



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**

**Facultad de Química**

**Escuela de Graduados**

**Programa de Magister en Ciencias con Mención en Química**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE ALGINATO TIOLADO S-  
PROTEGIDO CON CARACTERÍSTICAS MUCOADHESIVAS  
MEJORADAS**

**Tesis para optar al título de Magister en Ciencias c/m Químicas**

**POR: LAURA RAQUEL MACKAYA NAVARRO**

**Profesor guía: DR. VÍCTOR HAROLDO CAMPOS REQUENA**

**Concepción, Chile 2020**

## DERECHOS DE AUTOR

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



## AGRADECIMIENTOS

A proyecto FONDECYT 1190523 por el financiamiento.

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

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

Al Dr. Andreas Bernkop-Schnürch y su equipo del centro de Química y Biomedicina de la Universidad de Innsbruck, Austria, por la recepción en el Departamento de Tecnología Farmacéutica y su contribución desinteresada en la realización de gran parte experimental de la investigación.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	11
<b>SUMMARY</b>	12
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	13
1.1. Biopolímeros	13
1.2. Tiómeros	14
1.3. Alginato	15
1.4. Tiómeros S-protegidos	18
<b>2. HIPÓTESIS</b>	22
<b>3. OBJETIVOS</b>	22
3.1. Objetivo general	22
3.2. Objetivos específicos	22
<b>4. MATERIALES Y METODOLOGÍA</b>	23
4.1 Materiales	23
4.2. Síntesis de ligando S-protegido a base L-cisteína y N-acetil-L-cisteína	24
4.3. Síntesis de tiómero de alginato con L-cisteína S-protegida	24
4.4. Caracterización de tiómero de alginato con L-cisteína S-protegida	25
4.4.1. Determinación de grupos tiol	25
4.4.2. Determinación de enlaces disulfuro	27
4.4.3. Determinación de grupos amino primarios	28



4.5. Extracción y purificación mucosa porcina	29
4.6. Análisis reológico de mucoadhesión <i>in vitro</i>	30
4.7. Fabricación de tabletas de tíómeros S-protegidos	30
4.8. Ensayo de mucoadhesión mediante cilindro rotatorio	31
4.9. Ensayo de absorción de agua para tíómeros S-protegidos	31
4.10. Ensayo de toxicidad celular de tíómeros S-protegidos	32
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>33</b>
5.1. Obtención de tíómeros S-protegidos	33
5.2. Caracterización de tíómeros S-protegidos	34
5.3. Análisis reológico de tíómeros S-protegidos	36
5.4. Ensayo de absorción de agua para tíómeros S-protegidos	38
5.5. Ensayos de mucoadhesión <i>ex vivo</i> para tíómeros S-protegidos	41
5.6. Ensayo de toxicidad celular para tíómeros S-protegidos	44
<b>6. CONCLUSIONES</b>	<b>46</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>48</b>

## INDICE DE TABLAS

**Tabla 1:** Tiómeros S-protegidos preparados para el estudio a partir de dos tipos de alginato y dos concentraciones iniciales de ligando S-protegido. 24



## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Mecanismo de mucoadhesión entre polímero tiolado y capa de mucina debido a la formación de enlaces disulfuro. 14
- Figura 2:** Características estructurales del alginato: a) monómeros del alginato, b) conformación de la cadena, c) distribución de los bloques G y M. 16
- Figura 3.** Reacción de tiolación de alginato con L-cisteína mediado por carbodiimida. 17
- Figura 4.** Esquema de protección de grupos tiol de L-cisteína con ligando S-protector ácido 2-mercaptonicotínico (MNA). 18
- Figura 5.** Tiómero tradicional y tiómero preactivado o S-protegido. (a) Tiómero tradicional de ácido hialurónico-L-cisteína, y (b) tiómero preactivado o S-protegido de ácido hialurónico-MNA-L-cisteína. 19
- Figura 6.** Síntesis de ligando S-protegido a base de L-cisteína y N-acetil-L-cisteína. 20
- Figura 7.** Síntesis del tiómero de alginato S-protegido con ligando L-cisteína y N-acetil-L-cisteína. 21

<b>Figura 8:</b> Muestras de tíómeros S-protegidos obtenidos tras la síntesis, diálisis, liofilización y prensado.	33
<b>Figura 9.</b> Determinación de grupos tiol (-SH) en tíómeros de alginato S-protegidos ( $n = 3$ ).	35
<b>Figura 10.</b> Determinación enlaces disulfuro (S-S) en tíómeros de alginato S-protegidos ( $n = 3$ ).	35
<b>Figura 11.</b> Determinación de grupos amino primarios en tíómeros de alginato S-protegidos ( $n = 3$ ).	36
<b>Figura 12.</b> Determinación de (a) módulo elástico ( $G'$ ), módulo viscoso ( $G''$ ) y (b) viscosidad para tíómeros S-protegidos de alginato de sodio.	37
<b>Figura 13.</b> Determinación de (a) módulo elástico ( $G'$ ), módulo viscoso ( $G''$ ) y (b) viscosidad para tíómeros S-protegidos de ácido algínico.	38
<b>Figura 14.</b> Determinación de absorción de agua para alginato de sodio tiolado y sin modificar ( $n = 3$ ).	39
<b>Figura 15.</b> Determinación de absorción de agua para ácido algínico tiolado y sin modificar ( $n = 3$ ).	40



<b>Figura 16:</b> Muestras de tabletas de tíómeros S-protegidos en ensayo de mucoadhesión en cilindro rotatorio.	41
<b>Figura 17.</b> Ensayo de mucoadhesión <i>ex vivo</i> de tabletas de tíómeros S-protegidos a base de alginato de sodio ( $n = 4$ ).	41
<b>Figura 18.</b> Ensayo de mucoadhesión <i>ex vivo</i> de tabletas de tíómeros S-protegidos a base de ácido algínico ( $n = 4$ ).	42
<b>Figura 19.</b> Test de toxicidad celular para tíómeros S-protegidos a base de alginato de sodio ( $n = 3$ ).	44
<b>Figura 20.</b> Test de toxicidad celular para tíómeros S-protegidos a a base de ácido algínico ( $n = 3$ ).	44



## ABREVIATURAS

-SH	Grupos tiol
-S-S-	Enlaces disulfuro
EDAC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
MEM	Control positivo ensayo toxicidad celular
TRITON	Control negativo ensayo toxicidad celular
MNA	Ácido 2-mercaptonicotínico
NAC	N-acetil-L-cisteína
NHS	N-hidroxisuccinimida
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfónico
TRIS	2-amino-2(hidroximetil)-1,3-propanediol
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
G'	Módulo de almacenamiento
G''	Módulo de pérdida
$\eta$	Viscosidad dinámica
Caco-2	Células de carcinoma colorrectal humano
mbar	Milibar
mg	Mili gramos
mL	Mili litros
mM	Mili molar
nm	Nanómetros
$\mu$ L	Micro litros

## RESUMEN

Se sintetizó un tiómero de nueva generación S-protégido (preactivado) a partir del biopolímero alginato y un ligando a base de L-cisteína protegido con N-acetil-L-cisteína con el fin de obtener un polímero con propiedades mucoadhesivas mejoradas. Este tiómero se caracterizó mediante ensayos espectrofotométricos para cuantificar la cantidad de grupos tiol (-SH) y enlaces disulfuro (-S-S-) en el tiómero obteniendo como máximo para ambos análisis  $35.48 \pm 1,79$  y  $546.93 \pm 58.27$   $\mu\text{mol/g}$  polímero respectivamente. Además, se cuantificó los grupos amino primarios (L-cisteína no unida a la cadena polimérica) obteniendo un máximo de  $78,14 \pm 2,94$   $\mu\text{mol/g}$  de polímero lo que indica indirectamente el éxito de la unión del ligando protegido al polímero. En las pruebas de absorción de agua, tanto las tabletas de polímero como las tabletas de tiómeros, presentaron un aumento en su masa de al menos un 500%. Se realizaron pruebas de mucoadhesión *ex vivo* con mucosa intestinal de porcino simulando un ambiente gastrointestinal donde las tabletas de tiómero permanecieron adheridas a la mucosa un tiempo de  $70 \pm 4$  h en promedio lo cual mostró ser significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) comparado con  $5 \pm 1$  h del polímero sin modificar. Finalmente se analizó la toxicidad celular del tiómero comparado con el polímero puro por medio de un test de toxicidad con resazurina, en donde se obtuvo que tanto el polímero sin modificar como el tiómero no presentan un riesgo para la viabilidad celular al no mostrar diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) respecto al control.

## SUMMARY

A new generation S-protected (pre-activated) thiomers was synthesized from alginate biopolymer and a ligand based on L-cysteine protected with N-acetylcysteine in order to obtain a polymer with improved mucoadhesive properties. This thiomers was characterized by spectrophotometric tests to quantify the amount of thiol groups ( $-SH$ ) and disulfide bonds ( $-S-S-$ ) in the thiomers, obtaining a maximum of  $35.48 \pm 1.79$  y  $546.93 \pm 58.27$   $\mu\text{mol/g}$  polymer respectively for both analyzes. Furthermore, primary amino groups were determined (unbound L-cysteine) obtaining a maximum of  $78.14 \pm 2.94$   $\mu\text{mol/g}$  of polymer, which gives an indirect confirmation of the immobilization of the S-protected ligand to the polymer backbone. Evaluation of the swelling behavior, the polymer tablets and the thiomers tablets showed an increase of at least 500% in weight. *Ex vivo* mucoadhesion tests were performed with porcine intestinal mucosa simulating a gastrointestinal environment where thiomers tablets remained adhered to the mucosa for a mean of  $70 \pm 4$  h, which showed a significant difference ( $p < 0.05$ ) compared to  $5 \pm 1$  h of the unmodified polymer. Finally, the cellular toxicity of the thiomers and unmodified polymer was analyzed by a test with resazurin, where it was obtained that both the unmodified polymer and the thiomers did not present a significative risk for cell viability ( $p > 0.05$ ) compared the control.

## 1. INTRODUCCION

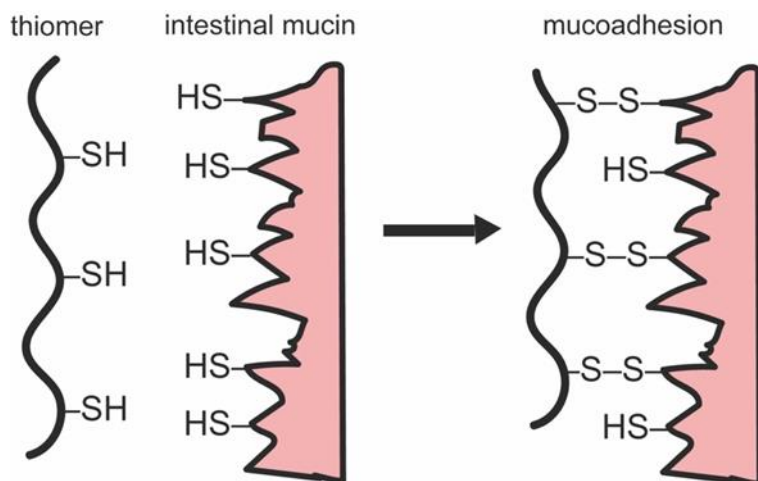
### 1.1. Biopolímeros

En las últimas dos décadas los biopolímeros han recibido gran atención debido a su potencial aplicación para reducir y/o reemplazar a los polímeros sintéticos a base de petróleo en diferentes campos, como, por ejemplo, el uso de películas de biopolímeros para barreras selectivas en transferencia de humedad, absorción de oxígeno, oxidación de lípidos y las pérdidas de aromas en materiales de empaque (Alboofetileh et al 2013). Otro potencial uso es en el área farmacéutica, en donde pueden ser utilizados como portadores de fármacos para liberación a velocidad controlada y hasta dirigirse a una determinada ubicación en el cuerpo como, por ejemplo, la mucosa intestinal donde se absorbe la mayoría de los fármacos (Iliescu et al., 2014).

Se ha buscado mejorar las propiedades mucoadhesivas de estos materiales poliméricos a través de diversos métodos, sin embargo, la mayoría de estos sistemas basa sus propiedades mucoadhesivas en la formación de interacciones no covalentes, como enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones iónicas entre el biopolímero y la mucosa. Estas interacciones son moderadamente débiles por lo que no se puede asegurar la localización de las formas de dosificación de manera prolongada en el tiempo en el sitio de absorción (Bernkop-Schnürch et al., 2001).

## 1.2. Tiómeros

La tiolación es uno de los enfoques generalmente aceptados para mejorar la propiedad de mucoadhesión tanto de polímeros naturales como sintéticos (Naveen et al., 2018). Los polímeros tiolados o tiómeros, son polímeros en los cuales se ha inmovilizado grupos tiol o sulfhidrilo ( $-SH$ ) en sus cadenas laterales. Las propiedades mucoadhesivas de los tiómeros son debidas a la imitación del mecanismo natural de la mucoadhesión el cual consiste en la unión covalente del polímero a la capa mucosa mediante la formación de enlaces disulfuro ( $-S-S-$ ) entre ambos. Estos enlaces disulfuro se producen entre los residuos de tiol del tiómero y los residuos tiol de los subdominios del mucus rico en cisteína, produciéndose una reacción de oxidación simple (Figura 1).



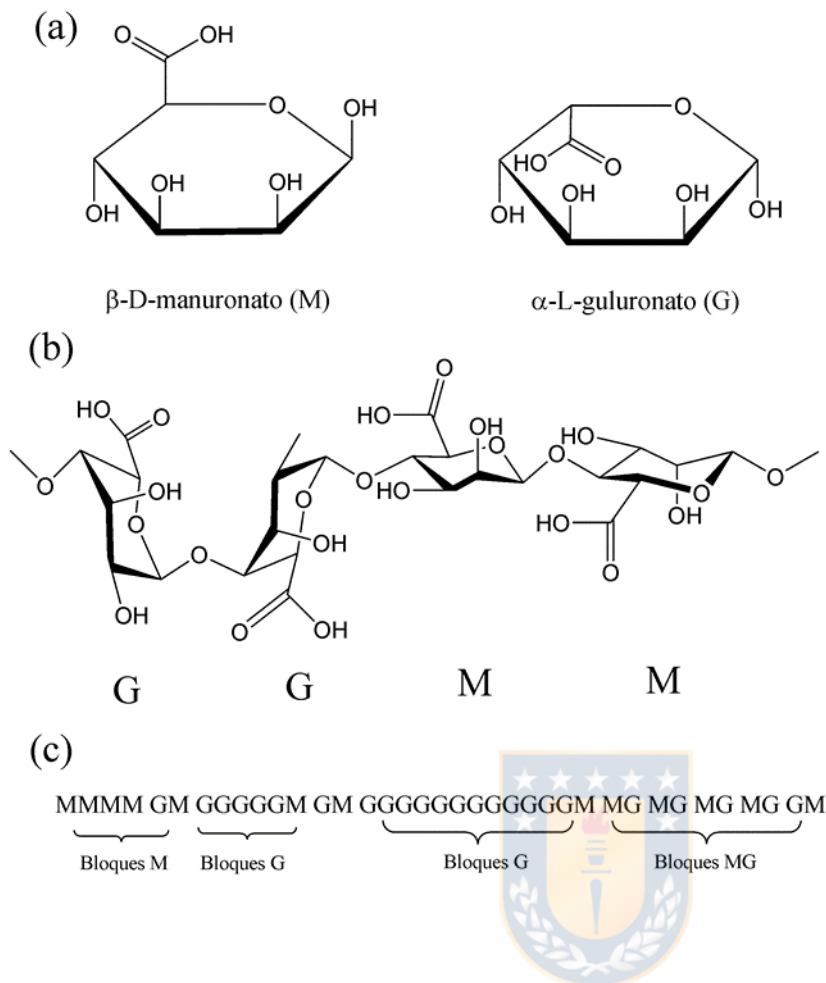
**Figura 1:** Mecanismo de mucoadhesión entre un tiómero y la capa de mucina debido a la formación de enlaces disulfuro (Naveen et al., 2018).

De esta manera, la mucoadhesión aumenta considerablemente en comparación con los portadores ausentes de los residuos que contienen tiol y que producen únicamente enlaces no covalentes (Laffleur et al., 2017). Debido a esta unión de tipo covalente, las propiedades mucoadhesivas de los tíómeros pueden llegar a ser hasta 140 veces mayor con respecto al polímero sin modificar (Bernkop-Schnürch, 2005). Muchos polímeros han sido estudiados como base para la producción de tíómeros: quitosano (Schmitz et al., 2007), ácido poli(acrílico) (Campos-Requena y Gómez 2018; Leitner et al, 2003), poli(alilamina) (Duggan et al, 2016), entre otros.

### 1.3. Alginato



El alginato es un biopolímero natural que se extrae de las algas. Se compone principalmente de unidades de ácido  $\beta$ -D-manurónico enlazadas y unidades de ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (Figura 2) (Alboofetileh et al 2013). Es el único polisacárido que naturalmente contiene grupos carboxilo en cada residuo constituyente (Abdollahi et al., 2013) los que pueden reaccionar con compuestos que contengan en su estructura grupos amino y de esta manera formar enlaces tipo amida (Bernkop-Schnurch et al., 2003).



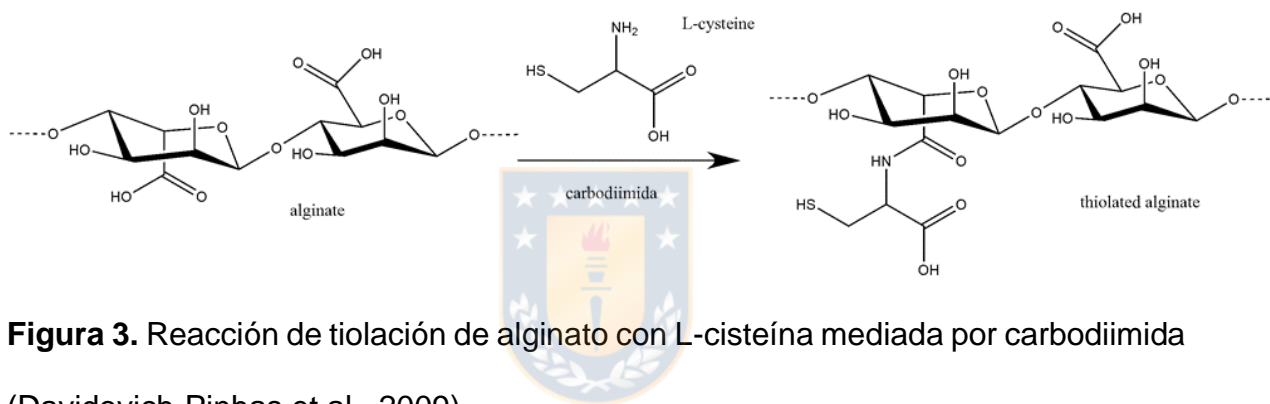
**Figura 2:** Características estructurales del alginato: a) monómeros del alginato, b) conformación de la cadena, c) distribución de los bloques G y M (Draget y Smidsrod, 2005).

El alginato es de gran interés como potencial componente de películas o recubrimientos debido a sus propiedades espesantes, estabilizantes, de suspensión, formadoras de películas, productoras de gel y estabilizadoras de emulsión (Rhim 2004). Su gama de excelentes propiedades, como la no toxicidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad, ha llevado a su uso en muchas áreas, como



alimentos, aditivos farmacéuticos, biología o portadores de enzimas, materiales de ingeniería de tejidos, etc. (Abdollahi et al., 2013).

Se pueden desarrollar tómeros de alginato por medio de la reacción con L-cisteína para así unir covalentemente grupos  $-SH$  (Figura 3) (Bernkop-Schnurch et al., 2003). La tiolación de alginato ofrece características importantes con respecto a la cohesión, adherencia y estabilidad (Kumar y Sinha, 2013).

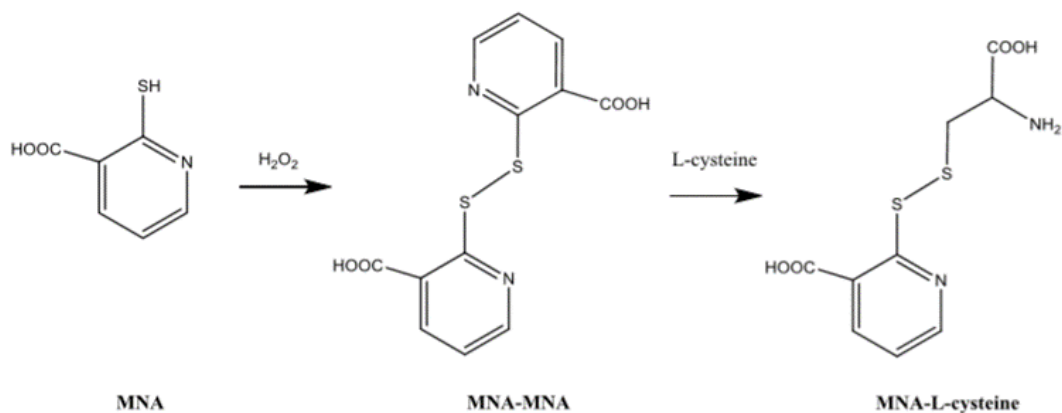


**Figura 3.** Reacción de tiolación de alginato con L-cisteína mediada por carbodiimida (Davidovich-Pinhas et al., 2009).

A pesar de las ventajas de los tómeros en lo que respecta a sus propiedades mucoadhesivas mejoradas, estos presentan problemas con su estabilidad debido a que los grupos tiol son altamente susceptibles a la oxidación (Bonengel et al., 2014). Esta oxidación demasiado temprana de los grupos tiol antes de entrar en contacto con la capa de mucus podría disminuir las interacciones de adhesión entre el tómero y la capa de mucus, lo que da como resultado una eficacia reducida de los tómeros (Iqbal et al., 2011).

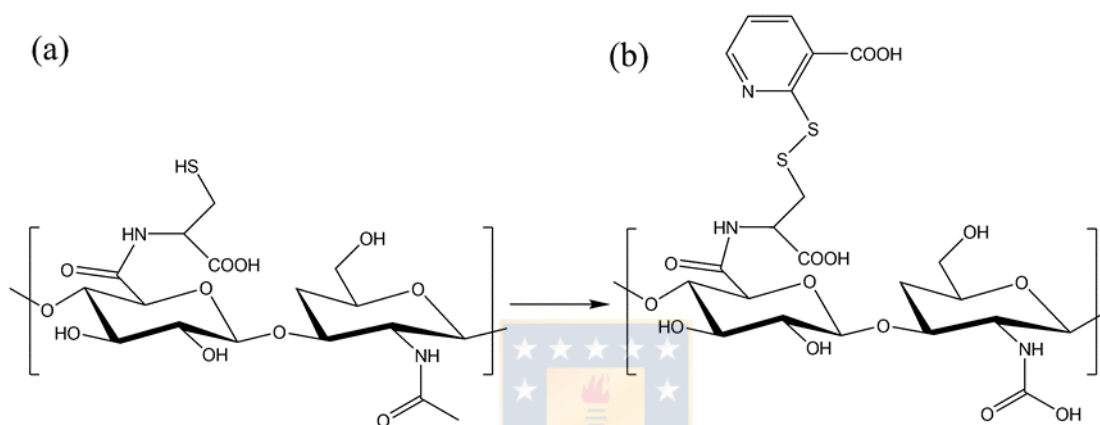
#### 1.4. Tímeros S-protegidos

Con el fin de mejorar las desventajas de los polímeros tiolados se ha introducido una nueva generación de polímeros mucoadhesivos, los tímeros preactivados o S-protegidos. Estos fueron creados para superar los inconvenientes de los tímeros clásicos, como la oxidación demasiado temprana de los grupos tiol, la reactividad dependiente del pH y, por tanto, mejorar su mucoadhesión (Hauptstein et al., 2015). Para proteger los grupos tiol de las reacciones de oxidación no controladas, se protegen estos grupos formando enlaces disulfuro con un agente (ligando S-protector) que contiene también grupos tiol y por tanto forman enlace disulfuro entre ellos. Este enlace disulfuro entre el tímero y el ligando S-protector una vez en el sitio de acción se escinde dejando expuesto nuevamente los grupos tiol para su adhesión con la mucosa (Bonengel et al., 2014).



**Figura 4.** Esquema de protección de grupos tiol de L-cisteína con ligando S-protector ácido 2-mercaptopyridínico (MNA) (Pereira et al., 2020).

El concepto de tímeros preactivados o S-protegidos se basa en la formación de un enlace covalente disulfuro entre el grupo tiol del tímero con el grupo tiol de un agente S-protector (Figura 4). Por lo tanto, si los grupos tiol del tímero se cambian completamente en enlaces disulfuros, se preservarán de la oxidación (Figura 5).

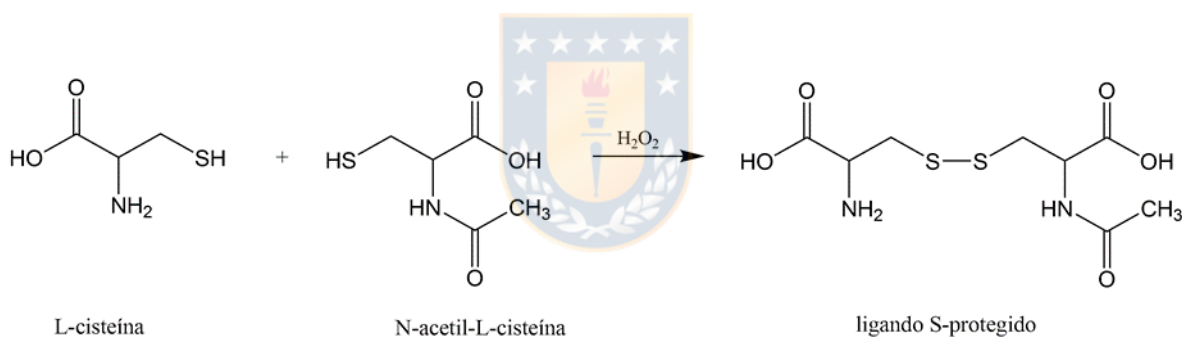


**Figura 5.** Tímero tradicional y tímero preactivado o S-protegido. (a) Tímero tradicional de ácido hialurónico-L-cisteína, y (b) tímero preactivado o S-protegido de ácido hialurónico-MNA-L-cisteína (Pereira et al.,2020).

De esta manera, los polímeros tiolados preactivados muestran mayor estabilidad en soluciones acuosas, presencia de oxígeno, en un amplio rango de pH, presentando así una gran ventaja en comparación con los tímeros clásicos de primera generación. Además, en base a consideraciones teóricas, los tímeros preactivados son aún más reactivos con la mucosa que los tímeros de primera generación (Perroné et al., 2018), su reactividad con el mucus y, en consecuencia, sus

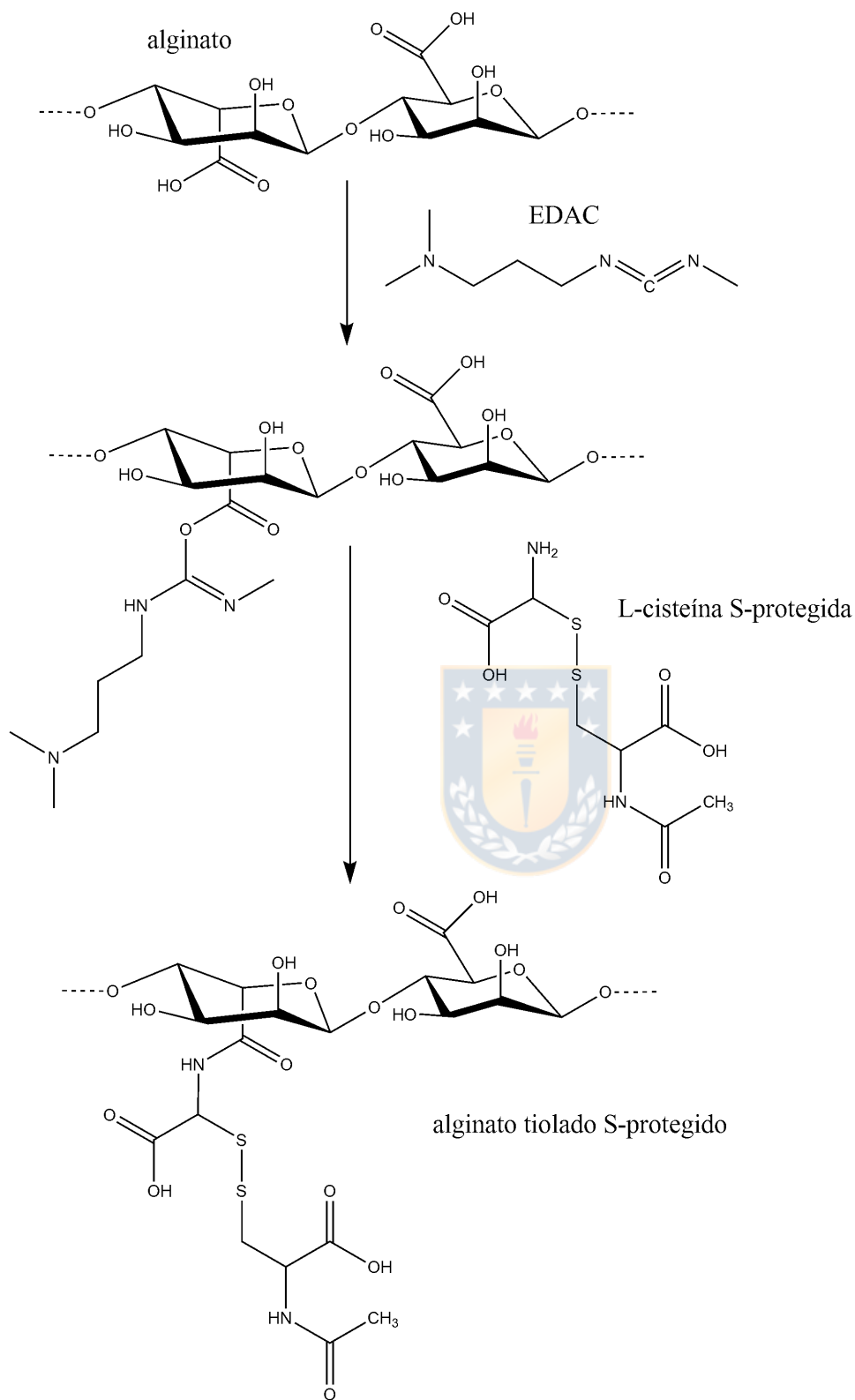
propiedades mucoadhesivas pueden mejorarse considerablemente (Perroné et al., 2017).

La protección de los grupos tiol se ha realizado hasta el momento de la presente investigación solo con el ligando S-protector ácido 2-mercaptónico (MNA) (Figura 4) (Pereira et al., 2020). En este presente estudio se realizará una metodología utilizando N-acetil-L-cisteína (NAC) y L-cisteína como ligando siendo una alternativa al MNA para proteger los grupos tiol inmovilizados en la cadena de alginato (Figura 6). Una vez obtenido el agente S-protegido se procederá a su inmovilización en la cadena polimérica del alginato resultando el tiómero de alginato S-protegido (Figura 7).



**Figura 6.** Síntesis de ligando S-protegido a base de L-cisteína y N-acetil-L-cisteína.

De esta manera, este estudio pretende modificar el alginato en un polímero tiolado preactivado o S-protegido, con un alto grado de modificación, mejorando su estabilidad, sus propiedades mucoadhesivas y sin efectos de toxicidad celular.



**Figura 7.** Síntesis del tiómero de alginato S-protegido con ligando L-cisteína y N-acetil-L-cisteína.

## 2. HIPÓTESIS

Utilizando una nueva metodología de protección de grupos tiol en tíómeros a base de N-acetil-L-cisteína, es posible mejorar la capacidad mucoadhesiva del alginato tiolado con L-cisteína.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general:

Sintetizar tíómeros preactivados o S-protegidos de nueva generación a base de alginato con L-cisteína S-protegida con N-acetil-L-cisteína, aumentando así sus propiedades mucoadhesivas.



### 3.2. Objetivos específicos:

- 1) Sintetizar un polímero tiolado S-protegido, a partir de alginato de sodio y ácido algínico.
- 2) Caracterizar tíómeros preactivados sintetizados mediante la cuantificación de enlaces disulfuro, grupos tiol y grupos amino primario en la cadena polimérica.
- 3) Realizar pruebas de mucoadhesión *in vitro* con mucina intestinal porcina mediante reología.
- 4) Hacer pruebas de mucoadhesión *ex vivo* con mucosa intestinal porcina para el tíómero preactivados.
- 5) Realizar ensayo de toxicidad celular en los tíómeros preactivados obtenidos.

## 4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 4.1. Materiales

Alginato de sodio (AS) (CAS W201502); ácido algínico (AA) (CAS 180947) ; N-acetil-L-cisteína (NAC); L-cisteína; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida clorhidrato (EDAC); ácido 2,4,6-trinitrobenzenesulfónico (TNBS); ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (Reactivo de Ellman); *N*-hidroxisuccinimida (NHS); 2-amino-2(hidroxiometil)-1,3-propanediol (TRIS); dihidrógeno fosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>); hidrogenofosfato de disodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>); borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>); ácido clorhídrico (HCl); peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); membrana tubo de diálisis MWCO (corte de peso molecular) 3.5 kDa; resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-una sal de sodio) y Triton™ X-100 fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Austria. Células de carcinoma colorrectal humano (Caco-2) fueron adquiridas por la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, Agencia de Protección de la Salud, Reino Unido). Medio de cultivo celular formado de polvo MEM 9.66 g/L (modificado con sales de Earle, rojo fenol, 19 aminoácidos y los aminoácidos no esenciales L-asp, L-asn, L-glu, L-ser, L-ala, L-gly y L-pro), 2.2 g/L de bicarbonato de sodio, L-glutamina 2 mmol/L, solución de penicilina-estreptomicina al 1% y suero fetal bovino (FBS) al 10%; FBS y solución salina tamponada con fosfato (PBS) 100 mmol/L se adquirieron de Gibco (Invitrogen, Lofer, Austria).

## 4.2. Síntesis de ligando S-protegido a base L-cisteína y N-acetil-L-cisteína

En un vaso de precipitado se mezclan L-cisteína y NAC en igual proporción y se ajusta el pH a 8.2 con NaOH (5.0 mol/L). Luego se agrega 50 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% v/v y se ajusta nuevamente el pH a 8.5 para dejar luego en agitación por 3 h. Se adiciona HCl para ajustar el pH a 7.5 garantizando la precipitación de la cisteína S-protegida. Se filtra la solución y congela a -20°C para luego liofilizar a 0,016 mbar (Christ Alpha 1-4 LSC).

## 4.3. Síntesis de tiómero de alginato con L-cisteína S-protegida

Para la síntesis de tiómero se evaluarán dos tipos de alginato (forma ácida y sódica) partiendo de dos concentraciones iniciales de ligando S-protegido (2.0 y 4.5 g), obteniéndose 4 tipos de tiómeros S-protegidos a evaluar, tal como se describe en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Tiómeros S-protegidos preparados para el estudio, a partir de dos tipos de alginato y dos concentraciones de ligando S-protegido.

Tipo de alginato	Cantidad de ligando S-protegido inicial	
	2.0 g	4.5 g
Alginato sódico	AS-2.0G	AS-4.5G
Ácido alginico	AA-2.0G	AA-4.5G



Se hidratan 2 g del polímero en 800 mL agua desionizada y se lleva a agitación por 3 h. Se ajusta el pH a 5.5 con HCl (5.0 mol/L) y se agrega EDAC (150 mmol/L) y NHS (40 mmol/L). Se ajusta nuevamente el pH a 5.5 con HCl (1.0 mol/L). Luego se agrega el ligando liofilizado obtenido en la sección 4.2. de acuerdo con las cantidades informadas en la Tabla 1 y se ajusta el pH a 7 para dejar en agitación de 16 a 18 h. Finalmente se dializa por 5 días en tubos de diálisis (MWCO 3.5 kDa) contra agua destilada, se congela a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se liofiliza a 0,016 mbar (Christ Alpha 1–4 LSC). Los tímeros obtenidos se nombran de acuerdo con el tipo de alginato usado y la concentración de ligando S-protegido tal como se indica en la Tabla 1.

#### **4.4. Caracterización de tímero de alginato con L-cisteína S-protegida**

##### *4.4.1. Determinación de grupos tiol*

La inmovilización de grupos tiol libres en el esqueleto del tímero S-protegido se determinó espectrofotométricamente por medio del ensayo de Ellman cuantificando directamente los grupos tiol libres con ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (Reactivo de Ellman) (Laffleur et al., 2017).

Para la preparación del buffer se mezclan 4,75 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 77,04 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en 500 mL de agua destilada, luego se ajusta el pH 8.0 con NaOH 5.0 mol/L.

Para la preparación del reactivo de Ellman se masan 3.0 mg de ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) y se disuelven en 10 mL del buffer fosfato.

Para cuantificar los grupos tiol de las muestras, se realiza una curva de calibración a base de L-cisteína clorhidrato. Para esto se disuelve 1.0 mg cisteína-HCl en 1 mL

de buffer fosfato pH 8 (solución stock), y se preparan seis puntos de la curva de acuerdo a:

**A** 50  $\mu\text{L}$  solución stock + 950  $\mu\text{L}$  buffer fosfato

**B** 500  $\mu\text{L}$  solución A + 500  $\mu\text{L}$  buffer fosfato

**C** 500  $\mu\text{L}$  solución B + 500  $\mu\text{L}$  buffer fosfato

**D** 500  $\mu\text{L}$  solución C + 500  $\mu\text{L}$  buffer fosfato

**E** 500  $\mu\text{L}$  solución D + 500  $\mu\text{L}$  buffer fosfato

**F** 500  $\mu\text{L}$  solución E + 500  $\mu\text{L}$  buffer fosfato

Se descarta 500  $\mu\text{L}$  de cada muestra de la curva, para igualar volúmenes con las muestras de polímero.

Para cada muestra y punto de la curva de calibración se realiza el siguiente procedimiento:



1) Se pesa 1.0-2.0 mg del polímero y se agrega 500  $\mu\text{L}$  de solución buffer fosfato dejando reposar durante 30 minutos.

2) Para cada muestra de polímero incluida la curva, se agrega 500  $\mu\text{L}$  del reactivo de Ellman (preparado el mismo día).

3) Se agita la muestra y se incuba protegida de la luz a temperatura ambiente (20°C) durante 90-120 minutos.

4) Se centrifuga la muestra por 5 min.

5) Se mide la muestra a 450 nm utilizando un espectrofotómetro M-200 Spectrometer; Tecan Infinite® (Austria)

#### 4.4.2 Determinación de enlaces disulfuro

Este análisis se emplea para determinar la cantidad total de enlaces disulfuro presentes en el tímero S-protegido (Iqbal et al., 2010). Primero se prepara una solución buffer TRIS pesando 0.788 g TRIS HCl y llevando a un volumen de 100 mL con agua destilada, ajustando el pH a 7.6. Luego se prepara un buffer fosfato pH 8 mezclando 9.5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 154.08 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ , llevando a 500 mL con agua destilada.

Los enlaces disulfuro se determinan de manera indirecta transformando todos los grupos  $-\text{S}-\text{S}-$  del tímero a grupos tiol  $-\text{SH}$  reduciéndolos con  $\text{NaBH}_4$ . Luego se determinan los grupos tiol totales por método de Ellman (sección 4.4.1) y a estos grupos tiol totales se les resta los grupos tiol determinados originalmente en la sección 4.4.1.

Para esto se masan primero 4 mg de reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico)) y se disuelve en 1 mL de buffer fosfato. Se hace una curva de calibración a base de L-cisteína masando 1 mg cisteína-HCl en 1 mL de buffer TRIS (Solución stock) y partir de esta se hacen 6 puntos de la curva de acuerdo a:

**A** 100  $\mu\text{L}$  solución stock + 900  $\mu\text{L}$  buffer TRIS

**B** 500  $\mu\text{L}$  solución A + 500  $\mu\text{L}$  buffer TRIS

**C** 500  $\mu\text{L}$  solución B + 500  $\mu\text{L}$  buffer TRIS

**D** 500  $\mu\text{L}$  solución C + 500  $\mu\text{L}$  buffer TRIS

**E** 500  $\mu\text{L}$  solución D + 500  $\mu\text{L}$  buffer TRIS

**F** 500  $\mu\text{L}$  solución E + 500  $\mu\text{L}$  buffer TRIS

Se descarta 500  $\mu\text{L}$  de cada muestra de la curva, para igualar volúmenes con las muestras de polímero.

Para las muestras y los puntos de la curva de calibración se realiza el siguiente procedimiento:

1. Pesar 1.0-2.0 mg de polímero en tubos Falcon de 15 mL y agregar 500  $\mu$ L de buffer TRIS. Esperar 30 min la hidratación del polímero.
2. Para las muestras y curva, agregar 1 mL  $\text{NaBH}_4$  (4%).
3. Incubar en un baño a 37°C bajo agitación lenta por 1h.
4. Agregar cuidadosamente bajo campana 250  $\mu$ L de HCl 5.0 mol/L, para terminar la reacción de reducción.
5. Agregar 1.0 mL de Buffer fosfato 1.0 mol/L seguido de 250  $\mu$ L de solución de reactivo de Ellman 4%.
6. Dejar en oscuridad durante 90-120 minutos y centrifugar por 2 min a 900 rpm.
7. Medir a 450 nm utilizando un espectrofotómetro M-200 Spectrometer; Tecan Infinite® (Austria).

#### *4.4.3. Determinación de grupos amino primarios*

Para cuantificar la L-cisteína libre no unida en el polímero o no protegida por NAC, se cuantificaron los grupos amino primarios a través del ensayo con el reactivo TNBS, el cual permite conocer la correlación directa con la L-cisteína no unida, mediante un análisis espectrofotométrico (Hombach et al., 2008).

Primero se prepara el reactivo TNBS-Lsg mezclando 200  $\mu$ L reactivo TNBS con 9.8 mL  $\text{NaHCO}_3$  8%. Luego se prepara una curva de calibración de L-cisteína clorhidrato a partir de una solución stock de 1 mg cisteína-HCl en 1 mL de solución NaCl 5%, y de estas se preparan 6 puntos de curva de acuerdo a:

**A** 50  $\mu\text{L}$  solución stock + 950  $\mu\text{L}$  solución NaCl 5%

**B** 500  $\mu\text{L}$  solución A + 500  $\mu\text{L}$  solución NaCl 5%

**C** 500  $\mu\text{L}$  solución B + 500  $\mu\text{L}$  solución NaCl 5%

**D** 500  $\mu\text{L}$  solución C + 500  $\mu\text{L}$  solución NaCl 5%

**E** 500  $\mu\text{L}$  solución D + 500  $\mu\text{L}$  solución NaCl 5%

**F** 500  $\mu\text{L}$  solución E + 500  $\mu\text{L}$  solución NaCl 5%

Se descarta 500  $\mu\text{L}$  de cada muestra de la curva, para igualar volúmenes con las muestras de polímero.

Para el ensayo se procede de la siguiente forma tanto para las muestras como para los puntos de la curva de calibración:

- 1) Agregar 500  $\mu\text{L}$  TNBS-Lsg.
- 2) Incubar por 90 min a 37°C.
- 3) Centrifugar las muestras durante 5 minutos.
- 4) Medir a 450 nm utilizando un espectrofotómetro M-200 Spectrometer; Tecan Infinite® (Austria).



#### **4.5. Extracción y purificación de mucosa porcina**

Se utilizaron intestinos de cerdo de un matadero (Götzens, Austria), los cuales se enjuagaron y cortaron para extraer suavemente la mucosa desde el interior mediante una espátula, evitando romper el intestino (extracción a temperatura ambiente). Esta se congela hasta su purificación. En la purificación se utiliza la mucosa extraída, la cual se mezcla con una solución de NaCl (0.1 mol/L), se agita por 1 h a 4°C (sumergida en un baño de hielo), posteriormente se centrifuga por 2

h a 9000 rpm, se descarta el sobrenadante, repitiendo 2 veces el proceso de purificación. Finalmente se congela la muestra hasta su posterior uso (Hauptstein et al., 2015).

#### **4.6. Análisis reológico de mucoadhesión *in vitro***

Se realizaron pruebas oscilatorias dinámicas para los polímeros en un reómetro de plato-plato, controlado termostáticamente (Thermo Scientific™ HAAKE™ MARS™, Alemania) para alícuotas de 1000  $\mu\text{L}$  (500  $\mu\text{L}$  polímeros 2% disueltos en buffer fosfato pH 8.0 (0.1 mol/L) y 500  $\mu\text{L}$  de mucosa intestinal purificada). El polímero y la mucosa se mezclaron en pocillos y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. El análisis se realizó a una frecuencia de 1 Hz (región viscoelástica lineal). A lo largo del período experimental la temperatura de la placa se mantuvo a 37 °C y un espacio de geometría de 0,5 mm. Los parámetros obtenidos fueron el módulo elástico ( $G'$ ), el módulo viscoso ( $G''$ ) y la viscosidad dinámica ( $\eta$ ) (Hombach et al., 2008).

#### **4.7. Fabricación de tabletas de tíómeros S-protegidos**

Los tíómeros S-protegidos de alginato liofilizado y alginato no modificado, se comprimieron en tabletas de cara plana de 30.0 mg y 5.0 mm de diámetro en una prensa excéntrica de un solo golpe (Paul Weber, Innsbruck, Austria). La presión de compactación se mantuvo constante durante 30 s (11 kN) (Mueller et al., 2011).

#### **4.8. Ensayo de mucoadhesión mediante cilindro rotatorio**

Las tabletas de tíómeros S-protegidos y de alginato sin modificar se unieron a la mucosa intestinal porcina recién extirpada, fijada a un cilindro de acero inoxidable con pegamento de cianoacrilato (Loctite, Innsbruck, Austria). El cilindro se sumerge en el aparato de disolución (Erweka Light, Alemania) que contiene tampón fosfato a pH 6.8 y 37°C. La velocidad del cilindro se ajustó a 100 rpm. El desprendimiento, la desintegración y la erosión de las tabletas se registró durante 72 h a través de una cámara filmadora. Esta prueba se realizó por cuatuplicado (Mueller et al., 2011).

#### **4.9. Ensayo de absorción de agua para tíómeros S-protegidos**

La capacidad de absorción de agua del tíómero S-protegido se determinó por método gravimétrico. Las tabletas (30 mg) de alginato sin modificar y Falcon con una solución tampón de fosfato 0.1 mol/L de pH 6.8. A intervalos de tiempo predeterminados, las tabletas de prueba hidratadas se sacan del medio de incubación, se retira el exceso de agua y se pesan. La cantidad de agua absorbida se calcula restando el peso original de la tableta antes de la prueba y el peso de la tableta tomada en el tiempo programado (Mueller et al., 2011).

#### 4.10. Ensayo de toxicidad celular de tiómeros S-protegidos

El impacto de alginato tiolado en la viabilidad de las células de carcinoma colorrectal humano (Caco-2) se evaluó mediante un ensayo de resazurina para confirmar la seguridad del tiómero preactivado recién sintetizado. Para este propósito, se obtuvieron células Caco-2 de la Colección Europea de Cultivos Celulares (Salisbury, Reino Unido). Las células Caco-2 a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células/pocillo se suspendieron en 500  $\mu$ L de MEM y se sembraron en una placa de 24 pocillos. La placa se incubó a una atmósfera de CO<sub>2</sub> (5%) y humedad relativa (95%) a 37 °C. Después de un período de incubación de 3 h con las mezclas de prueba, se reemplazó el medio de cada pocillo con solución de resazurina. Se utilizó Triton X-100 2% (v/v) actuando como control negativo y MEM blanco actuando como control positivo. Posteriormente, se midió la fluorescencia a una excitación de 540 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm con una fluorescencia de microplaca usando un espectrofotómetro M-200 Spectrometer; Tecan infinite®, (Austria). La viabilidad de las células se calculó en base a la ecuación 1 (Laffleur et al., 2016).

$$\%viabilidad\ celular = \frac{Valor\ absorbancia\ promedio\ de\ cada\ muestra}{Valor\ absorcia\ promedio\ del\ control\ bajo} \times 100$$

(ecuación 1)



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Obtención de tómeros S-protegidos

La síntesis del tómero S-protegido se logró mediante la formación de enlaces amida entre grupos del ácido carboxílico de la cadena del alginato y los grupos amino primario del ligando de L-cisteína S-protegida (Figura 7) (Laffleur et al., 2017). El tómero liofilizado presentó una textura porosa y esponjosa de color blanco amarillento, con un muy leve olor a azufre.



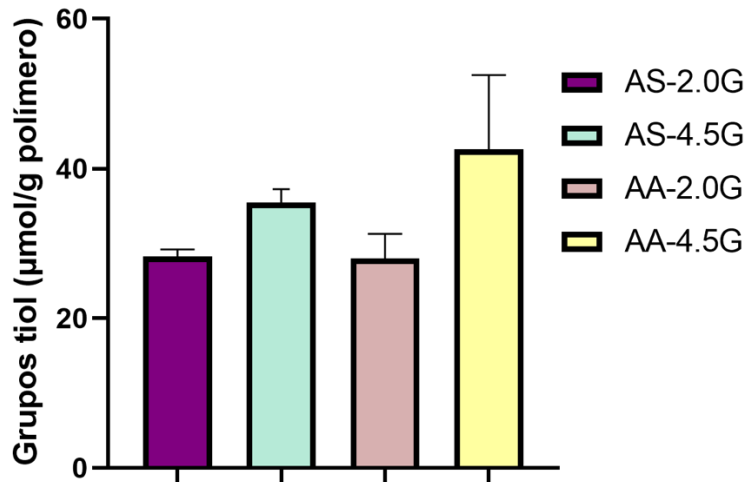
**Figura 8:** Muestras de tómeros S-protegidos obtenidos tras la síntesis, diálisis, liofilización y prensado.

## 5.2. Caracterización de tómeros S-protegidos

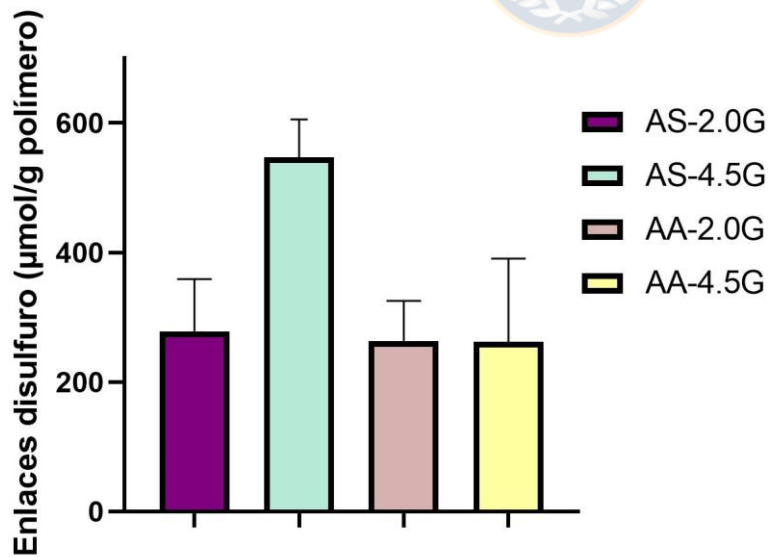
La concentración de grupos tiol (-SH) y enlaces disulfuro (S-S) se determinaron a través del ensayo de Ellman. Debido a la S-protección de los grupos tiol por el ligando protector NAC se espera que el valor de enlaces disulfuro sea considerablemente mayor que los grupos tiol listos para ser oxidados. En las Figuras 9 y 10 se observa que la respuesta de puentes disulfuro (S-S) respecto a los grupos tiol (-SH) obtenidos, es significativamente mayor en un factor promedio de 10 ( $p < 0.05$ ); con este resultado se ratifica la finalidad la metodología, generando una mayor cantidad de enlaces disulfuro sobre grupos tiol.

Para las tabletas de AS-4.5G, se observa una barra con un valor elevado que sobresale del promedio de los 3 conjugados (Fig 10 y 11); si bien el conjugado pudo presentar un mayor contenido de puentes disulfuro en su estructura, también muestra una mayor proporción de grupos amino libres, por lo que es posible que parte de estos grupos pertenezcan al ligando S-protegido.

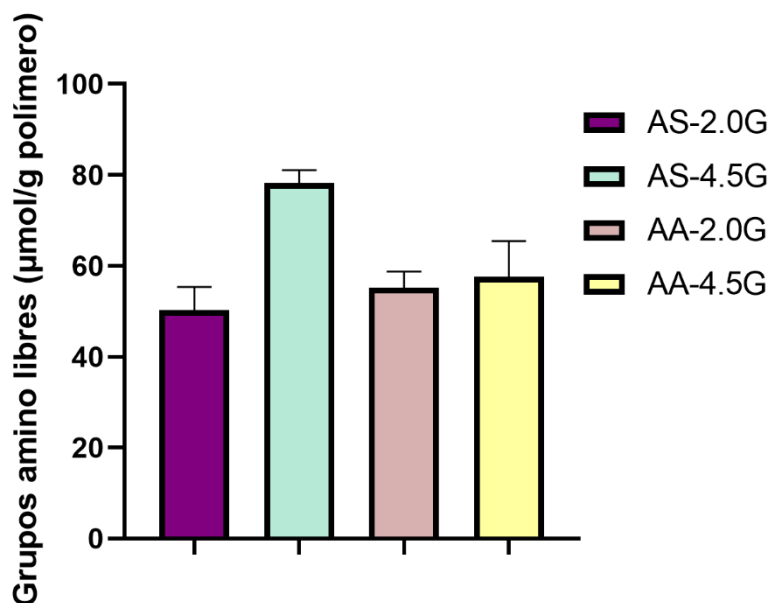
La cantidad de aminas primarias presente en la muestra indica indirectamente la cantidad de cisteína libre, es decir, que no está unida a la cadena del polímero (Hauptstein et al., 2013), la cual refleja los ácidos carboxílicos del alginato que no reaccionaron con el grupo amino primario del ligando o que permanecen en una etapa de reacción intermedia (Davidovich-Pinhas et al., 2009). Se espera que idealmente este valor sea muy cercano a cero. En la Figura 11 se observa que los valores obtenidos por el test de grupos amino primario están bajo los 80  $\mu\text{mol/g}$  de polímero, con esta información se puede confirmar la unión del ligando L-cisteína al polímero, comparando la cantidad cisteína utilizada durante la síntesis.



**Figura 9:** Determinación de grupos tiol (-SH) en tímeros de alginato S-protegidos ( $n = 3$ ).



**Figura 10:** Determinación enlaces disulfuro (S-S) en tímeros de alginato S-protegidos ( $n = 3$ ).



**Figura 11:** Determinación de grupos amino primarios en tíómeros de alginato S-protegidos ( $n = 3$ ).

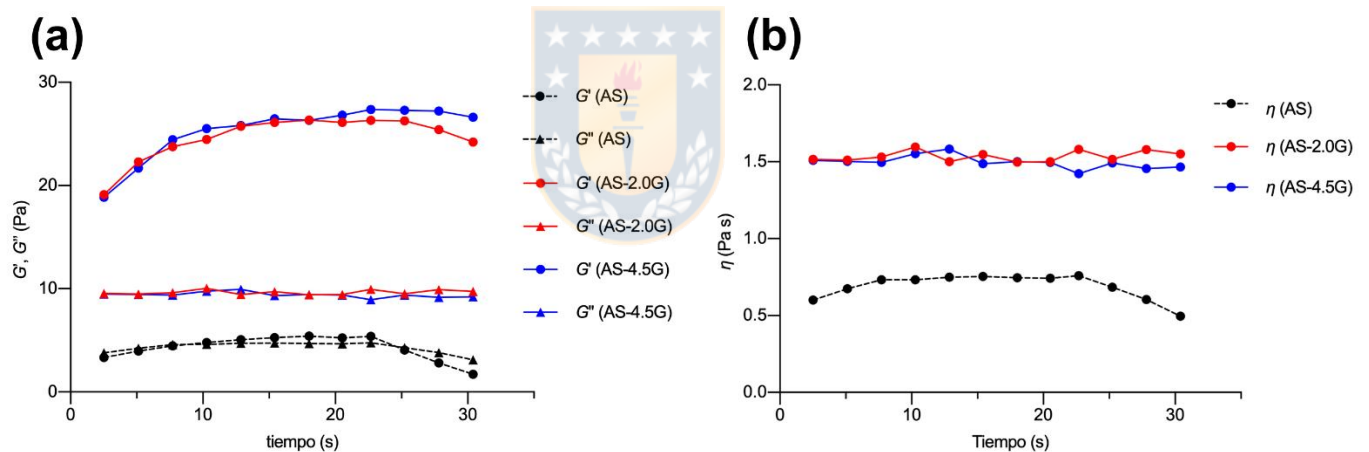


### 5.3. Análisis reológico de tíómeros S-protegidos

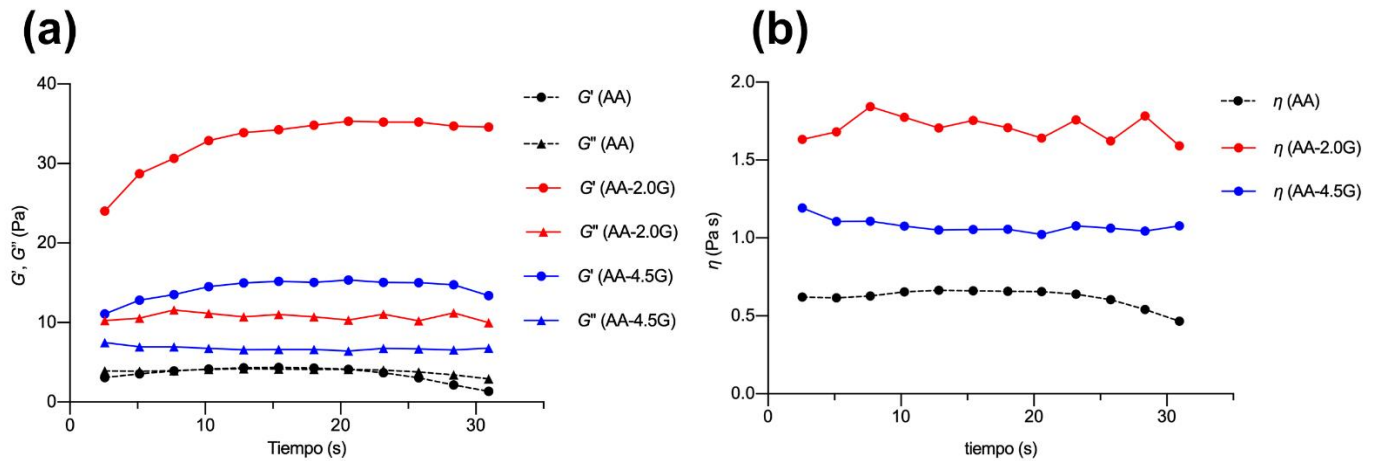
Se estima que la viscosidad aparente de la mezcla de polímero/mucina es el resultado de ciertas asociaciones tales como enredos de cadenas, cambios conformacionales e interacciones no covalentes. Se cree que las mismas propiedades también son responsables del fenómeno de mucoadhesión (Iqbal et al., 2011). El polímero preactivado mostró un cambio de viscosidad relativamente pequeño. Esto está de acuerdo con la teoría de que el grupo aromático evita que el polímero forme enlaces disulfuro adicionales (Hauptstein et al., 2015). En las Figuras 12 y 13, se observa un aumento en el módulo elástico en los polímeros modificados respecto al polímero sin modificar, tanto en alginato de sodio como

ácido algínico. La viscosidad de los polímeros modificados aumentó al doble respecto a los polímeros sin modificar.

El alginato tiolado se comporta como un gel con un módulo de almacenamiento mayor que el módulo de pérdida, a diferencia del alginato no modificado el cual muestra propiedades de una solución viscoelástica, este resultado indicaría la existencia de enlaces disulfuro intermoleculares entre la cadena de los polímeros y la glucoproteína que se encuentra en la mucina. Estas observaciones fortalecen la aseveración de que los enlaces disulfuro aumentan potencialmente la capacidad mucoadhesiva del polímero (Davidovich-Pinhas et al., 2009).



**Figura 12.** Determinación de (a) módulo elástico ( $G'$ ), módulo viscoso ( $G''$ ) y (b) viscosidad para tiómeros S-protectados de alginato de sodio.



**Figura 13.** Determinación de (a) módulo elástico ( $G'$ ), módulo viscoso ( $G''$ ) y (b) viscosidad para tíómeros S-prottegidos de ácido algínico.

#### 5.4. Estudio de absorción de agua para tíómeros S-prottegidos

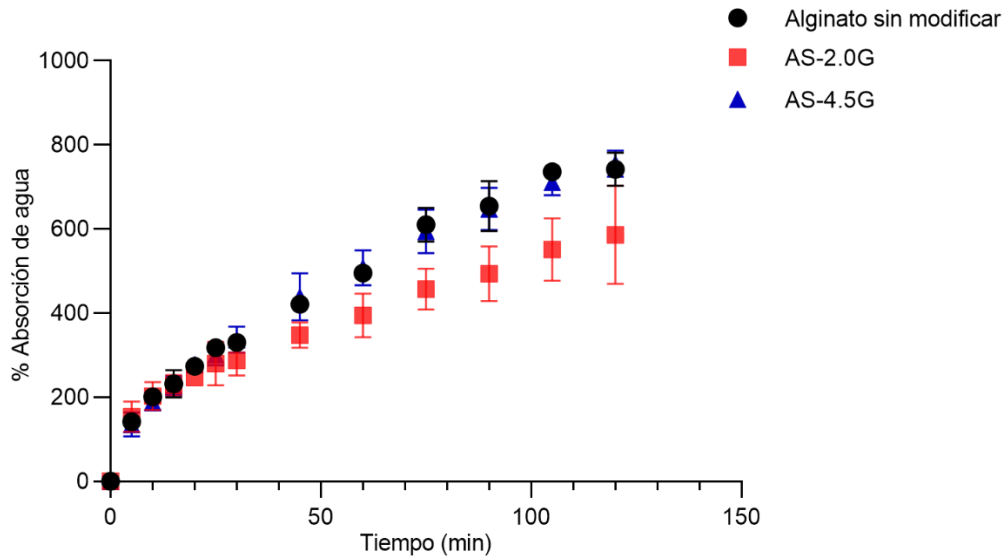
Quando un gel de polímero se hincha, su resistencia mecánica disminuye, por lo tanto, se puede promover el enredo con la superficie (Davidovich-Pinhas et al., 2009). El hinchamiento de los polímeros mucoadhesivos tiene una gran influencia en sus propiedades adhesivas y cohesivas. Al unirse el tíómero a la capa de mucus los polímeros mucoadhesivos toman agua del tejido subyacente mediante la absorción, la hinchazón y los efectos capilares que conducen a una adhesión considerablemente fuerte (Hombach y Berkhop- Schnürch, 2009). Ya que la humedad permite la formación y unión mucoadhesiva por enlaces débiles de van der Waals y enlaces de hidrógeno; el agua y la humedad que toman los polímeros conducen a una interacción rápida con la mucosa, lo que induce a la mucoadhesión (Laffleur et al., 2017). Un proceso de hinchamiento controlado puede proporcionar una adhesión prolongada, ya que, la sobrehidratación produce un hinchamiento

excesivo, lo que conlleva a propiedades cohesivas limitadas y como resultado, no se produce un enlace entre el polímero y la membrana mucosa. Por lo tanto, el hinchamiento debe ser moderado para evitar la sobrehidratación y la pérdida de las propiedades adhesivas antes de que el sistema de suministro alcance el objetivo (Iqbal et al., 2011 y Bonengel et al., 2014).

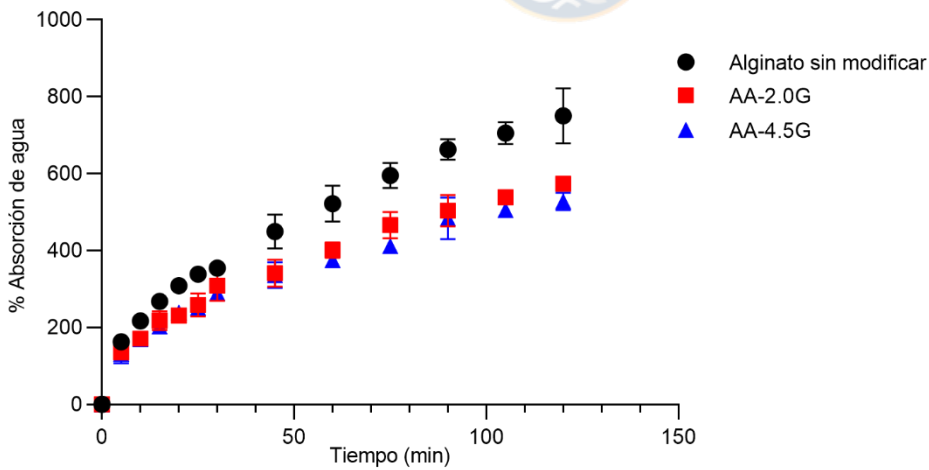
Las tabletas presentaron una absorción de agua similar de un 500% en peso en presencia de tampón pH = 6.8 (Figuras 14 y 15).

Para el ácido algínico, el polímero sin modificar presentó una mayor absorción de agua ya que, producto de la tiolación, se formaron enlaces disulfuro intra e intermoleculares. Esta reticulación condujo a una cohesión mejorada del polímero, una masa molecular más alta y, por lo tanto, a una disminución de la solubilidad y un aumento del tiempo de desintegración.

El en caso de alginato de sodio, el AS-4.5G y alginato sin modificar, presentaron un aumento de humedad muy similar, sin embargo, se esperaba que el alginato tiolado S-protegido mostrara un menor grado de absorción de agua que el alginato sin modificar, debido a la hidrofobicidad del ligando y que la modificación del polímero conduce a una mayor estabilidad de las tabletas. (Bonengel et al, 2014). Se estima que el resultado puede estar asociado a un fenómeno físico que involucra una propiedad estructural propia del alginato de sodio.



**Figura 14.** Determinación de absorción de agua para alginato de sodio tiolado y sin modificar ( $n = 3$ ).



**Figura 15.** Determinación de absorción de agua para ácido algínico tiolado y sin modificar ( $n = 3$ ).

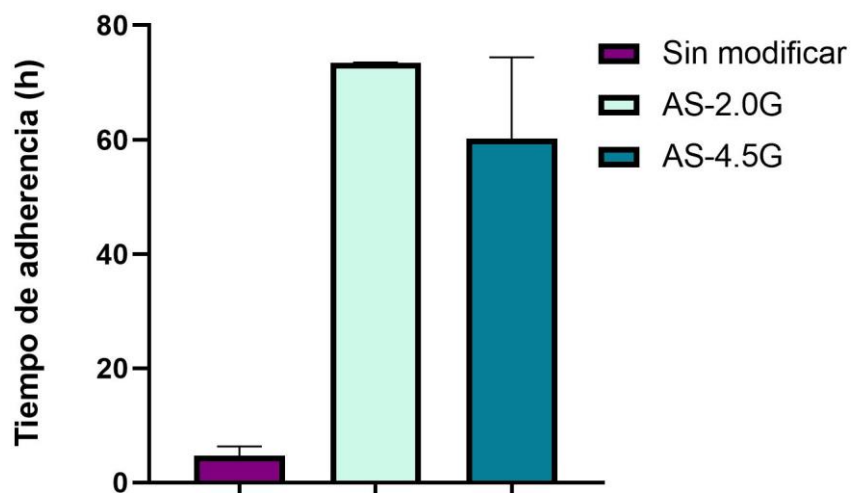


## 5.5. Ensayos de mucoadhesión *ex vivo* para tíómeros S-protegidos

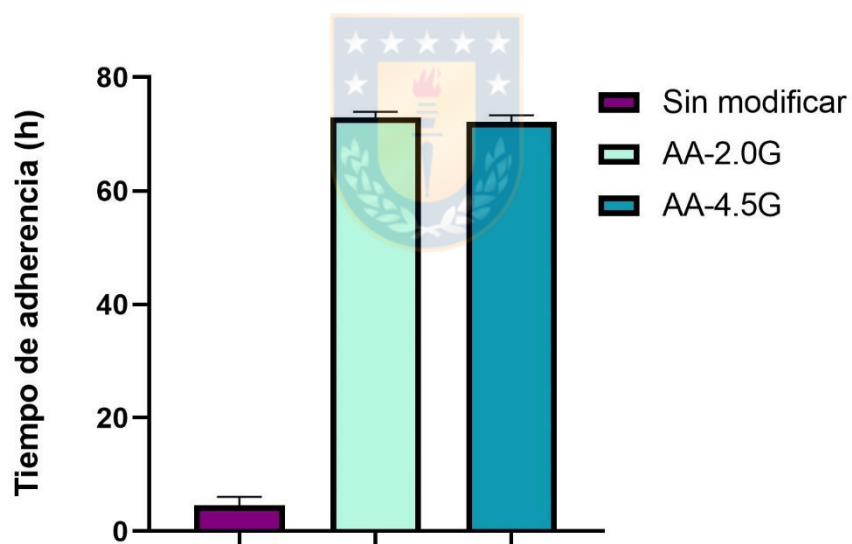
Para simular una situación *in vivo* de mucoadhesión, se evaluó el tiempo de adhesión de las tabletas de polímero a la mucosa porcina del intestino delgado fijada en un cilindro rotatorio (Figura 16). Las tabletas de polímeros sin modificar se mantuvieron adheridas al intestino en un promedio de 5 horas, tanto para el alginato de sodio como ácido algínico (Figuras 17 y 18).



**Figura 16:** Muestras de tabletas de tíómeros S-protegidos en ensayo de mucoadhesión en cilindro rotatorio.



**Figura 17.** Ensayo de mucoadhesión *ex vivo* de tabletas de tíómeros S-protegidos a base de alginato de sodio ( $n = 4$ ).



**Figura 18.** Ensayo de mucoadhesión *ex vivo* de tabletas de tíómeros S-protegidos a base de ácido alginico ( $n = 4$ ).

Para los polímeros modificados respecto al alginato sin modificar, el tiempo de adhesión es significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) ya que las tabletas permanecieron

adheridas al intestino en promedio 70 horas. El experimento se detuvo a las 73 horas con los discos de los polímeros tiolados preactivados convertidos en una masa gelatinosa sin forma, la cual se erosionó parcialmente antes del desprendimiento (Bonengel et al., 2014).

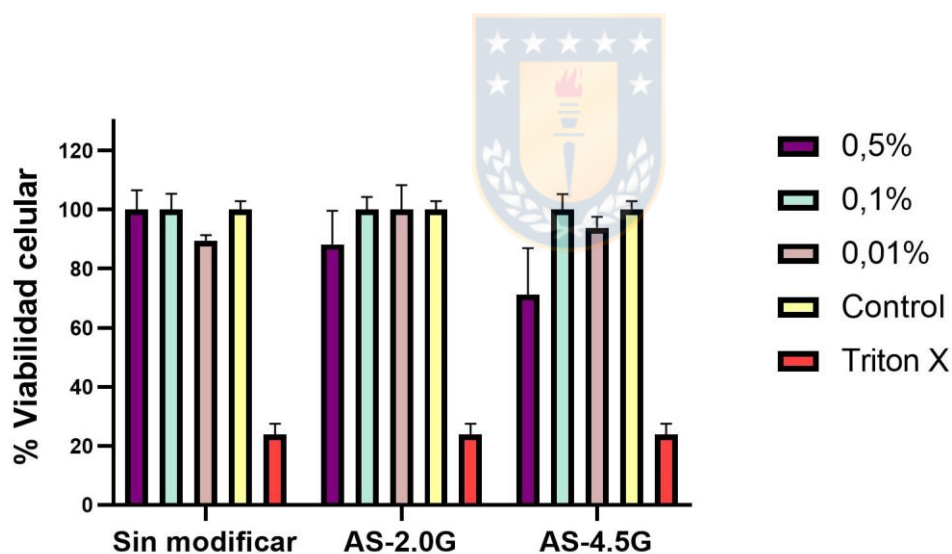
Las tabletas de ácido algínico tanto AA-2.0G como AA-4.5G, se mantuvieron adheridas la misma cantidad de tiempo a la mucosa intestinal, este resultado se puede relacionar directamente con el ensayo de puentes disulfuro, obteniendo en ambos ensayos, resultados proporcionales muy cercanos.

Los estudios de adhesión revelaron que la inmovilización de grupos tiol, da como resultado propiedades mucoadhesivas mejoradas (Iqbal et al., 2011) en un factor de 14 para ambas especies de polímero, este aumento en el tiempo de adherencia podría deberse al intercambio tiol/disulfuro, que se produce entre el polímero y la capa mucosa.

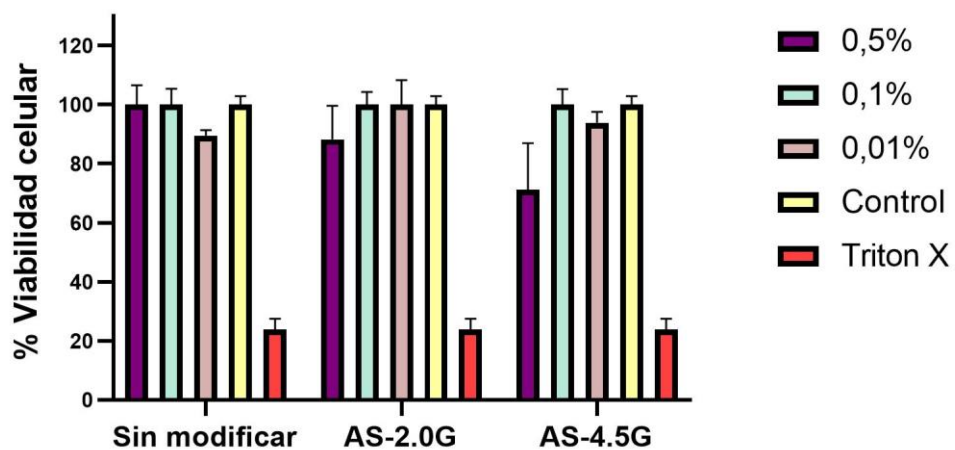
Estos resultados dejan ver las propiedades adhesivas mejoradas debido a la inmovilización de grupos tiol, así como propiedades cohesivas debido a la interacción y/o formación de enlaces disulfuro intramoleculares. La protección de grupos tiol debería proporcionar una reactividad completa frente a los subdominios de mucina ricos en tiol por reacción de intercambio de disulfuro (Bonengel et al., 2014). Tanto durante como después del proceso de interpenetración, se formarían enlaces disulfuro covalentes dentro de la matriz polimérica, lo que provoca anclajes adicionales mediante el almacenamiento con la capa de gel de mucus.

## 5.6. Ensayo de toxicidad de tiómeros S-protegidos

El análisis indica para ácido algínico y alginato de sodio (Figuras 19 y 20) que el polímero tiolado para las dos concentraciones de ligando, no presenta un riesgo en la viabilidad celular, ya que no se observa una toxicidad severa comparado al control positivo ( $p > 0.05$ ). Al finalizar el periodo de incubación de 3 horas, las células permanecieron vivas, por lo que la modificación del alginato no presenta un peligro celular (Hauptstein et al., 2013; Bonengel et al., 2014). Para el ácido algínico, presenta una viabilidad celular sobre el 87% y para el alginato de sodio sobre el 74%.



**Figura 19.** Test de toxicidad celular para tiómeros S-protegidos a base de alginato de sodio ( $n = 3$ ).



**Figura 20.** Test de toxicidad celular para tíómeros S-protegidos a base de ácido algínico ( $n = 3$ ).



## 6. CONCLUSIONES

- Con la metodología empleada en esta investigación se modificó químicamente alginato utilizando L-cisteína S-protegida con N-acetil-L-cisteína, y se obtuvo un tiómero S-protegido con propiedades mucoadhesivas mejoradas, de alta reactividad y estable.
- No existe una diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en los resultados obtenidos entre los polímeros alginato de sodio y ácido algínico.
- Los ensayos de cuantificación de grupos tiol, enlaces disulfuros y los grupos amino primario indican que la L-cisteína adicionada al polímero fue inmovilizada en la cadena polimérica, mostrando una cantidad de enlaces disulfuros considerablemente mayor que la cantidad de grupos tiol libres, y una muy baja cantidad de grupos amino primario.
- A través de la protección de los grupos tiol mediante la formación de un enlace disulfuro ligando-grupo S-protector, fue posible corroborar la adhesión del polímero a la mucosa intestinal en los ensayos *ex vivo*.
- Las tabletas de alginato tiolado S-protegido presentan una mucoadhesión *ex vivo* 14 veces mayor que los polímeros sin modificar.

- La modificación del alginato con el ligando L-cisteína S-protegido no muestra toxicidad significativa ( $p > 0.05$ ) comparado con el alginato sin modificar, y por tanto no presenta un riesgo para la viabilidad celular.



## REFERENCIAS

Alboofetileh, M., Rezaei, M., Hosseini, H., & Abdollahi, M. (2014). Effect of nanoclay and cross-linking degree on the properties of alginate-based nanocomposite film. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(4), 1622–1631. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12124>

Asim, M., Nazir, I., Jalil, A., Laffleur, F., Matuszczak, B. and Bernkop-Schnürch, A., 2020. Per-6-Thiolated Cyclodextrins: A Novel Type of Permeation Enhancing Excipients for BCS Class IV Drugs. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(7), pp.7942-7950. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b21335>

Bernkop-Schnürch, A. (2005). Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(11), 1569–1582. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.07.002>

Bernkop-Schnürch, A., Kast, C. E., & Richter, M. F. (2001). Improvement in the mucoadhesive properties of alginate by the covalent attachment of cysteine. *Journal of Controlled Release*, 71(3), 277–285. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00227-9](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00227-9)

Bonengel, S., Hauptstein, S., Perera, G., & Bernkop-Schnürch, A. (2014). Thiolated and S-protected hydrophobically modified cross-linked poly(acrylic acid) – A new generation of multifunctional polymers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 88(2), 390-396. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.06.009>



Campos-Requena, V. H., & Gómez, S. (2018). Synthesis of thiomers: Screening and optimization using chemometrics. *New Journal of Chemistry*, 42(6), 4670–4678. <https://doi.org/10.1039/c7nj04644h>

Campos-Requena, V. H., Rivas, B. L., Pérez, M. A., & Pereira, E. D. (2016). Short- and long-term loss of carvacrol from polymer/clay nanocomposite film - A chemometric approach. *Polymer International*, 65(5), 483–490. <https://doi.org/10.1002/pi.5084>

Davidovich-Pinhas, M., Harari, O. and Bianco-Peled, H., 2009. Evaluating the mucoadhesive properties of drug delivery systems based on hydrated thiolated alginate. *Journal of Controlled Release*, 136(1), pp.38-44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.01.029>

Duggan, S., O'Donovan, O., Owens, E., Duggan, E., Hughes, H., & Cummins, W. (2016). Comparison of the mucoadhesive properties of thiolated polyacrylic acid to thiolated polyallylamine. *International Journal of Pharmaceutics*, 498(1–2), 245–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.036>

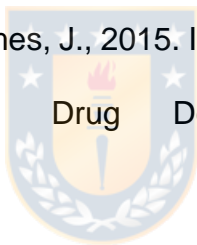
Hauptstein, S., Dezorzi, S., Prüfert, F., Matuszczak, B., & Bernkop-Schnürch, A. (2015). Synthesis and in vitro characterization of a novel S-protected thiolated alginate. *Carbohydrate Polymers*, 124, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.01.049>

Hombach, J., Palmberger, T. and Bernkop-Schnürch, A., 2009. Development and In Vitro Evaluation of a Mucoadhesive Vaginal Delivery System for Nystatin. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(2), pp.555-564. [Doi.org/10.1002/jps.21457](https://doi.org/10.1002/jps.21457)

Iqbal, J., Sarti, F., Perera, G. and Bernkop-Schnürch, A., 2011. Development and in vivo evaluation of an oral drug delivery system for paclitaxel. *Biomaterials*, 32(1), pp.170-175. [doi:10.1016/j.biomaterials.2010.09.036](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.036)

Iqbal, J., Shahnaz, G., Dünnhaupt, S., Müller, C., Hintzen, F., & Bernkop-Schnürch, A. (2012). Preactivated thiomers as mucoadhesive polymers for drug delivery. *Biomaterials*, 33(5), 1528-1535. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.021>

Laffleur, F., Leder, N. and Barthelmes, J., 2015. In vitro evaluation of thio-poly acrylic acid for intraoral delivery. *Drug Delivery*, 23(6), pp.2065-2073. [10.3109/10717544.2015.1122673](https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1122673)



Laffleur, F., Leder, N., & Barthelmes, J. (2016). In vitro evaluation of thio-poly acrylic acid for intraoral delivery. *Drug Delivery*, 23(6), 2065–2073. <https://doi.org/10.3109/10717544.2015.1122673>

Laffleur, F., Netsomboon, K., Bernkop-Schnürch, A., Westmeier, D., Stauber, R. H., & Docter, D. (2017). Comprehensive mucoadhesive study of anionic polymers and their derivate. *European Polymer Journal*, 93(June), 314–322. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.06.012>

Leitner, V. M., Walker, G. F., & Bernkop-Schnürch, A. (2003). Thiolated polymers: Evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins. *European*

Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 56(2), 207–214.  
[https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00061-4](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00061-4)

Mansuri, S., Kesharwani, P., Jain, K., Tekade, R. K., & Jain, N. K. (2016). Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. *Reactive and Functional Polymers*, 100, 151–172.  
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2016.01.011>

Mueller, C., Verroken, A., Iqbal, J. and Bernkop-Schnuerch, A., 2011. Thiolated chitosans: In vitro comparison of mucoadhesive properties. *Journal of Applied Polymer Science*. DOI 10.1002/app.35622

Naveen, N. R., Gopinath, C., & Rao, D. S. (2018). A spotlight on thiolated natural polymers and their relevance in mucoadhesive drug delivery system. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 4(1), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.08.002>

Pereira de Sousa, I., Suchaoin, W., Zupančič, O., Lechner, C., & Bernkop-Schnürch, A. (2016). Totally S-protected hyaluronic acid: Evaluation of stability and mucoadhesive properties as liquid dosage form. *Carbohydrate Polymers*, 152, 632-638. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.051>

Perrone, M., Lopalco, A., Lopodota, A., Cutrignelli, A., Laquintana, V., Franco, M., Denora, N. (2018). S-preactivated thiolated glycol chitosan useful to combine mucoadhesion and drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 132(July), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.09.015>

Perrone, M., Lopalco, A., Lopedota, A., Cutrignelli, A., Laquintana, V., Douglas, J., Franco, M., Liberati, E., Russo, V., Tongiani, S., Denora, N. and Bernkop-Schnürch, A., 2017. Preactivated thiolated glycogen as mucoadhesive polymer for drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 119, pp.161-169.

