



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

DISEÑO, DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE FORMACIÓN IN
SITU A PARTIR DE DISPERSIONES COLOIDALES DE LAPONITA PARA LA
CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. EN C. RAMÓN ANDRÉS PINEDA ÁLVAREZ

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

FACULTA DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad de México, JUNIO, 2024



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DISEÑO, DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE FORMACIÓN
IN SITU A PARTIR DE DISPERSIONES COLOIDALES DE LAPONITA PARA LA
CICATRIZACIÓN DE HERIDAS**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. EN C. RAMÓN ANDRÉS PINEDA ÁLVAREZ

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

FACULTA DE QUÍMICA, UNAM



Ciudad de México, JUNIO 2024

AGRADECIMIENTOS

A CONAHCYT y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por sus apoyos económicos de manutención y asistencia en toda mi formación académica, CV: 888004.

A los Doctores María Josefa Bernad Bernad, Gerardo Leyva Gómez y José Juan Escobar Chávez por su asesoría y guía como mi comité tutor.

A mis sinodales Doctores: Emilio Bucio Carrillo, Roberto Díaz Torres, Luz María Melgoza Contreras, Juan Arturo Mendoza Nieto y Gerardo Leyva Gómez por su pronta respuesta y comentarios en el presente proyecto de investigación.

A las maestras Carolina Flores y Azzeneth Ortega por su colaboración y contribución a mi proyecto de investigación.

A los Doctores Ruth Bustamante García Ruth, Atonatiu Gómez Martínez y Paula Guevara Paredes y el Bioterio de la Facultad de Química por su seguimiento y asistencia en el estudio in vivo que se realizó en el presente trabajo de investigación.

A la Dra María Isabel Mora Gracia y el Dr. Abel Zapata Arenas por compartir sus conocimientos en la preparación y análisis de tejidos epidérmico de ratas.

A los Doctores Mohammad-Ali Shahbazi y Hélder Santos, así como también a Santos Lab y al grupo de Técnicos de laboratorio por su hospitalidad y asesoría para poder cumplir con mi estancia de investigación en la University Medical Center Groningen de la Universidad de Groningen.

Dedicado a mi familia y amigos, que a pesar de la distancia han estado a mi lado.

El trabajo se realizó en:

- Laboratorio 118: Sistemas de liberación, edificio F, Facultad de Química, UNAM.

CONGRESOS, SYMPÓSION y CURSOS:

- Curso: Técnicas microscópicas de caracterización.
Universitat de Barcelona.
Coursera, Agosto, 2021
- Congreso: Laponite composites: in situ films forming as a healing agent.
International Conference on Polymers and Advanced Materials "Polymat- 022.
Huatulco, México. Octubre 16-21, 2022. Pineda-Álvarez, R. A., Flores-Avila, C., Medina-Torres, L., Gracia-Mora, J., Escobar-Chávez, J. J., Leyva-Gómez, G., Shahbazi, M.-A., & Bernad-Bernad, M. J. (2023). Laponite Composites: In Situ Films Forming as a Possible Healing Agent. *Pharmaceutics*, 15(6), 1634. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061634>.
- Curso: Redacción de Patentes.
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. a través de la Dirección de Vinculación.
Ciudad de México, México. Abril 24-29, 2023.
- Curso: 1st Symposium in Nanomedicine, Biomaterials and Bionanotechnology.
Instituto de Química, el Instituto de Investigaciones en Materiales y la Facultad de Química de la UNAM.
Ciudad de México, México. Junio 19-22, 2023.
- Taller: 1st Summer School in Nanomedicine, Biomaterials and Bionanotechnology.
Instituto de Química, el Instituto de Investigaciones en Materiales y la Facultad de Química de la UNAM.
Ciudad de México, México. Junio 19-21, 2023.
- Curso: Inmunohistoquímica.
Centro de Capacitación BioAdviser.
Ciudad de México, México. Septiembre 10 a octubre 01, 2023.

PREMIOS Y GALARDONES:

- Development and Characterization of Starch/Gelatin Microneedle Arrays Loaded with Lecithin–Gelatin Nanoparticles of Losartan for Transdermal Delivery.
Malvern Panalytical – Scientific Award 2022.
- De actor secundario a protagonista. Matrices de laponita para rutas alternativas de administración de Fármacos.
Mención de honor en la categoría de investigación tecnológica.
Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica – PREMIO CANIFARMA 2023.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	4
1.1 Marco teórico	5
1.1.1 Piel.....	5
1.1.2 Proceso de cicatrización	8
1.1.3 Apósitos para heridas	9
1.1.4 Minerales de arcilla en la industria farmacéutica.....	9
1.1.5 Maltodextrina (M) y Ascorbato de sodio (AS).....	13
1.1.6 Permeación de la piel.....	15
1.1.7 Películas de formación <i>in situ</i>	17
1.1.8 Caracterización de sistemas coloidales	21
1.1.9 Métodos para cuantificar la liberación de fármacos	28
JUSTIFICACIÓN	30
HIPÓTESIS	30
OBJETIVOS	31
METODOLOGÍA.....	33
5.1 Equipos, materiales y reactivos.....	33
5.1.1 Equipos	33
5.1.2 Materiales.....	33
5.1.3 Reactivos	34
5.2 Metodología	34
5.2.1 Interacción excipientes con laponita	34
5.2.2 Preparación del compósito particulado de laponita.....	36
5.2.3 Caracterización del compósito particulado de laponita	37

5.2.4	Caracterización de las películas de laponita	40
5.2.5	Estudios de liberación	43
5.2.6	Estudios <i>in vivo</i>	43
RESULTADOS Y ANÁLISIS.....		45
6.1	Interacción de excipientes con laponita.....	45
6.1.1	Contenido de Na, Li y Mg en laponita EP y RD.....	45
6.1.2	Adsorción de lecitina y ascorbato de sodio sobre laponita RD y EP	46
6.2	Preparación del compuesto particulado de laponita	50
6.3	Caracterización del compuesto particulado de laponita	52
6.3.1	Tamaño, PDI y potencial z	53
6.3.2	Porcentaje de encapsulamiento	56
6.3.3	Reología de las dispersiones coloidales	57
6.3.4	Morfología	59
6.4	Caracterización de las películas de laponita	60
6.4.1	Espesor de las películas	60
6.4.2	Propiedades mecánicas.....	60
6.4.3	Hinchamiento y pérdida de masa por solubilización	61
6.4.4	Efecto oclusivo	62
6.4.5	Claridad.....	62
6.4.6	Bioadhesión y bioadhesión post-humectación	63
6.4.7	Espectroscopía infrarroja (FTIR)	64
6.4.8	Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	65
6.4.9	Morfología de la superficie	67
6.5	Uniformidad de dosis.....	70
6.6	Estudios de liberación	70

6.7	Estudio <i>in vivo</i>	73
6.7.1	Sensibilidad a la formulación.....	73
6.7.2	Proceso de cicatrización	74
	CONCLUSIONES.....	78
	PERSPECTIVAS	80
	BIBLIOGRAFÍA.....	81
	ANEXOS.....	I
10.1	ANEXO 1. Validación del método analítico de ascorbato de sodio en agua destilada.....	I
10.2	ANEXO 2. Validación del método analítico de maltodextrina en agua (método ácido sulfúrico-fenol).....	V
10.3	ANEXO 3. Validación del método analítico de lecitina de soya en agua.....	IX
10.4	ANEXO 4. Protocolo extenso del estudio <i>in vivo</i>	XIII
10.5	ANEXO 5. Resumen del protocolo para sometimiento en el CICUAL.....	XXII
10.6	ANEXO 6. Aprobación comité de ética CICUAL	XXXIX
10.7	ANEXO 7. Adsorción de lecitina y ascorbato en la laponita RD y EP	XL
10.8	ANEXO 8. Informa de actividades en la UNIVERSIDAD DE GRONINGEN .	XLII
10.9	ANEXO 9. Inicio de escritura 2do artículo.	LIX
10.10	ANEXO 10. ARTÍCULO CIENTÍFICO.....	LXXXIV

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema del compuesto LGL MAS.....	3
Figura 2.	Estructura de la piel.....	5
Figura 3.	Disposición de las capas tetragonal.	10
Figura 4.	Laponita: Esquema de la disposición de atómica.....	11
Figura 5.	Laponita: conformación castillo de naipes.....	12
Figura 6.	Estructura molecular M y AS.	14

Figura 7. Proceso de permeación de fármacos a través de la piel.	15
Figura 8. Permeación a través del estrato córneo.	17
Figura 9. Mecanismo de formación de película <i>in situ</i>	18
Figura 10. Esquema compósito LGL.	19
Figura 11. Estructura e imágenes de microscopia electrónica de la gelatina.	20
Figura 12. Estructura e imágenes de microscopia electrónica de la lecitina de soya.	21
Figura 13. Celdas de difusión de Franz.	29
Figura 14. Esquema del proceso de preparación del compósito particulado.	37
Figura 15. Tendencia y modelos de ajuste de la adsorción de lecitina de soya y ascorbato de sodio sobre laponita.	47
Figura 16. Fotogramas de la adsorción de lecitina de soya sobre laponita EP.	49
Figura 17. Tendencia del potencial Z. Adsorción de lecitina de soya sobre laponita.	50
Figura 18. Compósitos preparado con 2 tipos de laponita: (a) RD y (b) EP.	50
Figura 19. Tendencia del tamaño de partícula del compósito.	53
Figura 20. Tendencia del potencial Z del compósito.	55
Figura 21. Estudio reológico.	58
Figura 22. TEM de las partículas.	59
Figura 23. Espectros IR de los excipientes y formulaciones óptimas.	65
Figura 24. Comportamiento térmico de los excipientes y películas por DSC.	66
Figura 25. Morfología de la superficie de las películas.	69
Figura 26. Perfiles de liberación y ajuste para M y AS en LGL MAS.	72
Figura 27. Esquema y resultados del estudio <i>in vivo</i> de sensibilidad a la formulación.	73
Figura 28. Estudio <i>in vivo</i> : Proceso de cicatrización, tinción H&E.	76
Figura 29. Estudio <i>in vivo</i> : Proceso de cicatrización, tinción Tricrómico de Masson.	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de maltodextrina y ascorbato de sodio.	14
Tabla 2. Propiedades farmacocinéticas del ascorbato de sodio.	14
Tabla 3. Efectos adversos del ascorbato de sodio.	15
Tabla 4. Equipos utilizados en el desarrollo del proyecto.	33
Tabla 5. Materiales utilizados en el desarrollo del proyecto.	34

Tabla 6. Reactivos utilizados en el desarrollo del proyecto.	34
Tabla 7. Adsorción de lecitina en laponita RD y EP: concentraciones y respuestas.	35
Tabla 8. Factores y respuestas del diseño experimental del compuesto particulado.	39
Tabla 9. Factores y respuestas de las películas de laponita.	41
Tabla 10. Contenido de Na, Li, Mg en laponita EP y RD.	45
Tabla 11. Análisis por DLS de las arcillas y lecitina de soya.	45
Tabla 12. Constantes de los modelos de ajuste de la adsorción de lecitina de soya y ascorbato de sodio sobre las arcillas.	47
Tabla 13. Resultados: tamaño, PDI, potencial z y encapsulamiento.	52
Tabla 14. Resultados de las películas de laponita.	60
Tabla 15. Uniformidad de dosis de LG MAS y LGL MAS.	70
Tabla 16. Liberación de los fármacos, modelos de ajuste.	71
Tabla 17. Reactivos utilizados en el desarrollo del proyecto.	XVI
Tabla 18. Reactivos utilizados en el desarrollo del proyecto.	XXX
Tabla 19. Resultados de lecitina de soya sobre laponita RD.	XL
Tabla 20. Resultados de lecitina de soya sobre laponita EP.	XL
Tabla 21. Resultados de ascorbato se sodio sobre laponita EP.	XLI
Tabla 22. Proceso de preparación de las nanopartículas de Fe ³⁺ /aminoácidos.	XLIV
Tabla 23. Resultados DLS nanopartículas de hierro.	XLIV

Abreviaturas

PDI	Índice de polidispersión
SEM	Microscopía electrónica de barrido
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
AFM	Microscopía de fuerza atómica
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
FTIR	Espectroscopía infrarrojo
M	Maltodextrina
AS	Ascorbato de sodio
DLS	Dispersión dinámica de luz
MMP	Metaloproteinasas de matriz
TIMP	Inhibidores tisulares de las MMP
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
TGF	Factor de crecimiento transformante
TNF	Factor de crecimiento tumoral
PVA	Alcohol polivinílico
USP	Farmacopea de los Estados Unidos Americanos

RESUMEN

Actualmente en el campo de regeneración de tejidos y específicamente en la cicatrización de heridas se necesita que los materiales cicatrizantes presenten características deseables tales como: 1) mantener el ambiente fisiológico en la lesión, en términos de temperatura, humedad e intercambio gaseoso, 2) tener la capacidad de formación de barrera que proteja la herida del medio circundante, 3) poder absorber el exudado, 4) ser de fácil manipulación, es necesario que la bioadhesión del apósito sea suficiente para mantenerse en el área dañada pero a su vez que sea de fácil retiro para no lesionarla así como tampoco a tejidos circundantes, además es deseable que sea translúcido para facilitar el seguimiento del proceso de recuperación a simple vista y 5) no presentar toxicidad o la capacidad de teñir las lesiones, haciendo difícil su observación.

Laponita es una arcilla sintética que presenta propiedades como hinchamiento, entrecruzamiento físico, modificador reológico, estabilizador de formulaciones y encapsulador de fármacos, lo que le convierte en una alternativa interesante para el desarrollo de nuevos apósitos. Este estudio evaluó el desempeño de esta arcilla en compósitos híbridos de lecitina:gelatina (LGL), así como también el mismo material más una mezcla de maltodextrina:ascorbato de sodio (LGL MAS), como sustancias activas, ver Figura 1. Estas formulaciones fueron aplicadas como una dispersión de nanopartículas en estado líquido, preparadas mediante el método de desolvatación de gelatina, que después se transformaron en películas mediante el método de evaporación de solvente. Ambos materiales fueron analizados como dispersiones y películas. Para lo cual, se utilizaron técnicas reológicas y dispersión dinámica de luz (DLS) para caracterizar las suspensiones, mientras que para las películas se determinaron las propiedades mecánicas, la morfología del apósito innovador fue observada por Microscopía Electrónica de Barrido y de Transmisión (SEM y TEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), y para el estudio *in vitro* de la liberación de las sustancias activas se realizó por celdas de difusión de Franz. Adicionalmente, se realizó el estudio *in vivo* de las formulaciones óptimas en cuanto a la sensibilización y el proceso de cicatrización un modelo de conejos y ratas, respectivamente.

Los compósitos óptimos contenían 8.8 mg de laponita, esta cantidad redujo el tamaño de partícula y evitó aglomeraciones por las propiedades de variabilidad de cargas de la arcilla que producen un efecto de entrecruzamiento físico. En las películas, mejoró el hinchamiento y proporcionó estabilidad hasta los 50 °C. Mientras que en el estudio de la liberación de fármacos de maltodextrina y ascorbato de sodio de LGL MAS se ajustaron a primer orden y Korsmeyer-Peppas modelos, respectivamente. Y el estudio *in vivo* se observó una adecuada tolerancia a las formulaciones en el modelo de conejos y una cicatrización acelerada en el modelo de ratas para ambas formulaciones óptimas. Por lo que se concluyó que los sistemas antes mencionados representan una interesante, innovadora y prometedora alternativa en el campo de los materiales cicatrizantes.

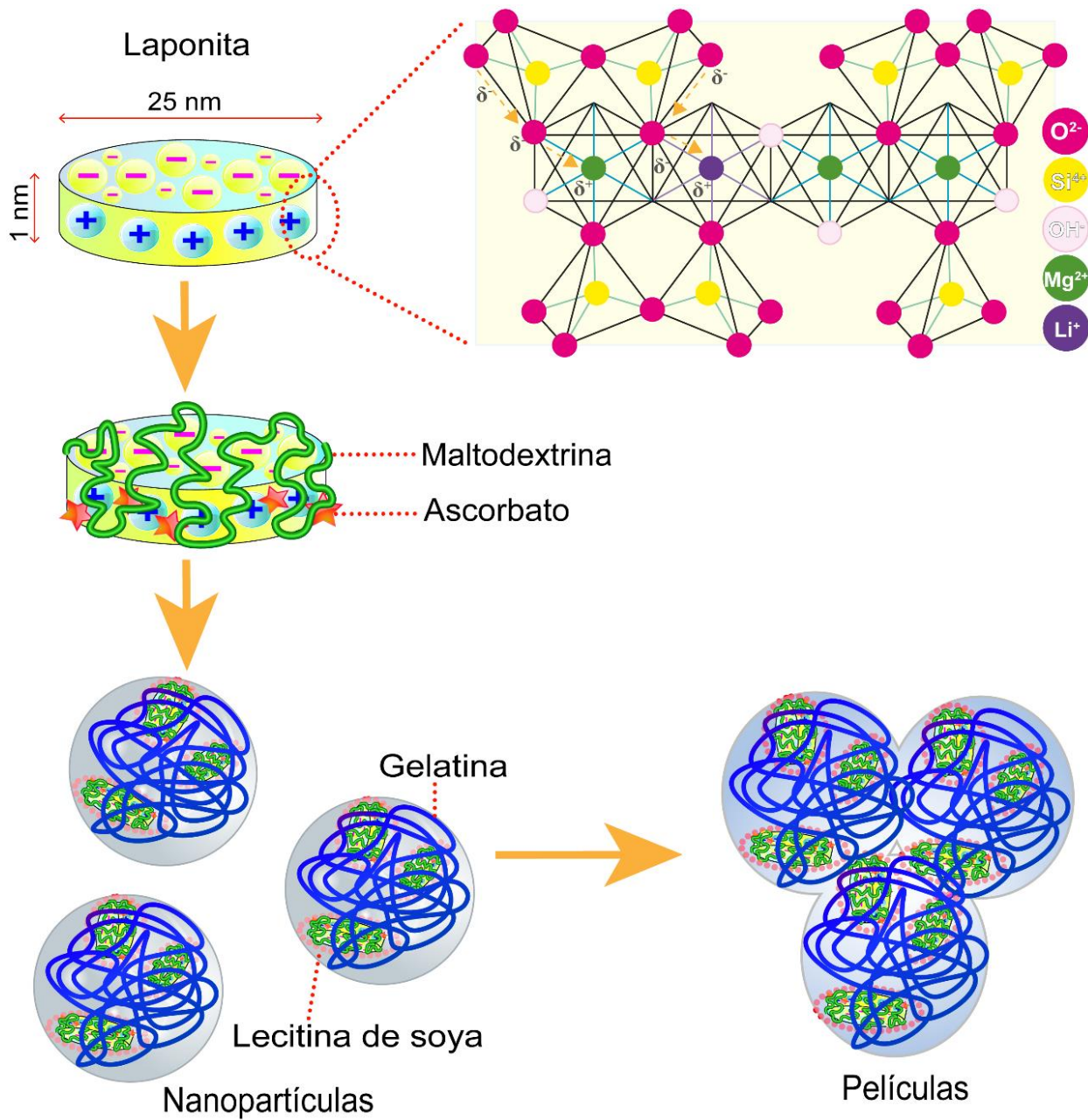


Figura 1. Esquema del compuesto LGL MAS.

INTRODUCCIÓN

Una herida es la ruptura de la integridad epitelial de la piel. Estas lesiones incrementan el riesgo a infecciones y que tejidos internos queden expuestos a factores dañinos [1]. Por este motivo, el cierre y reparación de las heridas después de un evento traumático o una cirugía son de vital importancia en el área clínica y la investigación, el correcto tratamiento de estas dará como resultado una cicatrización adecuada [2]. El manejo de heridas es una práctica muy costosa en todos los países y representa una enorme carga para los recursos sanitarios; estudios han calculado que el costo para su tratamiento en el Servicio Nacional de Salud (NHS: sistemas de salud financiados con fondos públicos en los países del Reino Unido) es de alrededor de 1 billón de libras esterlinas al año (25 billones de pesos mexicanos) [3]. En México la atención por estas afecciones principalmente se realiza en unidades de segundo nivel (79.4%) y ambulatorias (75.1%). Las lesiones más recurrentes son las heridas traumáticas (26.6%) y las úlceras de pie diabético (23.4%). Los costos directos mensuales en pesos mexicanos son de alrededor de los \$ 46,563,070.76 (ambulatorio) y \$1,864,124,436.89 (hospitalización) [4].

La mayoría de los tratamientos tópicos que actualmente se manejan en México resultan complicados para el paciente por la aplicación de más de un apósito en la herida y la limpieza que se debe realizar previo a su administración. Por otro lado, mantenerla descubierta presenta la posibilidad de eliminar por contacto la dosis de fármaco administrada y aún peor recaer en infecciones que agraven su condición [5,6]. Hoy en día, el uso de la nanotecnología mediante sistemas nanoacarreadores que faciliten la administración de fármacos y recubran heridas para protegerlas del medio podría ser una alternativa para cumplir con las condiciones ideales de un material cicatrizante. Laponita es un nanomaterial que ha venido describiendo propiedades interesantes para la ingeniería de tejidos como su efecto entrecruzante, cambiando las propiedades mecánicas de los materiales, su variabilidad de cargas permite reducir el tiempo de coagulación, su hinchamiento le permite adsorber el exudado en heridas y su amigable degradación produciendo metabolitos biológicamente activos que benefician el área lesionada. Por lo que se propone el presente trabajo de investigación, que es evaluar: 1) la capacidad de la laponita en un compósito particulado de gelatina:lecitina para formar

películas *in situ* y adicional 2) comparar su actividad cicatrizante vs. otro material con la misma matriz arcilla:polímeros cargados con maltodextrina y ascorbato de sodio, quienes han demostrado su actividad en la aceleración de los procesos de cicatrización.

1.1 Marco teórico

1.1.1 Piel

La piel o sistema integumentario actúa como una barrera impermeable, un escudo aislante y protege el cuerpo del estrés del ambiente. Es propensa a sufrir lesiones o heridas físicas, químicas y biológicas recurrentes [7]. Su estructura comprende el ectodermo superficial y la mesénquima subyacente, es decir está compuesta por 3 capas: epidermis, dermis e hipodermis, y anexos cutáneos que incluyen los folículos capilares, uñas y glándulas sebáceas y sudoríparas, como se muestra en la Figura 2.

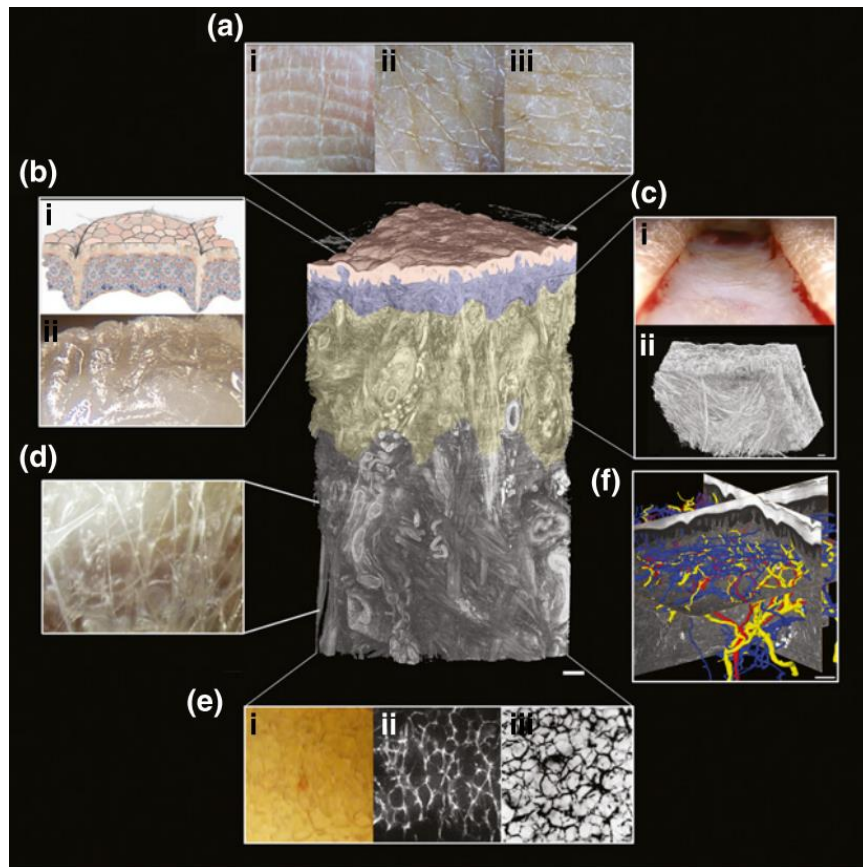


Figura 2. Estructura de la piel (imagen central es un render 3D imágenes episcópicas).
(a) Topografía superficial de la piel en diferentes sitios del cuerpo: (i) dedo, (ii) dorso de la mano y (iii) abdomen. (b) Epidermis: (i) Esquema, corneocitos de forma hexagonal. (ii) Corte transversal:

capa de ceramida arriba y dermis papilar en la parte inferior blanca, por alto contenido de colágeno. (c) Dermis (i) Corte a nivel de la dermis reticular. (ii) Fibras de colágeno entrecruzadas. (d) Red microvascular de colágeno extensible y flexible suelta. (e) Hipodermis: (i) Glóbulos de grasa, *in vivo*. (ii) Fibras fibroelásticas, vistas con fluorescencia. (iii) Grasa hipodérmica vista con tinción de tinta india. (f) Representación 3D de la vascularización de la piel utilizando imágenes episcópicas. Ramificación del árbol arterial (rojo), plexos venosos (azul), terminaciones nerviosas (amarillo) [8].

A. Epidermis: Es la capa más superficial y biológicamente activa de la piel, con un grosor aproximado de 0.5 a 1.5 mm dependiendo el área del cuerpo. Está formada de una capa epitelial escamosa estratificada, estrato córneo, compuesta básicamente de queratinocitos y melanocitos. También se encuentran las células de Langerhans, responsables de la síntesis de antígenos involucrados en varias respuestas de las células T. La siguiente capa es la epidermis interfolicular que presenta cúmulos hexagonales de alrededor de 30 células epiteliales como surcos intermedios, que actúan como punto de apoyo para el movimiento. Luego el estrato granuloso presenta un alto contenido de lípidos, a partir de ceramidas, colesterol y ácidos grasos que aportan a la firmeza y lucidez parcial de la epidermis. Estos se asientan en un complejo ensamblaje de colágena IV, laminina, nidógeno, perlecano, proteoglicanos de sulfato de heparina y moléculas de unión conocidas como membrana basal, que contienen células de Merkel, su membrana interactúa con las terminaciones nerviosas de la piel con estructuras similares a la sinapsis. Esta es la unión dermoepidérmica que define y mantiene adherida la epidermis y la dermis, proporcionando una fuerte barrera mecánica contra los patógenos [7,9].

B. Dermis: Es una capa gruesa, entre 2 a 4 mm, compuesta por fibras y tejido elástico que proporcionan soporte estructural y nutricional a la piel. Tiene dos capas: una superficial delgada, dermis papilar, que se encuentra debajo de la unión dermoepidérmica y contiene fibras de colágena sueltas, y una profunda y gruesa, dermis reticular, que está formada por una red más gruesas de colágena que corren paralelas a la superficie de la piel. La dermis contiene células estromales como fibroblastos, fibrocitos y células estructurales de la sangre y vasos linfáticos. Además, presenta muchas poblaciones diferentes de células inmunes mieloides y linfoides, nervios y melanocitos, que derivan de la cresta neural que residen o atraviesan la dermis, embebidos en un gel de mucopolisacárido unidos por colágena y fibras elastina. Las fibras de colágena constituyen el 70% de la dermis, dándole resistencia y tenacidad, mientras que la elastina

mantiene la elasticidad y flexibilidad normales y los proteoglicanos proporcionan viscosidad e hidratación. Esta matriz extracelular de la dermis se degrada constantemente por enzimas proteolíticas llamadas metaloproteinasas de matriz (MMP) y se reemplaza por nuevos componentes de la matriz. Las MMP son un grupo de proteinasas extracelulares dependientes de zinc que remodelan la matriz extracelular, producidas principalmente por queratinocitos, fibroblastos, neutrófilos y mastocitos. Hay tres grupos predominantes: colagenasas, gelatinasas y estromelisininas que están reguladas por los inhibidores tisulares de las MMP (TIMP). El equilibrio entre MMP y TIMP es importante en el mantenimiento de la estructura de la matriz dérmica [9].

C. Hipodermis: Sirve como reserva de energía, protege la piel y permite la movilidad al deslizarse sobre las estructuras subyacentes. La hipodermis está formada principalmente por adipocitos, que se organizan en lóbulos definidos por el tejido conectivo fibroso a manera de tabiques. Los nervios, la sangre y los vasos linfáticos se encuentran dentro de los tabiques [9].

D. Anexos cutáneos:

Glándulas sudoríparas: apocrinas y ecrinas: Las glándulas apocrinas se encuentran principalmente en el área periumbilical, areola, axilas, monte del pubis, labios, escroto, prepucio, región perianal, borde libre de los párpados (glándula de Moll) y el canal auditivo (glándula ceruminosa). Mientras que las glándulas ecrinas se encuentran en toda la superficie del cuerpo y la única variación entre las diferentes ubicaciones es su densidad, que varía de 100 a 600/cm² siendo el anexo más abundante en la piel. Además de producir sudor también tiene la función de termorregulación y rudimentaria odorífera (atrayente sexual) [8].

Folículos pilosos y glándulas sebáceas: Los folículos pilosos son estructuras derivadas de la epidermis como un brote epitelial de proyección hacia abajo. Se distribuyen por todo el cuerpo, excepto en palmas y plantas. Mientras que, las glándulas sebáceas y el músculo piloerector se encuentran junto con las glándulas apocrinas, como las axilas [8].

Uñas: La placa de la uña es una estructura delgada (0.25 a 0.6 mm para las uñas de las manos y hasta 1.3 mm para las uñas de los pies). Es dura, aunque ligeramente elástica; es translúcida; tiene una forma convexa; y comprende aproximadamente 25 capas de células muertas, queratinizadas y aplanadas. Es el producto permanente del epitelio germinativo de la matriz de uñas, que tiene un proceso de queratinización que ocurre sin la formación de una capa granular. Las fibras de queratina se mantienen unidas por proteínas globulares ricas en cisteína, cuyos enlaces disulfuro las unen [8].

1.1.2 Proceso de cicatrización

Las lesiones que sufre la piel o heridas requieren un correcto proceso de cicatrización, el cual comprende muchos procesos a nivel celular, de los cuales algunos siguen siendo desconocidos, pero la respuesta inmediata a una lesión es la vasoconstricción, que es causada por las prostaglandinas y los tromboxanos; seguido de:

A. Fase de inflamación (3 a 6 días): Inicia con la exposición del colágeno a las plaquetas, las cuales, mediante mediadores como fibronectina, serotonina, etc. provocan una desgranulación de estas y la activación de la cascada de la coagulación y esto provoca la movilización de células inflamatorias al sitio de la lesión. Las primeras células en responder son los neutrófilos, estos penetran en la herida y comienzan a limpiar las bacterias invasoras y tejido no viable, mediante enzimas proteolíticas. Luego migran los monocitos que se convierten en macrófagos activados, que juegan un rol en la fagocitosis, pero también producen factores de crecimiento que permiten la transición a la fase de proliferación.

B. Fase de proliferación (4 a 14 días): La epitelización depende de la proliferación y migración de células epiteliales desde los bordes de la herida y de cualquier remanente de los anexos de la piel (folículos vellosos, glándulas sebáceas y sudoríparas). La estimulación se da por el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y los factores de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α y TGF- β). La angiogénesis, estimulada por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), está marcada por la migración de las células endoteliales y la formación de capilares. La granulación, requiere nutrientes que son

llevados por los capilares, así como también son el camino para la migración de los fibroblastos al sitio lesionado para sintetizar colágena desorganizada y a proliferar.

C. Fase de remodelación (día 8 hasta 1 año): Ocurre el depósito de colágena en una red organizada y su síntesis dura aproximadamente de 4 a 5 semanas, pero el volumen aumenta a un año de la lesión [10].

1.1.3 Apósitos para heridas

Para promover el proceso de cicatrización a nivel hospitalario se utilizan apósitos que se clasifican según su función en la herida en:

A. Pasivos (solo proporcionan cobertura como las gasas, películas de poliuretano)

B. Activos (capaces de modificar la fisiología del entorno de la herida como apósitos antimicrobianos) [10].

Condiciones ideales que debe cumplir un material cicatrizante: Mantener un ambiente húmedo fisiológico que favorezca la granulación, crear una barrera que aisle la herida y la proteja de la contaminación, mantener un ambiente térmico fisiológico, permitir el intercambio gaseoso, adecuada circulación sanguínea, facilitar la eliminación de exudado y ser capaz de absorberlo, que sea adaptable, flexible, de fácil manipulación y bajo costo, que se encuentre libre de tóxicos, con un adhesivo que no lesione la piel circundante, permitir su retiro y cambio sin provocar dolor o traumatismo, que permita valorar la evolución de la lesión sin retirarlo, que no libere mal olor ni que manche la piel ni la herida [10].

1.1.4 Minerales de arcilla en la industria farmacéutica

Desde la antigüedad, egipcios y griegos han descrito el uso de arcillas en cosméticos y medicamentos. Actualmente, en la industria farmacéutica estos materiales se aplican en productos gastrointestinales y protectores solares. El término minerales de arcilla se refiere a los minerales específicos con moléculas de filosilicato (silicato en capas) que brindan cualidades plásticas a las arcillas. Sus propiedades se ven afectadas directamente por su estructura, lo que influye en la aplicación de cada una de ellas. Su

forma de partícula es plana y presentan capas tetragonales y octagonales en relación 1:1 y 2:1, como lo describe la Figura 3, unidas por átomos de oxígeno, donde las primeras presentan carácter hidrofóbico y carga neutra (ejemplo caolín), mientras que las segundas presentan facilidad para hincharse por su afinidad hidrofílica y tienen una carga mayormente negativa, ejemplo: laponita, mineral que se utilizó en el presente proyecto de investigación [11].

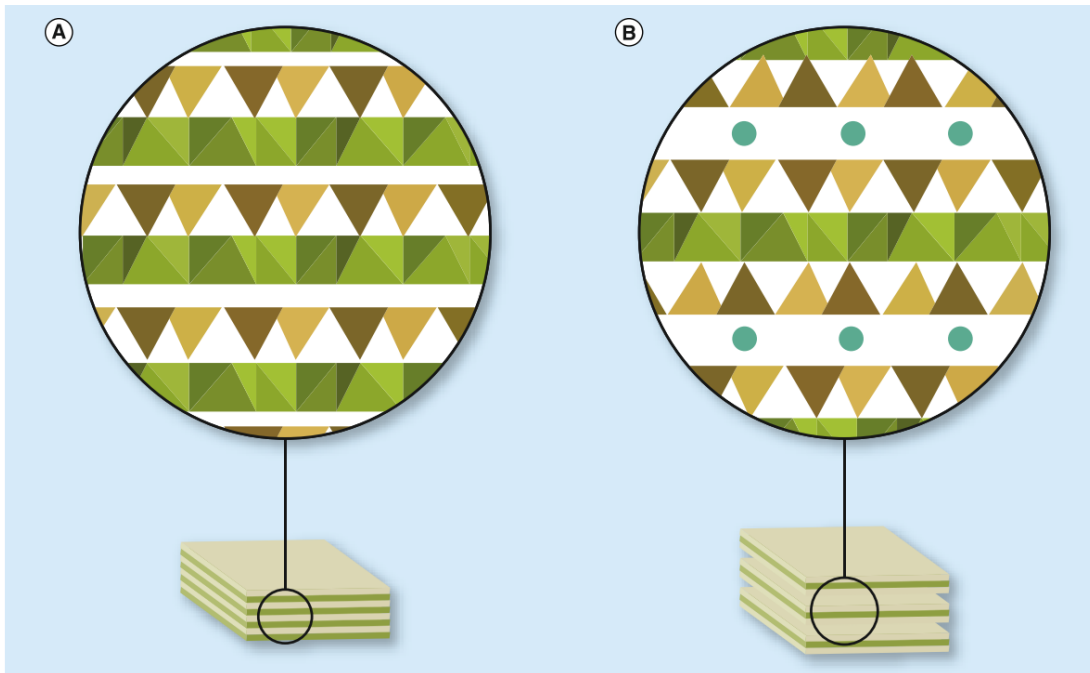


Figura 3. Disposición de las capas tetragonales ortogonales en minerales de arcilla: a. 1:1 y b. 2:1 [11].

1.1.4.1 Laponita

Resulta interesante para la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos por su degradación en medio fisiológico, lo que resulta en la liberación de productos como: Si(OH)_4 , Na^+ , Mg^{2+} y Li^+ . El ácido ortosilícico (Si(OH)_4), aumenta la síntesis de colágeno tipo I en células de osteosarcoma humano (MG-63), células primarias parecidas a osteoblastos derivadas de células estromales de médula ósea humana y células osteoblásticas tempranas humanas inmortalizadas. También aumentó significativamente la expresión génica de la fosfatasa alcalina y la osteocalcina mejorando los síntomas de esta enfermedad. El magnesio, por otro lado, es un elemento extremadamente importante en el cuerpo humano. No solo participa en la estabilización de todos los compuestos de

polifosfato en las células (trifosfato de adenosina, ATP), sino que también es necesario para numerosas funciones celulares, incluida la actividad enzimática, la acción del canal iónico, vías metabólicas y procesos de señalización. El sodio interfiere con la generación de impulsos nerviosos y también desempeña un papel en el mantenimiento del equilibrio de electrolitos y líquidos. Y finalmente el litio, se sabe que afecta el comportamiento de las neuronas, varias enzimas y vías de señalización [12]. A pesar que esta partícula presenta diferentes tipos (XLG, RD, EP, entre otras) para simplificar su estudio todas obedecen la fórmula empírica $\text{Na}^{+0.7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3})\text{O}_{20}(\text{OH})_4]^{-0.7}$, en la Figura 4 se describe la disposición interna de los cationes y demás grupos que forman la partícula.

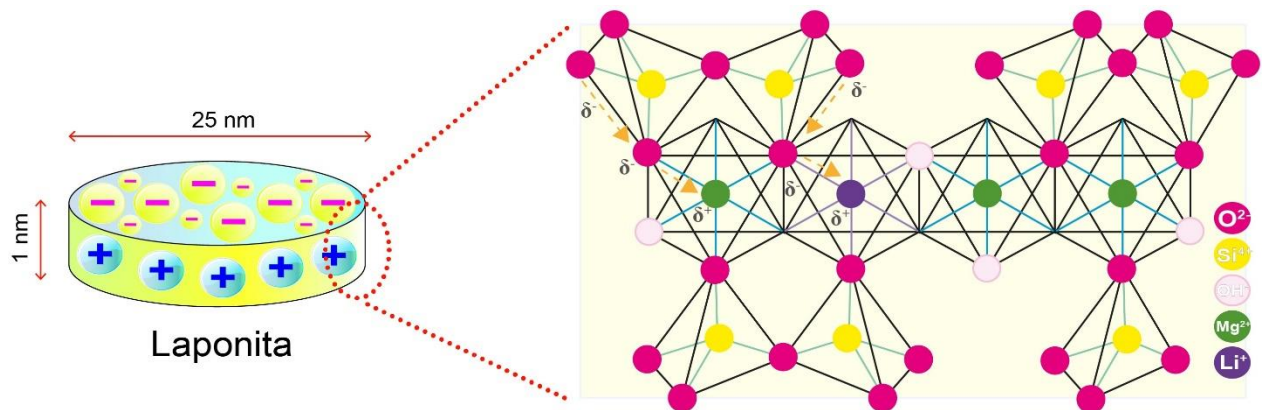


Figura 4. Laponita: Esquema de la disposición de atómica.

Los geles de esta arcilla han sido utilizados anteriormente para apósitos para heridas y administración de medicamentos para transportar aminoácidos como arginina, lisina, y leucina a las heridas, promoviendo la proliferación de fibroblastos de la piel humana [13]. Ghadiri y colaboradores describen que el nanocompuesto laponita/alginato/mafenida desarrollado y estudiado de manera *in vitro* a más de su actividad antibacteriana, el material tiene la capacidad de absorber el exudado de las heridas donde fue administrado, debido a la propiedad de hinchamiento de la arcilla, además los iones Mg^{2+} en su estructura química ayudaron a reducir la citotoxicidad de la mafenida en fibroblastos celulares que son los encargados de la síntesis de colágena en la fase de proliferación del proceso de cicatrización de la piel [14]. Su forma cristalina es un disco de 25 nm de diámetro y 0.92 nm de profundidad, presenta una carga negativa en su cuerpo y en los bordes es débilmente positiva debido a los iones sodio de su estructura molécula (Figura 4). Al dispersarla, las atracciones electrostáticas atraen los iones sodio hacia la superficie

de su cuerpo, pero la presión osmótica del agua los aleja. Se establece un equilibrio donde los iones sodio se mantienen en una región difusa a ambos lados del cristal (doble capa eléctrica). Además, cuando se acercan dos partículas, sus cargas positivas mutuas se repelen entre sí y la dispersión presenta baja viscosidad. La adición de compuestos polares a la dispersión reducirá la presión osmótica que mantiene los iones de sodio alejados de la superficie de la partícula. Esto hace que la doble capa eléctrica se contraiga y permita que la carga positiva más débil en el borde de los discos de arcilla interactúe con las superficies negativas de los discos adyacentes. El proceso puede continuar dando una estructura de “castillo de naipes” provocando un gel altamente tixotrópico, como se muestra en la Figura 5 [15]. Golafshan aprovechó esta propiedad del mineral para desarrollar su material, en conjunto con PVA y Alginato como polímeros, llamando a este fenómeno como un entrecruzamiento físico que depende de la concentración de laponita y así mismo puede afectar drásticamente las propiedades mecánicas del producto final [16].

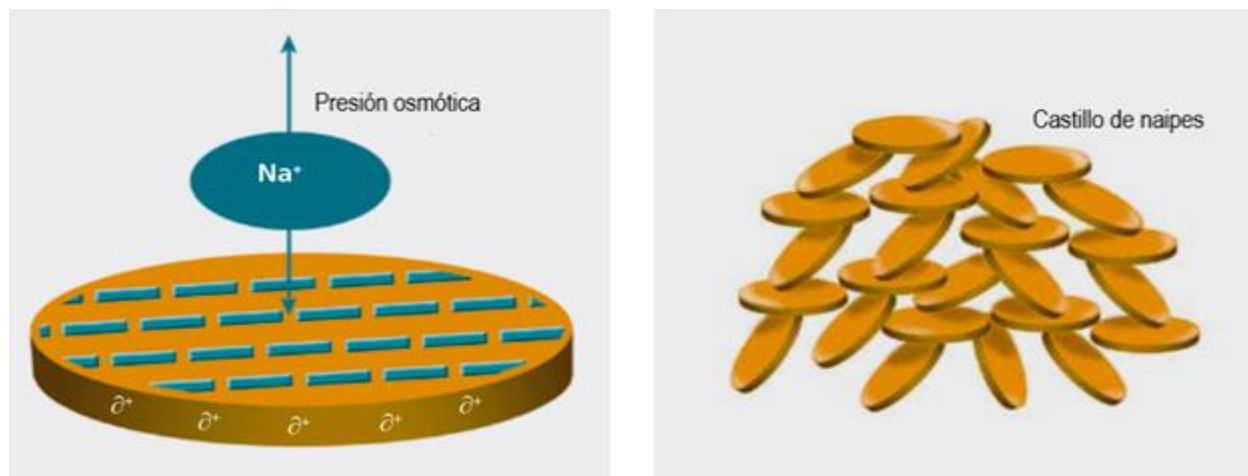


Figura 5. Laponita: conformación castillo de naipes [15].

Así también, Teng et al. (2022) y Rajabi et al. (2020) desarrollaron hidrogeles híbridos con gelatina y laponita para evaluar su hemocompatibilidad. Estos materiales describieron una buena compatibilidad y demostraron una actividad hemostática donde la carga negativa de la arcilla atraía componentes de la sangre y aceleraba el proceso de coagulación [17,18]. Otro aspecto para destacar de este mineral es su capacidad de intercambio iónico, por las diferentes cargas que presenta en su estructura, permite que

el fármaco quede adherido en su estructura mediante fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o electrostáticas y luego al estar expuesta a un medio rico en iones (herida) vuelva a ocurrir un intercambio liberando al principio activo [11].

En este proyecto de investigación se busca desarrollar un apósito innovador que tenga, no solo la capacidad de mimetizar las propiedades fisicoquímicas de la piel y protegerla del medio circundante, sino que también permita la liberación de principios activos para cambiar el entorno de la herida y acelerar su proceso de cicatrización. Es por lo que vemos necesario conocer las propiedades fisicoquímicas de los activos a usar, el proceso de permeación de los activos a través de la piel y el mecanismo de formación de las películas *in situ* que se explicaran en los siguientes párrafos.

1.1.5 Maltodextrina (M) y Ascorbato de sodio (AS)

En estudios clínicos la aplicación tópica de maltodextrina:ácido ascórbico en heridas y úlceras ha demostrado ser una cubierta protectora para la invasión de microorganismos, también promueven la estabilidad de humedad del medio para la granulación del tejido y además tienen actividad bacteriostática por la reducción de pH. Debido al metabolismo gradual, la maltodextrina puede liberar glucosa al medio profundo de la herida, brindando nutrición tópica al tejido. En estudios *in vitro* esta azúcar demostró un efecto quimiotáctico sobre leucocitos polimorfonucleares favoreciendo la cicatrización.

El mecanismo de acción de la maltodextrina:ácido ascórbico que acelera el proceso de cicatrización se debe a que actúan a nivel de los fibroblastos en conjunto con los factores de crecimiento transformante (TGF) expresando rápidamente un espectro amplio de enzimas relacionadas con el recambio de colágena (colagenasas y gelatinasas), acelerando la fase de proliferación [19].

Propiedades fisicoquímicas de los fármacos del proyecto

En la Tabla 1, se enlistan las propiedades fisicoquímicas de M y AS:

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de maltodextrina y ascorbato de sodio.

Propiedades	Principio activo	
	Maltodextrina (M)	Ascorbato de sodio (AS)
Masa molecular	1250 g/mol DE:19 [20]	176.12 g/mol [21]
Formula química	$(C_6H_{10}O_5)_nH_2O$ [22]	$C_6H_8O_6$ [21]
Solubilidad	Soluble en agua > 85 °C	Libremente soluble en agua 245 mg/mL [21]
Punto de fusión	181°C [23]	191°C [21]
LogP	-	-1.85 [21]
Clasificación biofarmaceutica	-	Clase 1 [21]
Humedad	7 al 11 % [24]	0.12 % **
pKa	3.0 [25]	4.7 [21]

DE: Equivalencia de dextrosas, ** calculado en el laboratorio ver ANEXO 1.

En la Figura 6 se puede observar la estructura molecular de M y AS:

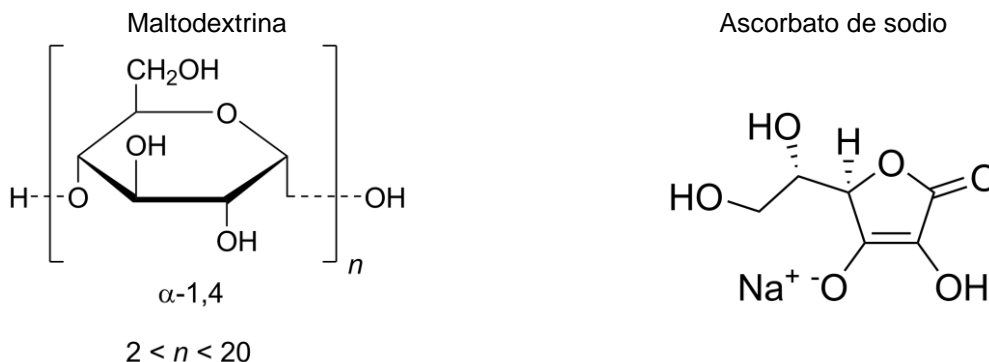


Figura 6. Estructura molecular M y AS.

1.1.4.2 Propiedades farmacocinéticas del ascorbato de sodio.

En la Tabla 2, se enlistan las propiedades farmacocinéticas del ascorbato de sodio:

Tabla 2. Propiedades farmacocinéticas del ascorbato de sodio [26].

Biodisponibilidad oral	70-90 %
Afinidad a proteínas	25 %
Tiempo de vida media ($t_{1/2}$)	16 días
Vía de eliminación	Mayormente biliar

Actualmente no existe una forma farmacéutica para el tratamiento o dosificación de estos activos (M y AS) reportada en la Farmacopea Mexicana ni en la USP (Farmacopea de los Estados Unidos) a nivel dérmico o como apósitos activos para heridas [27].

1.1.4.3 Efectos adversos del ascorbato de sodio

Los efectos adversos del fármaco se describen en la Tabla 3.

Cambios en funciones renales	Uricosuria y disminución de ácido úrico en plasma, lo que puede producir artritis [28]
------------------------------	--

1.1.6 Permeación de la piel

El proceso de permeación implica una serie de procesos que comienzan con la liberación del fármaco de la forma de dosificación, seguido de su difusión hacia y a través del estrato córneo, luego se reparte al ambiente epidérmico acuoso y la difusión a tejidos más profundos o la absorción en la circulación cutánea (Figura 7).

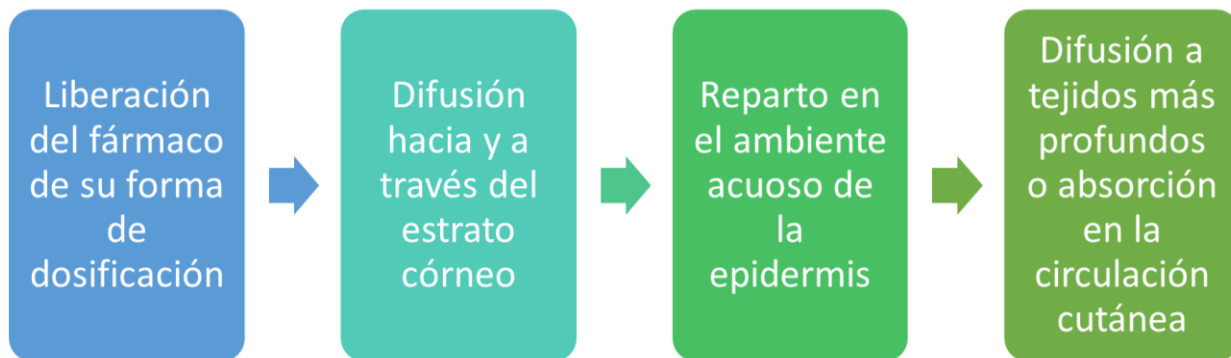


Figura 7. Proceso de permeación de fármacos a través de la piel.

Estos procesos dependen en gran medida de la solubilidad y la difusividad del fármaco dentro de cada entorno. La liberación del fármaco del vehículo de la forma de dosificación y la absorción en el estrato córneo depende de la solubilidad relativa en cada entorno y, por lo tanto, del coeficiente de partición del estrato córneo-vehículo. El coeficiente de difusión o flujo a la que el fármaco se mueve dentro de cada entorno depende de sus propiedades como: tamaño molecular, solubilidad y punto de fusión, ionización y potencial de unión dentro del entorno, y factores relacionados con el entorno, como su viscosidad y tortuosidad o longitud de la ruta de difusión. La permeación de una dosis infinita de una molécula aplicada en la superficie de la piel en un experimento *in vitro* en condiciones sink puede ser medida a través del tiempo en una gráfica de la cantidad acumulada del

penetrante contra el tiempo. La permeación en un estado estacionario o flujo (J) se puede seguir de una manera simplificada con base en la ley de difusión de Fick (Ecuación 1):

$$J = \frac{dQ}{dt} = \frac{DP C_V}{h}$$

Ecuación 1. Ley de Fick.

Donde Q es la cantidad de penetrante por unidad de área, D es el coeficiente de difusión del penetrante en la piel, P es el coeficiente de partición entre el estrato córneo y el vehículo, C_V es la concentración de penetrante aplicada y la h es la altura del camino de difusión [17-18]. El coeficiente de permeabilidad, K_p , es definido por la siguiente ecuación [31]:

$$K_p = \frac{DP}{h} \therefore J = K_p C_V$$

Ecuación 2. Coeficiente de permeabilidad, K_p .

Cuando se extrapola la línea del estado estacionario al eje del tiempo ($Q = 0$), se obtiene el valor de tiempo de latencia, t_L descrito en la [32].

$$t_L = \frac{h^2}{6D}$$

Ecuación 3. Tiempo de latencia, t_L .

1.1.6.1 Vías de permeación a través de la piel

Un penetrante aplicado a la superficie de la piel tiene 2 vías potenciales para permear la epidermis: a través de los anexos cutáneos (conductos del sudor, de los folículos pilosos y las glándulas sebáceas asociadas) y a través del estrato córneo continuo, que puede ser intra e intercelular como se muestra en la Figura 8. Estas vías no son mutuamente excluyentes, ya que la mayoría de los compuestos posiblemente permear la piel mediante una combinación de vías y la contribución relativa de cada una de ellas está relacionada con las propiedades fisicoquímicas de la molécula penetrante [29].

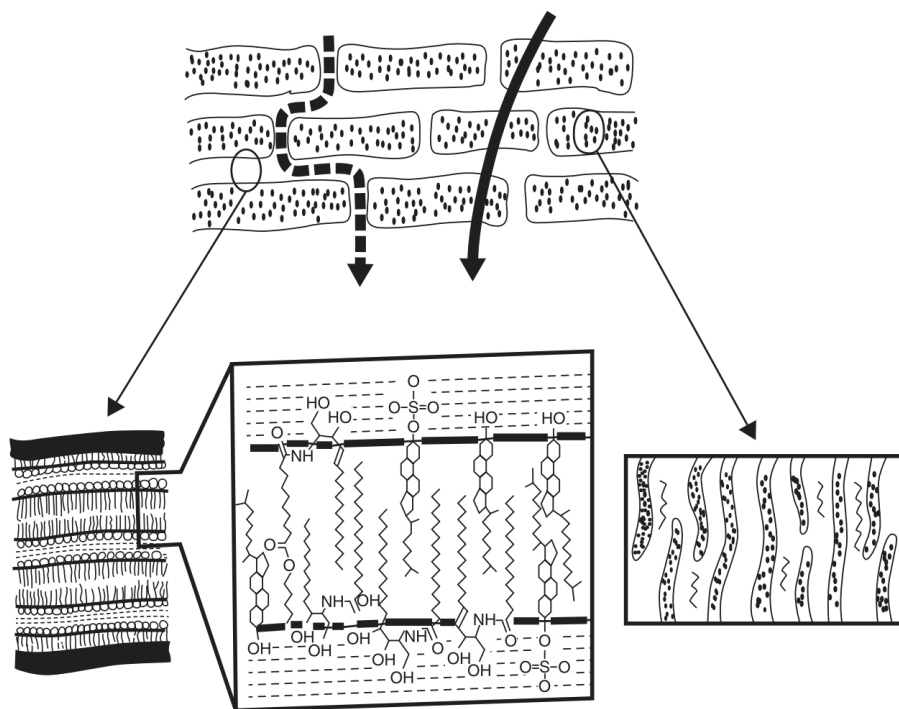


Figura 8. Permeación a través del estrato córneo [29].

1.1.7 Películas de formación *in situ*

Los sistemas llamados películas de formación *in situ* representan una alternativa a los preparados tópicos convencionales, especialmente soluciones, emulsiones, geles, cremas, pero también a los apósitos medicinales. Estos preparados se describen como una forma farmacéutica no sólida que produce una película *in situ*, es decir, después de su aplicación sobre la piel. Estos sistemas están compuestos por una sustancia activa e ingredientes formadores de película difundidos en un vehículo, que se evapora o se absorbe rápidamente en el estrato córneo, dejando una película adhesiva de excipientes junto con el fármaco. Además del hecho de que superan algunos de los inconvenientes de los productos tópicos convencionales, como la oclusión de los conductos sudoríparos y la eliminación dolorosa (parches) o la facilidad de limpieza, lo que conduce a niveles subterapéuticos de fármacos (cremas, ungüentos, geles), también pueden actuar como un reservorio de fármaco, reduciendo la frecuencia de las aplicaciones necesarias y mejorando así el cumplimiento del paciente. Además, su aspecto cosmético pueden resultar más atractivos que los de los semisólidos al ser de secado rápido, menos grasosos y más discretos gracias a su transparencia [33].

1.1.7.1 Proceso de formación de películas *in situ*

Los sistemas formadores de películas *in situ* son aplicados directamente en la piel y forman películas delgadas, translúcidas por la evaporación del vehículo, como se indica en la Figura 9. A medida que la evaporación del solvente inicia, las partículas de polímero o los sólidos empiezan a coalescer al mismo tiempo para dar origen a la forma sólida. Se debe tener en cuenta que si la evaporación o la coalescencia no ocurren de manera conjunta se puede obtener aglomerados de sólidos a manera de erosión [34].

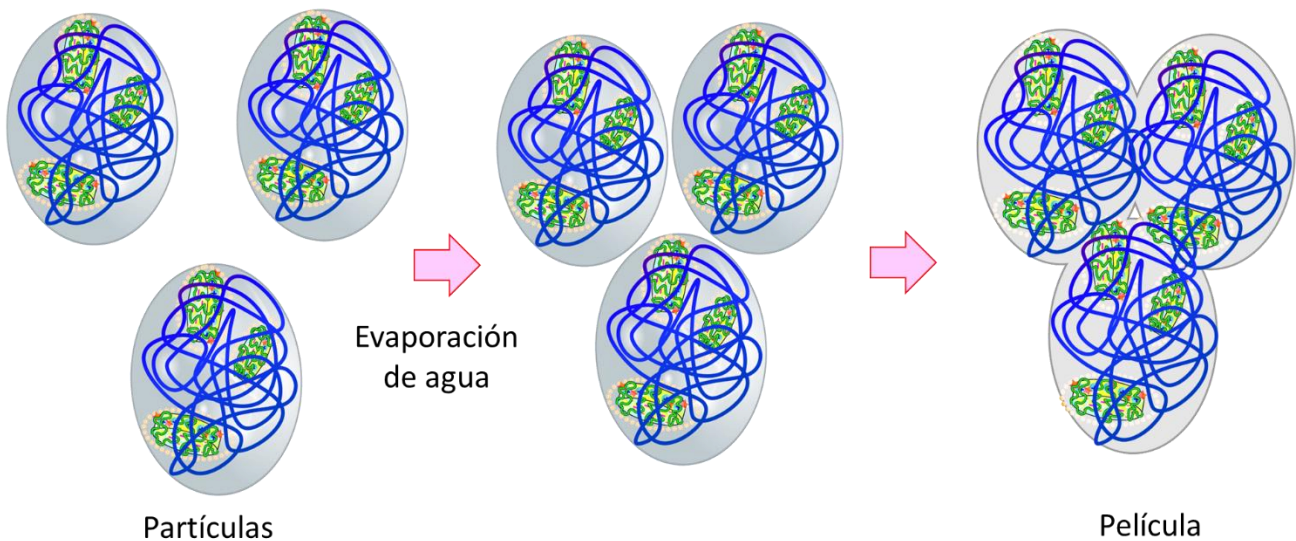


Figura 9. Mecanismo de formación de película *in situ*.

1.1.7.2 Compósitos

Los compósitos son materiales diseñados a partir de dos o más componentes, cada uno de los cuales ofrece propiedades físicas diferentes, que pueden combinarse de forma sinérgica. De este modo, las propiedades y arquitecturas de los materiales biológicos pueden reflejarse con mayor precisión mediante la adaptación [35]. En el caso de la presente investigación se combinó las propiedades entrecruzantes de la arcilla laponita con partículas coloidales para poder desarrollar sistemas formadores de películas *in situ*, como se observa en la Figura 10.

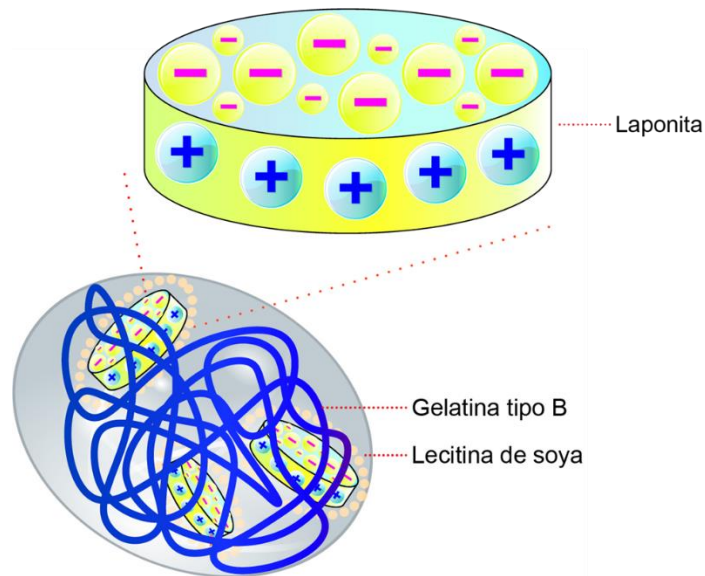


Figura 10. Esquema compuesto LGL.

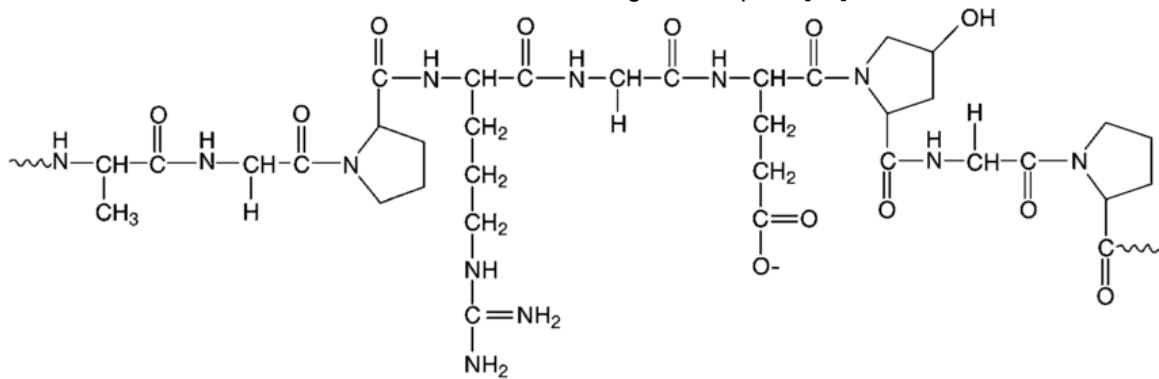
1.1.8 Macromoléculas biodegradables

En el grupo de las macromoléculas se encuentran las proteínas, carbohidratos y fosfolípidos, que están dentro del concepto de polímeros al estar conformadas por péptidos, por su elevada biocompatibilidad con el organismo son preferidos por investigadores para el desarrollo de sistemas de liberación de fármacos. En el presente proyecto de investigación se trabajó con gelatina tipo B y lecitina de soya, macromoléculas de origen natural pertenecientes a los tipos proteína y fosfolípidos, respectivamente.

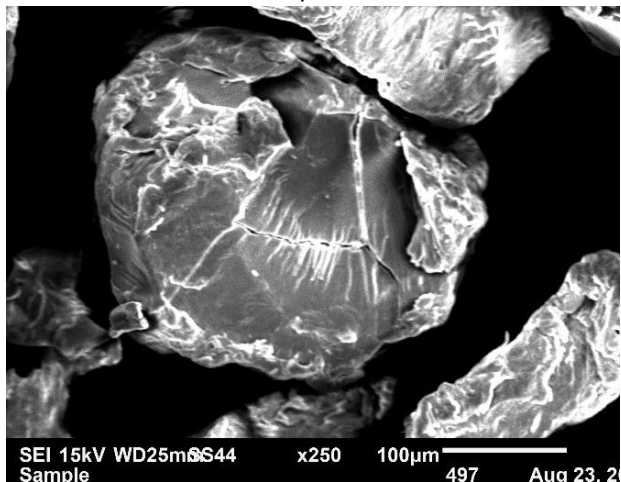
1.1.8.1 Gelatina tipo B

Es una proteína obtenida de la degradación hidrolítica de la colágena [36]. Su estructura molecular presenta aminoácidos: glicina, prolina y alanina, Figura 11, mostrando una estructura de triple hélice [37]. La materia prima fue observada en el microscopio electrónico de barrido a 250X y 2500X, como se muestra en la misma figura, describiendo una forma completamente amorfa y una red de microfibras en su superficie [36].

Estructura molecular de la gelatina tipo B [38].



Gelatina tipo B 250X.



Gelatina tipo B 2500X.

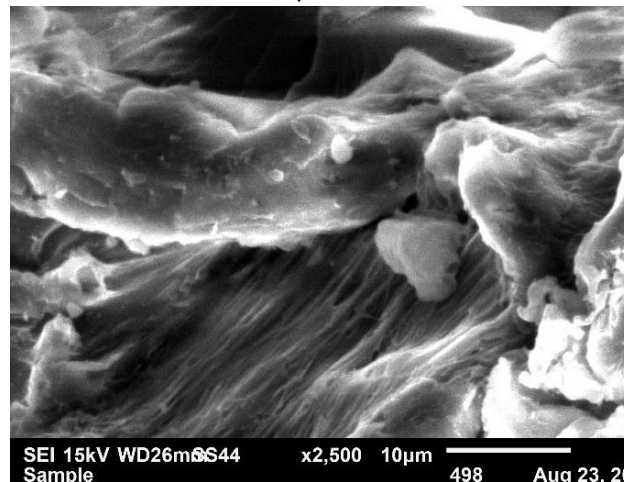


Figura 11. Estructura e imágenes de microscopía electrónica de la gelatina.

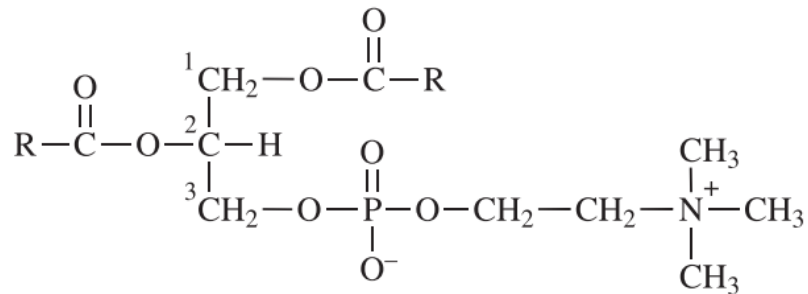
Existen 2 tipos: A y B, se diferencian por su punto isoeléctrico (pI), la primera es aproximadamente de 8 a 9 y la segunda de 4 a 5. Es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica y alimenticia por sus propiedades de recubrimiento, estabilización coloidal, biodegradable, micro y nanoencapsulamiento, abundancia y bajo costo. Su solubilidad en agua es a temperaturas superiores a los 30 °C [39].

1.1.8.2 Lecitina de soya

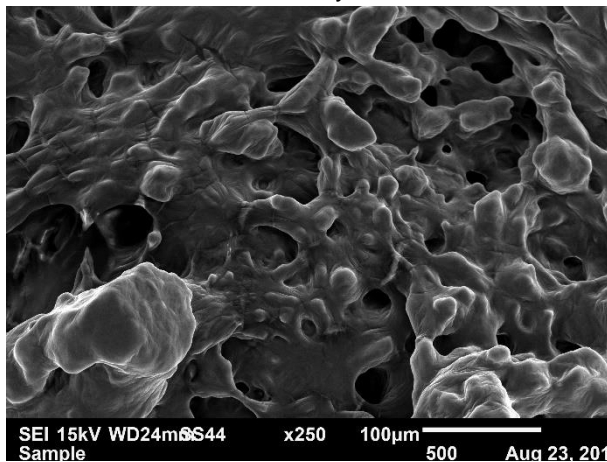
No se refiere a un compuesto en particular, sino que es una mezcla de fosfolípidos, su estructura molecular principal es un glicerol esterificado con 2 ácidos grasos y un grupo fosfato enlazado a un grupo colina como se observa en la Figura 12 [40]. Al observar la materia prima con la ayuda del microscopio electrónico de barrido a 250X y 2500X se

confirmó su forma amorfa y su distribución en agrupaciones a manera de islas, Figura 12 [41].

Estructura molecular principal de la lecitina de soya [40].



Lecitina de soya 250X.



Lecitina de soya 2500X.

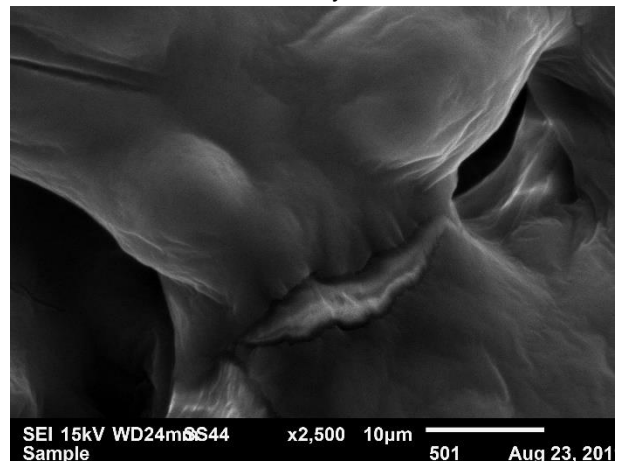


Figura 12. Estructura e imágenes de microscopía electrónica de la lecitina de soya.

Es aplicada como emulsificante y surfactante en la industria alimenticia, farmacéutica, cosmética y biotecnológica, además, es utilizado en sistemas de liberación de fármacos por su baja toxicidad, alto encapsulamiento de fármacos, capacidad de incluir fármacos lipofílicos e hidrofílicos, focalización de fármacos, liberación controlada (rápida o sostenida), y propiedades oclusivas [42].

1.1.9 Caracterización de sistemas coloidales

En el presente trabajo de investigación para caracterizar los compósitos lecitina:gelatina:laponita en suspensión se utilizó la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) para obtener el tamaño de partícula, el índice de polidispersión o PDI por sus siglas en inglés “PolyDispersity Index” y el potencial Z. También se utilizó la microscopía electrónica de Transmisión (TEM por sus siglas en inglés) para confirmar el tamaño de

las nanopartículas, ya que ofrece información más detallada sobre la morfología de las partículas [43].

1.1.9.1 Dispersión dinámica de la luz (DLS)

Es una técnica no invasiva que ofrece mediciones *in situ* del tamaño, PDI y potencial zeta provenientes de un análisis estadístico. Para la cuantificación del tamaño y PDI se basa en la medición de la intensidad de la luz dispersa que percibe la superficie de un detector de ley de la inversa del cuadrado, proveniente de un haz de luz a un ángulo dado que irradia una dispersión de partículas. Esta dispersión es el resultado de la interferencia de las diferentes partículas del medio. En un instante dado, el ángulo de luz dispersa total depende de las posiciones de las partículas. Sin embargo, las partículas ejecutan constantemente el movimiento browniano y sus posiciones fluctúan. Por lo tanto, la intensidad de la luz dispersa también fluctúa. Estas fluctuaciones de intensidad ocurren en la escala de tiempo que toma una partícula para mover una fracción significativa de la longitud de onda de la luz. La cual en sí misma es una señal estocástica (teoría de Smoluchowski), ya que refleja el movimiento térmico (browniano) de las partículas. Para extraer información útil de la señal, el instrumento de análisis realiza una corrección con el tiempo y correlaciona de esta manera el tamaño y PDI de las partículas [44].

Por otro lado, el potencial Z tampoco puede ser medido directamente, pero se puede calcular utilizando modelos teóricos incidiendo fenómenos electrocinéticos o electroacústicos. En este caso se aplica un campo eléctrico a través de la dispersión. Las partículas dentro de la celda con un determinado potencial Z migrarán hacia el electrodo de carga opuesta con una rapidez proporcional a la magnitud del potencial Z. Posteriormente se incide luz donde ocurre un cambio de frecuencia o un cambio de fase del haz incidente causado por estas partículas en movimiento, este fenómeno permite medir la movilidad de las partículas, y esta movilidad se convierte en potencial Z utilizando la teoría de Smoluchowski [45].

1.1.9.2 Isotherma de Langmuir modificada y Freundlich para sistemas en dispersión

Esta metodología se aplicó para conocer: mecanismos de adsorción, acoplamiento y afinidad de las moléculas que se emplean en el experimento sobre laponita, que es el excipiente de mayor interés [46], iniciaremos explicando la isoterma modificada de Langmuir la cual se describe en la Ecuación 4 y se basa en la adsorción por monocapa:

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{q_{m\acute{a}x}} + \frac{1}{K_L q_{m\acute{a}x}} x \left[\frac{1}{C_e} \right]^X$$

Ecuación 4. Isotherma de Langmuir modificada para sistemas en solución.

Donde:

q: relación entre soluto adsorbido en mg y la cantidad de adsorbente en g en el equilibrio (Ecuación 5):

$$q = \frac{m_{soluta}}{m_{adsorbente}} = \frac{(C_{inicial} - C)xV}{m_{adsorbente}}$$

Ecuación 5. Obtención de q.

q_{máx}: máxima adsorción de soluto (mg) entre adsorbente (g).

C_e: concentración en equilibrio del soluto (ppm).

K_L: Constante de adsorción.

X: Factor de concentración.

La característica principal de la isoterma de Langmuir es que brinda una constante adimensional R , Ecuación 6, la cual indica el tipo de isoterma: no favorecida para valores mayores a 1, lineal cuando es igual 1, favorecida para valores entre 0 y 1, y finalmente cuando es igual a 0 es un proceso irreversible [47].

$$R = \frac{1}{1 + K_L C_{inicial}}$$

Ecuación 6. Constante R.

La isoterma de Freundlich está dada por la Ecuación 7:

$$\ln q = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e$$

Ecuación 7. Isoterma de Freundlich.

Esta ecuación a más de tener una constante empírica K_F , también tiene un factor $1/n$ que corresponde a un índice de no linealidad de la isoterma y es adimensional [48].

1.1.9.3 Reología de sistemas en dispersión

La reología es la ciencia de la deformación y el flujo. Es una rama de la física y la fisicoquímica ya que las variables más importantes provienen del campo de la mecánica: fuerzas, deflexiones y velocidades [49]. Esta ciencia se ha utilizado ampliamente en la evaluación de sistemas coloidales, incluidos procedimientos como escaneo de temperatura, escaneo de frecuencia, escaneo de deformación y recuperación de fluencia, principalmente para caracterizar y evaluar la viscoelasticidad [50]. Las posibilidades de información que nos brinda esta disciplina es muy amplia por lo que discutiremos cada prueba realizada en este proyecto de investigación en la sección de resultados.

1.1.9.4 Espectroscopía Infrarroja (FTIR)

La espectroscopia infrarroja es una técnica que utiliza luz infrarroja para recopilar información sobre moléculas mediante la absorción, emisión o reflexión de la radiación. al observar la absorción de longitudes de onda específicas de radiación que corresponden a vibraciones moleculares, la espectroscopia infrarroja se utiliza específicamente para identificar los grupos funcionales presentes en las moléculas. El área espectral infrarroja (IR) del espectro electromagnético cubre un rango de longitud de onda de 0.8 a 100 μm . Las regiones de infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR) e infrarrojo lejano (FIR) del espectro IR normalmente se separan en tres grupos con rangos de longitud de onda respectivos de 0.8 a 2.5 μm , 2.5 a 15 μm y 15 μm a 100 μm [51].

Las dos formas de espectroscopia IR: MIR y FIR, a menudo denominados por espectros de vibración molecular, contienen información importante sobre la muestra. Los espectros producidos en la espectroscopia MIR se basan en modos de vibración fundamentales que

están relacionados con grupos funcionales particulares que se encuentran en la muestra. Estos espectros se registran comúnmente entre 4000 y 400 cm^{-1} en número de onda. Por otro lado, la espectroscopía NIR, que cubre el rango de números de onda de 10000 a 4000 cm^{-1} , captura espectros debidos a sobretonos moleculares y vibraciones combinadas de los modos vibratorios fundamentales. La espectroscopía FTIR es una técnica muy eficaz para analizar los grupos funcionales y las interacciones moleculares de especies químicas dentro del analito. La composición de diferentes componentes químicos, incluidos algunos que podrían no ser fácilmente visibles utilizando métodos como la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS), se puede determinar observando las posiciones de las bandas de absorción en el espectro IR como números de onda. Debido a su adaptabilidad, la espectroscopia IR se puede utilizar para analizar una variedad de materiales y sus condiciones de manera cuantitativa y cualitativa. Este mayor uso de FTIR se ha atribuido al aumento de la demanda de análisis de alta resolución con una reducción en el costo del análisis con mayor sensibilidad [52].

1.1.9.5 Propiedades mecánicas de películas

Las propiedades mecánicas de las películas de biopolímeros con aplicación en el tratamiento de heridas que comúnmente se estudian son: resistencia a la tracción, alargamiento, deformabilidad y módulo elástico, por su extrema importancia, ya que estos materiales de recubrimiento deben tener una adecuada resistencia mecánica para proteger la integridad del área lesionada en el medio circundante, así como también simular su ambiente fisiológico [53].

Las propiedades mecánicas de las películas de biopolímero dependen tanto de su composición y de las condiciones ambientales. Por ejemplo, la incorporación de plastificantes aumenta la movilidad de las cadenas poliméricas, lo que conduce a un mayor alargamiento y una disminución de la resistencia a la tracción de las películas plastificadas. Mientras que la incorporación de otros aditivos, como lípidos o materiales entrecruzantes, pueden mejorar la resistencia y extensibilidad de la película, en caso de aumentar demasiado la concentración de estos excipientes se obtendrá materiales mayormente rígidos que llevan a su fácil fractura. La humedad del ambiente afecta la

mecánica de las películas, por ejemplo, los materiales hidrofílicos absorben la humedad más fácilmente a niveles de humedad más altos, aumentando el efecto plastificante del agua, que posteriormente reduce la resistencia a la tracción y aumenta su extensibilidad [54,55]. En la sección de resultados se describirán los fenómenos que afectaron a las propiedades mecánicas de los materiales desarrollado en esta investigación.

1.1.9.6 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

DSC, un método termoanalítico, mide el flujo de calor (cambio de entalpía) cuando un analito se somete a cambios de temperatura estrictamente controlados que inducen transiciones de fase. El termograma proporciona las propiedades del material analizado, como temperaturas en la transición vítrea (T_g), inicio de fusión, pico de fusión (T_m) y entalpía de fusión (ΔH), esta información es utilizada para calcular su cristalinidad. Estas mediciones pueden ser específicas de una sustancia en particular, confirmando la identidad de esta en una mezcla de polímeros o un compuesto multicapa. Además, el ΔH del termograma DSC es proporcional a la masa de polímero colocada en el portamuestra de DSC, lo que permite calcular porcentajes de mezcla en una muestra de plástico e incluso la fracción de masa de polímeros en muestras ambientales. Se recomienda que el rango de temperatura de estudio exceda la temperatura de fusión, pero no acercarse a la temperatura de descomposición. El termograma se discute para confirmar los resultados de FTIR, diferenciar variantes de polímeros, cuantificar el porcentaje de mezclas de polímeros y/o detectar polímeros adicionales no observados por FTIR [56–58].

1.1.9.7 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés Scanning Electron Microscopy) es una técnica de obtención de imágenes ampliamente utilizada en investigación de materiales debido a su alta resolución y capacidades de analizar características morfológicas, estructurales y químicas de las muestras bajo estudio, algunos dispositivos pueden tener una resolución de hasta 1 nm [59]. Su funcionamiento consiste en: generar un haz de electrones de alta energía (electrones primarios) y se usa

un sistema de lentes condensadores para focalizar el haz y hacerlo incidir sobre una muestra, la cual generará, a su vez, electrones secundarios, retrodispersados, rayos X y tal vez luz como respuesta al impacto electrónico, y dichos electrones que salen de la muestra son detectados y registrados para convertirse en una señal digital que se interpreta como intensidad de color, para construir una “imagen” aunque no se usen fotones. Los equipos trabajan en una atmósfera interna prácticamente inexistente (alto vacío) [60].

1.1.9.8 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

TEM es una técnica que implica transmitir un haz de electrones a través de una muestra delgada para formar una imagen. Proporciona imágenes de alta resolución de la microestructura y disposición atómica de los materiales. El TEM funciona a 200 kV y está equipado con una cámara de alta resolución para obtener imágenes de la estructura atómica de las muestras, que normalmente tiene menos de 200 nm de espesor. Los electrones interactúan con los átomos de la muestra y se dispersan o absorben, según la estructura atómica y la composición del material. Luego, un detector recoge los electrones dispersos y los utiliza para generar una imagen de la muestra. Las imágenes TEM pueden proporcionar información sobre la estructura atómica, la orientación cristalográfica y los defectos de la muestra, con una resolución de hasta la escala sub-Angstrom, por lo que es aplicada en materiales a nivel nanoescala [61].

1.1.9.9 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Es un método para obtener imágenes de la topografía de la superficie no afectada por el límite de resolución óptica. Esta técnica tiene la capacidad única para medir las fuerzas de interacción a nivel atómico. El principio básico del AFM es que un láser se enfoca en la parte posterior de un microcantiléver mediante un sistema óptico y la reflexión es recibida por un detector eléctrico. Cuando se escanea la muestra, el cantiléver se doblará y ondulará con la morfología de la superficie de la muestra debido a la interacción entre los átomos en la superficie de la muestra y los átomos de la sonda en un extremo del cantiléver, y el haz reflejado también se desplazará, por lo que la información sobre la

morfología de la superficie de la muestra bajo prueba se puede obtener detectando el cambio de la posición del haz. Para obtener la morfología de la superficie y las propiedades mecánicas de las muestras biológicas, los modos de trabajo más utilizados son el modo de contacto y la espectroscopia de fuerza. En el modo de contacto, la punta del AFM hace contacto constantemente con la superficie de la muestra. Es útil para obtener imágenes topográficas de alta resolución y obtener propiedades de materiales [62,63].

1.1.10 Métodos para cuantificar la liberación de fármacos

Los estudios de liberación para formulaciones dérmicas se pueden realizar por métodos *in vitro* o *in vivo*, los cuales permiten cuantificar la cantidad de fármaco que atraviesa el estrato córneo y en algunos determinar las constantes cinéticas del estudio [32]. Para el presente trabajo de investigación se utilizó el método *in vitro* Celdas de difusión de Franz.

Celdas de difusión de Franz: Representa, desde su desarrollo en 1975, el principal método utilizado para evaluar la penetración transepitelial de fármacos. La celda de difusión es un sistema compuesto por dos cámaras, una donante y otra receptora, separadas por piel o membrana artificial (Figura 13). El estrato córneo o membrana es orientado hacia la cámara donante a través de la cual se aplican los fármacos a estudiar. Las celdas de difusión son mantenidas a 32 - 37 °C. Aun cuando este método es considerado un sistema confiable de screening para evaluar la bioequivalencia/biodisponibilidad tiene varias limitaciones, por un lado, no toma en cuenta como variable de análisis a las rutas de eliminación de fármacos (sistema vascular y metabolismo en la dermis) y, por otro, no pondera las modificaciones fisiológicas de la piel (contenido de agua, pH cutáneo, descamación del estrato córneo, temperatura). Es importante remarcar que la piel una vez montada en celdas de Franz o sistemas similares permanece con un grado constante de hidratación durante todo el período del ensayo. Este factor podría afectar la bicapa lipídica o inducir la formación de vesículas extracelulares en el estrato. A pesar de sus desventajas este modelo *in vitro* es un buen indicador cualitativo de la penetración cutánea de fármacos [64].

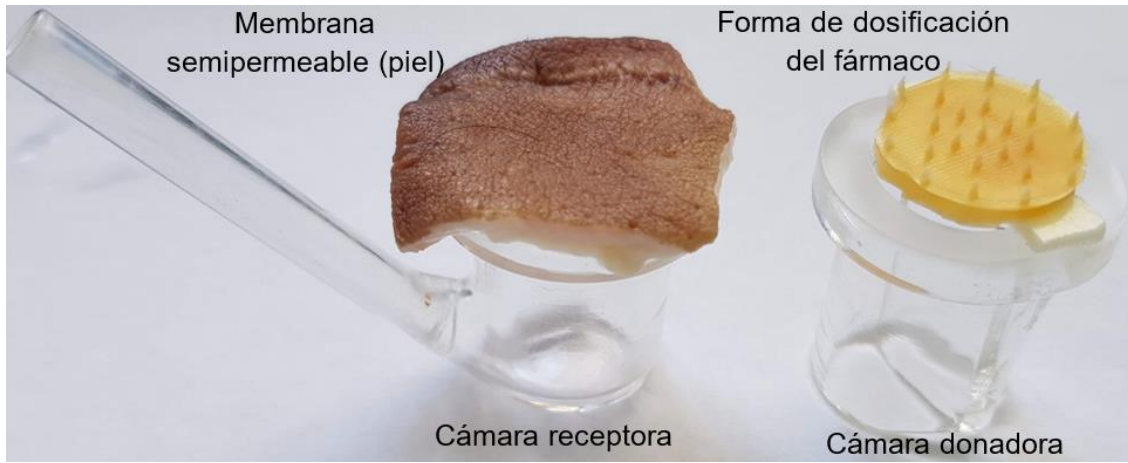


Figura 13. Celdas de difusión de Franz.

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, el tratamiento de heridas requiere la aplicación de uno o más apósitos para lograr un correcto proceso de cicatrización, su administración en muchos casos no puede ser realizada por el paciente mismo, sino que se necesita la atención del personal de salud, generando un costo a nivel hospitalario, adicional a ello, el material aplicado en la lesión queda expuesto al medio, lo que puede generar, por acciones involuntarias pérdida de la dosis y no se alcance el efecto terapéutico deseado o hasta incluso se genere una infección. Por lo anterior, es necesario el desarrollo de un compósito particulado innovador con la capacidad de formar películas *in situ* que en combinación con sus diversos estados y mecanismos de liberación de fármacos puedan acelerar el proceso de cicatrización. Siendo así, el compósito de laponita:macromoléculas un sistema biodegradable innovador de liberación de fármacos para acelerar la cicatrización de heridas.

HIPÓTESIS

El desarrollo de películas de formación *in situ* a partir de dispersiones coloidales particuladas de laponita, por sí sola vs. otras con la misma matriz arcilla:macromoléculas cargadas con maltodextrina y ascorbato de sodio, favorecerá el proceso de cicatrización de heridas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Diseñar, desarrollar y caracterizar dispersiones coloidales particuladas capaces de generar películas de formación *in situ* a partir de (1) lecitina:gelatina:laponita vs. (2) otras con la misma matriz macromoléculas:arcillas cargadas con maltodextrina y ascorbato de sodio y entender como esta forma farmacéutica innovadora interviene en el proceso de cicatrización de heridas.

Objetivos específicos

- Diseñar y desarrollar dispersiones coloidales particuladas capaces de generar películas de formación *in situ*, a partir de (1) lecitina:gelatina:laponita y (2) otras con la misma matriz macromoléculas:arcilla cargadas con maltodextrina y ascorbato de sodio, para favorecer el proceso de cicatrización.
- Caracterizar los sistemas coloidales previamente desarrollados mediante tamaño de partícula, PDI, potencial z, porcentaje de entrapamiento y la interacciones entre diferentes componentes con técnicas como: reología y microscopía electrónica de transmisión (TEM).
- Comparar y determinar las formulaciones óptimas y generar las películas de formación *in situ*.
- Caracterizar fisicoquímica las películas de formación *in situ* para favorecer la cicatrización mediante estudios mecánicos como: elasticidad, resistencia a tracción, bioadhesión, bioadhesión post humectación, y además microscopía electrónica de barrido, calorimetría diferencial de barrido (DSC), espectroscopía IR (FTIR), estudios de liberación y microscopía de fuerza atómica (AFM).
- Realizar los estudios *in vitro* de liberación de fármacos de las formulaciones optimizadas previamente para favorecer los procesos de cicatrización mediante celdas de Franz para su caracterización biofarmacéutica.
- Realizar los estudios *in vivo* de la administración de las formulaciones óptimas de la película de formación *in situ*.

- Definir cuál de las películas de formación *in situ* a partir de dispersiones coloidales partículas de lecitina:gelatina:laonita, por sí sola o en conjunto con maltodextrina y ascorbato de sodio, favorece los procesos de cicatrización de heridas.

METODOLOGÍA

5.1 Equipos, materiales y reactivos

5.1.1 Equipos

A continuación, en la Tabla 4 se muestran los equipos utilizados durante el desarrollo experimental del proyecto.

Tabla 4. Equipos utilizados en el desarrollo del proyecto.

Equipo	Marca	Modelo
Penetrómetro	Agrosta	I173XX
Ultraturrax	IKA	T18 digital
Micrómetro digital	CHE Scientific	CHESC05001
Texturómetro	TA Instruments	XT Plus
Espectrofotómetro UV-VIS	Ocean Optics Inc. Fuente de tungsteno DT-1000CE-BT SAD500 Ocean Optics Inc. Detector - interface.	S2000
Zetasizer	Malvern Instruments	Zen 3600
Balanza termogravimétrica	OHAUS	MB35 HALOGEN
Microscopio electrónico	JEOL	JSM-5900LV
Espectrofotómetro IR	PerkinElmer	UATR Two
Calorímetro Diferencial de Barrido	Mettler-Toledo	DSC1/700
Analizador termogravimétrico	PerkinElmer	TGA 4000
Reómetro	TA Instruments	Discovery HR3®
Espectrofotómetro de emisión atómica microonda de plasma	Agilent	4100
Espectrofotómetro de absorción atómica de flama	Varian	AA200
Microscopio electrónico de barrido	JEOL Inc.	JSM-5900
Microscopio electrónico de transmisión	JEOL Inc.	JEM-2010
Microscopio de fuerza atómica	PARK	NX10

5.1.2 Materiales

En la Tabla 5, se muestran los materiales utilizados durante la experimentación para el desarrollo y caracterización de los materiales formadores de películas.

Tabla 5. Materiales utilizados en el desarrollo del proyecto.

Material	Marca	Observación
Celdas de difusión tipo Franz de vidrio	-	-
Tubos eppendorf	Merck Milipore Ltd.	1.5 mL
Amicon Ultra 0.5 mL - Filtros de centrifuga	Merck Milipore Ltd.	Ultracel-10K

5.1.3 Reactivos

Los reactivos utilizados para el desarrollo y caracterización de las películas de formación *in situ* a partir de suspensiones coloidales de laponita se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 6. Reactivos utilizados en el desarrollo del proyecto.

Reactivo	Marca	Reactivo	Marca
Ascorbato de sodio (donación)*		Metanol	Fermont
Maltodextrina**	Sigma	Cloruro de potasio	Sigma
Gelatina de piel de bovino tipo B †	Sigma	Cloruro de sodio	Sigma
L- α -fosfotidilcolina de soya ††	Sigma	KH ₂ PO ₄	Sigma
Ácido clorhídrico	REASOL	Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Sigma
Hidróxido de sodio	MEYER	Glutaraldehído 25%	Merck KGaA
Acetona	J.T.Baker	Agua destilada	Milli-Q
Laponita EP (donación)‡	BYK	Laponita RD (donación)‡	BYK

Se realizó microscopía electrónica de barrido para el principio activo y polímeros de la formulación, observar en: *pág 6, **pág 23, †pág 24, ††pág 25.

5.2 Metodología

5.2.1 Interacción excipientes con laponita

Contenido de Na, Li y Mg en Laponita EP y RD

El contenido de Na, Li y Mg en laponita EP y RD se evaluó mediante 2 técnicas de espectrometría atómica: 1. MP-AES, Espectroscopía de Emisión Atómica de Plasma por Microondas (4100, Agilent), la metodología se describe en un procedimiento interno PT-USAII-FQ- EA-003, y 2. Flame-AA, Espectroscopia de Absorción Atómica de Llama (AA 220, Varian) el procedimiento interno: PT-USAII-FQ-EA-002. Las muestras se secaron en un horno microondas (MultiWave PRO, Anton Paar), utilizando HNO₃ súper puro. Para la calibración se utilizó un estándar certificado: HPS-QCS-27.

También se determinó la humedad de los excipientes y principios activos utilizados en el presente proyecto de investigación, para lo cual se empleó una balanza termogravimétrica MB35 Halogen, marca OHAUS.

Adsorción de lecitina sobre laponita RD y EP

Se preparó una dispersión madre en agua desionizada de laponita RD de concentración igual a ≈ 38 ppm, se mantuvo constante en todas las concentraciones de lecitina evaluadas. Para la lecitina de soya se preparó una dispersión madre de ≈ 2000 ppm. Se tomaron alícuotas desde 300 hasta 650 μL , todas fueron aforadas a 5 mL con la dispersión madre de la arcilla ($n=3$). Se agitó a 750 rpm por 2 h y se dejó en reposo por 24 h.

La cuantificación de lecitina se soya se realizó por espectroscopía UV-VIS a 255.92 nm, centrifugando 1.5 mL de cada muestra por 3 horas a 18500 rpm. Se tomó una alícuota de 500 μL y se llevó a 2 mL con agua desionizada. El método fue validado siguiendo la Guía de validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. [65], los resultados de la validación se exponen en la sección 10.3. ANEXO 3.

También se caracterizó cada dispersión por dispersión dinámica de la luz (DLS) para obtener tamaño, índice de polidispersión (PDI) y potencial Z, donde las muestras fueron evaluadas directamente. En la Tabla 7 se enlistan las concentraciones evaluadas y las respuestas a obtener.

Tabla 7. Adsorción de lecitina en laponita RD y EP: concentraciones y respuestas.

C_{inicial} ppm	C_e ppm	$C_{\text{adsorbida}}$ ppm	q mg/g	Langmuir		Freundlich		DLS		
				$1/C_e$ ppm^{-1}	$1/q$ g/mg	$\ln C_e$	$\ln q$	Tamaño nm	PDI	Potencial Z mV
120.6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
120.6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
120.6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
140.7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
140.7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
140.7	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
160.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
160.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
160.8	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

180.9	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
180.9	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
180.9	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
201.0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
201.0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
201.0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
241.2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
241.2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
241.2	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
261.3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
261.3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
261.3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Adsorción de Ascorbato de sodio sobre laponita EP

Se siguió la misma metodología anterior, para las alícuotas del soluto se inició en 150 hasta 650 μL y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 267 nm en un espectrofotómetro UV-VIS, el método fue validado, sección 10.1. ANEXO 1.

5.2.2 Preparación del compuesto particulado de laponita

Se prepararon 2 tipos de materiales formadores de películas: 1) LGL, con lecitina de soya, gelatina de piel de bovino tipo B y laponita EP, y 2) otro con la misma composición lípido/proteína/arcilla más Maltodextrina (M) y Ascorbato de Sodio (AS) al cual se le llamo LGL MAS. Se siguió la técnica de desolvatación de gelatina establecida por el investigador [66]. Se realizaron algunas modificaciones al proceso que se describe en la Figura 14.

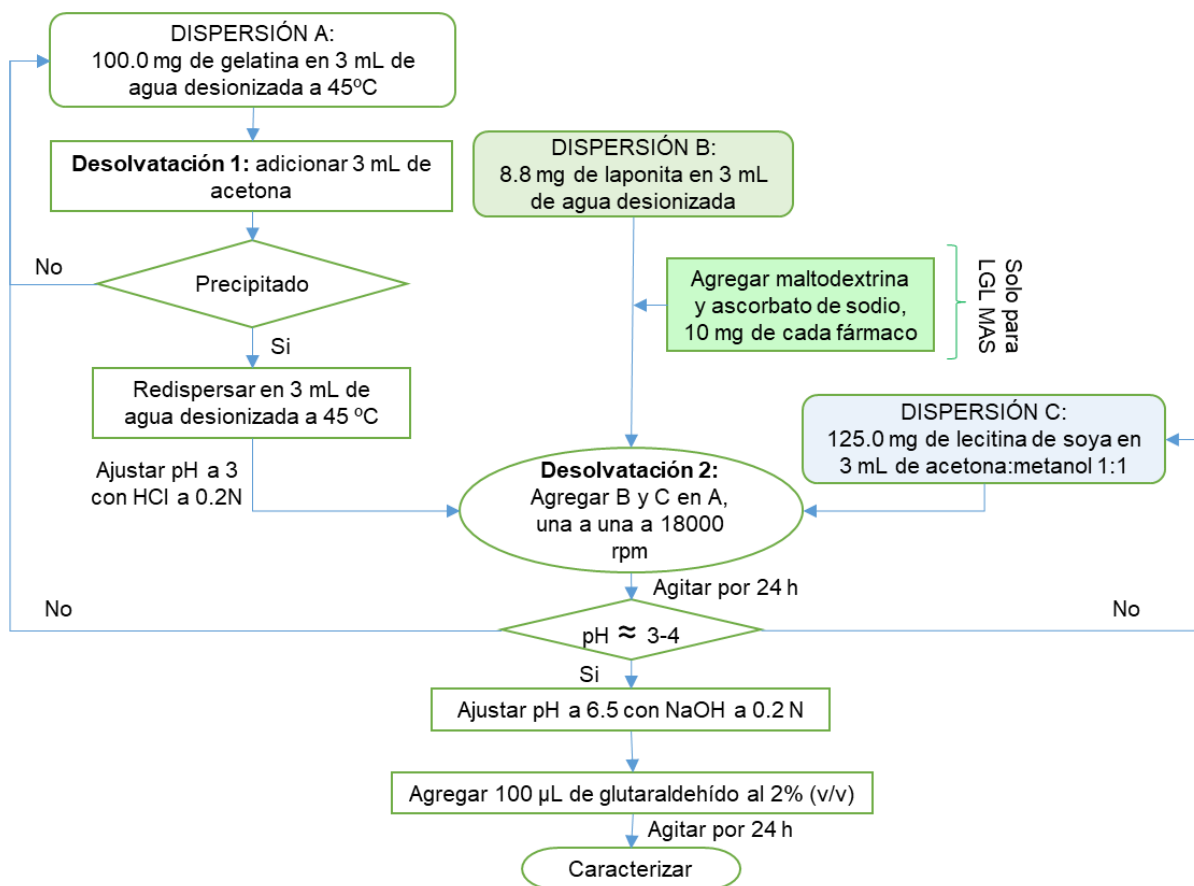


Figura 14. Esquema del proceso de preparación del compuesto particulado de laponita.

5.2.3 Caracterización del compuesto particulado de laponita

Determinación del tamaño de partícula, PDI y potencial Z

Las determinaciones se realizaron por la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) con un Zetasizer Zen 3600 (Malvern Instruments), fijando el ángulo de detección a 173° a $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. La solución de nanopartículas fue diluida (100 μL más 1 mL de agua desionizada) y se utilizó una celda desechable de vidrio de 1 cm. Para el potencial zeta se cambió la celda a una de doble capilar desechable manteniendo las mismas condiciones de ángulo y temperatura.

Porcentaje de encapsulamiento

Maltodextrina, método indirecto (técnica ácido sulfúrico-fenol [67]): Se agregaron 0.5 mL de la dispersión coloidal en un filtro Amicon Ultra 0.5 mL-Ultracel 10K dentro de

un tubo Eppendorf de 1.5 mL, posteriormente fue colocado en una centrífuga a 15000 rpm durante 20 minutos. Se tomó 50 µL del filtrado y se adicionó: 50 µL de agua, 200 µL de una solución de fenol al 6.5% (p/v) y finalmente 550 µL de H₂SO₄, se dejó reposar por 30 minutos con agitación manual leve a 6°C y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 492 nm haciendo uso de una celda de cuarzo de 1 cm.

El analito cuantificado se refiere a la masa de fármaco ($M_{\text{experimental}}$) que no fue encapsulado (método indirecto), para obtener el porcentaje de analito encapsulado se restó de la cantidad de maltodextrina colocada en la muestra ($M_{\text{adicionada}}$) cómo se expresa en la Ecuación 8. El método de cuantificación fue validado de acuerdo con la guía de validación para métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C [65], ver sección 10.2. ANEXO 2.

$$\% \text{ encapsulamiento} = \frac{M_{\text{adicionada a la formulación}} - M_{\text{experimental}}}{M_{\text{adicionada a la formulación}}} \times 100$$

Ecuación 8. Porcentaje de encapsulamiento por método indirecto.

Ascorbato de sodio, método indirecto: Se tomaron 100 µL del filtrado obtenido anteriormente y se llevó a 2 mL con agua destilada, para medir su absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 267 nm haciendo uso de una celda de cuarzo de 1 cm. El porcentaje de encapsulamiento fue determinado por la resta de la cantidad teórica de ascorbato de sodio agregado menos la detectada experimentalmente, que corresponde al principio activo que no fue encapsulado. El porcentaje de encapsulamiento fue determinado como en el inciso anterior y el método fue validado [65], ver sección 10.1. ANEXO 1.

Diseño experimental para obtener las formulaciones partículas óptimas

Para el estudio de las nanopartículas se evaluaron 3 factores o tratamientos los cuales fueron: 1) mezcla de Lecitina:Gelatina (L:G), 2) la cantidad de Iaponita y 3) presencia de los principios activos maltodextrina (M) y ascorbato de sodio (AS), con 2, 4 y 2 niveles respectivamente, por lo que fue un diseño multifactorial 2x4x2. Las respuestas fueron:

tamaño, PDI, potencial z, y porcentaje de encapsulamiento únicamente para las formulaciones cargadas con M:AS. También se prepararon blancos sin laponita en las mismas condiciones de preparación. Se evaluaron 3 repeticiones (n=3) de cada muestra, los resultados se expresarán en términos de promedio y la desviación estándar como se indica en la Tabla 8.

Tabla 8. Factores y respuestas del diseño experimental del compuesto particulado de laponita.

L:G mg:mg	Laponita mg	M:AS mg:mg	Tamaño nm	PDI	Pontencial Z mV	% encapsulamiento	
						M	AS
125:100	-	-	--	--	--	--	--
		10:10	--	--	--	--	--
	4.4	-	--	--	--	--	--
		10:10	--	--	--	--	--
	6.6	-	--	--	--	--	--
		10:10	--	--	--	--	--
	8.8	-	--	--	--	--	--
		10:10	--	--	--	--	--
150:100	-	-	--	--	--	--	--
		10:10	--	--	--	--	--
	4.4	-	--	--	--	--	--
		10:10	--	--	--	--	--
	6.6	-	--	--	--	--	--
		10:10	--	--	--	--	--
	8.8	-	--	--	--	--	--
		10:10	--	--	--	--	--

Reología de las dispersiones coloidal

El reómetro de esfuerzo controlado empleado en los ensayos fue un Discovery HR3® (TA Instruments) con una geometría de cilindros concéntricos (21.96 mm de diámetro exterior, 20.38 mm de diámetro interno, 59.90 mm de altura y 500 μm de gap). Se evaluaron las formulaciones óptimas para conocer el comportamiento viscoelástico η vs la velocidad de corte de 1 a 300 s^{-1} a 30.5 °C (temperatura promedio de la piel [68,69]). También se evaluó las propiedades viscoelásticas del material (módulo elástico y viscoso, representados por G' y G'' , respectivamente) vs. la frecuencia angular (ω) desde 1 a 300 rad/s a, con un porcentaje de deformación de 5 %, previamente evaluado su régimen viscoelástico lineal. Finalmente, se realizó el estudio de la estabilidad del fluido con respecto a la temperatura en un rango de temperatura de 18°C hasta 50°C (temperatura en la que la piel se puede encontrar, dependiendo de los estímulos del medio [68,69]).

Morfología

Las formulaciones óptimas se observaron mediante TEM (JEM-2010, JEOL Inc.). La dilución empleada para la observación fue 5 µL de muestra más 1 mL de agua desionizada, cada dilución fue colocada en el portamuestra y se almaceno hasta su completo secado a temperatura ambiente para continuar con su observación.

5.2.4 Caracterización de las películas de laponita

Espesor de las películas

El espesor fue medido en 4 zonas al azar de cada película, empleando un micrómetro digital (CHESC05001, CHE Scientific), el valor reportado de las muestras corresponde al promedio de estas mediciones.

Propiedades mecánicas

Para las pruebas mecánicas cada película fue recortada en forma de cuadrados de 3 cm por lado, luego se colocaron entre las dos mordazas del texturómetro (XT plus, TA instruments) y se estiró a una velocidad constante de 50 mm/min con una celda de carga de 50 N para determinar el módulo de Young y la resistencia a la tracción.

Hinchamiento y pérdida de masa por solubilización

El porcentaje de hinchamiento fue determinado de manera *in vitro*, pesando las películas antes ($M_{inicial}$) y después (M_{final}) de su inmersión en agua desionizada por 15 minutos a 25°C. El exceso de agua fue retirado con papel filtro. La Ecuación 9 describe la medición:

$$\% \text{ hinchamiento} = \frac{M_{final} - M_{inicial}}{M_{inicial}} \times 100$$

Ecuación 9. Porcentaje de hinchamiento de las películas.

Para la pérdida de masa por solubilización, las muestras fueron colocadas en un desecador con silica gel a 25°C por 12 h. Luego cada película fue pesada (M_{final} , en este caso), los valores fueron reportado como absolutos aplicando la Ecuación 9.

Efecto oclusivo

Las propiedades oclusivas de las películas se evaluaron utilizando el método modificado *in vitro* de De Vriger [70]. En esta prueba se colocaron 100 mg de NaOH en un vial, se tapó con la película y se pesó. El fundamento de este método es que la base higroscópica captura el vapor de agua que entra por la muestra que se usó como tapa. La respuesta se calculó comparando los pesos cuando comenzó el ensayo y cuando finalizó, después de 24 h, los resultados fueron expresados en términos de porcentaje. Se tomo como control positivo, al 100% del vapor de agua absorbido por la base en un vial sin tapa y se relacionó con cada medición.

Diseño experimental para obtener las películas óptimas

Los factores evaluados fueron: 1) cantidad de laponita y 2) la presencia los principios activos (M:AS), con 4 y 2 niveles respectivamente, lo que significa que el diseño fue factorial 4x2. Por otro lado, las respuestas analizadas fueron: espesor, módulo de Young's, resistencia a la tracción, hinchamiento, pérdida por solubilización y efecto oclusivo, como se describe en la Tabla 9, el número de repeticiones por muestra fueron 3 (n=3). Para conocer mejor el efecto de la laponita se trabajó con blancos sin esta arcilla.

Tabla 9. Factores y respuestas de las películas de laponita.

Laponita mg	M:AS mg:mg	Espesor mm	Módulo de Young's MPa	Resistencia a la tracción MPa	Hinchamiento %	Pérdida por solubilización %	Efecto oclusivo %
-	-	--	--	--	--	--	--
	10:10	--	--	--	--	--	--
4.4	-	--	--	--	--	--	--
	10:10	--	--	--	--	--	--
6.6	-	--	--	--	--	--	--
	10:10	--	--	--	--	--	--
8.8	-	--	--	--	--	--	--
	10:10	--	--	--	--	--	--

Claridad

La transmitancia (%T) fue medida a 620 nm en un espectrofotómetro, la cual se utilizó para determinar la claridad de las películas óptimas.

Bioadhesión y bioadhesión post-humectación

Para estas pruebas se utilizó un penetrómetro I173XX (Agrosta) configurado en el modo análisis de perfil de textura ($n = 3$). El instrumento comprimió la película óptima, de 1 cm de diámetro, contra la piel de cerdo dos veces a una velocidad de descenso de 10 mm/s con una carga de activación de 5 gf y una velocidad de retorno de 5 mm/s, y se detuvo durante 5 s entre cada ciclo. Para la bioadhesión post-humectación, el área de la piel a estudiar se humedeció durante 10 min antes de la prueba.

Espectroscopía infrarroja (FTIR)

Los espectros fueron obtenidos de las películas óptimas y los excipientes utilizando un espectrofotómetro UATR Two (PerkinElmer) de 500 a 4000 cm^{-1} con una resolución espectral de 2 cm^{-1} .

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se utilizó un DSC 1/700 (Mettler-Toledo) para medir la temperatura de transición vítrea (T_g) de las películas óptimas y excipientes. Para la calibración se empleó un estándar de indio (temperatura de fusión: 156.6°C). Se pesaron aproximadamente 5 mg de cada formulación directamente en el portamuestras. Se registraron los eventos térmicos en un rango de temperatura de 8 a 225°C con una rampa de 5°C/min bajo atmósfera de nitrógeno (purga a 20 mL/min).

Morfología de la superficie

Microscopía electrónica de barrido (SEM): Para la observación de las películas óptimas se utilizó un microscopio electrónico JSM-5900 (JEOL Inc.). Las muestras fueron depositados sobre el portamuestras y se realizó el recubierto de oro, obteniéndose una superficie conductora en condiciones de vacío.

Microscopía de fuerza atómica (AFM): Las mismas formulaciones fueron analizadas utilizando un Microscopio de Fuerza Atómica NX10 (PARK) equipado con el software para

análisis de imágenes XEI (4.3.4. Build 22, PARK Systems Corp., Suwon, República de Corea). Se utilizó el modo No-Contacto con una frecuencia de resonancia de 230 kHz y una velocidad de escaneo de 1.0 Hz. El área de la muestra analizada fue de 5x5 μm .

Uniformidad de dosis

En esta prueba fueron analizadas únicamente las muestras óptimas cargadas con los principios activos (M:AS), donde $n=10$. Cada película se sumergió en 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) durante 3 h, luego se adicionó 7 mL de agua desionizada. Se tomó 1 mL de la nueva dispersión y se centrifugó a 15000 rpm durante 30 min. Para la cuantificación de cada fármaco, el sobrenadante se diluyó 100 μL en 2 mL de agua desionizada y posteriormente se analizó empleando los métodos de espectrofotométricos UV-VIS validados descritos anteriormente.

5.2.5 Estudios de liberación

Para este estudio se utilizaron celdas de Franz y como membrana de separación entre compartimentos se emplearon bolsas de celulosa de diálisis MWCS 12–14 kDa (Spectra/Por, Los Ángeles, CA, EE. UU.). Las películas óptimas analizadas fueron las cargadas con maltodextrina y ascorbato de sodio. Las cuales fueron cortadas en círculos de 1 cm de diámetro, donde $n=6$. Como medio de disolución se usó 3.5 mL de solución tamponada de fosfato (PBS) con $\text{pH} = 7.4$ a $37.5\text{ }^\circ\text{C}$ y 50 rpm. Se extrajeron 250 μL de medio y repuesto a diferentes tiempos para la cuantificación de fármacos mediante los métodos espectrofotométricos mencionados anteriormente. Los datos se ajustaron a varios modelos cinéticos como: orden cero, primer orden, Higuchi y el modelo Korsmeyer-Peppas. El modelo con mayor coeficiente de correlación fue considerado el mejor ajuste.

5.2.6 Estudios *in vivo*

Se realizaron 2 estudios *in vivo*: 1) en un modelo de conejos, que corresponde al estudio de sensibilidad y 2) en ratas Wistar que corresponde al proceso de cicatrización. Para este último se realizaron las tinciones de hematoxilina y eosina (h&e) y tricrómico de Masson del tejido lesionado y desarrollar el respectivo análisis histológico, para lo cual se

contrataron los servicios de un tercero (Maestra en Medicina Veterinaria y Zootecnia Diana Patricia Galván Vela). Los modelos aplicados en el presente proyecto de investigación y la aprobación del comité de ética de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México se describen en la sección de ANEXOS 10.4, 10.5 y 10.6. Don los conejos fueron anestesiados con 3 mg/kg de Xilacina y 10 mg/kg de Ketamina vía intravenosa en la vena marginal, utilizando una aguja de calibre 27G y una jeringa de 1 mL para rasurar la zona a estudiar. Mientras que las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital (35 mg/kg) por vía intraperitoneal utilizando una aguja de calibre 27G y una jeringa de 1 mL para rasurar, realizar la herida y cada vez que se aplicó el apósito innovador, para su sacrificio fue necesario aumentar la dosis del anestésico a 63 mg/kg, usando la misma vía de administración. Las heridas tuvieron una forma recta con una longitud de 1 cm provocada con un bisturí y una profundidad de 3 mm.

Análisis estadístico: se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para obtener las formulaciones óptimas utilizando el software STATGRAPHICS Centurion XVI® (versión 16.2.04, StatPoint Technologies, Inc, EE. UU.).

RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 Interacción de excipientes con laponita

6.1.1 Contenido de Na, Li y Mg en laponita EP y RD

En la Tabla 10 se enlista los elementos analizados y su concentración por las técnicas propuestas en las arcillas, así como también la humedad. Donde las concentraciones de cationes en laponita RD fueron mayores desde 0.5 hasta el doble que la EP para cada metal.

Tabla 10. Contenido de Na, Li, Mg en laponita EP y RD.

Elemento	Técnica	LAP EP µg/g	RSD %	LAP RD µg/g	RSD %
Na	MP-AES	10376.01	4.71	20663.67	14.49
	Flame-AA	10707.25	3.47	21907.96	22.74
Li	MP-AES	2096.15	4.87	2975.24	14.24
	Flame-AA	1890.33	0.33	2942.54	7.38
Mg	MP-AES	131819.16	4.24	211789.91	6.56
	Flame-AA	125906.92	6.36	203072.47	10.03
	% Humedad	11.97	2.50	7.84	1.67

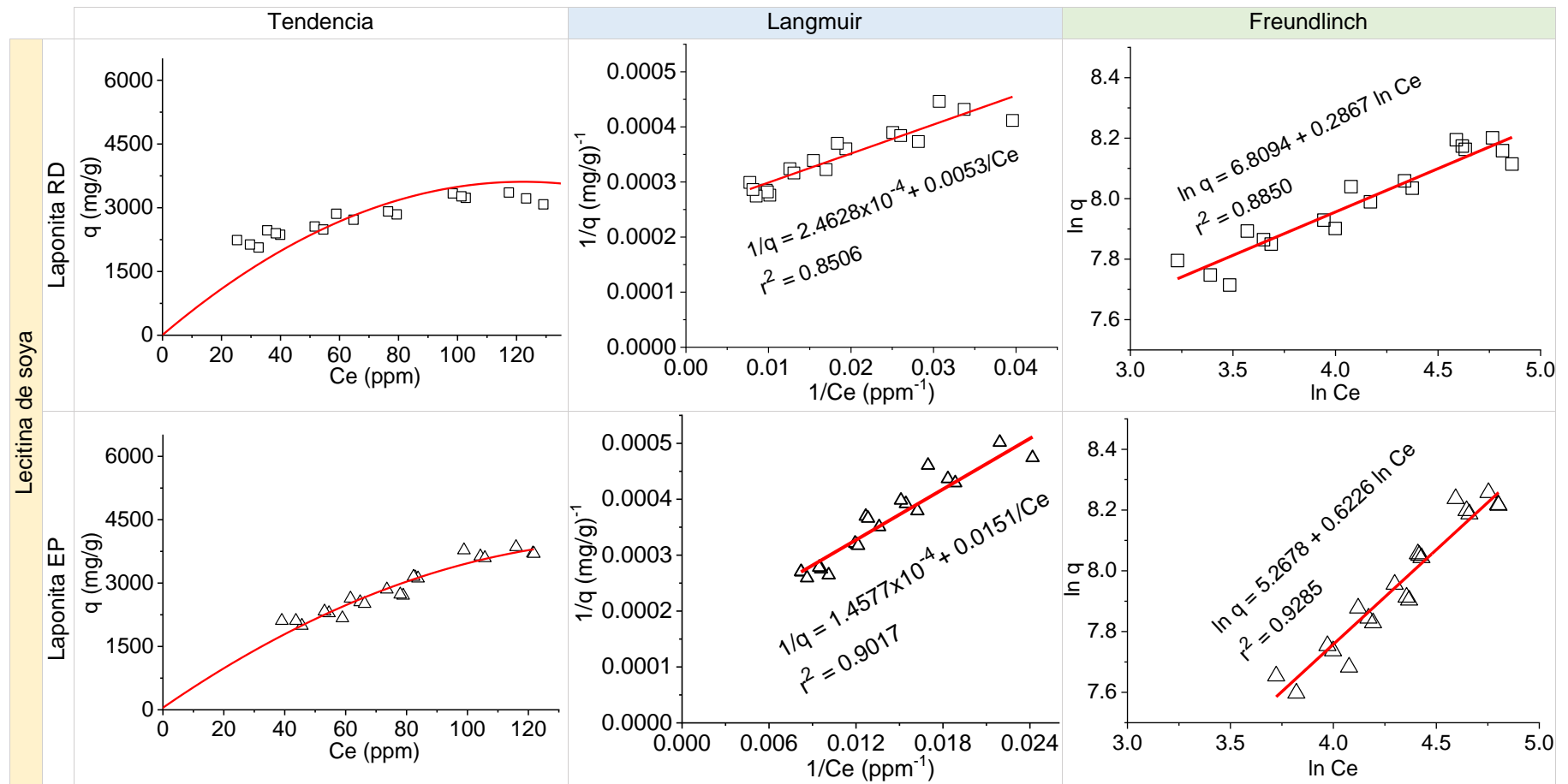
A continuación, se determinó el tamaño, PDI y potencial z de estos excipientes, los valores promedio se muestran en la Tabla 11. Con los resultados anteriores y los del potencial z es posible confirmar que la negatividad de las partículas de arcilla es completamente opuesta a la masa de los metales alcalinos y alcalinotérreos en su estructura, porque pueden atraer la densidad electrónica de los átomos externos del mineral, en este caso, oxígeno (ver Figura 4), este fenómeno influye en las interacciones extramoleculares [71,72]. Por esta razón, laponita EP que es más negativa, tiene una aplicación importante para la bioimpresión de materiales, porque puede resistir y estabilizar dispersiones con una presencia elevada de iones [73]. En la siguiente sección se discutirá este punto y los datos de humedad.

Tabla 11. Análisis por DLS de las arcillas y lecitina de soya.

Excipiente	Concentración ppm	Tamaño nm	PDI	Potencial Z mV
Laponita EP	37.0	33.2 ± 2.5	0.726 ± 0.066	-16.3 ± 2.9
Laponita RD	38.7	45.1 ± 2.9	0.714 ± 0.140	-6.8 ± 2.4
Lecitina	1988.3	813.7 ± 50.5	0.557 ± 0.026	-40.9 ± 2.4

6.1.2 Adsorción de lecitina y ascorbato de sodio sobre laponita RD y EP

Para un mejor análisis los datos obtenidos en esta sección fueron enlistados en la sección 10.7. ANEXO 7, a continuación de discutirán la tendencia de los resultados y el ajuste a los modelos de adsorción que se observan en la Figura 15.



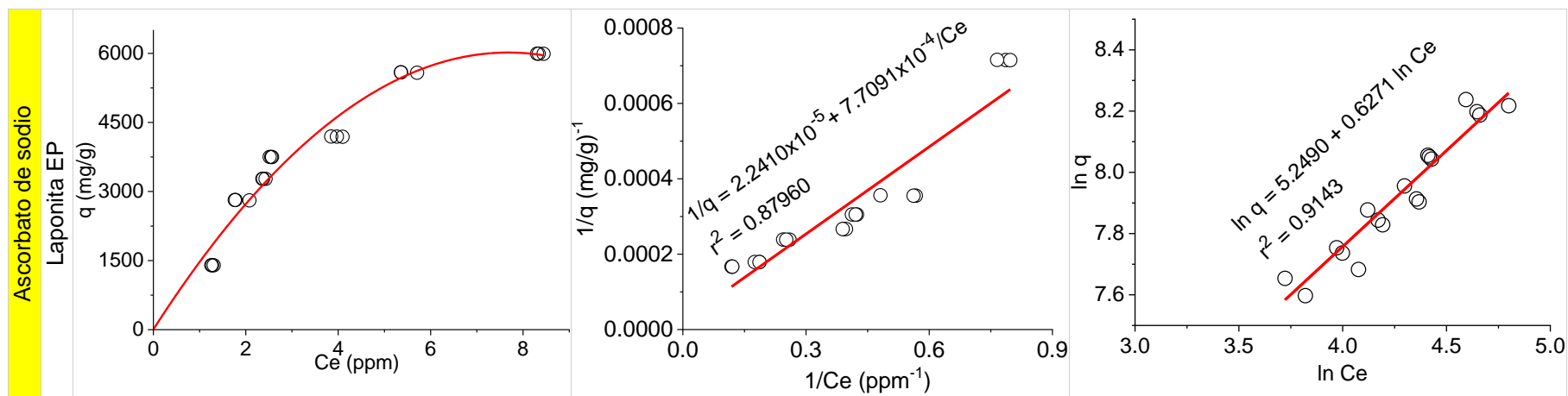


Figura 15. Tendencia y modelos de ajuste de la adsorción de lecitina de soja y ascorbato de sodio sobre laponita.

Las constantes obtenidas en cada modelo se enlistan en la Tabla 12.

Tabla 12. Constantes de los modelos de ajuste de la adsorción de lecitina de soja y ascorbato de sodio sobre las arcillas.

Modelo	Constante	Laponita RD		Laponita EP	
		Lecitina de soja	Lecitina de soja	Ascorbato de sodio	
Langmuir	K_L (L/mg)	0.0463	0.00965	0.02907	
	$q_{m\acute{a}x}$ (mg/g)	3782.9	6860.1	44622.4	
	R	0.1520	0.46475	0.36441	
	r^2	0.8506	0.9017	0.8796	
Freundlinch	K_F (L/mg)	906.3268	193.9887	190.3758	
	$1/n$	0.2867	0.6226	0.6271	
	r^2	0.8850	0.9285	0.9143	

Se decidió evaluar los fenómenos de adsorción de la laponita mediante la isoterma modificada de Langmuir y Freundlich para sistemas en dispersión con un solo soluto y diluidos, ya que son altamente aplicadas hasta la actualidad y adicional las constantes que brindan son de fácil entendimiento [46]. Inicialmente se consideró evaluar los excipientes aplicados sobre las arcillas en la misma concentración, pero por los límites de detección de los métodos espectrofotométricos para lecitina y ascorbato de sodio, se decidió iniciar las isotermas del fosfolípido con concentraciones elevadas en comparación a las usadas en la isoterma del ascorbato para que el instrumento pueda percibir los cambios del soluto.

La isoterma de Langmuir se basa en que existe una proporcionalidad entre el volumen de soluto adsorbido y la concentración de sitios libres en la superficie adsorbente y asume que los sitios ocupados son homogéneos y se produce en una monocapa [74]. En el caso de la isoterma de Freundlich nos describe que la adsorción ocurre en multicapa lo que significa que una vez el soluto ocupe los espacios disponibles del adsorbente, este seguirá acumulándose en la superficie en capas [75].

Para identificar el mejor ajuste de los datos obtenidos en los ensayos a cada modelo se utilizó el coeficiente de correlación r^2 , ver Figura 15 y Tabla 12. Para todos los casos evaluados, la isoterma de Freundlich describió siempre el mejor ajuste, los cuales fueron valores superiores a 0.88, indicando una elevada afinidad a la metodología aplicada. Por otro lado, al analizar las constantes de cada isoterma se puede observar que en la isoterma de Langmuir los resultados $q_{\text{máx}}$ no corresponden a los de una adsorción por monocapa, ya que son magnitudes muy elevadas e incluso mayores a la cantidad de adsorbente, pero los valores de R obtenidos se encuentran en el intervalo de 0.1 a 0.5 lo que significa que se favorece la adsorción de los solutos sobre la arcilla. Mientras que la constante $1/n$ de Freundlich nos dice que la adsorción no es lineal, lo que nos ayudó a confirmar que el fenómeno ocurre por multicapas [76].

Adicional a esto, al comparar los resultados obtenidos de la adsorción de lecitina de soya sobre laponita RD y EP, se pudo apreciar que hubo una mayor adsorción con el tipo EP, esto se debe principalmente a su composición, como se describió en el inciso anterior, a

menor contenido de cationes en su estructura, mayor negatividad, lo que le permite una superior interacción con el soluto. Por esta razón también se observó una mayor humedad en este tipo de mineral, ya que su densidad negativa le permite formar puentes de hidrógeno con el agua circundante del medio.

La lecitina al ser un fosfolípido presenta 2 cargas lo que le facilita su formación de sistemas tipo micelas en agua, con la presencia de laponita EP estas micelas incrementaron de tamaño cuando se aumentó la concentración del lípido por la adsorción en multicapa sobre la arcilla como se describió anteriormente, este fenómeno fue observado por microscopía electrónica de barrido, ver Figura 16.

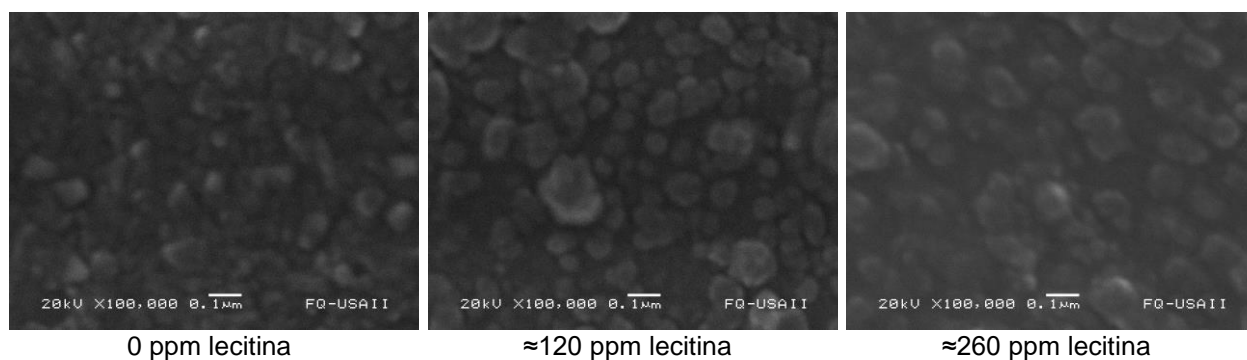


Figura 16. Fotogramas de la adsorción de lecitina de soya sobre laponita EP por SEM.

Adicional a la observación por SEM, también se analizaron las formulaciones por DLS, aunque no se identificó una tendencia del tamaño de partícula y PDI ya que no hubo diferencia significativa entre los datos obtenidos, no fue así con el potencial z, el cual se hizo más negativo cuando se aumentó la concentración de lecitina, lo que confirma lo que se observó por SEM, este fenómeno lo describe en la Figura 17.

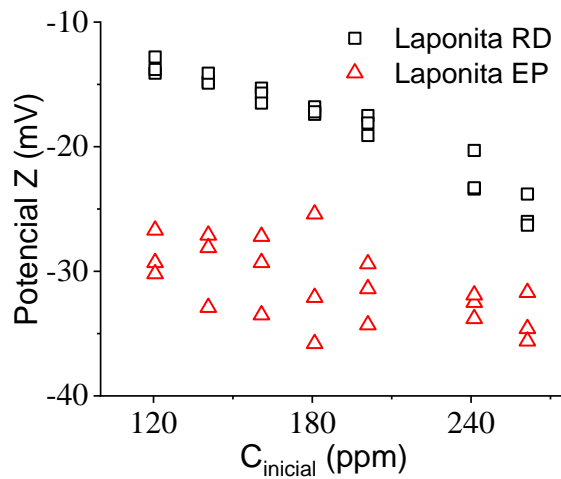


Figura 17. Tendencia del potencial Z. Adsorción de lecitina de soya sobre laponita RD y EP.

6.2 Preparación del compuesto particulado de laponita

Se puso a prueba laponita RD vs EP, a la vista, los compósitos particulados con el tipo EP mostraron mayor estabilidad y no precipitaron a los pocos días de su preparación, a diferencia de la RD como se muestra en la Figura 18. Por lo que se decidió continuar en los siguientes experimentos utilizando laponita EP, este fenómeno es respaldado con lo discutido en el inciso anterior.

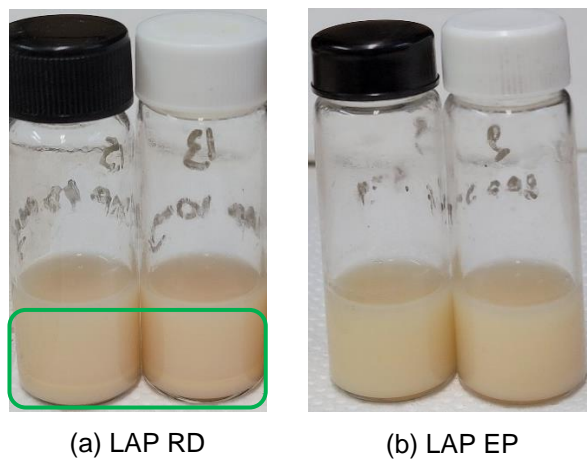


Figura 18. Compósitos preparado con 2 tipos de laponita: (a) RD y (b) EP.

Se decidió trabajar con la metodología de las nanopartículas previamente diseñadas por el investigador en su trabajo “Desarrollo y caracterización de microagujas poliméricas biodegradables cargadas con nanopartículas de lecitina/gelatina/losartán como novedosa

alternativa a la vía oral para el control de la hipertensión arterial” [66,77], se realizaron algunas modificaciones para poder incluir los demás excipientes. Los cambios realizados se exponen a continuación:

Se partió de 3 dispersiones (A, B y C), A y C corresponden a los excipientes mayoritarios que influyen en el desarrollo de este tipo de compósito particulado, la B contiene los principios activos hidrofílicos completamente dispersos para facilitar su preparación (M:AS), como se indica en la Figura 14.

En la A se realizó la primera desolvatación correspondiente a la gelatina, al agregar acetona se busca homogenizar el tamaño de las cadenas poliméricas. La adición del agente desolvatante reduce el agua disponible para mantener la gelatina en dispersión, dando como resultado la contracción de las cadenas de mayor tamaño del polímero. En cierto punto, la hidratación es demasiado baja y las cadenas de proteínas precipitan [37], dejando a las de menor tamaño como sobrenadante [78], logrando mejorar la distribución y reproducción del sistema final.

El propósito de reducir el pH a 3 de la gelatina tipo B en agua es llevarla por debajo de su punto isoeléctrico ($pI \approx 4-5$), para que sus cadenas se carguen positivamente y aumente la afinidad electrostática con los demás excipientes, en especial la lecitina de soya que se encuentra con carga negativa (fosfatidilcolina), a pesar de ser un zwitter-ión [39].

La B se preparó 24 horas antes que las demás, la arcilla necesita tiempo para completar su dispersión y correcto hinchamiento en agua [79], para los compósitos que contienen M:AS (maltodextrina:ascorbato de sodio) fue preparada por separado una dispersión del carbohidrato a 80°C en agua destilada, el incremento de temperatura facilita su solubilidad en agua, luego se tomó el tiempo necesario para que la temperatura descienda a 45°C, y se procedió a agregar el ascorbato de sodio; para el caso de las suspensiones sin M:AS se agregó la cantidad suficiente de agua para completar los 3 mL. Y se adicionó a la dispersión de gelatina gota a gota hasta una completa homogenización (45°C), usando un ultraturrax a 18000 rpm.

La lecitina de soya fue dispersa por separado en una mezcla metanol:acetona (dispersión C), para adicionarla con agitación violenta (18000 rpm) en la nueva suspensión coloidal (A:B) gota a gota, los solventes utilizados presentan actividad desolvatante sobre la gelatina [37], provocando una contracción en las cadenas poliméricas, ayudando a la formación de la gota de la partícula y que los fármacos quedan encapsulados en conjunto con la propiedad emulsificante de la lecitina, a pesar de que la maltodextrina es una macromolécula incompatible con la proteína [36,39]. Para mejorar la hidrofilia de la lecitina al medio acuoso se aumentó el pH a ≈ 6.5 , caso contrario las interacciones electrostáticas disminuirán, provocando que las partículas se agreguen y ocurra precipitación [39]. Para concluir, se adicionó glutaraldehído que tiene la función de entrecruzar los grupos amino libres de las cadenas de gelatina formando como intermedio una base conjugada de Schiff antes de concluir la reacción de Maillard [80].

6.3 Caracterización del compuesto particulado de laponita

En la Tabla 13 se enlistan los resultados obtenidos que se usaron para determinar las formulaciones óptimas.

Tabla 13. Resultados de tamaño, PDI, potencial z y encapsulamiento de los compósitos.

Muestra	L:G mg:mg	Laponita mg	M:AS mg:mg	Tamaño nm	PDI	Potencial Z mV	% Encapsulamiento	
							M	AS
LG	125:100	-	-	311.5 ± 36.4	0.179 ± 0.034	-43.2 ± 2.8	-	-
LG MAS			10:10	1801.5 ± 171.3	0.578 ± 0.183	-27.3 ± 0.8	50.03 ± 0.99	92.98 ± 0.90
LGL 4.4		4.4	-	371.8 ± 34.0	0.464 ± 0.046	-27.1 ± 1.0	-	-
LGL 4.4 MAS			10:10	1488.7 ± 118.5	0.513 ± 0.108	-15.8 ± 1.6	53.85 ± 0.98	96.59 ± 0.33
LGL 6.6		6.6	-	336.7 ± 18.9	0.625 ± 0.031	-28.2 ± 1.1	-	-
LGL 6.6 MAS			10:10	403.4 ± 65.1	0.433 ± 0.130	-16.4 ± 1.9	55.41 ± 0.25	97.68 ± 0.19
LGL		8.8	-	286.4 ± 28.7	0.222 ± 0.008	-34.5 ± 1.7	-	-
LGL MAS			10:10	391.8 ± 20.7	0.145 ± 0.043	-24.2 ± 2.2	57.12 ± 0.50	97.96 ± 0.06
	150:100	-	-	217.6 ± 12.3	0.295 ± 0.071	-38.2 ± 1.2	-	-
			10:10	1363.8 ± 24.2	0.508 ± 0.112	-24.3 ± 1.2	50.12 ± 0.28	93.28 ± 0.25
		4.4	-	266.6 ± 30.2	0.346 ± 0.030	-9.3 ± 0.3	-	-
			10:10	1574.3 ± 160.6	0.926 ± 0.092	-1.8 ± 0.8	54.26 ± 1.10	97.92 ± 0.50
		6.6	-	259.8 ± 4.4	0.400 ± 0.020	-12.2 ± 0.6	-	-
			10:10	772.6 ± 54.4	0.699 ± 0.044	-1.9 ± 0.3	54.81 ± 0.48	98.47 ± 0.50
		8.8	-	259.7 ± 26.2	0.408 ± 0.019	-15.1 ± 1.5	-	-
			10:10	372.6 ± 22.3	0.493 ± 0.050	-2.4 ± 1.4	57.08 ± 0.11	98.00 ± 0.39

6.3.1 Tamaño, PDI y potencial z

Tamaño

La tendencia de los resultados en cuando al tamaño de partícula se observa en la Figura 19. Donde a mayor concentración de laponita esta respuesta disminuye, lo que se debe al entrecruzamiento físico (mediante cargas electrostáticas) que ejerce la arcilla, estas cargas ayudan a que cada partícula se compacte de mejor manera y exista mayor interacciones con las demás macromoléculas para obtener tamaños más pequeños con poblaciones mayormente homogéneas; una característica de la laponita es que se debe llegar a un equilibrio entre ella y los polímeros con los que se trabaja, ya que si no, se puede afectar a estas propiedades: 1) en caso de que no exista la suficiente cantidad de laponita, la influencia de cargas aumenta la hidrofobicidad de las partículas desarrollándose sistemas completamente inestables, haciendo que precipiten y por otro lado, 2) si la cantidad de laponita está en exceso, se provoca un efecto de aglomeración ya que los discos del mineral que conforman una partícula atraerán a otras de partículas cercanas, provocando aglomeración y floculando el sistema [71,72,81,82].

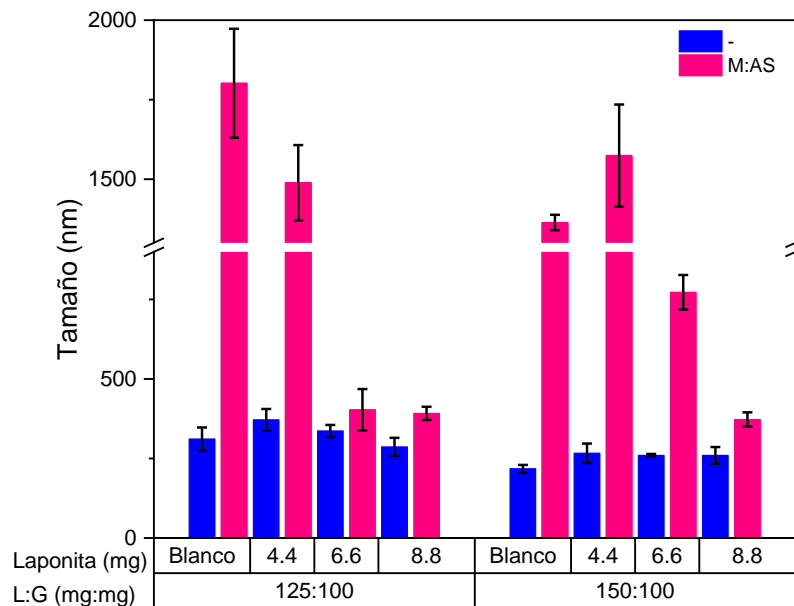


Figura 19. Tendencia del tamaño de partícula del compuesto.

Al diseñar un apósito, el tamaño de partícula juega un papel importante, actualmente se han reportado que los valores óptimos, en esta respuesta, para que un sistema innovador acelere el paso de la fase de inflamación a fase de proliferación en el proceso de cicatrización debe ser inferior a 473 nm, mientras que las partículas que alcanzan un tamaño de 1 μm o superior solo alcanzan a reducir los estados febriles e inflamación de la zona afectada [83–85], aunque se desconocen los mecanismos de acción de las mismas, en la presente investigación se decidió trabajar con compósitos particulados con un tamaño inferior a 473 nm.

PDI

Por otro lado, la seguridad y eficacia de una forma farmacéutica están limitadas por una inadecuada liberación del fármaco en el tejido diana y en los efectos secundarios en tejidos sanos. Ambas preocupaciones pueden superarse con el diseño de nanoacarreadores con características definidas y predecibles, que proporcionan la máxima biodisponibilidad y los mínimos efectos secundarios. La tendencia de las partículas a acumularse en el tejido diana depende de sus características fisicoquímicas, incluida la distribución del tamaño de partícula. Es así como, una formulación exitosa de partículas segura, estable y eficiente requiere de la preparación de poblaciones homogéneas (monodispersas) de cierto tamaño. Para describir el grado de no uniformidad de una distribución de tamaño de partículas se utiliza el índice de polidispersión (polydispersity index “PDI”), y su escala es adimensional desde 0.0 a 1.0, siendo 0.0 una distribución totalmente homogénea y 1.0 una distribución totalmente heterogénea. Aunque la FDA sólo describe la importancia de esta propiedad y no describe un criterio de aceptación, muchos trabajos de investigación recomiendan que para formulaciones farmacéuticas el PDI debe ser menor o igual que 0.3 [43]. En la Tabla 13 se aprecia como el nivel de la mezcla de Lecitina:Gelatina 125:100 mg:mg y 8.8 mg de laponita son los únicos sistemas que cumple con esta especificación.

Potencial Z

A pesar de que la bibliografía describe: “la carga de repulsión necesaria para evitar la aglomeración del sistema debe ser cercana a ± 30 mV [42,86]”, en el presente proyecto,

así como en otros, se ha demostrado que en sistemas con arcillas esta especificación no se cumple, ya que pueden formar la estructura de castillo de naipes aún dentro de cada partícula y mantener su estabilidad [87], en lo que se debe trabajar es en encontrar un equilibrio suficiente de la concentración de laponita para que las partículas vecinas no se atraiga por cargas, provocando aglomeraciones y luego la precipite, como se discutió en los párrafos anteriores.

La Figura 20 sirvió para analizar de mejor manera la tendencia de los resultados. Aunque existe una relación directa entre la concentración de laponita y el aumento de la carga negativa de las partículas, las muestras blanco reflejaron los resultados más negativos, demostrando una interacción electrostática significativa entre los excipientes y la arcilla [87,88]. Las formulaciones con el nivel de mezcla L:G igual a 150:100 mg:mg precipitaron después de dos semanas, de acuerdo con los resultados las magnitudes de esta respuesta son cercanos a cero, lo que significa que no existió la carga suficiente para que se repelan entre partículas vecinales. Esto se debe al hecho de que la relación entre laponita y el resto de la formulación es considerablemente baja, lo que dificulta la formación y conservación de la estructura del castillo de naipes y, en consecuencia, provoca la precipitación.

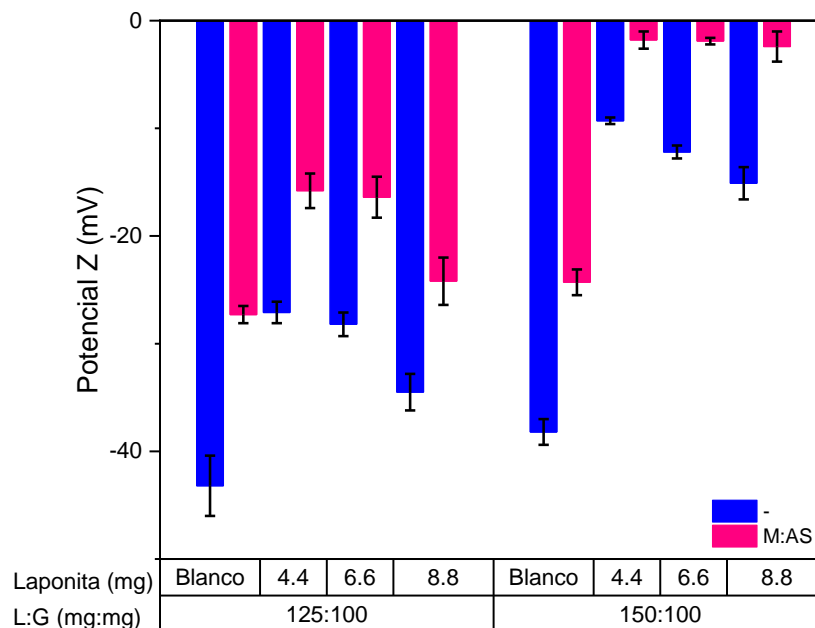


Figura 20. Tendencia del potencial Z del compuesto.

Por otro lado, se ha discutido anteriormente que una de las problemáticas para sistemas de liberación transdérmica es su carga, debido a que la capa superficial de la piel tiene una carga negativa por la fosfatidilcolina de los fosfolípidos que la componen, por tal razón con el potencial Z es posible predecir el comportamiento de estos sistemas en el lugar de administración y liberación. Es de suponerse que sistemas cargados positivamente tendrán un efecto positivo en la penetración de la piel en conjunto con las propiedades fisicoquímicas del fármaco y la influencia del vehículo. En este caso, el potencial Z de las partículas desarrolladas es negativo, lo que provoca que, por repulsión de cargas, el sistema se vuelva inestable y además se mantenga en el área de administración [52, 42].

6.3.2 Porcentaje de encapsulamiento

La Tabla 13 muestra cómo la arcilla aumentó significativamente esta respuesta frente a los blancos para ambos fármacos. Los resultados fueron cercanos en los diferentes niveles de laponita; por lo tanto, se aplicó un procedimiento de comparación múltiple para determinar qué medias eran significativamente diferentes de otras. No hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles que contenían 4.4 y 6.6 de laponita para ambos niveles de mezcla L:G. Adicionalmente, este ensayo demostró que el nivel de mineral de 8.8 mg encapsuló el mayor porcentaje de M:AS. El método utilizado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Además, este ensayo demostró la especificidad de los excipientes por el anión ascórbico debido a su afinidad higroscópica [89,90].

Con base en los resultados y lo discutido anteriormente, las formulaciones con la mezcla 125:100 mg:mg de L:G y 8,8 mg de laponita con y sin M:AS se tomaron como óptimas (LGL y LGL MAS, en negrita en la Tabla 13). Sin embargo, para evidenciar cómo la laponita influyó en las propiedades mecánicas y otras de las películas, el grupo continuó la investigación con todas las formulaciones del nivel de mezcla 125:100 mg:mg de L:G.

6.3.3 Reología de las dispersiones coloidales

La viscosidad es una macropropiedad, por lo que los resultados obtenidos en este estudio se correlacionaran más adelante con los de DLS y DSC. El propósito de evaluar la reología de las muestras a 30.5°C es determinar sus propiedades viscoelásticas, conocer el tipo de fluido al que corresponden y su estabilidad a la temperatura, ya que está muy discutida que la temperatura de la piel no se mantiene constante, sino que depende del estímulo del medio y puede ir desde 18°C hasta 50°C.

Al evaluar la viscosidad de las formulaciones óptimas versus la velocidad de corte [91], se observó que ambas dispersiones siguen un comportamiento no newtoniano, específicamente para fluidos adelgazantes ($n < 1$), como se muestra en la Figura 21^a. Esto significa que, a velocidades de cizallamiento elevadas, los fluidos disminuyeron su viscosidad. Para el fluido LGL, los valores iniciales fueron bajos (ligera pendiente, $n \ll 1$) en comparación con LGL MAS. La tendencia observada estuvo relacionada con un menor tamaño de partícula (286.4 ± 28.7 nm) y distribución con respecto a LGL, así como su mayor carga de repulsión (-34.5 ± 1.7 mV). Por el contrario, la otra formulación se caracterizó por un tamaño mayor y un potencial Z más cercano a cero, lo que provocó que algunas partículas se aglomerasen, creando una resistencia al flujo y por tanto obteniendo mayores valores de viscosidad.

La Figura 21b muestra los resultados del flujo oscilatorio de pequeña amplitud [92], evaluando el módulo elástico y viscoso (G' y G'' , respectivamente) vs. frecuencia angular (rad/s). Ambos fluidos óptimos demostraron el mismo comportamiento viscoelástico; sin embargo, el módulo elástico predominó en todas las frecuencias evaluadas ($G' > G''$) debido principalmente al entrecruzamiento físico entre polímeros y arcilla en las dispersiones [93]. Además, la mezcla M:AS no afectó las propiedades viscoelásticas evaluadas.

Finalmente, la prueba de estabilidad térmica de las formulaciones óptimas tanto para LGL como para LGL MAS en un rango de temperatura de 18 a 50 °C se describe en la Figura 21c (demarcada por curvas rosa y azul, respectivamente), donde el módulo elástico

dominó sobre el viscoso ($G' > G''$), lo que significa que el estado del gel predominó en este rango de temperatura. Para comprender mejor los efectos de la laponita en las muestras, también se analizó una formulación no óptima. Esta formulación no óptima contenía 6.6 mg de laponita (LGL 6.6, verde). Se observó que cuando la temperatura aumentaba por encima de los 31 °C, su módulo elástico disminuía (G'), indicando que se produjo un cambio en el componente sólido de esta formulación debido a la gelatina (uno de los excipientes más abundantes). Este biopolímero es sensible a la temperatura y al flujo ya que pierde completamente su forma sólida y pasa a un estado de gel débil a 31 °C. Resultados previos describen que esta formulación no es homogénea ya que necesita más cantidad de laponita para evitar este fenómeno, como lo demuestran las formulaciones óptimas [94].

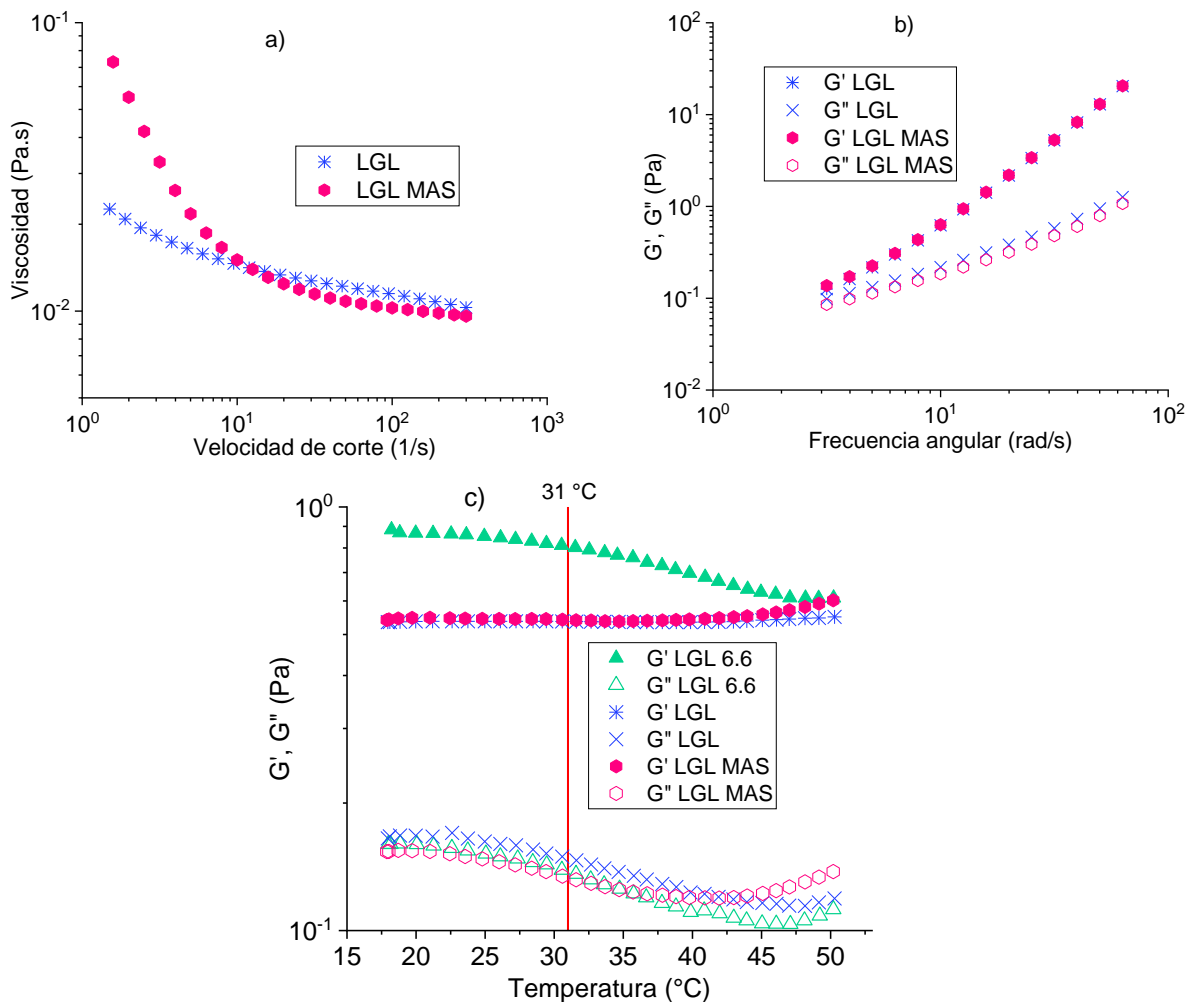


Figura 21. Estudio reológico: a) viscosidad, b) estudio oscilatorio y c) comportamiento térmico.

6.3.4 Morfología

La Figura 22 muestra la morfología de las partículas óptimas desarrolladas en el presente proyecto de investigación. TEM confirmó los resultados obtenidos por DLS, donde los fotogramas b, d, f y h corresponden al zoom del borde de cada tipo de partícula. Negrete y sus compañeros describen agregados a manera de filamentos muy delgados en espesor y pequeños en longitud en el borde del material que desarrollaron que corresponden a los discos de esta arcilla [95]. Lo mismo fue observado en el laboratorio, confirmando la presencia de este mineral en las partículas óptimas, ver Figura 22f y h correspondientes a LGL y LGL MAS, respectivamente. Los discos se pueden observar como líneas negras de 1 nm de espesor y 25 nm de longitud. Las partículas blanco frente a las de laponita con M:AS (ver Figura 22c, d para el blanco y g, h para LGL MAS) son completamente diferentes entre sí. La Figura 22c, la partículas presentan forma esférica, donde los excipientes ocupaban toda la partícula, como se observa al incrementar el acercamiento en la Figura 22d. Describiendo cadenas poliméricas a manera de partículas diminutas, por la incompatibilidad natural que prevalece entre las macromoléculas proteína-lípido-carbohidrato [96], mientras que, en LGL MAS, los excipientes se ubicaron en el centro de las partículas brindándoles una forma heterogénea.

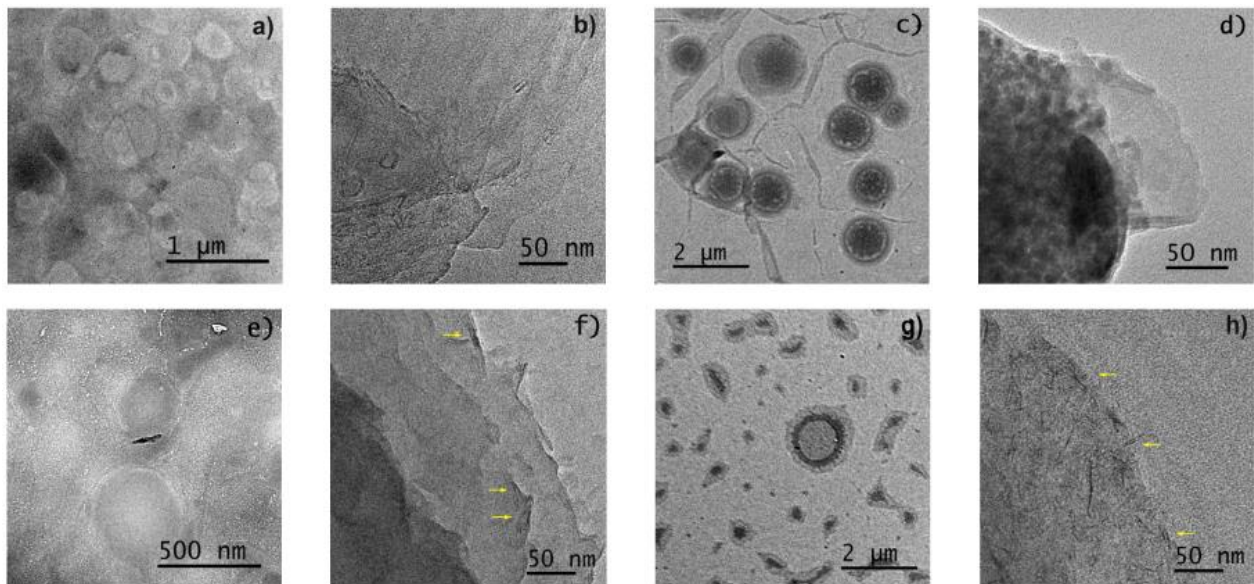


Figura 22. TEM de las partículas. LG: (a,b); LG MAS: (c,d); LGL: (e,f); LGL MAS: (g,h).

6.4 Caracterización de las películas de laponita

Los resultados obtenidos de las películas de formación *in situ* se enlistan en la Tabla 14.

Los cuales se usaron para estudiar el efecto de la laponita sobre este tipo de películas.

Tabla 14. Resultados de las películas de laponita.

Muestra	Espesor mm	Módulo de Young's MPa	Resistencia a la tracción MPa	Hinchamiento %	Pérdida por solubilización %	Efecto oclusivo %
LG	0.096 ± 0.007	23.9 ± 7.2	1.8 ± 0.3	-	-	88.58 ± 1.27
LG MAS	0.101 ± 0.005	164.3 ± 26.6	2.4 ± 0.2	-	-	86.43 ± 0.48
LGL 4.4	0.097 ± 0.005	27.6 ± 6.6	0.4 ± 0.2	442.87 ± 30.65	14.55 ± 2.57	77.23 ± 3.32
LGL 4.4 MAS	0.102 ± 0.012	101.7 ± 20.3	1.6 ± 0.8	171.66 ± 21.20	19.17 ± 0.39	80.73 ± 1.12
LGL 6.6	0.102 ± 0.007	18.7 ± 3.8	0.9 ± 0.1	523.74 ± 43.61	8.28 ± 1.53	70.33 ± 1.98
LGL 6.6 MAS	0.103 ± 0.010	72.7 ± 9.8	2.9 ± 0.5	277.17 ± 40.29	9.39 ± 0.64	81.11 ± 0.68
LGL	0.111 ± 0.009	4.7 ± 0.5	4.7 ± 0.8	672.46 ± 24.26	6.84 ± 0.87	69.56 ± 3.40
LGL MAS	0.113 ± 0.007	12.5 ± 2.7	7.1 ± 0.6	289.06 ± 7.73	6.85 ± 0.92	79.37 ± 1.00

6.4.1 Espesor de las películas

La Tabla 14 revela una diferencia estadísticamente significativa (ANOVA, $p < 0.05$) en el espesor de las muestras. Observándose una proporcionalidad en los factores evaluados, a mayor concentración de laponita, y presencia de M:AS, el espesor aumentó. Otras características estudiadas de las películas tienen una fuerte relación con esta respuesta, por lo que se discutirá en los siguientes párrafos.

6.4.2 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de una película varían dependiendo de los polímeros (estructura y grado de polimerización), solvente, pH, plastificante y proceso de fabricación [54]. Cuando el texturómetro obtiene la gráfica fuerza-desplazamiento, se puede medir la Resistencia a la Tracción (RT) y el módulo de Young (módulo elástico). RT mide la resistencia de la película y es expresada como la fuerza para que ocurra su fractura experimentalmente por el área de la sección transversal del material, mientras que el módulo de elástico expresa la resistencia del material a la deformación. Para resistir las deformaciones naturales de la piel humana, el RT de las películas debe estar en el rango de 2.5 a 16 N/mm² (MPa) y tener valores de módulo de Young cercanos a los del tejido tegumentario, que pueden ser valores entre 4.6 a 20 MPa [97].

La Tabla 14 muestra cómo la arcilla disminuyó la rigidez de las películas. Al comparar formulaciones con y sin M:AS, se puede observar que la adición de la mezcla de fármacos disminuyó el módulo elástico. Como se mencionó anteriormente, valores elevados de esta propiedad, que no estén dentro del rango, no son adecuados para materiales destinados a ser utilizados como apósitos para heridas. Con respecto a la resistencia a la tracción, se puede observar un efecto opuesto, y esta respuesta aumentó con la arcilla porque un alto contenido de laponita conduciría a una red de película altamente entrecruzada por cargas, haciendo que el material sea más resistente [98]. Sólo las formulaciones óptimas describieron valores que están dentro de las especificaciones tomadas por el grupo de investigación. En comparación con LGL, LGL MAS tuvo magnitudes más altas debido a la presencia del polisacárido, como explicaron Castro y colaboradores, la maltodextrina DE17-19 en hidrogeles para películas (carbohidratos utilizados en este estudio) tuvo un efecto plástico superior. Debido a que las cadenas de polímeros se encontraban menos enredadas, lo que hace que el material sea más resistente [99].

6.4.3 Hinchamiento y pérdida de masa por solubilización

Es este tipo de trabajo de investigación, el hinchamiento expresa el grado en que la película puede absorber agua, PBS u otras sustancias que simulen el exudado de la herida, permitiendo así la liberación del fármaco incorporado. En relación con esto, el hinchamiento excesivo puede causar una reducción en la integridad de la película, debido a la formación de un gel que fluye libremente ocurriendo su desintegración, y esto se conoce como pérdida por solubilización [100]. Las muestras blanco fueron imposibles de analizar, porque se dispersaron en agua, revelando que las partículas eran independientes y necesitaban otro polímero o entrecruzante para permanecer en este solvente en forma de películas. Bigi y sus colaboradores discutieron este punto. Mencionaron que las películas de gelatina necesitan concentraciones de glutaraldehído superiores al 0.25% (v/v) para no perder su integridad en disolventes hidrofílicos [53]. En este estudio, la concentración final de este entrecruzante covalente fue del 0.03% (v/v), valor que está claramente muy por debajo de la especificación. Al analizar las muestras con laponita, se pudo observar que la arcilla aumentó el hinchamiento y redujo la pérdida

por solubilización, lo que indica una excelente afinidad por el agua. Al mismo tiempo, actúa como un entrecruzador físico, ayudando a mantener la integridad de las películas [71]. LGL y LGL MAS mostraron el mejor desempeño en estas respuestas (ver Tabla 14).

6.4.4 Efecto oclusivo

La Tabla 14 enumera las medias obtenidas al evaluar la oclusividad de las películas con el mineral vs. las formulaciones blanco. Los valores de oclusión de los blancos fueron elevados ($p < 0.05$), la presencia de arcilla disminuyó esta respuesta, mientras que, en las muestras cargadas con fármacos, aunque no fue estadísticamente significativo ($p > 0.05$), se observó una ligera disminución al incrementar la cantidad de laponita, siendo LGL y LGL MAS las más bajas con 8.8 mg de la arcilla sintética. Este factor depende del volumen de la muestra, el tamaño de las partículas, la cristalinidad, la concentración de lípidos y el tipo de sistemas coloidales [101]. La ausencia de laponita (blancos) reveló un alto grado de oclusión como respuesta a la presencia de lecitina amorfa, que tiende a ocupar más espacio por su naturaleza hidrofóbica [42,102]. Por el contrario, la presencia de laponita condujo a: 1) una menor compactación, ya que las formulaciones óptimas mostraron el mayor espesor, 2) el desarrollo de nanohuecos durante el proceso de secado formados por la estructura del castillo de naipes, y 3) modificación del estado vítreo de las películas a temperatura ambiente [81,103]. LGL y LGL MAS no sufrieron ningún cambio en el comportamiento térmico. Como se ve en sus estudios de reología, su T_g es alrededor de 50°C , lo que se analizará con más detalle en la sección de DSC. Como resultado, la oclusividad podría afectar la biodisponibilidad de los fármacos encapsulados cuando se administran tópicamente, así como también el intercambio de gases, con el que presenta una relación inversa, es decir, a menor oclusividad mayor intercambio gaseoso, lo que se podría optimizar para obtener una membrana similar a la de la piel.

6.4.5 Claridad

Una de las condiciones esenciales de las películas destinadas a ser utilizadas como apósitos para heridas es permitir la evaluación del proceso de cicatrización, lo cual se

refiere a un material translúcido [104]. Pan y Kaygusuz mencionan que se requiere que la transmitancia de luz de los apósitos sea preferiblemente inferior al 10%, para evitar la radiación UV a la herida [105,106]. En este estudio, la transmitancia de las películas óptimas (tres muestras evaluadas, $n = 3$) fueron $1.68 \pm 0.25 \%$ y $5.13 \pm 0.59 \%$ para LGL y LGL MAS, respectivamente. Aunque las películas no eran 100% transparentes, estaban dentro del rango de especificación y demostraron un ligero paso de luz a través de ellas, debido a la presencia de nanohuecos producidos por laponita, como se describió anteriormente. Al comparar las formulaciones se observó una diferencia estadísticamente significativa entre las medias que presentaban la mezcla M:AS vs. las vacías. Lo que se debió a la presencia de maltodextrina D16.5-19.5 que mejoró la red de la película, haciéndola más homogénea y evitando las cadenas aglomeradas [99]. Este ensayo describió que las películas desarrolladas en el presente proyecto de investigación pueden ser una barrera protectora del medio circundante, incluida la radiación y a su vez permitirá observar el proceso de cicatrización.

6.4.6 Bioadhesión y bioadhesión post-humectación

La bioadhesión describe las fuerzas interfaciales entre dos materiales (al menos uno es biológico) que les permiten mantenerse unidos durante algún tiempo [107]. En el caso de un apósito para heridas, esta fuerza debe ser suficiente para permanecer en la zona dañada y, al mismo tiempo, ser fácil de retirar. Waring en su estudio clínico mencionó que los apósitos comerciales con valores superiores a 40 cN en cuanto a esta respuesta causaban dolor y daño extenso al ser removidos, ya que quedaban células y tejidos en el material [108]. Esto fue confirmado más tarde por Blacklow, quien sugirió valores cercanos a 10 cN, con esta fuerza los apósitos serían adecuados para aplicaciones clínicas [109]. Los resultados para LGL fueron -2.8 ± 0.7 cN y -5.2 ± 0.2 cN, respectivamente para cada respuesta y, para LGL MAS, los resultados fueron -4.0 ± 0.4 cN y -7.4 ± 0.2 cN (tres muestras evaluadas, $n = 3$). El signo negativo se correlaciona con la fuerza que ejerce el instrumento para separar las superficies. La presencia de M:AS mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Este resultado evidencia que el carbohidrato aumentó la bioadhesión por su naturaleza hidrofílica, interaccionando con el agua remanente en la piel [110].

Únicamente los valores de bioadhesión post-humectación en este estudio estuvieron cercanos a las especificaciones, debido al hinchamiento inducido por el agua de las cadenas de polímeros y los discos de arcilla, lo que en consecuencia aumentó las interacciones de la interfase entre ambas superficies. Este fenómeno tiene un efecto positivo en cuanto a su aplicación como apósito para heridas ya que es necesario limpiar y humedecer la zona lesionada antes de su aplicación. Por lo tanto, esto aumentará las interacciones entre la película y la piel, lo que permite que el apósito se mantenga en la lesión y sea fácil de retirar.

6.4.7 Espectroscopía infrarroja (FTIR)

El ancho, la intensidad y la posición de las bandas en los espectros IR son sensibles a los cambios de los grupos funcionales y las conformaciones de macromoléculas [111]. La Figura 23 muestra los espectros de excipientes y formulaciones óptimas. Para LGL, se observó una banda de alrededor de 3300 cm^{-1} que corresponde a la vibración N-H de la amida I de la gelatina tipo B; sin embargo, en el compuesto cargado con fármacos, esta banda se observó ligeramente más ancha debido a los grupos O-H de ascorbato y maltodextrina. Las bandas en 2926 y 2856 cm^{-1} en las formulaciones óptimas corresponden a enlaces C-H; su intensidad demostró la presencia de lecitina como excipiente principal, mientras que la banda en 1638 cm^{-1} representó el entrecruzamiento de gelatina ($-\text{N}=\text{C}-$, grupo aldimina) [87], el cual es más ancha en LGL MAS debido a los grupos carbonilo del ascorbato. La banda a 1629 cm^{-1} confirmó la presencia de grupos amida de gelatina. El grupo PO_2 del fosfolípido fueron representados por la banda a 1061 cm^{-1} . La aparición de una banda a 970 cm^{-1} se asoció con la vibración de estiramiento del enlace Si-O-Si en laponita [16,112].

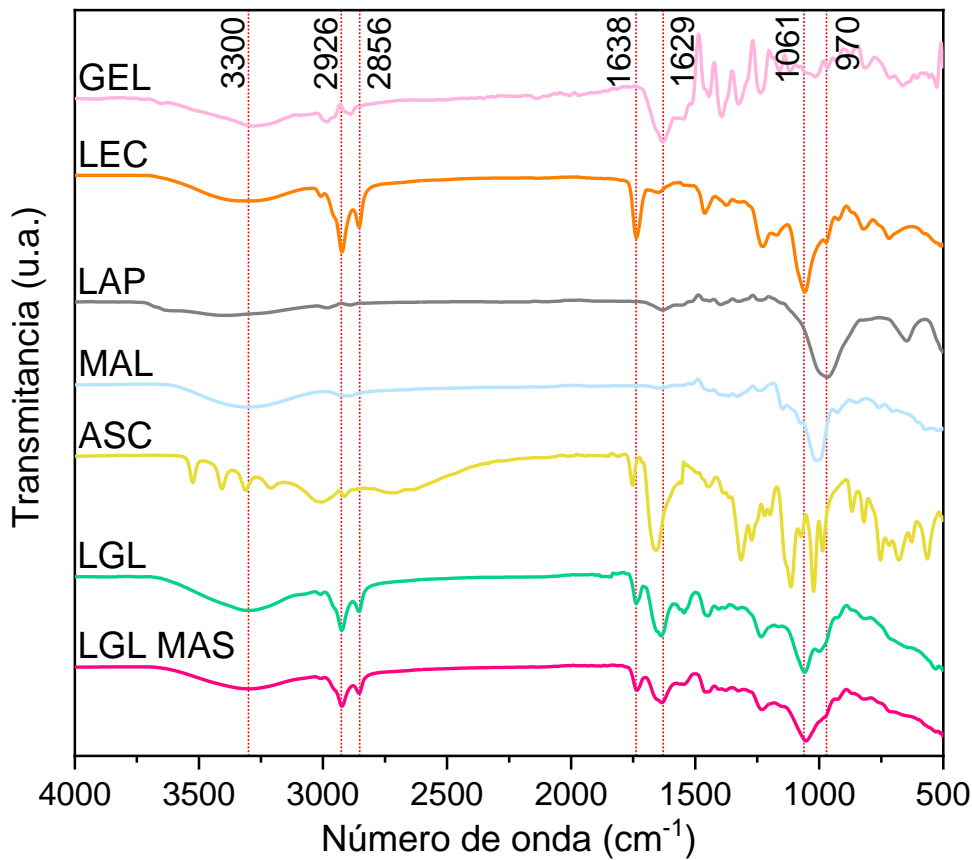


Figura 23. Espectros IR de los excipientes y formulaciones óptimas.

6.4.8 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Para productos farmacéuticos, su estabilidad depende de las condiciones del lugar donde se los almacenarán, como la temperatura y la humedad. Los valores de temperatura no deben ser superiores a 50°C [113]. DSC se utiliza para describir la estabilidad del material a un determinado rango de temperatura. Este experimento (como se muestra en la Figura 24) evaluó el comportamiento térmico de los excipientes y las películas: 1) no óptima (LGL 6.6) y 2) óptima (LGL MAS), así como las derivadas de cada escaneo (reportada debajo del termograma de cada analito) para garantizar un análisis confiable. Anteriormente, los ensayos de reología describieron los fenómenos térmicos de las dispersiones de nanocompuestos entre 18 y 50°C, en esta sección se comparará y discutirá a detalle dichos resultados.

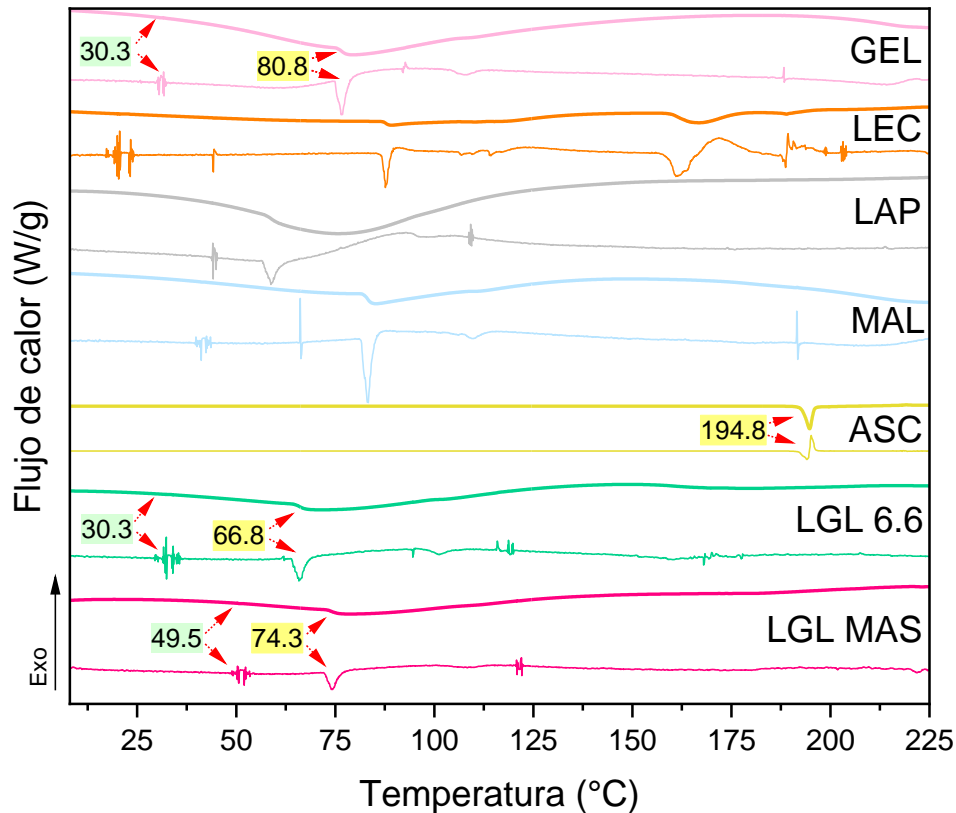


Figura 24. Comportamiento térmico de los excipientes y películas por DSC.

Independientemente de la concentración de laponita, ambas películas mostraron un comportamiento típico de materiales parcialmente cristalinos, con solo una temperatura de transición vítrea (T_g , resaltadas en verde) seguida por un pico de fusión endotérmico (T_m , resaltadas en amarillo). El cambio en las temperaturas de transición vítrea resultó de las interacciones entre arcilla y gelatina. Al comparar la T_g de la proteína y LGL 6.6 (30.3°C) vs. la película óptima con 8.8 mg de laponita, la T_g aumentó en 19°C (49.5°C), este fenómeno también se observó en la sección 6.3.3 Reología de las dispersiones coloidales, al igual que en investigaciones anteriores, como el trabajo de Varnik [114], quien interpretó los cambios de T_g de las cadenas poliméricas mediante simulaciones de dinámica molecular. Él señaló que los discos de laponita, fuertemente atractivos por la variabilidad de cargas, provocaron un aumento de la T_g , ya que el movimiento de las cadenas de polímeros donde estaban incrustados fue más lento en comparación con la gelatina a granel. Este cambio dependía de la concentración de laponita: una concentración más baja producía una atracción más débil, tenía el efecto opuesto o nulo

en comparación con el material a granel (donde las moléculas pueden relajarse más rápido). Al mismo tiempo, los otros excipientes probablemente también afectaron la transición vítrea en el producto final.

La temperatura de fusión de la gelatina depende de la humedad [81,115,116], $T_m = 80.8^\circ\text{C}$, fue superior a la de las películas LGL 6.6 y LGL MAS (66.8 y 74.3°C , respectivamente). Estos cambios se produjeron debido a la presencia de los discos de laponita, donde el polímero sufrió cambios, como bucles o secuencias más cortas, lo que resultó en estructuras menos estables vs. el material a granel. Por otro lado, la gráfica de lecitina tuvo diferentes valores de T_g y T_m por ser una mezcla de fosfolípidos. La T_m para el ascorbato de sodio fue 194.8°C [26]. Las bandas de laponita y maltodextrina corresponden a la desorción de agua en un proceso de deshidratación, dado que estos componentes son higroscópicos [117,118].

Las entalpías de fusión fueron 20.4 J/g, 0.6 J/g, 0.4 J/g y 290.2 J/g [119] para gelatina, LGL 6.6, LGL MAS y ascorbato de sodio, respectivamente. La ΔH de fusión de la proteína está relacionada con la desnaturalización de la triple hélice. Así, las entalpías medidas en las películas vs. gelatina fueron menores porque la arcilla interfirió en la formación de la triple hélice de la proteína. La estructura del castillo de naipes disminuyó la forma semicristalina del polímero mediante interacciones electrostáticas, evitando la renaturalización de las triples hélices en el proceso de secado. Además, la presencia de otros polímeros y el entrecruzante covalente influyó en estos valores [120].

6.4.9 Morfología de la superficie

La Figura 25 muestra cómo la rugosidad de las películas disminuyó en el siguiente orden: LG > LG MAS > LGL > LGL MAS (ver Figura 25i, j, k y l, respectivamente). Esta reducción se debe a la distribución homogénea de los discos de arcilla en las cadenas poliméricas, principalmente en la gelatina. Esto provocó cambios en la red, dando como resultado estructuras amorfas que predominaron en los materiales innovadores.

En las micrografías de LG (películas blanco sin fármacos) se observó una distribución uniforme de poros ovalados, ver Figura 25^a y e que corresponden a SEM y AFM, respectivamente. Investigaciones anteriores revelaron que las nanopartículas de LG tenían una forma capsular convexa después del proceso de secado. Por lo que en la película se observa estos poros como resultado de la coalescencia de las partículas [87]. Mientras que, LG MAS describió la presencia de cúmulos de los excipientes, como la maltodextrina (ver Figura 25b y f). Este material experimentó aglomeraciones durante el proceso de secado, así como separación de fases relacionada con la incompatibilidad natural de los polímeros utilizados. Como resultado, los poros de esta formulación se observaron de mayor tamaño, lo que tiene que ver también con un mayor tamaño de partícula descrito en la Tabla 13 por DLS y observado por TEM en la Figura 22c en comparación con los resultados de LG.

En las Figura 25g y h se observó un mayor espesor, donde $LGL\ MAS > LGL$. Estos resultados se correlacionan con los mostrados en la Tabla 14; se confirma que la arcilla está incrustada en las cadenas de polímeros, aumentando el espesor de las películas y limitando la formación de poros profundos, pero, aun así, se observaron formas convexas. Como expuso anteriormente Valencia, la reducción de la rugosidad es consecuencia de la orientación de los biopolímeros en la superficie de soporte (discos de laponita) durante el proceso de secado [82].

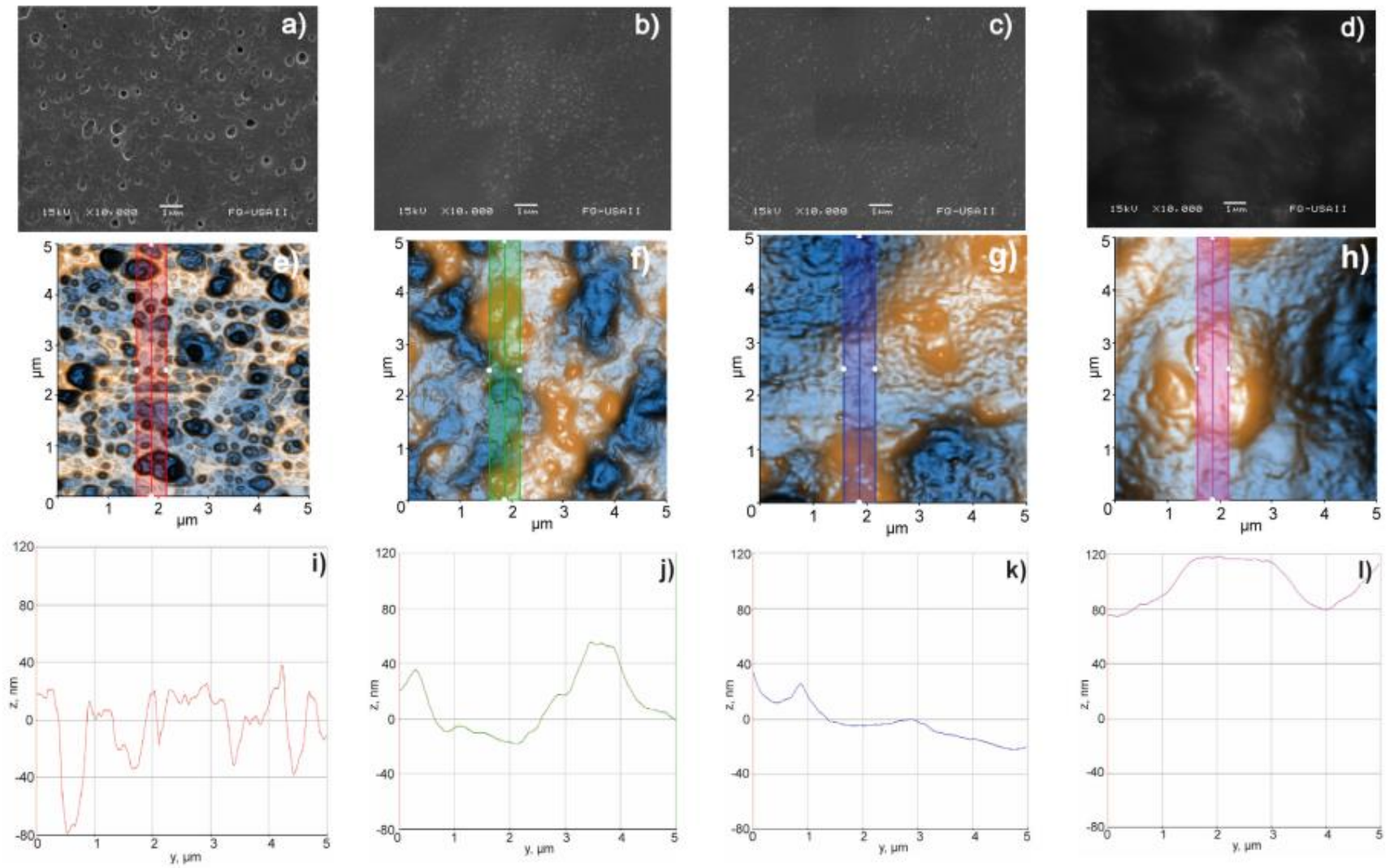


Figura 25. Morfología de la superficie: SEM (a–d), AFM (e–h), rugosidad (i–l). LG: (a,e,i); LG MAS: (b,f,j); LGL: (c,g,k); LGLMAS: (d,h,l).

6.5 Uniformidad de dosis

Para esta prueba LG MAS y LGL MAS fueron evaluados según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos [27]. Se acepta la uniformidad de dosis para formulaciones tópicas cuando la cantidad de activo en no menos de nueve de las diez unidades de dosis analizadas se encuentre dentro del rango de 85.0 a 115.0 %, y ninguna cantidad esté fuera del rango de 75.0 a 125.0% de la cantidad declarada. Además, se establece que el coeficiente de variación no deberá ser superior al 6.0 %. La Tabla 15 enumera los resultados de las muestras analizadas. Se demuestra que la formulación que contiene arcilla cumplió con el requisito de uniformidad de dosis para ambos API. Por el contrario, LG MAS no cumplía este requisito para AS, por lo que se descarta este blanco para los próximos ensayos.

Tabla 15. Uniformidad de dosis de LG MAS y LGL MAS.

Muestra	% Fármacos			
	LG MAS		LGL MAS	
	M	AS	M	AS
1	94.07	54.23	98.53	87.19
2	98.01	45.12	97.27	91.27
3	101.28	42.73	98.83	90.01
4	95.33	55.04	97.97	85.55
5	95.58	51.09	93.74	90.88
6	94.67	55.37	98.35	86.85
7	95.99	51.56	100.43	86.91
8	92.53	51.09	96.09	86.76
9	97.19	45.31	92.70	90.25
10	101.25	47.24	100.90	85.74
Promedio	96.59	49.88	97.48	88.14
SD	2.90	4.51	2.65	2.20
CV	3.00	9.04	2.72	2.50

6.6 Estudios de liberación

La idea inicial de este estudio fue comparar las formulaciones cargadas con los fármacos con y sin laponita para tener una idea clara del efecto de la arcilla sobre la liberación de estos, pero no fue posible por el incumplimiento de la uniformidad de dosis de LG MAS. En la Tabla 15 se ve reflejada la degradación del ascorbato de sodio, como respuesta a su fotosensibilidad. Ismail y colaboradores sugirieron reducciones en el movimiento de esta molécula como estrategia para evitar este fenómeno [26]. En este estudio, únicamente LGL MAS pudo superar dicho desafío debido a la presencia de los discos de

laponita. Sus bordes cargados positivamente atrajeron aniones ascorbato, reduciendo su movimiento. La Tabla 16 muestra los resultados para maltodextrina (M). Aproximadamente el 90% se liberó dentro de las 24 h, siguiendo un modelo de primer orden con un $r^2 = 0.9464$. Las formas sólidas, películas en el caso de este trabajo de investigación, que contienen fármacos hidrófilos (M) en matrices porosas tienden a seguir este perfil, en el que la liberación del principio activo es proporcional a la cantidad de fármaco que queda en su interior, de tal forma que la cantidad de fármaco liberada por unidad de tiempo disminuye [121,122].

Tabla 16. Liberación de los fármacos, modelos de ajuste.

Fármaco	Parámetro	Orden cero $F = kt$	Primer orden $F = 100[1 - e^{-kt}]$	Higuchi $F = kt^{0.5}$	Korsmeyer-Peppas $F = kt^n$
M	r^2	0.6930	0.9464	0.371	0.8612
	k	0.897 ± 0.070	0.376 ± 0.026	10.100 ± 0.472	41.139 ± 1.925
	n	-	-	-	0.183 ± 0.011
AS	r^2	0.9219	0.8848	0.9501	0.9680
	k	0.256 ± 0.007	0.013 ± 0.001	3.575 ± 0.042	6.896 ± 0.402
	n	-	-	-	0.370 ± 0.011

La Figura 26 para M (curva azul) muestra la fracción acumulada del fármaco liberado vs. tiempo. La pendiente (k) describe la velocidad de liberación dependiente del tiempo (ver Tabla 16), según lo definido por Mulye y compañeros. En las primeras horas, la liberación se considera constante y rápida, y describe una correlación lineal, que depende del área de superficie del material que está en contacto con el medio de liberación. Sin embargo, la liberación y la velocidad disminuyeron proporcionalmente al disminuir el área [123]. Este ensayo reforzó la idea de que LGL MAS es una película porosa debido a la presencia de laponita, como se describe en la sección 6.4.4 Efecto Oclusivo. Además, al aplicar LGL MAS como apósito, en las primeras horas el mecanismo de transporte sería rápido y adecuado, permitiendo que la maltodextrina pueda atravesar el tejido dañado y llegar al interno para aportar la energía acelerando el proceso de cicatrización [19]. La liberación del carbohidrato se estudió únicamente durante 144 h porque la señal disminuyó con el tiempo, ya que las alícuotas tomadas para cuantificarlo fueron recompensadas con medio. El método utilizado para esta cuantificación no fue sensible para detectar concentraciones bajas después de este punto.

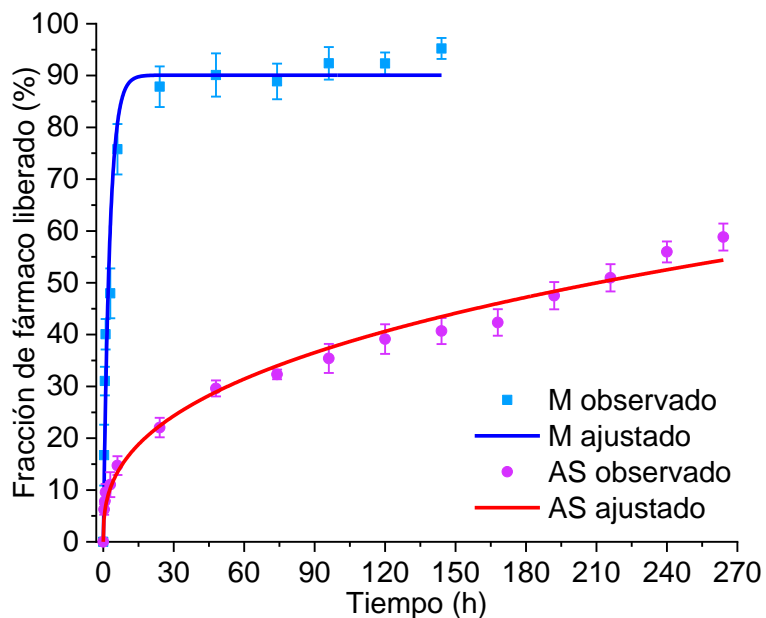


Figura 26. Perfiles de liberación y ajuste para M y AS en LGL MAS.

En la Figura 26 para AS (curva roja), la fracción de fármaco liberado fue aproximadamente del 60% en 264 h y siguió un modelo de ajuste Korsmeyer-Peppas con una $r^2 = 0.9680$ y un valor de $n = 0.370 \pm 0.011$ (ver Tabla 16). El modelo de ajuste proporciona un exponente n , que predice el mecanismo de transporte de fármacos. Para valores $n \leq 0.5$ sigue la difusión de Fick, para $n = 1.0$ es de orden cero y para $0.5 < n < 1.0$ la difusión es un transporte anómalo o no Fickiano [122], n en este ensayo es < 0.5 , por lo tanto, es una difusión de Fick. Otro modelo con un elevado coeficiente de correlación (r^2) en este estudio fue Higuchi, el cual considera que la fracción de fármaco liberado es proporcional a $t^{1/2}$, donde el fármaco transportado está soportado por la difusión de Fick y embebido en una película. Sáez explicó que en estos sistemas el compuesto bioactivo se distribuye uniformemente sobre un soporte polimérico sólido y puede disolverse en la matriz polimérica o dispersarse si su contenido excede el límite de solubilidad [124]. La migración del fármaco al medio se produjo por difusión molecular a través del soporte o por difusión a través de microporos existentes en la matriz polimérica. En este caso, la segunda ley de Fick interpreta el fenómeno de difusión, el cual nos dice que la rapidez del flujo del fármaco es dependiente del tiempo y la curva que representa la cantidad de fármaco liberada vs. tiempo es una elipse, ya que ocurre una disminución en la tasa de migración de la molécula activa con el tiempo, principalmente porque la vía de difusión

disminuye continuamente. El mecanismo de acción principal del ascorbato de sodio en la lesión es reducir el pH de la herida para evitar el crecimiento bacteriano; por esa razón, el fármaco debe permanecer en la zona dañada como lo describió esta prueba.

6.7 Estudio *in vivo*

6.7.1 Sensibilidad a la formulación

Para optimizar y cuidar la vida animal, se utilizó únicamente 6 individuos, el área a estudiar fue dividida en 4 cuadrantes como se muestra en la Figura 27 y fueron numerados como: 1) LGL, 2) LGL MAS, 3 y 4) blancos sin formulación. Se administró 0.1 mL de formulación y se inspeccionó visualmente con frecuencia, en el caso de registrarse algún signo de toxicidad, edema, inflamación e hinchazón hasta las 24 h. Adicionalmente se midió el tiempo que tarda la dispersión en formar la película, el cual fue ≈ 22 min.

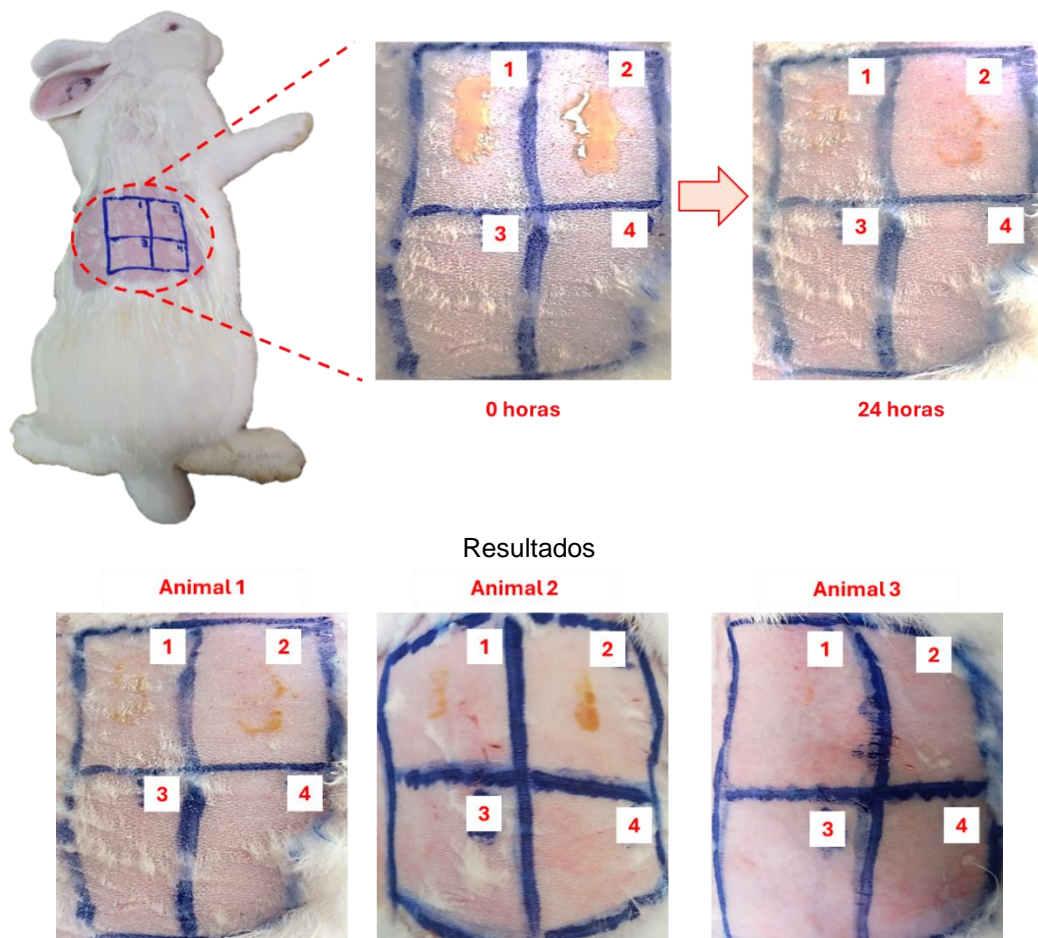


Figura 27. Esquema y resultados del estudio *in vivo* de sensibilidad a la formulación.

Este estudio es importante para conocer la tolerancia de la piel frente a formulaciones dérmicas, ya que existen polímeros y tensoactivos que pueden afectarla mostrando reacciones adversas [125]. Como se puede observar en los resultados de 3 animales de la Figura 27, en ninguno de ellos se percibió cambios en las áreas de piel donde se aplicó la formulación vs. los blancos. Esto se debe principalmente a que los compósitos puestos a prueba están constituidos por macromoléculas que son amigables con la piel como: 1) gelatina, quien es producto de la hidrólisis de la colágena, uno de los principales componentes de la piel [126], adicional otro de los componentes mayoritarios es 2) lecitina, quien es un fosfolípido que se encuentra en la membrana celular [127]. Además, la arcilla, aunque no es un material biodegradable, no presenta toxicidad en la piel y sus productos de degradación pueden ser asimilados y utilizados por la misma en procesos biológicos [128]. Y los fármacos en la formulación LGL MAS presentan sinergismo en procesos de cicatrización [19].

6.7.2 Proceso de cicatrización

Tinción H&E

Se estudio la histología tisular de las lesiones en ratas Wistar, para un mejor análisis las imágenes se dividieron en: 1) control, que corresponden zonas donde no se provocó daño ni aplico formulación, estas imágenes se tomaron como el éxito de una correcta cicatrización, 2) control + herida, para observar la cicatrización propia del individuo sin formulación en el área lesionada 3) LGL y 4) LGL MAS que corresponden a las formulaciones óptimas de la presente investigación, ver la Figura 28. Y las muestras fueron tomadas en los días 0, 1, 3 y 5. Se tomó este rango de tiempo para el estudio ya que en nuevos trabajos de investigación donde se desarrollan apósitos novedosos, señalan que la cicatrización completa de la herida ocurrió al cabo de 5 días [129,130].

La tinción H&E está compuesta de 2 pigmentos que muestras afinidad a ciertos componentes en las células: 1) hematoxilina tiñe de violeta azulado intenso los ribosomas, la cromatina (material genético) dentro del núcleo y otras estructuras. La eosina tiñe de rosa anaranjado o rosado el citoplasma, el colágeno, el tejido conjuntivo y otras estructuras que rodean y sostienen la célula [131].

Las muestras en tiempo 0 fueron de suma importancia para el grupo de investigación ya que nos muestra la pronta formación del coagulo de sangre para evitar hemorragias en las formulaciones con laponita (LGL y LGL MAS) como lo exponen trabajos anteriores [79,98,132], mostrándose en las imágenes una costra en la superficie de la herida, así como también una herida completamente definida. Esto es justificado por la variabilidad de cargas que presenta la arcilla, siendo atractiva de células hemáticas para evitar el sangrado. Este fenómeno no se observa en la herida sin compósito, mostrándose un área completamente irregular sin coagulo.

Al día 1 del estudio, en el tejido con LGL y LGL MAS se continúa observando un coagulo en la superficie y la reepitelización ha dado inicio y se encuentra muy avanzada en comparación a la lesión sin formulación, donde la herida continúa abierta y sin una forma definida. En el área estudiada de LGL se aprecia la angiogénesis, delgados filamentos de color rojo, que corresponden a la formación de capilares para el transporte de nutrientes a la zona afectada, esto no se puede percibir en la LGL MAS ya que la herida se encuentra mucho más cerrada y se puede decir que el proceso de reepiletización fue acelerado por la mezcla de fármacos maltodextrina:ascorbato de sodio.

Para el día 3 las áreas lesionadas donde se aplicó las formulaciones óptimas se encuentran completamente cerradas y los coágulos han desaparecido, únicamente se observa un delgado canal de células en cada una de ellas. A diferencia de la herida sin tratamiento, donde se aprecia que ha iniciado la reepitelización. Además, se observa que la lesión que se produjo al inicio del estudio con un bisturí fue completamente en línea recta, en este punto ha cambiado de forma, y la superficie se percibe como una cavidad ancha sin forma definida, debido al mal proceso de cicatrización que tiene el individuo por sí solo.

Para el día 5 fue muy difícil percibir algún remanente de herida en las muestras con LGL y LGL MAS, las imágenes son muy similares al blanco sin herida y sin formulaciones que se ha venido tomando como control, no así con la lesión que se dejó sin formulación, donde se sigue observando una cavidad. Adicional, en la superficie de cada tejido se

observan rastros de coagulo, esto se debe a que el estudio transcurrió muchos días y los animales se rasgaron el área de la lesión y se produjo eritema.

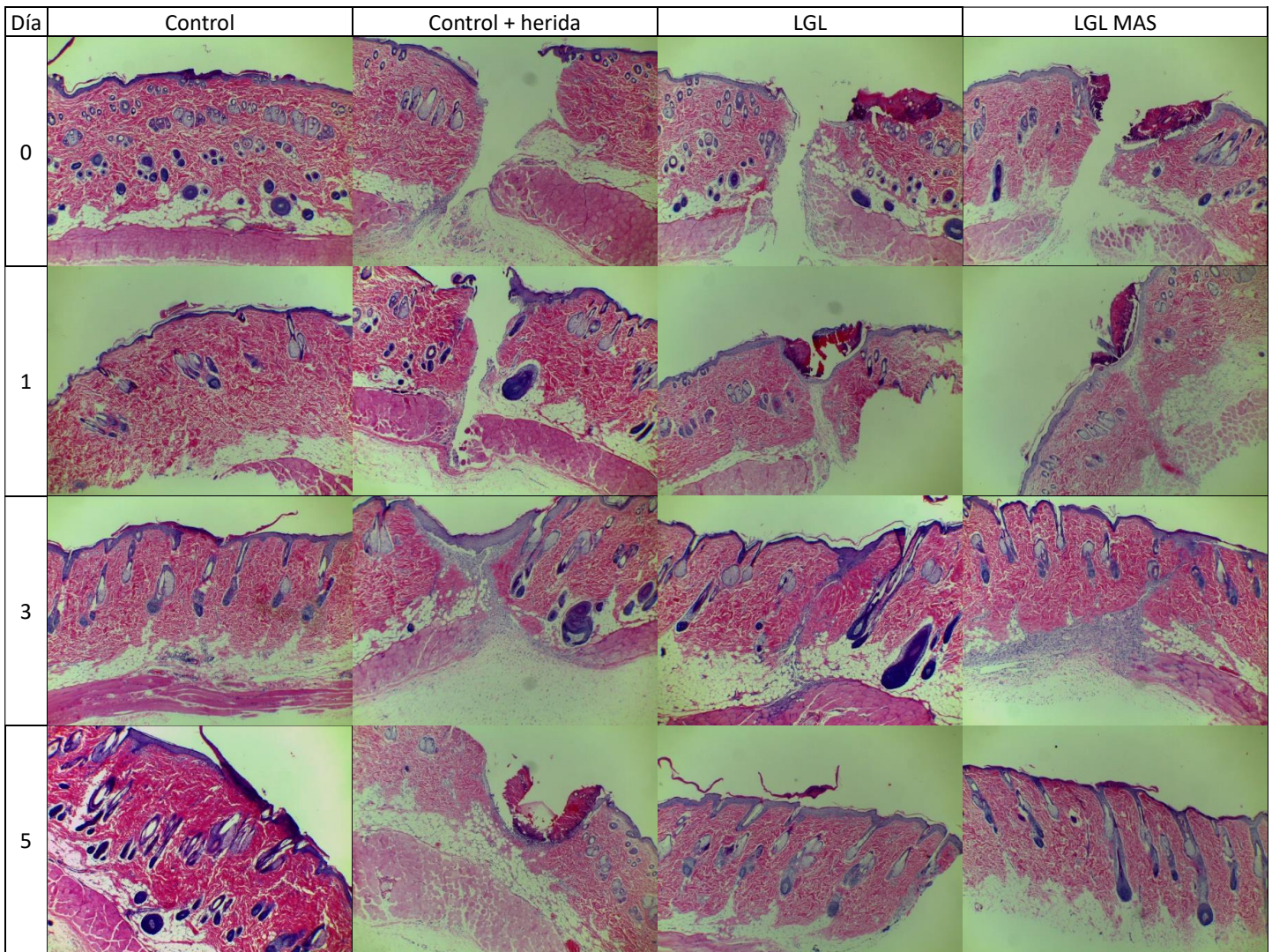


Figura 28. Estudio *in vivo*: Proceso de cicatrización, tinción H&E.

Tinción Tricrómico de Masson

Para un correcto análisis del área lesionada, al realizar los cortes de los tejidos para la tinción H&E, se realizó consecutivamente el corte respectivo para esta tinción. La Tricrómico de Masson se utiliza para teñir las fibras de colágena en rojo-violeta y las fibras elásticas en verde, mientras que las células musculares se tiñen en tonos de rosa o violeta. La técnica también tiñe el núcleo celular en negro o azul oscuro, lo que permite una fácil identificación de las células [133]. Como era de esperarse en este ensayo

también se observó el mismo proceso de cicatrización acelerado en las formulaciones LGL y LGL MAS. El área dañada al día 1 en las formulaciones LGL se observaron filamentos delgados en color verde que corresponde a elastina y gránulos color violeta que corresponde a la colágena, en las LGL MAS únicamente se observa un canal violeta que corresponde al cúmulo de colágena. Al finalizar el estudio se pudo observar tejidos similares al tomado como control, confirmando una correcta cicatrización, mientras que en el control + herida se observa una cavidad ancha delimitadas por fibras de colágena.

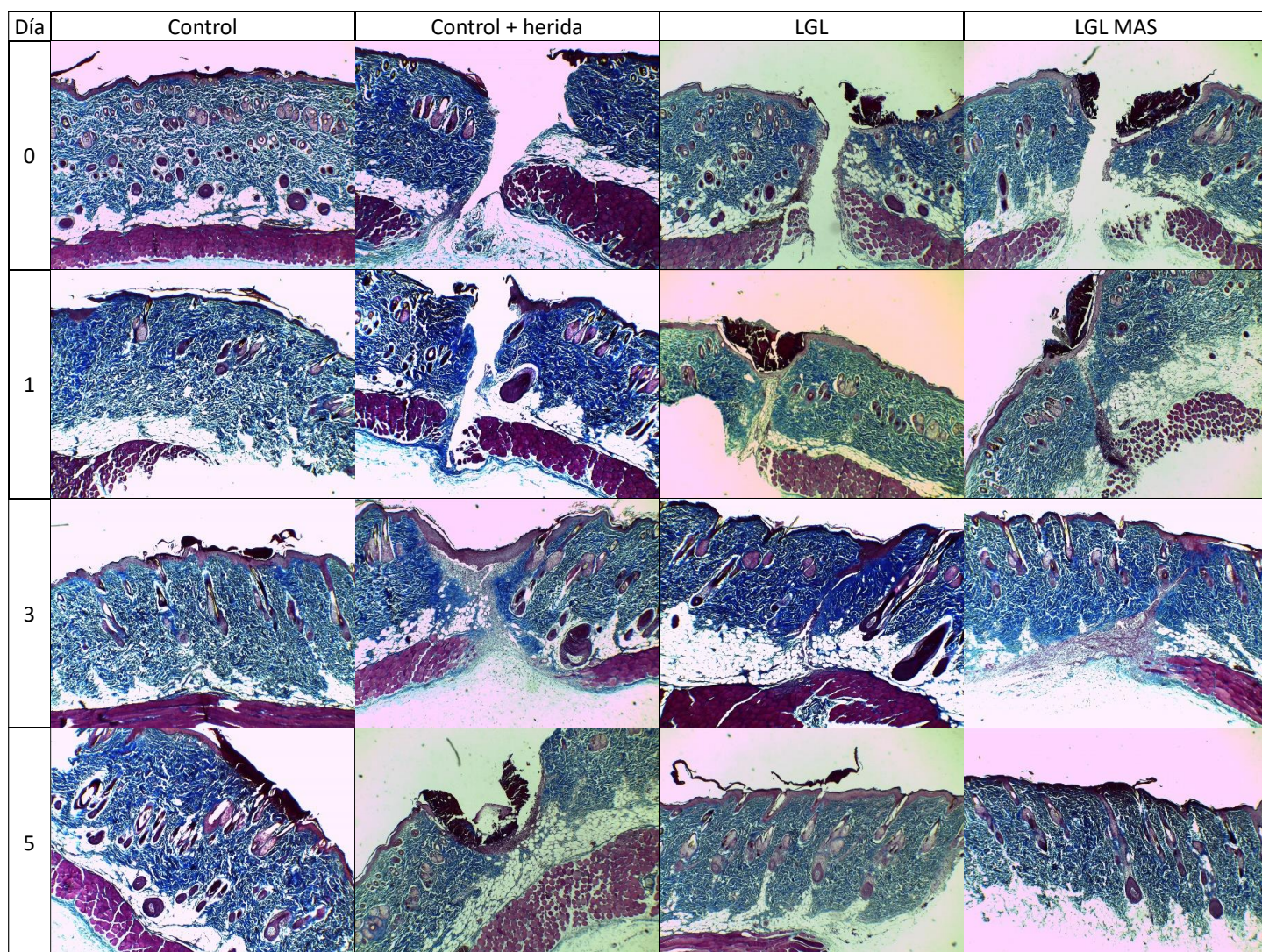


Figura 29. Estudio *in vivo*: Proceso de cicatrización, tinción Tricrómico de Masson.

Con este estudio se puede confirmar que los compósitos innovadores aceleran y estimulan un correcto proceso de cicatrización.

CONCLUSIONES

Los compósitos de laponita que contienen biopolímeros (lecitina:gelatina), tanto vacíos como cargados de fármacos (maltodextrina:ascorbato de sodio), formaron suspensiones capaces de formar películas *in situ*, en 22 min en modelos de conejos de Nueva Zelanda y ratas Wistar, brindando opciones atractivas e innovadoras para su uso como materiales de apósito, en los cuales, la arcilla mejoró significativamente las propiedades fisicoquímicas de las partículas y películas, que es relevante para su uso específico. Así, las suspensiones particuladas óptimas se prepararon mediante el método de desolvatación de gelatina, con 125:100 mg:mg de la mezcla lecitina:gelatina y 8.8 mg de arcilla: vacía (LGL), y otras cargadas con 10:10 mg:mg de maltodextrina:ascorbato de sodio (LGL MAS). Esta cantidad de laponita redujo el tamaño de las partículas a 286.4 ± 28.7 y 391.8 ± 20.7 nm para LGL y LGL MAS, respectivamente. Esto se puede atribuir a su efecto de entrecruzamiento físico. El PDI indicó una población homogénea (<0.3), lo que luego fue observado por TEM. Así también, las dispersiones exhibieron un potencial Z adecuado, capaz de evitar el fenómeno de aglomeración. Además, la arcilla proporcionó a los fluidos estabilidad a la temperatura en un rango de 18 a 50°C, lo que fue confirmado por reología y DSC.

En cuanto a las propiedades de la película, laponita mejoró el módulo elástico y plástico para resistir rupturas en el ambiente externo (propiedades mecánicas). El mineral también aumentó el hinchamiento de las películas hasta 672.46 ± 24.26 y $289.06 \pm 7.73\%$ para cada formulación óptima (LGL y LGL MAS), al mismo tiempo ayudó a mantener la integridad de las películas en agua y disminuyó el efecto oclusivo que se traduce en un incremento del intercambio de gases. Además, la claridad y bioadhesión fueron suficientes para observar el proceso de cicatrización y permanecer en la herida, facilitando también su posterior retiro de la lesión. Como se muestra en la sección de morfología de la superficie, se ha demostrado cómo los discos sintéticos disminuyeron la rugosidad de las películas.

El estudio de liberación de fármacos de LGL MAS, el mecanismo de transporte de la maltodextrina fue rápido y continuo, óptimo para llevar energía a los tejidos internos y

acelerar el proceso de cicatrización. Por el contrario, la liberación del ascorbato de sodio fue lenta, lo que significa que el fármaco permanecería de manera local, lo que reduciría el pH y, por lo tanto, evitaría el crecimiento bacteriano. En cuando al estudio *in vivo*, se pudo concluir que ambas formulaciones óptimas aceleraron e influyeron para que ocurra un correcto proceso de cicatrización. Los sistemas abordados en este estudio representan alternativas interesantes, innovadoras y prometedoras para encapsular fármacos, con potenciales aplicaciones en medicina, especialmente con respecto a apósitos para heridas.

Dentro de las actividades realizadas para obtener el Grado de Doctor se enlistan las siguientes:

- Estancia de investigación en la Universidad de Groningen: Development and characterization of iron/amino acid nanoparticles plus a cover of tannic acid-iron complex for cancer treatment (ANEXO 8).
- Inicio de 2do artículo científico: Adsorption of soy lecithin on laponite EP and RD (ANEXO 9).
- Artículo científico, DOI: 10.3390/pharmaceutics15061634, (ANEXO 10).

PERSPECTIVAS

- En el desarrollo de los compósitos se recomienda adicionar un plastificante, específicamente un alcohol de cadena corta, para mejorar la bioadhesión en piel seca y la elasticidad de la película.
- Para conocer a precisión el mecanismo de acción de los compósitos se sugiere realizar los estudios *in vitro* en células.
- En base al estudio *in vivo* realizado en la presente investigación, se recomienda repetir el mismo, en donde las muestras sean tomadas con menos tiempo, así como también realizar el respectivo análisis inmunohistoquímico, para observar marcadores de inflamación y reepitelización, ya que la bibliografía señala que, en ratas con heridas epidérmicas superficiales sin tratamiento, las 2 primeras fases del proceso de cicatrización finalizan a los 7 días [134], mientras que estudios actuales con el uso de la nanotecnología aceleran el paso de las mismas a un tiempo no mayor de 4 días [129,130]. Además, el uso de la inmunohistoquímica nos ayudará a realizar un estudio semicuantitativo del tejido lesionado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Vowden K, Vowden P. Wound dressings: principles and practice. Surgery (United Kingdom) [Internet]. 2017;35:489–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.005>
2. Madrid Martínez A, Santillan Reyes ER. Caracterización fisicoquímica y biológica de un biopolímero obtenido por irradiación gamma a base de quitosano y poloxámero. Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
3. Gupta B, Agarwal R, Alam MS. Hydrogels for wound healing applications [Internet]. Biomedical Hydrogels. Woodhead Publishing Limited; 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857091383.2.184>
4. Vela-Anaya G, Stegensek-Mejía EM, Leija-Hernández C. Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. Revista de Enfermería del Instituto Mexicano del Seguro Social [Internet]. 2018;26:105–14. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/enfermeriaimss/eim-2018/eim182g.pdf>
<http://www.medigraphic.com/pdfs/enfermeriaimss/eim-2018/eim182g.pdf>
5. Gómez BP. Síndrome metabólico y sus complicaciones: el pie diabético. Facultad de Medicina UNAM Mexico. 2017;60:7–18.
6. Rojas R, Basto A, Aguilar C, Zárate E, Villalpando S, Barrientos T. Prevalence of previously diagnosed diabetes mellitus in Mexico. Salud Publica Mex. 2018;60:224–32.
7. Gilaberte Y, Prieto-Torres L, Pastushenko I, Juarranz Á. Anatomy and Function of the Skin [Internet]. Nanoscience in Dermatology. Elsevier Inc.; 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
8. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. Exp Dermatol. 2016;25:92–8.
9. McGrath JA, Uitto J. Anatomy and Organization of Human Skin. Rook's Textbook of Dermatology: Eighth Edition. 2010;1:34–86.
10. Castellanos Ramirez DK, Gonzalez Villordo D, Gracia Bravo LJ. Manejo de heridas. Cirujano General [Internet]. 2005;27:164–7. Available from: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1103>

11. Gaskell E, Hamilton A. Antimicrobial clay-based materials for wound care. *Future Medical Chemistry*. 2014;6:641–55.
12. Tomás H, Alves CS, Rodrigues J. Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications? *Nanomedicine* [Internet]. 2018;14:2407–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.04.016>
13. Ghadiri M, Chrzanowski W, Lee WH, Rohanzadeh R. Layered silicate clay functionalized with amino acids: Wound healing application. *RSC Adv*. 2014;4:35332–43.
14. Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanzadeh R. Antibiotic eluting clay mineral (Laponite®) for wound healing application: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25:2513–26.
15. BYK Additives & Instruments. Laponite: performance additives [Internet]. Technical Information B-RI 21. 2014. p. 22. Available from: https://www.byk.com/.../BYK_B-RI21_LAPONITE_EN.pdf
16. Golafshan N, RezaHasani R, Tarkesh Esfahani M, Kharaziha M, Khorasani SN. Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material. *Carbohydr Polym*. 2017;176:392–401.
17. Teng L, Xia K, Qian T, Hu Z, Hong L, Liao Y, et al. Shape-Recoverable Macroporous Nanocomposite Hydrogels Created via Ice Templating Polymerization for Noncompressible Wound Hemorrhage. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022;
18. Rajabi N, Kharaziha M, Emadi R, Zarrabi A, Mokhtari H, Salehi S. An adhesive and injectable nanocomposite hydrogel of thiolated gelatin/gelatin methacrylate/Laponite® as a potential surgical sealant. *J Colloid Interface Sci*. 2020;564:155–69.
19. Cruz-Castañeda O, Cano-Colín S, Pat L, Salgado RM, Krötzsch E, Elizondo-Vázquez F, et al. Maltodextrin/ascorbic acid stimulates wound closure by increasing collagen turnover and TGF- β 1 expression in vitro and changing the stage of inflammation from chronic to acute in vivo. *J Tissue Viability*. 2017;26:131–7.
20. Avaltroni F, Bouquerand PE, Normand V. Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. *Carbohydr Polym*. 2004;58:323–34.
21. Vitamin C: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2022 May 18]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00126>

22. Kennedy JF, Knill CJ, Taylor DW. Maltodextrins. LC-GC North America [Internet]. 1995 [cited 2022 May 18];22:65–82. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-2159-4_3
23. Negrão-Murakami AN, Nunes GL, Pinto SS, Murakami FS, Amante ER, Petrus JCC, et al. Influence of DE-value of maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *LWT - Food Science and Technology*. 2017;79:561–7.
24. Radosta S, Schierbaum F, Reuther F, Anger H. Polymer-Water Interaction of Maltodextrins. Part I: Water Vapour Sorption and Desorption of Maltodextrin Powders. *Starch - Stärke* [Internet]. 1989 [cited 2022 May 18];41:395–401. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/star.19890411008>
25. Wangsakan A, Chinachoti P, McClements DJ. Isothermal titration calorimetry study of the influence of temperature, pH and salt on maltodextrin–anionic surfactant interactions. *Food Hydrocoll*. 2006;20:461–7.
26. Ismail Y, Mauer LJ. Phase transitions of ascorbic acid and sodium ascorbate in a polymer matrix and effects on vitamin degradation. *J Food Process Eng*. 2020;43.
27. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, tomo 1. Unidécima*. 2020.
28. Stein HB, Hasan A, Fox IH. Ascorbic acid induced uricosuria. A consequence of megavitamin therapy. *Ann Intern Med*. 1976;84:385–8.
29. Benson H, Watkinson A. *Transdermal and Topical Drug Delivery, Principles and Practice*. Primera. Benson H, Watkinson A, editors. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2012.
30. Guy RH, Hadgraft J. *Transdermal Drug Delivery*. Segunda. Guy RH, Hadgraft J, editors. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2003.
31. Moss GP, Dearden JC, Patel H, Cronin MTD. Quantitative structure – permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. 2002;16:299–317.
32. Serrano Catañeda P. *Desarrollo de una nueva forma farmacéutica a base de microagujas poliméricas biodegradables acopladas a un parche transdermico para la liberación de fármacos*. Universidad Autónomas Metropolitana Unidad Xochimilco; 2018.

33. Snejdrova E, Loskot J, Veris A, Kastner P, Andrys R. Formulation study of PLGA in situ films for topical delivery of salicylates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [Internet]. 2024;199:114282. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641124001085>
34. Kathe K, Kathpalia H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2017;12:487–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.004>
35. Scholz MS, Blanchfield JP, Bloom LD, Coburn BH, Elkington M, Fuller JD, et al. The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: A review. *Compos Sci Technol*. 2011. p. 1791–803.
36. Marfil PHM, Anhê ACBM, Telis VRN. Texture and Microstructure of Gelatin/Corn Starch-Based Gummy Confections. *Food Biophys*. 2012;7:236–43.
37. Azarmi S, Huang Y, Chen H, McQuarrie S, Abrams D, Roa W, et al. Optimization of a two-step desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2006;9:124–32.
38. Sahoo N, Sahoo RK, Biswas N, Guha A, Kuotsu K. Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. *Int J Biol Macromol*. 2015;81:317–31.
39. Xue J, Zhong Q. Blending lecithin and gelatin improves the formation of thymol nanodispersions. *J Agric Food Chem*. 2014;62:2956–62.
40. Phone-Poulenc R. Lecithin. *ARMIN WENDEL*. 2014;1–19.
41. Ries HR, Matsumoto M, Uyeda N, Suito E. Electron Microscope Studies of Monolayers of Lecithin. *Advances in Chemistry; American Chemical Society*. 1974;1:286–229.
42. Urbán-Morlán Z, Ganem-Rondero A, Melgoza-Contreras LM, Escobar-Chávez JJ, Nava-Arzaluz MG, Quintanar-Guerrero D. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing cyclosporine by the emulsification-diffusion method. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:611–20.
43. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 2018;10:1–17.

44. R. Pecora. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research*. 2000;2:123–31.
45. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12:255–64.
46. Sohn S, Kim D. Modification of Langmuir isotherm in solution systems - Definition and utilization of concentration dependent factor. *Chemosphere*. 2005;58:115–23.
47. Kaouah F, Boumaza S, Berrama T, Trari M, Bendjama Z. Preparation and characterization of activated carbon from wild olive cores (oleaster) by H₃PO₄ for the removal of Basic Red 46. *J Clean Prod* [Internet]. 2013;54:296–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.04.038>
48. Singh M, Hakimabadi SG, Van Geel PJ, Carey GR, Pham ALT. Modified competitive Langmuir model for prediction of multispecies PFAS competitive adsorption equilibria on colloidal activated carbon. *Sep Purif Technol*. 2024;345.
49. Mezger T. *The Rheology Handbook*. The Rheology Handbook. 2020.
50. Zhang C, Chen L, Teng H. Phase behavior of the gelation process of myofibrillar protein-curdlan blended system: Discussion based on rheology and gel properties. *Food Chem*. 2024;437.
51. Derkach SR, Voron'ko NG, Sokolan NI, Kolotova DS, Kuchina YA. Interactions between gelatin and sodium alginate: UV and FTIR studies. *J Dispers Sci Technol* [Internet]. 2020;41:690–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1611437>
52. Saji R, Ramani A, Gandhi K, Seth R, Sharma R. Application of FTIR spectroscopy in dairy products: A systematic review. *Food and Humanity*. 2024;2:100239.
53. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degree of crosslinking. 2001;22:3–8.
54. Wihodo M, Moraru CI. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. *J Food Eng*. Elsevier Ltd; 2013. p. 292–302.

55. Easdani M, Ahammed S, Saqib MN, Liu F, Zhong F. Engineering biodegradable controlled gelatin-zein bilayer film with improved mechanical strength and flexibility. *Food Hydrocoll.* 2024;148.
56. Lynch JM, Corniuk RN, Brignac KC, Jung MR, Sellona K, Marchiani J, et al. Differential scanning calorimetry (DSC): An important tool for polymer identification and characterization of plastic marine debris. *Environmental Pollution.* 2024;346.
57. Merdun H, Yıldırım M. Pyrolysis and combustion of industrial hemp, coal and their blends for thermal analysis by thermogravimetric analysis/Fourier transform infrared spectrometer. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy* [Internet]. 2024; Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0734242X241241604>
58. Yusoff Y, Sann TE. Biomass-plastic fusion: In-depth characterization through FTIR and TGA analysis. *Mater Today Proc.* 2024;
59. Vernon-Parry KD. Scanning Electron Microscopy : An introduction. *III-Vs Review.* 2000;13:40–4.
60. Clavijo J. Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos.* 2013;3.
61. Agrawal M, Prasad V, Nijhawan G, Jalal SS, Rajalakshmi B, Dwivedi SP. A Comprehensive Review of Electron Microscopy in Materials Science: Technological Advances and Applications. Msomi V, Ngonda T, editors. *E3S Web of Conferences* [Internet]. 2024;505:01029. Available from: <https://www.e3s-conferences.org/10.1051/e3sconf/202450501029>
62. Ganser C, Uchihashi T. Measuring mechanical properties with high-speed atomic force microscopy. *Microscopy.* Oxford University Press; 2024. p. 14–21.
63. Liu S, Han Y, Kong L, Wang G, Ye Z. Atomic force microscopy in disease-related studies: Exploring tissue and cell mechanics. *Microsc Res Tech.* John Wiley and Sons Inc; 2024. p. 660–84.
64. Villarino NF, Landoni MF. Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. *Analecta Vet.* 2006;26:28–37.

65. García MaA, Soberón E, Cortés M, Rodríguez R, Herrera JL, Alcantara A. Guía de validación de métodos analíticos (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.). 2002;132.
66. Pineda-Álvarez RA, Bernad-Bernad MJ, Rodríguez-Cruz IM, Escobar-Chávez JJ. Development and Characterization of Starch/Gelatin Microneedle Arrays Loaded with Lecithin–Gelatin Nanoparticles of Losartan for Transdermal Delivery. *J Pharm Innov.* 2020;
67. Rasouli M. Characterization and improvement of phenol-sulfuric acid microassay for glucose-based glycogen. 2020;2020–4.
68. Lenhardt R, Sessler DI. Estimation of mean body temperature from mean skin and core temperature. *Anesthesiology.* 2006;105:1117–21.
69. Ludwig N, Formenti D, Gargano M, Alberti G. Skin temperature evaluation by infrared thermography: Comparison of image analysis methods. *Infrared Phys Technol* [Internet]. 2014;62:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.infrared.2013.09.011>
70. López García M del R. Preparación y caracterización de nanopartículas lipídicas y evaluación de su efecto sobre la piel.
71. Bergaya F, Theng BKG, Lagaly G, editors. *Handbook of Clay Science.* Elsevier. Amsterdam: Elsevier; 2012.
72. Bergaya F, Theng BKG, Lagaly G, editors. *Handbook of Clay Science* [Internet]. Elsevier. *Dev Clay Sci.* Amsterdam: Elsevier; 2006. Available from: <http://books.google.com/books?id=uVbam9Snw5sC&pgis=1>
73. Jin Y, Chai W, Huang Y. Printability study of hydrogel solution extrusion in nanoclay yield-stress bath during printing-then-gelation biofabrication. *Materials Science & Engineering C* [Internet]. 2017;80:313–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.144>
74. Mamataliev N, Kalbaev A, Eshmetov I, Kuldasheva S. Comparison of physicochemical and adsorption properties of intercalated bentonite and laponite. *PROBLEMS IN THE TEXTILE AND LIGHT INDUSTRY IN THE CONTEXT OF INTEGRATION OF SCIENCE AND INDUSTRY AND WAYS TO SOLVE THEM: PTLICISIWS-2.* AIP Publishing; 2024. p. 030058.

75. Huerta-Ángeles G, Kanizsová L, Mielczarek K, Konefał M, Konefał R, Hodan J, et al. Sustainable aerogels based on biobased poly (itaconic acid) for adsorption of cationic dyes. *Int J Biol Macromol*. 2024;259.
76. Zhang H, Zheng Y, Wang H, Chang N. Preparation of starch-based adsorbing-flocculating bifunctional material St-A/F and its removal of active, direct and disperse dyes from textile printing and dyeing wastewater. *Polymer Bulletin*. 2024;81:2777–800.
77. Pineda R. Desarrollo y caracterización de microagujas poliméricas biodegradables cargadas con nanopartículas de lecitina/gelatina/losartán como novedosa alternativa a la vía oral para el control de la hipertensión arterial. 2020.
78. Coester C, Langer K, Von Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation-a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul*. 2000;17:187–93.
79. Gaharwar AK, Avery RK, Assmann A, Paul A, McKinley GH, Khademhosseini A, et al. Shear-Thinning Nanocomposite Hemorrhage. 2014;
80. Martucci JF, Accareddu AEM, Ruseckaite RA. Preparation and characterization of plasticized gelatin films cross-linked with low concentrations of Glutaraldehyde. *J Mater Sci*. 2012;47:3282–92.
81. López-Angulo D, Bittante AMQB, Luciano CG, Ayala-Valencia G, Flaker CHC, Djabourov M, et al. Effect of Laponite® on the structure, thermal stability and barrier properties of nanocomposite gelatin films. *Food Biosci* [Internet]. 2020;35:100596. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100596>
82. Valencia GA, Luciano CG, Lourenço RV, do Amaral Sobral PJ. Microstructure and physical properties of nano-biocomposite films based on cassava starch and laponite. *Int J Biol Macromol*. 2018;107:1576–83.
83. Berthet M, Gauthier Y, Lacroix C, Verrier B, Monge C. Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? *Trends Biotechnol* [Internet]. 2017;35:770–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779917301130>
84. Naderi N, Karponis D, Mosahebi A, Seifalian AM. Nanoparticles in wound healing; from hope to promise, from promise to routine. *Frontiers in Bioscience - Landmark*. 2018;23:1038–59.

85. Ding J, Venkatesan R, Zhai Z, Muhammad W, Nakkala JR, Gao C. Micro- and nanoparticles-based immunoregulation of macrophages for tissue repair and regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2020;192:111075. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111075>
86. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12:255–64.
87. García-Guzmán P, Medina-Torres L, Calderas F, Bernad-Bernad MJ, Gracia-Mora J, Mena B, et al. Characterization of hybrid microparticles/Montmorillonite composite with raspberry-like morphology for Atorvastatin controlled release. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2018;167:397–406. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.020>
88. Becher TB, Mendonça MCP, De Farias MA, Portugal R V., De Jesus MB, Ornelas C. Soft Nanohydrogels Based on Laponite Nanodiscs: A Versatile Drug Delivery Platform for Theranostics and Drug Cocktails. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10:21891–900.
89. Finotelli PV. Microencapsulation of Ascorbic Acid in Maltodextrin and Capsul Using Spray-. 2016;
90. Yang JH, Lee SY, Han YS, Park KC, Choy JH. Efficient transdermal penetration and improved stability of L-ascorbic acid encapsulated in an inorganic nanocapsule. *Bull Korean Chem Soc*. 2003;24:499–503.
91. Minjares-Fuentes R, Medina-Torres L, González-Laredo RF, Rodríguez-González VM, Eim V, Femenia A. Influence of water deficit on the main polysaccharides and the rheological properties of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) mucilage. *Ind Crops Prod*. 2017;109:644–53.
92. Blanco-López M, González-Garcinuño Á, Tabernero A, Martín Del Valle EM. Steady and Oscillatory Shear Flow Behavior of Different Polysaccharides with Laponite ®. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/polym13060966>
93. Liu P, Du M, Leong YK, Clode P, Liu J. Spherical metal oxides-LAPONITE® sheets interactions: Microstructure, rheology and thixotropy of composite gels. *Appl Clay Sci*. 2021;208.

94. Vanin FM, Sobral PJA, Menegalli FC, Carvalho RA, Habitante AMQB. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. 2005;19:899–907.
95. Negrete-Herrera N, Putaux JL, David L, De Haas F, Bourgeat-Lami E. Polymer/laponite composite latexes: Particle morphology, film microstructure, and properties. *Macromol Rapid Commun.* 2007;28:1567–73.
96. Al-Hassan AA, Norziah MH. Starch-gelatin edible films : Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2012;26:108–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.015>
97. Savencu I, Iurian S, Porfire A, Bogdan C, Tomuță I. Review of advances in polymeric wound dressing films. *React Funct Polym.* Elsevier B.V.; 2021.
98. Li C, Mu C, Lin W, Ngai T. Gelatin Effects on the Physicochemical and Hemocompatible Properties of Gelatin/PAAm/Laponite Nanocomposite Hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7:18732–41.
99. Castro N, Durrieu V, Raynaud C, Rouilly A. Influence of DE-value on the physicochemical properties of maltodextrin for melt extrusion processes. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2016;144:464–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.004>
100. Vivcharenko V, Benko A, Palka K, Wojcik M, Przekora A. Elastic and biodegradable chitosan/agarose film revealing slightly acidic pH for potential applications in regenerative medicine as artificial skin graft. *Int J Biol Macromol.* 2020;164:172–83.
101. Teeranachaideekul V, Boonme P, Souto EB, Müller RH, Junyaprasert VB. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *Journal of Controlled Release.* 2008;128:134–41.
102. Nasab ME, Takzaree N, Saffaria PM, Partoazar A. In vitro antioxidant activity and in vivo wound-healing effect of lecithin liposomes: A comparative study. *J Comp Eff Res.* 2019;8:633–43.
103. Wissing SA, Mü RH. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties [Internet]. *Int J Pharm.* 2002. Available from: www.elsevier.com/locate/ijpharm

104. Li X, Ma M, Ahn DU, Huang X. Preparation and characterization of novel eggshell membrane-chitosan blend films for potential wound-care dressing: From waste to medicinal products. *Int J Biol Macromol*. 2019;123:477–84.
105. Pan N, Qin J, Feng P, Song B. Window screen inspired fibrous materials with anisotropic thickness gradients for improving light transmittance. *Nanoscale*. 2019;11:13521–31.
106. Kaygusuz H, Torlak E, Akın-Evingür G, Özen İ, von Klitzing R, Erim FB. Antimicrobial cerium ion-chitosan crosslinked alginate biopolymer films: A novel and potential wound dressing. *Int J Biol Macromol*. 2017;105:1161–5.
107. Khanlari S, Dubé MA. Bioadhesives: A review. *Macromol React Eng*. 2013;7:573–87.
108. Waring M, Rippon M, Bielfeldt S, Brandt M. Cell attachment to adhesive dressings: Qualitative and quantitative analysis. *Wounds UK* [Internet]. 2008;4:35–47. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/242557299>
109. Blacklow SO, Li J, Freedman BR, Zeidi M, Chen C, Mooney DJ. Bioinspired mechanically active adhesive dressings to accelerate wound closure. *Synth Biol* [Internet]. 2019;5:1–9. Available from: <https://www.science.org>
110. Arilla E, Igual M, Martínez Monzó J, Codoñer Franch P, García Segovia P. Impact of Resistant Maltodextrin Addition on the Orange Juice. *Foods*. 2020;1832:1–9.
111. Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007;39:549–59.
112. Pálková H, Madejová J, Zimowska M, Serwicka EM. Laponite-derived porous clay heterostructures: II. FTIR study of the structure evolution. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2010;127:237–44.
113. Hamid-Akash MS, Rehman K. *Drug Stability and Chemical Kinetics*. Drug Stability and Chemical Kinetics. Springer Singapore; 2020.
114. Varnik F, Baschnagel J, Binder K. Static and dynamic properties of supercooled thin polymer films. *European Physical Journal E*. 2002;8:175–92.
115. Sobral PJA, Habitante AMQB. Phase transitions of pigskin gelatin. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2001;15:377–82. Available from: www.elsevier.com/locate/foodhyd

116. Abrusci C, Martín-González A, Del Amo A, Catalina F, Bosch P, Corrales T. Chemiluminescence study of commercial type-B gelatines. *J Photochem Photobiol A Chem.* 2004;163:537–46.
117. Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Antibiotic eluting clay mineral (Laponite®) for wound healing application: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25:2513–26.
118. Nurhadi B, Roos YH, Maidannyk V. Physical properties of maltodextrin de 10: Water sorption, water plasticization and enthalpy relaxation. *J Food Eng.* 2016;174:68–74.
119. Ziderman II, Gregorski KS, Lopez S V, Friedman M. Thermal interaction of ascorbic acid and sodium ascorbate with proteins in relation to nonenzymatic Browning and Maillard reactions of foods. *Food Chem [Internet].* 1989;37:1480–6. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
120. Hellio-Serughetti D, Djabourov M. Gelatin hydrogels cross-linked with bisvinyl sulfonemethyl. 2. The physical and chemical networks. *Langmuir.* 2006;22:8516–22.
121. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2001;13:123–33.
122. Kalam M, Humayun M, Parvez N, Yadav S, Garg A, Amin S, et al. Release kinetics of modified pharmaceutical dosage forms: a review. *Continental J Pharmaceutical Sciences.* 2007;1:30–5.
123. Mulye N V, Turco SJ. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dihydrate matrices. *Drug Dev Ind Pharm.* 1995;21:943–53.
124. Sáez V, Hernández E, Sanz Angulo L. Mecanismos de liberación de fármaco desde materiales poliméricos. *Revista Iberoamericana de Polímeros.* 2004;5:55–70.
125. Shahid M, Hussain A, Khan AA, Alanazi AM, Alaofi AL, Alam M, et al. Antifungal Cationic Nanoemulsion Ferrying Miconazole Nitrate with Synergism to Control Fungal Infections: In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Evaluations. *ACS Omega.* 2022;7:13343–53.
126. Schrieber, Reinhard; Gareis H. *Gelatine Handbook.* Wiley-VCH. 2007.
127. Le NTT, Cao V Du, Nguyen TNQ, Le TTH, Tran TT, Thi TTH. Soy lecithin-derived liposomal delivery systems: Surface modification and current applications. *Int J Mol Sci.* MDPI AG; 2019.

128. Das SS, Neelam, Hussain K, Singh S, Hussain A, Faruk A, et al. Laponite-based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Curr Pharm Des.* 2019;25:424–43.
129. Li J, Han J, Yu W, Wang K, Liu Z, Liu Y. Alginate-modulated continuous assembly of iron/tannic acid composites as photothermally responsive wound dressings for hemostasis and drug resistant bacteria eradication. *Int J Biol Macromol.* 2023;242.
130. Ahmadian Z, Correia A, Hasany M, Figueiredo P, Dobakhti F, Eskandari MR, et al. A Hydrogen-Bonded Extracellular Matrix-Mimicking Bactericidal Hydrogel with Radical Scavenging and Hemostatic Function for pH-Responsive Wound Healing Acceleration. *Adv Healthc Mater.* 2021;10.
131. Chen Z, Yuan M, Li H, Li L, Luo B, Lu L, et al. Succinylated chitosan derivative restore HUVEC cells function damaged by TNF- α and high glucose in vitro and enhanced wound healing. *Int J Biol Macromol.* 2024;265.
132. Baker SE, Sawvel AM, Zheng N, Stucky GD. Controlling bioprocesses with inorganic surfaces: Layered clay hemostatic agents. *Chemistry of Materials.* 2007;19:4390–2.
133. Assaw S. The use of modified Massion's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study [Internet]. *Malays J Vet Res (Putrajaya).* 2012. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/263542834>
134. Vidinsk[̄] B, Gál P, Toporcer T, Longauer F, Lenhardt ^a, Bobrov N, et al. Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats [Internet]. Available from: <http://www.vfu.cz/acta-vet/actavet.htm>
135. Liu S, Zhang M, Jin H, Wang Z, Liu Y, Zhang S, et al. Iron-Containing Protein-Mimic Supramolecular Iron Delivery Systems for Ferroptosis Tumor Therapy. *J Am Chem Soc.* 2023;145:160–70.
136. Li S, Zhang Y, Jin H, Gao H, Liu S, Shi W, et al. Biomimetic dual-nanozymes with catalytic cascade reactions against diabetic wound infection. *J Colloid Interface Sci.* 2023;651:319–33.
137. Pucci C, Martinelli C, De Pasquale D, Battaglini M, Di Leo N, Degl'Innocenti A, et al. Tannic Acid-Iron Complex-Based Nanoparticles as a Novel Tool against Oxidative Stress. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022;14:15927–41.

138. He M, Du C, Xia J, Zhang ZG, Dong CM. Multivalent Polypeptide and Tannic Acid Cooperatively Iron-Coordinated Nanohybrids for Synergistic Cancer Photothermal Ferroptosis Therapy. *Biomacromolecules*. 2022;23:2655–66.
139. Gonzaga V de AM, Poli AL, Gabriel JS, Tezuka DY, Valdes TA, Leitão A, et al. Chitosan-laponite nanocomposite scaffolds for wound dressing application. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108:1388–97.
140. Rouf TB, Schmidt G, Kokini JL. Zein–Laponite nanocomposites with improved mechanical, thermal and barrier properties. *J Mater Sci*. 2018;53:7387–402.
141. Olivera N, Rouf TB, Bonilla JC, Carriazo JG, Dianda N, Kokini JL. Effect of LAPONITE® addition on the mechanical, barrier and surface properties of novel biodegradable kafirin nanocomposite films. *J Food Eng*. 2019;245:24–32.
142. Bosch Ojeda C, Sanchez Rojas F. Recent developments in derivative ultraviolet/visible adsorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*. 2004;518:1–24.
143. Bosch Ojeda C, Sanchez Rojas F. Recent applications in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry : 2009–2011. A review. *Microchemical Journal* [Internet]. 2013;106:1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.012>
144. Harron DWG. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: The ICH Process. *The Textbook of Pharmaceutical Medicine*. 2013;1994:447–60.
145. Aubry T, Bossard F, Moan M. Laponite Dispersions in the Presence of an Associative Polymer. *American Chemical Society*. 2002;18:155–9.

ANEXOS

10.1 ANEXO 1. Validación del método analítico de ascorbato de sodio en agua destilada

Humedad ascorbato de sodio

	Humedad (%)
1	0.109
2	0.117
3	0.115
4	0.116
5	0.115
6	0.115
Promedio	0.115
SD	0.003

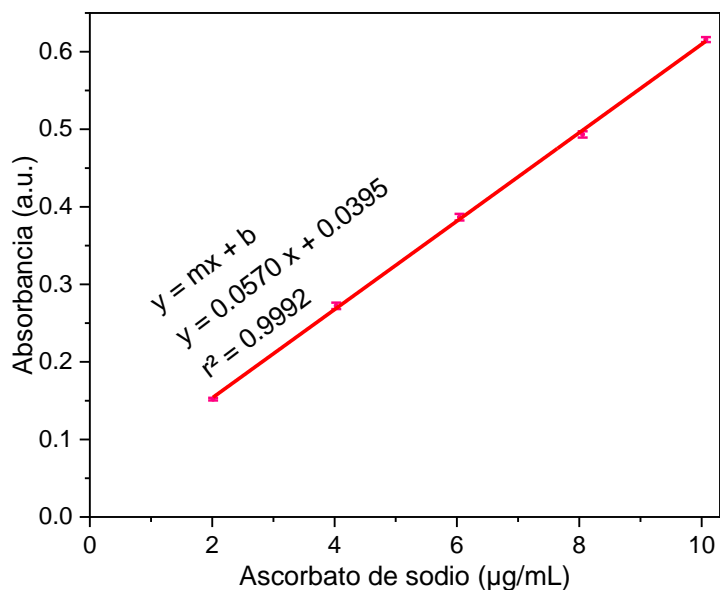
1.1.9.10 Precisión del sistema

	ABS (267 nm)
	0.391
	0.401
	0.407
	0.394
	0.402
	0.399
Promedio:	0.399
SD:	0.006
CV (%):	1.4

CV no exceda el 1.5%.

Linealidad sistema

Concentración (µg/mL)	ABS (267 nm)
2.0	0.154
2.0	0.151
2.0	0.151
4.0	0.269
4.0	0.271
4.0	0.277
6.0	0.388
6.0	0.39
6.0	0.382
8.0	0.494
8.0	0.489
8.0	0.497
10.1	0.618
10.1	0.617
10.1	0.612
m	0.0570
b	0.0395
r ²	0.9992



$r^2 \geq 0.98$.

Cálculo del intervalo de confianza de la pendiente:

$$IC(m) = m \pm (t_{0.975, n-2} * SD_m) = 0.0570 \pm (2.160 * 0.0004) = 0.0561; 0.0580 \text{ mL}/\mu\text{g}$$

El rango no incluye el valor cero.

1.1.9.11 Exactitud y repetibilidad del método

Masa adicionada (mg)	Masa recuperada (mg)	% Recobro
101.1	102.4	101.29
102.8	100.1	97.37
100.4	99.2	98.80
97.2	97.3	100.10
99.2	97.8	98.59
100	98.1	98.10
	Promedio	99.04
	SD	1.42
	CV (%)	1.4

El valor de CV no excede el 2%.

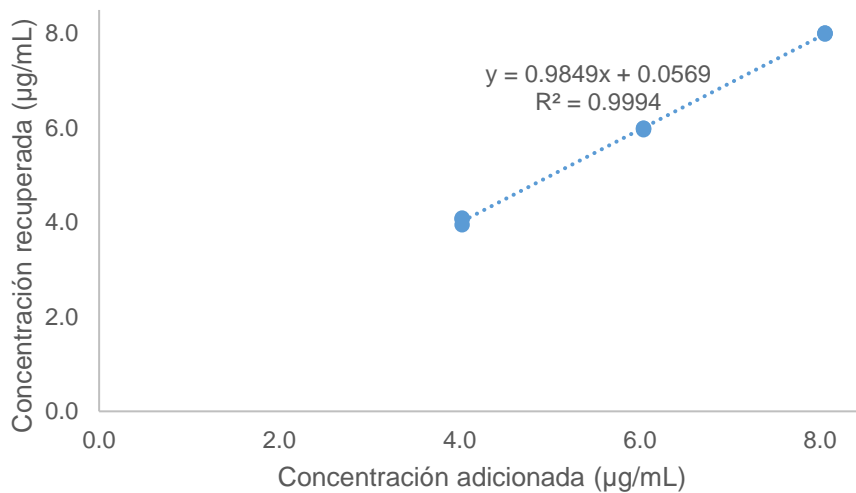
Cálculo de intervalo de confianza para el porcentaje de recobro ($t_{0.975, n-1} = 2.571$):

$$IC(\% \text{ de recobro}) = \% \pm (t_{0.975, n-1} * SD * n^{-1/2}) = 99.04 \pm 1.6 \% = 97.4; 100.6 \%$$

El intervalo incluye el valor de 100 %.

1.1.9.12 Linealidad del método

Cantidad adicionada (ug/mL)	Recuperada (µg/mL)	% Recobro
4.0	4.1	101.66
4.0	3.9	98.04
4.0	4.1	100.86
6.0	6.0	99.18
6.0	6.0	99.24
6.0	6.0	98.73
8.1	8.0	99.44
8.1	8.0	99.13
8.1	8.0	99.45
m	0.9849	
b	0.0569	
r ²	0.9994	



Regresión lineal:

Intervalo de confianza de la Pendiente	$m \pm (t_{0.975, n-2} * SD_m)$	0.96;1.01 Intervalo incluye 1
Intervalo de confianza de la Ordenada al origen	$b \pm (t_{0.975, n-2} * SD_b)$	-0.08;0.20 Intervalo incluye 0
Coefficiente de variación de la regresión lineal	$(SD_{regresión}/\bar{Y}) * 100$	0.77% El valor no excede 3%

Porcentaje de recobro:

Promedio (%)	99.52
SD (%)	1.09
CV (%)	1.10
	No mayor a 3

Intervalo de incertidumbre (%)	98.68;100.36 No incluye el valor 100
--------------------------------	---

1.1.9.13 Precisión del método

		Concentración (µg/mL)	
		Analista	
		1	2
Día	1	6.1	6.0
		6.2	5.9
		5.9	5.9
	2	6.0	5.9
		5.9	5.8
		5.8	5.6
Promedio		5.9	
SD		0.15	
CV (%)		2.51	No excede 3%

1.1.9.14 Estabilidad analítica de la muestra

% de fármaco en la muestra				
	Inicial	24 horas	72 horas	120 horas
	100.63	100.23	99.78	98.05
	99.31	97.09	96.99	96.72
	101.59	101.36	100.96	100.71
Promedio	100.51	99.56	99.24	98.49
	d _n	0.95	1.27	2.02

d_n no es mayor a 3%.

1.1.9.15 Límite de detección (LD) y cuantificación (LC) por desviación estándar de la ordenada al origen

LD	3.3*SD _b /m	0.16 µg/mL
LC	10*SD _b /m	0.51 µg/mL

10.2 ANEXO 2. Validación del método analítico de maltodextrina en agua (método ácido sulfúrico-fenol)

Humedad maltodextrina

	Humedad (%)
1	4.345
2	4.365
3	4.383
4	4.372
5	4.306
6	4.296
Promedio	4.345
SD	0.036

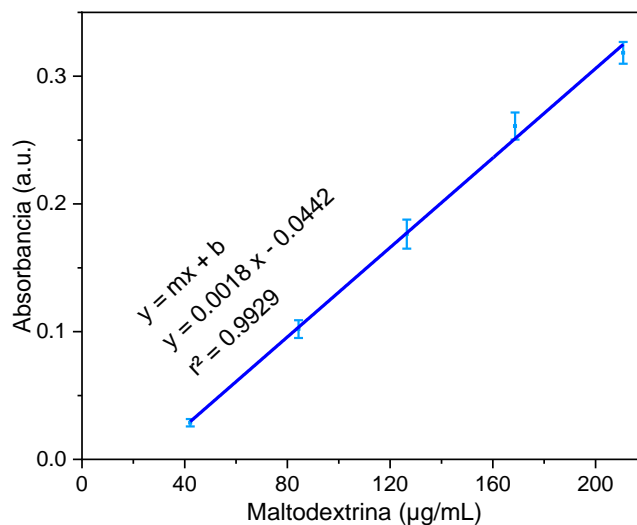
1.1.9.16 Precisión del sistema

	ABS (492 nm)
	0.168
	0.164
	0.165
	0.166
	0.167
	0.162
Promedio:	0.165
SD:	0.002
CV (%):	1.31

CV no exceda el 1.5%.

Linealidad sistema

Concentración (ug/mL)	ABS (492 nm)
42.2	0.027
42.2	0.032
42.2	0.027
84.3	0.098
84.3	0.098
84.3	0.110
126.5	0.167
126.5	0.189
126.5	0.173
168.6	0.249
168.6	0.265
168.6	0.269
210.8	0.318
210.8	0.310
210.8	0.327
m	0.0018
b	-0.0442
r ²	0.9929



r² ≥ 0.98.

Cálculo del intervalo de confianza de la pendiente:

$$IC(m) = m \pm (t_{0.975, n-2} * SD_m) = 0.0018 \pm (2.160 * 0.00004) = 0.0016; 0.0018 \text{ mL/ug}$$

El rango no incluye el valor cero.

1.1.9.17 Exactitud y repetibilidad del método

Masa adicionada (mg)	Masa recuperada (mg)	% Recobro
10.7	10.8	100.93
10.2	10.4	101.96
10.7	10.5	98.13
10.2	10.5	102.94
10.0	10.1	101.00
10.2	10.4	101.96
	Promedio	101.15
	SD	1.51
	CV (%)	1.49

El valor de CV no excede el 2%.

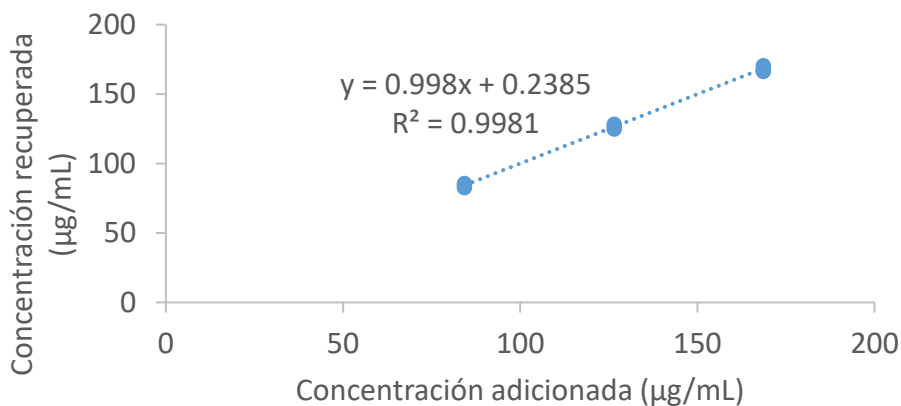
Cálculo de intervalo de confianza para el porcentaje de recobro ($t_{0.975, n-1} = 2.571$):

$$IC (\% \text{ de recobro}) = \% \pm (t_{0.975, n-1} * SD * n^{-1/2}) = 101.15 \pm 1.58 \% = 99.57; 102.74 \%$$

El intervalo incluye el valor de 100 %.

1.1.9.18 Linealidad del método

Cantidad adicionada (mg/mL)	Recuperada (mg/mL)	% Recobro
84.3	85.6	101.54
84.3	82.7	98.10
84.3	84.5	100.24
126.5	124.9	98.74
126.5	128.4	101.50
126.5	126.8	100.24
168.6	168.3	99.82
168.6	170.6	101.19
168.6	166.3	98.64
m	0.998	
b	0.238	
r ²	0.9981	



Regresión lineal:

Intervalo de confianza de la Pendiente	$m \pm (t_{0.975, n-2} * SD_m)$	0.96;1.04 Intervalo incluye 1
Intervalo de confianza de la Ordenada al origen	$b \pm (t_{0.975, n-2} * SD_b)$	-4.82;5.30 Intervalo incluye 0
Coefficiente de variación de la regresión lineal	$(SD_{regresión}/\bar{Y}) * 100$	1.69% El valor no excede 3%

Porcentaje de recobro:

Promedio (%)	100.00
SD (%)	1.29
CV (%)	1.29
	No mayor a 3
Intervalo de incertidumbre (%)	98.71;101.29

1.1.9.19 Precisión del método

		Concentración (ug/mL)	
		Analista	
		1	2
Día	1	150.9	149.5
		150.3	145.6
		148.9	147.1
	2	151.1	150.3
		150.2	153.8
		151.9	145.6
Promedio		149.6	
SD		2.5	
CV (%)		1.65	No excede 3%

1.1.9.20 Estabilidad analítica de la muestra

Estabilidad de la muestra			
% de fármaco en la muestra			
	Inicial	24 horas	36 horas
	98.41	98.39	99.34
	100.73	97.96	99.33
	103.61	100.02	98.18
Promedio	100.92	98.79	98.95
	d _n	2.13	1.97

d_n no es mayor a 3%

1.1.9.21 Límite de detección (LD) y cuantificación (LC) por desviación estándar de la ordenada al origen

LD	$3.3 \cdot SD_b/m$	10.86 ug/mL
LC	$10 \cdot SD_b/m$	32.91 ug/mL

10.3 ANEXO 3. Validación del método analítico de lecitina de soya en agua

Humedad lecitina de soya

	Humedad (%)
1	1.156
2	1.072
3	1.041
4	1.045
5	1.106
6	1.048
Promedio	1.078
SD	0.045

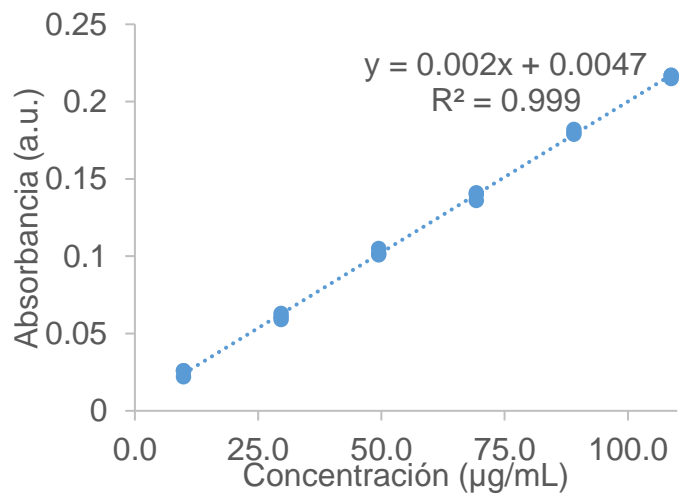
1.1.9.22 Precisión del sistema

	ABS (256 nm)
	0.115
	0.116
	0.113
	0.113
	0.114
	0.112
Promedio:	0.114
SD:	0.001
CV (%):	1.29

CV no exceda el 1.5%.

Linealidad sistema

Concentración (µg/mL)	ABS (256 nm)
9.9	0.026
9.9	0.022
9.9	0.026
29.7	0.063
29.7	0.061
29.7	0.059
49.5	0.101
49.5	0.105
49.5	0.102
69.2	0.141
69.2	0.14
69.2	0.136
89.0	0.18
89.0	0.182
89.0	0.179



108.8	0.217
108.8	0.215
108.8	0.217
m	0.0020
b	0.0047
r ²	0.9990

r² ≥ 0.98.

Cálculo del intervalo de confianza de la pendiente:

$$IC (m) = m \pm (t_{0.975, n-2} * SD_m) = 0.0020 \pm (2.160 * 0.00002) = 0.0019; 0.0020 \text{ mL}/\mu\text{g}$$

El rango no incluye el valor cero.

1.1.9.23 Exactitud y repetibilidad del método

Masa adicionada (mg)	Masa recuperada (mg)	% Recobro
10.4	10.4	99.71
10.1	10.3	101.72
10.2	10.0	98.00
10.2	10.2	99.82
10.3	10.1	97.96
10.1	10.0	98.96
	Promedio	99.36
	SD	1.41
	CV (%)	1.42

El valor de CV no excede el 2%.

Cálculo de intervalo de confianza para el porcentaje de recobro ($t_{0.975, n-1} = 2.571$):

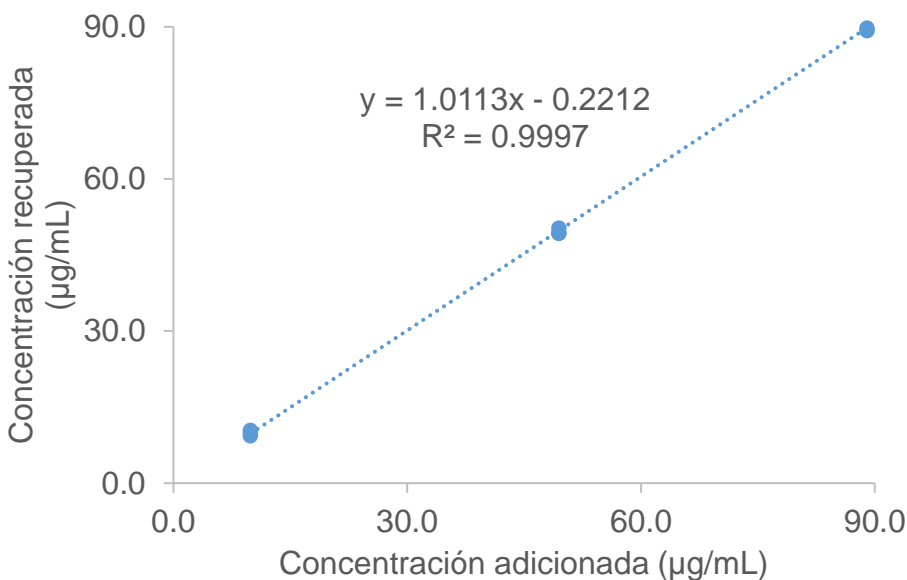
$$IC (\% \text{ de recobro}) = \% \pm (t_{0.975, n-1} * SD * n^{-1/2}) = 99.36 \pm 1.48 \% = 97.88; 100.84 \%$$

El intervalo incluye el valor de 100 %.

1.1.9.24 Linealidad del método

Cantidad adicionada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Recuperada ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Recobro
9.9	10.4	104.93
9.9	9.9	99.75
9.9	9.4	94.58
49.5	49.3	99.65
49.5	50.3	101.72
49.5	49.3	99.65
89.0	90.8	101.93
89.0	89.7	100.78
89.0	89.2	100.21
m	1.0113	
b	-0.2212	

r^2	0.9997
-------	--------



Regresión lineal:

Intervalo de confianza de la Pendiente	$m \pm (t_{0.975, n-2} * SD_m)$	0.9967;1.0258 Intervalo incluye 1
Intervalo de confianza de la Ordenada al origen	$b \pm (t_{0.975, n-2} * SD_b)$	-1.1326;0.6902 Intervalo incluye 0
Coefficiente de variación de la regresión lineal	$(SD_{regresión}/\bar{Y}) * 100$	1.25% El valor no excede 3%

Porcentaje de recobro:

Promedio (%)	100.35
SD (%)	2.74
CV (%)	2.73
	No mayor a 3
Intervalo de incertidumbre (%)	98.25;102.46 Incluye el valor 100

1.1.9.25 Precisión del método

		Concentración (µg/mL)	
		Analista	
		1	2
Día	1	57.0	56.5
		56.5	55.9
		54.9	54.4
Día	2	53.4	52.9
		54.9	53.9
		56.5	57.0
Promedio		55.3	

SD	1.4
CV (%)	2.59 No excede 3%

1.1.9.26 Estabilidad analítica de la muestra

Estabilidad de la muestra				
% de fármaco en la muestra				
	Inicial	24 horas	48 horas	72 horas
	97.9	97.9	98.8	97.0
	98.0	100.7	96.1	97.1
	99.0	99.9	100.8	96.2
Promedio	98.3	99.5	98.6	96.8
	d _n	1.2	0.3	1.5

d_n no es mayor a 3%

1.1.9.27 Límite de detección (LD) y cuantificación (LC) por desviación estándar de la ordenada al origen

LD	3.3*SD _{b/m}	2.0 µg/mL
LC	10*SD _{b/m}	5.9 µg/mL

10.4 ANEXO 4. Protocolo extenso del estudio *in vivo*



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA
DOCTORADO EN QUÍMICA
PROTOCOLO EN EXTENSO

Línea de investigación: Diseño, desarrollo y caracterización de películas de formación *in situ* a partir de dispersiones coloidales de laponita para la cicatrización de heridas.

Proyecto: Evaluación del efecto cicatrizante de las películas de formación *in situ* a partir de dispersiones coloidales de laponita en heridas inducidas en ratas Wistar.

Bernad Bernad María J., Bustamante-García Ruth, Gómez-Martínez Atonatiu E., Guevara-Paredes Paula F. y Pineda Álvarez Ramón A.

Introducción:

La falta de un material cicatrizante en el mercado con la capacidad de cambiar de estado líquido a película para el tratamiento de heridas y facilitar así su tratamiento despertó el interés del investigador. Aunque este tipo de apósitos han sido publicados en algunas revistas, aún presentan desafíos por superar como: el espesor [1], ya que solo utilizan polímeros amorfos en su composición. Al pasar de gel a película, el producto final tiende a ser muy delgado y frágil, por lo que para solucionar este problema se debe aplicar varias capas de material desarrollado, esperando a que se seque la primera capa para aplicar la siguiente. En este proyecto se superará este inconveniente trabajando con laponita, la cual presenta una estructura ordenada y servirá como soporte donde reposarán las cadenas poliméricas y podrán formar una película más gruesa; la arcilla brindará la misma función en el área lesionada para las células y el fluido extracelular.

Por ello, en esta investigación se propone la evaluación del desempeño de laponita en una matriz de lecitina:gelatina (LGL) vacíos frente a otra con la misma matriz fosfolípido:proteína:arcilla cargadas con una mezcla de maltodextrina:ascorbato de sodio (LGL MAS). Estas formas farmacéuticas innovadoras se aplicarán en estado líquido (dispersión de nanopartículas) para aumentar el contacto con superficies irregulares de las heridas, a partir de las cuales se formarán películas como materiales de cicatrización

y también se demostrará la función acarreadora de los nanodiscos de laponita para liberar maltodextrina (M) y ascorbato de sodio (AS). Por otro lado, el único problema que las investigaciones de este tipo de materiales, que cambian de estado, han intentan resolver es el desarrollo de una barrera antibacteriana y protectora para la herida, donde se han utilizado excipientes que mostraron citotoxicidad en las células epidérmicas y alta bioadhesión [2] que pueden lesionar la zona afectada y los tejidos vecinos al retirarlos. A diferencia del presente trabajo, que busca desarrollar un material con una función sistémica en las heridas de úlceras de pie diabético. Los excipientes tendrán una función específica en este tipo de lesiones como: (1) la lecitina es altamente oclusiva, protegerá la herida, (2) la gelatina, al ser un derivado de colágena, es altamente biocompatible con el sistema tegumentario, (3) laponita presenta actividades de sostén, hemolíticas y su amigable degradación capaz de proteger y acelerar diferentes procesos celulares, (4) maltodextrina, por su degradación gradual aportará energía a los tejidos profundos o internos y finalmente (5) ascorbato de sodio, que reducirá el pH de la herida, previniendo el crecimiento de microorganismos. Además, el uso conjunto de las dos últimas sustancias ha demostrado la aceleración de la síntesis de factores de crecimiento que influyen en la fase de proliferación. También, este proyecto buscará que el material tenga una bioadhesión adecuada que permitirá que las películas de formación *in situ* permanezcan en la herida, pero a su vez que sea fácil su retiro, sin dañar el área de la lesión y tejidos vecinos. Por lo que se propone la evaluación del efecto cicatrizante del material innovador en un modelo de ratas Wistar y para la evaluación de la sensibilidad cutánea, serán empleados los modelos de conejos Nueva Zelanda.

Objetivos:

- Comprobar que las películas de formación *in situ* a partir de dispersiones coloidales de laponita (LGL y LGL MAS) desarrollados son seguros mediante la prueba de sensibilidad cutánea en conejos Nueva Zelanda.
- Evaluar el efecto cicatrizante de las películas de formación *in situ* a partir de dispersiones coloidales de laponita (LGL y LGL MAS) en un modelo experimental de heridas inducidas en ratas Wistar.

Hipótesis o planteamiento del problema:

Si la laponita posee una estructura organizada que puede brindar soporte celular, así como también un efecto entrecruzante y atrayente de células por su variabilidad de cargas y sus componentes catiónicos (Mg^{2+} y Li^+), las películas de formación *in situ* a partir de dispersiones coloidales de esta arcilla podrán utilizarse como apósitos con la finalidad de promover y mejorar el proceso de cicatrización en las heridas inducidas en ratas Wistar.

Material y metodología:

Material biológico:

- Dispersiones coloidales de laponita (LGL y LGL MAS).
- 16 ratas macho de la cepa Wistar con un peso de 250.0 ± 50.0 g
- 6 conejos Nueva Zelanda con un peso de 2-3 Kg

Material de laboratorio:

- Caja de Petri
- Caja de acrílico para ratas con tapa
- Balanza con canastilla
- Estuche de disección
- Frascos de vidrio con tapa
- Jeringas de 1.0 mL
- Cronómetro
- Microscopio
- Microtomo
- Parches de gasa de 2.5 x 2.5 cm
- Vasos de precipitados de 50 y 250 mL
- Portaobjetos
- Espátula
- Navaja para afeitar

Procedimiento:

Los excipientes y activos que se utilizaron para desarrollar las películas de formación *in situ* a partir de suspensiones coloidales de laponita se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 17. Reactivos utilizados en el desarrollo del proyecto.

Excipientes y activos	Marca
Ascorbato de sodio (donación)	Sigma
Maltodextrina	Sigma
Gelatina de piel de bovino tipo B ⁺	Sigma
L- α -fosfatidilcolina de soya	Sigma
Ácido clorhídrico	REASOL
Hidróxido de sodio	MEYER
Acetona	J.T.Baker
Metanol	J.T.Baker
Laponita EP (donación)	BYK

Preparación de la suspensión coloidal:

Las suspensiones coloidales fueron preparadas como se describe en la Figura 1.

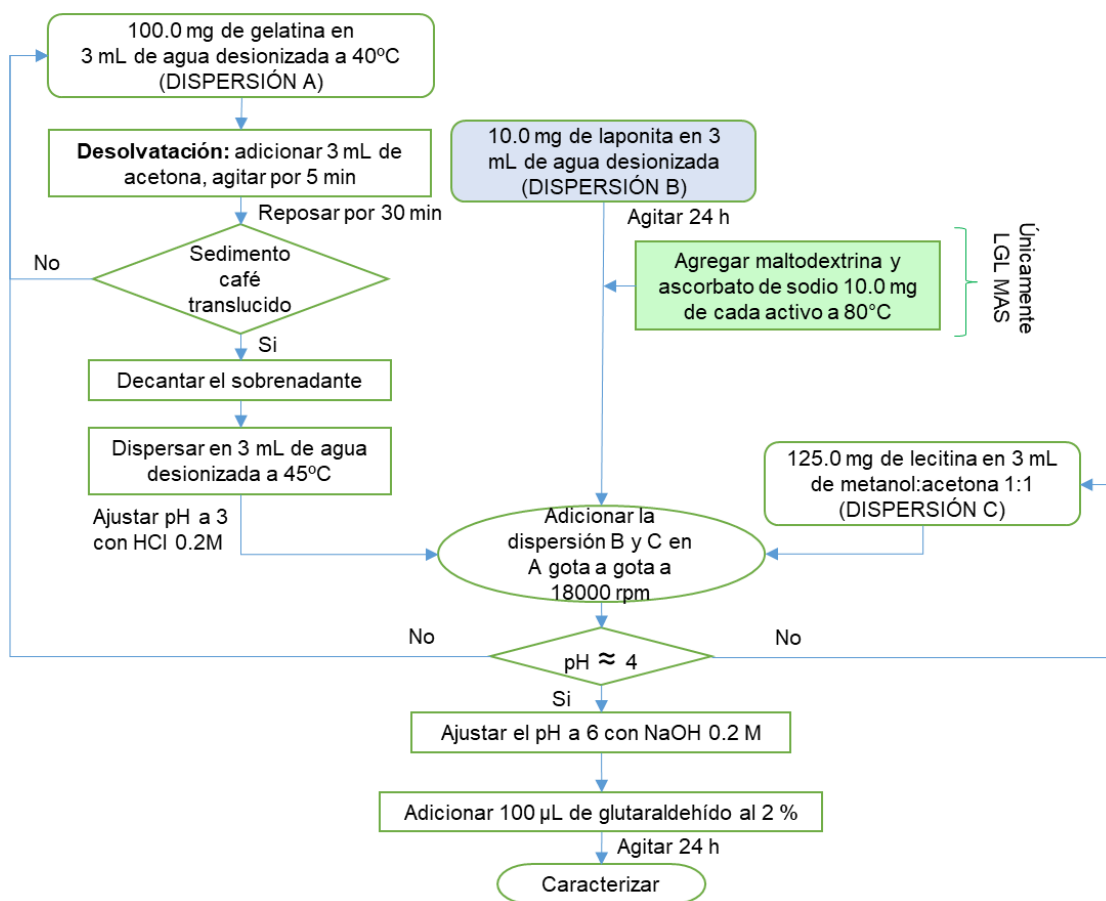


Figura 1. Preparación de las dispersiones coloidales.

Prueba de cicatrización:

Para evaluar el efecto cicatrizante de las películas de formación *in situ* a partir de dispersiones coloidales de laponita (LGL y LGL MAS), las ratas se dividirán al azar en dos grupos:

- Grupo I: Efecto cicatrizante de la dispersión LGL
- Grupo II: Efecto cicatrizante de la dispersión LGL MAS

Para determinar el tamaño de muestra, se utilizó el programa G*Power 3.1.9.7 (Figura 1), en el cual se estableció que, para cada uno de los grupos, se utilizarán 8 ratas. Prueba F, ANOVA de una vía, $p = 0.05$, potencia del 95%, $N = 16$.

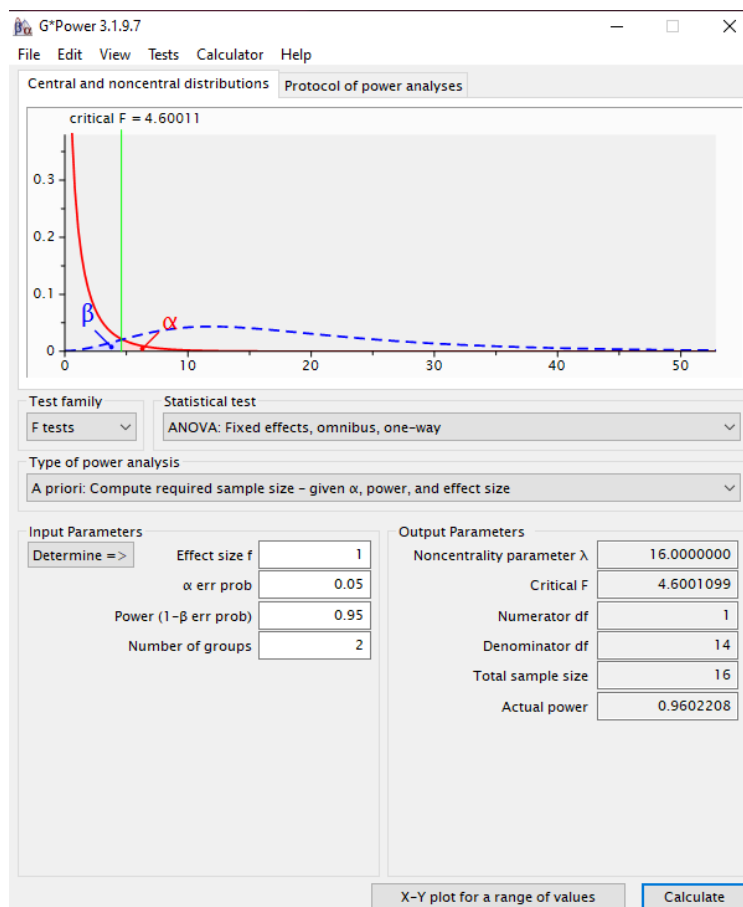


Figura 1. Cálculo de tamaño de muestra, programa G*Power 3.1.9.7.

Las ratas se encontrarán todo el tiempo en el bioterio de la Facultad de Química (edificio A), en cajas colectivas para roedor de 43 x 31 x 16.5 cm. En cada una de las cajas se colocarán 8 animales. Se mantendrán bajo condiciones controladas de luz (ciclo luz/oscuridad 12:12h), temperatura y humedad, con acceso a alimento y agua *ad libitum*

de acuerdo con la NOM-066-ZOO “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”.

1. Pesar y marcar a cada una de las ratas.
2. Anestesiarse a los animales con pentobarbital (35 mg/Kg) por vía intraperitoneal utilizando una aguja de calibre 27G y una jeringa de 1 mL.
3. Rasurar el dorso de los animales.
4. Delimitar las zonas como se muestra en la Figura 3 y realizar una herida de 1 cm de longitud en cada cuadrante.
5. Aplicar vía tópica la suspensión coloidal en las heridas recientes, cubriendo con una gasa estéril de 1 x 1 cm durante 60 min y medir el tiempo de formación de la película.
6. Administrar el producto a las 36, 72, y 144 h como se mencionó en el punto 5.
7. Sacrificar una rata de cada grupo a las 36, 72, y 144 h.

Nota: se contará con una rata extra por cualquier inconveniente que se presente durante el experimento.

La eutanasia se realizará mediante una sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico 63 mg/kg) vía intraperitoneal, con una aguja de calibre 27G y una jeringa de 1 mL; el animal se observará durante este periodo y se confirmará con la cesación de los signos vitales (ausencia de respiración, ritmo cardiaco, disminución de la temperatura, ausencia de reflejos) de acuerdo con lo establecido en la NOM 062-ZOO-1999.

8. Obtener cortes del tejido de cada uno de los animales sacrificados.
9. Realizar estudios moleculares (histología e inmunohistoquímica) de los tejidos para su posterior análisis en el microscopio.

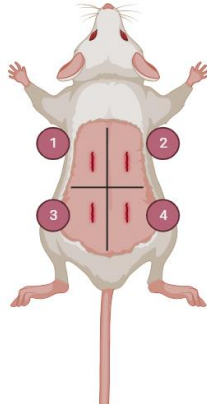


Figura 2. Distribución de los cuadrantes para la prueba de cicatrización en ratas.

1. Herida + vehículo; 2. Herida + marca comercial; 3. Herida; 4. Herida + producto final

Estudios Moleculares: Histología e Inmunohistoquímica

Para realizar el análisis histológico de los tejidos, se llevará a cabo el siguiente proceso: se tomará una muestra de tejido por escisión quirúrgica de las lesiones, se realizará la fijación de estas con paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% tamponado en una solución de fosfatos con cambios cada 24 h.

Una vez pasadas 72 h, se procesarán las muestras por la técnica clásica de inclusión en parafina; la cual consta en deshidratar los tejidos por inmersión en casetes para histología en diferentes soluciones de alcoholes desde el 30% hasta el 100%. Posteriormente, se pasarán a un líquido intermediario que ayudará a fijar la parafina en el tejido, en este caso se ocupará Xilol al 100%, una vez inmerso en esta solución, se pasará a soluciones de parafina (al menos 3) para su posterior embebimiento de las muestras, estas serán orientadas de la misma manera para obtener cortes histológicos de la misma zona.

Una vez realizado el bloque con el tejido embebido, se cortan en un micrótomos, procurando que los cortes tengan 5µm de espesor. Los cortes serán continuos para poder analizarlos y realizar las tinciones y las inmunohistoquímicas para detectar factores involucrados en la inflamación y proceso de cicatrización.

A nivel histológico se teñirán con hematoxilina-eosina y crómica de masson, con la finalidad de evaluar la continuidad del epitelio, edema, estrato basal, daño en la dermis e hipodermis, presencia de costra y reconstrucción epidérmica.

Prueba de sensibilidad:

En base al MGA 0515. Irritabilidad en piel de la FEUM 11ª edición, se utilizarán seis conejos albinos sanos, adultos con peso de 2 a 3 kg.

1. Antes de la prueba, se anestesiaron los animales con 3 mg/kg de Xilacina y 10 mg/kg de Ketamina vía intravenosa en la vena marginal, utilizando una aguja de calibre 27G y una jeringa de 1 mL.
2. Posteriormente, rasurar el área dorsal de cada conejo desde la región escapular a la lumbar, evitando cualquier tipo de irritación mecánica.
3. Delimitar cuatro áreas de 4 cm por lado de acuerdo con la Figura 4 y aplicar las suspensiones coloidales únicamente en dos cuadrantes de manera intercalada.
4. Cubrir cada zona de aplicación con parches de gasa de 2.5 cm por lado y un grosor de dos monocapas asegurándolos con tela adhesiva.
5. Transcurridos 5 minutos de la aplicación, retirar todo y evaluar el aspecto de la piel.
6. Observar la zona a las 24 h después de la aplicación.

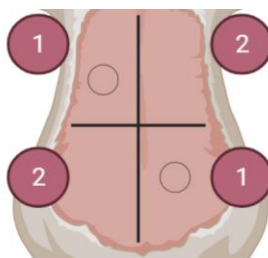


Figura 3. Distribución de los cuadrantes para la prueba de sensibilidad en conejos.
1: zona de prueba; 2: zona de control

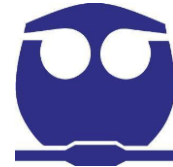
Análisis estadístico

Todos los datos serán analizados con un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, usando el software sigmaplot o G*power. Todos los valores con $p < 0.05$, serán considerados como significativos, a los que posteriormente se les realizará un análisis *post hoc* de Dunnet.

Referencias:

- [1] Koosehgol, S.; Ebrahimian-Hosseiniabadi, M.; Alizadeh, M.; Zamanian, A. Preparation and Characterization of in Situ Chitosan/Polyethylene Glycol Fumarate/Thymol Hydrogel as an Effective Wound Dressing. *Materials Science and Engineering C* 2017, 79, 66–75, doi:10.1016/j.msec.2017.05.001.
- [2] Dong, Y.; Hassan, W.U.; Kennedy, R.; Greiser, U.; Pandit, A.; Garcia, Y.; Wang, W. Performance of an in Situ Formed Bioactive Hydrogel Dressing from a PEG-Based Hyperbranched Multifunctional Copolymer. *Acta Biomater* 2014, 10, 2076–2085, doi:10.1016/j.actbio.2013.12.045.
- [3] Castellanos Ramirez, D.K.; Gonzalez Villordo, D.; Gracia Bravo, L.J. Manejo de Heridas. *Cirujano General* 2005, 27, 164–167.
- [4] Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11ª Edición.
- [5] Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2001, agosto 22) Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf

10.5 ANEXO 5. Resumen del protocolo para sometimiento en el CICUAL



PROGRAMA INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO (PICUAL), FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

COMITÉ PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO (CICUAL)

Los investigadores Jefes de Grupo y Profesores de la FQ, deberán someter sus propuestas de actividades que involucren el uso de animales (protocolos de investigación, proyectos educativos y prácticas de laboratorio) ante el CICUAL para su revisión. Después de valorarlas con base en a los principios, lineamientos criterios y políticas expuestas en este documento, el Comité podrá recomendar su realización sin cambios o bien proponer cambios o modificaciones, ya sea leves o sustanciales. También revisará las solicitudes de modificaciones a las propuestas ya aprobadas que comprendan cambios relevantes a las actividades, emitiendo una Carta de Aprobación o bien recomendando su modificación. El CICUAL sesiona los días martes hábiles de cada mes.

Los procedimientos requeridos para el sometimiento de Protocolos de Investigación son:

Es fundamental antes de llenar el formato, leer las especificaciones de manejo y bienestar de la especie que se empleará.

Llenar el Formato para el Registro de Proyectos/Protocolos que utilizan animales de laboratorio el cual se encontrará a su disposición en la página de la Facultad de Química y además enviar el protocolo en extenso, a fin de tener mayor detalle en los procedimientos. El sometimiento del Formato de Registro de Proyectos/Protocolos no excluye la entrega del protocolo impreso en extenso y de su versión electrónica.

Es importante llenar el **Formato de Registro de Proyectos/Protocolos** con claridad para evitar confusiones o retrasos.

El tiempo para entregar el **Formato de Registro de Proyectos/Protocolos** para su evaluación por el CICUAL es de al menos 7 días hábiles antes de su próxima sesión mensual.

El **Formato de Registro de Proyectos/Protocolos**, así como el protocolo en extenso, se debe enviar electrónicamente a la siguiente dirección de correo: cicualfq@gmail.com, además se deben entregar ambos en forma física en la oficina de la Jefatura del Departamento de Biología con la Mtra. Pilar Granada Macías, laboratorio 1-B del edificio “A” de la Facultad, en un horario de lunes a viernes de 9 a 14 hrs.

Todos los protocolos que sean aprobados por el CICUAL y que sean ejecutados en instalaciones de esta Facultad, podrán ser objeto de una visita del Comité para constatar las condiciones de albergue de los animales y que se realicen los procedimientos tal cual se declaró y aprobó ante este Comité.

En caso de realizarlo en instalaciones fuera de la Facultad de Química, anexar carta u oficio del Investigador Responsable y del responsable de la instalación donde se alojarán los animales, en el sentido de otorgar el permiso y facilidades para realizar una visita del CICUAL a la ejecución del proyecto.

Tiempo de Respuesta:

El CICUAL revisará los Protocolos que sean enviados para ello y se emitirá un Dictamen de Aprobación o de No Aprobación, que se le hará llegar al responsable del Protocolo en un lapso de 7 días posteriores a la sesión de este Comité.

En casos excepcionales cuando se requiera que el Comité evalúe protocolos que no se ajusten a las fechas antes descritas, el Comité establecerá las vías y mecanismos para dicho fin de manera particular, ya que dependerá de la carga de trabajo de sus miembros, así como de su disponibilidad para su revisión a conciencia, por lo que es muy importante que los Investigadores envíen sus protocolos en tiempo y forma establecidos anteriormente.

Revisión Continua:

El Comité podrá realizar visitas de seguimiento al Protocolo durante el transcurso del mismo.

El Investigador Responsable deberá informar oportunamente al Comité de: efectos adversos serios, informes de seguridad, desviaciones, cambios o enmiendas al Protocolo; los cuáles serán revisados por el Comité y se emitirá un informe sobre esta revisión.

Se podrán realizar renovaciones a la Carta de Aprobación, según lo requieran los Investigadores Responsables, comprometiéndose éstos a no haber realizado modificaciones a la metodología ya aprobada.

El Investigador Responsable deberá considerar los tiempos anteriormente descritos para su evaluación y aprobación, especialmente cuando éste sea sometido a otras instancias, como CONACYT, DGAPA, etc. Así como cuando necesite contar con la carta aprobación de este Comité.

El CICUAL podrá recomendar al Director y al H. Consejo Técnico de la FQ la suspensión de actividades cuando: 1) involucren el uso de animales y éstos no hayan sido sometidos al arbitrio del Comité; 2) se desatiendan las recomendaciones de modificación y 3) se lleven a cabo modificaciones sustanciales sin aprobación del Comité, en caso de propuestas previamente aprobadas.



PROGRAMA INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO (PICUAL), FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

COMITÉ PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO (CICUAL).

FORMATO PARA EL REGISTRO DE PROYECTOS/PROTOCOLOS QUE UTILIZAN ANIMALES DE LABORATORIO

1. Título del proyecto			
Diseño, desarrollo y caracterización de películas de formación <i>in situ</i> a partir de dispersiones coloidales de laponita para la cicatrización de heridas.			
Nombre del estudio			
Evaluación del efecto cicatrizante de las películas de formación <i>in situ</i> a partir de dispersiones coloidales de laponita en heridas inducidas en ratas Wistar. Realizar la prueba de sensibilidad cutánea en conejos Nueva Zelanda de las películas de formación <i>in situ</i> .			
2. Profesor/Investigador responsable			
Nombre:	Dra. María Josefa Bernad Bernad		
Departamento/Adscripción:	Departamento de Farmacia / Facultad de Química		
Teléfono/ extensión:	5526909036	Correo electrónico:	bernadf@comunidad.unam.mx
3. Nombre del personal que participará en el estudio:			
Dra. María Josefa Bernad Bernad Dra. Ruth Bustamante García MVZ. Atonatiu Edmundo Gómez Martínez e. MsC. Ramón Andrés Pineda Álvarez			
4. Fecha de Inicio del estudio	14 septiembre 2023		
5. Fecha probable de término	14 octubre 2023		



PROGRAMA INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO (PICUAL). CICUAL-FQ-UNAM

6. BREVE JUSTIFICACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL TEMA DEL ESTUDIO

La falta de un material cicatrizante en el mercado con la capacidad de cambiar de estado líquido a película para el tratamiento de heridas y facilitar así su tratamiento despertó el interés del investigador. Aunque este tipo de apósitos han sido publicados en algunas revistas, aún presentan desafíos por superar como: el espesor [1], ya que solo utilizan polímeros amorfos en su composición. Al pasar de gel a película, el producto final tiende a ser muy delgado y frágil, por lo que para solucionar este problema se debe aplicar varias capas de material desarrollado, esperando a que se seque la primera capa para aplicar la siguiente. En este proyecto se superará este inconveniente trabajando con laponita, la cual presenta una estructura ordenada y servirá como soporte donde reposarán las cadenas poliméricas y podrán formar una película más gruesa; la arcilla brindará la misma función en el área lesionada para las células y el fluido extracelular.

Por ello, en esta investigación se propone la evaluación del desempeño de laponita en una matriz de lecitina:gelatina (LGL) vacíos frente a otra con la misma matriz fosfolípido:proteína:arcilla cargadas con una mezcla de maltodextrina:ascorbato de sodio (LGL MAS). Estas formas farmacéuticas innovadoras se aplicarán en estado líquido (dispersión de nanopartículas) para aumentar el contacto con superficies irregulares de las heridas, a partir de las cuales se formarán películas como materiales de cicatrización y también se demostrará la función acarreadora de

los nanodiscos de laponita para liberar maltodextrina (M) y ascorbato de sodio (AS). Por otro lado, el único problema que las investigaciones de este tipo de materiales, que cambian de estado, han intentan resolver es el desarrollo de una barrera antibacteriana y protectora para la herida, donde se han utilizado excipientes que mostraron citotoxicidad en las células epidérmicas y alta bioadhesión [2] que pueden lesionar la zona afectada y los tejidos vecinos al retirarlos. A diferencia del presente trabajo, que busca desarrollar un material con una función sistémica en las heridas de úlceras de pie diabético. Los excipientes tendrán una función específica en este tipo de lesiones como: (1) la lecitina es altamente oclusiva, protegerá la herida, (2) la gelatina, al ser un derivado de colágena, es altamente biocompatible con el sistema tegumentario, (3) laponita presenta actividades de sostén, hemolíticas y su amigable degradación capaz de proteger y acelerar diferentes procesos celulares, (4) maltodextrina, por su degradación gradual aportará energía a los tejidos profundos o internos y finalmente (5) ascorbato de sodio, que reducirá el pH de la herida, previniendo el crecimiento de microorganismos. Además, el uso conjunto de las dos últimas sustancias ha demostrado la aceleración de la síntesis de factores de crecimiento que influyen en la fase de proliferación. También, este proyecto buscará que el material tenga una bioadhesión adecuada que permitirá que las películas de formación in situ permanezcan en la herida, pero a su vez que sea fácil su retiro, sin dañar el área de la lesión y tejidos vecinos. Por lo que se propone la evaluación del efecto cicatrizante del material innovador en un modelo de ratas Wistar y para la evaluación de la sensibilidad cutánea, serán empleados los modelos de conejos Nueva Zelanda.

7. TIPO DE ESTUDIO Señale lo correspondiente:

Agudo _____
24-48 hrs

Subcrónico _____
21 días-3 meses

Subagudo _____ **X** _____
49 hrs-20 días

Crónico _____
Más 3 meses

8. CLASIFICACIÓN DEL ESTUDIO De acuerdo al nivel de invasividad en los animales. (Ver anexo, no es necesario imprimirlo) Señale la categoría correspondiente

Categoría	A	Categoría	Categoría	Categoría
_____		B X _____	C _____	D _____

9. FORMA Y LUGAR DE OBTENCIÓN DE LOS ANIMALES

Los animales serán donados por el bioterio del edificio A de la Facultad de Química, UNAM. Estos animales serán reutilizados ya que, previamente fueron utilizados para la asignatura de Inmunología.

10. EN CASO DE TRANSPORTAR O MOVILIZAR ANIMALES ¿CÓMO SE REALIZARÁ?

Los animales se transportarán únicamente dentro del bioterio de la Facultad de Química (Edificio A).

Las ratas se mantendrán en cajas de policarbonato para roedor de 43 x 31 x 16.5 cm y los conejos permanecerán en jaulas metálicas, en la que un conejo no mayor de 4 kg tiene un área de piso de 0.40 m² y una altura del piso al techo de la jaula de 36 cm, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO.

11. ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA Y POTENCIA DEL ESTUDIO O REFERENCIAS EMPLEADAS

Para estimar el tamaño de la muestra, en el caso de las ratas, se utilizó el programa G*Power 3.1.9.7., en donde se determinó que se utilizarán dos grupos de 8 animales cada uno, Prueba F, ANOVA de una vía, $p = 0.05$, potencia del 95%, $N = 16$.

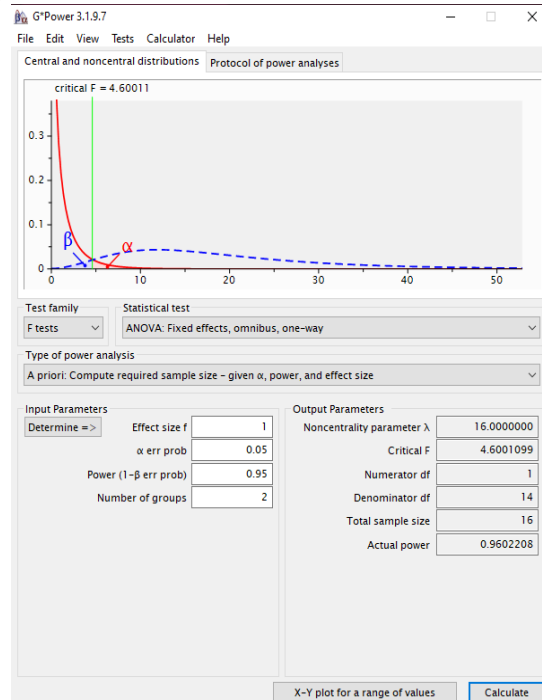


Figura 1. Cálculo de tamaño de muestra, programa G*Power 3.1.9.7.

Para los conejos, de acuerdo al MGA 0515 de la FEUM 11^a edición, se utilizarán 6 conejos.

12. INFORMACIÓN DE LOS ANIMALES

ESPECIE/ESTIRPE O CEPA	CANTIDAD	RANGO DE PESO	GÉNERO/EDAD
Ratas Wistar	16	250 ± 50 g	Indistinto/Adulto
Conejos Nueva Zelanda	6	2-3 Kg	Indistinto/Adulto
Número de grupos experimentales: Ratas: 2 grupos; Grupo I (LGL) Grupo II (LGL MAS) Conejos: 1 grupo			
Número de animales por grupo: Ratas: 8 Conejos: 6			
Nota. Debido a que el mismo animal servirá como control negativo y positivo, se utilizará una n mínima de 8 animales por grupo para rata y 6 para conejo.			

13. LOS ANIMALES SERÁN ALOJADOS EN: Escriba y señale según corresponda

Lugar	Bioterio de la Facultad de Química
Ubicación	Cto. Escola S/N, C.U., Coyoacán, 04510 Ciudad de México, CDMX
Cuarto de Experimentación	Cuarentena
Unidad de Aislamiento	n/A

14. ¿GARANTIZA UD., QUE CUENTA CON LAS CONDICIONES ADECUADAS DE ALOJAMIENTO PARA LA ESPECIE EMPLEADA?

Los animales permanecerán en todo momento dentro del bioterio de la Facultad de Química (Edificio A).

Las ratas se mantendrán en cajas colectivas de policarbonato para roedor de 43 x 31 x 16.5 cm con 8 animales cada una, y cada conejo permanecerán en una jaula metálica, en la que un conejo no mayor de 4 kg tiene un área de piso de 0.40 m² y una altura del piso al techo de la jaula de 36 cm.

15. CONDICIONES ESPECIALES QUE REQUIERAN LOS ANIMALES: Describa si requieren algunas condiciones o características especiales de alojamiento, mantenimiento, alimentación, cuidados veterinarios, etc.

Se mantendrán bajo condiciones controladas de luz (ciclo luz/oscuridad 12:12h), temperatura y humedad, con acceso a alimento y agua *ad libitum* de acuerdo con la NOM-062-ZOO-1999 ESPECIFICACIONES TÉCNICAS PARA LA PRODUCCIÓN, CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO. Los animales permanecerán en todo momento dentro del bioterio de la Facultad de Química (Edificio A). Las ratas se mantendrán en cajas colectivas para roedor de 43 x 31 x 16.5, y cada conejo permanecerán en una jaula metálica con un área de piso de 0.40 m² y una altura del piso al techo de la jaula de 36 cm.

16. PROCEDIMIENTOS QUE SE EMPLEARÁN EN EL PROYECTO/PROTOCOLO. Señale el correspondiente

Restricción de Agua y/o Alimento () Tiempo de restricción: _____	Estudios DL50 ()
Catéter, extracción de sangre, intubación ()	
Modificación de conducta ()	Producción de anticuerpos ()
Inoculación de agentes teratogénicos o carcinogénicos ()	Confinamiento o aislamiento ()
Sustancias químicas tóxicas ()	Inducción de lesiones (físicoquímicas o traumáticas) (X)
Procedimientos quirúrgicos Con recuperación (X)	Procedimientos quirúrgicos sin recuperación ()
Otros:	

17. METODOLOGÍA (Descripción detallada y precisa de la metodología de los procedimientos a realizar como material, sujeción, vías de administración o de toma de muestra, frecuencia y número de muestreo)

Los excipientes y activos que se utilizaron para desarrollar las películas de formación *in situ* a partir de suspensiones coloidales de laponita se enlistan en la Tabla 6.

Tabla 18. Reactivos utilizados en el desarrollo del proyecto.

Excipientes y activos	Marca
Ascorbato de sodio (donación)	Sigma
Maltodextrina	Sigma
Gelatina de piel de bovino tipo B [†]	Sigma
L- α -fosfotidilcolina de soya	Sigma
Ácido clorhídrico	REASOL
Hidróxido de sodio	MEYER
Acetona	J.T.Baker
Metanol	J.T.Baker
Laponita EP (donación)	BYK

Preparación de la suspensión coloidal:

Las suspensiones coloidales fueron preparadas como se describe en la Figura 2.

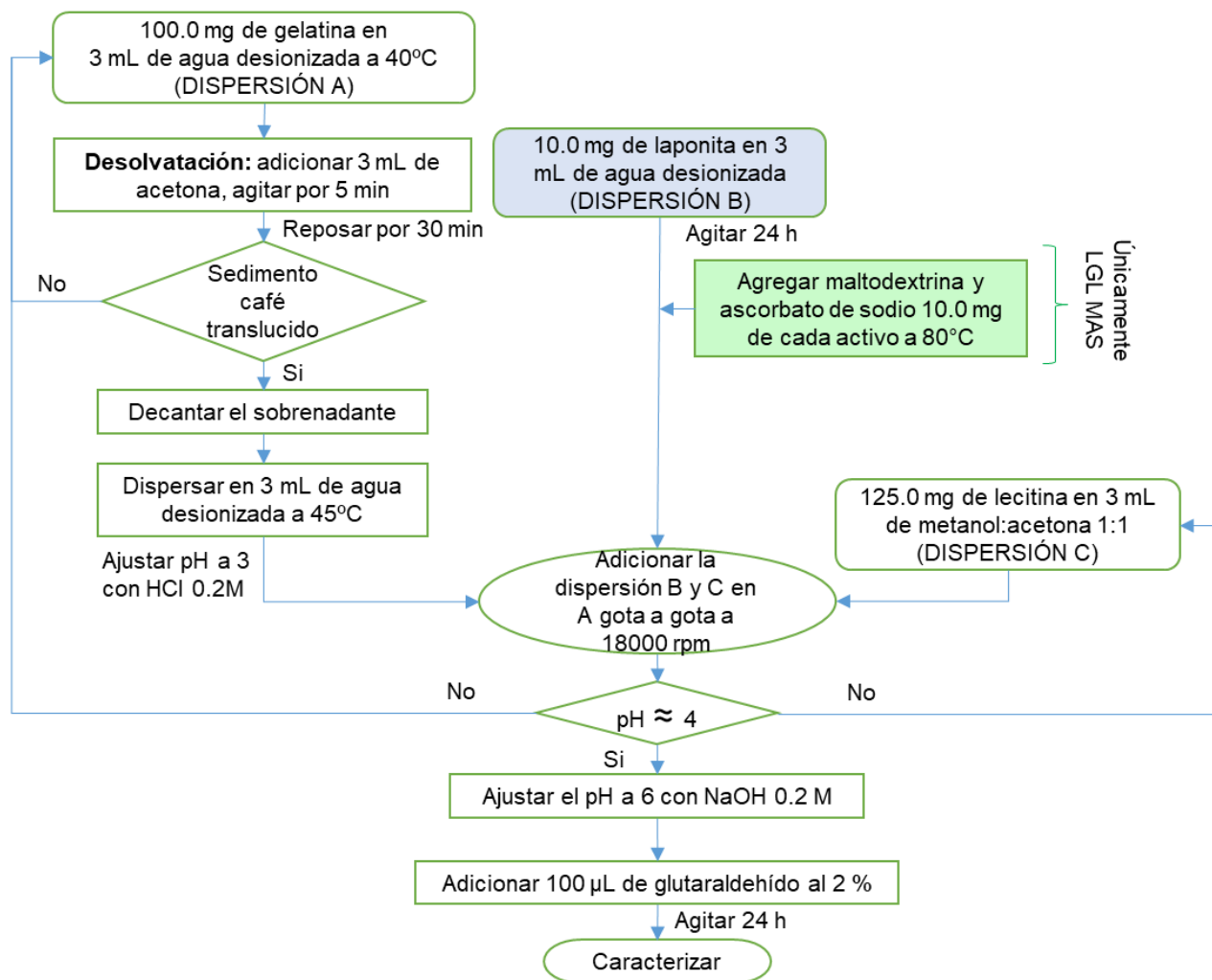


Figura 2. Preparación de las dispersiones coloidales.

Prueba de cicatrización:

Para evaluar el efecto cicatrizante de las películas de formación *in situ* a partir de suspensiones coloidales de laponita, las ratas se dividirán al azar en dos grupos de 8 ratas cada uno.

Pesar y marcar a cada una de las ratas.

Anestesiarse a los animales con pentobarbital (35 mg/Kg) por vía intraperitoneal utilizando una aguja de calibre 27G y una jeringa de 1 mL.

Rasurar el dorso de los animales.

Delimitar las zonas como se muestra en la Figura 3 y realizar una herida de 1 cm de longitud en cada cuadrante.

Aplicar vía tópica la suspensión coloidal en las heridas recientes (0.020 mL), cubriendo con una gasa estéril de 1 x 1 cm durante 60 min y medir el tiempo de formación de la película.

Administrar el producto a las 24 y 72 h como se mencionó en el punto 5.

Sacrificar una rata de cada grupo a las 0, 24, 72, y 120 h (día 0, 1, 3 y 5).

Nota: se contará con una rata extra por cualquier inconveniente que se presente durante el experimento.

La eutanasia se realizará mediante una sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico 63 mg/kg) vía intraperitoneal, con una aguja de calibre 27G y una jeringa de 1 mL; el animal se observará durante este periodo y se confirmará con la cesación de los signos vitales (ausencia de respiración, ritmo cardiaco, disminución de la temperatura, ausencia de reflejos) de acuerdo con lo establecido en la NOM 062-ZOO-1999.

Obtener cortes del tejido de cada uno de los animales sacrificados.

Realizar estudios moleculares (histología e inmunohistoquímica) de los tejidos para su posterior análisis en el microscopio.

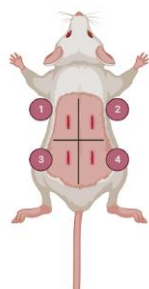


Figura 3. Distribución de los cuadrantes para la prueba de cicatrización en ratas.

1. Herida + vehículo; 2. Herida + marca comercial; 3. Herida; 4. Herida + producto final

Prueba de sensibilidad:

En base al MGA 0515. Irritabilidad en piel de la FEUM 11^a edición, se utilizarán seis conejos albinos sanos, adultos con peso de 2 a 3 kg.

Antes de la prueba, se anestesiaron los animales con 3 mg/kg de Xilacina y 10 mg/kg de Ketamina vía intravenosa en la vena marginal, utilizando una aguja de calibre 27G y una jeringa de 1 mL.

Posteriormente, rasurar el área dorsal de cada conejo desde la región escapular a la lumbar, evitando cualquier tipo de irritación mecánica.

Delimitar cuatro áreas de 4 cm por lado de acuerdo con la Figura 4 y aplicar las suspensiones coloidales únicamente en dos cuadrantes de manera intercalada (0.1 mL).

Cubrir cada zona de aplicación con parches de gasa de 2.5 cm por lado y un grosor de dos monocapas asegurándolos con tela adhesiva.

Transcurridos 5 minutos de la aplicación, retirar todo y evaluar el aspecto de la piel.

Observar la zona a las 24h después de la aplicación.

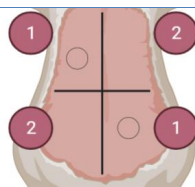


Figura 4. Distribución de los cuadrantes para la prueba de sensibilidad en conejos.

1: sitio de prueba; 2: sitio de control

18. ¿PROPORCIONARÁ A LOS SUJETOS DE ESTUDIO ALGÚN TIPO DE ENRIQUECIMIENTO ANIMAL O AMBIENTAL?

SÍ () NO (X)

EN CASO DE NO SER NECESARIO EXPLICAR PORQUÉ

Debido a la corta duración del experimento no es necesario.

19. ENCARGADO (S) DEL CUIDADO Y MANEJO DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

Nombre (s) completo (s)	Experiencia en el cuidado, manejo y salud de los animales (especialidad, diplomados, cursos, tiempo de experiencia, etc.).	Responsabilidades en el estudio
María Josefa Bernad Bernad	Dra. en investigación en nuevos sistemas de liberación, más de 25 años de experiencia en desarrollo y evaluación de efectos adversos en formulaciones Farmacéuticas.	Cuidado, asesoría e implementación del modelo de heridas inducidas, histología e inmunohistoquímica. Cuidado y asesoría para la prueba de sensibilidad en conejos.
Atonatiu E. Gómez Martínez	Médico veterinario, especialista en animales de laboratorio, certificado CONSERVET. 40 años de experiencia	Cuidado, asesoría e implementación del modelo de heridas inducidas y disposición final de los cadáveres. Cuidado y asesoría para la prueba de sensibilidad en conejos
Ruth Bustamante García	Dra. en investigación en medicina, 25 años de experiencia en modelos experimentales con animales de laboratorio para evaluación de efecto cicatrizante.	Cuidado, asesoría e implementación del modelo de heridas inducidas, histología e inmunohistoquímica.

Ramón Álvarez	Andrés Pineda	MsC. con cursos previos para el manejo de animales, así como conocimientos en el desarrollo de formulaciones inteligentes para administración dérmica y transdérmica. Curso de modelos previo a la experimentación animal	Obtención de nuevos sistemas de liberación dérmica y transdérmica. Evaluación de los materiales innovadores a evaluar de manera <i>in vitro</i> .
------------------	------------------	---	---

20. ANESTÉSICOS, TRANQUILIZANTES ANALGÉSICOS EMPLEADOS

FÁRMACO	DOSIS	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	FRECUENCIA DE ADMINISTRACIÓN
Ketamina	10 mg/kg	IV (conejo)	Una sola vez, previa a la tricotomía
Xilacina	3 mg/kg	IV (conejo)	Una sola vez, previa a la tricotomía
Pentobarbital	35 mg/kg	IP (rata)	Una sola vez, previa a la realización de la herida
Pentobarbital	63 mg/kg	IP (rata)	Una sola vez, eutanasia

21. ¿DE QUÉ MANERA EVALUARÁ EL GRADO DE EFECTIVIDAD DE LOS AGENTES ANESTÉSICOS, TRANQUILIZANTES Y/O ANALGÉSICOS QUE EMPLEARÁ?

Los Indicadores que deben ser evaluados en animales bajo el efecto de anestésicos son los siguientes:

Patrón respiratorio: Incluye no únicamente al número de respiraciones por minuto, sino también su profundidad y las características de la respiración del animal.

Color de las mucosas: Si un animal está recibiendo suficiente oxígeno durante la anestesia sus membranas mucosas permanecen rosadas. Esto puede evaluarse en la mayor parte de los animales observando la mucosa bucal, rectal o vulvar.

Temperatura corporal: La anestesia quirúrgica paraliza los centros reguladores de calor del cerebro, lo que resulta en una caída de la temperatura del paciente. Entre más baja la temperatura es más baja la capacidad del paciente para metabolizar las drogas.

Ojos: Los ojos de un animal anestesiado proporcionan una ventana del estado de anestesia.

Reflejos: Los reflejos que más frecuentemente se evalúan son el podal y el anal. Estos dos reflejos están presentes durante los planos quirúrgicos tres y cuatro, respectivamente, pero desaparecen cuando se alcanza la etapa cuatro de anestesia.

22. EN CASO DE LLEVAR A CABO PROCEDIMIENTOS INVASIVOS COMO CIRUGÍAS, ¿QUÉ CUIDADOS POST-OPERATORIOS SE TENDRÁN? (utilización de antibióticos, analgésicos, limpieza y desinfección, estudios clínicos, etc.)

Solo en caso de ratas; se hará la desinfección del lugar de la herida y como parte del protocolo se evaluarán los emulgeles y parches durante el proceso de cicatrización, por lo que, los animales estarán en observación cada 24 horas con limpieza y aplicación del producto final. Se llevará un registro de cambios conductuales, de peso, aparición de alguna alteración fisiológica como: diarrea, disminución de la adquisición de comida o agua; con la finalidad de mantener todas las condiciones óptimas para las ratas.

No se utilizarán agentes analgésicos, ya que interferiría con la evaluación del efecto cicatrizante, que posteriormente será evaluado en los tejidos por medio de inmunohistoquímica.

23. ¿QUÉ SE HARÁ CON LOS ANIMALES QUE PRESENTEN COMPLICACIONES O DETERIORO EN SU SALUD A CONSECUENCIA DEL EXPERIMENTO? (Criterios para establecer el “punto final humanitario”)* Documento disponible en el PICUAL.

Cuando los animales presenten cualquier anomalía que comprometa su estado de salud, como: diarrea, pérdida súbita de peso, deshidratación o cambios en la conducta, se les realizará una eutanasia para poner el punto final humanitario.

24. AL FINALIZAR LA EXPERIMENTACIÓN ¿QUÉ SE HARÁ CON LOS ANIMALES?

Las ratas se sacrificarán para obtener los tejidos y se realizará el desecho de los cadáveres en el sitio correspondiente.

Los conejos serán donados como lo disponga el encargado del bioterio.

25. DESCRIBIR DETALLADAMENTE EL MÉTODO DE EUTANASIA

Se realizará mediante una sobredosis de anestésico (pentobarbital sódico 63 mg/kg) vía intraperitoneal, con una aguja de calibre 27G usando una jeringa de 1 mL, el animal se observará durante este periodo y se confirmará con la cesación de los signos vitales.

26. ¿QUÉ SIGNOS EVALUARÁ PARA CONSIDERAR MUERTO AL ANIMAL?

Ausencia de ritmo cardíaco y actividad respiratoria, temperatura corporal baja, ausencia de reflejos.

27. DESCRIBA LA FORMA Y EL LUGAR EN EL QUE SE VA A DISPONER DE LOS CADÁVERES

En el bioterio de la Facultad de Química, existen refrigeradores especiales para la conservación de los cadáveres el tiempo que sea necesario hasta que la compañía encargada de deshacerse de ellos se lleve los restos de los roedores para su posterior incineración.

28. DENTRO DE SU PROTOCOLO ¿DE QUÉ MANERA IMPLEMENTA EL PRINCIPIO DE LAS 3 RRR´S? (Reducir, Refinar y Reemplazar).

Refinamiento, ya que este modelo está perfectamente establecido y validado en el bioterio por el grupo de trabajo, así mismo se utilizarán animales que fueron utilizados para las prácticas de inmunología en la Facultad de Química y podrán ser utilizados después para otros proyectos.

He leído y llenado verazmente este formulario y me comprometo a conducir mi proyecto de investigación o docencia de acuerdo con los lineamientos éticos y humanitarios que rigen la experimentación con animales, así como cumplir los aspectos relativos al cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio que se describen en la NOM-069-ZOO-1999.

Nombre: Dra. María Josefa



Bernad Bernad

Fecha: 31 de agosto de 2023

ANEXO

CATEGORIA A

Experimentos que causan poca o ninguna molestia o estrés.

Ejemplos: Experimentos que involucran invertebrados con un sistema nervioso complejo; estudios en vertebrados que incluyen la inmovilización con pericia y durante lapsos breves de los animales con propósitos de observación o examen físico; administración de sustancias no tóxicas por vía oral o parenteral transdérmica intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal; estudios agudos sin sobrevivencia en los cuales los animales están bajo anestesia profunda y no recuperan la consciencia; Métodos de eutanasia recomendados que están precedidos de inducción rápida de la inconsciencia, tales como sobredosis anestésica, decapitación precedida de sedación o anestesia superficial; lapsos breves de privación de agua y/o alimento equivalentes a los períodos de abstinencia en la naturaleza.

CATEGORIA B

Experimentos que causan estrés o dolor leve o dolor de corta duración.

Ejemplos: Estudios en vertebrados que demandan la canulación o cateterización de vasos sanguíneos o cavidades corporales, bajo anestesia; procedimientos de cirugía menor bajo anestesia, tales como biopsias y laparoscopia, inyección por vía intracardiaca o intratorácica; lapsos cortos de inmovilización que van más allá de la simple observación o examen, pero que causan estrés mínimo; lapsos cortos de privación de agua y/o alimento que exceden los períodos de abstinencia en la naturaleza; experimentos conductuales en animales conscientes que involucran inmovilización estresante de corta duración; estímulos nocivos de los cuales es imposible escapar Nota: durante o después de los procedimientos clasificados en esta categoría los animales no deben mostrar anorexia, deshidratación, hiperactividad, postración o somnolencia, aumento de las vocalizaciones y exacerbación de la conducta defensiva-agresiva o mostrar segregación social, aislamiento o automutilación.

CATEGORIA C

Experimentos que involucran dolor o estrés significativo e inevitable en especies animales vertebradas.

Ejemplos: Experimentos en vertebrados que involucran procedimientos de cirugía mayor conducidos bajo anestesia general y subsecuente recuperación; inducción de anomalías anatómicas o fisiológicas que resultarán en dolor o estrés; aplicación de

estímulos nocivos de los cuales sea imposible escapar; lapsos prolongados de inmovilización física (varias horas o más); inducción de estrés conductual, tales como privación materna, agresión, interacciones depredador-presa, procedimientos que causan desorganización sensoriomotriz severa, persistente o irreversible; el uso de adyuvante completo de Freund; producción de enfermedades por irradiación.

NOTA: Los procedimientos clasificados en esta categoría no deben causar anomalías clínicas, tales como: cambio evidente de los patrones conductuales o de actitudes, la ausencia de acicalamiento, deshidratación, vocalizaciones anormales, anorexia prolongada, colapso circulatorio, letargia extrema, o renuencia a moverse, y signos clínicos de infección sistémica o local avanzada o severa.

CATEGORIA D

Procedimientos que involucran infligir dolor severo, cercano o por encima del umbral de tolerancia al dolor en animales conscientes, no anestesiados.

Ejemplos: El uso de relajantes musculares o fármacos paralizantes, tales como la succinil colina y otros compuestos curariformes para inmovilización quirúrgica, utilizados sin combinación con anestésicos; quemaduras severas o traumas en animales no anestesiados; Pruebas de toxicidad y enfermedades infecciosas inducidas experimentalmente u otras condiciones cuya culminación es la muerte; intentos para inducir conductas similares a la psicosis; métodos de sacrificio no aprobados por la **NOM-062-ZOO-1999** tales como la administración de estricnina; estrés severo del que no puedan escapar o estrés terminal.

NOTA: Los experimentos de esta categoría están considerados como altamente cuestionables o inaceptables, cualesquiera que sea la significación de los resultados esperados. Muchos de estos procedimientos están específicamente prohibidos en las políticas nacionales de varios países en los cuales su utilización puede causar el retiro de los donativos gubernamentales y del registro ante las autoridades correspondientes.

10.6 ANEXO 6. Aprobación comité de ética CICUAL



FACULTAD DE QUÍMICA
COMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL
CUIDADO Y USO DE LOS ANIMALES
DE LABORATORIO
OFICIO/FQ/CICUAL/538/23
ASUNTO: DICTÁMEN

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD
DEPARTAMENTO DE FARMACIA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.
Presente

Por este medio le informamos que el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM, ha revisado su protocolo:

“Evaluación del efecto cicatrizante de las películas de formación in situ a partir de dispersiones coloidales de laponita en heridas inducidas en ratas Wistar”

No. de animales empleados: 16 Ratas Wistar

6 Conejos Nueva Zelanda

Emitiendo el dictamen de: **APROBADO**

Con una vigencia de: 1 año posterior a la fecha de aprobación.

Sin más por el momento le enviamos un cordial saludo.

Atentamente
“POR MÍ RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, CDMX a 19 de septiembre del 2023.

M. en C. Ma. Isabel Gracia Mora
Presidente

c.c.p. Dra. Itzel Guerrero Rios, Secretario Académico de Investigación y Posgrado, FQ.
c.c.p. C.P. Martha Castro Gutiérrez. Secretaria Administrativa, FQ.
c.c.p. Expediente CICUAL.

10.7 ANEXO 7. Adsorción de lecitina y ascorbato de sodio en la laponita RD y EP

1.1.9.28 Lecitina soya sobre laponita RD.

Tabla 19. Resultados de lecitina de soya sobre laponita RD.

Cinicial ppm	Ce ppm	C _{adsorbida} ppm	q mg/g	1/Ce ppm ⁻¹	1/q g/mg	ln Ce	ln q	Tamaño nm	PDI	Potencial Z mV
119.3	32.6	86.7	2240.4	0.03069	0.00045	3.48375	7.71439	903.3	0.565	-12.8
119.3	29.7	89.6	2315.9	0.03372	0.00043	3.38967	7.74757	803.4	0.677	-14.1
119.3	25.3	94.0	2429.3	0.03958	0.00041	3.22956	7.79536	902.6	0.613	-13.8
139.2	39.9	99.3	2565.1	0.02507	0.00039	3.68624	7.84976	971.7	0.750	-14.8
139.2	35.5	103.7	2678.5	0.02816	0.00037	3.56972	7.89300	981.9	0.655	-14.9
139.2	38.4	100.8	2602.9	0.02602	0.00038	3.64889	7.86438	963.9	0.708	-14.1
159.1	51.6	107.5	2776.5	0.01938	0.00036	3.94344	7.92895	980.4	0.811	-15.3
159.1	54.5	104.5	2700.9	0.01834	0.00037	3.99858	7.90135	843.3	0.662	-15.7
159.1	54.5	104.5	2700.9	0.01834	0.00037	3.99858	7.90135	806.8	0.624	-16.5
178.9	58.9	120.0	3101.2	0.01698	0.00032	4.07599	8.03956	911.1	0.616	-17.4
178.9	58.9	120.0	3101.2	0.01698	0.00032	4.07599	8.03956	901.2	0.760	-16.8
178.9	64.8	114.2	2950.1	0.01544	0.00034	4.17067	7.98959	945.7	0.584	-17.2
198.8	79.4	119.4	3085.9	0.01260	0.00032	4.37431	8.03460	1024.0	0.619	-17.5
198.8	76.5	122.4	3161.5	0.01308	0.00032	4.33677	8.05880	819.0	0.627	-18.1
198.8	76.5	122.4	3161.5	0.01308	0.00032	4.33677	8.05880	826.1	0.517	-19.1
238.6	102.8	135.8	3508.7	0.00973	0.00029	4.63266	8.16300	868.1	0.586	-23.4
238.6	98.4	140.2	3622.1	0.01016	0.00028	4.58903	8.19480	841.0	0.594	-20.3
238.6	101.3	137.3	3546.5	0.00987	0.00028	4.61833	8.17371	958.0	0.591	-23.3
258.5	129.1	129.4	3342.2	0.00775	0.00030	4.86070	8.11439	941.7	0.592	-26.0
258.5	117.4	141.1	3644.5	0.00852	0.00027	4.76570	8.20098	899.8	0.663	-26.3
258.5	123.3	135.2	3493.4	0.00811	0.00029	4.81433	8.15862	967.1	0.548	-23.8

1.1.9.29 Lecitina de soya sobre laponita EP

Tabla 20. Resultados de lecitina de soya sobre laponita EP.

Cinicial ppm	Ce ppm	C _{adsorbida} ppm	q mg/g	1/Ce ppm ⁻¹	1/q g/mg	ln Ce	ln q	Tamaño nm	PDI	Potencial Z mV
119.3	45.6	73.7	1992.8	0.02192	0.00050	3.82037	7.59729	950.1	0.652	-29.3
119.3	41.4	77.9	2108.1	0.02418	0.00047	3.72225	7.65355	884.1	0.874	-26.7
119.3	41.4	77.9	2108.1	0.02418	0.00047	3.72225	7.65355	913.5	0.696	-30.2
139.2	58.9	80.3	2170.6	0.01697	0.00046	4.07636	7.68275	1046.0	0.775	-32.9
139.2	54.5	84.7	2289.9	0.01834	0.00044	3.99858	7.73624	1209.0	0.748	-27.1
139.2	53.1	86.1	2329.4	0.01885	0.00043	3.97139	7.75337	935.6	0.768	-28.1
159.1	61.6	97.5	2636.4	0.01624	0.00038	4.12054	7.87716	1177.0	0.816	-33.5
159.1	64.8	94.3	2550.7	0.01544	0.00039	4.17067	7.84413	1004.0	0.834	-27.2
159.1	66.2	92.8	2511.2	0.01510	0.00040	4.19301	7.82850	948.2	0.660	-29.3
178.9	78.9	100.1	2706.2	0.01267	0.00037	4.36812	7.90329	986.0	0.577	-35.8
178.9	73.5	105.4	2851.2	0.01360	0.00035	4.29776	7.95548	1259.0	0.867	-25.4
178.9	77.9	101.0	2732.5	0.01283	0.00037	4.35572	7.91296	1104.0	0.788	-32.1
198.8	82.9	115.9	3135.9	0.01206	0.00032	4.41750	8.05069	1245.0	0.657	-34.3
198.8	83.8	115.1	3112.0	0.01194	0.00032	4.42811	8.04303	1233.0	0.697	-29.4
198.8	82.3	116.5	3151.6	0.01215	0.00032	4.41050	8.05566	902.8	0.721	-31.4
238.6	98.9	139.7	3779.5	0.01012	0.00026	4.59371	8.23735	1073.0	0.875	-32.5
238.6	104.2	134.3	3633.8	0.00959	0.00028	4.64679	8.19802	841.0	0.594	-20.3
238.6	105.7	132.9	3594.2	0.00946	0.00028	4.66072	8.18707	958.0	0.591	-23.3
258.5	121.5	137.0	3705.3	0.00823	0.00027	4.79981	8.21753	941.7	0.592	-26.0

258.5	121.8	136.7	3696.8	0.00821	0.00027	4.80239	8.21523	899.8	0.663	-26.3
258.5	116.0	142.5	3855.1	0.00862	0.00026	4.75317	8.25714	967.1	0.548	-23.8

1.1.9.30 Ascorbato de sodio sobre laponita EP

Tabla 21. Resultados de ascorbato se sodio sobre laponita EP.

Cinicial ppm	Ce ppm	C _{adsorbida} ppm	q mg/g	1/Ce ppm ⁻¹	1/q g/mg	ln Ce	ln q	Tamaño nm	PDI	Potencial Z mV
60.0	1.3	58.7	1398.3	0.78645	0.00072	0.24023	7.24301	442.8	0.719	-2.35
60.0	1.3	58.7	1398.7	0.79745	0.00071	0.22634	7.24331	577.4	0.550	-1.46
60.0	1.3	58.7	1397.5	0.76534	0.00072	0.26744	7.24241	591.3	0.715	-3.99
120.0	2.1	117.9	2807.7	0.48116	0.00036	0.73155	7.94011	460.9	0.533	-2.51
120.0	1.8	118.2	2815.2	0.56734	0.00036	0.56680	7.94278	473.4	0.524	-1.28
120.0	1.8	118.2	2814.8	0.56175	0.00036	0.57670	7.94263	406.2	0.404	-3.83
140.0	2.4	137.6	3275.5	0.41168	0.00031	0.88751	8.09423	477	0.451	-4.03
140.0	2.4	137.6	3277.2	0.42392	0.00031	0.85821	8.09474	434.8	0.464	-3.34
140.0	2.4	137.6	3276.8	0.42079	0.00031	0.86561	8.09461	623.1	0.412	-5.28
160.0	2.6	157.4	3748.8	0.39187	0.00027	0.93682	8.22918	622.2	0.584	-6.37
160.0	2.5	157.5	3749.6	0.39733	0.00027	0.92298	8.22940	527.2	0.471	-4.68
160.0	2.6	157.4	3748.3	0.38920	0.00027	0.94367	8.22907	569.3	0.424	-7.77
180.0	4.1	175.9	4188.2	0.24419	0.00024	1.40982	8.34003	708.1	0.724	-11.10
180.0	3.8	176.2	4194.1	0.25976	0.00024	1.34799	8.34142	519.8	0.624	-9.27
180.0	4.0	176.0	4191.1	0.25173	0.00024	1.37939	8.34073	582.1	0.512	-8.79
240.0	5.4	234.6	5586.7	0.18664	0.00018	1.67859	8.62815	641.7	0.612	-6.58
240.0	5.7	234.3	5578.4	0.17517	0.00018	1.74200	8.62665	557.7	0.527	-4.89
240.0	5.4	234.6	5586.7	0.18664	0.00018	1.67859	8.62815	711.6	0.567	-7.20
260.0	8.3	251.7	5991.9	0.11991	0.00017	2.12101	8.69817	670.7	0.232	-10.20
260.0	8.4	251.6	5989.4	0.11842	0.00017	2.13355	8.69775	500.3	0.605	-6.97
260.0	8.3	251.7	5992.8	0.12042	0.00017	2.11679	8.69831	540.4	0.464	-7.34

10.8 ANEXO 8. Informa de actividades en la UNIVERSIDAD DE GRONINGEN

Supervisor en la Universidad de Groningen: Mohammad-Ali Shahbazi

Adscripciones:

- Department of Biomedical Engineering, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Antonius Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen, The Netherlands; m.a.shahbazi@umcg.nl
- W.J. Kolff Institute for Biomedical Engineering and Materials Science, University of Groningen, Antonius Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen, The Netherlands.

Título del proyecto: Desarrollo y caracterización de nanopartículas de hierro/aminoácidos para el tratamiento del cáncer.

Antecedentes:

La ferroptosis, en células normales, es una modalidad de muerte celular programada dependiente del hierro, que implica acumulación intracelular de este metal, agotamiento de las defensas antioxidantes y peroxidación lipídica. Esto ocurre aumentando la concentración intracelular de Fe^{2+} para impulsar la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la reacción de Fenton y a su vez consumiendo glutatión para inhibir la actividad del glutatión peroxidasa y otros mecanismos intrínsecos para inducir este fenómeno. La administración directa de este metal y sus nano acarreadores presentan inconvenientes como: su baja solubilidad en agua, su escasa selectividad y el rápido metabolismo de las moléculas pequeñas, los efectos adversos y la ambigua relación dosis-efecto asociada con la terapia génica, así como su cuestionable biocompatibilidad, son factores que afectan a la salud humana y requieren una mayor optimización [135].

Hoy en día, el hierro se combina con proteínas para conseguir un nivel superior de biocompatibilidad e inmunogeneidad. El desafío de estos materiales novedosos es la extracción, purificación y almacenamiento porque son complicados y costosos [136]. Además, estas proteínas que contienen este metal generalmente tienen un contenido insuficiente de hierro y un efecto farmacéutico limitado y, por lo tanto, no son suficientes

para acelerar la ferroptosis y requieren mejoras adicionales para cumplir con las expectativas de una terapia específica [137]. Además, este tipo de materiales es usado en terapias fototérmicas (PTT) con temperaturas superiores a 50 °C, que pueden ser muy dañinas para tejidos vecinales, provocar metástasis y otros efectos adversos en el individuo [138].

























Este grupo de investigación pretende utilizar este fenómeno para acelerar la mortalidad de las células cancerosas desarrollando nanopartículas de Fe³⁺/Arginina para aumentar los niveles de hierro en el tejido canceroso objetivo. Además, la caracterización fisicoquímica del material innovador se realizará mediante DLS (Dynamic Light Scattering), Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Proceso de preparación de las nanopartículas de Fe³⁺/aminoácidos:

1. Preparar soluciones: para Arginina: cada solución tiene 9,8 mg de treonina (solución A) + 148 mg de FeCl₃ (solución B); y para arginina: cada solución tiene 17,42 mg de arginina (solución A) + 148 mg de FeCl₃ (Solución B).
2. Poner la solución B en A, agitar.
4. Agitar por 32 horas y calentar:
 - a. El grupo rosa, calentar a 80 °C por 4 horas y luego a 40 °C por 24 horas.
 - b. El grupo amarillo, calentar a 40°C por 24 horas.
5. Lavar las nanopartículas.
 - a. Centrifugar a 12500 rpm por 1 hora (muestras de 100 ml).
 - b. Centrifugar a 25000 rpm cada 30 minutos (muestras de 25 ml).

En la Tabla 22 se puede observar cómo transcurrió la reacción.

Tabla 22. Proceso de preparación de las nanopartículas de Fe³⁺/aminoácidos.

Temperatura (°C)	Volumen (mL)	Aminoácido	pH	Tiempo (h)				Centrifugado	Lavado
				0	6	24	32		
Temperatura ambiente, agitación 36 h	100	Arginina	2.19						
	25	Arginina	1.54						
40°C, agitación 36 h	100	Arginina	2.01						
	25	Arginina	1.51						

Resultados (DLS):

En la Tabla 23 se enlistan los resultados de las nanopartículas de hierro desarrolladas en las condiciones anteriormente descritas.

Tabla 23. Resultados DLS nanopartículas Fe³⁺/Treonina.

Temperatura (°C)	Volumen (mL)	Aminoácido	pH	Tamaño (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
Temperatura ambiente, agitación 36 h	100	Arginina	2.19	28.33	0.227	49.9
	25	Arginina	1.54	161.30	0.209	43.7
40°C, agitación 36 h	100	Arginina	2.01	37.45	0.397	46.6
	25	Arginina	1.51	38.62	0.507	44.7

De acuerdo con los resultados se continuará en el presente proyecto de investigación con el aminoácido ARGININA a temperatura ambiente y 36 h agitación ya que describieron los mejores resultados.

Bibliografía

1. Vowden K, Vowden P. Wound dressings: principles and practice. Surgery (United Kingdom) [Internet]. 2017;35:489–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.005>
2. Madrid Martínez A, Santillan Reyes ER. Caracterización fisicoquímica y biológica de un biopolímero obtenido por irradiación gamma a base de quitosano y poloxámero. Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
3. Gupta B, Agarwal R, Alam MS. Hydrogels for wound healing applications [Internet]. Biomedical Hydrogels. Woodhead Publishing Limited; 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857091383.2.184>
4. Vela-Anaya G, Stegensek-Mejía EM, Leija-Hernández C. Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. Revista de Enfermería del Instituto Mexicano del Seguro Social [Internet]. 2018;26:105–14. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/enfermeriaimss/eim-2018/eim182g.pdf>
<http://www.medigraphic.com/pdfs/enfermeriaimss/eim-2018/eim182g.pdf>
5. Gómez BP. Síndrome metabólico y sus complicaciones: el pie diabético. Facultad de Medicina UNAM Mexico. 2017;60:7–18.
6. Rojas R, Basto A, Aguilar C, Zárate E, Villalpando S, Barrientos T. Prevalence of previously diagnosed diabetes mellitus in Mexico. Salud Publica Mex. 2018;60:224–32.
7. Gilaberte Y, Prieto-Torres L, Pastushenko I, Juarranz Á. Anatomy and Function of the Skin [Internet]. Nanoscience in Dermatology. Elsevier Inc.; 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
8. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. Exp Dermatol. 2016;25:92–8.
9. McGrath JA, Uitto J. Anatomy and Organization of Human Skin. Rook's Textbook of Dermatology: Eighth Edition. 2010;1:34–86.

10. Castellanos Ramirez DK, Gonzalez Villordo D, Gracia Bravo LJ. Manejo de heridas. *Cirujano General* [Internet]. 2005;27:164–7. Available from: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1103>
11. Gaskell E, Hamilton A. Antimicrobial clay-based materials for wound care. *Future Medical Chemistry*. 2014;6:641–55.
12. Tomás H, Alves CS, Rodrigues J. Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications? *Nanomedicine* [Internet]. 2018;14:2407–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.04.016>
13. Ghadiri M, Chrzanowski W, Lee WH, Rohanizadeh R. Layered silicate clay functionalized with amino acids: Wound healing application. *RSC Adv*. 2014;4:35332–43.
14. Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Antibiotic eluting clay mineral (Laponite®) for wound healing application: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25:2513–26.
15. BYK Additives & Instruments. Laponite: performance additives [Internet]. Technical Information B-RI 21. 2014. p. 22. Available from: https://www.byk.com/.../BYK_B-RI21_LAPONITE_EN.pdf
16. Golafshan N, Rezasani R, Tarkesh Esfahani M, Kharaziha M, Khorasani SN. Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material. *Carbohydr Polym*. 2017;176:392–401.
17. Teng L, Xia K, Qian T, Hu Z, Hong L, Liao Y, et al. Shape-Recoverable Macroporous Nanocomposite Hydrogels Created via Ice Templating Polymerization for Noncompressible Wound Hemorrhage. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022;
18. Rajabi N, Kharaziha M, Emadi R, Zarrabi A, Mokhtari H, Salehi S. An adhesive and injectable nanocomposite hydrogel of thiolated gelatin/gelatin methacrylate/Laponite® as a potential surgical sealant. *J Colloid Interface Sci*. 2020;564:155–69.
19. Cruz-Castañeda O, Cano-Colín S, Pat L, Salgado RM, Krötzsch E, Elizondo-Vázquez F, et al. Maltodextrin/ascorbic acid stimulates wound closure by increasing collagen turnover and TGF- β 1 expression in vitro and changing the stage of inflammation from chronic to acute in vivo. *J Tissue Viability*. 2017;26:131–7.

20. Avaltroni F, Bouquerand PE, Normand V. Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. *Carbohydr Polym.* 2004;58:323–34.
21. Vitamin C: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2022 May 18]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00126>
22. Kennedy JF, Knill CJ, Taylor DW. Maltodextrins. *LC-GC North America* [Internet]. 1995 [cited 2022 May 18];22:65–82. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-2159-4_3
23. Negrão-Murakami AN, Nunes GL, Pinto SS, Murakami FS, Amante ER, Petrus JCC, et al. Influence of DE-value of maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *LWT - Food Science and Technology.* 2017;79:561–7.
24. Radosta S, Schierbaum F, Reuther F, Anger H. Polymer-Water Interaction of Maltodextrins. Part I: Water Vapour Sorption and Desorption of Maltodextrin Powders. *Starch - Stärke* [Internet]. 1989 [cited 2022 May 18];41:395–401. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/star.19890411008>
25. Wangsakan A, Chinachoti P, McClements DJ. Isothermal titration calorimetry study of the influence of temperature, pH and salt on maltodextrin–anionic surfactant interactions. *Food Hydrocoll.* 2006;20:461–7.
26. Ismail Y, Mauer LJ. Phase transitions of ascorbic acid and sodium ascorbate in a polymer matrix and effects on vitamin degradation. *J Food Process Eng.* 2020;43.
27. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, tomo 1. Unidécima.* 2020.
28. Stein HB, Hasan A, Fox IH. Ascorbic acid induced uricosuria. A consequence of megavitamin therapy. *Ann Intern Med.* 1976;84:385–8.
29. Benson H, Watkinson A. *Transdermal and Topical Drug Delivery, Principles and Practice. Primera.* Benson H, Watkinson A, editors. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2012.
30. Guy RH, Hadgraft J. *Transdermal Drug Delivery. Segunda.* Guy RH, Hadgraft J, editors. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences.* New York: Marcel Dekker, Inc.; 2003.

31. Moss GP, Dearden JC, Patel H, Cronin MTD. Quantitative structure – permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. 2002;16:299–317.
32. Serrano Catañeda P. Desarrollo de una nueva forma farmacéutica a base de microagujas poliméricas biodegradables acopladas a un parche transdermico para la liberación de fármacos. Universidad Autónomas Metropolitana Unidad Xochimilco; 2018.
33. Snejdrova E, Loskot J, Veris A, Kastner P, Andrys R. Formulation study of PLGA in situ films for topical delivery of salicylates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [Internet]. 2024;199:114282. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641124001085>
34. Kathe K, Kathpalia H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2017;12:487–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.004>
35. Scholz MS, Blanchfield JP, Bloom LD, Coburn BH, Elkington M, Fuller JD, et al. The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: A review. *Compos Sci Technol*. 2011. p. 1791–803.
36. Marfil PHM, Anhê ACBM, Telis VRN. Texture and Microstructure of Gelatin/Corn Starch-Based Gummy Confections. *Food Biophys*. 2012;7:236–43.
37. Azarmi S, Huang Y, Chen H, McQuarrie S, Abrams D, Roa W, et al. Optimization of a two-step desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2006;9:124–32.
38. Sahoo N, Sahoo RK, Biswas N, Guha A, Kuotsu K. Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. *Int J Biol Macromol*. 2015;81:317–31.
39. Xue J, Zhong Q. Blending lecithin and gelatin improves the formation of thymol nanodispersions. *J Agric Food Chem*. 2014;62:2956–62.
40. Phone-Poulenc R. Lecithin. *ARMIN WENDEL*. 2014;1–19.
41. Ries HR, Matsumoto M, Uyeda N, Suito E. Electron Microscope Studies of Monolayers of Lecithin. *Advances in Chemistry*; American Chemical Society. 1974;1:286–229.
42. Urbán-Morlán Z, Ganem-Rondero A, Melgoza-Contreras LM, Escobar-Chávez JJ, Nava-Arzaluz MG, Quintanar-Guerrero D. Preparation and characterization of solid lipid

nanoparticles containing cyclosporine by the emulsification-diffusion method. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:611–20.

43. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 2018;10:1–17.

44. R. Pecora. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research*. 2000;2:123–31.

45. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12:255–64.

46. Sohn S, Kim D. Modification of Langmuir isotherm in solution systems - Definition and utilization of concentration dependent factor. *Chemosphere*. 2005;58:115–23.

47. Kaouah F, Boumaza S, Berrama T, Trari M, Bendjama Z. Preparation and characterization of activated carbon from wild olive cores (oleaster) by H₃PO₄ for the removal of Basic Red 46. *J Clean Prod* [Internet]. 2013;54:296–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.04.038>

48. Singh M, Hakimabadi SG, Van Geel PJ, Carey GR, Pham ALT. Modified competitive Langmuir model for prediction of multispecies PFAS competitive adsorption equilibria on colloidal activated carbon. *Sep Purif Technol*. 2024;345.

49. Mezger T. *The Rheology Handbook*. The Rheology Handbook. 2020.

50. Zhang C, Chen L, Teng H. Phase behavior of the gelation process of myofibrillar protein-curdlan blended system: Discussion based on rheology and gel properties. *Food Chem*. 2024;437.

51. Derkach SR, Voron'ko NG, Sokolan NI, Kolotova DS, Kuchina YA. Interactions between gelatin and sodium alginate: UV and FTIR studies. *J Dispers Sci Technol* [Internet]. 2020;41:690–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1611437>

52. Saji R, Ramani A, Gandhi K, Seth R, Sharma R. Application of FTIR spectroscopy in dairy products: A systematic review. *Food and Humanity*. 2024;2:100239.

53. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degree of crosslinking. 2001;22:3–8.

54. Wihodo M, Moraru CI. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. *J Food Eng. Elsevier Ltd*; 2013. p. 292–302.
55. Easdani M, Ahammed S, Saqib MN, Liu F, Zhong F. Engineering biodegradable controlled gelatin-zein bilayer film with improved mechanical strength and flexibility. *Food Hydrocoll.* 2024;148.
56. Lynch JM, Corniuk RN, Brignac KC, Jung MR, Sellona K, Marchiani J, et al. Differential scanning calorimetry (DSC): An important tool for polymer identification and characterization of plastic marine debris. *Environmental Pollution.* 2024;346.
57. Merdun H, Yıldırım M. Pyrolysis and combustion of industrial hemp, coal and their blends for thermal analysis by thermogravimetric analysis/Fourier transform infrared spectrometer. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy* [Internet]. 2024; Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0734242X241241604>
58. Yusoff Y, Sann TE. Biomass-plastic fusion: In-depth characterization through FTIR and TGA analysis. *Mater Today Proc.* 2024;
59. Vernon-Parry KD. Scanning Electron Microscopy : An introduction. *III-Vs Review.* 2000;13:40–4.
60. Clavijo J. Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos.* 2013;3.
61. Agrawal M, Prasad V, Nijhawan G, Jalal SS, Rajalakshmi B, Dwivedi SP. A Comprehensive Review of Electron Microscopy in Materials Science: Technological Advances and Applications. Msomi V, Ngonda T, editors. *E3S Web of Conferences* [Internet]. 2024;505:01029. Available from: <https://www.e3s-conferences.org/10.1051/e3sconf/202450501029>
62. Ganser C, Uchihashi T. Measuring mechanical properties with high-speed atomic force microscopy. *Microscopy.* Oxford University Press; 2024. p. 14–21.
63. Liu S, Han Y, Kong L, Wang G, Ye Z. Atomic force microscopy in disease-related studies: Exploring tissue and cell mechanics. *Microsc Res Tech.* John Wiley and Sons Inc; 2024. p. 660–84.

64. Villarino NF, Landoni MF. Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. *Analecta Vet.* 2006;26:28–37.
65. García MaA, Soberón E, Cortés M, Rodríguez R, Herrera JL, Alcantara A. Guía de validación de métodos analíticos (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.). 2002;132.
66. Pineda-Álvarez RA, Bernad-Bernad MJ, Rodríguez-Cruz IM, Escobar-Chávez JJ. Development and Characterization of Starch/Gelatin Microneedle Arrays Loaded with Lecithin–Gelatin Nanoparticles of Losartan for Transdermal Delivery. *J Pharm Innov.* 2020;
67. Rasouli M. Characterization and improvement of phenol-sulfuric acid microassay for glucose-based glycogen. 2020;2020–4.
68. Lenhardt R, Sessler DI. Estimation of mean body temperature from mean skin and core temperature. *Anesthesiology.* 2006;105:1117–21.
69. Ludwig N, Formenti D, Gargano M, Alberti G. Skin temperature evaluation by infrared thermography: Comparison of image analysis methods. *Infrared Phys Technol [Internet].* 2014;62:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.infrared.2013.09.011>
70. López García M del R. Preparación y caracterización de nanopartículas lipídicas y evaluación de su efecto sobre la piel.
71. Bergaya F, Theng BKG, Lagaly G, editors. *Handbook of Clay Science.* Elsevier. Amsterdam: Elsevier; 2012.
72. Bergaya F, Theng BKG, Lagaly G, editors. *Handbook of Clay Science [Internet].* Elsevier. *Dev Clay Sci.* Amsterdam: Elsevier; 2006. Available from: <http://books.google.com/books?id=uVbam9Snw5sC&pgis=1>
73. Jin Y, Chai W, Huang Y. Printability study of hydrogel solution extrusion in nanoclay yield-stress bath during printing-then-gelation biofabrication. *Materials Science & Engineering C [Internet].* 2017;80:313–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.144>
74. Mamataliev N, Kalbaev A, Eshmetov I, Kuldashaeva S. Comparison of physicochemical and adsorption properties of intercalated bentonite and laponite. *PROBLEMS IN THE TEXTILE AND LIGHT INDUSTRY IN THE CONTEXT OF INTEGRATION OF SCIENCE*

AND INDUSTRY AND WAYS TO SOLVE THEM: PTLICISIWS-2. AIP Publishing; 2024. p. 030058.

75. Huerta-Ángeles G, Kanizsová L, Mielczarek K, Konefał M, Konefał R, Hodan J, et al. Sustainable aerogels based on biobased poly (itaconic acid) for adsorption of cationic dyes. *Int J Biol Macromol*. 2024;259.

76. Zhang H, Zheng Y, Wang H, Chang N. Preparation of starch-based adsorbing-flocculating bifunctional material St-A/F and its removal of active, direct and disperse dyes from textile printing and dyeing wastewater. *Polymer Bulletin*. 2024;81:2777–800.

77. Pineda R. Desarrollo y caracterización de microagujas poliméricas biodegradables cargadas con nanopartículas de lecitina/gelatina/losartán como novedosa alternativa a la vía oral para el control de la hipertensión arterial. 2020.

78. Coester C, Langer K, Von Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation-a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul*. 2000;17:187–93.

79. Gaharwar AK, Avery RK, Assmann A, Paul A, McKinley GH, Khademhosseini A, et al. Shear-Thinning Nanocomposite Hemorrhage. 2014;

80. Martucci JF, Accareddu AEM, Ruseckaite RA. Preparation and characterization of plasticized gelatin films cross-linked with low concentrations of Glutaraldehyde. *J Mater Sci*. 2012;47:3282–92.

81. López-Angulo D, Bittante AMQB, Luciano CG, Ayala-Valencia G, Flaker CHC, Djabourov M, et al. Effect of Laponite® on the structure, thermal stability and barrier properties of nanocomposite gelatin films. *Food Biosci [Internet]*. 2020;35:100596. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100596>

82. Valencia GA, Luciano CG, Lourenço RV, do Amaral Sobral PJ. Microstructure and physical properties of nano-biocomposite films based on cassava starch and laponite. *Int J Biol Macromol*. 2018;107:1576–83.

83. Berthet M, Gauthier Y, Lacroix C, Verrier B, Monge C. Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? *Trends Biotechnol [Internet]*. 2017;35:770–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779917301130>

84. Naderi N, Karponis D, Mosahebi A, Seifalian AM. Nanoparticles in wound healing; from hope to promise, from promise to routine. *Frontiers in Bioscience - Landmark*. 2018;23:1038–59.
85. Ding J, Venkatesan R, Zhai Z, Muhammad W, Nakkala JR, Gao C. Micro- and nanoparticles-based immunoregulation of macrophages for tissue repair and regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2020;192:111075. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111075>
86. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12:255–64.
87. García-Guzmán P, Medina-Torres L, Calderas F, Bernad-Bernad MJ, Gracia-Mora J, Mena B, et al. Characterization of hybrid microparticles/Montmorillonite composite with raspberry-like morphology for Atorvastatin controlled release. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2018;167:397–406. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.020>
88. Becher TB, Mendonça MCP, De Farias MA, Portugal R V., De Jesus MB, Ornelas C. Soft Nanohydrogels Based on Laponite Nanodiscs: A Versatile Drug Delivery Platform for Theranostics and Drug Cocktails. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10:21891–900.
89. Finotelli PV. Microencapsulation of Ascorbic Acid in Maltodextrin and Capsul Using Spray-. 2016;
90. Yang JH, Lee SY, Han YS, Park KC, Choy JH. Efficient transdermal penetration and improved stability of L-ascorbic acid encapsulated in an inorganic nanocapsule. *Bull Korean Chem Soc*. 2003;24:499–503.
91. Minjares-Fuentes R, Medina-Torres L, González-Laredo RF, Rodríguez-González VM, Eim V, Femenia A. Influence of water deficit on the main polysaccharides and the rheological properties of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) mucilage. *Ind Crops Prod*. 2017;109:644–53.
92. Blanco-López M, González-Garcinuño Á, Tabernero A, Martín Del Valle EM. Steady and Oscillatory Shear Flow Behavior of Different Polysaccharides with Laponite®. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/polym13060966>

93. Liu P, Du M, Leong YK, Clode P, Liu J. Spherical metal oxides-LAPONITE® sheets interactions: Microstructure, rheology and thixotropy of composite gels. *Appl Clay Sci.* 2021;208.
94. Vanin FM, Sobral PJA, Menegalli FC, Carvalho RA, Habitante AMQB. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. 2005;19:899–907.
95. Negrete-Herrera N, Putaux JL, David L, De Haas F, Bourgeat-Lami E. Polymer/laponite composite latexes: Particle morphology, film microstructure, and properties. *Macromol Rapid Commun.* 2007;28:1567–73.
96. Al-Hassan AA, Norziah MH. Starch-gelatin edible films : Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocoll [Internet].* 2012;26:108–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.015>
97. Savencu I, Iurian S, Porfire A, Bogdan C, Tomuță I. Review of advances in polymeric wound dressing films. *React Funct Polym.* Elsevier B.V.; 2021.
98. Li C, Mu C, Lin W, Ngai T. Gelatin Effects on the Physicochemical and Hemocompatible Properties of Gelatin/PAAm/Laponite Nanocomposite Hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7:18732–41.
99. Castro N, Durrieu V, Raynaud C, Rouilly A. Influence of DE-value on the physicochemical properties of maltodextrin for melt extrusion processes. *Carbohydr Polym [Internet].* 2016;144:464–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.004>
100. Vivcharenko V, Benko A, Palka K, Wojcik M, Przekora A. Elastic and biodegradable chitosan/agarose film revealing slightly acidic pH for potential applications in regenerative medicine as artificial skin graft. *Int J Biol Macromol.* 2020;164:172–83.
101. Teeranachaideekul V, Boonme P, Souto EB, Müller RH, Junyaprasert VB. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *Journal of Controlled Release.* 2008;128:134–41.
102. Nasab ME, Takzaree N, Saffaria PM, Partoazar A. In vitro antioxidant activity and in vivo wound-healing effect of lecithin liposomes: A comparative study. *J Comp Eff Res.* 2019;8:633–43.

103. Wissing SA, Mü RH. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties [Internet]. *Int J Pharm.* 2002. Available from: www.elsevier.com/locate/ijpharm
104. Li X, Ma M, Ahn DU, Huang X. Preparation and characterization of novel eggshell membrane-chitosan blend films for potential wound-care dressing: From waste to medicinal products. *Int J Biol Macromol.* 2019;123:477–84.
105. Pan N, Qin J, Feng P, Song B. Window screen inspired fibrous materials with anisotropic thickness gradients for improving light transmittance. *Nanoscale.* 2019;11:13521–31.
106. Kaygusuz H, Torlak E, Akın-Evingür G, Özen İ, von Klitzing R, Erim FB. Antimicrobial cerium ion-chitosan crosslinked alginate biopolymer films: A novel and potential wound dressing. *Int J Biol Macromol.* 2017;105:1161–5.
107. Khanlari S, Dubé MA. Bioadhesives: A review. *Macromol React Eng.* 2013;7:573–87.
108. Waring M, Rippon M, Bielfeldt S, Brandt M. Cell attachment to adhesive dressings: Qualitative and quantitative analysis. *Wounds UK* [Internet]. 2008;4:35–47. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/242557299>
109. Blacklow SO, Li J, Freedman BR, Zeidi M, Chen C, Mooney DJ. Bioinspired mechanically active adhesive dressings to accelerate wound closure. *Synth Biol* [Internet]. 2019;5:1–9. Available from: <https://www.science.org>
110. Arilla E, Igual M, Martínez Monzó J, Codoñer Franch P, García Segovia P. Impact of Resistant Maltodextrin Addition on the Orange Juice. *Foods.* 2020;1832:1–9.
111. Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2007;39:549–59.
112. Pálková H, Madejová J, Zimowska M, Serwicka EM. Laponite-derived porous clay heterostructures: II. FTIR study of the structure evolution. *Microporous and Mesoporous Materials.* 2010;127:237–44.
113. Hamid-Akash MS, Rehman K. *Drug Stability and Chemical Kinetics.* Drug Stability and Chemical Kinetics. Springer Singapore; 2020.
114. Varnik F, Baschnagel J, Binder K. Static and dynamic properties of supercooled thin polymer films. *European Physical Journal E.* 2002;8:175–92.

115. Sobral PJA, Habitante AMQB. Phase transitions of pigskin gelatin. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2001;15:377–82. Available from: www.elsevier.com/locate/foodhyd
116. Abrusci C, Martín-González A, Del Amo A, Catalina F, Bosch P, Corrales T. Chemiluminescence study of commercial type-B gelatines. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2004;163:537–46.
117. Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Antibiotic eluting clay mineral (Laponite®) for wound healing application: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25:2513–26.
118. Nurhadi B, Roos YH, Maidannyk V. Physical properties of maltodextrin de 10: Water sorption, water plasticization and enthalpy relaxation. *J Food Eng*. 2016;174:68–74.
119. Ziderman II, Gregorski KS, Lopez S V, Friedman M. Thermal interaction of ascorbic acid and sodium ascorbate with proteins in relation to nonenzymatic Browning and Maillard reactions of foods. *Food Chem* [Internet]. 1989;37:1480–6. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
120. Hellio-Serughetti D, Djabourov M. Gelatin hydrogels cross-linked with bisvinyl sulfonemethyl. 2. The physical and chemical networks. *Langmuir*. 2006;22:8516–22.
121. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;13:123–33.
122. Kalam M, Humayun M, Parvez N, Yadav S, Garg A, Amin S, et al. Release kinetics of modified pharmaceutical dosage forms: a review. *Continental J Pharmaceutical Sciences*. 2007;1:30–5.
123. Mulye N V, Turco SJ. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dihydrate matrices. *Drug Dev Ind Pharm*. 1995;21:943–53.
124. Sáez V, Hernáez E, Sanz Angulo L. Mecanismos de liberación de fármaco desde materiales poliméricos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2004;5:55–70.
125. Shahid M, Hussain A, Khan AA, Alanazi AM, Alaofi AL, Alam M, et al. Antifungal Cationic Nanoemulsion Ferrying Miconazole Nitrate with Synergism to Control Fungal Infections: In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Evaluations. *ACS Omega*. 2022;7:13343–53.
126. Schrieber, Reinhard; Gareis H. *Gelatine Handbook*. Wiley-VCH. 2007.

127. Le NTT, Cao V Du, Nguyen TNQ, Le TTH, Tran TT, Thi TTH. Soy lecithin-derived liposomal delivery systems: Surface modification and current applications. *Int J Mol Sci*. MDPI AG; 2019.
128. Das SS, Neelam, Hussain K, Singh S, Hussain A, Faruk A, et al. Laponite-based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Curr Pharm Des*. 2019;25:424–43.
129. Li J, Han J, Yu W, Wang K, Liu Z, Liu Y. Alginate-modulated continuous assembly of iron/tannic acid composites as photothermally responsive wound dressings for hemostasis and drug resistant bacteria eradication. *Int J Biol Macromol*. 2023;242.
130. Ahmadian Z, Correia A, Hasany M, Figueiredo P, Dobakhti F, Eskandari MR, et al. A Hydrogen-Bonded Extracellular Matrix-Mimicking Bactericidal Hydrogel with Radical Scavenging and Hemostatic Function for pH-Responsive Wound Healing Acceleration. *Adv Healthc Mater*. 2021;10.
131. Chen Z, Yuan M, Li H, Li L, Luo B, Lu L, et al. Succinylated chitosan derivative restore HUVEC cells function damaged by TNF- α and high glucose in vitro and enhanced wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2024;265.
132. Baker SE, Sawvel AM, Zheng N, Stucky GD. Controlling bioprocesses with inorganic surfaces: Layered clay hemostatic agents. *Chemistry of Materials*. 2007;19:4390–2.
133. Assaw S. The use of modified Massion's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study [Internet]. *Malays J Vet Res (Putrajaya)*. 2012. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/263542834>
134. Vidinsk[˚] B, Gál P, Toporcer T, Longauer F, Lenhardt^a, Bobrov N, et al. Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats [Internet]. Available from: <http://www.vfu.cz/acta-vet/actavet.htm>
135. Liu S, Zhang M, Jin H, Wang Z, Liu Y, Zhang S, et al. Iron-Containing Protein-Mimic Supramolecular Iron Delivery Systems for Ferroptosis Tumor Therapy. *J Am Chem Soc*. 2023;145:160–70.
136. Li S, Zhang Y, Jin H, Gao H, Liu S, Shi W, et al. Biomimetic dual-nanozymes with catalytic cascade reactions against diabetic wound infection. *J Colloid Interface Sci*. 2023;651:319–33.

137. Pucci C, Martinelli C, De Pasquale D, Battaglini M, Di Leo N, Degl'Innocenti A, et al. Tannic Acid-Iron Complex-Based Nanoparticles as a Novel Tool against Oxidative Stress. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2022;14:15927–41.
138. He M, Du C, Xia J, Zhang ZG, Dong CM. Multivalent Polypeptide and Tannic Acid Cooperatively Iron-Coordinated Nanohybrids for Synergistic Cancer Photothermal Ferroptosis Therapy. *Biomacromolecules*. 2022;23:2655–66.
139. Gonzaga V de AM, Poli AL, Gabriel JS, Tezuka DY, Valdes TA, Leitão A, et al. Chitosan-laponite nanocomposite scaffolds for wound dressing application. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2020;108:1388–97.
140. Rouf TB, Schmidt G, Kokini JL. Zein–Laponite nanocomposites with improved mechanical, thermal and barrier properties. *J Mater Sci*. 2018;53:7387–402.
141. Olivera N, Rouf TB, Bonilla JC, Carriazo JG, Dianda N, Kokini JL. Effect of LAPONITE® addition on the mechanical, barrier and surface properties of novel biodegradable kafirin nanocomposite films. *J Food Eng*. 2019;245:24–32.
142. Bosch Ojeda C, Sanchez Rojas F. Recent developments in derivative ultraviolet/visible adsorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*. 2004;518:1–24.
143. Bosch Ojeda C, Sanchez Rojas F. Recent applications in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry : 2009–2011. A review. *Microchemical Journal* [Internet]. 2013;106:1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.012>
144. Harron DWG. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: The ICH Process. *The Textbook of Pharmaceutical Medicine*. 2013;1994:447–60.
145. Aubry T, Bossard F, Moan M. Laponite Dispersions in the Presence of an Associative Polymer. *American Chemical Society*. 2002;18:155–9.

10.9 ANEXO 9. Inicio de escritura 2do artículo

JChem. Pharm. Bull.

Regular article

Adsorption of soy lecithin on laponite EP and RD

Ramón Andrés Pineda Álvarez^a, David González Orozco^a, María Josefa Bernad Bernad^{a*}.

^aChemistry Faculty, Universidad Nacional Autónoma de México; Cto. Escolar S/N, C.U., Coyoacán, Ciudad de México 04510, México.

SUMMARY

KEYWORDS

GRAPHICAL ABSTRACTS

INTRODUCTION

Lecithin has been extensively used in alimentary, cosmetic and pharmaceutical industry. This term refers to the mix of triglycerides, phospholipids (phosphatidylinositol, phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine), and glycolipids. However, the word lecithin, in the field of biochemistry specifically refers to pure phosphatidylcholine, which is extracted from vegetables such as soybeans, sunflower, rice beans, and rape seed; and from animal sources are egg yolk, marine sources, and milk. Where soy lecithin (SL) is considered to be more economical, safer, and stable from a production point of view (less polyunsaturated fatty acids) [127].

The standard method of analysis for lecithin generality is considered in the Official and Tentative Methods of the American Oil Chemists' Society (AOCS). This guide shows some methods using organic solvents, for example: AOCS Ja 4-46 (acetone) and AOCS Ja 3-87 (hexane), others using hard substances such as AOCS Ja 6-55 (potassium hydroxide), AOCS Ja 8-87 (peroxide) and AOCS Cd 1-25 (iodine), which are not friendly with the environment. Also, the SL concentration is evaluated by chromatographic methods like gas chromatography (GC), thin layer chromatography (TLC), and high performance liquid chromatography (HPLC) and the newer method to determine different types of phospholipid, ³¹P-NMR, those methods are too expensive, requires high standards and specific condition to analysis lecithin [40].

Laponite is a synthetic clay widely used as excipient and active substance in the pharmaceutical and cosmetic industry. Its form is like a disk with ≈ 25 nm diameter and ≈ 1 nm edge (see Figure 1), and its structure is like a sandwich, the external sheets are tetrahedral and octahedral in the middle (2:1) where the cations are found (Mg^{2+} and Li^+)[139,140]. Moreover, each disk has a negative charge on the surface and at the edge is weakly positive, this variability of charges allows the possibility to form a “house of cards” configuration, where the weaker positive charges interact with the negative surfaces of the adjacent disks, causing a highly thixotropic gel, this phenomenon is called physical crosslinked[141], Figure 1 describes it.

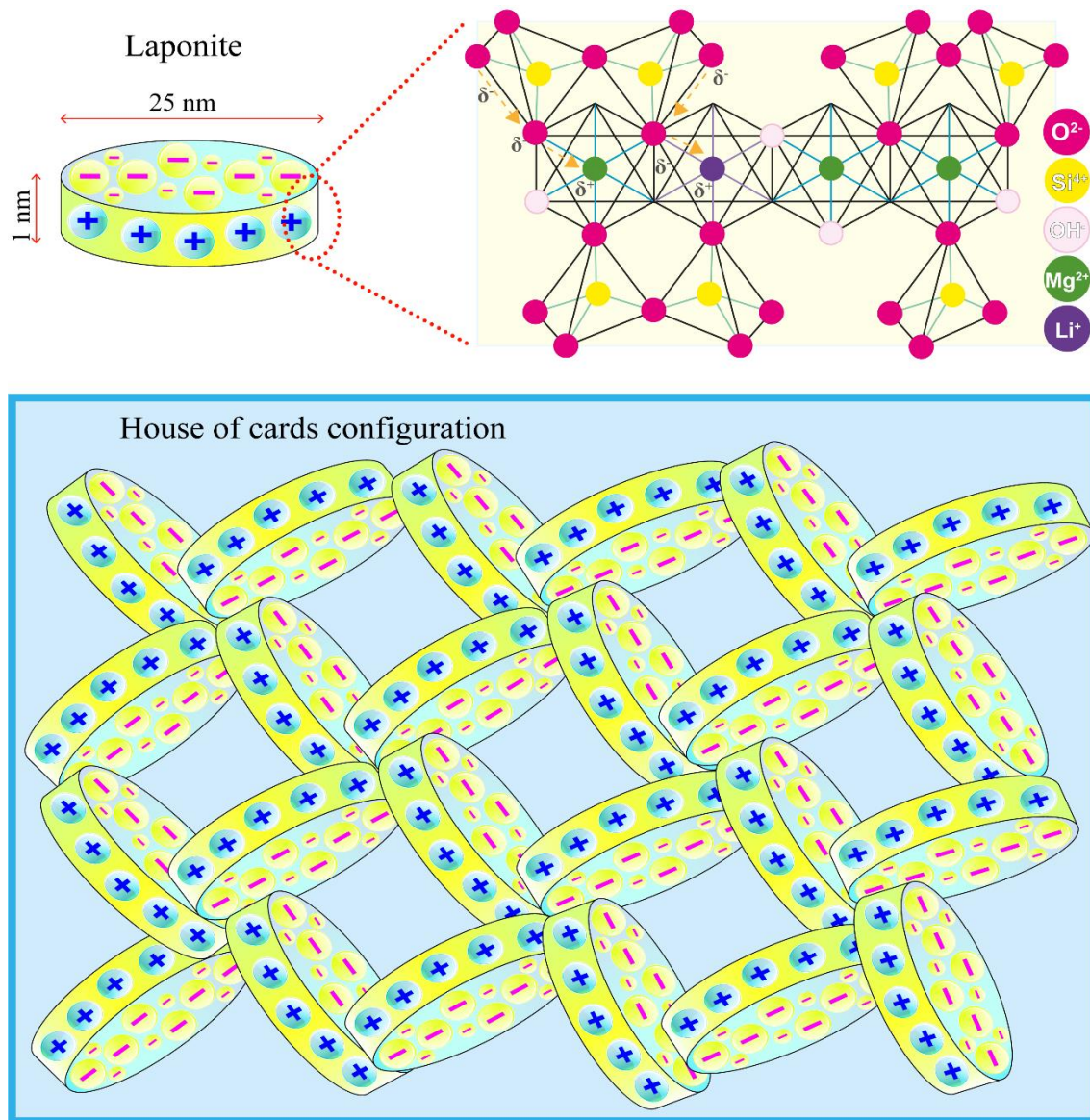


Figure 1. Scheme of laponite: structure and house of cards configuration.

RESULTS AND DISCUSSION

Na, Li and Mg in Laponite EP and RD (Lap RD and Lap EP)

Table 1 described the content of Na, Li and Mg in the different laponites evaluated. Where the amounts of cations in Lap RD were from 0.5 until twice more than EP for each metal. Considered, the Z potential of laponites in Table 3 was possible confirmed that the negativity of clay particles is completely opposite to the mass of alkaline and alkaline earth metals in its structure because they can attract the electronic density of the external atoms of the mineral, in these cases, oxygens, this phenomenon inferred the extra molecular interaction [71,72]. For this reason, Lap EP is more negative and has a major application

for bioprinting as supported batch material because can resist and stabilize dispersions with an elevated presence of ions [73]. In the Adsorption Method section discussed this point and humidity data (MB35 Halogen, OHAUS, USA).

Table 1. Na, Li and Mg in Laponite EP and RD.

Element	Technic	Lap EP (µg/g)	Lap RD (µg/g)
Na	MP-AES	10376.01	20663.67
	Flame-AA	10707.25	21907.96
Li	MP-AES	2096.15	2975.24
	Flame-AA	1890.33	2942.54
Mg	MP-AES	131819.16	211789.91
	Flame-AA	125906.92	203072.47
	% Humidity	11.97	7.84

Validation method of soy lecithin (SL)

In many cases of pharmaceutical and biological materials, like soy lecithin, are difficult to get the maximum points in a specific wavelength (λ_{max}) for spectral curves in UV-VIS spectrophotometry, derivative transformation is a great alternative to show inflection points and it will be a better way for quantification these types of molecules. However, this mathematical technic does not increase the information content of a spectrum, but it permits discrimination against broadband inferences, arising from turbidity or non-specific matrix adsorption and gets a specific λ to continue the research [142,143]. Thereby the researchers used the derivative transformation technic to quantify SL in different concentrations as show the Figure 2 and validated this method, the inflection point selected was 256 nm for the next assays.

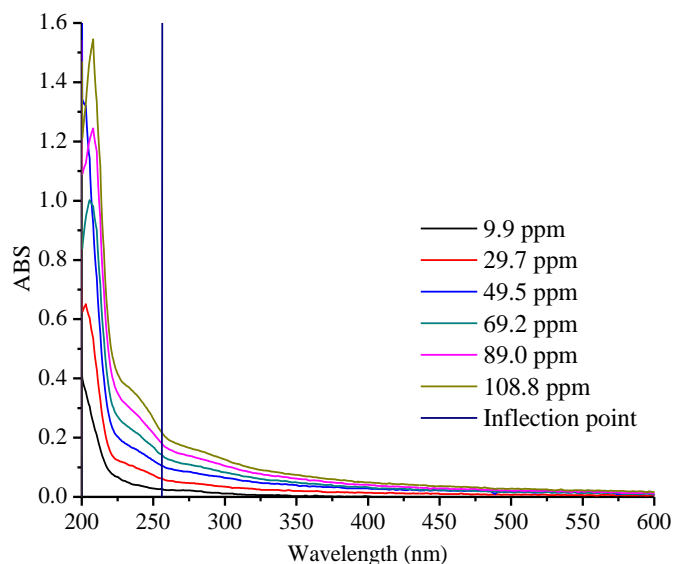


Figure 2. Spectral curves of different concentration of soy lecithin.

Table 2 described the data summary obtained in the validation method by ICH guidelines (linearity, accuracy, precision, sensitivity, repeatability and stability) [144]. All results gotten were in acceptance criteria.

Table 2. Summary of soy lecithin validation.

Parameter	Sample evaluated	Acceptance criteria	Result
System precision	55.5 ppm	% RSD < 1.5 %	1.3 %
System linearity	9.9 ppm	$y = mx + b$	$ABS = 0.0020 \cdot [SL_{ppm}] + 0.0047$
	29.7 ppm	$r^2 > 0.98$	0.9990
	49.5 ppm	$m \text{ CI}^\dagger \neq 0$	0.0019 ppm ⁻¹ to 0.0020 ppm ⁻¹
Sensitivity	69.2 ppm	$LOD^\ddagger = 3.3 \cdot SD_b/m$	2.0 ppm
	89.0 ppm	$LOC^\S = 10 \cdot SD_b/m$	5.9 ppm
	108.8 ppm		
Method accuracy and repeatability	≈ 10.2 mg	% RSD < 2.0 %	1.42 %
		$CI^\dagger \cap 100 \%$	97.88 % to 100.84 %
Method linearity	9.9 ppm	$y = mx + b$	$ABS = 1.0113 \cdot [SL_{ppm}] - 0.2212$
	49.5 ppm	$r^2 > 0.98$	0.9997

	89.0 ppm	$m \text{ CI}^\dagger \cap 1$	0.9967 ppm ⁻¹ to 1.0258 ppm ⁻¹
		$b \text{ CI}^\dagger \cap 0$	-1.1326 ppm ⁻¹ to 0.6902 ppm ⁻¹
		% RSD _{regression} < 3.0 %	1.2 %
		% RSD < 3.0 %	2.7 %
Method precision	≈ 55.5 ppm	% RSD < 3.0 %	2.6 %
Method stability	≈ 55.5 ppm	$ d_n < 3.0 \%$	24 h = 1.2 % 48 h = 0.3 % 72 h = 1.5 %

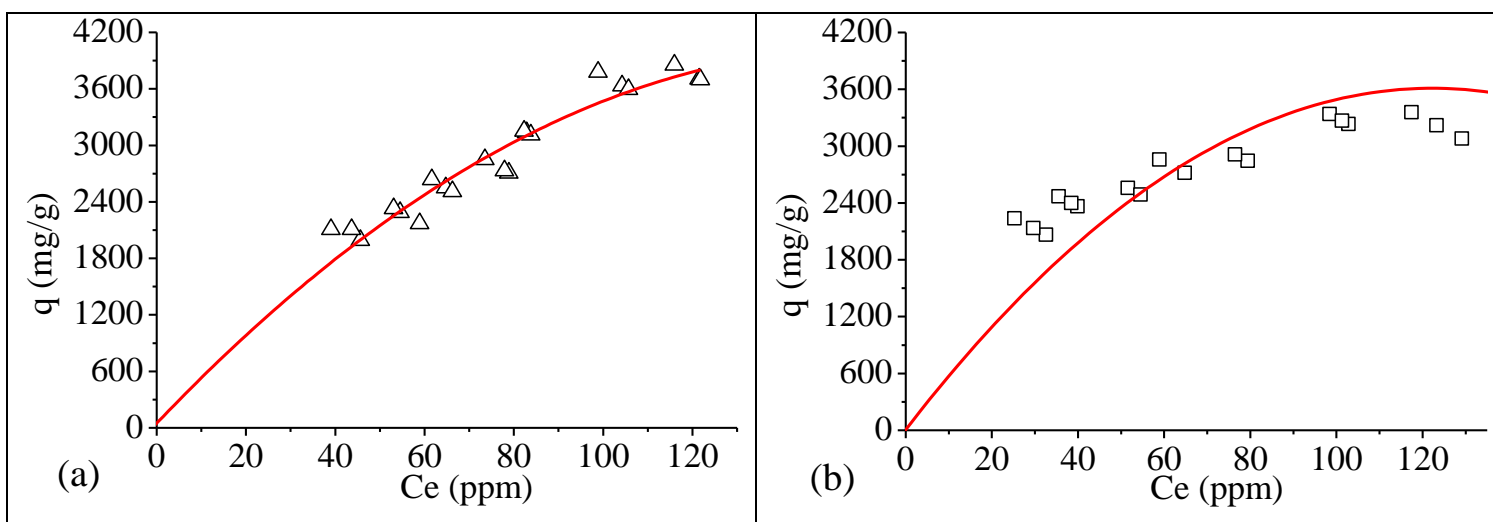
[†]Confidence Interval; [‡]Limit of Detection; [¶]Limit of Quantification.

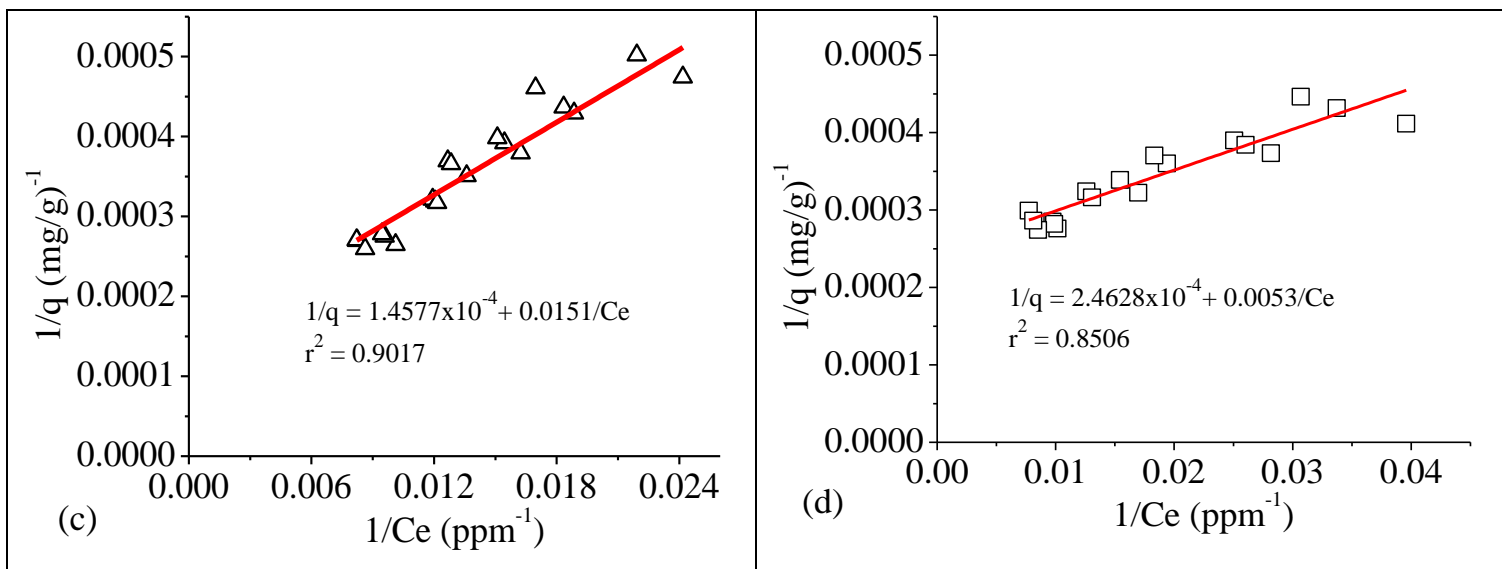
Adsorption method

Blanks

Table 3. Properties of raw materials by DLS.

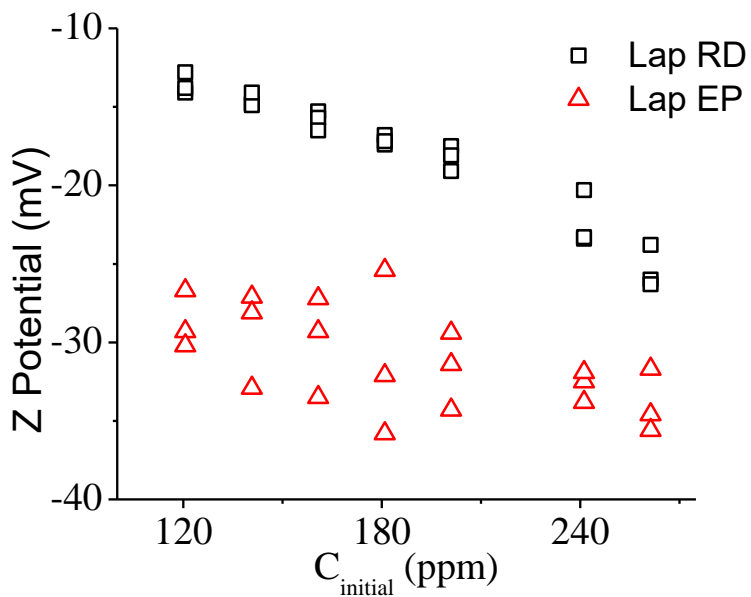
Excipient	Concentration ppm	Size nm	PDI	Z Potential mV
Lap EP	37.0	33.2 ± 2.5	0.726 ± 0.066	-16.3 ± 2.9
Lap RD	38.7	45.1 ± 2.9	0.714 ± 0.140	-6.8 ± 2.4
Lecithin	1988.3	813.7 ± 50.5	0.557 ± 0.026	-40.9 ± 2.4



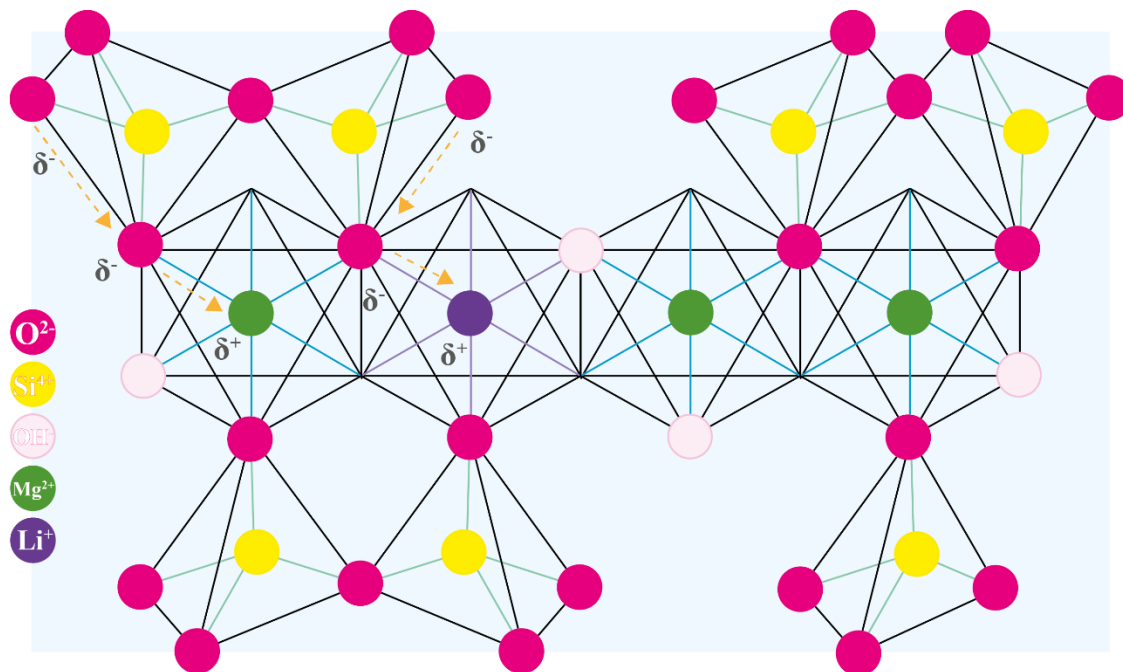


Especificar que son puntos experimentales, y línea de tendencia

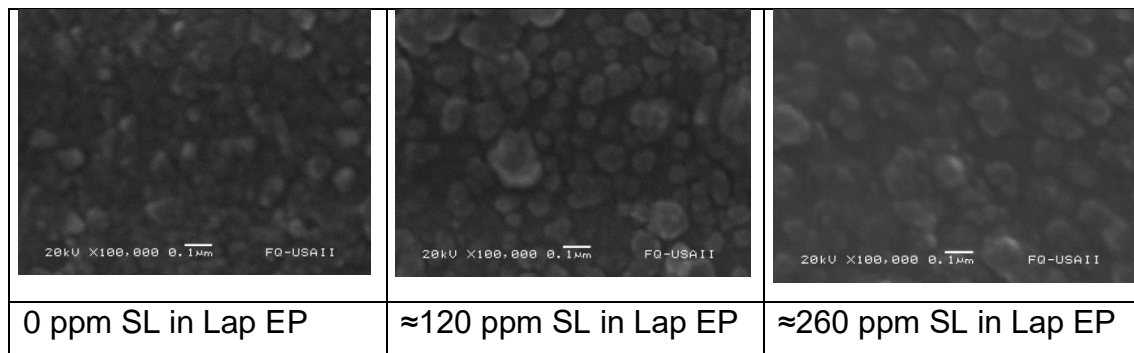
Potencial Z



Esquema de lo que pasa



SEM



CONCLUSION

EXPERIMENTAL

Materials

Na, Li and Mg in Laponite EP and RD

The content of Na, Li and Mg on laponites was evaluated for 2 technics of atomic spectrometry: 1. MP-AES, Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy (4100, Agilent), the methodology is described in an internal procedure PT-USAI I-FQ-EA-003, and 2. Flame-AA, Flame Atomic Absorption Spectroscopy (AA 220, Varian) the internal

procedure: PT-USAll-FQ-EA-002. The samples were dried in a microwave oven (MultiWave PRO, Anton Paar), using super pure HNO₃. A certified standard was used for calibration: HPS-QCS-27.

Validation soy lecithin method

Selection of wavelength for soy lecithin: The spectral curves of 9.9 ppm to 108.8 ppm of soy lecithin in deionized water obtained in spectrophotometer (S2000 Ocean Optics Inc. Spectrophotometer, DT-1000CE-BT Tungsten source, SAD500 Ocean Optics Inc. Serial Port Interface and 1 cm quartz cuvette) were evaluated in OriginPro 8® software (version SR0 v8.0724, OriginLab Corporation, USA) to determine the second derivative and get the better inflection point.

The method was evaluated in terms of concentration from 9.9 ppm to 108.8 ppm in deionized water, per UV-VIS spectrometry at 256 nm, and validated according to ICH guidelines (linearity, accuracy, precision, sensitivity, repeatability and stability)[65,144].

Adsorption method

The assay was designed with slight modifications using the previously reported by Aubry and coworkers[145]: 24 hours before starting, prepared with deionized water, which remained constant in the lecithin concentrations evaluated. The stock dispersion of soy lecithin was ≈ 2000 ppm, aliquots from 300 to 650 μL were taken, and complete until 5 mL with the initial clay dispersion (n=3). And finally, stirred at 750 rpm for 2 h and stored for 24 h in a room temperature. The same process was applied for Laponite EP.

Quantification: 1.5 mL of each sample was centrifugated at 18500 rpm for 3 hours. The supernatant diluted with 500 μL in 2 mL of deionized water and analyzed using the validated UV–VIS spectrometry method at 256 nm.

Particle size, PDI and Z potential: The particle size and PDI were evaluated using Zeta Sizer (Zen 3600, Malvern Instruments, UK) by adding each sample directly in the cell. The same process was applied for Laponite EP, RD and soy lecithin, those measurement was taking as blank.

Morphology

The formulations and excipients were observed by scanning electron microscopy (SEM) (JSM-5900, JEOL, U.K), the samples were coated with gold to obtain a conducting surface.

Statistic's analysis

The experimental data was carried out using the STATGRAPHICS Centurion XVI® software (version 16.2.04, StatPoint Technologies, Inc, USA).

Acknowledgments

Conflicts of interest

Suppelemetary Materials

References

1. Vowden K, Vowden P. Wound dressings: principles and practice. Surgery (United Kingdom) [Internet]. 2017;35:489–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.06.005>
2. Madrid Martínez A, Santillan Reyes ER. Caracterización fisicoquímica y biológica de un biopolímero obtenido por irradiación gamma a base de quitosano y poloxámero. Universidad Nacional Autónoma de México; 2015.
3. Gupta B, Agarwal R, Alam MS. Hydrogels for wound healing applications [Internet]. Biomedical Hydrogels. Woodhead Publishing Limited; 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1533/9780857091383.2.184>
4. Vela-Anaya G, Stegensek-Mejía EM, Leija-Hernández C. Características epidemiológicas y costos de la atención de las heridas en unidades médicas de la Secretaría de Salud. Revista de Enfermería del Instituto Mexicano del Seguro Social [Internet]. 2018;26:105–14. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/enfermeriaimss/eim-2018/eim182g.pdf%0Ahttp://www.medigraphic.com/pdfs/enfermeriaimss/eim-2018/eim182g.pdf>
5. Gómez BP. Síndrome metabólico y sus complicaciones: el pie diabético. Facultad de Medicina UNAM Mexico. 2017;60:7–18.
6. Rojas R, Basto A, Aguilar C, Zárate E, Villalpando S, Barrientos T. Prevalence of previously diagnosed diabetes mellitus in Mexico. Salud Publica Mex. 2018;60:224–32.

7. Gilaberte Y, Prieto-Torres L, Pastushenko I, Juarranz Á. Anatomy and Function of the Skin [Internet]. *Nanoscience in Dermatology*. Elsevier Inc.; 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802926-8.00001-X>
8. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol*. 2016;25:92–8.
9. McGrath JA, Uitto J. Anatomy and Organization of Human Skin. *Rook's Textbook of Dermatology: Eighth Edition*. 2010;1:34–86.
10. Castellanos Ramirez DK, Gonzalez Villordo D, Gracia Bravo LJ. Manejo de heridas. *Cirujano General* [Internet]. 2005;27:164–7. Available from: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1103>
11. Gaskell E, Hamilton A. Antimicrobial clay-based materials for wound care. *Future Medical Chemistry*. 2014;6:641–55.
12. Tomás H, Alves CS, Rodrigues J. Laponite®: A key nanoplatform for biomedical applications? *Nanomedicine* [Internet]. 2018;14:2407–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2017.04.016>
13. Ghadiri M, Chrzanowski W, Lee WH, Rohanizadeh R. Layered silicate clay functionalized with amino acids: Wound healing application. *RSC Adv*. 2014;4:35332–43.
14. Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Antibiotic eluting clay mineral (Laponite®) for wound healing application: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25:2513–26.
15. BYK Additives & Instruments. Laponite: performance additives [Internet]. Technical Information B-RI 21. 2014. p. 22. Available from: https://www.byk.com/.../BYK_B-RI21_LAPONITE_EN.pdf
16. Golafshan N, RezaHasani R, Tarkesh Esfahani M, Kharaziha M, Khorasani SN. Nanohybrid hydrogels of laponite: PVA-Alginate as a potential wound healing material. *Carbohydr Polym*. 2017;176:392–401.
17. Teng L, Xia K, Qian T, Hu Z, Hong L, Liao Y, et al. Shape-Recoverable Macroporous Nanocomposite Hydrogels Created via Ice Templating Polymerization for Noncompressible Wound Hemorrhage. *ACS Biomater Sci Eng*. 2022;

18. Rajabi N, Kharaziha M, Emadi R, Zarrabi A, Mokhtari H, Salehi S. An adhesive and injectable nanocomposite hydrogel of thiolated gelatin/gelatin methacrylate/Laponite® as a potential surgical sealant. *J Colloid Interface Sci.* 2020;564:155–69.
19. Cruz-Castañeda O, Cano-Colín S, Pat L, Salgado RM, Krötzsch E, Elizondo-Vázquez F, et al. Maltodextrin/ascorbic acid stimulates wound closure by increasing collagen turnover and TGF- β 1 expression in vitro and changing the stage of inflammation from chronic to acute in vivo. *J Tissue Viability.* 2017;26:131–7.
20. Avaltroni F, Bouquerand PE, Normand V. Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. *Carbohydr Polym.* 2004;58:323–34.
21. Vitamin C: Uses, Interactions, Mechanism of Action | DrugBank Online [Internet]. [cited 2022 May 18]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00126>
22. Kennedy JF, Knill CJ, Taylor DW. Maltodextrins. LC-GC North America [Internet]. 1995 [cited 2022 May 18];22:65–82. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4615-2159-4_3
23. Negrão-Murakami AN, Nunes GL, Pinto SS, Murakami FS, Amante ER, Petrus JCC, et al. Influence of DE-value of maltodextrin on the physicochemical properties, antioxidant activity, and storage stability of spray dried concentrated mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). *LWT - Food Science and Technology.* 2017;79:561–7.
24. Radosta S, Schierbaum F, Reuther F, Anger H. Polymer-Water Interaction of Maltodextrins. Part I: Water Vapour Sorption and Desorption of Maltodextrin Powders. *Starch - Stärke* [Internet]. 1989 [cited 2022 May 18];41:395–401. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/star.19890411008>
25. Wangsakan A, Chinachoti P, McClements DJ. Isothermal titration calorimetry study of the influence of temperature, pH and salt on maltodextrin–anionic surfactant interactions. *Food Hydrocoll.* 2006;20:461–7.
26. Ismail Y, Mauer LJ. Phase transitions of ascorbic acid and sodium ascorbate in a polymer matrix and effects on vitamin degradation. *J Food Process Eng.* 2020;43.
27. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, tomo 1. Unidécima.* 2020.

28. Stein HB, Hasan A, Fox IH. Ascorbic acid induced uricosuria. A consequence of megavitamin therapy. *Ann Intern Med.* 1976;84:385–8.
29. Benson H, Watkinson A. *Transdermal and Topical Drug Delivery, Principles and Practice*. Primera. Benson H, Watkinson A, editors. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2012.
30. Guy RH, Hadgraft J. *Transdermal Drug Delivery*. Segunda. Guy RH, Hadgraft J, editors. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2003.
31. Moss GP, Dearden JC, Patel H, Cronin MTD. Quantitative structure – permeability relationships (QSPRs) for percutaneous absorption. 2002;16:299–317.
32. Serrano Catañeda P. Desarrollo de una nueva forma farmacéutica a base de microagujas poliméricas biodegradables acopladas a un parche transdermico para la liberación de fármacos. Universidad Autónomas Metropolitana Unidad Xochimilco; 2018.
33. Snejdrova E, Loskot J, Veris A, Kastner P, Andrys R. Formulation study of PLGA in situ films for topical delivery of salicylates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [Internet]. 2024;199:114282. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641124001085>
34. Kathe K, Kathpalia H. Film forming systems for topical and transdermal drug delivery. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2017;12:487–97. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.07.004>
35. Scholz MS, Blanchfield JP, Bloom LD, Coburn BH, Elkington M, Fuller JD, et al. The use of composite materials in modern orthopaedic medicine and prosthetic devices: A review. *Compos Sci Technol.* 2011. p. 1791–803.
36. Marfil PHM, Anhê ACBM, Telis VRN. Texture and Microstructure of Gelatin/Corn Starch-Based Gummy Confections. *Food Biophys.* 2012;7:236–43.
37. Azarmi S, Huang Y, Chen H, McQuarrie S, Abrams D, Roa W, et al. Optimization of a two-step desolvation method for preparing gelatin nanoparticles and cell uptake studies in 143B osteosarcoma cancer cells. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2006;9:124–32.
38. Sahoo N, Sahoo RK, Biswas N, Guha A, Kuotsu K. Recent advancement of gelatin nanoparticles in drug and vaccine delivery. *Int J Biol Macromol.* 2015;81:317–31.

39. Xue J, Zhong Q. Blending lecithin and gelatin improves the formation of thymol nanodispersions. *J Agric Food Chem*. 2014;62:2956–62.
40. Phone-Poulenc R. Lecithin. *ARMIN WENDEL*. 2014;1–19.
41. Ries HR, Matsumoto M, Uyeda N, Suito E. Electron Microscope Studies of Monolayers of Lecithin. *Advances in Chemistry; American Chemical Society*. 1974;1:286–229.
42. Urbán-Morlán Z, Ganem-Rondero A, Melgoza-Contreras LM, Escobar-Chávez JJ, Nava-Arzaluz MG, Quintanar-Guerrero D. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing cyclosporine by the emulsification-diffusion method. *Int J Nanomedicine*. 2010;5:611–20.
43. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*. 2018;10:1–17.
44. R. Pecora. Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids. *Journal of Nanoparticle Research*. 2000;2:123–31.
45. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12:255–64.
46. Sohn S, Kim D. Modification of Langmuir isotherm in solution systems - Definition and utilization of concentration dependent factor. *Chemosphere*. 2005;58:115–23.
47. Kaouah F, Boumaza S, Berrama T, Trari M, Bendjama Z. Preparation and characterization of activated carbon from wild olive cores (oleaster) by H₃PO₄ for the removal of Basic Red 46. *J Clean Prod [Internet]*. 2013;54:296–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2013.04.038>
48. Singh M, Hakimabadi SG, Van Geel PJ, Carey GR, Pham ALT. Modified competitive Langmuir model for prediction of multispecies PFAS competitive adsorption equilibria on colloidal activated carbon. *Sep Purif Technol*. 2024;345.
49. Mezger T. *The Rheology Handbook*. The Rheology Handbook. 2020.
50. Zhang C, Chen L, Teng H. Phase behavior of the gelation process of myofibrillar protein-curdlan blended system: Discussion based on rheology and gel properties. *Food Chem*. 2024;437.

51. Derkach SR, Voron'ko NG, Sokolan NI, Kolotova DS, Kuchina YA. Interactions between gelatin and sodium alginate: UV and FTIR studies. *J Dispers Sci Technol* [Internet]. 2020;41:690–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/01932691.2019.1611437>
52. Saji R, Ramani A, Gandhi K, Seth R, Sharma R. Application of FTIR spectroscopy in dairy products: A systematic review. *Food and Humanity*. 2024;2:100239.
53. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degree of crosslinking. 2001;22:3–8.
54. Wihodo M, Moraru CI. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. *J Food Eng. Elsevier Ltd*; 2013. p. 292–302.
55. Easdani M, Ahammed S, Saqib MN, Liu F, Zhong F. Engineering biodegradable controlled gelatin-zein bilayer film with improved mechanical strength and flexibility. *Food Hydrocoll*. 2024;148.
56. Lynch JM, Corniuk RN, Brignac KC, Jung MR, Sellona K, Marchiani J, et al. Differential scanning calorimetry (DSC): An important tool for polymer identification and characterization of plastic marine debris. *Environmental Pollution*. 2024;346.
57. Merdun H, Yıldırım M. Pyrolysis and combustion of industrial hemp, coal and their blends for thermal analysis by thermogravimetric analysis/Fourier transform infrared spectrometer. *Waste Management & Research: The Journal for a Sustainable Circular Economy* [Internet]. 2024; Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0734242X241241604>
58. Yusoff Y, Sann TE. Biomass-plastic fusion: In-depth characterization through FTIR and TGA analysis. *Mater Today Proc*. 2024;
59. Vernon-Parry KD. Scanning Electron Microscopy : An introduction. *III-Vs Review*. 2000;13:40–4.
60. Clavijo J. Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*. 2013;3.
61. Agrawal M, Prasad V, Nijhawan G, Jalal SS, Rajalakshmi B, Dwivedi SP. A Comprehensive Review of Electron Microscopy in Materials Science: Technological Advances and Applications. Msomi V, Ngonda T, editors. *E3S Web of Conferences*

[Internet]. 2024;505:01029. Available from: <https://www.e3s-conferences.org/10.1051/e3sconf/202450501029>

62. Ganser C, Uchihashi T. Measuring mechanical properties with high-speed atomic force microscopy. *Microscopy*. Oxford University Press; 2024. p. 14–21.

63. Liu S, Han Y, Kong L, Wang G, Ye Z. Atomic force microscopy in disease-related studies: Exploring tissue and cell mechanics. *Microsc Res Tech*. John Wiley and Sons Inc; 2024. p. 660–84.

64. Villarino NF, Landoni MF. Administración transdérmica de fármacos: una alternativa terapéutica. *Analecta Vet*. 2006;26:28–37.

65. García MaA, Soberón E, Cortés M, Rodríguez R, Herrera JL, Alcantara A. Guía de validación de métodos analíticos (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C.). 2002;132.

66. Pineda-Álvarez RA, Bernad-Bernad MJ, Rodríguez-Cruz IM, Escobar-Chávez JJ. Development and Characterization of Starch/Gelatin Microneedle Arrays Loaded with Lecithin–Gelatin Nanoparticles of Losartan for Transdermal Delivery. *J Pharm Innov*. 2020;

67. Rasouli M. Characterization and improvement of phenol-sulfuric acid microassay for glucose-based glycogen. 2020;2020–4.

68. Lenhardt R, Sessler DI. Estimation of mean body temperature from mean skin and core temperature. *Anesthesiology*. 2006;105:1117–21.

69. Ludwig N, Formenti D, Gargano M, Alberti G. Skin temperature evaluation by infrared thermography: Comparison of image analysis methods. *Infrared Phys Technol* [Internet]. 2014;62:1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.infrared.2013.09.011>

70. López García M del R. Preparación y caracterización de nanopartículas lipídicas y evaluación de su efecto sobre la piel.

71. Bergaya F, Theng BKG, Lagaly G, editors. *Handbook of Clay Science*. Elsevier. Amsterdam: Elsevier; 2012.

72. Bergaya F, Theng BKG, Lagaly G, editors. *Handbook of Clay Science* [Internet]. Elsevier. Dev Clay Sci. Amsterdam: Elsevier; 2006. Available from: <http://books.google.com/books?id=uVbam9Snw5sC&pgis=1>

73. Jin Y, Chai W, Huang Y. Printability study of hydrogel solution extrusion in nanoclay yield-stress bath during printing-then-gelation biofabrication. *Materials Science & Engineering C* [Internet]. 2017;80:313–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.144>
74. Mamataliev N, Kalbaev A, Eshmetov I, Kuldashaeva S. Comparison of physicochemical and adsorption properties of intercalated bentonite and laponite. *PROBLEMS IN THE TEXTILE AND LIGHT INDUSTRY IN THE CONTEXT OF INTEGRATION OF SCIENCE AND INDUSTRY AND WAYS TO SOLVE THEM: PTLICISIWS-2*. AIP Publishing; 2024. p. 030058.
75. Huerta-Ángeles G, Kanizsová L, Mielczarek K, Konefał M, Konefał R, Hodan J, et al. Sustainable aerogels based on biobased poly (itaconic acid) for adsorption of cationic dyes. *Int J Biol Macromol*. 2024;259.
76. Zhang H, Zheng Y, Wang H, Chang N. Preparation of starch-based adsorbing-flocculating bifunctional material St-A/F and its removal of active, direct and disperse dyes from textile printing and dyeing wastewater. *Polymer Bulletin*. 2024;81:2777–800.
77. Pineda R. Desarrollo y caracterización de microagujas poliméricas biodegradables cargadas con nanopartículas de lecitina/gelatina/losartán como novedosa alternativa a la vía oral para el control de la hipertensión arterial. 2020.
78. Coester C, Langer K, Von Briesen H, Kreuter J. Gelatin nanoparticles by two step desolvation-a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J Microencapsul*. 2000;17:187–93.
79. Gaharwar AK, Avery RK, Assmann A, Paul A, McKinley GH, Khademhosseini A, et al. Shear-Thinning Nanocomposite Hemorrhage. 2014;
80. Martucci JF, Accareddu AEM, Ruseckaite RA. Preparation and characterization of plasticized gelatin films cross-linked with low concentrations of Glutaraldehyde. *J Mater Sci*. 2012;47:3282–92.
81. López-Angulo D, Bittante AMQB, Luciano CG, Ayala-Valencia G, Flaker CHC, Djabourov M, et al. Effect of Laponite® on the structure, thermal stability and barrier properties of nanocomposite gelatin films. *Food Biosci* [Internet]. 2020;35:100596. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100596>

82. Valencia GA, Luciano CG, Lourenço RV, do Amaral Sobral PJ. Microstructure and physical properties of nano-biocomposite films based on cassava starch and laponite. *Int J Biol Macromol*. 2018;107:1576–83.
83. Berthet M, Gauthier Y, Lacroix C, Verrier B, Monge C. Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? *Trends Biotechnol* [Internet]. 2017;35:770–84. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779917301130>
84. Naderi N, Karponis D, Mosahebi A, Seifalian AM. Nanoparticles in wound healing; from hope to promise, from promise to routine. *Frontiers in Bioscience - Landmark*. 2018;23:1038–59.
85. Ding J, Venkatesan R, Zhai Z, Muhammad W, Nakkala JR, Gao C. Micro- and nanoparticles-based immunoregulation of macrophages for tissue repair and regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2020;192:111075. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111075>
86. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2013;12:255–64.
87. García-Guzmán P, Medina-Torres L, Calderas F, Bernad-Bernad MJ, Gracia-Mora J, Mena B, et al. Characterization of hybrid microparticles/Montmorillonite composite with raspberry-like morphology for Atorvastatin controlled release. *Colloids Surf B Biointerfaces* [Internet]. 2018;167:397–406. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.04.020>
88. Becher TB, Mendonça MCP, De Farias MA, Portugal R V., De Jesus MB, Ornelas C. Soft Nanohydrogels Based on Laponite Nanodiscs: A Versatile Drug Delivery Platform for Theranostics and Drug Cocktails. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10:21891–900.
89. Finotelli PV. Microencapsulation of Ascorbic Acid in Maltodextrin and Capsul Using Spray-. 2016;
90. Yang JH, Lee SY, Han YS, Park KC, Choy JH. Efficient transdermal penetration and improved stability of L-ascorbic acid encapsulated in an inorganic nanocapsule. *Bull Korean Chem Soc*. 2003;24:499–503.
91. Minjares-Fuentes R, Medina-Torres L, González-Laredo RF, Rodríguez-González VM, Eim V, Femenia A. Influence of water deficit on the main polysaccharides and the

rheological properties of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) mucilage. *Ind Crops Prod.* 2017;109:644–53.

92. Blanco-López M, González-Garcinuño Á, Tabernero A, Martín Del Valle EM. Steady and Oscillatory Shear Flow Behavior of Different Polysaccharides with Laponite ®. 2021; Available from: <https://doi.org/10.3390/polym13060966>

93. Liu P, Du M, Leong YK, Clode P, Liu J. Spherical metal oxides-LAPONITE® sheets interactions: Microstructure, rheology and thixotropy of composite gels. *Appl Clay Sci.* 2021;208.

94. Vanin FM, Sobral PJA, Menegalli FC, Carvalho RA, Habitante AMQB. Effects of plasticizers and their concentrations on thermal and functional properties of gelatin-based films. 2005;19:899–907.

95. Negrete-Herrera N, Putaux JL, David L, De Haas F, Bourgeat-Lami E. Polymer/laponite composite latexes: Particle morphology, film microstructure, and properties. *Macromol Rapid Commun.* 2007;28:1567–73.

96. Al-Hassan AA, Norziah MH. Starch-gelatin edible films : Water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizers. *Food Hydrocoll [Internet].* 2012;26:108–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.04.015>

97. Savencu I, Iurian S, Porfire A, Bogdan C, Tomuță I. Review of advances in polymeric wound dressing films. *React Funct Polym.* Elsevier B.V.; 2021.

98. Li C, Mu C, Lin W, Ngai T. Gelatin Effects on the Physicochemical and Hemocompatible Properties of Gelatin/PAAm/Laponite Nanocomposite Hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7:18732–41.

99. Castro N, Durrieu V, Raynaud C, Rouilly A. Influence of DE-value on the physicochemical properties of maltodextrin for melt extrusion processes. *Carbohydr Polym [Internet].* 2016;144:464–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.03.004>

100. Vivcharenko V, Benko A, Palka K, Wojcik M, Przekora A. Elastic and biodegradable chitosan/agarose film revealing slightly acidic pH for potential applications in regenerative medicine as artificial skin graft. *Int J Biol Macromol.* 2020;164:172–83.

101. Teeranachaideekul V, Boonme P, Souto EB, Müller RH, Junyaprasert VB. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *Journal of Controlled Release*. 2008;128:134–41.
102. Nasab ME, Takzaree N, Saffaria PM, Partoazar A. In vitro antioxidant activity and in vivo wound-healing effect of lecithin liposomes: A comparative study. *J Comp Eff Res*. 2019;8:633–43.
103. Wissing SA, Mü RH. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties [Internet]. *Int J Pharm*. 2002. Available from: www.elsevier.com/locate/ijpharm
104. Li X, Ma M, Ahn DU, Huang X. Preparation and characterization of novel eggshell membrane-chitosan blend films for potential wound-care dressing: From waste to medicinal products. *Int J Biol Macromol*. 2019;123:477–84.
105. Pan N, Qin J, Feng P, Song B. Window screen inspired fibrous materials with anisotropic thickness gradients for improving light transmittance. *Nanoscale*. 2019;11:13521–31.
106. Kaygusuz H, Torlak E, Akin-Evingür G, Özen İ, von Klitzing R, Erim FB. Antimicrobial cerium ion-chitosan crosslinked alginate biopolymer films: A novel and potential wound dressing. *Int J Biol Macromol*. 2017;105:1161–5.
107. Khanlari S, Dubé MA. Bioadhesives: A review. *Macromol React Eng*. 2013;7:573–87.
108. Waring M, Rippon M, Bielfeldt S, Brandt M. Cell attachment to adhesive dressings: Qualitative and quantitative analysis. *Wounds UK* [Internet]. 2008;4:35–47. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/242557299>
109. Blacklow SO, Li J, Freedman BR, Zeidi M, Chen C, Mooney DJ. Bioinspired mechanically active adhesive dressings to accelerate wound closure. *Synth Biol* [Internet]. 2019;5:1–9. Available from: <https://www.science.org>
110. Arilla E, Igual M, Martínez Monzó J, Codoñer Franch P, García Segovia P. Impact of Resistant Maltodextrin Addition on the Orange Juice. *Foods*. 2020;1832:1–9.
111. Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2007;39:549–59.

112. Pálková H, Madejová J, Zimowska M, Serwicka EM. Laponite-derived porous clay heterostructures: II. FTIR study of the structure evolution. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2010;127:237–44.
113. Hamid-Akash MS, Rehman K. *Drug Stability and Chemical Kinetics*. Drug Stability and Chemical Kinetics. Springer Singapore; 2020.
114. Varnik F, Baschnagel J, Binder K. Static and dynamic properties of supercooled thin polymer films. *European Physical Journal E*. 2002;8:175–92.
115. Sobral PJA, Habitante AMQB. Phase transitions of pigskin gelatin. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2001;15:377–82. Available from: www.elsevier.com/locate/foodhyd
116. Abrusci C, Martín-González A, Del Amo A, Catalina F, Bosch P, Corrales T. Chemiluminescence study of commercial type-B gelatines. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2004;163:537–46.
117. Ghadiri M, Chrzanowski W, Rohanizadeh R. Antibiotic eluting clay mineral (Laponite®) for wound healing application: an in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25:2513–26.
118. Nurhadi B, Roos YH, Maidannyk V. Physical properties of maltodextrin de 10: Water sorption, water plasticization and enthalpy relaxation. *J Food Eng*. 2016;174:68–74.
119. Ziderman II, Gregorski KS, Lopez S V, Friedman M. Thermal interaction of ascorbic acid and sodium ascorbate with proteins in relation to nonenzymatic Browning and Maillard reactions of foods. *Food Chem* [Internet]. 1989;37:1480–6. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
120. Hellio-Serughetti D, Djabourov M. Gelatin hydrogels cross-linked with bisvinyl sulfonemethyl. 2. The physical and chemical networks. *Langmuir*. 2006;22:8516–22.
121. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001;13:123–33.
122. Kalam M, Humayun M, Parvez N, Yadav S, Garg A, Amin S, et al. Release kinetics of modified pharmaceutical dosage forms: a review. *Continental J Pharmaceutical Sciences*. 2007;1:30–5.
123. Mulye N V, Turco SJ. A simple model based on first order kinetics to explain release of highly water soluble drugs from porous dicalcium phosphate dihydrate matrices. *Drug Dev Ind Pharm*. 1995;21:943–53.

124. Sáez V, Hernáez E, Sanz Angulo L. Mecanismos de liberación de fármaco desde materiales poliméricos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2004;5:55–70.
125. Shahid M, Hussain A, Khan AA, Alanazi AM, Alaofi AL, Alam M, et al. Antifungal Cationic Nanoemulsion Ferrying Miconazole Nitrate with Synergism to Control Fungal Infections: In Vitro, Ex Vivo, and In Vivo Evaluations. *ACS Omega*. 2022;7:13343–53.
126. Schrieber, Reinhard; Gareis H. *Gelatine Handbook*. Wiley-VCH. 2007.
127. Le NTT, Cao V Du, Nguyen TNQ, Le TTH, Tran TT, Thi TTH. Soy lecithin-derived liposomal delivery systems: Surface modification and current applications. *Int J Mol Sci*. MDPI AG; 2019.
128. Das SS, Neelam, Hussain K, Singh S, Hussain A, Faruk A, et al. Laponite-based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Review. *Curr Pharm Des*. 2019;25:424–43.
129. Li J, Han J, Yu W, Wang K, Liu Z, Liu Y. Alginate-modulated continuous assembly of iron/tannic acid composites as photothermally responsive wound dressings for hemostasis and drug resistant bacteria eradication. *Int J Biol Macromol*. 2023;242.
130. Ahmadian Z, Correia A, Hasany M, Figueiredo P, Dobakhti F, Eskandari MR, et al. A Hydrogen-Bonded Extracellular Matrix-Mimicking Bactericidal Hydrogel with Radical Scavenging and Hemostatic Function for pH-Responsive Wound Healing Acceleration. *Adv Healthc Mater*. 2021;10.
131. Chen Z, Yuan M, Li H, Li L, Luo B, Lu L, et al. Succinylated chitosan derivative restore HUVEC cells function damaged by TNF- α and high glucose in vitro and enhanced wound healing. *Int J Biol Macromol*. 2024;265.
132. Baker SE, Sawvel AM, Zheng N, Stucky GD. Controlling bioprocesses with inorganic surfaces: Layered clay hemostatic agents. *Chemistry of Materials*. 2007;19:4390–2.
133. Assaw S. The use of modified Massion's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study [Internet]. *Malays J Vet Res (Putrajaya)*. 2012. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/263542834>
134. Vidinsk[̄] B, Gál P, Toporcer T, Longauer F, Lenhardt ^a, Bobrov N, et al. Histological Study of the First Seven Days of Skin Wound Healing in Rats [Internet]. Available from: <http://www.vfu.cz/acta-vet/actavet.htm>

135. Liu S, Zhang M, Jin H, Wang Z, Liu Y, Zhang S, et al. Iron-Containing Protein-Mimic Supramolecular Iron Delivery Systems for Ferroptosis Tumor Therapy. *J Am Chem Soc.* 2023;145:160–70.
136. Li S, Zhang Y, Jin H, Gao H, Liu S, Shi W, et al. Biomimetic dual-nanozymes with catalytic cascade reactions against diabetic wound infection. *J Colloid Interface Sci.* 2023;651:319–33.
137. Pucci C, Martinelli C, De Pasquale D, Battaglini M, Di Leo N, Degl’Innocenti A, et al. Tannic Acid-Iron Complex-Based Nanoparticles as a Novel Tool against Oxidative Stress. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022;14:15927–41.
138. He M, Du C, Xia J, Zhang ZG, Dong CM. Multivalent Polypeptide and Tannic Acid Cooperatively Iron-Coordinated Nanohybrids for Synergistic Cancer Photothermal Ferroptosis Therapy. *Biomacromolecules.* 2022;23:2655–66.
139. Gonzaga V de AM, Poli AL, Gabriel JS, Tezuka DY, Valdes TA, Leitão A, et al. Chitosan-laponite nanocomposite scaffolds for wound dressing application. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2020;108:1388–97.
140. Rouf TB, Schmidt G, Kokini JL. Zein–Laponite nanocomposites with improved mechanical, thermal and barrier properties. *J Mater Sci.* 2018;53:7387–402.
141. Olivera N, Rouf TB, Bonilla JC, Carriazo JG, Dianda N, Kokini JL. Effect of LAPONITE® addition on the mechanical, barrier and surface properties of novel biodegradable kafirin nanocomposite films. *J Food Eng.* 2019;245:24–32.
142. Bosch Ojeda C, Sanchez Rojas F. Recent developments in derivative ultraviolet/visible adsorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta.* 2004;518:1–24.
143. Bosch Ojeda C, Sanchez Rojas F. Recent applications in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry : 2009–2011. A review. *Microchemical Journal [Internet].* 2013;106:1–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.012>
144. Harron DWG. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: The ICH Process. *The Textbook of Pharmaceutical Medicine.* 2013;1994:447–60.
145. Aubry T, Bossard F, Moan M. Laponite Dispersions in the Presence of an Associative Polymer. *American Chemical Society.* 2002;18:155–9.

Supplementary data

Laponita EP

Sample μL	C_{initial} ppm	C_e ppm	C_{adsorbed} ppm	q mg/g	$1/C_e$ ppm^{-1}	$1/q$ g/mg	Size nm	PDI	Z Potential mV
300	119.3	45.6	73.7	1992.8	0.02192	0.00050	950.1	0.652	-29.3
300	119.3	41.4	77.9	2108.1	0.02418	0.00047	884.1	0.874	-26.7
300	119.3	41.4	77.9	2108.1	0.02418	0.00047	913.5	0.696	-30.2
350	139.2	58.9	80.3	2170.6	0.01697	0.00046	1046.0	0.775	-32.9
350	139.2	54.5	84.7	2289.9	0.01834	0.00044	1209.0	0.748	-27.1
350	139.2	53.1	86.1	2329.4	0.01885	0.00043	935.6	0.768	-28.1
400	159.1	61.6	97.5	2636.4	0.01624	0.00038	1177.0	0.816	-33.5
400	159.1	64.8	94.3	2550.7	0.01544	0.00039	1004.0	0.834	-27.2
400	159.1	66.2	92.8	2511.2	0.01510	0.00040	948.2	0.660	-29.3
450	178.9	78.9	100.1	2706.2	0.01267	0.00037	986.0	0.577	-35.8
450	178.9	73.5	105.4	2851.2	0.01360	0.00035	1259.0	0.867	-25.4
450	178.9	77.9	101.0	2732.5	0.01283	0.00037	1104.0	0.788	-32.1
500	198.8	82.9	115.9	3135.9	0.01206	0.00032	1245.0	0.657	-34.3
500	198.8	83.8	115.1	3112.0	0.01194	0.00032	1233.0	0.697	-29.4
500	198.8	82.3	116.5	3151.6	0.01215	0.00032	902.8	0.721	-31.4
600	238.6	98.9	139.7	3779.5	0.01012	0.00026	1073.0	0.875	-32.5
600	238.6	104.2	134.3	3633.8	0.00959	0.00028	1032.0	0.692	-33.8
600	238.6	105.7	132.9	3594.2	0.00946	0.00028	969.9	0.867	-31.9
650	258.5	121.5	137.0	3705.3	0.00823	0.00027	1296.0	0.822	-34.6
650	258.5	121.8	136.7	3696.8	0.00821	0.00027	1339.0	0.734	-31.7
650	258.5	116.0	142.5	3855.1	0.00862	0.00026	1325.0	0.919	-35.6

Laponita RD

Sample μL	C_{initial} ppm	C_e ppm	C_{adsorbed} ppm	q mg/g	$1/C_e$ ppm^{-1}	$1/q$ g/mg	Size nm	PDI	Z Potential mV
300	119.3	32.6	86.7	2240.4	0.03069	0.00045	903.3	0.565	-12.8
300	119.3	29.7	89.6	2315.9	0.03372	0.00043	803.4	0.677	-14.1
300	119.3	25.3	94.0	2429.3	0.03958	0.00041	902.6	0.613	-13.8
350	139.2	39.9	99.3	2565.1	0.02507	0.00039	971.7	0.750	-14.8
350	139.2	35.5	103.7	2678.5	0.02816	0.00037	981.9	0.655	-14.9
350	139.2	38.4	100.8	2602.9	0.02602	0.00038	963.9	0.708	-14.1
400	159.1	51.6	107.5	2776.5	0.01938	0.00036	980.4	0.811	-15.3
400	159.1	54.5	104.5	2700.9	0.01834	0.00037	843.3	0.662	-15.7
400	159.1	54.5	104.5	2700.9	0.01834	0.00037	806.8	0.624	-16.5

450	178.9	58.9	120.0	3101.2	0.01698	0.00032	911.1	0.616	-17.4
450	178.9	58.9	120.0	3101.2	0.01698	0.00032	901.2	0.760	-16.8
450	178.9	64.8	114.2	2950.1	0.01544	0.00034	945.7	0.584	-17.2
500	198.8	79.4	119.4	3085.9	0.01260	0.00032	1024.0	0.619	-17.5
500	198.8	76.5	122.4	3161.5	0.01308	0.00032	819.0	0.627	-18.1
500	198.8	76.5	122.4	3161.5	0.01308	0.00032	826.1	0.517	-19.1
600	238.6	102.8	135.8	3508.7	0.00973	0.00029	868.1	0.586	-23.4
600	238.6	98.4	140.2	3622.1	0.01016	0.00028	841.0	0.594	-20.3
600	238.6	101.3	137.3	3546.5	0.00987	0.00028	958.0	0.591	-23.3
650	258.5	129.1	129.4	3342.2	0.00775	0.00030	941.7	0.592	-26.0
650	258.5	117.4	141.1	3644.5	0.00852	0.00027	899.8	0.663	-26.3
650	258.5	123.3	135.2	3493.4	0.00811	0.00029	967.1	0.548	-23.8

10.10 ANEXO 10. ARTÍCULO CIENTÍFICO

Article

Laponite Composites: In Situ Films Forming as a Possible Healing Agent

Ramón Andrés Pineda-Álvarez ¹, Carolina Flores-Avila ¹, Luis Medina-Torres ¹ , Jesús Gracia-Mora ¹ ,
José Juan Escobar-Chávez ² , Gerardo Leyva-Gómez ¹ , Mohammad-Ali Shahbazi ^{3,4} 
and María Josefa Bernad-Bernad ^{1,*}

¹ Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Cto. Exterior S/N, Coyoacán, Ciudad de México 04510, Mexico; and_res5@comunidad.unam.mx (R.A.P.-Á.)

² Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Unidad de Investigación Multidisciplinaria-L12 (Sistemas Transdérmicos), Universidad Nacional Autónoma de México, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, km 2.5 San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli 54714, Mexico

³ Department of Biomedical Engineering, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Antonius Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen, The Netherlands; m.a.shahbazi@umcg.nl

⁴ W.J. Kolff Institute for Biomedical Engineering and Materials Science, University of Groningen, Antonius Deusinglaan 1, 9713 AV Groningen, The Netherlands

* Correspondence: bernadf@comunidad.unam.mx

Abstract: A healing material must have desirable characteristics such as maintaining a physiological environment, protective barrier-forming abilities, exudate absorption, easy handling, and non-toxicity. Laponite is a synthetic clay with properties such as swelling, physical crosslinking, rheological stability, and drug entrapment, making it an interesting alternative for developing new dressings. This study evaluated its performance in lecithin/gelatin composites (LGL) as well as with the addition of maltodextrin/sodium ascorbate mixture (LGL MAS). These materials were applied as nanoparticles, dispersed, and prepared by using the gelatin desolvation method—eventually being turned into films via the solvent-casting method. Both types of composites were also studied as dispersions and films. Dynamic Light Scattering (DLS) and rheological techniques were used to characterize the dispersions, while the films' mechanical properties and drug release were determined. Laponite in an amount of 8.8 mg developed the optimal composites, reducing the particulate size and avoiding the agglomeration by its physical crosslinker and amphoteric properties. On the films, it enhanced the swelling and provided stability below 50 °C. Moreover, the study of drug release in maltodextrin and sodium ascorbate from LGL MAS was fitted to first-order and Korsmeyer–Peppas models, respectively. The aforementioned systems represent an interesting, innovative, and promising alternative in the field of healing materials.

Keywords: laponite; maltodextrin; sodium ascorbate; wound dressing; films; composite



Citation: Pineda-Álvarez, R.A.; Flores-Avila, C.; Medina-Torres, L.; Gracia-Mora, J.; Escobar-Chávez, J.J.; Leyva-Gómez, G.; Shahbazi, M.-A.; Bernad-Bernad, M.J. Laponite Composites: In Situ Films Forming as a Possible Healing Agent. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 1634. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061634>

Academic Editors: Ioana Mirela Vasincu, Florentina Lupascu, Maria Apotrosoaei and Lenuta Profire

Received: 19 April 2023

Revised: 19 May 2023

Accepted: 22 May 2023

Published: 31 May 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

A wound is defined as an epithelial rupture of the skin that is classified as acute or chronic. Within them, they are subdivided into pressure ulcers, venous leg ulcers, and diabetic foot ulcers, as well as traumatic and surgical wounds. These lesions increase the risk of infections, while internal tissues are exposed to damaging factors [1]. For this reason, in clinical fields, the closure and repair of wounds after a traumatic event or surgery are vital. Proper treatment will result in increased survival of patients through adequate healing [2]. However, the wound healing process requires many processes at the cellular level, some of which remain unknown.

Using nanotechnology through nanocarrier systems that facilitate the administration of drugs and cover wounds to protect them could be an alternative to meet the ideal conditions of healing materials such as laponite composites. Laponite is a mineral clay that is widely

used as an excipient and active substance in the pharmaceutical and cosmetic industry. Laponite composites are described as disks with an approximate diameter of 25 nm and a width of approximately 1 nm. This clay has a negative charge on the inner surface and, at the edges, is weakly positive [3,4]. Laponite's external sheets are tetrahedral and octahedral in the middle (2:1)—where Mg^{2+} and Li^+ cations are found. The weaker positive charges interact with the opposing surfaces of the adjacent particles when suspended in water. The process can go on to give a “house of cards” structure, causing a highly thixotropic gel, which is referred to by researchers as physical crosslink [5]. This clay is attractive for regenerative medicine and tissue engineering [6,7] due to its degradation in a physiological environment; for wound healing, the most important are Mg^{2+} and Na^+ . Magnesium is an essential element in the human body, as it is involved in producing all polyphosphate compounds in cells (adenosine triphosphate, ATP), enzyme activity and ion channel action, metabolic pathways, and other processes. Sodium plays a role in maintaining electrolyte and fluid balance [8]. Additionally, the gels of this clay have previously been used for wound dressing and drug delivery purposes to carry amino acids such as arginine, lysine, and leucine to wounds, promoting human skin fibroblast proliferation [9]. Ghandiri and coworkers described a developed laponite/alginate/mafenide nanocomposite studied *in vitro*. In addition to its antibacterial activity, it was able to absorb exudate from wounds where it was administered due to the swelling property of the laponite. Moreover, the Mg^{2+} ions in its chemical structure helped to reduce the cytotoxicity of mafenide in cellular fibroblasts, which are in charge of collagen synthesis in the proliferation phase of the healing process [10]. Another function of this clay is that its structure facilitates physical crosslink via interactions between positive and negative charges, and this was confirmed by Golafshan in a PVA/Alginate network, who explained how this feature depends on its concentration. At the same time, laponite dramatically influenced the mechanical properties of the materials [11].

Teng et al. (2022) and Rajabi et al. (2020) combined gelatin with laponite to develop hydrogels with hemocompatibility properties. The hybrids were described as having good compatibility and showed a hemostatic function because the negative surface of the clay attracted blood components and accelerated the clotting process. They suggested their materials could be applied to wounds to avoid hemorrhages [12,13]. On the other hand, in clinical studies, the topical application of maltodextrin/sodium ascorbate in wounds has shown to be a protective cover for the invasion of microorganisms, they also promote the stability of the humidity of the medium for tissue granulation and have bacteriostatic activity due to pH reduction. Due to gradual metabolism, maltodextrin can release glucose into the deep wound environment, providing topical nutrition to the tissue. *In vitro* studies showed the chemotactic effect of this sugar on polymorphonuclear leukocytes, benefitting healing. The action mechanism followed by maltodextrin/sodium ascorbate to accelerate the healing process relies on whether its conjunction with transforming growth factors (TGF) at the fibroblast level cause the rapid expression of a broad spectrum of enzymes related to collagen rechange (collagenases and gelatinases), accelerating the proliferation phase [14].

This study evaluated the performance of laponite in lecithin/gelatin composites (LGL) vs. loading them with a maltodextrin/sodium ascorbate mixture (LGL MAS). The innovative pharmaceutical forms were applied in a liquid state (nanoparticle dispersion) to increase contact with irregular surfaces, from which films were formed as possible dressing materials. Additionally, this research proved that the nanocarrier function of the clay nanodisks is to deliver maltodextrin and sodium ascorbate. These experiments offer insights into changes in the physicochemical properties of the particles and films developed with lecithin/gelatin/laponite and explain the benefits and limitations of adding this clay into them.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Laponite EP (LAP) and sodium ascorbate (AS) were donated by BYK Additives & Instruments and AVIMEX (CDMX, Cuautitlan Izcalli, Mexico), respectively. Maltodextrin DE 16.5–19.5 (M), gelatin from bovine skin type B strength ~225 g bloom (GEL), L- α -Phosphatidylcholine from soybean type IV-S, $\geq 30\%$ (enzymatic) (LEC), glutaraldehyde grade I 25% (*v/v*) were purchased from Merck, while acetone and potassium chloride were purchased from J. T. Baker, and other analytical-grade chemicals and solvents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.2. Preparation of Nanoparticles and Films

The nanoparticles were prepared by the desolvation method previously reported [15], from 3 dispersions (see Figure 1): (a) 100.0 mg of gelatin dispersed in 3 mL of deionized water at 45 °C, then 3 mL of acetone was added as a desolvating agent. The precipitate was redispersed in the same water volume at 45 °C, and the pH was adjusted to 3 with 0.2 N HCl. (b) For formulations only with laponite, the dispersion contained 8.8 mg of clay in 3 mL of deionized water, while others with maltodextrin/sodium ascorbate mix (M:AS) were supplemented with 10 mg of each drug, and (c) 125.0 mg of lecithin was dispersed in 3 mL of acetone: methanol 1:1. Each dispersion was added consecutively as they were prepared under 18,000 rpm for 2 min using T-18 ULTRA-TURRAX[®] (IKA). Acetone: methanol was allowed to evaporate for about 24 h under constant stirring (1000 rpm), and subsequently, the pH was adjusted to 6.5 with 0.2 N NaOH. Finally, 100 μ L of glutaraldehyde 2% (*v/v*) was added as a crosslinking agent. The resulting dispersion was stirred for 24 h more.

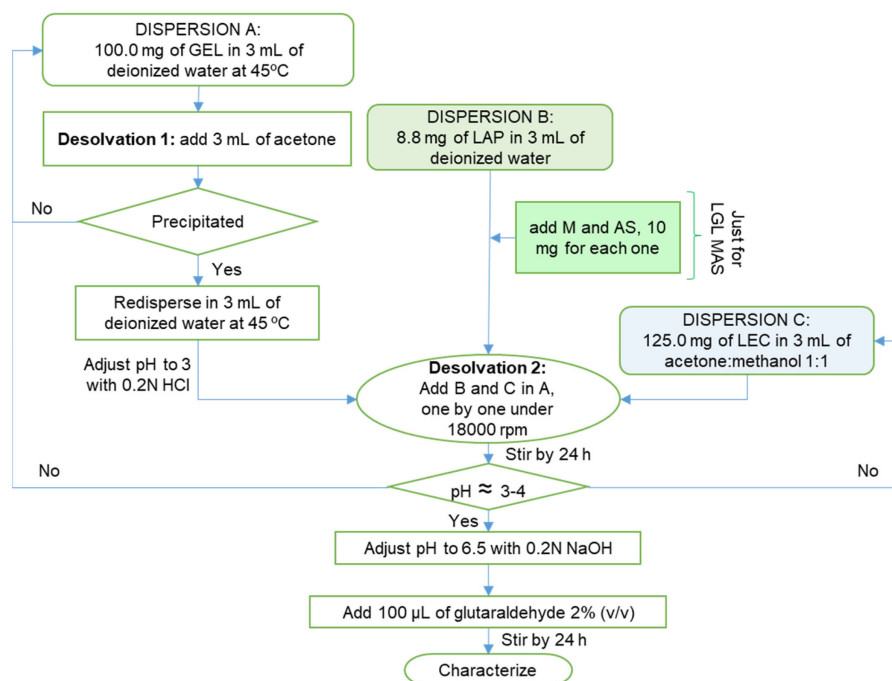


Figure 1. Schematic representation of the preparation of the nanoparticles.

The films were prepared by solvent evaporation. A total of 4 mL of dispersed nanoparticles was put in a square mold with an area of 9 cm² for 30 min at 25 °C.

2.3. Characterization of Nanoparticles

2.3.1. Particle Size, Polydispersity Index (PDI), and Zeta Potential (ξ)

Dynamic Light Scattering technique (DLS) was applied by using a Zeta-sizer Zen 3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK) with a detection angle of 173° at 25 °C \pm 1 °C. For

each measurement, 50 μL of sample plus 1 mL of deionized water were added to a 1 cm glass disposable cell. For the Zeta potential, the cell was changed to a disposable double capillary cell, maintaining the same angle, temperature, and dilution, and deionized water was added. All measurements were taken in triplicate under room temperature appear in mean \pm SD.

2.3.2. Entrapment Efficiency

Maltodextrin (M). The phenol-sulfuric acid method measured the non-entrapment maltodextrin (see Figure 2a) [16]. Using an Amicon Ultra 0.5 mL Ultracel 10K filter in Eppendorf tubes, 0.5 mL of nanoparticle dispersion was centrifuged at 15,000 rpm for 30 min. The filtering was diluted with 100 μL in 2 mL of deionized water. A total of 50 μL of diluted dispersion was extracted and put in an assay tube, then 50 μL of deionized water, 200 μL of phenol 6.5% (p/v), and 550 μL of sulfuric acid concentrated were added consecutively. The samples were stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min and analyzed using the ultraviolet–visible (UV–VIS) spectrometry method at 491 nm (S2000 Ocean Optics Inc. Spectrophotometer, DT-1000CE-BT Tungsten source, SAD500 Ocean Optics Inc. Serial Port Interface, and 1 cm quartz cuvette). The analyzed drug corresponded to the non-entrapment drug. The percentage of entrapment efficiency was calculated according to the following Equation (1):

$$\% \text{ Entrapment efficiency} = \frac{\text{mg AS}_{\text{used in formulation}} - \text{mg AS}_{\text{analyzed}}}{\text{mg AS}_{\text{used in formulation}}} \times 100 \quad (1)$$

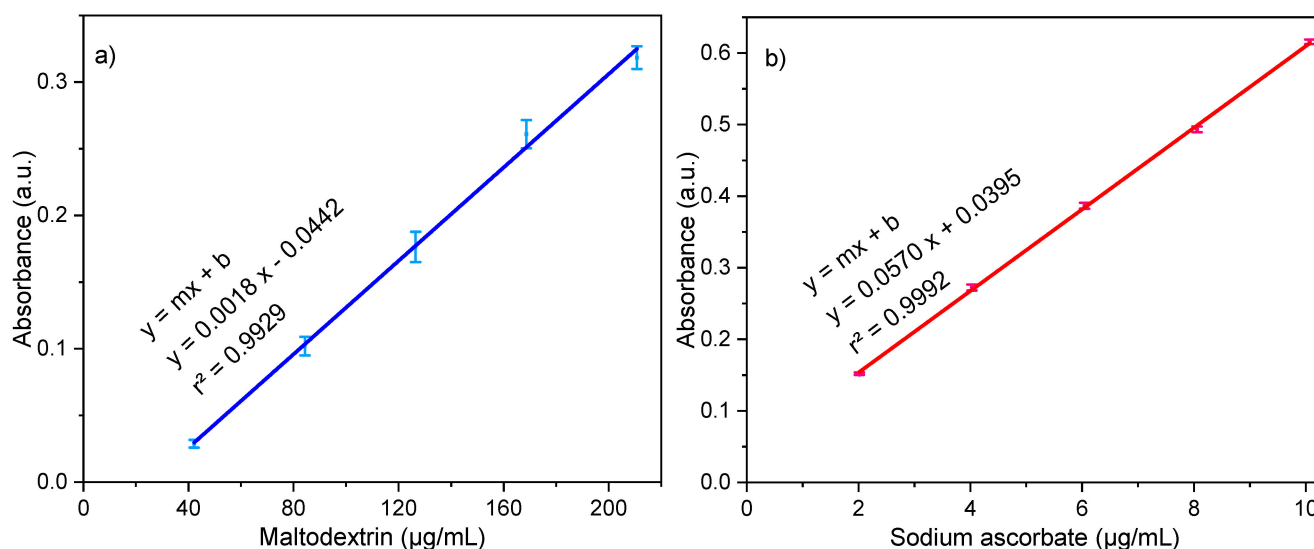


Figure 2. Calibration curves: (a) maltodextrin and (b) sodium ascorbate.

Sodium ascorbate (AS). The diluted dispersion prepared before was analyzed via ultraviolet–visible (UV–VIS) spectrometry at 267 nm (see Figure 2b). To calculate the percentage of entrapment efficiency, the same equation used to calculate that of maltodextrin was used.

Figure 2 shows the calibration curves for each drug. Maltodextrin was analyzed from 42 to 210 $\mu\text{g/mL}$, and sodium ascorbate from 2 to 10 $\mu\text{g/mL}$. All measurements were taken in triplicate.

2.3.3. Rheology Study

The samples were characterized in a stress-controlled model TA Instruments Discovery HR3[®] rheometer (TA Instruments, New Castle, DE, USA) with a concentric cylinders geometry (21.96 mm outer diameter, 20.38 mm inner diameter, 59.9 mm height and 500 μm gap). Viscosity measurements under steady-state simple shear flow ranged from 1 to

300 s⁻¹ at 30.5 °C (skin temperature [17]). Viscoelastic properties (i.e., storage and loss modulus) under small-amplitude linear oscillatory flow (i.e., $\gamma < 5\%$) ranged from 1 to 300 rad/s. The study of the stability of the fluid concerning temperature was carried out in a temperature range of 18 °C to 50 °C (the temperature in which the skin can be found, depending on the stimuli of the environment [17,18]).

2.3.4. Morphology

The optimal formulations were observed via Transmission Electron Microscopy (TEM), which was performed by using a JEM-2010 microscope (JEOL Inc., Peabody, MA, USA). The dilution consisted of 5 µL of sample plus 1 mL of deionized water.

2.4. Characterization of Films

2.4.1. Film Thickness

Through the use of a Digital Micrometer CHESC05001 (CHE SCIENTIFIC, resolution of 0.001 mm), we randomly measured the films' thickness in four positions, and the mean values were used in the calculations.

2.4.2. Mechanical Properties

Each film (3 × 3 cm) was placed between the two jaws of the Texture Analyzer instrument XT plus (TA instruments) at a constant crosshead speed of 50 mm/min with a load cell of 50 N to determine Young's modulus and tensile strength (three samples of each formulation).

2.4.3. Swelling Behavior and Mass Loss by Solubilization

The degree of swelling in the films was determined by weighing the films before (M_o) and after (M_f) immersion in 20 mL of deionized water for 15 min at 25 °C. Excess water was removed via the use of filter paper. The following Equation (2) calculated this response:

$$\% \text{ Degree of swelling} = \frac{M_f - M_o}{M_o} \times 100 \quad (2)$$

For loss by solubilization, the samples were stored in a desiccator with silica gel at 25 °C for 12 h. Each film was weighed (M_f , in this case), and the results were reported as absolute values using the last equation.

2.4.4. Occlusive Effects

The occlusive properties of composite films were evaluated using De Vrieger's in vitro modified method [19]. In this test, ≈100 mg of NaOH was put in a vial, covered with the film, and weighed. The hygroscopic basis captured water vapor that had entered through the sample. This response was calculated by comparing the differential weight loss (%) from when the trial started and when it finished (after 24 h). As a positive control, 100% of water vapor absorbed by the basis was transferred into a vial with NaOH without cover and was related to each measurement.

2.4.5. Clarity

Transmittance (%T) at 620 nm in a spectrophotometer (S2000 Ocean Optics Inc. Spectrophotometer, DT-1000CE-BT Tungsten source, SAD500 Ocean Optics Inc. (Orlando, FL, USA) Serial Port Interface, and 1 cm quartz cuvette) determined the clarity of the optimal formulations.

2.4.6. Bioadhesion and Postwetting Bioadhesion

Penetrometer I173XX (Agrosta, Normandy, France) configured in texture profile analysis mode measured the responses of the three samples analyzed ($n = 3$). The instrument compressed the optimal film (which was 1 cm in diameter) against the pig skin twice at 10 mm/s with an activation charge of 5 gf and a return speed of 5 mm/s, and paused for

5 s between the cycles. For post-wetting bioadhesion, the skin area was moisturized 10 min before the test.

2.4.7. ATR-FT-IR

The attenuated total reflectance–Fourier-transform infrared (FT-IR) spectra were recorded using a UATR Two spectrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) from 500 to 4000 cm^{-1} with a spectral resolution of 2 cm^{-1} .

2.4.8. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

A DSC 1/700 (Mettler-Toledo, Columbus, OH, USA) was used to measure the film's glass transition temperature (T_g). Calibration employed an Indium standard (melting temperature: 156.6 °C). Approximately 5 mg film was weighed directly into standard aluminum pans. Thermal events were recorded in a temperature range from 8 to 225 °C with a 5 °C/min ramp under a nitrogen atmosphere (purge at 20 mL/min).

2.4.9. Surface Morphology—Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM)

Via the use of SEM JSM-5900 (JEOL USA, Inc., Peabody, MA, USA), the optimal films deposited on the holder coated with gold were observed, obtaining a conductive surface in vacuum conditions.

Finally, the same films were analyzed using an Atomic Force Microscope NX10 (PARK) equipped with software for image analysis XEI (4.3.4. Build 22, PARK Systems Corp., Suwon, Republic of Korea), using the Non-Contact Mode with a resonance frequency of 230 kHz and a scan speed of 1.0 Hz. The treatment of the images was performed using $5 \times 5 \mu\text{m}$ of the sample.

2.4.10. Uniformity of Content

Each optimal film was left in 3 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) for 3 h (ten samples analyzed, $n = 10$), with the addition of 7 mL of deionized water, and then 1 mL of the new dispersion was centrifuged at 15,000 rpm for 30 min. For each drug, the supernatant was diluted at 100 μL in 2 mL of deionized water and subsequently analyzed using the validated UV–VIS spectrometry method described previously.

2.4.11. Drug Release

Franz Cells were used to evaluate the release of the drugs, using regenerate cellulose dialysis bags MWCS 12–14 kDa (Spectra/Por, Los Angeles, CA, USA) as membranes separating donor and receptor compartments. Optimal composite films that were 1 cm in diameter and supplemented with the drugs (LGL MAS) were evaluated (six samples analyzed, $n = 6$). The dissolution medium was added to 3.5 mL of phosphate-buffered solution (PBS) with pH = 7.4 at 37.5 °C and 50 rpm. A total of 250 μL PBS was extracted at different times for drug quantifications by applying the previously mentioned spectrophotometric methods. The data were fitted to various kinetic models, such as zero-order, first-order, Higuchi, and the Korsmeyer–Peppas model. The model with the highest correlation coefficient was considered the best fit.

Statistical analyses. The experimental data were analyzed by using STATGRAPHICS Centurion XVI[®] software (version 16.2.04, StatPoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA).

3. Results and Discussion

3.1. Preparation of Nanoparticles

The excipient charges were the principal property taken into consideration for the manufacture of composites. The desolvation method consisted of three dispersions, as described in Figure 1. In dispersion A, the addition of a desolvating agent reduced the water available to keep the gelatin dispersed, resulting in the contraction of polymer chains; the hydration became too low for larger chains and then precipitated (desolvation 1).

This phenomenon improved the distribution and reproducibility of the final product. Then, pH was adjusted to 3—below gelatin's isoelectric point ($pI \approx 4-5$)—to charge it positively [15]. Dispersion B consisted of amphoteric laponite for LGL formulations, while for LGL MAS, it contained the clay and maltodextrin/sodium ascorbate mixture. In the latter, the positive edges of the solid disk formed electrostatic interactions with ascorbate anions. In the case of maltodextrin (a neutral carbohydrate), it developed physical interaction mainly with the negative surface of the mineral [8,20]. Finally, dispersion C had a negative charge due to the presence of soy lecithin (phosphatidylcholine). During the mixing process with the rest of the dispersions, the acetone/methanol mix exhibited desolvating activity upon gelatin, contracted the chains of protein (desolvation 2), and formed the particles by means of violent agitation. At the end of this process, the pH of the dispersion was around 3–4. This condition increased the hydrophobicity of the lecithin and caused particles aggregation [21] while having a possible negative effect upon wounds, if the composites fitted as dressings [22]. For those reasons, pH was adjusted to 6.5, and glutaraldehyde was added as a covalent crosslinker of the free amino groups of the gelatin chains through a Maillard reaction [15]. The films were formed by water evaporation, allowing the coalescence of the particles [23], and the clay acted as a physical crosslinker [24], helping to accelerate the drying process. This research aimed to shed light on the properties of the laponite-based film used on wounds in a liquid state, which will help to increase contact on the irregular surface of wounds.

3.2. Characterization of Nanoparticles

3.2.1. Particle Size, Polydispersity Index (PDI), and Zeta Potential (ξ)

Particle size. When designing the composite dressing, particle size played an important role. Recently, it has been reported that a particle size of ≤ 473 nm accelerates the passage from the inflammation to the proliferation phase in the healing process, while particles with a size of ≥ 1 μm are only able to reduce feverish states and inflammation in the affected area, although their mechanisms of action are unknown [25–27]. In this research, the nanoparticles with 8.8 mg of laponite, regardless of the condition evaluated, exhibited sizes ≤ 473 nm (see Table 1). This assay demonstrated that the particulate size decreased when the clay concentration increased. This is related to Laponite's physical crosslinker effect, which attracted the excipients into the center of the particle [28], thus aiding in the general crosslinking process. Furthermore, the emulsification activity of lecithin showed the same tendency as previously reported (the higher the concentration, the more compact the particles were [29]).

Polydispersity index (PDI). The successful formulation of safe, stable, and efficient particles requires the preparation of homogeneous populations of a certain size; hence, a value of $PDI \leq 0.3$ is recommended [30]. The results for this response did not show a trend (see Table 1) due to the structural heterogeneity [31]. Nevertheless, the formulations with L:G mix 125:100 and 8.8 mg of laponite had the best performance.

Zeta Potential determinations (ζ). The necessary repulsion charge to avoid the aggregation of the particles stands over ± 30 mV [15]. It has been reported that particulate systems have better stability; hence, the interior and exterior formation of the house of cards structure is related to the presence of a clay [32]. Clay concentration plays a significant role upon dispersion stability given the fact that, in high concentration, the neighboring particles are highly attracted by charges, causing agglomerations and leading to precipitation. On the other hand, when not in sufficient concentration, precipitation occurs as a result of poor repulsion between them; thus, the challenge is to find a sufficient balance between laponite and excipients in order to maintain dispersion stability [28,33]. Although there is a direct correlation between laponite concentration and the increased of the negativity charge of particles, the blank samples reflected the most negative results, demonstrating a significant electrostatic interaction between the excipients and the clay [31,34]. The formulations with 150:100 mg:mg L:G mix level precipitated after two weeks—in accordance with their results with values close to zero. The lack of repulsion interaction in these formulations derives

from the fact that the ratio between laponite and the rest of the formulation is considerably low, thereby making it difficult to form and preserve the house of cards structure and consequently causing precipitation (see Table 1).

Table 1. Particulate composite results and responses in terms of size, PDI, Z potential, and entrapment efficiency ($n = 3$). L (soy lecithin), G (Gelatin type B), M (Maltodextrin), and AS (Sodium Ascorbate). The factors and results with bold font describe the optimal formulation.

Sample	L:G mg:mg	Laponite mg	M:AS mg:mg	Size nm	PDI	Z Potential mV	% Entrapment	
							M	AS
LG		-	-	311.5 ± 36.4	0.179 ± 0.034	-43.2 ± 2.8	-	-
LG MAS			10:10	1801.5 ± 171.3	0.578 ± 0.183	-27.3 ± 0.8	50.03 ± 0.99	92.98 ± 0.90
LGL 4.4		4.4	-	371.8 ± 34.0	0.464 ± 0.046	-27.1 ± 1.0	-	-
LGL 4.4 MAS			10:10	1488.7 ± 118.5	0.513 ± 0.108	-15.8 ± 1.6	53.85 ± 0.98	96.59 ± 0.33
LGL 6.6	125:100	6.6	-	336.7 ± 18.9	0.625 ± 0.031	-28.2 ± 1.1	-	-
LGL 6.6 MAS			10:10	403.4 ± 65.1	0.433 ± 0.130	-16.4 ± 1.9	55.41 ± 0.25	97.68 ± 0.19
LGL		8.8	-	286.4 ± 28.7	0.222 ± 0.008	-34.5 ± 1.7	-	-
LGL MAS			10:10	391.8 ± 20.7	0.145 ± 0.043	-24.2 ± 2.2	57.12 ± 0.50	97.96 ± 0.06
		-	-	217.6 ± 12.3	0.295 ± 0.071	-38.2 ± 1.2	-	-
			10:10	1363.8 ± 24.2	0.508 ± 0.112	-24.3 ± 1.2	50.12 ± 0.28	93.28 ± 0.25
	150:100	4.4	-	266.6 ± 30.2	0.346 ± 0.030	-9.3 ± 0.3	-	-
			10:10	1574.3 ± 160.6	0.926 ± 0.092	-1.8 ± 0.8	54.26 ± 1.10	97.92 ± 0.50
			-	259.8 ± 4.4	0.400 ± 0.020	-12.2 ± 0.6	-	-
			10:10	772.6 ± 54.4	0.699 ± 0.044	-1.9 ± 0.3	54.81 ± 0.48	98.47 ± 0.50
		8.8	-	259.7 ± 26.2	0.408 ± 0.019	-15.1 ± 1.5	-	-
			10:10	372.6 ± 22.3	0.493 ± 0.050	-2.4 ± 1.4	57.08 ± 0.11	98.00 ± 0.39

3.2.2. Entrapment Efficiency

Table 1 shows how laponite significantly increased this response in comparison to the blanks for both drugs, although, at first glance, results appeared to be rather equal regardless of the laponite concentration. To determine the significant differences between samples, Fisher's least significant difference (LSD) procedure was used. Through utilizing this procedure, it is possible to state that there were no statistically significant differences between the levels containing 4.4 and 6.6 mg of laponite for both L:G mix levels. This assay demonstrated that the 8.8 mg-containing clay level was the highest encapsulation of M and AS. Moreover, this assay proved the specificity of the excipients to ascorbic anions due to their hydroscopic affinity and charge [35,36].

Based on the results, the particles with the 125:100 mg:mg L:G mix and 8.8 mg laponite, with and without M and AS, were taken as the optimal formulation (LGL and LGL MAS, bold in Table 1). Nevertheless, the complete level of L:G mix in the selected formulation was further studied in films in order to obtain insights about the influence of laponite in regard to mechanical properties and other factors relevant to their possible use as wound dressing materials.

3.2.3. Rheological Analysis

The purpose of evaluating the rheological properties of the samples was to determine their response to flow and gain a better knowledge of the type of fluid to which they correspond at 30.5 °C (mean skin temperature) and their stability at temperatures from 18 °C to 50 °C. This was mainly due to the fact that the skin temperature depends on the surrounding environment, leading to fluctuations in its values in the range evaluated [17,18]. The results presented here are further complemented by the following section concerning Differential Scanning Calorimetry (DSC).

While assessing the viscosity of the optimal formulations vs. shear rate [37], it was observed that both dispersions follow a non-Newtonian behavior, specifically for thinning fluids ($n < 1$), as shown in Figure 3a. This means that, at higher shear rates, the fluids decreased their viscosity. For LGL fluid, the initial values were low (slight slope, $n \ll 1$) in comparison to LGL MAS. The observed trend was related to smaller particle size (286.4 ± 28.7 nm) and distribution regarding LGL, as well as its higher repulsion charge (-34.5 ± 1.7 mV). In contrast, the other formulation was characterized by a bigger size and a Z potential closer to zero, which probably meant that some particles agglomerated, creating a resistance to flow and therefore obtaining higher values of viscosity. Figure 3b displays the small-amplitude oscillatory flow results [38], evaluating the elastic and viscous modulus (G' and G'' , respectively) vs. frequency-flow (ω). Both optimal fluids demonstrated the same viscoelastic behavior; however, the elastic modulus predominated at all evaluated frequencies ($G' > G''$) mainly due to the entanglement between biopolymers and clay in the dispersions [39]. Additionally, the M:AS mix did not affect the evaluated viscoelastic properties.

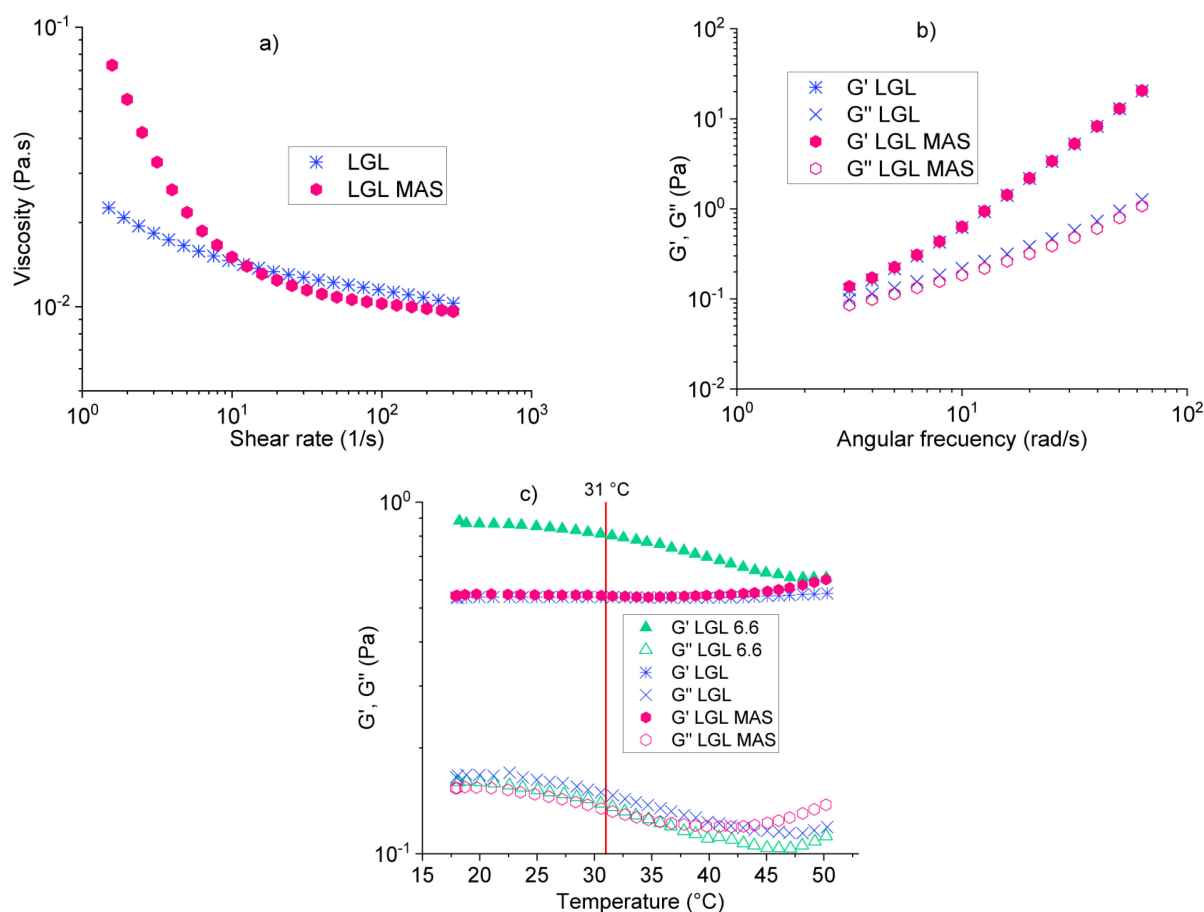


Figure 3. Rheology studies: (a) viscosity, (b) oscillatory study, and (c) thermal behavior.

Finally, the thermal stability test of the optimal formulations for both LGL and LGL MAS at a temperature range from 18 to 50°C is described in Figure 3c (demarcated by pink and violet curves, respectively), wherein the elastic modulus dominated over the viscous modulus ($G' > G''$), meaning that the gel state remained in this temperature range. To gain a better understanding of the effects of laponite on the samples, a non-optimal formulation was analyzed as well. This non-optimal formulation contained 6.6 mg of laponite (LGL 6.6, green). It was observed that when the temperature increased above 31°C , its elastic modulus decreased (G'), implying that a change had occurred in the solid component of this formulation due to the gelatin (one of the most abundant excipients). This biopolymer

is sensitive to temperature and flow since it completely loses its solid form and turns into a weak gel state at 31 °C. The material was not homogeneous and needed more laponite (clay) to avoid this phenomenon, as shown by the optimal formulations [40].

3.2.4. Morphology

Figure 4 shows the development of the particles. TEM confirmed the results obtained via DLS. Figure 4b,d,f,h correspond to the zoom on the edge of each type of particle in the images. The aggregation of some clay platelets at the edge of the optimal particles (see Figure 4f for LGL and Figure 4h for LGL MAS) was observed as described by Negrete and coworkers in their research [41]. The clay can be observed as black lines that are ~1 nm thick and 25 nm length. The blank vs. laponite particles with M:AS (see Figure 4c,d,g,h) are completely different from one another. The first one, Figure 4c, had a spherical form, where excipients occupied the whole particle, as seen in the close-up presented in Figure 4d. The polymers observed were similar to tiny particles, given the natural incompatibility that prevails between protein-lipid-carbohydrate systems [42], while, in LGL MAS, the excipients were located in the center of the material with a heterogeneous form, being mainly capsular.

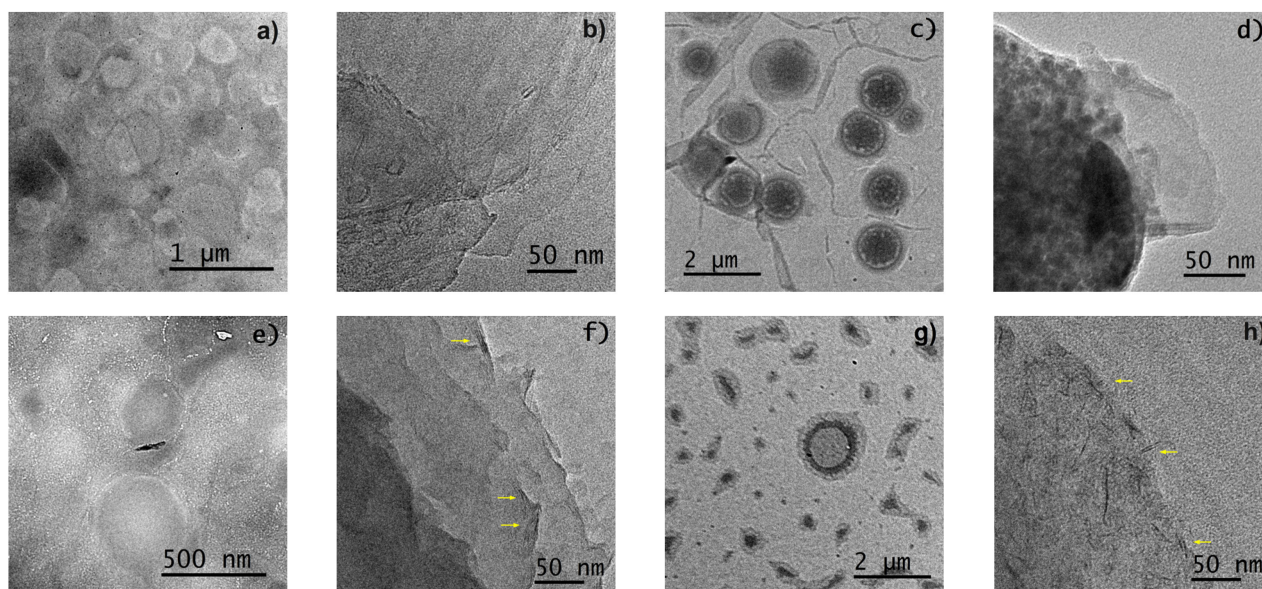


Figure 4. TEM of particles: LG: (a,b); LG MAS: (c,d); LGL: (e,f); LGL MAS: (g,h).

3.3. Characterization of Films

3.3.1. Film Thickness

Table 2 reveals a statistically significant difference (ANOVA, $p < 0.05$) in which the clay amount and drug mix affected this response. Whereas, laponite concentrations, as well as the addition of M:AS, were proportional to thickness. Other studied features of the films have a strong relationship with this response, as will be discussed in the following paragraphs.

3.3.2. Mechanical Properties

The mechanical properties of a film vary depending on the polymers (structure and degree of polymerization), solvent, pH, plasticizer, and manufacturing process [43]. Thus, when the Texture Analyzer obtains the force-displacement plot, the Tensile Strength (TS) and the Young's modulus (elastic modulus) can be measured. TS measures the film strength as fracture force experimented by the transverse section area of the material, while the elastic modulus expresses the material's resistance to deformation. In order to resist the natural deformations of the human skin, the TS of films should be in the range of

2.5–16 N/mm² (MPa) and have closer Young's modulus values to that of the skin tissue, which can hold values from 4.6 to 20 MPa [44].

Table 2. Film results, three samples analyzed for each test ($n = 3$).

Sample	Thickness mm	Young's Modulus MPa	Tensile Strength MPa	Swelling %	Loss by Solubilization %	Occlusive Effects %
LG	0.096 ± 0.007	23.9 ± 7.2	1.8 ± 0.3	-	-	88.58 ± 1.27
LG MAS	0.101 ± 0.005	164.3 ± 26.6	2.4 ± 0.2	-	-	86.43 ± 0.48
LGL 4.4	0.097 ± 0.005	27.6 ± 6.6	0.4 ± 0.2	442.87 ± 30.65	14.55 ± 2.57	77.23 ± 3.32
LGL 4.4 MAS	0.102 ± 0.012	101.7 ± 20.3	1.6 ± 0.8	171.66 ± 21.20	19.17 ± 0.39	80.73 ± 1.12
LGL 6.6	0.102 ± 0.007	18.7 ± 3.8	0.9 ± 0.1	523.74 ± 43.61	8.28 ± 1.53	70.33 ± 1.98
LGL 6.6 MAS	0.103 ± 0.010	72.7 ± 9.8	2.9 ± 0.5	277.17 ± 40.29	9.39 ± 0.64	81.11 ± 0.68
LGL	0.111 ± 0.009	4.7 ± 0.5	4.7 ± 0.8	672.46 ± 24.26	6.84 ± 0.87	69.56 ± 3.40
LGL MAS	0.113 ± 0.007	12.5 ± 2.7	7.1 ± 0.6	289.06 ± 7.73	6.85 ± 0.92	79.37 ± 1.00

Table 2 shows how laponite decreased the stiffness of the films. When comparing formulations with and without M:AS, it can be observed that the addition of the drug mixture improves the elastic module. As previously mentioned, high values of this property are not suitable for materials intended for use as wound dressing materials. Regarding the TS, an opposite effect can be observed, and this response increased with clay because a high laponite content would lead to a highly crosslinked film network, making materials more resistible [28]. Only the optimal formulations had values that corresponded to those selected as specifications. In comparison to LGL, LGL MAS had higher amounts due to the presence of the polysaccharide, as explained by Castro and coworkers. Maltodextrin DE17–19 on hydrogels for films (carbohydrate used in this study) had a superior elevated plastic character and less-entangled polymer chains, making the material more resistant [45].

3.3.3. Swelling Behavior and Mass Loss by Solubilization

For studies such as the one described in this paper, swelling expresses the degree to which the film can absorb water, PBS, or other substances that simulate the exudate, thus allowing the release of the incorporated drug. In relation to this, excessive swelling can cause a reduction in the film's integrity due to the formation of a free-flowing gel, and this is known as loss by solubilization [46]. The blanks were impossible to analyze because they dispersed on water, revealing that the particles were independent and needed another polymer or crosslinker to stay on this solvent in the same manner that the films did. Bigi and collaborators discussed this point. They mentioned that gelatin films needed concentrations of glutaraldehyde above 0.25% (v/v) to not lost their integrity in hydrophilic solvents [47]. In this study, the concentration of the covalent crosslinker was 0.03% (v/v), which is clearly under the aforementioned value. Laponite increased the swelling and reduced the loss by solubilization, indicating an excellent affinity for water. Simultaneously, it could act as a physical crosslinker, aiding in the maintenance of the films' integrity [48]. LGL and LGL MAS showed the best performance in these responses (see Table 2).

3.3.4. Occlusive Effects

Table 2 enlists the means obtained from evaluating the occlusiveness of composite films vs. blanks. The occlusion factors of the blanks were the highest ($p < 0.05$); however, the presence of clay decreased the responses for empty formulations, while, in those loaded with drugs, although not statistically significant ($p > 0.05$), this led to a slight decrease, with LGL and LGL MAS being the lowest with 8.8 mg of clay. This factor depends on the sample volume, particle size, crystallinity, lipid concentration, and type of colloidal systems [49]. The absence of laponite in the blank formulations revealed a high occlusive grade as a response to the presence of amorphous lecithin, which tend to occupy more space despite being hydrofobic [29,50]. In contrast, the presence of laponite led to (1) less compaction, as the optimal formulations showed the highest thickness, (2) the development of nanovoids

during the drying process formed by the house of cards structure, and (3) films being in the glassy state at room temperature [33,51]. LGL and LGL MAS did not suffer any change in thermal behavior. As seen from their rheology studies, their T_g was ≥ 50 °C, which will be further discussed in the DSC section. As a result, the occlusiveness might affect the bioavailability of the drugs entrapped when administered topically, as well as the gas exchange.

3.3.5. Clarity

One of the essential properties of films intended for use as wound dressings is to allow the evaluation of the healing process, for which a translucent material is preferred [52]. The light transmittance for dressings is preferably less than 10% since it could prevent UV radiance to the wound, as mentioned by Pan and Kaygusuz [53,54]. In this study, the transmittances of the optimal films (three samples evaluated, $n = 3$) were $1.68 \pm 0.25\%$ and $5.13 \pm 0.59\%$ for LGL and LGL MAS, respectively. Although the films were not 100% transparent, they were in the specification range and demonstrated a slight pass of light across them due to the presence of nanovoids by laponite, as described before. The significant difference in means was because of the presence of maltodextrin D16.5–19.5 in the formulations with drugs, which improved the film network, making it more homogeneous and avoiding the agglomerated chains [45]. This assay described the project films as a protective barrier from the environment, including radiance, that will allow the healing process to be observed.

3.3.6. Bioadhesion and Post-Wetting Bioadhesion

Bioadhesion describes the interfacial forces between two materials (at least one is biological) that need to be held together for some time [55]. For wound dressing, this force needs to be enough to stay in the damaged area while, at the same time, being easy to remove. In his clinical study, Waring mentioned that commercial dressings with values of over 40 cN regarding this response caused pain and extensive damage when removed, as cells and tissues remained in the material [56]. This was later confirmed by Blacklow, who suggested values close to 10 cN for this force to make them suitable for clinic application [57]. The results for LGL were -2.8 ± 0.7 cN and -5.2 ± 0.2 cN, respectively, for each response and, for LGL MAS, the results were -4.0 ± 0.4 cN and -7.4 ± 0.2 cN (three samples evaluated, $n = 3$). The negative sign correlates with the force made by the instrument to separate the surfaces. The presence of M:AS showed a statistically significant difference ($p < 0.05$). This result was evidence that the carbohydrate increased the response by its hydrophilic nature, bonding to water remnants in the skin [58]. The values in the post-wetting bioadhesion assay were close to the specifications due to the water-induced swelling of the polymer chains and clay platelets, which consequently increased the interface interactions between both surfaces. This phenomenon has a positive effect in regard to its application as a wound dressing since it is necessary to clean and wet the injured area prior to application. Thus, this will increase the force between film and skin, enabling the dressing to hold together while making it less difficult to remove.

3.3.7. ATR-FT-IR

The width, intensity, and position of FTIR spectral bands are all sensitive to chemical function changes and macromolecule conformations [59]. Figure 5 shows the excipients and optimal formulations spectra. For LGL, a band was observed to be around 3300 cm^{-1} of N-H vibration of amide I of gelatin type B; however, on the composite with loaded with drugs, this band was seen as slightly wider due to O-H groups of ascorbate and maltodextrin. The bands at 2926 and 2856 cm^{-1} on the optimal formulation corresponded to C-H bonds; their intensity demonstrated the presence of lecithin as a major excipient, while the band at 1638 cm^{-1} represented the crosslinking of gelatin (-N=C-, aldimine group) [34], which was wider on LGL MAS because of the existence of carbonyl groups in ascorbate. The band at 1629 cm^{-1} confirmed the presence of amide groups of gelatin. The

PO₂ groups of phospholipids were presented by the band at 1061 cm⁻¹. The appearance of a band at 970 cm⁻¹ was associated with the stretching vibration of the Si–O–Si bond on laponite [11,60].

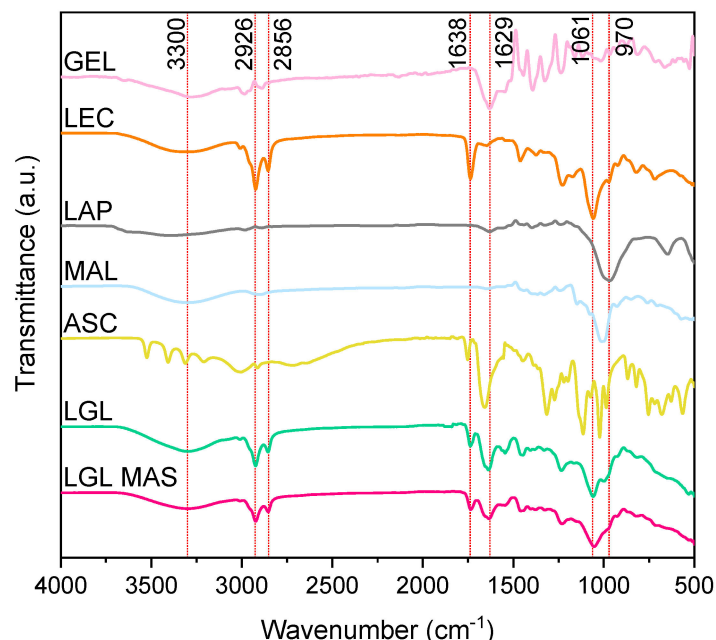


Figure 5. Fourier-transform infrared spectroscopy patterns for excipients and nanocomposite films.

3.3.8. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

For pharmaceutical products, stability depends on the conditions of where the products will be stored, such as temperature and humidity. Temperature values should not be above 50 °C [61]. DSC is used to describe the material stability in a certain temperature range. This experiment (as reported in Figure 6) evaluated the thermal behavior of excipients on a non-optimal (LGL 6.6) and optimal (LGL MAS) formulations of films (top), as well as the derivatives of each scan (below) to ensure reliable analysis. Previously, rheology assays portrayed the thermal phenomena of nanocomposite dispersions as being at 18 to 50 °C, and this will be compared and discussed at length in this section.

Regardless of laponite concentration, both films showed behavior that is typical of partially crystalline materials, with only one glass transition (T_g , green box) being followed by an endothermal melting peak (T_m , yellow box). The change in glass transition temperatures resulted from the interactions between the clay and gelatin. Compared to T_g of protein and LGL 6.6 (30.3 °C) vs. the optimal film with 8.8 mg of laponite, T_g increased by 19 °C (49.5 °C), this phenomenon was observed in the fluid behavior (Rheological analysis section) as well as in previous research such as in the work of Varnik and coworkers [62], as they interpreted the changes of T_g of polymer chains using molecular dynamics simulations. Those strongly attractive platelets (clay) led to an increase in T_g because the motion of the polymer chains, where they were embedded, was slowed in comparison to the gelatin alone. This change depended on laponite concentration—a lower concentration produced a weaker attraction and had the opposite or no effect compared to the bulk material (where the molecules can relax faster). At the same time, the other excipients probably affected the glass transition in the final product as well. The melting temperature of gelatin, which depends on the moisture [63,64], T_m = 80.8 °C [33], was higher than LGL 6.6 and the LGL MAS films (66.8 and 74.3 °C, respectively). Those changes occurred due to the presence of laponite platelets, and the polymer suffered some changes, such as loops or shorter sequences, resulting in less stable structures than the bulk materials. On the other hand, the lecithin plot had different T_g and T_m values by being a phospholipid mix. The T_m for sodium ascorbate was 194.8 °C [65]. The bands of laponite

and maltodextrin corresponded to water desorption in a dehydration process, given the fact these components are hygroscopic [10,66].

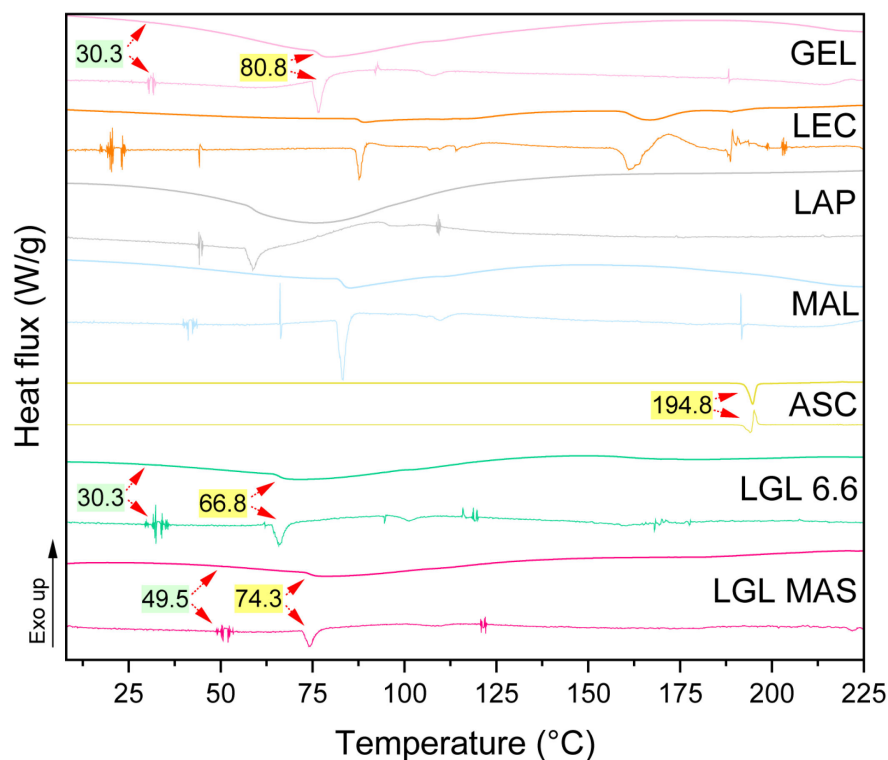


Figure 6. Thermal behavior determined by DSC for excipients and nanocomposite films.

The melting enthalpies were 20.4 J/g, 0.6 J/g, 0.4 J/g and 290.2 J/g [67] for gelatin, LGL 6.6, LGL MAS, and sodium ascorbate, respectively. The ΔH melting for gelatin is related to the triple helix denaturation. Thus, the enthalpies measured in the films vs. the protein were lower because laponite interfered in the formation of the triple helix of the protein. The house of cards structure increased amorphous polymer structure via electrostatic interactions with the polymer chains, avoiding the renaturation of the triple helices in the drying process. Additionally, the presence of other polymers and covalent crosslinkers influenced these values [68].

3.3.9. Surface Morphology, Scanning Electron Microscopy (SEM), and Atomic Force Microscopy (AFM)

Figure 7 shows how the roughness of the films decreased in the following order: LG > LG MAS > LGL > LGL MAS (see Figure 7i,j,k,l, respectively). This reduction is due to the homogeneous distribution of clay's platelets on polymer chains, primarily on gelatin. This led to changes in the network, resulting in amorphous structures, which were predominant in the new materials. From the micrographs, SEM and AFM (see Figure 7a,e), LG was described as having a uniform distribution of oval holes within it. Previous research revealed that the LG nanoparticles had a convex capsular form after the drying process. This translates into a more pronounced shape once the film was formed, leaving behind voids as a result the coalescence of the particles [34]. LG MAS evidenced the effects of the presence of cumulus on other excipients, such as maltodextrin (see Figure 7b,f). This film experienced agglomeration during the drying process, as well as phase separation related to the natural incompatibility of the polymers used. As a result, the holes for this formulation were wider due to its bigger particle size (see Table 1 and Figure 4c) in comparison to those presented on LG.

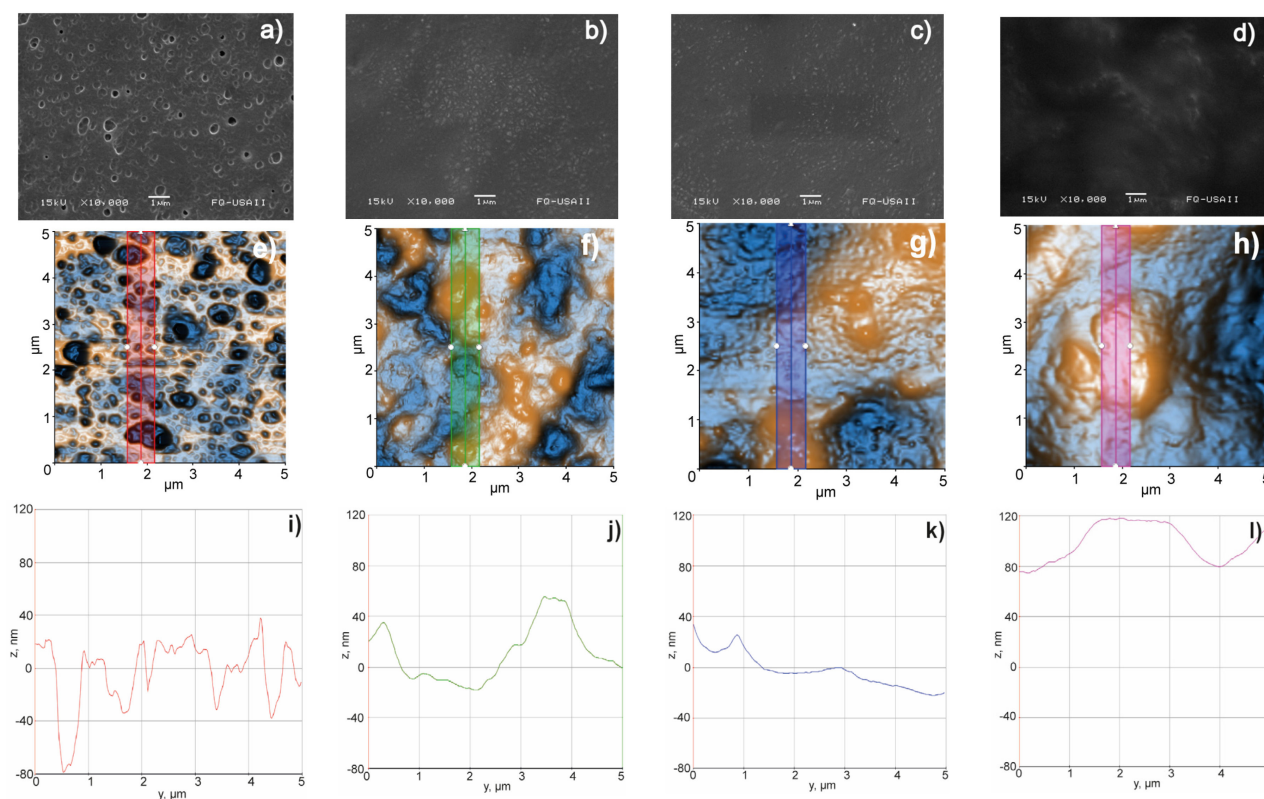


Figure 7. Surface morphology, SEM (a–d), AFM (e–h), and roughness (i–l) microphotograms of the following: (a,e,i) LG; (b,f,j) LG MAS; (c,g,k) LGL; (d,h,l) LGL MAS.

The surfaces in Figure 7g,h were wider in both laponite films (LGL MAS > LGL). This result correlates with those shown in Table 2; hence, the clay was embedded in the polymer chains, increasing the thickness of the films and limiting the formation of deep craters. Still, the existence of convex shapes was observed. As previously discussed by Valencia, the reduction in the roughness could be a consequence of biopolymers' orientation on the support surface (laponite platelets) during the drying process [20].

3.3.10. Uniformity of Content

LG MAS and LGL MAS were evaluated according to the Pharmacopeia of the Mexican United States [69]. The uniformity of doses is accepted when the active amount in no less than nine out of the ten units of doses is within the range of 85.0 to 115.0%, and no amount is outside the range of 75.0 to 125.0% of the declared quantity. The previous is assessed using the method of uniformity of content. Moreover, it is established that the coefficient of variation should not be greater than 6.0%. Table 3 lists the results for the preceding formulations. It is shown that the clay containing formulation complied with the requirement of the uniformity of dose for both APIs. On the other hand, LG MAS did not fulfill this requirement for AS.

3.3.11. Drug Release

Although initially contemplated, it was not possible to compare the effect of laponite upon drug release. This was due to the non-compliance with uniformity of content of LG MAS. The degradation of sodium ascorbate, as an expected response due to its photosensitivity, is accountable for this result. Ismail and collaborators suggested reductions in the movement of molecules as a strategy to avoid this phenomenon [65]. In this case, LGL MAS was able to overcome such an effect due to the presence of laponite platelets. Their positive edges attracted ascorbate anions, consequently reducing AS motion.

Table 3. Uniformity of content of LG MAS and LGL MAS.

Assay	Drug (%)			
	LG MAS		LGL MAS	
	M	AS	M	AS
1	94.07	54.23	98.53	87.19
2	98.01	45.12	97.27	91.27
3	101.28	42.73	98.83	90.01
4	95.33	55.04	97.97	85.55
5	95.58	51.09	93.74	90.88
6	94.67	55.37	98.35	86.85
7	95.99	51.56	100.43	86.91
8	92.53	51.09	96.09	86.76
9	97.19	45.31	92.70	90.25
10	101.25	47.24	100.90	85.74
Mean	96.59	49.88	97.48	88.14
SD	2.90	4.51	2.65	2.20
CV	3.00	9.04	2.72	2.50

Table 4 shows the results for maltodextrin (M). Approximately 90% was released within 24 h following a first-order model ($r^2 = 0.9464$). Solid forms, similar to the films presented in this paper, containing hydrophilic drugs (M) in porous matrices tend to follow this profile, in which the release of the active substance is proportional to the amount of drug remaining in its interior in such a way that the amount of drug released by a unit of time diminishes [70,71].

Table 4. Dissolution model parameters for LGL MAS.

Drug	Parameters	Zero-Order $F = kt$	First-Order $F = 100[1 - e^{-kt}]$	Higuchi $F = kt^{0.5}$	Korsmeyer–Peppas $F = kt^n$
M	r^2	0.6930	0.9464	0.371	0.8612
	k	0.897 ± 0.070	0.376 ± 0.026	10.100 ± 0.472	41.139 ± 1.925
	n	-	-	-	0.183 ± 0.011
AS	r^2	0.9219	0.8848	0.9501	0.9680
	k	0.256 ± 0.007	0.013 ± 0.001	3.575 ± 0.042	6.896 ± 0.402
	n	-	-	-	0.370 ± 0.011

Figure 8 for M (blue curve) displays the accumulated fraction of drug release vs. time. The slope (k) describes a time dependent release rate, as defined by Mulye and coworkers. In the first few hours, the rate was seen as constant and fast, related to a linear correlation derived between the surface area of a material and the release medium (see Figure 7h). However, release and the rate decreased proportionally with decreasing area [72]. This assay reinforced the idea that LGL MAS was a porous film due to the presence of laponite, as described in the occlusive effect discussion. Moreover, in the first few hours, the transport mechanism was fast and adequate to apply LGL MAS as dressing, allowing maltodextrin to cross from damaged to internal tissue and bring the energy necessary to accelerate the healing process [14]. The carbohydrate release was studied only for 144 h because the signal decreased over time—when the aliquots refilled the medium. The method used for this determination was not sensitive to detect low concentrations after this point.

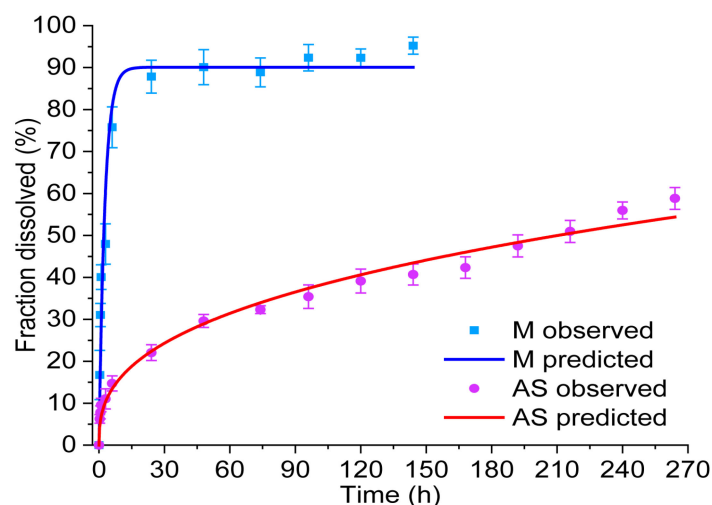


Figure 8. Release profile and fit of M and AS in LGL MAS.

In Figure 8, for AS (red curve), the fraction of drugs released was approximately 60% in 264 h, as determined by a Korsmeyer–Peppas model ($r^2 = 0.9680$) with an n value equal to 0.370 ± 0.011 (see Table 4). This fitting model provided an exponent n , which predicts the drug transport mechanism. For n values ≤ 0.5 , a Fick diffusion is followed. $n = 1.0$ reflects a zero-order behavior, while, for $0.5 < n < 1.0$, the diffusion is non-Fickian (also known as anomalous transport [71]). The n value on this assay revealed the AS released was guided by Fick diffusion. Drug transport mechanisms were also fitted to a Higuchi model, which considers the fraction of drugs released as being proportional to $t^{1/2}$. For this work, the model supported by Fick diffusion is considered as the main mechanism driving the displacement of drugs while embedded on a film (see Table 4). Saez found that in systems that follow Higuchi’s model, the bioactive compound was uniformly distributed on solid polymer support and could be dissolved in the polymeric matrix, as well as dispersed, if its content exceeds the solubility limit [73]. Fick’s second law is interpreted for the AS diffusion phenomenon as follows: the drug migration to the medium occurred by molecular diffusion through the support or by diffusion through existing micropores in the hybrid matrix. A decrease in the drug migration rate across time was observed as well, mainly in relation to continuous decreases in the diffusion path. This assay provided information about the efficacy of LGL MAS as a possible capable bacteriostatic dressing; hence, AS will remain in the wound to reduce pH-avoiding bacterial growth.

4. Conclusions

The laponite composites containing biopolymers (lecithin/gelatin), both empty and loaded with drugs (maltodextrin/sodium ascorbate), formed suspensions capable of forming in situ films, which yield attractive and innovative options for use as dressing materials, in which, the clay significantly improved the physicochemical properties of the particles and films, which is relevant to its targeted usage. Thus, the optimal particulate suspensions were prepared via the gelatin desolvation method, with 125:100 mg:mg of lecithin/gelatin mix and 8.8 mg of clay: empty (LGL), and others loaded with 10 mg of maltodextrin and sodium ascorbate (LGL MAS). This amount of laponite reduced the particulate size to 286.4 ± 28.7 and 391.8 ± 20.7 nm for LGL and LGL MAS, respectively. This can be attributed to its physical crosslinking effect. The PDI indicated a homogeneous population (<0.3), which was later observed by TEM. The dispersion exhibited an adequate Z potential—capable of avoiding agglomeration phenomenon. Additionally, the clay provided temperature stability at a range from 18 to 50 °C, and this was confirmed by rheology and DSC. Regarding the properties of the film, laponite enhanced elastic and plastic modulus to resist ruptures in the external environment (mechanical properties). Laponite also raised the swelling of the films up to 672.46 ± 24.26 and $289.06 \pm 7.73\%$ for each optimal

formulation (LGL and LGL MAS) while helping to maintain the integrity of the films in water and allowing the gas exchange. Additionally, the clarity and bioadhesion should be enough to observe the healing process and stay in the wound, also making subsequent removal from the wound easier. As shown in the surface morphology section, how the synthetic mineral decreased the roughness has been described. Concerning drug release from LGL MAS, the maltodextrin provided fast and continuous transport—optimal for bringing energy to interior tissues and accelerating the healing process. In contrast, the release of sodium ascorbate was slow, meaning the drug remained in the local area, which would reduce the pH and therefore possibly avoid bacterial growth. The systems addressed in this study represent interesting, innovative, and promising alternatives to encapsulate drugs, with potential applications in medicine, especially with respect to wound dressings.

Author Contributions: Conceptualization: M.J.B.-B., M.-A.S. and R.A.P.-Á.; methodology and investigation: R.A.P.-Á., C.F.-A. and L.M.-T.; validation: C.F.-A. and M.J.B.-B.; formal analysis and data curation: J.J.E.-C., G.L.-G., M.J.B.-B., J.G.-M. and M.-A.S.; resources and funding acquisition: M.J.B.-B. and M.-A.S.; writing—original draft preparation: R.A.P.-Á. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT), CVU 888004.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: New data were created.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vowden, K.; Vowden, P. Wound Dressings: Principles and Practice. *Surgery* **2017**, *35*, 489–494. [[CrossRef](#)]
2. Madrid Martínez, A.; Santillan Reyes, E.R. Caracterización Físicoquímica y Biológica de Un Biopolímero Obtenido Por Irradiación Gamma a Base de Quitosano y Poloxámero. Bachelor's Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, 2015.
3. Rouf, T.B.; Schmidt, G.; Kokini, J.L. Zein–Laponite Nanocomposites with Improved Mechanical, Thermal and Barrier Properties. *J. Mater. Sci.* **2018**, *53*, 7387–7402. [[CrossRef](#)]
4. Gonzaga, V.D.A.M.; Poli, A.L.; Gabriel, J.S.; Tezuka, D.Y.; Valdes, T.A.; Leitão, 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*, 1388–1397. [[CrossRef](#)]
5. Olivera, N.; Rouf, T.B.; Bonilla, J.C.; Carriazo, J.G.; Dianda, N.; Kokini, J.L. Effect of LAPONITE® Addition on the Mechanical, Barrier and Surface Properties of Novel Biodegradable Kafirin Nanocomposite Films. *J. Food Eng.* **2019**, *245*, 24–32. [[CrossRef](#)]
6. 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*, 424–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Viseras, C.; Carazo, E.; Borrego-Sánchez, A.; García-Villén, F.; Sánchez-Espejo, R.; Cerezo, P.; Aguzzi, C. Clay Minerals in Skin Drug Delivery. *Clays Clay Miner.* **2019**, *67*, 59–71. [[CrossRef](#)]
8. Tomás, H.; Alves, C.S.; Rodrigues, J. Laponite®: A Key Nanoplatfom for Biomedical Applications? *Nanomedicine* **2018**, *14*, 2407–2420. [[CrossRef](#)]
9. Ghadiri, M.; Chrzanowski, W.; Lee, W.H.; Rohanizadeh, R. Layered Silicate Clay Functionalized with Amino Acids: Wound Healing Application. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 35332–35343. [[CrossRef](#)]
10. Ghadiri, M.; Chrzanowski, W.; Rohanizadeh, R. Antibiotic Eluting Clay Mineral (Laponite®) for Wound Healing Application: An in Vitro Study. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2014**, *25*, 2513–2526. [[CrossRef](#)]
11. 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. [[CrossRef](#)]
12. Teng, L.; Xia, K.; Qian, T.; Hu, Z.; Hong, L.; Liao, Y.; Peng, G.; Yuan, Z.; Chen, Y.; Zeng, Z. Shape-Recoverable Macroporous Nanocomposite Hydrogels Created via Ice Templating Polymerization for Noncompressible Wound Hemorrhage. *ACS BioMater. Sci. Eng.* **2022**, *8*, 2076–2087. [[CrossRef](#)]
13. Rajabi, N.; Kharaziha, M.; Emadi, R.; Zarrabi, A.; Mokhtari, H.; Salehi, S. An Adhesive and Injectable Nanocomposite Hydrogel of Thiolated Gelatin/Gelatin Methacrylate/Laponite® as a Potential Surgical Sealant. *J. Colloid Interface Sci.* **2020**, *564*, 155–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Cruz-Castañeda, O.; Cano-Colín, S.; Pat, L.; Salgado, R.M.; Krötzsch, E.; Elizondo-Vázquez, F.; de la Garza, A.; Baena-Ocampo, L. Maltodextrin/Ascorbic Acid Stimulates Wound Closure by Increasing Collagen Turnover and TGF- β 1 Expression in Vitro and Changing the Stage of Inflammation from Chronic to Acute in Vivo. *J. Tissue Viability* **2017**, *26*, 131–137. [[CrossRef](#)]
15. Pineda-Álvarez, R.A.; Bernad-Bernad, M.J.; Rodríguez-Cruz, I.M.; Escobar-Chávez, J.J. Development and Characterization of Starch/Gelatin Microneedle Arrays Loaded with Lecithin–Gelatin Nanoparticles of Losartan for Transdermal Delivery. *J. Pharm. Innov.* **2020**, *17*, 71–84. [[CrossRef](#)]
16. Rasouli, M. Characterization and Improvement of Phenol-Sulfuric Acid Microassay for Glucose-Based Glycogen. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2014**, *18*, 2020–2024. [[PubMed](#)]
17. Ludwig, N.; Formenti, D.; Gargano, M.; Alberti, G. Skin Temperature Evaluation by Infrared Thermography: Comparison of Image Analysis Methods. *Infrared Phys. Technol.* **2014**, *62*, 1–6. [[CrossRef](#)]
18. Lenhardt, R.; Sessler, D.I. Estimation of Mean Body Temperature from Mean Skin and Core Temperature. *Anesthesiology* **2006**, *105*, 1117–1121. [[CrossRef](#)]
19. López García, M.d.R. Preparación y Caracterización de Nanopartículas Lipídicas y Evaluación de Su Efecto Sobre Las Propiedades de Barrera de La Piel. Master's Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico, 2014.
20. Valencia, G.A.; Luciano, C.G.; Lourenço, R.V.; Do Amaral Sobral, P.J. Microstructure and Physical Properties of Nano-Biocomposite Films Based on Cassava Starch and Laponite. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107*, 1576–1583. [[CrossRef](#)]
21. Xue, J.; Zhong, Q. Blending Lecithin and Gelatin Improves the Formation of Thymol Nanodispersions. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 2956–2962. [[CrossRef](#)]
22. Schneider, L.A.; Korber, A.; Grabbe, S.; Dissemond, J. Influence of PH on Wound-Healing: A New Perspective for Wound-Therapy? *Arch. Dermatol. Res.* **2007**, *298*, 413–420. [[CrossRef](#)]
23. Brown, G.L. Formation of Films from Polymer Dispersions. *J. Polym. Sci.* **1956**, *22*, 423–434. [[CrossRef](#)]
24. Liu, B.; Li, J.; Lei, X.; Miao, S.; Zhang, S.; Cheng, P.; Song, Y.; Wu, H.; Gao, Y.; Bi, L.; et al. Cell-Loaded Injectable Gelatin/Alginate/LAPONITE[®] Nanocomposite Hydrogel Promotes Bone Healing in a Critical-Size Rat Calvarial Defect Model. *R. Soc. Chem.* **2020**, *10*, 25652–25661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Berthet, M.; Gauthier, Y.; Lacroix, C.; Verrier, B.; Monge, C. Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment? *Trends Biotechnol.* **2017**, *35*, 770–784. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Naderi, N.; Karponis, D.; Mosahebi, A.; Seifalian, A.M. Nanoparticles in Wound Healing; from Hope to Promise, from Promise to Routine. *Front. Biosci.-Landmark* **2018**, *23*, 1038–1059. [[CrossRef](#)]
27. Ding, J.; Venkatesan, R.; Zhai, Z.; Muhammad, W.; Nakkala, J.R.; Gao, C. Micro- and Nanoparticles-Based Immunoregulation of Macrophages for Tissue Repair and Regeneration. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *192*, 111075. [[CrossRef](#)]
28. Li, C.; Mu, C.; Lin, W.; Ngai, T. Gelatin Effects on the Physicochemical and Hemocompatible Properties of Gelatin/PAAm/Laponite Nanocomposite Hydrogels. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 18732–18741. [[CrossRef](#)]
29. Nasab, M.E.; Takzaree, N.; Saffaria, P.M.; Partoazar, A. In Vitro Antioxidant Activity and in Vivo Wound-Healing Effect of Lecithin Liposomes: A Comparative Study. *J. Comp. Eff. Res.* **2019**, *8*, 633–643. [[CrossRef](#)]
30. Danaei, M.; Dehghankhold, M.; Ataei, S.; Hasanzadeh Davarani, F.; Javanmard, R.; Dokhani, A.; Khorasani, S.; Mozafari, M.R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics* **2018**, *10*, 57. [[CrossRef](#)]
31. Becher, T.B.; Mendonça, M.C.P.; De Farias, M.A.; Portugal, R.v.; De Jesus, M.B.; Ornelas, C. Soft Nanohydrogels Based on Laponite Nanodiscs: A Versatile Drug Delivery Platform for Theranostics and Drug Cocktails. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2018**, *10*, 21891–21900. [[CrossRef](#)]
32. García-Guzmán, P.; Medina-Torres, L.; Calderas, F.; Bernad-Bernad, M.J.; Gracia-Mora, J.; Marcos, X.; Correa-Basurto, J.; Núñez-Ramírez, D.M.; Manero, O. Rheological Mucoadhesion and Cytotoxicity of Montmorillonite Clay Mineral/Hybrid Microparticles Biocomposite. *Appl. Clay Sci.* **2019**, *180*, 105202. [[CrossRef](#)]
33. López-Angulo, D.; Bittante, A.M.Q.B.; Luciano, C.G.; Ayala-Valencia, G.; Flaker, C.H.C.; Djabourov, M.; José do Amaral Sobral, P. Effect of Laponite[®] on the Structure, Thermal Stability and Barrier Properties of Nanocomposite Gelatin Films. *Food Biosci.* **2020**, *35*, 100596. [[CrossRef](#)]
34. García-Guzmán, P.; Medina-Torres, L.; Calderas, F.; Bernad-Bernad, M.J.; Gracia-Mora, J.; Mena, B.; Manero, O. Characterization of Hybrid Microparticles/Montmorillonite Composite with Raspberry-like Morphology for Atorvastatin Controlled Release. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *167*, 397–406. [[CrossRef](#)]
35. Finotelli, P.V. Microencapsulation of Ascorbic Acid in Maltodextrin and Capsul Using Spray-Drying. In *Proceedings of ENPROMER*; E-Papers Serviços Editoriais: Rio de Janeiro, Brasil, 2016.
36. Yang, J.H.; Lee, S.Y.; Han, Y.S.; Park, K.C.; Choy, J.H. Efficient Transdermal Penetration and Improved Stability of L-Ascorbic Acid Encapsulated in an Inorganic Nanocapsule. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, *24*, 499–503. [[CrossRef](#)]
37. Minjares-Fuentes, R.; Medina-Torres, L.; González-Laredo, R.F.; Rodríguez-González, V.M.; Eim, V.; Femenia, A. Influence of Water Deficit on the Main Polysaccharides and the Rheological Properties of Aloe Vera (*Aloe Barbadosensis* Miller) Mucilage. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *109*, 644–653. [[CrossRef](#)]
38. Blanco-López, M.; González-Garcinuño, Á.; Tabernero, A.; Martín Del Valle, E.M. Steady and Oscillatory Shear Flow Behavior of Different Polysaccharides with Laponite. *Polymers* **2021**, *13*, 2520. [[CrossRef](#)]

39. Liu, P.; Du, M.; Leong, Y.K.; Clode, P.; Liu, J. Spherical Metal Oxides-LAPONITE® Sheets Interactions: Microstructure, Rheology and Thixotropy of Composite Gels. *Appl. Clay Sci.* **2021**, *208*, 106113. [[CrossRef](#)]
40. Vanin, F.M.; Sobral, P.J.A.; Menegalli, F.C.; Carvalho, R.A.; Habitante, A.M.Q.B. Effects of Plasticizers and Their Concentrations on Thermal and Functional Properties of Gelatin-Based Films. *Food Hydrocoll.* **2005**, *19*, 899–907. [[CrossRef](#)]
41. Negrete-Herrera, N.; Putaux, J.L.; David, L.; de Haas, F.; Bourgeat-Lami, E. Polymer/Laponite Composite Latexes: Particle Morphology, Film Microstructure, and Properties. *Macromol. Rapid Commun.* **2007**, *28*, 1567–1573. [[CrossRef](#)]
42. Al-Hassan, A.A.; Norziah, M.H. Starch-Gelatin Edible Films: Water Vapor Permeability and Mechanical Properties as Affected by Plasticizers. *Food Hydrocoll.* **2012**, *26*, 108–117. [[CrossRef](#)]
43. Wihodo, M.; Moraru, C.I. Physical and Chemical Methods Used to Enhance the Structure and Mechanical Properties of Protein Films: A Review. *J. Food Eng.* **2013**, *114*, 292–302. [[CrossRef](#)]
44. Savencu, I.; Iurian, S.; Porfire, A.; Bogdan, C.; Tomuță, I. Review of Advances in Polymeric Wound Dressing Films. *React. Funct. Polym.* **2021**, *168*, 105059. [[CrossRef](#)]
45. Castro, N.; Durrieu, V.; Raynaud, C.; Rouilly, A. Influence of DE-Value on the Physicochemical Properties of Maltodextrin for Melt Extrusion Processes. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *144*, 464–473. [[CrossRef](#)]
46. Vivcharenko, V.; Benko, A.; Palka, K.; Wojcik, M.; Przekora, A. Elastic and Biodegradable Chitosan/Agarose Film Revealing Slightly Acidic PH for Potential Applications in Regenerative Medicine as Artificial Skin Graft. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 172–183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Rubini, K.; Roveri, N. Mechanical and Thermal Properties of Gelatin Films at Different Degree of Crosslinking. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2001**, *22*, 3–8. [[CrossRef](#)]
48. Bergaya, F.; Theng, B.K.G.; Lagaly, G. (Eds.) *Handbook of Clay Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2012; ISBN 9780444533548.
49. Teeranachaideekul, V.; Boonme, P.; Souto, E.B.; Müller, R.H.; Junyaprasert, V.B. Influence of Oil Content on Physicochemical Properties and Skin Distribution of Nile Red-Loaded NLC. *J. Control. Release* **2008**, *128*, 134–141. [[CrossRef](#)]
50. Urbán-Morlán, Z.; Ganem-Rondero, A.; Melgoza-Contreras, L.M.; Escobar-Chávez, J.J.; Nava-Arzaluz, M.G.; Quintanar-Guerrero, D. Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles Containing Cyclosporine by the Emulsification-Diffusion Method. *Int. J. Nanomed.* **2010**, *5*, 611–620. [[CrossRef](#)]
51. Wissing, S.A.; Mü, R.H. The Influence of the Crystallinity of Lipid Nanoparticles on Their Occlusive Properties. *Int. J. Pharm.* **2002**, *242*, 377–379. [[CrossRef](#)]
52. Li, X.; Ma, M.; Ahn, D.U.; Huang, X. Preparation and Characterization of Novel Eggshell Membrane-Chitosan Blend Films for Potential Wound-Care Dressing: From Waste to Medicinal Products. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *123*, 477–484. [[CrossRef](#)]
53. Pan, N.; Qin, J.; Feng, P.; Song, B. Window Screen Inspired Fibrous Materials with Anisotropic Thickness Gradients for Improving Light Transmittance. *Nanoscale* **2019**, *11*, 13521–13531. [[CrossRef](#)]
54. Kaygusuz, H.; Torlak, E.; Akın-Evingür, G.; Özen, İ.; von Klitzing, R.; Erim, F.B. Antimicrobial Cerium Ion-Chitosan Crosslinked Alginate Biopolymer Films: A Novel and Potential Wound Dressing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *105*, 1161–1165. [[CrossRef](#)]
55. Khanlari, S.; Dubé, M.A. Bioadhesives: A Review. *Macromol. React. Eng.* **2013**, *7*, 573–587. [[CrossRef](#)]
56. Waring, M.; Rippon, M.; Bielfeldt, S.; Brandt, M. Cell Attachment to Adhesive Dressings: Qualitative and Quantitative Analysis. *Wounds* **2008**, *4*, 35–47.
57. Blacklow, S.O.; Li, J.; Freedman, B.R.; Zeidi, M.; Chen, C.; Mooney, D.J. Bioinspired Mechanically Active Adhesive Dressings to Accelerate Wound Closure. *Synth Biol.* **2019**, *5*, eaaw3963. [[CrossRef](#)]
58. Arilla, E.; Igual, M.; Martínez Monzó, J.; Codoñer Franch, P.; García Segovia, P. Impact of Resistant Maltodextrin Addition on the Orange Juice. *Foods* **2020**, *1832*, 1832. [[CrossRef](#)]
59. Kong, J.; Yu, S. Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2007**, *39*, 549–559. [[CrossRef](#)]
60. Pálková, H.; Madejová, J.; Zimowska, M.; Serwicka, E.M. Laponite-Derived Porous Clay Heterostructures: II. FTIR Study of the Structure Evolution. *Microporous Mesoporous Mater.* **2010**, *127*, 237–244. [[CrossRef](#)]
61. Hamid-Akash, M.S.; Rehman, K. *Drug Stability and Chemical Kinetics*; Springer: Singapore, 2020; Volume 1, ISBN 9789811564260.
62. Varnik, F.; Baschnagel, J.; Binder, K. Static and Dynamic Properties of Supercooled Thin Polymer Films. *Eur. Phys. J. E* **2002**, *8*, 175–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Sobral, P.J.A.; Habitante, A.M.Q.B. Phase Transitions of Pigskin Gelatin. *Food Hydrocoll.* **2001**, *15*, 377–382. [[CrossRef](#)]
64. Abrusci, C.; Martín-González, A.; Del Amo, A.; Catalina, F.; Bosch, P.; Corrales, T. Chemiluminescence Study of Commercial Type-B Gelatines. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **2004**, *163*, 537–546. [[CrossRef](#)]
65. Ismail, Y.; Mauer, L.J. Phase Transitions of Ascorbic Acid and Sodium Ascorbate in a Polymer Matrix and Effects on Vitamin Degradation. *J. Food Process. Eng.* **2020**, *43*, e13073. [[CrossRef](#)]
66. Nurhadi, B.; Roos, Y.H.; Maidannyk, V. Physical Properties of Maltodextrin de 10: Water Sorption, Water Plasticization and Enthalpy Relaxation. *J. Food Eng.* **2016**, *174*, 68–74. [[CrossRef](#)]
67. Ziderman, I.I.; Gregorski, K.S.; Lopez, S.V.; Friedman, M. Thermal Interaction of Ascorbic Acid and Sodium Ascorbate with Proteins in Relation to Nonenzymatic Browning and Maillard Reactions of Foods. *Food Chem.* **1989**, *37*, 1480–1486. [[CrossRef](#)]
68. Hellio-Serughetti, D.; Djabourov, M. Gelatin Hydrogels Cross-Linked with Bisvinyl Sulfonemethyl. 2. The Physical and Chemical Networks. *Langmuir* **2006**, *22*, 8516–8522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

69. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de Los Estados Unidos Mexicanos, Tomo 1; Undécima*; Secretaria de Salud: Mexico City, Mexico, 2020.
70. Costa, P.; Sousa Lobo, J.M. Modeling and Comparison of Dissolution Profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *13*, 123–133. [[CrossRef](#)]
71. Kalam, M.; Humayun, M.; Parvez, N.; Yadav, S.; Garg, A.; Amin, S.; Sultana, Y.; Ali, A. Release Kinetics of Modified Pharmaceutical Dosage Forms: A Review. *Cont. J. Pharm. Sci.* **2007**, *1*, 30–35.
72. Mulye, N.V.; Turco, S.J. A Simple Model Based on First Order Kinetics to Explain Release of Highly Water Soluble Drugs from Porous Dicalcium Phosphate Dihy Drate Matrices. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1995**, *21*, 943–953. [[CrossRef](#)]
73. Sáez, V.; Hernández, E.; Sanz Angulo, L. Mecanismos de Liberación de Fármaco Desde Materiales Poliméricos. *Rev. Iberoam. Polímeros* **2004**, *5*, 55–70.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.