


Liberación controlada del ácido sináptico mediante una hidrotalcita híbrida y su actividad antioxidante

Sánchez Torres Sarahi¹, Moreno Barrueta Emily¹, Santana Cruz Alejandra¹, Flores Moreno Jorge Luis¹, Ruiz Hernández Itan Homero²

¹Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias Básicas. Av. San Pablo No. 420, Col. Nueva el Rosario, Azcapotzalco, Ciudad de México, C.P. 02128, México.

²Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciencias básicas e ingeniería, Avenida Francisco J. Múgica S/N, Morelia, Michoacán, C.P. 58030, México.

*Autor para correspondencia: sca@azc.uam.mx

ORCID :0000-0001-8951-8145

Recibido:

15/mayo/2023

Aceptado:

05/octubre/2023

Palabras clave:

Antioxidante,
hidrotalcita,
ácido sináptico

Keywords:

Antioxidant,
hydrotalcite,
sinapic acid

RESUMEN

Los aniones de ácido sináptico se intercalaron en la región interlamina del hidróxido doble en capas de Zn-Al, mediante intercambio iónico siendo este el método más factible para la síntesis. El material generado por este proceso se caracterizó estructuralmente y se probó en dos aplicaciones importantes: de forma in vitro como agente de entrega en un sistema que imita las condiciones biológicas durante un periodo de tiempo determinado evidenciando la capacidad que tiene para ser un nanotransportador y como antioxidante mediante la optimización del ensayo 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) en condiciones normales, para obtener el porcentaje de inhibición como captador de radicales libres.

ABSTRACT

The sinapic acid anions were intercalated in the interlamina region of the double hydroxide in Zn-Al layers, by means of ion exchange, this being the most feasible method for the synthesis. The material generated by this process was structurally characterized and tested in two important applications: in vitro as a delivery agent in a system that mimics biological conditions for a given period of time, evidencing its ability to be a nanocarrier, and as an antioxidant by optimizing the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil (DPPH) assay under normal conditions, to obtain the percentage of inhibition as a free radical scavenger.

Introducción

Actualmente la búsqueda de matrices, orgánicas e inorgánicas, adecuadas para encapsular moléculas biológicamente activas (MBA) ha ido incrementado, debido a la necesidad de protegerlas de factores que alteren su integridad química. A medida que estos estudios avanzan, surgen nuevas necesidades para mejorar tanto la vía como la dosis de administración de las MBA en el organismo. Una necesidad específica, es proteger la MBA durante su paso por el tracto digestivo para que la liberación ocurra de manera sostenida y prolongada en el intestino, con el fin de reducir la frecuencia de ingesta (Rives et al., 2014). Se ha fijado gran atención en los sistemas bidimensionales biocompatibles, en específico los llamados hidróxidos dobles laminares (HDL); esto gracias a su gama de propiedades lo que les permite ser partícipes de una gran variedad de aplicaciones (Mishra et al., 2018).

Los HDL originalmente son un mineral tipo Hidrotalcita (HT) (Dana, James D. Dana n.d.), descubiertos en la naturaleza alrededor del año 1842, su composición química está representada por la fórmula general $[MII_1 - x MIII_x (OH)_2]^{x+} [A^{n-x/n} H_2O]^{x-}$, donde M(II) y M(III) son cationes metálicos divalentes y trivalentes, respectivamente y A^n es un anión n-valente. Estos compuestos consisten en láminas octaédricas de tipo brucita cargadas positivamente, alternadas con capas intermedias que contienen aniones carbonato en el mineral natural u otros aniones intercambiables sintéticos similares a HT, junto con moléculas de agua (Skinner, 1963). En particular, si el anión es de naturaleza orgánica el nuevo material se considera un material híbrido debido a la presencia de interacciones electrostáticas fuertes.

En los últimos años, se ha informado sobre la existencia de métodos sencillos y de bajo costo (Taylor, 1969; Birgül & Tasdemir, 2012; Evans & Duan, 2006) para preparar los materiales nanohíbridos (sólidos laminares) tal como la coprecipitación, el intercambio iónico y el efecto memoria.

Particularmente el intercambio iónico es un método comúnmente utilizado para esta síntesis, ha sido efectivo para la intercalación de diferentes tipos de aniones (Evans & Duan, 2006; Cunha et al., 2016; Kostadinova et al., 2016). El intercambio de huéspedes generalmente depende de las fuerzas electrostáticas entre las capas de HDL cargadas positivamente y los aniones en intercambio (Kuthati et al., 2015). Los aniones huésped, más comunes son NO_3^- , Br^- y Cl^- (Rives et al., 2014), para evitar la intercalación de carbonatos.

La existencia de una interacción electrostática débil con las capas genera que estos aniones se pueden reemplazar fácilmente por aniones con una interacción electrostática más alta con las capas.

Teniendo como objetivo demostrar el uso potencial de ácido sinápico intercalado en HDL a base de ZnAl biocompatible. Llevando a cabo dos estudios in vitro para determinar la viabilidad de utilizar este material como antioxidante y también como un sistema prolongado de liberación.

Metodología

Síntesis del material

Se utilizó el método de hidrólisis de la urea para sintetizar ZnAl- NO_3 ($Zn^{2+}/Al^{3+} = 2$) doble capa de hidróxido (Pshinko et al., 2011). Brevemente, $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ y $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ se disolvieron en agua destilada y desionizada libre de CO_2 . Luego, una mezcla de urea y amonio, se añadió nitrato y la mezcla se agitó magnéticamente. En un matraz fondo redondo de tres bocas equipado con reflujo condensador a $90^\circ C$ durante 10 h. El sistema fue purgado de CO_2 por gas argón burbujeante durante 1 h. El precipitado blanco se centrifugó durante 15 min, lavado con agua caliente desionizada y libre de CO_2 y finalmente secado a $120^\circ C$ durante 12 h en un horno. Después de preparar el HDL ZnAl- NO_3 , el intercambio iónico en ZnAl, y de manera general, el ácido sinápico se disolvió en una mezcla etanol/agua libre de CO_2 . Para asegurar la presencia de los aniones (provenientes de la deprotonación de la función ácido carboxílico del ácido sinápico) el pH de la solución se ajustó a 9. Seguido a esto, la solución se burbujeó durante 20 min con argón a fin de purgar y mantener una atmósfera inerte. Posteriormente se adicionó la proporción calculada del hidróxido doble laminar en su forma HDL- NO_3 que previamente se tenía sintetizada en el laboratorio. El burbujeo con argón se mantuvo durante 30 min para finalmente sellar el sistema y asegurar una atmósfera inerte. El sistema se dejó en agitación durante 4 días a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, el sólido se separó por centrifugación y fue lavado con agua libre de CO_2 y etanol, pues evitó la competencia con los demás aniones o moléculas en la región interlaminar y por último fue secado a $35^\circ C$ durante 48 h (Jain et al., 1981).

Liberación Controlada

Previo a las pruebas de liberación se realizó una curva de calibración para poder determinar la cantidad de MBA liberada. Los resultados se reportan en una curva de porcentaje de liberación de MBA en función del tiempo.

Las pruebas de liberación se realizaron en un sistema buffer fosfato salino con pH=7.40, a una temperatura de 36.6 °C, manteniéndose en agitación constante dentro de una incubadora. Se uso una membrana de diálisis con los sistemas suspendidos en la solución salina. Tomándose alícuotas de la muestra en intervalos de tiempo durante varias horas, las cuales fueron analizadas mediante espectroscopia UV-vis.

Propiedad antioxidante

Para la actividad antioxidante se preparó una solución 0.1 mM de DPPH. Para la medición se tomaron distintas concentraciones de material híbrido. Brevemente, se pesaron y colocaron en viales ámbar, agregando DPPH (previamente preparada), las cuales fueron incubadas a 25 °C manteniéndose en agitación hasta la disolución de esta. A cada una de estas soluciones se le agrego etanol y se mantuvieron en agitación a T ambiente y en la oscuridad.

Resultados y discusión

Hidróxido Doble laminar

En la figura 1. se muestra el difractograma del sólido, así como la distancia interplanar d_{003} . Mediante la comparación con el patrón de difracción característico de la hidrotalcita. En la tabla 1. se muestra la distancia interlaminar y el parámetro de red c para el sólido ZnAl-NO₃, obtenidos por DRX, obedeciendo a la tendencia esperada según el tamaño del anión presente en la región interlaminar.

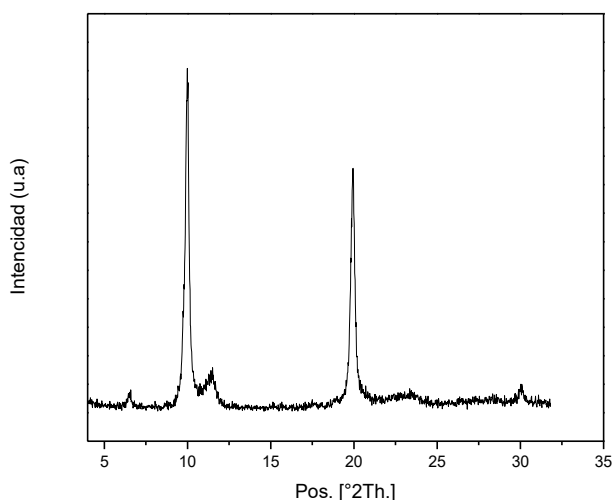


Figura 1. Difractograma del Hidróxido Doble Laminar ZnAl-NO₃.

Tabla 1. Parámetro de red c del HDL.

Sólido	2θ (°)	d_{003} (Å)	Parámetro c (Å)
ZnAl-NO ₃	9.86	8.96	26.88

El espectro infrarrojo mostrado en la figura 2. es congruente con lo reportado en la literatura. El sólido ZnAl-NO₃ muestra una banda de absorción ancha y muy intensa, centrada alrededor de 3445 cm⁻¹, que se atribuye a la frecuencia de vibración del modo de estiramiento αOH de los grupos O-H que forman las láminas tipo brucita, así como también es atribuible al mismo modo de vibración, pero de los grupos O-H del agua contenida en la región interlaminar.

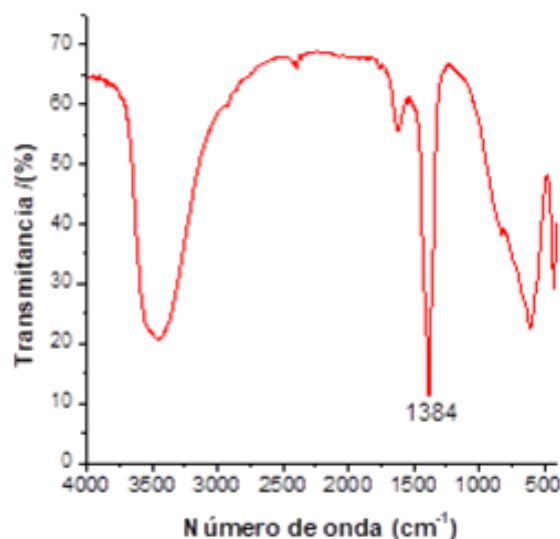


Figura 2. Espectro Infrarrojo del Hidróxido Doble Laminar ZnAl-NO₃.

La banda de absorción que se asocia al modo de vibración de flexión de los grupos O-H en las moléculas de H₂O aparece en 1616 cm⁻¹. El pequeño hombro situado alrededor de 3065 cm⁻¹ se atribuye a la frecuencia del modo de vibración de los grupos O-H en las láminas. La región por debajo de 1000 cm⁻¹ contiene bandas que se asignan a las vibraciones de los enlaces M-O y O-M-O que conforman la red. Finalmente, lo más importante en la caracterización del sólido es la presencia de la banda 1384 cm⁻¹, pues esta banda proviene de los modos de vibración de los aniones que residen en el espacio interlaminar. De esta forma, la primera banda situada a 1384 cm⁻¹ para este sólido se le atribuye al modo de vibración 3 del grupo NO₃.

En la figura 3. se observa claramente el desplazamiento de la reflexión del plano 003 hacia 5.67° en 2θ , primer indicio de que se ha intercalado la MBA en su forma aniónica. Asimismo, se encuentran la reflexión armónica 006 en 11.17° . Lo anterior implica que la molécula se ha intercalado con orientaciones distintas.

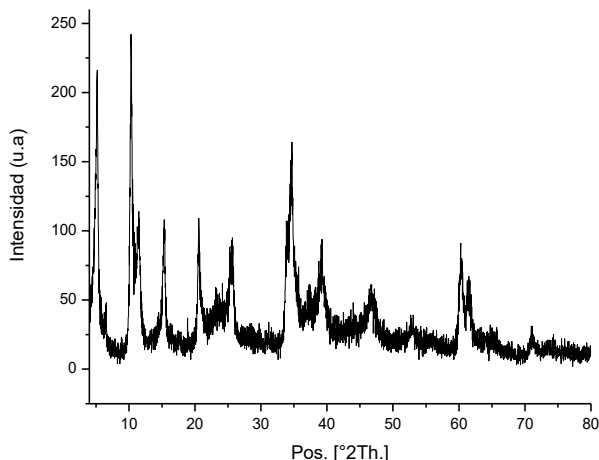


Figura 3. Difractograma del material ZnAl-NO₃-Ácido Sinápico.

Además, muestra la presencia de tres reflexiones entre los ángulos 30° y 40° en 2θ , que se atribuyen a las reflexiones características del ZnO.

Calculando la distancia interlaminar por la ecuación de la ley de Bragg en el plano basal (003), con la reflexión que muestra mayor intensidad, se obtiene un valor de $d_{003}=14.524 \text{ \AA}$ y, por consiguiente, debido al tamaño de una lámina tipo brucita 4.8 \AA , se obtiene una altura de galería de 9.7243 \AA .

De igual forma, se muestran reflexiones después de los 60° en 2θ , las cuales equivalen a la distancia entre los cationes metálicos dentro de las láminas y que pueden determinarse mediante el parámetro de celda a , de fórmula $a=2d_{110}$; donde d es calculada de la misma forma que la distancia interlaminar por la ley de Bragg y; el parámetro de red c , relaciona la distancia interlaminar a partir de la reflexión del plano basal (003), de fórmula $c=3d_{003}$. Así, los cálculos proporcionan los valores de los parámetros de celda $a=3.0475 \text{ \AA}$ y $c=43.5728 \text{ \AA}$.

Por otra parte, se realizó la comparación entre la matriz y el material híbrido, con la MBA intercalada mediante espectroscopia IR.

En el espectro IR reportado en la figura 4, puede verse la presencia de un mayor número de bandas, correspondientes a los nuevos grupos funcionales que se han intercalado.

Existe una banda ubicada entre 3400 cm^{-1} y 3500 cm^{-1} , la cual está asociada a vibraciones de estiramiento y tensión de los grupos OH, en la capa del material híbrido; esta se encuentra seguida de una banda a 1640 cm^{-1} , atribuida a las vibraciones de flexión de los enlaces O-H.

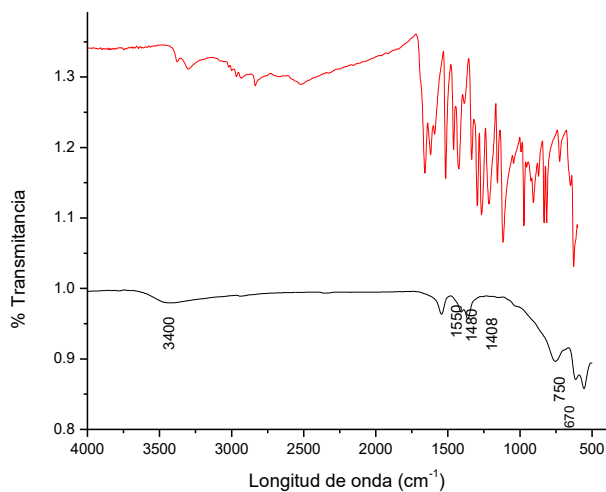


Figura 4. Espectro Infrarrojo del ZnAl-NO₃- Ácido Sinápico.

El espectro de IR se encuentra en la región de la sustitución aromática, por su estructura, las señales se encuentran en $1550, 1408, 750$ y 670 cm^{-1} . Así como un número de bandas por debajo de 1000 cm^{-1} , pertenecientes a las vibraciones de M-O y O-M-O, que son las vibraciones de los oxígenos que están coordinados a los iones metálicos y que, de igual forma, muestra un desplazamiento de las bandas.

Evaluación

La curva de espectrofotometría de la molécula del ácido sinápico que se muestra en la figura 5 presenta una de sus regiones de máxima absorción, mediante una comparativa de los diferentes números de onda, en un intervalo de 200 a 900 nm y a distintas concentraciones en un rango de 0 a 400 ppm .

Así, una máxima absorción para el ácido sinápico, detectada en el espectrofotómetro, ocurre a los 307 nm . Al graficar la concentración y la absorbancia a una longitud de onda, se obtiene una regresión lineal, definida por la ecuación $y=0.0808x-0.2315$ y un valor de correlación (r), igual a 0.9992

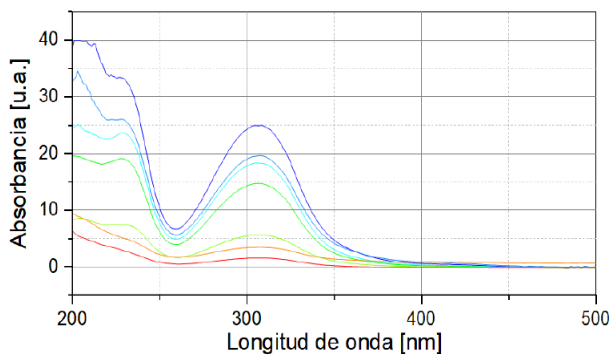


Figura 5. Espectro UV-Vis para soluciones de ácido sinápico.

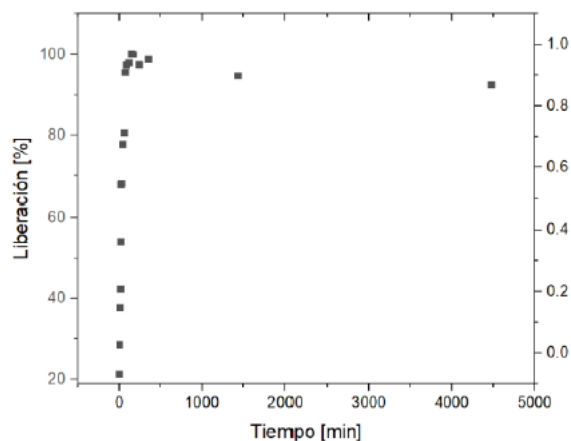


Figura 6. Liberación del material ZnAl-NO₃ - Ácido Sinápico.

Tal como se muestra en la figura 6. se obtuvieron resultados de 28.5 %, al haber transcurrido los primeros 5 minutos; 67%, antes de 30 minutos y el 100%, después de 150 minutos. Posteriormente, al aumentar los 150 minutos, la liberación finaliza con 92 % de liberación del total activo. Esto refleja valores decrecientes al haber alcanzado el 100%, lo cual se atribuye a una cristalización del sólido, que ha sido liberado inicialmente, así como al tiempo en el que se ha comenzado la liberación y las propiedades específicas del material híbrido.

Con esta evaluación se comprueba la habilidad de las matrices inorgánicas, para actuar como matrices huésped que logran encapsular una MBA y liberarla en un medio biológico, en proporción respecto al tiempo.

Finalmente, la actividad antioxidante es un método que se basa en medir la captación del radical libre DPPH por parte de la estructura antioxidante. Siendo este un radical estable que presenta en disolución un color violeta oscuro.

Una vez mezclado el radical y el antioxidante indica que a mayor captación del radical libre por parte del antioxidante, habrá una disminución de la absorbancia inicial en el DPPH, lo que conlleva una decoloración del color violeta inicial. Esta diferencia de absorbancia indica la capacidad antioxidante de la estructura de estudio.

Los resultados mostrados en la tabla 2. están expresados como porcentaje presentando buena capacidad antioxidante, con un promedio de 22.18 %. Estos datos nos indican que es importante conocer la cinética de la reacción y la capacidad del antioxidante para reaccionar con un radical específico; en el caso de la desaparición del radical DPPH que presenta una ecuación doble exponencial que sugiere la presencia de antioxidantes que actúan de forma rápida o lenta.

En este sentido, el ácido sinápico se considera con un efecto protector antioxidante y se evidencia en la **Tabla 2.** donde los valores obtenidos de absorbancia no varían a lo largo del ensayo, mostrando a tiempo cero un valor de absorbancia muy inferior al obtenido por el radical DPPH lo que se traduce en actividad antioxidante. Como la inactivación del radical se inicia tan pronto como se adiciona el material híbrido, no es viable la determinación directa de la absorbancia al tiempo cero, por lo que se evalúa la disminución de absorbancia a lo largo del tiempo

Tabla 2. Datos de absorbancia de la capacidad antioxidante.

Concentración (mg)	Absorbancia	% Cap. Antioxidante
Dpph _{EtOH}	11.53	
0.5	8.975	22.15958369
1	8.869	23.07892454
2	9.071	21.32697311
Promedio		22.18849378

Conclusiones

El conjunto de resultados y su análisis permite formular las siguientes conclusiones:

Se probó que el material obtenido por intercambio iónico (ZnAl-NO₃), logro reconstruirse y obtener el material híbrido HDL-AS requerido.

La caracterización y evaluación de los materiales, resultó indispensable para la determinación de lo anteriormente mencionado, así como de las características propias de cada material.

La evaluación de liberación controlada, reflejo el comportamiento de los materiales intercalados, en un medio que simula el pH y la temperatura fisiológica; en la que los materiales que contienen a la molécula huésped reflejan una mayor velocidad de liberación.

El HDL de partida, presenta actividad antioxidante importante dejando en evidencia que el ácido sináptico es buen antioxidante.

Referencias

R., Adiga, K. C., & Pai Verneker, V. R. (1981). A new approach to thermochemical calculations of condensed fuel-oxidizer mixtures. *Combustion and Flame*, 40, 71–79.

Kostadinova, D., Cenacchi Pereira, A., Lansalot, M., D'Agosto, F., Bourgeat-Lami, E., Leroux, F., Taviot-Guého, C., Cadars, S., & Prevot, V. (2016). Intercalation and structural aspects of macroRAFT agents into MgAl layered double hydroxides. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 7, 2000–2012.

Kuthati, Y., Kankala, R. K., & Lee, C.-H. (2015). Layered double hydroxide nanoparticles for biomedical applications: Current status and recent prospects. *Applied Clay Science*, 112-113, 100–116.

Pshinko, G. N., Kosorukov, A. A., Puzyrnaya, L. N., & Goncharuk, V. V. (2011). Layered double hydroxides intercalated with EDTA as effective sorbents for U(VI) recovery from wastewater. *Radiochemistry*, 53(3), 303–307.

Rives, Rives, V., del Arco, M., & Martín, C. (2014). Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review. *Applied Clay Science*, 88-89, 239–269.

Skinner, B. J. (1963). The System of Mineralogy of James Dwight Dana and Edward Salisbury Dana. Yale University, 1837-1892. vol. 3, Silica Materials. Revised and enlarged by Clifford Frondel. Wiley, New York, ed. 7, 1962. xii + 334 pp. Illus. \$7.95. *Science*, 139(3557), 821.

Taylor, H. F. W. (1969). Segregation and cation-ordering in sjögrenite and pyroaurite. *Mineralogical Magazine*, 37(287), 338–342.