733
0.4	68.568	69.940	68.5676	69.025	0.792
0.5	87.337	89.543	87.3374	88.073	1.273



Coeficiente de Correlación = 0.998129
 R-cuadrada = 99.6261 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99.6064 por ciento
 Error estándar del est. = 1.47599
 Error absoluto medio = 1.1895
 Estadístico Durbin-Watson = 1.88866
 (P=0.3573)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.0503488

Figura 67. Modelo ajustado a regresión lineal para colesterol (n=3)

Tabla 47. Parámetros de ajuste de curva de calibración de colesterol

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.0938941	0.743132	0.126349	0.9008
Pendiente	175.544	2.46734	71.1473	0.0000

Tabla 48. ANOVA de curva de calibración de colesterol

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	11027.6	1	11027.6	5061.93	0.0000
Residuo	41.3923	19	2.17854		
Total (Corr.)	11069.0	20			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre área (u.a.) y colesterol (mg/L) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99.6261% de la variabilidad en Área (u.a.). El coeficiente de correlación es igual a 0.998129, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables

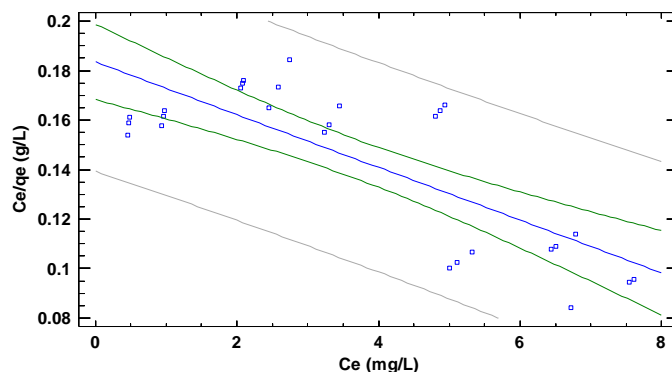
ISOTERMA DE LANGMUIR

Tabla 49. Áreas para adsorción de colesterol con arcillas MMT

AM(mg/L)	MMT Nanoclay			MMT K30			MMT K10		
60	16.6824	16.9459	16.186	12.1922	12.6251	12.7793	10.1177	10.9413	9.843
120	34.3394	33.0882	33.8574	25.125	26.6052	26.2451	22.2046	21.6985	21.5517
240	73.1251	73.6659	72.2737	56.2068	58.7685	58.7552	58.489	59.7016	58.151
300	48.2441	45.3841	43.1442	32.0011	31.0646	29.5814	14.8858	14.8415	14.2131
420	57.9569	60.6175	56.8664	43.3213	42.0064	44.5219	26.1611	24.8676	28.04
600	86.8531	85.6014	84.4914	67.3458	64.1609	66.1983	40.5133	40.3792	40.1761
1002	17.6445	18.7888	18.0409	17.5532	17.5188	17.6901	9.1013	10.7723	10.0574
1200	22.919	23.9346	22.7208	20.1047	20.6238	20.6333	15.5561	12.1927	13.0171
1602	13.4619	11.886	13.3347	19.1016	18.5944	18.3276	22.0844	23.172	25.6235

Tabla 50. Adsorción de colesterol con arcilla MMT Nanoclay (n=3)

Co (mg/L)	Ce (mg/L)			qe (mg/g)			ce/qe (g/L)			Media (qe)	DE	Media (Ce)	DE	Media (Ce/qe)	DE
60	0.4725	0.4800	0.4583	2.9764	2.9760	2.9771	0.1587	0.1613	0.1540	0.4703	0.0110	2.9765	0.0005	0.1580	0.0037
120	0.9754	0.9398	0.9617	5.9512	5.9530	5.9519	0.1639	0.1579	0.1616	0.9590	0.0180	5.9521	0.0009	0.1611	0.0030
240	2.0801	2.0955	2.0559	11.8960	11.8952	11.8972	0.1749	0.1762	0.1728	2.0772	0.0200	11.8961	0.0010	0.1746	0.0017
300	2.7429	2.5800	2.4524	14.8629	14.8710	14.8774	0.1845	0.1735	0.1648	2.5918	0.1456	14.8704	0.0073	0.1743	0.0099
420	3.2962	3.4478	3.2341	20.8352	20.8276	20.8383	0.1582	0.1655	0.1552	3.3260	0.1099	20.8337	0.0055	0.1596	0.0053
600	4.9423	4.8710	4.8078	29.7529	29.7564	29.7596	0.1661	0.1637	0.1616	4.8737	0.0673	29.7563	0.0034	0.1638	0.0023
1002	4.9989	5.3248	5.1118	49.8501	49.8338	49.8444	0.1003	0.1069	0.1026	5.1452	0.1655	49.8427	0.0083	0.1032	0.0033
1200	6.5012	6.7905	6.4448	59.6749	59.6605	59.6778	0.1089	0.1138	0.1080	6.5789	0.1855	59.6711	0.0093	0.1103	0.0031
1602	7.6152	6.7175	7.5427	79.7192	79.7641	79.7229	0.0955	0.0842	0.0946	7.2918	0.4987	79.7354	0.0249	0.0915	0.0063



Coeficiente de Correlación = -0.781421
 R-cuadrada = 61.0619 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 59.5044 por ciento
 Error estándar del est. = 0.0201475
 Error absoluto medio = 0.0169851
 Estadístico Durbin-Watson = 1.67023 (P=0.1590)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.142237

Figura 68. Ajuste adsorción de colesterol -MMT Nanoclay a modelo lineal de Langmuir (n=3)

Tabla 51. Parámetros de ajuste de MMT Nanoclay

Parámetro	Mínimos Cuadrados Estimado	Estándar Error	Estadístico T	Valor-P
Intercepto	0.183437	0.00739046	24.8207	0.0000
Pendiente	-0.0106427	0.00169974	-6.26135	0.0000

Tabla 52. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir MMT Nanoclay

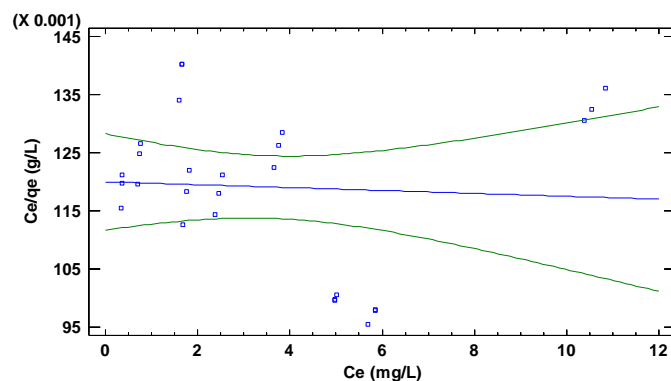
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.015914	1	0.015914	39.20	0.0000
Residuo	0.0101481	25	0.000405923		
Total (Corr.)	0.0260621	26			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Ce/qe (g/L) y Ce (mg/L) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 61.0619% de la variabilidad en Ce/qe (g/L). El coeficiente de correlación es igual a -0.781421, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables

Tabla 53. Adsorción de colesterol con arcilla MMT K30 (n=3)

Co (mg/L)	Ce (mg/L)			qe (mg/g)			ce/qe (g/L)			Media (qe)	DE	Media (Ce)	DE	Media (Ce/qe)	DE
	60	0.3446	0.3569	0.3613	2.9828	2.9822	2.9819	0.1155	0.1197	0.1212	0.3543	0.0087	2.9823	0.0004	0.1188
120	0.7130	0.7551	0.7449	5.9644	5.9622	5.9628	0.1195	0.1267	0.1249	0.7376	0.0220	5.9631	0.0011	0.1237	0.0037
240	1.5983	1.6712	1.6708	11.9201	11.9164	11.9165	0.1341	0.1402	0.1402	1.6468	0.0420	11.9177	0.0021	0.1382	0.0035
300	1.8176	1.7643	1.6798	14.9091	14.9118	14.9160	0.1219	0.1183	0.1126	1.7539	0.0695	14.9123	0.0035	0.1176	0.0047
420	2.4625	2.3876	2.5309	20.8769	20.8806	20.8735	0.1180	0.1143	0.1212	2.4603	0.0717	20.8770	0.0036	0.1178	0.0035
600	3.8311	3.6496	3.7657	29.8084	29.8175	29.8117	0.1285	0.1224	0.1263	3.7488	0.0919	29.8126	0.0046	0.1257	0.0031

1002	4.9729	4.9631	5.0119	49.8514	49.8518	49.8494	0.0998	0.0996	0.1005	4.9826	0.0258	49.8509	0.0013	0.1000	0.0005
1200	5.6997	5.8475	5.8502	59.7150	59.7076	59.7075	0.0954	0.0979	0.0980	5.7991	0.0862	59.7100	0.0043	0.0971	0.0014
1602	10.8279	10.5390	10.3870	79.5586	79.5731	79.5807	0.1361	0.1324	0.1305	10.5846	0.2240	79.5708	0.0112	0.1330	0.0028



Coeficiente de Correlación = -0.0577545
 R-cuadrada = 0.333558 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = -3.6531 por ciento
 Error estándar del est. = 0.0135538
 Error absoluto medio = 0.010391
 Estadístico Durbin-Watson = 1.99284 (P=0.4581)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.0172217

Figura 69. Ajuste adsorción de colesterol -MMT K30 a modelo lineal de Langmuir (n=3)

Tabla 54. Parámetros de ajuste de MMT K30

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.119995	0.00402345	29.8238	0.0000
Pendiente	-0.000248685	0.000859743	-0.289255	0.7748

Tabla 55. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir MMT K10

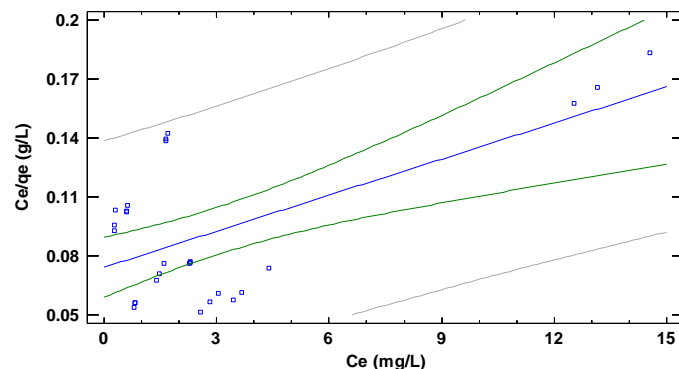
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0000153705	1	0.0000153705	0.08	0.7748
Residuo	0.00459267	25	0.000183707		
Total (Corr.)	0.00460804	26			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es mayor o igual a 0.05, no hay una relación estadísticamente significativa entre C_e/q_e (g/L) y C_e (mg/L) con un nivel de confianza del 95.0% o más. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 0.333558% de la variabilidad en C_e/q_e (g/L). El coeficiente de correlación es igual a -0.0577545, indicando una relación relativamente débil entre las variables.

Tabla 56. Adsorción de colesterol con arcilla MMT K10 (n=3)

Co (mg/L)	Ce (mg/L)			qe (mg/g)			ce/qe (g/L)			Media (qe)	DE	Media (Ce)	DE	Media (Ce/qe)	DE
60	0.2855	0.3090	0.2777	2.9857	2.9846	2.9861	0.0956	0.1035	0.0930	0.2907	0.0163	2.9855	0.0008	0.0974	0.0055
120	0.6298	0.6154	0.6112	5.9685	5.9692	5.9694	0.1055	0.1031	0.1024	0.6188	0.0098	5.9691	0.0005	0.1037	0.0016
240	1.6633	1.6978	1.6536	11.9168	11.9151	11.9173	0.1396	0.1425	0.1388	1.6716	0.0232	11.9164	0.0012	0.1403	0.0020

300	0.8426	0.8401	0.8043	14.9579	14.9580	14.9598	0.0563	0.0562	0.0538	0.8290	0.0214	14.9585	0.0011	0.0554	0.0014
420	1.4849	1.4113	1.5920	20.9258	20.9294	20.9204	0.0710	0.0674	0.0761	1.4961	0.0909	20.9252	0.0045	0.0715	0.0044
600	2.3025	2.2949	2.2833	29.8849	29.8853	29.8858	0.0770	0.0768	0.0764	2.2936	0.0097	29.8853	0.0005	0.0767	0.0003
1002	2.5656	3.0415	2.8379	49.9717	49.9479	49.9581	0.0513	0.0609	0.0568	2.8150	0.2388	49.9593	0.0119	0.0563	0.0048
1200	4.4041	3.4461	3.6809	59.7798	59.8277	59.8160	0.0737	0.0576	0.0615	3.8437	0.4993	59.8078	0.0250	0.0643	0.0084
1602	12.5271	13.1466	14.5431	79.4736	79.4427	79.3728	0.1576	0.1655	0.1832	13.4056	1.0327	79.4297	0.0516	0.1688	0.0131



Coeficiente de Correlación = 0.626414
R-cuadrada = 39.2394 por ciento
R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 36.809 por ciento
Error estándar del est. = 0.030349
Error absoluto medio = 0.0256817
Estadístico Durbin-Watson = 1.36004 (P=0.0375)
Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.302844

Figura 70. Ajuste adsorción de colesterol -MMT K10 a modelo lineal de Langmuir (n=3)

Tabla 57. Parámetros de ajuste de MMT K10

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.0741577	0.00744499	9.96076	0.0000
Pendiente	0.00612366	0.00152402	4.0181	0.0005

Tabla 58. ANOVA de ajuste lineal a Langmuir MMT K10

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.0148706	1	0.0148706	16.15	0.0005
Residuo	0.0230265	25	0.000921059		
Total (Corr.)	0.0378971	26			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre C_e/q_e (g/L) y C_e (mg/L) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 39.2394% de la variabilidad en C_e/q_e (g/L). El coeficiente de correlación es igual a 0.626414, indicando una relación moderadamente fuerte entre las variables.

Tabla 59. Parámetros de ajuste a modelo lineal de Langmuir (n=3)

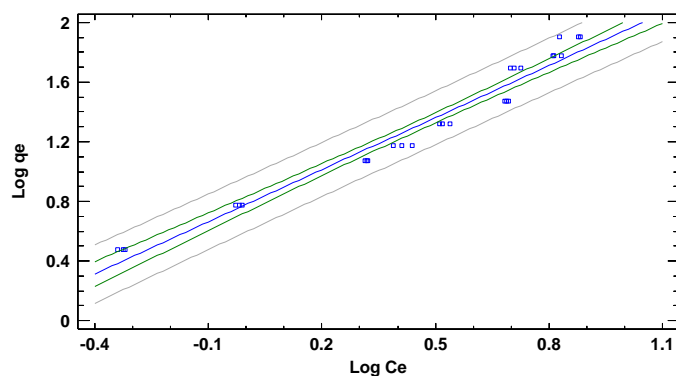
Arcilla	m	b	Capacidad de adsorción máxima (Q) (mg/g)	K_L (L/g)	a_L (K) (L/mg)	R	R ²
MMT Nanoclay	-0.0106	0.1834	94.3396	5.4526	0.0578	0.7814	0.6106
MMT K30	-0.0002	0.1200	5000.0000	8.3333	0.0017	0.0577	0.0333
MMT K10	0.0061	0.0741	163.9344	13.4953	0.0823	0.6264	0.3924

Tabla 60. Determinación de RL para arcilla Nanoclay, MMT K30 y MMT K10

Concentración inicial AM (mg/L)	R _L Nanoclay	R _L MMT K30	R _L MMT K10
60	0.2238	0.9074	0.1684
120	0.1260	0.8306	0.0919
240	0.0672	0.7102	0.0482
300	0.0545	0.6623	0.0389
420	0.0396	0.5834	0.0281
600	0.0280	0.4950	0.0198
1002	0.0170	0.3699	0.0120
1200	0.0142	0.3289	0.0100
1602	0.0107	0.2686	0.0075

ISOTERMA DE FREUNDLICH**Tabla 61. Adsorción de AM con arcilla MMT Nanoclay (n=3)**

Co (mg/L)	Log Ce			Log qe			Media (log Ce)	DE	Media (log qe)	DE
60	-0.3256	-0.3188	-0.3388	0.4737	0.4736	0.4738	-0.3277	0.0102	0.4737	0.0001
120	-0.0108	-0.0270	-0.0170	0.7746	0.7747	0.7747	-0.0183	0.0082	0.7747	0.0001
240	0.3181	0.3213	0.3130	1.0754	1.0754	1.0754	0.3175	0.0042	1.0754	0.0000
300	0.4382	0.4116	0.3896	1.1721	1.1723	1.1725	0.4131	0.0243	1.1723	0.0002
420	0.5180	0.5375	0.5098	1.3188	1.3186	1.3189	0.5218	0.0143	1.3188	0.0001
600	0.6939	0.6876	0.6819	1.4735	1.4736	1.4736	0.6878	0.0060	1.4736	0.0000
1002	0.6989	0.7263	0.7086	1.6977	1.6975	1.6976	0.7113	0.0139	1.6976	0.0001
1200	0.8130	0.8319	0.8092	1.7758	1.7757	1.7758	0.8180	0.0122	1.7758	0.0001
1602	0.8817	0.8272	0.8775	1.9016	1.9018	1.9016	0.8621	0.0303	1.9017	0.0001



Coeficiente de Correlación = 0.982825
 R-cuadrada = 96.5944 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 96.4582 por ciento
 Error estándar del est. = 0.0858216
 Error absoluto medio = 0.0756905
 Estadístico Durbin-Watson = 1.06938 (P=0.0034)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.423961

Figura 71. Ajuste adsorción de colesterol -MMT Nanoclay a modelo lineal de Freundlich (n=3)**Tabla 62. Parámetros de ajuste de MMT Nanoclay**

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.779359	0.0254779	30.5896	0.0000
Pendiente	1.1665	0.0438062	26.6287	0.0000

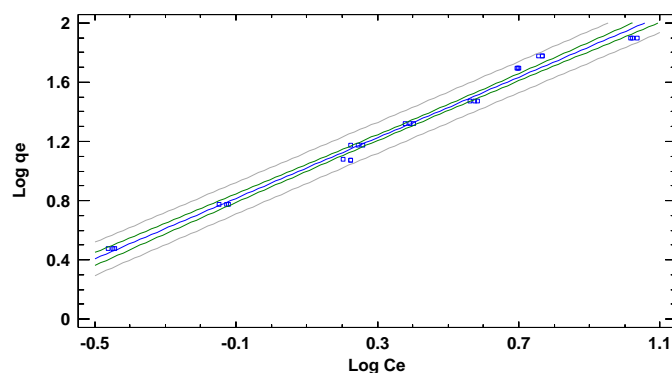
Tabla 63. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich MMT Nanoclay

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	5.22268	1	5.22268	709.09	0.0000
Residuo	0.184134	25	0.00736535		
Total (Corr.)	5.40681	26			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Log q_e y Log C_e con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 96.5944% de la variabilidad en Log q_e . El coeficiente de correlación es igual a 0.982825, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables

Tabla 64. Adsorción de AM con arcilla MMT K30 (n=3)

Co (mg/L)	Log C_e			Log q_e			Media (log C_e)	DE	Media (log q_e)	DE
60	-0.4627	-0.4474	-0.4421	0.4746	0.4745	0.4745	-0.4507	0.0107	0.4745	0.0001
120	-0.1469	-0.1220	-0.1279	0.7756	0.7754	0.7754	-0.1323	0.0130	0.7755	0.0001
240	0.2036	0.2230	0.2229	1.0763	1.0761	1.0761	0.2165	0.0112	1.0762	0.0001
300	0.2595	0.2466	0.2253	1.1735	1.1735	1.1737	0.2438	0.0173	1.1735	0.0001
420	0.3914	0.3780	0.4033	1.3197	1.3197	1.3196	0.3909	0.0127	1.3197	0.0001
600	0.5833	0.5622	0.5758	1.4743	1.4745	1.4744	0.5738	0.0107	1.4744	0.0001
1002	0.6966	0.6958	0.7000	1.6977	1.6977	1.6977	0.6975	0.0022	1.6977	0.0000
1200	0.7558	0.7670	0.7672	1.7761	1.7760	1.7760	0.7633	0.0065	1.7760	0.0000
1602	1.0345	1.0228	1.0165	1.9007	1.9008	1.9008	1.0246	0.0092	1.9008	0.0001



Coeficiente de Correlación = 0.994218
 R-cuadrada = 98.847 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98.8009 por ciento
 Error estándar del est. = 0.0498907
 Error absoluto medio = 0.0394083
 Estadístico Durbin-Watson = 2.18542 (P=0.6512)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.126417

Figura 72. Ajuste adsorción de colesterol -MMT K30 a modelo lineal de Freundlich (n=3)

Tabla 65. Parámetros de ajuste de MMT K30

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.91819	0.0126078	72.8274	0.0000
Pendiente	1.02321	0.0221017	46.2955	0.0000

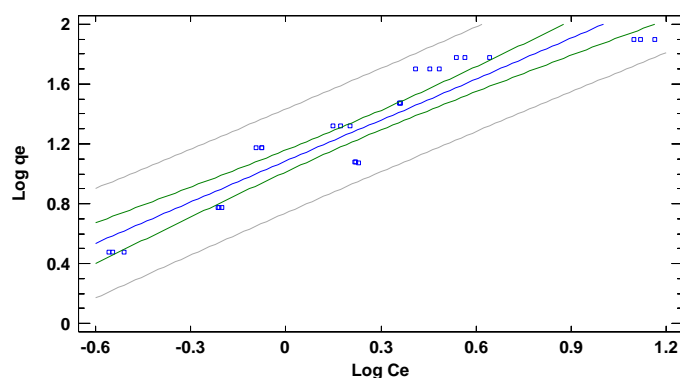
Tabla 66. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich MMT K30

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	5.33478	1	5.33478	2143.27	0.0000
Residuo	0.062227	25	0.00248908		
Total (Corr.)	5.397	26			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Log qe y Log Ce con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 98.847% de la variabilidad en Log qe. El coeficiente de correlación es igual a 0.994218, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables

Tabla 67. Adsorción de AM con arcilla MMT K10 (n=3)

Co (mg/L)	Log Ce			Log qe			Media (log Ce)	DE	Media (log qe)	DE
60	-0.5444	-0.5101	-0.5565	0.4750	0.4749	0.4751	-0.5370	0.0241	0.4750	0.0001
120	-0.2008	-0.2109	-0.2138	0.7759	0.7759	0.7759	-0.2085	0.0068	0.7759	0.0000
240	0.2210	0.2299	0.2184	1.0762	1.0761	1.0762	0.2231	0.0060	1.0761	0.0000
300	-0.0744	-0.0757	-0.0946	1.1749	1.1749	1.1749	-0.0815	0.0113	1.1749	0.0000
420	0.1717	0.1496	0.2019	1.3207	1.3208	1.3206	0.1744	0.0263	1.3207	0.0001
600	0.3622	0.3608	0.3586	1.4755	1.4755	1.4755	0.3605	0.0018	1.4755	0.0000
1002	0.4092	0.4831	0.4530	1.6987	1.6985	1.6986	0.4484	0.0372	1.6986	0.0001
1200	0.6439	0.5373	0.5660	1.7766	1.7769	1.7768	0.5824	0.0551	1.7768	0.0002
1602	1.0978	1.1188	1.1627	1.9002	1.9001	1.8997	1.1264	0.0331	1.9000	0.0003



Coeficiente de Correlación = 0.934761
 R-cuadrada = 87.3778 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 86.8729 por ciento
 Error estándar del est. = 0.165045
 Error absoluto medio = 0.147717
 Estadístico Durbin-Watson = 1.48531 (P=0.0742)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0.202755

Figura 73. Ajuste adsorción de colesterol -MMT K10 a modelo lineal de Freundlich (n=3)

Tabla 68. Parámetros de ajuste de MMT K10

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	1.08481	0.0356255	30.4505	0.0000
Pendiente	0.914748	0.0695343	13.1554	0.0000

Tabla 69. ANOVA de ajuste lineal a Freundlich MMT K10

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	4.7142	1	4.7142	173.06	0.0000
Residuo	0.680993	25	0.0272397		
Total (Corr.)	5.39519	26			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Log q_e y Log C_e con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 87.3778% de la variabilidad en Log q_e . El coeficiente de correlación es igual a 0.934761, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Tabla 70. Parámetros de ajuste a modelo lineal Freundlich (n=3)

Arcilla	m	b	Capacidad de adsorción de Freundlich (Kf) (mg/g (L/mg) ^{1/n})	Recíproco de orden de reacción (1/n)	R	R ²
MMT Nanoclay	1.1665	0.7793	6.0159	0.8573	0.9828	0.9659
MMT K30	1.0232	0.9182	8.2832	0.9773	0.9942	0.9885
MMT K10	0.9147	1.0848	12.1563	1.0933	0.9348	0.8738

ANEXO II. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MP

Se realizó un diseño L8 2x6, se analizó la media de las variables de respuesta de tamaño, PDI y potencial Z.

Tabla 71. Diseño de experimentos Taguchi L82x6

Nombre	Unidades	Tipo	Papel	Bajo	Alto
A:velocidad de agitación	rpm	Continuo	Controlable	-1.0	1.0
B:atorvastatina	mg	Continuo	Controlable	-1.0	1.0
C:metanol	mL	Continuo	Controlable	-1.0	1.0
D:agente desolvatación	mL	Continuo	Controlable	-1.0	1.0
E:gelatina	mg/mL	Continuo	Controlable	-1.0	1.0
F:entrecruzante	UL	Continuo	Controlable	-1.0	1.0

Tabla 72. Resultados de los 8 experimentos Taguchi

Experimento	Tamaño (nm)	Media (nm)	DE (nm)	ZP (mV)	Media (mV)	DE (mV)	PDI	Media	DE
E1	626.40	648.27	16.21	29.60	30.07	0.40	0.40	0.36	0.04
	648.80			30.60			0.39		
	671.90			29.80			0.31		
	639.20			30.00			0.31		
	642.40			29.90			0.35		
	660.90			30.50			0.39		
E2	1703.00	1650.83	84.33	27.00	26.65	0.38	0.46	0.44	0.03
	1616.00			26.70			0.49		
	1738.00			26.70			0.44		
	1711.00			27.10			0.41		
	1627.00			26.20			0.40		
	1510.00			26.20			0.44		
E3	2553.00	2364.00	148.84	19.40	19.58	0.24	0.54	0.52	0.03
	2550.00			19.60			0.50		
	2300.00			19.30			0.55		
	2227.00			19.60			0.51		
	2242.00			19.60			0.56		
	2312.00			20.00			0.48		
E4	521.60	525.55	13.87	26.80	27.08	0.60	0.31	0.36	0.05
	523.60			27.30			0.39		
	553.00			27.30			0.32		
	516.50			27.60			0.37		
	515.50			26.00			0.34		
	523.10			27.50			0.43		
E5	812.20	798.82	32.80	22.60	23.43	0.94	0.33	0.32	0.05
	790.30			24.50			0.40		
	848.00			23.90			0.31		
	779.90			23.60			0.29		
	810.70			24.00			0.30		
	751.80			22.00			0.27		
E6	1698.00	1833.33	98.32	15.70	15.53	0.53	0.52	0.46	0.04
	1979.00			15.50			0.49		
	1863.00			15.00			0.44		
	1888.00			15.20			0.42		
	1801.00			16.50			0.46		
	1771.00			15.30			0.41		
E7	1246.00	1345.00	56.77	23.60	22.42	0.86	0.33	0.28	0.03
	1331.00			23.40			0.28		
	1385.00			22.20			0.26		
	1370.00			21.60			0.28		

	1406.00			21.90			0.27		
	1332.00			21.80			0.28		
E8	709.30	703.60	8.40	28.10	27.62	0.38	0.36	0.30	0.04
	713.10			27.30			0.29		
	692.80			28.00			0.26		
	699.50			27.40			0.30		
	696.50			27.70			0.27		
	710.40			27.20			0.32		

Tabla 73. ANOVA para tamaño (nm) (n=6)

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:velocidad de agitación	35.7075	1	35.7075	0.01	0.9360
B:atorvastatina	1.03371E6	1	1.03371E6	189.00	0.0000
C:metanol	147032.	1	147032.	26.88	0.0000
D:agente desolvatación	1.13283E6	1	1.13283E6	207.12	0.0000
E:gelatina	1.5302E7	1	1.5302E7	2797.72	0.0000
F:entrecruzante	1.01809E6	1	1.01809E6	186.14	0.0000
AB	193472.	1	193472.	35.37	0.0000
Error total	218778.	40	5469.46		
Total (corr.)	1.9046E7	47			

R-cuadrada = 98.8513 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98.6503 por ciento

Error estándar del est. = 73.9558

Error absoluto medio = 45.4667

Estadístico Durbin-Watson = 1.89805 (P=0.4244)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.0497771

En este caso, 6 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 98.8513% de la variabilidad en tamaño. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 98.6503%.

Tabla 74. ANOVA para PDI (nm) (n=6)

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	Razón-F	Valor-P
A:velocidad de agitación	0.00824252	1	0.00824252	5.67	0.0221
B:atorvastatina	0.055965	1	0.055965	38.51	0.0000
C:metanol	0.00394219	1	0.00394219	2.71	0.1074
D:agente desolvatación	0.0425425	1	0.0425425	29.27	0.0000
E:gelatina	0.102029	1	0.102029	70.20	0.0000
F:entrecruzante	0.0111935	1	0.0111935	7.70	0.0083
AB	0.0789752	1	0.0789752	54.34	0.0000
Error total	0.0581355	40	0.00145339		
Total (corr.)	0.361025	47			

R-cuadrada = 83.8971 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 81.0791 por ciento

Error estándar del est. = 0.0381233

Error absoluto medio = 0.0289653

Estadístico Durbin-Watson = 1.4931 (P=0.0655)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.232939

En este caso, 6 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 83.8971% de la variabilidad en PDI. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 81.0791%.

Tabla 75. ANOVA para potencial Zeta (nm) (n=6)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A:velocidad de agitación	0.775208	1	0.775208	2.23	0.1432
B:atorvastatina	334.435	1	334.435	961.83	0.0000
C:metanol	1.43521	1	1.43521	4.13	0.0489
D:agente desolvatación	34.5102	1	34.5102	99.25	0.0000
E:gelatina	432.6	1	432.6	1244.15	0.0000
F:entrecruzante	3.57521	1	3.57521	10.28	0.0026
AB	155.16	1	155.16	446.24	0.0000
Error total	13.9083	40	0.347708		
Total (corr.)	976.4	47			

R-cuadrada = 98.5755 porciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 98.3263 porciento

Error estándar del est. = 0.589668

Error absoluto medio = 0.425694

Estadístico Durbin-Watson = 1.88646 (P=0.4100)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0.0427002

En este caso, 6 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 98.5755% de la variabilidad en potencial Z. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 98.3263%.

Tabla 76. Optimización de las respuestas

Respuesta	Optimizado	Predicción	Inferior 95.0% Límite	Superior 95.0% Límite	Deseabilidad
Tamaño	si	1300.0	1239.59	1360.41	1.0
Potencial Z	si	22.659	22.1773	23.1406	0.643041
PDI	si	0.279504	0.248365	0.310642	0.204964

Deseabilidad optimizada = 0.508907

Tabla 77. Factores establecidos óptimos

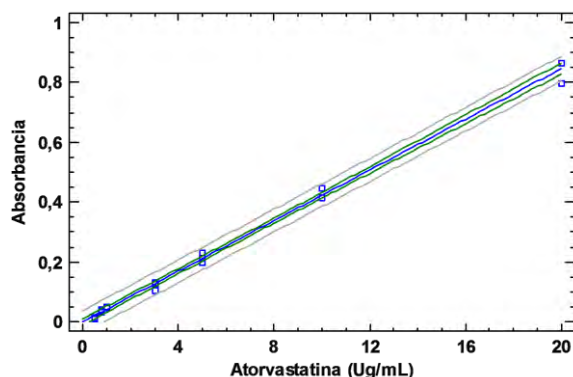
Factor	Establecimiento
Velocidad de agitación	0.999989
atorvastatina	-1.0
Metanol	-0.999998
Agente desolvatación	0.999933
Gelatina	0.919534
Entrecruzante	-0.997106

Eficiencia de entrappe de MP

Se preparó una curva de calibración de 7 puntos de atorvastatina cálcica en metanol en un intervalo de concentraciones de 1 a 20 $\mu\text{g/mL}$ por triplicado a partir de una solución stock.

Tabla 78. Curva de calibración de atorvastatina cálcica en metanol (n=3)

Atorvastatina ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Media	Desviación Estándar
0.5	0.0120	0.0110	0.0130	0.0120	0.0010
0,8	0.0350	0.0320	0.0390	0.0353	0.0035
1.0	0.0500	0.0460	0.0500	0.0487	0.0023
3.0	0.1040	0.1270	0.1300	0.1203	0.0142
5.0	0.1990	0.2320	0.2130	0.2147	0.0166
10.0	0.4130	0.4460	0.4450	0.4347	0.0188
20.0	0.7950	0.8640	0.8640	0.8410	0.0398



Coeficiente de Correlación = 0,998201
 R-cuadrada = 99,6405 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,6216 por ciento
 Error estándar del est. = 0,0176064
 Error absoluto medio = 0,0121912
 Estadístico Durbin-Watson = 1,09626 (P=0,0104)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,418409

Figura 74. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en metanol (n=3)

Tabla 79. ANOVA de atorvastatina cálcica en metanol (n=3)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,63229	1	1,63229	5265,72	0,0000
Residuo	0,00588971	19	0,000309985		
Total (Corr.)	1,63818	20			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y atorvastatina ($\mu\text{g/mL}$) con un nivel de confianza del 95,0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99,6405% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0,998201, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables

Tabla 80. Parámetro de ajuste a regresión lineal simple de atorvastatina cálcica en metanol (n=3)

m	b	R	R ²
0.0423	0.0002	0.9982	0.9964

Tabla 81. Tabla. determinación de EE de MP (n=3)

AC total inicial (mg)	Absorbancia	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	AT en MP(mg)	EE (%)	Media	Desviación Estándar
10.50	0.381	9.002	6.752	64.303	67.30	2.65
10.10	0.395	9.333	7.000	69.307		
10.30	0.397	9.381	7.035	68.305		

ANEXO III. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MP/MMT

Tabla 82. Determinación de potencial z de MP y MMT en función de pH

pH	Micropartículas (MP)			MMT Nanoclay		
	Potencial Z (mV)	Media (mV)	Desviación Estándar (mV)	Potencial Z (mV)	Media (mV)	Desviación Estándar (mV)
3.0	18.6	18.8667	0.2517	-20.5	-20.5000	0.3000
	18.9			-20.2		
	19.1			-20.8		
4.0	11.4	12.0333	0.7095	-25.4	-25.8333	0.7506
	11.9			-25.4		
	12.8			-26.7		
5.0	-1.56	-1.5700	0.0458	-22.8	-22.8333	0.2517
	-1.53			-22.6		
	-1.62			-23.1		
6.5	-5.78	-6.4400	0.6502	-27.3	-27.7667	0.4163
	-6.46			-28.1		
	-7.08			-27.9		
7.0	-11.6	-11.9333	0.4933	-26.2	-26.6000	0.4000
	-11.7			-26.6		
	-12.5			-27.0		
8.0	-14.5	-15.4667	1.2662	-27.7	-27.9000	0.1732
	-15.0			-28.0		
	-16.9			-28.0		

Tabla 83. Determinación de tamaño de partícula y PDI de MP y MP/MMT

Sistema	Tamaño de partícula (nm)	Media (nm)	Desviación Estándar (nm)	PDI	Media	Desviación Estándar (nm)
MP	1664	1423.667	208.510	0.297	0.267	0.026
	1291			0.247		
	1316			0.257		
MP/MMT	5703	5779.333	607.110	0.316	0.345	0.097
	5214			0.454		
	6421			0.266		

ANEXO IV. PERFILES DE LIBERACIÓN

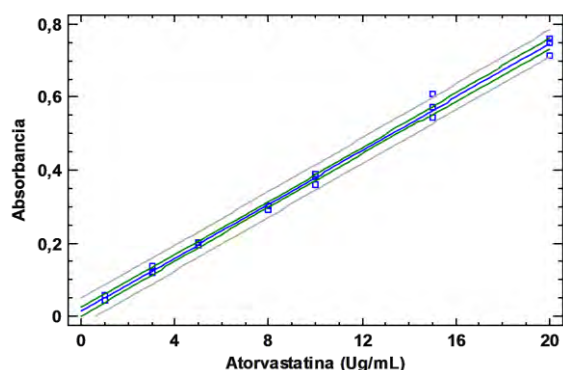
CURVAS DE CALIBRACIÓN DE ATORVASTATINA CÁLCICA A DIFERENTES VALORES DE pH

Se preparó una curva de calibración de 7 puntos de atorvastatina cálcica en soluciones amortiguadoras a pH=1.6, 5.0, 5.8, 6.5 y 7.0 en un intervalo de concentraciones de 1 a 20 µg/mL por triplicado a partir de una solución stock.

CURVA DE CALIBRACIÓN A pH 1.6

Tabla 84. Curvas de calibración de atorvastatina cálcica en buffer pH 1.6 (n=3)

Atorvastatina (µg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Media	Desviación Estándar
1.0	0.0420	0.0450	0.0590	0.0487	0.0091
3.0	0.1180	0.1230	0.1360	0.1257	0.0093
5.0	0.1950	0.2020	0.1960	0.1977	0.0038
8.0	0.3040	0.3040	0.2930	0.3003	0.0064
10.0	0.3830	0.3620	0.3890	0.3780	0.0142
15.0	0.5740	0.5430	0.6090	0.5753	0.0330
20.0	0.7610	0.7490	0.7120	0.7407	0.0255



Coeficiente de Correlación = 0,99774
 R-cuadrada = 99,5485 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,5247 por ciento
 Error estándar del est. = 0,0162721
 Error absoluto medio = 0,0106878
 Estadístico Durbin-Watson = 2,00463 (P=0,4609)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0,128405

Figura 75. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en buffer pH 1.6 (n=3)

Tabla 85. ANOVA de atorvastatina cálcica en buffer pH 1.6 (n=3)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,10924	1	1,10924	4189,26	0,0000
Residuo	0,00503086	19	0,000264782		
Total (Corr.)	1,11427	20			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y atorvastatina (µg/mL) con un nivel de confianza del 95,0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99,5485% de la variabilidad en Absorbancia.

CURVA DE CALIBRACIÓN A pH 5.0

Tabla 86. Curvas de calibración de atorvastatina cálcica en buffer pH 5.0 (n=3)

Atorvastatina (µg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Media	Desviación estándar
1.0	0.0390	0.0650	0.0420	0.0487	0.0142
3.0	0.1260	0.1580	0.1060	0.1300	0.0262
5.0	0.2640	0.2350	0.1890	0.2293	0.0378
8.0	0.3190	0.3050	0.3230	0.3157	0.0095
10.0	0.3940	0.3920	0.3700	0.3853	0.0133
15.0	0.5880	0.5660	0.5610	0.5717	0.0144
20.0	0.8100	0.7990	0.7390	0.7827	0.0382

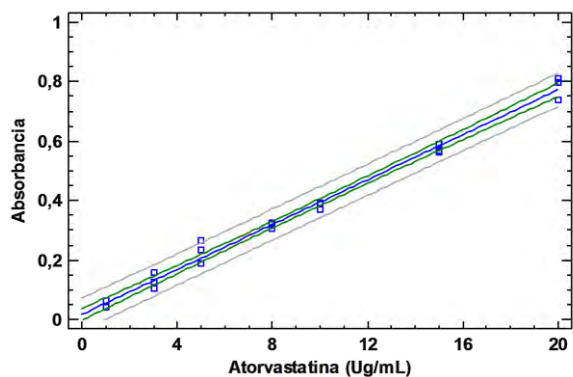


Figura 76. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en buffer pH 5.0 (n=3)

Coefficiente de Correlación = 0,99522
 R-cuadrada = 99,0463 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98,9961 por ciento
 Error estándar del est. = 0,0243987
 Error absoluto medio = 0,0185624
 Estadístico Durbin-Watson = 1,50048 (P=0,0992)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,188396

Tabla 87. ANOVA de atorvastatina cálcica en buffer pH 5.0 (n=3)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,1747	1	1,1747	1973,29	0,0000
Residuo	0,0113107	19	0,000595299		
Total (Corr.)	1,18601	20			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y atorvastatina (Ug/mL) con un nivel de confianza del 95,0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99,0463% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0,99522, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

CURVA DE CALIBRACIÓN A pH 5.8

Tabla 88. Curvas de calibración de atorvastatina cálcica en buffer pH 5.8 (n=3)

Atorvastatina (µg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Media	Desviación Estándar
1.0	0.0400	0.0660	0.0700	0.0587	0.0163
3.0	0.1030	0.1290	0.1460	0.1260	0.0217
5.0	0.1820	0.2210	0.2300	0.2110	0.0255
8.0	0.2960	0.3620	0.3690	0.3423	0.0403
10.0	0.3810	0.4250	0.4390	0.4150	0.0303
15.0	0.6360	0.6230	0.6680	0.6423	0.0232
20.0	0.7880	0.8090	0.7920	0.7963	0.0112

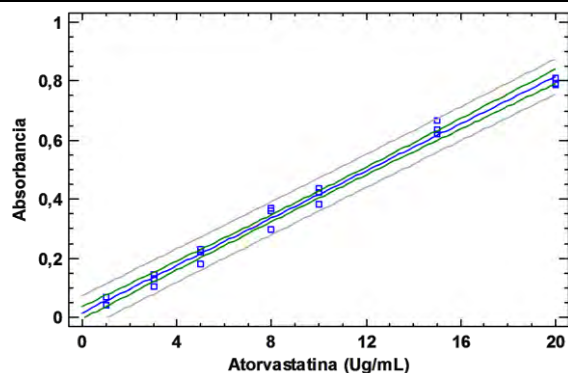


Figura 77. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en buffer pH 5.8 (n=3)

Coefficiente de Correlación = 0,99513
 R-cuadrada = 99,0283 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98,9772 por ciento
 Error estándar del est. = 0,0260853
 Error absoluto medio = 0,0212674
 Estadístico Durbin-Watson = 1,23506 (P=0,0253)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,350715

Tabla 89. ANOVA de atorvastatina cálcica en buffer pH 5.8 (n=3)

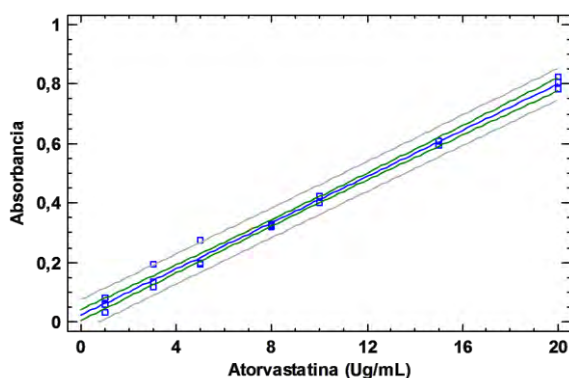
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,31762	1	1,31762	1936,42	0,0000
Residuo	0,0129284	19	0,000680443		
Total (Corr.)	1,33055	20			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y atorvastatina ($\mu\text{g/mL}$) con un nivel de confianza del 95,0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99,0283% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0,99513, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

CURVA DE CALIBRACIÓN A pH 6.5

Tabla 90. Curvas de calibración de atorvastatina cálcica en buffer pH 6.5 (n=3)

Atorvastatina ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Media	Desviación Estándar
1.0	0.0590	0.0830	0.0340	0.0587	0.0245
3.0	0.1340	0.1930	0.1160	0.1477	0.0403
5.0	0.1960	0.2750	0.2000	0.2237	0.0445
8.0	0.3280	0.3250	0.3180	0.3237	0.0051
10.0	0.4020	0.4240	0.4010	0.4090	0.0130
15.0	0.6090	0.5940	0.6080	0.6037	0.0084
20.0	0.7850	0.8220	0.8050	0.8040	0.0185



Coeficiente de Correlación = 0,995856
 R-cuadrada = 99,1728 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 99,1293 por ciento
 Error estándar del est. = 0,0233526
 Error absoluto medio = 0,0168824
 Estadístico Durbin-Watson = 1,2302 (P=0,0246)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,383043

Figura 78. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en buffer pH 6.5 (n=3)**Tabla 91. ANOVA de atorvastatina cálcica en buffer pH 6.5 (n=3)**

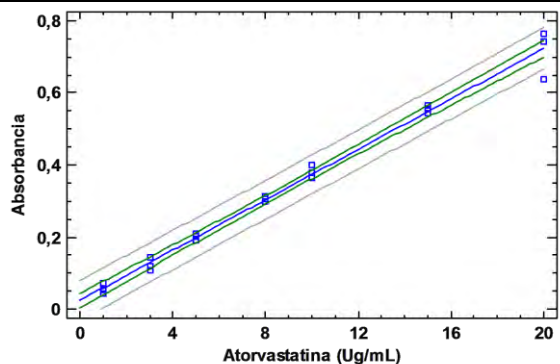
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,24229	1	1,24229	2277,99	0,0000
Residuo	0,0103615	19	0,000545343		
Total (Corr.)	1,25265	20			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre absorbancia y atorvastatina ($\mu\text{g/mL}$) con un nivel de confianza del 95,0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 99,1728% de la variabilidad en absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0,995856, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

CURVA DE CALIBRACIÓN A pH 7.0

Tabla 92. Curvas de calibración de atorvastatina cálcica en buffer pH 7.0 (n=3)

Atorvastatina (µg/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3	Media	Desviación Estándar
1.0	0.0530	0.0440	0.0720	0.0563	0.0143
3.0	0.1430	0.1100	0.1190	0.1240	0.0171
5.0	0.2020	0.1910	0.2080	0.2003	0.0086
8.0	0.3060	0.3000	0.3120	0.3060	0.0060
10.0	0.3790	0.4000	0.3650	0.3813	0.0176
15.0	0.5550	0.5670	0.5450	0.5557	0.0110
20.0	0.7410	0.7620	0.6360	0.7130	0.0675



Coeficiente de Correlación = 0,994101
 R-cuadrada = 98,8236 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 98,7617 por ciento
 Error estándar del est. = 0,0250783
 Error absoluto medio = 0,0155024
 Estadístico Durbin-Watson = 1,02766 (P=0,0059)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = 0,170516

Figura 79. Modelo ajustado a regresión lineal para atorvastatina cálcica en buffer pH 7.0 (n=3)

Tabla 93. ANOVA de atorvastatina cálcica en buffer pH 7.0 (n=3)

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1,00384	1	1,00384	1596,13	0,0000
Residuo	0,0119495	19	0,000628921		
Total (Corr.)	1,01579	20			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre Absorbancia y atorvastatina (µg/mL) con un nivel de confianza del 95,0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 98,8236% de la variabilidad en Absorbancia. El coeficiente de correlación es igual a 0,994101, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Tabla 94. Parámetro de ajuste a regresión lineal simple de atorvastatina cálcica en soluciones buffer a diferentes valores de pH

pH	m	b	R	R ²
1.6	0.0367	0.0132	0.9977	0.9955
5.0	0.0377	0.0175998	0.9952	0.9905
5.8	0.0399	0.0161795	0.9951	0.9903
6.5	0.0388	0.0234023	0.9958	0.9917
7.0	0.0349	0.0247717	0.9941	0.9882

ANEXO. PERFIL DE LIBERACIÓN

Tabla 95. Perfil de liberación de micropartículas (MP) FAS (n=3)

pH	Tiempo (h)	Absorbancia			Atorvastatina liberada (µg)			% Acumulado Liberado			Media (%)	Desviación Estándar
		1	2	3	1	2	3	1	2	3		
1.6	0.5	0.1710	0.3290	0.2540	435.2480	868.1090	665.2752	6.4549	12.8744	9.8663	9.7319	3.2119
1.6	1.0	0.2650	0.2350	0.2440	699.2262	618.5722	645.1117	10.3698	9.1737	9.5673	9.7036	0.6096
1.6	2.0	0.3510	0.3960	0.3790	939.2262	1059.3896	1013.5586	13.9291	15.7112	15.0315	14.8906	0.8994
6.5	4.0	0.3940	0.2890	0.3230	1923.8272	1775.3543	1818.6646	28.5312	26.3292	26.9716	27.2773	1.1324
6.5	6.0	0.5880	0.4780	0.5800	2425.3423	2261.9199	2478.6141	35.9688	33.5452	36.7589	35.4243	1.6746
6.5	8.0	0.3680	0.3220	0.3510	2781.6605	2663.8442	2768.6192	41.2532	39.5059	41.0598	40.6063	0.9578
7.0	10.0	0.1710	0.1670	0.1750	3208.3768	3077.6665	3205.1923	47.5816	45.6431	47.5343	46.9197	1.1058
7.0	12.0	0.2360	0.2570	0.2740	3418.3654	3359.4316	3513.0604	50.6958	49.8218	52.1001	50.8726	1.1494
7.0	24.0	0.4480	0.4900	0.4830	4024.5258	4030.0620	4117.2152	59.6854	59.7675	61.0600	60.1710	0.7710
7.0	48.0	0.6000	0.6180	0.5820	4501.1734	4439.6608	4436.8427	66.7543	65.8420	65.8002	66.1322	0.5392

Tabla 96. Perfil de liberación de micropartículas (MP) FED (n=4)

pH	Tiempo (h)	Absorbancia				Atorvastatina liberada				% Acumulado Liberado				Media (%)	Desviación Estándar
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4		
5.0	0.5	0.0670	0.1360	0.1060	0.0860	110.4481	302.5792	218.9727	163.4536	1.6382	4.4880	3.2479	2.4244	2.9496	1.2181
5.0	1.0	0.1200	0.1810	0.1530	0.1410	258.2623	429.0273	351.1585	317.9344	3.8307	6.3635	5.2085	4.7157	5.0296	1.0563
5.0	2.0	0.1660	0.2330	0.2060	0.2060	387.3880	573.7814	498.3716	498.5902	5.7459	8.5106	7.3920	7.3953	7.2609	1.1390
5.8	4.0	0.2060	0.2020	0.2220	0.2270	875.3010	1051.7712	1027.6657	1041.6950	12.9828	15.6003	15.2427	15.4508	14.8192	1.2330
5.8	6.0	0.3870	0.3750	0.3790	0.3800	1364.2038	1521.0576	1456.2616	1451.3651	20.2344	22.5609	21.5999	21.5272	21.4806	0.9551
5.8	8.0	0.3700	0.3940	0.4090	0.4320	1336.0708	1588.3211	1547.5660	1607.3753	22.5327	26.4472	25.2337	25.5269	24.9351	1.6830
7.0	10.0	0.1450	0.1410	0.1930	0.1490	1730.1685	1974.3703	2086.0777	2020.5188	25.6625	29.2846	30.9415	29.9691	28.9645	2.3039
7.0	12.0	0.1640	0.1650	0.1870	0.2220	2191.1427	2465.0866	2539.7740	2799.8312	32.4999	36.5631	37.6709	41.5282	37.0655	3.7139
7.0	24.0	0.3350	0.3440	0.2880	0.3310	3198.5811	3505.7628	3152.3127	3471.5102	47.4426	51.9989	46.7563	51.4908	49.4222	2.7046
7.0	48.0	0.4110	0.3510	0.3660	0.3550	3705.4579	3608.9147	3660.3356	3652.8856	56.9608	53.5288	55.2915	54.1810	54.9906	1.5016

Tabla 97. Perfil de liberación de material compuesto (MP/MMT) FAS (n=3)

pH	Tiempo (h)	Absorbancia			Atorvastatina liberada (µg)			% Acumulado Liberado			Media (%)	Desviación Estándar
		1	2	3	1	2	3	1	2	3		
1.6	0.5	0.0940	0.0980	0.1010	224.5613	237.6676	243.3896	3.3303	3.5247	3.6096	3.4882	0.1432
1.6	1.0	0.1180	0.1260	0.1200	292.8992	315.2698	298.4305	4.3438	4.6756	4.4259	4.4818	0.1728
1.6	2.0	0.1740	0.1820	0.1650	450.6376	472.8447	426.0327	6.6831	7.0125	6.3182	6.6713	0.3473
6.5	4.0	0.2600	0.2730	0.2640	1107.0896	1153.6098	1085.2827	16.4186	17.1085	16.0952	16.5408	0.5176
6.5	6.0	0.3820	0.3730	0.3590	1434.8674	1433.0846	1350.1615	21.2797	21.2532	20.0235	20.8521	0.7178
6.5	8.0	0.4050	0.4290	0.3900	1497.4937	1579.9280	1432.4847	24.0616	26.6464	23.2394	24.6492	1.7779
7.0	10.0	0.0820	0.1280	0.1080	1677.7802	1899.1830	1690.7082	24.8822	28.1657	25.0739	26.0406	1.8429
7.0	12.0	0.1500	0.1900	0.1680	1884.0839	2107.2060	1890.1351	27.9417	31.2507	28.0315	29.0747	1.8851
7.0	24.0	0.2550	0.3340	0.3400	2192.9664	2513.2231	2376.6681	32.5226	37.2721	35.2470	35.0139	2.3833
7.0	48.0	0.3880	0.5250	0.5050	2604.1412	3101.7618	2898.7311	38.6205	46.0004	42.9894	42.5368	3.7107

Tabla 98. Perfil de liberación de material compuesto (MP/MMT) FED (n=3)

pH	Tiempo (h)	Absorbancia			Atorvastatina liberada (µg)			% Acumulado Liberado			Media (%)	Desviación Estándar
		1	2	3	1	2	3	1	2	3		
5.0	0.5	0.0680	0.0950	0.0960	114.0000	188.2077	189.0710	1.1400	2.2728	2.2841	1.8990	0.6573
5.0	1.0	0.1100	0.1480	0.1491	230.4481	336.2951	337.5920	2.3045	4.0611	4.0922	3.4859	1.0233
5.0	2.0	0.1650	0.2390	0.2407	382.8525	587.9344	590.6937	3.8285	7.0999	7.1492	6.0259	1.9031
5.8	4.0	0.1520	0.2280	0.2319	731.4305	1130.6812	1143.6524	7.3143	13.6542	13.8199	11.5961	3.7091
5.8	6.0	0.2310	0.3070	0.3157	936.3921	1340.5534	1366.0433	9.3639	16.1886	16.4961	14.0162	4.0319
5.8	8.0	0.2530	0.2940	0.3179	994.5507	1308.1748	1372.5621	10.2432	15.7326	16.7679	14.2479	3.5066
7.0	10.0	0.1070	0.0580	0.0589	1483.4956	1474.6897	1562.5090	14.8350	17.8084	18.8641	17.1692	2.0893
7.0	12.0	0.1360	0.0880	0.0895	2594.7735	2115.3660	2218.9409	25.9477	25.5453	26.7979	26.0970	0.6395
7.0	24.0	0.3030	0.2380	0.2399	3398.2807	2729.8760	2839.0321	33.9828	32.9661	34.2844	33.7444	0.6907
7.0	48.0	0.3780	0.2830	0.2894	4426.2578	3481.9218	3609.4170	44.2626	42.0479	43.5875	43.2993	1.5013

Tabla 99. Resumen perfiles de liberación FAS y FED

Replica	MP						MP/MMT					
	FAS (n=3)			FED (n=4)			FAS (n=3)			FED (n=3)		
	1.6	6.5	7	5	5.8	7	1.6	6.5	7	5	5.8	7
1	13.9291	41.2532	66.7543	5.7459	22.5327	56.9608	6.6831	24.0616	38.6205	3.8285	10.2432	44.2626
2	15.7112	39.5059	65.842	8.5106	26.4472	53.5288	7.0125	26.6464	46.0004	7.0999	15.7326	42.0479
3	15.0315	41.0598	65.8002	7.392	25.2337	55.2915	6.3182	23.2394	42.9894	7.1492	16.7679	43.5875
4				7.3953	25.5269	54.181						
Media (% Acumulado)	14.891	40.606	66.132	7.261	24.935	54.991	6.671	24.649	42.537	6.026	14.248	43.299
Desviación Estándar	0.899	0.958	0.539	1.139	1.683	1.502	0.347	1.778	3.711	1.903	3.507	1.135

- Muestra 1: MP 1.6 FAS
- Muestra 2: MP 6.5 FAS
- Muestra 3: MP 7 FAS
- Muestra 4: MP 5 FED
- Muestra 5: MP 5.8 FED
- Muestra 6: MP 7 FED
- Muestra 7: MP/MMT 1.6 FAS
- Muestra 8: MP/MMT 6.5 FAS
- Muestra 9: MP/MMT 7 FAS
- Muestra 10: MP/MMT 5 FED
- Muestra 11: MP/MMT 5.8 FED
- Muestra 12: MP/MMT 7 FED

Tabla 100. ANOVA entre sistemas y medios

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	13635.9	11	1239.62	329.33	0.0000
Intra grupos	90.3384	24	3.7641		
Total (Corr.)	13726.2	35			

La prueba-F en la tabla ANOVA determina si hay diferencias significativas entre las medias. Si las hay, las Pruebas de Rangos Múltiples indican cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La tabla ANOVA descompone la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 329.328, es el cociente entre el estimado entre-grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 12 variables con un nivel del 95.0% de confianza.

Tabla 101. Método: 95.0 porcentaje LSD entre sistemas y medios

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
MP/MMT 5 FED	3	6.02587	X
MP/MMT 1.6 FAS	3	6.67127	X
MP 5 FED	3	7.21617	X
MP/MMT 5.8 FED	3	14.2479	X
MP 1.6 FAS	3	14.8906	X
MP/MMT 6.5 FAS	3	24.6491	X
MP 5.8 FED	3	24.7379	X
MP 6.5 FAS	3	40.6063	X
MP/MMT 7 FAS	3	42.5368	X
MP/MMT 7 FED	3	43.2993	X
MP 7 FED	3	55.2604	X
MP 7 FAS	3	66.1322	X

Se han identificado 6 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

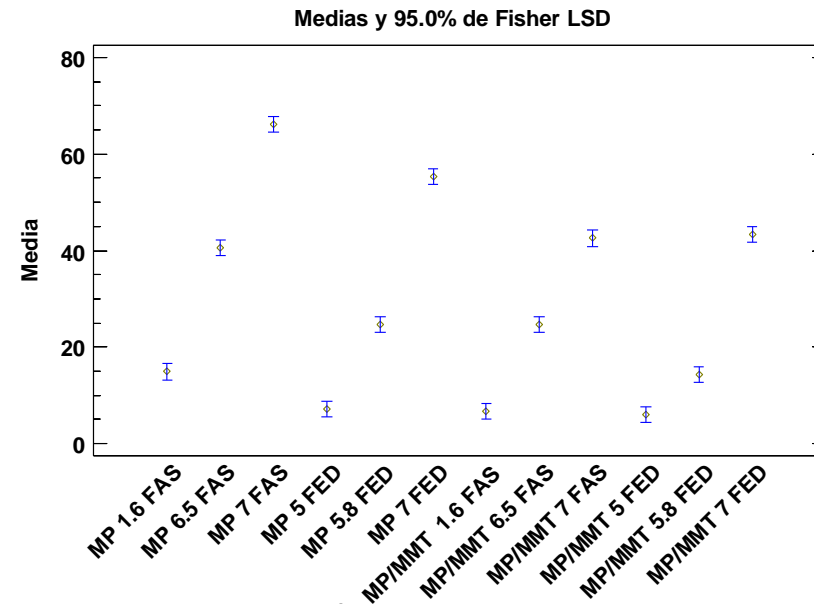


Figura 80. Gráfica de medias de % liberados

Tabla 102. Ajuste a modelo de Korsmeyer-Peppas de MP y MP/MTT en condiciones FAS y FED

	MP FAS	MP FED
Parámetros	KORSMEYER-PEPPAS	KORSMEYER-PEPPAS
N_observed	9.0000	10.0000
DF	7.0000	8.0000
R_obs-pre	0.9582	0.9744
Rsqr	0.9140	0.9467
Rsqr_adj	0.9115	0.9451
MSE	17.4207	24.1803
MSE_root	4.1581	4.8474
Weighting	1.0000	1.0000
SS	121.9447	193.4427
WSS	121.9447	193.4427
AIC	47.0944	56.0795
MSC	2.6923	2.3938

ANEXO V. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD

Tabla 103. Resultados de viabilidad celular para MP 24 h

Repetición	CONTROL	0.5	2.4	5.0	16.1	32.3	48.4	121.0	282.2	483.8	4800	9700
	Absorbancia											
1	0.968	0.729	0.898	0.81	0.929	0.948	0.834	0.78	0.75	0.546	0.11	0.105
2	1.032	1.022	0.692	0.841	0.792	0.77	0.773	0.577	0.721	0.532	0.102	0.102
3	0.82	1.064	0.96	0.725	0.804	0.841	0.685	0.669	0.743	0.504	0.117	0.109
4	0.846	0.946	0.752	0.766	0.793	0.679	0.623	0.603	0.738	0.506	0.108	0.116
5	0.779	0.907	0.899	0.988	0.876	0.609	0.766	0.578	0.587	0.604	0.131	0.118
6	0.644	0.665	1.084	0.953	0.902	0.594	1.045	0.942	0.561	0.615	0.108	0.128
7	0.811	0.855	1.018	0.813	1.058	0.735	0.654	0.898	0.795	0.615	0.119	0.124
8	0.926	1.035	0.947	0.766	0.785	1.078	0.889	0.897	0.822	0.659	0.115	0.135
9	1.012	1.032	0.757	0.705	0.829	0.606	0.972	0.79	0.948	0.689	0.111	0.131
10	0.831	0.733	1.082	0.906	1.112	0.568	0.969	0.666	0.831	0.522	0.099	0.129
11	1.199	0.581	0.766	0.959	0.801	0.678	0.633	0.746	0.541	0.523	0.113	0.121
12	0.899	0.952	0.765	0.825	0.791	0.696	0.959	0.757	0.623	0.687	0.11	0.121
Promedio	0.897	0.877	0.885	0.838	0.873	0.734	0.817	0.742	0.722	0.584	0.112	0.120
DE	0.144	0.163	0.137	0.094	0.111	0.155	0.149	0.127	0.123	0.070	0.008	0.010
Viabilidad celular (%)	100.028	97.742	98.662	93.432	97.287	81.773	91.063	82.711	80.453	65.050	12.477	13.369
DE (%)	16.006	18.162	15.249	10.491	12.334	17.259	16.630	14.137	13.715	7.795	0.924	1.164

Tabla 104. Resultados de viabilidad celular para MMT 24 h

Repetición	CONTROL	0.252	1.2096	2.52	8.064	16.128	24.192	60.48	141.12	241.92	2400	4850
	Absorbancia											
1	0.773	0.54	0.897	0.637	0.742	0.597	0.885	0.788	0.775	0.75	0.244	0.259
2	0.7	1.028	0.98	0.764	0.455	0.691	0.854	0.805	0.665	0.825	0.247	0.316
3	0.782	0.584	0.945	0.779	0.87	0.86	0.819	0.843	0.842	0.727	0.306	0.351
4	0.751	0.603	0.722	0.507	0.849	0.763	0.879	0.88	0.78	0.73	0.272	0.314
5	0.800	0.627	0.571	0.481	0.848	0.849	0.602	0.738	0.695	0.722	0.299	0.131
6	0.805	0.863	0.867	0.938	0.505	0.761	0.729	0.796	0.794	0.765	0.267	0.159
7	0.666	0.893	0.601	0.853	0.437	0.869	0.799	0.758	0.707	0.84	0.28	0.123
8	0.903	0.789	0.773	0.868	0.894	0.76	0.737	0.726	0.721	0.771	0.302	0.142
9	0.762	0.894	0.733	0.815	0.917	0.789	0.699	0.778	0.736	0.814	0.195	0.13
10	0.821	0.783	0.809	0.781	0.922	0.761	0.677	0.781	0.753	0.781	0.136	0.161
11	0.739	0.741	0.888	0.652	0.803	0.792	0.71	0.825	0.641	0.789	0.158	0.155
12	0.963	1.054	0.89	0.835	0.917	0.809	0.646	0.763	0.748	0.809	0.155	0.136
Promedio	0.789	0.783	0.806	0.743	0.763	0.775	0.753	0.790	0.738	0.777	0.238	0.198
DE	0.081	0.171	0.130	0.143	0.187	0.075	0.093	0.044	0.057	0.040	0.062	0.086
Viabilidad celular (%)	100.000	99.271	102.197	94.106	96.736	98.236	95.437	100.137	93.547	98.469	30.218	25.106
DE (%)	9.610	20.207	15.375	16.959	22.134	8.923	11.019	5.186	6.691	4.710	7.292	10.141

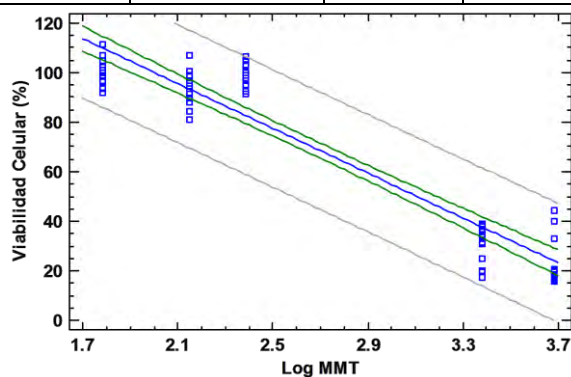
Tabla 105. Resultados de viabilidad celular para MP/MMT 24 H

Repetición	AC-MP/MMT 24 h											
	CONTROL	0.71	3.39	7.06	22.58	45.16	67.74	169.34	395.14	677.38	6720	13580
	Absorbancia											
1	0.568	0.687	0.566	0.606	0.669	0.670	0.694	0.633	0.232	0.126	0.142	0.120
2	0.784	0.708	0.657	0.505	0.521	0.585	0.512	0.463	0.245	0.138	0.127	0.139
3	0.944	0.626	0.597	0.611	0.548	0.449	0.596	0.417	0.217	0.103	0.135	0.132
4	0.507	0.695	0.563	0.563	0.587	0.502	0.421	0.432	0.170	0.109	0.121	0.132
5	0.776	0.615	0.580	0.564	0.533	0.616	0.415	0.535	0.245	0.124	0.112	0.109
6	0.630	0.628	0.599	0.579	0.541	0.556	0.522	0.487	0.236	0.126	0.104	0.134
7	0.542	0.712	0.556	0.579	0.594	0.597	0.681	0.564	0.178	0.121	0.106	0.122
8	0.641	0.627	0.770	0.593	0.706	0.681	0.697	0.569	0.192	0.117	0.119	0.114
9	0.636	0.669	0.740	0.656	0.688	0.701	0.651	0.569	0.196	0.121	0.114	0.120
10	0.591	0.673	0.773	0.538	0.662	0.689	0.688	0.552	0.157	0.126	0.109	0.121
11	0.603	0.628	0.770	0.683	0.742	0.711	0.724	0.512	0.174	0.113	0.102	0.116
12	0.556	0.748	0.727	0.635	0.664	0.663	0.673	0.425	0.204	0.114	0.127	0.108
Promedio	0.648	0.668	0.658	0.593	0.621	0.618	0.606	0.513	0.204	0.120	0.118	0.122
DE	0.126	0.043	0.091	0.050	0.076	0.083	0.111	0.069	0.031	0.009	0.013	0.010
Viabilidad celular (%)	100.026	103.086	101.569	91.461	95.872	95.422	93.544	79.192	31.456	18.493	18.236	18.866
DE (%)	19.424	6.663	14.034	7.678	11.729	12.884	17.128	10.608	4.765	1.437	1.955	1.548

DETERMINACIÓN DE IC50

Tabla 106. Determinación de IC50 de MMT 24 h

Replica	Log MMT	Viabilidad Celular (%)	Log MMT	Viabilidad Celular (%)	Log MMT	Viabilidad Celular (%)	Log MMT	Viabilidad Celular (%)	Log MMT	Viabilidad Celular (%)
1	1.782	99.873	2.150	98.226	2.384	95.057	3.380	30.925	3.686	32.826
2		102.028		84.284		104.563		31.305		40.051
3		106.844		106.717		92.142		38.783		44.487
4		111.534		98.859		92.522		34.474		39.797
5		93.536		88.086		91.508		37.896		16.603
6		100.887		100.634		96.958		33.840		20.152
7		96.071		89.607		106.464		35.488		15.589
8		92.015		91.381		97.719		38.276		17.997
9		98.606		93.283		103.169		24.715		16.477
10		98.986		95.437		98.986		17.237		20.406
11		104.563		81.242		100.000		20.025		19.645
12		96.705		94.804		102.535		19.645		17.237



Coeficiente de Correlación = -0.965193
 R-cuadrada = 93.1597 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 90.8796 por ciento
 Error estándar del est. = 11.569
 Error absoluto medio = 6.90382
 Estadístico Durbin-Watson = 2.38313 (P=0.3981)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.312673

Figura 81. Modelo ajustado a regresión lineal (n=12) para MMT 24 h

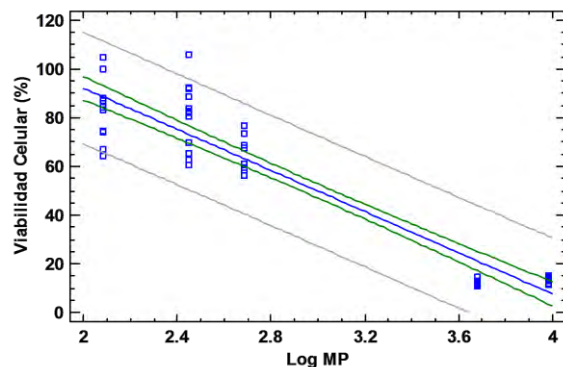
Tabla 107. ANOVA para IC50 de MMT 24

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	65625.9	1	65625.9	477.31	0.0000
Residuo	7974.55	58	137.492		
Total (Corr.)	73600.5	59			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Log MMT y Viabilidad celular con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 93.1597% de la variabilidad en Viabilidad celular (%). El coeficiente de correlación es igual a -0.965193, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. El error estándar del estimado

Tabla 108. Determinación de IC50 de MP 24 h

Replica	Log MP	Viabilidad Celular (%)	Log MP	Viabilidad Celular (%)	Log MP	Viabilidad Celular (%)	Log MP	Viabilidad Celular (%)	Log MP	Viabilidad Celular (%)
1	2.083	86.957	2.451	83.612	2.685	60.870	3.681	12.263	3.987	11.706
2		64.326		80.379		59.309		11.371		11.371
3		74.582		82.832		56.187		13.043		12.152
4		67.224		82.274		56.410		12.040		12.932
5		64.437		65.440		67.336		14.604		13.155
6		105.017		62.542		68.562		12.040		14.270
7		100.111		88.629		68.562		13.266		13.824
8		100.000		91.639		73.467		12.821		15.050
9		88.071		105.686		76.812		12.375		14.604
10		74.247		92.642		58.194		11.037		14.381
11		83.166		60.312		58.305		12.598		13.489
12		84.392		69.454		76.589		12.263		13.489



Coeficiente de Correlación = -0.980262
 R-cuadrada = 96.0915 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 94.7886 por ciento
 Error estándar del est. = 8.04717
 Error absoluto medio = 5.79815
 Estadístico Durbin-Watson = 2.61592 (P=0.5505)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.466617

Figura 82. Modelo ajustado a regresión lineal (n=12) para MP 24 h

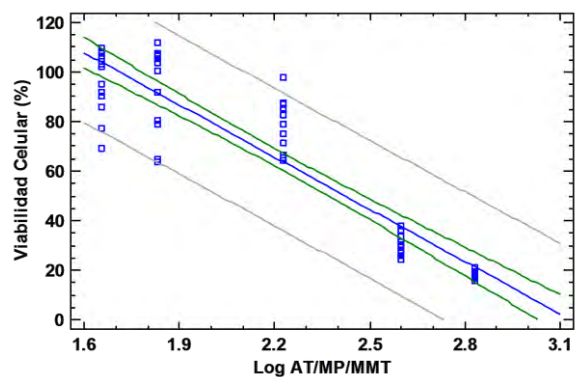
Tabla 109. ANOVA para IC50 de MP 24 h

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	57314.3	1	57314.3	455.90	0.0000
Residuo	7291.51	58	125.716		
Total (Corr.)	64605.8	59			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Log MP y Viabilidad Celular (%) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 96.0915% de la variabilidad en Viabilidad Celular (%). El coeficiente de correlación es igual a -0.980262, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Tabla 110. Determinación de IC50 de MP/MMT 24 h

Replica	Log AT/MP/MT	Viabilidad Celular (%)	Log AT/MP/MT	Viabilidad Celular (%)	Log AT/MP/MT	Viabilidad Celular (%)	Log AT/MP/MT	Viabilidad Celular (%)	Log AT/MP/MT	Viabilidad Celular (%)
1	1.655	103.395	1.831	107.099	2.229	97.685	2.597	35.802	2.831	19.444
2		90.278		79.012		71.451		37.809		21.296
3		69.290		91.975		64.352		33.488		15.895
4		77.469		64.969		66.667		26.235		16.821
5		95.062		64.043		82.562		37.809		19.136
6		85.802		80.556		75.154		36.420		19.444
7		92.130		105.093		87.037		27.469		18.673
8		105.093		107.562		87.809		29.630		18.056
9		108.179		100.463		87.809		30.247		18.673
10		106.327		106.173		85.185		24.228		19.444
11		109.722		111.728		79.012		26.852		17.438
12		102.315		103.858		65.586		31.481		17.593



Coeficiente de Correlación = -0.964224
 R-cuadrada = 92.9728 por ciento
 R-cuadrado (ajustado para g.l.) = 90.6304 por ciento
 Error estándar del est. = 11.058
 Error absoluto medio = 7.0487
 Estadístico Durbin-Watson = 2.14292 (P=0.2488)
 Autocorrelación de residuos en retraso 1 = -0.179888

Figura 83. Modelo ajustado a regresión lineal (n=12) para AT/MP/MMT 24 h

Tabla 111. ANOVA para IC50 de MP/MMT 24 h

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	58241.5	1	58241.5	308.05	0.0000

Residuo	10965.7	58	189.064		
Total (Corr.)	69207.2	59			

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre Log AT/MP/MMT y Viabilidad Celular (%) con un nivel de confianza del 95.0%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo ajustado explica 92.9728% de la variabilidad en Viabilidad celular (%). El coeficiente de correlación es igual a -0.964224, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables.

Tabla 112. Parámetros de regresión lineal de MMT, MP y MP/MMT para 24 h

Sistema	m	b	R	R ²
MMT	- 45.197	190.463	0.965	0.932
MP	-42.240	176.577	0.980	0.961
MP/MMT	-70.170	220.002	0.964	0.930

ANEXO VI. PUBLICACIÓN



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Characterization of hybrid microparticles/Montmorillonite composite with raspberry-like morphology for Atorvastatin controlled release



Perla García-Guzmán^a, Luis Medina-Torres^b, Fausto Calderas^c,
María Josefa Bernad-Bernad^b, Jesús Gracia-Mora^b, Baltasar Mena^d, Octavio Manero^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones en Materiales, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria C.P.04510, Ciudad de México, Mexico

^b Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria C.P.04510, Ciudad de México, Mexico

^c Facultad de Estudios Superiores (FES) Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Campus II Batalla 5 de mayo s/n esq. Fuerte de Loreto, Col. Ejército de Oriente, Iztapalapa C.P. 09230, Ciudad de México, Mexico

^d Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior S/N, Coyoacán, Cd. Universitaria C.P.04510, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 December 2017

Received in revised form 22 March 2018

Accepted 4 April 2018

Available online 9 April 2018

Keywords:

Rheology

Montmorillonite

Hybrid microparticles

Gelatin

Atorvastatin

Drug delivery

ABSTRACT

In this work, we prepared a novel composite based on hybrid gelatin carriers and montmorillonite clay (MMT) to analyze its viability as controlled drug delivery system. The objective of this research involves the characterization of composites formed by structured lipid-gelatin micro-particles (MP) and MMT clay. This analysis included the evaluation of the composite according to its rheological properties, morphology (SEM), particle size, XRD, FT-IR, and *in vitro* drug release. The effect of pH in the properties of the composite is evaluated. A novel *raspberry-like* or *armor* MP/MMT clay composite is reported, in which the pH has an important effect on the final structure of the composite for *ad-hoc* drug delivery systems. For pH values below the isoelectric point, we obtained defined morphologies with entrapment efficiencies up to 67%. The pH level controls the MP/MMT composite release mechanism, restringing drug release in the stomach-like environment. Intended for oral administration, these results evidence that the MP/MMT composite represents an attractive alternative for intestinal-colonic controlled drug delivery systems.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Atorvastatin (AC) ([R-(R), R/]-2-(4-fluorophenyl)-b, d-dihydroxy-5-(1-methylethyl)-3-phenyl-4 [(phenylamino) carbonyl] - 1H-pyrrole-1-heptanoic acid) is widely prescribed as a cholesterol-lowering agent. It belongs to the second generation of statins as a synthetic reversible inhibitor of the microsomal enzyme 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase which catalyzes the rate-limiting step in cholesterol biosynthesis. AC is rapidly absorbed after oral administration, but possesses poor bioavailability (~12%) attributed to instability in stomach acidic medium, crystalline properties, low aqueous solubility and high hepatic first-pass metabolism. Usually an administration of high doses and longtime therapies is necessary, although it is related

to adverse effects particularly rhabdomyolysis, liver abnormalities and kidney failure may be present [1].

Several approaches considered the enhancement of oral bioavailability and water solubility of drugs, including micro and nano-carriers based on polymers, lipids, oils, proteins, polysaccharides, inorganic materials and so on. Various studies with Atorvastatin have reported enhanced oral bioavailability and efficacy, including nanoparticles of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) [2,3], chitosan [4], Eudragit [5] and poly(ϵ -caprolactone) [6] are include.

In the development of new drug carriers, each material provides distinct advantages. However, a strategy to use drug-carriers hybridization involves the design of a new delivery vehicle named lipid-polymer hybrid carrier, which combines the characteristics of polymeric nanoparticles and liposomes [7–11]. With these systems, some studies pointed out the improvement in drug loading capacity, solubility, bioavailability and sustained release to oral administration [10,12]. In addition, clays and polymer blends constitute novel hybrid drug delivery systems also known as

* Corresponding author.

E-mail address: manero@unam.mx (O. Manero).

polymer-clay composites. Clays have an important role in pharmaceutical formulations used as excipients and active agents. Clays may interact with drug molecules and other formulation components such as polymers. The addition of clays can improve polymer properties related to controlled-release systems, namely, swelling, erosion, biodegradation and dissolution. Various mechanisms are involved in the interaction between clays and polymers such as hydrogen-bonding, dipole-dipole interactions, covalent bonding and electrostatic interactions or cation exchange, depending on the polymer type and pH of the medium [13]. Polymer-clay composites are prepared by several methods, in particular: (1) intercalation of polymers from solution; (2) intercalation of polymers from melt; (3) *in situ* intercalative polymerization and (4) template synthesis methods [14].

Montmorillonite (MMT) has become prominent among other clays due to its abundance, environmentally friendliness and well-studied chemistry. MMT is a natural material with high internal surface area, high cation exchange capacity (CEC), high adsorption and swelling ability, low or null toxicity, good biocompatibility and it is a material “generally recognized as safe” (GRAS) by the FDA [15–17]. MMT is a layered hydrate aluminum silicate which belongs to the smectite group of phyllosilicates. The layer thickness of each platelet is in the order of 1 nm and the lateral dimension is approximately 200 nm. These platelets are composed of one Al-octahedral sheet (O) sandwiched between two Si-tetrahedral sheets (T). The triple sheet structure is stacked in layers bound together by van der Waals forces and is referred as 2:1 (T-O-T) layer configuration of tactoids. It possesses a net negative charged face (F) due to isomorphous ionic substitution in the T-O-T structure, compensated by interlayer hydrated cations potentially exchanged by cations and organic molecules. In addition, MMT possesses a pH-dependent charge in their edges (E), with reported isoelectric point (IEP) between 5.0 and 7.0. This allows face-to-face (F-F), edge-to-face (E-F) and edge-to-edge (E-E) interactions leading to formation of different particle associations like “house-of-cards” at pH < 7.0, which are responsible for interesting rheological properties such as its viscosity and viscoelastic response [13,18,19].

On the other hand, due to its negative permanent charge, MMT may be a safe candidate to prepare composites by electrostatic interactions with cationic polymers, like gelatin (GEL). GEL is a biopolymer derived from collagen with ample applications in pharmacy and medicines due to its biodegradability, biocompatibility in physiological environments, low-cost, readily available and low antigenicity. In addition, due to its gel-forming properties, GEL has been extensively studied with relation to the preparation of micro and nanocarriers, including nanoparticles for swelling controlled delivery of chloroquine phosphate [20] and insulin [21]. The inherent cationic property of GEL is due to lysine and arginine residues; [22] thus, GEL shows cationic behavior at pH values below the IEP via protonation of amine groups. GEL properties can be tuned easily by pH, ionic strength and temperature without any additional complex functionalization [23,24]. In the literature, several authors have reported the preparation of GEL/MMT composites for controlled drug delivery such as intercalation of pure GEL chains [13], hydrogel systems [25] and nanoparticles [26]. Nevertheless, it has been reported that the addition of MMT inside GEL carriers reduces the entrapment efficiency and drug loading capacity [17,26,27]. Hence, it is highly recommended to search for composites of various structures keeping high the drug entrapment efficiency and taking advantage of MMT controlled release properties with Atorvastatin (a low water-soluble drug). Since GEL is an amphoteric biopolymer, the interaction with MMT may depend on the pH of the medium for composite preparation and mechanism/rate release. The objective of this research was the preparation of a novel composite of hybrid microparticles (lipid-polymer) and MMT clay and to evaluate the effect of Gastrointestinal tract (GIT) pH conditions on Atorvastatin

controlled release. In addition, measurements of particle size, zeta potential, infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray powder diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and rheological characterization may shed light into the structure-properties relationship of this composite.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Gelatin (type B, gel strength ~225 g Bloom), Lecithin (L- α -Phosphatidylcholine from egg yolk, ~60% TLC), methylene blue, Atorvastatin calcium salt trihydrate (AC) and Montmorillonite clay (Na⁺ MMT) NanoClay Nanomer[®] from Sigma-Aldrich were used as received. Materials included Glutaraldehyde (GA) grade I (25% solution in water) from Merck, regenerate cellulose dialysis bags (MWCS 12–14 kDa) from Spectra/Por, USA, ultrapure water of quality 18.2 M Ω cm at 25.0 \pm 1 $^{\circ}$ C from distilled water with a Barnstead Nanopure diamond system. All buffer solutions were prepared according to the USP30-NF25 and all other reagents and solvents were analytical grade.

2.2. Preparation of lipid-polymer hybrid microparticles (MP)

The lipid-polymer hybrid microparticles (MP) were prepared by the previously reported two-step desolvation method [28,29], with slight modifications as per laboratory conditions. Briefly, GEL (200.0 mg) was dissolved in deionized water (10.0 mL) at 40.0 \pm 1 $^{\circ}$ C. High molecular weight (HMW) GEL chains were precipitated by addition of acetone (10.0 mL) as desolvating agent. The supernatant was discarded and the precipitated HMW GEL was re-dissolved in deionized water (10.0 mL) at 40.0 \pm 1 $^{\circ}$ C. The pH was adjusted to 3.0 \pm 0.1 with HCl 0.2 M. AC (10.0 mg) and lecithin (100.0 mg) were dissolved in methanol (5.0 mL), the resulting AC/lecithin solution was added to the HMW GEL solution drop-wise under constant stirring at 750 rpm. Methanol was evaporated at room conditions for 12 h and acetone (10.0 mL) was added drop-wise under constant stirring to precipitate hybrid MP. Finally, an aqueous solution of Glutaraldehyde (2% v/v, 25 μ L) was added as a cross-linking agent and stirred for 12 h at 750 rpm. The AC loaded MP were centrifuged at 14 000 rpm (Sorvall Biofuge Primo R) during 30 min at room temperature, the supernatant was discarded and the pellet was re-dispersed in deionized water two times. The MP dispersion was freeze-dried at -50.0 \pm 1 $^{\circ}$ C and 0.024 mBar for 48 h (Labconco free zone triad).

2.3. Characterization of lipid-polymer hybrid microparticles (MP)

2.3.1. Entrapment efficiency (EE%)

Entrapment efficiency of AC was determined by mixing the MP dispersion (0.5 mL) with acetone (1.0 mL) and sonicated for 1 h (Cole-Parmer Ultrasonic) at room temperature with a high-frequency output of 42 kHz. The solution was centrifuged at 14 000 rpm for 30 min (Sorvall Biofuge Primo R); the supernatant was analyzed by UV-vis Spectrophotometric method with a S2000 spectrometer using a DT1000 deuterium light source, a SAD500 serial port interface (Ocean Optics, Inc.), with 10 mm path length quartz cuvette (Prolab). Measurements were performed in triplicate at room temperature and the data was presented in mean \pm SD. The entrapment efficiency (Eq. (1)) was calculated as follows:

$$\text{Entrapment Efficiency (\%)} = \frac{\text{Amount of AC in microparticles}}{\text{Total amount of AC}} \quad (1)$$

2.4. Preparation of microparticle/MMT clay composite (MP/MMT)

The MP/MMT composite was prepared by an exfoliation/adsorption from solution and evaporation method previously reported [30] with slight modifications. An amount of MMT clay (50.0 mg) was added to deionized water and adjusted to pH = 3.0 ± 0.1 (2.0 mL) with HCl 0.2 M and sonicated during 30 min (Cole-Parmer Ultrasonic) at room temperature with a high-frequency output of 42 kHz. A fresh MP dispersion (5.0 mL) adjusted to pH = 3.0 ± 0.1 was added dropwise to the MMT clay dispersion and stirred for 1 h at 750 rpm under room conditions. The MP/MMT composite dispersion was verted in a petri dish and air dried at $25.0 \pm 1^\circ\text{C}$ for 12 h.

2.5. Cation exchange capacity (CEC) and surface area (S_{BET}) determination

The CEC determination of MMT clay was made according to the standard test method for methylene blue index of clay (ASTM C 837-81). An amount of clay (2.0 g) was placed in a beaker; deionized water (300.0 mL) was added and sufficient sulfuric acid to bring the pH within 2.5–3.8. After the adjusting the pH, a burette was filled with methylene blue solution (0.1 meq mL^{-1}) added (5.0 mL) to the slurry and stirred for 1–2 min. Finally, a drop of the slurry was placed on a filter paper. The methylene blue solution was added in increments of 1.0 mL under constant stirring, after each addition a drop was added on filter paper. The end point was indicated by the formation of a light blue halo around the drop [31]. The CEC (Eq. (2)) was calculated as follows:

$$\text{CEC} = \frac{E \cdot V}{W} 100 \quad (2)$$

where, CEC is the cation exchange capacity in equivalents 100 g^{-1} of clay, E represents equivalents of methylene blue per milliliter, V represents the milliliters of methylene blue solution required for the titration and W is grams of dry clay.

Brunauer-Emmett-Teller (BET) surface area (S_{BET}) was obtained from N_2 adsorption-desorption isotherms at 77 K measured on a Nova 2200e (QuantaChrome Instruments) after degassing the sample under vacuum for 24 h at $120.0 \pm 1^\circ\text{C}$ for MMT clay raw powder.

2.6. MP, MMT and MP/MMT clay composite characterization

2.6.1. Particle size and zeta potential (ξ)

The hydrodynamic diameter and polydispersity index (PDI) were determined by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Zen3600 (Malvern Instruments) at $25.0 \pm 1^\circ\text{C}$ with 173° backscatter as angle of detection for MP, MMT and MP/MMT composite. MMT (10.0 mg mL^{-1}) was dispersed with magnetic stirring during 30 min, after that the dispersion was sonicated (Cole-Parmer Ultrasonic) with a high-frequency output of 42 kHz during 30 min at room temperature. All measurements were taken in triplicate and the data was presented in mean \pm SD.

Zeta Potential (ξ) of MP, MMT and MP/MMT composite was evaluated by electrophoretic light scattering. The surface charge of MP and MMT was determined with the dispersion ($100.0 \mu\text{L}$) diluted to 1.5 mL with 10.0 mM NaCl solution adjusting the pH to values between 3.0 ± 0.1 and 8.0 ± 0.1 , using HCl 0.2 M or NaOH 0.2 M. The NaCl solution compensated for the conductivity effect resulting from the addition of HCl or NaOH [32]. The Zeta potential of the final MP/MMT composite was evaluated in deionized water. All measurements were taken in triplicate at room temperature and the data was presented in mean \pm SD.

2.6.2. Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy

The MP, MMT clay raw powder and MP/MMT composite were characterized by FT-IR. Transmission infrared spectra were recorded with a FTIR/FIR Spectrum 400 spectrophotometer (Perkin-Elmer). The infrared spectra of the samples were measured over a wavelength range of $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$.

2.6.3. XRD powder diffraction

X-ray powder diffraction (XRD) determinations on powdered MMT clay alone and MP/MMT clay composite, within the scattering angle range of $2\theta\text{--}2\text{--}70$ at the rate of 0.01°s^{-1} . To evaluate the pH effect on the interaction, XRD patterns were recorded in the MP/MMT composite followed by adjusting the pH ± 0.1 to 1.6, 3.0, 5.0, 6.5 and 7.0, using HCl 0.2 M or NaOH 0.2 M. XRD and air dried at room conditions for 12 h. XRD patterns were analyze with software Match! 3[®].

2.6.4. Shape and morphology by scanning electron microscopy (SEM)

The shape and surface morphology were determined by scanning electron microscopy (SEM) (JSM-35 CF, JEOL) with 20 kV. A drop of MP dispersion or MP/MMT composite was deposited, air-dried at room conditions and coated with gold to obtain a conducting surface. Finally, the sample was analyzed under vacuum. The pH effect on morphology was analyzed by SEM in MP/MMT composite prepared at different pH conditions (namely pH = 3.0 ± 0.1 and 7.0 ± 0.1).

2.7. Rheological characterization

Rheological measurements were performed in a stress-controlled model TA Instruments Discovery HR3[®] rheometer using a concentric cylinders geometry (21.96 mm outer diameter, 20.38 mm inner diameter, 59.90 mm height and $500 \mu\text{m}$ gap).

To analyze the pH effect on the rheological behavior, MP and MP/MMT composite were re-suspended in deionized water at $25.0 \pm 1^\circ\text{C}$ (10 mg mL^{-1}), adjusting the pH ± 0.1 to 3.0, 4.8 and 7.0 using HCl 0.2 M or NaOH 0.2 M. Samples were characterized under steady-simple shear flow in the range from 1 to 100 s^{-1} , and under oscillatory flow in the linear viscoelastic regime, previously determined for each experimental conditions ($\gamma < 50\%$) at $37.0 \pm 1^\circ\text{C}$. The angular frequencies (ω) of the tests ranged from 1 to 100 rad/s at $37.0 \pm 1^\circ\text{C}$ (circulating water bath Cole Parmer Polystat and Peltier AR-G2). Both G' (elastic) and G'' (viscous) moduli served to analyze the viscoelastic behavior of the samples. All data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and a value of ($p < 0.05$) was considered statistically significant [33].

2.8. In vitro drug release studies

The drug release profile was measured by the dialysis bag method. An amount of MP or MP/MMT composite was loaded into a pre-swelled dialysis bag. The dialysis assembly was then suspended in release medium (100.0 mL) at $37.0 \pm 1^\circ\text{C}$ in a closed beaker with constant magnetic stirring (250 rpm). The study was carried out using different media to simulate GIT pH conditions considering the effect of food intake on pH and the transit time [34]. For the study in the fasted-state (FAS) the dialysis bag was first soaked in a simulated gastric fluid (SGF), a hydrochloric acid buffer solution pH 1.6 ± 0.1 (FAS-SGF) and kept for 2 h. Then, it was transferred into simulated intestinal fluid (SIF) (100.0 mL) of phosphate buffer solution pH 6.5 ± 0.1 (FAS-SIF) and kept for 6 h. Finally, it was extracted and immersed in simulated colonic fluid (SCF) (100.0 mL), a phosphate buffer solution pH 7.0 ± 0.1 (FAS-SCF) for 40 h. For the fed-state (FED) an acetate buffer solution was used at of pH 5.0 ± 0.1 (FED-SGF), a phosphate buffer solution with pH

of 5.8 ± 0.1 (FED-SIF) and pH of 7.0 ± 0.1 (FED-SCF). At determined time intervals, a volume of the release medium was withdrawn and assayed by UV-vis spectrophotometric method. An equal amount of fresh medium, which was preheated to 37.0 ± 1 °C, was added for compensation after each sample drawing to maintain sink conditions. All the experiments were performed in triplicate and the data was presented in mean \pm SD. A Spectrophotometric (UV) analysis of AC was carried out at wavelength of maximum absorbance ($\lambda_{\text{max}}=243.07$ nm). The analyze was performed in a S2000 spectrometer using a DT1000 deuterium light source, SAD500 serial port interface (Ocean Optics, Inc.) and 10 mm path length quartz cuvette (Prolab). Statistical comparisons were made using one-way analysis of variance (ANOVA). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Data processing used a statistical software program (Statgraphics Centurion® XVII).

The AC release at physiological pH conditions was analyzed to evaluate the release kinetics and mechanism from the MP and MP/MMT clay composite with a semi-empirical equation developed by Korsmeyer (1983) and Peppas (1985) to describe drug release from polymeric systems (Eq. (3)):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (3)$$

Here, M_t/M_∞ is the drug fraction released at time t , k is the release rate constant and n is the release exponent. The value of n was used to characterize different release mechanisms, such that $n=0.5$ corresponds to Fickian diffusion, values of n between 0.5 and 1.0 corresponds to a non-Fickian (anomalous) transport, and $n=1.0$ corresponds to Case II transport (relaxational). Generally, this model was used to analyze the drug release from polymeric formulations when the mechanism is not well known or when more than one type of release mechanism could be involved. The examination of the goodness of fit statistics was made by determination of R-square (R^2) [35].

3. Results and discussion

3.1. Characterization of lipid-polymer hybrid microparticles (MP)

Lipid-polymer hybrid microparticles were prepared by two-step desolvation method, which separate low molecular weight chains (LMW) to achieve uniform size distribution and reproducibility. At pH 3.0 ± 0.1 GEL (IEP=4.8–5.0) protonated lysine residues and a positive charge due to amine groups (NH_3^+) prevented uncontrolled agglomeration of GEL chains. This behavior allowed the interaction with negative charged lecithin, which is a mixture of zwitterionic and anionic phospholipids [28]. The desolvating agent was used to dehydrate GEL molecules and induce conformational stretched-coil changes and precipitation of MP [29]. Finally, GA was used as a cross-linker to further harden and stabilize the MP structure to overcome its rapid dissolution in aqueous media and avoid a fast drug release at body temperature. GA is a well-known crosslinking agent for proteins, reacting easily at room temperature with the concurrent formation of aldimine linkage ($-\text{CH}=\text{N}-$) between free protein amino groups. In addition, it is highly soluble in aqueous solution and a good GEL crosslinking agent (generating inter/intra covalent bonds). Also, GA has been used extensively with GEL to prepare nano-carriers for insulin delivery [21], bone tissue repair scaffolds [36], nanoparticles for oral drug delivery [28,37], intravesical cancer therapy [38] and magnetic targeted drug delivery [39].

3.1.1. Entrapment efficiency (EE%)

Entrapment of hydrophobic drugs in GEL carriers could be explained considering the preferential localization of drug inside the carrier core, which is less hydrophilic than the external aqueous

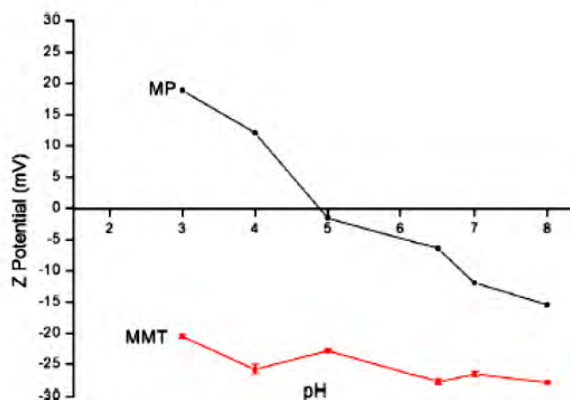


Fig. 1. pH effect on Zeta potential (ξ) for MP and MMT clay.

environment [29]. However, lipid-polymer carriers have been employed successfully for drug delivery of low-water soluble drugs and acid labile nature in biological milieu, for instance Amphotericin B [28] and Resveratrol [12], hence these carriers were selected to load hydrophobic and low-water soluble drug AC. In this work the hybrid MP, formed by lecithin and GEL, enabled the interaction of phospholipids hydrophobic region with AC, and the interaction with GEL through their hydrophilic region. Accordingly, AC can be loaded within the lipid core and stabilized by a GEL coat [28]. The EE determined for MP is $67.30\% \pm 2.65$ ($n=3$), which is higher than that of other reports with AC-PLGA nanoparticle systems (EE 34–37%) [2]. As reported recently, loaded gelatin-stearic acid hybrid nanoparticles possess lower efficiency (EE 18–58%) than that of our systems [40].

3.1.2. Particle size and Zeta potential (ξ)

The average size of MP was 1.42 ± 0.21 μm ($n=3$) with a PDI of 0.27 ± 0.03 . Unimodal size distribution was found with PDI lower than 0.5, which is an evidence of a uniform dispersion. Two-step desolvation method allowed the preparation of AC loaded hybrid MP with desirable size and PDI.

Zeta potential reflects the stability of colloidal dispersions, a high value indicates a high electric charge on the particles surface, leading to strong repellent forces between particles to prevent aggregation. A lower value of zeta potential is related to an eventually aggregation due to Van Der Waal inter-particle attractions [41]. The MP zeta potential was 22.30 ± 0.35 mV (deionized water). The MP surface charge was also evaluated in a pH range from 3.0 ± 0.1 to 8.0 ± 0.1 as shown in Fig. 1. Upon increasing the pH, a decrease in MP zeta potential was measured, confirming that the zeta potential is an inverse function of pH. This indicated that the GEL was present on the particle surface. The positive charge is primarily attributed to predominance of NH_3^+ groups, and the negative charge is due to COO^- groups. The IEP of GEL where the net charge is equal to zero was observed around pH -4.8 ± 0.1 as reported in literature [29,32]. For the MMT clay, zeta potential in deionized water was found at -38.20 ± 0.50 mV ($n=3$) in good agreement with reported data, for instance D. Zadaka et al. reported zeta potential values of Montmorillonite (MMT) from -37 mV to -42 mV [42]. In the dispersion of MMT clay (5 mg mL^{-1}) (see Fig. 1) a slight increase in zeta potential from -27.90 to -20.50 mV was observed as pH decreases. MMT has a negative charge at all pH values, but in acidic environment, an excess of protons create positive edge charges, the density of which decreases with rising pH [43].

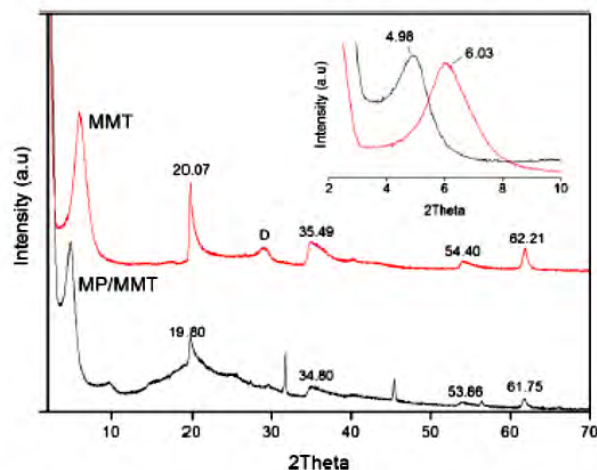


Fig. 2. XRD patterns of MMT and MP/MMT composite prepared at pH 3.0 ± 0.1 .

3.2. Characterization of microparticles/Montmorillonite clay composite (MP/MMT)

There are several of methods to determine CEC, but methylene blue adsorption is faster and widely used. The estimated CEC value of MMT clay raw powder was 75.77 ± 2.39 meq 100 g^{-1} ($n=3$) according to the literature ($70\text{--}130$ meq 100 g^{-1}) [44]. The DLS particle size of MMT dispersion after magnetic stirring amounted $1.9\text{ }\mu\text{m}$, and after sonication it was 478.7 ± 24.38 nm with PDI of 0.391 ± 0.014 ($n=3$), indicating that after the sonication process the MMT was well-dispersed since the particle size was around 500 nm which is a value previously reported [41] and the surface area (S_{BET}) was $54.94\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$. The process of intercalation of polymers chains and colloidal dispersions is well known. The polymer intercalation in MMT clay in aqueous medium is driven by displacement of surface-associated water molecules. But, in our work, the intercalation was performed at pH $\sim 3.0 \pm 0.1$ consisting in the adsorption of negative charged MMT ($\xi = -20.5 \pm 0.30$ mV) on the positive charged MP surface ($\xi = 18.87 \pm 0.25$ mV), and so the process was driven by a strong electrostatic attraction. The preparation of hybrid materials using electrostatic interactions of polymer and inorganic nanoparticles has been previously reported by direct addition method, which consists of mixing both components together to form aggregates of the two oppositely charged materials. After water evaporation, the dispersion re-assembled producing exfoliated/intercalated structures. However, a proportion of the layers may stack again in parallel re-forming the tactoids [45].

In the MP/MMT composite particles the zeta potential diminished ($\xi = 11.10 \pm 0.64$ mV) indicating that hybrid particles were partially covered by the MMT clay. This result corroborates the electrostatic adsorption between MMT clay and MP. In addition, an increase in size to $5.77 \pm 0.60\text{ }\mu\text{m}$ ($n=3$) with a PDI of 0.28 ± 0.03 was observed, which is likely to be caused by the MMT adsorption to the MP leading to the new raspberry-like structure, this increase in particle size indicates the formation of a different structure from MP or MMT alone. Other authors reported similar results with different systems, for instance Xu et al. (2014) mentioned that the particle distributions are broader and the sizes are bigger in composite particles than those of the pure polymer particles, due to the presence of MMT [46].

XRD patterns allowed to investigate the pH effect on the MP/MMT composite preparation (Fig. 2). The Bragg's law $n\lambda = 2d\sin\theta$, where n is a positive integer and λ is the incident wave wavelength was used to calculate the crystallographic space d [44].

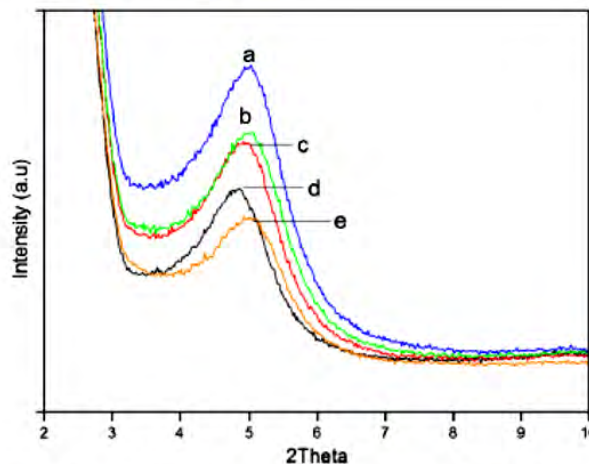


Fig. 3. pH effect on XRD patterns of MP/MMT composite: a-pH 7.0 (2θ 5.05), b-pH 6.5 (2θ 5.03), c-pH 3.0 (2θ 4.98), d-pH 1.6 (2θ 4.69) and e-pH 5.0 (2θ 5.08).

The d_{001} , d_{003} , $d_{020-110}$, $d_{130-200}$, and d_{060} diffractions of the main MMT component were observed at 6.03, 19.80, 34.80 and 61.75 (2θ). Also, a peak from the non-clay component Dolomite (D) was observed at 29.05 (2θ) [44]. MMT reflection at $2\theta = 6.03$ indicated a basal spacing of 14.65 Å, whereas a major shifting to a lower diffraction angle $2\theta = 4.98$ with expansion of basal spacing up to 17.74 Å was observed in the MP/MMT composite. The increase in the basal spacing provided evidence of intercalation of the GEL in the inter-layer space of the clay. Besides, there was a decrease in intensity in the other MMT characteristics reflections [25].

The Fig. 3 illustrates the pH effect (namely pH ± 0.1 –1.6, 3.0, 5.0, 6.5 and 7.0) on the XRD diffraction patterns in MP/MMT composite. The interaction was highlighted by the appearance of the peak around $2\theta = 4.69^\circ$ – 5.08° (d spacing 18.85–17.74 Å) whose d increased as the pH decreased, except for pH values close to IEP. These results may be explained according to the existing interactions of MP surface with MMT clay. It is well known that GEL possesses amphoteric properties, so at pH values of 1.6 ± 0.1 and 3.0 ± 0.1 (pH < IEP), GEL has a positive surface charge due to NH_3^+ groups, interactions with MMT negative faces is promoted, as reflected by an increase in d spacing to 18.85 and 17.74 Å respectively. Moreover, at pH $\sim 6.5 \pm 0.1$ and 7.0 ± 0.1 (pH > IEP) the MP have a negative surface charge due to COO^- groups coordinating with MMT laminae, but with lower interaction level which was reflected in lower increase in d spacing (17.55 and 17.51 Å). At pH > IEP the interaction between GEL and MMT occurs through the pH-dependent edges charge. Moreover, hydrogen bridge interactions between carbonyl groups in GEL and MMT hydroxyl groups also exist. However, at pH 5.0 ± 0.1 (pH \sim IEP) the GEL ionization degree was lower, leading to the lowest increase of d spacing to 17.39 Å. Our results were in general agreement with previous reports and revealed the complex interaction between both materials [30,47,48].

The FT-IR spectra of MP, MP/MMT composite and raw materials allowed to find evidence of interactions, compatibility and crosslinking. The AC spectra is shown in Fig. 4, revealing characteristic peaks of aromatic (N–H) stretching and (C=O) stretching at 3234 cm^{-1} and 1649 cm^{-1} . In addition, peaks at 3365 cm^{-1} from (–OH) and 2972 cm^{-1} of (–CH₃), 1579 cm^{-1} of (C–N) and 1432 cm^{-1} corresponding to (C–C) are observed [6]. The GEL spectra showed the characteristic absorption band for amide A (N–H) as stretching vibration at 3306 cm^{-1} , amide B at 3071 cm^{-1} , 1636 cm^{-1} of (C=O) stretching of amide I and (N–H) bend at 1534 cm^{-1} of amide II [26,49]. The lecithin spectra showed peaks

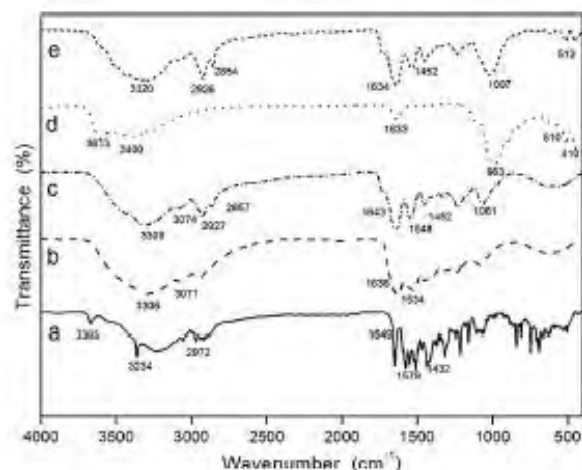


Fig. 4. FT-IR spectra of Atorvastatin (a), gelatin (b), hybrid microparticles (c), Montmorillonite clay (d), and MP/Montmorillonite composite (e).

at 1737 cm^{-1} for the vibrational signal of (C=O) and at 1227 , 1060 and 824 cm^{-1} of (PO_2) [50]. In the AC loaded MP, spectra depicted the characteristics bands of amide A (3307 and 3309 cm^{-1}), amide B (3074 and 3071 cm^{-1}), amide I (1634 cm^{-1}) and amide II (1548 and 1543 cm^{-1}) indicating a major amount of GEL. In addition, the peak observed at 1452 cm^{-1} was due to aldimine (CH=N) absorption, which is a strong evidence indicating the cross-linking in MP [21]. The bands of AC were hidden by the GEL and lecithin bands. The MMT spectra depicted a broad band near to 3400 cm^{-1} due to ($-\text{OH}$) stretching band for interlayer water. The band at 3613 cm^{-1} is due to the ($-\text{OH}$) stretching in ($\text{Al}-\text{Al}-\text{OH}$) and ($\text{Al}-\text{Mg}-\text{OH}$). The characteristic peaks at 1022 , 988 and 403 cm^{-1} corresponds to the ($\text{Si}-\text{O}-\text{Si}$) stretching band. Bands at 693 and 520 cm^{-1} are attributed to ($\text{O}-\text{Si}-\text{O}$) and ($\text{Al}-\text{Si}-\text{O}$) vibrations [44]. In the MP/MMT composite, spectra revealed characteristic bands of GEL

around 3300 and 1634 cm^{-1} from amide A and B, and the characteristic signal of crosslinking aldimine at 1452 cm^{-1} corresponding to MP, in addition to MMT bands around 512 cm^{-1} indicating the composite composition.

3.3. Shape and morphology by scanning electron microscopy (SEM)

The shape and surface morphology were determined by SEM. Fig. 5A illustrates the spherical morphology and smooth surface, without cracks or heterogeneity of the MP sample. The SEM image of MP/MMT composite (Fig. 5B) revealed MMT clay particles randomly adsorbed onto the MP surface, leading to a rough and irregular surface maintaining the spherical shape of the original MP system [26]. The composite depicted a *raspberry-like* or *armor* morphology, consisting in organic cores coated with inorganic particles [51]. This morphology was previously reported in systems such as silver/polypyrrole composites attached to the surface of silica spheres [52] and polystyrene/laponite composites [53]. Despite of the existence of reports on the preparation of GEL/MMT composites for controlled drug delivery, no *raspberry-like* structures have been mentioned so far. Moreover, the addition of MMT inside GEL carriers reduces the entrapment efficiency of drugs [17,26,27]. In our system, this effect can be avoided by the localization of MMT clay on the MP surface preventing fast release and allowing the maximum EE% and drug loading capacity. However, different ratios of MP and MMT clay should be explored in future studies, to evaluate the ratio effect on morphology and drug release more thoroughly.

To evaluate the pH effect on morphology, SEM was performed at pH below the GEL IEP ($\text{pH } 3.0 \pm 0.1$) and above IEP ($\text{pH } 7.0 \pm 0.1$). At $\text{pH } 3.0 \pm 0.1$, Fig. 5C illustrates the afore-mentioned *raspberry-like* structure due to the adsorption of negative permanent charged MMT layers on the MP surface by electrostatic attraction. While at $\text{pH } 7.0 \pm 0.1$, Fig. 5D illustrates that MP preserved their smooth surface, since MP and MMT clay are negatively charged, preventing the adsorption of MMT layers on the MP surface.

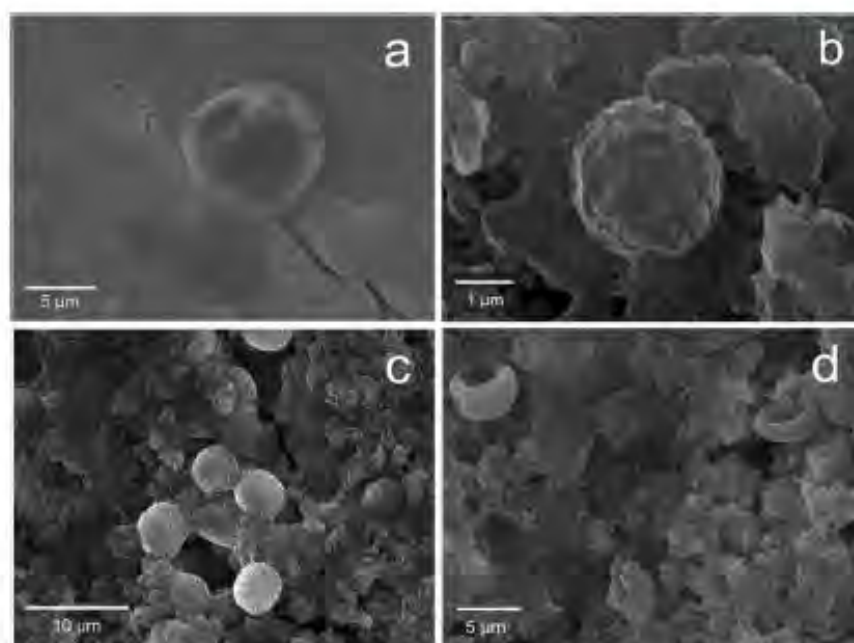


Fig. 5. SEM images of MP (a), MP/MMT composite prepared at $\text{pH } 3.0 \pm 0.1$ (b-c), MP/MMT composite prepared at $\text{pH } 7.0 \pm 0.1$ (d).

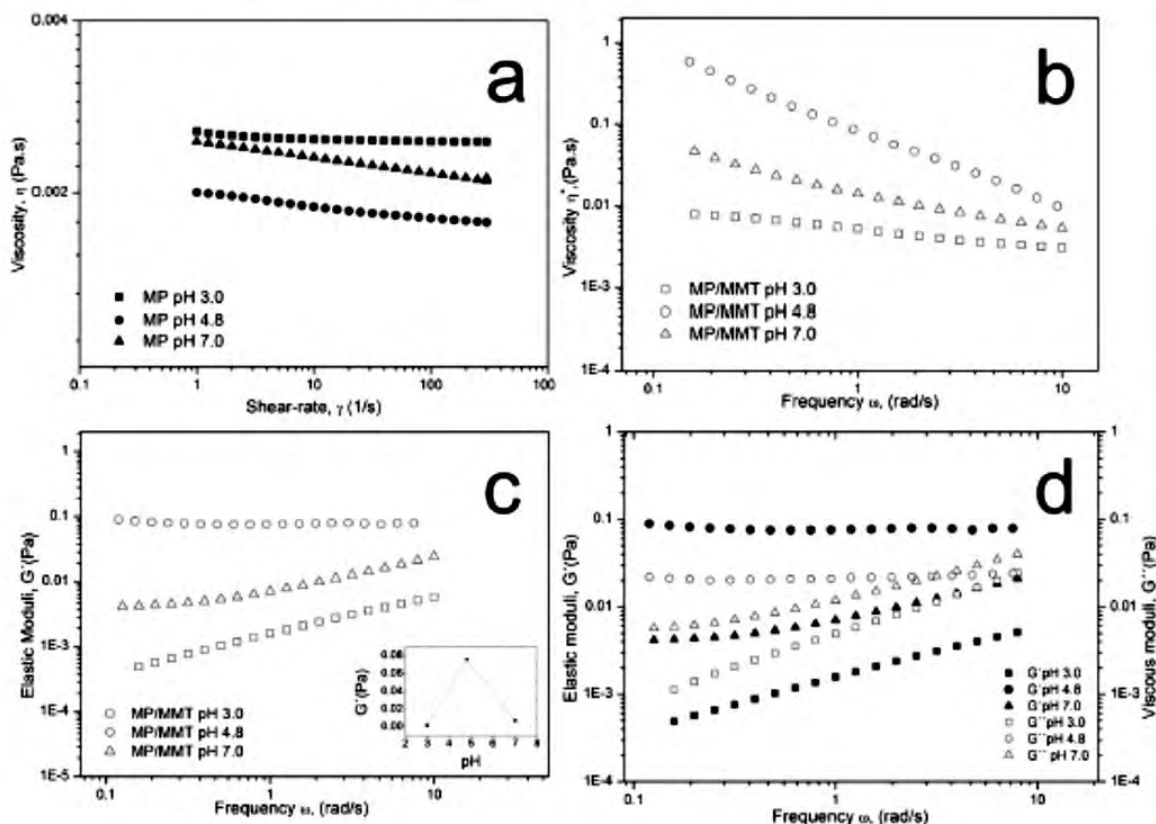


Fig. 6. pH effect (pH = 3.0 (■), 4.8 (●) and 7.0 (▲)) on the rheological behavior of MP (solid symbols) and MP/MMT composite particle-forming solutions (open symbols). MP viscosity vs shear rate (a), MP/MMT complex viscosity vs frequency (b), MP/MMT G' vs frequency (c) and MP/MMT G'/G'' vs frequency (d).

3.4. Rheological characterization

The rheological behavior was analyzed according to the pH in the composite particle forming-solution (CFS). Under steady simple-shear the viscosity (η) depends on pH, being Newtonian in the MP system alone (Fig. 6A) at all pH values. Magnitudes of viscosity amounted to follows: η 3.0 ± 0.1 (pH < IEP) > η 7.0 ± 0.1 (pH > IEP) > η 4.8 ± 0.1 (pH = IEP). At pH values above and below IEP, strong positive or negative charges produced electrostatic repulsion between GEL chains, allowing relaxation and increasing water uptake, with increasing η . The Newtonian behavior stems from the feeble interaction among the spherical particles observed in SEM. However, the addition of clay induced a significant increase in the complex viscosity (η^*) and a change to a non-Newtonian shear thinning behavior ($n < 1$) for MP/MMT system (Fig. 6B), as the complex viscosity decreased with increasing frequency (ω) [54]. The non-Newtonian behavior was caused by the clay which associated to form structures that were susceptible to flow-induced changes. The η^* is pH-dependent, resulting from MP and MMT interactions, with a maximum η^* at pH = IEP. Viscosities follow the order η^* 4.8 ± 0.1 (pH = IEP) > η^* 7.0 ± 0.1 (pH > IEP) > η^* 3.0 ± 0.1 (pH < IEP). These results were agreement to those reported in the literature for similar GEL/MMT systems [48].

The pH-dependent edge charge of MMT allowed for different modes of associations between particles such as face-to-face (F-F), edge-to-edge (E-E) and edge-to-face (E-F). At acidic pH (below IEP), structure formation occurring due to the electrostatic attraction between negatively charged faces and positively charged edges (E-F) appeared. Hence, MMT particles associate in the so called "house-of-cards" structure [55], but this structure was weakened

with positively charged MP. Thus, at pH 3.0 ± 0.1 , the lowest η^* value was corresponded to the less frequency-dependent behavior (Fig. 6B).

Conversely, at high pH values (above IEP), edges and faces of MMT are negatively charged. Here, structure formation was due to the long-range electrostatic repulsion (E-E and F-F). Moreover, at this pH (7.0 ± 0.1) negatively charged hybrid MP appeared, allowing a stronger "house-of-cards" structure, with a large complex viscosity and pronounced frequency-dependent behavior (Fig. 6B). Interactions between MMT and MP revealed a "solid-like" behavior (see Fig. 6C, dominant viscous behavior $G'' > G'$ but with a frequency independent plateau) observed at low frequencies. At IEP (pH 4.8 ± 0.1), hybrid MP are neutral and do not interfere in the MMT particle association. Instead, they allowed (E-F) associations, which lead to the strongest "house-of-cards" structure, observed in Fig. 6B. This structure showed the highest η^* viscosity, as reported elsewhere for similar systems [18,19].

Fig. 6C shows the results of the linear viscoelastic oscillatory tests. The inset depicts the elastic modulus G' ($\omega = 1$ rad/s) as function of pH. G' attains a maximum at IEP (pH = 4.8 ± 0.1) followed by a decrease for pH values far from IEP (pH 3.0 ± 0.1 and 7.0 ± 0.1). These results support pH-dependent elasticity of the MP/MMT composite. At pH = IEP the composite presents a highly elastic structure based on a continuous network ("house-of-cards") which relaxes as the system moves away from IEP [18,19]. It is important to mention that at pH 3.0 ± 0.1 and 7.0 ± 0.1 , the viscous character dominated along the entire range of frequencies ($G'' > G'$), but at pH 4.8 ± 0.1 the elastic character dominated ($G' > G''$) corresponding to a semi-solid behavior (see Fig. 6D).

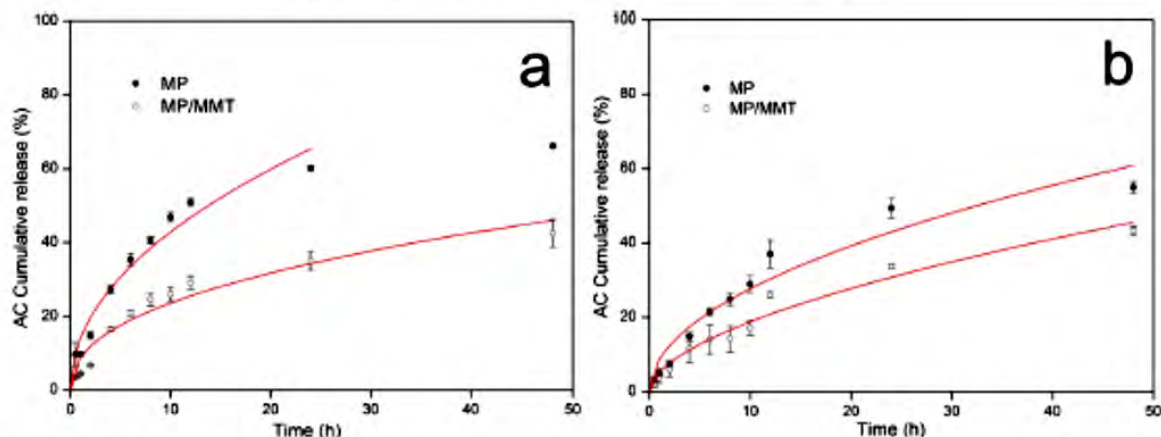


Fig. 7. In vitro release profile of AC from MP and MP/MMT composite in FAS state (a: hybrid microparticles (●), MP/MMT composite (○), mean \pm SD, $n=3$) and FED state (b: hybrid microparticles (●), MP/MMT composite (○), mean \pm SD, $n=3$). Symbols corresponds to experimental data; solid line corresponds to the 60% drug release fitted to Korsmeyer-Peppas model.

3.5. In vitro drug release studies

When formulations are administered orally, they pass through different gastrointestinal regions where they are exposed to different pH conditions. To account for such path, the *in vitro* release of AC was evaluated in various pH media that simulated the GIT environment and transit time at corporal temperature ($37.0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). *In vitro* release profile from MP and MP/MMT composite were examined during 48 h with the dialysis bag method under gastric, intestinal and colonic conditions for both FAS (Fig. 7A) and FED states (Fig. 7B). An immediate release in gastric conditions was retarded, releasing only 14.89% for FAS state ($\text{pH } 1.6 \pm 0.1$) and 5.24% with the FED state ($\text{pH } 5.0 \pm 0.1$) within 2 h. At intestinal condition it can be seen that AC cumulative release was 40.60% for FAS ($\text{pH } 6.5 \pm 0.1$) and 17.84% for FED ($\text{pH } 5.8 \pm 0.1$). The release profile observed at FAS and FED mediums was delayed, after which the release was continuous and in a controlled manner during 48 h. The release profile depicted an initial rapid release period during 12 h, followed by a slower release rate up to 48 h. The biphasic pattern of drug release observed is similar to that reported elsewhere [40]. Moreover, a significant difference ($p < 0.05$) past 48 h occurred, the cumulative% AC release under FAS state ($\text{pH } 7.0 \pm 0.1$) amounted to 66.13%, which is larger and faster than that of the FED state ($\text{pH } 7.0 \pm 0.1$) with 54.99%.

The drug release from GEL carriers involves desorption, diffusion and biodegradation. In addition, crosslinking has been reported to have a significant impact on the drug release rate [29]. When the AC loaded MP are in contact with the release medium, solvent molecules diffuse to the GEL network followed by subsequent relaxation of GEL chains. Therefore, the AC molecules dissolve in the medium and release out through channels. The significant difference ($p < 0.05$) in the FAS and FED profile release of MP may be due to the role of pH in regulating water sorption and swelling of

MP as a function of GEL-IEP. At acidic ($\text{pH} < \text{IEP}$ i.e., 1.6 ± 0.1) or basic ($\text{pH} > \text{IEP}$ i.e., 5.8 ± 0.1 , 6.5 ± 0.1 and 7.0 ± 0.1) swelling increases by electrostatic repulsions, attaining the minimum value at IEP ($\text{pH} \sim \text{IEP}$ i.e., 5.0 ± 0.1) [26]. However, one of the most important effects of clays in polymeric systems is the dramatic improvement of barrier properties. In the MP/MMT composite, delayed releases with respect to the MP alone occurred. The presence of MMT modified the AC release through two basic mechanisms. One is the improvement of the barrier properties by the creation a tortuous path that retards the diffusion of drug molecules from MP and decreasing the solvent uptake. The other limits the swelling behavior of GEL by electrostatic attraction [14,30]. Both MP and MP/MMT composite sustained the release of AC for a long periods (48 h) even in the more extreme pH conditions. This result suggested that the MP/MMT composite allowed the maximum% of AC release in the intestinal and colonic regions where the AC can be absorbed more efficiently.

At $\text{pH} = 1.6 \pm 0.1$ ($\text{pH} < \text{IEP}$) the positively-charged MP surface attracted negatively charged MMT particles, reducing swelling [48]. At $\text{pH} = 5.0 \pm 0.1$ ($\text{pH} \sim \text{IEP}$), the MP surface is neutral resulting in similar values ($p > 0.05$) of cumulative release percentage between MP and MP/MMT composite. Under these conditions, MP drives the AC release, because of poor interactions with MMT. At $\text{pH} = 5.8 \pm 0.1$, 6.5 ± 0.1 and 7.0 ± 0.1 ($\text{pH} > \text{IEP}$) the MP surface is charged negatively, thus reducing the interaction with MMT, allowing the AC release.

The AC release profiles were fitted to the Korsmeyer-Peppas model with a good fit ($R^2 = 0.91-0.97$), and Table 1 summarizes the parameters obtained. The release rate of the composite followed different kinetics depending on the pH release medium, being controlled by interaction between GEL and MMT. A decrease in release rate (k_{KP}) occurred with MMT. Both MP and MP/MMT composite have n -values corresponding to a Fickian diffusion release in

Table 1
AC cumulative release (%) and Korsmeyer-Peppas parameters for MP and MP/MMT composite in FAS and FED conditions, mean \pm SD, $n=3$. (* Statistically significant difference ($p < 0.05$) for FAS, ** and for FED).

PARAMETER	MP FAS	MP/MMT FAS	MP FED	MP/MMT FED
SGF ($n=3$) \pm SD	14.89 \pm 0.89*	6.67 \pm 0.34*	7.26 \pm 1.14	6.02 \pm 1.90
SIF ($n=3$) \pm SD	40.60 \pm 0.95*	22.26 \pm 1.09*	22.54 \pm 1.85**	14.10 \pm 3.62**
SCF ($n=3$) \pm SD	66.13 \pm 0.53*	42.53 \pm 3.71*	54.99 \pm 0.57**	43.29 \pm 1.50**
kKP ($n=3$) \pm SD	15.75 \pm 0.43	7.96 \pm 0.34	7.21 \pm 1.03	4.78 \pm 1.74
n ($n=3$) \pm SD	0.41 \pm 0.005	0.47 \pm 0.02	0.57 \pm 0.04	0.60 \pm 0.12
R^2	0.9140	0.9741	0.9467	0.9483

FAS ($n = 0.41$ and 0.47), since for $\text{pH} < \text{IEP}$ (1.6) and $\text{pH} > \text{IEP}$ (6.5 and 7.0). For FED state an anomalous release (non-Fickian) ($n = 0.57$ and 0.60) appeared, since pH values corresponded to $\text{pH} \sim \text{IEP}$ (5.0) and $\text{pH} > \text{IEP}$ (5.8 and 7.0). In this case, AC release involved a complex mechanism including Fick diffusion and erosion. The slightly increase in n -values for MP/MMT composite with respect to MP alone indicated the increasing restriction in drug release by MMT [56].

These results revealed that the new MP/MMT composite is a good candidate and promising drug release system for controlled intestinal-colonic drug delivery, reducing the AC release in stomach-like environment controlled by the pH of GIT.

4. Conclusions

A novel hybrid lipid-polymer MP/MMT composite with high drug entrapment efficiency (>60%) was prepared and characterized using size and zeta potential, XRD, FT-IR, SEM and rheometry. The degree of interaction between the MMT clay and MP estimated by XRD experiments revealed strong pH-dependency. SEM images depicted a new *raspberry-like* structure with adsorption of MMT on the MP surface caused by electrostatic attraction. Future work on different ratios of MP to MMT to better tune the swelling/release relationship should be considered.

A non-Newtonian behavior is observed ($n < 1$) in MP/MMT composite water dispersions at all pH studied. The complex viscosity (η^*) is pH-dependent, resulting from MP and MMT interactions, with a maximum η^* at pH-IEP. Additionally, at $\text{pH } 3.0 \pm 0.1$ and 7.0 ± 0.1 , the viscous character dominates along the entire frequency range ($G'' > G'$), but at pH of 4.8 ± 0.1 , the elastic character dominates ($G' > G''$) corresponding to a *semi-solid* behavior. Moreover, the storage modulus (G') attains a maximum at IEP ($\text{pH} = 4.8 \pm 0.1$), whereas for pH values far from IEP ($\text{pH } 3.0 \pm 0.1$ and 7.0 ± 0.1), lower values appeared. These results support the pH-dependent elasticity of the MP/MMT composite, and at pH-IEP the composite presents a highly elastic structure based on a continuous network ("*house-of-cards*").

Finally, the MP and MP/MMT systems revealed controlled drug release of AC during 48 h with pH-dependent drug rate and release mechanism. This new composite is a straightforward low-cost and attractive drug delivery system intended for intestinal-colonic controlled release. Future studies will include *in vivo* controlled release experiments and pharmacokinetics evaluation of these systems.

Conflicts of interest

The authors declare that there are not any conflicts of interest regarding this work.

Acknowledgments

This research was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) [grant number 240052 and 235880].

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.020>.

References

[1] M. Anwar, M.H. Warsi, N. Mallick, S. Akhter, S. Gahoi, G.K. Jain, S. Talegaonkar, F.J. Ahmad, R.K. Khar, Enhanced bioavailability of nano-sized chitosan-atorvastatin conjugate after oral administration to rats, *Eur. J. Pharm. Sci.* 44 (2011) 241–249, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2011.08.001>.

[2] A.K. Meena, D.V. Ratnam, G. Chandrabai, D.D. Ankola, P.R. Rao, M.N.V.R. Kumar, Oral nanoparticulate atorvastatin calcium is more efficient and safe in comparison to lipicure in treating hyperlipidemia, *Lipids* 43 (2008) 231–241, <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-007-3142-5>.

[3] Z. Li, W. Tao, D. Zhang, C. Wu, B. Song, S. Wang, T. Wang, M. Hu, X. Liu, Y. Wang, Y. Sun, J. Sun, The studies of PLGA nanoparticles loading atorvastatin calcium for oral administration in vitro and in vivo, *Asian J. Pharm. Sci.* 12 (2017) 285–291, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2016.08.006>.

[4] A.B. Ahmed, R. Konwar, R. Sengupta, Atorvastatin calcium loaded chitosan nanoparticles: in vitro evaluation and in vivo pharmacokinetic studies in rabbits, *Braz. J. Pharm. Sci.* 51 (2015) 467–477, <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502015000200024>.

[5] N. Kumar, S. Chaurasia, R.R. Patel, G. Khan, B. Mishra, Atorvastatin calcium encapsulated eudragit nanoparticles with enhanced oral bioavailability, safety and efficacy profile, *Pharm. Dev. Technol.* 22 (2017) 156–167, <http://dx.doi.org/10.3109/10837450.2015.1108983>.

[6] N. Kumar, S. Chaurasia, R.R. Patel, G. Khan, V. Kumar, B. Mishra, Atorvastatin calcium loaded PCL nanoparticles: development, optimization, in vitro and in vivo assessments, *RSC Adv.* 6 (2016) 16520–16532, <http://dx.doi.org/10.1039/c5ra26674b>.

[7] L. Zhang, L. Zhang, Lipid-Polymer hybrid nanoparticles: synthesis, characterization and applications, *Nano Life* 1 (2010) 163–173, <http://dx.doi.org/10.1142/S179398441000016X>.

[8] L. Zhang, J.M. Chan, F.X. Gu, J.W. Rhee, A.Z. Wang, A.F. Radovic-Moreno, F. Alexis, R. Langer, O.C. Farokhzad, Self-assembled lipid-polymer hybrid nanoparticles: a robust drug delivery platform, *ACS Nano* 2 (2008) 1696–1702, <http://dx.doi.org/10.1021/nm800275r>.

[9] B. Mandal, N.K. Mittal, P. Balabathula, L.A. Thoma, G.C. Wood, Development and in vitro evaluation of core-shell type lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer, *Eur. J. Pharm. Sci.* 81 (2016) 162–171, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.021>.

[10] K. Hadinoto, A. Sundaresan, W.S. Cheow, Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85 (2013) 427–443, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.002>.

[11] B. Mandal, H. Bhattacharjee, N. Mittal, H. Sah, P. Balabathula, L.A. Thoma, G.C. Wood, Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 9 (2013) 474–491, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2012.11.010>.

[12] S. Kumar, P. Sangwan, V. Lather, D. Pandita, Biocompatible PLGA-oil hybrid nanoparticles for high loading and controlled delivery of resveratrol, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 30 (2015) 54–62, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2015.09.016>.

[13] S. Jayrajshin, G. Shankar, Y.K. Agrawal, L. Bakre, Montmorillonite nanoclay as a multifaceted drug-delivery carrier: a review, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 39 (2017) 200–209, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.03.023>.

[14] C. Viseras, C. Aguzzi, P. Cerezo, M.C. Bedmar, Biopolymer-clay nanocomposites for controlled drug delivery, *Mater. Sci. Technol.* 24 (2008) 1020–1026, <http://dx.doi.org/10.1179/174328408X341708>.

[15] US FDA, Evaluation of the Health Aspects of Bentonite and Clay (Kaolin) as Food Ingredients, 1974.

[16] A. Gujari, B.V. Rodriguez, J. Pescador, C. Maeder, G.W. Beall, L.K. Lewis, Factors affecting the association of single- and double-stranded RNAs with montmorillonite nanoclays, *Int. J. Biol. Macromol.* 109 (2018) 551–559, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomac.2017.12.124>.

[17] S. Lal, M. Datta, In vitro prolonged gastric residence and sustained release of atenolol using novel clay polymer nanocomposite, *Appl. Clay Sci.* 114 (2015) 412–421, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2015.06.017>.

[18] J.D.G. Durán, M.M. Ramos-Tejada, F.J. Arroyo, F. González-Caballero, Rheological and electrokinetic properties of sodium montmorillonite suspensions, *J. Colloid Interface Sci.* 229 (2000) 107–117, <http://dx.doi.org/10.1006/jcis.2000.6956>.

[19] F. Karimi, N. Taheri Qazvini, R. Namivandi-Zangeneh, Fish gelatin/Laponite biohybrid elastic coacervates: a complexation kinetics-structure relationship study, *Int. J. Biol. Macromol.* 61 (2013) 102–113, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomac.2013.06.054>.

[20] A.K. Bajpai, J. Choubey, Design of gelatin nanoparticles as swelling controlled delivery system for chloroquine phosphate, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 17 (2006) 345–358, <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-006-8235-9>.

[21] S. Goswami, J. Bajpai, A.K. Bajpai, Designing gelatin nanocarriers as a swellable system for controlled release of insulin: an In-Vitro kinetic study, *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* 47 (2009) 119–130, <http://dx.doi.org/10.1080/10601320903458556>.

[22] R. Hafidz, C. Yaakob, Chemical and functional properties of bovine and porcine skin gelatin, *Int. Food Res. J.* 18 (2011) 813–817.

[23] S.K. Samal, M. Dash, S. Van Vlierberghe, D.L. Kaplan, E. Chiellini, C. van Blitterswijk, L. Moroni, P. Dubruel, Cationic polymers and their therapeutic potential, *Chem. Soc. Rev.* 41 (2012) 7147–7194, <http://dx.doi.org/10.1039/c2cs35094g>.

[24] M. Santoro, A.M. Tataro, A.G. Mikos, Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering, *J. Control. Release* 190 (2014) 210–218, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.014>.

[25] B.D. Kevadiya, S. Rajkumar, H.C. Bajaj, S.S. Chettiar, K. Gosai, H. Brahmabhatt, A.S. Bhatt, Y.K. Barvaliya, G.S. Dave, R.K. Kothari, Biodegradable gelatin-ciprofloxacin-montmorillonite composite hydrogels for controlled drug release and wound dressing application, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 122 (2014) 175–183, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.06.051>.

- [26] M. Sarmah, N. Banik, A. Hussain, A. Ramteke, H.K. Sharma, T.K. Maji, Study on crosslinked gelatin-montmorillonite nanoparticles for controlled drug delivery applications, *J. Mater. Sci.* 50 (2015) 7303–7313, <http://dx.doi.org/10.1007/s10853-015-9287-3>.
- [27] S. Jain, M. Datta, Montmorillonite-PLGA nanocomposites as an oral extended drug delivery vehicle for venlafaxine hydrochloride, *Appl. Clay Sci.* 99 (2014) 42–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2014.06.006>.
- [28] S. Jain, P.U. Valvi, N.K. Swarnakar, K. Thanki, Gelatin coated hybrid lipid nanoparticles for oral delivery of amphotericin B, *Mol. Pharm.* 9 (2012) 2542–2553, <http://dx.doi.org/10.1021/mp300320d>.
- [29] A.O. Elzoghby, Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: reviewing three decades of research, *J. Control. Release* 172 (2013) 1075–1091, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.019>.
- [30] J.P. Zheng, P. Li, Y.L. Ma, K. De Yao, Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. I. Preparation and properties, *J. Appl. Polym. Sci.* 86 (2002) 1189–1194.
- [31] American Society for testing materials, Standard Test Method for Methylene Blue Index of Clay C837–09, 2012.
- [32] S. Azarmi, Y. Huang, H. Chen, S. McQuarrie, D. Abrams, W. Roa, W.H. Finlay, G.G. Miller, R. Löbenberg, Optimization of a two-step desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells, *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9 (2006) 124–132.
- [33] I. Medina-Torres, E.E. García-Cruz, F. Calderas, R.F. González Laredo, G. Sánchez-Olivares, J.A. Gallegos-Infante, N.E. Rocha-Guzmán, J. Rodríguez-Ramírez, Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*), *LWT – Food Sci. Technol.* 50 (2013) 642–650, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.038>.
- [34] M.R.C. Marques, R. Löbenberg, M. Almukainzi, Simulated biological fluids with possible application in dissolution testing, *Dissolution Technol.* 18 (2011) 15–28.
- [35] P. Costa, Modeling and comparison of dissolution profiles, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001) 123–133.
- [36] M. Kazemzadeh, Fabrication of porous hydroxyapatite-gelatin composite scaffolds for bone tissue engineering, *Iran. Biomed. J.* 10 (2006) 215–223.
- [37] M.H. El-Shabouri, Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A, *Int. J. Pharm.* 249 (2002) 101–108.
- [38] Z. Lu, T. Yeh, M. Tsai, J.L. Au, M.G. Wientjes, Paclitaxel-loaded gelatin nanoparticles for intravesical bladder cancer therapy, *Clin. Cancer Res.* 10 (2004) 7677–7684.
- [39] B. Gaihre, M.S. Khil, D.R. Lee, H.Y. Kim, Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and in vitro drug release study, *Int. J. Pharm.* 365 (2009) 180–189, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.08.020>.
- [40] D. Shilpi, V. Kushwah, A.K. Agrawal, S. Jain, Improved stability and enhanced oral bioavailability of atorvastatin loaded stearic acid modified gelatin nanoparticles, *Pharm. Res.* 34 (2017) 1505–1516, <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-017-2173-8>.
- [41] C.H.C. Flaker, R.V. Lourenço, Bittante A.M.Q.B, P.J.A. Sobral, Gelatin-based nanocomposite films: a study on montmorillonite dispersion methods and concentration, *J. Food Eng.* 167 (2015) 65–70, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.11.009>.
- [42] D. Zadaka, A. Radian, Y.G. Mishaal, Applying zeta potential measurements to characterize the adsorption on montmorillonite of organic cations as monomers, micelles, or polymers, *J. Colloid Interface Sci.* 352 (2010) 171–177, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.08.010>.
- [43] E. Tombácz, M. Szekeeres, Colloidal behavior of aqueous montmorillonite suspensions: the specific role of pH in the presence of indifferent electrolytes, *Appl. Clay Sci.* 27 (2004) 75–94, <http://dx.doi.org/10.1016/j.clay.2004.01.001>.
- [44] B. Caglar, B. Afsin, A. Tabak, E. Eren, Characterization of the cation-exchanged bentonites by XRPD, ATR, DTA/TG analyses and BET measurement, *Chem. Eng. J.* 149 (2009) 242–248, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2008.10.028>.
- [45] M.A. Hood, M. Mari, R. Muñoz-Espí, Synthetic strategies in the preparation of polymer/inorganic hybrid nanoparticles, *Materials (Basel)* 7 (2014) 4057–4087, <http://dx.doi.org/10.3390/ma7054057>.
- [46] G.Z. Xu Jingshui, Ke Yangchuan, Qian Zhou, Xianglong Hu, Zijuan Tan, Liyan Yang, Youzhi Song, Yangyang Zhao, Preparation, Structure, and properties of Poly(vinyl acetate-co-methyl methacrylate) Nanocomposite Microspheres with exfoliated Montmorillonite Through using two-stage in situ suspension polymerization, *Polym. Compos.* 35 (2014) 1106–1116, <http://dx.doi.org/10.1002/pc.22758>.
- [47] J.F. Martucci, A. Vázquez, R.A. Ruseckaitė, Nanocomposites based on gelatin and montmorillonite: morphological and thermal studies, *J. Therm. Anal. Calorim.* 89 (2007) 117–122, <http://dx.doi.org/10.1007/s10973-006-7454-0>.
- [48] P. Li, J.P. Zheng, Y.L. Ma, K. De Yao, Gelatin/montmorillonite hybrid nanocomposite. II. swelling behavior, *J. Appl. Polym. Sci.* 88 (2003) 322–326.
- [49] J.G. Borges, A.G. Silva, C.M. Cervi-Bitencourt, F.M. Vanin, R.A. Carvalho, Lecithin, gelatin and hydrolyzed collagen orally disintegrating films: functional properties, *Int. J. Biol. Macromol.* 86 (2016) 907–916, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomac.2016.01.089>.
- [50] J.M. Nzei, A. Proctor, Determination of phospholipids in vegetable oil by fourier transform infrared spectroscopy, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 1281–1289.
- [51] M. Agrawal, S. Gupta, M. Stamm, Recent developments in fabrication and applications of colloid based composite particles, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 615–627, <http://dx.doi.org/10.1039/c0jm02631j>.
- [52] T. Yao, C. Wang, J. Wu, Q. Lin, H. Lv, K. Zhang, K. Yu, B. Yang, Preparation of raspberry-like polypyrrole composites with applications in catalysis, *J. Colloid Interface Sci.* 338 (2009) 573–577, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2009.05.001>.
- [53] Y.J. Kim, Y.D. Liu, H.J. Choi, S.J. Park, Facile fabrication of Pickering emulsion polymerized polystyrene/laponite composite nanoparticles and their electrorheology, *J. Colloid Interface Sci.* 394 (2013) 108–114, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2012.12.040>.
- [54] M.F. Coronado-Jorge, C.H. Caicedo Flaker, S.F. Nassar, L.C.F. Moraes, A.M.Q.B. Bittante, P.J. Do Amaral Sobral, Viscoelastic and rheological properties of nanocomposite-forming solutions based on gelatin and montmorillonite, *J. Food Eng.* 120 (2014) 81–87, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.07.007>.
- [55] E. Günster, S. İççi, N. Öztekin, F.B. Erim, Ece Ö.J, N. Güngör, Effect of cationic surfactant adsorption on the rheological and surface properties of bentonite dispersions, *J. Colloid Interface Sci.* 303 (2006) 137–141, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2006.07.021>.
- [56] R.A. Bini, M.F. Silva, L.C. Varanda, M.A. da Silva, C.A. Dreiss, Soft nanocomposites of gelatin and poly(3-hydroxybutyrate) nanoparticles for dual drug release, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 157 (2017) 191–198, <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.051>.