



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Desarrollo y caracterización de un parche de microagujas con nanopartículas de magnetita y base de laponita para administración ocular

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

QFB Adriana Azeneth Ortega Romero

Tutora: Dra. María Josefa Bernad Bernad  
Facultad de Química, Departamento de Farmacia, UNAM

Ciudad de México, Marzo, 2023



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.

## Jurado asignado

- Presidente:** Dr. David Quintanar Guerrero
- Vocal:** Dra. América Rosalba Vázquez Olmos
- Vocal:** Dr. José Juan Escobar Chávez
- Vocal:** Dr. Jorge Esteban Miranda Calderón
- Secretario:** Dr. Gerardo Leyva Gómez

## Asesora

Dra. María Josefa Bernad Bernad

**Sustentante:** Ortega Romero Adriana Azeneth

### *Sitio donde se desarrolló el tema:*

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Química, Edificio F-1, Departamento de Farmacia, Laboratorio de sistemas de liberación de fármacos.

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Facultad de Química, Edificio B, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Laboratorio 100.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Química, por su formación y las herramientas provistas para mi crecimiento personal y profesional.

Al Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante mis estudios de maestría, con el número de becario: 1101037.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo económico brindado para la presentación de este trabajo en el congreso “International Conference on Polymers and Advanced Materials POLYMAT-2022” en Huatulco, Oaxaca, México llevado a cabo del 16 al 21 de octubre del 2022.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) por el apoyo PAPIIT IT201518 “Síntesis y caracterización de sistemas nanohíbridos superparamagnéticos con posible aplicación en el tratamiento del cáncer”.

A mi asesora, la Dra. María Josefa Bernad Bernad, por su confianza en mi capacidad para llevar a cabo este proyecto, su apoyo y por el tiempo compartido desde licenciatura.

Al Dr. Jesús Gracia Mora, por sus recomendaciones respecto al proyecto y aportaciones para mi crecimiento desde mi licenciatura.

A los miembros del jurado, por el tiempo invertido en la revisión de esta tesis, por valiosas aportaciones para la mejora de esta y compartirme sus conocimientos.

A la Mtra. Leticia Antonio Gutiérrez, por ser un apoyo incomparable, por compartir conmigo sus conocimientos, experiencia, consejos y parte de su tiempo cuando fue necesario. Así como ser una referencia importante desde que me integre al grupo de trabajo hasta la fecha.

Al Mtro. Ramón Andrés Pineda Alvarez y a la Dra. Sandra Lucia Ramírez Rave por las experiencias y tiempo compartido en estos dos años.

Al grupo de trabajo del laboratorio 307, por permitirme el uso de su propela y centrifuga fundamentales para la realización de este trabajo.

A mi familia, mi pareja y, en especial, al f.d. Sully Ortega, por ser un soporte importante durante todo este periodo.





## ÍNDICE

<b>1 Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Introducción</b> .....	<b>2</b>
<b>3 Marco teórico</b> .....	<b>3</b>
3.1 El ojo.....	3
3.1.1 <i>Parpados y Conjuntiva</i> .....	4
3.1.2 <i>Aparato nasolagrimon</i> .....	4
3.1.2.1 <i>Película lagrimon</i> .....	5
3.1.3 <i>Túnica externa o fibrosa (córnea y esclera)</i> .....	5
3.1.3.1 <i>Córnea</i> .....	5
3.1.3.2 <i>Esclera o Esclerótica</i> .....	5
3.1.4 <i>Túnica media o vascular (iris, cuerpo ciliar y coroides)</i> .....	6
3.1.4.1 <i>Iris</i> .....	6
3.1.4.2 <i>Cuerpo ciliar</i> .....	6
3.1.4.3 <i>Coroides</i> .....	7
3.1.5 <i>Túnica interna o Retina</i> .....	7
3.1.6 <i>Humor vítreo</i> .....	7
3.2 Microagujas .....	7
3.3 Nanopartículas superparamagnéticas de hierro (SPIONs) .....	9
3.3.1 <i>Magnetita</i> .....	10
3.3.1.1 <i>Superparamagnetismo</i> .....	11
3.4 Laponita .....	13
<b>4 Antecedentes</b> .....	<b>14</b>
4.1 Sistemas farmacéuticos para la administración ocular .....	14
4.1.1 <i>Microagujas para uso intraocular</i> .....	16
4.1.2 <i>Uso de nanopartículas magnéticas en la administración ocular</i> .....	17
4.2 Laponita como un material de uso biomédico .....	19
4.2.1 <i>Laponita en administración ocular</i> .....	19
4.2.2 <i>Laponita en conjunción con nanopartículas magnéticas</i> .....	20

<b>5 Planteamiento del problema</b> .....	<b>21</b>
<b>6 Hipótesis</b> .....	<b>22</b>
<b>7 Objetivos</b> .....	<b>22</b>
7.1 Objetivo general.....	22
7.1.1 <i>Objetivos particulares</i> .....	22
<b>8 Materiales</b> .....	<b>23</b>
<b>9 Metodología</b> .....	<b>23</b>
9.1 Estudio del sistema intercalado Laponita/Magnetita (L/M).....	23
9.1.1 <i>Síntesis del sistema L/M</i> .....	23
9.1.2 <i>Optimización del tamaño de cristalito de la magnetita en el sistema L/M</i> .....	24
9.1.2.1 <i>Diseño de experimentos para el sistema L/M</i> .....	24
9.1.2.2 <i>Determinación del tamaño de las nanopartículas dentro de L/M</i> ....	26
9.2 Caracterización del sistema L/M.....	27
9.2.1 <i>Espectroscopia de Infrarrojo</i> .....	28
9.2.2 <i>Difracción de Rayos X de polvos</i> .....	28
9.2.3 <i>Dispersión dinámica de Luz</i> .....	28
9.2.4 <i>Análisis Térmico</i> .....	29
9.2.4.1 <i>Calorimetría diferencial de Barrido</i> .....	29
9.2.4.2 <i>Termogravimetría</i> .....	29
9.2.5 <i>Microscopia electrónica de Barrido (SEM)</i> .....	29
9.2.5.1 <i>Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos</i> <i>(EDS)</i> .....	30
9.2.6 <i>Microscopia electrónica de transmisión (TEM)</i> .....	30
9.2.7 <i>Isotermas de adsorción de N<sub>2</sub></i> .....	30
9.3 Estudio de las películas formadoras del parche .....	31
9.3.1 <i>Proceso de fabricación de las películas a base de alginato</i> .....	31
9.3.2 <i>Optimización del módulo de Young de las películas a base de alginato</i> .....	32
9.3.2.1 <i>Diseño de experimentos para las películas de alginato</i> .....	32

9.3.2.2 Pruebas de tensión.....	34
9.4 Caracterización de la película optimizada .....	34
9.4.1 Descripción física, grosor y peso.....	35
9.4.2 Microscopia electrónica de Barrido.....	35
9.4.2.1 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos (EDS).....	35
9.4.3 Espectroscopia de Infrarrojo .....	35
9.4.4 Análisis térmicos.....	36
9.4.4.1 Calorimetría diferencial de Barrido .....	36
9.4.4.2 Termogravimetría.....	36
9.4.4.3 Pérdida por secado.....	36
9.4.5 Desintegración.....	36
9.4.6 Hinchamiento.....	37
9.4.6.1 pH superficial.....	37
9.4.7 Degradación.....	38
9.4.8 Permeabilidad al vapor.....	38
9.4.9 Propiedades mecánicas –Determinación del módulo de Young.....	39
9.5 Fabricación del parche con microagujas .....	39
9.5.1 Fabricación del molde hembra de microagujas.....	39
9.5.2 Fabricación del parche con microagujas .....	42
9.6 Caracterización del parche con microagujas .....	43
9.6.1 Microscopia electrónica de Barrido.....	43
9.6.1.1 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos (EDS).....	43
9.6.2 Uniformidad de contenido de magnetita en el parche .....	43
<b>10 Resultados .....</b>	<b>45</b>
10.1 Estudio del sistema intercalado Laponita/Magnetita (L/M) .....	45
10.1.1 Síntesis del sistema L/M.....	45
10.1.2 Optimización del tamaño de cristalito.....	47
10.2 Caracterización del Sistema L/M .....	50

10.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo .....	50
10.2.2 Difracción de rayos X de polvos .....	51
10.2.3 Dispersión dinámica de Luz .....	53
10.2.4 Análisis térmico.....	55
10.2.4.1 Calorimetría diferencial de barrido.....	55
10.2.4.2 Termogravimetría.....	56
10.2.5 Microscopia electrónica de barrido .....	58
10.2.5.1 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos (EDS).....	60
10.2.6 Microscopia electrónica de transmisión.....	64
10.2.7 Adsorción de N <sub>2</sub> .....	68
10.3 Estudio de las películas formadoras del parche .....	69
10.3.1 Proceso de fabricación de las películas de alginato .....	69
10.3.2 Optimización del módulo de Young de las películas a base de alginato. .....	72
10.4 Caracterización de la película optimizada y formulaciones derivadas. ....	75
10.4.1 Descripción física, grosor y peso.....	75
10.4.2 Microscopia electrónica de Barrido.....	77
10.4.2.1 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos (EDS).....	80
10.4.3 Espectroscopia de Infrarrojo .....	83
10.4.4 Análisis térmicos.....	85
10.4.4.1 Calorimetría diferencial de barrido.....	85
10.4.4.2 Termogravimetría.....	87
10.4.4.3 Pérdida por secado.....	89
10.4.5 Desintegración.....	90
10.4.6 Hinchamiento.....	91
10.4.7 pH superficial.....	94
10.4.8 Degradación .....	94
10.4.9 Permeabilidad al vapor.....	97
10.4.10 Propiedades Mecánicas – Determinación del módulo de Young .....	99

10.5 Fabricación del parche con microagujas .....	101
10.6 Caracterización del parche con microagujas .....	103
10.6.1 Microscopia electrónica de barrido .....	103
10.6.1.1 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos (EDS).....	105
10.6.2 Uniformidad de contenido de la magnetita en el parche .....	107
<b>11 Conclusiones .....</b>	<b>109</b>
<b>12 Perspectivas .....</b>	<b>110</b>
<b>13 Anexo .....</b>	<b>111</b>
13.1 Anexo 1. Difractogramas de los sistemas L/M sintetizados en el diseño de experimentos, el resultado de refinamiento y el ajuste gaussiano para las señales predominante de magnetita usadas para el cálculo de tamaño de cristalito. ....	111
13.2 Anexo 2: Resultados del análisis estadístico del diseño de experimentos para el sistema L/M.....	125
13.3 Anexo 3: Gráficas de perfil para la determinación de la distancia interplanar de las fases presente en la figura 23a. ....	126
13.4 Anexo 4: Gráficas de perfil para la determinación de la distancia interplanar de las fases presente en la figura 23b. ....	129
13.5 Anexo 5: Gráficas de deformación vs. Esfuerzo de las películas parte del diseño de experimentos. ....	131
13.6 Anexo 6: Estadísticos para el diseño de diseño de experimentos para las películas formadoras de microagujas. ....	134
13.7 Anexo 7. Curvas de calibración de calibración de Fe <sup>3+</sup> coordinado con Cl <sup>-</sup> .....	136
<b>14 Referencias .....</b>	<b>138</b>

## Índice de Tablas

Tabla 1. Lista de diferentes clasificaciones y correspondientes categorías para las microagujas .....	8
Tabla 2. Propiedades de la magnetita. Adaptado de Niculescu, A. et al., 2022 <sup>52</sup> ..	11
Tabla 3. Factores y niveles estudiados en el diseño de experimentos para la optimización del tamaño de cristalito de la magnetita .....	25
Tabla 4. Orden de experimentos realizados para la optimización del tamaño de cristalito de la magnetita .....	26
Tabla 5. Fases inorgánicas identificadas y usadas en el refinamiento de Rietveld	27
Tabla 6. Parámetros para experimentos de DLS .....	29
Tabla 7. Factores y niveles evaluados en el diseño de experimentos.....	33
Tabla 8. Orden de experimentos y condiciones de los mismos dentro del diseño de experimentos .....	33
Tabla 9. Resultado de tamaño, polidispersidad y potencial Z .....	54
Tabla 10. Formulación general de las películas evaluadas .....	69
Tabla 11. Formulaciones derivadas del diseño de experimentos .....	74
Tabla 12. Descripción de la apariencia y resultados de peso y grosor de las películas fabricadas.....	76
Tabla 13. Resultados de la pérdida por secado porcentual. ....	89
Tabla 14. Tiempo de desintegración de las películas .....	90
Tabla 15. pH superficial de las películas .....	94
Tabla 16. Resultados de cuantificación de Fe <sup>3+</sup> determinada y magnetita calculada. ....	107
Tabla 17. ANOVA para el modelo cuadrático .....	125
Tabla 18. Ecuación del modelo cuadrático sobre valores codificados .....	125
Tabla 19. Estadísticos del modelo cuadrático.....	125
Tabla 20. ANOVA para el modelo cuadrático .....	134
Tabla 21. Tabla de estadísticos para el modelo cuadrático .....	134
Tabla 22. Ecuación del modelo cuadrático con factores codificados .....	135

## Índice de Figuras

Figura 1. Diagrama anatómico del ojo <sup>9</sup> .....	3
Figura 2. Estructura de la magnetita. Imagen tomada de Friák, M. et al. , 2007 <sup>48</sup> . 10	
Figura 3. a) Esquema de un material magnético en bulto y b) Relación entre el diámetro de partícula y la coercitividad .....	11
Figura 4. Curvas de magnetización ejemplificando distintos comportamientos. ...	12
Figura 5. Representación esquemática de la estructura de la laponita. Imagen adaptada de Liu, G. et al., 2020 <sup>59</sup> .....	13
Figura 6. Proceso general de síntesis del sistema L/M. Realizado en BioRender	24
Figura 7. Diagrama de Ishikawa sobre las variables que afectan el tamaño de cristalito.....	25
Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de fabricación de las películas .....	31
Figura 9. Diagrama de Ishikawa sobre la fabricación del parche de microagujas .	32
Figura 10. Fabricación del molde hembra de microagujas a) adaptación del instrumento universal de prueba para indentación de la base, b) fotografía del molde hembra posterior a la perforación, c) vista transversal de las cavidades del molde, d) vista superior y acercamiento a una de las cavidades formadas en el molde hembra.....	41
Figura 11. Modelo del parche con microagujas y sistema L/M. Creado en BioRender .....	42
Figura 12. Muestras húmedas (superior) y secas (inferior) a concentración de laponita de a) 2% b) 1% y c) 0.5% con una concentración de Fe <sup>3+</sup> de 0.3 M.....	46
Figura 13. Gráfica de superficie respuesta para el tamaño de partícula/cristalito de la magnetita en el sistema LM.....	48
Figura 14. Espectro de infrarrojo de Laponita (negro), Sistema L/M (rojo), mezcla física (azul) y magnetita (verde). .....	50
Figura 15. Difractograma de la laponita (negro), sistema L/M (rojo) y magnetita (azul) .....	52
Figura 16. Bandas principales de la magnetita (izquierda) y sistemas LM tras refinamiento (derecho) con el respectivo ajuste gaussiano.....	53



Figura 17. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido del sistema L/M, mezcla física, laponita y magnetita. ....	55
Figura 18. Termograma de la laponita, magnetita y sistema L/M con respecto a, que corresponde la pérdida porcentual de peso (izquierda) y la primera derivada con respecto de esta con respecto al tiempo (derecha) .....	57
Figura 19. Imágenes de SEM de laponita ( a ) y b ) , sistema L/M ( c ) y d ) ) y magnetita ( e ) y f ) ) a dos distintos aumentos. ....	59
Figura 20. Resultados del análisis cuantitativo elemental por EDS de a) Laponita, b) sistema L/M y c) magnetita. ....	61
Figura 21. Distribución de los elementos indicativos de magnetita y laponita en el sistema L/M .....	63
Figura 22. Microscopias y distribución de tamaño con ajuste gaussiano de magnetita (a y c) y del sistema L/M (b y d) .....	64
Figura 23. Microscopias de a) magnetita y b) sistema L/M mostrando la distancia interplanar .....	66
Figura 24. Imagen obtenida por TEM de la laponita.....	67
Figura 25. Gráficas de adsorción/desorción de N <sub>2</sub> .....	68
Figura 26. Estructura de caja de huevo entre sales de alginato y cationes de calcio. Imagen traducida de Zhang, X. et al <sup>157</sup> .....	70
Figura 27. Mecanismo de formación de películas a partir de disoluciones poliméricas .....	71
Figura 28. A) Gráfica de superficie-respuesta y b) contornos para la optimización del módulo de Young con el factor de cantidad de cloruro de calcio fijado en 5mg ....	73
Figura 29. Fotografía de las películas a) base, b) con agente osmótico y c) optimizada.....	75
Figura 30. Imágenes de SEM a un menor (izquierda) y mayor (derecha) aumento de las películas fabricadas donde a) y b) es la película base, c) y d) película con agente osmótico sin intercalador y e) y f) películas con agente osmótico e intercalador (formulación optimizada).....	79
Figura 31. a) Microscopia, b)) análisis elemental y c) distribución elemental de elementos característicos estudiados en la película base .....	80

Figura 32. a) Microscopia, b)) análisis elemental y c) distribución elemental de elementos característicos estudiados en la película con agente osmótico .....	81
Figura 33. a) Microscopia, b)) análisis elemental y c) distribución elemental de elementos característicos estudiados en la película con agente osmótico y agente intercalador (formulación optimizada). .....	83
Figura 34. Espectro de infrarrojo de las películas fabricadas (superior) y acercamiento a la región de 700 a 600 $\text{cm}^{-1}$ (inferior) .....	84
Figura 35. Termogramas obtenidos por DSC de las películas fabricadas .....	86
Figura 36. Termogravimetría (Superior) y Primer derivada con respecto al tiempo (Inferior) de la pérdida de peso de las películas fabricadas .....	88
Figura 37. Cinética de hinchamiento.....	92
Figura 38. Proceso de disolución e hinchamiento en un polímero con (inferior) y sin entrecruzamiento (superior) .....	93
Figura 39. Cinética de degradación de las películas .....	95
Figura 40. Permeabilidad al vapor a distintos tiempos .....	97
Figura 41. Gráfica de esfuerzo vs. Deformación .....	100
Figura 42. Módulo de Young calculado al 0.2% de deformación .....	101
Figura 43. Fotografías de parches con microagujas.....	102
Figura 44. Microscopias a distintas regiones de un mismo parche con microagujas .....	104
Figura 45. Imágenes de diferentes microagujas ( a, b, c) obtenidas por SEM (1) y sus respectivos mapeos de hierro (2) .....	106
Figura 46. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 1.1 y temperatura = 75°C (1). Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.....	112
Figura 47. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 2 y temperatura = 90°C. Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	113
Figura 48. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 0.2 y temperatura = 75°C. Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	114

Figura 49. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: $L/M = 1.1$ y temperatura = $75^{\circ}\text{C}$ (2). Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	115
Figura 50. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: $L/M = 1.1$ y temperatura = $60^{\circ}\text{C}$ . Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	116
Figura 51. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: $L/M = 2$ y temperatura = $75^{\circ}\text{C}$ . Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	117
Figura 52. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: $L/M = 0.2$ y temperatura = $90^{\circ}\text{C}$ . Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	118
Figura 53. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: $L/M = 0.2$ y temperatura = $60^{\circ}\text{C}$ . Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	119
Figura 54. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: $L/M = 1.1$ y temperatura = $75^{\circ}\text{C}$ (3). Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	120
Figura 55. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: $L/M = 1.1$ y temperatura = $75^{\circ}\text{C}$ (4). Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	121
Figura 56. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: $L/M = 1.1$ y temperatura = $75^{\circ}\text{C}$ (5). Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	122
Figura 57. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: $L/M = 2$ y temperatura = $60^{\circ}\text{C}$ . Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	123
Figura 58. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: $L/M = 1.1$ y temperatura = $90^{\circ}\text{C}$ . Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita. ....	124
Figura 59. Gráfica de perfil para el plano (220), distancia promedio: $0.296\text{nm}$ ...	126

Figura 60. Gráfica de perfil para el plano (311)-magnetita, distancia promedio: 0.2531nm .....	126
Figura 61. Gráfica de perfil para el plano (311)-magnetita, distancia promedio: 0.2533nm .....	127
Figura 62. Gráfica de perfil para el plano (222)-magnetita, distancia promedio: 0.2459nm .....	128
Figura 63. Gráfica de perfil para el plano (311)-maghemita, distancia promedio: 0.2515nm .....	128
Figura 64. Gráfica de perfil para el plano (311)-magnetita, distancia promedio: 0.2544nm .....	129
Figura 65. Gráfica de perfil para el plano (222)-magnetita, distancia promedio: 0.2438nm .....	129
Figura 66. Gráfica de perfil para el plano (220)-magnetita, distancia promedio: 0.2952nm .....	130
Figura 67. Gráficas Esfuerzo vs. deformación .....	131
Figura 68. Gráficas Esfuerzo vs. deformación (continuación) .....	132
Figura 69. Gráficas Esfuerzo vs. deformación (continuación) .....	133
Figura 70. Curva de calibración promedio de $Fe^{3+}$ .....	136
Figura 71. Curva de calibración $Fe^{3+}$ , día 1 .....	136
Figura 72. Curva de calibración $Fe^{3+}$ , día 2 .....	137
Figura 73. Curva de calibración de $Fe^{3+}$ , día 3 .....	137

## 1 Resumen

La administración de fármacos al ojo se ve obstaculizada por su gran hermeticidad, así como los mecanismos de limpieza y drenado presentes en este órgano. Derivado de los retos que presenta la administración de fármacos dirigidos al ojo, el presente trabajo consistió en el desarrollo y caracterización de un parche con microagujas a partir de una formulación híbrida, cargadas con magnetita intercalada en laponita. Las nanopartículas magnéticas se sintetizaron por el método de coprecipitación en presencia de laponita como agente estabilizador. El producto fue separado por decantación magnética, lavado con agua desionizada y secado al vacío. Este fue analizado por medio de difracción de rayos X de polvos, la aportación de la magnetita fue determinada por medio de la realización de refinamientos de Rietveld y el tamaño de cristalito se calculó por medio de la ecuación de Scherrer. Por su parte, se fabricaron películas de alginato de sodio por el método de moldeo; las cuales fueron secadas en incubadora a 45°C. Una vez secas, las películas fueron estudiadas por medio de pruebas de tensión, donde se determinó su módulo de Young 0.2% de deformación.

El tamaño de las nanopartículas de magnetita y el módulo de Young de las películas fue optimizada por medio del uso del diseño de experimentos de dos factores tipo CCD- centrado a la cara y de tres factores tipo Box-Behnken, respectivamente. Las nanopartículas y películas optimizadas fueron posteriormente caracterizadas mediante diferentes técnicas. De esta manera, las nanopartículas empleadas presentaron un tamaño promedio de  $(9.7 \pm 0.21)$  nm, mientras que la película formadora de microagujas presentó un módulo de Young de  $(1654.73 \pm 165.67)$  MPa.

Ambos elementos fueron mezclados en una formulación final para la fabricación del parche con microagujas. El molde para su fabricación se realizó por medio de indentación con un rodillo de microagujas de acero inoxidable sobre base de parafina. La técnica de micromoldeo se usó para la fabricación del parche con microagujas. Los parches fabricados se caracterizaron por medio de microscopía y

se les cuantificó la cantidad de hierro en ellas. Las microagujas tienen un largo de  $(635.74 \pm 75.04)$   $\mu\text{m}$  y ancho de  $(261.81 \pm 8.30)$   $\mu\text{m}$  con una cantidad de nanopartículas de magnetita de  $(31.658 \pm 8.431)$   $\mu\text{g}$ .

## 2 Introducción

El ojo, un órgano complejo responsable de la visión, representa una de las partes del cuerpo humano con dificultad de acceso cuando se trata de la administración de fármacos. Sus propias barreras, mecanismos de limpieza y drenado, así como su reducida área son algunos de los desafíos a superar<sup>1, 2</sup>. Aunque existen formas farmacéuticas convencionales para el tratamiento de sus padecimientos, la mayoría presenta desventajas que van desde una baja biodisponibilidad hasta la pérdida de su función<sup>3</sup>.

Las microagujas han sido propuestas como una estrategia de interés para tratar las desventajas previamente mencionadas. En comparación con las agujas hipodérmicas, las microagujas son de menor tamaño, más seguras y menos invasivas<sup>4</sup>. Estas pueden ser categorizadas mediante diferentes características como solubilidad, material del que están hecho y la existencia o no de estructuras internas (canales). Siendo las microagujas poliméricas solubles sólidas preferidas para la administración ocular con tamaños en un rango de 25-2000  $\mu\text{m}$  de altura<sup>5</sup>. Estas pueden a su vez contener sistemas nanoparticulados para mejorar su desempeño<sup>6</sup>.

Entre ellas, el uso de nanopartículas superparamagnéticas de hierro, SPIONS por sus siglas en inglés, es de gran interés ya que su comportamiento magnético puede ser aprovechado como estrategia para vectorización<sup>7</sup>. Además, que este tipo de nanopartículas, principalmente aquellas de magnetita y maghemita, se han demostrado biocompatibles y, por sus características, han sido empleados como agentes antitumorales o de diagnóstico<sup>7</sup>. No obstante, de manera general los sistemas nanométricos presentan una alta reactividad y una tendencia a su

aglomeración. Por lo que, el uso de agentes estabilizantes es una estrategia comúnmente empleada<sup>7</sup>.

La laponita es una arcilla biocompatible, nanométrica, que se ha empleado como agente estabilizador de nanopartículas y como agente de refuerzo en películas poliméricas<sup>8</sup>. La conjunción de los elementos descritos se muestra como una estrategia de interés para abordar las dificultades que presenta la administración ocular.

### 3 Marco teórico

#### 3.1 El ojo

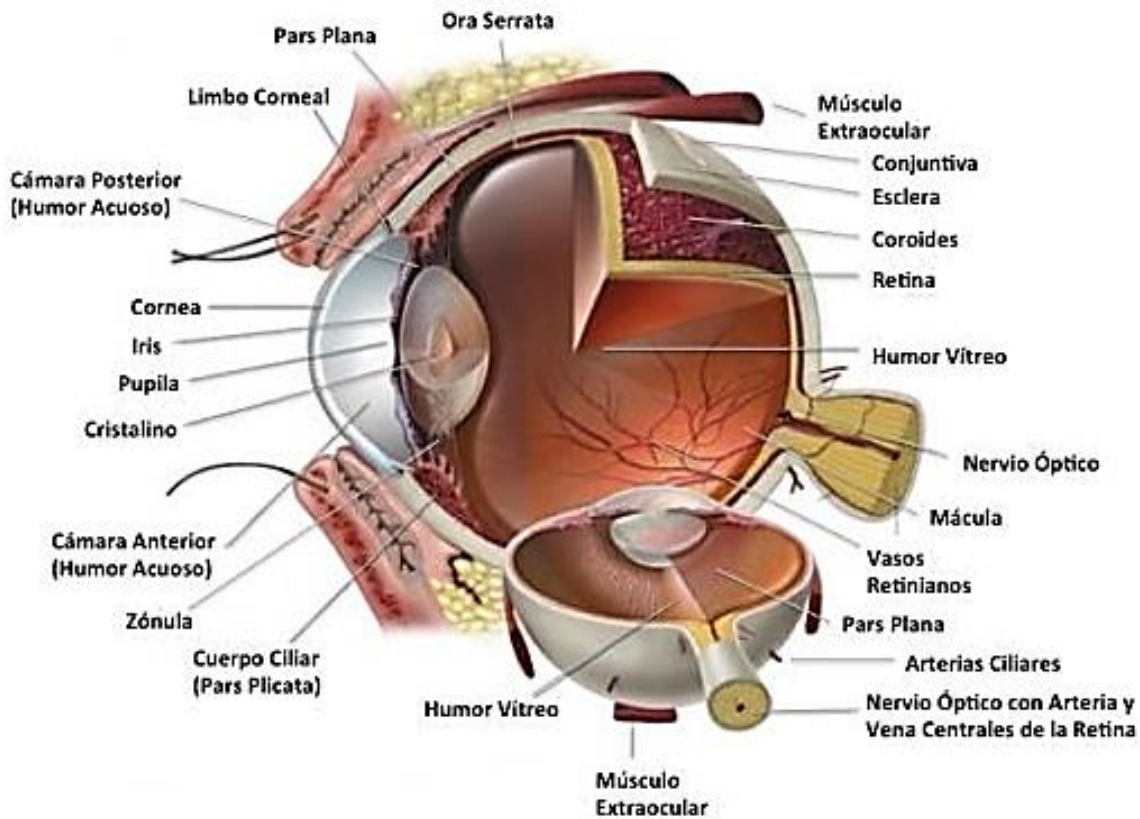


Figura 1. Diagrama anatómico del ojo<sup>9</sup>

El ojo es un órgano sensorial complejo que puede ser descrito como un cuerpo globular con gran hermeticidad que envuelve una sustancia tipo gel y posee lentes que le confieren la función de captar imágenes y transportarlas hacia el cerebro. Un

diagrama de este órgano se muestra en la figura 1. El ojo se encuentra formado por tres túnicas, cada una con funciones sensoriales, de protección o de nutrición. Además, anatómicamente se encuentra dividido en dos cámaras, cuyas características impactan sobre la entrega de fármacos. Por lo que para el correcto tratamiento de sus patologías es de suma importancia el entendimiento de su anatomía y fisiología.

### *3.1.1 Párpados y Conjuntiva*

Los párpados son una extensión de la piel que recubren la parte externa del ojo. Su principal función es de protección por medio del parpadeo, el cual previene la entrada de sustancias foráneas y renueva la película lagrimal<sup>10</sup>. En su borde límite con el interior, se localizan las glándulas de Meibomio, un tipo de glándulas sebáceas, que producen la parte oleosa de la película lagrimal<sup>10, 11</sup>.

La conjuntiva es una membrana mucosa vascularizada<sup>12</sup> que se encuentra dividida en tres partes: la conjuntiva tarsal que reviste el interior del párpado, una parte media que sirve de sección transitoria y la conjuntiva bulbar<sup>2, 11</sup>. La conjuntiva contribuye a la formación de la película lagrimal secretando una mezcla fluida de electrolitos y mucina<sup>2</sup>. La conjuntiva bulbar representa una primera barrera para la permeación tópica de fármacos; debido a la gran pérdida de estos por circulación sistémica; de manera que la vía conjuntival/esclera resulta en una baja biodisponibilidad<sup>12</sup>.

### *3.1.2 Aparato nasolagrimal*

El aparato nasolagrimal posee dos funciones, una función secretora y otra excretora. La función secretora se encuentra a cargo de las glándulas lagrimales principales y accesorias, las cuales producen las lágrimas, es decir, la porción acuosa de la película lagrimal<sup>11</sup>. Por su parte, la función excretora es realizada por los conductos lagrimales, el saco lagrimal y los puntos lagrimales; esta implica el paso de la lagrime al saco, el cual con el parpadeo se distiende, originando una presión



negativa que atrae la lagrime para su remoción<sup>11</sup>. De manera general, la función de este aparato es el continuo mantenimiento del estado de hidratación de la superficie ocular, además de una función de protección<sup>2</sup>.

### *3.1.2.1 Película lagrimal*

La película lagrimal es la primera gran barrera para la administración ocular tópica<sup>5</sup>. La vida media de un fármaco en condiciones normales es de 4 min, que se ve reducida por un aumento en el drenado hacia el conducto nasolagrimal causado por el parpadeo<sup>13</sup>. Esta barrera está compuesta por tres capas: una capa lipídica que reduce la pérdida por evaporación, la capa acuosa media que contiene una mezcla compleja de sustancias antibacterianas y enzimas y una capa de mucosa que protege y lubrica a la superficie de la córnea<sup>2, 13</sup>. Entre las características fisicoquímicas más relevantes son su pH de  $7.4 \pm 0.2$  con una capacidad buffer asimétrica<sup>14</sup>, una osmolalidad de 300 a 320 osm<sup>14</sup>, viscosidad media de 2.9cps<sup>15</sup> y una tensión superficial promedio de 44mN/min<sup>16</sup>.

### *3.1.3 Túnica externa o fibrosa (córnea y esclera)*

#### *3.1.3.1 Córnea*

La córnea es la capa más externa del ojo, actúa como una barrera mecánica hacia sustancias exógenas y protege el tejido ocular<sup>5</sup>; adicionalmente de actuar como lente<sup>11</sup>. En su región media cuenta con un grosor de 520µm que se engrosa en la periferia<sup>17</sup>. Se encuentra constituida por cinco capas: epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana de Decemet y endotelio<sup>5, 12</sup>. La córnea tiene una gran sensibilidad por la red de terminaciones nerviosas trigeminales presentes en las capas internas epiteliales<sup>11</sup>.

#### *3.1.3.2 Esclera o Esclerótica*

La esclera es la cubierta fibrosa que envuelve al ojo y está constituida principalmente del colágeno<sup>18</sup>. La distribución irregular de las fibras de colágeno que

le constituyen le vuelven opaca y elástica, confiriendo al ojo protección y forma<sup>11</sup>. Su grosor es variable acorde a la región en que se estudie, teniendo valores desde 1mm (en la vecindad del nervio óptico) a 0.39mm (región ecuatorial)<sup>19, 20</sup>. Su permeabilidad es cercana a la mitad de la de la conjuntiva, no obstante es aproximadamente 10 veces mayor que la córnea<sup>12</sup>.

### *3.1.4 Túnica media o vascular (iris, cuerpo ciliar y coroides)*

La túnica vascular también es conocida como tracto uveal, se encarga del suministro de sangre a la retina<sup>18</sup>.

#### *3.1.4.1 Iris*

El iris es la capa más anterior del tracto uveal<sup>10</sup>, divide el ojo en dos cámaras: anterior y posterior. Su región central es hueca, se conoce como pupila, a partir de la cual el paso entre ambas cámaras es continuo y permite el paso del humor acuoso por ellas<sup>11</sup>. En combinación con los vasos del cuerpo ciliar, su endotelio forma la barrera hematoacuosa que actúa como principal barrera para la entrega de fármacos al segmento anterior del ojo<sup>21</sup>.

#### *3.1.4.2 Cuerpo ciliar*

El cuerpo ciliar es una prolongación de la coroides, produce el humor acuoso<sup>10</sup> y forma parte de la barrera hematoacuosa<sup>10, 21</sup>. La barrera hematoacuosa controla el paso del humor acuoso, modulando así la presión interna del ojo<sup>12</sup>; además que su propiedad como barrera es fundamental para el mantenimiento del equilibrio químico y transparencia de los fluidos oculares<sup>22</sup>. Por su parte, el humor acuoso provee de nutrientes a la córnea, mantiene la presión ocular<sup>2</sup> y es un medio de excreción de los desechos metabólicos con un tiempo de recambio total de una a dos horas<sup>23</sup>.

### *3.1.4.3 Coroides*

La coroides es un tejido sumamente vascularizado, que aporta oxígeno y nutrientes a la retina<sup>13</sup>. Se encuentra formado por 5 capas de vasos y capilares, lo que involucra un gran flujo sanguíneo<sup>2, 13</sup> y, por consiguiente, una eliminación alta de fármacos tras administración subretinal<sup>24</sup>.

### *3.1.5 Túnica interna o Retina*

La parte interna del ojo se encuentra confinada por la retina. Esta última puede dividirse, acorde a sus funciones, en dos capas: la retina sensorial y el epitelio pigmentario de la retina. La parte sensorial está compuesta de varias capas de células ganglionares, bipolares y fotorreceptores<sup>18</sup> encargados de la transmisión de sensaciones visuales<sup>11</sup>. Por su parte, el epitelio, conjuntamente con las células endoteliales de los capilares de la retina, forma la barrera hematoretiniana<sup>12</sup>. Esta última, por el tipo de uniones que presenta, aísla el interior del ojo<sup>25</sup> de sustancias foráneas provenientes de la circulación<sup>3</sup>, siendo un reto considerable para la administración de fármacos en la cámara posterior.

### *3.1.6 Humor vítreo*

El humor vítreo no es parte de ninguna túnica, es una sustancia gelatinosa que se encuentra confinada en el glóbulo ocular, en el segmento ubicado atrás del iris (cámara vitreal). Su composición es 99% de agua y un 1% una mezcla de colágeno, ácido hialurónico y elementos formes<sup>10, 18</sup>. La cámara vitreal es la región más empleada para la administración de fármacos intencionados para la cámara posterior por medio de inyecciones directas en ella<sup>1</sup>.

## *3.2 Microagujas*

Las agujas hipodérmicas para la administración de fármacos permiten el uso de vías que mejoran la biodisponibilidad de los mismos<sup>26</sup>. No obstante, poseen ciertas desventajas como el ser dolorosas e invasivas, además de requerir ayuda de un

profesional para su aplicación y que la frecuencia de administración, por incomoda y repetida, lleve a una falta de apego por parte del paciente<sup>27</sup>. Las microagujas de manera general para sus diversas aplicaciones se describen como estructuras piramidales que forman parte de un parche con un tamaño promedio de 150-1500µm de longitud, 50-250µm de ancho en la base que se reduce a 1-50 µm en la punta<sup>28</sup>. Son capaces de penetrar tejido y administrar fármaco, como una aguja hipodérmica lo haría, pero se consideran menos invasivas y dolorosas a la par que presentan un mejor desempeño que las ya mencionadas; conservando simultáneamente las ventajas de su contraparte de mayor tamaño<sup>29</sup>.

Estos dispositivos han sido empleados en diferentes tejidos y para distintas patologías, inclusive siendo usadas en el área cosmética<sup>30</sup>, siendo principalmente desarrolladas en el ámbito de la administración transdérmica<sup>31</sup>. Las microagujas se pueden clasificar acorde al método de fabricación, material a partir del cual fueron fabricadas, su solubilidad, mecanismo de degradación o poseer o no cubiertas o canales internos<sup>28, 32-34</sup>. Dichas clasificaciones no son excluyentes entre sí, en la tabla 1 se presentan las diferentes categorías para su clasificación. Cabe mencionar que lo presentado en dicha tabla es una recopilación entorno a la bibliografía revisada<sup>4, 30, 31, 33, 35, 36</sup>.

*Tabla 1. Lista de diferentes clasificaciones y correspondientes categorías para las microagujas*

Método de fabricación	Material	Solubilidad	Mecanismo de degradación	Estructuras internas
Micromoldeo	Metálicas	Solubles	Disolución	Sólidas
Fotolitografía	Vidrio	Insolubles	Biodegradación	Huecas
Impresión 3D	Silicón	Hidrogel	No degradables	Recubrimiento
Devastación laser	Poliméricas			Sin recubrimiento
Microesterolitografía				Recubiertas
Producción en fase líquida continua				

Estos dispositivos se han empleado tanto en la administración de fármacos como biofármacos<sup>28, 32-34</sup>. No obstante, su desempeño puede ser mejorado por medio del uso de nanoacarreadores<sup>28</sup> ofreciendo una mejora en el entrapamiento de fármacos o vectorización, como puede ser por el uso de nanopartículas magnéticas; o mejorando propiedades propias de las microagujas, como por adición de nanomateriales como las arcillas.

### 3.3 Nanopartículas superparamagnéticas de hierro (SPIONs)

Los nanomateriales, aquellos que cuentan con al menos una de sus dimensiones<sup>37</sup> en el 1-100nm<sup>38</sup>, han probado ser útiles en diversas áreas como la biomédica<sup>39</sup> debido a sus propiedades. Entre sus aplicaciones se encuentran fungir como acarreadores o vectores para la administración de fármacos, adicional a su uso como quimioterapéuticos y agentes de diagnóstico<sup>40</sup>.

En específico, las nanopartículas de hierro se han mostrado prometedoras para la vectorización de fármacos sitio específicas guiadas por estímulos magnéticos, aunque su aplicación se encuentra limitada por su capacidad de promover reacciones oxidativas<sup>41</sup>. En relación con lo anterior, las ferritas y las diversas fases de óxido de hierro (magnetita y maghemita)<sup>7</sup> también se han estudiado como nanopartículas en este tipo de aplicaciones mostrando una mejor biocompatibilidad<sup>42</sup> y menor citotoxicidad<sup>39</sup>, conservando sus propiedades magnéticas. En conjunto, las nanopartículas de los materiales mencionados se conocen de manera general como nanopartículas de hierro superparamagnéticas, SPION por sus siglas en inglés. La alta reactividad de las nanopartículas y su tendencia a aglomerarse son parte de las desventajas que presentan para su aplicación y contribuyen al riesgo toxicológico que representan<sup>43</sup>. Por lo que, la funcionalización de su superficie por medio de recubrimientos orgánicos o inorgánicos permite mejorar su estabilidad de suspensión, disminuir su reactividad y prevenir su rápida degradación una vez dentro de la célula<sup>44</sup>.

### 3.3.1 Magnetita

La magnetita es un óxido mixto de hierro, presente en la naturaleza como el óxido de hierro más común y empleado<sup>45</sup>, con fórmula general  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Este óxido posee una estructura cristalina de espinela cúbica inversa, cuyos átomos de oxígeno se encuentran empaquetados en una red cristalina cúbica centrada a la cara, mientras que los cationes trivalentes y divalentes de hierro ocupan los intersticios tetraédricos y octaédricos<sup>44-47</sup>. De manera específica, los cationes  $\text{Fe}^{3+}$  ocupan la totalidad de los huecos tetraédricos y la mitad de los huecos octaédricos, mientras que la mitad restante de estos últimos los ocupan cationes  $\text{Fe}^{2+}$ <sup>44-47</sup>. Una representación esquemática de la estructura de la magnetita se presenta en la figura 2.

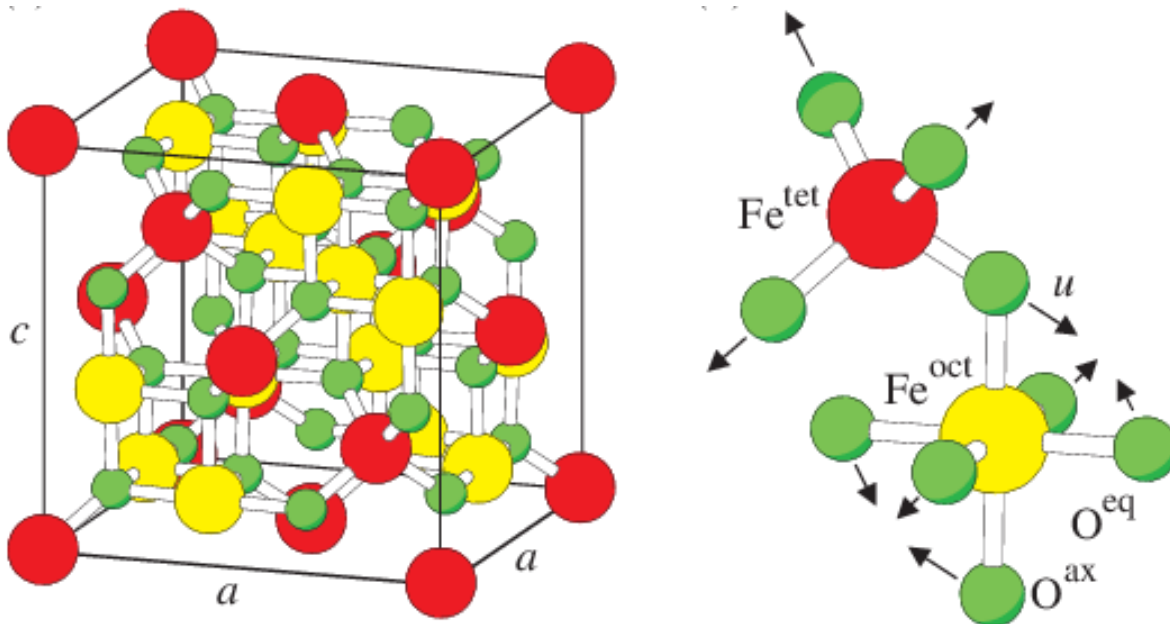


Figura 2. Estructura de la magnetita. Imagen tomada de Friák, M. et al., 2007<sup>48</sup>

La magnetita se distingue de otras fases de hierro por su coloración negra, la cual se relaciona con transferencia de carga existente entre los cationes de hierro di- y tri- valentes en las posiciones octaédricas<sup>47</sup>. Otra característica importante de este óxido son sus propiedades magnéticas, ya que estas son dependientes del tamaño. Como bulto, la magnetita actúa como un material ferrimagnético con una alta magnetización de saturación<sup>49, 50</sup>. No obstante, una vez que se reduce su tamaño a nanopartículas de 20nm de diámetro<sup>51</sup> se observa la desaparición de la coercitividad

volviéndose superparamagnéticas<sup>50, 51</sup>. Otras propiedades de la magnetita se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Propiedades de la magnetita. Adaptado de Niculescu, A. et al., 2022<sup>52</sup>

Formula general	Color	Temperatura de fusión	Sistema cristalográfico	Parámetro de red	Dureza
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Negro	1583-1597 °C	cúbico	Å = 0.8396 nm	5.5
Formula estructural	Densidad	Temperatura de Curie	Tipo de estructura	Comportamiento magnético (bulto)	Δ°G de formación
[Fe <sup>3+</sup> ] <sub>tet</sub> [Fe <sup>3+</sup> , Fe <sup>2+</sup> ] <sub>oct</sub> O <sup>2-</sup> <sub>4</sub>	5.18 g/cm <sup>3</sup>	577°C	Espinela inversa	Ferrimagnético	-1012.6 kJ/mol

### 3.3.1.1 Superparamagnetismo

El superparamagnetismo es un fenómeno que se presenta por la reducción de tamaño en materiales ferro- y ferri-magnéticos. Esto ya que, como materiales en bulto, se dice que el material está compuesto por dominios (fig 3a). Los dominios son regiones que contienen momentos magnéticos acoplados en la misma dirección,

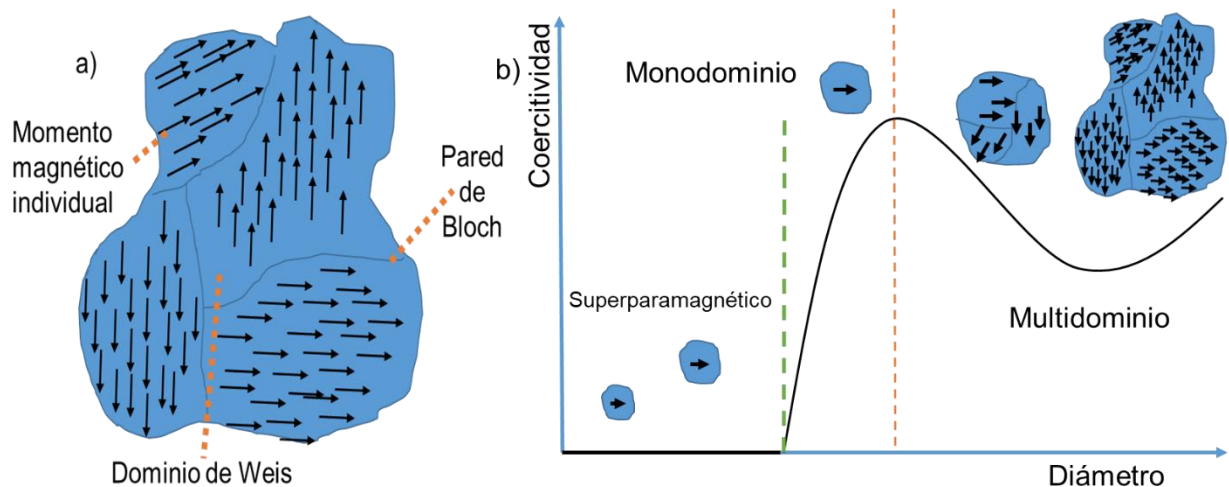


Figura 3. a) Esquema de un material magnético en bulto y b) Relación entre el diámetro de partícula y la coercitividad

y que están separados unos de otros<sup>53, 54</sup>. Cada dominio podría estar entonces representado por un solo vector de magnetización para todos sus momentos magnéticos por unidad de volumen como respuesta ante la presencia de un campo magnético<sup>53, 54</sup>.

La reducción de tamaño de partícula del material conlleva el paso de un material magnético multidominio a uno monodominio. Bajo esta condición, las nanopartículas monodominio presentan un máximo en su coercitividad que dificulta su desmagnetización<sup>50</sup>. Esto se asocia con el tiempo de relajación del espín, el cual no es suficiente para completar la rotación del momento magnético, por lo que el material conserva su comportamiento magnético como bulto (estado de bloqueo)<sup>54</sup>. Sin embargo, a un menor tamaño, con respecto al diámetro crítico para pasar de un material multidominio a uno monodominio, la coercitividad del material se reduce hasta llegar cercana o igual a cero, cambiando el perfil de la curva de magnetización del material (fig. 4)<sup>50, 51, 54</sup>, semejando el comportamiento paramagnético. Esta condición es conocida como superparamagnetismo<sup>50, 54</sup>. Las nanopartículas superparamagnéticas muestran una mejor respuesta magnética con un tiempo de relajación sumamente corto ante la aplicación de campos magnéticos externos que sus contrapartes de mayor tamaño multi- o mono- dominio<sup>50, 54</sup>.

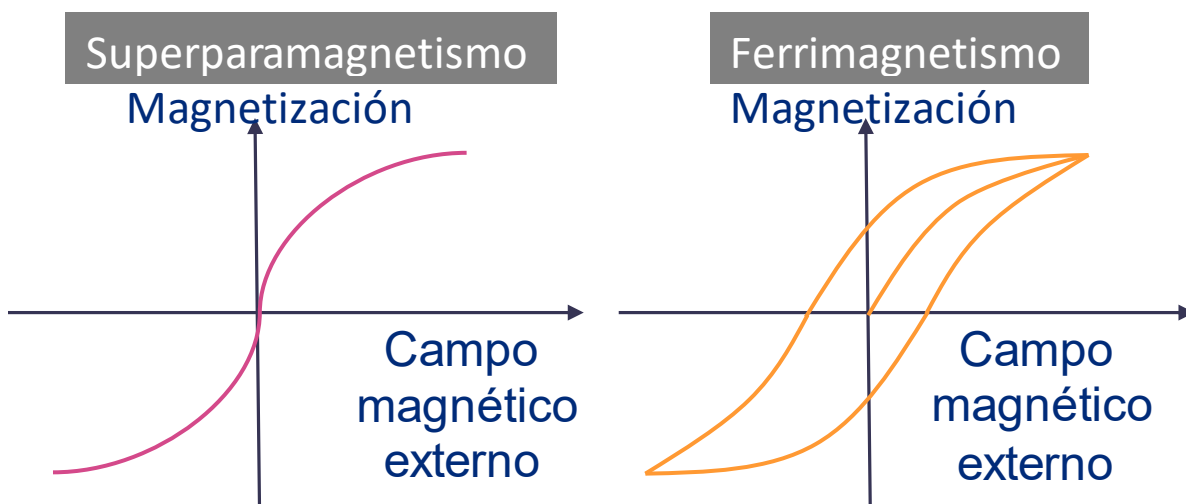


Figura 4. Curvas de magnetización ejemplificando distintos comportamientos.



### 3.4 Laponita

Las arcillas comprenden a un grupo vasto de materiales producto del desgaste de minerales de silicatos<sup>55</sup>. De manera general, se describen como materiales formados por capa de aluminosilicatos (filosilicatos) con dos unidades estructurales: una capa tetraédrica y otra octaédrica<sup>55</sup>. Existe la posibilidad de que los átomos centrales de silicio en la capa tetraédrica y de aluminio en la capa octaédrica sean reemplazados por cationes de menor valencia como magnesio, litio o hierro<sup>56</sup>; además que la capa octaédrica puede estar relacionada con una (1:1) o dos capas (2:1) tetraédricas<sup>57</sup>. En relación con lo anterior, es por medio de estas diferencias que es posible el establecimiento de grupos de arcillas, entre los que se encuentra el grupo de las esmectitas<sup>55</sup>. Estas se caracterizan por tener una relación de sus capas 2:1 y su excelente capacidad de hinchamiento en presencia de agua<sup>55, 58</sup>.

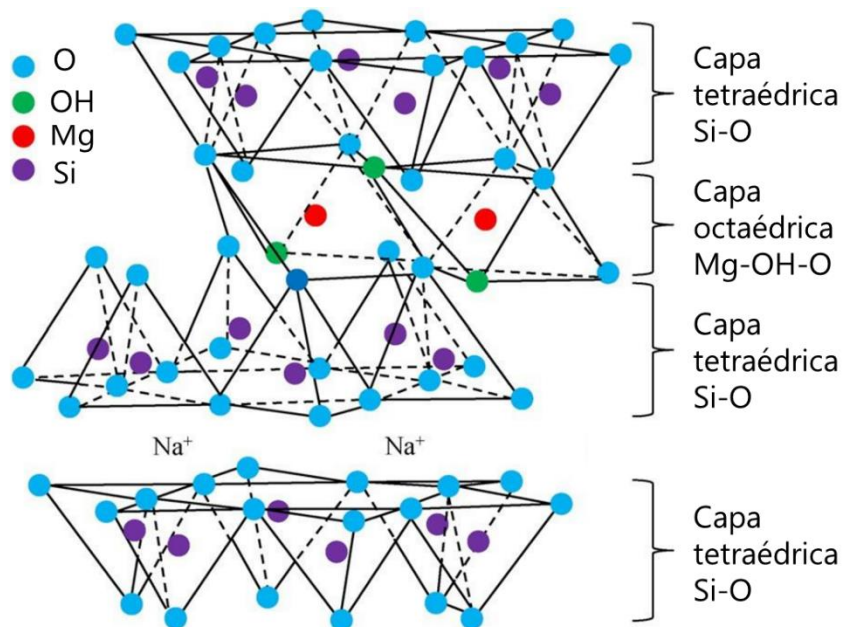


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de la laponita. Imagen adaptada de Liu, G. et al., 2020<sup>59</sup>

La laponita (fig. 5),  $\text{Na}^{+0.7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]^{-0.7}$ , es un aluminosilicato parte del grupo de las esmectitas sintetizado a partir de una combinación de sales a temperaturas y proporciones controladas<sup>60</sup>. Se describe como nanodiscos de 25 nm de diámetro y 0.92nm de ancho empaquetados en pila que al contacto con agua se

separan y dispersan<sup>8, 55, 60</sup>. Esta arcilla posee una gran área superficial específica, alta capacidad de intercambio catiónico y de adsorción<sup>8, 55, 60</sup>. Lo anterior se relaciona con su carga superficial, la que es negativa en sus caras y positiva en los bordes<sup>8, 55, 60</sup>. Adicionalmente, este material es biocompatible y de baja toxicidad; por lo que se ha estudiado su uso en aplicaciones biomédicas<sup>8, 60, 61</sup>. Macroscópicamente, es un polvo blanco con la capacidad de formar suspensiones, geles y películas traslúcidas<sup>8, 60, 61</sup>. Su versatilidad le ha permitido ser empleado para mejorar las propiedades de barrera de recubrimientos y películas<sup>62-66</sup>, como modificador de las propiedades reológicas<sup>67-70</sup> y liberación controlada de fármacos<sup>8, 61, 71, 72</sup>.

## **4 Antecedentes**

### **4.1 Sistemas farmacéuticos para la administración ocular**

Como se ha mencionado anteriormente, el ojo presenta varias dificultades para el tratamiento de sus padecimientos. Estos están en función del origen del padecimiento y la localización del mismo. En principio, las soluciones y ungüentos oftálmicos son las formas farmacéuticas más recurrentes y comunes ocupando cerca del 90% del mercado<sup>73</sup>. Si bien son ampliamente aceptadas por los pacientes, entre sus principales desventajas están el bajo tiempo de retención en el ojo que se traduce a una baja biodisponibilidad, además de baja permeabilidad a la cámara posterior<sup>73</sup>. Entre las opciones para mejorar el tiempo de retención de estas formulaciones se encuentra el aumento de viscosidad<sup>2, 13, 73</sup>. Con desventajas similares a la anterior se encuentra el uso de suspensiones<sup>2, 13</sup>, en las que el tamaño de partícula es un parámetro crítico a contemplar ya que tiene influencia sobre la biodisponibilidad del fármaco<sup>3</sup> y es parte de los requisitos a cumplir ante la regulación<sup>2</sup>. Por su parte, las emulsiones han mostrado mejora en el tiempo de retención y control de la liberación<sup>3</sup>, aunque existen problemas relacionados con su estabilidad y dificultad de esterilización<sup>2</sup>.

De esta forma, la necesidad de mejora sobre los productos farmacéuticos oftálmicos ha llevado al desarrollo de sistemas más complejos como los insertos. Los insertos

son preparaciones sólidas o semisólidas que se implantan en el saco conjuntival inferior<sup>13, 73</sup>. Si bien hay dispositivos de este tipo en el mercado, también cuentan con desventajas como incomodidad en el ojo y baja carga de fármaco. Una amplia revisión de dichos dispositivos fue realizada por Bertens, C. et al<sup>73</sup>. De igual manera se ha estudiado a los lentes de contacto como una forma farmacéutica<sup>74, 75</sup>. Se destaca de estos dispositivos sus métodos de fabricación, ya que este determina cómo será la carga del fármaco y guie la liberación del mismo a partir del lente de contacto<sup>74, 75</sup>. Si bien, tanto los insertos como los lentes de contacto logran mejorar el tiempo de residencia del fármaco en el ojo, debido a las características propias de este órgano estos dispositivos junto con las formas farmacéuticas ya mencionadas limitan su aplicabilidad a padecimientos en la cámara anterior.

La entrega de fármacos a la cámara posterior, entonces se ve limitada a una única opción, el uso de inyecciones, más comúnmente aquellas intravítreas<sup>13</sup>. Si bien las inyecciones intravítreas permiten acceso a regiones posteriores del ojo, conllevan una difusión no selectiva del fármaco administrado<sup>76</sup>. Esta es la menor de las desventajas, ya que independientemente de la estructura en la que se haga la administración con agujas hipodérmicas (27-30G), existe un alto riesgo de infecciones, desprendimiento de retina, hemorragias internas e inclusive ceguera<sup>20</sup>. Por lo que, el conocimiento de las consideraciones biomecánicas del ojo es fundamental de considerar al momento de formular y plantear una administración intraocular. Ejemplo de esto es el trabajo realizado por Hancock, S. et al. , 2021 sobre dichos aspectos en relación a la administración ocular empleando inyecciones en el espacio supracoroidea<sup>76</sup>. De manera general, el desarrollo de dispositivos y sistemas de tamaño micro o nano se ha observado como una estrategia prometedora para el tratamiento de padecimientos oculares<sup>77</sup>. Derivado de los riesgos que representa las inyecciones intraoculares empleando agujas hipodérmicas, se ha explorado el uso de microagujas como una alternativa novedosa para la administración intraocular<sup>36</sup>.

Indistintamente de la forma farmacéutica empleada, estas pueden beneficiarse del uso de nanoestructuras<sup>3, 6, 20</sup>. Entre estas se encuentran liposomas, niosomas,

dendrimeros, aptameros, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas inorgánicas, nanogeles, nanoemulsiones, hidrogeles, nanocapsulas poliméricas<sup>3, 6, 20, 78</sup>. Una perspectiva general de estos sistemas se encuentra en la revisión realizada por Qamar, et al<sup>6</sup>. Por su parte, el trabajo de Gorantla, S et al. , 2020 complementa el anterior con la consideración de los retos actuales de la nanomedicina<sup>20</sup>. Una consideración del beneficio que presenta la conjunción de elemento nanométricos para la generación de sistemas más complejos fue revisado por Kang-Mieler et al<sup>79</sup>. Relacionado con lo anterior y la necesidad de alcanzar regiones específicas en el ojo, lo cual es contrario a la amplia difusión que se observa tras la administración usando inyecciones, se ha propuesto el uso de nanopartículas magnéticas para conseguir vectorización<sup>80</sup>. Ejemplos de lo anterior es el uso de nanopartículas magnéticas formando parte acarreadores poliméricos para la entrega de rampamicina estudiado por Oliveira, et al., 2012<sup>81</sup> y un sistema similar dirigido a tumores por Li, G. et al<sup>82</sup>. Adicionalmente, también se ha considerado a este tipo de nanopartículas como agentes de diagnóstico<sup>83</sup>.

#### *4.1.1 Microagujas para uso intraocular*

Acorde al trabajo de revisión realizado por Ingrole, S. et al., 2021 el estudio de microagujas se centra en cuatro tipos principales: sólidas, solubles, huecas y recubiertas, con una aplicación para entrega de fármacos o de agentes diagnóstico; cuyo estudio ha crecido considerablemente desde el primer artículo relacionado con ellas publicado en 1990<sup>35</sup>. Igual que la investigación, las patentes para microagujas han ido en aumento, donde queda demostrado el interés por parte de la industria por su desarrollo al contar con el mayor número de ellas, donde Norteamérica, encabezada por estados unidos, presenta una amplia contribución a las patentes<sup>35</sup>. Se concluye que por las tendencias observadas en la revisión, las microagujas son una plataforma versátil y prometedora para la mejora de la salud<sup>35</sup>. Un ejemplo actual, es el trabajo realizado por Srivastava, P. et al., 2021 en el que la fabricación de un parche con microagujas con liposomas se basó en un enfoque de calidad por diseño<sup>84</sup>.

Inicialmente, las microagujas surgieron como una propuesta para administración transdérmica, como una alternativa menos dolorosa e invasiva con respecto a la administración intramuscular e intravenosa<sup>28</sup>. Sin embargo, como muestra el trabajo de Panda, P. et al., 2021<sup>36</sup> y de Rzhavskiy, A. et al., 2018<sup>30</sup>, este tipo de dispositivo son capaces de ser aplicados en otras vías de administración. Específicamente, en cuanto a administración ocular se refiere, se ha observado que los tipos de microagujas comúnmente investigados son sólidas, huecas y solubles con aplicaciones en el tratamiento de glaucoma, uveítis, degeneración de la macula, y retinitis pigmentosa<sup>4</sup>. Un 27% de los estudios clínicos reportados fueron financiados por Clearside Biomedical<sup>35</sup>, cuya tecnología para microagujas se centra en dispositivos de microagujas sólidas huecas para la administración en el espacio supracoroideo<sup>35, 76</sup>.

Diversos tipos de microagujas para administración ocular han sido desarrollados. Un sistema de microagujas auto-adheribles y trabadas internamente a partir de PVA es presentado en el trabajo de Amer, M. et al., 2020<sup>85</sup>. El trabajo evalúa métodos de fabricación para un parche de microagujas de características deseables para administración ocular, entre las que se contempla la curvatura del parche, así como estudios de indentación de la esclera<sup>85</sup>. Roy, G. et al., 2019, 2020 han investigado parche de microagujas para administración ocular de anfotericina B<sup>86</sup> y de pilocarpina<sup>87</sup>. En ambos estudios, el desarrollo de parche con microagujas mostraron características de liberación y fuerza de indentación adecuadas para su empleo en el ojo<sup>86, 87</sup>.

#### *4.1.2 Uso de nanopartículas magnéticas en la administración ocular*

Como se ha mencionado en secciones anteriores, las nanopartículas magnéticas se observan como una herramienta versátil para vectorización. En cuanto a administración ocular, Holligan et al., 2003 realizaron estudios del movimiento guiado por un imán de un ferrofluido en un modelo *in vitro* de la cámara vítrea con resultados favorables para alcanzar la retina<sup>88</sup>. Por su parte, Haik et al., 2003 propusieron la fabricación de un gel híbrido con partículas de maghemita

funcionalizadas con CTAB como alternativa para el tratamiento del desprendimiento de retina<sup>89</sup>. Posteriormente, un estudio del empleo de nanopartículas como parte integral de células como sistema magnéticamente dirigido para el tratamiento de la degeneración de la macula fue desarrollado por Ito, A. et al., 2005<sup>90</sup>. No obstante, aunque prometedor, los autores hacen énfasis en el requerimiento de estudios de toxicidad originados por la presencia de las nanopartículas<sup>90</sup>. Estudios similares sobre la terapia basada en células en conjunción con nanopartículas magnéticas fueron investigados por Yanai, A. et al., 2012<sup>91</sup> y Moysidis, S. et al, 2015<sup>92</sup>. Relacionado con lo anterior, estudios sobre la función de células endoteliales de la córnea por marcaje con SPION<sup>93, 94</sup> y evaluando también magnetoliposomas por Wu, M. et al., 2015<sup>95</sup> han sido investigados, en los que no se mostró ninguna modificación por la presencia de SPIONs en las células.

Dengler, M. et al., 2010 realizó la administración sistémica en un sistema *in vivo* de nanopartículas magnéticas de cobalto. Ellos demostraron la aplicación de este tipo de sistemas como agentes de diagnósticos órgano dirigido, alcanzando al ojo<sup>96</sup>. En una tónica similar, Raju, H. et al., 2012 estudiaron nanopartículas superparamagnéticas como agentes de diagnóstico en estudios de imagenología tras administración intravitrea<sup>97</sup>. Giannaccini, M. et al., 2014 observaron una biodistribución de las nanopartículas magnéticas preferencial en el epitelio pigmentado de la retina en un modelo en embriones de pez cebra sin necesidad del uso de estímulo magnético<sup>98</sup>. Estudios acerca de la capacidad de nanopartículas de una ferrita con Zn y Mn para la neuroprotección ocular en glaucoma han sido investigados<sup>99-101</sup>. El uso de nanopartículas magnéticas en la vectorización de material genético<sup>102, 103</sup>, anticuerpos<sup>78, 104</sup> y moléculas pequeñas<sup>105</sup> a regiones de difícil acceso del ojo han sido estudiados. Los trabajos anteriormente descritos son ejemplo de la aplicación de nanopartículas magnéticas como estrategia versátil para administración ocular. A la par del desarrollo de estos sistemas, se han hecho revisiones sobre su toxicidad en tejidos oculares<sup>106</sup> así como sus ventajas y desventajas en este órgano<sup>107</sup>.

## 4.2 Laponita como un material de uso biomédico

La versatilidad de la laponita queda demostrada por la gran cantidad de sistemas en las que se le ha adicionado. Este material ha sido ampliamente usado como agente modificador de la liberación de fármacos, marcadores celulares, así como material modificador de propiedades ópticas y mecánicas de distintos tipos de materiales y dispositivos<sup>8, 61, 108, 109</sup>. Ejemplo de estos es la investigación de esta arcilla como modificador de las propiedades reológicas de distintos polisacáridos de interés farmacéutico<sup>68, 69</sup>, modificador de las propiedades mecánicas de películas poliméricas<sup>64, 110, 111</sup>, hidrogeles<sup>62</sup>, nanocompositos<sup>63, 112</sup>, modificador de la liberación de distintos principios activos como doxorubicina<sup>113, 114</sup>, diversos antibióticos<sup>115-117</sup> o donepezilo<sup>118</sup>, por mencionar algunas.

### 4.2.1 Laponita en administración ocular

En cuanto a la administración ocular se refiere, la seguridad de esta arcilla fue probada en formulaciones para administración por medio de inyecciones intravítreas y supracoroideas en un modelo *in vivo* de conejo<sup>119</sup>. La laponita mostró biocompatibilidad y en conjunción con la transparencia de sus geles, probó ser una opción viable para este tipo de administración<sup>119</sup>. Modelos *in vitro* simulando las condiciones del humor vítreo como medio de liberación<sup>120</sup> e *in vivo* tras administración intravítreal en conejo<sup>72</sup> de dexametasona a partir de laponita fueron estudiados. Una formulación de laponita intercalada con brimonidina como alternativa de liberación sostenida para el tratamiento de glaucoma se ha investigado en modelo *in vivo*<sup>121</sup>. Esta formulación se siguió por medio de tomografía de coherencia óptica, siendo una aplicación novedosa de esta técnica de manera cuali- y cuantitativa<sup>122</sup>. Si bien el estudio muestra que es favorable este tipo de intercalados como estrategia ante padecimientos del ojo, el modelo animal empleado resultó con limitaciones que requieren el uso de otros parámetros para confirmar el uso de este sistema en particular<sup>121</sup>. La laponita también ha sido estudiada en la formación de nanocompositos como andamio de células corneas

endoteliales; los resultados sugieren que es como una opción viable para la transplatación de este tipo celular<sup>123</sup>.

#### *4.2.2 Laponita en conjunción con nanopartículas magnéticas*

La laponita junto con otras arcillas han sido estudiadas también como agentes de recubrimiento de otras nanopartículas inórganicas<sup>70, 124</sup>. Se ha observado que la interacción entre las nanopartículas y la arcilla ocurre en la superficie guiada por interacciones del tipo electrostático<sup>70</sup>. Este tipo de intercalados ha mostrado modificar de manera positiva las propiedades de las nanopartículas magnéticas<sup>67, 70, 124</sup>. Szabó, T. et al., 2007 estudiaron los efectos de la adición de Laponita y montmorillonita sobre las características de nanopartículas de maghemita, donde concluyen que este tipo de sistemas puede ser utilizado en la adsorción de diferentes tipos de moléculas<sup>124</sup>. Ejemplo de ello es la formación de hidrogeles con nanopartículas de magnetita soportada en laponita para la adsorción de albumina sérica bovina<sup>125</sup> y remoción de azul de metileno<sup>126</sup>. Tzitzios, V. et al., 2010 estudiaron la formación de ferrogel y ferrofluidos empleando laponita<sup>127</sup>. En este trabajo, se resalta que la presencia de laponita no afecta sobre el comportamiento magnético de las nanopartículas de maghemita; proponiendo el uso de estos nanocompositos como agentes de diagnóstico en estudios de imagenología empleando resonancia magnética (MRI)<sup>127</sup>. Nanocompositos de este tipo fueron probados en modelos *in vivo* mostrando su aplicabilidad como agentes en MRI en tumores<sup>128</sup>. De igual manera, este tipo de intercalados también han sido incorporados a matrices más complejas para la generación de compositos estímulo sensible como muestra el trabajo de Goncharuk, O. et al., 2020<sup>129</sup>.



## 5 Planteamiento del problema

Los tratamientos para padecimientos oculares requieren la optimización de los tiempos de retención y la permeabilidad de las barreras de los fármacos; mientras se limita el daño, dolor e incomodidad que experimenta el paciente. No obstante, las formas farmacéuticas convencionales empleadas para administración en el ojo, sobre todo aquellos tratamientos dirigidos a la región posterior de este órgano, cubren de manera incompleta los requerimientos previamente mencionados.

En relación con lo anterior, los parches con microagujas se contemplan como una opción viable para la administración ocular. Este tipo de dispositivos pueden incorporar el uso de nanosistemas para mejorar sus características. Ejemplo de esto es, el uso de nanopartículas magnéticas como acarreadores o de arcillas nanométricas, como la laponita, como estabilizantes o modificadores de propiedades mecánicas.

A pesar de la amplia información que se tiene con respecto al uso de laponita y, por su parte, de nanopartículas magnéticas como nanosistemas con aspectos favorables para ojo; existe poca investigación en torno a su adición a formas farmacéuticas distintas a las convencionales empleadas en este órgano. Mientras que, si bien diferentes tipos de microagujas se han desarrollado y estudiado para la liberación de fármacos en ojo, al ser una forma farmacéutica novedosa la optimización de ellas se vuelve de interés para potencializar aún más sus ventajas ya descritas. De esta manera, se expone una necesidad de desarrollo y caracterización de un sistema que pueda conjuntar las bondades de estos tres elementos.

## 6 Hipótesis

El uso de una arcilla en la síntesis de nanopartículas magnéticas y su integración en formulaciones de alginato para la fabricación de películas, tendrá un efecto positivo sobre las características finales, control del tamaño de la nanopartículas y aumento del módulo de Young de las películas, que formaran parte del parche de microagujas.

## 7 Objetivos

### 7.1 Objetivo general

Fabricar y caracterizar un parche con microagujas poliméricas formadoras de un hidrogel con características adecuadas para la administración de magnetita estabilizada con laponita por vía ocular.

#### 7.1.1 Objetivos particulares

- Sintetizar las nanopartículas de magnetita por el método de coprecipitación en presencia de laponita para su recubrimiento apoyada en un diseño de experimentos.
- Caracterizar el producto de optimización mediante diferentes metodologías y compararle con el producto ausente de arcilla.
- Optimizar el módulo de Young de películas de alginato mediante la aplicación de un diseño de experimentos evaluando variables concernientes a la formulación.
- Caracterizar la película optimizada correspondiente mediante diferentes metodologías para elucidar su comportamiento *in vitro*.
- Establecer una metodología para la fabricación del parche de microagujas y del molde, acorde a los requerimientos del dispositivo.
- Conjuntar el sistema de nanopartículas recubiertas con arcilla junto con la formulación óptima para la fabricación del parche de microagujas.

## 8 Materiales

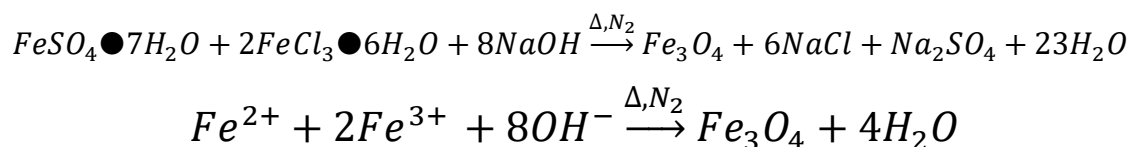
Sulfato de hierro (II) heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99\%$ ), cloruro de hierro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $> 97\%$ ) y Alginato de Sodio ( $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ ) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich Co, mientras que la laponita RD se obtuvo de BYK Additives. Hidróxido de Sodio ( $\text{NaOH}$ ) de Macron Chemicals fue empleado durante la síntesis de magnetita. Cloruro de Calcio anhidro ( $\text{CaCl}_2$ ,  $> 99\%$ ) y ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ , 36.5-38%) de J.T.Baker fueron utilizados. Maltosa Advantose 100 con número de lote 9G110141 fue adquirido de SPI Pharma™. La glicerina ( $\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$ ) grado analítico utilizada fue comprada a Omnicem. Por su parte, agua desionizada fue utilizada como disolvente y agente suspensor.

## 9 Metodología

### 9.1 Estudio del sistema intercalado Laponita/Magnetita (L/M)

#### 9.1.1 Síntesis del sistema L/M

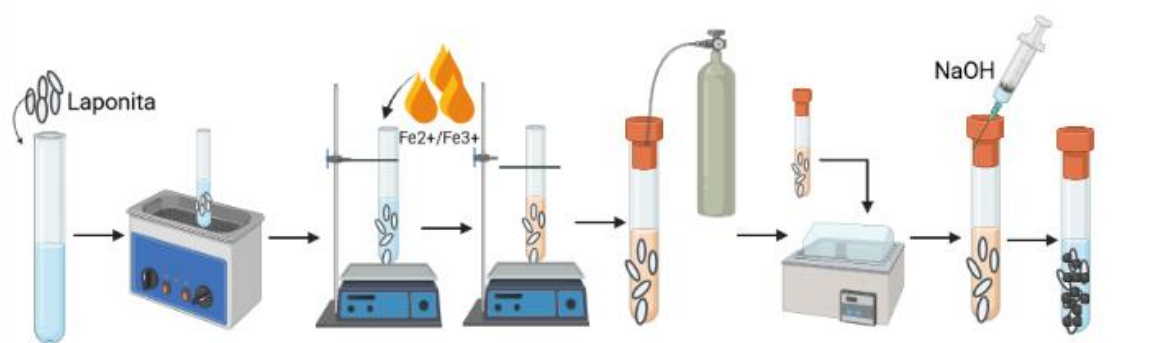
La síntesis de las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  intercaladas en laponita se realizó por el método de coprecipitación modificado acorde a lo reportado por Ding, L. et al., 2016<sup>128</sup>. La reacción llevada a cabo es la siguiente:



*Ecuación 1 Ecuación química para la síntesis de magnetita.*

Experimentalmente, en un tubo de ensaye se suspendió la laponita, 11.6 – 116mg, en un volumen de 15 mL de agua desionizada por medio de sonicación durante una hora empleando un baño sónico (UltraSonic) a 28H. A continuación, se le agregó una alícuota de 10mL de una disolución de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  previamente realizada con una concentración de 0.025M y 0.05M respectivamente. Dicha disolución se preparó disolviendo con agitación manual  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  pesado en cantidades estequiométricas 2:1 en agua desionizada. La disolución de sales de hierro mezclada con la suspensión de laponita se agitó a 1200rpm por medio de

agitación magnética durante una hora. Al término, a la disolución se le burbujeo  $N_2$  durante 10 minutos con una purga cada 2 minutos para asegurar la atmósfera inerte interna en el tubo. Se procedió con un calentamiento, a 60 - 90°C, de 10 minutos en baño de agua B-491 (Buchi) con agitación manual vigorosa cada 2 minutos. Una vez finalizado el calentamiento, se agregó rápidamente 1mL de NaOH 2M con agitación vigorosa manual, inmediatamente después. La mezcla fue agitada empleando una incubadora BJPX-100B (BIOBASE) a 300rpm a 35°C por una hora. Para la recuperación del producto, el sólido obtenido fue decantado magnéticamente durante una noche en atmósfera inerte. Tras su separación, el producto se lavó tres veces con agua desionizada. Para terminar, el producto fue secado en un desecador termostático al vacío VACUO-TEMP 4000474 (JP Selecta) a 45°C por dos horas. Un esquema del proceso se presenta en la fig. 6.



*Figura 6. Proceso general de síntesis del sistema L/M. Realizado en BioRender*

### *9.1.2 Optimización del tamaño de cristalito de la magnetita en el sistema L/M*

#### *9.1.2.1 Diseño de experimentos para el sistema L/M*

Una vez establecida la metodología de síntesis, se realizó un diseño de experimentos del tipo central compuesto centrado a las caras con el objetivo de minimizar el tamaño de cristalito (<10nm) de la magnetita intercalada con la laponita. Primeramente, se realizó un diagrama de Ishikawa para establecer las variables de estudio (fig. 7).

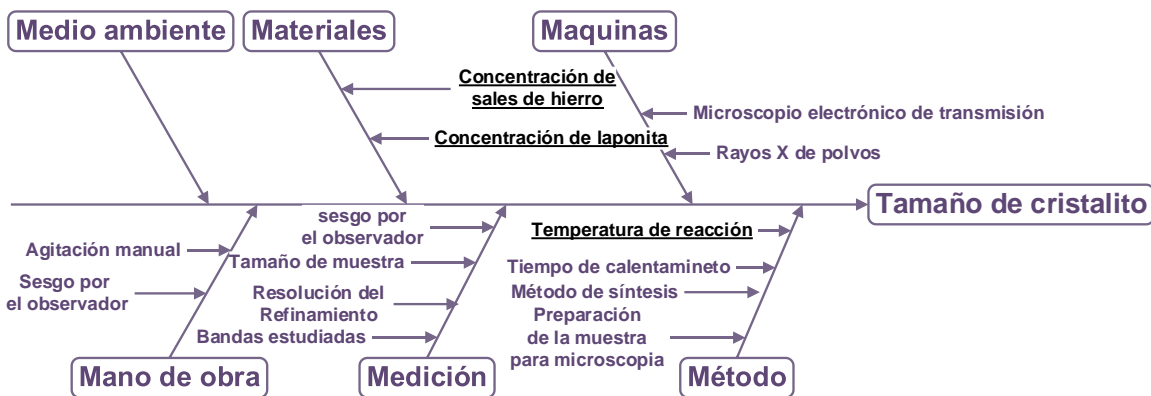


Figura 7. Diagrama de Ishikawa sobre las variables que afectan el tamaño de cristalito

Acorde a este diagrama, las variables de proceso seleccionadas como factores del diseño fueron la proporción de laponita con respecto a la magnetita y la temperatura de calentamiento, ya que estas están directamente relacionadas con la síntesis. Para la elección de los niveles, se realizó previamente un estudio de cernimiento con respecto a la cantidad de arcilla a emplear; mientras que el rango de temperaturas estudiado abarca aquellas encontradas en la bibliografía revisada<sup>67, 124, 125, 127-129</sup>, así como en trabajos previos realizados por el grupo de trabajo<sup>130, 131</sup>. En la tabla 3, se presentan los factores y niveles estudiados; por su parte, el esquema del diseño de experimentos se presenta en la tabla 4. El tamaño de cristalito de las nanopartículas fue la variable de respuesta a estudiar.

Tabla 3. Factores y niveles estudiados en el diseño de experimentos para la optimización del tamaño de cristalito de la magnetita

Factor	Nivel Bajo	Nivel Alto
Proporción Laponita/Magnetita	0.2	2
Temperatura de calentamiento (°C)	60	90

*Tabla 4. Orden de experimentos realizados para la optimización del tamaño de cristalito de la magnetita*

Orden	Corrida	Proporción L/M	Temperatura de Calentamiento (°C)
5	1	1.1	75
9	2	2	90
4	3	0.2	75
10	4	1.1	75
2	5	1.1	60
6	6	2	75
7	7	0.2	90
1	8	0.2	60
12	9	1.1	75
13	10	1.1	75
11	11	1.1	75
3	12	2	60
8	13	1.1	90

#### *9.1.2.2 Determinación del tamaño de las nanopartículas dentro de L/M*

Para la determinación del tamaño de las nanopartículas/cristalito de magnetita contenidas en el sistema L/M, cada uno de los puntos del diseño fue estudiado por medio de difracción de rayos X de polvos en un equipo D8 ADVANCE (Brucker AXS) con una fuente de radiación de CuK $\alpha$  y una  $\lambda=1.54$  Å, en un intervalo de 5° a 80° a una velocidad de 10°/min. Una vez obtenidos los difractogramas, la identificación de fases y el refinamiento de Rietveld para obtener la contribución de la magnetita en el sistema L/M se hizo empleando el software de licencia libre, Profex<sup>132</sup>. En la tabla 5, se presentan el nombre de las fases elegidas para el refinamiento dentro de la biblioteca del software, así como la referencia de la cual fueron obtenidos. Tras el refinamiento, la determinación del tamaño promedio del cristalito se calculó empleando la ecuación de Scherrer (Eq 2).

Tabla 5. Fases inorgánicas identificadas y usadas en el refinamiento de Rietveld

Fase inorgánica	PDF o Referencia
Magnetita (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> )	04-005-4319
Laponita - smectitedi2w	Tsipurski et al., Clay Minerals 19(1984), 177-193

Ecuación 2 Ecuación de Scherrer para el cálculo del tamaño de cristalito

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Donde:

D es el tamaño del cristalito

K es la constante de Scherrer, en este caso 0.95 para geometrías esféricas

$\lambda$  es la longitud de onda de la fuente del equipo, 0.154 nm

$\beta$  es el ancho a la altura media de las bandas en radianes

$\theta$  es el ángulo medio en radianes

El ancho a la altura media de las bandas fue calculado aplicando un ajuste gaussiano al difractograma de la contribución de la magnetita empleando el programa OriginPro y utilizando el promedio de las tres bandas más intensas correspondientes a los planos (311), (220), (400). En el anexo 1 se encuentran presentes los difractogramas, los resultados de refinamiento y los ajustes gaussianos para cada uno de los puntos del diseño

## 9.2 Caracterización del sistema L/M

Tras la selección de las condiciones optimizadas para la síntesis del sistema L/M, dicho intercalado, magnetita sintetizada bajo las mismas condiciones sin presencia de Laponita, la arcilla y la mezcla física fueron caracterizados mediante las siguientes técnicas:

### *9.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo*

Los espectros de infrarrojo por la técnica de reflectancia total atenuada de las muestras en polvos fueron obtenidos en un equipo FTIR/IR Spectrum 400 (Perkin-Elmer) en un intervalo de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Esto con el objetivo de estudiar los modos vibracionales del sistema.

### *9.2.2 Difracción de Rayos X de polvos*

La técnica de difracción de rayos X de polvos se empleó para estudiar la estructura cristalina de la magnetita en presencia o no de laponita, así como la determinación del tamaño del cristalito. Esta técnica fue llevada a cabo en un Difractómetro de rayos X, modelo D8 ADVANCE (BRUKER AXS) en modo Theta-Theta. con una fuente de radiación de  $\text{CuK}\alpha$  y una  $\lambda=1.54 \text{ \AA}$  y estudiando en un intervalo de  $5^\circ$  a  $80^\circ$  a una velocidad de  $10^\circ/\text{min}$ . Por su parte, la identificación de fases y los refinamientos de Rietveld fueron realizados por medio el programa Profex<sup>132</sup> como descrito en la sección 9.1.2.2.

### *9.2.3 Dispersión dinámica de Luz*

Las determinaciones del tamaño de partícula y potencial Zeta se llevaron a cabo en un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Panalytical) a partir de diluciones de una suspensión en agua desionizada de muestra de polvo seca previamente sometida a sonicación hasta cumplir con los requerimientos de calidad solicitados por el equipo. Esto fue realizado por triplicado en una celda DTS1070 a temperatura ambiente con un tiempo de estabilización de 300seg. Los parámetros del medio dispersante y materiales se presenta en la tabla 7.



*Tabla 6. Parámetros para experimentos de DLS*

Medio dispersante	Índice de refracción	Absorción
Agua	1.330	N/A
Material		
Magnetita	2.42	0.9
Laponita	1.54	0.013

#### *9.2.4 Análisis Térmico*

##### *9.2.4.1 Calorimetría diferencial de Barrido*

El efecto de la temperatura sobre la magnetita se evaluó por medio de calorimetría diferencial de barrido. Esto se realizó sobre una muestra como polvo finamente triturado y previamente secado usando un equipo DSC1 (Mettler Toledo) en un rango de 25°C a 550°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min con atmosfera de aire.

##### *9.2.4.2 Termogravimetría*

Complementaria a la técnica anterior, la termogravimetría se llevó a cabo en un equipo TGA4000 (Perkin Elmer) en un rango de 25°C a 550°C con atmosfera de aire a una velocidad de 10°C/min.

##### *9.2.5 Microscopia electrónica de Barrido (SEM)*

La microscopia electrónica de Barrido de la laponita, magnetita y sistema L/M se realizó en un equipo JEOL JSM-5910 (JEOL) a 20kV a diferentes aumentos estudiando electrones secundarios. Esto con el objetivo de estudiar la morfología de las muestras, la distribución de su tamaño y estudio de la homogeneidad de textura de las mismas.

#### *9.2.5.1 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos (EDS)*

A la par de la observación en SEM, se llevó a cabo la Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos en las que se investigó la presencia de hierro como átomo representativo de la magnetita, así como de silicio y magnesio como átomos que representan la presencia de magnetita. En específico para el sistema L/M, también se realizó un mapeo de estos elementos en su muestra para determinar su distribución en el polvo obtenido.

#### *9.2.6 Microscopia electrónica de transmisión (TEM)*

Las muestras, como polvo, fueron suspendidas en etanol y posteriormente fueron centrifugadas. Una gota del sobrenadante fue colocada en la rejilla para su observación. La obtención de las imágenes y patrones de difracción se realizó en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2010 (JEOL) a 200kV. Se determinó el espacio interplanar empleando el software Gatan Digital Micrograph, mientras que el tamaño de partícula se determinó a partir del conteo de 200 a 250 nanopartículas empleando el software ImageJ<sup>133</sup>. La distribución del tamaño de partícula se obtuvo a partir de un ajuste gaussiano al histograma de tamaño de partícula usando el software OriginPro.

#### *9.2.7 Isotermas de adsorción de N<sub>2</sub>*

Para estas determinaciones se realizaron las isotermas de adsorción de N<sub>2</sub> de la laponita, la magnetita y el sistema L/M. Estas se llevaron a cabo en un equipo Nova 800 BET (Anton-Parr) acorde a ASTM D4222. Previo a la experimentación, las muestras fueron desgasificadas con vacío con un calentamiento hasta 300°C a velocidad de 5°C/min y manteniéndolas a dicha temperatura por un tiempo de 180 minutos.

### 9.3 Estudio de las películas formadoras del parche

#### 9.3.1 Proceso de fabricación de las películas a base de alginato

Para la fabricación de las películas a estudiar, primeramente, se pesó la cantidad de laponita correspondiente, 0-1g, y se suspendió empleando un sonicador (ULTRASONIK) de 28H en 90 gramos de agua desionizada por una hora. A esta suspensión se le adicionó 1 gramo de alginato de sodio usando agitación magnética a 350 rpm por una hora. Una vez cumplido este periodo de tiempo, se le agregó el volumen pertinente de glicerina, 250-500 $\mu$ L, y se dejó agitando en las mismas condiciones por 10 minutos. Se continuó con la adición de 150mg de maltosa y la cantidad acorde de CaCl<sub>2</sub>, 0-40mg, ambos disueltos en 10 gramos de agua desionizada, empleando una jeringa a flujo de 10mL/h, mientras se agitaba simultáneamente usando una propela EuroStar 20 (IKA) digital a 1000rpm. Esta mezcla fue almacenada en refrigeración.

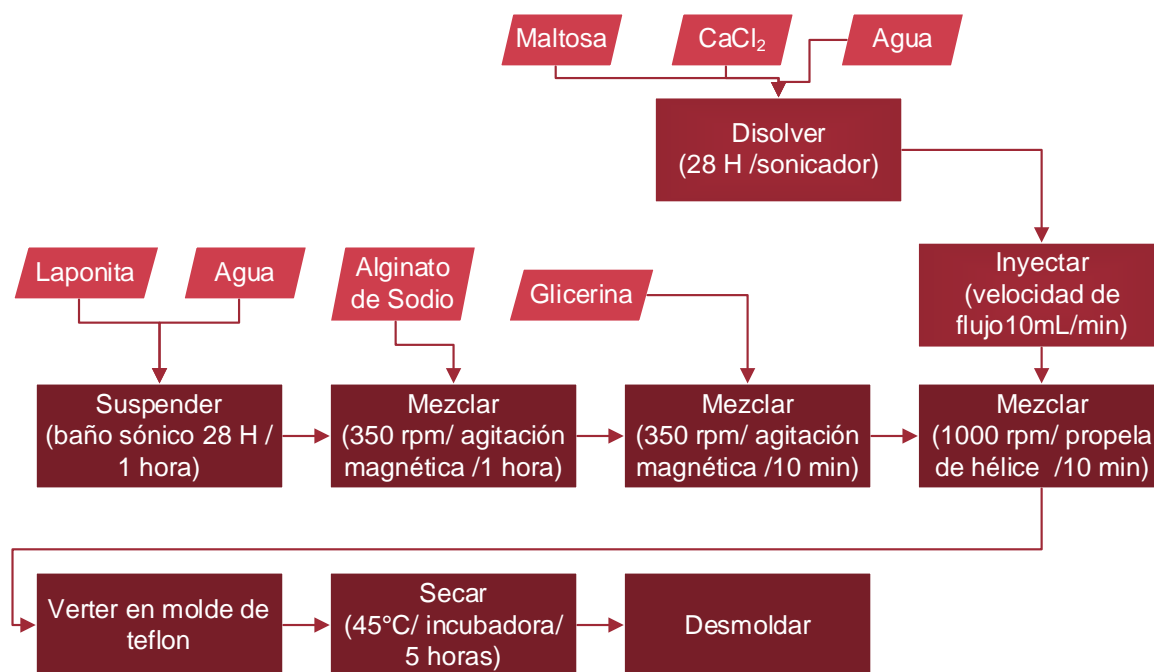


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso de fabricación de las películas

Con la mezcla para películas anteriormente descrita se fabricaron las películas evaluadas en el posterior diseño por medio del método moldeo y evaporación. Para ello, la mezcla fue sonicada en un baño sónico (ULTRASONIK) de 28H por 20 minutos

para la remoción de aire contenido en ella. A continuación, 9.5 gramos de mezcla fueron vertidos sobre un molde de teflón, el cual se colocó en una incubadora BJPX-100B (BIOBASE) a 45°C sin agitación por 5 horas. Al finalizar la película formada fue desmoldada y cortada acorde a las especificaciones del resto de las pruebas. El proceso se encuentra descrito en la figura 8.

### 9.3.2 Optimización del módulo de Young de las películas a base de alginato.

#### 9.3.2.1 Diseño de experimentos para las películas de alginato

Previamente se realizó un diagrama de Ishikawa para determinar las posibles variables que podrían impactar sobre la fabricación del parche de microagujas (fig. 9). Derivado de esto, se determinó como principal variable de respuesta el módulo de Young de las películas, ya que esta propiedad describe la relación entre el esfuerzo para generar una deformación. De manera tal que, al maximizar esta respuesta, la película sea capaz de formar microagujas que presenten la menor deformación tras ser retiradas del molde y mantengan su forma durante su indentación en el globo ocular.

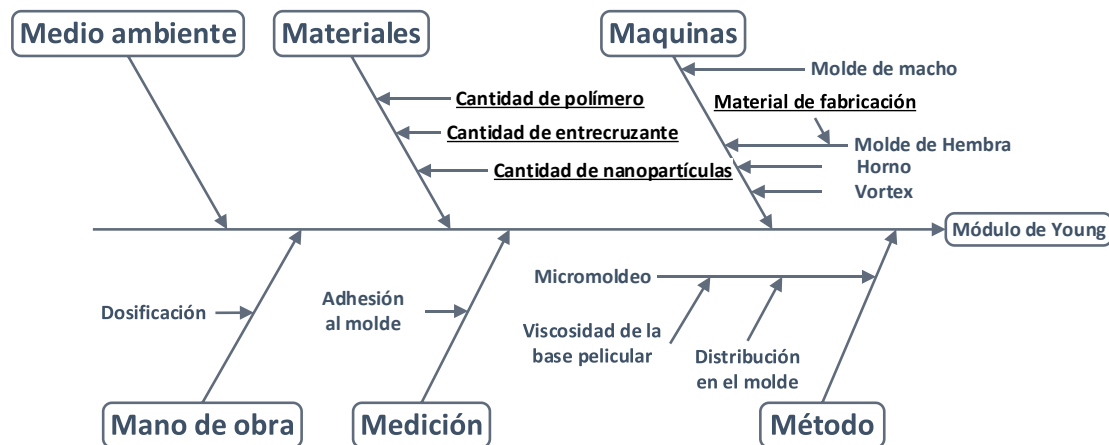


Figura 9. Diagrama de Ishikawa sobre la fabricación del parche de microagujas

Para realizar la optimización, se seleccionaron las variables correspondientes a la formulación para evaluar en un diseño Box Behnken de tres factores y dos niveles.

Estas corresponden al agente intercalador, al agente de refuerzo y al agente plastificante, es decir, al  $\text{CaCl}_2$ , la laponita y la glicerina respectivamente. En la tabla 7, se presentan los factores y niveles utilizados en esta experimentación. Por su parte, en la tabla 8, se encuentra el esquema general de experimentos realizados. Cabe aclarar que las cantidades presentadas se encuentran referidas a 10 gramos de agua.

*Tabla 7. Factores y niveles evaluados en el diseño de experimentos*

Factor	Nivel Bajo	Nivel Alto
Laponita (mg)	0	100
$\text{CaCl}_2$ (mg)	0	10
Glicerina ( $\mu\text{L}$ )	25	50

*Tabla 8. Orden de experimentos y condiciones de los mismos dentro del diseño de experimentos*

No. De experimento	Corrida	Factor 1	Factor 2	Factor 3
		Laponita mg	B:Glicerina $\mu\text{L}$	C: $\text{CaCl}_2$ mg
6	1	100	25	0
15	2	50	25	5
12	3	50	50	10
3	4	0	50	5
2	5	100	0	5
5	6	0	25	0
9	7	50	0	0
17	8	50	25	5
11	9	50	0	10
7	10	0	25	10
10	11	50	50	0

8	12	100	25	10
14	13	50	25	5
13	14	50	25	5
4	15	100	50	5
1	16	0	0	5
16	17	50	25	5
18	18	50	25	5
19	19	50	50	0
20	20	50	0	10

---

#### 9.3.2.2 Pruebas de tensión

El módulo de Young de las películas obtenidas se determinó al 0.2% de deformación de la curva de Esfuerzo vs. Deformación (anexo 5) calculada a partir de los datos obtenidos en el aparato universal de prueba. Las pruebas de tracción fueron realizadas en un equipo Multitest1-i (Mecmesin) con caja de fuerza de 50 N y velocidad de desplazamiento de 10mm/min. El grosor promedio de las películas fue previamente determinado usando un micrómetro. Cada experimento fue realizado por sextuplicado para obtener el módulo de Young promedio de cada lote.

#### 9.4 Caracterización de la película optimizada

La película optimizada fue estudiada bajo las siguientes condiciones para su caracterización:

- ❖ Sin agente osmótico ni intercalador (base)
- ❖ Con agente osmótico sin intercalador
- ❖ Con agente osmótico y agente intercalador (película seleccionada por medio de la optimización)

#### *9.4.1 Descripción física, grosor y peso*

La descripción física se realizó por inspección visual de un lote de 10 películas posterior a ser desmoldadas. El grosor promedio de cada tipo se determinó midiendo con un micrómetro en 5 lugares aleatorios de cada película en un lote de 6 películas por tipo. La determinación del peso promedio se realizó a partir de la medición en balanza analítica de 18 muestras de 1cm<sup>2</sup> de película.

#### *9.4.2 Microscopia electrónica de Barrido*

La microscopia electrónica de Barrido, SEM por sus siglas en inglés, se empleó para el estudio de la textura y morfología de las películas. Esta se realizó en un microscopio JEOL JSM-5910 (JEOL) a 20kV a diferentes aumentos. Las muestras fueron recubiertas con oro previo a su observación.

##### *9.4.2.1 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos (EDS)*

En simultaneo a la técnica anterior, es posible la detección de rayos X característicos de la muestra. Estos permiten hacer un microanálisis elemental de elementos claves presentes en la formulación. Para este estudio se seleccionaron al C, H, O, como representantes de la parte orgánica del sistema y al Na, Mg, Si como representantes de la porción inorgánica del mismo. De esta manera, el sistema Oxford Aztec 100 acoplado al microscopio previamente descrito se usó para el análisis elemental de las películas.

#### *9.4.3 Espectroscopia de Infrarrojo*

Muestras de las películas ya desmoldadas fueron analizadas en un equipo FTIR/IR Spectrum 400 (Perkin-Elmer) en un intervalo de 4000-400 cm<sup>-1</sup>. Se empleó la técnica de reflectancia total atenuada para la obtención de los espectros correspondientes. Las muestras fueron analizadas sin ninguna preparación particular.

#### 9.4.4 Análisis térmicos

##### 9.4.4.1 Calorimetría diferencial de Barrido

Las transiciones térmicas de primer y segundo orden de los diferentes tipos de películas fueron estudiadas en un equipo DSC1 (Mettler Toledo) en un rango de 25°C a 550°C a una velocidad de 10°C/min con atmosfera de N<sub>2</sub>. Las muestras empleadas fueron tiras de película equivalentes a 1cm<sup>2</sup>.

##### 9.4.4.2 Termogravimetría

En correlación con la prueba anterior, el estudio de termogravimetría para investigar residuo carbónico, pérdida de agua entre otras se llevó a cabo en un equipo TGA4000 (Perkin Elmer) en un rango de 25°C a 550°C con atmosfera de N<sub>2</sub> a una velocidad de 1°C/min

##### 9.4.4.3 Pérdida por secado

Muestras previamente pesadas de 1cm<sup>2</sup> de los tres tipos películas (n=8) fueron colocadas en un desecador termostático al vacío VACUO-TEMP 4000474 (JP Selecta) a 60°C por 24 horas. Una vez alcanzado la condición de peso constante, las películas fueron pesadas nuevamente. La pérdida por secado se calculó por diferencia de pesos y se expresó en porcentaje, acorde a la ecuación presentada a continuación.

*Ecuación 3. Cálculo de la pérdida de peso porcentual*

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

##### 9.4.5 Desintegración

La prueba de desintegración se realizó acorde al MGA 0261 de la FEUM 11.<sup>a</sup> edición. En cada uno de los espacios de la canastilla del equipo se colocaron muestras de



1cm<sup>2</sup> de la película a estudiar. La canastilla se colocó en el equipo junto con agua destilada a 37°C como medio de desintegración. La prueba dio inicio y se detuvo hasta que la forma de las películas introducidas en la canastilla se hubiese perdido, el tiempo transcurrido de inicio a fin es el tiempo de desintegración.

#### *9.4.6 Hinchamiento*

Muestras de 2cm<sup>2</sup> de película se sumergieron en 25mL de agua desionizada. Pasado cierto tiempo, el agua fue removida y la película pesada. A continuación, a la misma muestra húmeda se sumergió nuevamente. Este ciclo de sumersión y pesado se repitió hasta que la diferencia entre los pesos de dos tiempos continuos fuese negativa. El experimento fue realizado por sextuplicado para cada tipo de películas.

El hinchamiento de cada muestra se determinó de la siguiente manera:

#### *Ecuación 4 Ecuación para el cálculo del porcentaje de hinchamiento*

$$\text{Hinchamiento}(\%) = \frac{W_t \text{ (mg)} - W_0 \text{ (mg)}}{W_0 \text{ (mg)}}$$

Donde:

$W_t$  es el peso de la película tras sumersión a distintos tiempos.

$W_0$  es el peso inicial de la película.

Las mediciones se realizaron a los 0, 10, 20, 30, 45, 60, 80, 100, 120, 150, 210 segundos.

#### *9.4.6.1 pH superficial*

Al finalizar las pruebas de Hinchamiento, las muestras aún húmedas fueron empleadas para la determinación del pH superficial. Para esto, únicamente se midió el pH del gel resultante utilizando tiras reactivas

#### 9.4.7 Degradación

De manera similar al hinchamiento, muestras de 2cm<sup>2</sup> de película fueron sumergidas en 25mL de agua desionizada. Tras cierto tiempo el agua fue retirada, la película pesada aun húmeda y posteriormente puesta a secar. Una vez seca, cada muestra se volvió a pesar para determinar la degradación. Para cada tiempo, la determinación se realizó por triplicado. El cálculo de la degradación es el siguiente

#### *Ecuación 5 Determinación del porcentaje de degradación*

$$\text{Degradación}(\%) = \frac{|W_t \text{ (mg)} - W_0 \text{ (mg)}|}{W_0 \text{ (mg)}}$$

Donde:

$W_t$  es el peso de la película seca tras sumersión a distintos tiempos.

$W_0$  es el peso inicial de la película.

Las mediciones se realizaron en intervalos de 30 segundos durante 5 minutos.

#### 9.4.8 Permeabilidad al vapor

En este ensayo se evaluó la captación de agua por parte de NaOH permitida por las películas fabricadas. Para ello, en viales de vidrio con boquilla de 1 cm de diámetro se colocaron perlas de hidróxido de sodio con masa aproximada de 430 mg. Estos se taparon con círculos de las películas (muestras, n=6), Parafilm® (control negativo) y nada (control positivo y referencia) y se sellaron empleando un sello de aluminio colocado con una engargoladora para asegurar que el único paso de vapor fuese a través del área correspondiente a la boquilla.

A continuación, los viales fueron pesados una vez preparados y se volvieron a pesar posteriormente a 24,48 y 72 horas. El cálculo del porcentaje de permeabilidad al vapor de agua se acorde a la siguiente ecuación:

*Ecuación 6. Cálculo de la Permeabilidad al vapor.*

$$\text{Permeabilidad al vapor (\%)} = \frac{M_{H_2O} \text{ vial}}{M_{H_2O} \text{ c+}} \times 100$$

Donde:

$M_{H_2O}$  vial corresponde a la masa de agua dentro del vial calculado por diferencia de pesos con respecto al tiempo anterior.

$M_{H_2O}$  c+ es la masa de agua captada por el control positivo para cada tiempo.

#### *9.4.9 Propiedades mecánicas –Determinación del módulo de Young.*

Se realizó de manera idéntica a lo descrito en el punto 9.3.2.2 Pruebas de tensión para las películas de interés.

### *9.5 Fabricación del parche con microagujas*

Una vez obtenido tanto la película como las nanopartículas en las condiciones seleccionadas a partir de los diseños de experimentos respectivos, se continuo con la unión de ambos elementos para la fabricación del parche con microagujas. Previo a esto fue necesario la fabricación de los moldes hembra que permitirían generar las microagujas por el método de micromoldeo.

#### *9.5.1 Fabricación del molde hembra de microagujas*

La fabricación del molde hembra de microagujas se realizó a partir de modificaciones al protocolo presentado en el trabajo Badhe, R et al. 2021<sup>134</sup>. En un molde de silicona con 18 espacios de tamaño de 2x2x2cm se colocaron en cada espacio 2.71 gramos de parafina sólida. El molde se colocó en una estufa a una temperatura de 80°C por 30 minutos para derretir la cera presente en cada espacio. Una vez ocurrido esto, el molde fue retirado del horno y enfriado a temperatura ambiente hasta que la parafina estuviese nuevamente sólida y firme. Cada cuadrado de parafina, de ahora en adelante llamado base, fue desmoldado para proseguir con la formación de las cavidades de las microagujas.

Para la formación del molde hembra de microagujas, cada base fue indentada por un rodillo de microagujas de acero inoxidable Dermaroller© para penetración de 2.5mm. El cabezal del rodillo en cuestión fue adaptado a la pinza de sujeción del instrumento universal de pruebas (fig. 7a). En esta configuración, el cabezal fue calentado en un baño de agua 55°C por 5 min previo a la penetración de la base. Al termino de este periodo de tiempo, la pinza fue colocada en el equipo y la base colocada en el soporte del mismo. Se deslizó la pinza hacia abajo hasta hacer contacto con la base y a partir de ese punto se prosiguió con una indentación hasta alcanzar los 2.5mm de profundidad a una velocidad constante. Llegado a dicha distancia, se permitió un tiempo de 1 min de espera previo a la separación del cabezal de la base, obteniendo así el molde deseado (fig. 7b-d).

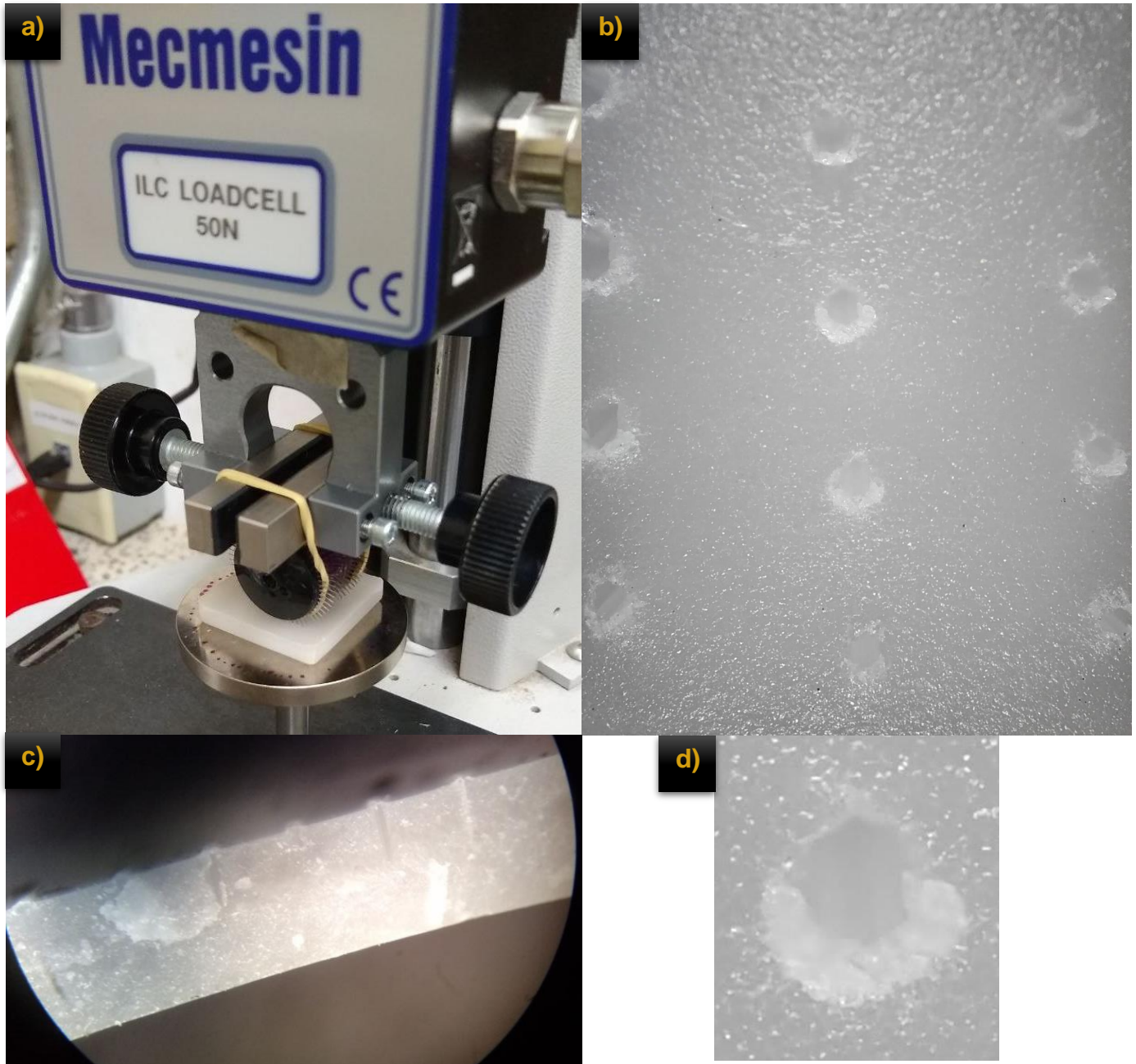
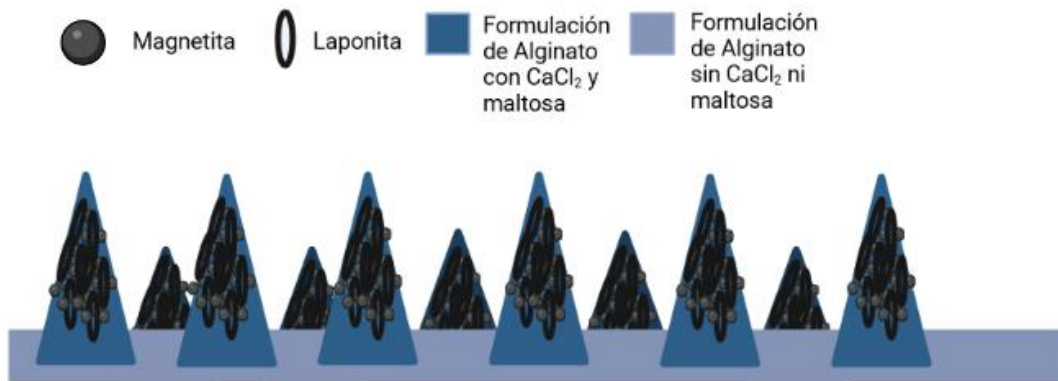


Figura 10. Fabricación del molde hembra de microagujas a) adaptación del instrumento universal de prueba para indentación de la base, b) fotografía del molde hembra posterior a la perforación, c) vista transversal de las cavidades del molde, d) vista superior y acercamiento a una de las cavidades formadas en el molde hembra

### 9.5.2 Fabricación del parche con microagujas

Debido a los requerimientos del ojo, el parche de microagujas puede separarse en dos partes: la primera parte correspondiente a las microagujas que contiene la formulación formadora de película proveniente del diseño de experimentos a la que se agregó el sistema L/M para una concentración final de 12mg/mL de hierro y la segunda que es únicamente la plataforma para colocar las agujas en el ojo formada por la formulación anterior sin agente osmótico, intercalador ni magnetita. Un ejemplo del parche objetivo se presenta en la siguiente figura.



*Figura 11. Modelo del parche con microagujas y sistema L/M. Creado en BioRender*

Para esta fabricación, se colocó 1 mL de la formulación con magnetita sobre el molde. Se continuó con tres ciclos constituidos por 30 minutos colocadas a vacío a una presión de -550mm de Hg y 30 minutos de sonicado en baño de hielo. Al terminar el tercer ciclo, la formulación se retiró, el molde se limpió con ayuda de un hisopo y se le colocó 1mL de la formulación para la parte externa. A este se le sometió nuevamente a un ciclo de vacío y sonicado. Posteriormente, se le secó por una hora en una incubadora a 45°C y se permitió que terminara su secado a temperatura ambiente, para desmoldarlo al día siguiente.

## 9.6 Caracterización del parche con microagujas

### 9.6.1 Microscopía electrónica de Barrido

Para estudiar la morfología y uniformidad de las microagujas se tomaron imágenes a distintos aumentos empleando un microscopio JEOL JSM-5910 (JEOL) a 20kV. A pesar de ser en su mayoría un material polimérico, se decidió no recubrir la muestra y únicamente esta fue adherida a una cinta de carbono para su observación.

#### 9.6.1.1 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos (EDS)

Simultáneamente se realizó un mapeo de los elementos característicos de la laponita y la magnetita empleando el sistema Oxford Aztec 100 acoplado al microscopio como descrito en secciones anteriores.

#### 9.6.2 Uniformidad de contenido de magnetita en el parche

La cuantificación de la magnetita se realizó de manera indirecta, haciendo la determinación del hierro total en la muestra. Para ello, se cuantifico el  $\text{Fe}^{3+}$  coordinado con  $\text{Cl}^-$  acorde a la metodología establecida por Torras, M et al., 2020<sup>135</sup>. En este, disoluciones de  $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en agua desionizada en un rango de 2.79 a 1.95 mg/L fueron preparadas. De cada una de estas disoluciones se tomó una alícuota de 500 $\mu\text{L}$  y se diluyeron en 2 mL de agua desionizada y 2 mL de HCl al 37%. Cada dilución se dejó incubando a temperatura ambiente durante 1 hora. Las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro UV-Vis, registrando el máximo a 348nm. Un total de 6 curvas fueron realizadas y medidas por tres días consecutivos, estas se presentan en el anexo 7. Por ello, las muestras fueron sellas con Parafilm® y guardadas en refrigeración hasta su siguiente uso. El blanco se preparó de igual manera que la curva, únicamente sustituyendo el volumen de la alícuota por un volumen igual de agua desionizada.

Una vez realizadas las curvas, la cuantificación de magnetita en cada parche con microagujas se llevó a cabo de la siguiente manera. Parches con microagujas de 1cm<sup>2</sup> de diámetro (n=6) se colocaron en tubos eppendorf y se les adicionó 500 $\mu\text{L}$

de agua desionizada. Las muestras fueron agitadas empleando un vortex a máxima potencia durante 15 segundos. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 6200rpm en una centrifuga (GmCLab) por 10 min. El sobrenadante fue retirado con ayuda de una micropipeta. Este proceso fue repetido tres veces en total para asegurar la completa remoción de la formulación polimérica. A continuación, se les adiciono 500µL de agua y 400µL de agua. Las muestras fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente para permitir la digestión de las nanopartículas. Al finalizar el período de incubación, las muestras fueron analizados en un espectrofotómetro UV-Vis.



## 10 Resultados

### 10.1 Estudio del sistema intercalado Laponita/Magnetita (L/M)

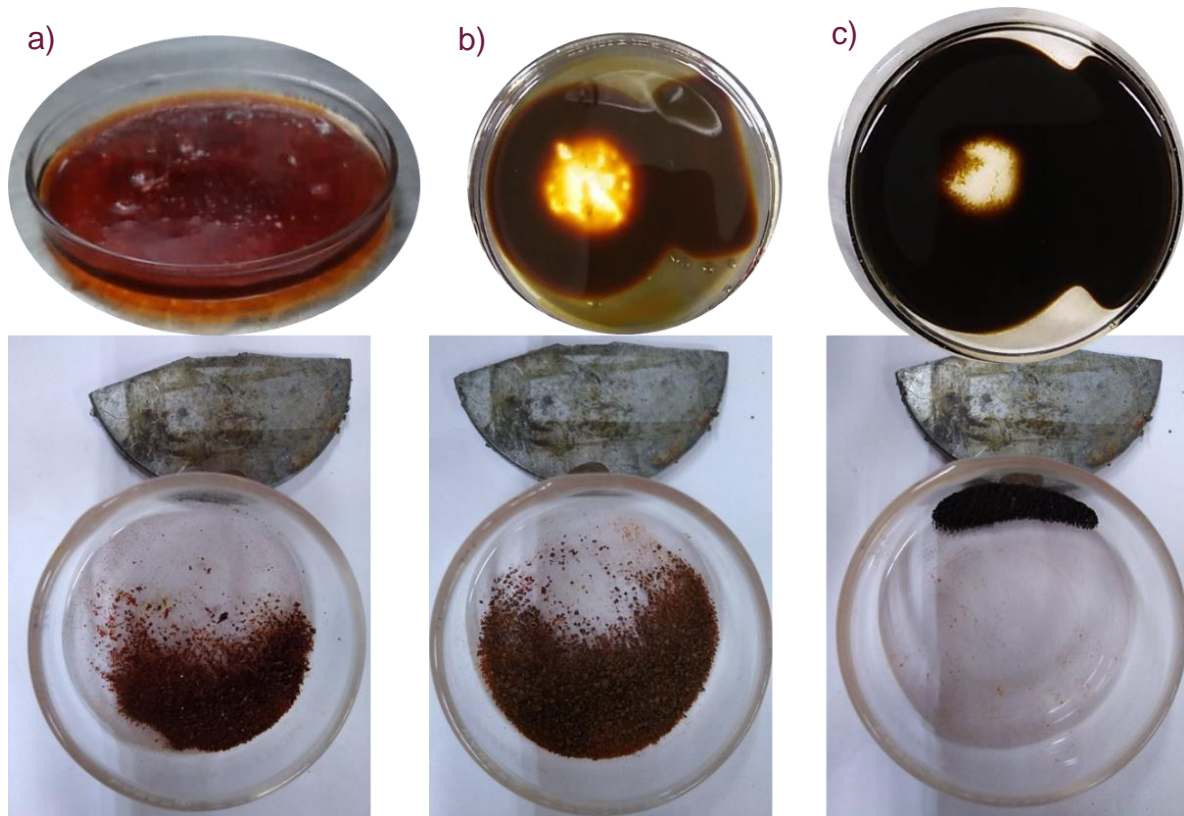
#### 10.1.1 Síntesis del sistema L/M

Para la síntesis de nanopartículas de magnetita en laponita se realizó una modificación al método de coprecipitación comúnmente empleado en la síntesis de este óxido de hierro. Esta metodología se eligió sobre otras por ser relativamente sencilla de realizar y reproducir, costo efectiva y de corto tiempo<sup>136</sup>. El producto obtenido se trata de un sistema tipo core-shell<sup>137</sup>, en el que la arcilla se encuentra soportando a las nanopartículas magnéticas.

La inmovilización de la magnetita en la laponita es posible debido a la interacción electrostática entre los nanodiscos y los cationes de hierro en el medio. La laponita es una arcilla que se dispersa rápidamente en agua. Esto da origen a una carga superficial positiva en los bordes y una carga superficial negativa en la cara de la arcilla. Al momento en que se da la adición de la disolución de sales de hierro, los cationes di y trivalentes de este metal se unen a la cara de la laponita. Una vez que se hace la adición de la base, la formación de los núcleos de magnetita puede darse tanto con los cationes libres en disolución como con aquellos en la superficie de la arcilla. De manera que la laponita funge como un centro de nucleación heterogénea y agente estabilizador una vez formado el núcleo.

Lo anterior tiene como implicación un posible efecto sobre los procesos de crecimiento que puedan gobernar sobre la formación de las nanopartículas de magnetita y por tanto un efecto sobre el tamaño final de las mismas y su distribución. Szabo, T. et al., 2007 han realizado estudios sobre el efecto de la síntesis de nanopartículas de óxido de hierro soportadas en arcillas; siendo estas factor en propiedades como la distribución del tamaño de partícula y el valor del mismo, entre otras<sup>124</sup>. No obstante, actualmente no existe mecanismo que permita explicar este efecto observado; no sólo para el crecimiento de las nanopartículas adsorbidas en arcillas, sino para la formación general de nanopartículas. Si bien el modelo de

LaMer provee una explicación basada en la teoría clásica de nucleación; esta propuesta para el proceso de crecimiento de nanopartículas requiere de un estudio a profundidad limitado por la instrumentación y técnicas disponibles que restringen su aplicación<sup>138, 139</sup>.



*Figura 12. Muestras húmedas (superior) y secas (inferior) a concentración de laponita de a) 2% b) 1% y c) 0.5% con una concentración de  $Fe^{3+}$  de 0.3 M*

Para la definición de los niveles de laponita a usar en el diseño de experimentos, se probaron suspensiones al 0.5, 1 y 2 % m/v de la arcilla con la disolución de  $Fe^{3+}$  en dos valores 0.3 y 0.03 M. En las seis pruebas, el producto resultante fue un sólido negro que presentaba una mayor suspensión a mayor concentración de laponita y, por tanto, una mayor resistencia a la decantación magnética. Las muestras al 2% de laponita fueron imposibles de separar de las aguas madres de la reacción, por consiguiente, el lavado de las muestras no se realizó y la remoción del agua tardó más de 24 horas con vacío. Estas muestras presentaron oxidación demostrado por un cambio de color inicial negro a un rojo tras la remoción del agua, además que el sólido recuperado no presentó ninguna respuesta magnética (fig 9a). La magnetita,

$\text{Fe}_3\text{O}_4$ , se describe como un sólido con respuesta magnética color negro-café oscuro; mientras que la hematita,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , otro óxido de hierro, se presenta como un sólido de color rojo ladrillo-café rojizo con nula respuesta ante la presencia de un imán<sup>140</sup>. Derivado de lo anterior, dicha concentración de laponita fue descartada.

Por su parte, la muestra con 0.03 M de Hierro y 1% de laponita presento problemas similares a los ya previamente descrito, no obstante, para esta muestra en específico el producto recuperado cambio de un color negro a un sólido café claro magnético (fig 9b). Dentro de las distintas fases que puede presentar el hierro se encuentra la maghemita,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , una fase de transición entre la magnetita y la hemátita que se distingue de ambas al presentarse como un sólido con un color café claro-café caramelo con respuesta magnética<sup>140</sup>. En este caso, como los anteriores, la gran capacidad de adsorción de agua exhibida por la laponita en combinación con el tratamiento térmico empleado para el secado del producto, llevo a la oxidación de la fase de hierro.

De esta manera, las tres muestras restantes fueron rápidas de separar y el producto recuperado fue un sólido negro que respondió al acercamiento de un imán. Calculando la proporción laponita/magnetita (L/M) de las muestras se obtuvo 1.9, 0.79 y 0.19 para las combinaciones 0.5% Laponita – 0.03M Fe, 1% Laponita – 0.3M Fe y 0.5% Laponita – 0.3 M Fe respectivamente. Por lo que se decidió por trabajar con proporciones de laponita/magnetita de 2 y 0.02 como nivel superior e inferior y concentración fija de  $\text{Fe}^{3+}$  de 0.05M. Estos son los niveles trabajados en el diseño de experimentos ya descrito (sección 9.1.2.1). Asegurando de esta manera obtener la fase deseada de hierro en todos los puntos del diseño evaluadas.

### *10.1.2 Optimización del tamaño de cristalito*

La gráfica de superficie-respuesta obtenida tras el diseño de experimentos de cara centrada al cubo realizado para la minimización del tamaño de las nanopartículas magnéticas se presenta en la siguiente figura. Los difractogramas y refinamientos de Rietveld mediante los que se obtuvo los resultados para generar la figura 13 se

encuentran en el anexo 1. Por su parte, la tabla de ANOVA, el modelo matemático generado y los estadísticos para el mismo se encuentran localizados en el Anexo 2.

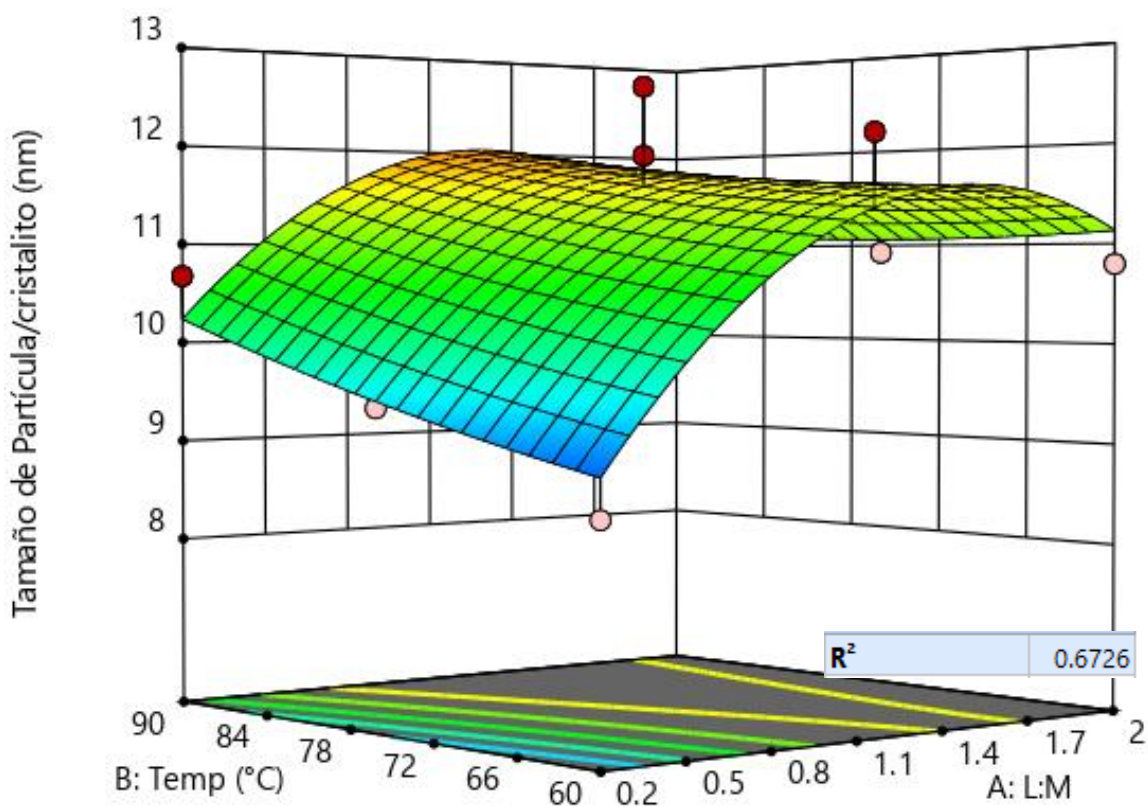


Figura 13. Gráfica de superficie respuesta para el tamaño de partícula/cristalito de la magnetita en el sistema LM

Acorde a esta gráfica, es posible observar que tanto el aumento de temperatura como el aumento de laponita en el medio conllevan a un mayor tamaño del cristalito de la magnetita. La relación entre la temperatura y el tamaño de partícula o cristalito se puede explicar por los procesos de crecimiento de Ostwald<sup>141</sup>. A una mayor temperatura la solubilidad límite aumenta, de manera tal que el proceso continuo de nucleación y disolución produce la formación de núcleos de mayor tamaño que tienden a la agregación. De manera general es conocido que la temperatura tiene un efecto directo sobre los procesos de nucleación y crecimiento<sup>142</sup>.

Por su parte, la superficie de respuesta generada presenta una curvatura que se origina principalmente por la variable de proporción Laponita/Magnetita. Puesto que

la concentración de la disolución de sales de hierro fue la misma para todos los experimentos, es posible decir que el comportamiento observado en la gráfica es principalmente derivado por la creciente adición de la arcilla en cada nivel estudiado. La laponita, como fue mencionado en la sección anterior, tiene una capacidad de intercambio de cationes que le permite la interacción con los cationes de hierro presentes en el medio independientemente de la carga de los mismos. Se ha observado que esta propiedad tiene efecto sobre los procesos de nucleación, crecimiento y migración, además se ha descrito que los procesos de nucleación gobiernan sobre los de crecimiento en la laponita<sup>124</sup>. Una vez que la densidad de carga superficial es igualada, la laponita deja de fungir como centro de nucleación y, por tanto, por arriba ese valor la formación de núcleos se ve guiado principalmente por los procesos de migración de cationes en el medio.

Basta decir que de lo observado en la gráfica de superficie-respuesta, la condición en la que se observa el mínimo de tamaño, 8.54nm, obtenido con los niveles de variables estudiados está a una proporción de 0.2 de Laponita/magnetita y una temperatura de 60°C. Esta fue la condición seleccionada para la caracterización siguiente del sistema. Esto debido a que el tamaño es importante para asegurar el comportamiento magnético y la biodegradación de la nanopartícula. Con respecto al magnetismo, de manera general para las nanopartículas de  $Fe_3O_4$ , un tamaño por debajo de 20nm<sup>51</sup> permite asegurar que estas serán superparamagnéticas a manera que funcionen como vectores para fármacos estímulo-sensible a la presencia de campos magnéticos al exhibir nula coercitividad y ninguna magnetización residual con alta magnetización ante la presencia de un campo magnético externo. O bien, al considerar su uso como agente antitumoral o agente de diagnóstico, el tamaño exhibe una relación proporcional con la tasa de absorción específica<sup>143</sup> que puede impactar negativamente sobre el empleo de SPIONS en el área biomédica. En cuanto a la biodegradación de este tipo de nanopartículas, se ha estudiado que la disminución de tamaño previene la formación de depósitos en el ojo, sin daño ni presencia de estas en tejidos oculares<sup>106</sup>.

## 10.2 Caracterización del Sistema L/M

### 10.2.1 Espectroscopia de Infrarrojo

El espectro de infrarrojo para la laponita, magnetita y sistema L/M obtenidos por la técnica de reflectancia total atenuada para estudiar las vibraciones de los enlaces en estos se presentan en la siguiente figura.

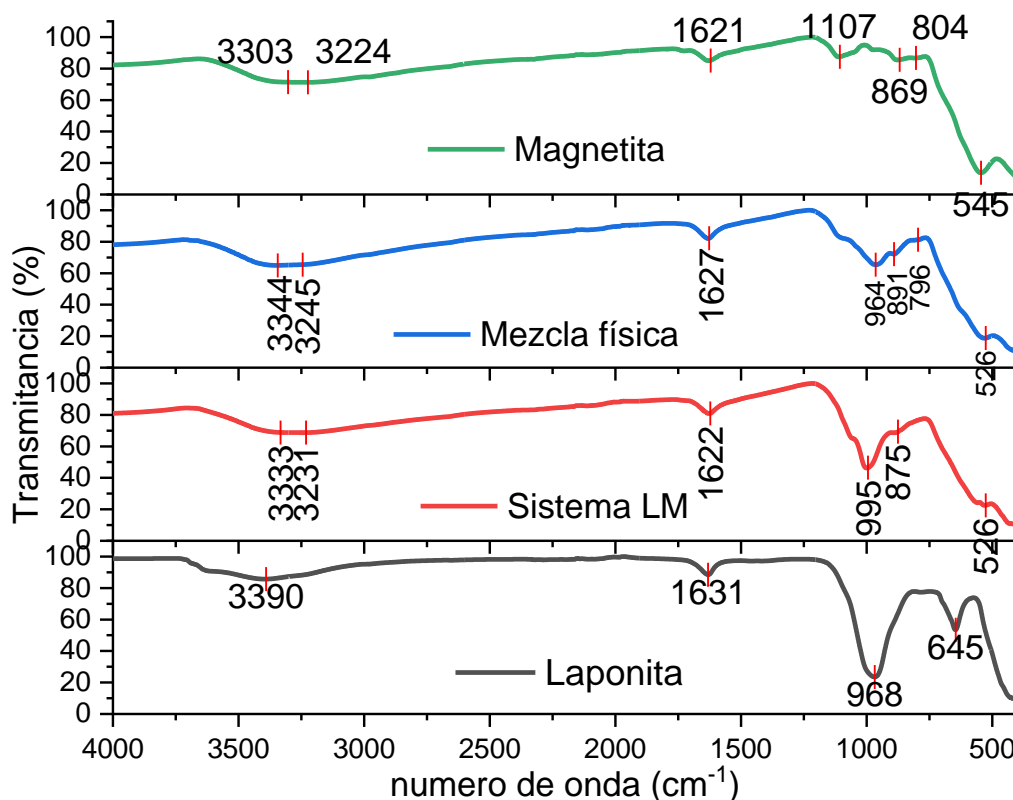


Figura 14. Espectro de infrarrojo de Laponita (negro), Sistema L/M (rojo), mezcla física (azul) y magnetita (verde).

Como es posible observar en la figura 14, en todas las muestras existe una banda alrededor de los  $3300\text{ cm}^{-1}$ . Dicha banda se presenta ensanchada, su forma característica pone en evidencia la presencia de agua superficial en ellas. Esta tiene origen por vibraciones de estiramiento de los enlaces O-H en la molécula del agua. En la magnetita, la banda en  $545\text{ cm}^{-1}$  corresponde a las vibraciones de estiramiento del enlace Fe-O, mientras que la banda en  $1107\text{ cm}^{-1}$  está relacionada con las vibraciones asimétricas del tipo oscilatorios de dicho enlace. Por su parte, el espectro de la laponita muestra sus bandas características. La banda a  $968\text{ cm}^{-1}$  se debe a con las vibraciones asimétricas de estiramiento que experimenta el enlace



Si-O; mientras que la banda en  $645\text{cm}^{-1}$  es resultado de las vibraciones de estiramiento de los enlaces Mg-O.

La presencia de las bandas características tanto para la laponita como para la magnetita se encuentran en la mezcla física como en el sistema L/M. Existe una interacción entre ambos tipos de estructuras inorgánicas puesto en evidencia por el desplazamiento de las señales características. No obstante, la intensidad de las bandas en el sistema L/M es mayor a las correspondientes en la mezcla física, esto puede indicar una mayor interacción entre la laponita y la magnética en el sistema L/M con respecto a la mezcla física. De manera general, el proceso de obtención del sistema L/M permite la recuperación de ambos por la interacción evidenciada en el espectro.

### *10.2.2 Difracción de rayos X de polvos*

La difracción de rayos X de polvos se empleó con el objetivo de estudiar el tamaño de cristalito y efecto sobre las fases de hierro atribuibles a la presencia de Laponita durante la síntesis de magnetita. El difractograma en cuestión para la laponita, la magnetita y el sistema L/M se presenta en la figura 15. Es importante mencionar que en este caso no se realizó el estudio de la mezcla física.

De acuerdo a lo observado en el difractograma, las señales correspondientes a los planos (001), (005), (200) y (060) de la laponita<sup>69, 71, 129, 132</sup> se encuentran localizados en  $5.6$ ,  $28.1^\circ$ ,  $34.7^\circ$  y  $60.7^\circ$  y con distancias interplanares ( $d$ ) calculadas de  $1.513\text{nm}$ ,  $0.3183\text{nm}$ ,  $0.2576\text{nm}$ ,  $0.1527\text{nm}$  respectivamente. Se observa de manera general para el grupo de las arcillas y minerales del grupo de las esmectitas que las bandas de orden superior, como en este caso la correspondiente al plano (060), son características y permite la diferenciación entre ellas<sup>58</sup>. La distancia interplanar de este plano corresponde con lo esperado para un esmectita trioctahédrica<sup>58, 144</sup>; adicionalmente lo encontrado para el resto de las señales para la laponita coinciden con lo previamente reportado por diversos autores<sup>69, 71, 129, 132</sup>. Aunque es importante hacer mención sobre las señales no marcadas, aun no existe una asignación

definitiva de los planos a estas y/o presentan diferencias en la literatura. No sólo eso, también existen estudios que mencionan que la laponita más que hacer referencia a un solo tipo de arcilla, acorde a los estudios de rayos X de polvos, se identifica como una mezcla de arcillas y se sugiere el uso de mezcla de filosilicatos Mg-Li en lugar de laponita<sup>129, 145</sup>. Por lo que el análisis de la laponita por esta técnica es de interés para un mejor entendimiento general de misma.

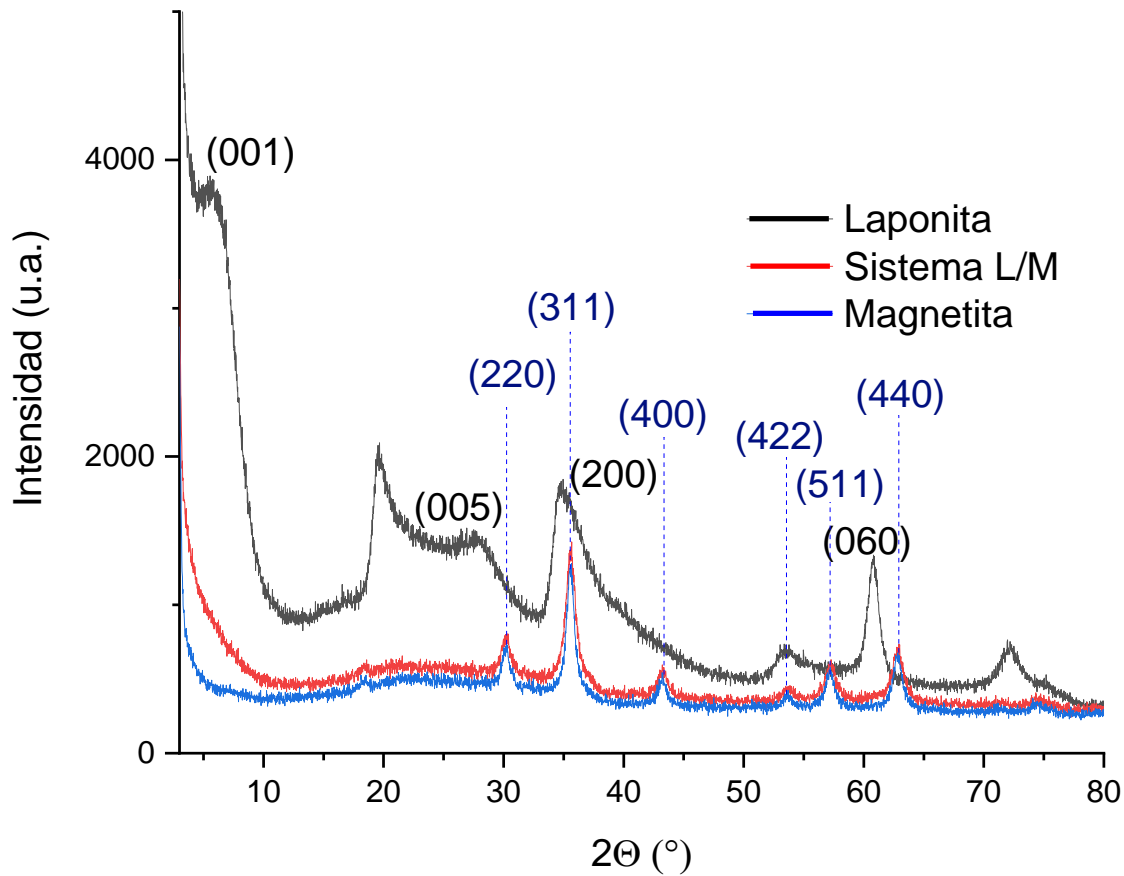
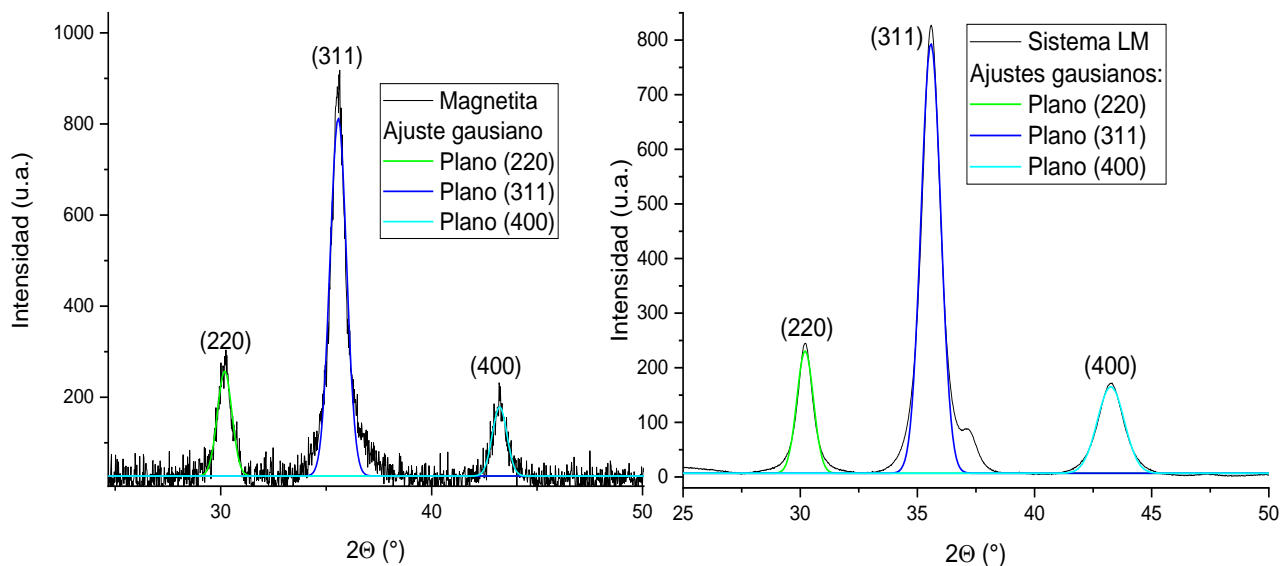


Figura 15. Difractograma de la laponita (negro), sistema L/M (rojo) y magnetita (azul)

Por su parte la magnetita fue correctamente identificada mediante las señales a 30.0°, 35.5°, 43.2° correspondientes a los planos (220), (311) y (400). Estas tres señales son las principales empleadas para su identificación, igualmente se presentan el resto de sus bandas como fue señalado en la figura 15. Con respecto al sistema elegido, el sistema LM presenta de manera clara las bandas correspondientes a la magnetita, no obstante, las señales de la arcilla se ven considerablemente disminuidas. Esto es principalmente derivado de la proporción



empleada y fue previamente observado en el diseño de experimentos, así como en experimentos previos como el reportado por Goncharuk, O. et al., 2020<sup>129</sup>.



*Figura 16. Bandas principales de la magnetita (izquierda) y sistemas LM tras refinamiento (derecho) con el respectivo ajuste gaussiano*

De las bandas principales (figura 16) ya mencionadas se obtuvo el tamaño promedio de partícula/cristalito para la magnetita empleando la ecuación de Scherrer. Se obtuvo un tamaño promedio para la magnetita sola e intercalada con laponita de 10.34 y 8.54nm respectivamente. Como se mencionó en la sección 10.1, la laponita actúa como centro de nucleación heterogénea para la formación de magnetita debido a su capacidad de intercambio de cationes derivado de la carga superficial negativa en su cara. Esto le confiere una capacidad de control sobre el tamaño que lleva a una reducción del mismo por su presencia. A pesar que, bajo las condiciones seleccionadas, la presencia de formación de núcleos en el medio también existe, este mecanismo se encuentra compitiendo con la formación de núcleos en la superficie de la arcilla.

### *10.2.3 Dispersión dinámica de Luz*

La dispersión dinámica de luz es una técnica que permite la determinación del tamaño de partícula de sistemas dispersos. De manera que se obtiene un tamaño

promedio del sistema y el valor del índice de polidispersión (PDI) del mismo. El equipo permite también la determinación del potencial Z de la muestra. Los resultados de estas determinaciones se presentan para la laponita, la magnetita y el sistema L/M en la tabla 9.

*Tabla 9. Resultado de tamaño, polidispersidad y potencial Z*

Material	Tamaño		
	hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
Magnetita	3727± 1148	0.273	9.71 ± 7.16
Sistema L/M	7272 ± 590.5	0.363	-23.1 ± 6.19
Laponita	102.7 ± 5.043	0.213	-21.5 ± 7.59

Acorde a estos resultados, la magnetita presenta un tamaño de partícula considerablemente mayor a lo esperado, fuera incluso del tamaño para ser consideradas nanopartículas. El resultado implica que la técnica empleada no es la adecuada para la determinación del tamaño de este tipo de nanopartículas. Esto ya que el potencial Z determinado para la magnetita tiende a la neutralidad y, por tanto, a la aglomeración del sistema, explicando así el tamaño obtenido. Es decir que realmente lo que se está midiendo son agregados de nanopartículas. Si bien el PDI observado es pequeño, es indicativo que los aglomerados de nanopartículas llegan a un tamaño mínimo relacionado con la minimización de su energía de superficie. Adicionalmente si bien la medición del potencial Z cumplió los requerimientos de calidad de la medición, la medición de tamaño no mostró esto incluso a diferentes condiciones estudiadas.

La laponita, por su parte, presenta de igual manera un tamaño promedio mayor al teórico con baja dispersión con valores acordes a lo reportado en la bibliografía<sup>128</sup>. Este material si bien no tiende a aglomerarse, forma estructuras complejas al suspenderse que podrían explicar el aumento de tamaño. Con respecto al sistema L/M, la intercalación de la magnetita se confirma tanto en el aumento del tamaño

medido, como en el cambio del potencial Z. Este a su vez tiene un valor aún más negativo, que el de la laponita misma, no obstante, no existe diferencia significativa entre ellos. La adición de la laponita, mejora la capacidad de suspensión de la magnetita, sin embargo, no es suficiente para prevenir su aglomeración. Mayor cantidad de laponita durante la síntesis apoya a la suspensión de las nanopartículas magnéticas como observado inicialmente en el estudio del proceso de síntesis (sección 10.1.1).

#### 10.2.4 Análisis térmico

##### 10.2.4.1 Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido se realizó para el estudio de las transiciones de primer y segundo orden que pudiesen suceder sobre el sistema generado. En la figura 17 se presenta el termograma correspondiente a esta prueba.

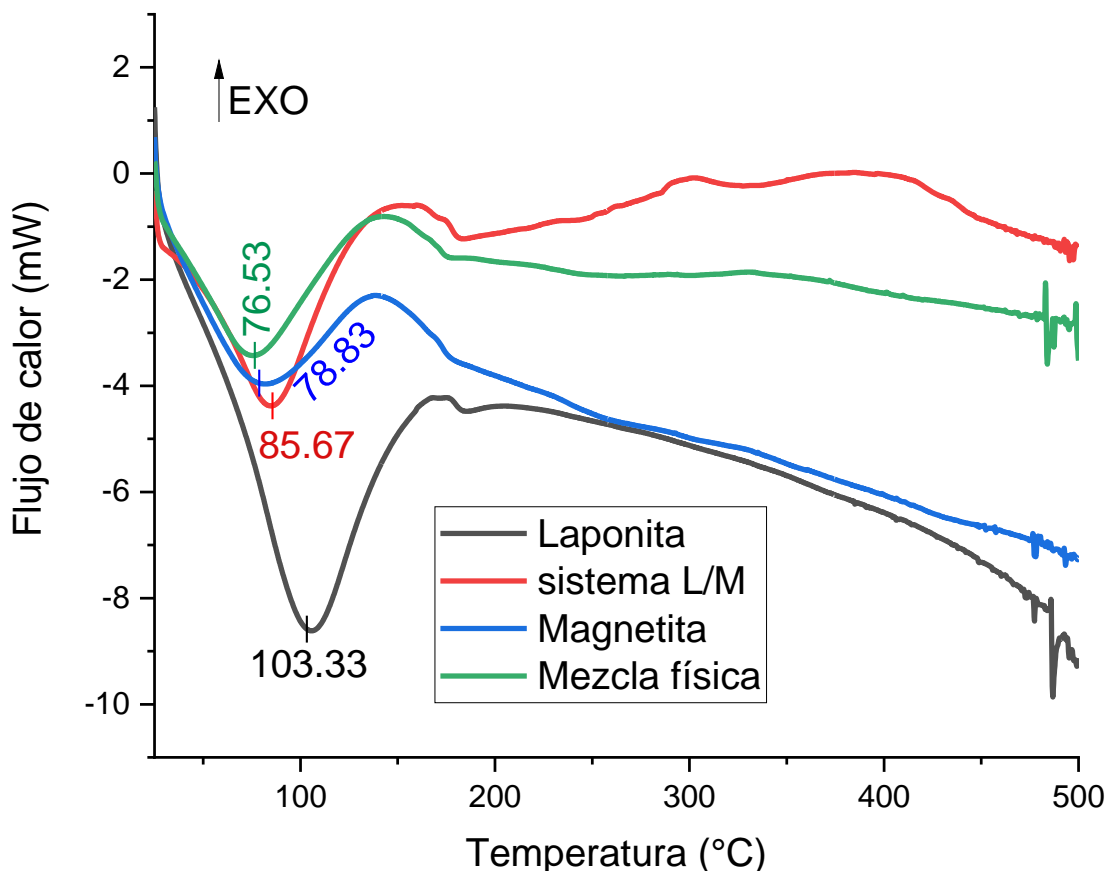


Figura 17. Termograma obtenido por calorimetría diferencial de barrido del sistema L/M, mezcla física, laponita y magnetita.

De la gráfica anterior, es posible decir que en el intervalo de temperaturas estudiado únicamente se aprecia una endoterma coincidente en todas las muestras analizadas. La endoterma más pronunciada en 103.3°C se presenta en la laponita, esto aunado principalmente a la alta hidrofiliicidad que tiene este material, como es común en este tipo de arcillas<sup>108</sup>. Por su parte, la endoterma de la magnetita y la mezcla física de polvos se presenta a temperaturas similares, 76.5°C y 78.8°C respectivamente, donde el cambio de temperatura se relaciona principalmente con la adición de la laponita quien se relaciona con mayor afinidad al agua. Por su parte, el sistema L/M también presenta la liberación de agua fisisorbida a una mayor temperatura, 85.6°C, y es ligeramente mayor en intensidad a las anteriores. De manera general, la transición térmica observada se relaciona con la liberación de agua fisisorbida en todos los sistemas. Por lo que, es posible decir que el agua se encuentra interaccionando tanto con la laponita como con la magnetita con una mayor fuerza en el sistema L/M que lo mostrado por la mezcla de polvos. Esto implica un aumento en la hidrofiliicidad de las nanopartículas, como fue observado previamente en el trabajo de Aguiar, A.S. et al., 2020<sup>67</sup>. Esto es positivo, ya que el sistema se piensa incorporar a una base pelicular polimérica que emplea agua como disolvente. De manera tal, que esto ayuda a la distribución y dispersión del sistema L/M en dicha mezcla. Adicionalmente, al no haber ninguna transición en el rango de temperaturas estudiado se confirma la estabilidad térmica del sistema. Cabe notar, que existente otras transiciones presentes cercanas a los 300°C que corresponde a la oxidación de la magnetita a maghemita<sup>146</sup>. Aunque el estudio de estas se ve complicado por la velocidad de calentamiento.

#### *10.2.4.2 Termogravimetría*

A manera de ayudar a la comprensión de los cambios con respecto a la temperatura que experimenta el sistema se realizaron los estudios de termogravimetría. Los resultados de este análisis se presentan en la figura 18. Es posible observar una primera pérdida de masa en los tres sistemas analizados. La laponita posee una pérdida de peso del 15.5% en un rango de temperatura de 25 a 100°C con la pérdida

máxima en 64.6°C. La magnetita exhibe la menor pérdida de peso de las tres muestras analizadas, perdiendo menos del 5% de su masa en el mismo rango de temperatura que la arcilla con una pérdida máxima a los 43.6°C. Por último, el sistema L/M presenta una pérdida de peso del 7%, mayor que el sistema sin laponita, en el mismo rango de tiempo que las dos anteriores con una pérdida máxima a 49.3°C. Estas pérdidas de peso observadas únicamente se relacionan con la liberación de agua fisisorbida, siendo mayor en la laponita por su hidrofiliidad. Su presencia en el sistema L/M mejora la hidrofiliidad del mismo como previamente mencionado. Con esto, es posible confirmar lo observado en la calorimetría diferencial de barrido.

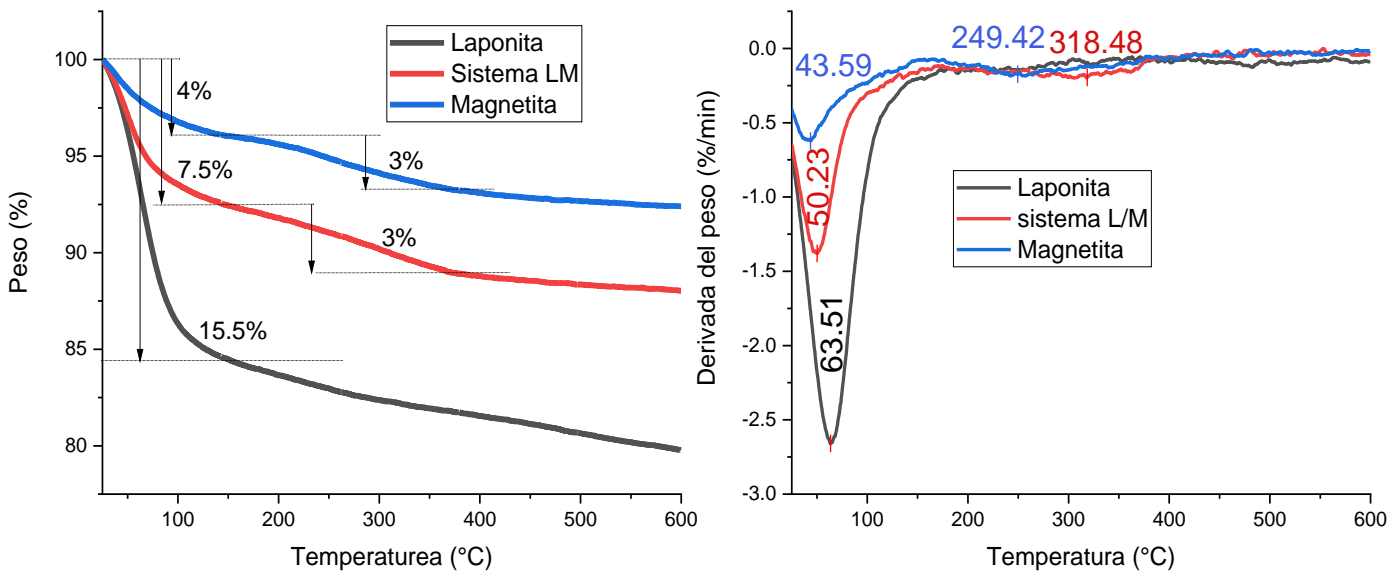


Figura 18. Termograma de la laponita, magnetita y sistema L/M con respecto a, que corresponde la pérdida porcentual de peso (izquierda) y la primera derivada con respecto de esta con respecto al tiempo (derecha)

En el caso de la magnetita y el sistema L/M ambos presentan una segunda pérdida de masa, no muy evidente por la velocidad de calentamiento empleada, que va en un rango de 150 a 370°C correspondientes a oxidación de la magnetita a la maghemita. Esto coincide con lo previamente reportado para la magnetita<sup>146</sup>. Se observa un desplazamiento del máximo de temperatura al que ocurre esta pérdida de masa a una temperatura más alta en el sistema L/M. Lo cual indica que la laponita provee una protección frente a la oxidación de la magnetita, efecto comúnmente

observado en la laponita. Desafortunadamente, no fue posible observar esta transición en la calorimetría diferencial de barrido. Esto puede pasar de acuerdo a la proporción de maghemita que se haya formado<sup>147</sup>. Lo cual es dependiente de la temperatura, la cantidad de oxígeno y el tiempo de calentamiento<sup>146</sup>.

#### *10.2.5 Microscopía electrónica de barrido*

Se realizó la microscopía electrónica de barrido a la laponita, magnetita y sistema L/M. Las imágenes correspondientes a estas muestras se presentan en la figura 19. A primera vista y en el menor acercamiento (imágenes a la izquierda en la figura 16), la distinción entre los tres polvos analizados no es inmediata. Todas las muestras exhiben una distribución heterogénea de los tamaños de su población. Esto se debe a la formación de agregados de nanopartículas, cuya unión ocurre como consecuencia de la disminución de la energía superficial de estas partículas. A pesar de lo anterior, la muestra del sistema L/M (figura 19 c) presentó la menor heterogeneidad de sus aglomerados, esto indica que la formación de la estructura de intercalación entre laponita y magnetita permite disminuir la energía superficial del sistema y por tanto controlar la formación de cúmulos. Siendo lo anterior la principal razón por la que se sintetizó este tipo de estructura.

A un mayor acercamiento (imágenes a la derecha en la figura 19), la laponita (figura 19b) presenta el mayor tamaño de las tres muestras. Esto es acorde con el hecho que sus aglomerados están compuestos de únicamente partículas con el mayor tamaño de los sistemas estudiados, nanodiscos de 25nm de largo y 1 nm de ancho. Por su parte, la magnetita está compuesta de aglomerados de nanopartículas de menor tamaño con un tamaño promedio de 10nm de radio (de acuerdo a lo observado en los estudios de difracción de rayos X). Con respecto al sistemas L/M, su población presenta aglomerados de tamaño medio como es esperado para un sistema particulado que conjunta ambos tipos de nanopartículas en el.



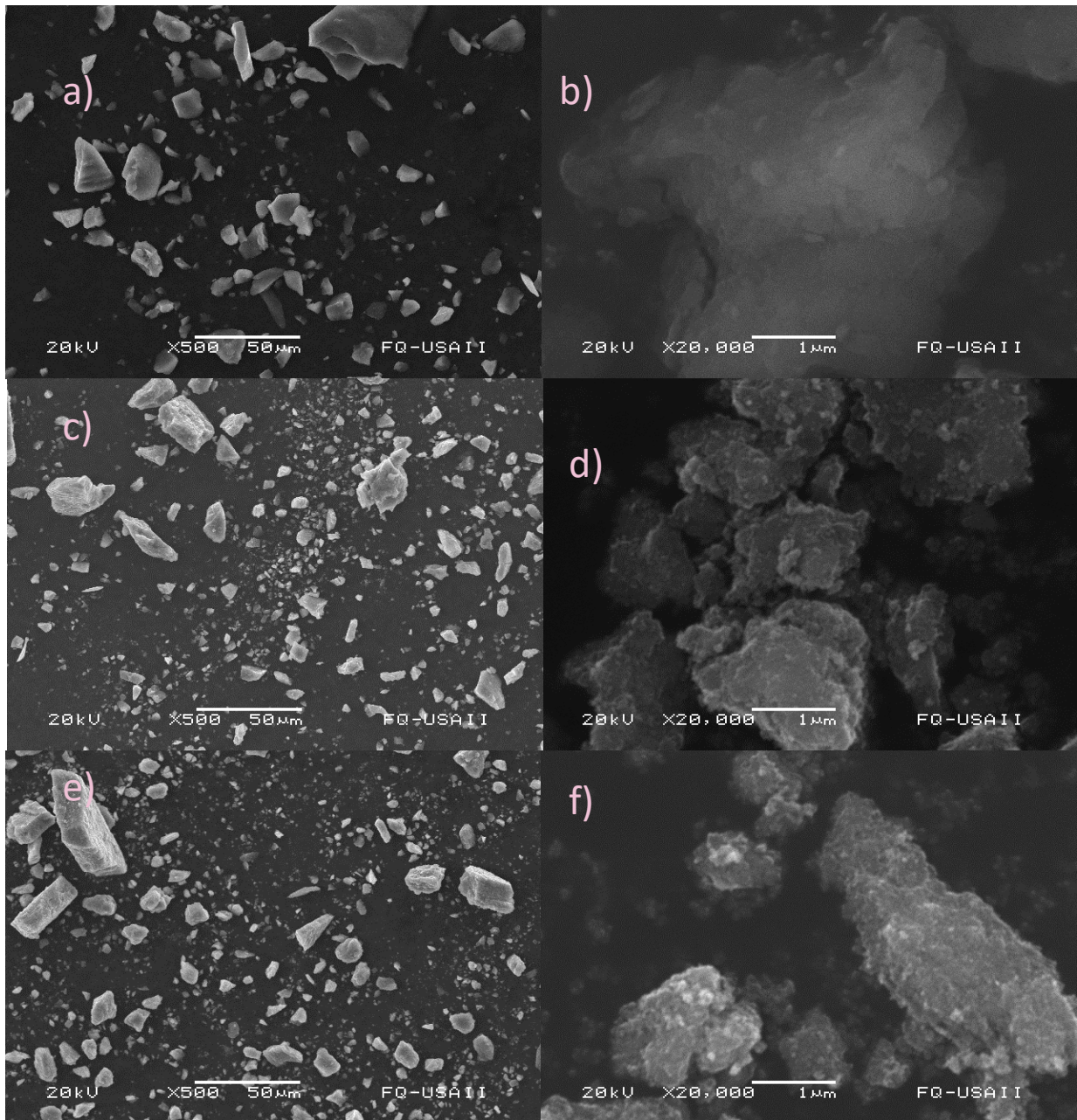


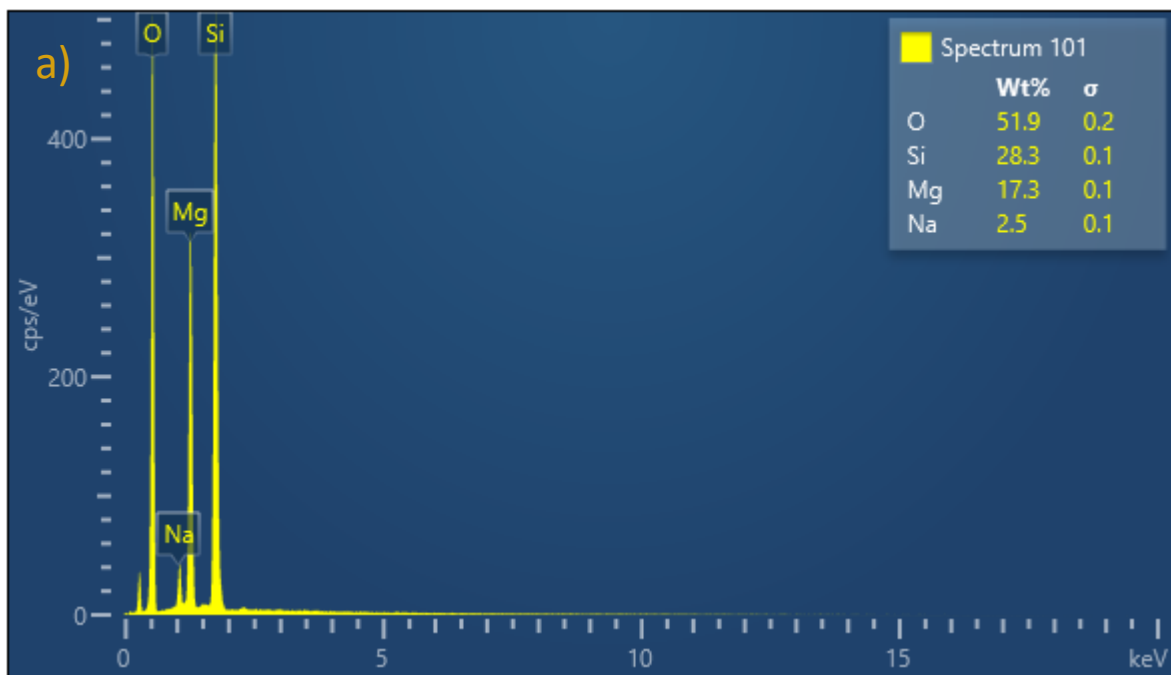
Figura 19. Imágenes de SEM de laponita ( a ) y b ) , sistema L/M ( c ) y d ) ) y magnetita ( e ) y f ) a dos distintos aumentos.

Adicional a esto, existe un cambio de textura en los aglomerados de las tres muestras. La laponita muestra la formación de paquetes que se acomodan paralelos entre sí, congruente con su forma, que da la aparición de una textura que simula la formación de capas. La magnetita se observa con una textura granulada proveniente de la unión de varias nanopartículas esféricas. Esta textura se conserva

en el sistema L/M, no obstante, no es tan evidente como en el anterior, debido a la presencia de nanodiscos que previenen el acomodo de las nanopartículas que da origen a este tipo de textura. El cambio en la textura, la formación de aglomerados de tamaño intermedio y la mejora de la distribución de tamaños de su población observada en el sistema L/M pueden ser consideradas como evidencia de la formación del sistema intercalado.

#### 10.2.5.1 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos (EDS)

Durante la observación al microscopio electrónico de barrido se da la producción de rayos X característicos que permiten realizar un estudio de la composición elemental de las muestras observadas. En la figura 20 se presentan los resultados del análisis semicuantitativo de los elementos representativos de la magnetita y la laponita.





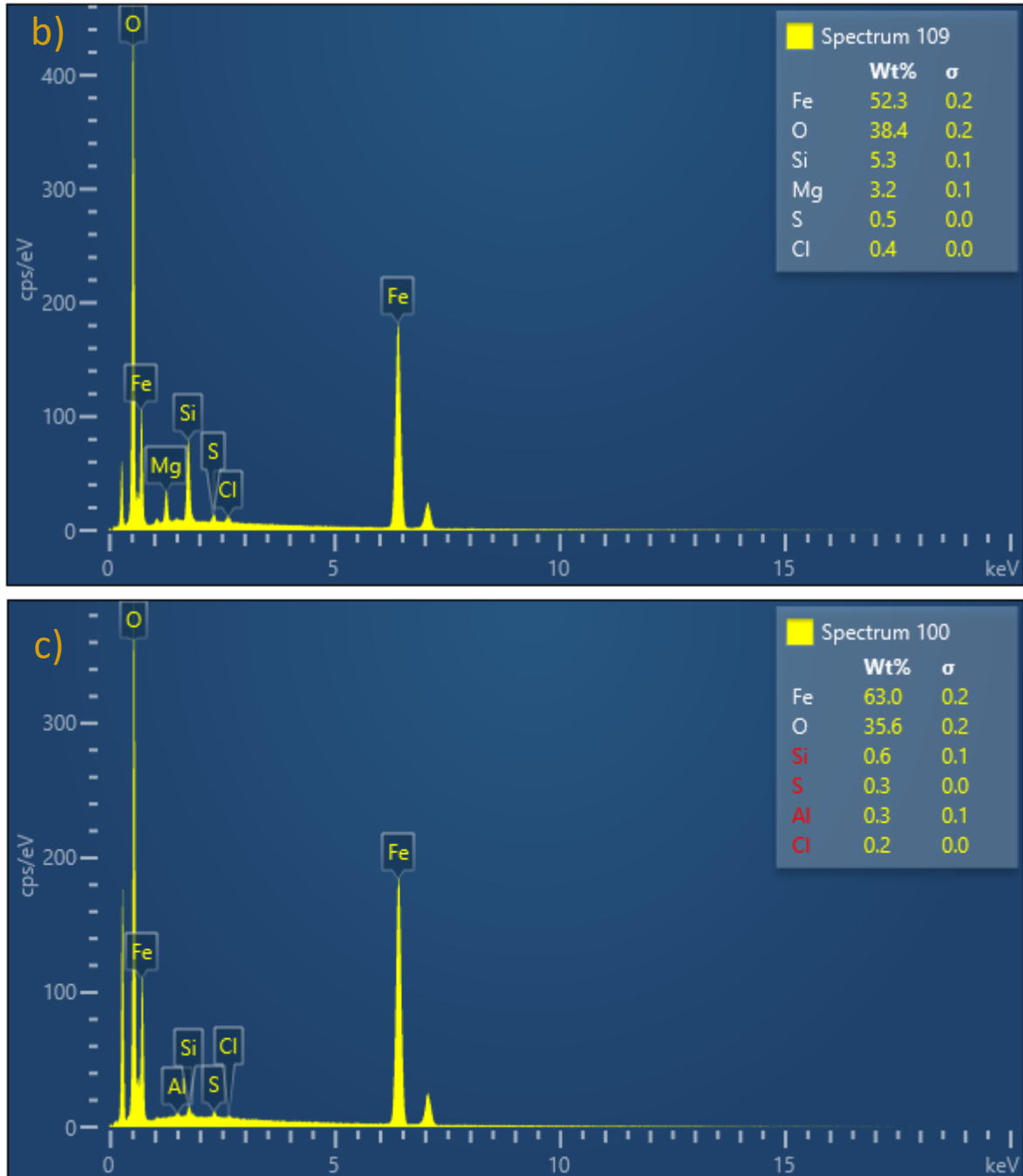


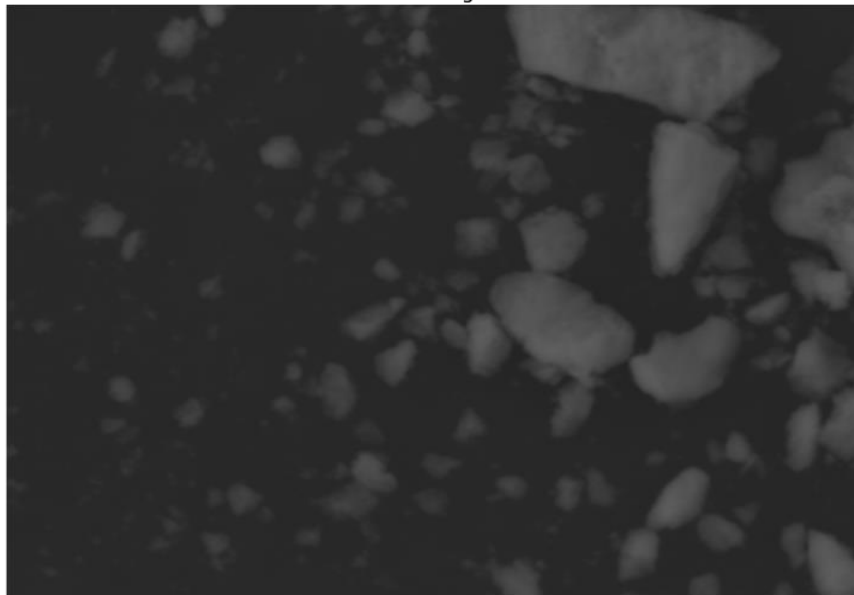
Figura 20. Resultados del análisis cuantitativo elemental por EDS de a) Laponita, b) sistema L/M y c) magnetita.

Acorde a las gráficas presentadas, se observa en la laponita únicamente la presencia de los elementos que le componen, como lo son el silicio y el magnesio. La magnetita muestra existencia de hierro y oxígeno en mayor media como es esperado para dicho óxido, no obstante, se observa la presencia de cantidades

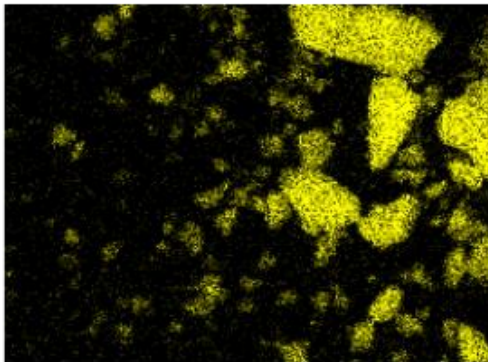
bajas de átomos relacionados con la laponita que pueden explicarse como contaminación durante la preparación de la muestra. En el sistema L/M, los elementos indicativos de tanto la arcilla como el óxido de hierro se encuentran presentes. En específico se observa un aumento considerable de los elementos de la arcilla con respecto a lo observado en la magnetita, por lo que su presencia en la muestra como contaminación queda descartada.

Para el sistema L/M se realizó un mapeo elemental en distintas zonas de la muestra. Estos resultados están presentados en la figura 21, en la que se observa que elementos representativos de la magnetita y laponita se encuentran distribuidos uniformemente en la muestra, confirmando de esta manera la formación del intercalado. Existen partes de la muestra donde únicamente se ubican los elementos relacionados con la presencia de magnetita, las cuales pueden ser resultado de nanopartículas sueltas de este óxido de hierro originadas en la síntesis o bien, por producto de la separación de la arcilla durante la preparación de la muestra para la microscopía.

Electron Image 30

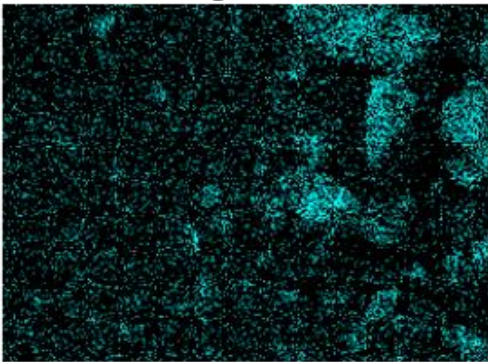


10µm Fe Kα1



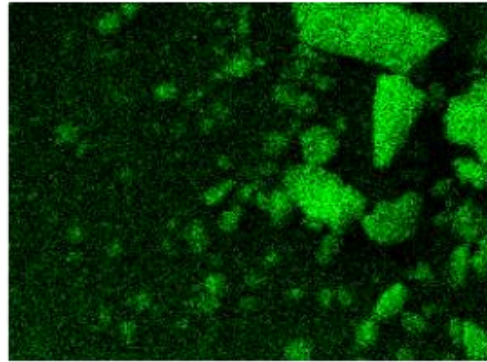
10µm

Mg Kα1\_2



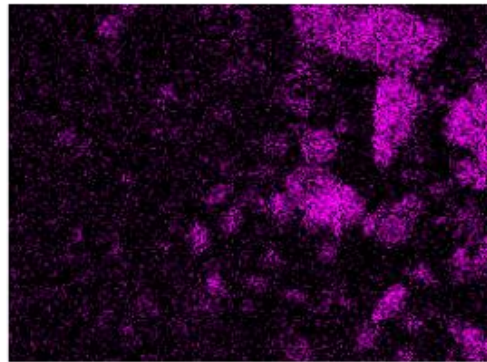
10µm

O Kα1



10µm

Si Kα1



10µm

Figura 21. Distribución de los elementos indicativos de magnetita y laponita en el sistema L/M

### 10.2.6 Microscopía electrónica de transmisión

La microscopía electrónica de transmisión permitió estudiar la distribución de tamaño y forma de las nanopartículas sintetizadas; así como determinar la distancia interplanar de las fases de hierro presentes, a partir del análisis de las imágenes obtenidas. Dichas imágenes se presentan en la figura 22. En éstas las nanopartículas se observan esféricas formando aglomerados. Contrario a lo esperado, a pesar que se muestra la presencia de laponita en el sistema L/M (figura 22b), esto no impide la formación de aglomerados como esperado, a pesar de que se observa interaccionando con las nanopartículas de magnetita.

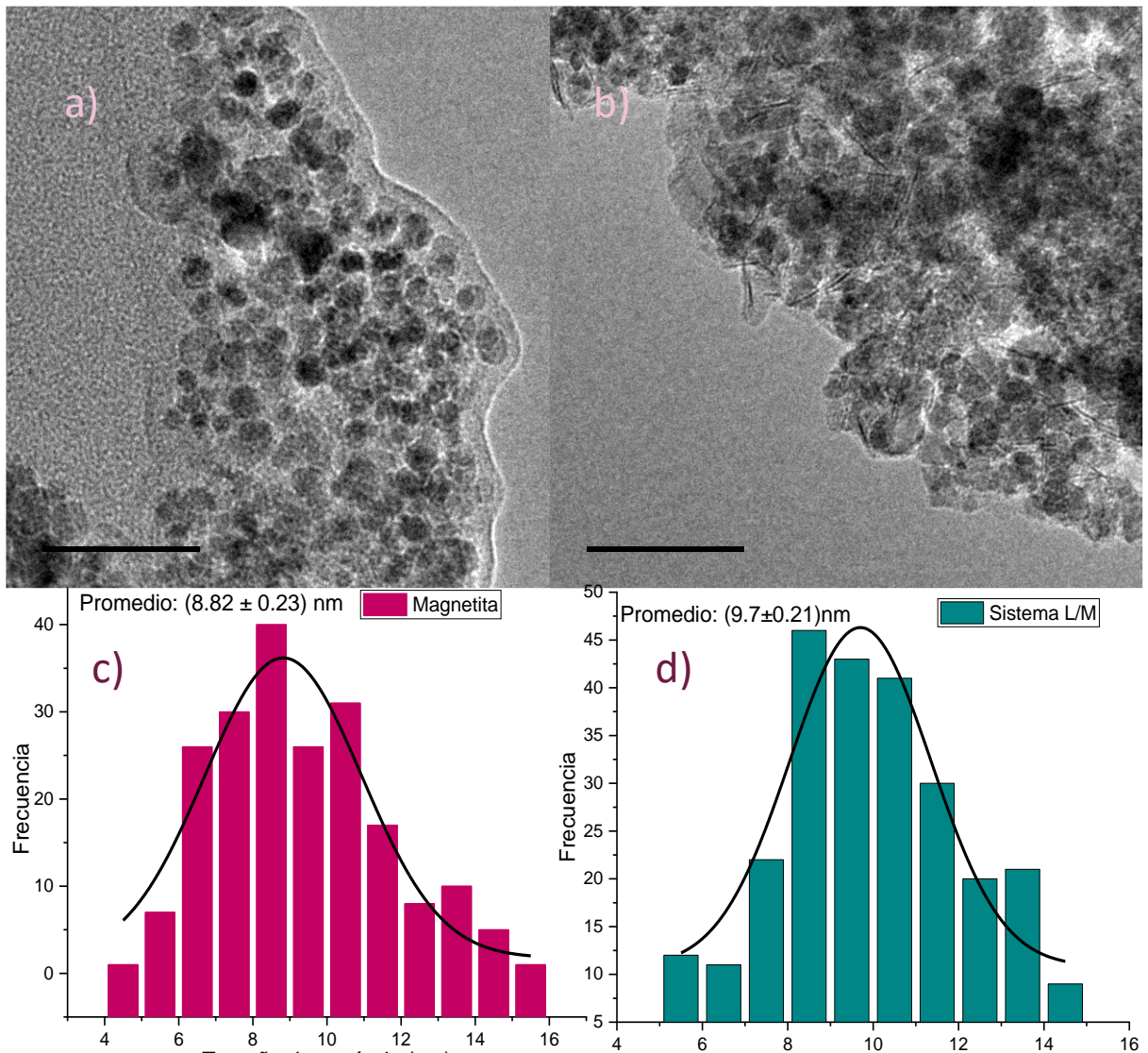


Figura 22. Microscopías y distribución de tamaño con ajuste gaussiano de magnetita (a y c) y del sistema L/M (b y d)

Lo anterior puede deberse a que la cantidad de magnetita presente no es suficiente para que sus interacciones interpartícula superen a las correspondientes entre nanopartículas magnéticas. Esto era de esperarse tomando en consideración lo observado en los estudios previos realizados sobre el establecimiento de las condiciones para la síntesis. Por lo que para poder observar de mejor manera el efecto de la laponita como agente estabilizante, este requiere aumentar la cantidad presente en el medio y, por tanto, se requiere de evaluar métodos de separación y secado que permitan la recuperación del sistema de manera óptima. Es decir, en el menor tiempo posible y evite el cambio de fase observado en las nanopartículas magnéticas.

Sobre la distribución de tamaño, la magnetita sintetizada en ausencia de la arcilla presenta un tamaño promedio de  $8.82 \pm 0.23$  nm determinado por el ajuste gaussiano; menor a los  $9.7 \pm 0.2$  nm de las nanopartículas en el sistema L/M, resultados similares fueron observados por Ding, L. et al., 2016<sup>128</sup>. Dicho resultado contradice a lo calculado a partir de los difractogramas (sección 10.2.2). Cabe resaltar que la distribución de tamaño obtenida a partir de las imágenes de microscopia es resultado de determinaciones manuales susceptibles a sesgo por parte del operador, lo cual en consecuencia puede afectar el resultado final. El tamaño promedio de las nanopartículas también fue determinado a partir del conteo individual con el que se obtuvo la distribución. De esta manera, las nanopartículas sin y con laponita tienen un tamaño promedio de  $9.24 \pm 2.22$  nm y  $9.95 \pm 2.24$  nm, respectivamente. Este último resultado implica que no hay diferencia significativa por la adición de laponita en el tamaño promedio de las partículas.

Por su parte, en la figura 23 se muestran imágenes de microscopia señalizando las distancias interplanares determinadas a partir de las gráficas de perfil (anexo 3 y 4). A partir de estas distancias es posible hacer identificación de las fases que componen las nanopartículas. Para la figura 23a, las distancia promedio por 10 planos de 0.296, 0.253 y 0.245 nm corresponden a los planos (220), (311) y (222) de la magnetita<sup>148</sup>.



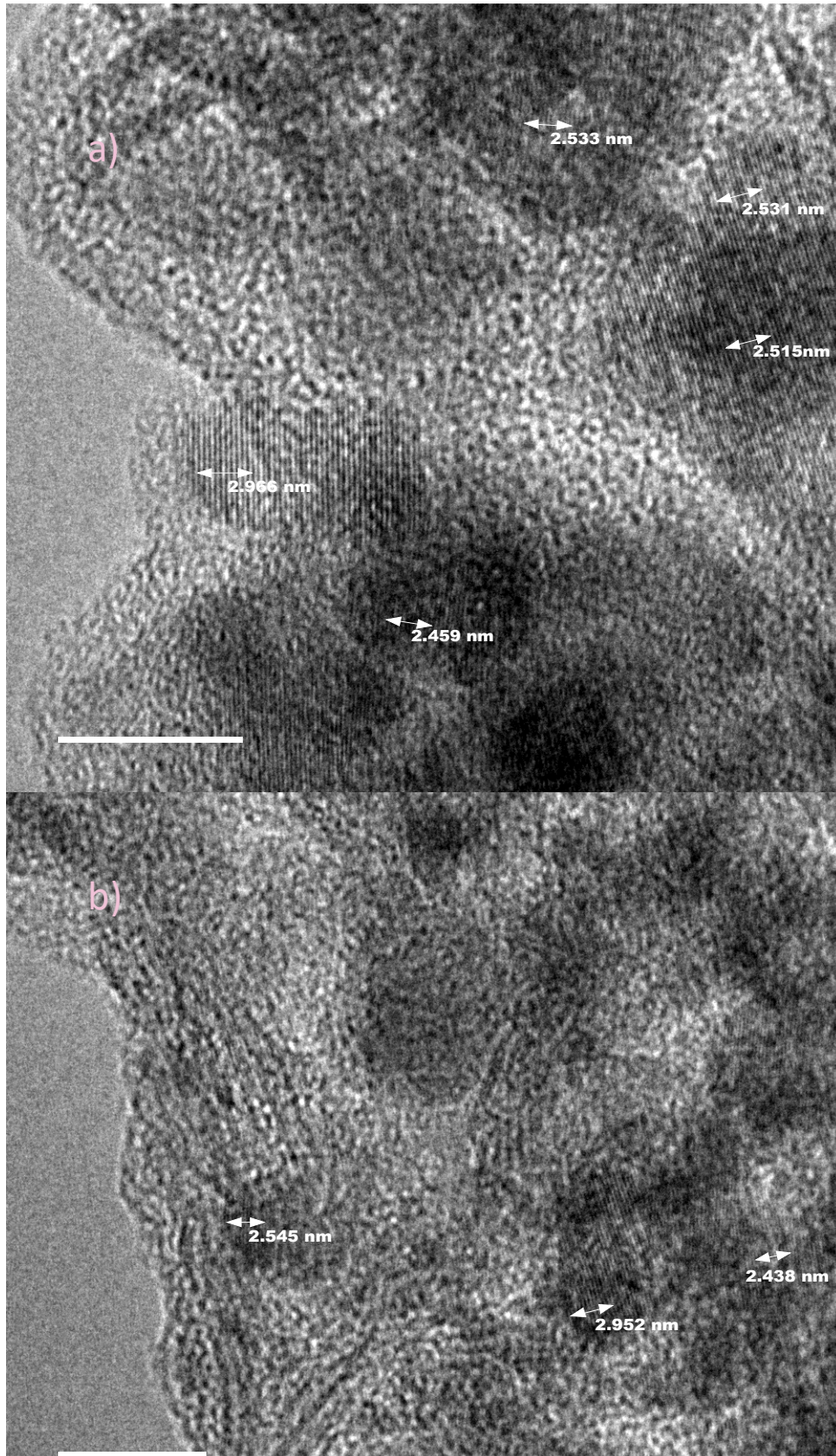
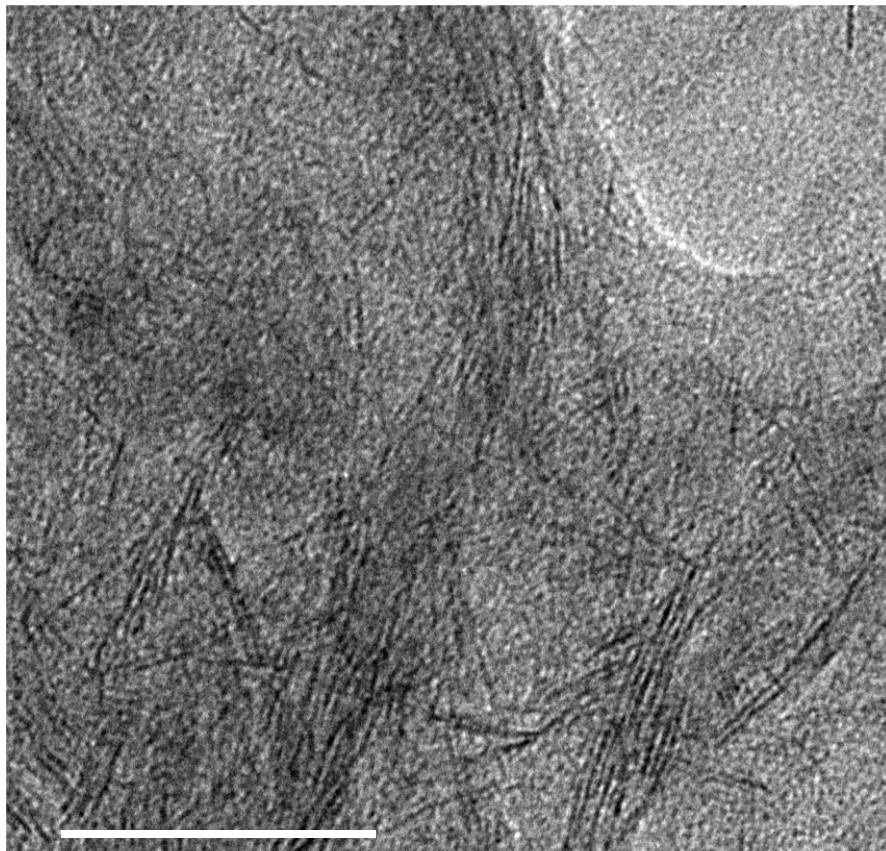


Figura 23. Microscopias de a) magnetita y b) sistema L/M mostrando la distancia interplanar

No obstante, en la misma muestra se exhibe la presencia de maghemita, ya que se obtuvo distancia interplanar de 0.251nm correspondiente al plano (311) de este óxido<sup>148</sup>. Su presencia se debe a la oxidación de la muestra, la cual puede estar relacionada con el tiempo y condiciones de almacenamiento previo a su observación al microscopio. Por su parte, las nanopartículas en el sistema L/M (fig. 20b) presentan distancias interplanares asociadas a la magnetita (0.254nm, plano (311) y 0.243nm, plano (222)) y maghemita (0.295nm, plano (220))<sup>148</sup>.

La microscopia correspondiente a la laponita (fig. 24) muestra que, a pesar de ser discos, estos comúnmente se observan como filamentos al momento en que su plano basal se encuentra colocado paralelo al haz de electrones<sup>149, 150</sup>. Adicional al hecho, que llegan a observarse estructuras tipo tactoides apilados de manera paralela entre si, de dos o más unidades<sup>151</sup>. De igual manera, la laponita da paso a la formación de una estructura reticular<sup>152</sup> sobre la rejilla de observación derivado de la formación previa de un gel durante la preparación de la muestra.



*Figura 24. Imagen obtenida por TEM de la laponita*



### 10.2.7 Adsorción de $N_2$

Las isothermas de adsorción de nitrógeno permiten evaluar la textura de las nanopartículas. Las gráficas de adsorción y desorción de las muestras estudiadas se presentan en la figura 25. La magnetita muestra rápida saturación que se mantiene estable y posteriormente crece rápidamente, mientras que la desorción presenta una pequeña meseta con una rápida disminución. Esto indica que las nanopartículas sintetizadas tiene un comportamiento congruente con una isoterma tipo IV, mostrando el comportamiento de un material mesoporoso, similar a lo reportado para nanopartículas de magnetita sintetizadas por coprecipitación<sup>153</sup>.

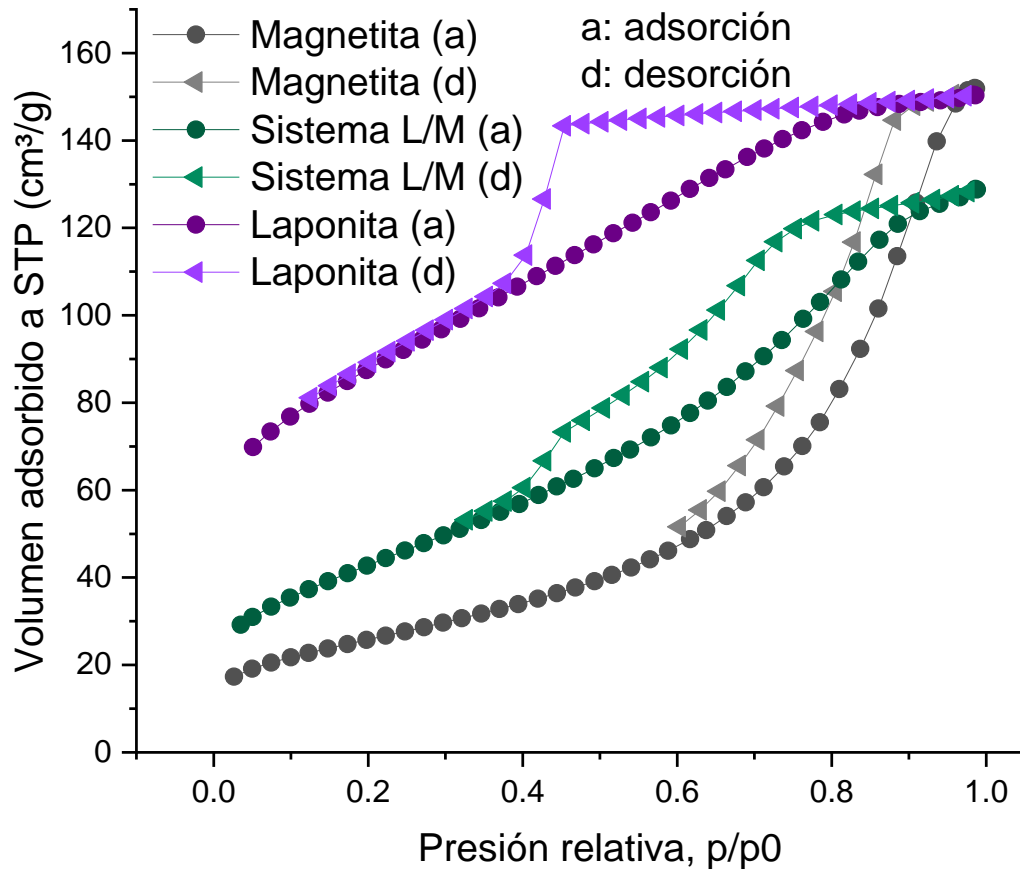


Figura 25. Gráficas de adsorción/desorción de  $N_2$

Por su parte la laponita, muestra una saturación casi inmediata que sigue de manera continua hasta un máximo, esto es congruente con una adsorción tipo IV con una desorción que forma un lazo de histéresis tipo H2<sup>154</sup>. Este comportamiento se atribuye principalmente a los poros interlaminares presentes en los cúmulos del



material como previamente reportado<sup>155</sup>. Por último, en el sistema L/M, se observa que la presencia de la laponita aumenta la cantidad de gas que es capaz de adsorberse sin modificar el tipo de isoterma. No obstante, la rama de desorción cambia a un tipo de lazo de histéresis H5. Esta habla de un material que posee poros parcialmente bloqueados y abiertos simultáneamente<sup>154</sup>. Si bien este comportamiento es poco usual, en este caso se presenta por la conjunción de la magnetita con la laponita. Es posible proponer con estos resultados el empleo del intercalado como nanoacarreador de fármacos.

### 10.3 Estudio de las películas formadoras del parche

#### 10.3.1 Proceso de fabricación de las películas de alginato

La fabricación de las películas podemos dividir las en dos cuestiones clave, una correspondiente a la formulación y otra dedicada al proceso, que impactan directamente sobre las características finales de las películas producidas. Con respecto a la formulación, esta debe atender a las necesidades para lo que será empleada; con motivo de esto en la tabla 10 están enlistados los componentes generales de las formulaciones estudiadas, así como la función de los mismos dentro de ellas.

*Tabla 10. Formulación general de las películas evaluadas*

Componente	Función
Alginato de sodio	Agente formador de película
Laponita	Agente de refuerzo
Maltosa	Agente osmótico y de refuerzo
Cloruro de calcio	Agente intercalador
Glicerol	plastificante
Agua	Disolvente

El alginato de sodio se seleccionó por su biodegradabilidad y mucoadhesividad que favorecen su residencia al colocarle en el ojo, así como facilidad para trabajar y

llevar a cabo su intercalación, además de ser costo-efectivo<sup>156</sup>. Acerca de la adición de maltosa, ésta actúa como un agente con función dual, permite la simplificación de la formulación, adicional al hecho de haber sido previamente estudiada en combinación con el alginato para la fabricación de microagujas mostrando buenos resultados<sup>32</sup>. La laponita de igual manera se utilizó para intentar aumentar la dureza de las películas, además de ayudar a la mejoría en diversas características de películas. Por su parte, la adición de cloruro de calcio atiende al hecho de ser un excelente intercalador de las sales de alginato a partir de la coordinación de los cationes de calcio con los grupos carboxilos de  $\alpha$ -L-guluronatos en dicho polímero. Dando la formación de dímeros cuya estructura se conoce como “estructura caja de huevos” (fig. 26) que le permite llevar a cabo el proceso de gelación<sup>157</sup>. La cantidad de cloruro de calcio, laponita y glicerol fueron estudiados como los factores dentro del diseño de experimentos posterior al tener un impacto directo sobre las propiedades mecánicas de la película. Los niveles fueron definidos a partir de consideraciones experimentales y revisión. Si bien la maltosa también posee un efecto sobre dichas propiedades, se decidió mantener este componente en una cantidad fija ya que su principal función en la formulación es la de agente osmótico.

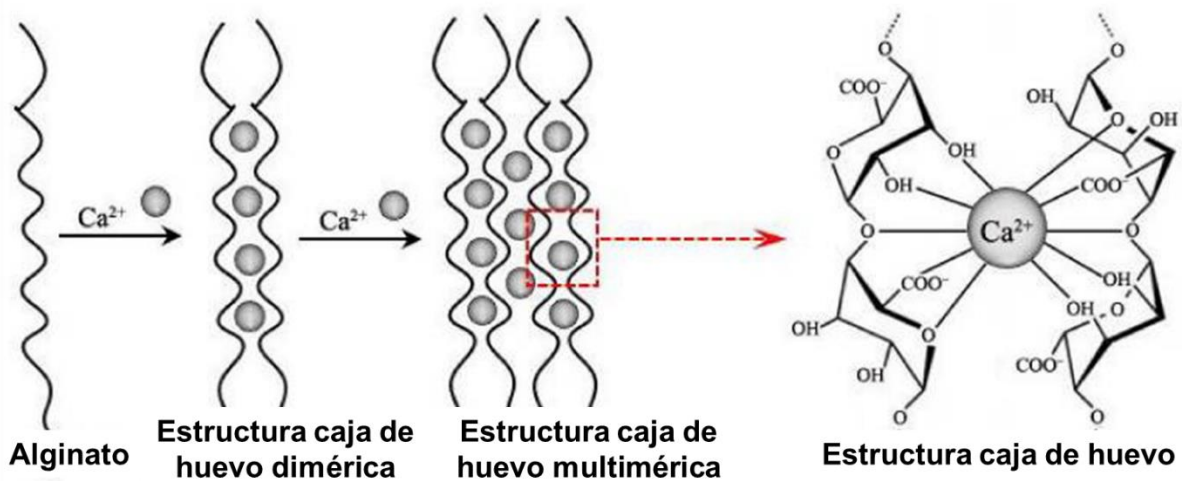
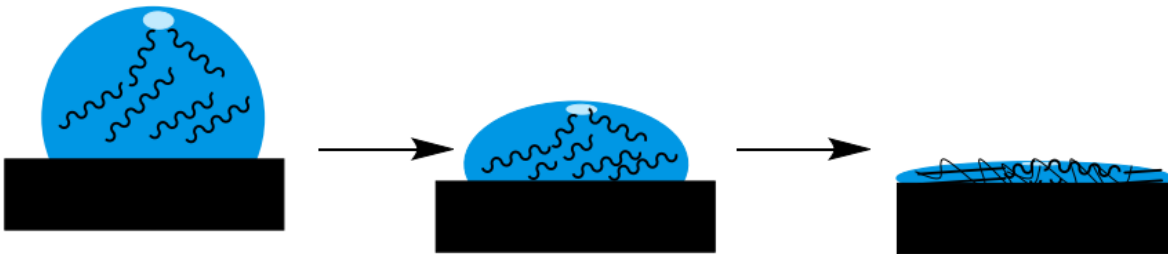


Figura 26. Estructura de caja de huevo entre sales de alginato y cationes de calcio. Imagen traducida de Zhang, X. et al<sup>157</sup>

Independientemente de las diferencias entre las formulaciones, todas fueron capaz de formar películas. Los mecanismos de formación de películas a partir de soluciones o dispersiones polimérica en disolvente fueron descritos por Felton, L.A.,

et al., 2013 Específicamente, en este trabajo el mecanismo que se sigue es aquel de una solución polimérico. De acuerdo a este, la formación de la película comienza una vez que la solución se encuentra en el sustrato sobre el que se formara la película con la conjunta evaporación del disolvente (fig. 27). Con ello se da la interpenetración de las cadenas del polímero y eventual formación de un gel que se tornará en la película con el secado constante<sup>158</sup>. Siendo critico en este mecanismo el proceso de secado y las características del sustrato para la formación de la película. Cabe mencionar que si bien el trabajo de *L.A. Felton et al., 2013* se enfoca principalmente a películas formadas por aspersion, los mecanismos descritos son aplicables a películas en general.



*Figura 27. Mecanismo de formación de películas a partir de disoluciones poliméricas*

Con lo que respecta a los procesos, resaltan entre ellos el orden y método de adición y la posición de secado dentro de la incubadora como aquellos con el mayor efecto sobre las características de la película. El orden de adición tiene un efecto directo sobre las propiedades de textura de las películas. Esto se determinó en pruebas preliminares realizadas del proceso para determinar la secuencia final descrita. Como ejemplo de ello, la adición inicial de alginato de sodio genera un cambio en las propiedades reológicas por la propia disolución del polímero que evitan una distribución uniforme de la laponita en una posterior suspensión; dando origen a películas de textura rugosa que podría generar molestias en su aplicación en el ojo. Adicional a ello, la intercalación inicial del polímero por la adición del cloruro de calcio de igual manera genera cambios en las propiedades reológicas que conllevan el uso de mayores tiempos y velocidades en los procesos de mezclado provocando una mayor entrada de aire en la mezcla y dando como resultado películas con una gran cantidad de burbujas. Si bien es posible la desgasificación de la mezcla, esta sería más tardada que la realizada en este trabajo.

Por su parte el método de adición, atienden a las características de homogeneidad de la mezcla polimérica, principalmente sobre la adición del cloruro de calcio. Esta debe ser agregada en disolución de manera paulatina y continua mientras la mezcla es agitada a alta velocidad. De cambiar los parámetros seleccionados, una mayor velocidad de inyección daría la formación de fibras de hidrogel, sobre cúmulos uniformemente distribuidos; mientras que una menor velocidad de agitación de la mezcla produce la acumulación del agente intercalante en zonas de la disolución. De manera que en ambos casos descritos la disolución y, por consiguiente, las películas, tendrían zonas con un alto o bajo grado de intercalación repartidas de forma heterogénea en ellas. Por lo tanto, habría una mayor variación de sus propiedades inter-lote. Por último, la posición dentro de la incubadora da origen a diferencias en el grosor y propiedades mecánicas derivado de la posición del ventilador. Este se encuentra ubicado a un costado de plancha sobre la que se lleva acabo el secado. Lo anterior origina una corriente de aire paralela unidireccional al calentamiento, causando que el secado sea irregular y que, en función de la viscosidad de la mezcla, se presente un flujo que conlleve a zonas con mayor masa y grosor. A pesar de lo anterior, el proceso descrito se probó funcional para la fabricación general de todas las películas evaluadas en el diseño de experimentos siguiente.

### *10.3.2 Optimización del módulo de Young de las películas a base de alginato.*

A continuación, se presentan la gráfica de superficie respuesta y la gráfica de contornos resultantes del diseño de experimentos realizado.

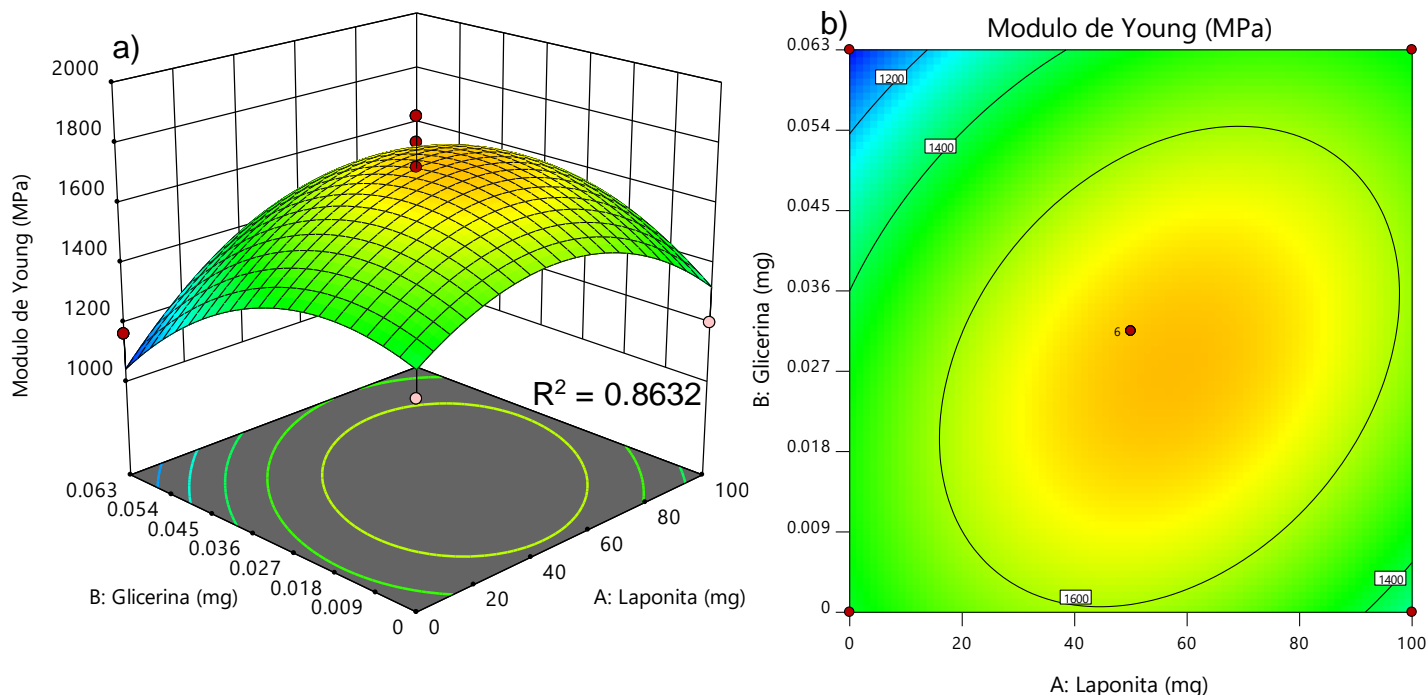


Figura 28. A) Gráfica de superficie-respuesta y b) contornos para la optimización del módulo de Young con el factor de cantidad de cloruro de calcio fijado en 5mg

Acorde a estas gráficas, las variables estudiadas presentan un efecto cuadrático significativo que corresponde a una disminución del valor de la respuesta. Describiendo lo acorde para cada variable de estudio, la disminución del valor del módulo de Young por la adición del glicerol coincide con su función de plastificante, dándole mayor flexibilidad a la película al impedir el acomodo de las cadenas de alginato de sodio favoreciendo la presencia de regiones amorfas en la película. No obstante, la disminución por aumento del cloruro de calcio o la laponita se contraponen a lo esperado acorde a la teoría. En ambos casos, se esperaba un aumento de la respuesta por adición de cualquiera de dichos factores. Esto ya que ambos factores se han estudiado en diferentes condiciones sobre el módulo de Young de hidrogeles de alginato de sodio, o bien, de películas poliméricas, respectivamente. En todos los casos, ambos factores mostraban un aumento general de dicha propiedad<sup>62, 63, 156, 159</sup>. Por lo que, es posible que un tercer agente dentro de la formulación, que no fue estudiado dentro del diseño, este interactuando sobre dichos factores, provocando el comportamiento cuadrático de la respuesta.

Considerando las propiedades del cloruro de calcio y la laponita, se sospechó de la maltosa por su efecto sobre la variable de respuesta al fungir como agente de refuerzo.

El objetivo de la realización de un diseño de experimentos fue buscar la formulación que aportara el mayor módulo de Young a la película con la mayor cantidad de laponita posible. Esto para asegurar que las microagujas posteriormente fabricadas sean resistentes y rígidas por lo que experimentaran la menor deformación durante su remoción del molde, además de conservar su forma y ser capaces de penetrar el ojo. Mientras que la cantidad de laponita se maximizó para asegurar que se favorezcan las interacciones entre los nanodiscos tanto del sistema nanoparticulado como en la formulación, facilitando de esta manera la suspensión del sistema LM y su integración, así como su distribución, homogénea en la película formadora de microagujas. En la tabla 11, se presenta la formulación final determinada como resultado del diseño. Es importante mencionar que adicional a esta formulación, se decidió estudiar una formulación equivalente con y sin agente osmótico u agente intercalador. Esto ya que ambos tienen un efecto directo sobre las propiedades de tonicidad y disolución de la película, que podrían representar un riesgo al ojo. Dichas formulaciones de igual manera se presentan en la tabla 11.

*Tabla 11. Formulaciones derivadas del diseño de experimentos*

Componente	Película base (- agente osmótico, - intercalador)	Película + agente osmótico, - intercalador	Película* + agente osmótico, + intercalador	Película formadora de microagujas**
Alginato de sodio (mg)	100	100	100	100
Laponita (mg)	100	100	100	65.3
Maltosa (mg)	N/A	150	150	150

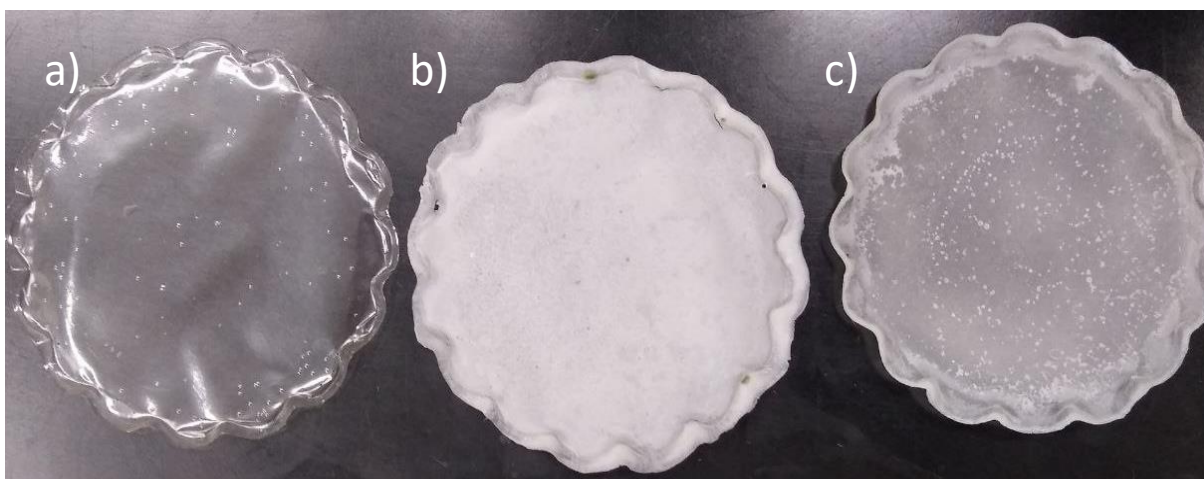
Cloruro de calcio (mg)	N/A	N/A	4	4
Glicerol ( $\mu\text{L}$ )	25	25	25	25
Magnetita/Laponita	N/A	N/A	N/A	208.4

N/A: no aplica; • formulación optimizada; \*\* únicamente realizada para la fabricación del parche, la cantidad total de laponita corresponde a la presente en la película optimizada.

## 10.4 Caracterización de la película optimizada y formulaciones derivadas.

### 10.4.1 Descripción física, grosor y peso

Tras su fabricación, las películas fueron inspeccionadas visualmente, cortadas, pesadas y su grosor medido empleando un micrómetro. Los resultados de estas evaluaciones se presentan en la tabla 12.



*Figura 29. Fotografía de las películas a) base, b) con agente osmótico y c) optimizada*

A partir de la inspección visual, la película base es la que presenta las mejores características de transparencia de todo el grupo (fig. 29a). Este resultado se relaciona con la presencia de laponita en la formulación. Se ha observado que la adición de arcillas a películas poliméricas provee de una mejora en la transparencia de las mismas<sup>64, 66</sup>. Ya que se presenta un aumento de sus propiedades de transmisión por su distribución homogénea que evita una formación de agregado de las cadenas poliméricas, además de las interacciones que puede tener con esta, así como su índice de refracción<sup>64</sup>. Confirmación de esta observación podría



obtenerse por medio de determinaciones de opacidad y transmitancia. No obstante, el par restante presentan la aparición de opacidad, por lo que se concluye que esto se deriva por la adición de la maltosa (fig. 29b y 29c). Lo cual puede indicar un posible depósito del disacárido en la película.

*Tabla 12. Descripción de la apariencia y resultados de peso y grosor de las películas fabricadas*

Prueba	Película base (Sin intercalador ni agente osmótico)	Película sin intercalador con agente osmótico	Película optimizada (Con intercalador y agente osmótico)
Apariencia	Transparente, lisa, homogénea, medianamente flexible	Homogénea, lisa, opaca, medianamente rígida y ligeramente quebradiza	Homogénea, lisa, opaca, medianamente rígida y ligeramente quebradiza
Textura	Lisa	ligeramente rugosa	ligeramente rugosa
Peso (g)* n=18	0.0055 ± 0.0001	0.0103 ± 0.01238	0.0096 ± 0.00053
Grosor (mm)* n=8	0.0377 ± 0.0008	0.078 ± 0.0013	0.071 ± 0.0015

\*Resultados presentados como promedio ± eem (error estándar de la media)

Con respecto al peso, la película base presenta una diferencia significativa con las siguiente dos únicamente relacionado con la adición de la maltosa. Si bien la adición de cloruro de calcio en la formulación optimizada debería de causar un segundo aumento del peso, la cantidad usada de esta sal con respecto a la maltosa es considerablemente menor y, por tanto, se encuentra eclipsado por estar debajo del límite de medición de la balanza. A pesar de lo anterior el cambio de peso solo se



relaciona con la adición de componentes a la formulación y coincide con lo adicionado.

Por su parte, el grosor de las películas con maltosa presenta un aumento con una diferencia significativa de esta propiedad al compararla con la película base; más no así entre sí. Ello implica que el cambio se relaciona con la adición de la maltosa como en el caso de la apariencia. Se propone que el depósito de este azúcar se da en la región más superficial de la película, creando un tipo de recubrimiento que modifica la apariencia, el grosor y la textura. Esto se apoya con el hecho que la sensación organoléptica al tacto de dichas películas deja una sensación polvosa residual.

De estas observaciones iniciales, se contempló el uso de la película base como formadora del soporte para las microagujas por sus características de transparencia y grosor. Estas podrían ser beneficiosas al parche por conferirle baja interferencia a la visión y baja molestia por su presencia en este órgano; además que el valor del grosor también tiene un impacto directo sobre el intercambio de oxígeno requerido por el globo ocular<sup>160</sup>. Mientras que la formulación optimizada se usó para la formación de las microagujas.

#### *10.4.2 Microscopia electrónica de Barrido*

Un análisis más profundo de la morfología del material híbrido fabricado se realizó por medio de la microscopia electrónica de barrido. Las imágenes obtenidas resultado de esta técnica se presentan en la figura 30. Es posible observar que la apariencia macroscópica de la película base corresponde con su microscopia. Se confirma que el material es homogéneo y la laponita, así como el polímero, se encuentran distribuidos uniformemente formando la película, con casi nula rugosidad.

Este no es el caso de las películas con maltosa, donde se da la aparición de estructuras de apariencia amorfa distribuidos uniformemente en ambos materiales.

Ello es congruente con la observación macroscópica y permite confirmar las suposiciones realizadas en la sección anterior. La maltosa presenta una inestabilidad en la formulación que conllevan a su precipitación en la superficie del material. No obstante, dichos cúmulos se mantienen unidos a la película polimérica, de manera tal que la maltosa le recubre. Este hecho tiene fundamento en el cambio de tamaño que se ve de los cúmulos tras la intercalación del alginato de sodio con el cloruro de calcio agregado en las películas de formulación optimizada.

Como consecuencia de lo anterior, la opacidad y textura de las películas se ven afectadas. Sin embargo, dicho efecto no es negativo, ya que esta rugosidad puede favorecer a la interacción de las microagujas con estructuras celulares presentes en el ojo, mejorando de tal manera la residencia de las microagujas en el interior. A pesar de los beneficios que pueda aportar la rugosidad, la inestabilidad presentada por la maltosa en la formulación dificulta su uso para la formación de todo el parche, por los riesgos de tonicidad y afecciones a la visión que pudiesen derivarse. Esto apoya al uso de más de una formulación para la fabricación del parche de microagujas.

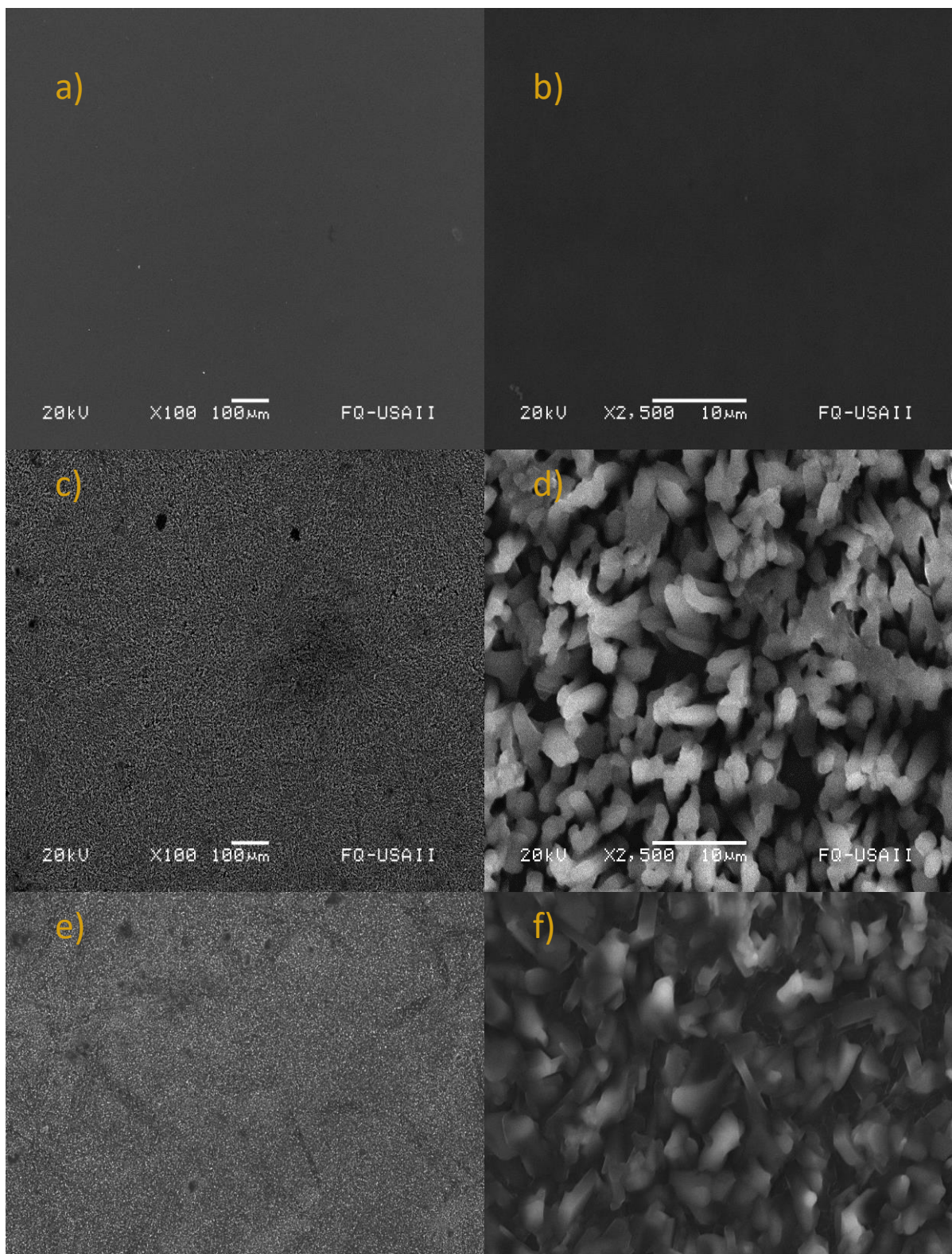


Figura 30. Imágenes de SEM a un menor (izquierda) y mayor (derecha) aumento de las películas fabricadas donde a) y b) es la película base, c) y d) película con agente osmótico sin intercalador y e) y f) películas con agente osmótico e intercalador (formulación optimizada).



### 10.4.2.1 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos (EDS)

Simultaneo a la observación al microscopio descrita en la sección anterior, se llevó a cabo el mapeo de elementos característicos de la laponita, el agente osmótico y el agente intercalador en las películas fabricadas para evaluar la uniformidad del material. En las figuras 31, 32 y 33 se encuentran los resultados correspondientes a la película base, aquella con maltosa y aquella tanto con el disacárido como con el cloruro de calcio respectivamente.

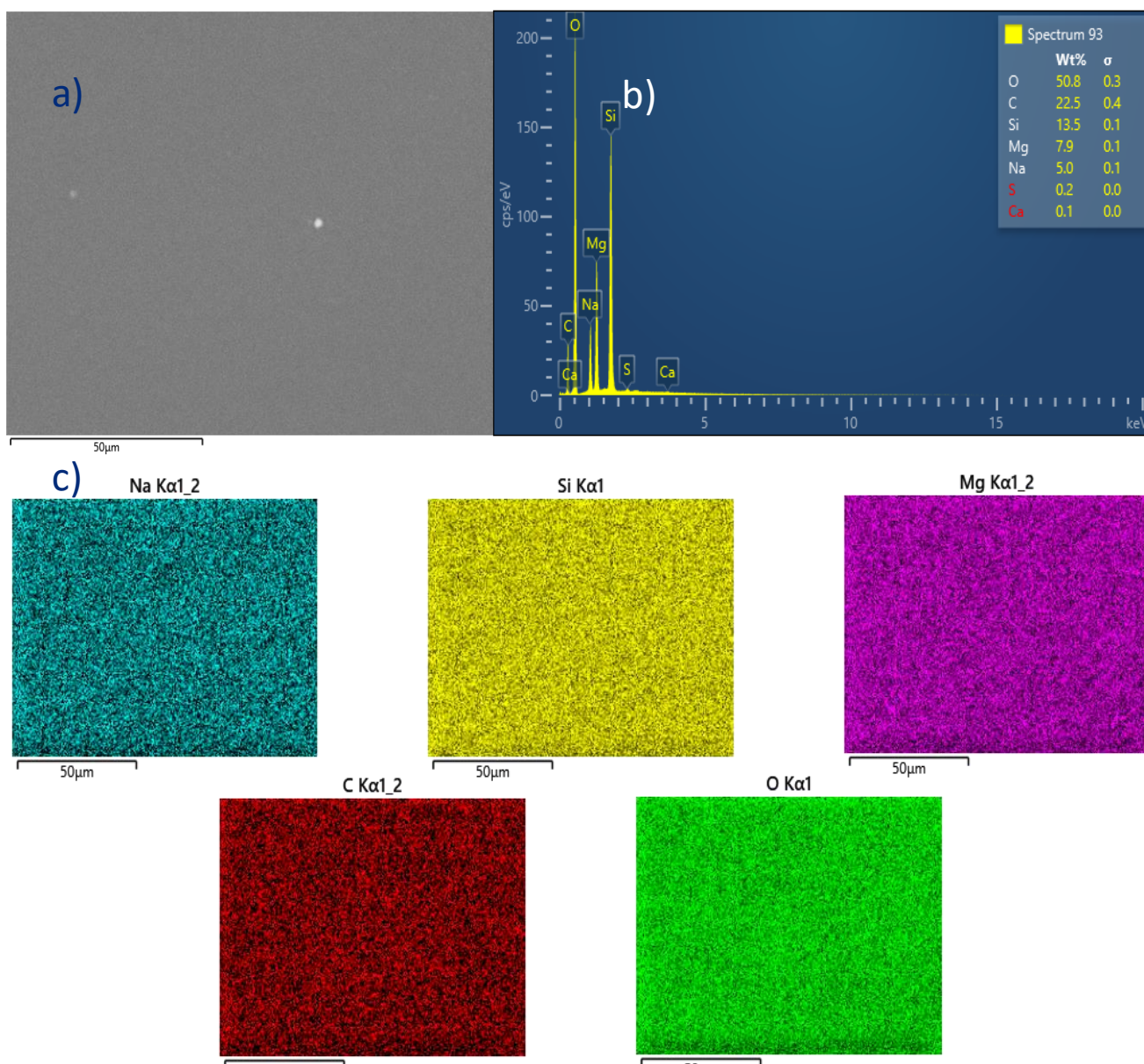


Figura 31. a) Microscopía, b) análisis elemental y c) distribución elemental de elementos característicos estudiados en la película base

Respecto a la película base (fig. 31), se observa la distribución homogénea de los elementos característicos tanto para la laponita como los que conforman el polímero, dando como resultado una película uniforme, como previamente fue descrita. Se confirma una buena distribución de la arcilla en la película polimérica, manteniéndose suspendida en ella sin formación de aglomerados. Esto indica que existe una interacción entre el alginato y la laponita que la distribuyen de manera homogénea entre las cadenas de alginato de sodio. La presencia de azufre y calcio son producto de contaminación de la muestra, esto es claro al comparar con el resto de las películas fabricadas.

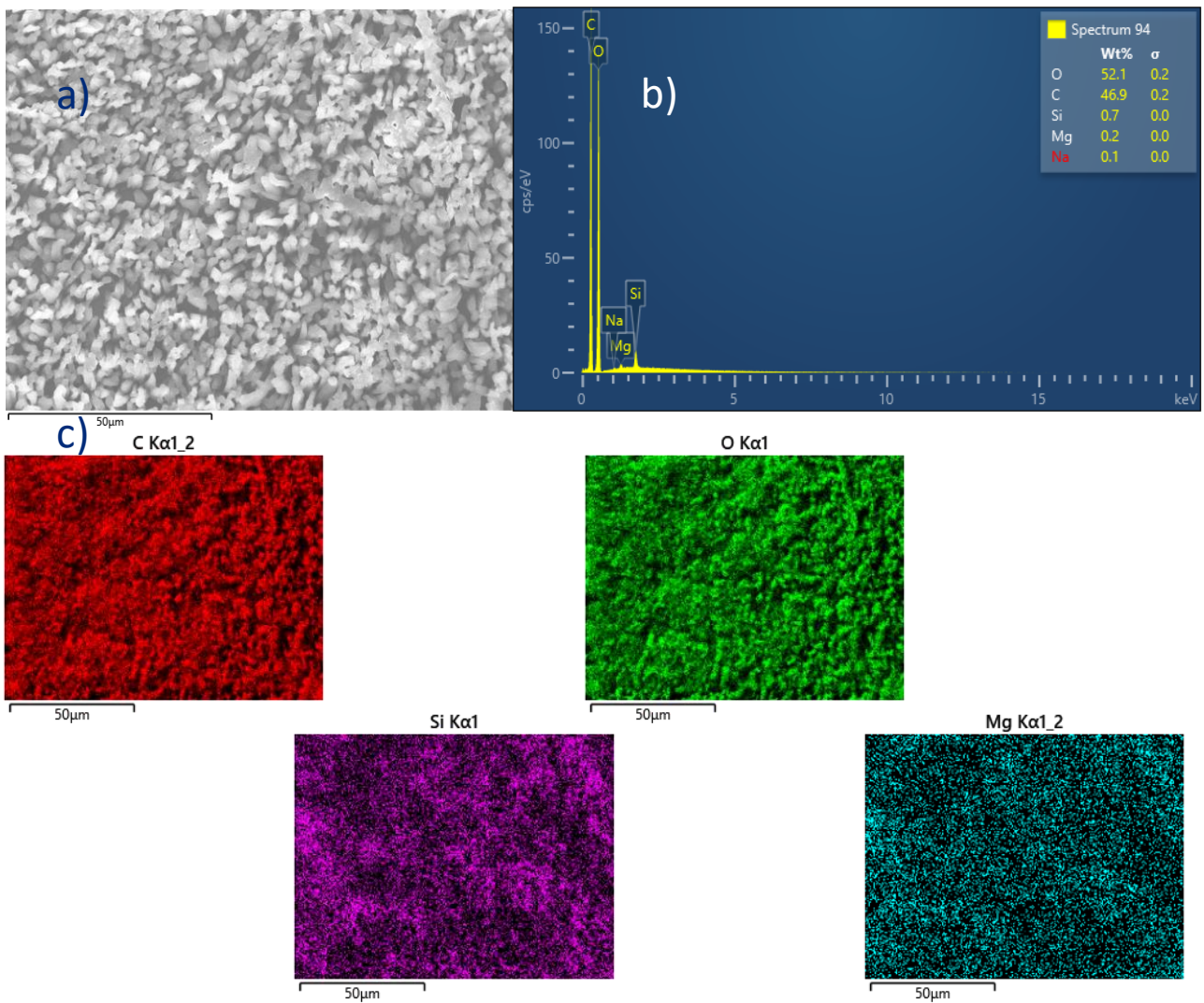


Figura 32. a) Microscopía, b)) análisis elemental y c) distribución elemental de elementos característicos estudiados en la película con agente osmótico

Por su parte, una vez que se adiciona el disacárido (fig. 32) es posible observar la formación de cúmulos como fue mencionado en la sección anterior. La distribución de carbono y oxígeno es uniforme en el material, no así de silicio y magnesio, quienes son elementos representativos de la arcilla. Existen zonas con una mayor cantidad de Si y Mg, implicando que la adición de maltosa afecta su distribución. La interacción entre las arcillas y azúcares han sido estudiados en otros trabajos como el realizado por Aristilde, L. et al., 2017. En este se determinó por medio de distintas metodologías que la interacción entre azúcares y arcillas sucede por medio de la formación de puentes de hidrogeno y el secuestro de agua superficial de la arcilla por parte del azúcar adsorbido<sup>161</sup>. Este tipo de mecanismo se conoce como la formación de un puente de agua, que se describe como la formación de un puente de hidrogeno entre el grupo polar de la molécula orgánica no iónica con una molécula de agua de la esfera primaria de hidratación de los cationes en la arcilla<sup>162</sup>. Esto da una respuesta a la distribución heterogénea de la laponita a partir de la formación de complejos con la maltosa acorde a los mecanismos descritos. De igual manera, puesto que el agua se encuentra secuestrada por la formación de los puentes de agua, es posible decir que esto da origen a la inestabilidad de la maltosa y su precipitación en la película. Ya que menos moléculas de agua se encuentran disponible para mantener disuelta la maltosa en la película.

En la figura 33, se presentan los resultados para la película optimizada. A diferencia de lo observado tras la adición de la maltosa, el agregar cloruro de calcio y formar el intercalado conlleva a una mejora de la distribución de la arcilla en la película. Esto ya que no hay observación de cúmulos de los elementos característicos de la laponita como en el caso anterior. La formación del hidrogel y el proceso empleado para su fabricación aseguran la formación de un material homogéneo y uniforme a pesar de la inestabilidad demostrada por el disacárido. Si bien existe interacción entre la arcilla y el azúcar, el principal motivo que da origen a la inestabilidad es la competencia por el agua entre la interacción del disacárido y la arcilla y la requerida para su disolución en la película. Es factible proponer que esta inestabilidad con la



maltosa sea el origen del comportamiento parabólico observado en el diseño de experimentos.

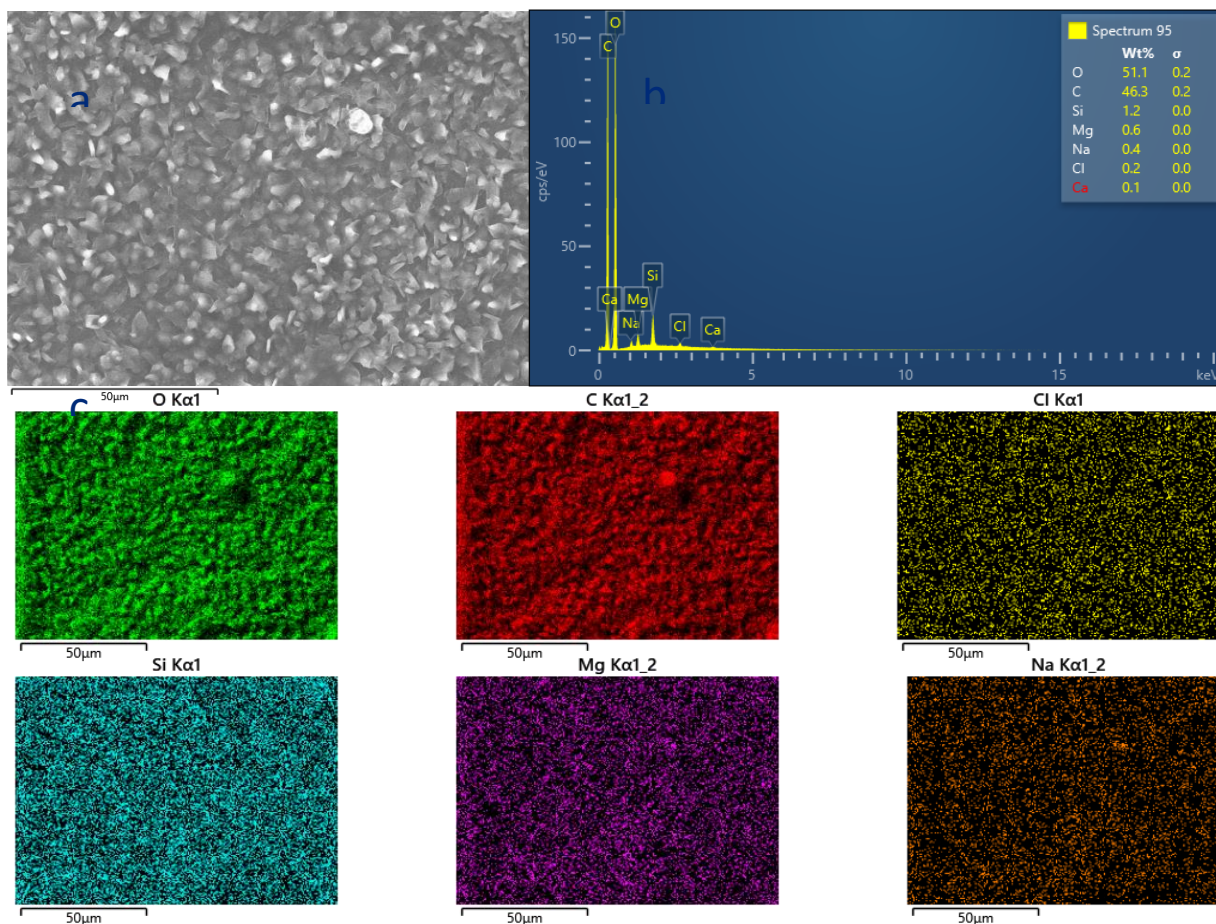


Figura 33. a) Microscopía, b) análisis elemental y c) distribución elemental de elementos característicos estudiados en la película con agente osmótico y agente intercalador (formulación optimizada).

#### 10.4.3 Espectroscopia de Infrarrojo

El estudio de los enlaces presentes en el material híbrido se realizó por medio de espectroscopia infrarrojo. El espectro obtenido para todas las películas fabricadas se presenta en la figura 34. En el espectro de la formulación base, la presencia de agua es exhibida por el ensanchamiento de las bandas en la región en los  $3000\text{cm}^{-1}$ . Las bandas en  $3699$ ,  $3174$  y  $2935\text{cm}^{-1}$  se atribuyen a las vibraciones de estiramiento del enlace O-H y el estiramiento de enlace C-H relacionados con el alginato de sodio. Otras bandas relacionadas con la presencia del polímero se

presentan en  $1605\text{ cm}^{-1}$  y  $1413\text{ cm}^{-1}$ , vibración de estiramiento asimétrico y simétrico del enlace C-O del grupo carboxilo en este; mientras que la banda en  $811\text{ cm}^{-1}$  corresponde a los residuos de ácido manurónico<sup>159</sup>. De igual manera, se observan las bandas características de vibraciones de Si-O y Mg-O en  $971\text{ cm}^{-1}$  y  $648\text{ cm}^{-1}$  presentes en la laponita.

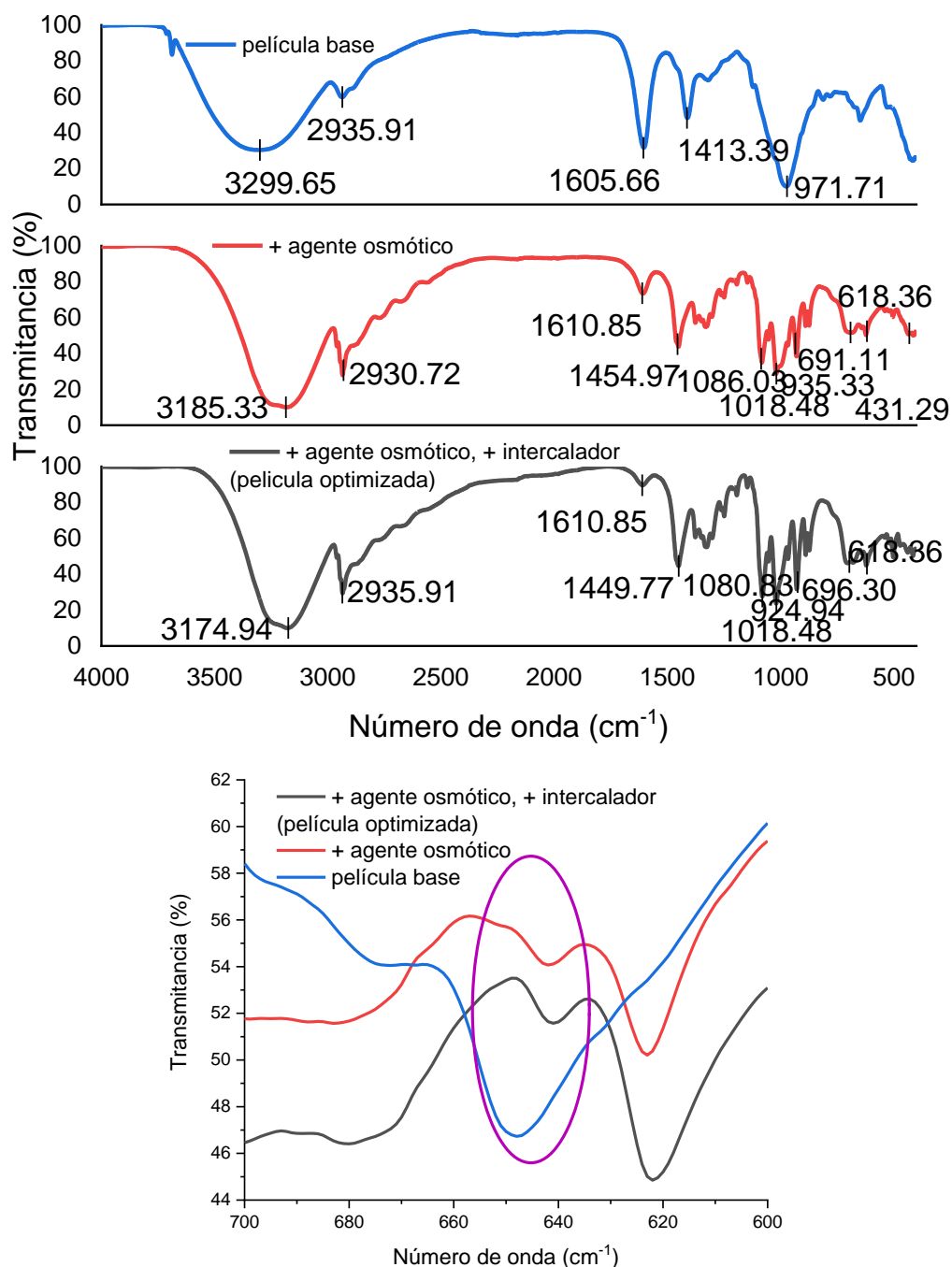


Figura 34. Espectro de infrarrojo de las películas fabricadas (superior) y acercamiento a la región de  $700\text{ a }600\text{ cm}^{-1}$  (inferior)



No obstante, en las películas tras adicionar el agente osmótico, presentan espectros similares entre sí pero considerablemente diferentes con respecto a la base. La presencia del alginato se confirma por las bandas presentes alrededor de  $2935\text{ cm}^{-1}$ . La banda alrededor de  $1600\text{ cm}^{-1}$ , presenta un desplazamiento de  $1605\text{ cm}^{-1}$  en la base a  $1610\text{ cm}^{-1}$  en la película intercalada debido a la participación de carboxilo en la formación de la estructura de caja de huevo<sup>159</sup>. La región de  $400$  a  $750\text{ cm}^{-1}$  presenta bandas principalmente asociadas a los modos vibracionales de flexión de los enlaces C-C-O y O-C-O, en la región de  $750$  a  $1250\text{ cm}^{-1}$  se presentan bandas correspondientes a estiramientos de los enlaces C-C y C-O de la maltosa<sup>163</sup>. Mientras que de manera similar al alginato, los modos vibracionales de estiramiento de los enlaces C-H y C-O se presentan con bandas de  $2500$  a  $3500\text{ cm}^{-1}$ <sup>163</sup>. Por último, es propio mencionar que las señales de la maltosa dominan sobre el resto de las señales, tanto para el alginato como para la laponita, si bien esto puede ser efecto de la cantidad de cada uno en la formulación, también puede relacionarse con el depósito superficial de la maltosa por la inestabilidad que presenta. A pesar de lo anterior, la señal correspondiente al modo vibracional del enlace Mg-O a  $650\text{ cm}^{-1}$  de la laponita.

#### *10.4.4 Análisis térmicos*

##### *10.4.4.1 Calorimetría diferencial de barrido*

Los eventos térmicos que se presentan en las muestras fueron estudiados por medio de la calorimetría diferencial de barrido. Los termogramas correspondientes se muestran en la figura 35. En la película base podemos observar que la adición de la laponita no modifica las transiciones clásicas que experimenta el alginato de sodio. Estos son una endoterma a  $89^\circ\text{C}$  y una exoterma a  $224^\circ\text{C}$  que se les atribuye a la deshidratación y descomposición del polímero respectivamente. Estos eventos se presentan a una temperatura  $10^\circ\text{C}$  por encima de lo reportado previamente<sup>164</sup>, lo cual indica que, a pesar de la presencia del plastificante, la arcilla confiere una termoestabilidad al material. Este efecto depende enteramente de lo significativa que sea la interacción entre el polímero y la arcilla estudiada<sup>111</sup>.

No obstante, tras la adición de la maltosa se observa un cambio del perfil térmico de las dos películas restantes. La primera endoterma correspondiente a la deshidratación del alginato se presenta alrededor de los 100°C grados en ambas películas. La siguiente endoterma a 126°C se relaciona con la fusión de la maltosa, confirmado que esta no se encuentra disuelta en la película<sup>165, 166</sup>. La siguiente endoterma a 151 y 157°C según el caso, se le atribuye a la separación de la maltosa del material. Esto ha sido previamente observado por otros azúcares, específicamente disacáridos<sup>167</sup>. En el rango de 200 a 240°C se presenta la degradación de la maltosa y la descomposición del alginato.

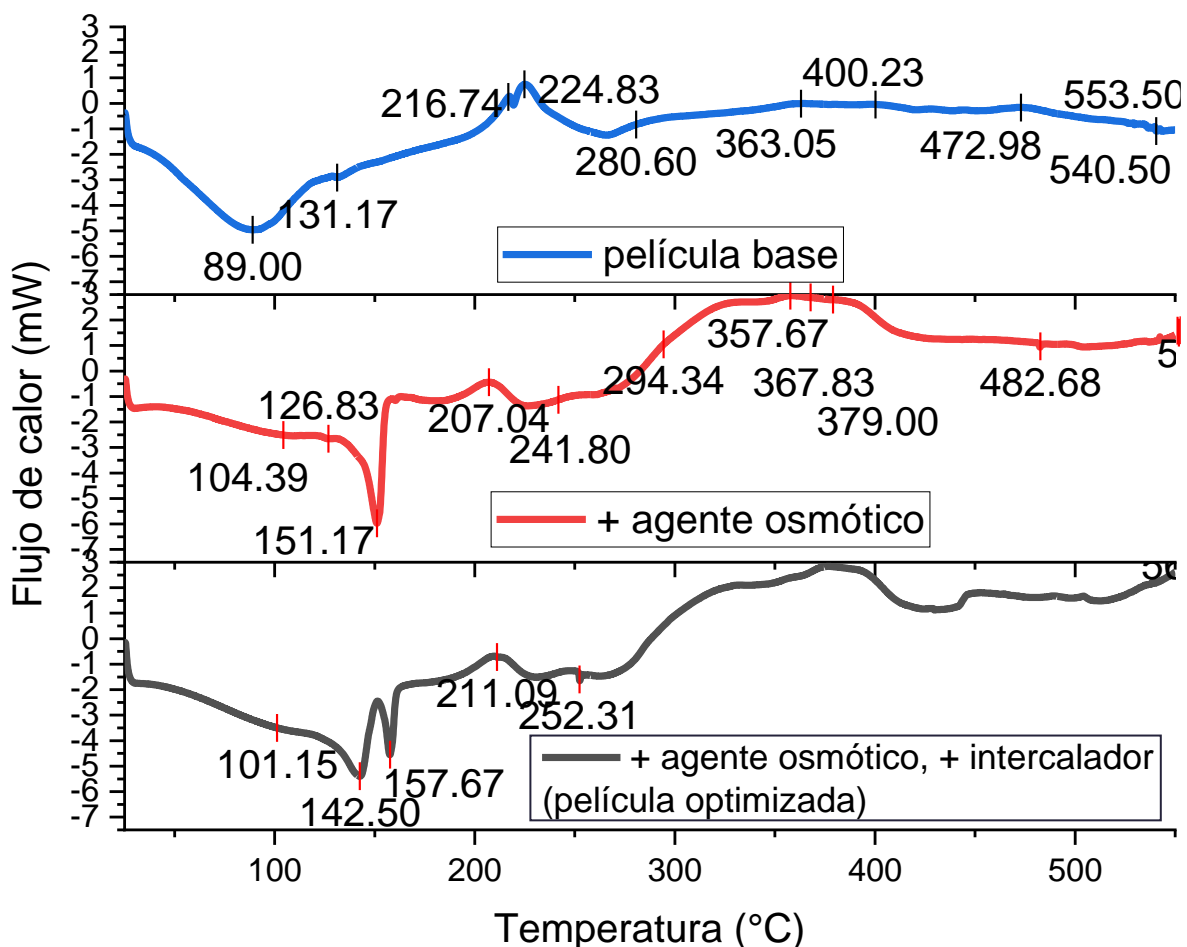


Figura 35. Termogramas obtenidos por DSC de las películas fabricadas

#### 10.4.4.2 Termogravimetría

Se realizaron los estudios de cambio de masa experimentados por la temperatura en las películas cuyos resultados aparecen en la parte superior de la figura 36, así como la primera derivada de dichos resultados en el inferior de dicha figura. En la película base, es posible atribuir la primera pérdida de peso a la deshidratación de la película (25-200°C), seguida por la descomposición del polímero más la evaporación de la glicerina (200-500°C), continuando con la formación del carbonato de sodio (500-650°C) y terminando con la mezcla de este junto con la laponita. Las cuales están en concordancia con lo previamente reportado para este polímero<sup>164</sup>.

En el caso de películas con agente osmótico con y sin intercalador, presentan las mismas pérdidas de peso entre sí con ligeros desplazamientos de los máximos por la presencia del cloruro de calcio en la formulación optimizada. Los primeros cambios presentes en ambas se dan tanto por la deshidratación de la película como por la descomposición de la maltosa y el alginato, así como la evaporación de la glicerina. Durante la deshidratación, la película con ambos agentes tiene la menor cantidad de agua. Esto debido a que la formación de la estructura de caja de huevo por la reacción de intercalación del  $\text{Ca}^{2+}$  con los residuos carboxílicos del polímero, deja menor cantidad de sitios disponibles con los que el agua pueda interaccionar<sup>159</sup>. Sobre el agente intercalador, se ha propuesto que la descomposición de la maltosa, observada a 193°C, es producto de reacciones de hidrólisis<sup>168</sup>. Se observa la formación tanto del residuo de carbonatos y cloruros de sodio y calcio por encima de los 500°C.

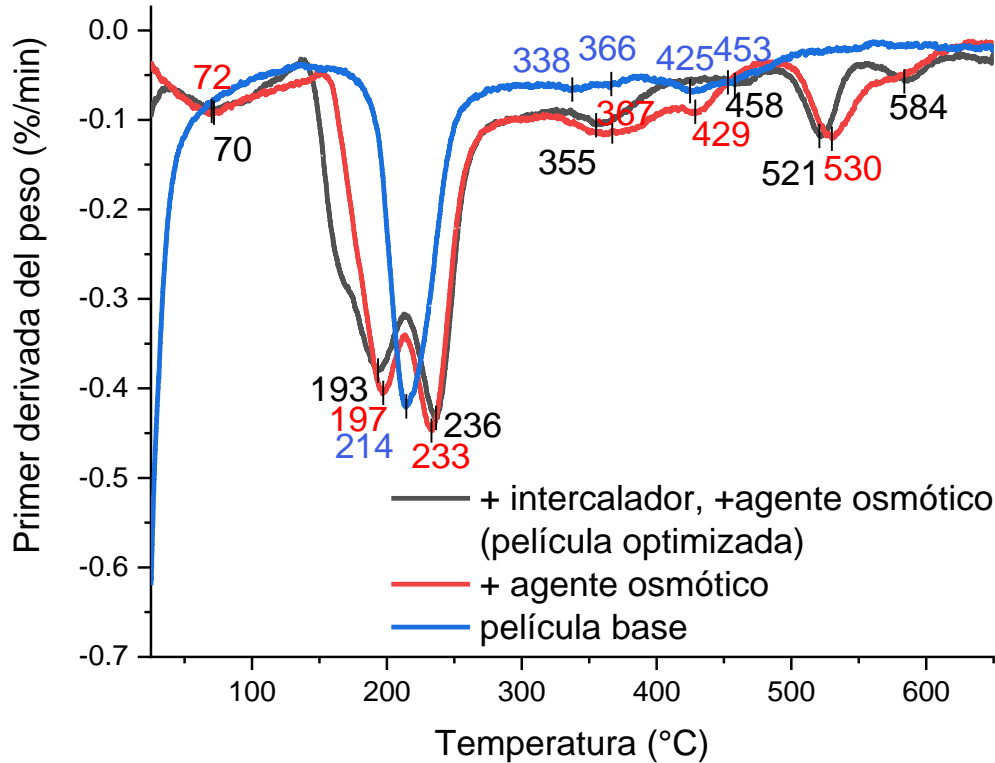
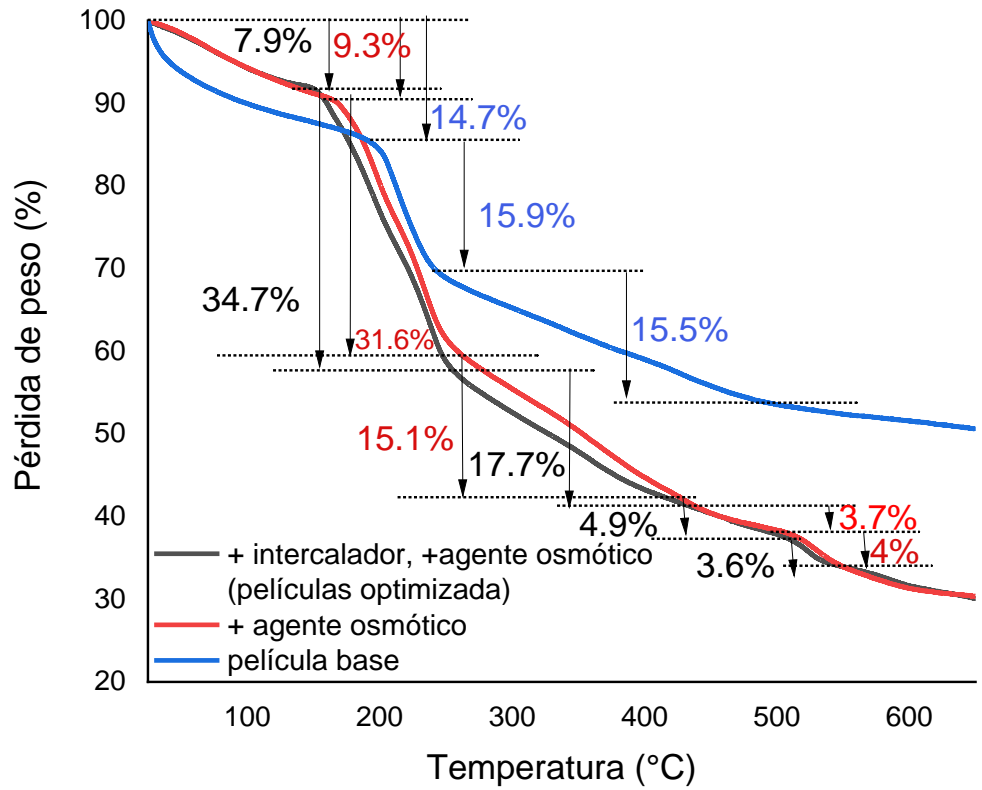


Figura 36. Termogravimetría (Superior) y Primer derivada con respecto al tiempo (Inferior) de la pérdida de peso de las películas fabricadas

#### 10.4.4.3 Pérdida por secado

Los resultados de la evaluación de la pérdida de los componentes volátiles<sup>169</sup> en las películas se presentan en la tabla 13. Este tipo de pérdidas se atribuyen únicamente a la presencia de agua. Para la película base, se observa que esta posee la mayor cantidad de agua de las tres formulaciones, hecho que concuerda en parte con lo observado en la termogravimetría. Ya que la primera pérdida de peso observada en la prueba anterior presenta una diferencia mayor del 5% con respecto a lo expuesto en la pérdida por secado. La diferencia entre ambos se relaciona con el resto de eventos térmicos que experimentan la muestra acorde a la metodología empleada. Específicamente el inicio de la descomposición del polímero, que ocurre en la película, pero no son observables en este tipo de metodologías. Es importante mencionar que el agua en la película puede actuar como plastificante de la misma, teniendo un efecto sobre las propiedades mecánicas del material<sup>170</sup>. Explicando así las diferencias encontradas durante las evaluaciones descriptivas de las películas (sección 10.4.1), donde esta película demostró tener la mejor flexibilidad de las tres.

*Tabla 13. Resultados de la pérdida por secado porcentual.*

Película base (Sin intercalador ni agente osmótico)	Película sin intercalador con agente osmótico	Película optimizada (Con intercalador y agente osmótico)
(10.33 ± 0.40)%	(7.13 ± 0.32)%	(7.02 ± 0.49)

\*Resultados presentados como promedio ± eem

Con respecto al resto de las películas, tras la adición únicamente del agente osmótico, se observa una disminución del agua en la película. Este resultado presenta una diferencia del 2% con respecto a lo observado en su termogravimetría. Estas diferencias pueden atribuirse a distintos factores como lo son, similar al caso de la formulación base, que la termogravimetría permite observar otros tipos de eventos térmicos en la película que se dan paralelos a la deshidratación; también a

la modalidad de cada uno de los experimentos, donde la termogravimetría se manejó en una modalidad no isotérmica, contrario a la pérdida de peso que es isotérmica y, por último, a la sensibilidad del aparato de medición. No obstante, es posible suponer que la disminución de agua libre en la película se relaciona con la formación del puente de agua que da la interacción entre el disacárido y la arcilla como fue mencionado en la sección 10.4.4.1. Misma que permite catalizar la reacción de degradación del azúcar que se discutió durante el análisis de su termogravimetría.

Caso similar se presenta en la película tanto con agente osmótico e intercalador. Nuevamente el valor determinado de agua es menor al observado en la termogravimetría. Dichas diferencias pueden explicarse igual que el caso anterior, únicamente haciendo la notación de lo correspondiente por la adición del cloruro de calcio. Es importante notar que, si bien el valor promedio de esta película es menor al de aquella con únicamente maltosa, lo cual concuerda con los resultados de las secciones anteriores, estas no presentan diferencias significativas. Por lo que, el efecto del cloruro de calcio o la maltosa no es distinguible por medio de este experimento.

#### *10.4.5 Desintegración*

La desintegración de las películas se estudió como un método auxiliar y complementario a las pruebas de hinchamiento y degradación también realizadas. A continuación, en la tabla 14 se muestran los tiempos de desintegración de las películas.

*Tabla 14. Tiempo de desintegración de las películas*

Película base (Sin intercalador ni agente osmótico)	Película sin intercalador con agente osmótico	Película optimizada (Con intercalador y agente osmótico)
35.74s	33.26s	1min20s

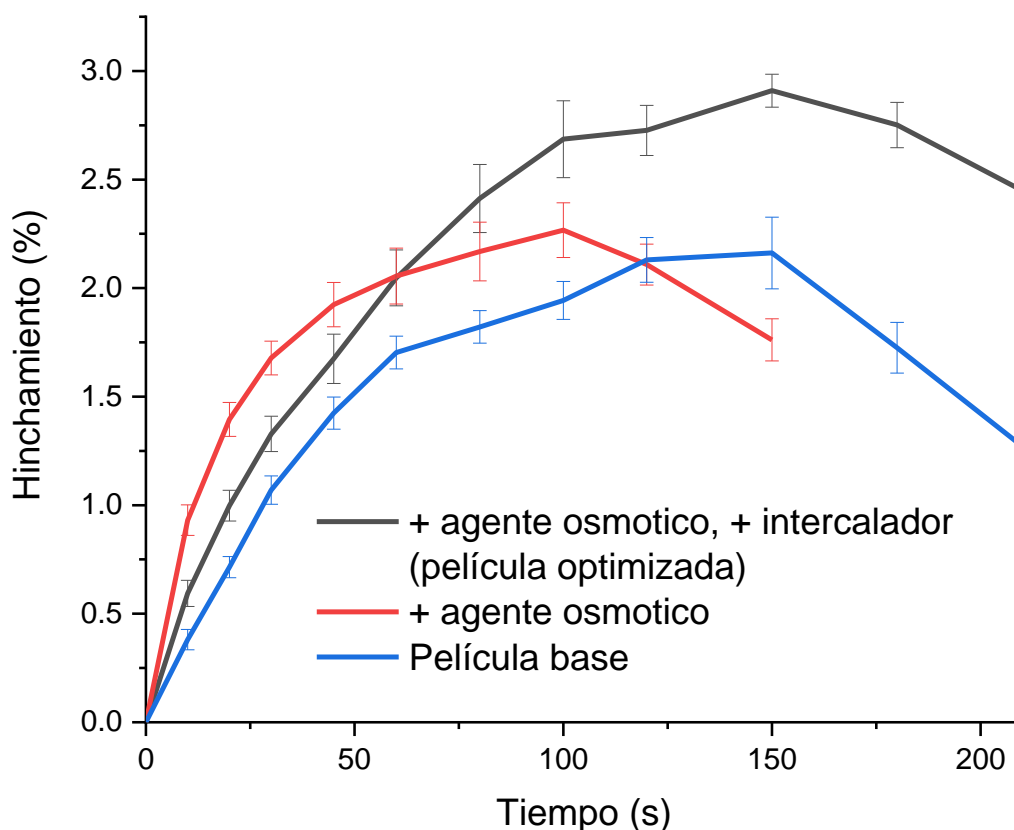
Tanto la película base, como aquella con maltosa, presentan tiempos de desintegración cortos. Lo cual las hace adecuadas para aplicaciones donde se requiera la rápida pérdida de la forma, como lo puede ser la formación de la base del parche con microagujas. Esto ya que se contempla que una vez colocado, el parche se disuelva rápidamente en el ojo para afectar lo menos posible la visión. Como se había mencionado antes, en ese sentido, la película base presenta las mejores características para la formación de este soporte. Si bien, presenta un tiempo de desintegración mayor, sus propiedades ópticas, mecánicas y osmóticas se prefieren sobre la película con maltosa. Cuya adición favorece a la desintegración, al favorecer la entrada de agua, que atiende a su función como agente osmótico.

En este experimento, es claro el efecto de la intercalación del cloruro de calcio con las cadenas de alginato. Esta reacción es guiada por interacciones electrostáticas y se considera reversible<sup>171</sup>. Dicha reacción da la formación de una red tridimensional, conocida como hidrogel, el cual es en principio insoluble<sup>172</sup>. Razón por la cual, a esta película le toma cerca del triple de tiempo que las otras películas para desintegrarse. Esto implica que al momento de formar las microagujas conservará la forma al penetrar el ojo, a pesar que el andamio este desintegrado en el exterior.

#### *10.4.6 Hinchamiento*

Los resultados de la cinética de captación de agua de las películas se exponen en la figura 37. La película base muestra la menor captación de agua en el primer minuto en comparación del resto. Esta captación únicamente está relacionada con los procesos de disolución del polímero, así como la hidrofiliidad de la laponita. La máxima captación de agua por parte de esta formulación se alcanza alrededor de los dos minutos. Por su parte, la adición de maltosa, produce la mayor captación de agua en el menor tiempo. Esto debido a su función como agente osmótico y el estado físico en que se encuentra en la película debido a la inestabilidad que presenta. Es decir, que favorece la entrada de agua con el fin de solubilizarse, explicando también porque esta película alcanza su máximo hinchamiento y

presenta degradación en un menor tiempo que para el resto de las películas. Si bien este efecto también se presenta en la película optimizada, la formación del hidrogel como producto del entrecruzamiento del alginato con los cationes de calcio divalentes prevalece. Por lo que, el efecto del agente osmótico se demuestra por una mayor entrada de agua con respecto a la base en el primer minuto; mientras que el efecto de la intercalación conlleva a un mayor hinchamiento. Aunque el máximo se localice al mismo tiempo que el de la película base.

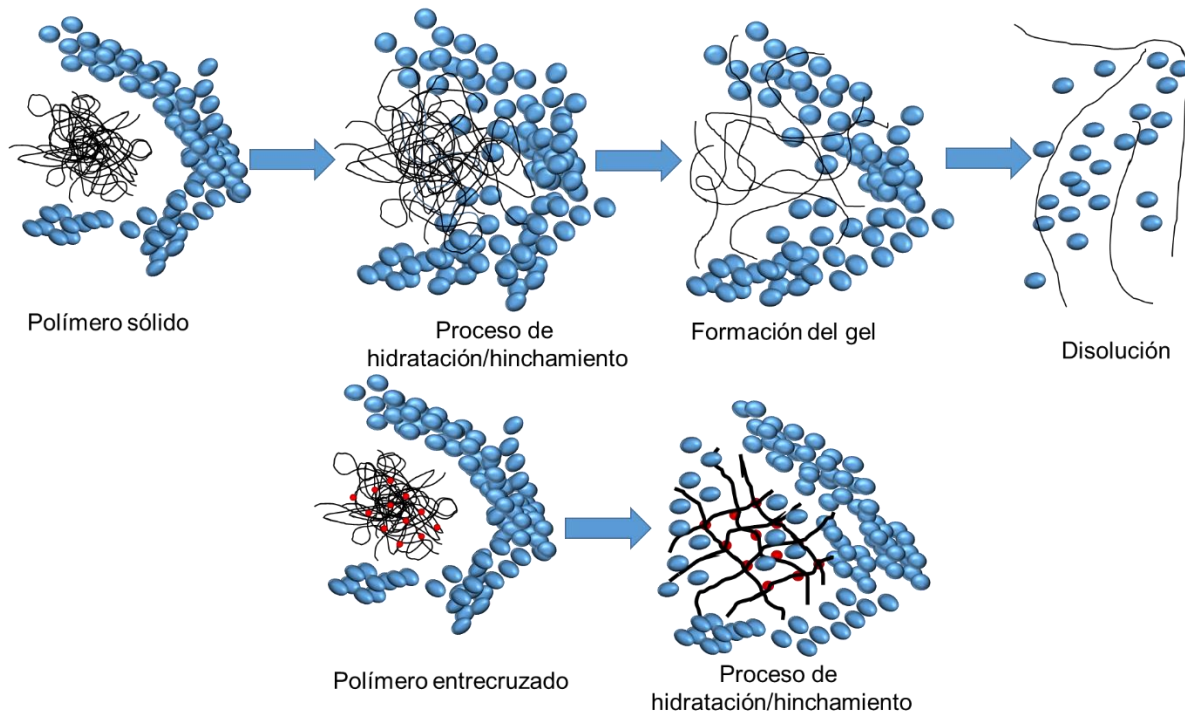


*Figura 37. Cinética de hinchamiento*

Es importante mencionar que, a pesar que se observa una entrada de agua en las películas, este proceso es dependiente de la cinética de disolución del polímero (figura 37). De manera general, la disolución de un polímero se puede describir de la siguiente forma (fig. 38): el polímero sólido interactúa con las moléculas del disolvente en la parte más externa, esta interacción produce una relajación de las cadenas que permite una mayor entrada de disolvente (proceso de hinchamiento), conforme más solvente entra, mayor es la relajación de cadenas dando la formación



de un gel, terminando con la separación de las cadenas ya alargadas y completamente rodeadas por moléculas del solvente (disolución). Sin embargo, en caso de los polímeros entrecruzados, estos se encuentran formando una red tridimensional que les permite únicamente llevar a cabo la primera parte del proceso, es decir, el hinchamiento<sup>171, 172</sup>.



*Figura 38. Proceso de disolución e hinchamiento en un polímero con (inferior) y sin entrecruzamiento (superior)*

Acorde a lo observado en la cinética de hinchamiento, al contemplar el uso simultaneo tanto de la formulación base como de la optimizada en la fabricación del parche de microagujas, se considera que, tras la inserción en el ojo, las microagujas procederán a hincharse quedando fijas en el lugar de penetración a pesar de la pronta desintegración y disolución del andamio a estar formadas de la formulación optimizada. Si bien el andamio, constituido por la formulación base, presenta un hinchamiento, que puede representar un aumento de su grosor, este no representa una molestia significativa para el ojo derivado del bajo aumento que este exhibe en conjunción con su rápida desintegración. Dando así, cualidades apropiadas al parche con microagujas.

#### 10.4.7 pH superficial

A la par de la prueba anterior, se realizó la medición del pH superficial del gel remanente. Los resultados para esta se exponen en la tabla 15. Las películas presentan un valor de pH neutro o cercano a la neutralidad. El alginato de sodio en disoluciones acuosas al 1% presenta un pH de 7.2<sup>173</sup>, por su parte la maltosa presenta un pH de 4.5-6.5 en disoluciones al 10%<sup>173</sup>, mientras que la laponita presenta un pH de 9-10 en dispersiones al 1%<sup>8</sup>. Por lo que, el pH de estos materiales es resultado de la interacción de estos componentes entre sí llegando a un equilibrio donde el pH básico por la presencia de la laponita prevalece. Esto no es negativo para la formulación, ya que se ha observado que el desempeño del alginato en formulaciones de liberación modificada mejora en pH ligeramente básicos<sup>1</sup>. Adicional a esto, es deseable que las formulaciones oftálmicas presenten valores de osmolaridad y pH lo más similares a las condiciones fisiológicas. Específicamente, sobre el pH, el ojo presenta mejor tolerancia a condiciones ácidas, por lo que las formulaciones empleadas en él se encuentran en un rango de pH de 5-8<sup>2</sup>. Todas las películas exhiben valores en este rango por lo que ninguna representa un riesgo hacia este órgano. Adicional al hecho que el ojo cuenta con mecanismos de limpieza y drenado<sup>12</sup> que de igual manera disminuirían la probabilidad de daño tras la aplicación del sistema.

Tabla 15. pH superficial de las películas

Película base (Sin intercalador ni agente osmótico)	Película sin intercalador con agente osmótico	Película optimizada (Con intercalador y agente osmótico)
8	8	7

#### 10.4.8 Degradación

Como se mencionó en la sección 10.4.6, el proceso de hinchamiento presenta una íntima relación con los procesos de disolución, que al trasladarlo a la película nos

referimos a la degradación de este material. Los resultados de la cinética de degradación de las películas por interacción con el disolvente se presentan en la figura 39.

La cinética de degradación de la película base inicia de manera lenta y presenta una meseta hasta los 150s. Posterior a este tiempo, el porcentaje de degradación presenta un incremento súbito continuo hasta la degradación total de la película alrededor de los 4 minutos. Durante la meseta se da la hidratación del polímero y el hinchamiento del mismo, congruente con lo observado en las pruebas de hinchamiento. Ello implica que en los primeros 2 minutos, estos procesos se anteponen a la degradación; al llegar a los 2 minutos y medio los procesos de hidratación alcanzan un máximo, de manera que la mayoría de las cadenas del polímero se encuentran rodeadas por moléculas del disolvente y parte de ellas empiezan a formar parte de la disolución. La velocidad de disolución del polímero aumenta con lo que la degradación de la película también.

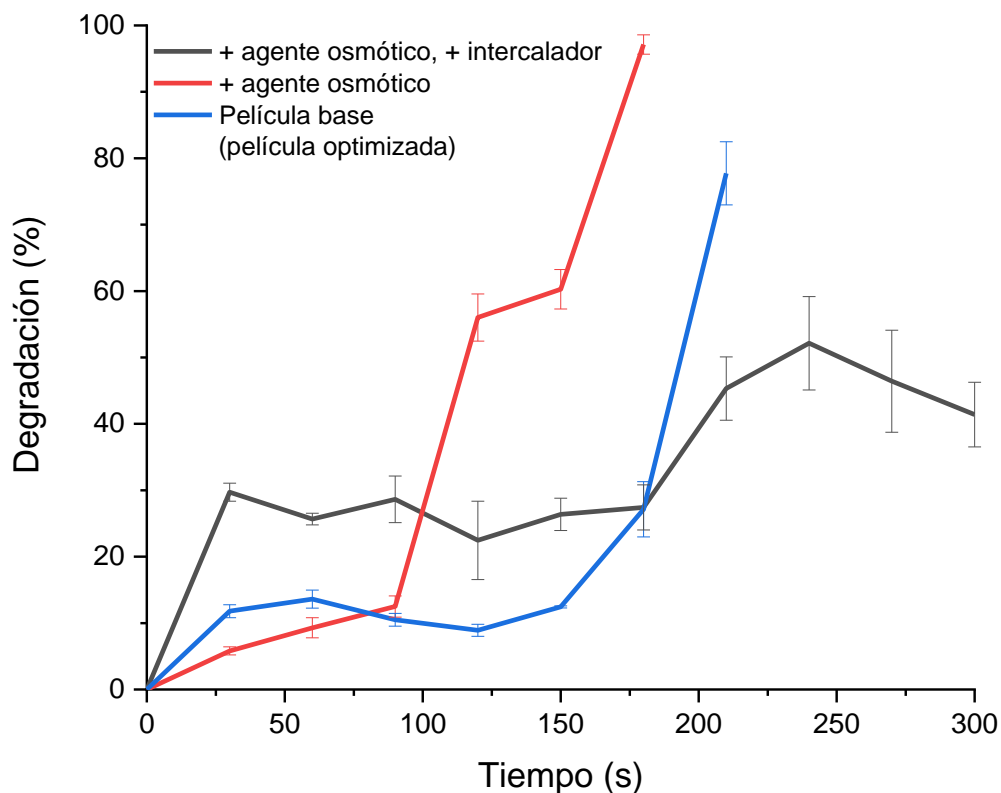


Figura 39. Cinética de degradación de las películas

Este mismo comportamiento lo exhibe la película tras la adición de la maltosa, aunque con algunas diferencias. La degradación de esta película es menor en los primeros tiempos, no obstante, la degradación aumenta rápidamente llegando a su totalidad a menor tiempo. La disminución inicial de la degradación puede explicarse como propuesto por los resultados anteriores. La película se encuentra recubierta por maltosa precipitada, lo que conlleva a una ganancia inicial de peso observada en las pruebas de hinchamiento. En tiempos cortos, primero implica la disolución del disacárido y, posteriormente, la humectación de la película. Una vez que ambos procesos suceden, la degradación de la película incrementa rápidamente ya que ambos componentes ya se encuentran en gran medida disueltos. Esto demuestra el comportamiento de la maltosa como agente osmótico, favoreciendo la pronta entrada de agua al material.

La película optimizada, aquella con agente osmótico e intercalador, presenta la mayor degradación de las tres películas. A pesar de ello, la degradación alcanzada es constante y forma una meseta en los primeros tiempos, análoga a lo observado en la formulación base. Se propone que la pérdida inicial implica la disolución de la maltosa superficial, como sucede en el caso anteriormente descrito. Sin embargo, la película de alginato se mantiene unida e intacta por lo que la degradación conserva el comportamiento observado en la película base. Los tiempos y comportamientos concuerdan con lo observado en el hinchamiento. Un aumento en la degradación se muestra tras haber conseguido el máximo de captación de agua. Esto implica que cadenas no unidas al hidrogel, completamente laxas, escapan de este formando parte de la disolución. De igual manera, debido a que la reacción de entrecruzamiento entre el polímero y el  $\text{Ca}^{2+}$  es una reacción reversible, existe la posibilidad que las moléculas de agua ocasionen la disrupción de dicho enlace<sup>174</sup>. En este caso, la degradación observada consistiría de tanto una degradación física, por la propia disolución de los componentes de la formulación; así como de una degradación química por rompimiento de la estructura de caja de huevo.

En cuanto a las implicaciones de este proceso sobre el parche de microagujas, el soporte fabricado con la formulación base, si bien presenta una desintegración de 35s, la cinética de degradación permite observar que, a pesar de ello, esta podría permitir la inserción de las microagujas y su fijación en el lugar por su hinchamiento. Mientras que el proceso de hinchamiento y de degradación de la formulación optimizada, formando las microagujas, podría causar modificaciones sobre la liberación del sistema L/M.

#### 10.4.9 Permeabilidad al vapor

El ojo requiere para su funcionamiento gran cantidad de oxígeno<sup>175</sup>, por lo que cualquier material que se coloque en él requiere permitir el intercambio gaseoso con el medio. En relación con esto, se determinó la permeabilidad al vapor de las películas, estos resultados se exhiben en la figura 40.

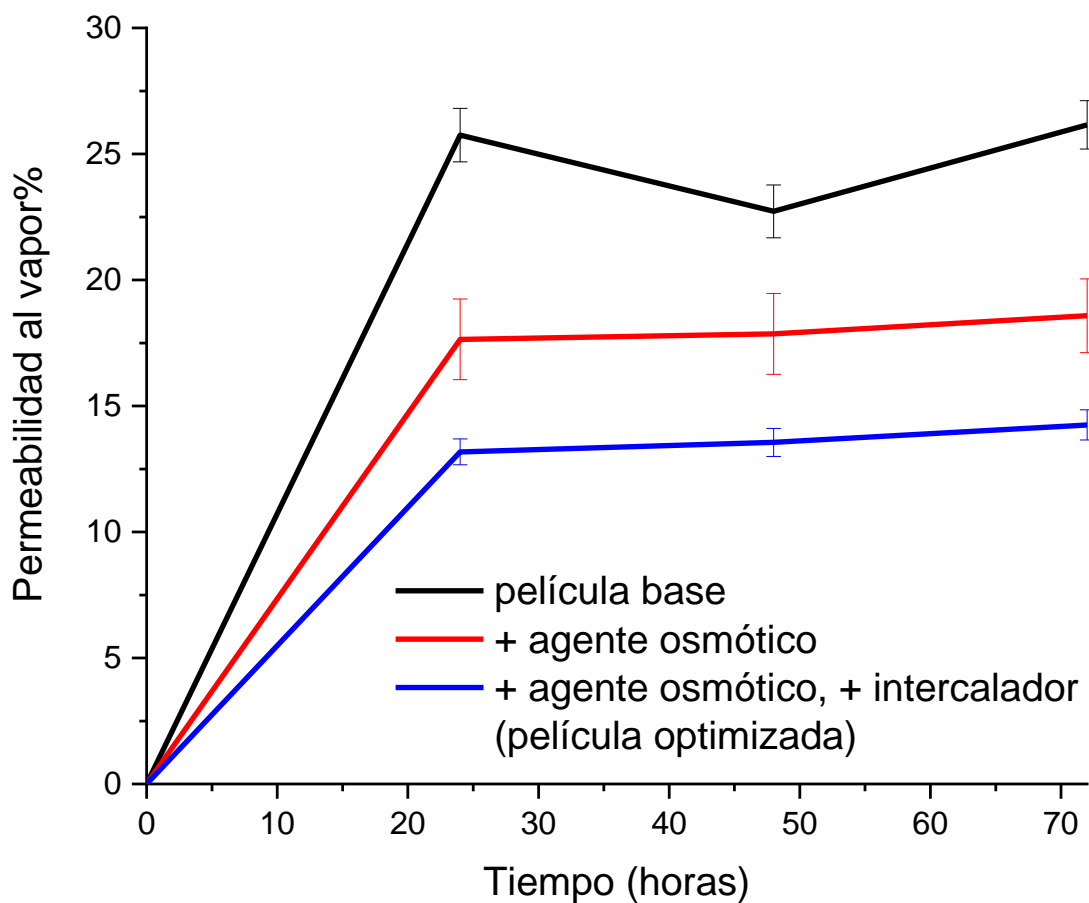


Figura 40. Permeabilidad al vapor a distintos tiempos

La formulación base genera la película con el mayor paso de vapor en comparación con el resto de las formulaciones. En este caso es claro que tanto la adición del agente osmótico como del intercalado producen una disminución en la permeabilidad de la película y el efecto de estos componentes sobre dicha propiedad es aditivo. Previamente se ha observado que la adición de disacáridos a películas poliméricas disminuye la permeabilidad de las mismas<sup>176</sup>. Adicionalmente, este resultado es congruente igualmente con el grosor de la muestra.

Es necesario entender cómo se da el proceso de transporte de vapor para explicar mejor el comportamiento de las películas. El paso de vapor a través del material requiere primero la adsorción de las moléculas del vapor a la superficie del material, seguido por su difusión a través de la película y termina con su desorción. Considerando esto, la permeabilidad del material depende de la interacción que pueda tener este con las moléculas del vapor en cuestión, no obstante, un segundo factor es importante, la tortuosidad del material. Si bien, el efecto de la maltosa sobre matrices poliméricas no ha sido en gran medida explorado<sup>177</sup>, para el caso en cuestión la presencia de depósitos suspendidos en la película modifica la tortuosidad del material y su superficie, afectando así el proceso de difusión y explicando la disminución de la permeabilidad. La modificación de la superficie se ha teorizado como explicación para la disminución de la liberación de compuestos fenólicos en micropartículas de alginato de calcio con maltosa<sup>177</sup>.

Por su parte, la película optimizada presenta la menor permeabilidad al vapor de las tres películas. Esto demuestra un efecto sobre la solubilidad y difusión de agua en el material como previamente observado en otros trabajos<sup>159</sup>. El entrecruzamiento del alginato con el calcio divalente produce una modificación de la red polimérica, causando un ordenamiento sobre esta y un rearrreglo de la tortuosidad del material. Además de disminuir la disponibilidad de grupos funcionales capaces de interactuar con las moléculas del vapor de agua. El efecto del entrecruzamiento es dependiente del catión con el que se intercale el alginato y el método empleado para el entrecruzamiento<sup>178</sup>. Este resultado, en conjunto con las pruebas anteriores,

muestran que la película optimizada no posee características para formar todo el dispositivo. Ya que, si bien sus procesos de hinchamiento y degradación le permitirían penetrar el globo ocular para hacer la entrega del sistema L/M, sus características físicas, como el grosor y su transparencia, y la permeabilidad al vapor que presenta podrían ocasionar molestias, llanto e imposibilitar la visión en caso de formar el soporte. Lo que deriva en que la conjunción de la película base y la película optimizada sea favorecedor para la fabricación del parche con microagujas.

#### *10.4.10 Propiedades Mecánicas – Determinación del módulo de Young*

Las películas fabricadas fueron sometidas a estudios de tensión para la determinación de su módulo de Young. Las gráficas de esfuerzo vs. Deformación correspondientes se presentan en la figura 41. En dicha figura, se aprecia que la formulación base posee las mejores propiedades mecánicas de las tres películas. Lo cual implica que la incompatibilidad de la maltosa en la formulación afecta de manera negativa sobre las propiedades mecánicas de las películas. Esto es contrario a lo reportado en la literatura, donde su adición a formulaciones de alginato se asociaba con una función de refuerzo<sup>32</sup>. No obstante, en ninguno de estos estudios previos se presentaba la inestabilidad del disacárido en la película. Por lo que es preciso evaluar si el efecto osmótico sobre el desempeño del parche es suficiente para justificar su presencia en la formulación final. Sin embargo, las películas fabricadas presentan un aumento en el módulo de Young con respecto a otros trabajos con alginato, tanto como película como formando ya microagujas,<sup>159, 179, 180</sup>, además de presentar características comparables a otros sistemas poliméricos empleados en la fabricación de películas de aplicación biomédica o microagujas<sup>63, 134</sup>.

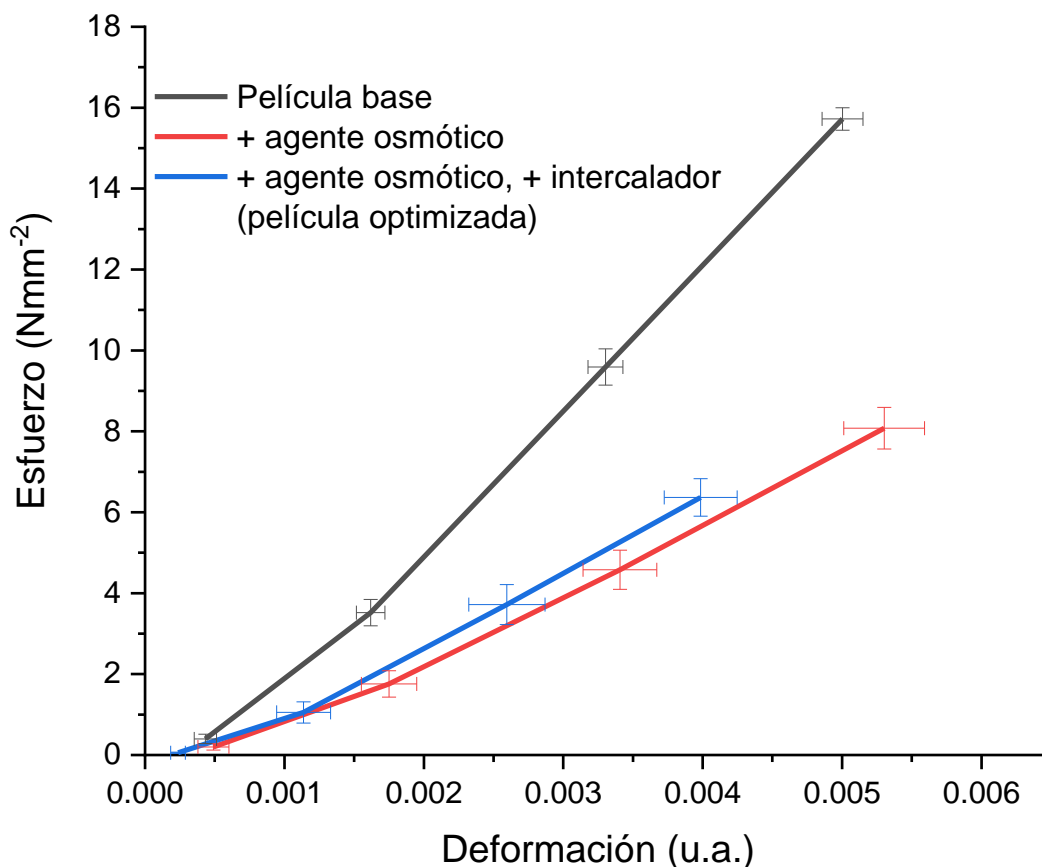


Figura 41. Gráfica de esfuerzo vs. Deformación

A pesar de lo anterior, la película optimizada presenta una mejoría de sus propiedades por la adición del cloruro de calcio. Este hecho está relacionado con la modificación del arreglo de las cadenas poliméricas por la reacción de entrecruzamiento con el catión divalente<sup>32, 156</sup>.

Con respecto al módulo de Young (fig. 42), todos presentan una diferencia significativa entre sí ( $p < 0.005$ ), por lo que el efecto del entrecruzamiento o bien la inestabilidad de la maltosa no son efectos despreciables. Específicamente para la película optimizada, es justo decir en esta sección que acorde a la optimización de esta respuesta, el modelo generado posee una deseabilidad de 0.83 con un sesgo calculado de 3.26%. Ambos resultados confirman la aplicabilidad del modelo generado en la fabricación de películas. Si bien otras variables de respuesta pudieron ser estudiadas para la optimización, el módulo Young destaca entre estas al ser un valor producto de la relación entre esfuerzo y deformación. Lo cual implica



que su maximización conlleva a una película de baja elasticidad, pero con alta resistencia a una fuerza de tensión. Ambas son características deseables para formar microagujas rígidas y capaces de penetrar tejido. De manera tal que los resultados de estas pruebas de tensión respaldan el uso de la formulación optimizada en la fabricación de las microagujas.

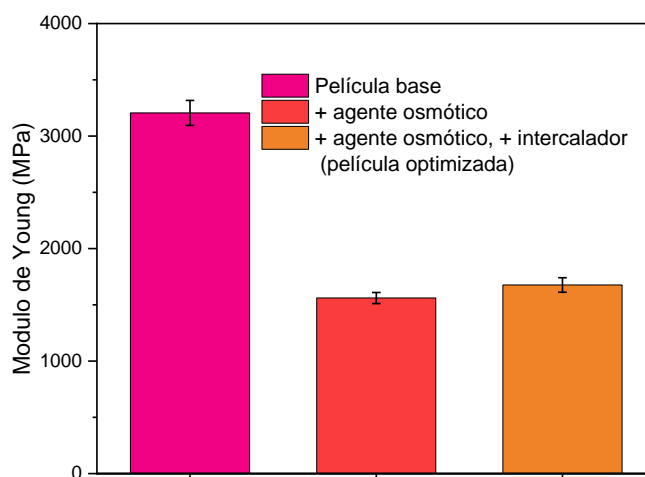


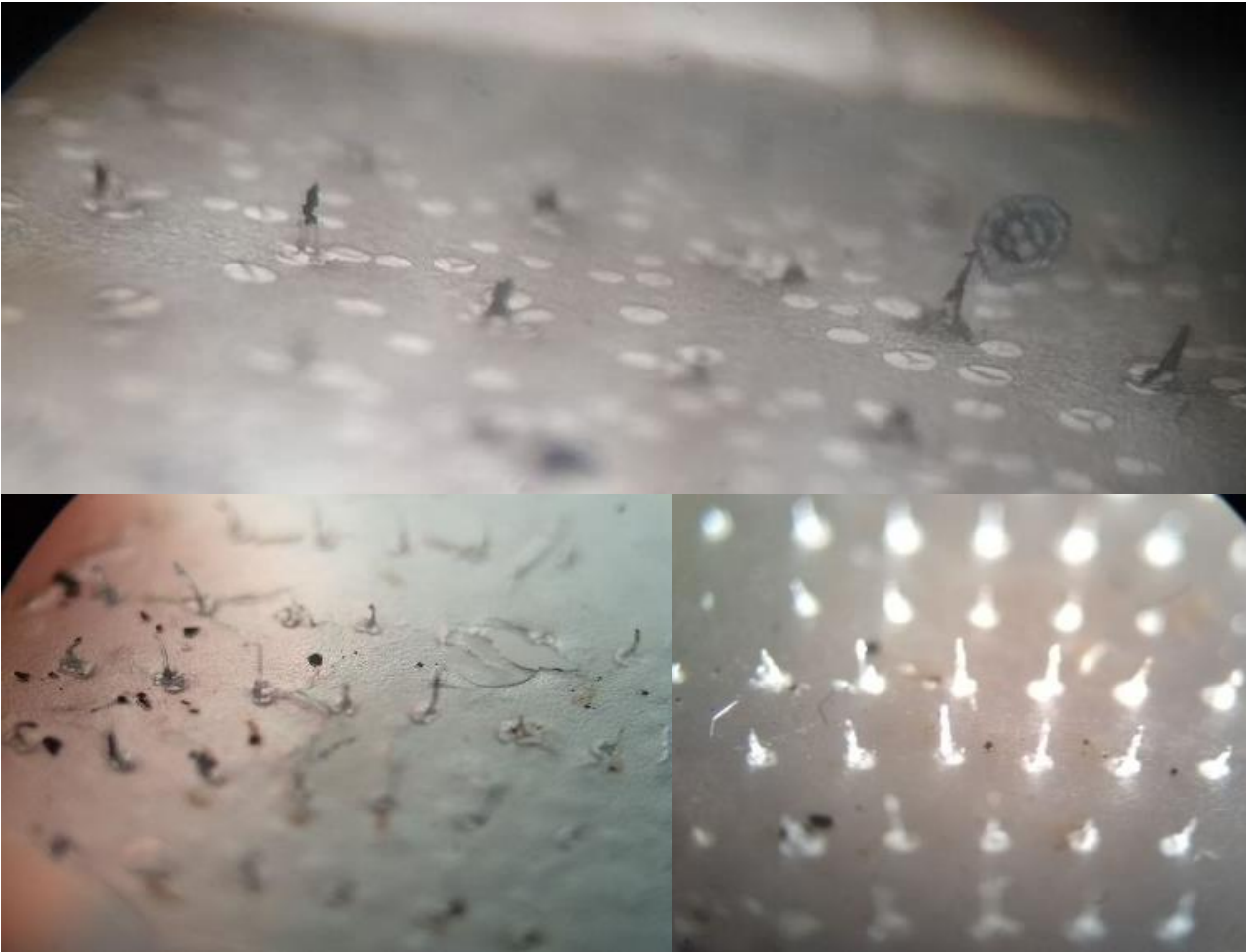
Figura 42. Módulo de Young calculado al 0.2% de deformación

### 10.5 Fabricación del parche con microagujas

La fabricación del parche con microagujas es dependiente de características propias de la formulación, así como del molde. La reología de la formulación impacta directamente sobre su capacidad de llenar las cavidades y dar la formación de las microagujas. La composición de la misma impacta sobre su capacidad de esparcimiento en el molde, afectando la forma del parche y las microagujas. Se resalta la importancia de la comprensión de los fenómenos de superficie presentes entre el molde y la formulación.

En la figura 43, se encuentran fotografías del parche con microagujas tomadas en un microscopio de disección. En las fotografías es posible observar las agujas con una coloración café/negra por la presencia de la magnetita en el sistema L/M adicionado en la formulación. Mientras que el resto del parche se ve traslucido congruente con lo observado para la formulación base en la sección 10.4.1. No obstante, existe la aparición de rugosidad y burbujas relacionados con el proceso

de secado y aplicación de vacío respectivamente. Si bien, el sonicado debería ayudar a la disminución de las burbujas, no es suficiente para contrarrestar lo producido por la aplicación de vacío. Adicionalmente, existe la presencia de aglomerados del sistema L/M fuera de las microagujas, depositadas en la base.



*Figura 43. Fotografías de parches con microagujas*

En este caso en específico, la formulación es hidrofílica, mientras que el molde es hidrofóbico al estar hecho con una cera, por lo que lo que para conseguir el llenado de las cavidades es necesario la aplicación de energía. Esto tiene como resultado el proceso de fabricación descrito en la sección 9.5.2. Si bien el proceso es funcional, no es óptimo puesto que tiene varias desventajas. Como queda demostrado por el escape de la magnetita desde las cavidades a la base tras el último ciclo de vacío y sonicación. Lo que origina que las microagujas posean una menor cantidad de

magnetita capaz de ser introducida en el ojo. De igual manera, queda en evidencia que el proceso lleva a una mezcla de las formulaciones que puede afectar las propiedades estudiadas en la sección 10.4. Adicionalmente, los fenómenos de superficie y el proceso de secado afectan directamente la apariencia del parche y la morfología de las microagujas causando heterogeneidad en el producto. Cabe destacar que otros procesos como la centrifugación o el uso de solo vacío o sonificado, así como combinación de estos fueron investigados sin éxito. De igual manera, el uso de calentamiento durante el secado fue estudiado, desafortunadamente, el rendimiento del proceso era del 50% motivo por el que se descartó. En este sentido, si bien fue posible obtener un parche con microagujas, es necesario investigar modificaciones en el proceso para mejorar las características finales del producto.

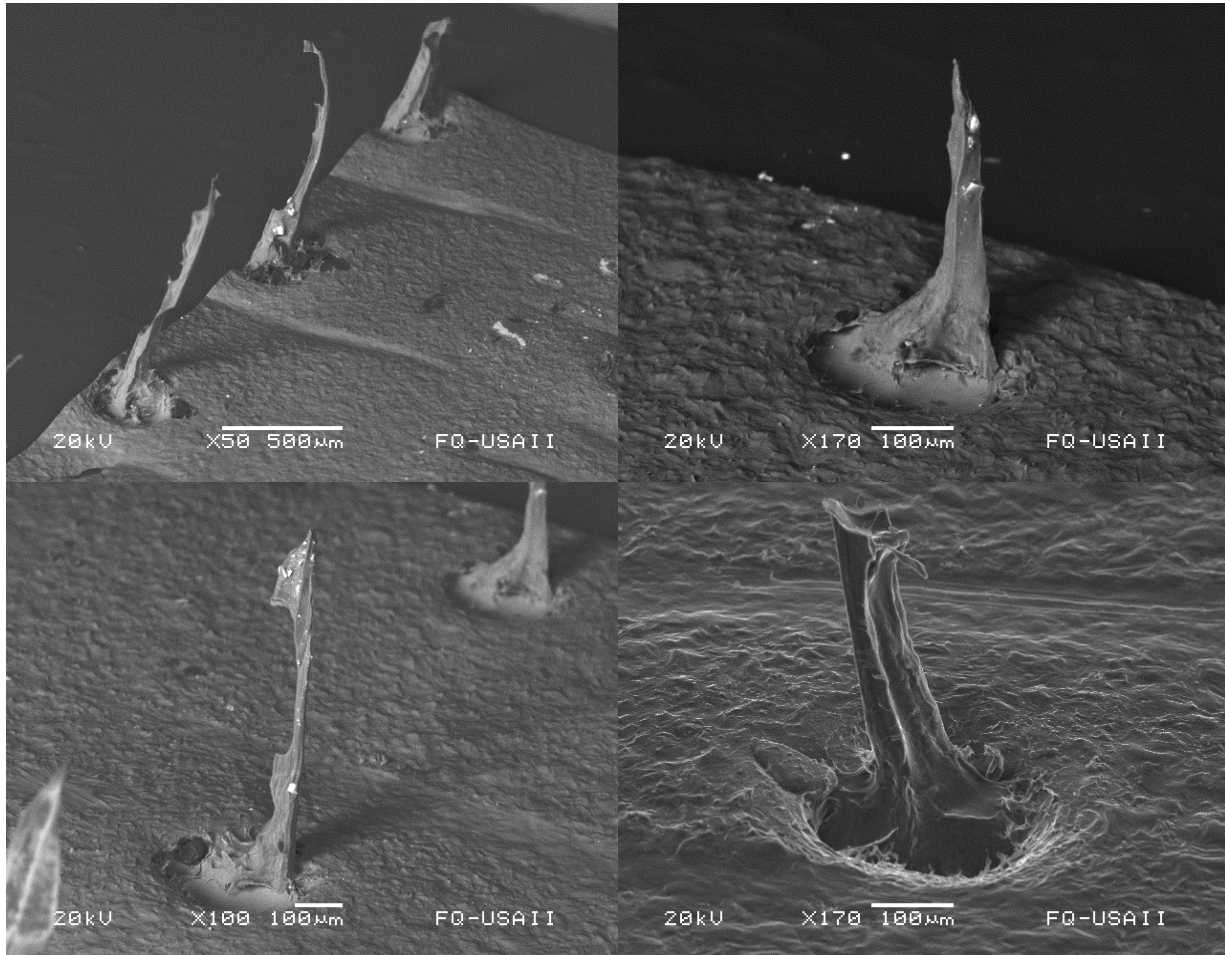
Derivado de las desventajas del método propuesto, estas modificaciones deben de estar encaminadas a la mejora de la residencia del sistema L/M en las cavidades, la mejora de la interacción de la formulación con el molde para favorecer su adhesión en él y la disminución de aparición de burbujas. Para ello es preciso llevar a cabo la evaluación a distintas presiones de vacío, diferentes frecuencias del baño ultrasónico y tiempos empleados, así como investigar el efecto sobre el producto final de un llenado fraccionado de las cavidades con tiempos de secado intermedios a cada ciclo.

## 10.6 Caracterización del parche con microagujas

### 10.6.1 Microscopia electrónica de barrido

Si bien las microagujas fabricadas tienen el tamaño suficiente para ser observadas en el microscopio de disección, la microscopia electrónica de barrido permite una mejor descripción del producto obtenido. Las imágenes del parche fabricado se presentan en la figura 44. Las microagujas tienen un largo de  $(635.74 \pm 75.04) \mu\text{m}$  y ancho de  $(261.81 \pm 8.30) \mu\text{m}$ . Suponiendo un llenado completo de las cavidades, existe una reducción de tamaño cercana a 5 veces el largo de la indentación en el

molde. Esta reducción se relaciona con los fenómenos de superficie presentes durante el secado. La eliminación de agua produce un aumento de las fuerzas cohesivas de la disolución polimérica, que producen una contracción de la misma que se traduce en la reducción del tamaño final.



*Figura 44. Microscopias a distintas regiones de un mismo parche con microagujas*

Por lo que, un cambio o modificación del material del molde o la adición de un tensoactivo a la disolución podrían mejorar la adhesión de la formulación a la cavidad a manera de limitar la reducción y mejorar la forma de las microagujas una vez secas. Las microagujas fabricadas, se observan deformes, incompletas e irregulares, por lo que estas difícilmente podrían penetrar el ojo. Esto únicamente resalta la importancia de mejorar el proceso para asegurar una mejor formación del parche. Adicional a este hecho, el tamaño obtenido si bien permite penetrar la primera barrera del ojo, la córnea, no es suficiente para llegar a otras regiones del

ojo; dificultando de esta manera el acceso a la parte posterior del mismo. Un incremento de 400  $\mu\text{m}$  como mínimo es necesario para alcanzar el espacio en el interior de la cámara vitreal<sup>17, 19</sup>, acorde a los distintos grosores reportados para las diversas túnicas del ojo, y lograr de esta manera un acercamiento a la entrega en la región deseada.

#### *10.6.1.1 Espectroscopia de energía dispersiva de rayos X característicos (EDS)*

Para evaluar la distribución de la magnetita en el parche y las microagujas se realizaron mapeos de hierro en este. Las imágenes de microscopio y el mapeo correspondiente se muestran en la figura 45. El mapeo elemental confirma que el proceso de fabricación conlleva una distribución inespecífica y heterogénea de la magnetita en el parche, contrario a lo deseado. La figura 45a.2 muestra la completa salida de la magnetita de la cavidad producto por el último ciclo de vacío tras la adición de la formulación base.

Por su parte en figura 45b.2 la mayor parte de la magnetita se ubica en la región del ápice de la microaguja: mientras que la microaguja en la figura 45c.2 exhibe la distribución más homogénea de magnetita. Las nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  se encuentran tanto dispersas como formando aglomerados en el parche y las microagujas. Por lo que el método para integrarlas a la formulación polimérica no es el idóneo. Ya que se esperaba una mejora de su dispersión por interacción con la arcilla adicionada a la formulación. Dicho efecto se observó desde el establecimiento de los niveles y procesos de síntesis (sección 10.1.1) así como reportado en la literatura<sup>67, 125-128</sup>. A pesar de la distribución no uniforme de la magnetita y la formación de aglomerados, las nanopartículas se encuentran embebidas en la película que forma el parche y las microagujas mostrando su integración en el material.



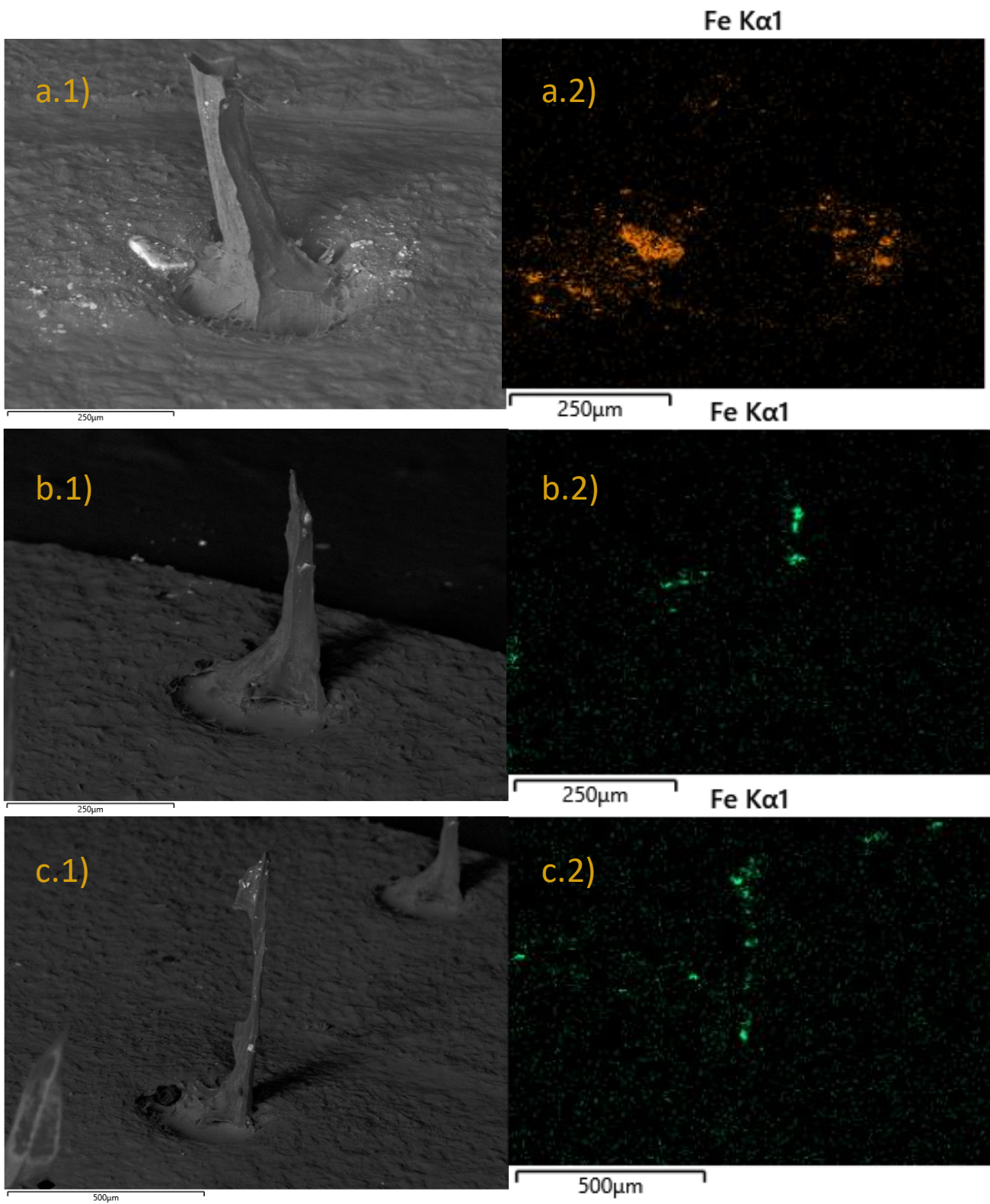


Figura 45. Imágenes de diferentes microagujas ( a, b, c) obtenidas por SEM (1) y sus respectivos mapeos de hierro (2)

### 10.6.2 Uniformidad de contenido de la magnetita en el parche

Si bien en las secciones anteriores queda establecido que la distribución de la magnetita no se concentra en las puntas como esperado acorde al proceso propuesto, es necesario conocer la cantidad de magnetita por parche. La tabla 15 muestra los resultados de dicha cuantificación, considerando que el  $\text{Fe}^{3+}$  es únicamente proveniente de degradación ácida de la magnetita.

Tabla 16. Resultados de cuantificación de  $\text{Fe}^{3+}$  determinada y magnetita calculada.

Parche	Cantidad de $\text{Fe}^{3+}$ ( $\mu\text{g}$ )	Cantidad de magnetita ( $\mu\text{g}$ )
1	16.020	22.522
2	17.960	25.249
3	16.920	23.787
4	25.490	35.835
5	26.280	36.946
6	32.440	45.606
Promedio total	22.518	31.658
DS total	5.997	8.431
cv%	26.631	26.631
eem	2.448	3.442

Los resultados de la cuantificación muestran una gran variación. Esta variación es aunada al proceso de fabricación tanto de los moldes como del parche. El tamaño de las cavidades impacta directamente en el volumen final de la formulación que puede albergar, por lo que variaciones al momento de la penetración con el rodillo de microagujas de acero se traducen a diferencias de la cantidad de magnetita. Sobre la formulación, la existencia de aglomerados en ella evita una distribución uniforme de la magnetita una vez depositada ya que puede ocasionar el taponamiento de las cavidades. Por último, con respecto al proceso el escape de la formulación con magnetita de las cavidades al parche produce zonas de diferentes concentraciones de magnetita.



Acerca de la cantidad de magnetita en el parche, esta se encuentra dentro del rango comúnmente empleado para su uso como agente de diagnóstico<sup>83, 181</sup> donde por tamaño y concentración presenta nula a baja toxicidad<sup>7</sup>. No obstante, esta tiene posibilidad de aumentar para mejorar su desempeño una vez aplicado en el ojo.

## 11 Conclusiones

El presente trabajo demuestra la posibilidad de la fabricación de un dispositivo con microagujas de formulación dual polimérica para la administración de magnetita en ojo. Esto por medio de un proceso sencillo, empleando materia prima de bajo costo tanto para la fabricación de este parche como para la elaboración del molde; donde este último es reutilizable.

Fue posible relacionar y controlar el tamaño de dicho óxido de hierro mediante la realización de un diseño de experimentos explorando la presencia de la laponita en el medio y la temperatura. Obteniendo por este medio nanopartículas de tamaño aproximado de 8nm, valor relevante sobre sus propiedades magnéticas, características de biocompatibilidad y biodegradación. El producto presentó características adecuadas para su integración a formulaciones poliméricas acuosas como mostrado por la mejora de su potencial Z y su hidrofiliidad.

Con respecto a la formulación polimérica, fue posible la optimización de su módulo de Young, maximizando su valor en condiciones específicas (mayor cantidad de laponita a emplear). La película resultante posee características adecuadas para el uso de su formulación para la fabricación de microagujas, es decir, un rápido hinchamiento y una pronta degradación, resistente y rígida, de pH no irritante, por mencionar algunas. Se evaluó el efecto del agente entrecruzante y agente osmótico, determinando como factible el uso de una formulación carente de ambos para la formación del soporte de las microagujas procedentes de la formulación optimizada.

## 12 Perspectivas

Acerca del sistema L/M, si bien, existen estudios previos, como los explorados en los antecedentes, que muestran bajo a nulo daño a sistemas biológicos por parte de sistemas similares, es importante realizar estudios de toxicidad, viabilidad celular y movilidad que confirmen las bondades de adicionar la arcilla como recubrimiento de las nanopartículas magnéticas. Además de realizar estudios de magnetización que comprueben el comportamiento superparamagnético de las nanopartículas y determinen si existen algún efecto sobre este por parte de la presencia de la arcilla.

Concerniente a la formulación, se propone la exploración de modificaciones a la misma que evalúen como variable la concentración de agente osmótico y adición de un tensoactivo para buscar mejorar las características del parche con microagujas. De igual manera, es importante investigar y caracterizar la formulación optimizada como líquido mediante estudios de ángulo de contacto y reología.

Por último, El parche de microagujas fabricado presenta áreas de oportunidad para una mejora de sus características. En específico, se proponen modificaciones a la formulación y proceso para mejorar la forma y figura de las microagujas. Así como, atacar los problemas relacionados con la uniformidad de contenido y la ubicación del sistema L/M en las microagujas. De igual manera, deben estudiarse distintos procesos para la integración del sistema L/M a la formulación polimérica que apoyen tanto a la dispersión uniforme del intercalado y la uniformidad de contenido de este en las microagujas. Adicionalmente se requieren las pruebas de penetración del ojo y de liberación del sistema L/M a partir del parche como estudios para tener una caracterización más completa del parche con microagujas fabricado.

## 13 Anexo

13.1 Anexo 1. Difractogramas de los sistemas L/M sintetizados en el diseño de experimentos, el resultado de refinamiento y el ajuste gaussiano para las señales predominante de magnetita usadas para el cálculo de tamaño de cristalito.

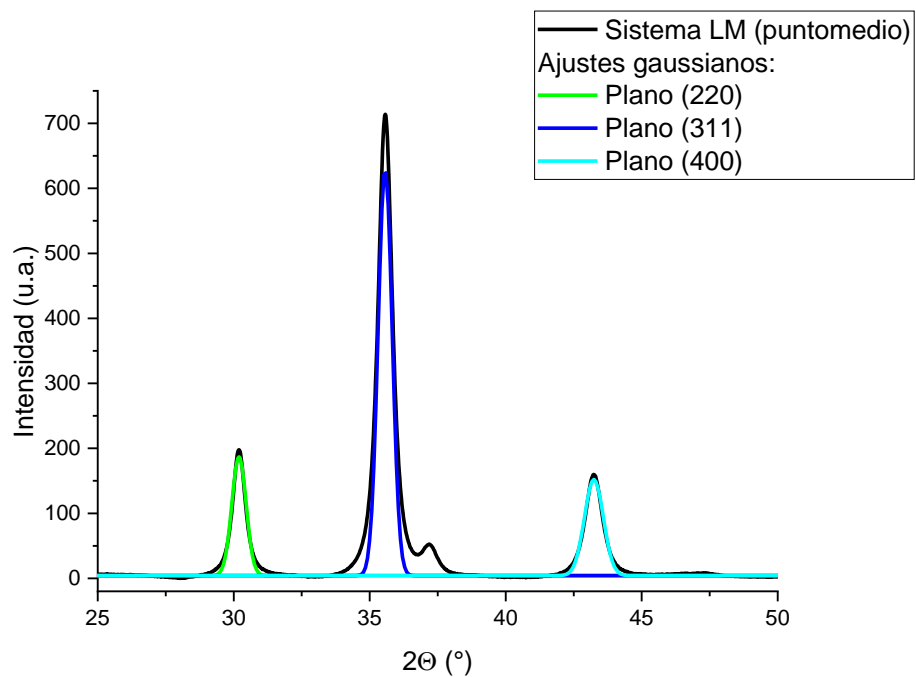
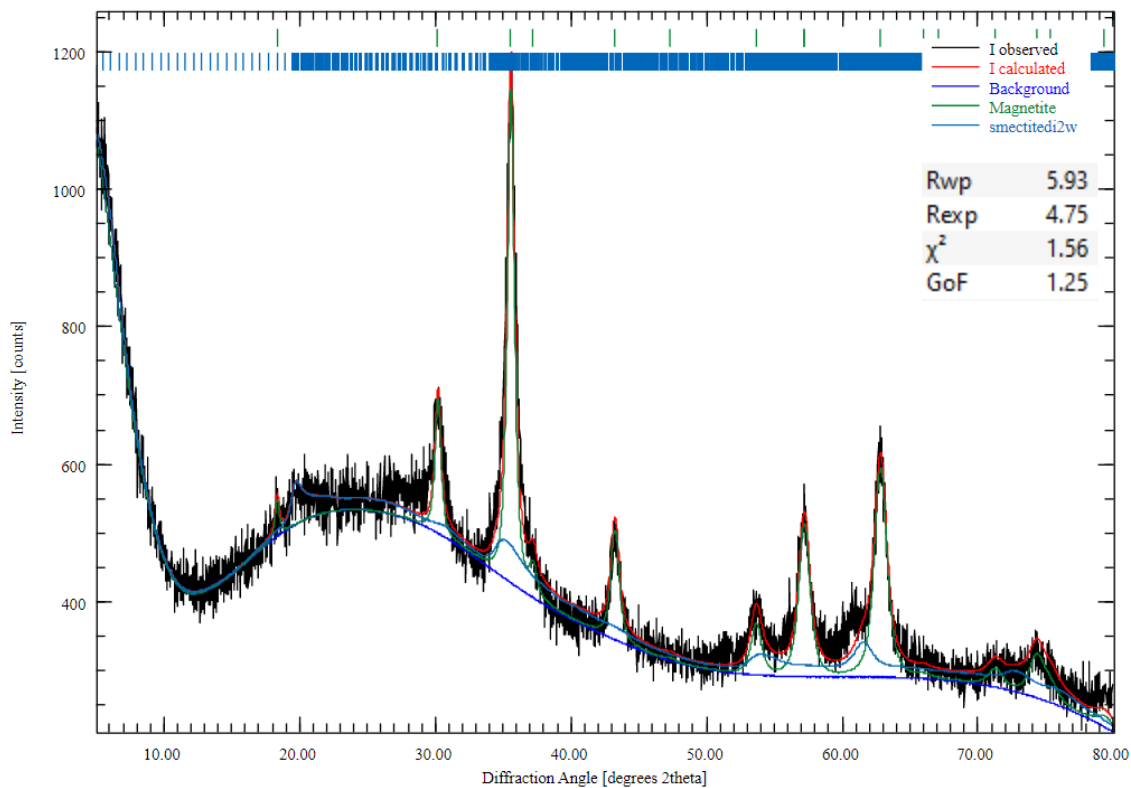


Figura 46. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 1.1 y temperatura = 75°C (1). Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.

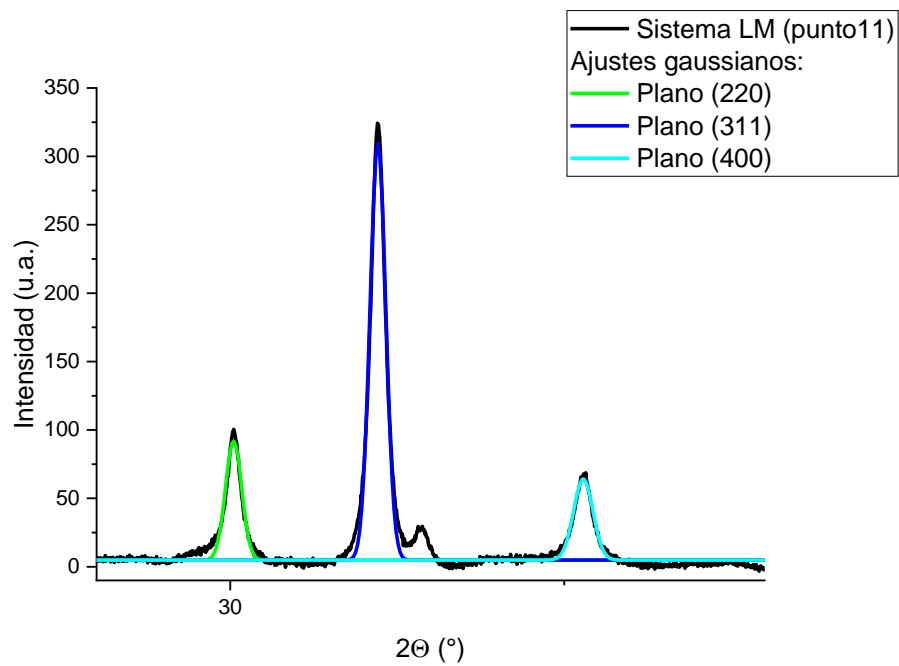
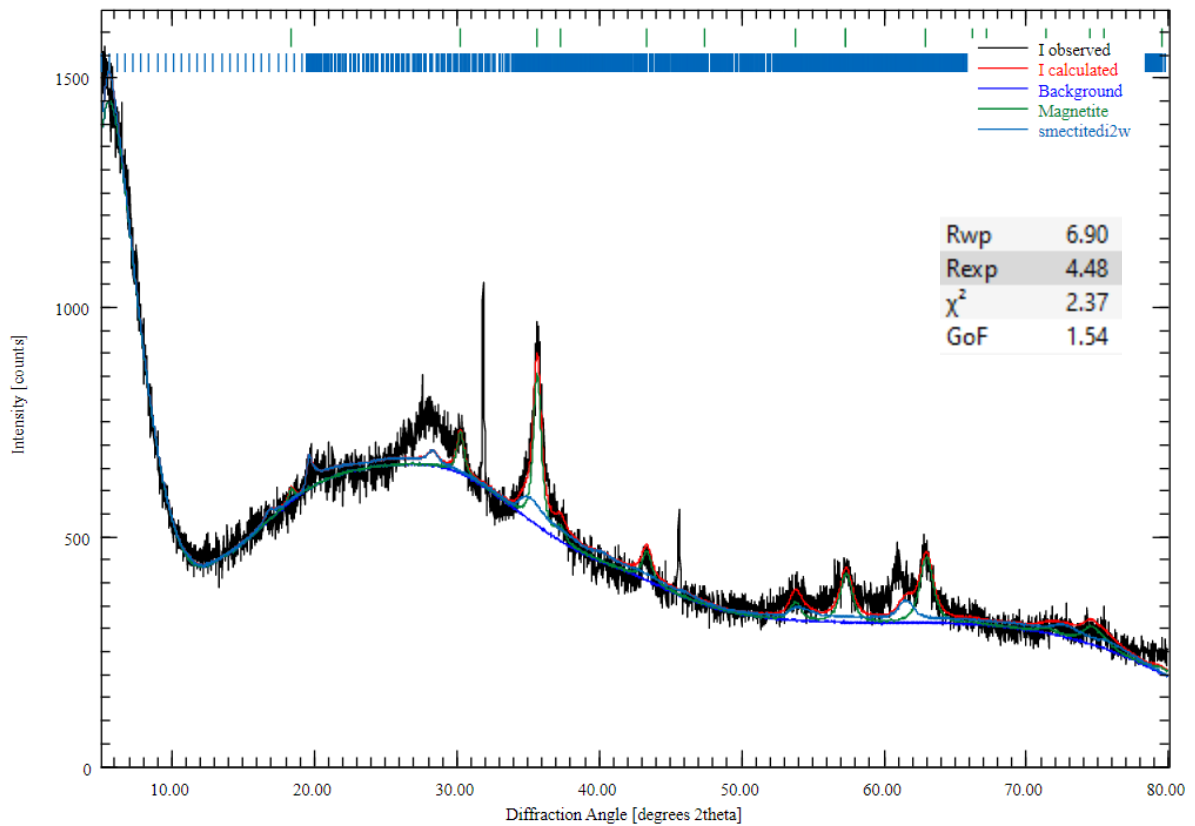


Figura 47. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 2 y temperatura = 90°C. Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.

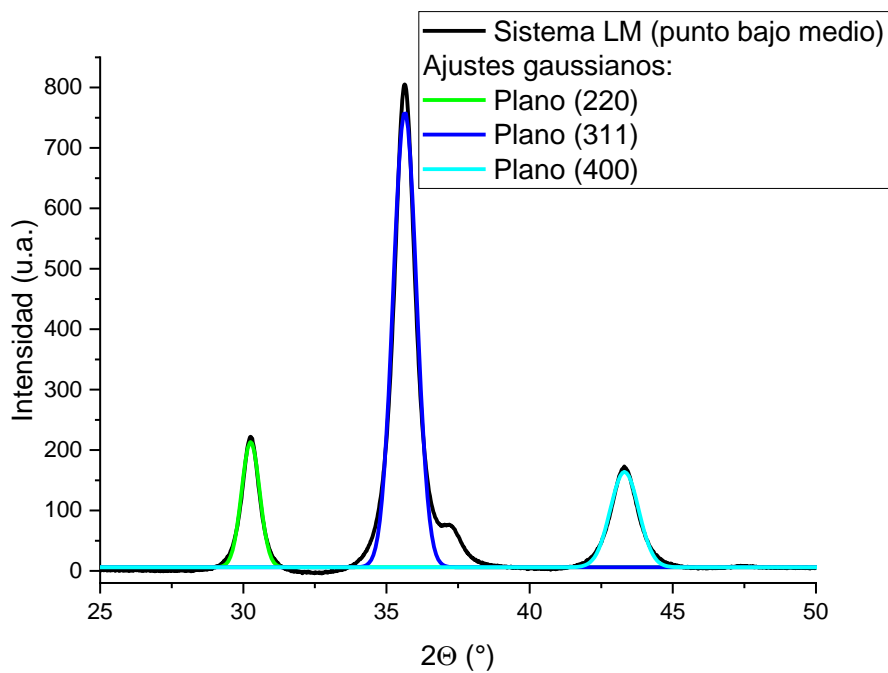
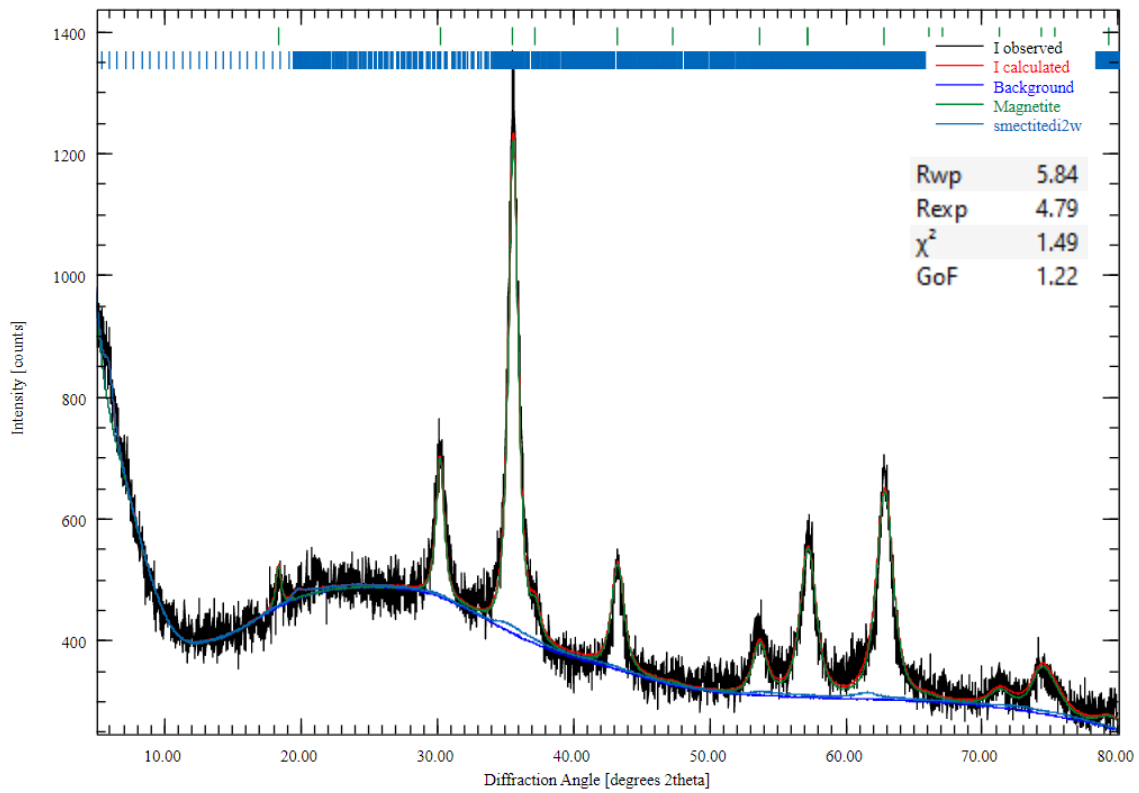


Figura 48. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 0.2 y temperatura = 75°C. Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.



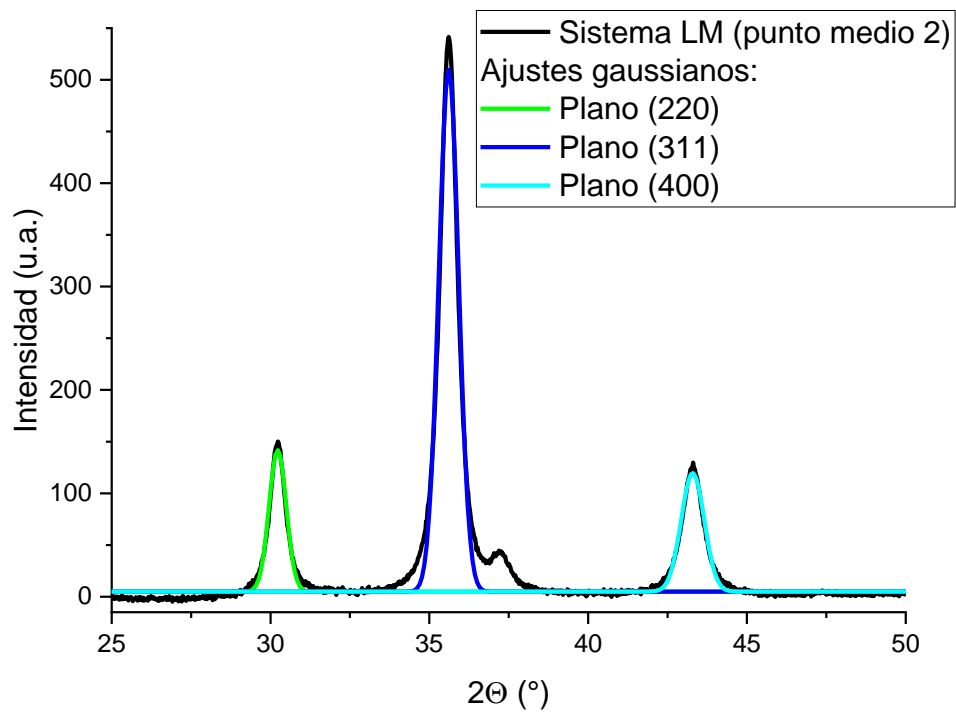
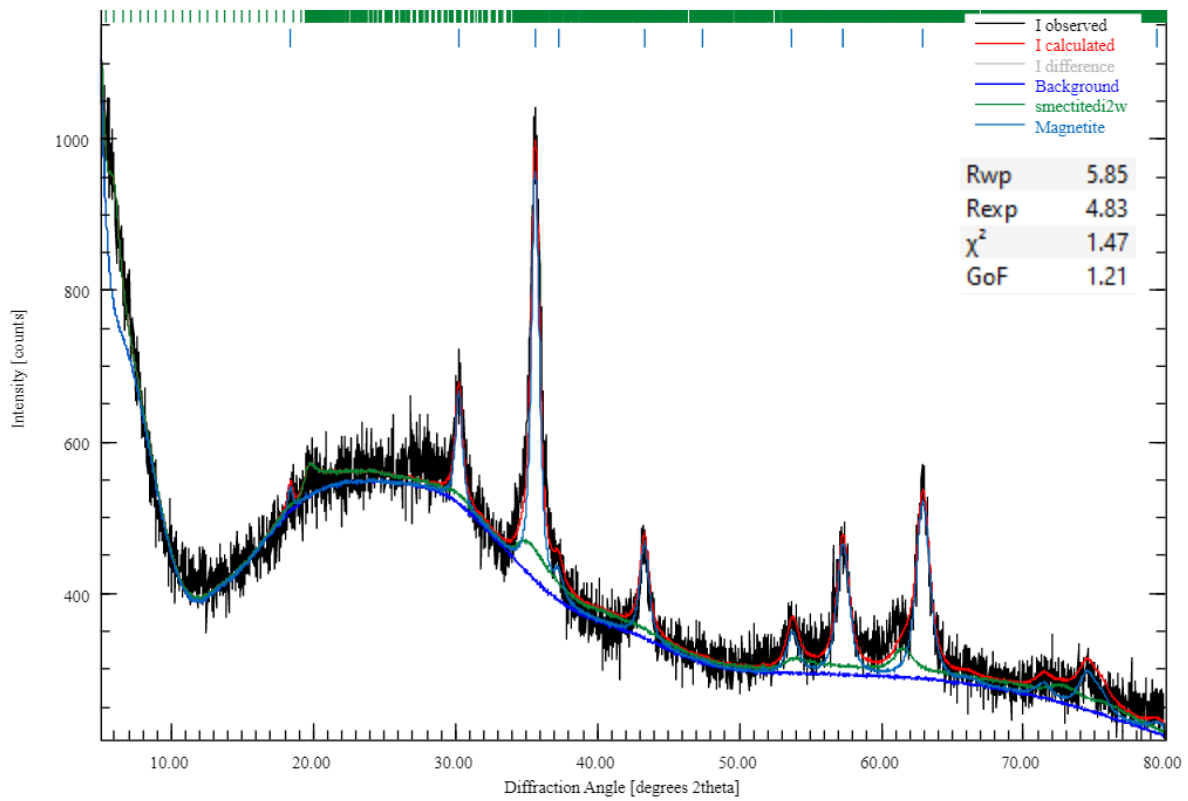


Figura 49. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 1.1 y temperatura = 75°C (2). Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.

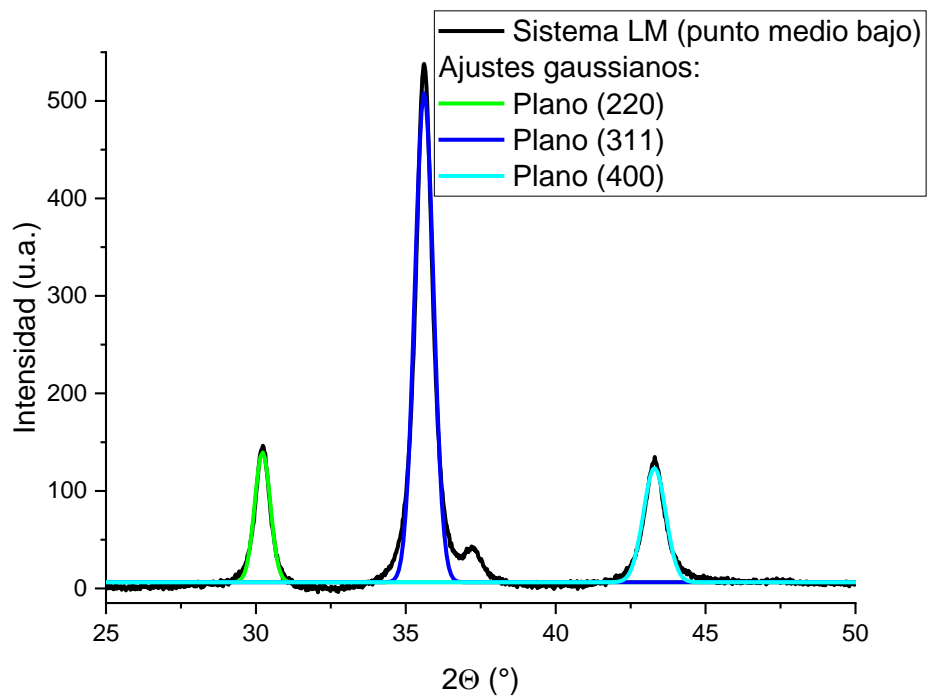
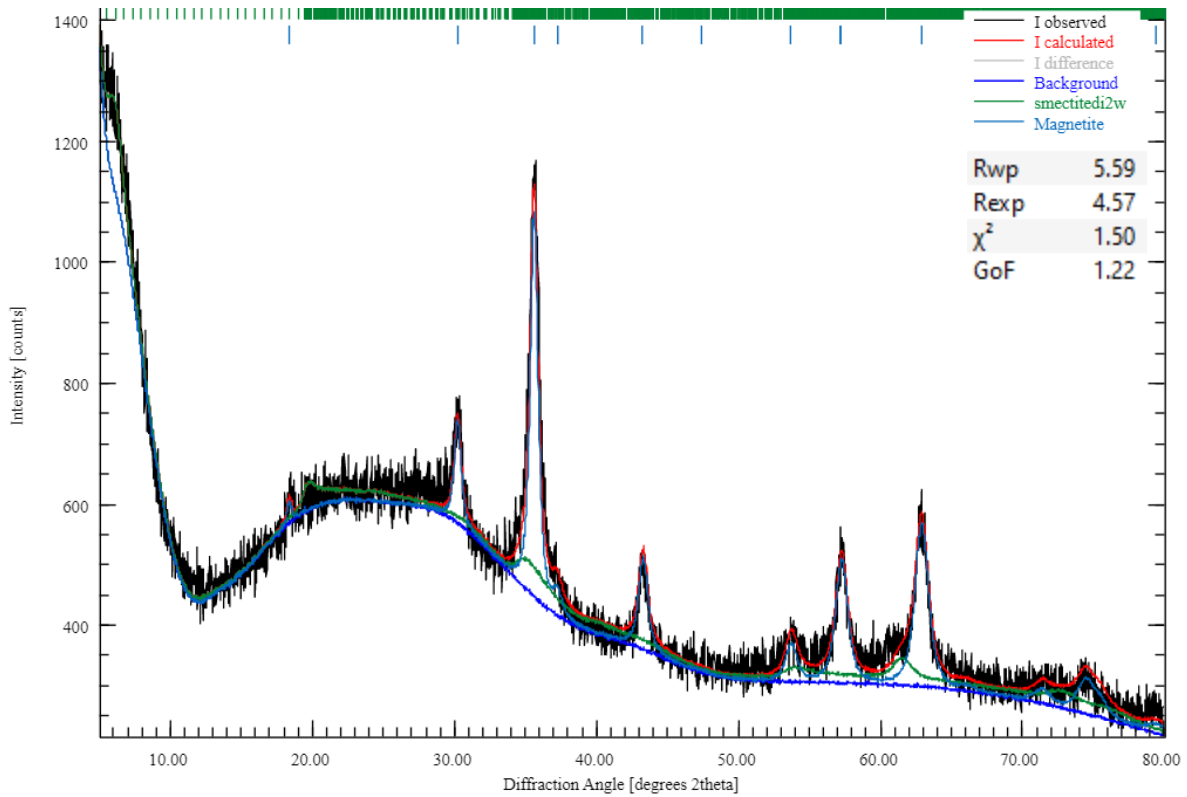


Figura 50. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 1.1 y temperatura = 60°C. Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.

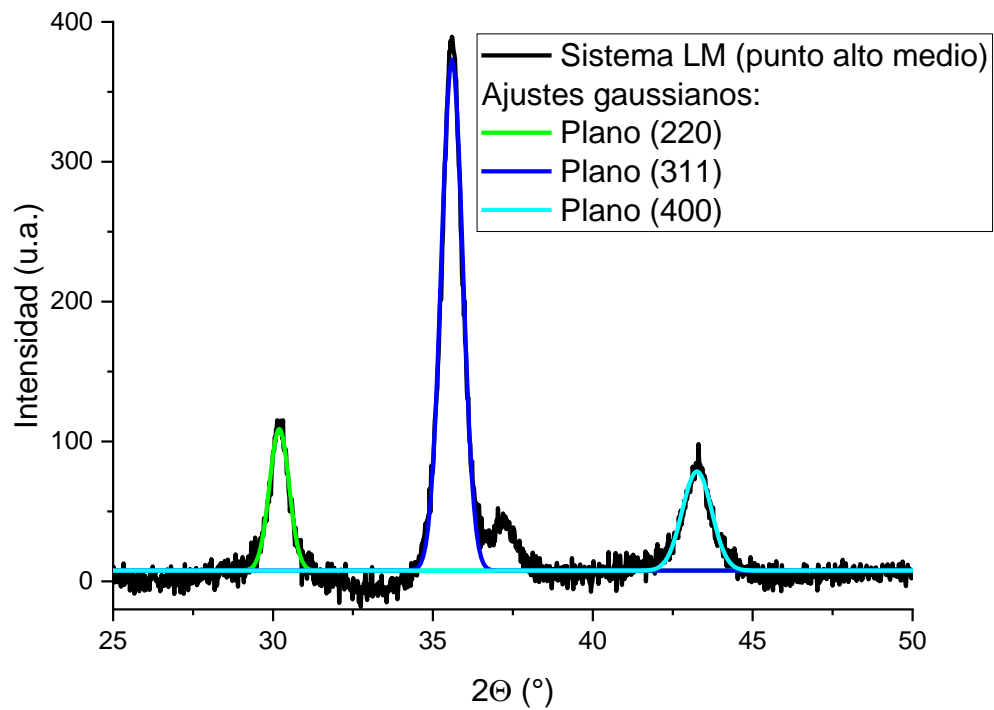
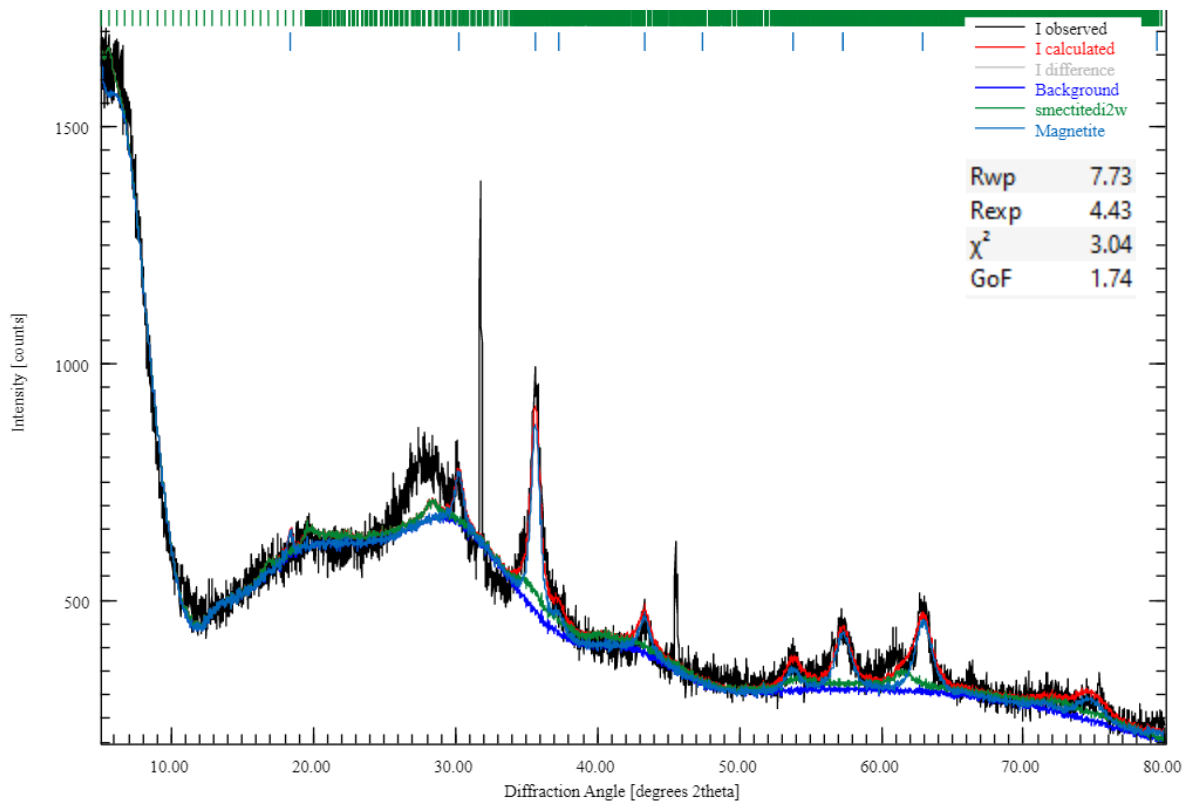


Figura 51. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 2 y temperatura = 75°C. Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.

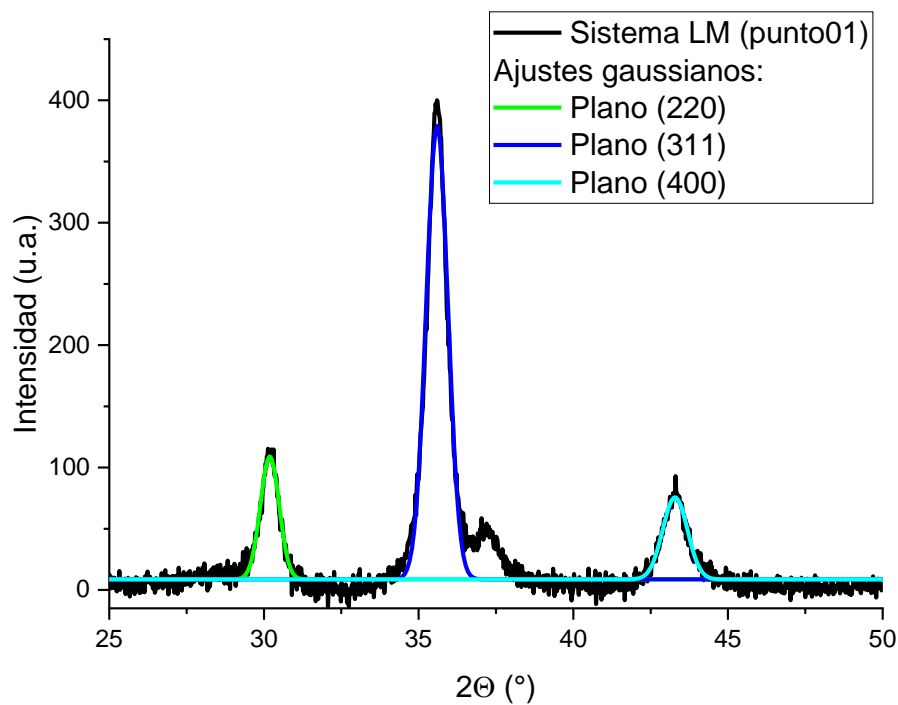
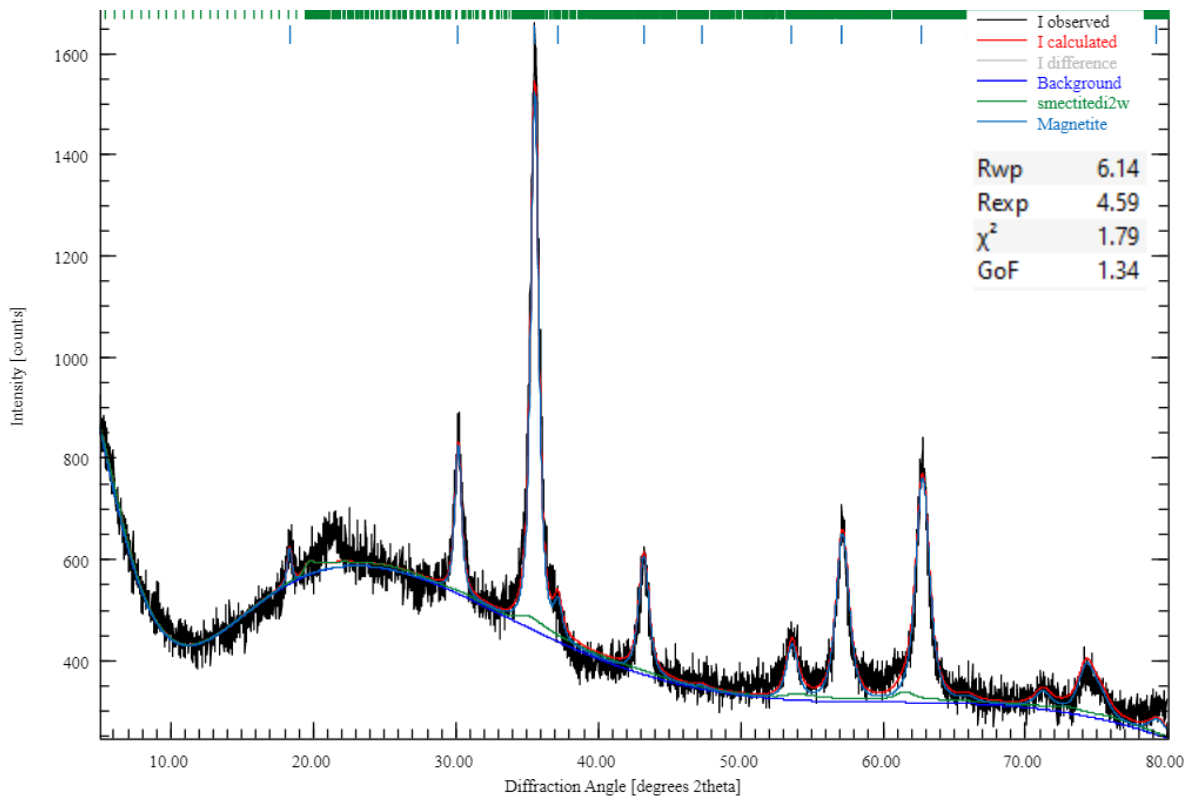


Figura 52. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 0.2 y temperatura = 90°C. Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.

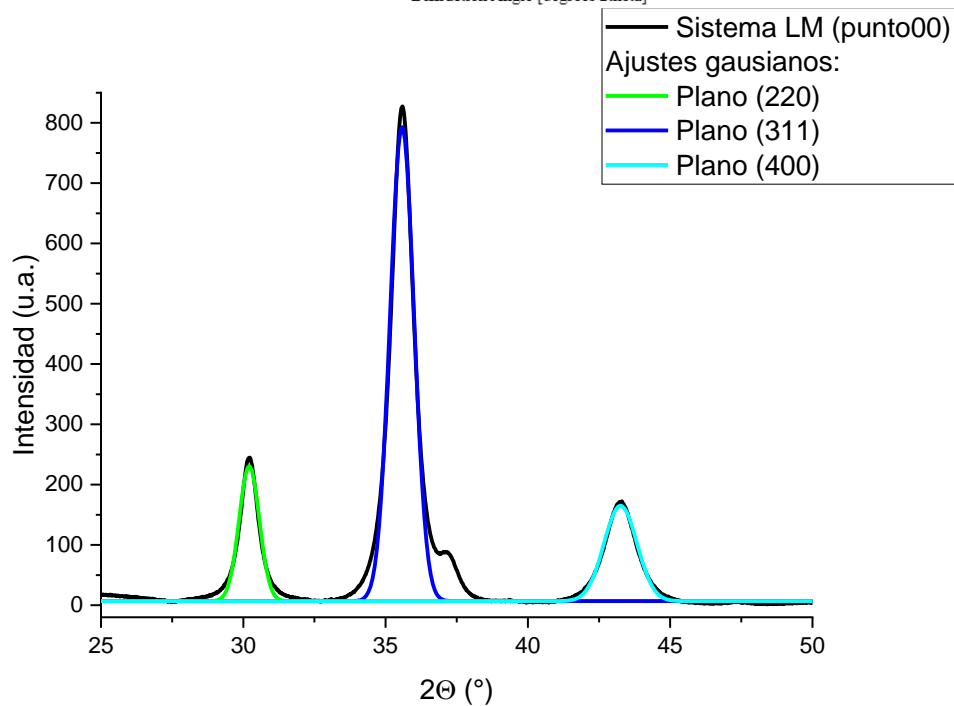
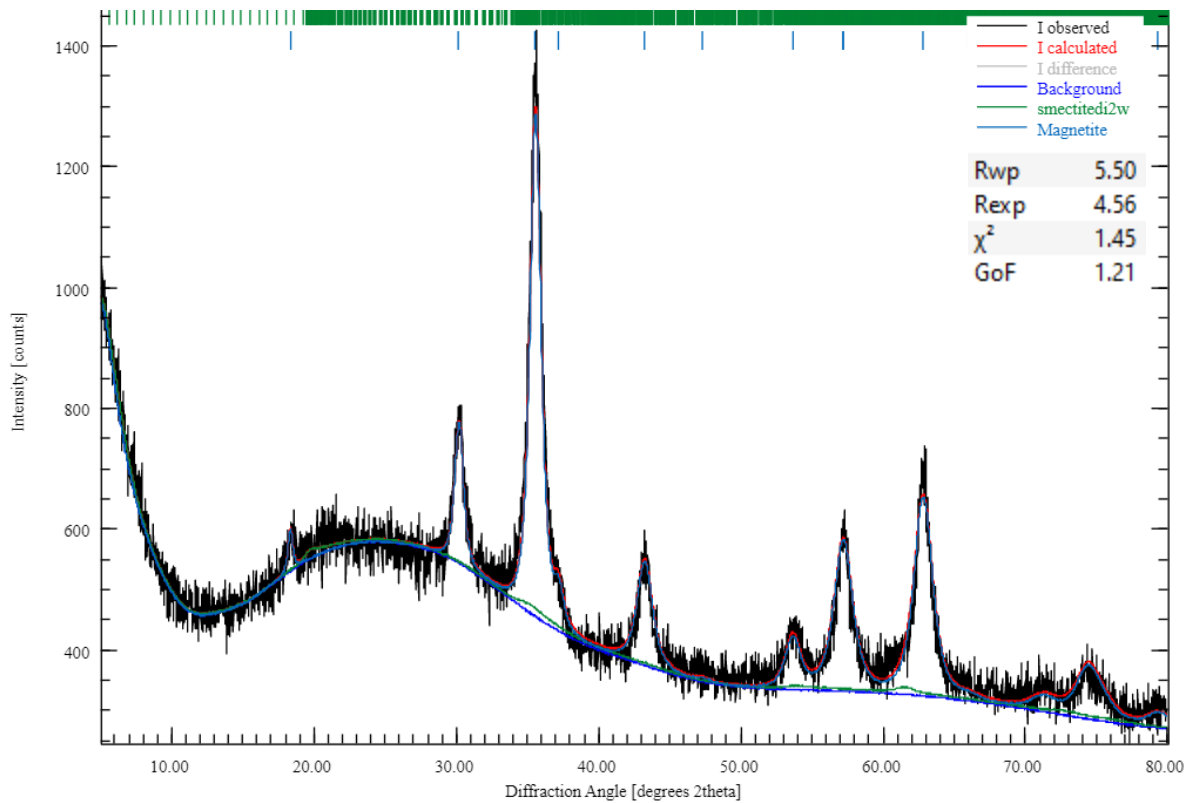


Figura 53. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 0.2 y temperatura = 60°C. Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.

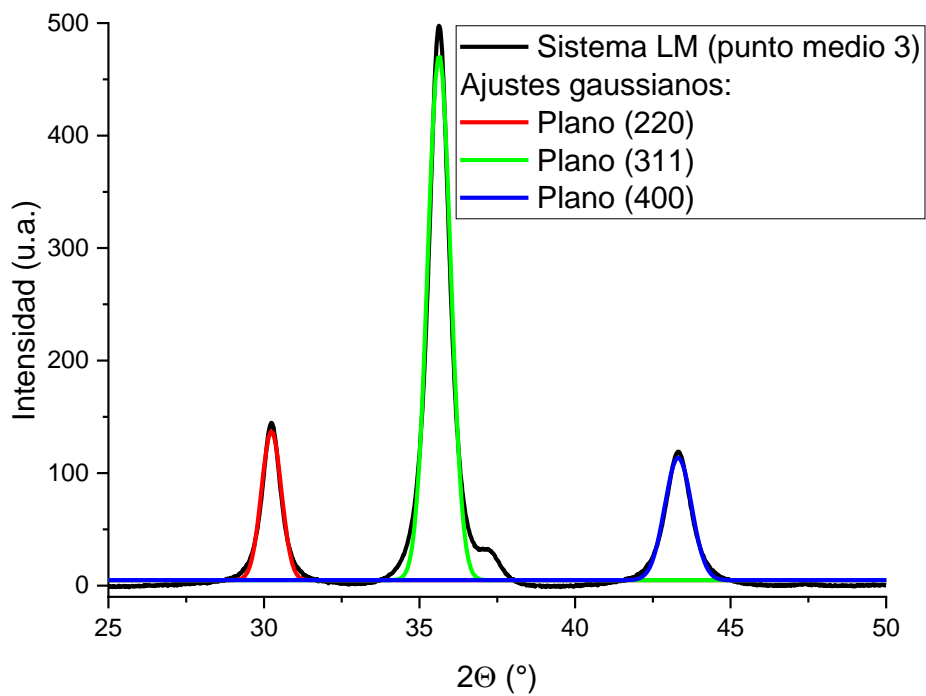
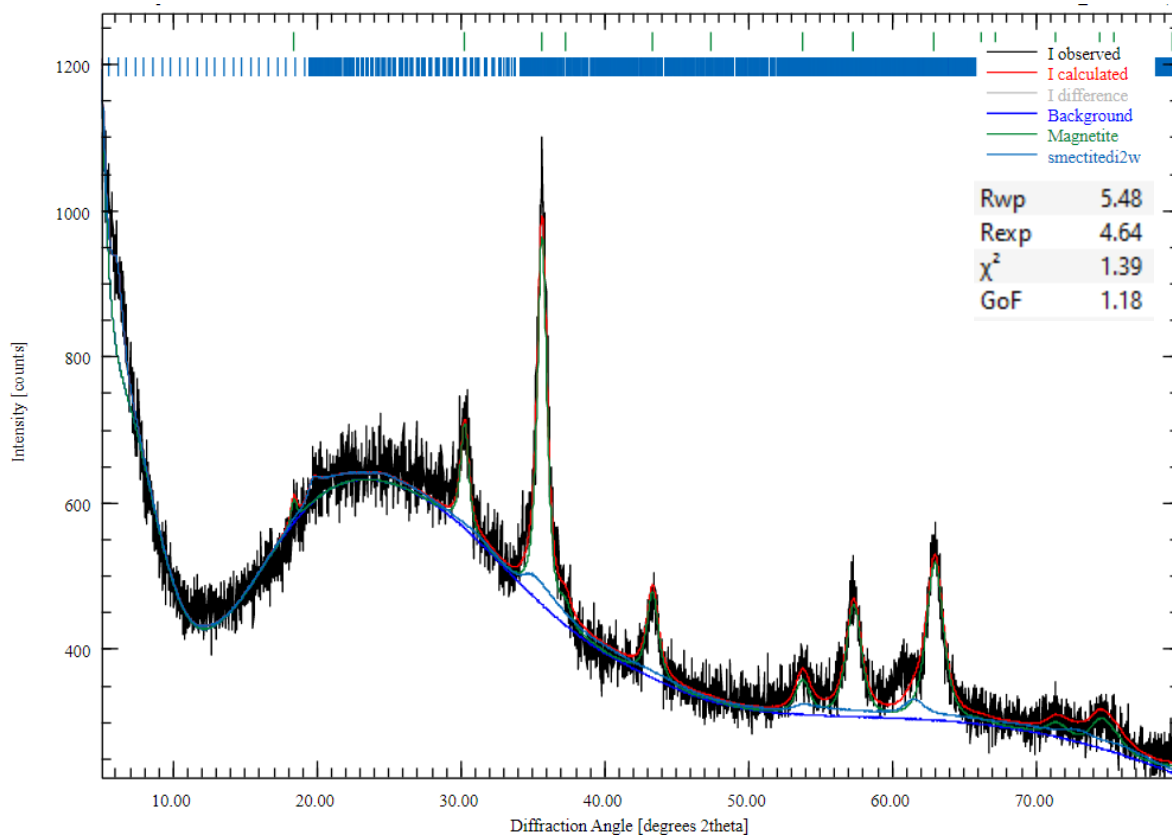


Figura 54. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 1.1 y temperatura = 75°C (3). Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.

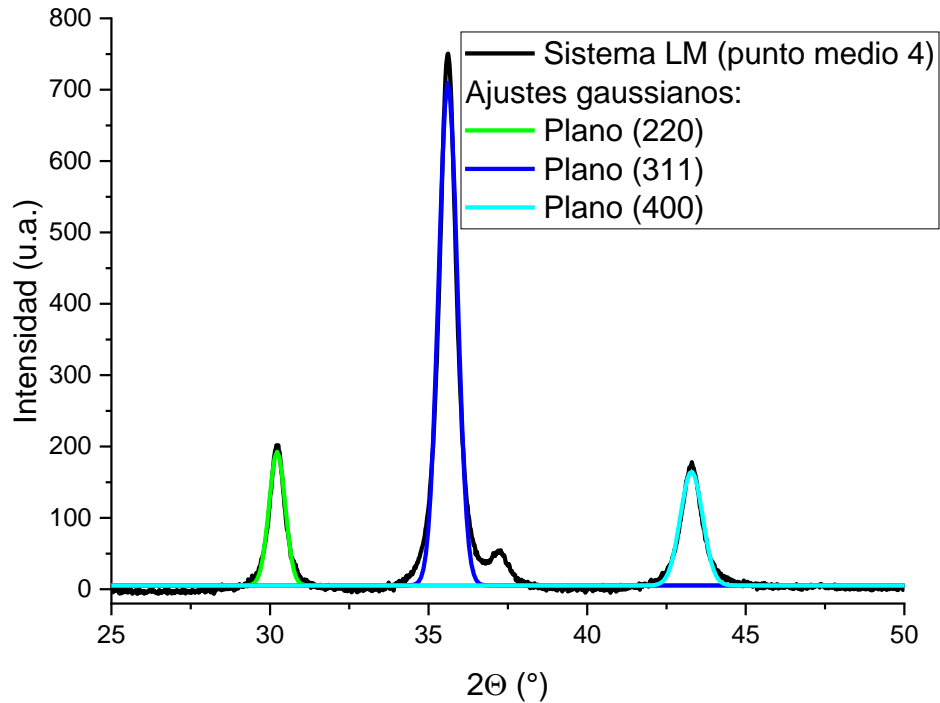
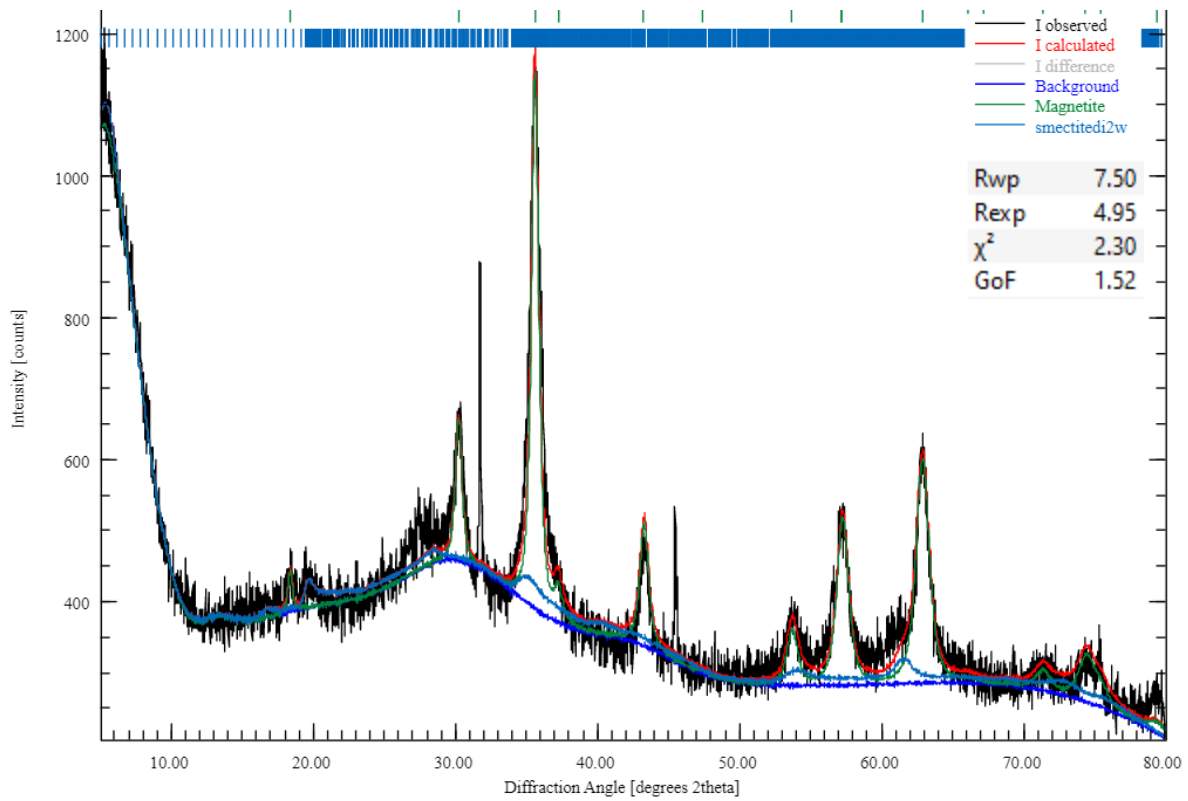


Figura 55. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 1.1 y temperatura = 75°C (4). Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.



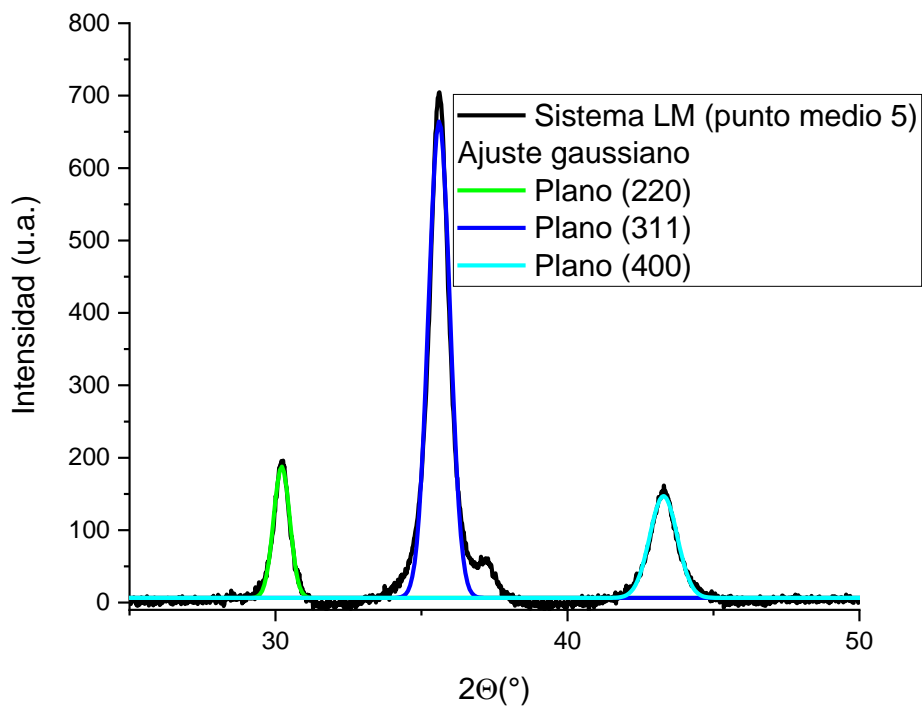
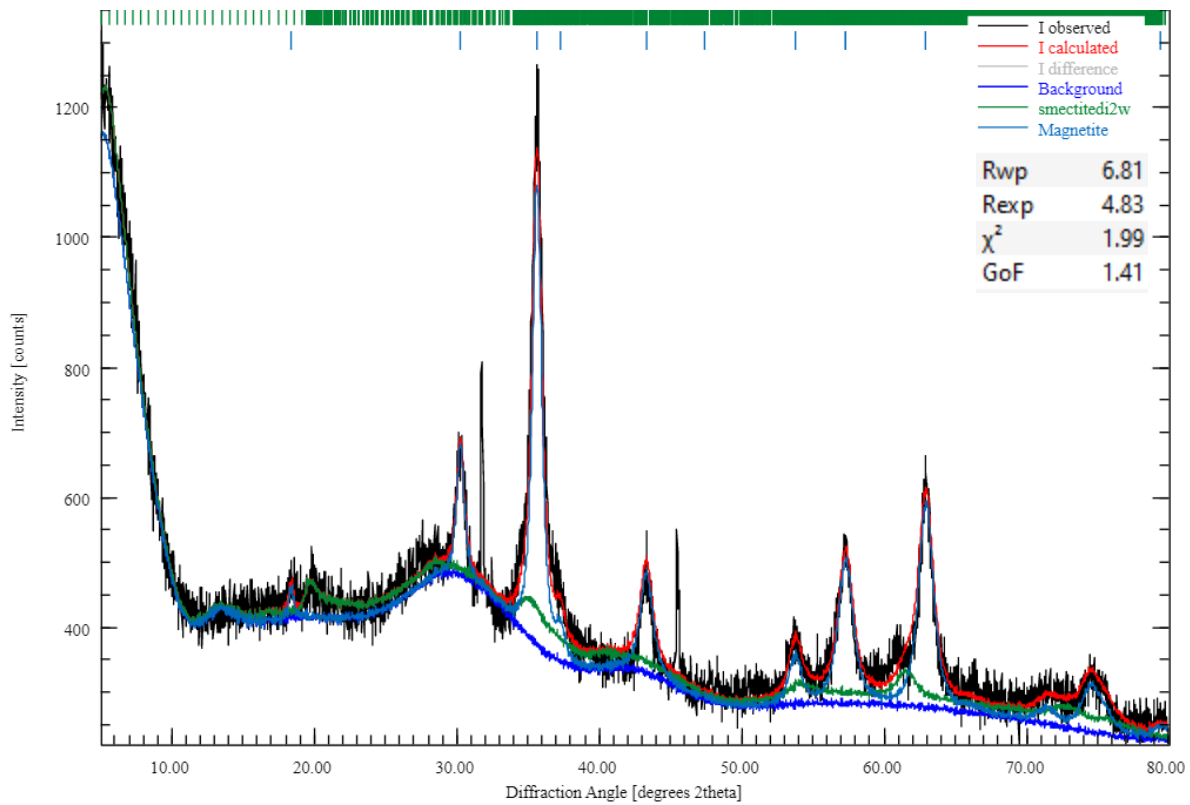


Figura 56. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 1.1 y temperatura = 75°C (5). Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.

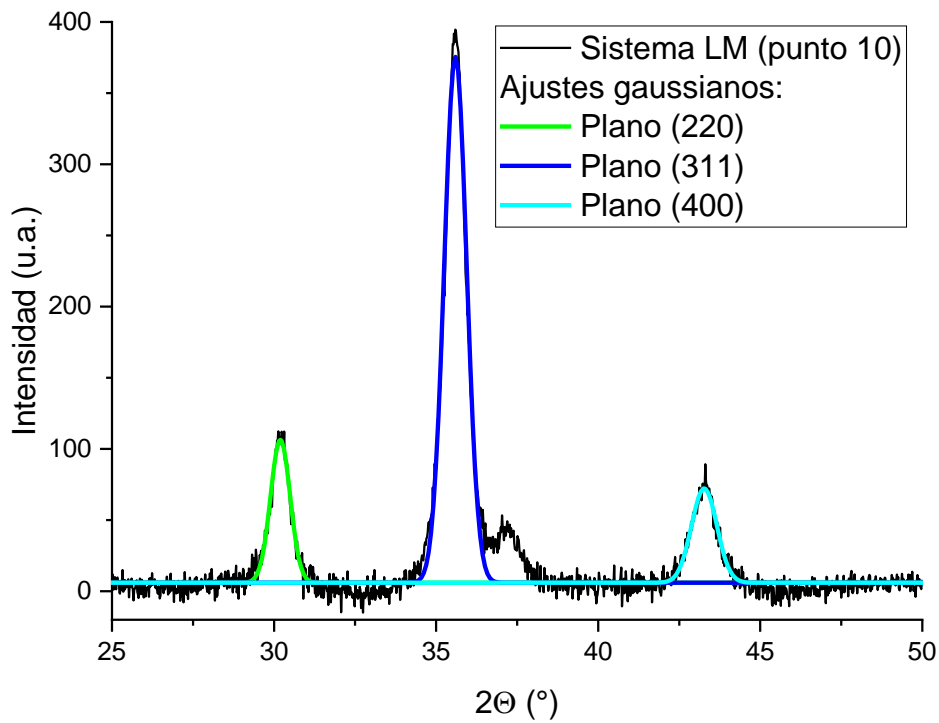
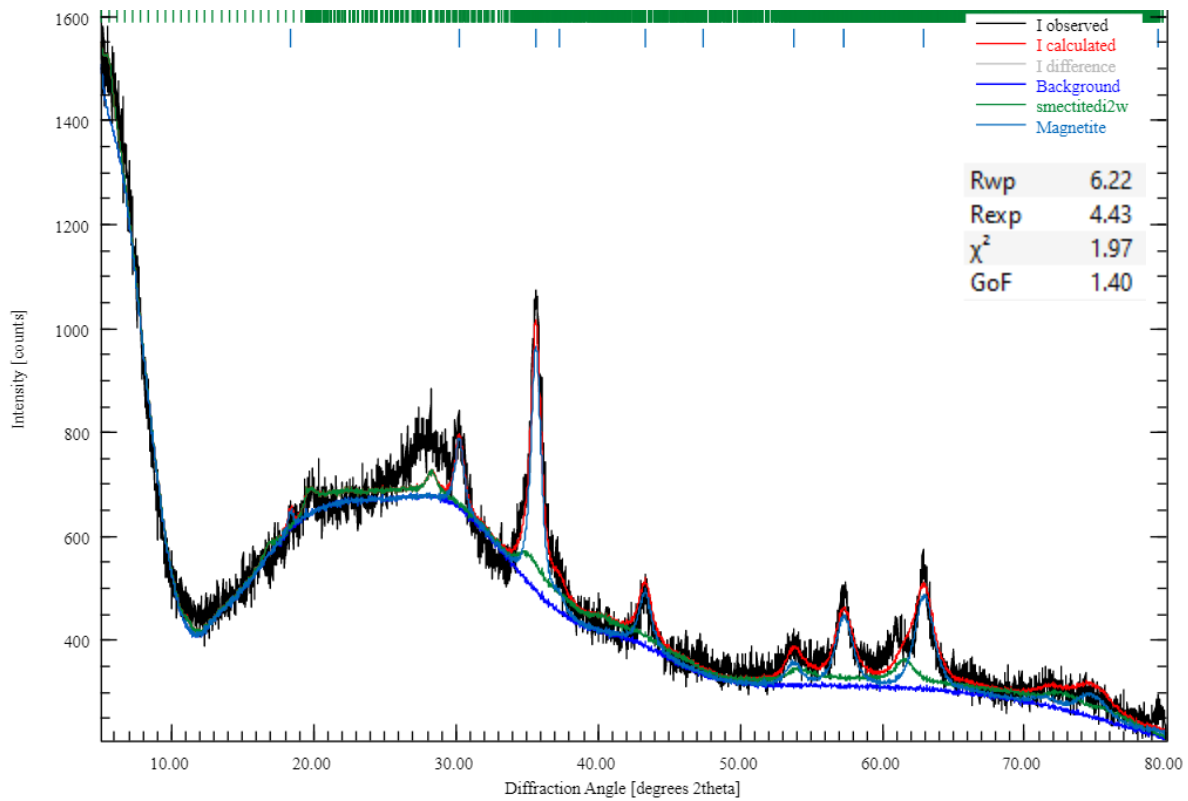


Figura 57. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 2 y temperatura = 60°C. Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.

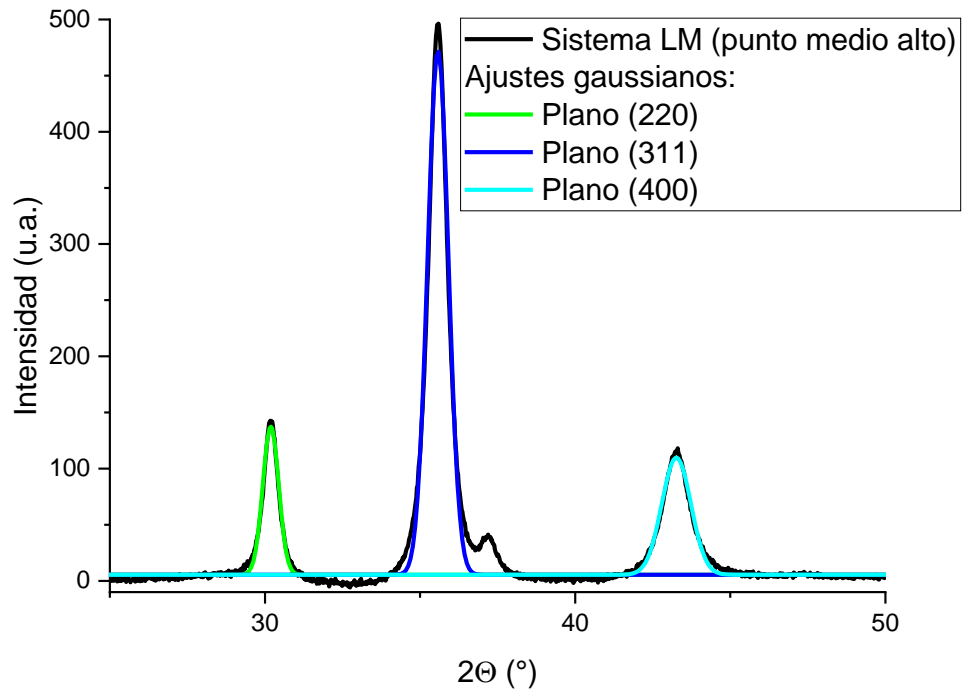
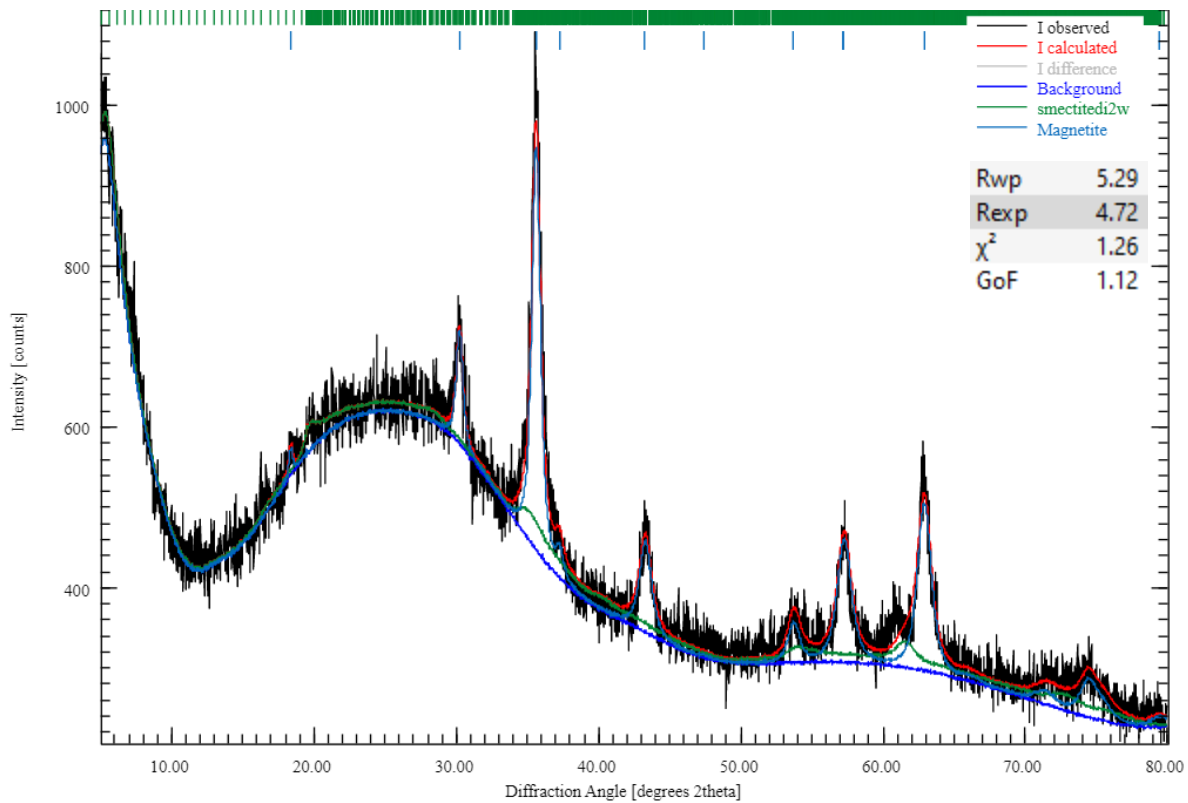


Figura 58. Superior: Difractograma del sistema L/M, condiciones: L/M = 1.1 y temperatura = 90°C. Inferior: Ajuste gaussiano de las señales representativas de la magnetita.

13.2 Anexo 2: Resultados del análisis estadístico del diseño de experimentos para el sistema L/M

**Respuesta 1: Tamaño de Partícula/cristalito**

*Tabla 17. ANOVA para el modelo cuadrático*

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Model	9.21	5	1.84	2.05	0.2241	not significant
A-L:M	3.73	1	3.73	4.16	0.0971	
B-Temp	0.6970	1	0.6970	0.7771	0.4184	
AB	0.4139	1	0.4139	0.4615	0.5271	
A <sup>2</sup>	4.21	1	4.21	4.69	0.0826	
B <sup>2</sup>	0.0225	1	0.0225	0.0251	0.8803	
Residual	4.48	5	0.8969			
Lack of Fit	2.03	3	0.6759	0.5501	0.6960	not significant
Pure Error	2.46	2	1.23			
Cor Total	13.70	10				

*Tabla 18. Ecuación del modelo cuadrático sobre valores codificados*

*Tabla 19. Estadísticos del modelo cuadrático*

				Tamaño de	=
				Partícula/cristalito	
<b>Std. Dev.</b>	0.9471	<b>R<sup>2</sup></b>	0.6726	+7.36263	
<b>Mean</b>	10.91	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0.3453	+6.16302	L:M
<b>C.V. %</b>	8.68	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	-0.8832	-0.013919	Temp
		<b>Adeq Precision</b>	4.4037	-0.023829	L:M * Temp
				-1.59099	L:M <sup>2</sup>
				+0.000419	Temp <sup>2</sup>

13.3 Anexo 3: Gráficas de perfil para la determinación de la distancia interplanar de las fases presente en la figura 23a.

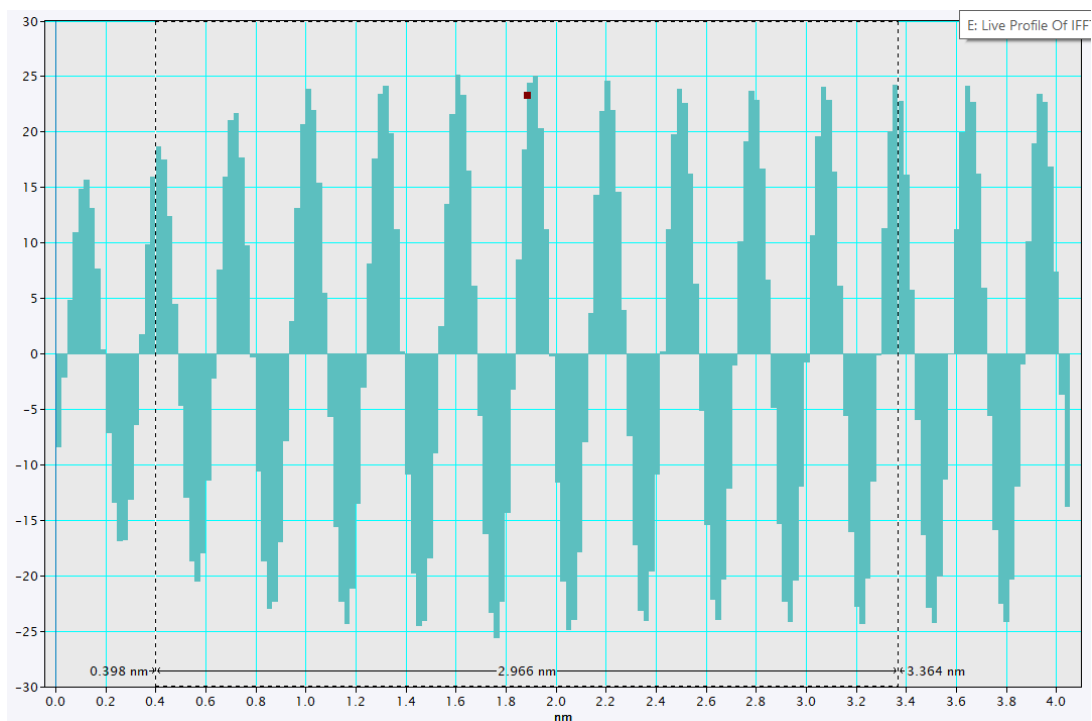


Figura 59. Gráfica de perfil para el plano (220), distancia promedio: 0.296nm

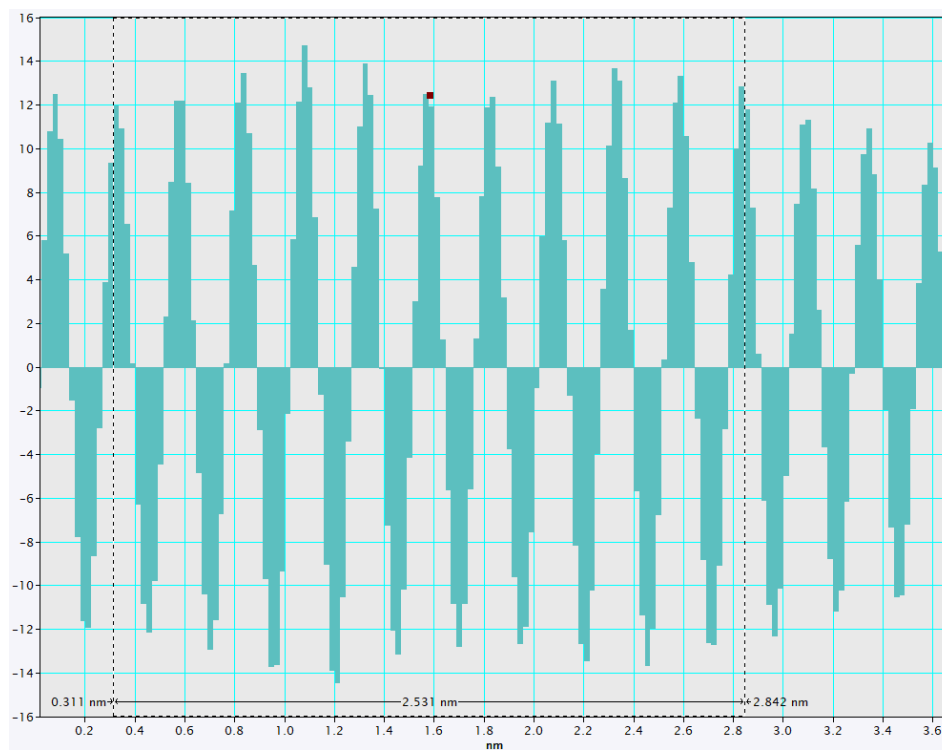


Figura 60. Gráfica de perfil para el plano (311)-magnetita, distancia promedio: 0.2531nm

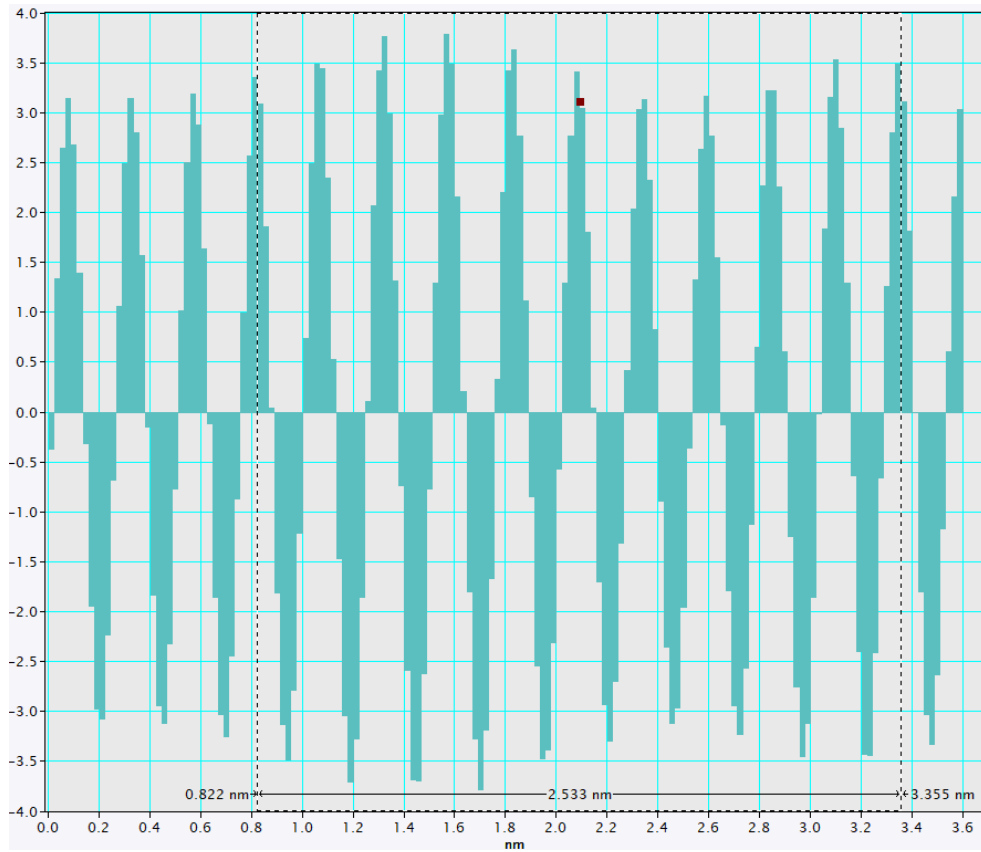


Figura 61. Gráfica de perfil para el plano (311)-magnetita, distancia promedio: 0.2533nm

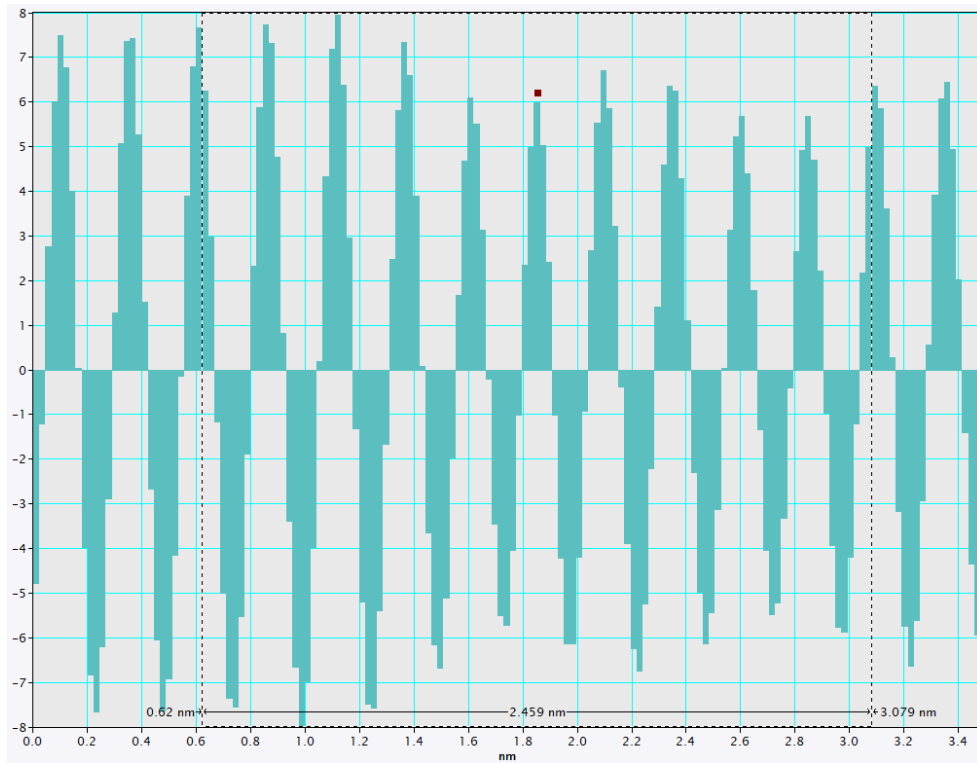


Figura 62. Gráfica de perfil para el plano (222)-magnetita, distancia promedio: 0.2459nm

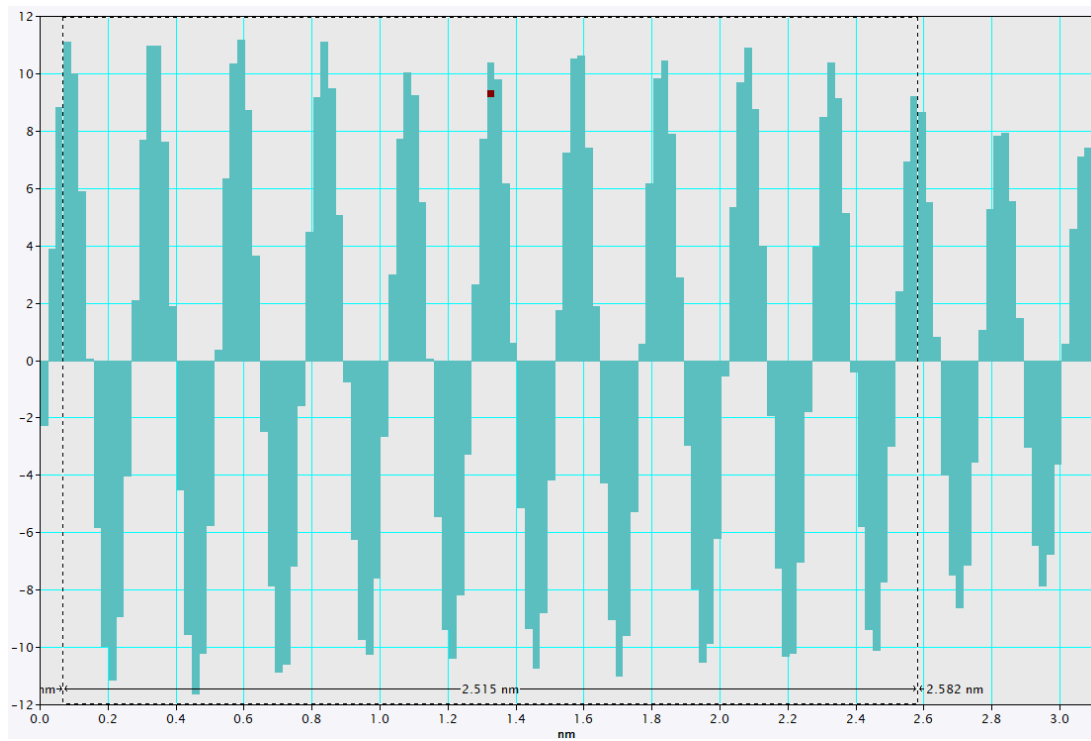


Figura 63. Gráfica de perfil para el plano (311)-maghemita, distancia promedio: 0.2515nm



13.4 Anexo 4: Gráficas de perfil para la determinación de la distancia interplanar de las fases presente en la figura 23b.

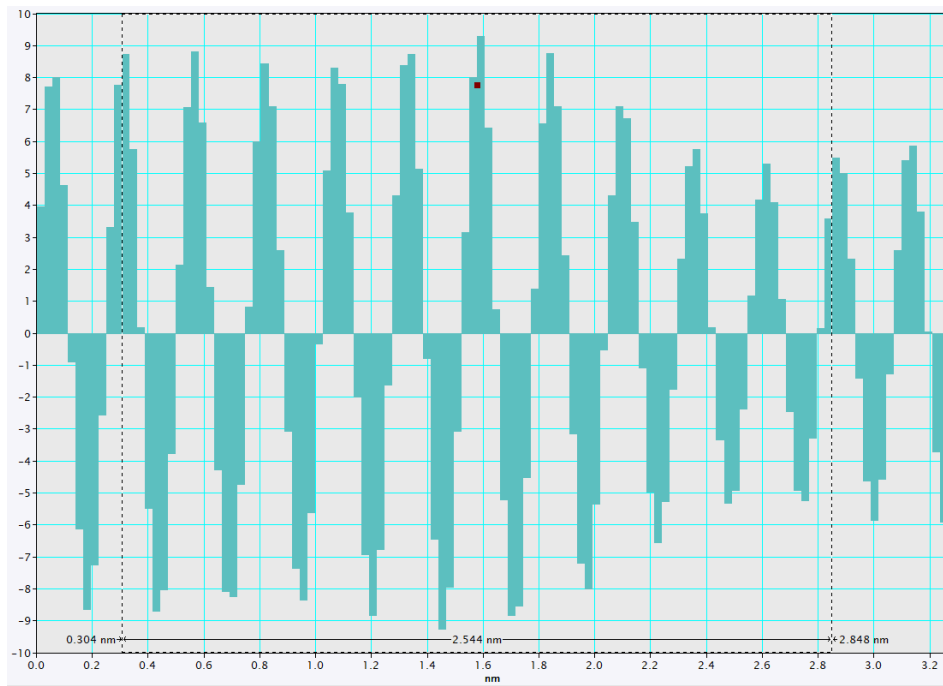


Figura 64. Gráfica de perfil para el plano (311)-magnetita, distancia promedio: 0.2544nm

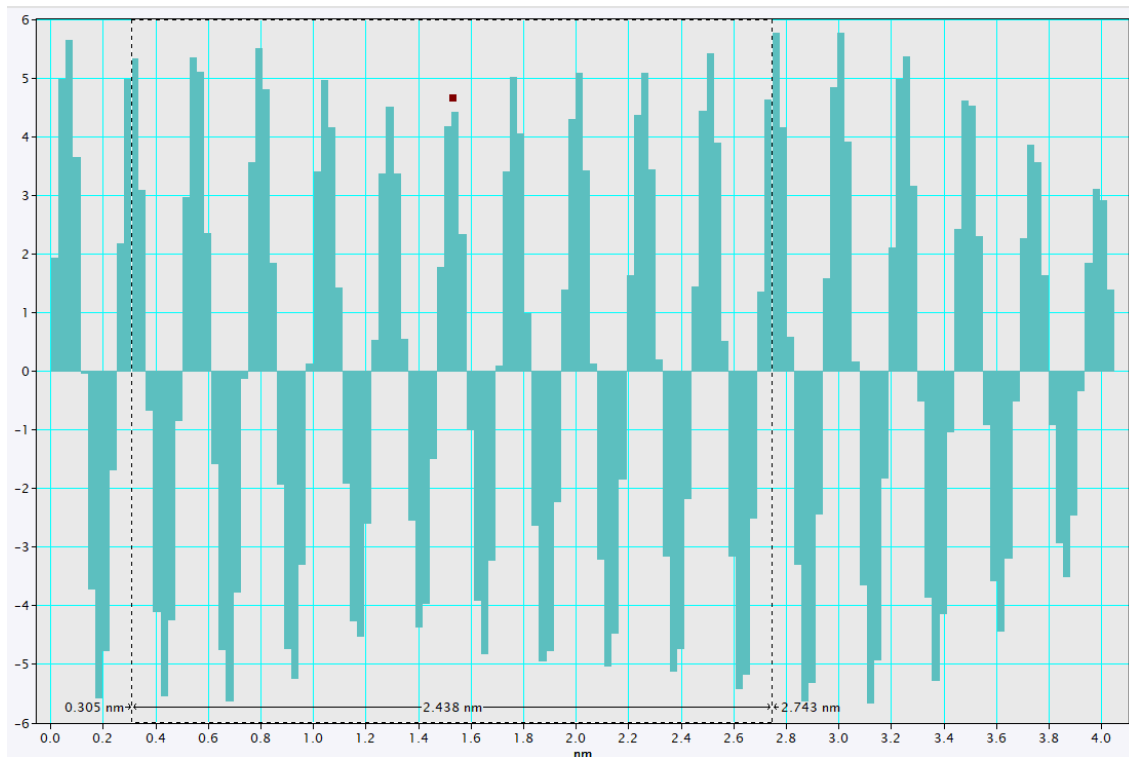


Figura 65. Gráfica de perfil para el plano (222)-magnetita, distancia promedio: 0.2438nm

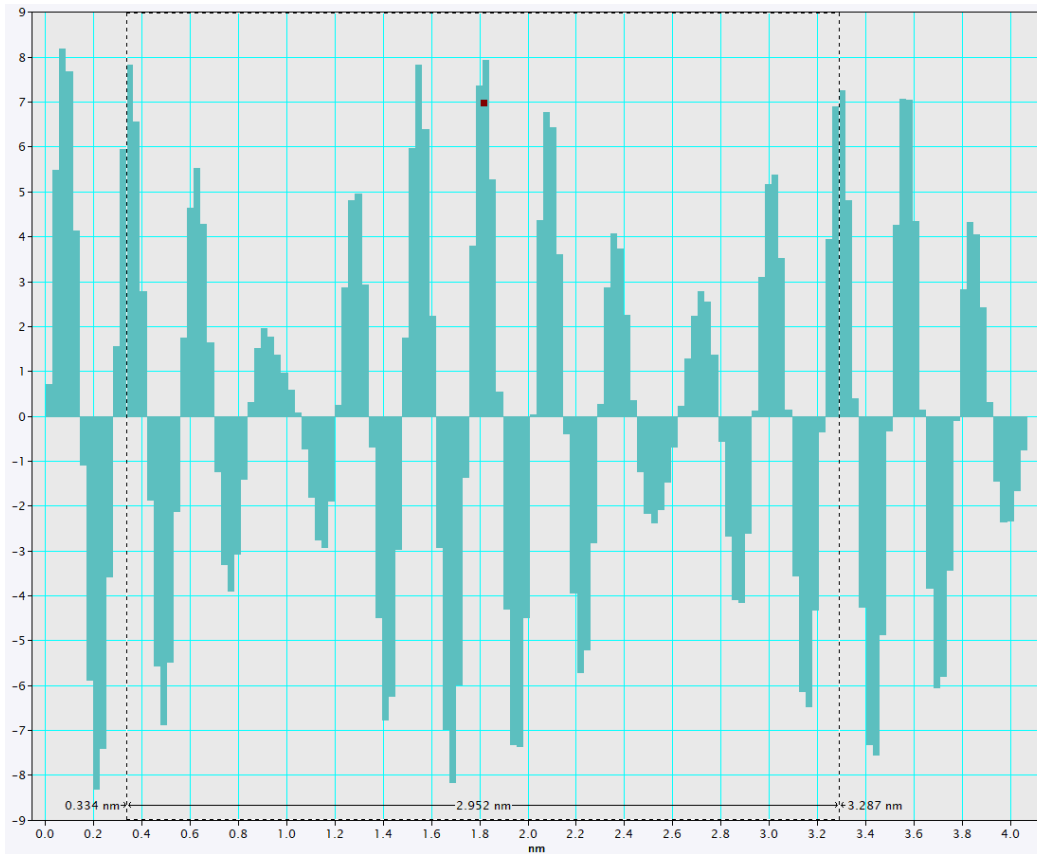


Figura 66. Gráfica de perfil para el plano (220)-magnetita, distancia promedio: 0.2952nm

13.5 Anexo 5: Gráficas de deformación vs. Esfuerzo de las películas parte del diseño de experimentos.

En las siguientes gráficas el número denota el número de corrida correspondiente a cada experimento.

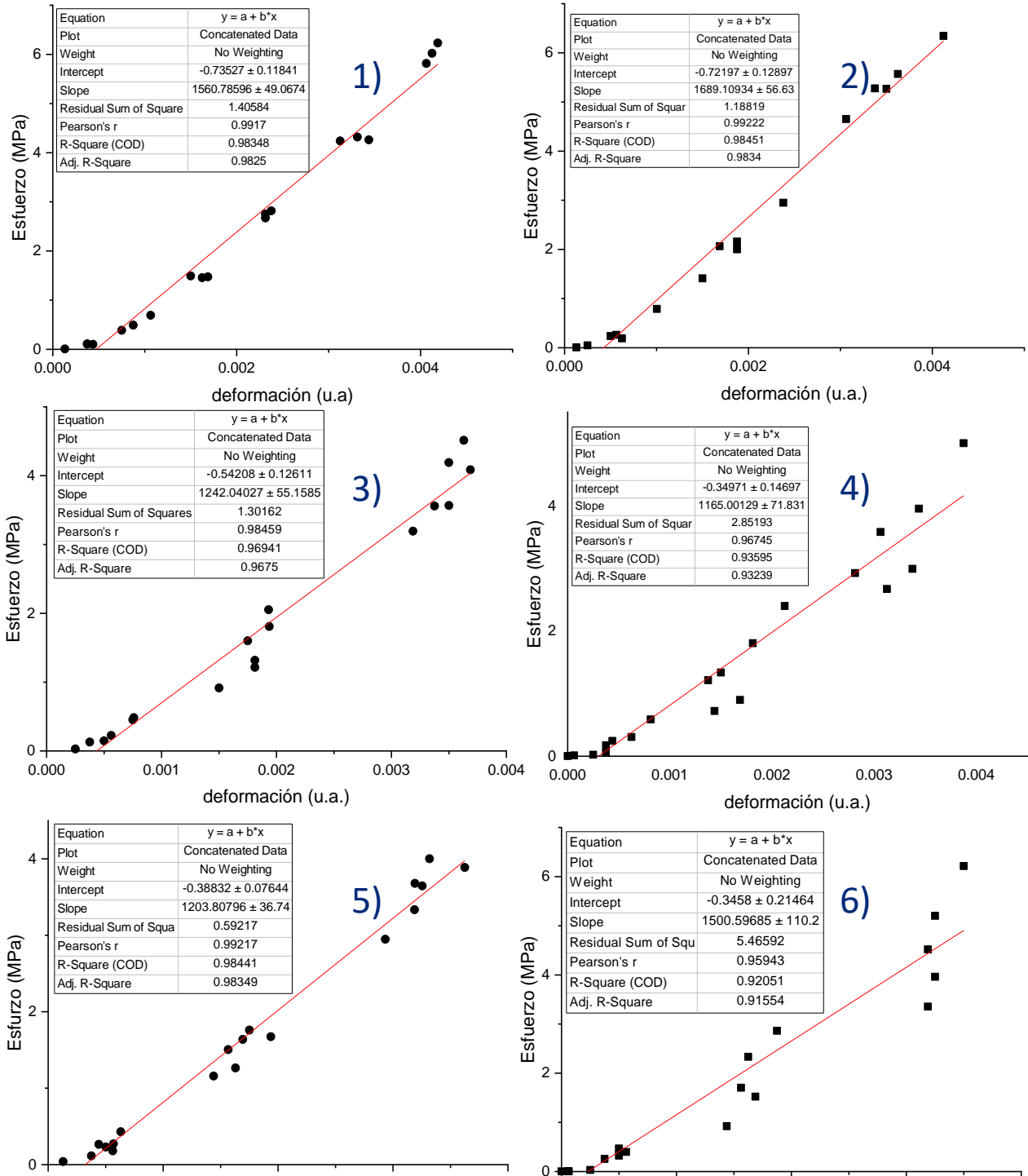


Figura 67. Gráficas Esfuerzo vs. deformación

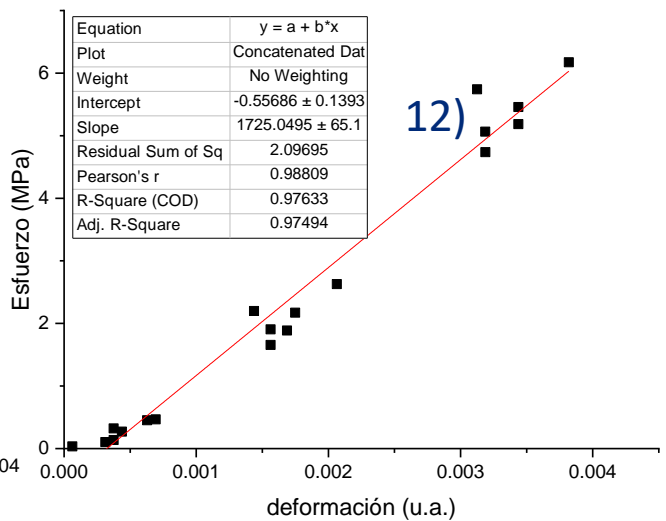
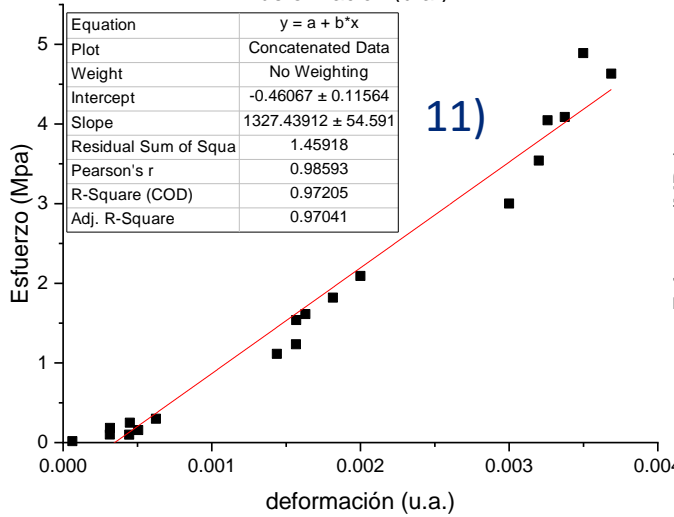
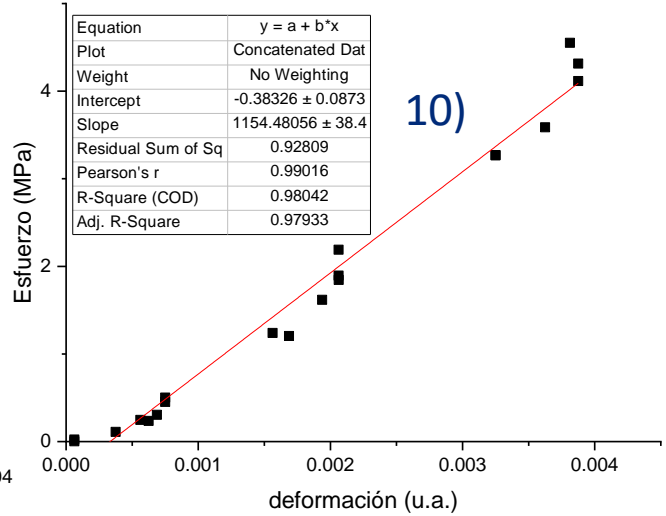
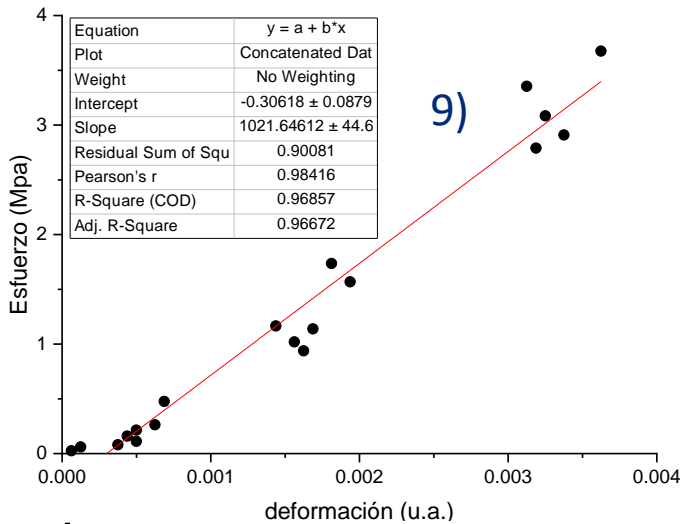
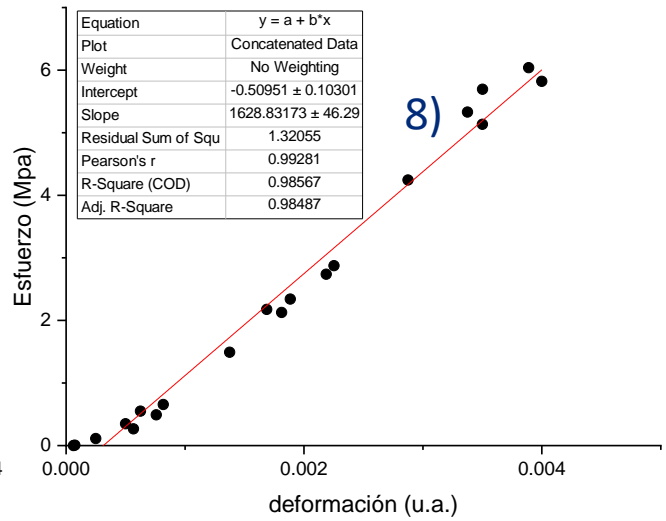
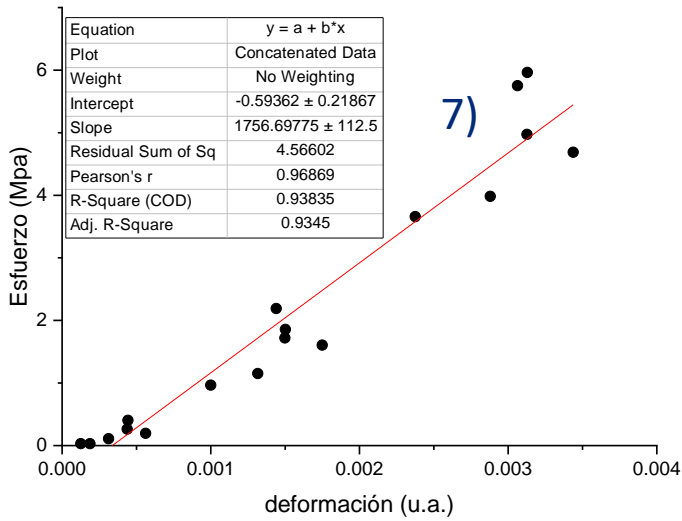


Figura 68. Gráficas Esfuerzo vs. deformación (continuación)

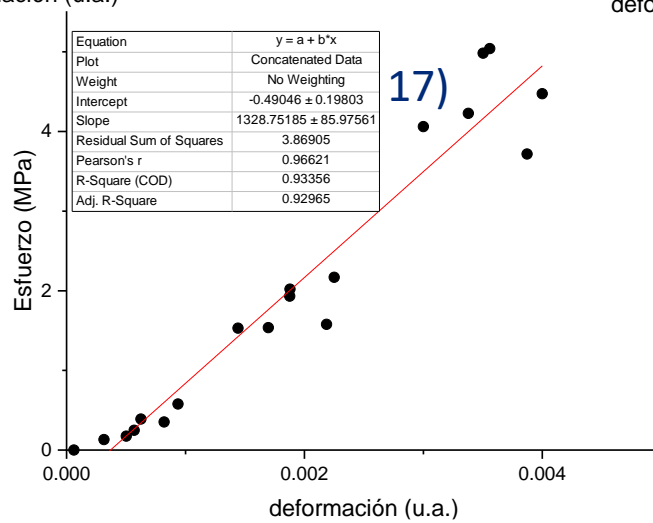
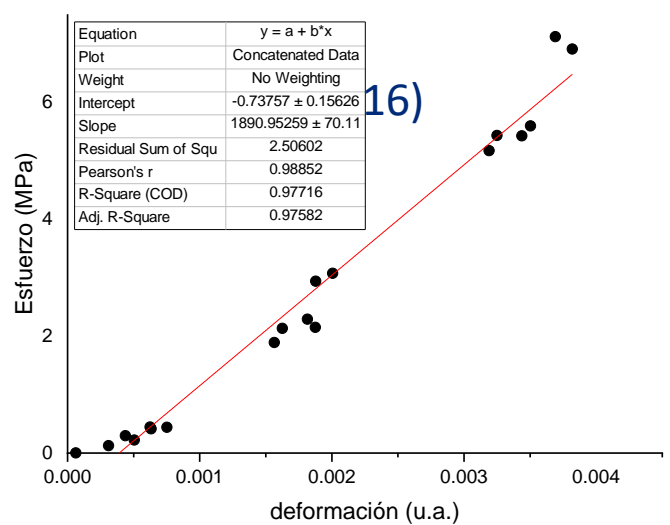
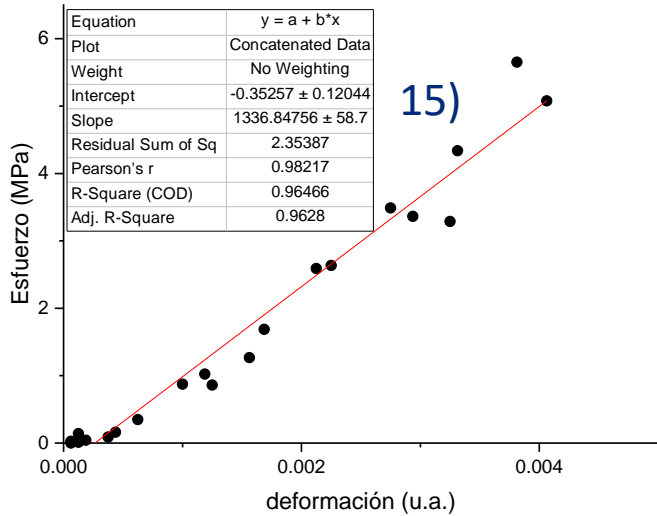
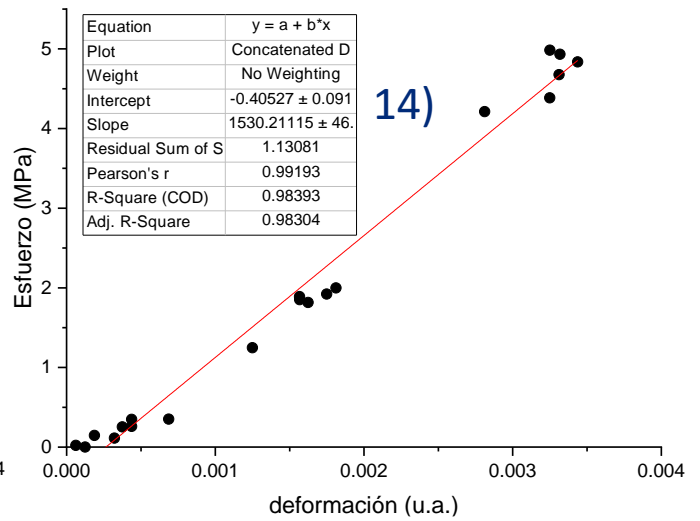
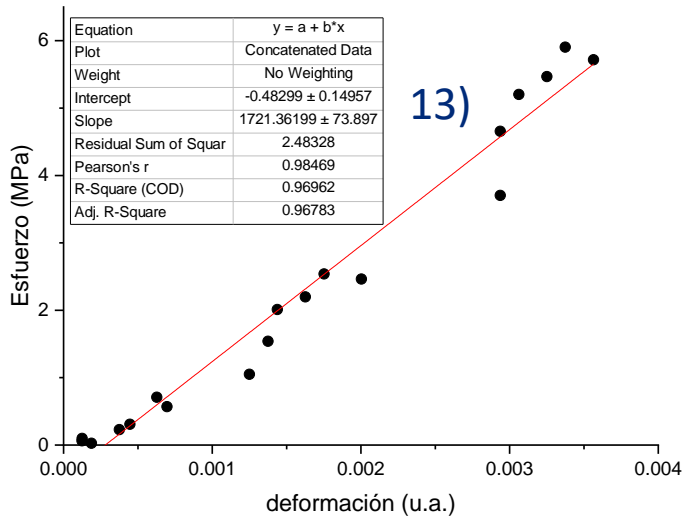


Figura 69. Gráficas Esfuerzo vs. deformación (continuación)

13.6 Anexo 6: Estadísticos para el diseño de diseño de experimentos para las películas formadoras de microagujas.

**Respuesta 1: Modulo de Young**

*Tabla 20. ANOVA para el modelo cuadrático*

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
<b>Model</b>	9.406E+05	9	1.045E+05	5.61	0.0118	significant
A-Laponita	44723.28	1	44723.28	2.40	0.1599	
B-Glicerina	35694.16	1	35694.16	1.92	0.2037	
C-CaCl <sub>2</sub>	1.385E+05	1	1.385E+05	7.43	0.0260	
AB	62063.13	1	62063.13	3.33	0.1055	
AC	15080.32	1	15080.32	0.8092	0.3946	
BC	66436.51	1	66436.51	3.57	0.0957	
A <sup>2</sup>	2.021E+05	1	2.021E+05	10.85	0.0110	
B <sup>2</sup>	1.700E+05	1	1.700E+05	9.12	0.0166	
C <sup>2</sup>	1.031E+05	1	1.031E+05	5.53	0.0465	
<b>Residual</b>	1.491E+05	8	18635.23			
Lack of Fit	1.085E+05	3	36153.82	4.45	0.0708	not significant
Pure Error	40620.37	5	8124.07			
<b>Cor Total</b>	1.090E+06	17				

*Tabla 21. Tabla de estadísticos para el modelo cuadrático*

<b>Std. Dev.</b>	136.51	<b>R<sup>2</sup></b>	0.8632
<b>Mean</b>	1469.87	<b>Adjusted R<sup>2</sup></b>	0.7093
<b>C.V. %</b>	9.29	<b>Predicted R<sup>2</sup></b>	-0.6462
		<b>Adeq Precision</b>	6.6704

Tabla 22. Ecuación del modelo cuadrático con factores codificados

---

Módulo de Young =	
+1721.55	
+74.77	A
-66.80	B
-131.59	C
+124.56	AB
+61.40	AC
+128.88	BC
-215.23	A <sup>2</sup>
-197.35	B <sup>2</sup>
-153.70	C <sup>2</sup>

---

13.7 Anexo 7. Curvas de calibración de calibración de Fe<sup>3+</sup> coordinado con Cl<sup>-</sup>

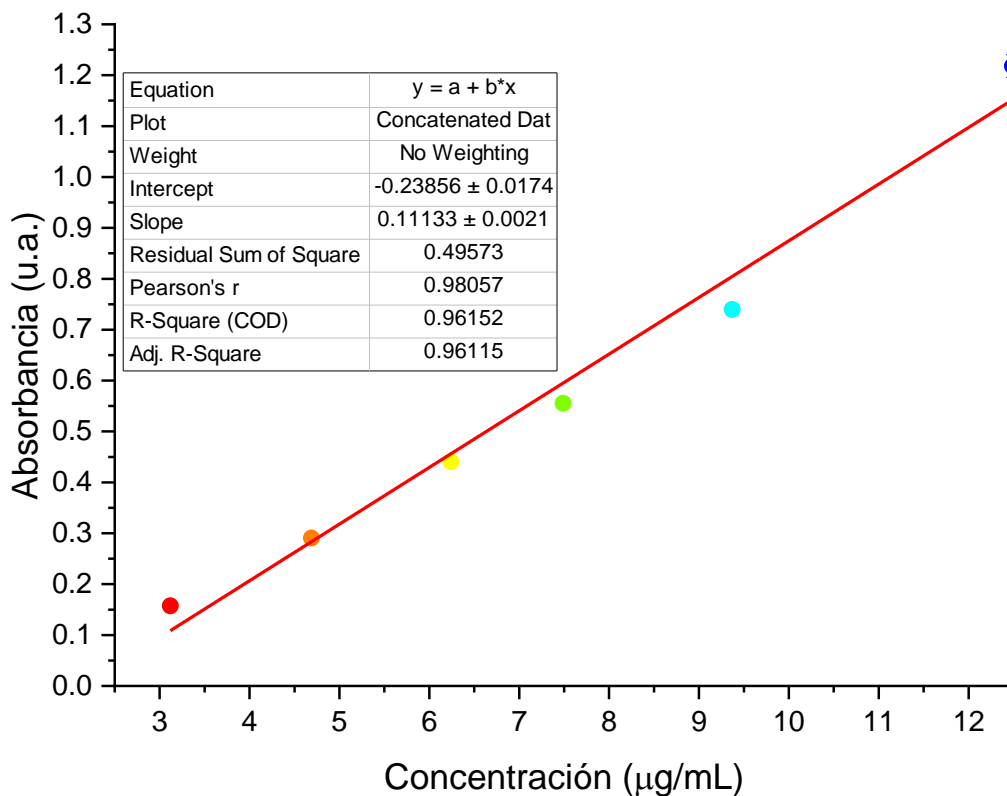


Figura 70. Curva de calibración promedio de Fe<sup>3+</sup>

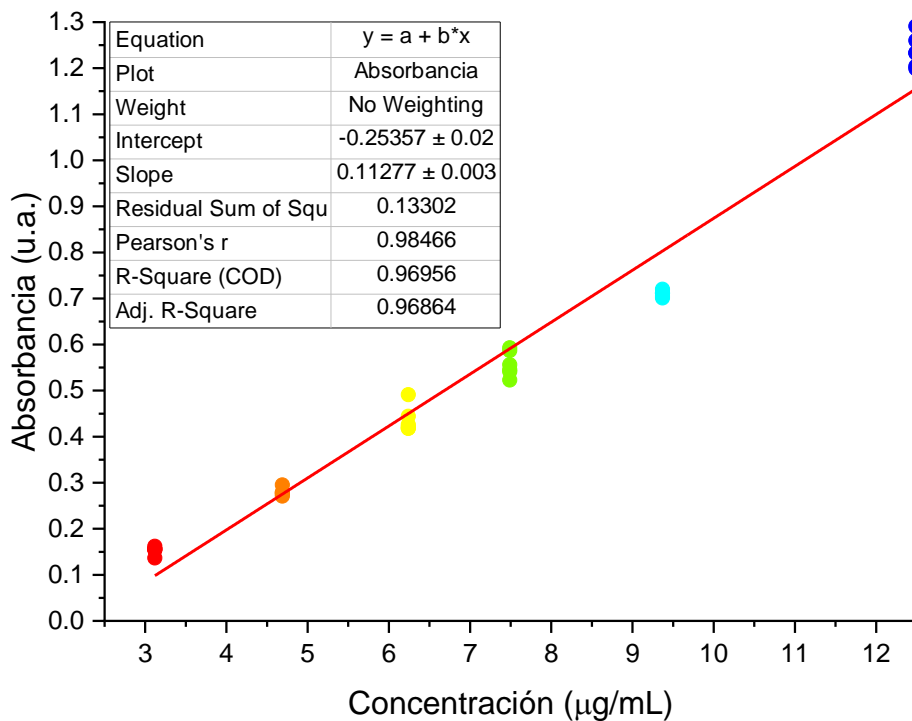


Figura 71. Curva de calibración Fe<sup>3+</sup>, día 1



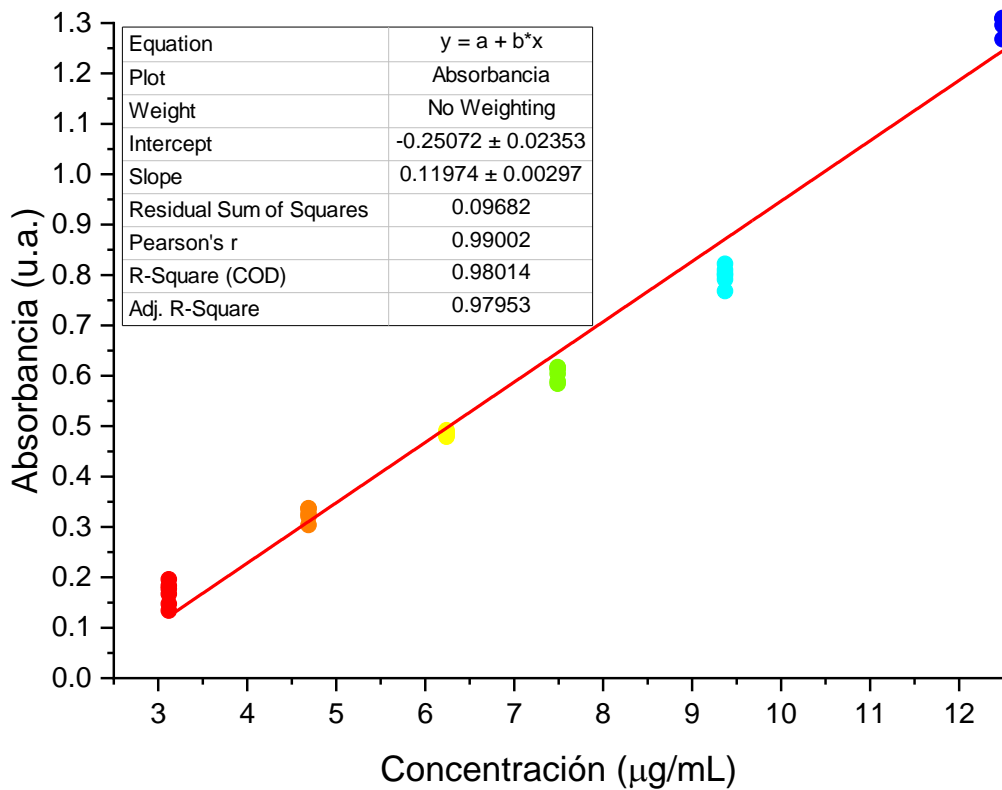


Figura 72. Curva de calibración  $Fe^{3+}$ , día 2

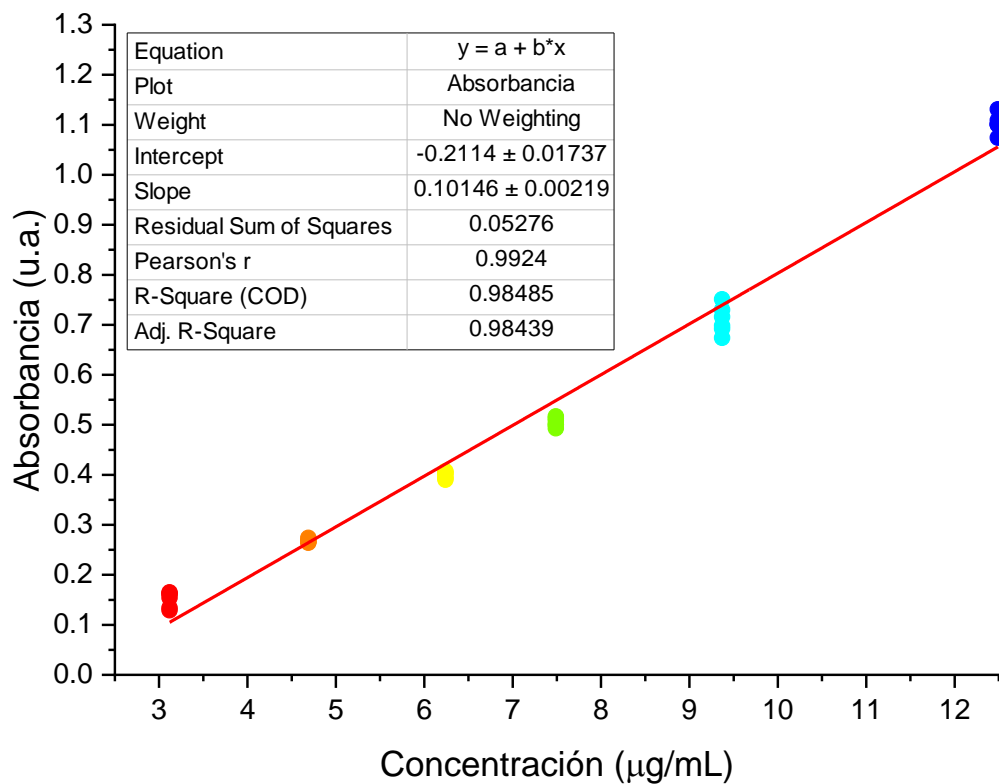


Figura 73. Curva de calibración de  $Fe^{3+}$ , día 3

## 14 Referencias

1. Dosmar, E.; Walsh, J.; Doyel, M.; Bussett, K.; Oladipupo, A.; Amer, S.; Goebel, K., Targeting Ocular Drug Delivery: An Examination of Local Anatomy and Current Approaches. *Bioengineering (Basel)* **2022**, 9(1).
2. Nema, S.; Ludwig, J. D., *Pharmaceutical Dosage Forms - Parenteral Medications: Volume 1: Formulation and Packaging*. CRC Press: 2016.
3. Gote, V.; Sikder, S.; Sicotte, J.; Pal, D., Ocular Drug Delivery: Present Innovations and Future Challenges. *J Pharmacol Exp Ther* **2019**, 370(3), 602-624.
4. Gupta, P.; Yadav, K. S., Applications of microneedles in delivering drugs for various ocular diseases. *Life Sci* **2019**, 237, 116907.
5. Thakur Singh, R. R.; Tekko, I.; McAvoy, K.; McMillan, H.; Jones, D.; Donnelly, R. F., Minimally invasive microneedles for ocular drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv* **2017**, 14(4), 525-537.
6. Qamar, Z.; Qizilbash, F. F.; Iqbal, M. K.; Ali, A.; Narang, J. K.; Ali, J.; Baboota, S., Nano-Based Drug Delivery System: Recent Strategies for the Treatment of Ocular Disease and Future Perspective. *Recent Pat Drug Deliv Formul* **2019**, 13(4), 246-254.
7. Ansari, S.; Ficiara, E.; Ruffinatti, F. A.; Stura, I.; Argenziano, M.; Abollino, O.; Cavalli, R.; Guiot, C.; D'Agata, F., Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the Central Nervous System. *Materials (Basel)* **2019**, 12(3).
8. Tomas, H.; Alves, C. S.; Rodrigues, J., Laponite(R): A key nanoplatform for biomedical applications? *Nanomedicine* **2018**, 14(7), 2407-2420.
9. Ruiz Casas, D. Anatomía del Globo Ocular. <https://www.doctordiegoruizcasas.com/anatomia-globo-ocular> (accessed 29/11).
10. Peláez, I. G.; Yépez, S. C.; Cano, M. U.; Fortoul van der Goes, T. I., Ojo y sus anexos. In *Histología y biología celular*, 3e, Fortoul van der Goes, D. T. I., Ed. McGraw-Hill Education: New York, NY, 2017.
11. Wiechers, E. G., El ojo: estructura y función. In *Oftalmología en la práctica de la medicina general*, 5e, Hernández, E. G.; Wiechers, E. G., Eds. McGraw-Hill: New York, NY, 2020.
12. Barar, J.; Asadi, M.; Mortazavi-Tabatabaei, S. A.; Omid, Y., Ocular Drug Delivery; Impact of in vitro Cell Culture Models. *Journal of ophthalmic & vision research* **2009**, 4(4), 238-52.
13. Awwad, S.; Mohamed Ahmed, A. H. A.; Sharma, G.; Heng, J. S.; Khaw, P. T.; Brocchini, S.; Lockwood, A., Principles of pharmacology in the eye. *Br J Pharmacol* **2017**, 174(23), 4205-4223.
14. Scientific, C. L. e. G., *Tables, 8th edition. Vol. 1. Units of Measurement. Body Fluids. Composition of the Body. Nutrition.*, . Ciba Pharmaceutical Co; Subsequent edición: 1981; Vol. 1, p 178-184.
15. Schueller WO, Y. W., Hill RM, Clinical measurements of tears. *J Am Optom Ass* **1972**, 1358-1361.
16. Hung G, H. F., Stark L, Dynamics of the human eye blink. *Am J Optom Physiol Opt* **1977**, (54), 678-690.
17. Ehlers, N.; Hjortdal, J., The Cornea: Epithelium and Stroma. In *Advances in Organ Biology*, Fischbarg, J., Ed. Elsevier: 2005; Vol. 10, pp 83-111.
18. Riordan-Eva, P., Anatomía y embriología del ojo. In *Vaughan y Asbury. Oftalmología general*, 18e, Riordan-Eva, P.; Cunningham, J. E. T., Eds. McGraw-Hill Education: New York, NY, 2015.
19. Olsen, T. W.; Aaberg, S. Y.; Geroski, D. H.; Edelhauser, H. F., Human sclera: Thickness and surface area. *American Journal of Ophthalmology* **1998**, 125(2), 237-241.
20. Gorantla, S.; Rapalli, V. K.; Waghule, T.; Singh, P. P.; Dubey, S. K.; Saha, R. N.; Singhvi, G., Nanocarriers for ocular drug delivery: current status and translational opportunity. *RSC Adv* **2020**, 10(46), 27835-27855.
21. Gaudana, R.; Ananthula, H. K.; Parenky, A.; Mitra, A. K., Ocular Drug Delivery. *The AAPS Journal* **2010**, 12(3), 348-360.
22. Freddo, T. F., Shifting the Paradigm of the Blood-Aqueous Barrier. *Experimental Eye Research* **2001**, 73(5), 581-592.
23. Snell, R. S.; Lemp, M. A., *Clinical Anatomy of the Eye*. Wiley: 2013.
24. Scheinman, R. I.; Vooturi, S. K.; Kompella, U. B., Druggable Targets and Therapeutic Agents for Disorders of the Back of the Eye. In *Drug Product Development for the Back of the Eye*, Kompella, U. B.; Edelhauser, H. F., Eds. Springer US: Boston, MA, 2011; pp 495-563.
25. Strauss, O., The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. **2005**, 85(3), 845-881.
26. Shargel, L.; Yu, A. B. C., *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics*, Seventh Edition. McGraw-Hill Education: 2015; pp 567-572.
27. Golan, D. E., *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: 2008.
28. Azmana, M.; Mahmood, S.; Hilles, A. R.; Mandal, U. K.; Saeed Al-Japairai, K. A.; Raman, S., Transdermal drug delivery system through polymeric microneedle: A recent update. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* **2020**, 60.
29. Moffatt, K.; Wang, Y.; Raj Singh, T. R.; Donnelly, R. F., Microneedles for enhanced transdermal and intraocular drug delivery. *Curr Opin Pharmacol* **2017**, 36, 14-21.

30. Rzhveskiy, A. S.; Singh, T. R. R.; Donnelly, R. F.; Anissimov, Y. G., Microneedles as the technique of drug delivery enhancement in diverse organs and tissues. *J Control Release* **2018**, *270*, 184-202.
31. Waghule, T.; Singhvi, G.; Dubey, S. K.; Pandey, M. M.; Gupta, G.; Singh, M.; Dua, K., Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system. *Biomed Pharmacother* **2019**, *109*, 1249-1258.
32. Damiri, F.; Kommineni, N.; Ebhodaghe, S. O.; Bulusu, R.; Jyothi, V.; Sayed, A. A.; Awaji, A. A.; Germoush, M. O.; Al-Malky, H. S.; Nasrullah, M. Z.; Rahman, M. H.; Abdel-Daim, M. M.; Berrada, M., Microneedle-Based Natural Polysaccharide for Drug Delivery Systems (DDS): Progress and Challenges. *Pharmaceuticals (Basel)* **2022**, *15* (2).
33. Shaikh, S.; Bhan, N.; Rodrigues, F. C.; Dathathri, E.; De, S.; Thakur, G., Microneedle platform for biomedical applications. In *Bioelectronics and Medical Devices*, 2019; pp 421-441.
34. Yang, J.; Liu, X.; Fu, Y.; Song, Y., Recent advances of microneedles for biomedical applications: drug delivery and beyond. *Acta Pharm Sin B* **2019**, *9* (3), 469-483.
35. Ingrole, R. S. J.; Azizoglu, E.; Dul, M.; Birchall, J. C.; Gill, H. S.; Prausnitz, M. R., Trends of microneedle technology in the scientific literature, patents, clinical trials and internet activity. *Biomaterials* **2021**, *267*, 120491.
36. Panda, A.; Matadh, V. A.; Suresh, S.; Shivakumar, H. N.; Murthy, S. N., Non-dermal applications of microneedle drug delivery systems. *Drug Deliv Transl Res* **2021**.
37. Singh, R.; Singh, R., A Review on Nano Materials of Carbon. *IOSR Journal of Applied Physics* **2017**, *9*, 42-57.
38. Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.-H.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schué, F., Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **2012**, *84* (2), 377-410.
39. Xiao, Y.; Du, J., Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *J Mater Chem B* **2020**, *8* (3), 354-367.
40. Burns, A.; Self, W. T., Antioxidant Inorganic Nanoparticles and Their Potential Applications in Biomedicine. In *Smart Nanoparticles for Biomedicine*, 2018; pp 159-169.
41. Huber, D. L., Synthesis, Properties, and Applications of Iron Nanoparticles. **2005**, *1* (5), 482-501.
42. Sangaiya, P.; Jayaprakash, R., A Review on Iron Oxide Nanoparticles and Their Biomedical Applications. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism* **2018**, *31* (11), 3397-3413.
43. Kefeni, K. K.; Msagati, T. A. M.; Nkambule, T. T.; Mamba, B. B., Spinel ferrite nanoparticles and nanocomposites for biomedical applications and their toxicity. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2020**, *107*, 110314.
44. Neuberger, T.; Schöpf, B.; Hofmann, H.; Hofmann, M.; von Rechenberg, B., Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2005**, *293* (1), 483-496.
45. Yew, Y. P.; Shameli, K.; Miyake, M.; Ahmad Khairudin, N. B. B.; Mohamad, S. E. B.; Naiki, T.; Lee, K. X., Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: A review. *Arabian Journal of Chemistry* **2020**, *13* (1), 2287-2308.
46. Seabra, A. B.; Pelegrino, M. T.; Haddad, P. S., Chapter 24 - Antimicrobial Applications of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Perspectives and Challenges. In *Nanostructures for Antimicrobial Therapy*, Ficaí, A.; Grumezescu, A. M., Eds. Elsevier: 2017; pp 531-550.
47. Lamichhane, N.; Sharifabad, M. E.; Hodgson, B.; Mercer, T.; Sen, T., Chapter 13 - Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) as therapeutic and diagnostic agents. In *Nanoparticle Therapeutics*, Kesharwani, P.; Singh, K. K., Eds. Academic Press: 2022; pp 455-497.
48. Friák, M.; Schindlmayr, A.; Scheffler, M., Ab initio study of the half-metal to metal transition in strained magnetite. *New J. Phys.* **2007**, *9*.
49. Wu, W.; Wu, Z.; Yu, T.; Jiang, C.; Kim, W.-S., Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and Technology of Advanced Materials* **2015**, *16* (2), 023501.
50. Koo, K. N.; Ismail, A. F.; Othman, M. H. D.; Bidin, N.; Rahman, M. A. J. M. J. F. A. S., Preparation and characterization of superparamagnetic magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles: A short review. **2019**, *15* (1), 23-31.
51. Baumgartner, J.; Bertinetti, L.; Widdrat, M.; Hirt, A. M.; Faivre, D., Formation of Magnetite Nanoparticles at Low Temperature: From Superparamagnetic to Stable Single Domain Particles. *PLOS ONE* **2013**, *8* (3), e57070.
52. Niculescu, A.-G.; Chircov, C.; Grumezescu, A. M., Magnetite nanoparticles: Synthesis methods – A comparative review. *Methods* **2022**, *199*, 16-27.
53. Papaefthymiou, G. C., Nanoparticle magnetism. *Nano Today* **2009**, *4* (5), 438-447.
54. Wallyn, J.; Anton, N.; Vandamme, T. F., Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications-A Review. *Pharmaceutics* **2019**, *11* (11).

55. Peixoto, D.; Pereira, I.; Pereira-Silva, M.; Veiga, F.; Hamblin, M. R.; Lvov, Y.; Liu, M.; Paiva-Santos, A. C., Emerging role of nanoclays in cancer research, diagnosis, and therapy. *Coordination Chemistry Reviews* **2021**, *440*.
56. Calabi Floody, M.; Theng, B. K. G.; Reyes, P.; Mora, M. L., Natural nanoclays: applications and future trends – a Chilean perspective. *Clay Minerals* **2009**, *44* (2), 161-176.
57. Mousa, M.; Evans, N. D.; Oreffo, R. O. C.; Dawson, J. I., Clay nanoparticles for regenerative medicine and biomaterial design: A review of clay bioactivity. *Biomaterials* **2018**, *159*, 204-214.
58. Poppe, L. J.; Paskevich, V. F.; Hathaway, J. C.; Blackwood, D. S. *A laboratory manual for X-ray powder diffraction*, 2001-41; 2001.
59. Liu, G.; Zhang, C.; Zhao, M.; Guo, W.; Luo, Q., Comparison of Nanomaterials with Other Unconventional Materials Used as Additives for Soil Improvement in the Context of Sustainable Development: A Review. *Nanomaterials (Basel)* **2020**, *11* (1).
60. GmbH, B.-G., LAPONITE. Germany, 2014.
61. Das, S. S.; Neelam; Hussain, K.; Singh, S.; Hussain, A.; Faruk, A.; Tebyetekerwa, M., Laponite-based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Curr Pharm Des* **2019**, *25* (4), 424-443.
62. Golafshan, N.; RezaHasani, R.; Tarkesh Esfahani, M.; Kharaziha, M.; Khorasani, S. N., Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material. *Carbohydr Polym* **2017**, *176*, 392-401.
63. Gonzaga, V. A. M.; Poli, A. L.; Gabriel, J. S.; Tezuka, D. Y.; Valdes, T. A.; Leitao, A.; Rodero, C. F.; Bauab, T. M.; Chorilli, M.; Schmitt, C. C., Chitosan-laponite nanocomposite scaffolds for wound dressing application. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2020**, *108* (4), 1388-1397.
64. Silva, J. M.; Barud, H. S.; Meneguim, A. B.; Constantino, V. R. L.; Ribeiro, S. J. L., Inorganic-organic bio-nanocomposite films based on Laponite and Cellulose Nanofibers (CNF). *Applied Clay Science* **2019**, *168*, 428-435.
65. Silva, J. M.; Maturi, F. E.; Barud, H. S.; Constantino, V. R. L.; Ribeiro, S. J. L., New organic-inorganic hybrid composites based on cellulose nanofibers and modified Laponite. **2018**, *7* (5), 327-334.
66. Valencia, G. A.; Lourenço, R. V.; Bittante, A. M. Q. B.; do Amaral Sobral, P. J., Physical and morphological properties of nanocomposite films based on gelatin and Laponite. *Applied Clay Science* **2016**, *124-125*, 260-266.
67. Aguiar, A. S.; Michels, L.; da Silva, F. G.; Kern, C.; Gomide, G.; Ferreira, C. M.; Depuyrot, J.; Aquino, R.; da Silva, G. J., The use of a laponite dispersion to increase the hydrophilicity of cobalt-ferrite magnetic nanoparticles. *Applied Clay Science* **2020**, *193*.
68. Blanco-Lopez, M.; Gonzalez-Garcinuno, A.; Tabernero, A.; Martin Del Valle, E. M., Steady and Oscillatory Shear Flow Behavior of Different Polysaccharides with Laponite((R)). *Polymers (Basel)* **2021**, *13* (6).
69. Davila, J. L.; d'Avila, M. A., Laponite as a rheology modifier of alginate solutions: Physical gelation and aging evolution. *Carbohydr Polym* **2017**, *157*, 1-8.
70. Liu, P.; Du, M.; Leong, Y.-K.; Clode, P.; Liu, J., Spherical metal oxides-LAPONITE® sheets interactions: Microstructure, rheology and thixotropy of composite gels. *Applied Clay Science* **2021**, *208*.
71. Ghadiri, M.; Hau, H.; Chrzanowski, W.; Agus, H.; Rohanizadeh, R., Laponite clay as a carrier for in situ delivery of tetracycline. *RSC Advances* **2013**, *3* (43), 20193-20201.
72. Prieto, E.; Cardiel, M. J.; Vispe, E.; Idoipe, M.; Garcia-Martin, E.; Fraile, J. M.; Polo, V.; Mayoral, J. A.; Pablo, L. E.; Rodrigo, M. J., Dexamethasone delivery to the ocular posterior segment by sustained-release Laponite formulation. *Biomed Mater* **2020**, *15* (6), 065021.
73. Bertens, C. J. F.; Gijs, M.; van den Biggelaar, F. J. H. M.; Nuijts, R. M. M. A., Topical drug delivery devices: A review. *Experimental Eye Research* **2018**, *168*, 149-160.
74. Holgado, M. A.; Anguiano-Domínguez, A.; Martín-Banderas, L., Contact lenses as drug-delivery systems: a promising therapeutic tool. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)* **2020**, *95* (1), 24-33.
75. Rykowska, I.; Nowak, I.; Nowak, R., Soft Contact Lenses as Drug Delivery Systems: A Review. *Molecules* **2021**, *26* (18), 5577.
76. Hancock, S. E.; Wan, C. R.; Fisher, N. E.; Andino, R. V.; Ciulla, T. A., Biomechanics of suprachoroidal drug delivery: From benchtop to clinical investigation in ocular therapies. *Expert Opin Drug Deliv* **2021**, *18* (6), 777-788.
77. Sheng, A.; Lin, L.; Zhu, J.; Zhuang, J.; Li, J.; Chang, L.; Cheng, H., Micro/nanodevices for assessment and treatment in stomatology and ophthalmology. *Microsyst Nanoeng* **2021**, *7*, 11.
78. Joseph, M.; Trinh, H. M.; Cholkar, K.; Pal, D.; Mitra, A. K., Recent perspectives on the delivery of biologics to back of the eye. *Expert Opin Drug Deliv* **2017**, *14* (5), 631-645.
79. Kang-Mieler, J. J.; Rudeen, K. M.; Liu, W.; Mieler, W. F., Advances in ocular drug delivery systems. *Eye (Lond)* **2020**, *34* (8), 1371-1379.
80. Lins, P. M. P.; Ribovski, L.; Sampaio, I.; Santos, O. A.; Zucolotto, V.; Cancino-Bernardi, J., Inorganic Nanoparticles for Biomedical Applications. In *Nanocarriers for Drug Delivery: Concepts and Applications*, Eloy, J. O.; Abriata, J. P.; Marchetti, J. M., Eds. Springer International Publishing: Cham, 2021; pp 49-72.

81. Oliveira, R. R.; Ferreira, F. S.; Cintra, E. R.; Branquinho, L. C.; Bakuzis, A. F.; Lima, E. M., Magnetic nanoparticles and rapamycin encapsulated into polymeric nanocarriers. *J Biomed Nanotechnol* **2012**, *8* (2), 193-201.
82. Li, G.; Cao, L.; Zhou, Z.; Chen, Z.; Huang, Y.; Zhao, Y., Rapamycin loaded magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/carboxymethylchitosan nanoparticles as tumor-targeted drug delivery system: Synthesis and in vitro characterization. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2015**, *128*, 379-388.
83. Bouma, B. E.; Cimalla, P.; Leitgeb, R. A.; Werner, T.; Gaertner, M.; Mueller, C.; Walther, J.; Wittig, D.; Ader, M.; Karl, M.; Koch, E., Magnetomotive imaging of iron oxide nanoparticles as cellular contrast agents for optical coherence tomography. In *Optical Coherence Tomography and Coherence Techniques VI*, 2013.
84. Srivastava, P. K.; Thakkar, H. P., QbD-driven development of dissolving microneedle patch loaded with ultradeformable liposomes encapsulated Noopept: Exploring a patient friendly, once-daily option to manage dementia. *Eur J Pharm Sci* **2021**, *164*, 105909.
85. Amer, M.; Chen, R. K., Self-Adhesive Microneedles with Interlocking Features for Sustained Ocular Drug Delivery. *Macromol Biosci* **2020**, *20* (6), e2000089.
86. Roy, G.; Galigama, R. D.; Thorat, V. S.; Mallela, L. S.; Roy, S.; Garg, P.; Venuganti, V. V. K., Amphotericin B containing microneedle ocular patch for effective treatment of fungal keratitis. *Int J Pharm* **2019**, *572*, 118808.
87. Roy, G.; Galigama, R. D.; Thorat, V. S.; Garg, P.; Venuganti, V. V. K., Microneedle ocular patch: fabrication, characterization, and ex-vivo evaluation using pilocarpine as model drug. *Drug Dev Ind Pharm* **2020**, *46* (7), 1114-1122.
88. Holligan, D. L.; Gillies, G. T.; Dailey, J. P., Magnetic guidance of ferrofluidic nanoparticles in an in vitro model of intraocular retinal repair. *Nanotechnology* **2003**, *14* (6), 661.
89. Haik, Y.; Chatterjee, J.; Chen, C.-J. In *Synthesis of magnetic nanocomposite gels for ophthalmic applications*, 2003 Nanotechnology Conference and Trade Show-Nanotech 2003, 2003; pp 109-111.
90. Ito, A.; Hibino, E.; Kobayashi, C.; Terasaki, H.; Kagami, H.; Ueda, M.; Kobayashi, T.; Honda, H., Construction and delivery of tissue-engineered human retinal pigment epithelial cell sheets, using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Tissue engineering* **2005**, *11* (3-4), 489-96.
91. Yanai, A.; Häfeli, U. O.; Metcalfe, A. L.; Soema, P.; Addo, L.; Gregory-Evans, C. Y.; Po, K.; Shan, X.; Moritz, O. L.; Gregory-Evans, K., Focused magnetic stem cell targeting to the retina using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Cell Transplant* **2012**, *21* (6), 1137-48.
92. Moysidis, S. N.; Alvarez-Delfin, K.; Peschansky, V. J.; Salero, E.; Weisman, A. D.; Bartakova, A.; Raffa, G. A.; Merkhofer, R. M., Jr.; Kador, K. E.; Kunzevitzky, N. J.; Goldberg, J. L., Magnetic field-guided cell delivery with nanoparticle-loaded human corneal endothelial cells. *Nanomedicine* **2015**, *11* (3), 499-509.
93. Bi, Y. L.; Wu, M. F.; Lu, L. X.; Zhou, Q.; Du, F.; Sun, X. T.; Tang, S. F.; Xu, G. T., Functions of corneal endothelial cells do not change after uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Mol Med Rep* **2013**, *7* (6), 1767-72.
94. Cornell, L. E.; Wehmeyer, J. L.; Johnson, A. J.; Desilva, M. N.; Zamora, D. O., Magnetic Nanoparticles as a Potential Vehicle for Corneal Endothelium Repair. *Mil Med* **2016**, *181* (5 Suppl), 232-9.
95. Wu, M. F.; Lu, L. X.; Sun, X. T.; Du, F.; Bi, Y. L., Comparison between Dextran-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles and Magnetoliposome on Rabbit Corneal Endothelial Cells Labeling. *Advanced Materials Research* **2013**, *652-654*, 234-240.
96. Dengler, M.; Saatchi, K.; Dailey, J. P.; Matsubara, J.; Mikelberg, F. S.; Häfeli, U. O.; Yeung, S. N.; Häfeli, U.; Schütt, W.; Zborowski, M., Targeted Delivery of Magnetic Cobalt Nanoparticles to the Eye Following Systemic Administration. 2010; pp 329-336.
97. Raju, H. B.; Hu, Y.; Padgett, K. R.; Rodriguez, J. E.; Goldberg, J. L., Investigation of nanoparticles using magnetic resonance imaging after intravitreal injection. *Clin Exp Ophthalmol* **2012**, *40* (1), 100-7.
98. Giannaccini, M.; Giannini, M.; Calatayud, M. P.; Goya, G. F.; Cuschieri, A.; Dente, L.; Raffa, V., Magnetic nanoparticles as intraocular drug delivery system to target retinal pigmented epithelium (RPE). *Int J Mol Sci* **2014**, *15* (1), 1590-605.
99. Jeoung, J. W.; Jeun, M.; Park, J. H.; Kim, Y. J.; Bae, S.; Park, K. H., Induction of Heat Shock Protein-72 by Magnetic Nanofluid Hyperthermia in Cultured Retinal Ganglion Cells for Neuroprotective Treatment in Glaucoma. *Journal of Nanomaterials* **2015**, *2015*, 1-8.
100. Bae, S.; Jeoung, J. W.; Jeun, M.; Jang, J. T.; Park, J. H.; Kim, Y. J.; Lee, K.; Kim, M.; Lee, J.; Hwang, H. M.; Paek, S. H.; Park, K. H., Magnetically softened iron oxide (MSIO) nanofluid and its application to thermally-induced heat shock proteins for ocular neuroprotection. *Biomaterials* **2016**, *101*, 165-75.
101. Jeun, M.; Jeoung, J. W.; Moon, S.; Kim, Y. J.; Lee, S.; Paek, S. H.; Chung, K. W.; Park, K. H.; Bae, S., Engineered superparamagnetic Mn<sub>0.5</sub>Zn<sub>0.5</sub>Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as a heat shock protein induction agent for ocular neuroprotection in glaucoma. *Biomaterials* **2011**, *32* (2), 387-94.
102. Czugala, M.; Mykhaylyk, O.; Böhrer, P.; Onderka, J.; Stork, B.; Wesselborg, S.; Kruse, F. E.; Plank, C.; Singer, B. B.; Fuchsluger, T. A., Efficient and safe gene delivery to human corneal endothelium using magnetic nanoparticles. *Nanomedicine (London, England)* **2016**, *11* (14), 1787-800.



103. Park, E. J.; Chae, J. B.; Kang, S.; Lyu, J.; Jeong, U.; Yeom, C.; Kim, Y.; Chang, J., Nano-sized iron particles may induce multiple pathways of cell death following generation of mistranscribed RNA in human corneal epithelial cells. *Toxicol In Vitro* **2017**, *42*, 348-357.
104. Du, Z. J.; Li, P.; Wang, L., Magnetic nanoparticles conjugated with "RPE cell -MCP-1 antibody -VEGF antibody" compounds for the targeted therapy of age-related macular degeneration: a hypothesis. *Int J Ophthalmol* **2017**, *10* (5), 812-814.
105. Tabatabaei, S. N.; Tabatabaei, M. S.; Girouard, H.; Martel, S., Hyperthermia of magnetic nanoparticles allows passage of sodium fluorescein and Evans blue dye across the blood-retinal barrier. *Int J Hyperthermia* **2016**, *32* (6), 657-65.
106. Raju, H. B.; Hu, Y.; Vedula, A.; Dubovy, S. R.; Goldberg, J. L., Evaluation of magnetic micro- and nanoparticle toxicity to ocular tissues. *PLoS One* **2011**, *6* (5), e17452.
107. Schneider-Futschik, E. K.; Reyes-Ortega, F., Advantages and Disadvantages of Using Magnetic Nanoparticles for the Treatment of Complicated Ocular Disorders. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (8).
108. Gaharwar, A. K.; Cross, L. M.; Peak, C. W.; Gold, K.; Carrow, J. K.; Brokesh, A.; Singh, K. A., 2D Nanoclay for Biomedical Applications: Regenerative Medicine, Therapeutic Delivery, and Additive Manufacturing. *Adv Mater* **2019**, *31* (23), e1900332.
109. Kaniewska, K.; Karbarz, M.; Katz, E., Nanocomposite hydrogel films and coatings – Features and applications. *Applied Materials Today* **2020**, *20*.
110. Cavallaro, G.; Lazzara, G.; Lisuzzo, L.; Milioto, S.; Parisi, F., Filling of Mater-Bi with Nanoclays to Enhance the Biofilm Rigidity. *J Funct Biomater* **2018**, *9* (4).
111. López-Ângulo, D.; Bittante, A.; Luciano, C.; Ayala Valencia, G.; Flaker, C.; Djabourov, M.; Sobral, P., *Effect of Laponite on the structure, thermal stability and barrier properties of nanocomposite gelatin films*. 2020.
112. Li, X.; Liu, A.; Ye, R.; Wang, Y.; Wang, W., Fabrication of gelatin–laponite composite films: Effect of the concentration of laponite on physical properties and the freshness of meat during storage. *Food Hydrocolloids* **2015**, *44*.
113. Goncalves, M.; Figueira, P.; Maciel, D.; Rodrigues, J.; Shi, X.; Tomas, H.; Li, Y., Antitumor efficacy of doxorubicin-loaded laponite/alginate hybrid hydrogels. *Macromol Biosci* **2014**, *14* (1), 110-20.
114. Wang, S.; Wu, Y.; Guo, R.; Huang, Y.; Wen, S.; Shen, M.; Wang, J.; Shi, X., Laponite nanodisks as an efficient platform for Doxorubicin delivery to cancer cells. *Langmuir* **2013**, *29* (16), 5030-6.
115. Ghadiri, M.; Chrzanowski, W.; Rohanizadeh, R., Antibiotic eluting clay mineral (Laponite(R)) for wound healing application: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med* **2014**, *25* (11), 2513-26.
116. Ghadiri, M.; Hau, H.; Chrzanowski, W.; Agus, H.; Rohanizadeh, R., Laponite clay as a carrier for in situ delivery of tetracycline. *RSC Advances* **2013**, *3* (43).
117. Hamilton, A. R.; Hutcheon, G. A.; Roberts, M.; Gaskell, E. E., Formulation and antibacterial profiles of clay–ciprofloxacin composites. *Applied Clay Science* **2014**, *87*, 129-135.
118. Park, J. K.; Choy, Y. B.; Oh, J. M.; Kim, J. Y.; Hwang, S. J.; Choy, J. H., Controlled release of donepezil intercalated in smectite clays. *Int J Pharm* **2008**, *359* (1-2), 198-204.
119. Prieto, E.; Vispe, E.; De Martino, A.; Idoipe, M.; Rodrigo, M. J.; Garcia-Martin, E.; Fraile, J. M.; Polo-Llorens, V.; Mayoral, J. A., Safety study of intravitreal and suprachoroidal Laponite clay in rabbit eyes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **2018**, *256* (3), 535-546.
120. Fraile, J. M.; Garcia-Martin, E.; Gil, C.; Mayoral, J. A.; Pablo, L. E.; Polo, V.; Prieto, E.; Vispe, E., Laponite as carrier for controlled in vitro delivery of dexamethasone in vitreous humor models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **2016**, *108*, 83-90.
121. Rodrigo, M. J.; Cardiel, M. J.; Fraile, J. M.; Mendez-Martinez, S.; Martinez-Rincon, T.; Subias, M.; Polo, V.; Ruberte, J.; Ramirez, T.; Vispe, E.; Luna, C.; Mayoral, J. A.; Garcia-Martin, E., Brimonidine-LAPONITE® intravitreal formulation has an ocular hypotensive and neuroprotective effect throughout 6 months of follow-up in a glaucoma animal model. *Biomaterials Science* **2020**, *8* (22), 6246-6260.
122. Rodrigo, M. J.; Palomar, A. P. d.; Montolío, A.; Mendez-Martinez, S.; Subias, M.; Cardiel, M. J.; Martinez-Rincon, T.; Cegoñino, J.; Fraile, J. M.; Vispe, E.; Mayoral, J. A.; Polo, V.; Garcia-Martin, E., Monitoring New Long-Lasting Intravitreal Formulation for Glaucoma with Vitreous Images Using Optical Coherence Tomography. **2021**, *13* (2), 217.
123. Parikumar, P.; John, S.; Senthilkumar, R.; Manjunath, S.; Baskar, S.; Haraguchi, K.; Abraham, S., Successful transplantation of in vitro expanded human corneal endothelial precursors to corneal endothelial surface using a nanocomposite sheets. *Journal of stem cells & regenerative medicine* **2011**, *7* (2), 94.
124. Szabó, T.; Bakandritsos, A.; Tzitzios, V.; Papp, S.; Korösi, L.; Galbács, G.; Musabekov, K.; Bolatova, D.; Petridis, D.; Dékány, I., Magnetic iron oxide/clay composites: effect of the layer silicate support on the microstructure and phase formation of magnetic nanoparticles. *Nanotechnology* **2007**, *18* (28).
125. Mahdavinia, G. R.; Mousanezhad, S.; Hosseinzadeh, H.; Darvishi, F.; Sabzi, M., Magnetic hydrogel beads based on PVA/sodium alginate/laponite RD and studying their BSA adsorption. *Carbohydr Polym* **2016**, *147*, 379-391.

126. Mahdavinia, G. R.; Soleymani, M.; Sabzi, M.; Azimi, H.; Atlasi, Z., Novel magnetic polyvinyl alcohol/laponite RD nanocomposite hydrogels for efficient removal of methylene blue. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2017**, *5* (3), 2617-2630.
127. Tzitzios, V.; Basina, G.; Bakandritsos, A.; Hadjipanayis, C. G.; Mao, H.; Niarchos, D.; Hadjipanayis, G. C.; Tucek, J.; Zboril, R., Immobilization of magnetic iron oxide nanoparticles on laponite discs - an easy way to biocompatible ferrofluids and ferrogels. *J Mater Chem* **2010**, *20* (26), 5418-5428.
128. Ding, L.; Hu, Y.; Luo, Y.; Zhu, J.; Wu, Y.; Yu, Z.; Cao, X.; Peng, C.; Shi, X.; Guo, R., LAPONITE(R)-stabilized iron oxide nanoparticles for in vivo MR imaging of tumors. *Biomater Sci* **2016**, *4* (3), 474-82.
129. Goncharuk, O.; Samchenko, Y.; Kernosenko, L.; Korotych, O.; Poltoratska, T.; Pasmurtseva, N.; Oranska, O.; Sternik, D.; Mamyshev, I., Thermoresponsive hydrogels physically crosslinked with magnetically modified LAPONITE(R) nanoparticles. *Soft Matter* **2020**, *16* (24), 5689-5701.
130. Antonio Gutiérrez, L. Síntesis y caracterización de un sistema de nanopartículas magnéticas con polímeros de impronta molecular y su evaluación en la liberación modificada de fármacos. Universidad Nacional Autónoma de México, en línea, 2020.
131. Casillas Popova, S. N. Nanopartículas electromagnéticas como nueva forma farmacéutica. Universidad Nacional Autónoma de México, en línea, 2020.
132. Doebelin, N.; Kleeberg, R., Profex: a graphical user interface for the Rietveld refinement program BGMN. *Journal of applied crystallography* **2015**, *48* (Pt 5), 1573-1580.
133. Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W., NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **2012**, *9* (7), 671-675.
134. Badhe, R. V.; Adkine, D.; Godse, A., Development of Polylactic Acid and Bovine Serum Albumin-layered-coated Chitosan Microneedles Using Novel Bees Wax Mould. *Turk J Pharm Sci* **2021**, *18* (3), 367-375.
135. Torras, M.; Moya, C.; Pasquevich, G.; Roig, A., Accurate iron quantification in colloids and nanocomposites by a simple UV-Vis protocol. *Microchimica Acta* **2020**, 187.
136. Nawaz, M.; Sliman, Y.; Ercan, I.; Lima-Tenório, M. K.; Tenório-Neto, E. T.; Kaewsaneha, C.; Elaissari, A., 2 - Magnetic and pH-responsive magnetic nanocarriers. In *Stimuli Responsive Polymeric Nanocarriers for Drug Delivery Applications*, Makhoul, A. S. H.; Abu-Thabit, N. Y., Eds. Woodhead Publishing: 2019; pp 37-85.
137. Dembski, S.; Schneider, C.; Christ, B.; Retter, M., 5 - Core-shell nanoparticles and their use for in vitro and in vivo diagnostics. In *Core-Shell Nanostructures for Drug Delivery and Theranostics*, Focarete, M. L.; Tampieri, A., Eds. Woodhead Publishing: 2018; pp 119-141.
138. Polte, J., Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *CrystEngComm* **2015**, *17* (36), 6809-6830.
139. Whitehead, C. B.; Özkar, S.; Finke, R. G., LaMer's 1950 Model for Particle Formation of Instantaneous Nucleation and Diffusion-Controlled Growth: A Historical Look at the Model's Origins, Assumptions, Equations, and Underlying Sulfur Sol Formation Kinetics Data. *Chemistry of Materials* **2019**, *31* (18), 7116-7132.
140. Mammucari, R., Processing of iron oxide nanoparticles by supercritical fluids. *Industrial and Engineering Chemistry Research* **2008**, *47*, 599-614.
141. Fang, M.; Strom, V.; Olsson, R. T.; Belova, L.; Rao, K. V., Particle size and magnetic properties dependence on growth temperature for rapid mixed co-precipitated magnetite nanoparticles. *Nanotechnology* **2012**, *23* (14), 145601.
142. Tao, K.; Dou, H.; Sun, K., Interfacial coprecipitation to prepare magnetite nanoparticles: Concentration and temperature dependence. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2008**, *320* (1-3), 115-122.
143. Lv, Y.; Yang, Y.; Fang, J.; Zhang, H.; Peng, E.; Liu, X.; Xiao, W.; Ding, J., Size dependent magnetic hyperthermia of octahedral Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. *RSC Advances* **2015**, *5* (94), 76764-76771.
144. Boettinger, J. L.; Southard, R. J., Phyllosilicate Distribution and Origin in Aridisols on a Granitic Pediment, Western Mojave Desert. *Soil Science Society of America Journal* **1995**, *59* (4), 1189-1198.
145. Christidis, G.; Aldana, C.; Chryssikos, G.; Gionis, V.; Kalo, H.; Stöter, M.; Brey, J.; Robert, J.-L., The Nature of Laponite: Pure Hectorite or a Mixture of Different Trioctahedral Phases? *Minerals* **2018**, *8* (8).
146. Khan, U. S.; Amanullah; Manan, A.; Khan, N.; Mahmood, A.; Rahim, A., Transformation mechanism of magnetite nanoparticles. *Materials Science-Poland* **2015**, *33* (2), 278-285.
147. Stoia, M.; Istrate, R.; Păcurariu, C., Investigation of magnetite nanoparticles stability in air by thermal analysis and FTIR spectroscopy. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2016**, *125* (3), 1185-1198.
148. Petrov, D. A.; Lin, C. R.; Ivantsov, R. D.; Ovchinnikov, S. G.; Zharkov, S. M.; Yurkin, G. Y.; Velikanov, D. A.; Knyazev, Y. V.; Molokeyev, M. S.; Tseng, Y. T.; Lin, E. S.; Edelman, I. S.; Baskakov, A. O.; Starchikov, S. S.; Lyubutin, I. S., Characterization of the iron oxide phases formed during the synthesis of core-shell Fe(x)O(y)@C nanoparticles modified with Ag. *Nanotechnology* **2020**, *31* (39), 395703.
149. Jansson, M.; Belić, D.; Forsman, J.; Skepö, M., Nanoplatelet interactions in the presence of multivalent ions: The effect of overcharging and stability. *Journal of Colloid and Interface Science* **2020**, *579*, 573-581.
150. Negrete; Letoffe, J.-M.; Putaux, J.-L.; David, L.; Bourgeat-Lami, E., Aqueous Dispersions of Silane-Functionalized Laponite Clay Platelets. A First Step toward the Elaboration of Water-Based Polymer/Clay Nanocomposites. *Langmuir* **2004**, *20* (5), 1564-1571.

151. Pálková, H.; Madejová, J.; Zimowska, M.; Bielańska, E.; Olejniczak, Z.; Lityńska-Dobrzyńska, L.; Serwicka, E. M., Laponite-derived porous clay heterostructures: I. Synthesis and physicochemical characterization. *Microporous and Mesoporous Materials* **2010**, *127* (3), 228-236.
152. Jatav, S.; Joshi, Y. M., Phase Behavior of Aqueous Suspension of Laponite: New Insights with Microscopic Evidence. *Langmuir* **2017**, *33* (9), 2370-2377.
153. Fato, F. P.; Li, D.-W.; Zhao, L.-J.; Qiu, K.; Long, Y.-T., Simultaneous Removal of Multiple Heavy Metal Ions from River Water Using Ultrafine Mesoporous Magnetite Nanoparticles. *ACS Omega* **2019**, *4* (4), 7543-7549.
154. Thommes, M.; Kaneko, K.; Neimark, A.; Olivier, J.; Rodriguez-Reinoso, F.; Rouquerol, J.; Sing, K., Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2015**, *87*.
155. Zimowska, M.; Gurgul, J.; Pálková, H.; Olejniczak, Z.; Łątka, K.; Lityńska-Dobrzyńska, L.; Matachowski, L., Structural rearrangements in Fe-porous clay heterostructures composites derived from Laponite® – Influence of preparation methods and Fe source. *Microporous and Mesoporous Materials* **2016**, *231*, 66-81.
156. Beata Łabowska, M.; Michalak, I.; Detyna, J., Methods of extraction, physicochemical properties of alginates and their applications in biomedical field – a review. *Open Chemistry* **2019**, *17* (1), 738-762.
157. Zhang, X.; Wang, X.; Fan, W.; Liu, Y.; Wang, Q.; Weng, L., Fabrication, Property and Application of Calcium Alginate Fiber: A Review. *Polymers (Basel)* **2022**, *14* (15).
158. Felton, L. A., Mechanisms of polymeric film formation. *Int J Pharm* **2013**, *457* (2), 423-7.
159. Costa, M. J.; Marques, A. M.; Pastrana, L. M.; Teixeira, J. A.; Sillankorva, S. M.; Cerqueira, M. A., Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. *Food Hydrocolloids* **2018**, *81*, 442-448.
160. Lira, M.; Pereira, C.; Real Oliveira, M. E. C. D.; Castanheira, E. M. S., Importance of contact lens power and thickness in oxygen transmissibility. *Contact Lens and Anterior Eye* **2015**, *38* (2), 120-126.
161. Aristilde, L.; Galdi, S. M.; Kelch, S. E.; Aoki, T. G., Sugar-influenced water diffusion, interaction, and retention in clay interlayer nanopores probed by theoretical simulations and experimental spectroscopies. *Advances in Water Resources* **2017**, *106*, 24-38.
162. Chesworth, W.; Camps Arbestain, M.; Macías, F.; Spaargaren, O.; Spaargaren, O.; Mualem, Y.; Morel - Seytoux, H. J.; Horwath, W. R.; Almendros, G.; Chesworth, W.; Grossl, P. R.; Sparks, D. L.; Spaargaren, O.; Fairbridge, R. W.; Singer, A.; Eswaran, H.; Micheli, E.; Spaargaren, O.; Huang, P. M.; Singer, A.; Weaver, C. E.; Theng, B. K. G., Clay - Organic Interactions. In *Encyclopedia of Soil Science*, Chesworth, W., Ed. Springer Netherlands: Dordrecht, 2008; pp 144-150.
163. Wiercigroch, E.; Szafraniec, E.; Czamara, K.; Pacia, M. Z.; Majzner, K.; Kochan, K.; Kaczor, A.; Baranska, M.; Malek, K., Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* **2017**, *185*, 317-335.
164. J. P. Soares, J. E. S., G. O. Chierice, E. T. G. Cavalheir, Thermal behavior of alginic acid and its sodium salt. *Eclética Química* **2004**, *20* (2), 53-56.
165. Hsieh, W.-H.; Cheng, W.-t.; Chen, L.-c.; Lin, H.-L.; Lin, S. Y. In *Non-isothermal Dehydration Kinetics of Glucose Monohydrate, Maltose Monohydrate and Trehalose Dihydrate by Thermal Analysis and DSC-FTIR Study*, 2017.
166. Reynhardt, E. C., An NMR, DSC and X-ray investigation of the disaccharides sucrose, maltose and lactose. *Molecular Physics* **1990**, *69* (6), 1083-1097.
167. Sun, W. Q.; Davidson, P., Protein inactivation in amorphous sucrose and trehalose matrices: effects of phase separation and crystallization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1998**, *1425* (1), 235-244.
168. Liskowitz, J. W.; Weill, C. E.; Carrioll, B., Thermal behavior of some reducing disaccharides. *Carbohydrate Research* **1980**, *79* (1), 23-28.
169. Mexicanos, M. S. d. S. C. P. d. I. F. d. I. E. U., *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 11 ed.; Secretaría de Salud. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos: 2014; Vol. 1.
170. Felton, L. A., *Aqueous Polymeric Coatings for Pharmaceutical Dosage Forms*. CRC Press: 2016.
171. Braun, D.; Cherdrón, H.; Rehahn, M.; Ritter, H.; Voit, B., Modification of Macromolecular Substances. In *Polymer Synthesis: Theory and Practice: Fundamentals, Methods, Experiments*, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; pp 323-373.
172. Ravve, A., Physical Properties and Physical Chemistry of Polymers. In *Principles of Polymer Chemistry*, Springer New York: New York, NY, 2012; pp 17-67.
173. Sheskey, P. J.; Cook, W. G.; Cable, C. G., *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6 ed.; Pharmaceutical Press: 2009.
174. Shoichet, M. S.; Li, R. H.; White, M. L.; Winn, S. R., Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose. **1996**, *50* (4), 374-381.



175. Schmidt, M.; Giesl, A.; Laufs, T.; Hankeln, T.; Wolfrum, U.; Burmester, T., How Does the Eye Breathe?: EVIDENCE FOR NEUROGLOBIN-MEDIATED OXYGEN SUPPLY IN THE MAMMALIAN RETINA \*. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278* (3), 1932-1935.
176. Guerrero, P.; Abedin, N. F. Z.; Caba, K. d. I. In *THE EFFECT OF PLASTICIZER CONTENT AND DISACCHARIDE TYPE ON THE MECHANICAL , BARRIER AND PHYSICAL PROPERTIES OF BOVINE GELATIN-BASED FILMS*, 2014.
177. Mirmazloum, I.; Ladányi, M.; Omran, M.; Papp, V.; Ronkainen, V.-P.; Pónya, Z.; Papp, I.; Némedi, E.; Kiss, A., Co-encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and Reishi medicinal mushroom (*Ganoderma lingzhi*) extract in moist calcium alginate beads. *International Journal of Biological Macromolecules* **2021**, *192*, 461-470.
178. Choi, I.; Lee, Y.; Lyu, J. S.; Lee, J.-S.; Han, J., Characterization of ionically crosslinked alginate films: Effect of different anion-based metal cations on the improvement of water-resistant properties. *Food Hydrocolloids* **2022**, *131*, 107785.
179. Pereira, R.; Tojeira, A.; Vaz, D. C.; Mendes, A.; Bártolo, P., Preparation and Characterization of Films Based on Alginate and Aloe Vera. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization* **2011**, *16* (7), 449-464.
180. Zhang, Y.; Jiang, G.; Yu, W.; Liu, D.; Xu, B., Microneedles fabricated from alginate and maltose for transdermal delivery of insulin on diabetic rats. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2018**, *85*, 18-26.
181. Bassetto, M.; Ajoy, D.; Poulhes, F.; Obringer, C.; Walter, A.; Messadeq, N.; Sadeghi, A.; Puranen, J.; Ruponen, M.; Kettunen, M.; Toropainen, E.; Urtti, A.; Dollfus, H.; Zelphati, O.; Marion, V., Magnetically Assisted Drug Delivery of Topical Eye Drops Maintains Retinal Function In Vivo in Mice. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (10).