



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

**Diseño, Síntesis y Caracterización de Sistemas de
Liberación Múltiple de Antibióticos con Acción Selectiva
al Tejido Óseo**

Placente, Damián

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2022

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 2 de Mayo de 2017 y el 4 de Noviembre de 2022, bajo la dirección de Dra. Paula Verónica Messina, Profesora Adjunta de la Universidad Nacional del Sur e Investigadora Principal de CONICET.

Placente, Damián.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/..../..... , mereciendo la calificación de(.....)

Agradecimientos

El haber llegado a este punto tiene que ver con la participación de instituciones, estructuras educativas y personas que fueron muy importantes para poder concluir esta formación de posgrado.

En primera instancia, agradecer al Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur y al Instituto de Química del Sur – INQUISUR – CONICET, por proveer del lugar físico y marco académico donde se desarrolló el trabajo de investigación. Agradecer al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por otorgarme la beca interna doctoral, constituyendo el soporte económico a lo largo de estos años de formación.

Agradecer a mi directora, la Dra. Paula Messina, quien me abrió las puertas de su grupo de investigación y me permitió formar parte de este proyecto. Fue la guía de este trabajo, compartiendo sus conocimientos y estando siempre presente durante todo este proceso.

A Lucho, por haberme presentado al grupo, por compartir su conocimiento, por su amistad y apoyo permanente. Gracias.

A los hermanos de la oficina, Javi, Noelia y Noel, por todos los mates compartidos y por estar siempre dispuestos a dar una mano cuando los necesité. Gracias.

A Carli, por su amistad, generosidad, compañerismo y cada una de las horas compartidas a lo largo de todo este proceso. Gracias.

Al Dr. Juan M. Ruso por su calidez humana y por recibirme en su laboratorio, permitiéndome vivir una experiencia muy enriquecedora en el plano profesional y personal. Gracias.

Quiero agradecer a todos los investigadores que colaboraron en la realización de este trabajo, Dr. Juan Manuel Sieben, Dra. Mónica Baldini, Dr. Juan M. Ruso, Dra. Graciela Santillán y Dr. Juan Laiuppa. Agradezco a ellos su predisposición, compromiso y profesionalismo aportado en cada uno de los desafíos propuestos.

Por último, un agradecimiento muy especial para las personas más importantes de mi vida, mi familia y amigos/as, su presencia y apoyo diario fueron el motor para transitar esta etapa.

Resumen

El desarrollo científico y tecnológico de los últimos años se ha acompañado de un aumento de la esperanza de vida y un incremento, en consecuencia, de eventos asociados a desórdenes patológicos. En el tejido óseo, estas afecciones incluyen desde fracturas hasta osteoporosis, osteomielitis, osteosarcoma y osteoartritis. Esto ha acrecentado el número de implantes e injertos de hueso realizados en el ámbito de la ortopedia y odontología. Estas cirugías suponen un riesgo inherente de infección y de desarrollo de afecciones periimplantarias, con el consecuente aflojamiento del implante y necesidad de procedimientos de revisión. El desarrollo de microorganismos en la superficie de una prótesis genera un proceso infeccioso que cursa con inflamación de los tejidos blandos que rodean al implante, comprometiendo su futuro.

Adicionalmente, en muchos casos son necesarias cirugías de revisión por aflojamiento aséptico, es decir, aflojamiento del implante debido a procesos no infecciosos. Este evento está asociado a la falta de integración del implante con el hueso (osteointegración), con impedimento de fijación de la prótesis al cuerpo.

En virtud de lo mencionado, el objetivo de este trabajo fue el desarrollo de nuevas estrategias que permitan conjuntamente mejorar la integración hueso-implante y a la vez evitar la colonización bacteriana de las superficies implantables. Para la implementación de dichas estrategias se emplearon nanopartículas de hidroxiapatita (nano-HA), las cuales reúnen muchas características que la convierten en una alternativa ideal para su uso en el desarrollo de biomateriales destinados al tejido óseo: composición química similar a la fase mineral ósea, biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades osteoinductivas.

Para ello, se han abordado diferentes enfoques como el desarrollo de plataformas y/o formulaciones portadoras de fármacos (plataformas HA_I/CIP, HA_I/L-ARG/IBU y la formulación multifármaco LMm/nano-HA_I), así como mecanismos alternativos para impedir la colonización de superficies implantables por parte de microorganismos sin la incorporación de principios activos (plataformas HA_{II}/MoO_x). Los sistemas desarrollados demostraron ser estrategias válidas y con potencial para su aplicabilidad como biomateriales para el recubrimiento de superficies implantables y/o relleno de pequeños defectos óseos.

Las plataformas HA_I/CIP, HA_I/L-ARG/IBU y la formulación multifármaco LMm/nano-HA_I propiciaron la liberación de los fármacos ibuprofeno y ciprofloxacina dentro de los rangos de concentración terapéuticos, con una cinética controlada dependiente del pH y

IV

en los tiempos adecuados en relación al proceso normal de curación de heridas. Además, la formulación multifármaco demostró estabilidad de almacenamiento en un marco temporal apropiado, actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* y biocompatibilidad *in vitro* en cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata.

Por otra parte, a partir del desarrollo de las plataformas HA_{II}/MoO_x hemos confirmado que las propiedades de fluorescencia autoactivadas pueden inducirse combinando óxidos de molibdeno (MoO_x) con cristales de HA. Los defectos puntuales inducidos en nano-HA_{II} actúan como aceptores de electrones, propiciándole propiedades redox al material que explicarían la actividad antibacteriana de las plataformas frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Se verificó la biocompatibilidad *in vitro* de estas plataformas por interacción de las mismas con cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata.

Abstract

The scientific and technological development of recent years has been accompanied by an increase in life expectancy and, consequently, an increase in events associated with pathological disorders. In bone tissue, these conditions range from fractures to osteoporosis, osteomyelitis, osteosarcoma and osteoarthritis. This has increased the number of implants and bone grafts performed in the field of orthopedics and dentistry. These surgeries pose an inherent risk of infection and the development of peri-implant conditions, with the consequent loosening of the implant and the need for revision procedures. The microorganism's growth on the surface of a prosthesis generates an infectious process that causes inflammation of the soft tissues surrounding the implant, compromising its future.

Additionally, in many cases revision surgeries are necessary due to aseptic loosening, that is, loosening of the implant due to non-infectious processes. This event is associated with the lack of integration of the implant with the bone (osseointegration), with a prosthesis fixation impediment to the body.

By virtue of the above, the objective of this work was the development of new strategies that jointly allow to improve bone-implant integration and, at the same time, avoid bacterial colonization of implantable surfaces. For the implementation of these strategies, hydroxyapatite nanoparticles (nano-HA) were used, which have many characteristics that make them an ideal alternative to use in the development of biomaterials for bone tissue: chemical composition similar to the bone mineral phase, biocompatibility, biodegradability and osteoinductive properties.

To this end, different approaches have been addressed, such as the development of drug-releasing platforms and/or formulations (HA_I/CIP, HA_I/L-ARG/IBU platforms, and the LMm/nano-HA_I multidrug formulation), as well as alternative mechanisms to prevent the colonization of implantable surfaces by microorganisms without the incorporation of active ingredients (HA_{II}/MoO_x platforms). The developed systems proved to be valid strategies with potential for their applicability as biomaterials for the coating of implantable surfaces and/or filling of small bone defects.

The HA_I/CIP, HA_I/L-ARG/IBU platforms and the LMm/nano-HA_I multidrug formulation favored the release of ibuprofen and ciprofloxacin drugs within therapeutic concentration ranges, with controlled kinetics dependent on pH and time. in relation to the normal process of wound healing. In addition, the multidrug formulation demonstrated storage

VI

stability in an appropriate time frame, *in vitro* antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, and *in vitro* biocompatibility with primary cultures of rat calvaria osteoblasts.

On the other hand, from the development of HA_{II}/MoO_x platforms we have confirmed that self-activated fluorescence properties can be induced combining molybdenum oxides (MoO_x) with HA crystals. The point defects induced in nano-HA_{II} act as electron acceptors, providing redox properties to the material that would explain the antibacterial activity of the platforms against the bacterial strains *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The *in vitro* biocompatibility of these platforms was verified through their interaction with primary cultures of rat calvaria osteoblasts.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Firma del director.

Índice de contenidos

Prefacio	I
Agradecimientos	II
Resumen	III
Abstract	V
Índice de contenidos.....	VIII
Listado de abreviaturas y símbolos	XI
Capítulo 1: Introducción general.....	1
1.1 Problemática actual asociada a la creciente demanda de implantes en ortopedia, odontología y cirugía reconstructiva.....	1
1.2 Hidroxiapatita, componente estructural del hueso.....	6
1.3 Diseño y desarrollo de biomateriales a partir de HA nanoestructurada	8
1.4 Referencias.....	10
Capítulo 2: Objetivos	16
Capítulo 3: Síntesis y caracterización de plataformas HA_I/CIP y HA_I/L-ARG/IBU.....	19
3.1 Síntesis de nano-HA _I a partir de estructuras orgánicas autoensambladas	19
3.2 Administración localizada de fármacos a partir de nano-HA _I	24
3.3 Experimental – Materiales	27
3.3.1 Reactivos	27
3.3.2 Síntesis de HA _I (plantillas CTAB/PPG)	28
3.3.3 Desarrollo de plataformas HA _I /CIP y HA _I /L-ARG/IBU	30
3.3.4 Liberación de los fármacos a partir de las plataformas HA _I /CIP y HA _I /L-ARG/IBU	31

3.3.5 Modelos empleados para el análisis de los procesos de adsorción y desorción	32
3.3.6 Capacidad de carga y liberación	37
3.3.7 Análisis estadístico de los datos	37
3.4 Resultados y discusión	38
3.4.1 Caracterización fisicoquímica de HA _I	38
3.4.2 Evaluación del comportamiento independiente de adsorción de CIP e IBU en HA _I	41
3.4.3 Evaluación del comportamiento de liberación independiente de los fármacos a partir de las plataformas HA _I /CIP y HA _I /L-ARG/IBU	54
3.5 Conclusión	58

Capítulo 4: Diseño, síntesis y caracterización de una formulación multifármaco biocompatible basada en nano-hidroxiapatita con un recubrimiento lipídico mimético de membrana67

4.1 Estructuras lipídicas miméticas de membrana como portadores de fármacos y moduladores de su liberación	68
4.1.1 Anfifilos y agregados moleculares: mesofases	68
4.1.2 Lecitinas naturales para el desarrollo de biomateriales.....	71
4.1.3 Adsorción de bicapas lipídicas sobre soportes sólidos	73
4.1.4 Objetivo.....	74
4.2 Experimental – Materiales y métodos.....	75
4.2.1 Reactivos	75
4.2.2 Formulación multifármaco basada en nano-HA con un recubrimiento lipídico mimético de membrana LMm/nano-HA _I	75
4.2.3 Eficacia de carga y liberación de fármacos	80
4.2.4 Ensayos de biocompatibilidad.....	83
4.2.5 Evaluación de la actividad de CIP e IBU <i>in vitro</i>	84
4.2.6 Análisis estadístico de los datos	86
4.3 Resultados y discusión	86

4.3.1 Formulaciones LMm/nano-HA _I	86
4.3.2 Carga y liberación múltiple de los fármacos CIP e IBU	96
4.3.3 Biocompatibilidad y eficiencia de la formulación multifármaco LMm/nano-HA _I (0,05 mg LS75·mg HA _I ⁻¹)	104
4.4 Conclusiones	108
4.5 Bibliografía	110
Capítulo 5: Síntesis y caracterización de plataformas HA/MoOx: un enfoque nanoteranóstico específico para tejido óseo	118
5.1 Consideraciones generales	118
5.1.1 Nueva síntesis de nano-HA	118
5.1.2 Plataformas nano-HA _{II} /MoO _x	120
5.2 Experimental – Materiales y métodos.....	123
5.2.1 Reactivos	123
5.2.2 Síntesis de nano-HA _{II} y de plataformas nano-HA _{II} / MoO _x a partir de plantillas de Pluronic® F-127/ Tween® 60.....	123
5.2.3 Caracterización microestructural y morfológica	125
5.2.4 Caracterización molecular electroactiva	128
5.2.5 Caracterización molecular fotoactiva	130
5.2.6 Ensayo de viabilidad celular	131
5.2.7 Actividad antibacteriana.....	131
5.2.8 Degradación hidrolítica <i>in vitro</i>	133
5.2.9 Análisis estadístico de los datos	134
5.3 Resultados y discusión.....	134
5.3.1 Plataformas nano-HA _{II} /MoO _x : procesamiento de cambios microestructurales	135

5.3.2 Defectos puntuales intrínsecos dentro de las plataformas nano-HA _{II} /MoO _x : inducción de fluorescencia autoactivada y capacidad de respuesta redox	147
5.3.3 Biocompatibilidad y actividad antimicrobiana de las plataformas nano-HA _{II} /MoO _x	155
5.4 Conclusión	162
5.5 Referencias.....	163
Capítulo 6: Conclusiones generales y perspectivas a futuro	171
6.1 Sistemas portadores de fármacos: plataformas HA _I /CIP, HA _I /L-ARG/IBU y formulación multifármaco LMm/nano-HA _I	171
6.2 Plataformas con actividad antibacteriana sin la incorporación de principios activos: plataformas nano-HA _{II} /MoO _x	174
6.3 Perspectivas a futuro	175
Capítulo 7: Producción científica	177

Listado de abreviaturas y símbolos

$\Delta C_{p,i}$	capacidad calorífica diferencial
ΔH_i	entalpía durante la transición de fase
ΔH_{vH}	entalpía de transición de van't Hoff
ΔH_t	entalpía de transición experimental
ΔG_u	cambio en la energía libre de Gibbs
$\Delta G_u (H_2O)$	energía libre de estabilización
ΔS_i	entropía de transición de fase
σ	parámetro de cooperatividad
AA	ácido L-ascórbico
AcB	buffer acetato
AE	análisis elemental
BSA	albúmina de suero bovino
C	control
C_e	concentración residual en el equilibrio
CIM_{50}	concentración mínima que inhibe el crecimiento del 50% de la población bacteriana
CIM_{90}	concentración mínima que inhibe el crecimiento del 90% de la población bacteriana
CIP	Ciprofloxacina
CMC	concentración micelar crítica
C_p	calor específico a presión constante
CPP	parámetro crítico de empaquetamiento
CTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
d	diámetro
DL_{HA}	capacidad de carga de los fármacos
DLS	dispersión cuasi-elástica de la luz
DR%	porcentajes de concentración máxima liberada con respecto al total cargado

DRX	difracción de Rayos X
E_c	banda de conducción
EDX	espectroscopia dispersiva de rayos X
EE%	eficiencia de encapsulación porcentual de los fármacos
E_g	energía de banda prohibida
E_v	banda de valencia
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos
FE-SEM	microscopio electrónico de barrido de emisión de campo
FL	fotoluminiscencia
FT-IR	Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier
FTT	transformada de Fourier
GC	carbono vítreo
H	fase cristal líquido hexagonal invertido
HA	Hidroxiapatita
HA _I /CIP	nanopartículas de hidroxiapatita cargadas con ciprofloxacina
HA _I /L-ARG/IBU	nanopartículas de hidroxiapatita cargadas con ibuprofeno con L-arginina como agente enlazante
HA _I	HA sintetizada a partir de plantillas CTAB/PPG
HA _{II}	HA sintetizada a partir de plantillas Tween® 60/Pluronic® F-127
HA _{II} /MoOx (I)	relación en peso de PMA/ nano-HA _{II} : 4/1
HA _{II} /MoOx (II)	relación en peso de PMA/ nano-HA _{II} : 2/1
HA _{II} /MoOx (III)	relación en peso de PMA/ nano-HA _{II} : 1/1
HA _{II} /MoOx (IV)	relación en peso de PMA/ nano-HA _{II} : ½
HA _{II} /MoOx	nanopartículas de hidroxiapatita con incorporación de óxidos de molibdeno
H-TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión de alta resolución
h_v	energía del fotón
IBU	Ibuprofeno
ICP-AES	espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo

I_p	pico de corriente
$k_{(E)}$	constante de velocidad heterogénea aparente
K_a	constante de disociación ácida
K_L	constante de Langmuir
K_{ps}	producto de solubilidad
K_u	constante de equilibrio de desnaturalización
l	longitud
L_α	fase cristal líquido lamelar
L'_α	fase cristal líquido lamelar intermedio
L_2	solución isotrópica "oleosa"
L-ARG	aminoácido L-Arginina
LMm/nano-HA ₁	formulación multifármaco constituida por nano-HA ₁ con un recubrimiento lipídico mimético de membrana
LMV	liposomas multilamelares
LS75	Lipoid® S75
MMA	metilmetacrilato
MoO _x	óxidos de molibdeno
n	exponente difusional de Korsmeyer-Peppas
nano-HA	nanopartículas de hidroxapatita
nano-rods	nanopartículas con forma de rodillos
PBS	buffer fosfato
PM	peso molecular
PMA	ácido fosfomolíbico
PMMA	polimetilmetacrilato
POE	polioxietileno
POP	polioxipropileno
PPG	polipropilenglicol
Q	fase cristal líquido cúbico
q_e	capacidad de adsorción en el equilibrio
R%	porcentaje de reducción del recuento de unidades formadoras de colonias

rds	paso determinante de la velocidad
R_{ku}	parámetro de Kurtosis
R_L	factor de separación
rOBs	cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata
ROS	especies reactivas de oxígeno
RP-HPLC	cromatografía líquida de alta presión de fase inversa
RS%	porcentaje de fuga de azúcares reductores
R_{sk}	parámetro de asimetría
S_{Ac}	acidez superficial
SAED	patrones de difracción de electrones de área selecta
S_{BET}	área superficial de BET
SCE	electrodo de calomel saturado
SUV	liposomas unilamelares pequeños
Tc	temperatura de transición
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
UFC	unidades formadoras de colonias
UV-Vis	Espectroscopía de absorción en la región del ultravioleta-visible
VC	voltamogramas cíclicos
$X_c\%$	porcentaje de cristalinidad

Capítulo 1

Introducción general

1.1 Problemática actual asociada a la creciente demanda de implantes en ortopedia, odontología y cirugía reconstructiva

El desarrollo tecnológico y la creciente capacidad para abordar afecciones médicas previamente intratables han generado una mejora continua en la esperanza de vida en las últimas décadas [1]. Esto ha producido un incremento en el número de eventos asociados a lesiones y desórdenes óseos patológicos, que engloban desde fracturas hasta osteoporosis, osteomielitis, osteosarcoma y osteoartritis [2]. En consecuencia, se ha dado un aumento en el número de implantes e injertos de hueso realizados en el ámbito de la ortopedia y odontología [3]. Las proyecciones que se hacen solo en el ámbito de la cirugía ortopédica, estiman que para 2030 se realizarán cuatro millones de procedimientos de artroplastia total de rodilla y cadera por año [4]. Los distintos tipos de cirugías implicadas en la colocación de prótesis, injertos y/o sustitutos óseos para reconstrucción de piezas dañadas y/o relleno de defectos provocados por la extirpación de tejido infectado o tumores, conlleva un riesgo inherente de infección y de desarrollo de afecciones periimplantarias, con el consecuente aflojamiento del implante y necesidad de procedimientos de revisión [1], [4]–[6]. Teniendo en cuenta esto, no sorprenden los datos que alertan del crecimiento en el número de pacientes diagnosticados y tratados por infecciones protésicas articulares [7], [8]. Así, los procedimientos de revisión, cada vez más frecuentes, son usualmente causados por infecciones periprotésicas que afectan la salud del paciente y la del sistema de salud, dado la complejidad y costo de las mismas [3], [4], [8]. Situando los hechos en números, la mitad de las infecciones originadas en el ámbito hospitalario involucran el uso de dispositivos médicos implantables [5]. Por ejemplo, el 15% y 30% de las revisiones de prótesis de cadera y rodilla, respectivamente, tienen la infección como causa principal [3], [9]. Dado el aumento progresivo en el

número de revisiones necesarias, el problema que esto representa para el sistema de salud en términos de carga económica será cada vez más importante [3], [7]–[9].

Los microorganismos pueden alcanzar la prótesis en el momento de la implantación por distintos mecanismos. Uno de ellos se asocia con tener comprometida su esterilidad, o como resultado de contaminación de la herida y/o el dispositivo a implantar por aire o malas prácticas asépticas [10]. Otra vía de contaminación, podría darse en un implante previamente estéril, a través de siembra hematógena durante una bacteriemia o desde un foco de infección adyacente al sitio de implantación [11]. Cuando los microorganismos, generalmente bacterias, colonizan la superficie de una prótesis y el sistema inmune no es capaz de eliminarlos a tiempo, estos proliferan y desarrollan un foco infeccioso que cursa con inflamación de los tejidos blandos del hueso que rodean el implante y de sus componentes restauradores, lo cual compromete seriamente su futuro [5], [12]. En este escenario, inicialmente tenemos lo que se conoce como mucositis periimplantaria y periimplantitis. Ambos estados inflamatorios se diferencian en que uno de ellos tiene su curso sin pérdida ósea adicional, la mucositis, mientras que la periimplantitis se da con pérdida progresiva del hueso periimplantario de soporte [6], [12]. Si bien el diagnóstico clínico diferencial preciso muchas veces es complejo, distintos artículos que tratan sobre la incidencia de estas afecciones informan prevalencias del 48% al 90% para la mucositis y del 28% al 51% para la periimplantitis [13]–[16]. Sin embargo, ambas afecciones comparten su etiología infecciosa a partir del desarrollo de biofilms bacterianos en la superficie del implante [17], [18], Fig. 1.1.

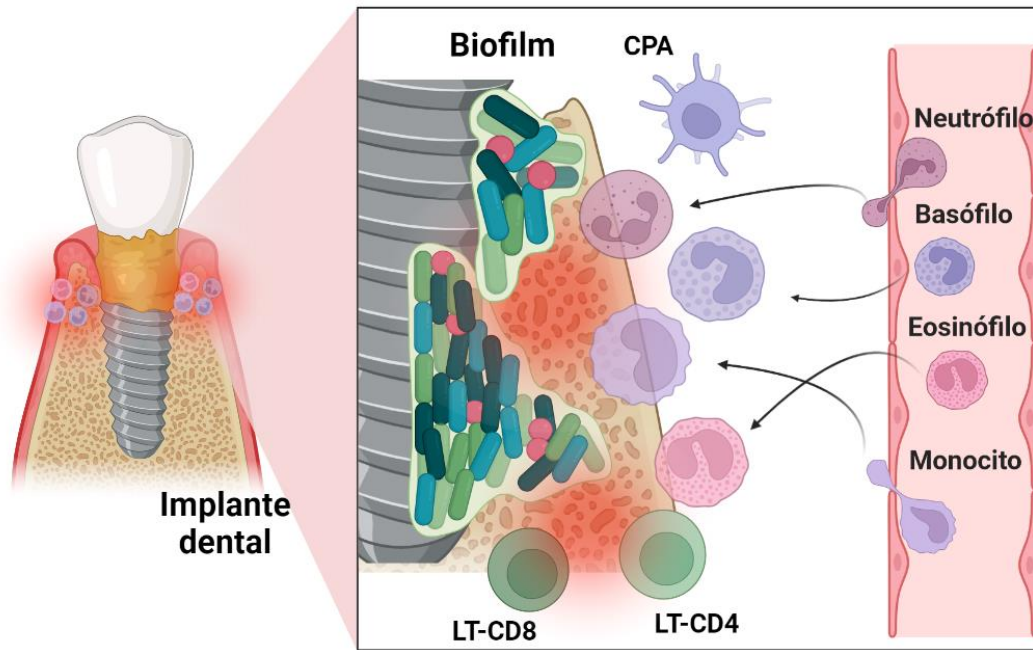


Figura 1.1: Representación esquemática de la respuesta inflamatoria asociada con periimplantitis por desarrollo de un biofilm bacteriano en la superficie del implante dental. Creado con Biorender.com.

Los biofilms son comunidades de bacterias embebidas en una matriz de polímeros extracelulares cuyas propiedades le permiten adherirse fuertemente a la superficie del implante [19]. Estas estructuras funcionan como un ambiente protector que pone las bacterias al resguardo tanto del sistema inmune como de los antibióticos [20]–[23]. Las cepas comúnmente implicadas en infecciones periprotésicas y osteomielitis son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus mirabilis*, entre otras [20], [21], [23]–[25]. Una vez dada la infección, si esta es detectada de manera temprana, es posible conservar el implante, pero siempre será necesario un desbridamiento quirúrgico de los tejidos afectados, con abundantes lavados y empleo de soluciones antisépticas [4], [10], [26]. Sin embargo, una vez establecida la formación de un biofilm maduro en la superficie de la prótesis, es prácticamente imposible eliminar la infección si no se extrae el implante previamente [5], [26]–[28]. El control de estas infecciones es de vital importancia, dado que el avance de la misma puede derivar incluso en una septicemia, poniendo en riesgo la vida del propio paciente [7], [8], [28].

Todo esto se vincula directamente, además, con la dificultad que representa el abordaje de terapias dirigidas al tejido óseo dada su baja perfusión sanguínea [29], la cual se ve aún más comprometida con el envejecimiento y presencia de patologías de base como osteoporosis, diabetes mellitus y malos hábitos como el tabaquismo [2], [30]. Esto hace que los tratamientos farmacológicos sean difícilmente exitosos y conlleven largos períodos de exposición a drogas (meses de terapia) con el consecuente riesgo de reacciones adversas y deterioro de la salud del paciente [5], [30], [31].

Adicionalmente, en muchos otros casos son necesarios procedimientos de revisión quirúrgica por aflojamiento del implante debido a procesos no infecciosos, lo que se conoce como aflojamiento aséptico [32]. En este caso, el fracaso está asociado a falta de integración del implante con el hueso (osteointegración), lo que produce una micromovilidad que impide un adecuado crecimiento óseo alrededor del mismo, con formación de tejido fibroso e impedimento de fijación de la prótesis al cuerpo [33].

Todo esto explica por qué representa una necesidad actual el desarrollo de nuevas estrategias que permitan conjuntamente mejorar la integración hueso-implante y a la vez evitar la colonización bacteriana de las superficies implantables.

De las opciones disponibles, el injerto óseo autólogo (autoinjerto), es decir, hueso obtenido del propio paciente, constituye la alternativa *gold estándar* en términos de integración en la interfase hueso – implante, al presentar óptimas propiedades osteogénicas, osteoinductivas y no inmunogénicas [34]. Sin embargo, su uso está restringido debido a que pueden provocar morbilidad en el sitio donante (dolor, hematoma, infección), su disponibilidad es limitada ya que puede ser insuficiente para rellenar grandes defectos y por el aumento en los tiempos quirúrgicos [35], [36]. Los aloinjertos, comprenden tejido óseo tomado de un individuo de la misma especie, pero no relacionado genéticamente con el receptor [37]. Estos presentan como inconvenientes la posibilidad de rechazo por reacción inmunitaria contra el injerto, la transmisión de enfermedades y su alto costo [35], [38]. Debido a esto, el énfasis científico actual se encuentra enfocado a proveer alternativas que permitan reducir la necesidad de uso de estos injertos.

En los últimos años el avance de la nanotecnología ha provisto de alternativas superadoras al potenciar el desarrollo de los denominados biomateriales de tercera generación. Un biomaterial es un material pensado para interactuar con sistemas

biológicos y aportar soluciones de carácter médico [39]. Se los identifica como de tercera generación debido a que poseen la propiedad de ser biodegradables, bioactivos y osteoinductores [40], a diferencia de los implantes metálicos ampliamente utilizados (titanio, aluminio, acero inoxidable) los cuales se consideran bioinertes, al no promover una interacción/integración con los tejidos biológicos [41].

El término biodegradable se refiere a la propiedad de un material para servir de soporte estructural temporal, acompañando la regeneración tisular y degradándose conforme se da la remodelación fisiológica normal del tejido [42], [43], esto es, la degradación ácida mediada por los osteoclastos durante el proceso de resorción, sin generar residuos perjudiciales [44]. Osteoinducción alude a la aptitud del material para generar el microambiente adecuado para reclutar células mesenquimales (células madre indiferenciadas) e inducir su diferenciación en células formadoras de hueso [45]. Por otra parte, la bioactividad de un sustituto óseo, hace referencia a su capacidad de promover la formación de una capa de apatita en su superficie, la cual asegura la formación de enlaces químicos fuertes entre el implante y el hueso favoreciendo su integración, promoviendo el crecimiento de hueso nuevo y evitando su rechazo mediado por encapsulamiento de tejido fibroso [46]–[48]. De esta manera, los biomateriales que reúnen estas características son capaces de inducir en sus superficies procesos biológicos específicos que propician la formación de hueso nuevo y la integración del implante al hueso que lo rodea [49].

La hidroxiapatita (HA) nanoestructurada reúne muchas características que la convierten en una alternativa ideal para implantes ortopédicos y dentales, o como componente de los mismos [1], [2], [24], [42], [50]. Su composición química similar a la fase mineral ósea, biocompatibilidad, biodegradabilidad y propiedades osteoinductivas, se conjugan con su gran área superficial activa, baja solubilidad en agua y estabilidad frente a condiciones oxidantes y reductoras que la hace potencialmente apropiada tanto para la adsorción directa de moléculas activas y/o la funcionalización de su superficie para fines específicos [24], [42], [43], [50]–[54].

El uso principal de la hidroxiapatita es como sustituto sintético del injerto óseo para reparación de tejidos duros, donde representa una alternativa al autoinjerto para el aumento óseo y relleno de defectos [55], [56]; Ostim®, BelOst® y Nanobone® constituyen ejemplos comercialmente disponibles.

Los injertos óseos constituyen el segundo trasplante de tejido más frecuente, con más de dos millones de procedimientos anuales en todo el mundo [56]. Los sustitutos óseos sintéticos tienen entonces una gran demanda potencial por delante, habiendo experimentado un gran aumento en su uso en los últimos años para cirugía protésica de revisión, cirugía oncológica, ortopedia y odontología [1], [57].

Adicionalmente, la HA posee un caso de uso importante como recubrimiento de diversos materiales implantables, habiéndose asociado esta aplicación en implantes metálicos ortopédicos de cadera y rodilla e implantes dentales [1], [2], [24], [50], [58]. La presencia de recubrimientos de HA en la superficie de implantes metálicos propicia la adhesión/unión en la interfase hueso – implante, promoviendo integración, de vital importancia de cara a prevenir aflojamientos asépticos y acelerando el periodo de curación de la herida [59]–[61]; los implantes metálicos no pueden promover esta interacción [41], [60]. Además, proporcionan un método de fijación alternativo al uso de cementos óseos poliméricos de polimetilmetacrilato (PMMA), frecuentemente utilizados en cirugía ortopédica, que han causado complicaciones por daño térmico durante el proceso de polimerización (necrosis tisular, proceso fuertemente exotérmico), efectos negativos en el remodelado óseo (mala biocompatibilidad, disminución de la revascularización) y toxicidad de largo plazo por liberación del monómero metilmetacrilato (MMA) al medio biológico [62]–[66].

1.2 Hidroxiapatita, componente estructural del hueso

El tejido óseo es tejido conectivo especializado que se compone de una fase mineral inorgánica (HA), una fase orgánica (95% corresponde a colágeno de tipo I) y una componente celular (osteoclastos, osteoblastos y osteocitos) [67]. A escala macroscópica podemos diferenciar entre hueso trabecular o esponjoso y hueso compacto o cortical. El hueso cortical constituye la capa exterior, rodea el canal medular y posee funciones de soporte y protección. El hueso trabecular, en cambio, de menor resistencia a la compresión, se ubica en el interior de los huesos; la disposición de sus láminas intersticiales delimita espacios denominados trabéculas, donde se aloja la médula ósea y los osteocitos [41]. A escala nanométrica, el hueso se compone de fibrillas de colágeno entre y sobre las cuales cristalizan los cristales de apatita biológica, con dimensiones que van desde los 10 a los 100 nm [68], [69], Fig. 1.2.

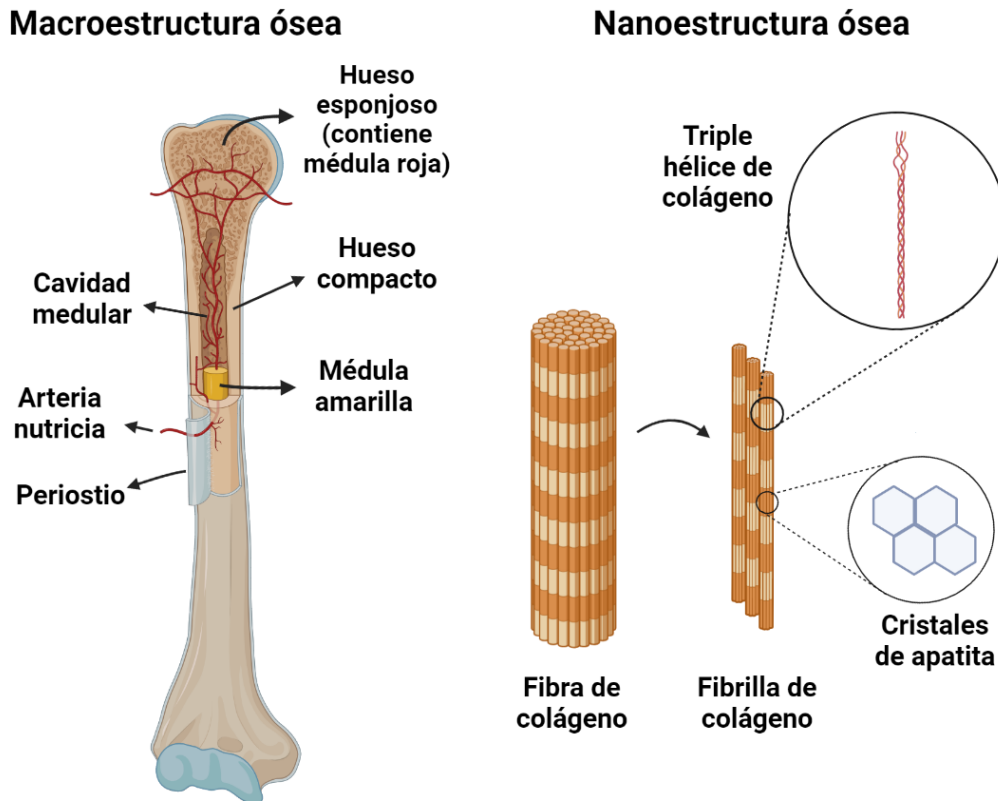


Figura 1.2: Representación esquemática de la macro y nanoestructura ósea. Esquema adaptado de la publicación de Sadat-Shojai M. y *col* [70]. Creado con Biorender.com.

El término apatita biológica se emplea para dejar en claro las diferencias que presenta la fase mineral del hueso en relación a la hidroxiapatita estequiométrica de fórmula: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Si bien su composición química y estructura cristalina es similar, la apatita biológica presenta defectos cristalinos que hacen a su falta de homogeneidad estructural, la cual modifica sus propiedades, como la cristalinidad, solubilidad, parámetros cristalinos, entre otros [71]–[75]. De la misma, el dopado e inducción de defectos puede permitir la adición de nuevas propiedades, enfoque que será abordado en el capítulo 5. Entre los defectos cristalinos presentes en la apatita biológica, se destacan sustituciones de átomos de la red por otros ($\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$, $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{3-}$, $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, $\text{K}^+/\text{Ca}^{2+}$, entre otros) [52], [53], [75]–[77] y vacancias (falta de un átomo en una posición de la red), donde se destacan las vacantes -OH [48], [71], [72]. Así, caracterizamos a la apatita biológica como no estequiométrica, pobremente cristalina y deficiente en calcio [71]–[75], representada por la siguiente fórmula:



La HA que se obtiene por síntesis en el laboratorio en condiciones normales cristaliza como cristal molecular iónico en un sistema cristalino hexagonal (grupo espacial P63/m), Fig 1.3, con una celda unitaria que consta de 44 átomos donde los iones Ca y -OH conforman un canal estructural a lo largo del eje “c” principal (canales -OH) [1], [48], [49].

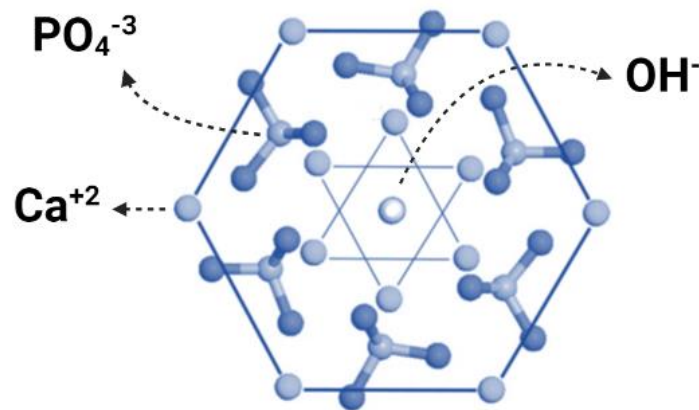


Figura 1.3: Esquema de una unidad estructural hexagonal de HA estequiométrica proyectada en la dirección [001]. Esquema adaptado de la publicación de Lu y col [78].

1.3 Diseño y desarrollo de biomateriales a partir de HA nanoestructurada

La HA de tamaño nanométrico juega un rol importante en la implementación de biomateriales implantables. El objetivo de este trabajo de tesis será añadir a las capacidades mencionadas de la hidroxiapatita como regenerador óseo, propiedades de relevancia para la profilaxis y/o tratamiento de afecciones ligadas al tejido óseo.

En investigaciones previas realizadas en nuestro grupo de investigación, se han sintetizado y caracterizado nanopartículas de hidroxiapatita (nano-HA) no estequiométrica biocompatibles (**HA_I**, $\text{Ca}_{9.42}(\text{PO}_4)_{5.42}(\text{HPO}_4)_{0.58}(\text{OH})_{1.42}$), con propiedades de topografía superficial, degradación y bioactividad apropiadas para la regeneración *in vitro* de tejido óseo [42], [43], [52]–[54]. Dichas nanopartículas fueron

tomadas como punto de partida para el desarrollo de sistemas portadores de fármacos. El objetivo de estos sistemas es permitir la administración localizada y controlada de fármacos de interés en patologías asociadas al tejido óseo. Para ello se estudiaron dos enfoques, la adsorción directa de los fármacos en nano-HA_I y el uso de portadores y/o moduladores de los mismos que permitan su integración en una única formulación. La implementación de dichas estrategias se encuentra detallada en los capítulos 3 y 4.

Adicionalmente, se diseñó una nueva síntesis a partir de la cual se logró obtener nanopartículas de hidroxiapatita no estequiométrica (HA_{II}, Ca_{9.12}(PO₄)_{5.12}(HPO₄)_{0.88}(OH)_{1.12}) de características similares a la antes mencionada, pero con una mejora sustancial en cuanto a los rendimientos de reacción. Esta última, se utilizó para el desarrollo de plataformas de hidroxiapatita – óxidos de molibdeno con el fin de lograr mecanismos alternativos para impedir la colonización de superficies de implantes por parte de microorganismos patógenos sin la incorporación de principios activos. Los resultados de esta investigación se presentan en el capítulo 5.

1.4 Bibliografía

- [1] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials Science*, Fourth Edition. UK: Academic Press: Oxford, 2013.
- [2] P. Lavrador, V. M. Gaspar, and J. F. Mano, “Stimuli-responsive nanocarriers for delivery of bone therapeutics – Barriers and progresses,” *Journal of Controlled Release*, vol. 273, pp. 51–67, 2018.
- [3] A. Wengler, U. Nimptsch, and T. Mansky, “Hip and Knee Replacement in Germany and the USA,” *Deutsches Ärzteblatt International*, vol. 111, no. 23, pp. 407–416, 2014.
- [4] N. B. Shah *et al.*, “Pseudomonas Prosthetic Joint Infections: A Review of 102 Episodes,” *Journal of Bone and Joint Infection*, vol. 1, no. 1, pp. 25–30, 2016.
- [5] J. P. Guggenbichler, O. Assadian, M. Boeswald, and A. Kramer, “Incidence and clinical implication of nosocomial infections associated with implantable biomaterials - catheters, ventilator-associated pneumonia, urinary tract infections,” *GMS Krankenhaushygiene interdisziplinär*, vol. 6, no. 1, pp. 1–19, 2011.

- [6] R. Smeets, A. Henningsen, O. Jung, M. Heiland, C. Hammächer, and J. M. Stein, "Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis - a review," *Head and Face Medicine*, vol. 10, no. 1. BioMed Central Ltd., pp. 1–13, 2014.
- [7] D. R. Osmon *et al.*, "Executive Summary: Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 56, no. 1, pp. 1–10, 2013.
- [8] P. Hsieh, M. S. Lee, K. Hsu, Y. Chang, H. Shih, and S. W. Ueng, "Gram-Negative Prosthetic Joint Infections: Risk Factors and Outcome of Treatment," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 49, no. 7, pp. 1036–1043, 2009.
- [9] M. Haenle, C. Skripitz, W. Mittelmeier, and R. Skripitz, "Economic Impact of Infected Total Knee Arthroplasty," *The Scientific World Journal*, vol. 2012, pp. 1–6, 2012.
- [10] S. G. Giulieri, P. Graber, P. E. Ochsner, and W. Zimmerli, "Management of Infection Associated with Total Hip Arthroplasty according to a Treatment Algorithm," *Infection*, vol. 32, no. 4, 2004.
- [11] D. R. Murdoch *et al.*, "Infection of Orthopedic Prostheses after Staphylococcus aureus Bacteremia," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 32, no. 4, pp. 647–649, 2001.
- [12] S. Renvert, G. R. Persson, F. Q. Pirih, and P. M. Camargo, "Peri-implant health, peri-implant mucositis, and peri-implantitis: Case definitions and diagnostic considerations," *J Clin Periodontol*, vol. 45, pp. 278–285, 2018.
- [13] V. Astolfi *et al.*, "Incidence of Peri-Implantitis and Relationship with Different Conditions: A Retrospective Study," *Int J Environ Res Public Health*, vol. 19, no. 7, pp. 1–11, 2022.
- [14] D. Rodrigo *et al.*, "Prevalence and risk indicators of peri-implant diseases in Spain," *J Clin Periodontol*, vol. 45, no. 12, pp. 1510–1520, 2018.
- [15] A.-M. Roos-Jansaker, C. Lindahl, H. Renvert, and S. Renvert, "Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part II: presence of peri-implant lesions," *J Clin Periodontol*, vol. 33, no. 4, pp. 290–295, 2006.
- [16] C. Fransson, U. Lekholm, T. Jemt, and T. Berglundh, "Prevalence of subjects with progressive bone loss at implants," *Clin Oral Implants Res*, vol. 16, no. 4, pp. 440–446, 2005.
- [17] G. I. Lafaurie *et al.*, "Microbiome and Microbial Biofilm Profiles of Peri-Implantitis: A Systematic Review," *J Periodontol*, vol. 88, no. 10, pp. 1066–1089, 2017.

- [18] N. U. Zitzmann, T. Berglundh, C. P. Marinello, and J. Lindhe, "Expression of endothelial adhesion molecules in the alveolar ridge mucosa, gingiva and periimplant mucosa," *J Clin Periodontol*, vol. 29, no. 6, pp. 490–495, 2002.
- [19] J. Costerton, "Overview of microbial biofilms," *J Ind Microbiol*, vol. 15, no. 3, pp. 137–140, 1995.
- [20] Q. Zou, Y. Li, L. Zhang, Y. Zuo, J. Li, and J. Li, "Antibiotic delivery system using nano-hydroxyapatite/ chitosan bone cement consisting of berberine," *J Biomed Mater Res A*, vol. 89, no. 4, pp. 1108–1117, 2009.
- [21] D. Neut, J. R. van Horn, T. G. van Kooten, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher, "Detection of Biomaterial-Associated Infections in Orthopaedic Joint Implants," *Clin Orthop Relat Res*, vol. 413, pp. 261–268, 2003.
- [22] E. Lenguerrand, M. R. Whitehouse, A. D. Beswick, A. D. Toms, M. L. Porter, and A. W. Blom, "Description of the rates, trends and surgical burden associated with revision for prosthetic joint infection following primary and revision knee replacements in England and Wales: An analysis of the National Joint Registry for England, Wales, Northern Ireland and the Isle of Man," *BMJ Open*, vol. 7, no. 7, 2017.
- [23] J. P. Overbeck, S. T. Winckler, R. Meffert, H. U. Spiegel, and E. Brug, "Penetration of Ciprofloxacin into Bone: A New Bioabsorbable Implant," *Journal of Investigative Surgery*, vol. 8, no. 3, pp. 155–162, 1995.
- [24] G. Chindamo, S. Sapino, E. Peira, D. Chirio, M. C. Gonzalez, and M. Gallarate, "Bone diseases: Current approach and future perspectives in drug delivery systems for bone targeted therapeutics," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 5. MDPI AG, 2020.
- [25] L. Pulido, E. Ghanem, A. Joshi, J. J. Purtill, and J. Parvizi, "Periprosthetic joint infection: The incidence, timing, and predisposing factors," *Clin Orthop Relat Res*, vol. 466, no. 7, pp. 1710–1715, 2008.
- [26] A. Kienzle, S. Walter, P. von Roth, M. Fuchs, T. Winkler, and M. Müller, "High Rates of Aseptic Loosening After Revision Total Knee Arthroplasty for Periprosthetic Joint Infection," *JBJS Open Access*, vol. 5, no. 3, pp. 1–8, 2020.
- [27] V. John, D. Shin, A. Marlow, and Y. Hamada, "Peri-Implant Bone Loss and Peri-Implantitis: A Report of Three Cases and Review of the Literature," *Case Rep Dent*, vol. 2016, pp. 1–8, 2016.
- [28] S. Gulhane, I. S. Vanhegan, and F. S. Haddad, "Single stage revision," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 94, no. 11, pp. 120–122, 2012.
- [29] B. Clarke, "Normal bone anatomy and physiology.," *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, vol. 3 Suppl 3, 2008.
- [30] J. Gogia, J. Meehan, P. di Cesare, and A. Jamali, "Local Antibiotic Therapy in Osteomyelitis," *Semin Plast Surg*, vol. 23, no. 02, pp. 100–107, 2009.

- [31] H. Segawa, D. T. Tsukayama, R. F. Kyle, D. A. Becker, and R. B. Gustilo, "Infection After Total Knee Arthroplasty. A Retrospective Study of the Treatment of Eighty-One Infections," *J Bone Joint Surg*, vol. 81, no. 10, pp. 1434–1445, 1999.
- [32] P. Wooley and E. Schwarz, "Aseptic loosening," *Gene Ther*, vol. 11, no. 4, pp. 402–407, 2004.
- [33] P. Drees, A. Eckardt, R. E. Gay, S. Gay, and L. C. Huber, "Mechanisms of Disease: molecular insights into aseptic loosening of orthopedic implants," *Nat Clin Pract Rheumatol*, vol. 3, no. 3, pp. 165–171, 2007.
- [34] M. Hallman and A. Thor, "Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry," *Periodontol 2000*, vol. 47, no. 1, pp. 172–192, 2008.
- [35] J. Baumhauer, M. S. Pinzur, R. Donahue, W. Beasley, and C. DiGiovanni, "Site Selection and Pain Outcome After Autologous Bone Graft Harvest," *Foot Ankle Int*, vol. 35, no. 2, pp. 104–107, 2014.
- [36] W. Zhu *et al.*, "Experimental study on the conduction function of nano-hydroxyapatite artificial bone," *Micro Nano Lett*, vol. 5, no. 1, pp. 19–27, 2010.
- [37] O. Martínez Alvarez *et al.*, "Bone grafts and bone substitutes in implant dentistry," *Av Odontostomatol*, vol. 34, no. 3, pp. 111–119, 2018.
- [38] M. Sánchez González, V. Vicent Carsí, and E. Navarrete Faubel, "Injerto autólogo," *Monografías de Actualización de la Sociedad Española de Medicina y Cirugía del Pie y Tobillo*, vol. 9, no. 1, pp. 37–44, 2017.
- [39] J. E. Ellingsen, P. Thomsen, and S. P. Lyngstadaas, "Advances in dental implant materials and tissue regeneration," *Periodontol 2000*, vol. 41, no. 1, pp. 136–156, 2006.
- [40] L. L. Hench and J. M. Polak, "Third-Generation Biomedical Materials," *Science*, vol. 295, no. 5557, pp. 1014–1017, 2002.
- [41] J. E. Davies and J. E. Davies, "Understanding Peri-Implant Endosseous Healing Address for Correspondence," *Journal of Dental Education*, vol. 67, no. 8, pp. 932–949, 2003.
- [42] N. L. D'Elía, C. Mathieu, C. D. Hoemann, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. v. Messina, "Bone-repair properties of biodegradable hydroxyapatite nano-rod superstructures," *Nanoscale*, vol. 7, no. 44, pp. 18751–18762, 2015.
- [43] N. L. D'Elía, A. N. Gravina, J. M. Ruso, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. v. Messina, "Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic," *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1830, no. 11, pp. 5014–5026, 2013.

- [44] S. L. Teitelbaum, "Bone Resorption by Osteoclasts," *Science (1979)*, vol. 289, no. 5484, pp. 1504–1508, 2000.
- [45] A. T. and J. C., "Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration," *European Spine Journal*, vol. 10, no. 2, pp. 96–101, 2001.
- [46] L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, and T. K. Greenlee, "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials," *J Biomed Mater Res*, vol. 5, no. 6, pp. 117–141, 1971.
- [47] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907–2915, 2006.
- [48] V. Bystrov, E. Paramonova, L. Avakyan, J. Coutinho, and N. Bulina, "Simulation and Computer Study of Structures and Physical Properties of Hydroxyapatite with Various Defects," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 10, p. 2752, 2021.
- [49] N. L. D'Elía, "Materiales nanoestructurados en base a fosfatos de calcio: hacia la regeneración de tejido óseo," Universidad Nacional del Sur (Argentina), 2016. Ed. UNS.
- [50] H. Zhou and J. Lee, "Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering," *Acta Biomater*, vol. 7, no. 7, pp. 2769–2781, 2011.
- [51] S. v. Dorozhkin, "Bioceramics of calcium orthophosphates," *Biomaterials*, vol. 31, no. 7, pp. 1465–1485, 2010.
- [52] N. C. Andrés, N. L. D'Elía, J. M. Ruso, A. E. Campelo, V. L. Massheimer, and P. v. Messina, "Manipulation of Mg^{2+} - Ca^{2+} Switch on the Development of Bone Mimetic Hydroxyapatite," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 9, no. 18, pp. 15698–15710, 2017.
- [53] N. C. Andrés, J. M. Sieben, M. Baldini, C. H. Rodríguez, Á. Famiglietti, and P. v. Messina, "Electroactive Mg^{2+} -Hydroxyapatite Nanostructured Networks against Drug-Resistant Bone Infection Strains," *ACS Appl Mater Interfaces*, vol. 10, no. 23, pp. 19534–19544, 2018.
- [54] N. L. D'Elia, N. Gravina, J. M. Ruso, J. L. Marco-Brown, J. M. Sieben, and P. v. Messina, "Albumin-mediated deposition of bone-like apatite onto nano-sized surfaces: Effect of surface reactivity and interfacial hydration," *J Colloid Interface Sci*, vol. 494, pp. 345–354, 2017.
- [55] G. Fernandez de Grado *et al.*, "Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management," *J Tissue Eng*, vol. 9, pp. 1–18, 2018.
- [56] V. Campana *et al.*, "Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 25, no. 10, pp. 2445–2461, 2014.
- [57] R. A. Bhatt and T. D. Rozental, "Bone Graft Substitutes," *Hand Clin*, vol. 28, no. 4, pp. 457–468, 2012.

- [58] L. Sun, C. C. Berndt, K. A. Gross, and A. Kucuk, "Material fundamentals and clinical performance of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings: A review," *J Biomed Mater Res*, vol. 58, no. 5, pp. 570–592, 2001.
- [59] B. Leon and J. A. Janson, *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*, 1st ed. New York, NY: Springer New York, 2009.
- [60] R. Geesink, K. de Groot, and C. Klein, "Bonding of bone to apatite-coated implants," *J Bone Joint Surg Br*, vol. 70-B, no. 1, pp. 17–22, 1988.
- [61] G. Y. Nakama, M. S. Peccin, G. J. Almeida, O. de A. Lira Neto, A. A. Queiroz, and R. D. Navarro, "Cemented, cementless or hybrid fixation options in total knee arthroplasty for osteoarthritis and other non-traumatic diseases," *Cochrane Database of Systematic Reviews*, pp. 1–46, 2012.
- [62] Harlan. Amstutz, P. Campbell, N. Kossovsky, and Ian. Clarke, "Mechanism and Clinical Significance of Wear Debris-Induced Osteolysis," *Clin Orthop Relat Res*, vol. 276, pp. 7–18, 1992.
- [63] T.-H. Lim *et al.*, "Biomechanical Evaluation of an Injectable Calcium Phosphate Cement for Vertebroplasty," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 27, no. 12, pp. 1297–1302, 2002.
- [64] J. X. Lu *et al.*, "Human biological reactions at the interface between bone tissue and polymethylmethacrylate cement," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 13, no. 8, pp. 803–809, 2002.
- [65] H. Deramond, N. T. Wright, and S. M. Belkoff, "Temperature elevation caused by bone cement polymerization during vertebroplasty," *Bone*, vol. 25, no. 2, pp. 17–21, 1999.
- [66] B. Bai, L. M. Jazrawi, F. J. Kummer, and J. M. Spivak, "The Use of an Injectable, Biodegradable Calcium Phosphate Bone Substitute for the Prophylactic Augmentation of Osteoporotic Vertebrae and the Management of Vertebral Compression Fractures," *Spine (Phila Pa 1976)*, vol. 24, no. 15, pp. 1521–1526, 1999.
- [67] A. L. Boskey, "Biom mineralization: conflicts, challenges, and opportunities," *J Cell Biochem Suppl*, vol. 30–31, pp. 83–91, 1998.
- [68] Y. Cai *et al.*, "Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation," *J Mater Chem*, vol. 17, no. 36, pp. 3780–3787, 2007.
- [69] S. Weiner and H. D. Wagner, "The material Bone: Structure-Mechanical Function Relations," *Annual Review of Materials Science*, vol. 28, no. 1, pp. 271–298, 1998.
- [70] M. Sadat-Shojai, M.-T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi, and A. Jamshidi, "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures," *Acta Biomater*, vol. 9, no. 8, pp. 7591–7621, 2013.

- [71] S. A. M. Tofail, D. Haverty, K. T. Stanton, and J. B. McMonagle, "Structural Order and Dielectric Behaviour of Hydroxyapatite," *Ferroelectrics*, vol. 319, no. 1, pp. 117–123, 2005.
- [72] K. Matsunaga and A. Kuwabara, "First-principles study of vacancy formation in hydroxyapatite," *Phys Rev B*, vol. 75, no. 1, pp. 1–9, 2007.
- [73] S. Nakamura, H. Takeda, and K. Yamashita, "Proton transport polarization and depolarization of hydroxyapatite ceramics," *J Appl Phys*, vol. 89, no. 10, pp. 5386–5392, 2001.
- [74] M. I. Kay, R. A. Young, and A. S. Posner, "Crystal Structure of Hydroxyapatite," *Nature*, vol. 204, no. 4963, pp. 1050–1052, 1964.
- [75] A. v. Bystrova, Yu. D. Dekhtyar, A. I. Popov, J. Coutinho, and V. S. Bystrov, "Modified Hydroxyapatite Structure and Properties: Modeling and Synchrotron Data Analysis of Modified Hydroxyapatite Structure," *Ferroelectrics*, vol. 475, no. 1, pp. 135–147, 2015.
- [76] C. Rey, "Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties.," *Biomaterials*, vol. 11, pp. 13–5, 1990.
- [77] D. E. Ellis *et al.*, "A theoretical and experimental study of lead substitution in calcium hydroxyapatite," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 8, no. 8, pp. 967–976, 2006.
- [78] X. Lu *et al.*, "Hexagonal hydroxyapatite formation on TiO₂ nanotubes under urea modulation," *CrystEngComm*, vol. 13, no. 11, pp. 3741–3749, 2011.

Capítulo 2

Objetivo general

La presente propuesta estudiará estrategias para añadir a las capacidades de la hidroxiapatita como regenerador óseo, propiedades de relevancia para la profilaxis y/o tratamiento de afecciones ligadas al tejido óseo, integrando múltiples funciones en un mismo sistema.

Objetivos específicos:

1. Desarrollar sistemas portadores de fármacos a partir de regeneradores óseos de HA_I
 - a. Síntesis de plataformas HA_I/CIP y HA_I/L-ARG/IBU
 - i. Estudiar la adsorción del antibiótico ciprofloxacina en nano-HA_I en condiciones fisiológicas (pH=7,4, 37°C), de herida abierta (pH=6, 37°C) y resorción ósea (pH=4,2, 37°C).
 - ii. Estudiar la adsorción del antiinflamatorio ibuprofeno en nano-HA_I utilizando el aminoácido L-ARG como agente enlazante en los tres medios mencionados en el apartado anterior.
 - iii. Analizar el comportamiento cinético de adsorción y desorción independiente de ciprofloxacina e ibuprofeno en los tres medios de pH mencionados.
 - b. Síntesis de la formulación multifármaco LMm/nano-HA_I
 - i. Desarrollar un recubrimiento lipídico mimético de membrana en la superficie de nano-HA_I: establecer los parámetros de formulación y analizar el proceso de adsorción.

- ii. Caracterizar la microestructura de la formulación multifármaco alcanzada.
 - iii. Caracterización térmica y estabilidad de almacenamiento de la formulación.
 - iv. Estudiar la eficiencia de carga y liberación simultánea de los fármacos ciprofloxacina e ibuprofeno por la formulación multifármaco en condiciones fisiológicas (pH=7,4, 37°C), de herida abierta (pH=6, 37°C) y resorción ósea (pH=4,2, 37°C).
 - v. Evaluar la actividad antibacteriana y antiinflamatoria de los fármacos liberados por la formulación.
 - vi. Estudiar la biocompatibilidad de la formulación mediante la interacción con osteoblastos primarios de bóveda craneal de rata.
2. Desarrollar plataformas con actividad antibacteriana a partir de regeneradores óseos de HA sin la incorporación de principios activos: Síntesis de plataformas nano-HA_{II}/MoO_x.
- a. Implementar una nueva síntesis de hidroxiapatita y desarrollar sobre la base de la misma las plataformas nano-HA_{II}/MoO_x a partir de inducir cambios químicos y físicos en nano-HA utilizando óxidos de molibdeno (MoO_x).
 - b. Caracterizar la microestructura y morfología de las plataformas nano-HA_{II}/MoO_x obtenidas.
 - c. Estudiar las propiedades optoelectrónicas y electroactivas resultantes de las plataformas alcanzadas.
 - d. Evaluar la actividad antibacteriana de las plataformas frente a cepas patógenas de relevancia clínica: *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Analizar el estado celular de las cubiertas externas de los microorganismos luego de tomar contacto con el material y determinar la presencia de contenido citoplasmático liberado al medio luego de dicha exposición.
 - e. Estudiar la biocompatibilidad de las plataformas sintetizadas mediante la interacción de las mismas con osteoblastos primarios de bóveda craneal de rata.

*Síntesis y caracterización de
sistemas portadores de fármacos
a partir de regeneradores óseos
de hidroxiapatita*

Capítulo 3

Síntesis y caracterización de plataformas HA_I/CIP y HA_I/L-ARG/IBU

En este capítulo se mencionarán aspectos relevantes relativos a la síntesis y caracterización de nanopartículas de hidroxiapatita (nano-HA) a partir de plantillas de bromuro de hexadeciltrimetilamonio y polipropilenglicol (CTAB y PPG, respectivamente). A la hidroxiapatita proveniente de esta síntesis la nombraremos HA_I. En investigaciones anteriores realizadas en nuestro grupo de investigación, “*Materiales Nanoestructurados*”, se demostró las aptitudes de estas plataformas bioactivas y biodegradables para promover regeneración ósea in vitro [1]–[3]. Este regenerador óseo se utilizó como plataforma para el desarrollo de distintos sistemas portadores de fármacos. La primera estrategia implementada para la formulación de estos sistemas fue la adsorción directa de los fármacos en nano-HA_I; los resultados de esta investigación se detallan en este capítulo.

3.1 Síntesis de nano-HA_I a partir de estructuras orgánicas autoensambladas

Comenzaremos describiendo el concepto empleado para la síntesis de hidroxiapatita dado que ambas síntesis utilizadas a lo largo de esta tesis comparten en esencia la misma estrategia. Tanto HA_I como la nueva síntesis de hidroxiapatita (HA_{II}, que se detallará en el capítulo 5), son síntesis hidrotermales que emplean estructuras orgánicas autoensambladas, tales como agregados micelares y poliméricos, como agentes directores de estructura para el desarrollo de materiales inorgánicos [1], [2], [4]–[6]. Así, las superficies de estos agregados dirigen la nucleación de los cristales por complementariedad geométrica, electrostática, y estereoquímica, permitiendo el control de la forma y tamaño de los mismos [1], [2], [7]. De esta manera se consigue una síntesis biomimética debido a su similitud con la equivalente a nivel biológico, donde la matriz

proteica sintetizada por los osteoblastos actúa como plantilla para dirigir la nucleación y crecimiento de los cristales de apatita biológica.

La síntesis de HA_I emplea la asociación de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) y polipropilenglicol (PPG) para dar origen a estas estructuras supramoleculares autoensambladas, un surfactante y un polímero, respectivamente.

Los surfactantes son un grupo de moléculas anfifílicas, es decir, que presentan una afinidad dual, conjugando regiones hidrofílicas con afinidad por el agua, con regiones hidrofóbicas con afinidad por sustancias lipídicas. Estas moléculas presentan la capacidad de autoensamblarse espontáneamente en solución a fin de satisfacer su doble afinidad, y la manera en que lo hacen se correlaciona con su estructura química y las condiciones experimentales [8]–[10]. La forma de estas estructuras autoagregadas estará determinada por la conformación más favorable desde el punto de vista termodinámico, la cual se puede expresar convenientemente a partir del parámetro crítico de empaquetamiento (CPP), que se define a partir de la relación de ciertas variables de tamaño características del anfifilo en un ambiente de solución dado:

$$CPP = v / a l_c \quad (\text{ec. 3.1})$$

donde “v” corresponde al volumen de la/s “colas” hidrocarbonadas; “a”, al área efectiva del grupo “cabeza” del anfifilo y “l_c”, a la longitud de las cadenas hidrocarbonadas.

En la Fig. 3.1 se representan esquemáticamente las formas de autoagregación comúnmente observadas y el parámetro de empaquetamiento crítico característico de los surfactantes que le dan origen.

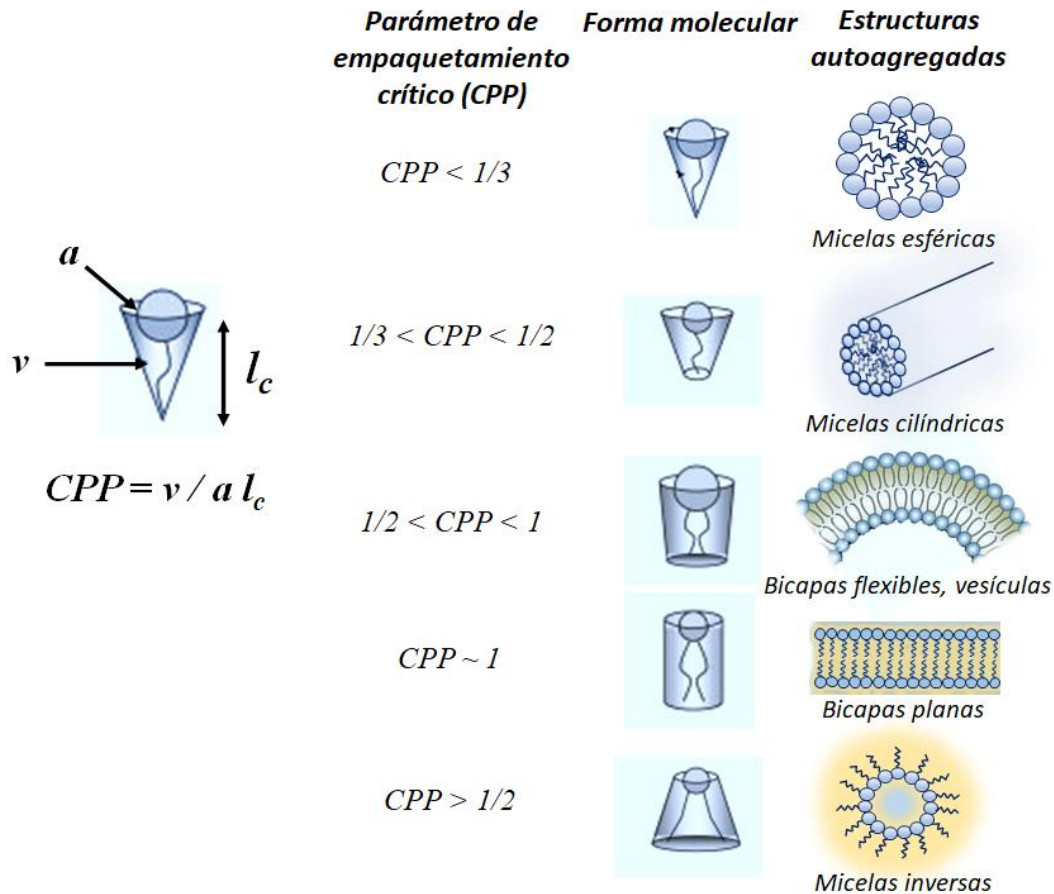


Figura 3.1: representación esquemática de distintas formas de agregación de moléculas anfifílicas en función a su forma molecular expresada a partir del CPP; “v” corresponde al volumen de la/s “colas” hidrocarbonadas; “a”, al área efectiva del grupo “cabeza” del anfifilo y “lc”, a la longitud de las cadenas hidrocarbonadas. Esquema adaptado de la publicación de *Dutt y col* [11].

Los micelas constituyen uno de los tipos de agregación. Estas estructuras se forman por el autoensamblado espontáneo de moléculas anfifílicas cuando se encuentran por encima de una determinada concentración, denominada concentración micelar crítica (CMC), que es característica de cada sistema de surfactante-solvente y dependiente de la temperatura [9].

Sabemos a partir de literatura que el tamaño de un nanocrystal de apatita biológica es de aproximadamente 10 a 100 nm, con forma aplanada, acicular o de rodillos [12]. De modo que podemos valernos de surfactantes, o mezclas de los mismos, que en condiciones establecidas den origen a micelas cilíndricas de tamaño nanométrico y utilizar estas estructuras para dirigir la nucleación de los cristales, a fin de mimetizar la morfología y estructura cristalina de la apatita biológica.

El CTAB ($C_{19}H_{42}BrN$), Fig. 3.2, es una sal de amonio cuaternaria que posee una cadena hidrocarbonada de 16 carbonos y un grupo polar cargado positivamente, por lo que pertenece al grupo de surfactantes catiónicos.

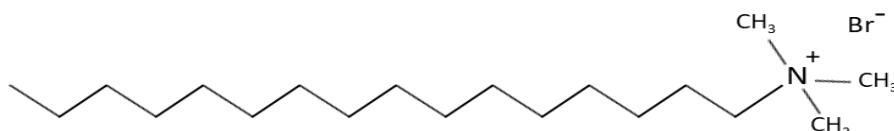


Figura 3.2: Estructura de la molécula de CTAB.

Por encima de su CMC, el CTAB forma micelas esféricas que en presencia de sales experimentan transiciones hacia micelas cilíndricas de aproximadamente 47 nm de longitud [13], [14]. Se ha demostrado, además, el uso de nitrito de sodio ($NaNO_2$) para generar dichas transiciones, permitiendo el desarrollo de micelas cilíndricas estables [15]. De esta manera, las micelas cilíndricas de CTAB moldearán la deposición de los iones fosfato y calcio, y favorecerán la formación de nano-rods de HA [1], [2].

Como se mencionó anteriormente, utilizaremos una asociación surfactante – polímero para dirigir la nucleación de los cristales. Determinados polímeros solubles en agua establecen una interacción sinérgica con las micelas de surfactante al confinar el entorno del medio de reacción, promoviendo un crecimiento controlado de los cristales [1], [2]. Con este fin, se utilizó en esta síntesis PPG (Fig. 3.3), polímero de amplio uso en biotecnología debido a su no toxicidad, bajo costo, y solubilidad en agua a bajas temperaturas [16].

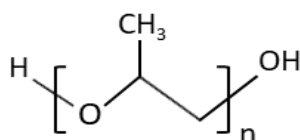


Figura 3.3: Estructura de la molécula de PPG.

Esta síntesis desarrollada y caracterizada en nuestro grupo de investigación propició la obtención de HA nanométrica, bioactiva y biocompatible, de composición química, morfología y tamaño similar a la apatita biológica [1]–[3]. El producto de síntesis corresponde a hidroxiapatita pobremente cristalina (porcentaje de cristalinidad, $X_c\% = 73,83$), deficiente en calcio, que se distingue por una composición no estequiométrica (HA_I , $\text{Ca}_{9,42}(\text{PO}_4)_{5,42}(\text{HPO}_4)_{0,58}(\text{OH})_{1,42}$). La relación Ca/P de la hidroxiapatita teórica es de 1,67 y esa relación es de 1,53 para la obtenida por nuestra síntesis. Todas estas características la asemejan a la apatita biológica, la cual, es pobremente cristalina y presenta distintas modificaciones químicas y/o defectos en su estructura que la hacen diferir de la HA estequiométrica [17], [18].

Con respecto a su bioactividad, HA_I demostró que sus propiedades fisicoquímicas superficiales favorecieron la nucleación, crecimiento y aglomeración de depósitos de fosfatos de calcio esferoidales en su superficie confirmando su bioactividad *in vitro* [1].

Por otra parte, la biocompatibilidad, es decir, la habilidad de un material de estar en contacto con los tejidos vivos sin causar daño, es un requisito imprescindible para un biomaterial implantable [19]. Los ensayos de viabilidad celular *in vitro* constituyen un buen acercamiento para evaluar esta propiedad. En ese sentido, se verificó la viabilidad de cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata cuando fueron cultivados en presencia de nano- HA_I durante 48 y 72 hs [2], [3].

Asimismo, HA_I no se degrada significativamente en condiciones fisiológicas (pH = 7,4; 37°C), mientras que sí lo hace en condiciones de resorción ósea (pH = 4,2; 37°C), demostrando una degradación del ~50% a las 48 h de ensayo, para alcanzar un ~100% luego de 25 días de contacto con el medio ácido [2]. Este perfil de degradación dependiente del pH permite que nano- HA_I pueda potencialmente actuar como soporte estructural temporal del implante, y a la vez permitir los procesos normales de remodelación ósea mediante la degradación ácida mediada por los osteoclastos.

En virtud de todo esto, creemos que nano- HA_I posee propiedades prometedoras de cara a su uso para la reparación de tejidos duros. El objetivo será valernos de estas propiedades para utilizarla como plataforma para desarrollar sistemas portadores de fármacos.

3.2 Administración localizada de fármacos a partir de nano-HA_I

El abordaje del amplio grupo de trastornos que conocemos como enfermedades óseas presenta como dificultad común la baja perfusión del tejido óseo [20]–[24]. Esto genera la necesidad de administrar altas dosis de fármacos por vía oral y/o parenteral durante prolongados períodos para alcanzar concentraciones efectivas de los mismos, lo que conlleva la exposición a un gran abanico de efectos adversos [22], [25]–[28]. El desarrollo de sistemas para la administración local de fármacos a partir de plataformas osteoinductivas representa una estrategia prometedora para superar estos problemas. Esto permite proveer concentraciones efectivas de fármacos en el tejido óseo, evitar los efectos adversos de su administración sistémica en altas dosis y simultáneamente inducir su regeneración.

Tal como se mencionó en el capítulo 1, la necesidad de profilaxis y/o tratamiento antibiótico y antiinflamatorio es común tanto para las intervenciones quirúrgicas implicadas en la colocación de implantes e injertos óseos, así como para enfermedades puntuales, como la osteomielitis [20], [26], [29]–[31]. Para conferirle tales atributos a nano-HA_I, se empleó el antibiótico ciprofloxacina (CIP) y el antiinflamatorio ibuprofeno (IBU).

La ciprofloxacina (CIP) es un antibiótico de amplio espectro perteneciente a la familia de las fluoroquinolonas (Fig 3.4) y ampliamente utilizado para el tratamiento de diversas infecciones, entre ellas, aquellas que afectan al tejido óseo [32]–[35]. Su acción bactericida se debe a que inhibe la síntesis de ADN bacteriano al bloquear la acción de las enzimas ADN-girasa y topoisomerasa IV, ejerciendo una acción letal sobre el microorganismo [32], [36].

Este fármaco presenta ventajas en relación a otros utilizados para terapia dirigida al tejido óseo, entre las que se destacan:

- Amplio espectro, activo frente a un gran número de especies *Gram-negativas* y *Gram-positivas*, con bajos valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) (0,25 – 2 ug/ml) para la mayoría de las especies bacterianas implicadas en infecciones óseas [33], [34], [37], [38].
- Alta penetración del tejido óseo, mayor a la demostrada por Gentamicina, antibiótico frecuentemente incorporado en cementos óseos de PMMA [39], [40].
- Muy buena seguridad, fármaco relativamente no tóxico [37], [41].

- Buena estabilidad térmica y estabilidad en solución a 37°C durante 14 días [23].
- Buena actividad *in vitro* frente a bacilos *Gram-negativos* con resistencia múltiple a antibióticos, así como para *Staphylococcus aureus resistente a meticilina* [37], [41].

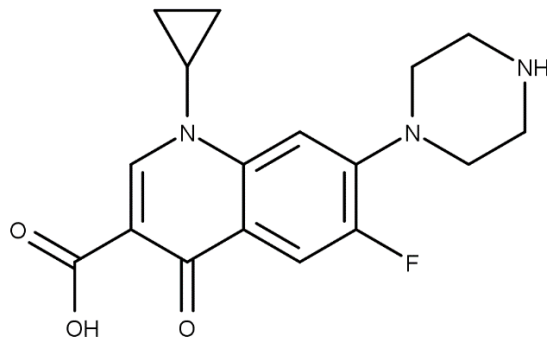


Figura 3.4: Estructura de la molécula de ciprofloxacina.

En la Tabla 3.1 se presentan las concentraciones mínimas de ciprofloxacina que inhiben el crecimiento del 50% (CIM₅₀) y del 90% (CIM₉₀) de las principales especies bacterianas aisladas en infecciones de hueso. Se destaca los bajos valores de CIM para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, especies responsables de más de la mitad de las infecciones de hueso [29]; así como para *Pseudomonas aeruginosa*, patógeno oportunista frecuentemente responsable de infecciones intrahospitalarias [41].

Tabla 3.1: Actividad *in-vitro* de Ciprofloxacina; CIM₅₀ y CIM₉₀ de las principales especies bacterianas aisladas en infecciones de hueso. Adaptado de la publicación de Wolfson and Hooper [37].

<i>Especies bacterianas Gram-negativas</i>	<i>CIM₅₀ / CIM₉₀ (ug/ml)</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,12 / 0,5
<i>Escherichia coli</i>	0,02 / 0,03
<i>Proteus mirabilis</i>	0,06 / 0,13
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,01 / 0,01
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,03 / 0,06
<i>Serratia marcescens</i>	< 0,1 / 1,0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,03 / 0,06
<i>Especies bacterianas Gram-positivas</i>	<i>CIM₅₀ / CIM₉₀ (ug/ml)</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5 / 1,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,25 / 0,25
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,5 / 2,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,0 / 2,0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0,5 / 1,0
<i>Enterococcus faecium</i>	1,0 / 2,0

El ibuprofeno (IBU) (Fig 3.5), por otra parte, es un antiinflamatorio no esteroideo ampliamente utilizado para el alivio del dolor postoperatorio y la inflamación, frecuentemente asociada a estados infecciosos [43], [44]. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima ciclooxygenasa, enzima que cataliza la conversión de ácido araquidónico en eicosanoides mediadores de la inflamación como prostaglandinas y leucotrienos.

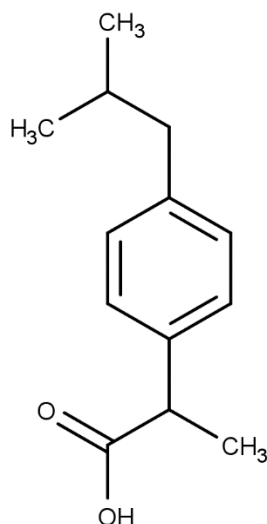


Figura 3.5: Estructura de la molécula de ibuprofeno.

De modo que se plantea el uso de plataformas bioactivas, biodegradables y biocompatibles de HA_I para la administración localizada de ciprofloxacina e ibuprofeno, a fin de evitar los traumas periimplantarios y, simultáneamente, promover la regeneración del tejido. La primera estrategia a evaluar, la adsorción directa de ambos fármacos sobre nano-HA_I, se detalla a continuación.

3.3 Experimental - Materiales y Métodos

3.3.1 Reactivos

Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB, PM = 364,48 g/mol, 99 %, Sigma), Polipropilenglicol (PPG, PM= 425 g/mol, $\delta = 1,004 \text{ g/cm}^3$ a 25 °C, Sigma-Aldrich), Fosfato de sodio (Na₃PO₄, PM = 148 g/mol, 96 %, Sigma), Cloruro de calcio (CaCl₂, PM = 91 g/mol, 99 %, Sigma), Nitrito de sodio (NaNO₂, PM = 69 g/mol, 97 %, Sigma), Ácido acético (C₂H₄O₂, 99%, Sigma – Aldrich), trihidrato de acetato de sodio (C₂H₃NaO₂·3H₂O, 99%, Sigma – Aldrich), hidróxido de sodio (NaOH, 97%, Sigma – Aldrich), solución salina buffer fosfato (tabletas de PBS, Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, Sigma – Aldrich), Ciprofloxacina (CIP, PM = 331,346 g/mol, $\geq 98\%$, Sigma), Ibuprofeno (IBU, PM= 206,29 g/mol, $\geq 98\%$, Sigma), L-arginina (L-ARG, PM = 174,20 g/mol, $\geq 98\%$, Sigma). Se utilizó agua tridestilada para la preparación de todas las soluciones.

3.3.2 Síntesis de HA_I a partir de plantillas CTAB/PPG

Para la síntesis de HA_I se siguieron los procedimientos desarrollados en nuestro grupo de investigación por D'Elía y col [1]–[3]. Se añadieron 20 mL de PPG a 350 mL de solución micelar de CTAB (3,13 mM) a temperatura ambiente, bajo agitación magnética a 500 rpm hasta su total incorporación. Manteniendo la agitación, se incorporaron secuencialmente 200 mL de solución acuosa de NaNO₂ 2 M y 2,2 g de CaCl₂. Para concluir, a la solución mixta anterior se le adicionó gota a gota 200 mL de solución acuosa de Na₃PO₄ (0,14 M). Después de la integración de todos los reactivos, la solución se agitó durante 1 h. La mezcla resultante se dejó durante 24 h en autoclave a 100 °C. Una vez finalizado el tratamiento hidrotermal, se obtienen dos fases en el medio de reacción; un sobrenadante que es descartado, y un precipitado donde está el material sintetizado. Este precipitado se filtra y se lava con agua Milli-Q para remover impurezas. Luego el material se somete a calcinación a 400 °C durante 3 h para eliminar por completo los restos de componentes orgánicos (surfactante y polímero).

Los nanopartículas de HA_I fueron caracterizados por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM/H-TEM), Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FT-IR) y Potencial Zeta (ζ).

3.3.2.1 Microscopía electrónica de transmisión

Las nanopartículas sintetizadas fueron observadas utilizando un microscopio de transmisión de electrones (TEM) CM-12 Philips equipado con una cámara digital MEGA VIEW-II DOCU, y operado a 120 kV con un aumento de 730.000×. Los materiales en polvo se colocaron sobre portamuestras de cobre (2.000 *mesh*) y las observaciones se realizaron en campo brillante. Para el análisis morfológico de las nanopartículas se utilizaron las micrografías TEM obtenidas, mientras que las dimensiones de las nanopartículas se calcularon con el programa de procesamiento de imágenes digitalizadas ImageJ®.

Además, se obtuvieron micrografías de alta resolución (H-TEM) utilizando un microscopio Libra 200 FE OMEGA que trabaja a un voltaje operativo de 200 kV, lo que corresponde a un aumento máximo de 1 000 000×. Las muestras en polvo se colocaron sobre portamuestras de carbono de (2000 *mesh*) y las observaciones se realizaron en

campo brillante. Los patrones de difracción de electrones de área selecta (SAED) se obtuvieron aplicando la transformada de Fourier a micrografías H-TEM mediante el software gratuito de procesamiento de imágenes digitalizadas ImageJ®.

3.3.2.2 Difracción de rayos X en polvo

Los espectros de difracción de rayos X (DRX) de las muestras fueron obtenidos utilizando un difractómetro Philips PW 1710 con radiación Cu Ka ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) y un monocromador de grafito operado a 45 kV, 30 mA y 25 °C.

3.3.2.3 Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

Las muestras (HA_I y HA_I/L-ARG) se analizaron utilizando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) en el rango de longitud de onda de 4000-400 cm⁻¹, con el equipo Fourier Nicolet FT-IR Nexus 470. Las muestras se realizaron al 1% m/m en KBr (grado FT-IR, Aldrich Chemical Co.); por lo tanto, 1,5 mg de cada muestra y 150 mg de KBr secados en estufa se homogeneizaron completamente en un mortero de ágata con precaución para evitar la humedad. Cada registro se realizó por triplicado. Para el fondo se preparó una muestra de KBr puro.

3.3.2.4 Potencial Zeta (ζ)

El potencial zeta (ζ) de nano-HA_I y de las nanopartículas con principios activos adsorbidos se midió a $25,0 \pm 0,1 \text{ °C}$ mediante un equipo Malvern Zetasizer Nano (ZS90) con un láser de He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$). El software del instrumento proporciona el potencial zeta a partir de medidas de movilidades electroforéticas (μE), utilizando la ecuación de Henry [45].

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(Ka)}{3\eta} \quad (\text{ec. 3.2})$$

donde U_E es la movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica, z es el potencial ζ , $f(Ka)$ es la función de Henry y η es la viscosidad.

3.3.3 Desarrollo de plataformas HA_I/CIP y HA_I/L-ARG/IBU

El desarrollo de estas plataformas se llevó a cabo mediante la adsorción de los fármacos de manera individual sobre HA_I a partir de soluciones acuosas de los mismos. Se utilizaron tres soluciones para evaluar el comportamiento de adsorción: buffer fosfato (PBS, 10 mM, pH=7,4); buffer fosfato (PBS, 100 mM, pH=6) y buffer acetato (AcB, pH=4,2).

Los experimentos de adsorción se llevaron a cabo durante 7 días (10.080 min) en tubos de vidrio de fondo redondo de 5 ml, sumergidos en un baño termostático a 37 °C. Se incorporaron 3,5 mg de HA_I en 4 ml de soluciones acuosas de CIP a los tres pH mencionados con rangos de concentración de 0,004 - 0,039 mM. Al final de cada período de adsorción, la muestra se centrifugó durante 3 min a una velocidad de 9000 min⁻¹. Luego, se analizó la concentración del sobrenadante de CIP antes y después de la adsorción a $\lambda = 275$ nm en un espectrofotómetro de barrido UV-Vis-NIR (Varian Cary 100 Bio), provisto de un controlador de temperatura (UV09005M013), utilizando una celda de cuarzo rectangular de 1 cm de longitud de trayectoria.

El proceso de adsorción de IBU se llevó a cabo en experimentos independientes utilizando la misma metodología y condiciones que las utilizadas para el estudio de adsorción CIP; sin embargo, para aumentar la interacción entre HA_I e IBU, siendo ambas estructuras cargadas negativamente a los pH de trabajo, primero se adsorbió el aminoácido L-arginina (L-ARG) en nano-HA_I y luego se evaluó la interacción con IBU. De esta manera, la arginina actúa como agente enlazante para IBU, estrategia abordada con éxito en estudios anteriores para permitir adsorción de especies con carga neta negativa (material genético) en nano-HA [46]. La concentración utilizada de L-ARG se estableció con modificaciones de la relación PO₄⁻³: L-ARG (1:6) reportada por Wang *et al.*[46]. Así, para efectuar su adsorción, se incubaron 3,5 mg de HA_I en 5 ml de una solución acuosa de L-ARG (0,046 M) a pH 6, durante 24 h, a temperatura ambiente. La L-ARG presenta a pH 6 la mayor cantidad de moléculas con una carga neta positiva (dos cargas positivas y una negativa), lo cual favorece su interacción con HA, con carga neta negativa a este pH. Luego, se descartó el sobrenadante después de centrifugar a 9000 rpm durante 12 min. Las nanopartículas precipitadas (HA_I/L-ARG) se secaron a 60°C hasta peso constante y finalmente se verificó la adsorción del aminoácido en tres experimentos independientes por medidas de potencial zeta (ζ), FT-IR y análisis elemental (AE). Esta última técnica se utilizó para obtener el porcentaje de nitrógeno correspondiente al

aminoácido adsorbido, utilizándose para ello el analizador elemental Exeter Analytical CE-440.

Una vez obtenida HA₁/L-ARG, se procedió a promover la adsorción de IBU, utilizando la misma metodología y condiciones que las mencionadas para la adsorción CIP. El rango de concentración de IBU en los tres medios de adsorción fue de 0,145 a 1,45 mM. Las concentraciones adsorbidas de IBU se midieron mediante espectroscopia UV-Vis siguiendo la misma metodología que para CIP a $\lambda = 224$ nm.

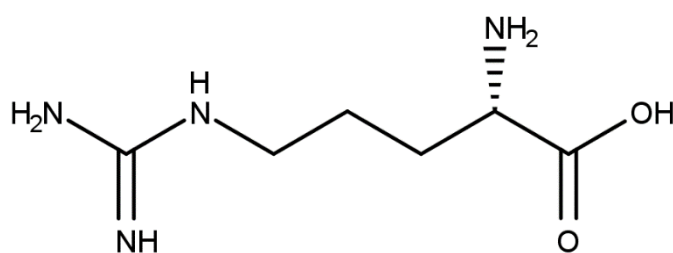


Figura 3.6: Estructura de la molécula de L-ARG.

3.3.4 Liberación los fármacos a partir de las plataformas HA₁/CIP y HA₁/L-ARG/IBU

El proceso de cicatrización de heridas, así como el remodelado óseo normal, constituyen procesos fisiológicos complejos, cuyas etapas tienen lugar en condiciones de pH controladas diferentes. Si bien el pH fisiológico normal de los fluidos corporales es 7,4, tenemos fluctuaciones en distintos procesos y tejidos. Encontramos que el pH superficial de la piel fluctúa entre 4,2 – 5,6 [47]; pero una vez en condiciones de herida abierta el pH normal de los tejidos sub epidérmicos (7,4) se acidifica en los estadios iniciales del proceso de curación, estableciéndose en torno a 6 [48]. Por otra parte, durante el remodelado normal del tejido óseo, la resorción tiene lugar a pH ácido estimado entre 4 y 5 [49]. Debido a esto, consideramos importante evaluar el comportamiento de liberación de los fármacos en el rango de pH 4,2 - 7,4. Para ello, se utilizaron los tres medios mencionados para el ensayo de adsorción: buffer fosfato (PBS, 10 mM, pH=7,4;

condiciones fisiológicas); buffer fosfato (PBS, 100 mM, pH=6, condiciones de herida abierta) y buffer acetato (AcB, pH =4,2, condiciones de piel sana y resorción ósea).

Los experimentos de desorción se llevaron a cabo a 37°C durante 7 días (10.080 min) en las tres condiciones de pH citadas, con excepción de las muestras a pH 4,2, como se explicará abajo. Cada muestra de HA_I/CIP y HA_I/L-ARG/IBU se incubó en los tres medios en experimentos independientes, cuantificándose la presencia de los fármacos liberados a diferentes tiempos mediante espectroscopia UV-Vis.

3.3.5 Modelos empleados para el análisis de los procesos de adsorción y desorción

Se utilizaron tres modelos de isotermas para analizar el comportamiento de adsorción: Langmuir [50], Freundlich [51], Sips [52]. Cabe destacar que estos modelos fueron concebidos originalmente para explicar la adsorción de gases en sólidos [53]. Sin embargo, los principios postulados por los mismos son aplicables para la adsorción en fase líquida y han sido empleados con éxito para explicar el comportamiento de numerosos sistemas, tal como puede observarse a partir de lo informado en literatura [53]–[57].

Debido a que el proceso de adsorción de ambos fármacos en HA_I depende del tiempo, a partir de los experimentos de adsorción se evaluó el comportamiento cinético utilizando el modelo de Avrami [58]. Es importante remarcar que los estudios de adsorción, cinética de adsorción y desorción a pH 4,2 se realizaron durante 24 h (1.440 min) debido a que las nanopartículas de hidroxiapatita comienzan a degradarse a partir de las 30 h de incubación a dicho pH [2], lo que conduciría a un aumento de la liberación de los fármacos por disolución de HA_I y no solo por un proceso de desorción.

Finalmente, los resultados del ensayo de liberación se ajustaron mediante el modelo de Kosmeyer-Peppas [59], [60].

La aplicación de los modelos empleados se describió extensamente en la literatura y sus características fundamentales se resumen en la siguiente sección.

3.3.5.1 Modelos de adsorción

Los modelos de adsorción describen la retención de una sustancia (adsorbato) desde una fase acuosa en una superficie sólida (adsorbente) a temperatura y valores de pH constantes [61]. Cuando el adsorbato de la solución se mantiene en contacto con el adsorbente durante un tiempo suficiente, se establece un equilibrio de adsorción; sin embargo, para esto, es necesaria una interacción dinámica entre el adsorbato y la superficie [60], [62].

El modelo de isoterma de *Langmuir* (ec. 3.3) ha sido el más utilizado entre los modelos de isoterma de dos parámetros para describir los datos de adsorción experimental [55]. El mismo supone que la cantidad máxima de fármaco adsorbido coincide con una monocapa saturada de moléculas de adsorbato (una molécula de espesor) sobre la superficie del adsorbente. El modelo asume sitios idénticos a lo largo de una superficie homogénea del material, donde la adsorción tiene lugar con energías de sorción uniformes y solo puede ocurrir en un número fijo (predeterminado) de ciertos sitios localizados [50], [63]. No hay interacción lateral ni impedimento estérico entre las moléculas adsorbidas, incluso en sitios adyacentes [64], [65].

Modelo de isoterma de Langmuir:

$$q_e = \frac{q_{mon}K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (\text{ec. 3.3})$$

donde K_L es la constante de Langmuir (l/mmol) y está relacionada con la energía de adsorción, mientras que q_{mon} es la cantidad máxima de adsorbato que corresponde a la cobertura completa de la superficie del adsorbente. La capacidad de adsorción en el equilibrio, q_e (mmol/g), se calcula con la ecuación 3.3, donde C_0 (mmol/l) es la concentración inicial, C_e la concentración residual en el equilibrio (mmol/l), V es el volumen de la solución (l) y n es la masa de adsorbente (mg).

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)V}{n} \quad (\text{ec. 3.4})$$

Una vez obtenido K_L (l/mmol), se puede calcular una constante adimensional conocida como factor de separación (R_L) para predecir la eficiencia de adsorción:

$$R_L = \frac{1}{1+K_L C_0} \quad (\text{ec. 3.5})$$

Donde C_0 es la concentración inicial más alta de soluto. El factor de separación indica que la naturaleza de la adsorción es favorable ($0 < R_L < 1$), desfavorable ($R_L > 1$), lineal ($R_L = 1$) o irreversible ($R_L = 0$) [53].

El modelo de isoterma de *Freundlich* es el primer modelo de adsorción para describir un sistema no ideal, reversible, que involucra energía superficial heterogénea y que no está restringido a la formación de una monocapa [51].

Así este modelo se puede aplicar a la adsorción multicapa, con una distribución no uniforme del calor de adsorción y, por lo tanto, los sitios de unión tienen diferente energía, siendo primero ocupados aquellos con mayor energía de unión. Mientras que las moléculas de adsorbato se unen al absorbente, la energía de sus sitios de unión disminuye exponencialmente [66].

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (\text{ec. 3.6})$$

Donde K_F es la constante de Freundlich y es un indicador de la capacidad de adsorción; q_e (mmol/g) es la capacidad de adsorción en equilibrio; y $1/n$ es la intensidad de adsorción que proporciona una medida de que tan favorable es el proceso de adsorción. Así el valor del exponente puede ser indicador de un proceso de adsorción favorable ($0 < 1/n < 1$), desfavorable ($1/n > 1$) o irreversible ($1/n = 1$) [53].

El modelo de isoterma de *Sips* [52] corresponde a uno de los modelos de tres parámetros que más aplicación ha demostrado al combinar los modelos de Langmuir y Freundlich a partir de una expresión que exhibe un límite finito para concentraciones altas de adsorbato, lo cual pretende resolver los problemas del modelo de Freundlich a dichas concentraciones [61]. El modelo es adecuado para predecir la adsorción en superficies heterogéneas y la adsorción localizada sin interacción adsorbato – adsorbato [56] ; se modela con la ecuación:

$$q_e = \frac{q_m b C_e^{1/ns}}{1 + b C_e^{1/ns}} \quad (\text{ec. 3.7})$$

Donde b (l/mmol) es la constante Sips y representa la energía involucrada en el proceso de adsorción; C_e la concentración residual en el equilibrio (mmol/l); q_m es la cantidad máxima de adsorbato que corresponde a la cobertura completa de la superficie del adsorbente; $1/ns$ es el exponente de Sips, a menudo considerado como el factor de heterogeneidad del sistema. Cuando dicho exponente adopta el valor 1, la isoterma de Sips se reduce a la isoterma de Langmuir; por lo que valores de $1/ns$ tendientes o próximos a 1 indican una superficie de adsorción ideal relativamente homogénea, mientras que valores que distan de la unidad se asocian a un mayor grado de heterogeneidad en el sistema que puede deberse al adsorbente, al adsorbato o a una contribución de ambos [53], [56], [57], [67].

El ajuste de los modelos se evaluó a partir de procedimientos no lineales utilizando el software informático ORIGIN® (versión 9.0).

3.3.5.2 Modelo cinético de adsorción

El comportamiento cinético de adsorción viene dado por las ecuaciones de Langergren que se han utilizado para la mayoría de los trabajos de cinética de adsorción [68]. Estas expresiones son casos especiales de la ecuación cinética general de Langmuir [69]. Sin embargo, los cambios de las tasas de adsorción en función del tiempo de contacto y otros cambios que dependen de la temperatura son la carencia de este modelo.

En este análisis se ha utilizado la ecuación de Avrami para evaluar el comportamiento cinético de adsorción:

$$q_t = q_e (1 - \exp^{-[k_{av}t]^n}) \quad (\text{ec. 3.8})$$

donde k_{av} es la constante de velocidad cinética de Avrami y n es el orden de la reacción. Este modelo no considera mecanismos de interacción, lo cual es un inconveniente del mismo.

3.3.5.3 Modelo cinético de liberación de fármacos

El modelo de Korsmeyer-Peppas [59] es muy utilizado para describir la entrega de fármacos desde diversas formulaciones farmacéuticas, permitiendo caracterizar distintos mecanismos de liberación. El modelo se representa mediante la siguiente ecuación:

$$Q = k_{KP} t^n \quad (\text{ec. 3.9})$$

Donde Q es la cantidad acumulada de fármaco liberado en el tiempo [también podría expresarse como M_t/M_∞ (liberación fraccionada de soluto)]; k_{KP} es la constante de velocidad de liberación y “ n ” es el exponente difusional. El valor de “ n ” caracteriza el mecanismo de liberación del fármaco, $n \leq 0,45$ corresponde a un mecanismo de difusión Fickiano; $0,45 < n < 0,89$ corresponde al transporte no Fickiano; $n = 0,89$ para transporte de relajación y $n > 0,89$ para transporte de super-relajación [70]–[73]. Para obtener el exponente difusional solo se debe tomar la porción $Q\% < 60$ de la curva de liberación [74], [75].

3.3.6 Capacidad de carga y liberación

La eficiencia de encapsulamiento porcentual (EE %) y la capacidad de carga de los fármacos por nano-HA_I (DL_{HA}) se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$EE\% = \frac{W_{total} - W_{lib}}{W_{total}} \times 100 \quad (\text{ec. 3.10})$$

$$DL_{HA} = \frac{W_{total} - W_{lib}}{W_{HA}} \quad (\text{ec. 3.11})$$

donde W_{lib} representa la cantidad de fármaco cuantificada en el sobrenadante, W_{total} y W_{HA} la cantidad total de fármaco y HA_I añadidas inicialmente al sistema, respectivamente.

Los porcentajes de concentración máxima liberada por ambas plataformas se establecieron de la siguiente manera:

$$DR\% = \frac{W_{lib}}{W_{cargada}} \times 100 \quad (\text{ec. 3.12})$$

donde W_{lib} y $W_{cargada}$ son la cantidad de fármaco en el sobrenadante después de la liberación y la cargada, respectivamente.

3.3.7 Análisis Estadístico de los datos

Todos los experimentos se realizaron por triplicado como mínimo. Todos los valores se informaron como valor medio \pm desviación estándar (DE). El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía). La prueba t de Student y los valores de probabilidad por debajo de 0,05 ($p < 0,05$) se consideraron significativamente diferentes.

3.4 Resultados y Discusión

3.4.1 Caracterización fisicoquímica de HA_I

Se estudió la morfología de las nanopartículas mediante microscopía TEM. Se pueden observar a partir de las micrografías como partículas uniformes con forma de rodillos (nano-rods), alargadas y de bordes redondeados (Fig. 3.7). Su diámetro (15 ± 2 nm) y su longitud (53 ± 14 nm) se corresponden con los valores informados previamente por D'elia et al [1]–[3], [7].

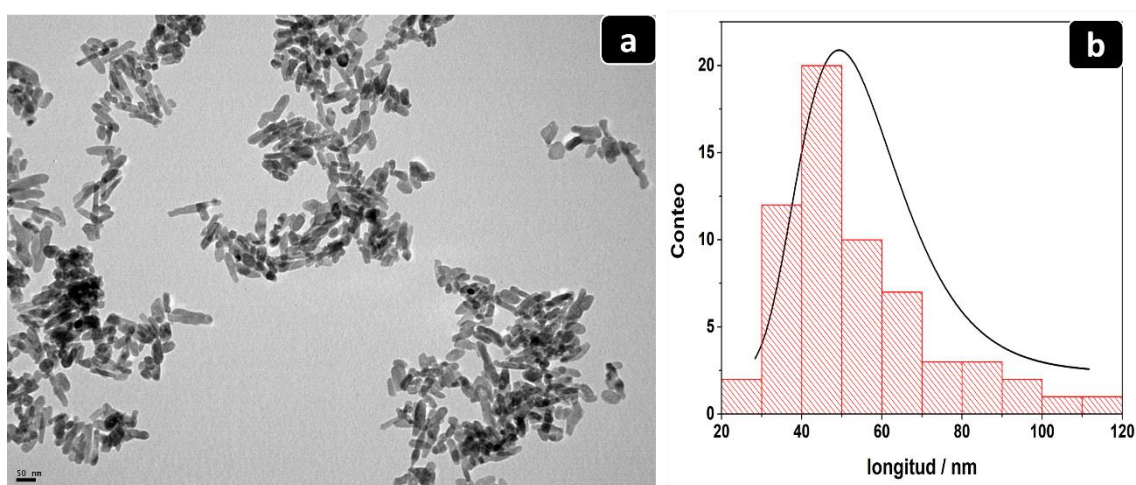


Figura 3.7: Micrografía TEM de los nano-rods de HA_I (a). El histograma (b) muestra la distribución de tamaño en el eje longitudinal de las nanopartículas. Figura adaptada de referencia [76].

Se comprobó la identidad cristalográfica a partir del análisis del espectro de DRX (Fig. 3.8) al corroborar que los picos de difracción del material se ajustan con los picos indexados en la base de datos JCPDS (“Joint Committee on Powder Diffraction Standards”) número 00-09-0432 para la HA hexagonal con la siguiente fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

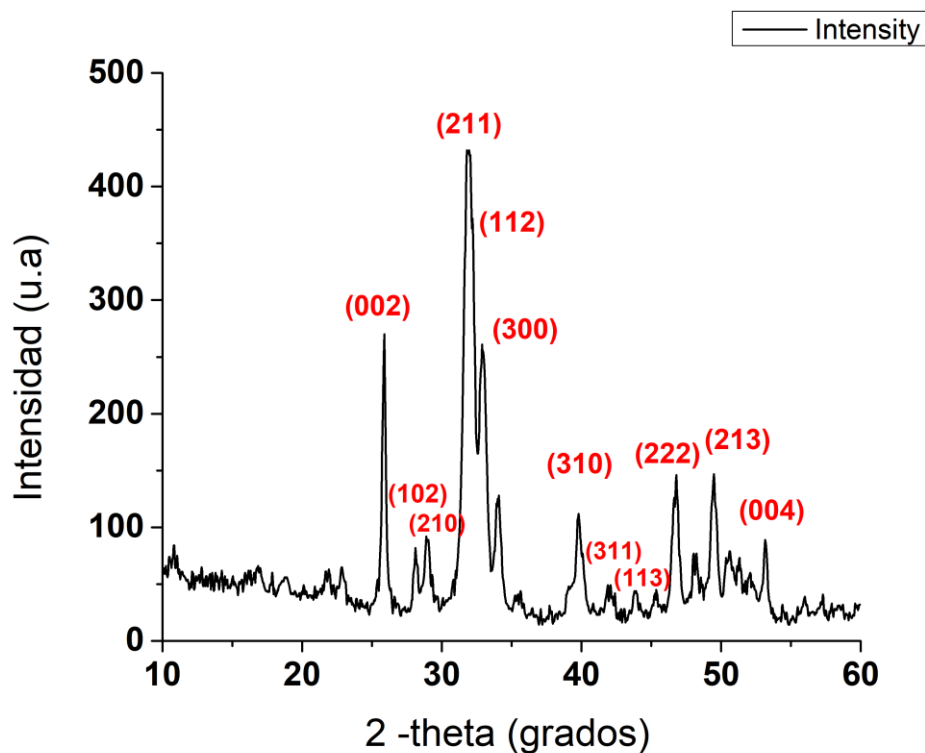


Figura 3.8: Espectro de DRX correspondiente a nano- HA_I .

La estructura microcristalina se evidenció mediante la evaluación de los patrones de difracción de electrones de área seleccionada (SAED) que se pueden extraer de la transformada rápida de Fourier (FFT) a partir de microfotografías de H-TEM, Fig. 3.9 a y b, mediante el procesamiento de imágenes digitalizadas utilizando el software ImageJ[®]. Se obtuvieron varias imágenes de difracción de electrones puntuales de monocristal, tales como la que se informa en la Fig. 3.9 c. La representación de difracción de electrones muestra un patrón hexagonal perfecto característico de la celda unitaria de HA, que se puede indexar como planos (002) después de las mediciones de distancias interplanares, $d = 0.345 \text{ nm}$, Fig. 3.9 d.

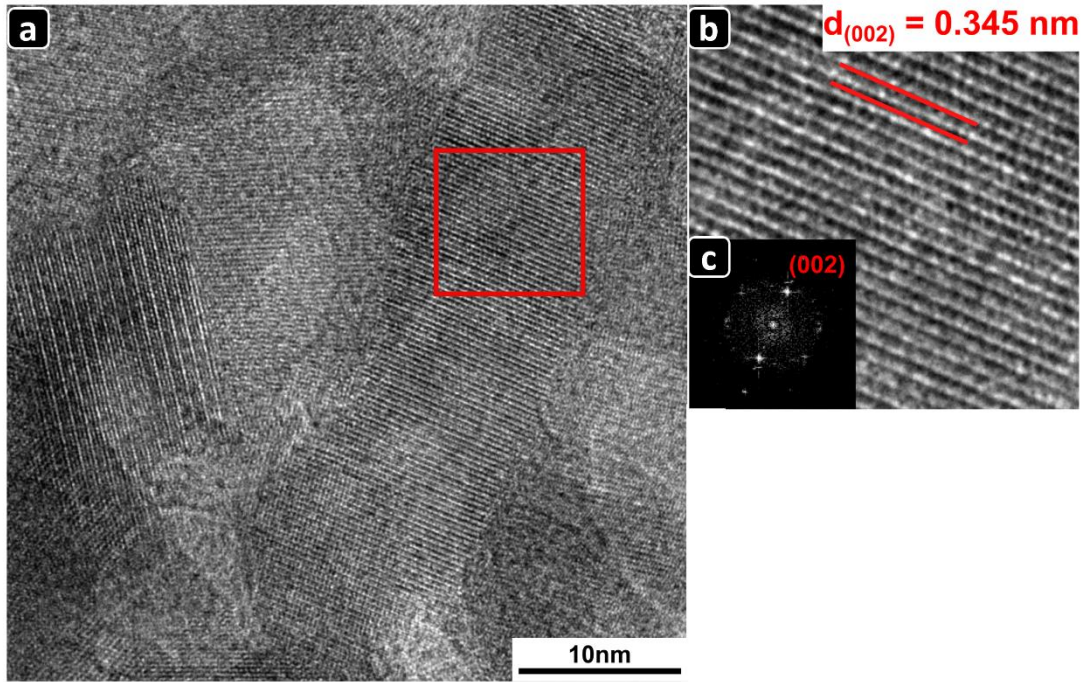


Figura 3.9: Microfotografías H-TEM de nano- HA_I . (a) nano-rods de HA_I , (b) planos cristalinos, (c) patrones de difracción de electrones de área seleccionada (SAED). El área analizada se indica en recuadro rojo. Figura adaptada de referencia [77].

Es sabido que la presencia de diferentes grupos cargados en la superficie de las nanopartículas les confiere propiedades eléctricas que, combinadas con su tamaño, tienen gran influencia en las propiedades de biointegración [78]. Por lo tanto, la presencia de estos grupos funcionales ha sido verificada por FT-IR y el balance de carga de las partículas, en los tres medios estudiados, se obtuvo por potencial ζ .

El espectro FT-IR de nano- HA_I se muestra en la Fig. 3.10. En esta figura se marcan las bandas vibratorias de los grupos fosfato y el estiramiento de los grupos -OH. Las bandas de absorción de fosfato se muestran en 1036 (ν_3), 602 (ν_2), 563 (ν_4) cm^{-1} ; la región entre 3000 y 3700 cm^{-1} está relacionada con el estiramiento -OH; mientras que el área de 3440 y 1650 cm^{-1} refleja el agua adsorbida en la superficie de los nanomateriales.

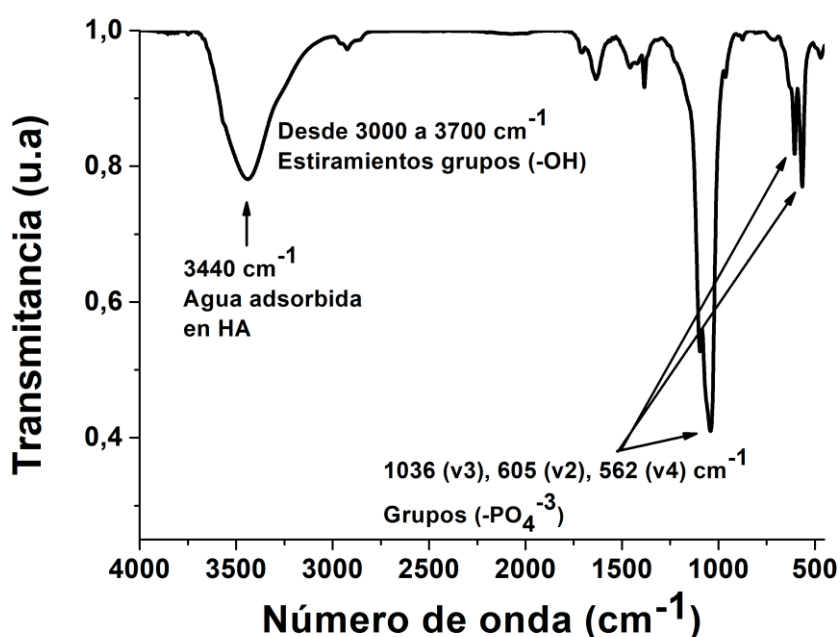


Figura 3.10: Espectro FT-IR de nano-HA_I

Por otra parte, los valores de potencial ζ estuvieron muy influenciadas por el pH del medio; su rango fue desde -13,48 mV, para las nanopartículas en PBS, a -21,12 mV en AcB. La carga negativa en la superficie de las nanopartículas la confiere la presencia de grupos fosfatos; sin embargo, el Ca^{2+} en la superficie disminuye su potencial negativo debido a su carga positiva. Estos resultados, y los de las nanopartículas con fármacos adsorbidos, se presentan en la Tabla 3, en la siguiente sección.

3.4.2 Evaluación del comportamiento independiente de adsorción de CIP e IBU en HA_I

Para determinar el mecanismo de adsorción de los fármacos y evaluar el efecto del pH sobre la capacidad de adsorción, los datos experimentales se ajustaron a la ecuación de Langmuir, Freundlich y Sips (Fig. 3.11). Se presentan las isothermas ajustadas para CIP (Fig. 3.11, a – c) y las correspondientes a la adsorción de IBU (Fig. 3.11, d – f). Los parámetros derivados de los ajustes, desviaciones estándar y sus respectivos coeficientes de determinación (R^2) se resumen en la Tabla 2.

El proceso de adsorción de ambos fármacos describe isothermas de tipo “L” o “tipo Langmuir” según la clasificación propuesta por Giles et al [79]. Se observa que cuanto mayor es la concentración de adsorbato, mayor es la capacidad de adsorción hasta que se limita el número de sitios de adsorción, ocurriendo competencia entre las moléculas de fármaco por los sitios disponibles.

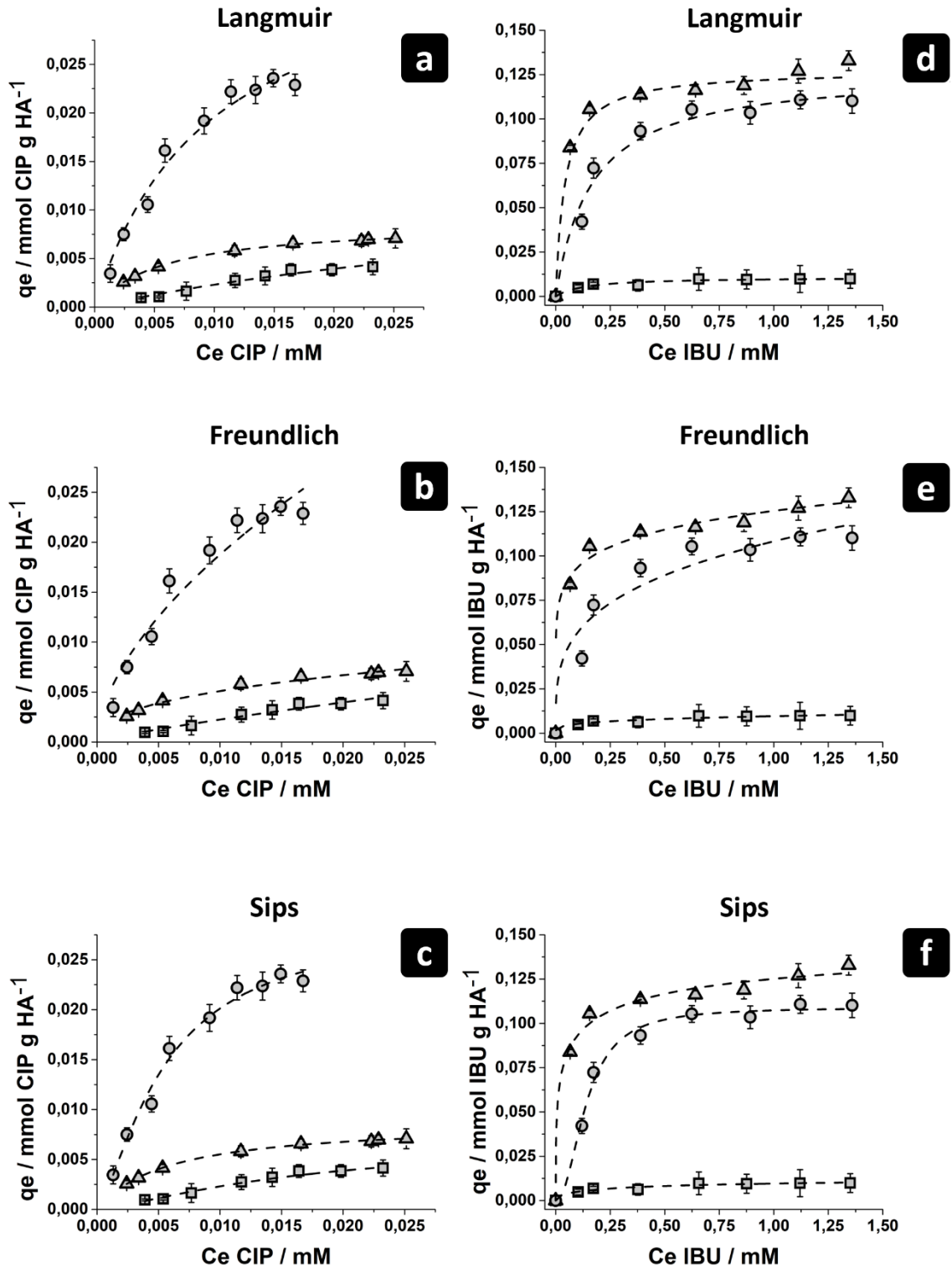


Figura 3.11: Representaciones gráficas de los modelos de ajuste propuestos (líneas de puntos) a nuestros valores de adsorción experimentales de CIP (a - c) e IBU (d -f) a diferentes pH: 4,2 (cuadrados), 6 (círculos) y 7,4 (triángulos).

La Tabla 3.2 muestra que el modelo de isoterma que mejor se ajustó a los datos experimentales relativos a la adsorción de CIP fue el modelo Sips para los tres medios estudiados, con valores de coeficientes de determinación cercanos a la unidad. Esto sugiere que la superficie de nano-HA_I no es homogénea y que los diferentes sitios de adsorción en su superficie no son energéticamente equivalentes. Esto es coherente con la naturaleza de la hidroxiapatita dada por los grupos PO₄³⁻ y Ca²⁺ y con las características superficiales de HA_I estudiadas en nuestro grupo de investigación por D'elia y col. [1], [2].

Tabla 3.2: valores de los parámetros y R² obtenidos para los tres modelos utilizados para analizar el proceso de adsorción de CIP.

<i>Modelo</i>	<i>Medio de ads.</i>	<i>R_L</i>	<i>K_L (l/mmol)</i>	<i>q_{mon} (mmol/g)</i>	<i>R²</i>
<i>Langmuir</i>	pH 4,2	0,597	20,439 ± 10,316	0,0136 ± 0,0051	0,9602
	pH 6	0,235	83,194 ± 21,488	0,0384 ± 0,0039	0,9728
	pH 7,4	0,150	172,025 ± 5,129	0,0087 ± 8,01e-5	0,9987
			<i>n</i>	<i>K_F</i>	<i>R²</i>
<i>Freundlich</i>	pH 4,2		1,225 ± 0,140	0,0967 ± 0,0373	0,9465
	pH 6		1,721 ± 0,107	0,2728 ± 0,0874	0,9383
	pH 7,4		2,552 ± 0,192	0,0310 ± 0,0038	0,9729
		<i>1/ns</i>	<i>b (l/mmol)^{1/ns}</i>	<i>qm (mmol/g)</i>	<i>R²</i>
<i>Sips</i>	pH 4,2	1,358 ± 0,299	263,676 ± 51,923	0,0069 ± 0,0024	0,9887
	pH 6	1,391 ± 0,120	139,502 ± 12,043	0,0288 ± 0,0024	0,9944
	pH 7,4	1,022 ± 0,059	173,607 ± 6,818	0,0087 ± 0,0003	0,9988

El modelo de Freundlich fue el que peor correlación mostró con los datos experimentales, expresado en los valores de R² más bajos. Sin embargo, la adsorción de CIP estuvo aceptablemente representada por la isoterma de Langmuir, con valores de R² cercanos a la unidad a pH 7,4, lo cual sugiere que probablemente el proceso de adsorción haya estado dominado por la formación de una monocapa. Adicionalmente, los valores de R_L (0 < R_L < 1), así como los valores del parámetro “n” de Freundlich (n > 1), sugieren que HA_I es favorable para la adsorción de CIP en los tres medios estudiados.

La concentración de equilibrio de CIP adsorbida (q_e) fue 0,0072 (mmol/g HA_I) a pH 7,4; 0,0226 (mmol/g HA_I) a pH 6 y 0,0042 (mmol/g HA_I) a pH 4,2. Estas concentraciones representan una eficiencia de encapsulamiento (EE%) de fármaco de $(16,1 \pm 2,3) \%$ a pH 7,4; $(49,7 \pm 5,4) \%$ a pH 6; y $(9,4 \pm 1,3) \%$ a pH 4,2.

De modo que la concentración de CIP adsorbida en las nanopartículas dependió en gran medida del pH. Este comportamiento se debe a los cambios en las condiciones de potencial superficial de las nanopartículas cuando varía el pH (Tabla 3.3) y a las propiedades de ionización de CIP a diferentes pH (Fig. 3.12).

Tabla 3.3: valores de potencial ζ relativos a nano-HA_I cargada y desprovista de fármaco en los tres medios de estudio.

<i>Plataformas</i>	<i>Medio (pH)</i>	<i>potencial $\zeta \pm SD$ (mV)</i>
<i>nano-HA_I</i>	7,4	-13,4 \pm 1,2
<i>nano-HA_I</i>	6	-19,3 \pm 1,4
<i>nano-HA_I</i>	4,2	-21,1 \pm 1,8
<i>HA_I/CIP</i>	7,4	-15,4 \pm 1,4
<i>HA_I/CIP</i>	6	-10,8 \pm 1,3
<i>HA_I/CIP</i>	4,2	-4,1 \pm 0,8
<i>HA_I/L-ARG</i>	6	-7,2 \pm 0,6
<i>HA_I/L-ARG/IBU</i>	7,4	-14,2 \pm 0,8
<i>HA_I/L-ARG/IBU</i>	6	-21,3 \pm 1,1
<i>HA_I/L-ARG/IBU</i>	4,2	-9,5 \pm 1,2

En la Fig. 3.12 se presenta la distribución de especies de CIP en solución en función del pH. La ciprofloxacina tiene un esqueleto bicíclico y dos grupos ionizables principales: el grupo carboxilato (COO⁻), que presenta carga negativa cuando se ioniza y el grupo amina (NH) del anillo de piperazina, que se vuelve positivo al ionizarse.

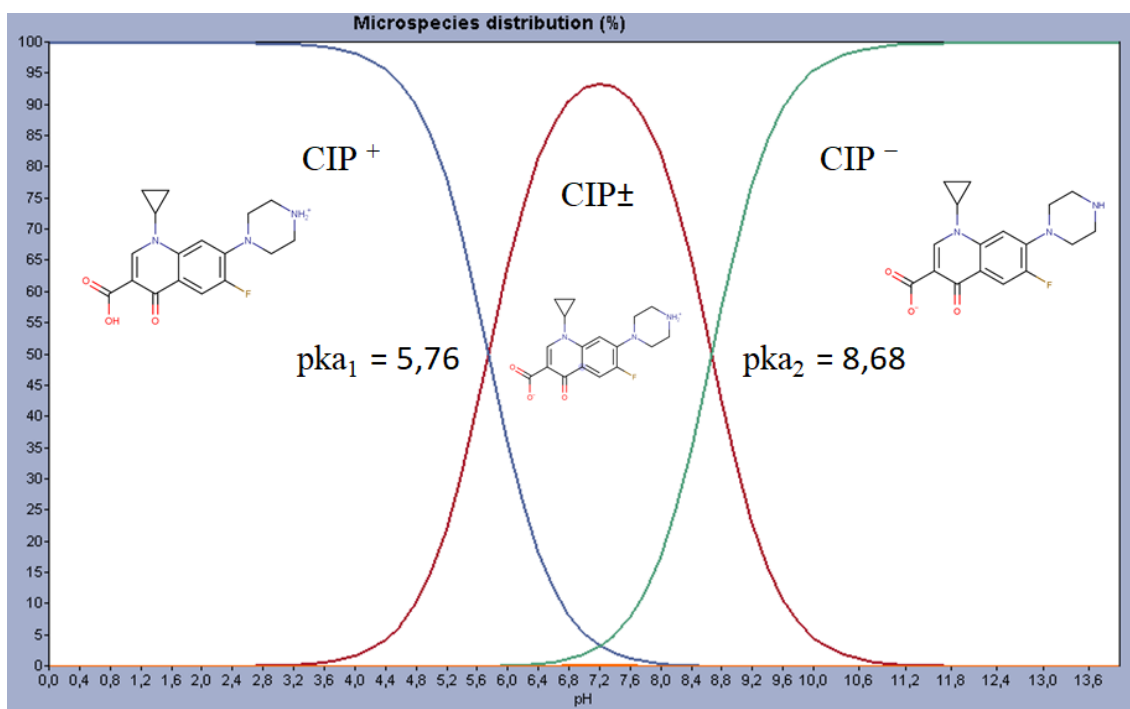


Figura 3.12: Distribución de especies de CIP en solución en función del pH. Se presentan las especies predominantes: anión (CIP^-), catión (CIP^+) y zwitterion (CIP^\pm)

El grupo carboxilato tiene un pKa de 5,76 y la amina cíclica de 8,68 [80]. En consecuencia, esta molécula exhibe cinco especies dependiendo de los valores de pH: neutral (CIP° , de contribución despreciable), anión (CIP^-), catión (CIP^+), catión (CIP^{++} , solo presente a $\text{pH} < 1$) y zwitterion (CIP^\pm). En el rango de pH estudiado en este trabajo, hay una prevalencia de la especie zwitterion (CIP^\pm) y de CIP con carga positiva (CIP^+), razón por la cual nos centraremos en estas dos especies para entender el comportamiento del fármaco. Por otra parte, los nano-rods de HA_1 tienen una carga negativa que varía de -13,4 a -21,1 mV a medida que el pH disminuye (Tabla 3.3).

La adsorción máxima de CIP se da a pH 6; en estas condiciones el 36,2% de las moléculas están cargadas positivamente (CIP^+) y el 63,5% restante se encuentra como especie zwitterión (CIP^\pm). Este comportamiento podría ser analizado tal como fue reportado por Chen et al. [81]. Así, el hecho de que encontremos adsorbida la concentración más alta de CIP posiblemente se deba a que el balance de cargas negativas y positivas en las nanopartículas se compense con la distribución de cargas de CIP a este pH, lo que es beneficioso para la adsorción del antibiótico por interacciones electrostáticas. Esto significa que CIP puede interactuar con grupos de carga negativa y

positiva de los nano-rods (PO_4^{3-} y Ca^{2+} , respectivamente) lo que propicia el aumento de su concentración en la superficie de HA_I . La variación en el potencial ζ de las nanopartículas (nano- HA_I) hacia valores más positivos en las plataformas HA_I/CIP , refleja esta interacción.

A pH 7,4 el potencial ζ no varía significativamente entre las nanopartículas cargadas (plataformas HA_I/CIP) y desprovistas de fármaco (nano- HA_I). Este comportamiento podría ser consecuencia de que el 92,4% de las moléculas de CIP tienen ambos grupos ionizados a este pH (CIP^\pm), de modo que cuando se absorbe esta especie el balance neto de carga absorbida añadida a las nanopartículas es prácticamente nulo. Las moléculas de CIP formarían así una monocapa que expone los grupos negativos y positivos con una distribución similar a la de los grupos PO_4^{3-} y Ca^{2+} de nano- HA_I .

A pH 4,2, nano- HA_I presenta el valor negativo más grande de potencial ζ . En estas condiciones, el 97,3% de las moléculas CIP están presentes como especie catión (CIP^+), por lo que se evidencia un aumento positivo marcado del potencial ζ de las plataformas HA_I/CIP . Esta interacción de las moléculas de CIP^+ y HA_I por fuerzas electrostáticas disminuye la carga negativa de $-21,1$ a $-4,1$ mV. Sin embargo, la concentración de CIP adsorbida es la más baja a este pH. Esto se puede atribuir al desbalance en la carga de las moléculas de CIP (prácticamente toda como especie CIP^+), lo que dificulta su interacción con los grupos positivos (Ca^{2+}) en la superficie de nano- HA_I , sumado a la disolución parcial de las nanopartículas que podría estar contribuyendo al comportamiento observado. Así, las capacidades de carga de HA_I (DL_{HA}) fueron: ($2,3 \pm 0,3$ ug mg^{-1} HA_I) a pH 7,4; ($7,3 \pm 0,8$ ug mg^{-1} HA_I) a pH 6 y ($1,4 \pm 0,2$ ug mg^{-1} HA_I) a pH 4,2; a 37°C. Estos hallazgos están de acuerdo con los resultados informados por Li et al. [82].

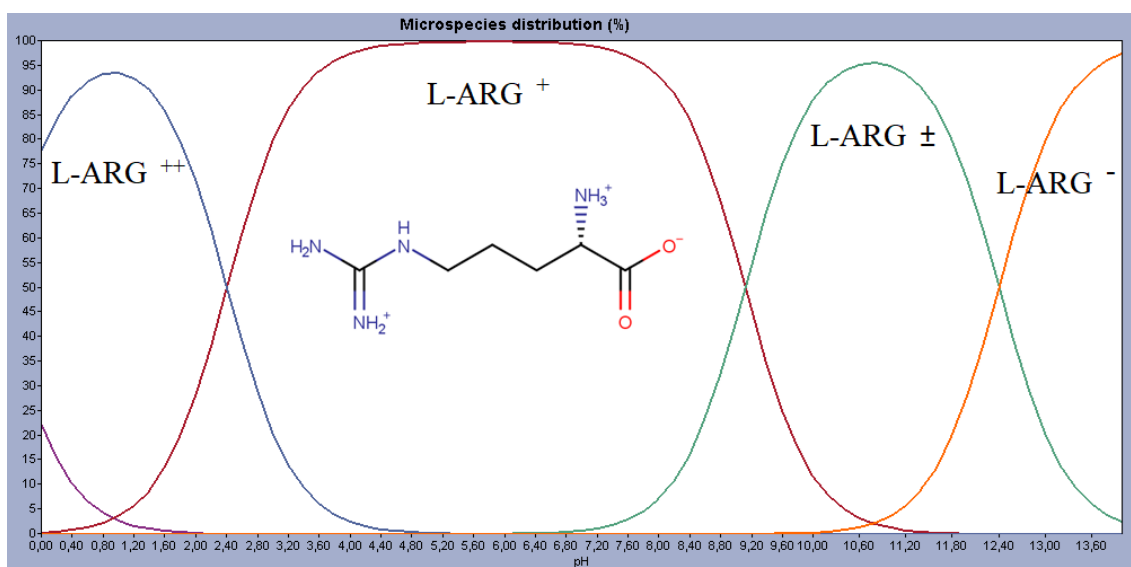


Figura 3.13: Distribución de especies de L-ARG en solución en función del pH. Se presenta la especie predominante (L-ARG⁺) al pH de trabajo.

Para llevar a cabo el proceso de adsorción de IBU sobre HA_I, primero fue necesario adsorber L-ARG. Este aminoácido tiene un comportamiento dependiente del pH (Fig. 3.13); exponiendo dos cargas positivas (dos grupos amina) y una negativa (grupo carboxilato) a todos los pH utilizados en este estudio [83]. La adsorción se realizó a pH 6 y fue confirmada por potencial ζ , EA y FT-IR. En estas condiciones de pH, el valor del potencial ζ fue de $-19,3$ mV para nano-HA_I y de $-7,2$ mV para HA_I/L-ARG (Tabla 3.3). Esta disminución de la carga negativa de las nanopartículas es indicativa de la interacción entre la superficie de las mismas y el aminoácido. Por medio de EA se determinó el porcentaje de nitrógeno (N), el cual fue aproximadamente 6% del total de elementos. En la Fig. 3.14 se muestran los espectros FT-IR de HA_I y HA_I/L-ARG. Mediante los mismos se validó la presencia de L-ARG sobre la superficie de HA_I. Las bandas vibracionales entre 1400 y 1420 cm^{-1} se atribuyen a la presencia del grupo $-\text{NH}_2$, tal como fue informado previamente por Zhao y col. [84].

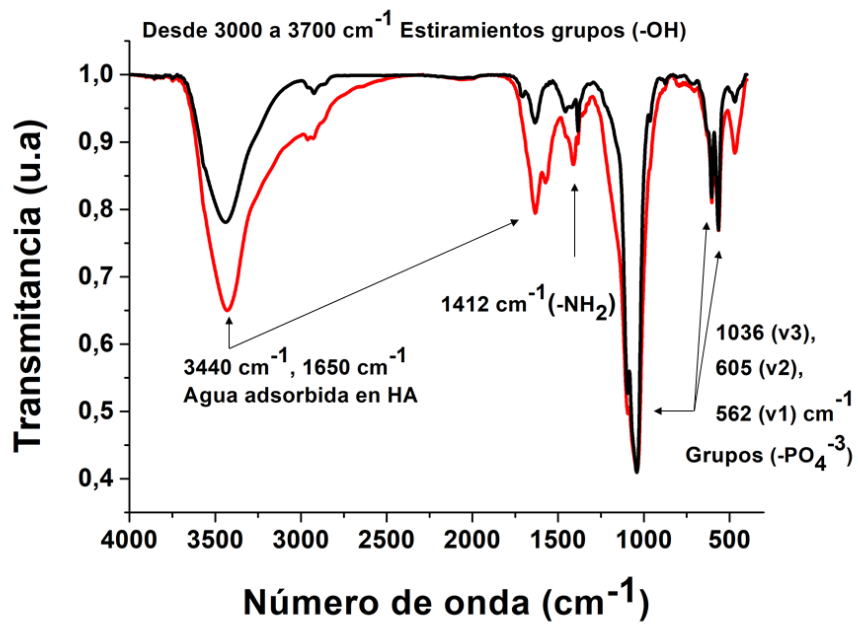


Figura 3.14: Espectros FT-IR de HA₁ (línea negra) y HA₁/L-ARG (línea roja).

Se analizó la correlación de los datos experimentales con los modelos previamente mencionados (Tabla 3.4), a fin de obtener información del mecanismo implicado en el proceso de adsorción de IBU en HA₁/L-ARG.

Tabla 3.4: valores de los parámetros y R^2 obtenidos para los tres modelos utilizados para analizar el proceso de adsorción de IBU.

<i>Modelo</i>	<i>Medio de ads.</i>	R_L	K_L (l/mmol)	q_{mon} (mmol/g)	R^2
Langmuir	pH 4,2	0,481	$7,427 \pm 2,210$	$0,0108 \pm 0,0007$	0,9434
	pH 6	0,534	$6,014 \pm 1,195$	$0,1271 \pm 0,0062$	0,9745
	pH 7,4	0,228	$23,387 \pm 4,656$	$0,1274 \pm 0,0035$	0,9820
			n	K_F	R^2
Freundlich	pH 4,2		$3,837 \pm 0,779$	$0,0096 \pm 0,0004$	0,8279
	pH 6		$3,569 \pm 0,622$	$0,1082 \pm 0,0054$	0,8066
	pH 7,4		$7,836 \pm 0,998$	$0,1255 \pm 0,0022$	0,9201
		$1/ns$	b (l/mmol) ^{1/ns}	qm (mmol/g)	R^2
Sips	pH 4,2	$0,543 \pm 0,057$	$1,708 \pm 0,432$	$0,0152 \pm 0,0014$	0,9405
	pH 6	$1,470 \pm 0,157$	$65,099 \pm 5,848$	$0,1090 \pm 0,0031$	0,9887
	pH 7,4	$0,399 \pm 0,031$	$3,384 \pm 0,496$	$0,1621 \pm 0,0548$	0,9901

La adsorción a pH 4,2 fue errática y muy pobre, con lo cual se hará hincapié al comportamiento a pH 6 y 7,4. El modelo de isoterma que mejor se ajustó a los datos experimentales en ambos medios fue el modelo Sips, con los valores de R^2 más altos, cercanos a la unidad, lo cual coincide con el comportamiento comentado anteriormente para CIP. Esto sugiere la adsorción superficial heterogénea de IBU en HA_I/L-ARG, con sitios de sorción energéticamente no equivalentes, de acuerdo con la naturaleza del adsorbente dada por la presencia de la L-ARG ionizada y de los grupos PO₄³⁻ y Ca²⁺ debido a la cobertura incompleta de HA_I con el aminoácido. Esta nueva contribución a la heterogeneidad superficial de HA_I se ve reflejada en los valores de los coeficientes de Sips (1/ns) obtenidos, los cuales distan mucho de la unidad, condición a la cual la ecuación de Sips se reduce a la de Langmuir.

La adsorción de IBU se representa mal por la isoterma de Freundlich y presenta un buen ajuste al modelo de Langmuir, lo cual propone que el proceso de adsorción probablemente haya estado dominado por la formación de una monocapa. Adicionalmente, los valores de R_L ($0 < R_L < 1$), así como los valores del parámetro n de Freundlich ($n > 1$), sugieren que HA_I/L-ARG es favorable para la adsorción de IBU en ambos medios.

La adsorción de IBU también se vio muy influenciada por el pH; la concentración de equilibrio de IBU adsorbido fue 0,12 (mmol/g) a pH 7,4; 0,11(mmol/g) a pH 6; mientras que la adsorción a pH 4,2 fue prácticamente nula. Estas concentraciones representan una eficiencia de encapsulamiento (EE%) baja en general para el fármaco, esto es: $(7,2 \pm 0,6) \%$ a pH 7,4; $(6,6 \pm 0,4) \%$ a pH 6.

El pKa de IBU es 4,85, con lo cual a pH 4,2 tiene el 81,77 % de sus moléculas en forma neutra, Fig. 3.15. Teniendo en cuenta esto, podemos explicar la casi nula adsorción de IBU a este pH debido a una deficiente interacción con L-ARG adsorbida (así como con los grupos PO_4^{3-} y Ca^{2+} no funcionalizados con el aminoácido), sumado a la probable contribución de una disolución parcial de HA_1 en este medio. Debido a ello, el proceso de adsorción a pH 4,2 fue ineficaz y errático. Este comportamiento es corroborado por la falta de variabilidad del potencial ζ entre $\text{HA}_1/\text{L-ARG}$ y $\text{HA}_1/\text{L-ARG}/\text{IBU}$.

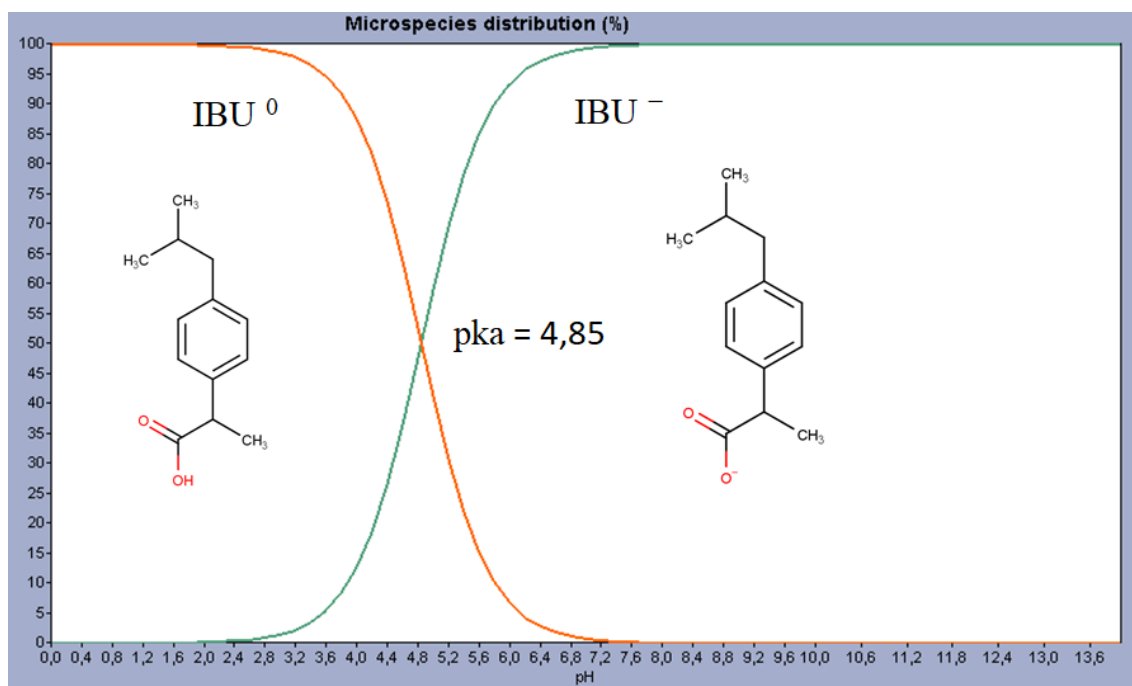


Figura 3.15: Distribución de especies de IBU en solución en función del pH.

Todas las moléculas de IBU tienen carga negativa por encima de pH 6, por lo tanto, se favorece la interacción con la superficie de $\text{HA}_1/\text{L-ARG}$ debido a la presencia de los grupos con carga positiva correspondientes al aminoácido, así como con los iones Ca^{2+} disponibles de la hidroxiapatita. Además de interacciones de tipo electrostáticas, la presencia de L-ARG representa un mejor soporte para propiciar interacciones de tipo

hidrofóbicas con IBU. Así, se incrementa la concentración de IBU absorbida a pH 6 y pH 7,4. Mediante el potencial ζ se evidencia esto por el aumento de carga negativa de HA_I/L-ARG cuando se adsorbe IBU en ambos medios. De esta manera, las capacidades de carga de HA_I (DL_{HA}) para el antiinflamatorio fueron: ($24,7 \pm 2,1 \text{ ug mg}^{-1} \text{ HA}_I$) a pH 7,4 y ($22,6 \pm 1,8 \text{ ug mg}^{-1} \text{ HA}_I$) a pH 6, a 37 °C.

3.4.3 Evaluación del comportamiento cinético de adsorción independiente de CIP e IBU en HA_I

La cinética de adsorción se estudió mediante el modelo de Avrami. La Fig. 3.16 muestra la dependencia con el tiempo de la concentración de CIP (Fig. 3.16 a) e IBU (Fig. 3.16 b) adsorbidos en HA_I.

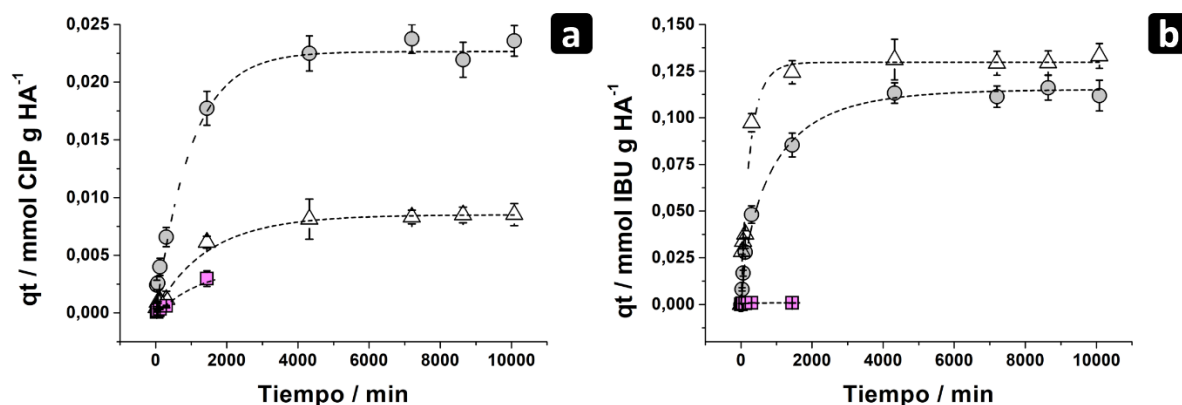


Figura 3.16: Estudios de cinética de adsorción para CIP (a) e IBU (b). Modelo de Avrami a 37 °C. Triángulos: pH 7,4; círculos: pH 6; cuadrados: pH 4,2.

El estudio a pH 4,2, tanto para CIP como para IBU, se llevó a cabo hasta los 1440 min (24 h) debido a que por encima de este tiempo nano-HA_I comienza a disolverse significativamente [1]–[3] y los resultados podrían malinterpretarse. La figura muestra que se alcanza una adsorción inicial más rápida para IBU y más gradual para CIP, alcanzándose los equilibrios de adsorción a los ~1440 min (24 h) y ~3130 min (52 h), respectivamente, en los tres medios estudiados. Los resultados de estos procesos para

ambos fármacos, así como el orden del proceso cinético (n) y la constante cinética (K_{av}) se presentan en las Tablas 3.5 y 3.6 para CIP e IBU, respectivamente.

Tabla 3.5: Parámetros cinéticos de adsorción de CIP en nano- HA_I obtenidos mediante la ecuación de Avrami, a 37°C.

<i>Medio de ads.</i>	$K_{av} (min^{-1})$	n	$q_e (mmol/g HA_I)$	R^2
pH 4,2	$8,88 e-4 \pm 2,07 e-4$	$1,1602 \pm 0,2681$	$0,0036 \pm 1,81e-4$	0,9666
pH 6	$1,04 e-3 \pm 1,25 e-4$	$0,8173 \pm 0,0701$	$0,0231 \pm 4,92 e-4$	0,9926
pH 7,4	$8,52 e-4 \pm 2,21 e-5$	$0,7560 \pm 0,0566$	$0,0086 \pm 4,79 e-4$	0,9853

Tabla 3.6: Parámetros cinéticos de adsorción de IBU en nano- HA_I obtenidos mediante la ecuación de Avrami, a 37°C.

<i>Medio de ads.</i>	$K_{av} (min^{-1})$	n	$q_e (mmol/g HA_I)$	R^2
pH 4,2	$0,0218 \pm 1,33 e-3$	$0,3990 \pm 0,0237$	$8,37 e-4 \pm 5,73e-5$	0,8709
pH 6	$0,0012 \pm 1,21 e-4$	$0,6896 \pm 0,0358$	$0,1144 \pm 0,0018$	0,9966
pH 7,4	$0,0039 \pm 6,49 e-4$	$0,8921 \pm 0,1533$	$0,1305 \pm 0,0035$	0,9787

Considerando el proceso de adsorción de CIP, tanto los valores de K_{av} , como los órdenes de reacción (n), no demuestran tener una dependencia fuerte con el pH, aunque las concentraciones adsorbidas son diferentes dependiendo del medio de adsorción. Por el contrario, para IBU se observa que el valor de K_{av} a pH 7,4 es tres veces más grande que a pH 6, lo que podría implicar que el proceso de adsorción se desarrolla por un mecanismo diferente. Sin embargo, este modelo no nos permite saber qué tipo de mecanismo está involucrado en la adsorción. Los valores de “ n ” obtenidos para IBU muestran valores similares a los pH estudiados. Como mencionamos anteriormente, el proceso de adsorción de IBU es errático y deficiente a pH 4,2, por lo que el proceso cinético no puede analizarse satisfactoriamente.

3.4.3 Evaluación del comportamiento de liberación independiente de los fármacos a partir de las plataformas HA₁/CIP y HA₁/L-ARG/IBU

Los datos de cinética de liberación de los fármacos *in vitro* se ajustaron a diferentes modelos matemáticos: cero y primer orden, Higuchi, Weibull y Korsmeyer-Peppas. La liberación de CIP e IBU desde las plataformas se explicó mejor a través del modelo de Korsmeyer-Peppas. En las Fig. 3.17 y 3.18 se muestra el comportamiento de liberación de ambos fármacos en función del tiempo en los tres medios evaluados, indicándose en las ordenadas los mmoles de fármaco liberado por gramo de HA₁. A la derecha de cada curva ajustada, se muestra la relación entre las concentraciones adsorbidas y liberadas del fármaco en los medios estudiados expresados de manera porcentual (DR%).

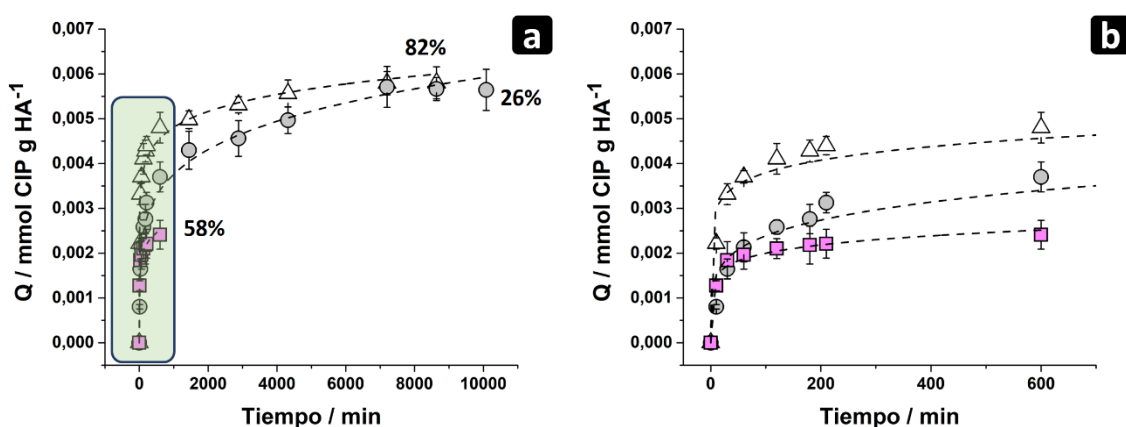


Figura 3.17: Estudios de desorción de CIP a 37 °C. El ajuste de los datos experimentales corresponden al modelo de Korsmeyer-Peppas. Triángulo: pH 7,4; círculo: pH 6; cuadrado: pH 4,2. Los porcentajes (%) mostrados representan la relación entre las concentraciones adsorbidas y desorbidas del fármaco en los tres medios estudiados. La figura “a” corresponde a la totalidad del estudio, mientras que “b” representa una ampliación del área coloreada en “a”.

Los valores de las constantes, exponentes difusionales y coeficiente de determinación se muestran en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Estudio de liberación de CIP. Parámetros del modelo de Korsmeyer –Peppas en los diferentes medios estudiados, a 37°C.

<i>Medio de liberación</i>	<i>K (Q min⁻ⁿ)</i>	<i>n</i>	<i>R²</i>
pH 4,2	2,37 e-3 ± 1,59 e-4	0,2334 ± 0,0512	0,9678
pH 6	9,62 e-4 ± 9,53 e-5	0,2908 ± 0,0313	0,9756
pH 7,4	1,11 e-3 ± 1.06 e-4	0,2763 ± 0,0445	0,9769

Los valores de DR% para CIP fueron: (82,1 ± 9,7) % a pH 7,4; (26,3 ± 5,8) % a pH 6; y (58,2 ± 9,1) % a pH 4,2. El comportamiento de entrega de CIP presenta similitudes en condiciones fisiológicas (pH=7,4; 37°C) y en condiciones de resorción ósea (pH=4,2; 37°C). Se puede observar un patrón bifásico de liberación, característico del modelo de Peppas, con una rápida liberación inicial (liberación del 50% y 45% del antibiótico en la primera hora, para pH 7,4 y 4,2, respectivamente), seguida de una liberación sostenida del fármaco. Estas rápidas tasas de entrega se pueden apreciar mejor en la Fig. 3.17 b, y se corresponden con los valores de las constantes cinéticas obtenidas, las cuales son mayores a la obtenida para pH 6. En ambas condiciones se alcanzaron los porcentajes de liberación más grandes (82% y 58% de lo adsorbido, a pH 7,4 y 4,2, respectivamente); esto se puede asociar al perfil de solubilidad de CIP, con alta solubilidad a pH ácido y alcalino, y baja para pH cercanos a la neutralidad [85]. El pH exacto de solubilidad mínima tiene una dependencia específica de la formulación [85], exhibiendo un valor mínimo a pH 6 para las plataformas HA_I/CIP. De modo que ambos medios resultaron ser los más favorables para la liberación del antibiótico desde HA_I.

La liberación se dio de manera más extendida a pH 6, con porcentajes de liberación no superiores al 10% durante la primera hora de ensayo. Así, si bien cuantitativamente en este medio se libera más concentración de CIP debido a la cantidad de fármaco cargado, solo el 26 % del antibiótico que se adsorbe en HA_I se libera a este pH durante 10.080 min (7 días).

De esta manera, las plataformas HA_I/CIP podrían satisfacer la necesidad de una descarga inicial rápida y a la vez actuar como reservorio de CIP para liberación sostenida, considerando las fluctuaciones de pH posibles en el tejido peri-implantario. Teniendo en cuenta el rango de concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) para los especies bacterianas implicadas en infecciones peri-implantarias y osteomielitis (0,5 – 2 ug/ml) los

niveles de fármaco liberados por 50 mg de las plataformas HA_I/CIP podrían cubrir satisfactoriamente estas demandas.

Adicionalmente, el modelo de Korsmeyer – Peppas sugiere, a partir del valor del exponente difusional (parámetro “n”), el mecanismo que podría estar gobernando la liberación de los fármacos a partir de las plataformas. En este caso, los valores de “n” fueron inferiores a 0,45 en los tres medios estudiados, con lo que el modelo sugiere que la entrega de CIP a partir de las plataformas se da por difusión de tipo Fick. Peppas y colaboradores han informado a partir de una serie de estudios que la forma y el tamaño de la estructura del sistema de liberación juegan un papel importante en el proceso [86], [87]. En esos trabajos, los autores informaron que el valor del exponente difusional (n) está muy influenciado por la heterogeneidad de la estructura del adsorbente, en este caso, las nanopartículas de las que se libera el fármaco. Esto significa que el valor de “n” se ve afectado por la geometría y distribución de tamaño de nano-HA_I. Observaron que un valor de $n = 0,43$ para un fármaco liberado desde una matriz esférica con una distribución de tamaño homogénea, podía convertirse en 0,3 si se liberaba desde una matriz de idéntica geometría, pero con una distribución de tamaño heterogénea. Presumimos que este factor está jugando un papel importante en nuestros sistemas, y que por esta razón los valores de “n” obtenidos para la liberación de ambos fármacos, si bien tienden al esperado para un mecanismo de liberación de tipo Fick, no alcanzan el valor teórico de 0,45 que establece idealmente el modelo para geometrías cilíndricas. Debido a esto, y a partir de las características de nuestras plataformas, creemos que el mecanismo de difusión de Fick debería ser el principal factor de control de la velocidad de liberación de ambos fármacos.

El comportamiento de liberación de IBU se presenta en la Fig. 3.18. Los valores de DR% para IBU fueron: $(99,6 \pm 9,2) \%$ a pH 6; $(36,3 \pm 5,1) \%$ a pH 7,4 y $(1,1 \pm 0,7) \%$ a 4,2, a 37°C.

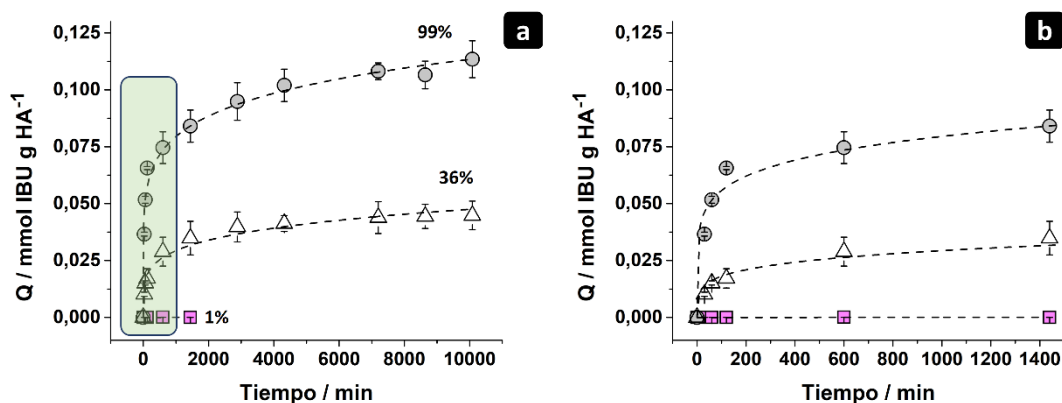


Figura 3.18: Estudios de desorción de IBU a 37 °C. Los datos experimentales se ajustan al modelo de Korsmeyer-Peppas. Triángulo: pH 7,4; círculo: pH 6; cuadrado: pH 4,2. Todos los porcentajes (%) mostrados representan la relación entre las concentraciones adsorbidas y desorbidas del fármaco en los tres medios estudiados (DR%). La figura “a” corresponde a la totalidad del estudio, mientras que “b” representa una ampliación del área coloreada en “a”.

Las constantes, exponentes difusionales y coeficientes de determinación se muestran en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8: Estudio de liberación de IBU. Parámetros del modelo de Korsmeyer –Peppas en los diferentes medios estudiados a 37°C.

Medio de liberación	$K (Q \text{ min}^{-n})$	n	R^2
pH 4,2	$2,43 \text{ e-}5 \pm 1,38 \text{ e-}5$	$0,0838 \pm 0,0912$	0,6059
pH 6	$0,0274 \pm 0,0024$	$0,4067 \pm 0,0311$	0,9830
pH 7,4	$0,0069 \pm 0,0010$	$0,3420 \pm 0,0809$	0,9743

Mencionamos anteriormente que el proceso de adsorción a pH 4,2 fue deficiente y errático, lo cual se trasladó, en consecuencia, al comportamiento de liberación, con niveles casi nulos de fármaco liberado, por lo que el análisis se hará para los dos medios restantes.

El comportamiento de IBU a pH 6 y 7,4 es opuesto al de CIP. Observamos, a pH 6, un perfil de liberación caracterizado por una rápida descarga inicial, (49% del fármaco liberado en la primera hora), seguido por una liberación sostenida, hasta alcanzarse la descarga del 100% del antiinflamatorio cargado. Por otra parte, a pH 7,4 se observa una liberación progresiva de IBU, caracterizada por una descarga del 11% durante la primera hora, hasta alcanzar finalmente la liberación del 29% de IBU adsorbido a las 24 h. Así, las plataformas HA_I/L-ARG/IBU podrían funcionar como buenos reservorios para propiciar una administración sostenida del fármaco en el tiempo en condiciones fisiológicas normales.

Cabe mencionar que en todos los casos analizados estamos hablando de concentraciones y/o porcentajes acumulados de liberación. Teniendo en cuenta el entorno fisiológico en el cual tendrían utilidad potencial estas plataformas, el porcentaje total liberado sería mayor, mejorando el desempeño de las mismas como sistemas de administración. Esto se debe a que conforme se da la liberación de los fármacos en el sitio de implantación y comienzan a ejercer acción local, parte difunde a otros compartimentos o sufre metabolización, con lo que se favorece el equilibrio de disolución de los fármacos aún retenidos por las plataformas, aumentando su liberación al medio circundante. Sumado a esto, debemos también tener en cuenta que finalmente las plataformas generadas a partir de HA_I serán biodegradadas por el proceso de remodelado fisiológico del hueso a pH ácido, lo cual terminará conduciendo a la descarga total de ambos fármacos. Si tomamos como referencia el comportamiento farmacocinético de IBU informado por Davies [88], el cual demostró que la concentración plasmática máxima alcanzada luego la ingesta de un comprimido de 400 mg es 28,3 ug/ml, podemos presumir que estas demandas podrían ser cubiertas con creces a partir de 50 mg de las plataformas HA_I/L-ARG/IBU.

3.5 Conclusión

En este trabajo se han desarrollado dos plataformas de hidroxiapatita portadoras de principios activos de utilidad para la profilaxis y/o tratamiento de patologías asociadas al tejido óseo. Los principios activos se adsorbieron en HA_I directamente (CIP), o mediante L-ARG como enlazador (IBU), siguiendo un comportamiento sensible al pH, dando origen a las plataformas HA_I/CIP y HA_I/L-ARG/IBU, respectivamente.

Los datos experimentales se ajustaron a tres modelos de isothermas y el modelo Sips explicó mejor el proceso de adsorción para ambos fármacos. Los medios más adecuados para el desarrollo de estas plataformas demostraron ser a pH 6 y 7,4, para CIP e IBU, respectivamente, medios donde su adsorción fue máxima. Si bien las cantidades adsorbidas de ambos fármacos fueron altas (DL_{HA} satisfactorios), la eficiencia de encapsulamiento porcentual de las plataformas (EE%) fue baja en general: 7,2 y 16,1 %; y 6,6 y 49,7 %, para IBU y CIP, a pH 7,4 y 6, respectivamente.

La cinética de adsorción de ambos fármacos mostró diferencias considerables pensando en el desarrollo de las plataformas, alcanzándose los equilibrios de adsorción a los ~1440 min (24 h) y ~3130 min (52 h) para IBU y CIP, respectivamente, en los tres medios estudiados.

La liberación de ambos fármacos a partir de las respectivas plataformas estuvo dentro del rango terapéutico de concentraciones y sigue una liberación sensible al pH. Los perfiles de liberación confieren a las plataformas buenas perspectivas de cara a poder propiciar concentraciones efectivas rápidas de fármaco liberado, así como para actuar como reservorios temporales y proveer liberación sostenida en el gradiente de pH naturales de las zonas lesionadas. Esto hace que estas plataformas sean buenos candidatos potenciales para relleno de defectos óseos, haciendo disponibles concentraciones adecuadas de IBU y CIP sin necesidad de acudir a grandes cantidades de las plataformas; a partir de una mezcla de ~50 mg de cada una de ellas se podrían obtener concentraciones terapéuticas efectivas de los principios activos. De esta manera, las plataformas tendrían buenas cualidades para poder cumplir con las demandas de nuevas estrategias de tratamiento relacionadas con la reconstrucción de defectos óseos, a partir de las propiedades osteoinductivas, bioactivas y biodegradables de nano- HA_L .

En el siguiente capítulo, se abordará una estrategia diferente para el desarrollo de sistemas de administración múltiple de fármacos a partir de hidroxiapatita nanoestructurada.

3.6 Bibliografía

- [1] N. L. D'Elía, A. N. Gravina, J. M. Ruso, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. V. Messina, "Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic," *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, vol. 1830, no. 11, pp. 5014–5026, 2013.
- [2] N. L. D'Elía, C. Mathieu, C. D. Hoemann, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. V. Messina, "Bone-repair properties of biodegradable hydroxyapatite nano-rod superstructures," *Nanoscale*, vol. 7, no. 44, pp. 18751–18762, 2015.
- [3] N. L. D'Elía, N. Gravina, J. M. Ruso, J. L. Marco-Brown, J. M. Sieben, and P. V. Messina, "Albumin-mediated deposition of bone-like apatite onto nano-sized surfaces: Effect of surface reactivity and interfacial hydration," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 494, pp. 345–354, 2017.
- [4] M. Cao, Y. Wang, C. Guo, Y. Qi, and C. Hu, "Preparation of ultrahigh-aspect-ratio hydroxyapatite nanofibers in reverse micelles under hydrothermal conditions," *Langmuir*, vol. 20, no. 11, pp. 4784–4786, 2004.
- [5] Y. Sun, G. Guo, D. Tao, and Z. Wang, "Reverse microemulsion-directed synthesis of hydroxyapatite nanoparticles under hydrothermal conditions," *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, vol. 68, no. 3, pp. 373–377, 2007.
- [6] K. Lin, J. Chang, R. Cheng, and M. Ruan, "Hydrothermal microemulsion synthesis of stoichiometric single crystal hydroxyapatite nanorods with mono-dispersion and narrow-size distribution," *Materials Letter*, vol. 61, no. 8–9, pp. 1683–1687, 2007.
- [7] N. L. D'Elía, "Materiales nanoestructurados en base a fosfatos de calcio: hacia la regeneración de tejido óseo," Universidad Nacional del Sur (Argentina), 2016. Ed. UNS.
- [8] J. P. Hill, L. Kumar Shrestha, S. Ishihara, Q. Ji, and K. Ariga, "molecules Self-Assembly: From Amphiphiles to Chromophores and Beyond," *Molecules*, vol. 19, pp. 8589–8609, 2014.
- [9] C. de Oliveira Rangel Yagui, A. Lineu Prestes, C. O. Rangel-Yagui, A. Pessoa-Jr, and L. Costa Tavares, "Micellar solubilization of drugs," *Journal of Pharmaceutical Science*, vol. 8, no. 2, pp. 147–163, 2005.
- [10] M. Ramanathan, L. K. Shrestha, T. Mori, Q. Ji, J. P. Hill, and K. Ariga, "Amphiphile nanoarchitectonics: from basic physical chemistry to advanced applications," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 26, pp. 10580–10611, 2013.
- [11] S. Dutt, P. F. Siril, and S. Remita, "Swollen liquid crystals (SLCs): a versatile template for the synthesis of nano structured materials," *RSC Adv*, vol. 7, no. 10, pp. 5733–5750, 2017.

- [12] Y. Cai *et al.*, “Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation,” *J Mater Chem*, vol. 17, no. 36, pp. 3780–3787, 2007.
- [13] C. Gamboa, H. Ríos, and L. Sepúlveda, “Effect of the nature of counterions on the sphere-to-rod transition in cetyltrimethylammonium micelles,” *Journal of Physical Chemistry*, vol. 93, no. 14, pp. 5540–5543, 2002.
- [14] T. Imae and S. Ikeda, “Sphere-rod transition of micelles of tetradecyltrimethylammonium halides in aqueous sodium halide solutions and flexibility and entanglement of long rodlike micelles,” *Journal of Physical Chemistry*, vol. 90, no. 21, pp. 5216–5223, 2002.
- [15] Y. Liu, W. Wang, Y. Zhan, C. Zheng, and G. Wang, “A simple route to hydroxyapatite nanofibers,” *Materials Letter*, vol. 56, no. 4, pp. 496–501, 2002.
- [16] A. Ulu, E. Birhanlı, S. Köytepe, and B. Ateş, “Chitosan/polypropylene glycol hydrogel composite film designed with TiO₂ nanoparticles: A promising scaffold of biomedical applications,” *International journal of biological macromolecules*, vol. 163, pp. 529–540, 2020.
- [17] F. Barrère, C. A. van Blitterswijk, and K. de Groot, “Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics.,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 1, no. 3, pp. 317–32, 2006.
- [18] C. Rey, “Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties.,” *Biomaterials*, vol. 11, pp. 13–5, 1990.
- [19] D. F. Williams, “On the mechanisms of biocompatibility,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 20, pp. 2941–2953, 2008.
- [20] J. Gogia, J. Meehan, P. di Cesare, and A. Jamali, “Local Antibiotic Therapy in Osteomyelitis,” *Semin Plast Surg*, vol. 23, no. 02, pp. 100–107, 2009.
- [21] V. Conceição, A. Martins, G. Goissis, A. C. Ribeiro, E. Marcantô, and M. R. Bet, “The Controlled Release of Antibiotic by Hydroxyapatite: Anionic Collagen Composites,” 1998.
- [22] P. I. Sealy, C. Nguyen, M. Tucci, H. Benghuzzi, and J. D. Cleary, “Delivery of antifungal agents using bioactive and nonbioactive bone cements,” *Annals of Pharmacotherapy*, vol. 43, no. 10, pp. 1606–1615, 2009.
- [23] B. Mousset, M.-A. Benoit, C. Delloye, R. Bouillet, and J. Gillard, “Biodegradable implants for potential use in bone infection An in vitro study of antibiotic-loaded calcium sulphate,” 1995.
- [24] B. Clarke, “Normal Bone Anatomy and Physiology,” *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, vol. 3, no. Supplement 3, pp. 131–139, 2008.
- [25] G. Chindamo, S. Sapino, E. Peira, D. Chirio, M. C. Gonzalez, and M. Gallarate, “Bone diseases: Current approach and future perspectives in drug delivery systems for bone targeted therapeutics,” *Nanomaterials*, vol. 10, no. 5. MDPI AG, pp. 875–885, 2020.

- [26] U. Joosten, A. Joist, T. Frebel, B. Brandt, S. Diederichs, and C. von Eiff, "Evaluation of an in situ setting injectable calcium phosphate as a new carrier material for gentamicin in the treatment of chronic osteomyelitis: Studies in vitro and in vivo," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4287–4295, 2004.
- [27] V. Conceição, A. Martins, G. Goissis, A. C. Ribeiro, E. Marcantô, and M. R. Bet, "The Controlled Release of Antibiotic by Hydroxyapatite: Anionic Collagen Composites," 1998.
- [28] B. Mousset, M. A. Benoit, C. Delloye, R. Bouillet, and J. Gillard, "Biodegradable implants for potential use in bone infection," *Int Orthop*, vol. 19, no. 3, pp. 157–161, 1995.
- [29] Q. Zou, Y. Li, L. Zhang, Y. Zuo, J. Li, and J. Li, "Antibiotic delivery system using nano-hydroxyapatite/ chitosan bone cement consisting of berberine," *Journal of Biomedical Materials Research A*, vol. 89, no. 4, pp. 1108–1117, 2009.
- [30] L. Pulido, E. Ghanem, A. Joshi, J. J. Purtill, and J. Parvizi, "Periprosthetic joint infection: The incidence, timing, and predisposing factors," *Clin Orthop Relat Res*, vol. 466, no. 7, pp. 1710–1715, 2008.
- [31] D. Neut, J. R. van Horn, T. G. van Kooten, H. C. van der Mei, and H. J. Busscher, "Detection of Biomaterial-Associated Infections in Orthopaedic Joint Implants," *Clin. Orthop. Relat. Res.*, vol. 413, pp. 261–268, 2003.
- [32] C. M. Oliphant, G. M. Green, K. Permanente, and R. W. Sloan, "Quinolones: A Comprehensive Review," *Am Fam Physician*, vol. 65, no. 3, pp. 455–464, 2002.
- [33] A. Forsgren, "Overview of Scandinavian in vitro studies with ciprofloxacin," *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplement*, vol. 60, pp. 16–20, 1989.
- [34] R. Norrby, "Ciprofloxacin in the treatment of acute and chronic osteomyelitis: a review," *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplement*, vol. 60, pp. 74–78, 1989.
- [35] J. S. Wolfson and D. C. Hooper, "Fluoroquinolone antimicrobial agents," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 2, no. 4, pp. 378–424, 1989.
- [36] K. J. Aldred, R. J. Kerns, and N. Osheroff, "Mechanism of quinolone action and resistance," *Biochemistry*, vol. 53, no. 10. American Chemical Society, pp. 1565–1574, 2014.
- [37] J. S. Wolfson and D. C. Hooper, "Fluoroquinolone Antimicrobial Agents," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 2, no. 4, pp. 378–424, 1989.
- [38] C. Castro *et al.*, "Ciprofloxacin implants for bone infection. In vitro-in vivo characterization," *Journal of Controlled Release*, vol. 93, no. 3, pp. 341–354, 2003.
- [39] J. P. Overbeck, S. T. Winckler, R. Meffert, H. U. Spiegel, and E. Brug, "Penetration of Ciprofloxacin into Bone: A New Bioabsorbable Implant," vol. 8, no 3, pp. 155-162, 1995.

- [40] J. F. Bergmann Verlag, A. Hirle, and W. Ritzerfeld, "Archives of Orthopaedic and Traumatic Surgery The Release of Gentamycin into the Wound Secretions from Polymethylmethacrylate Beads* A Study with Reference to the Animal Experiment," pp. 65-70, 1979.
- [41] C. E. Nord and R. Norrby, "Changing trends in antibiotic therapy: role of ciprofloxacin.," *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplement*, vol. 60, pp. 1-128, 1989.
- [42] K. Streeter and M. Katouli, "Pseudomonas Aeruginosa: A Review Of Their Pathogenesis And Prevalence In Clinical Settings And The Environment," *Infect. Epidemiol. Microbiol.*, vol. 2, no. 1, pp. 25-32, 2016.
- [43] I. Pountos, T. Georgouli, G. M. Calori, and P. v. Giannoudis, "Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect bone healing? A critical analysis," *Scientific World Journal*, vol. 2012, pp. 1-14, 2012.
- [44] S. Sakka and S. I. Hanounch, "Investigation of the effect of ibuprofen on the healing of osseointegrated oral implants.," *J. Investig. Clin. Dent.*, vol. 4, no. 2, pp. 113-119, 2013.
- [45] R.J. Hunter, "Zeta Potential in Colloid Science," *Elsevier*, p. 398, 1981.
- [46] G. H. Wang, Y. Z. Zhao, J. Tan, S. H. Zhu, and K. C. Zhou, "Arginine functionalized hydroxyapatite nanoparticles and its bioactivity for gene delivery," *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)*, vol. 25, no. 2, pp. 490-496, 2015.
- [47] L. R. Bennison, C. N. Miller, R. J. Summers, A. Minnis, G. Sussman, and W. McGuiness, "The pH of wounds during healing and infection: a descriptive literature review," *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*, vol. 25, no. 2, pp. 1-7, 2017.
- [48] M. Gautam, C. J. Benson, and K. A. Sluka, "Increased response of muscle sensory neurons to decreases in pH after muscle inflammation," *Neuroscience*, vol. 170, no. 3, pp. 893-900, 2010.
- [49] R. Baron, L. Neff, D. Louvard, and P. J. Courtoy, "Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border.," *J. Cell Biol.*, vol. 101, no. 6, pp. 2210-2222, 1985.
- [50] I. Langmuir, "The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids," *Journal of the American chemical society*, vol. 38, no. 11, pp. 2221-2295, 1916.
- [51] H. Freundlich, "Über die Adsorption in Lösungen," *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, vol. 57U, no. 1, pp. 385-470, 1907.
- [52] R. Sips, "On the structure of a catalyst surface," *J Chem Phys*, vol. 16, no. 5, pp. 490-495, 1948.

- [53] D. Do. Duong, *Adsorption analysis: equilibria and kinetics*. Imperial College Press, 1998.
- [54] J. S. Piccin, T. R. S. A. Cadaval, L. A. A. de Pinto, and G. L. Dotto, “Adsorption isotherms in liquid phase: Experimental, modeling, and interpretations,” in *Adsorption Processes for Water Treatment and Purification*, Springer International Publishing, pp. 19–51, 2017.
- [55] R. Saadi, Z. Saadi, R. Fazaeli, and N. E. Fard, “Monolayer and multilayer adsorption isotherm models for sorption from aqueous media,” *Korean Journal of Chemical Engineering*, vol. 32, no. 5. Springer New York LLC, pp. 787–799, 2015.
- [56] E. O. da Silva *et al.*, “Removal of methylene blue from aqueous solution by ryegrass straw,” *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 17, no. 8, pp. 3723–3740, 2020.
- [57] K. V. Kumar and K. Porkodi, “Relation between some two- and three-parameter isotherm models for the sorption of methylene blue onto lemon peel,” *Journal of Hazardous Materials*, vol. 138, no. 3. pp. 633–635, 2006.
- [58] M. Avrami, “Granulation, phase change, and microstructure kinetics of phase change. III,” *J. Chem. Phys.*, vol. 9, no. 2, pp. 177–184, 1941.
- [59] R. W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, and N. A. Peppas, “Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers,” *Int. J. Pharm.*, vol. 15, no. 1, pp. 25–35, 1983.
- [60] N. A. Peppas, “A model of dissolution-controlled solute release from porous drug delivery polymeric systems,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 17, no. 6, pp. 1079–1087, 1983.
- [61] K. Y. Foo and B. H. Hameed, “Insights into the modeling of adsorption isotherm systems,” *Chemical Engineering Journal*, vol. 156, no. 1. pp. 2–10, 2010.
- [62] S. J. Allen, G. Mckay, and J. F. Porter, “Adsorption isotherm models for basic dye adsorption by peat in single and binary component systems,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 280, no. 2, pp. 322–333, 2004.
- [63] K. Vijayaraghavan, T. V. N. Padmesh, K. Palanivelu, and M. Velan, “Biosorption of nickel(II) ions onto *Sargassum wightii*: Application of two-parameter and three-parameter isotherm models,” *J. Hazard Materia*, vol. 133, no. 1–3, pp. 304–308, 2006.
- [64] N. Hassan, V. Verdinelli, J. M. Ruso, and P. v. Messina, “Assessing structure and dynamics of fibrinogen films on silicon nanofibers: towards hemocompatibility devices,” *Soft Matter.*, vol. 8, no. 24, pp. 6582–6592, 2012.
- [65] K. S. Tapan, S. Karmaker, H. Ichikawa, and Y. Fukumori, “Mechanisms and kinetics of trisodium 2-hydroxy-1,1'-azonaphthalene-3, 4',6-trisulfonate adsorption onto chitosan,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 286, no. 2, pp. 433–439, 2005.

- [66] J. Zeldowitsch, "Adsorption site energy distribution," *Acta physicochem.URSS*, vol. 1, no. 1, pp. 961–973, 1934.
- [67] J. A. Manzanares, A. K. Rimpelä, and A. Urtti, "Interpretation of Ocular Melanin Drug Binding Assays Alternatives to the Model of Multiple Classes of Independent Sites," *Mol. Pharm.*, vol. 13, no. 4, pp. 1251–1257, 2016.
- [68] Y. S. Ho and G. McKay, "Sorption of dyes and copper ions onto biosorbents," *Process Biochemistry*, vol. 38, no. 7, pp. 1047–1061, 2003.
- [69] Y. S. Ho and G. McKay, "Sorption of dyes and copper ions onto biosorbents," *Process Biochemistry*, vol. 38, no. 7, pp. 1047–1061, 2003.
- [70] A. Jain and S. K. Jain, "In vitro release kinetics model fitting of liposomes: An insight," *Chem Phys Lipids*, vol. 201, pp. 28–40, 2016.
- [71] G. Bayramoğlu, E. Batislam, and M. Y. Arica, "Preparation and drug-release behavior of minocycline-loaded poly[hydroxyethyl methacrylate-co-poly(ethylene glycol)-methacrylate] films," *J. Appl. Polym. Science*, vol. 112, no. 2, pp. 1012–1020, 2009.
- [72] A. Jain and S. K. Jain, "Multipronged, strategic delivery of paclitaxel-topotecan using engineered liposomes to ovarian cancer," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 42, no. 1, pp. 136–149, 2016.
- [73] S. Dash, M. Padala, N. Lilakanta, and C. Prasanta, "Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems," *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, vol. 67, no. 3, pp. 217–223, 2010.
- [74] P. L. Ritger and N. A. Peppas, "A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices," *Journal of Controlled Release*, vol. 5, no. 1, pp. 37–42, 1987.
- [75] P. L. Ritger and N. A. Peppas, "A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs," *Journal of Controlled Release*, vol. 5, no. 1, pp. 23–36, 1987.
- [76] D. Placente, L. A. Benedini, M. Baldini, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. v. Messina, "Multi-drug delivery system based on lipid membrane mimetic coated nano-hydroxyapatite formulations," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 548, no. 1, pp. 559–570, 2018.
- [77] L. Benedini, D. Placente, J. Ruso, and P. Messina, "Adsorption/desorption study of antibiotic and anti-inflammatory drugs onto bioactive hydroxyapatite nano-rods," *Materials Science and Engineering C*, vol. 99, pp. 180–199, 2019.
- [78] H. Zhou and J. Lee, "Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering," *Acta Biomater.*, vol. 7, no. 7, pp. 2769–2781, 2011.
- [79] C. H. Giles, T. H. MacEwan, S. N. Nakhwa, and D. Smith, "786. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific

- surface areas of solids,” *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, pp. 3973–3993, 1960.
- [80] P. Hongsawat, P. Prarat, C. Ngamcharussrivichai, and P. Punyapalakul, “Adsorption of ciprofloxacin on surface functionalized superparamagnetic porous silicas,” *Desalination Water Treat.*, vol. 52, no. 22–24, pp. 4430–4443, 2014.
- [81] Y. Chen *et al.*, “Adsorptive removal and adsorption kinetics of fluoroquinolone by nano-hydroxyapatite,” *PLoS One*, vol. 10, no. 12, pp. 1–13, 2015.
- [82] S. Li, X. Zhang, and Y. Huang, “Zeolitic imidazolate framework-8 derived nanoporous carbon as an effective and recyclable adsorbent for removal of ciprofloxacin antibiotics from water,” *J. Hazard Mater.*, vol. 321, pp. 711–719, 2017.
- [83] C. A. Fitch, G. Platzner, M. Okon, B. Garcia-Moreno E., and L. P. McIntosh, “Arginine: Its pka value revisited,” *Protein Science*, vol. 24, no. 5, pp. 752–761, 2015.
- [84] Y. Zhao, J. Zha, S. Zhu, Y. Huang, Z. Li, and K. Zhou, “Synthesis and characterization of arginine-modified and europium-doped hydroxyapatite nanoparticle and its cell viability,” *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, vol. 21, no. 8, pp. 1773–1778, 2011.
- [85] M. E. Olivera *et al.*, “Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Ciprofloxacin Hydrochloride,” *J. Pharm. Science*, vol. 100, no. 1, pp. 22–33, 2011.
- [86] P. L. Ritger and N. A. Peppas, “A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs,” *Journal of Controlled Release*, vol. 5, no. 1, pp. 23–36, 1987.
- [87] P. L. Ritger and N. A. Peppas, “A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swelling devices,” *Journal of Controlled Release*, vol. 5, no. 1, pp. 37–42, 1987.
- [88] N. M. Davies, “Clinical Pharmacokinetics of Ibuprofen,” *Clinical Pharmacokinetics*, vol. 34, no. 2, pp. 101–154, 1998.

Capítulo 4

Diseño, síntesis y caracterización de una formulación multifármaco biocompatible basada en nano-hidroxiapatita con un recubrimiento lipídico mimético de membrana

El estudio descrito en el capítulo anterior fue el punto de partida para entender cómo interactúan nano-HA_I y los fármacos, CIP e IBU. En este trabajo abordaremos una nueva estrategia para el desarrollo de un sistema que permita la carga y liberación múltiple de fármacos. Para ello, recurriremos al uso de un vehículo lipídico que nos permita mejorar las propiedades de nano-HA_I como portador de fármacos, buscando aumentar la eficiencia de encapsulamiento de los mismos y poder prescindir de L-ARG como agente enlazante para la adsorción de IBU, reuniendo así ambos fármacos en un único sistema que propicie su liberación con una cinética controlada. El abordaje de dicha estrategia se detalla a continuación.

4.1 Estructuras lipídicas miméticas de membrana como portadores de fármacos y moduladores de su liberación

4.1.1 Anfifilos y agregados moleculares: mesofases

Como se mencionó en el capítulo anterior, los surfactantes (o tensioactivos) son un grupo de moléculas anfifílicas que conjugan regiones hidrofílicas, que presentan afinidad por el agua, con regiones hidrofóbicas, con afinidad por sustancias lipídicas (Fig 4.1). Estas moléculas poseen la capacidad de disminuir la tensión superficial y de autoorganizarse para dar origen a diversas estructuras ordenadas, dependiendo de la composición del sistema y de la temperatura [1]. Estos diversos ordenamientos estructurales propician que las colas hidrocarbonadas de las moléculas anfifílicas estén en contacto con un entorno no polar dado por las regiones hidrofóbicas de sus moléculas vecinas, satisfaciendo así su afinidad [1]. Lo mismo ocurre para las regiones polares o hidrofílicas de estos agregados. Estas estructuras comprenden desde agregados micelares, originados a baja concentración de surfactante (aunque por encima de la concentración micelar crítica), hasta estructuras con un orden de largo alcance, conocidas como cristales líquidos, que tienen lugar a altas concentraciones de surfactante [2].

Los cristales líquidos o mesofases, se caracterizan por presentar un estado intermedio entre el orden estructural de largo alcance de un cristal y el “desorden” de un líquido [3]. Hay una fuerte correlación entre la forma molecular del anfifilo y la disposición estructural o tipo de empaquetamiento que adoptan las mesofases que forma [4], tal como se mencionó en la *sección 3.1* del capítulo anterior. La temperatura, pH (ionización) y composición del sistema alterarán este empaquetamiento originando transiciones de fase de un tipo de cristal líquido a otro [3]. En la Fig. 1 se muestran algunas de las mesofases liotrópicas más frecuentes, como la hexagonal o lamelar, formadas por el autoensamblado molecular de moléculas anfifílicas en concentraciones altas. Estas estructuras líquido – cristalinas pueden, por efecto de agregado de solvente (dilución), dispersarse en agregados coloidales vesiculares o liposomas, los cuales conservan la disposición estructural de la fase de la cual provienen [1].

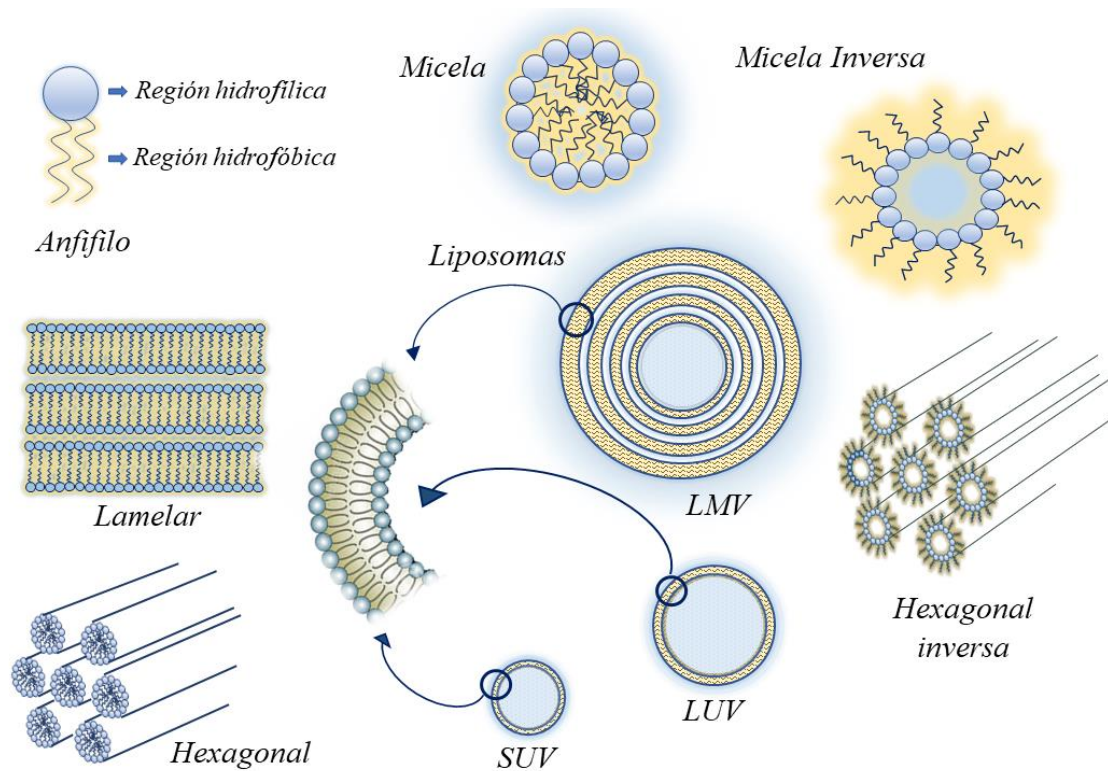


Figura 4.1: Las moléculas anfifílicas se autoagregan dependiendo de la temperatura, concentración y forma molecular para dar origen a distintos arreglos estructurales. En el centro de la imagen se representan esquemáticamente distintos tipos de liposomas: multilamelares (LMV), unilamelares grandes (LUV) y unilamelares pequeños (SUV). Esquema adaptado de la publicación de *Lasic y col.* [1].

Los liposomas son vesículas micro o nanométricas que se caracterizan por poseer una fase acuosa interna encapsulada por paredes estructuradas en forma de bicapas lipídicas, arreglo estructural que poseen las membranas biológicas [5]. Son de tamaño variable y forma aproximadamente esférica, con diámetros que van desde los 20 nm hasta unos pocos micrómetros [6].

Los componentes habitualmente empleados para su formulación son fosfolípidos, tanto purificados como mezclas de ellos, naturales o sintéticos, que pueden incorporar colesterol u otros agentes a fines de manipular sus propiedades, como su permeabilidad, estabilidad, etc. Estos lípidos de doble cadena, con parámetros de empaquetamiento cercanos a 1, forman una fase líquido-cristalina lamelar, que al dispersarse en agua da lugar a la formación de vesículas o liposomas. Estas estructuras pueden estar constituidas por más de una bicapa, lo que se conoce como liposomas multilamelares (LMV, diámetros mayores a 500 nm); o por solo una, los denominados liposomas unilamelares,

clasificándose estos últimos en grandes (LUV, 100 – 1000 nm de diámetro) y pequeños (SUV, 20 – 100 nm) [7].

Los liposomas han despertado rápidamente el interés debido a su versatilidad para aplicación en distintas industrias, entre las que se destaca la industria farmacéutica. Conjugar la capacidad de encapsular moléculas bioactivas en un compartimento interno hidrofílico, así como de incorporarlas en regiones hidrofóbicas de la bicapa, convierte a estos sistemas en excelentes vehículos de compuestos bioactivos de naturaleza hidrofílica, hidrofóbica y/o antipática (Fig. 4.2) [8]. Estas vesículas lipídicas añaden, además, la capacidad de proveer estabilidad química y biológica a las sustancias vehiculizadas, así como de modular y dirigir su liberación en sitios específicos a partir de su diseño, composición química y/o funcionalización de membrana [9], [10]. Todo esto, sumado a su capacidad para mimetizar el comportamiento y estructura de las membranas biológicas, han establecido a los liposomas como herramientas de gran utilidad como portadores de fármacos (para terapia contra el cáncer, enfermedades infecciosas, afecciones dermatológicas), así como de material genético en terapia génica y de diversos compuestos en el diseño de vacunas [11]–[17].

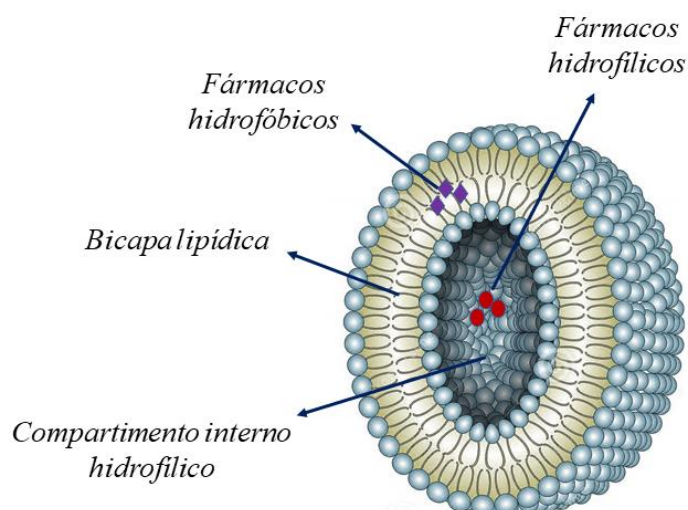


Figura 4.2: Estructura esquemática de un liposoma unilamelar y sus compartimentos para vehículo de moléculas bioactivas.

Las bicapas lipídicas presentan movilidad y fluidez, lo cual depende de la temperatura de transición (T_c) del lípido o mezcla de lípidos que las constituyen. La T_c es la temperatura por encima de la cual los lípidos cambian su estado físico, pasando de un estado ordenado de gel cristalino a un estado desordenado de cristal líquido [18]. Esta temperatura, característica para cada lípido, es un factor importante a tener en cuenta en el diseño de estas formulaciones, ya que los liposomas se forman por encima de ella. Además, al condicionar la fluidez de la membrana, condiciona la liberación de las moléculas vehiculizadas [10]. Por ello, a partir de la elección de los componentes de la bicapa, se puede tender hacia membranas con cadenas hidrocarbonadas más empaquetadas (lípidos con T_c más altas) o más fluidas, donde las mismas se encuentran más aleatoriamente dispuestas y las cabezas polares presentan mayor movilidad rotacional (lípidos con T_c más bajas) [5], [18].

4.1.2 Lecitinas naturales para el desarrollo de biomateriales

Los fosfolípidos, por su naturaleza anfipática, son los más utilizados en formulaciones de liposomas. Entre las diversas fuentes de fosfolípidos naturales, las lecitinas han sido ampliamente utilizadas debido a su composición, biocompatibilidad, biodegradabilidad y ausencia de toxicidad y/o inmunogenicidad [18]–[21]. De hecho, estos fosfolípidos naturales son emulsionantes aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para su uso en la industria alimentaria, cosmética y farmacéutica [21].

Las lecitinas comprenden una mezcla compleja de glicerofosfolípidos, entre los que se destacan la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, el fosfatidilinositol, triglicéridos y glicolípidos, entre otros constituyentes menores [22]. Esta composición de las lecitinas las asemeja con la de las membranas plasmáticas de células eucariotas, donde la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol son sus componentes mayoritarios [23]. Estos fosfolípidos presentan como esqueleto general una molécula de glicerol, que se esterifica con dos ácidos grasos de cadena larga (que pueden presentar insaturaciones) y un grupo fosfato; en la Fig. 4.3 se representa esquemáticamente la estructura de la fosfatidilcolina, componente mayoritario de la

lecitina de soja y fosfolípido más abundante de las membranas celulares de las células de mamíferos [24].

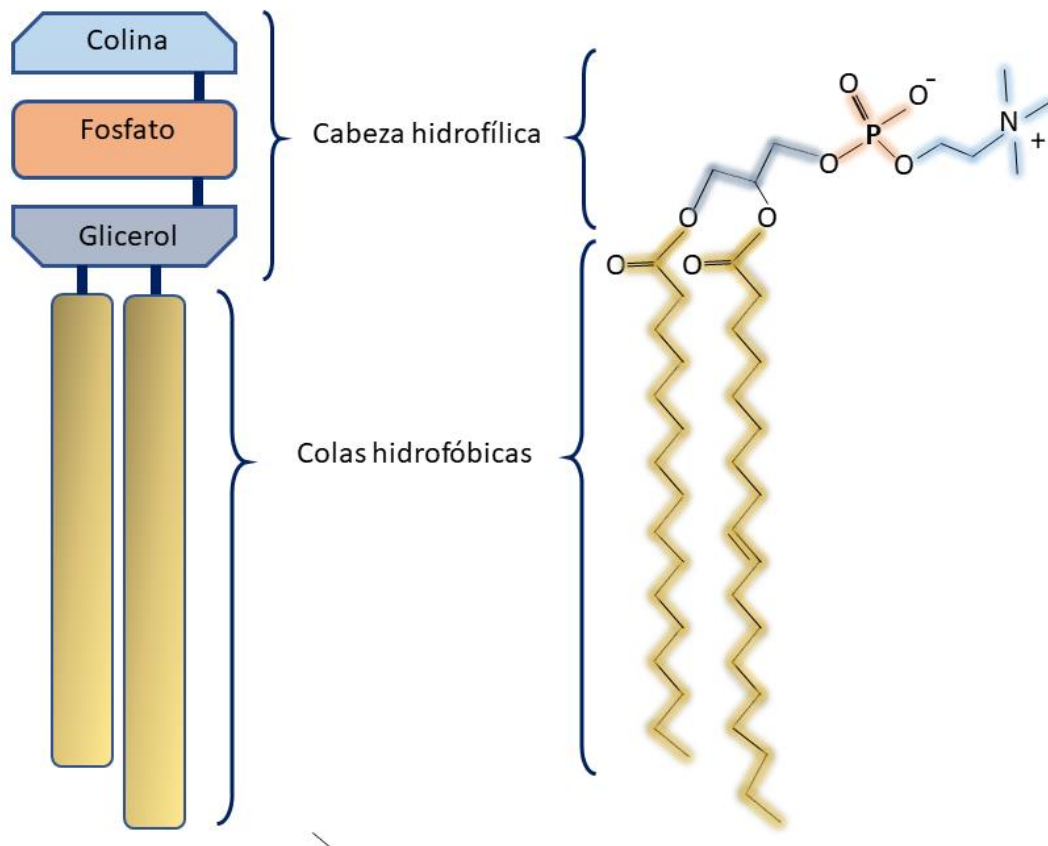


Figura 4.3: Representación esquemática de la estructura de la fosfatidilcolina.

La lecitina se puede extraer de fuentes animales y vegetales, siendo el huevo y la soja, las fuentes más frecuentes para cada tipo, respectivamente. La lecitina de soja presenta algunas ventajas con respecto a las de origen animal. Entre ellas, presenta mayor estabilidad, dado que posee una menor concentración de ácidos grasos poliinsaturados, y mayor seguridad, al poseer menos inconvenientes de contaminación debido a la presencia de proteínas o agentes infecciosos en sus extractos [9], [20]. Estas características, sumadas al costo, hacen a la lecitina de soja apropiada para la producción de liposomas a gran escala [9], [19], [25].

Además de las aptitudes mencionadas para emplearse en el diseño de vesículas, las lecitinas presentan una capacidad antioxidante conocida [26], [27], que ha propiciado su uso para aumentar la estabilidad de diferentes formulaciones frente a entornos oxidantes [21], [28], [29]. Esto se debe a que tanto los ácidos grasos insaturados como

los grupos fosfato presentes pueden reaccionar con diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS), neutralizándolas y evitando el daño celular [28], [30]. Esta propiedad es relevante cuando se piensa en el proceso de curación de heridas, donde es sabido que el estrés oxidativo en exceso, mediado por ROS, juega un papel importante en aquellas lesiones que no cursan con una recuperación apropiada [31]–[34]. Adicionalmente, se ha observado el rol de las lecitinas como modulares de la respuesta inflamatoria, donde han demostrado aumentar la capacidad de los macrófagos y el recuento linfocitario, así como disminuir la generación de citoquinas inflamatorias [30], [35], [36]. Estas cualidades se han propuesto como las responsables de la capacidad de las lecitinas para favorecer la regeneración de heridas, habiendo mostrado, incluso, un rendimiento superior a la fenitoína en estudios en ratas, fármaco recetado para acelerar la cicatrización de lesiones ulcerosas [30].

En este trabajo nos apoyaremos en las propiedades beneficiosas mencionadas de la lecitina de soja para incorporarla en una formulación que nos permita mejorar la capacidad de la hidroxiapatita como portador de fármacos, a partir de un sistema biomimético que promueva la regeneración del tejido vivo.

4.1.3 Adsorción de bicapas lipídicas sobre soportes sólidos

El desarrollo de bicapas lipídicas sobre distintos soportes sólidos se ha convertido en una herramienta muy útil para un gran número de aplicaciones, al representar una interface que permite recrear o imitar el comportamiento de las membranas celulares [37], [38]. Tal es así, que se han empleado para entender mecanismos fisiológicos que tienen lugar en las membranas, como la señalización celular, interacciones lípido-proteínas, así como su empleo para el desarrollo de biosensores y sistemas para administración de fármacos [38]–[42]. En ese sentido, el empleo de microbalanzas de cristal de cuarzo con monitoreo de disipación ha tenido un rol muy importante al permitir obtener información muy precisa de la cinética de adsorción de vesículas lipídicas en sustratos sólidos en tiempo real, así como el seguimiento de la deformación, ruptura y fusión de estas vesículas para dar origen a bicapas lipídicas [43]–[45]. Mediante del empleo de esta técnica se han reportado numerosos estudios que describen la dinámica de formación de estas estructuras miméticas de membrana sobre sustratos sólidos de diversa naturaleza [37], [38], [44], [46]–[48].

El método más utilizado para su desarrollo, conocido como fusión vesicular, se basa en promover la adsorción de vesículas lipídicas en un sustrato sólido, con la consecuente ruptura y fusión vesicular, que da origen a la bicapa [38], [41], [42].

La adsorción de las vesículas va a depender de un gran número de factores como su tamaño, naturaleza, pH del medio de adsorción, temperatura, fuerza iónica; así como de atributos propios del adsorbente, como su naturaleza, carga superficial, propiedades superficiales, etc.[43], [46], [48], [49]. Todos estos factores determinarán las interacciones vesícula – adsorbente y vesícula – vesícula, que a su vez condicionarán el tipo de estructura lipídica desarrollada sobre el soporte sólido. Con respecto a las propiedades de las superficies de adsorción, se ha visto cómo la hidrofiliidad o hidrofobicidad conduce a distintos tipos de ensamblajes lipídicos, que van desde bicapas o monocapas hasta adsorción de vesículas intactas [43]. Los sustratos hidrofílicos conducen al desarrollo de bicapas, mientras los hidrofóbicos al de monocapas fosfolípicas [38], [43]–[47], [50]. Entre ellos, el dióxido de silicio, sustrato hidrofílico, ha sido el más utilizado y la dinámica vesicular de adsorción está ampliamente estudiada para dar origen al desarrollo de bicapas lipídicas [37], [42], [45], [48], [49].

4.1.4 Objetivo

En virtud de lo antes mencionado, se investigó en este trabajo el desarrollo de un recubrimiento mimético de membrana sobre las nanopartículas de HA_I a partir de fosfolípidos naturales extraídos de la lecitina de soja, que actúe como vehículo y modulador de la liberación de CIP e IBU. Primero, se estudió la adsorción del recubrimiento lipídico en la superficie de las nanopartículas a fin de establecer los parámetros de formulación. Luego, en base a la formulación seleccionada del cribado inicial, se evaluó la eficacia simultánea de carga y liberación de los fármacos. Se analizó el perfil de adsorción de CIP e IBU, se determinó la capacidad de carga máxima y la cinética de liberación de ambos fármacos en condiciones fisiológicas y de herida abierta [51]. Se validó el potencial antibiótico de CIP frente a cepas bacterianas responsables de infecciones óseas frecuentes, y se verificó la actividad del ibuprofeno mediante la prueba de desnaturalización de la albúmina. La biocompatibilidad de los sistemas se confirmó mediante la interacción con osteoblastos primarios de bóveda craneal de rata. Los resultados de este trabajo se detallan a continuación.

4.2 Experimental - Materiales y Métodos

4.2.1 Reactivos

Bromuro de hexadecil-trimetilamonio (CTAB, 99 %, Sigma); Polipropilenglicol (PPG, PM= 425 g/mol, $\delta = 1,004 \text{ g/cm}^3$ a 25 °C, Sigma-Aldrich), Fosfato de sodio (Na_3PO_4 , 96 %, Sigma), Cloruro de calcio (CaCl_2 , 99 %, Sigma), Nitrito de sodio (NaNO_2 , 97 %, Sigma); Ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$, 99%, Sigma – Aldrich); trihidrato de acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99%, Sigma – Aldrich); hidróxido de sodio (NaOH, 97%, Sigma – Aldrich); solución salina buffer fosfato (tabletas de PBS, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, Sigma – Aldrich); metanol (CH_3OH , anhidro 99,8%, Sigma – Aldrich); etanol (EtOH, 96%, Sigma – Aldrich); ácido clorhídrico (HCl, 37%, Sigma – Aldrich); cloroformo (CH_3Cl , anhidro 99%, Sigma – Aldrich); albúmina de suero bovino (BSA, Fracción V, 95%, Carl Roth); azida de sodio (NaN_3 , 99,5%, Sigma-Aldrich); urea (CON_2H_4 , 98%, Sigma-Aldrich); Lipoid S75 (LS75, Lipoid AG Sennweidstrasse 44 CH-6312 Steinhausen/ZG Suiza); colorante rojo neutro ($\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{ClN}_4$, BioReagent, Sigma – Aldrich); Ciprofloxacina (CIP, $\geq 98\%$, Sigma), Ibuprofeno (IBU, $\geq 98\%$, Sigma). Se utilizó agua tridestilada para la preparación de todas las soluciones.

4.2.2 Formulación multifármaco basada en nano-hidroxiapatita con un recubrimiento lipídico mimético de membrana: LMm/nano- HA_I

4.2.2.1 Preparación y selección de la formulación óptima

Se prepararon y caracterizaron nanopartículas de HA_I siguiendo los procedimientos descritos anteriormente en la *Sección 3.3.2*. Para la preparación de recubrimientos lipídicos miméticos de membrana se utilizó Lipoid S75 (LS75). LS75 es un extracto comercial de lecitina de soja que contiene 69,3% de fosfatidilcolina, 9,8% de fosfatidiletanolamina, 2,1% de lisofosfatidilcolina y 18,8% de ácidos grasos (17-20% palmítico, 2-5% esteárico, 8-12% oleico, 58-65% linoleico y 4-6% de ácido linolénico) [52]. Debido a su composición, actualmente se utiliza para construir modelos miméticos de membrana [53]. Se prepararon vesículas unilamelares de acuerdo con el método de hidratación de película delgada [7]. Este método se basa en la disolución del componente lipídico en un solvente orgánico, la evaporación de este último y la rehidratación de la película lipídica residual con un solvente acuoso [7]. En este caso, se disolvió la cantidad

adecuada de LS75 en una mezcla de cloroformo y metanol 4/1 ($\text{CHCl}_3/\text{MetOH}$ (4/1)) para obtener una concentración final de $0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se secó bajo corriente de nitrógeno (N_2) para obtener una película lipídica delgada. Luego, la película de lípidos resultante se hidrató con PBS ($\text{pH} = 7,4$) hasta el 30% del volumen final, se calentó durante 5 min en baño a una temperatura $10 \text{ }^\circ\text{C}$ superior a la T_c del LS75 ($50\text{-}55 \text{ }^\circ\text{C}$) y se llevó a vortex 1 min, obteniéndose así una preparación de vesículas lipídicas multilamelares (LMVs). El proceso de homogeneización y reducción del tamaño se llevó a cabo por sonicación durante 30 min de la dispersión de vesículas, dando origen a las vesículas unilamelares (SUVs). Finalmente se incorpora el 70% del volumen de PBS necesario para alcanzar la concentración deseada ($0,25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). El tamaño hidrodinámico promedio de las SUVs medidos por análisis de dispersión de luz cuasi-elástica (DLS) fue de $63,4 \pm 6,7 \text{ nm}$, con una dispersidad alta ($\text{PDI} > 0,4$). El diámetro medio observado por TEM fue de $56,7 \pm 9,2 \text{ nm}$ de diámetro, Fig. 4.4.

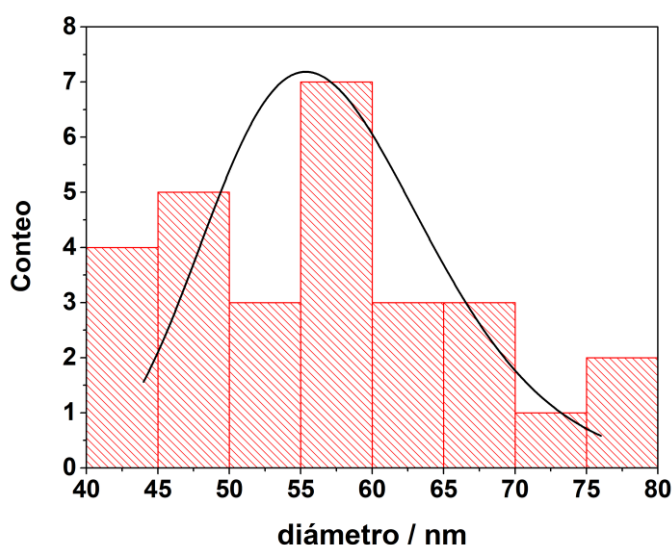


Figura 4.4: El histograma muestra la distribución de tamaño del diámetro de las SUVs.

Para obtener las formulaciones LMm/nano- HA_I , se suspendieron las nanopartículas de HA_I en PBS para obtener una concentración madre de 10 mg mL^{-1} y se sonicó durante 30 min. La formulación óptima de LMm/nano- HA_I se seleccionó después de identificar la capacidad máxima de adsorción de las SUVs en HA_I . Se llevaron a cabo experimentos de adsorción agregando la suspensión de HA_I a la dispersión de liposomas a temperatura ambiente. Cantidades adecuadas de la suspensión de nano- HA_I

y de la dispersión de SUVs de LS75 se mezclaron y diluyeron en tubos de ensayo para centrifuga con PBS, para obtener una concentración final de $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de HA_I y $0 - 0,28 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de LS75. Las mezclas se mantuvieron en contacto durante 20 h en refrigeración ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) y luego se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. La capa inferior centrifugada se separó del sobrenadante, se hidrató con PBS y se centrifugó nuevamente. El proceso se repitió tres veces para eliminar el lípido no adherido. En la Fig. 4.5 se presenta una representación esquemática del proceso de formación de las vesículas lipídicas y de la formulación LMm/nano- HA_I .

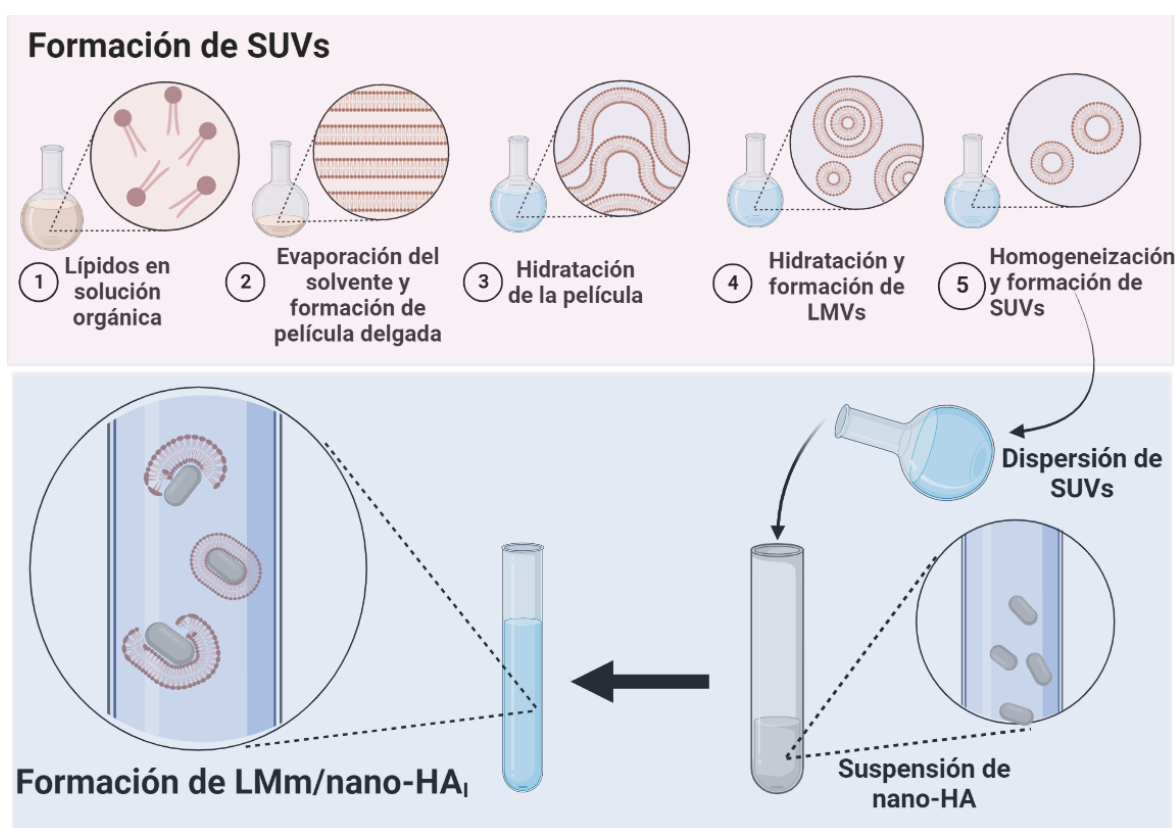


Figura 4.5: Representación esquemática del proceso de obtención de la formulación LMm/nano- HA_I . Creado con Biorender.com.

Después de la centrifugación, los sobrenadantes se transfirieron a viales de vidrio y se conservaron para la posterior cuantificación de lípidos mediante cromatografía líquida de alta presión de fase inversa, RP-HPLC. La cantidad de lípidos adsorbidos en HA_I se calculó como la diferencia entre la concentración inicial y la concentración

presente en el sobrenadante. La capacidad de adsorción, “q” (mg LS75/mg HA_I), se calculó con la ecuación:

$$q = \frac{([LS75]_0 - [LS75]) \times V}{m} \quad (ec. 4.1)$$

donde [LS75]₀ y [LS75] son las concentraciones inicial y en el sobrenadante de LS75 expresadas en mg·mL⁻¹; V (mL) es el volumen total de dispersión y m la masa de HA_I (mg).

4.2.2.2 Cuantificación de lípidos adsorbidos por RP-HPLC

Para la determinación de “q” (mg LS75/mg HA_I), se inyectó manualmente una alícuota de 20 µL de cada muestra en un HPLC Waters 600E MDS (Waters, Mississauga, ON, Canadá). El RP-HPLC estaba equipada con una columna de fase inversa C₁₈ (columna Nova-Pak C18, 60 Å, 4 µm, 3,9 mm x 150 mm, 1 por paquete, WAT086344) y un detector UV-vis (Water 486) ajustado a 205 nm. La fase móvil fue metanol – PBS 1 mM, 9,5:0,5 (v/v), pH = 7.4, bombeado a un caudal de 1 mL/min [54]. La concentración de lípidos en todas las muestras se determinó comparando la absorbancia UV de la fosfatidilcolina con una curva estándar ($R^2 > 0,998$) generada en las mismas condiciones. Las muestras y los disolventes se filtraron antes de su uso.

4.2.2.3 Distribución del tamaño de partícula y medición del potencial zeta (ζ)

Las distribuciones de tamaño y los potenciales (ζ) de las vesículas lipídicas (SUVs) y las formulaciones LMm/nano- HA_I se determinaron a 25,0 ± 0,1 °C utilizando un Malvern Zeta Sizer Nano (ZSP) con un láser He-Ne (633 nm) como fuente de luz incidente. El tamaño medio de partícula se obtuvo mediante análisis de dispersión de luz cuasi-elástica (DLS) a partir de las intensidades medidas en un ángulo de dispersión de 90°. Se realizaron diluciones 1/10 de todas las muestras con medio de hidratación filtrado a una tasa de recuento adecuada antes del análisis. Los valores informados fueron el resultado de diez determinaciones independientes.

4.2.2.4 Caracterización térmica y estabilidad de almacenamiento de las formulaciones de LMm/nano-HA_I

La caracterización térmica de las formulaciones de LMm/nano-HA_I se determinó utilizando un calorímetro diferencial de barrido Q20 (TA Instruments). Las escalas de temperatura y entalpía se calibraron utilizando muestras estándar de indio (CAS No.7440-74-6/1, T_m=156,6 °C, ΔH_m=3,295 kJ mol⁻¹) y zinc (CAS No.7440-66-6/ 3, T_m=419,53 °C, ΔH_m=7,103 kJ mol⁻¹). Las muestras de LMm/nano-HA_I, pesadas con una balanza de precisión de ± 0,00001 g, se sellaron en una bandeja de aluminio hermética para evitar cualquier pérdida de humedad durante la medición calorimétrica diferencial de barrido (DSC). Las muestras se enfriaron previamente a -20 °C durante 1 min. Posteriormente se calentaron hasta 600 °C a razón de 0,08 °C seg⁻¹. Se utilizó nitrógeno ultrapuro como gas de purga a una velocidad de 20 mL min⁻¹ durante la medición. La sustracción de la línea de base se realizó para corregir cualquier diferencia de capacidad calorífica entre la muestra y el horno de referencia. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El calor específico C_p en J g⁻¹ K⁻¹ de cada muestra se calculó a partir del termograma DSC consistente en flujo de calor (W g⁻¹) mediante la ecuación [55]

$$C_p = Q' \times 60/r \quad (\text{ec. 4.2})$$

donde r es la tasa de calentamiento del proceso en K min⁻¹, Q' es el flujo de calor en W g⁻¹. Los datos resultantes se usaron para construir curvas de calor específico versus temperatura. Los picos superpuestos se deconvolucionaron utilizando ajustes gaussianos.

La estabilidad de almacenamiento de las formulaciones de LMm/nano-HA_I se realizó mediante espectroscopia UV-Vis. Los espectros de absorción UV-vis se registraron en un espectrofotómetro de barrido UV-vis-NIR (Varian Cary 100 Bio) provisto de un controlador de temperatura (UV09005M013), utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de longitud de trayectoria. El índice de oxidación se calculó según la fórmula [56].

$$\% \textit{oxidation} = \frac{[\mu \textit{mol mL}^{-1} \textit{dieno}]}{[\mu \textit{mol mL}^{-1} \textit{fosfolípidos totales}]} \times 100 \quad (\textit{ec. 4.3})$$

La concentración de dieno se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de 30000 [56] y la absorbancia máxima del pico deconvolucionado a 222 nm.

4.2.2.5 Caracterización microestructural

La caracterización morfológica se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y óptica (MO). Las microfotografías TEM se tomaron utilizando un microscopio electrónico de transmisión Philips CM-12 operado a 120 kV equipado con una cámara digital MEGA VIEW-II DOCU. Las observaciones se realizaron en un campo claro después de teñir la muestra con una solución al 2 % en peso de PTA neutro (tamponada a pH 6,9–7,1 usando NaOH). Las muestras en polvo se colocaron sobre soportes de carbón de malla 2000. Las observaciones de MO se realizaron con un microscopio polarizador Nikon Eclipse E-200 POL (Tokio, Japón) acoplado a una cámara Nikon COOLPIX S4.

4.2.3 Eficiencia de carga y liberación de fármacos

Se estudió la eficiencia de carga *individual* de los fármacos CIP e IBU de las formulaciones de LMm/nano-HA_I. Se incorporaron las cantidades adecuadas de ambos fármacos a la solución orgánica de Lipoid S75 para alcanzar una concentración final de 0,25 mg·mL⁻¹ para LS75 y (2-20 μg·mL⁻¹) para cada principio activo de manera independiente. Luego, se obtuvieron las SUVs y se prepararon las formulaciones LMm/nano-HA_I cargadas de fármaco siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. Para determinar la capacidad máxima de carga, se suspendió 1 mL de la formulación con los fármacos incorporados en 4 mL de HCl/EtOH (1:1) para destruir la asociación membrana lipídica/nano-HA_I; se probaron otras condiciones menos agresivas, pero no permitieron romper esta asociación. Posteriormente, las muestras se agitaron vigorosamente y la HA_I precipitada se separó por centrifugación (4000 rpm, 10 min). Luego, los sobrenadantes se usaron para la cuantificación de los fármacos por medio de

espectroscopía UV-vis. Las medidas de absorbancia se registraron a $\lambda_{\max}=278,6$ nm para CIP y a $\lambda_{\max}=195,8$ y $221,2$ nm para IBU. La eficiencia de encapsulación (EE %) y la capacidad de carga de los fármacos por la formulación (DL_{HA}) se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones [57]:

$$EE\% = \frac{W_{total} - W_{lib}}{W_{total}} \times 100 \quad (ec. 4.4)$$

$$DL_{HA} = \frac{W_{total} - W_{lib}}{W_{HA}} \quad (ec. 4.5)$$

donde W_{lib} representa la cantidad de fármaco cuantificada en el sobrenadante, W_{total} y W_{HA} la cantidad total de fármaco y HA_I añadidas inicialmente al sistema, respectivamente.

Una vez establecidas las concentraciones que generaban la máxima incorporación de ambos fármacos de manera *individual*, se cuantificó, siguiendo el mismo procedimiento, la eficiencia de encapsulación cuando ambos se incorporan al sistema de manera *simultánea*.

Después del establecimiento de la máxima capacidad de carga *simultánea* de ambos fármacos por la formulación LMm/nano- HA_I ($0,05$ mg LS75·mg HA^{-1}), se seleccionaron dichas concentraciones para estudios de cinética de liberación. Estos estudios se realizaron en condiciones de pH fisiológico, de herida abierta y de piel sana (pH=7.4, 6.2 y 4.2; T=37 °C) para cada principio activo cargado. Tres juegos de tubos (diez tubos de vidrio cada uno) que contenían 1 mL de muestra cargada con fármaco se pusieron en contacto con 4 mL de los distintos medios de liberación seleccionados: PBS (pH=7,4), PBS (pH=6,2) y solución buffer de ácido acético/acetato de sodio (buffer AcOH, pH=4,2). Las cantidades de ambos principios activos liberados después de 0,25 a 72 h se determinaron mediante espectrometría UV-vis. Los resultados se expresaron como porcentaje de liberación de fármaco:

$$DR\% = \frac{W_{lib}}{W_{cargada}} \times 100 \quad (ec. 4.6)$$

donde W_{lib} y $W_{cargada}$ son la cantidad de fármaco en el sobrenadante después de la liberación y la cargada, respectivamente.

4.2.3.1 Modelos cinéticos para análisis de los perfiles de liberación

Para el estudio de los perfiles cinéticos de liberación se recurrió al modelo de Korsmeyer – Peppas, descrito en la *sección 3.3.5.3* del capítulo 3, y al modelo de Weibull, ambos modelos ampliamente utilizados para el análisis de entrega de fármacos desde estructuras lipídicas de tipo membrana [58].

El modelo de Weibull [59] ha sido descrito para diferentes procesos de liberación como:

$$DR\% = DR_0\% \left[1 - e^{-\frac{(t-T)^b}{a}} \right] \quad (ec. 4.7)$$

En esta ecuación, $DR\%$ es la cantidad de fármaco liberado en función del tiempo “ t ”; $DR_0\%$ es la cantidad total de fármaco que se libera a $t = \infty$ y T representa el tiempo de retraso (fase lag) medido como resultado del proceso de liberación. El parámetro “ a ” representa un parámetro de escala que describe la dependencia del tiempo y “ b ” describe la forma de progresión de la curva de liberación. Para $b = 1$, la forma de la curva corresponde exactamente a la forma de un perfil exponencial con la constante $k = 1/a$. El parámetro “ a ” puede ser reemplazado por el tiempo de disolución, $T_{60\%}$, que está definido por $a = (T_{60\%})^b$, y representa el intervalo de tiempo necesario para liberar el 60% del fármaco presente en una formulación farmacéutica.

4.2.4 Ensayos de Biocompatibilidad

4.2.4.1 Aislamiento y cultivo de osteoblastos de rata (rOBs)

Los cultivos primarios de osteoblastos de calvaria de rata (rOBs) se obtuvieron de calvarias aisladas de ratas Wistar jóvenes como se describió previamente [60]. Brevemente, las calvarias se obtuvieron a partir de ratas sacrificadas por decapitación rápida; se incubaron a 37 °C en PBS (conteniendo EDTA, 4 mM) durante dos períodos de 10 min y los sobrenadantes fueron descartados. Posteriormente, las calvarias se lavaron en PBS para luego realizar una digestión enzimática en una solución de 200 U/ml de colagenasa (U/ml: unidades de enzima por mililitro de disolución) en PBS durante cuatro períodos de 15 min. Las células liberadas durante la primera digestión fueron descartadas, mientras que las digestiones posteriores se recolectaron y se separaron de la solución enzimática mediante centrifugación durante 10 min a 1500 rpm. Luego, los osteoblastos fueron cultivados en Medio Esencial Alfa-Minimum suplementado con suero fetal bovino al 15%, 1 % de penicilina y estreptomina (α -MEM – 15 % FBS, 1 % P-E) a 37°C en atmósfera húmeda (5,5 % CO₂). El medio de cultivo se descartó luego de 24 h y se sustituyó por α -MEM – 10 % FBS, 1 % P-E, en el cual las células se cultivaron durante 2 o 3 días hasta llegar a aproximadamente un 80 % de confluencia. Por último, las células se almacenaron congeladas hasta su uso. El cuidado y manejo de los animales [61] fueron realizados por el servicio de animales del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, Argentina, de acuerdo con el estándar internacionalmente reconocido “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de laboratorio” promulgada por el Consejo Nacional de Investigación [62]. Los procedimientos activos utilizados en este trabajo han sido aprobados por el CICUAE (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación, Biología, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, Argentina). Se utilizaron células de paso dos a cuatro (P2-P4).

4.2.4.2 Morfología y viabilidad celular

Se llenó una placa de 48 pocillos con 25 μ L de muestras (SUVs de LS75, formulación LMm/nano-HA_I y formulación LMm/nano-HA_I cargada con CIP e IBU) y se esterilizó mediante radiación UV durante 5 h. Luego se sembraron los rOBs y se cultivaron durante 24 y 48 h en Medio Esencial Alfa-Minimum suplementado con suero

fetal bovino al 10% (α -MEM-10% FBS, Sigma-Aldrich), en atmósfera humidificada (5,5% CO₂) a 37° C. Después del tratamiento, la estimación de la viabilidad celular se realizó siguiendo el ensayo de absorción de rojo neutro [63]. La morfología de las células se observó en un microscopio Nikon Eclipse TE 300 acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS U2. Las células cultivadas en ausencia de material se usaron como control (C).

4.2.5 Evaluación de la actividad de ciprofloxacina e ibuprofeno *in vitro*

La actividad antibacteriana de la formulación LMm/nano-HA_I cargada con CIP e IBU se evaluó contra tres cepas bacterianas elegidas por representar un espectro clínicamente relevante de organismos [64], [65]: *Staphylococcus aureus* (S. aureus, ATCC 29213), especie *Gram-positiva*; *Escherichia coli* (E. coli, ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa, ATCC 27853), especies *Gram-negativas*. Estas cepas fueron aisladas y almacenadas en la Cátedra de Microbiología del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, Argentina.

4.2.5.1 Ensayo de difusión en agar

Para la prueba de difusión en agar se prepararon placas de petri estériles (8,5 cm de diámetro) que contenían 20 mL de agar nutritivo Mueller Hinton (Sigma-Aldrich, CAS N° 70191). Se hizo un pequeño orificio en el centro del agar solidificado con un ansa estéril. A continuación, se esparcieron uniformemente sobre las placas 100 μ L de un inóculo bacteriano de una concentración equivalente a 0,5 estándares de turbidez de McFarland utilizando una ansa estéril para placas. Las placas se dejaron 10 min para la correcta adsorción del microorganismo al medio de cultivo. Al mismo tiempo, los discos de papel de filtro estériles se embebieron con 20 μ L de muestras de la formulación LMm/nano-HA_I (a la máxima capacidad de carga de fármacos) por medio de una pipeta estéril y se incubaron durante la noche a 37 °C. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Se usaron muestras de LMm/nano- HA_I (no cargadas con fármaco) como control negativo.

4.2.5.2 Cuantificación de bacterias viables mediante ensayo de inoculación líquida

Se colocaron 2 ml de muestras de LMm/nano-HA_I (a la máxima capacidad de carga de fármacos) en 10 ml de PBS estéril que contenían 0,5 ml de inóculo bacteriano (equivalente a 0,5 estándares de turbidez de McFarland) y se cultivaron a 37 °C. Las 3 cepas bacterianas fueron expuestas a las muestras de la formulación multifármaco durante 1, 3, 24 y 48 h con agitación continua (25 rpm) en agitador rotatorio (New Brunswick Scientific). Una vez alcanzados los respectivos tiempos de contacto, se tomaron alícuotas de 1 ml de sobrenadante y se diluyeron según se requería de acuerdo con el método descrito por Miles et al. [66]. De cada una de estas diluciones en serie, se colocó 1 mL en placas de petri estériles (8,5 cm de diámetro) y luego se vertieron 20 mL de agar Mueller Hinton estéril (Sigma-Aldrich, CAS N° 70191) sobre la muestra. Después de la solidificación del agar a temperatura ambiente, las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C; las que contenían entre 30 y 300 colonias se contaron y multiplicaron por el valor de dilución adecuado para alcanzar el número final de colonias bacterianas desarrolladas. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción del recuento de colonias:

$$R\% = \frac{R_i - R_f}{R_i} \times 100 \quad (\text{ec. 4.8})$$

donde R_i y R_f son los recuentos bacterianos inicial y final, expresadas como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL⁻¹). Se utilizó como control el cultivo microbiano en ausencia del material, C.

4.2.5.3 Inhibición de la desnaturalización de la albúmina

La actividad del ibuprofeno liberado de la formulación LMm/nano-HA_I se evaluó indirectamente analizando el proceso de desnaturalización de la albúmina de suero bovino (BSA) de acuerdo con Galantini et al. [67] y Del Giudice et al. [68]. Se preparó una solución de BSA al 0,207% en peso, disolviendo la cantidad adecuada de polvo de BSA en PBS 10 mM, pH 7.4, con la adición de azida sódica 11 mM como conservante. La solución se filtró antes de su uso con un filtro de membrana Nucleopore (diámetro de 100

nm). Para inducir el proceso de desnaturalización, un volumen conocido de solución de proteína se mantuvo en contacto durante 10 h con la cantidad adecuada de urea (agente desnaturalizante) en el rango de concentraciones de 0,5 a 11 M, en matraces volumétricos. Se preparó otra batería de tubos con la cantidad adecuada de formulación multifármaco para lograr una relación molar (10:1) IBU:BSA y se mantuvo en contacto durante 5 h con la solución de BSA preparada, antes de la agregación del agente desnaturalizante. La proporción de proteína desnaturalizada, u %, se calculó de la siguiente manera:

$$u\% = \left(\frac{[Abs] - [Abs]_N}{[Abs]_D - [Abs]_N} \right) \times 100 \quad (ec. 4.9)$$

donde $[Abs]$, $[Abs]_N$ y $[Abs]_D$ son la absorbancia del grupo triptófano (Trp), $\lambda_{Trp}=280$ nm, en cada punto, en los estados nativo y desnaturalizado total, respectivamente. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y a temperatura ambiente.

4.2.6 Análisis estadístico

Todas las pruebas cuantitativas se realizaron por triplicado y luego se calcularon los valores medios con sus respectivas desviaciones estándar (media \pm DE). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA). La prueba t de Student y los valores de probabilidad por debajo de 0,05 ($p < 0,05$) se consideraron significativamente diferentes.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Formulaciones LMm/nano-HA_I

4.3.1.1 Screening inicial

La capacidad de adsorción de las nanopartículas de HA_I depende de su área superficial, topografía e hidratación, siendo esta última modulada por el pH y la concentración de electrolitos. Dichas características, Tabla 4.1, fueron previamente evaluadas en nuestro grupo de investigación por D'Elía y col. [60], [69], [70], habiéndose

verificado, además, la naturaleza hidrofílica de HA_I, así como también se informó lo propio en otros trabajos reportados en literatura [71], [72]. En los presentes experimentos de adsorción, además de la temperatura, se mantuvieron constantes tanto el pH como la fuerza iónica para que el foco central del proceso esté asociado con las interacciones entre las vesículas lipídicas y la superficie de HA_I.

Tabla 4.1: Propiedades superficiales de nano-HA_I

	$S_{BET}/m^2 g^{-1}$	$S_{Ac}/mmol g^{-1}$	R_{ku}	R_{sk}	d/nm	l/nm
nano-HA_I	$80,0 \pm 2,1$	$0,061 \pm 0,004$	$1,51 \pm 0,23$	$2,21 \pm 0,45$	15 ± 2	53 ± 14

Dimensiones de las nanopartículas de HA_I: diámetro (d) y longitud (l); área superficial (S_{BET}); acidez superficial (S_{Ac}); rugosidad superficial: parámetro de Kurtosis (R_{ku}) y parámetro de asimetría (R_{sk}).

Para seleccionar la formulación adecuada de LMm/nano-HA_I, se analizó la capacidad de adsorción (q) de las SUVs de LS75 sobre HA_I; los resultados se muestran en la Fig. 4.6:

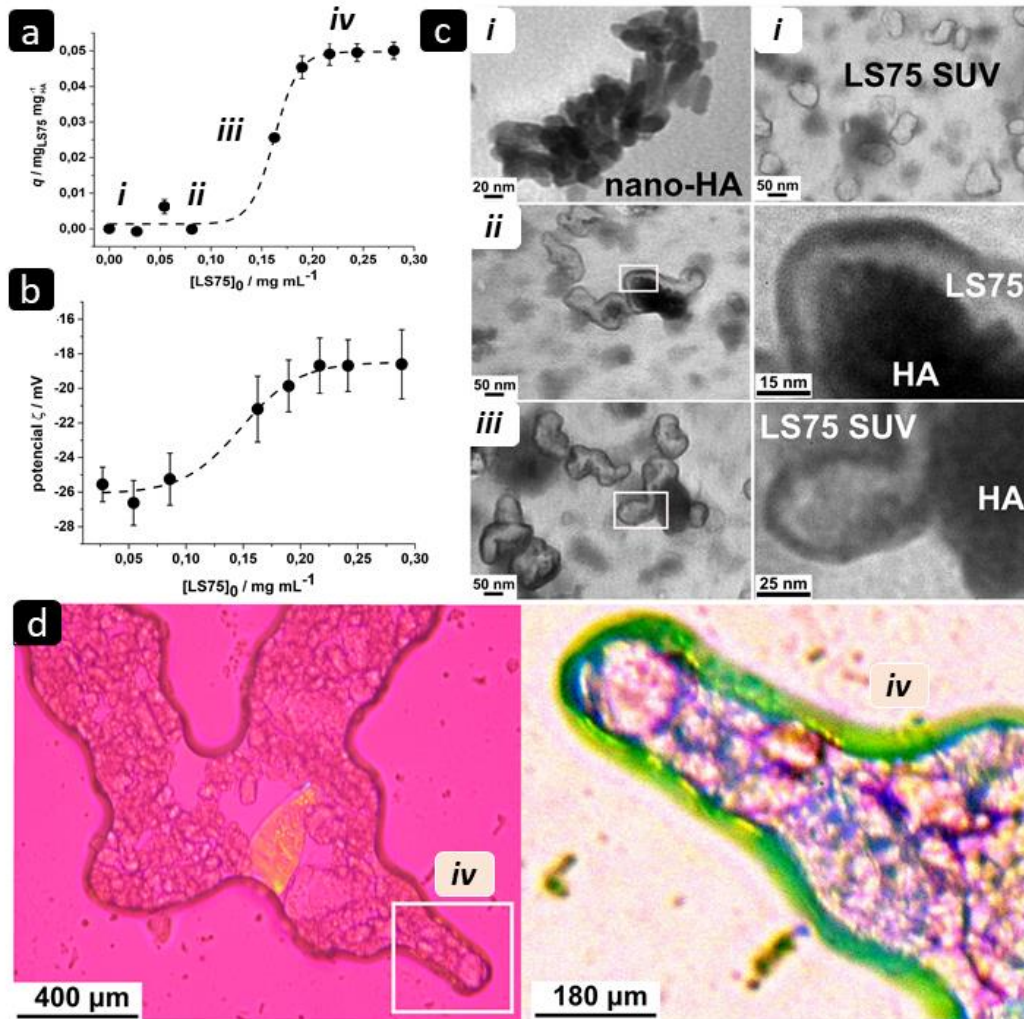


Figura 4.6: (a) variación de la capacidad de adsorción (q) y (b) potencial ζ frente a la concentración inicial de SUVs de LS75 (expresada como concentración inicial de LS75, $[LS75]_0$). (c) Observaciones de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de (i) nano-HA_I, SUVs LS75 y SUVs LS75/nano-HA_I a diferentes $[LS75]_0$: (ii) 0,08 mg mL⁻¹; (iii) 0,16 mg mL⁻¹; (iv) 0,25 mg mL⁻¹. Las muestras se diluyeron 1/10 para obtener imágenes representativas. (d) Microfotografía de microscopía óptica con luz polarizada de SUVs LS75 / nano-HA_I a $[LS75]_0 = 0.25$ mg mL⁻¹; aumento de 40x. La caja se amplió y manipuló (se descartó el fondo y se mejoró el contraste) con Image J Software para resaltar la capa de cristal líquido de los SUVs LS75 (amarillo-verde) alrededor de los cristales HA_I. Figura adaptada de referencia [73].

El proceso de adsorción general está representado por una curva sigmoide característica de una isoterma de tipo S, Fig. 4.6a, según la clasificación propuesta por Giles et al [74]. La progresión de la curvatura muestra que la adsorción se vuelve más fácil a medida que aumentan las concentraciones iniciales de fosfolípidos ($[LS75]_0$). Este proceso, llamado adsorción cooperativa, implica una asociación lado a lado de moléculas

adsorbidas que facilitan su unión a la superficie [75]. Experimentalmente se vio que cuando se obtienen este tipo de isothermas el adsorbato usualmente reúne una serie de características: (i) es una molécula monofuncional, es decir, tiene un gran residuo hidrofóbico (> 5 átomos de carbono) y una región localizada de la molécula con afinidad por el sustrato (ii) tiene una atracción intermolecular moderada, lo que hace que se empaquete verticalmente en una capa adsorbida de matriz regular; y (iii) encuentra una fuerte competencia por los sitios del sustrato, de las moléculas de solvente o de otros solutos presentes [74]. En nuestro caso, las condiciones (i) y (ii) se cumplen porque la estructura molecular de los fosfolípidos da cuenta de un esqueleto de hidrocarburo de más de 5 átomos de carbono y también favorece un arreglo de empaque vertical de acuerdo con su parámetro de empaquetamiento crítico ($P_c \approx 1$) [76]. Estudios previos [70] de interacciones de nano- HA_I /albúmina de suero bovino (BSA) indicaron que el proceso de adsorción de proteínas ocurre a través de interacciones electrostáticas seleccionadas entre los grupos Ca^{2+} y PO_4^{3-} en las superficies de nano- HA_I y los grupos COO^- y residuos de NH_4^+ en la molécula de BSA. Además, se demostró una alta competencia entre las moléculas de agua y proteína por los sitios de adsorción de HA_I [70]. Dado que están involucrados grupos funcionales similares, el mecanismo de unión de BSA a HA_I podría ser válido para la adsorción de LS75; cumpliendo la condición (iii) necesaria para obtener una isoterma tipo S. Los informes de literatura afirman que cuando se obtiene una isoterma tipo S con adsorbatos monofuncionales, aromáticos o alifáticos (> 5 átomos de carbono), las moléculas adsorbidas se orientan perpendicularmente a la superficie [74]. Este hecho apoya la idea de que las moléculas de fosfolípidos están orientadas en paralelo sobre superficies de nano- HA_I .

Por otro lado, en PBS, las superficies de HA_I se hidratan presentando una densidad de carga superficial negativa, potencial $\zeta = -26,5 \pm 1,4$ mV. En estas condiciones, la interacción máxima entre las moléculas de fosfatidilcolina y HA_I hidratado se produciría a través de los grupos $-N(CH_3)_3^+$ (colina). Dado que las SUVs LS75 también poseen carga superficial negativa, potencial $\zeta = -19,2 \pm 2,1$ mV, la repulsión electrostática explicaría la baja adsorción inicial. La ubicación paralela de las moléculas de fosfolípidos en la superficie de HA_I , dejaría sus cadenas hidrofóbicas expuestas a la solución, lo que va en contra de su naturaleza anfifílica. Por lo tanto, se propone que después del proceso de adsorción inicial, tuvo lugar una segunda etapa de adsorción más rápida y altamente favorecida que produjo la formación de una bicapa de fosfolípidos como recubrimiento.

Se describió un mecanismo similar para explicar la isoterma de adsorción tipo S del ácido antraceno-1-sulfónico sobre celulosa en agua [74].

La adsorción de LS75 en nano-HA_I se verificó a partir de medidas de potencial ζ de las nanopartículas equilibradas en PBS, antes y después de los experimentos de adsorción; los resultados se muestran en la Fig. 4.6b. Los resultados obtenidos mostraron una curva sigmoide concordante con la isoterma de adsorción. A lo largo de la fase de adsorción inicial, los sistemas mostraron un potencial ζ similar al del nano-HA_I pura, mientras que en la segunda etapa los valores tendieron hacia aquellos observados para las SUVs LS75 puras. Este hecho respalda la formación de una bicapa de fosfolípidos externa en la superficie del sustrato HA_I después de completar el proceso de adsorción.

Las observaciones de las micrografías TEM (Fig. 4.6c.) revelaron que hubo una interacción directa entre las SUVs LS75 y los nano-rods de HA_I. Se presentan aquí las nano-HA_I y SUVs LS75 puras (i) y luego de su interacción a distintas concentraciones iniciales de LS75: 0,08 mg mL⁻¹ (ii); 0,16 mg mL⁻¹ (iii); 0,25 mg mL⁻¹ (iv). Las muestras se diluyeron 1/10 para obtener imágenes representativas. En la Fig. 4.6d, se presenta el sistema LMm/nano-HA_I a [LS75]₀ = 0.25 mg mL⁻¹, observado por microscopía óptica con luz polarizada (aumento de 40x). La caja se amplió y manipuló (se descontó el fondo y se mejoró el contraste) con el software Image J para resaltar (en amarillo-verde) la capa de cristal líquido formada por la fase lipídica alrededor de los cristales de nano-HA_I.

Se puede verificar, así, que hay una adsorción explícita de las SUVs LS75 en nano-HA_I. A la máxima capacidad de adsorción, $q = 0,05 \text{ mg LS75} \cdot \text{mg HA}^{-1}$, se formó una estructura mimética de membrana sobre nano-HA_I, LMm/nano-HA_I. Se confirmó por microscopía de luz polarizada, que existe una asociación organizada de fosfolípidos similar a una mesofase líquido-cristalina, manifestada en las texturas birrefringentes mostradas en la Fig. 4.6d.

Para entender en profundidad la dinámica de adsorción y poder tener más precisiones de cómo se da la adsorción de los fosfolípidos para originar estas estructuras, habría que recurrir al uso de otro tipo de técnicas, como por ejemplo la microbalanza de cristal de cuarzo con control de disipación, que nos permita dilucidar si lo que ocurre aquí es la ruptura de las vesículas por sonicación y la consecuente adsorción de fosfolípidos individuales para luego autoensamblarse en bicapas, o si se da la adsorción de vesículas

intactas que luego se deforman y fusionan para dar origen a las bicapas, u otro tipo de mecanismo.

4.3.1.2 Caracterización térmica y estabilidad al almacenamiento

Se ha demostrado que las transiciones de fase, la peroxidación y/o la degradación hidrolítica de los fosfolípidos pueden afectar atributo físicos, tales como permeabilidad y fluidez, de las bicapas presentes en los liposomas. Tales propiedades impactan en el tamaño de las vesículas, la rigidez, el atrapamiento de fármacos y la unión a proteínas, lo que altera el rendimiento de la formulación in vivo. En consecuencia, antes de continuar, se analizó el efecto de nano-HA_I sobre el comportamiento de fase de la membrana de fosfolípidos y sobre la estabilidad de almacenamiento de las formulaciones de LMm/nano-HA_I. Todos los experimentos se realizaron sobre la capacidad de adsorción máxima de los sistemas LMm/nano-HA_I, esto es, $q = 0,05 \text{ mg LS75} \cdot \text{mg HA}_I^{-1}$. Los termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las SUVs LS75 y los sistemas LMm/nano-HA_I se muestran en la Fig. 4.7.

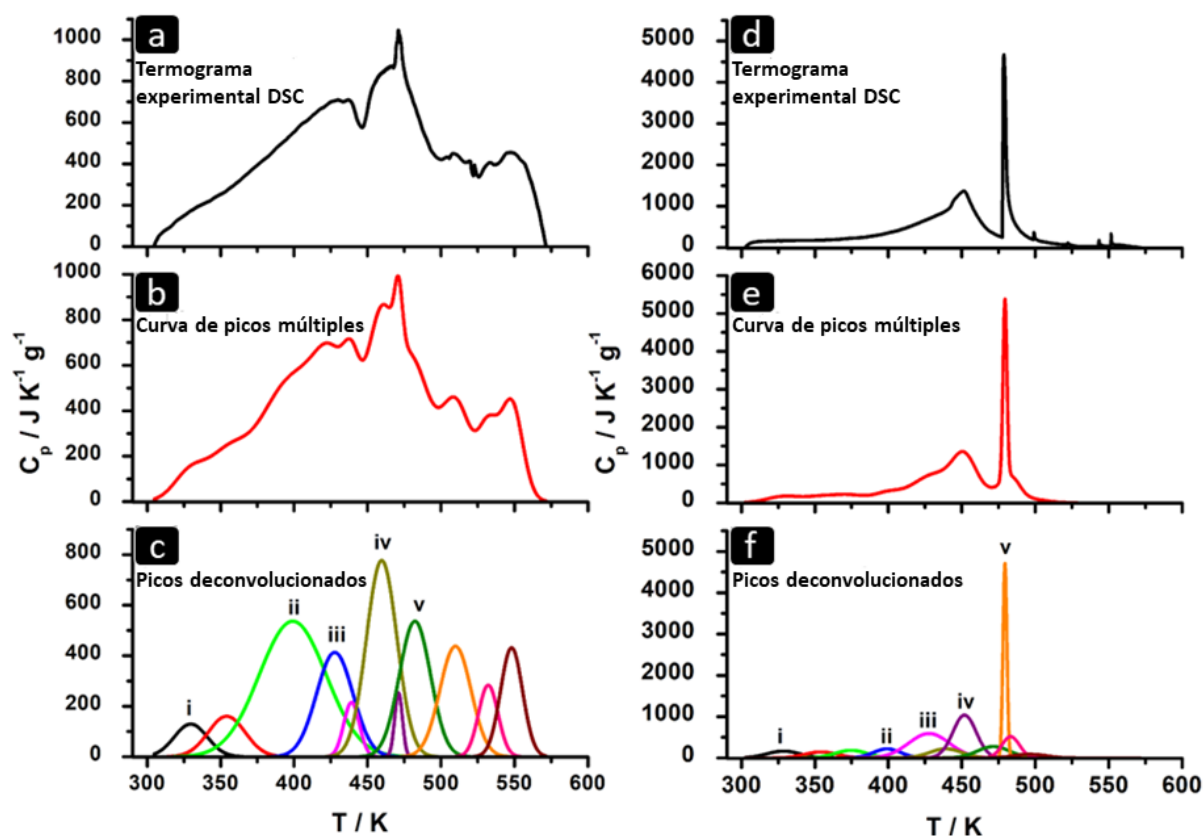


Figura 4.7: Termogramas obtenidos por DSC de SUVs LS75, $[\text{LS75}]_0 = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ (a, b, c) y formulación LMM/nano- HA_1 ($0,05 \text{ mg LS75} \cdot \text{mg HA}_1^{-1}$) (d, e, f). Figura adaptada de referencia [73].

Al estar compuestas de fosfolípidos naturales, donde existe una mezcla de longitudes de cadena de hidrocarburos, las SUVs LS75 muestran un termograma amplio y mal definido en el rango de temperatura de 300–550 K, Fig. 4.7a. Después de la deconvolución, el termograma resultó ser la suma de varios picos que representan diferentes transiciones de fase, Fig. 4.7c, en total acuerdo con lo informado en literatura [77]. Se detectaron cinco transiciones de fase principal endotérmicas a 329, 400, 428, 460 y 483 K; los parámetros termodinámicos se resumen en la Tabla 4.2. El pico observado a 329 K (56 °C), “i”, indica la temperatura de transición (T_m) a la cual la fase de gel ($L_\alpha + \text{H}_2\text{O}$) pasa al estado de cristal líquido lamelar (L_α). La presencia de agua ligada en la lecitina de soja aumentó la organización más prolongada de las moléculas de fosfolípidos y explicó las transiciones que surgen de T_m : “ii” $L_\alpha \rightarrow$ fase cristal líquido lamelar intermedia, (L'_α); “iii” $L'_\alpha \rightarrow$ fase cúbica (Q); “iv” $Q \rightarrow$ fase hexagonal reversible (H); y finalmente “v” $H \rightarrow$ solución “aceite” isotrópica [78].

Las transiciones de fase equivalentes se identificaron con el sistema LMm/nano-HA_I, Fig. 4.7d y f. Los parámetros termodinámicos calculados de las transiciones "i, ii, iii y iv" fueron comparables a los obtenidos para las SUVs LS75, mientras que la transición "v" surgió como un pico muy estrecho de un valor de ΔC_p muy superior, lo que denota una transición de fase extremadamente cooperativa. El análisis de cooperatividad de las transiciones de fase se realizó sobre la base de la metodología propuesta por Hobai y col. [79]. El parámetro cooperativo, σ , está ligado a la energía libre interfacial que genera la cooperatividad [79]:

$$\sigma = \left(\frac{\Delta H_t}{\Delta H_{vH}} \right)^2 \quad (\text{ec. 4.10})$$

donde ΔH_t y ΔH_{vH} fueron los valores experimentales y de van't Hoff (vH) de las principales entalpías de transición, respectivamente. Estos últimos se calcularon mediante una expresión aproximada, propuesta por Sturtevant [80]:

$$\Delta H_{vH} \sim \frac{6.9 \times T_0^2}{\Delta T_{1/2}} \quad (\text{ec. 4.11})$$

donde $T_0 \approx T_t$ es la temperatura de transición del fosfolípido "puro". En nuestro caso, se utilizaron temperaturas de transición experimentales, T_t , porque eran análogas a las observadas en el diagrama de fases de la lecitina de soja "pura" [78]. Los valores más pequeños de σ corresponden a una mayor cooperatividad de transición. La magnitud $n = 1/\sqrt{\sigma}$ está relacionada con el tamaño del dominio de la unidad cooperativa, siendo equivalente al número promedio de lípidos por lípido interfacial dentro de un dominio en el centro de la transición [79]. Los parámetros calculados para las transiciones de fase de fosfolípidos detectadas en la formulación LMm/nano-HA_I en comparación con las SUVs LS75 mostraron un valor de T_m de los sistemas LMm/nano-HA_I que garantizan un estado de gel de los fosfolípidos a 37 °C, y en consecuencia, que son aplicables para la entrega de fármacos [81]. Además, indicaron un aumento de la cooperatividad lipídica debido a la presencia de nanopartículas de HA_I para aquellas transiciones ocurridas a $T > T_m$; los resultados se resumen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Propiedades térmicas de las SUVs LS75 y de la formulación LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA⁻¹).

	<i>SUVs LS75</i>	<i>LMm / nano-HA_I</i>
<i>i, L_α + H₂O → L_α</i>		
T / K	329,0 ± 1,1	328,0 ± 0,9
ΔT _{1/2} / K	26,5 ± 0,9	26,9 ± 0,8
σ	0,05	0,03
n	≈ 5	≈ 6
ΔH / kJ g ⁻¹	3,61 ± 0,69	4,72 ± 0,56
ΔS / J K ⁻¹ g ⁻¹	10,97 ± 1,13	14,40 ± 2,41
ΔC _p / kJ K ⁻¹ g ⁻¹	129,65 ± 9,11	166,67 ± 7,43
<i>ii, L_α → L'α</i>		
T / K	400,0 ± 1,1	398,0 ± 0,6
ΔT _{1/2} / K	53,6 ± 1,0	21,8 ± 1,2
σ	2,2	0,01
n	≈ 1	≈ 10
ΔH / kJ g ⁻¹	30,60 ± 3,11	5,16 ± 0,87
ΔS / J K ⁻¹ g ⁻¹	76,50 ± 4,23	12,94 ± 1,12
ΔC _p / kJ K ⁻¹ g ⁻¹	536,14 ± 8,12	222,20 ± 2,67
<i>iii, L'α → Q</i>		
T / K	428,0 ± 0,9	427,0 ± 1,0
ΔT _{1/2} / K	29,1 ± 0,5	32,8 ± 0,8
σ	0,09	0,30
n	≈ 3	≈ 2
ΔH / kJ g ⁻¹	12,82 ± 2,21	20,68 ± 0,97
ΔS / J K ⁻¹ g ⁻¹	29,95 ± 1,11	48,39 ± 1,01
ΔC _p / kJ K ⁻¹ g ⁻¹	413,00 ± 6,12	592,6 ± 7,43
<i>iv, Q → H</i>		
T / K	460,0 ± 0,9	452,0 ± 0,8
ΔT _{1/2} / K	24,4 ± 1,1	18,7 ± 0,8
σ	0,11	0,07
n	≈ 3	≈ 4
ΔH / kJ g ⁻¹	20,23 ± 2,11	20,66 ± 3,20
ΔS / J K ⁻¹ g ⁻¹	44,00 ± 4,12	45,70 ± 3,12
ΔC _p / kJ K ⁻¹ g ⁻¹	777,78 ± 23,12	1036,97 ± 23,89
<i>v, H → L₂</i>		
T / K	483,0 ± 0,9	479,0 ± 1,1
ΔT _{1/2} / K	24,9 ± 0,9	3,1 ± 0,4
σ	0,05	9,43 × 10 ⁻⁴
n	≈ 5	≈ 33
ΔH / kJ g ⁻¹	14,27 ± 2,31	15,68 ± 1,87
ΔS / J K ⁻¹ g ⁻¹	29,53 ± 3,10	32,74 ± 3,61
ΔC _p / kJ K ⁻¹ g ⁻¹	537,04 ± 5,76	4713,76 ± 24,34

L_{α} , fase cristal líquido lamelar; L'_{α} , cristal líquido lamelar intermedio, parcialmente ordenado en otras fases; Q, fase cristal líquido cúbico; H, fase cristal líquido hexagonal invertido; L2, solución isotrópica "oleosa"; T_i , temperatura de transición; $\Delta T_{1/2}$, ancho de la transición a la mitad de la altura del pico; ΔH_i , entalpía durante la transición de fase; $\Delta C_{p,i}$, capacidad calorimétrica diferencial; ΔS_i , entropía de transición de fase.

La degradación de la bicapa lipídica debido a reacciones de hidrólisis y peroxidación es siempre una preocupación asociada con el almacenamiento de formulaciones de fármacos de liposomas [82]; estos eventos pueden verse alterados por la presencia de nano- HA_I . Se evaluó la estabilidad de la formulación de LMm/nano- HA_I frente a la hidrólisis y la peroxidación después de un período de almacenamiento de 20 días. Los fosfolípidos naturales, como la lecitina de soja, contienen solo enlaces dobles no conjugados y, por lo tanto, tienen un pico de absorbancia UV en longitudes de onda cortas (200–205 nm). La peroxidación de lípidos da como resultado la formación de dienos y trienos conjugados que están más favorecidos energéticamente que dos o tres dobles enlaces aislados; estos se detectan fácilmente, ya que absorben en la región UV a 230 y 270 nm respectivamente [56]. La Fig. 4.8a muestra los espectros UV-vis de la lecitina de soja después de ser separada del sistema LMm/nano- HA_I en los diferentes períodos de almacenamiento. Puede verse que el sistema es razonablemente estable frente a la oxidación. La formación de subproductos de degradación (dienes y/o trienos) fue inferior al 1% hasta los 15 días de almacenamiento, con un 6% de oxidación computado a los 20 días de almacenamiento, Fig. 4.8c.

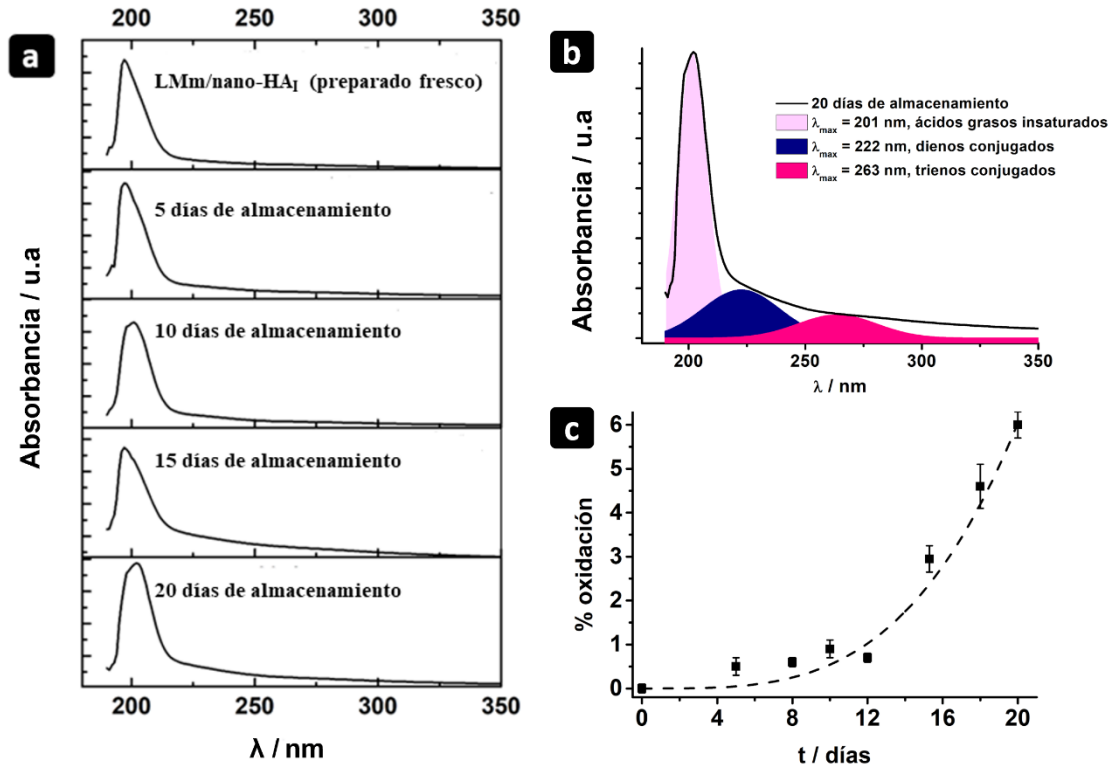


Figura 4.8: (a) espectros UV-vis del sistema LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA_I⁻¹) registrados durante el período de almacenamiento de 0; 5; 10; 15; 20 días. (b) Ejemplo de picos deconvolucionados de espectros UV-vis. (c) Índice de oxidación en función del tiempo de almacenamiento.

4.3.2 Carga y liberación múltiple de los fármacos CIP e IBU

La capacidad de carga *individual* de ibuprofeno y ciprofloxacina de la formulación LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA_I⁻¹) se muestra en la Fig. 4.9.

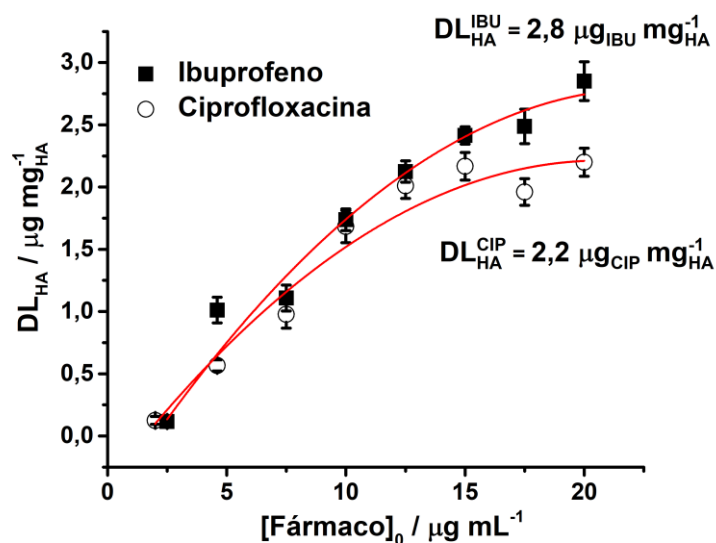


Figura 4.9: Capacidad de carga individual de fármaco (DL) de la formulación LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA_I⁻¹), a temperatura ambiente.

Se alcanzó una eficiencia de encapsulación *individual* máxima (EE%) de $(45,1 \pm 3,7) \%$ y $(57,3 \pm 5,4) \%$ para CIP e IBU, respectivamente; los resultados obtenidos están de acuerdo con los datos informados en literatura [83]–[85]. Después de la carga *simultánea* de ambos fármacos por la formulación, se observó que, aunque ambos son retenidos por el portador, Fig. 4.10 a y b, la capacidad de adsorción disminuyó. Los sistemas cargados con ambos fármacos retuvieron $(34,3 \pm 3,2) \%$ y $(26,2 \pm 4,3) \%$ de CIP e IBU, respectivamente.

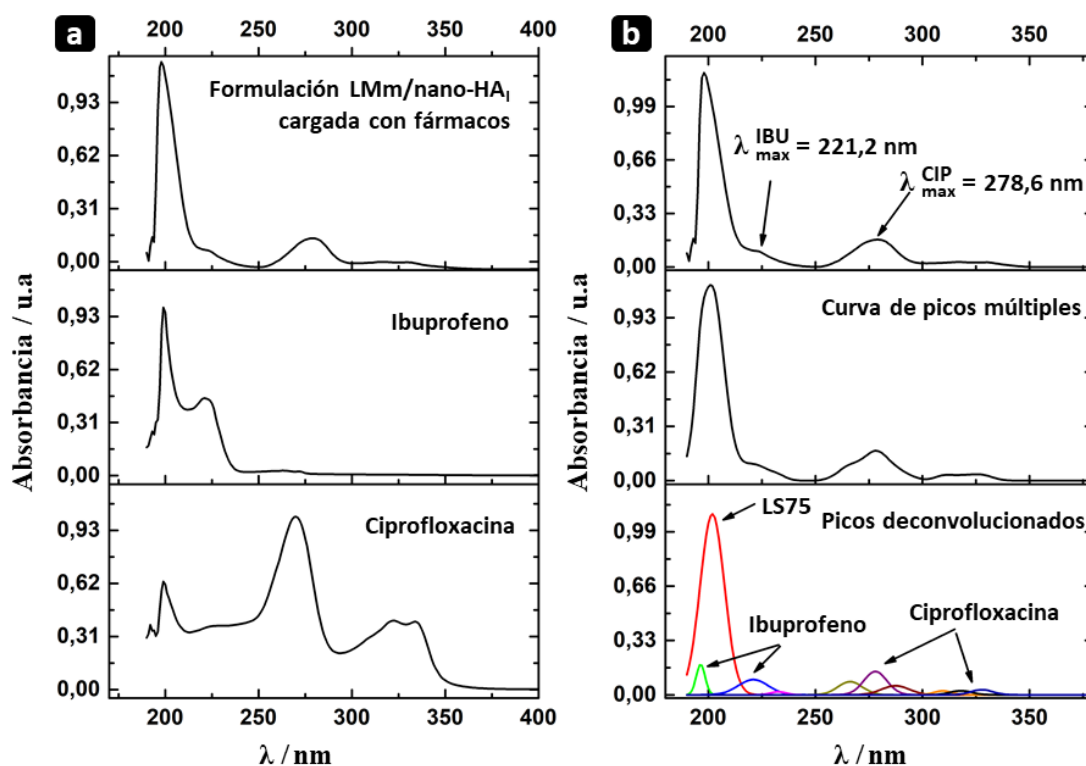


Figura 4.10: (a) Espectro UV-vis de la formulación LMM/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA_I⁻¹), con la máxima eficiencia de encapsulación alcanzada para ambos fármacos ($EE_{CIP} \% = 34,3 \pm 3,2$; $EE_{IBU} \% = 26,1 \pm 4,3$). Los espectros de IBU y CIP puros se incluyen como referencia. (b) Picos experimentales, teóricos y deconvolucionados de espectros UV-vis de la formulación LMM/nano-HA_I con la máxima eficiencia de encapsulación alcanzada para ambos fármacos. Figura adaptada de referencia [73].

La reducción de la eficiencia de encapsulación evidenció una clara competencia de los fármacos por las regiones de alojamiento del portador lipídico conforme a su distribución de carga a pH fisiológico (pH=7,4). Se han reportado varios estudios en relación a la interacción de ambos fármacos con biomembranas de fosfatidilcolina [86]–[90]. En ellos, se ha informado que CIP se ubica en el límite hidrofílico-hidrofóbico de la membrana, es decir, en la interfaz entre el grupo polar de la cabeza de los fosfolípidos y los primeros átomos de carbono de las cadenas hidrocarbonadas [86], [89]; mientras que IBU se dispone en la región hidrofóbica entre las cadenas acílicas de los ácidos grasos, dejando solo su grupo polar (COO⁻) en la interfaz lípido-agua [90], Fig 4.11a.

Tanto CIP como IBU tienen una gran capacidad para afectar la orientación de las cadenas lipídicas, induciendo modificaciones conformacionales que alteran la estructura y fluidez de las membranas [86], [87], [89], [90]. Sin embargo, se demostró que IBU, por

su localización, ejerce un mayor desorden en el empaquetamiento de las cadenas de acilo [90]. El desorden y/o perturbación de las cadenas lipídicas está asociado a la conversión conformacional *trans-gauche*, Fig 4.11 b, [89], [91], [92]. La conformación *trans* es la más estable, permite que las colas hidrocarbonadas de los fosfolípidos estén extendidas, lo que propicia mayores atracciones intermoleculares de Van de Waals entre las mismas y hace a la membrana más compacta y menos fluida [91], [92]. La conversión a la conformación *gauche* genera torceduras en las cadenas y desordena las membranas disminuyendo su espesor y aumentando el área por molécula [91], Fig 4.11b.

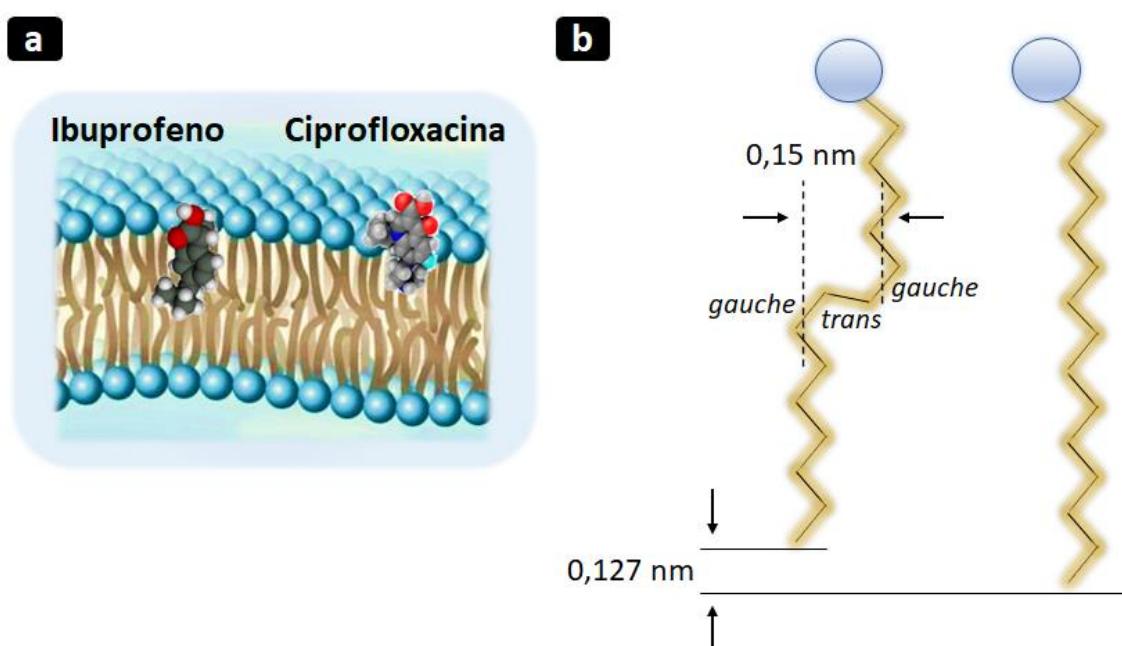


Figura 4.11: (a) Representación esquemática de la ubicación preferencial de las moléculas de IBU y CIP en una bicapa lipídica. (b) Conformación “*all trans*” (derecha) y conformación *gauche-trans-gauche* (izquierda) relativa a la cadena hidrocarbonada de los fosfolípidos de membrana (por simplicidad se representó una cadena hidrocarbonada por fosfolípido). Esquema adaptado de la publicación de *Hianik y col.*[91].

La reorganización de la membrana de fosfolípidos y la aparición de pliegues en las cadenas hidrocarbonadas para alojar las moléculas de IBU tiene un costo energético para el sistema LMm/nano-HA_i. La conversión *trans-gauche* conlleva un exceso energético para el sistema estimado en 3,5 kcal mol⁻¹ [89], [91], [92]. Por lo tanto, no fue sorprendente que nuestros resultados mostraran una menor retención de IBU en comparación con CIP y una reducción en la concentración final total de fármaco asimilada debido a la presencia *simultánea* de los mismos en la bicapa lipídica.

Los perfiles de liberación de IBU y CIP de la formulación multifármaco LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA_I⁻¹) se presentan en la Fig. 4.12.

En condiciones fisiológicas (pH=7,4; 37°C), Fig. 4.12a, se observa una liberación rápida y casi completa de IBU en 4 h, mientras que CIP demostró un perfil en dos etapas, entregándose el (38,5 ± 5,2) % en 4 h para posteriormente liberarse de manera gradual, manifestando un comportamiento de liberación sostenida. Se obtuvieron resultados similares a pH=6.2, Fig. 4.12b, liberándose prácticamente la totalidad de IBU y el (21,9 ± 3,4) % de CIP en las primeras 4 hs de ensayo.

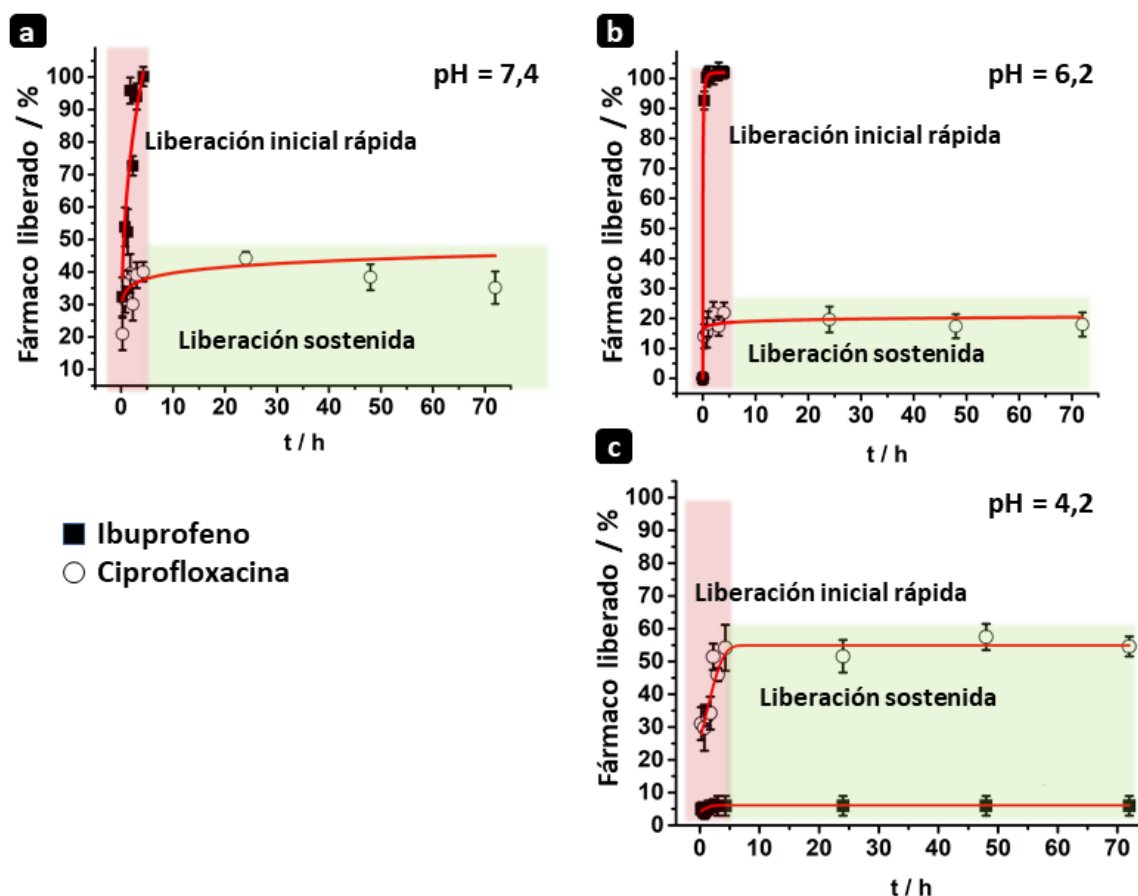


Figura 4.12: Liberación de ibuprofeno y ciprofloxacina de la formulación LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA_I⁻¹) cargado a su máxima capacidad portadora (EE% CIP = 34,3 ± 3,2 %; EE% IBU = 26,2 ± 4,3%) en (a) condiciones fisiológicas, pH = 7.4, (b) condiciones de herida abierta, pH = 6.2 y (c) condiciones de resorción ósea, pH = 4.2, a 37 °C. Las líneas rojas corresponden al ajuste del modelo de Weibull.

Los datos de cinética de liberación de los fármacos in vitro se ajustaron a diferentes modelos matemáticos: primer y cero orden [58], Hixson – Crowell [93], Higuchi [94], Korsmeyer – Peppas [95], Peppas – Sahlin [96] y Weibull [59], [97]. Se obtuvieron resultados adecuados después de la aplicación de los modelos Korsmeyer – Peppas y Weibull. Los resultados obtenidos indican que el mecanismo de difusión de Fick debería ser el principal factor de control de la velocidad del paso del fármaco a través de la bicapa lipídica, hallándose en todos los casos valores de “n” < 0,45, Tabla 4.3.

Tabla 4.3: Parámetros cinéticos obtenidos de la liberación de IBU y CIP de la formulación LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA⁻¹).

	<i>pH = 7,4</i>		<i>pH = 6,2</i>		<i>pH = 4,2</i>	
	<i>IBU</i>	<i>CIP</i>	<i>IBU</i>	<i>CIP</i>	<i>IBU</i>	<i>CIP</i>
Modelo de Korsmeyer - Peppas: $Q\% = k \times t^n$						
<i>k / % h⁻ⁿ</i>	59,27 ± 5,88	31,56 ± 1,97	44,97 ± 6,75	17,31 ± 1,08	5,28 ± 0,24	35,51 ± 2,73
<i>n</i>	0,39 ± 0,09	0,18 ± 0,06	0,28 ± 0,06	0,13 ± 0,06	(4,00 ± 0,01) × 10 ⁻²	0,26 ± 0,08
<i>R²</i>	0,9831	0,9587	0,9672	0,9994	0,9437	0,9785
Modelo de Weibull: $DR\% = DR_0\% \left[1 - e^{-\frac{(t-T)^b}{a}} \right]$						
<i>DR₀%</i>	97,58 ± 2,45	61,25 ± 1,71	101,9 ± 2,56	31,95 ± 4,29	10,03 ± 2,19	52,78 ± 3,94
<i>T / h</i>	0	0,25 ± 0,05	0	0	0	0
<i>b</i>	1	0,11 ± 0,03	0,47 ± 0,07	0,06 ± 0,01	0,1	1
<i>a / h^b</i>	1,05 ± 0,36	4,44 ± 1,13	25,12 ± 5,78	51,81 ± 6,29	33,33	0,97 ± 0,29
<i>T_{60%} = a^{1/b} / h</i>	1,05 ± 0,18	(7,75 ± 0,06) × 10 ⁵	(1,14 ± 0,54) × 10 ⁻³	(4,58 ± 0,84) × 10 ²⁹	(1,69 ± 0,12) × 10 ¹⁵	0,97 ± 0,31
<i>R²</i>	0,9675	0,9548	0,9999	0,9574	0,9439	0,9628

Donde k es la constante cinética (con unidades de t⁻ⁿ), t es el tiempo de liberación y n es el exponente de difusión que describe la liberación del fármaco. DR% es la cantidad de fármaco liberado en el momento t, DR₀% la cantidad total de fármaco que se libera; T representa el tiempo de retraso medido como resultado del mecanismo de liberación; “a” es un parámetro de escala que describe la dependencia del tiempo, “b” describe la forma de progresión de la curva de disolución y T_{60%} representa el intervalo de tiempo necesario (h) para liberar ≈ 60% del fármaco.

Los parámetros cinéticos del modelo de Weibull obtenidos indican que, desde un punto de vista teórico, la liberación de IBU a partir de la formulación a pH=7,4 no tiene fase de retraso (fase lag) y el 60% del fármaco se descarga en la primera hora, $t_{60} \% \approx 1$ h. De acuerdo con la farmacocinética de IBU en plasma [98], [99], la concentración sistémica máxima, alrededor de $28,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, se alcanza después de 1,5 h de disolución de una tableta ingerida de 400 mg; podría liberarse localmente una concentración equivalente de manera localizada a partir de 80 mg de la formulación multifármaco LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA_I⁻¹) en un tiempo idéntico.

La liberación de CIP en condiciones fisiológicas ocurre progresivamente con 0,25 h de tiempo de retraso y un $t_{60}\%$ de $(7,75 \pm 0,06) \times 10^5$ h, lo que denota que la liberación máxima acumulada no alcanza a ser del 60%, acercándose asintóticamente a este valor. Los niveles de concentración alcanzados estuvieron dentro del rango de las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) para aquellos microorganismos asociados a infecciones óseas periimplantarias (0,5 – 2 ug/ml) [100].

Por otra parte, en un entorno de pH de piel sana, pH = 4,2 [51], el comportamiento de expulsión de los fármacos es totalmente opuesto, Fig. 4.12c. La ciprofloxacina se libera más rápido y en mayor proporción, manteniendo el mecanismo de difusión de tipo Fick, con una cantidad total liberada ($DR_0\%$) de $(52,78 \pm 3,94) \%$ y con $t_{60}\% = (0,97 \pm 0,31)$ h; mientras que el ibuprofeno se retiene casi que completamente en el sistema, $DR_0\% = (10,03 \pm 2,19) \%$. Las nanopartículas de HA_I son biodegradables a pH=4,2 [69], lo que podría afectar la estabilidad de la formulación y generar la posterior descarga de fármacos. Sin embargo, el 40% de CIP se libera en una hora; punto en el que las nanopartículas tienen aproximadamente un 1% de degradación [69]. Por otro lado, nano-HA_I se degrada en un 50% a los 2,5 días, mientras que IBU no se libera en dicho período. Estos hechos indican que la liberación de los fármacos en condiciones de pH ácido no está sujeta únicamente a tiempos de degradación de nano-HA_I. A partir del pK_a de IBU (4,85), vemos que en estas condiciones de pH el 81% de las moléculas de ibuprofeno se encuentran como especie neutra [101] por lo que su solubilidad acuosa es casi nula, lo que generaría su permanencia dentro de la membrana de fosfolípidos. En cambio, CIP, como se mencionó en el capítulo anterior, presenta un perfil de solubilidad en forma de “U”, con alta solubilidad a $10 < \text{pHs} < 5$ y baja solubilidad cerca de la neutralidad [102].

El pH exacto de solubilidad mínima tiene una dependencia específica de la formulación [102], exhibiendo un valor mínimo a $\text{pH}=6,2$ en nuestra formulación multifármaco LMm/nano- HA_I ($0,05 \text{ mg LS75} \cdot \text{mg HA}_I^{-1}$).

El pH superficial de la piel sana posee un rango de pH de 4,2 a 5,6 que le sirve como protección antimicrobiana y que contribuye a las propiedades de este órgano como barrera de defensa con el medio externo [51]. Tras la implantación, el tejido subyacente expuesto está en un entorno de pH de 7,4 [51], el cual se acidifica en los estadios iniciales de la respuesta inflamatoria implicada en el proceso de curación, estableciéndose en torno a 6 [103], por lo que el pH del tejido en el lecho de la herida fluctuará, secuencialmente, de un pH ligeramente ácido a un pH neutro. La homeostasis, la inflamación y la proliferación celular, los tres pasos iniciales en el proceso de reparación de heridas, dura aproximadamente 7 días; dentro de los primeros 2-3 días de la cirugía comienza la migración y proliferación celular [104]. Es muy importante eliminar cualquier microorganismo dentro de los tres primeros días, ya que compiten con las células sanas por la adhesión a la superficie del implante. Si se adhieren bacterias en lugar de células de tejido, la probabilidad de que el implante sea integrado y la herida cicatrice correctamente es menor. Por el contrario, lo más probable es que se desarrolle un foco infeccioso y se progrese a un estado inflamatorio (peri-implantitis) que genere la necesidad de revisiones quirúrgicas que pueden derivar finalmente a la remoción del implante. Teniendo en cuenta esta escala temporal, demostramos que la formulación es estable y la disponibilidad de principios activos es adecuada para contrarrestar cualquier posible efecto no deseado relacionado con el procedimiento quirúrgico. La cinética de liberación sensible al pH evidencia que la liberación de ambos fármacos de la formulación LMm/nano- HA_I ($0,05 \text{ mg LS75} \cdot \text{mg HA}_I^{-1}$) es adecuada para el tratamiento de heridas abiertas derivadas de la cirugía de implantes. La ciprofloxacina podría actuar profilácticamente contra microorganismos patógenos, mientras que el ibuprofeno se liberará en el entorno de pH inflamatorio a medida que la herida progresa hacia la cicatrización y el pH se vuelve neutral.

4.3.3 Biocompatibilidad y eficiencia de la formulación multifármaco LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA_I⁻¹)

Las formulaciones de vehículos de fármacos no deberían provocar efectos adversos cuando se ponen en contacto con tejido vivo, es decir, la biocompatibilidad es un requisito imprescindible para un biomaterial implantable. Los ensayos de viabilidad celular *in vitro* constituyen un buen acercamiento para evaluar esta propiedad [69], [70], [105]. Por lo tanto, como paso previo a probar la eficiencia de la formulación, se verificó la biocompatibilidad de la formulación frente a un cultivo primario de osteoblastos de calvaria de rata (rOBs) mediante el ensayo de Rojo Neutro después de 48 h de tratamiento [63]; los resultados se muestran en la Fig. 4.13 a.

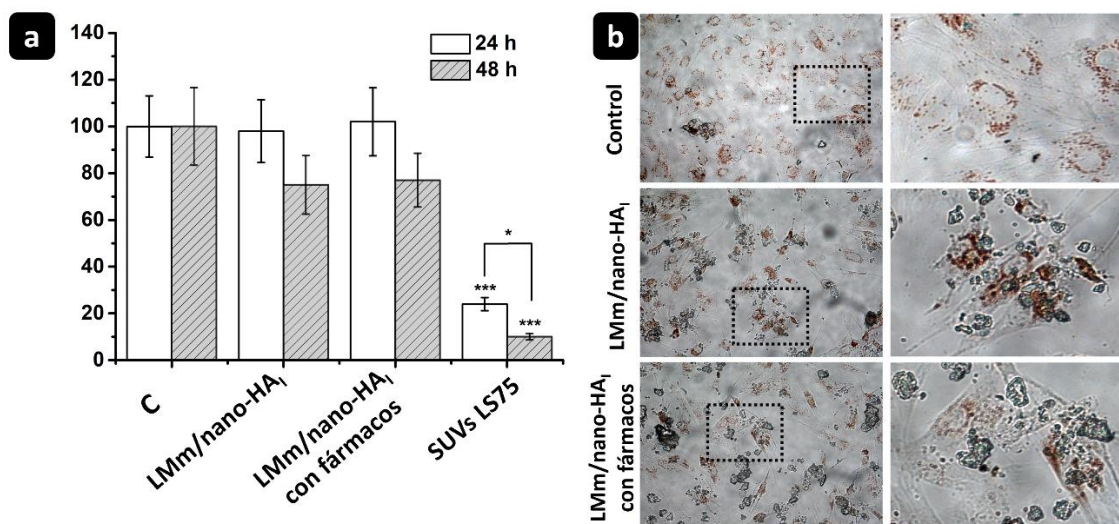


Figura 4.13: (a) viabilidad de (rOBs) después de 24 y 48 h de cultivo en presencia de la formulación LMm/nano-HA sin fármacos cargados, LMm/nano-HA con la máxima capacidad de carga de CIP e IBU y las vesículas de fosfolípidos (SUVs LS75). Los resultados se expresaron como porcentajes relativos al control (C). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$); las diferencias significativas entre las muestras se indican entre paréntesis. (b) Microfotografías ópticas de rOBs adheridos teñidos con colorante Rojo Neutro después de 48h de cultivo; los cristales de HA_I parecen como puntos brillantes. Figura adaptada de referencia [73].

La selección del tiempo de tratamiento se realizó en base a los resultados de la cinética de liberación: la liberación de IBU de LMm/nano-HA_I a pH fisiológico se había dado por completo a las 24 h de tratamiento mientras que CIP había alcanzado un nivel

de concentración estable. El ensayo de rojo neutro cuantifica actividad lisosomal, es decir, examina la aptitud de las células viables para asimilar moléculas de colorante en los lisosomas [63]. Los resultados obtenidos mostraron que la actividad lisosomal de los rOBs después de 48 h de cultivo en presencia de formulación LMm/nano-HA_I, tanto cargada como desprovista de fármaco, no tuvo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, C. La viabilidad de las células se correlacionó con las observaciones por microscopía óptica que confirmaron su estado de proliferación activa. Los rOBs en presencia del sistema LMm/nano-HA se adhirieron por completo y no se pudieron apreciar diferencias morfológicas significativas en comparación con el control, Fig. 4.13b. Al contrario de los sistemas LMm/nano-HA_I, se observó una clara reducción de la viabilidad de los rOBs después de 24 y 48 h de cultivo en presencia de las SUVs LS75. Los sistemas acuosos de fosfolípidos, particularmente la lecitina, experimentan autooxidación por radicales libres que dan como resultado la formación de dienos conjugados seguidos de hidropéroxido [56]. La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) va en contra de la viabilidad celular [106]. Particularmente, en nuestras condiciones experimentales, la producción de ROS se ve muy favorecida ya que las muestras se esterilizaron con luz UV antes del cultivo celular. La reducción de la viabilidad celular en presencia de las SUVs LS75 y no en presencia de los sistemas LMm/nano-HA_I, confirma nuestros resultados previamente inferidos relacionados con la asociación de nano-HA_I y fosfolípidos. La interacción entre LS75 y nano-HA_I para formar los sistemas LMm/nano-HA_I estabiliza la bicapa de fosfolípidos frente a la peroxidación y prácticamente evita la producción de especies ROS. A diferencia de las formulaciones farmacéuticas convencionales, los liposomas presentan un desafío en términos de esterilización debido a su composición; los fosfolípidos pueden verse afectados por las temperaturas ambientales y degradarse químicamente por oxidación e hidrólisis [81]. La irradiación puede emplearse para la esterilización de liposomas, sin embargo, se informó que los mismos pueden sufrir daño por oxidación e hidrólisis de los fosfolípidos. En nuestro trabajo, se encontró que las membranas lipídicas podrían protegerse del daño en presencia de las nanopartículas de HA_I. Este hecho da como resultado no solo un aumento en la estabilidad de almacenamiento, sino también una alta resistencia a las condiciones de esterilización por radiación UV. Una vez confirmada la biocompatibilidad de la formulación LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA⁻¹), se evaluó la influencia del sistema portador sobre la actividad de los fármacos. En el apartado anterior se demostró que la formulación cargaba y liberaba Ibuprofeno y Ciprofloxacina en las concentraciones

requeridas para ejercer una acción terapéutica adecuada en el tiempo de cicatrización adecuado.

Como confirmación, se realizaron y analizaron a continuación pruebas de actividad antibacteriana y de inhibición de la desnaturalización de albúmina *in vitro*. La reducción de los recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC) bacterianas, R%, en función de la liberación cinética de CIP se muestra en la Fig. 4.14a.

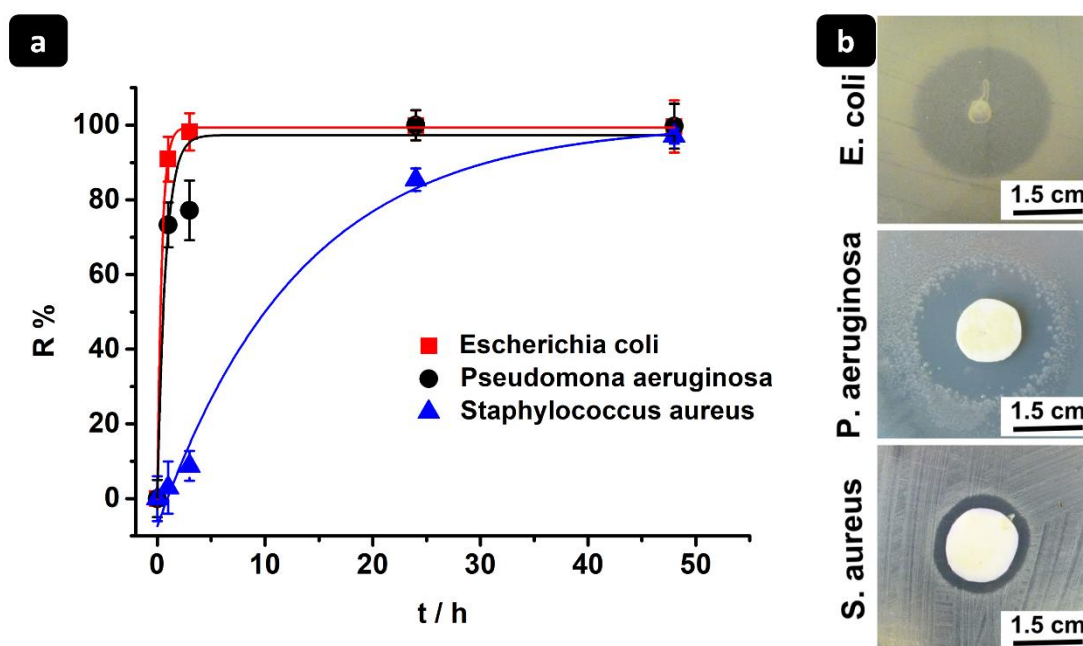


Figura 4.14: (a) cinética de reducción de los recuentos de UFC, R%, en presencia de la formulación multifármaco LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA⁻¹) a la máxima capacidad de carga. (b) Resultados del ensayo de difusión en agar después de 24 h de cultivo.

Se observó que para las bacterias *Gram-negativas*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, se alcanzó un 100% de capacidad de reducción en las 4 h iniciales, coincidiendo con la liberación inicial rápida de Ciprofloxacina observada. Por otro lado, la cinética de reducción de *S. aureus* fue gradual, exhibiendo un 50% de reducción a las ~10 h y una reducción general (100% de reducción) a las 48 h de ensayo. Se obtuvieron resultados comparables después del ensayo de difusión en agar, Fig. 4.14b, donde se puede observar que las áreas de inhibición para *S. aureus* eran menores que para *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Los resultados obtenidos concuerdan con la acción terapéutica de CIP y con su mayor efectividad antibacteriana frente a cepas *Gram-negativas* [100].

Para evaluar la actividad del ibuprofeno liberado por la formulación, se realizó el ensayo de inhibición de la desnaturalización de la albúmina. La albúmina es la proteína más abundante del plasma humano y tiene una gran importancia para transportar diversas sustancias ligadas a ella en el torrente sanguíneo, desde sustancias endógenas a exógenas. El ibuprofeno posee una conocida capacidad de unión a la albúmina que ha demostrado un efecto estabilizador de la estructura terciaria de la proteína cuando se la expone frente a diferentes agentes desnaturalizantes, como la urea. El antiinflamatorio ibuprofeno puede estabilizar drásticamente el isómero normal de la albúmina humana [67]. Generalmente se utiliza como modelo experimental a la albúmina sérica bovina (BSA) para diversos estudios de interacción de albúmina debido a que un 88% de su secuencia es homóloga a la de la albúmina humana [107], [108].

Hemos investigado la influencia del ibuprofeno en la desnaturalización de BSA inducida por urea para comprobar su actividad estabilizadora [67], [109], los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.15. Se calcularon las constantes de equilibrio de desnaturalización (K_u) y los cambios de energía libre de Gibbs (ΔG_u) a varias concentraciones de agente desnaturalizante utilizando las siguientes ecuaciones [110]:

$$K_u = \frac{u\%}{100-u\%} = e^{-\Delta G_u/RT} \quad (ec. 4.12)$$

Los valores de (ΔG_u) para BSA y para el complejo IBU-BSA se graficaron frente a la concentración de agente desnaturalizante, [D], y se aplicó un análisis de mínimos cuadrados lineales a los datos para determinar la energía libre de estabilización, ΔG_u (H_2O), como se indica por la ecuación [110]:

$$\Delta G_u = \Delta G_u(H_2O) - m[D] \quad (ec. 4.13)$$

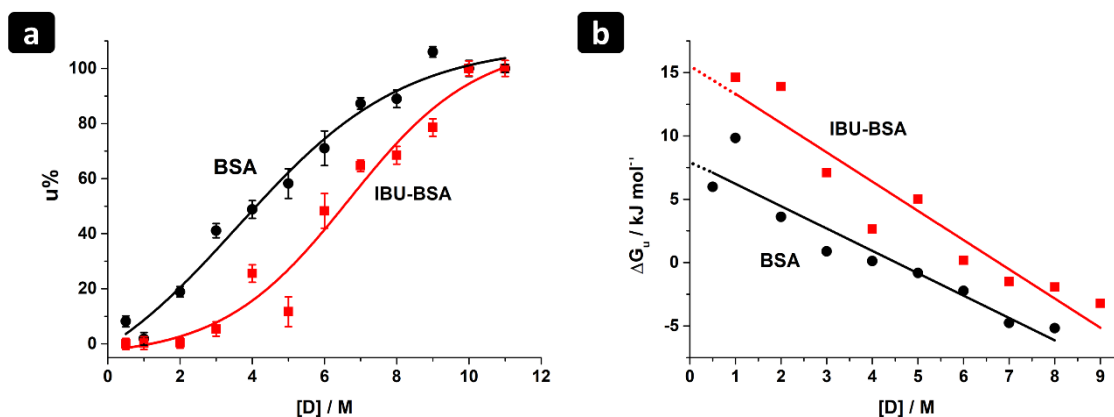


Figura 4.15: (a) porcentaje desnaturado y (b) energía libre de Gibbs en función de la concentración de agente desnaturante para BSA y para el complejo IBU-BSA.

El complejo IBU-BSA requirió 1,8 veces la concentración de agente desnaturante para lograr un 50% de desnaturación ($[D]_{0.5}$) y aumentó la energía libre de estabilización en comparación con BSA libre, Tabla 4.4.

Tabla 4.4: Parámetros que caracterizan la desnaturación de BSA e IBU-BSA a 25 °C.

	$n / \text{kJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$	$\Delta G_u(\text{H}_2\text{O}) / \text{kJ mol}^{-1}$	$[D]_{0.5} / \text{M}$
<i>BSA</i>	$1,76 \pm 0,23$	$7,98 \pm 1,07$	$3,60 \pm 0,95$
<i>IBU-BSA</i>	$2,31 \pm 0,29$	$15,63 \pm 1,64$	$6,67 \pm 0,58$

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el ibuprofeno liberado del sistema de administración múltiple de fármacos generó una estabilización de la estructura de BSA que se manifestó como una reducción de su porcentaje de desnaturación, en total acuerdo con los datos de literatura, validándose así su actividad [111].

4.4 Conclusiones

En este trabajo hemos desarrollado con éxito un sistema de administración multifármaco biocompatible basado en nano-hidroxiapatita con un recubrimiento lipídico

mimético de membrana: LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA⁻¹). Se confirmó que existe una interacción directa entre las moléculas de fosfolípidos y las nanopartículas de hidroxiapatita que se produce a través de un mecanismo de adsorción cooperativa. La asociación lado a lado entre las moléculas adsorbidas estabiliza la formulación de LMm/nano-HA_I frente a la peroxidación y/o degradación hidrolítica aumentando su estabilidad de almacenamiento y su resistencia a la esterilización por radiación ultravioleta.

La formulación seleccionada de LMm/nano-HA_I (0,05 mg LS75·mg HA⁻¹) se carga de manera efectiva con ciprofloxacina e ibuprofeno simultáneamente en una concentración que, una vez liberada por el sistema, proporciona los principios activos de manera localizada en un rango terapéutico adecuado, evitando la necesidad de acudir a dosis elevadas de la terapia sistémica convencional. La formulación demostró mejorar la eficiencia de carga porcentual (EE%) de los fármacos en relación a la de las nanopartículas de HA_I; siendo del 57,3 y 45,2%, y del 26,3 y 34,1% para la carga individual y simultánea de IBU y CIP, respectivamente.

Los principios activos descargados de la formulación multifármaco LMm/nano-HA_I alcanzan un rango terapéutico de concentración siguiendo una cinética de liberación que responde al pH, conservando su actividad terapéutica. De esta manera, exhibiendo una buena biocompatibilidad, alta estabilidad y propiciando el suministro local de ciprofloxacina e ibuprofeno en el marco de tiempo de curación adecuado, las formulaciones poseen cualidades esenciales para cumplir con las solicitudes de nuevas estrategias de tratamiento relacionadas con la reconstrucción de defectos óseos.

En el Capítulo 6, se presentará una visión general y comparada de las estrategias abordadas para el desarrollo de sistemas portadores de fármacos tanto en el capítulo anterior como en el presente.

4.5 Bibliografía

- [1] D. Lasic, "Novel applications of liposomes," *Trends Biotechnology*, vol. 16, no. 7, pp. 307–321, 1998.
- [2] R. Bala, R. K. Sindhu, B. Kaundle, R. Madaan, and S. Cavalu, "The prospective of liquid crystals in nano formulations for drug delivery systems," *J. Mol. Struct.*, vol. 1245, pp. 1–12, 2021.
- [3] A. Zabara and R. Mezzenga, "Controlling molecular transport and sustained drug release in lipid-based liquid crystalline mesophases," *Journal of Controlled Release*, vol. 188, Elsevier, pp. 31–43, 2014.
- [4] A. F. Kostko *et al.*, "Salt Effects on the Phase Behavior, Structure, and Rheology of Chromonic Liquid Crystals," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 109, no. 41, pp. 19126–19133, 2005.
- [5] U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, and W. Khan, "Liposomal formulations in clinical use: An updated review," *Pharmaceutics*, vol. 9, no. 2. MDPI AG, pp. 1–33, 2017.
- [6] Y. Barenholz and D. J. A. Crommelin, "Liposomes as pharmaceutical dosage forms," *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, vol. 9, 1994.
- [7] T. A. Elbayoumi and V. P. Torchilin, *Liposomes: Methods and protocols*, 1st ed., vol. 1. Totowa, NJ: Humana Press, 2010.
- [8] M. Gibis, N. Rahn, and J. Weiss, "Physical and oxidative stability of uncoated and chitosan-coated liposomes containing grape seed extract," *Pharmaceutics*, vol. 5, no. 3, pp. 421–433, 2013.
- [9] N. T. T. Le, V. du Cao, T. N. Q. Nguyen, T. T. H. Le, T. T. Tran, and T. T. Hoang Thi, "Soy Lecithin-Derived Liposomal Delivery Systems: Surface Modification and Current Applications," *International journal of molecular sciences.*, vol. 20, no. 19, p. 4706, 2019.
- [10] Y. Barenholz, "Liposome application: problems and prospects," *Current opinion in colloid & interface science*, vol. 6, no. 1, pp. 66–77, 2001.
- [11] F. Meunier, H. G. Prentice, and O. Ringden, "Liposomal amphotericin B (AmBisome): safety data from a phase II/III clinical trial," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 28, no. suppl B, pp. 83–91, 1991.
- [12] S. Phuphanich, B. Maria, R. Braeckman, and M. Chamberlain, "A pharmacokinetic study of intra-CSF administered encapsulated cytarabine (DepoCyt®) for the treatment of neoplastic meningitis in patients with leukemia, lymphoma, or solid tumors as part of a phase III study," *Journal of Neurooncology.*, vol. 81, no. 2, pp. 201–208, 2006.
- [13] E. Andreopoulou *et al.*, "Pegylated liposomal doxorubicin HCL (PLD; Caelyx/Doxil®): Experience with long-term maintenance in responding patients with recurrent epithelial ovarian cancer," *Annals of Oncology*, vol. 18, no. 4, pp. 716–721, 2007.

- [14] Ž. Vanić, M. W. Jøraholmen, and N. Škalko-Basnet, "Nanomedicines for the topical treatment of vulvovaginal infections: Addressing the challenges of antimicrobial resistance," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 178, p. 1138-55, 2021.
- [15] L. Bungener *et al.*, "Virosome-mediated delivery of protein antigens to dendritic cells," *Vaccine*, vol. 20, no. 17-18, pp. 2287-2295, 2002.
- [16] B. Carvalho, L. M. Roland, L. F. Chu, V. A. Campitelli, and E. T. Riley, "Single-Dose, Extended-Release Epidural Morphine (DepoDur™) Compared to Conventional Epidural Morphine for Post-Cesarean Pain," *Anesth Analg*, vol. 105, no. 1, pp. 176-183, 2007.
- [17] J. A. Silverman and S. R. Deitcher, "Marqibo® (vincristine sulfate liposome injection) improves the pharmacokinetics and pharmacodynamics of vincristine," *Cancer Chemother Pharmacol*, vol. 71, no. 3, pp. 555-564, 2013.
- [18] S. W. Burgess, J. D. Moore, and W. A. Shaw, "Lipids as raw materials for pharmaceutical products: properties and characteristics," in *Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes*, vol. 3, Y. Barenholz and D. D. Lasic, pp. 5-22, Eds. 2018.
- [19] T. L. Nguyen, T. H. Nguyen, and D. H. Nguyen, "Development and In Vitro Evaluation of Liposomes Using Soy Lecithin to Encapsulate Paclitaxel," *Int J Biomater*, vol. 2017, pp. 1-7, 2017.
- [20] G. R. List, "Soybean Lecithin: Food, Industrial Uses, and Other Applications," in *Polar Lipids: Biology, Chemistry, and Technology*, Elsevier Inc., pp. 1-33, 2015.
- [21] Y. Pan, R. v. Tikekar, and N. Nitin, "Effect of antioxidant properties of lecithin emulsifier on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds," *Int. J. Pharm.*, vol. 450, no. 1-2, pp. 129-137, 2013.
- [22] C. R. Scholfield, "Composition of soybean lecithin," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 58, no. 10, pp. 889-892, 1981.
- [23] A. Zachowski, "Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement," *Biochemical Journal*, vol. 294, no. 1, pp. 1-14, 1993.
- [24] N. G. Frega, D. Pacetti, and E. Boselli, "Characterization of Phospholipid Molecular Species by Means of HPLC-Tandem Mass Spectrometry," in *Tandem Mass Spectrometry: Applications and Principles*, pp. 637-672, 2012.
- [25] P. van Hoogevest and A. Wendel, "The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 116, no. 9, pp. 1088-1107, 2014.
- [26] J. Feigenbaum, "Antioxidant Effect of Commercial Lecithin in Fortified Margarine," *Nature*, vol. 157, no. 3997, pp. 770-771, 1946.
- [27] A. Judde, P. Villeneuve, A. Rossignol-Castera, and A. le Guillou, "Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 80, no. 12, pp. 1209-1215, 2003.
- [28] A. Judde, P. Villeneuve, A. Rossignol-Castera, and A. le Guillou, "Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 80, no. 12, pp. 1209-1215, 2003.

- [29] S. F. Hosseini, L. Ramezanzade, and M. Nikkhah, "Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 105, pp. 1455–1463, 2017.
- [30] M. E. Nasab, N. Takzaree, P. M. Saffaria, and A. Partoazar, "In vitro antioxidant activity and in vivo wound-healing effect of lecithin liposomes: A comparative study," *Journal of Comparative Effectiveness Research*, vol. 8, no. 8, pp. 633–643, 2019.
- [31] M. Panchatcharam, S. Miriyala, V. S. Gayathri, and L. Suguna, "Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species," *Mol. Cell Biochem.*, vol. 290, no. 1–2, pp. 87–96, 2006.
- [32] P. Roy, S. Amdekar, A. Kumar, R. Singh, P. Sharma, and V. Singh, "In vivo antioxidative property, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta*," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 140, no. 1, pp. 186–192, 2012.
- [33] M. Schäfer and S. Werner, "Oxidative stress in normal and impaired wound repair," *Pharmacological Research*, vol. 58, no. 2, pp. 165–171, 2008.
- [34] O. Şenel, O. Cetinkale, G. Özbay, F. Ahçioğlu, and R. Bulan, "Oxygen Free Radicals Impair Wound Healing in Ischemic Rat Skin," *Annals of plastic surgery*, vol. 39, no. 5, pp. 516–523, 1997.
- [35] D. T. S. Z. Miranda *et al.*, "Soy lecithin supplementation alters macrophage phagocytosis and lymphocyte response to concanavalin A: a study in alloxan-induced diabetic rats," *Cell Biochem Funct*, vol. 26, no. 8, pp. 859–865, 2008.
- [36] A. Sturm and A. U. Dignass, "Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1582, no. 1–3, pp. 282–288, 2002.
- [37] N.J. Cho, C. W. Frank, B. Kasemo, and F. Höök, "Quartz crystal microbalance with dissipation monitoring of supported lipid bilayers on various substrates," *Nature Protocols*, vol. 5, no. 6, pp. 1096–1106, 2010.
- [38] M. Dacic, J. A. Jackman, S. Yorulmaz, V. P. Zhdanov, B. Kasemo, and N.-J. Cho, "Influence of Divalent Cations on Deformation and Rupture of Adsorbed Lipid Vesicles," *Langmuir*, vol. 32, no. 25, pp. 6486–6495, 2016.
- [39] F. Mazur, M. Bally, B. Städler, and R. Chandrawati, "Liposomes and lipid bilayers in biosensors," *Adv. Colloid Interface Science*, vol. 249, pp. 88–99, 2017.
- [40] Y.-H. M. Chan and S. G. Boxer, "Model membrane systems and their applications," *Current opinion in chemical biology*, vol. 11, no. 6, pp. 581–587, 2007.
- [41] E. T. Castellana and P. S. Cremer, "Solid supported lipid bilayers: From biophysical studies to sensor design," *Surf. Sci. Rep.*, vol. 61, no. 10, pp. 429–444, 2006.
- [42] R. P. Richter, R. Bérat, and A. R. Brisson, "Formation of Solid-Supported Lipid Bilayers: An Integrated View," *Langmuir*, vol. 22, no. 8, pp. 3497–3505, 2006.
- [43] C. A. Keller and B. Kasemo, "Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance," *Biophysics Journal*, vol. 75, no. 3, pp. 1397–1402, 1998.

- [44] D. Meléndrez, T. Jowitt, M. Iliut, A. F. Verre, S. Goodwin, and A. Vijayaraghavan, "Adsorption and binding dynamics of graphene-supported phospholipid membranes using the QCM-D technique," *Nanoscale*, vol. 10, no. 5, pp. 2555–2567, 2018.
- [45] K. H. Biswas, J. A. Jackman, J. H. Park, J. T. Groves, and N.J. Cho, "Interfacial Forces Dictate the Pathway of Phospholipid Vesicle Adsorption onto Silicon Dioxide Surfaces," *Langmuir*, vol. 34, no. 4, pp. 1775–1782, 2017.
- [46] B. Seantier and B. Kasemo, "Influence of Mono- And Divalent Ions on the Formation of Supported Phospholipid Bilayers via Vesicle Adsorption," *Langmuir*, vol. 25, no. 10, pp. 5767–5772, 2009.
- [47] A. M. Carmona-Ribeiro and T. M. Herrington, "Phospholipid Adsorption onto Polystyrene Microspheres," *J. Colloid Interface Science*, vol. 156, no. 1, pp. 19–23, 1993.
- [48] T. H. Anderson, Y. Min, K. L. Weirich, H. Zeng, D. Fygenon, and J. N. Israelachvili, "Formation of Supported Bilayers on Silica Substrates," *Langmuir*, vol. 25, no. 12, pp. 6997–7005, 2009.
- [49] E. Reimhult, F. Höök, and B. Kasemo, "Vesicle adsorption on SiO₂ and TiO₂: Dependence on vesicle size," *J. Chem. Phys.*, vol. 117, no. 16, pp. 7401–7404, 2002.
- [50] R. G. Horn, "Direct measurement of the force between two lipid bilayers and observation of their fusion," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 778, no. 1, pp. 224–228, 1984.
- [51] L. R. Bennison, C. N. Miller, R. J. Summers, A. Minnis, G. Sussman, and W. McGuiness, "The pH of wounds during healing and infection: a descriptive literature review," *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*, vol. 25, no. 2, pp. 1–7, 2017.
- [52] M. Gibis, N. Rahn, and J. Weiss, "Physical and Oxidative Stability of Uncoated and Chitosan-Coated Liposomes Containing Grape Seed Extract," *Pharmaceutics*, vol. 5, no. 4, pp. 421–433, 2013.
- [53] L. A. Benedini, M. A. Sequeira, M. L. Fanani, B. Maggio, and V. I. Doderio, "Development of a Nonionic Azobenzene Amphiphile for Remote Photocontrol of a Model Biomembrane," *J. Phys. Chem. B*, vol. 120, no. 17, pp. 4053–4063, 2016.
- [54] M. Smith and F. B. Jungalwala, "Reversed-phase high performance liquid chromatography of phosphatidylcholine: a simple method for determining relative hydrophobic interaction of various molecular species," *J. Lipid Res.*, vol. 22, no. 4, pp. 697–704, 1981.
- [55] Gönül Kaletunç, *Calorimetry in Food Processing: Analysis and Design of Food Systems*, 1st ed. John Wiley & Sons, 2009.
- [56] R. R. C. New, *Structure of liposomes. Liposomes: A practical Approach*. IRC Oxford, 1997.
- [57] J. Samuel, M. E. C. Lutsiak, and G. S. Kwon, "Analysis of Peptide and Lipopeptide Content in Liposomes," *Journal of pharmacy and pharmaceutical Science*, vol. 5, no. 3, pp. 279–284, 2002.

- [58] A. Jain and S. K. Jain, "In vitro release kinetics model fitting of liposomes: An insight," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 201, pp. 28–40, 2016.
- [59] W. Weibull, "A statistical distribution function of wide applicability," *Journal of Applied Mechanics-Transactions of the American Society of Mechanical Engineers*, vol. 18, no. 3, pp. 293–297, 1951.
- [60] N. L. D'Elía, A. N. Gravina, J. M. Ruso, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. v. Messina, "Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic," *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, vol. 1830, no. 11, pp. 5014–5026, 2013.
- [61] N. C. Andrés, N. L. D'Elía, J. M. Ruso, A. E. Campelo, V. L. Massheimer, and P. V. Messina, "Manipulation of Mg^{2+} - Ca^{2+} Switch on the Development of Bone Mimetic Hydroxyapatite," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 18, pp. 15698–15710, 2017.
- [62] National Research Council, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, D.C.: National Academies Press, 2010.
- [63] G. Repetto, A. del Peso, and J. L. Zurita, "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity," *Nature Protocols*, vol. 3, no. 7, pp. 1125–1131, 2008.
- [64] N. B. Shah *et al.*, "Pseudomonas Prosthetic Joint Infections: A Review of 102 Episodes," *J. Bone Jt. Infect.*, vol. 1, no. 1, pp. 25–30, 2016.
- [65] M. E. A. de Kraker, P. G. Davey, and H. Grundmann, "Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe," *PLoS Med*, vol. 8, no. 10, 2011.
- [66] A. A. Miles, S. S. Misra, and J. O. Irwin, "The estimation of the bactericidal power of the blood," *Epidemiol. Infect.*, vol. 38, no. 6, pp. 732–749, 1938.
- [67] L. Galantini, C. Leggio, P. v. Konarev, and N. v. Pavel, "Human serum albumin binding ibuprofen: A 3D description of the unfolding pathway in urea," *Biophys. Chem.*, vol. 147, no. 3, pp. 111–122, 2010.
- [68] A. del Giudice, C. Leggio, N. Balasco, L. Galantini, and N. v. Pavel, "Ibuprofen and Propofol Cobinding Effect on Human Serum Albumin Unfolding in Urea," *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 34, pp. 10043–10051, 2014.
- [69] N. L. D'Elía, C. Mathieu, C. D. Hoemann, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. V. Messina, "Bone-repair properties of biodegradable hydroxyapatite nano-rod superstructures," *Nanoscale*, vol. 7, no. 44, pp. 18751–18762, 2015.
- [70] N. L. D'Elia, N. Gravina, J. M. Ruso, J. L. Marco-Brown, J. M. Sieben, and P. V. Messina, "Albumin-mediated deposition of bone-like apatite onto nano-sized surfaces: Effect of surface reactivity and interfacial hydration," *J. Colloid Interface Science*, vol. 494, pp. 345–354, 2017.
- [71] R. Astala and M. J. Stott, "First-principles study of hydroxyapatite surfaces and water adsorption," *Physical Review B*, vol. 78, no. 7, p. 075427, 2008.

- [72] M. Corno, C. Busco, V. Bolis, S. Tosoni, and P. Ugliengo, "Water Adsorption on the Stoichiometric (001) and (010) Surfaces of Hydroxyapatite: A Periodic B3LYP Study," *Langmuir*, vol. 25, no. 4, pp. 2188–2198, 2009.
- [73] D. Placente, L. A. Benedini, M. Baldini, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. V. Messina, "Multi-drug delivery system based on lipid membrane mimetic coated nano-hydroxyapatite formulations," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 548, no. 1, pp. 559–570, 2018.
- [74] C. H. Giles, T. H. MacEwan, S. N. Nakhwa, and D. Smith, "786. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids," *Journal of the Chemical Society (Resumed)*, pp. 3973–3993, 1960.
- [75] J. S. Piccin, T. R. S. A. Cadaval, L. A. A. de Pinto, and G. L. Dotto, "Adsorption isotherms in liquid phase: Experimental, modeling, and interpretations," in *Adsorption Processes for Water Treatment and Purification*, Springer International Publishing, pp. 19–51, 2017.
- [76] Jacob N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces*, Third edition. Academic Press, 2010.
- [77] M. S. Freag, Y. S. R. Elnaggar, and O. Y. Abdallah, "Lyophilized phytosomal nanocarriers as platforms for enhanced diosmin delivery: Optimization and ex vivo permeation," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 8, pp. 2385–2397, 2013.
- [78] B. Bergenstfihl and K. Fontell, "Phase equilibria in the system soybean lecithin/water," *Prog. Colloid Polym. Sci.*, vol. 68, pp. 48–62, 1983.
- [79] S. Hobai, "An approximate cooperativity analysis by DSC of phase transitions of DPPC-DOcNa dispersions," *arXiv preprint physics/0101022*, pp. 1–7, 2001.
- [80] J. M. Sturtevant, "A scanning calorimetric study of small molecule-lipid bilayer mixtures.," *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol. 79, pp. 3963–3967, 1982.
- [81] B. S. Pattni, V. v. Chupin, and V. P. Torchilin, "New Developments in Liposomal Drug Delivery," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 19, pp. 10938–10966, 2015.
- [82] N. M. Payton, M. F. Wempe, Y. Xu, and T. J. Anchordoquy, "Long-Term Storage of Lyophilized Liposomal Formulations," *J. Pharm. Sci.*, vol. 103, no. 12, pp. 3869–3878, 2014.
- [83] R. Nicholov *et al.*, "Interaction of Ciprofloxacin Loaded Liposomes with Pseudomonas Aeruginosa Cells," *Cells and Materials*, vol. 3, no. 3, pp. 321–326, 1993.
- [84] A. R. Mohammed, N. Weston, A. G. A. Coombes, M. Fitzgerald, and Y. Perrie, "Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability," *Int. J. Pharm.*, vol. 285, no. 1–2, pp. 23–34, 2004.
- [85] Y. He, L. Luo, S. Liang, M. Long, and H. Xu, "Influence of probe-sonication process on drug entrapment efficiency of liposomes loaded with a hydrophobic drug," *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 68, no. 4, pp. 193–197, 2019.

- [86] M. T. Montero, J. Hernández Borrell, and K. M. W. Keough, "Fluoroquinolone–Biomembrane Interactions: Monolayer and Calorimetric Studies," *Langmuir*, vol. 14, no. 9, pp. 2451–2454, 1998.
- [87] J. Hernandez Borrell and T. Montero, "Does ciprofloxacin interact with neutral bilayers? An aspect related to its antimicrobial activity," *Int J Pharm*, vol. 252, no. 1–2, pp. 149–157, 2003.
- [88] R. Sreij *et al.*, "Interaction of the Saponin Aescin with Ibuprofen in DMPC Model Membranes," *Mol. Pharm.*, vol. 15, no. 10, pp. 4446–4461, 2018.
- [89] H. Bensikaddour *et al.*, "Characterization of the Interactions between Fluoroquinolone Antibiotics and Lipids: a Multitechnique Approach," *Biophys. J.*, vol. 94, no. 8, pp. 3035–3046, 2008.
- [90] C. B. Fox, R. A. Horton, and J. M. Harris, "Detection of Drug–Membrane Interactions in Individual Phospholipid Vesicles by Confocal Raman Microscopy," *Anal. Chem.*, vol. 78, no. 14, pp. 4918–4924, 2016.
- [91] T. Hianik, "Structure and physical properties of biomembranes and model membranes," *Acta Physica Slovaca*, vol. 56, no. 6, 2006.
- [92] T. Róg, M. Pasenkiewicz-Gierula, I. Vattulainen, and M. Karttunen, "Ordering effects of cholesterol and its analogues," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1788, no. 1, pp. 97–121, 2009.
- [93] A. W. Hixson and J. H. Crowell, "Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation," *Ind. Eng. Chem.*, vol. 23, no. 8, pp. 923–931, 1931.
- [94] T. Higuchi, "Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices," *J. Pharm. Sci.*, vol. 52, no. 12, pp. 1145–1149, 1963.
- [95] R. W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, and N. A. Peppas, "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers," *Int. J. Pharm.*, vol. 15, no. 1, pp. 25–35, 1983.
- [96] N. A. Peppas and J. J. Sahlin, "A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation," *Int. J. Pharm.*, vol. 57, no. 2, pp. 169–172, 1989.
- [97] F. Langenbucher, "Letters to the Editor: Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 24, no. 12, pp. 979–981, 2011.
- [98] N. M. Davies, "Clinical Pharmacokinetics of Ibuprofen," *Clin Pharmacokinet*, vol. 34, no. 2, pp. 101–154, 1998.
- [99] G. F. Lockwood *et al.*, "Pharmacokinetics of ibuprofen in man. I. Free and total area/dose relationships," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 34, no. 1, pp. 97–103, 1983.
- [100] J. S. Wolfson and D. C. Hooper, "The Fluoroquinolones: Structures, Mechanisms of Action and Resistance, and Spectra of Activity In Vitro," 1985.
- [101] T. Liu and J. Qiu, "Preparations and properties of amino acid/dodecylamine/ibuprofen/H₂O vesicles and microspheres," *Colloids Surf. A Physicochem. Eng Asp*, vol. 320, no. 1–3, pp. 85–91, 2008.

- [102] M. E. Olivera *et al.*, "Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Ciprofloxacin Hydrochloride," *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no. 1, pp. 22–33, 2011.
- [103] M. Gautam, C. J. Benson, and K. A. Sluka, "Increased response of muscle sensory neurons to decreases in pH after muscle inflammation," *Neuroscience*, vol. 170, no. 3, pp. 893–900, 2010.
- [104] O. Garraud, W. N. Hozzein, and G. Badr, "Wound healing: time to look for intelligent, 'natural' immunological approaches?," *BMC Immunol.*, vol. 18, no. S1, p. 23, 2017.
- [105] D. F. Williams, "On the mechanisms of biocompatibility," *Biomaterials*, vol. 29, no. 20, pp. 2941–2953, 2008.
- [106] N. Gravina, K. Maghni, M. Welman, L. Yahia, D. A. Mbeh, and P. v. Messina, "Protective role against hydrogen peroxide and fibroblast stimulation via Ce-doped TiO₂ nanostructured materials," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1860, no. 2, pp. 452–464, 2016.
- [107] F.-F. Tian *et al.*, "Synthesis of a Novel Hydrazone Derivative and Biophysical Studies of Its Interactions with Bovine Serum Albumin by Spectroscopic, Electrochemical, and Molecular Docking Methods," *J. Phys. Chem. B*, vol. 114, no. 46, pp. 14842–14853, 2010.
- [108] P. Bolel, N. Mahapatra, and M. Halder, "Optical Spectroscopic Exploration of Binding of Cochineal Red A with Two Homologous Serum Albumins," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 60, no. 14, pp. 3727–3734, 2012.
- [109] Y. Mizushima and M. Kobayashi, "Interaction of anti-inflammatory drugs with serum proteins, especially with some biologically active proteins," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 20, no. 3, pp. 169–173, 2011.
- [110] F. Ahmad and C. C. Bigelow, "Estimation of the free energy of stabilization of ribonuclease A, lysozyme, alpha-lactalbumin, and myoglobin.," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 257, no. 21, pp. 12935–12938, 1982.
- [111] A. del Giudice, C. Leggio, N. Balasco, L. Galantini, and N. v. Pavel, "Ibuprofen and Propofol Cobinding Effect on Human Serum Albumin Unfolding in Urea," *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 34, pp. 10043–10051, 2014.

Capítulo 5

Síntesis y caracterización de plataformas HA/MoOx: un enfoque nanoteranóstico específico para tejido óseo

En los trabajos anteriores se presentó el desarrollo de sistemas portadores de fármaco pensados para poder promover, en conjunto, regeneración tisular, control de la inflamación y defensa contra cepas bacterianas resistentes responsables de infecciones óseas. Continuando con la búsqueda de integrar múltiples funciones en un mismo sistema, se presenta en este trabajo el desarrollo de un enfoque alternativo. A partir de este nuevo diseño, generando cambios químicos y físicos en nano-HA utilizando óxidos de molibdeno (MoOx), se obtuvieron plataformas con propiedades antibióticas y fluorescentes sin la incorporación de agentes químicos moleculares. La hidroxiapatita empleada (HA_{II}) fue producto de una nueva síntesis que nos permitió hacer un uso más eficiente de los reactivos, mejorando el rendimiento de reacción y la masa de material obtenida por unidad de síntesis.

5.1 Consideraciones generales

5.1.1 Nueva síntesis de nano-HA

La nueva síntesis de nanopartículas de hidroxiapatita (nano-HA_{II}) se llevó a cabo a partir de plantillas de Pluronic[®] F-127/ Tween[®] 60 de acuerdo con una modificación del método propuesto por *F. Ye y col.*[1]. Abordando el mismo concepto empleado en su equivalente para HA_I, corresponde a una síntesis hidrotérmal que utiliza estructuras autoagregadas como plantilla para dirigir la nucleación de los cristales de hidroxiapatita, en este caso, una mezcla de tensioactivos no iónicos: Pluronic[®] F-127 y Tween[®] 60.

El Pluronic[®] F-127 pertenece a la familia de copolímeros tribloque sintéticos [2]. Está constituido por una unidad central hidrofóbica de polioxipropileno (POP) rodeada de dos unidades hidrofílicas de polioxietileno (POE), Fig. 5.1. Dada su excelente biocompatibilidad, están aprobados por la FDA para uso farmacéutico en diferentes aplicaciones terapéuticas [3], [4].

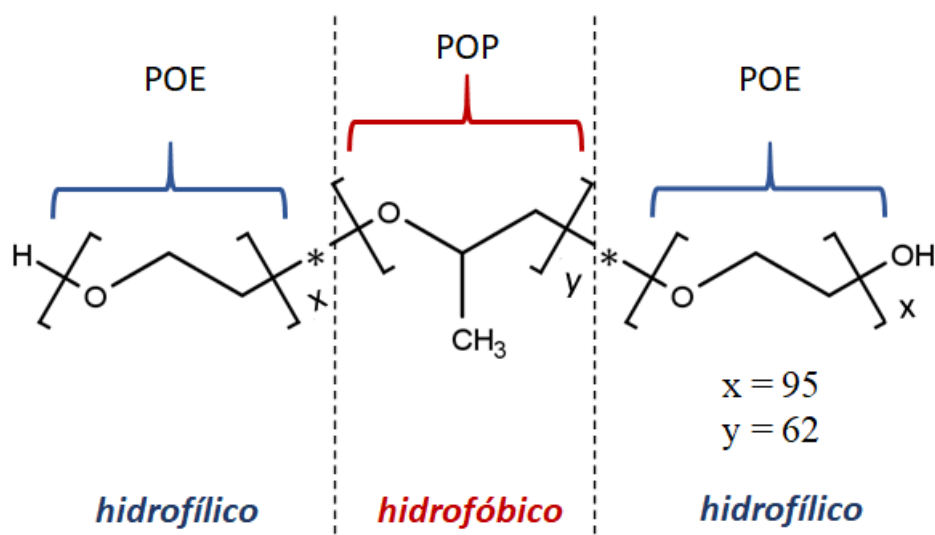


Figura 5.1: estructura del Pluronic[®] F-127; POP: polioxipropileno; POE: polioxietileno.

Su amplia utilización en diversas aplicaciones ha aportado mucha información relativa a su comportamiento en solución. Este polímero soluble en agua, por encima de su CMC da origen a micelas poliméricas, proceso promovido por la deshidratación progresiva de las unidades hidrofóbicas de polioxipropileno [1], [2], [4]–[8].

Por otra parte, el monoestearato de polioxietilen(20)sorbitano, conocido comercialmente como Tween[®] 60, es de amplio uso en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria, dada su estabilidad y ausencia de toxicidad que permiten su uso como detergente, humectante y emulsionante en diversas aplicaciones [9]–[11]. Se pueden identificar en su estructura, Fig. 5.2, un dominio hidrofílico, dado por los grupos polioxietileno (POE), y uno hidrofóbico expresada por la cadena hidrocarbonada del ácido esteárico.

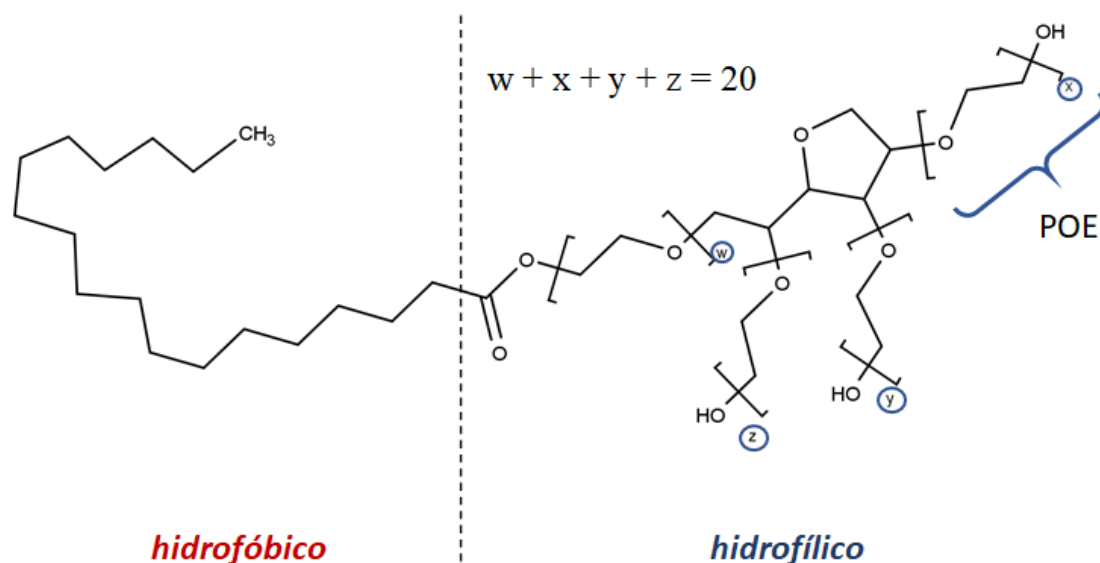


Figura 5.2: estructura del tensioactivo Tween[®] 60; POE: polioxietileno.

Se han reportado en varias oportunidades las propiedades de ambos surfactantes no iónicos para dar origen en medio acuoso a la formación de micelas cilíndricas y diversos tipos de mesofases liotrópicas, ya sea en sistemas monocomponentes, como en diversas mezclas de surfactantes y/o asociaciones de surfactantes y polímeros [1], [8], [12]–[17]. De acuerdo con esto, haremos uso de esta asociación de tensioactivos no iónicos para su utilización como plantilla para la síntesis de nano-HA_{II}.

5.1.2 Plataformas nano-HA_{II}/MoO_x

Como ya hemos mencionado, la hidroxiapatita biológica difiere de la estequiométrica al ser pobremente cristalina, deficiente en calcio y presentar distintos tipos de defectos, como sustituciones de átomos en la red cristalina, vacancias, intersticiales, impurezas, entre otros [18]–[22]. La síntesis de hidroxiapatita mimética ósea debe contemplar estos atributos, los cuales se manifiestan en la composición (relación Ca/P), parámetros cristalinos y en sus propiedades biológicas. La presencia de defectos cristalinos ha permitido recrear el comportamiento de la apatita biológica, dando origen a materiales con una mejor biocompatibilidad, adhesión y unión a células óseas en relación a la HA cristalina estequiométrica [23]–[25]. La distribución de estos defectos

depende las condiciones de síntesis empleadas durante su fabricación: temperatura, presión, humedad, tasas de calentamiento – enfriamiento, etc [19]. Diversos defectos puntuales, es decir, defectos que ocurren en o alrededor de un único punto de la red, han sido informados en literatura para nano-HA, habiéndose identificado:

- Vacancias, dadas por la falta de un átomo en una posición de la red; se destacan las vacantes -OH, comúnmente originadas durante los tratamientos térmicos, así como las de oxígeno (vacantes -O), que pueden surgir tanto del grupo OH como del grupo PO_4^{-3} [18]–[20], [25]–[28].
- Sustituciones de átomos de la red por otros ($\text{CO}_3^{2-}/\text{PO}_4^{-3}$, $\text{HPO}_4^{2-}/\text{PO}_4^{-3}$, $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, entre otros) [22], [29]–[32].
- Intersticiales, dados por la inserción de átomos de hidrógeno o protones (H-intersticial) en la red cristalina de HA [22], [31].

La presencia de estos defectos genera una nueva distribución de los niveles electrónicos afectando los valores de E_g (energía de banda prohibida) y creando nuevos niveles de energía, E_i , dentro de esta brecha energética, lo cual, a su vez, determina propiedades ópticas y electrónicas a los materiales. Esto permite la excitación óptica de un electrón desde estos niveles resultantes (E_i) a la banda de conducción originando nuevas líneas de emisión y la consecuente generación de niveles de atrapamiento de electrones, Fig 5.3 [25].

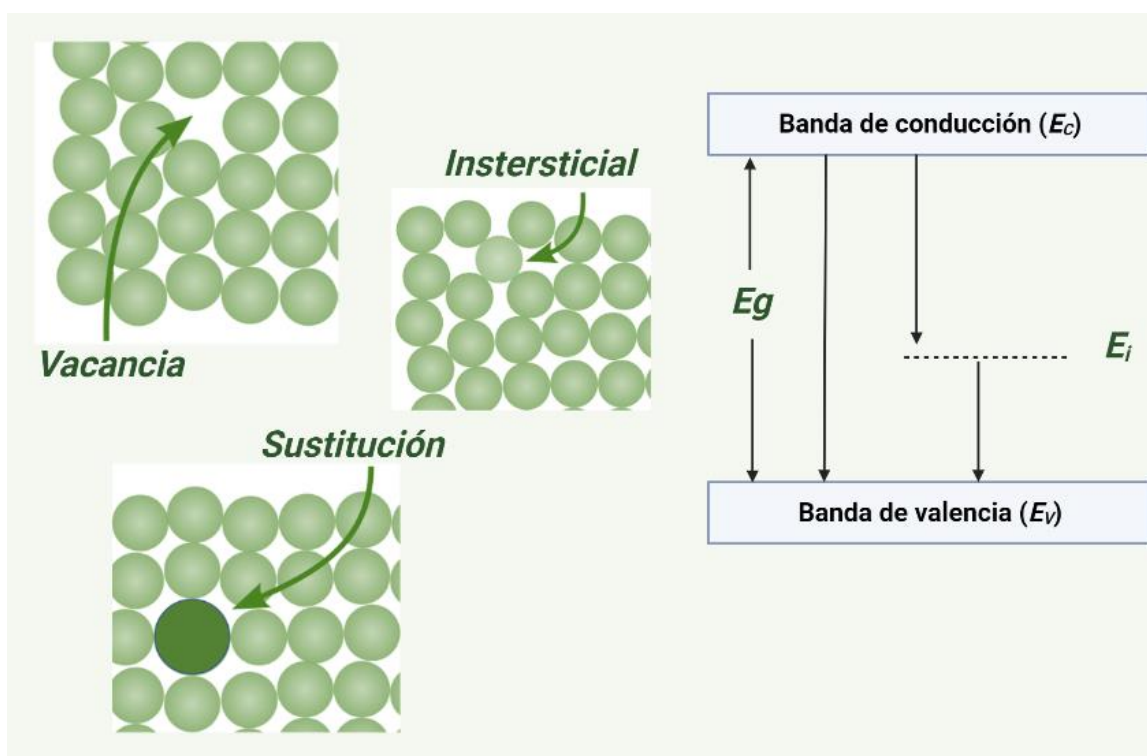


Figura 5.3: Representación esquemática de defectos cristalinos puntuales comúnmente observados en HA y la generación de nuevos niveles de energía (E_i) dentro de la banda prohibida.

Se propone en este trabajo añadir propiedades y/o funciones a nano- HA_{II} a partir de la incorporación de óxidos de molibdeno (MoOx) en su estructura cristalina. El molibdeno (Mo) es un oligoelemento esencial [33] y sus óxidos se encuentran entre los compuestos ópticos y electrónicos más adaptables y funcionales [34]. Se reportan aplicaciones bien reconocidas en sensores, dispositivos de emisión de campo, materiales térmicos y herramientas cromogénicas y electrocromáticas [34]. Asimismo, se han asociado propiedades antimicrobianas a las nanopartículas de Mo y MoOx [35], [36].

El objetivo de este estudio fue conferirle valor agregado a nano- HA_{II} a partir de las propiedades de interés mencionadas, promoviendo cambios fisicoquímicos en las nanopartículas a partir de la incorporación de MoOx . Se desarrollaron 4 plataformas: $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoOx}$ (I), $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoOx}$ (II), $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoOx}$ (III) y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoOx}$ (IV). Se llevó a cabo su caracterización microestructural y se evaluó las propiedades optoelectrónicas y antibacterianas de las mismas. Por último, se verificó su biocompatibilidad por interacción con cultivos de células primarias de osteoblastos de calota de rata. Los resultados se presentan a continuación.

5.2 Experimental - Materiales y Métodos

5.2.1 Reactivos

Copolímero tribloque poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) Pluronic[®] F-127 (EO₁₀₂PO₇₀EO₁₀₂, CAS n° 9003-11-6, BioReagent, Sigma - Aldrich); monoestearato de polioxietilen(20)sorbitano (Tween[®] 60, CAS n° 9005-67-8, Sigma - Aldrich); fosfato de sodio dodecahidrato tribásico (Na₃PO₄·12H₂O, CAS n° 10101-89-0, Sigma - Aldrich); cloruro de calcio (CaCl₂, CAS n°10043-52-4, Sigma - Aldrich); hidrato de ácido fosfomolibdico (H₃[P(Mo₃O₁₀)₄] · x28H₂O, CAS n°51429-74-4, Sigma – Aldrich); solución salina buffer fosfato (PBS tablets, Na₂HPO₄ / NaH₂PO₄, Sigma - Aldrich); etanol (EtOH, CAS n° 64-17-5, Sigma – Aldrich), colorante Rojo Neutro (C₁₅H₁₇ClN₄, CAS n° 553-24-2, BioReagent, Sigma - Aldrich), cloruro de 2,3,5-Trifenil-2H-tetrazolio 98% (C₁₉H₁₅ClN₄, CAS n° 298-96-4, Sigma - Aldrich) y sonda redox de ácido L-ascórbico (C₆H₈O₆, CAS n°A92902 Sigma - Aldrich) fueron utilizadas sin purificación adicional. Para la preparación de las soluciones se utilizó agua Milli-Q.

5.2.2 Síntesis de nano-HA_{II} y de plataformas nano-HA_{II}/MoO_x a partir de plantillas de Pluronic[®] F-127/ Tween[®] 60

Como se mencionó en la sección anterior, se realizó la síntesis de nano-HA_{II} según una modificación del método propuesto por *F. Ye y col.*[1] utilizando una mezcla de tensioactivos no iónicos como plantilla. Primero, se disolvieron 0,2900 g de Pluronic[®] F-127 en 10 ml de una solución equivolúmica de H₂O/EtOH después de una intensa sonicación. Luego, se preparó una segunda solución que contenía 0,1310 g de Tween[®] 60, 3,8012 g de Na₃PO₄·12H₂O y 20 mL de agua Milli-Q; los constituyentes se agitaron magnéticamente a 500 rpm hasta su completa disolución a temperatura ambiente (TA). A continuación, ambas soluciones se mezclaron y luego se agitaron continuamente a 500 rpm durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron lentamente, gota a gota, manteniendo la agitación, 0,01675 moles de Ca²⁺ (5 ml de una solución acuosa de CaCl₂ 37 % en peso, pH = 9). Después de la integración de todos los reactivos, el gel resultante se autoclavó durante 24 h a 100 °C. Una vez finalizado el tratamiento hidrotermal, se obtienen dos fases en el medio de reacción; un sobrenadante que es descartado y un precipitado donde está el material sintetizado. Este precipitado se filtra y se lava con agua Milli-Q para remover impurezas. Luego el material se somete a

calcinación a 400 °C durante 3 h para eliminar por completo los restos de surfactante [37]. Este proceso de síntesis se esquematiza en la Fig. 5.4:

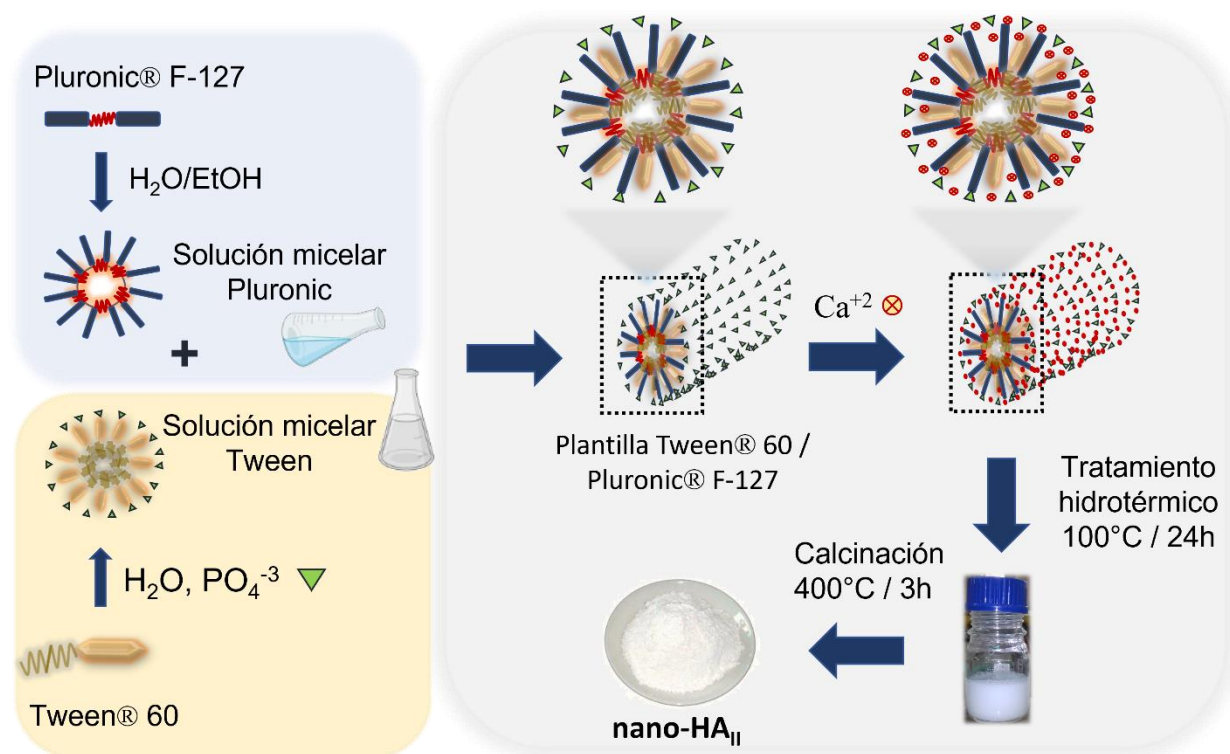


Figura 5.4: Representación esquemática del proceso de síntesis de nano-HA_{II}.

Una vez obtenido nano-HA_{II}, se procedió a desarrollar las plataformas nano-HA_{II}/MoO_x utilizando una modificación del método de impregnación por humedad incipiente [38]. Para ello, se dispersaron 100 mg de nano-HA_{II} en 50 ml de agua Milli-Q por sonicación durante 45 min. A continuación, se disolvieron en agua las cantidades necesarias de hidrato de ácido fosfomolibdico (PMA) y se añadieron 10 ml de soluciones acuosas de PMA al 4, 2, 1 y 0,5 % en peso a cada dispersión de nano-HA_{II}. Las mezclas se agitaron magnéticamente a 500 rpm durante 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, los recipientes de reacción se dejaron a 100 °C en autoclave durante 24 h; las plataformas nano-HA_{II} /MoO_x obtenidas se filtraron adecuadamente y se lavaron con agua Milli-Q. Los valores de pH de las soluciones se midieron durante todo el experimento por medio de un medidor de sobremesa ION 510 (OAKTON Instruments). La inspección por espectrofotometría UV-vis se realizó a temperatura ambiente usando

un espectrofotómetro Agilent Cary 60, con una celda de cuarzo de 1 cm de longitud de trayectoria.

Se obtuvieron cuatro materiales y se nombraron según la relación en peso PMA/nano- HA_{II} de las soluciones empleadas inicialmente para su síntesis. Así, se obtuvieron las plataformas:

- ❖ $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoOx}$ (I); relación en peso de PMA/ nano- HA_{II} : 4/1
- ❖ $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoOx}$ (II); relación en peso de PMA/ nano- HA_{II} : 2/1
- ❖ $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoOx}$ (III); relación en peso de PMA/ nano- HA_{II} : 1/1
- ❖ $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoOx}$ (IV); relación en peso de PMA/ nano- HA_{II} : 1/2

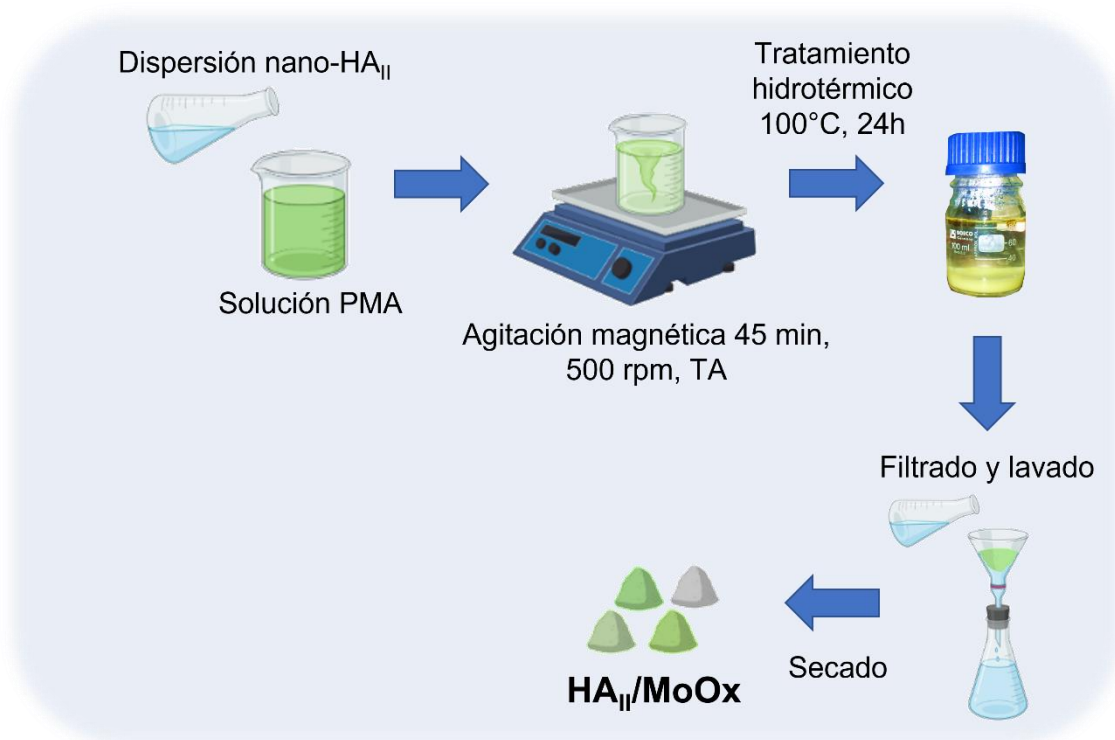


Figura 5.5: Desarrollo de las plataformas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoOx}$ a partir del método de impregnación por humedad incipiente

5.2.3 Caracterización microestructural y morfológica

Las micrografías de microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (H-TEM) se obtuvieron utilizando un microscopio Libra 200 FE OMEGA que trabaja a un voltaje operativo de 200 kV, lo que corresponde a un aumento máximo de 1 000 000 \times . Las muestras en polvo se colocaron sobre soportes de carbono (2000 *mesh*) y las observaciones se realizaron en campo claro. Los patrones de difracción de electrones de

área seleccionada (SAED) se extrajeron de la transformada de Fourier (FFT) de microfotografías H-TEM mediante el procesamiento de imágenes digitalizadas utilizando software libre, Image J [39].

La caracterización topográfica se realizó utilizando un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FE-SEM) ZEISS ULTRA PLUS, acoplado a un espectrofotómetro de dispersión de energía de rayos X (EDX) que permite el microanálisis químico elemental. Las imágenes se adquirieron con un detector de electrones secundarios (In lens) operado con un voltaje de aceleración (EHT) de 3,00 kV y una resolución de distancia de trabajo (WD) de 2,1 nm. La compensación local de la carga se logró mediante la inyección de gas nitrógeno.

Los datos de difracción de rayos X en polvo (DRX) se adquirieron con un difractómetro Philips PW 1710 asociado con una fuente de radiación Cu K α ($\lambda = 1,5418$ nm) y un monocromador de grafito operado a 45 kV, 30 mA y temperatura ambiente. Se utilizaron como referencias las tarjetas del “Joint Committee on Powder Diffraction Standards” (archivo JCPDS n.º 09-0432) y los archivos de la base de datos RRUFF [40] (R060180, R100180). Los patrones de difracción de todas las muestras fueron equivalentes a la forma cristalina hexagonal de HA (simetría de grupo espacial P6 $_3$ /m, $a = b \neq c$; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$) y la forma cristalina tetragonal de powellita (simetría de grupo espacial I41/a, $a = b \neq c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$). Los parámetros de geometría de red (a , b , c) y el volumen de la celda unitaria directa (V) se calcularon mediante el refinamiento de Rietveld utilizando el paquete de software Rietica v4.2 [41] sobre la base de la siguiente ecuación:

Sistema Hexagonal

$$\frac{1}{(d_{hkl})^2} = \left[\frac{4}{3} \right] [(h^2 + hk + k^2)/a^2] + [l^2/c^2] \quad (\text{ec. 5.1})$$

$$V = \left[\frac{\sqrt{3}}{2} \right] [a^2c] \quad (\text{ec. 5.2})$$

Sistema Tetragonal

$$\frac{1}{(d_{hkl})^2} = [(h^2 + k^2)/a^2] + [l^2/c^2] \quad (\text{ec. 5.3})$$

$$V = a^2c \quad (\text{ec. 5.4})$$

donde, d_{hkl} es la distancia interplanar calculada por la ecuación de Bragg ($\lambda = 2d_{hkl} \text{sen } \theta$) y (hkl) el índice de Miller de las reflexiones simétricas utilizadas en el cálculo [42]. La fracción de fase cristalina HA ($X_{c,HA}$) en todas las muestras se evaluó usando la siguiente ecuación [43]:

$$X_{c,HA} = 1 - \frac{v_{112/300}}{I_{300}} \quad (\text{ec. 5.5})$$

donde I_{300} es la intensidad del pico de difracción de la familia del plano de Miller (300) y $v_{112/300}$ es la intensidad del hueco entre los picos de difracción de los planos (112) y (300) de HA. La verificación se hizo con la relación [44]:

$$B_{002} \sqrt[3]{X_{c,HA}} = K \quad (\text{ec. 5.6})$$

donde K es igual a 0,24 y representa una constante hallada para una gran cantidad de polvos de HA diferentes [45], y B_{002} es el ancho completo en la mitad del máximo (FWHM) en grados de la reflexión (002). Las incertidumbres esperadas rondan el 15 %.

El modelado molecular se realizó mediante un método combinado para la determinación de la estructura *ab initio* a partir de datos de difracción de polvo [46] utilizando el paquete de software Endeavor (versión de demostración gratuita).

La carga superficial de las plataformas se determinó a $25,0 \pm 0,1$ °C utilizando un equipo Malvern Zeta Sizer Nano (ZS90) con un láser He-Ne (633 nm) como fuente de luz incidente, 4 mW máx. Todas las muestras (0,2 mg/ml) se diluyeron con medio de hidratación filtrado (PBS, pH = 7,4) a una tasa de recuento adecuada antes del análisis. Los valores informados fueron el resultado de diez determinaciones independientes.

5.2.4 Caracterización molecular electroactiva

El comportamiento electroactivo de todos los materiales desarrollados se probó frente a la sonda redox de ácido L-ascórbico (AA) (solución tamponada con PBS 10,0 mM) siguiendo un procedimiento previamente descrito [29]. El ácido L-ascórbico es un antioxidante esencial y un cofactor asociado con la regulación, desarrollo y mantenimiento de varios tipos de células en el organismo, entre ellas las presentes en el tejido óseo [37], [47]. La actividad del AA en los organismos vivos depende de sus habilidades redox, dadas por la relaciones entre el ácido ascórbico, el ácido semi-dehidroascórbico y el ácido dehidroascórbico, por lo que es una sonda redox reconocida para examinar el estado redox biológico [48].

Se utilizaron celdas de vidrio convencionales de tres compartimentos para realizar los experimentos electroquímicos a temperatura ambiente con un potenciostato/galvanostato VersaSTAT 3 de Princeton Applied Research. Se utilizó un alambre de platino (Pt) como contraelectrodo, mientras que un electrodo de calomel saturado (SCE, +0,241 vs. NHE) sirvió como electrodo de referencia. Se prepararon electrodos modificados con nano-HA_{II}/MoO_x según el estudio de *Andrés y col* [29]. Para ello, 20,0 mg de cada una de las muestras se dispersaron por sonicación en 1 ml de etanol durante 45 min. Luego se pipetearon 20 µl de la suspensión y se extendieron sobre una varilla de carbono vítreo pulido con espejo (GC, 3 mm de diámetro), seguido de secado al aire a temperatura ambiente. Posteriormente, se pipetearon 10 µL de una solución de Nafion/etanol (0,05 % en peso) en el electrodo de GC modificado con los nanomateriales. El electrodo se dejó secar al aire durante 1 h antes de su uso. Se registraron voltamogramas cíclicos (VC) a diferentes velocidades de barrido, que oscilaron entre 10 y 500 mV s⁻¹. La convolución semi-integral de los datos voltamperométricos se realizó utilizando el paquete de software gratuito eL-ChemViewer [49].

La constante de velocidad heterogénea ($k_{(E)}$) para sistemas cuasi-reversibles en el barrido positivo se expresó de acuerdo con el estudio de Deakin y col.[50].

$$k_{(E)} = D^{1/2} \frac{i}{I_L - I_{(E)} \left(1 + e^{nF/RT(E^{0'} - E)} \right)} \quad (\text{ec. 5.7})$$

donde i es la corriente en el momento t , I_L es la corriente limitante de difusión semiintegral, $I_{(E)}$ es la corriente semiintegral en un potencial aplicado, n es el número de electrones en el paso determinante de la velocidad, F es la constante de Faraday, D es el coeficiente de difusión y $E^{\circ'}$ es el potencial formal del proceso de dos electrones. Para sistemas electroquímicamente irreversibles, como en el caso de la oxidación de AA, la relación para la onda directa en los voltamogramas es:

$$\ln(k_{(E)}) = \ln\left(D^{\frac{1}{2}}\right) + \ln\left(\frac{i}{I_L - I_{(E)}}\right) \quad (\text{ec. 5.8})$$

Todos los cálculos se realizaron con el coeficiente de difusión obtenido de un handbook de electroquímica [51].

La dependencia de la velocidad de barrido con las alturas de los picos para la onda anódica se evaluó mediante la ecuación de Randles-Ševčík [52]:

$$I_p = 2.687 \times 10^5 A n^{3/2} (D\nu)^{1/2} C \quad (\text{ec. 5.9})$$

En esta expresión, I_p es el pico de corriente, A es el área electroactiva, C es la concentración de la especie electroactiva, n es el número de electrones intercambiados y ν es la velocidad de barrido, respectivamente. El paso determinante de la velocidad (rds) de la reacción podría establecerse analizando la pendiente de la gráfica semiintegral de VC [53]. La transferencia de un primer electrón corresponde a una pendiente de $0.5F/RT$; donde F es la constante de Faraday, R la constante universal de los gases y T la temperatura absoluta. Por otro lado, si la transferencia del segundo electrón es rds , el gráfico semiintegral de VC debe estar asociado a una pendiente de $1.5F/RT$ [53]. Las pendientes determinadas a partir de los gráficos de Randles-Ševčík fueron de aproximadamente $0,48F/RT$, indicando que la transferencia del primer electrón es el rds , es decir, la formación del anión radical ascorbilo.

5.2.5 Caracterización molecular fotoactiva

Las propiedades optoelectrónicas de todas las muestras se evaluaron registrando sus espectros UV-vis y de fluorescencia a temperatura ambiente usando un espectrofotómetro Agilent Cary 60 UV-Vis y un espectrofluorómetro de barrido JASCO FP-6500, respectivamente, utilizándose en ambos casos una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las determinaciones de fluorescencia se realizaron utilizando un ancho de banda de 5 nm tanto para excitación como para emisión, un tiempo de respuesta de 0,2 segundos y una velocidad de barrido de 5000 nm min⁻¹. Ambos espectros se registraron después de la sonicación de las nanopartículas (1 mg mL⁻¹) en PBS para producir dispersiones homogéneas. La solución de PBS se utilizó como blanco. Las energías de banda prohibida óptica (E_g) de las plataformas nano-HA_{II} y nano-HA_{II}/MoO_x se estimaron a partir de la región de absorción en fuerte aumento (región de absorción de aumento considerable) de acuerdo con la ley de Tauc y Menth [54], extrapolando el coeficiente de adsorción (α) a cero en la gráfica de $(\alpha h\nu)^m$ vs. la energía del fotón ($h\nu$) [55]. Debido a que solo se consideran las transiciones directas permitidas, $m = 2$. La adsorción de la muestra (A) se convierte en el coeficiente de absorción usando la siguiente relación [56]:

$$\alpha = \left(\frac{2.303 \times 10^3}{lc} \right) \times A\rho \quad (\text{ec. 5.10})$$

donde ρ es la densidad de HA biogénico ($\approx 2,23 \pm 0,09$ g cm⁻³) [57], l es la longitud de la cubeta (1 cm), y c es la concentración de nanopartículas (1 mg mL⁻¹).

Para evaluar la epifluorescencia de las plataformas, se observaron recubrimientos secos de material homogéneo [37] en un microscopio invertido Nikon Eclipse TE300, dotado de una cámara digital ANDOR Neo/Zyla B&W y una DS Fi2 color para imágenes de fluorescencia y campo brillante, respectivamente. Las fotografías se adquirieron sin filtros (para campo brillante/contraste de fase) y un conjunto de filtros Chroma 8300 con excitadores de banda única (DAPI ($\lambda_{\text{EX}} = 360$ nm /40x), FITC ($\lambda_{\text{EX}} = 492$ nm /18x) y Texas Red ($\lambda_{\text{EX}} = 572$ nm /23x)). Se usaron pocillos sin recubrimiento como control, C.

5.2.6 Ensayo de viabilidad celular

La biocompatibilidad de las plataformas nano-HA_{II} y nano-HA_{II}/MoO_x se probó en presencia de cultivos celulares primarios de osteoblastos de calvaria de rata (rOBs), siguiendo la misma metodología descrita anteriormente en la *Sección 4.2.4*. La estimación de la viabilidad celular se realizó siguiendo el ensayo de captación del colorante Rojo Neutro [58] y se confirmó por observación morfológica utilizando un microscopio Nikon Eclipse TE 300 acoplado a una cámara Nikon Digital Sight DS U2. Los rOBs cultivados en ausencia de las plataformas se usaron como control, C.

5.2.7 Actividad antibacteriana

Los efectos antimicrobianos de las plataformas nano-HA_{II} y nano-HA_{II}/MoO_x se analizaron frente a dos cepas bacterianas que representan un espectro clínicamente relevante de microorganismos [59], [60]: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ATCC 29213), especie *Gram-positiva* y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*, ATCC 27853), especie *Gram-negativa*. Estas cepas fueron aisladas y almacenadas en la Cátedra de Microbiología del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, Argentina. Las bacterias se cultivaron a 37 °C y se dejaron madurar durante la noche para asegurar que estén en fase de crecimiento exponencial al momento de su uso. Posteriormente, se tomaron 100 µL de una dispersión madre equivalente a 0,5 estándares de turbidez de McFarland, 10⁶ unidades formadoras de colonias (UFC) por mL y se colocaron en tubos de ensayo que contenían 50 y 100 mg mL⁻¹ del material a investigar en un volumen final de 5 mL de caldo nutritivo estándar (Sigma-Aldrich, CAS no. 70122). Las bacterias se expusieron a muestras de nano-HA_{II} y HA_{II}/MoO_x durante 24 y 48 h con agitación continua a 100 rpm en un agitador rotatorio (New Brunswick Scientific). Luego del tiempo de contacto con la muestra, se tomaron alícuotas de 1 mL de sobrenadante y se diluyeron según se requería de acuerdo con el método descrito por *Miles y col.*[61]. De cada una de estas diluciones en serie, se colocó 1 mL en placas de Petri para cultivo estériles (8,5 cm de diámetro) y luego se vertieron sobre la muestra 20 ml de agar estéril para recuento en placa (nº de referencia 1054630500, Merck). Después de la solidificación del agar a temperatura ambiente, las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C; las que contenían entre 30 y 300 colonias se contaron y multiplicaron por el valor de dilución adecuado para alcanzar el número final de colonias de bacterias. Los

resultados se expresaron como el porcentaje de reducción del recuento de colonias de bacterias:

$$R \% = \frac{R_i - R_f}{R_i} \times 100 \quad (\text{ec. 5.11})$$

donde R_i y R_f son los recuentos bacterianos inicial y final, expresadas como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL^{-1}). Se utilizó como control el cultivo microbiano en ausencia del material, C.

El examen de la integridad de la membrana citoplasmática bacteriana se realizó mediante la determinación colorimétrica de azúcares reductores con cloruro de trifeniltetrazolio, según la metodología propuesta por Mattson y Jensen [62]. Para detectar la fuga de azúcares a través de la membrana citoplasmática, se agregaron cantidades apropiadas de caldo Mueller Hinton, microorganismos y de los biomateriales desarrollados a los tubos de ensayo, logrando una concentración bacteriana final de 10^6 UFC mL^{-1} y 100 mg mL^{-1} de las plataformas nano- HA_{II} y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoOx}$. Se dejaron en contacto durante 48 h y luego se centrifugaron y separaron los sobrenadantes de todos los tubos. Se guardó 1 mL de cada sobrenadante y luego se evaluó la presencia de azúcares reductores en los mismos [62]. Los resultados se expresaron en porcentaje de fuga de azúcares reductores (RS%):

$$\text{RS}\% = ((A_f - A_i)/A_f) \times 100 \quad (\text{ec. 5.12})$$

donde A_f y A_i son las absorbancias de la solución final e inicial leídas a 577 nm. Se usó cultivo microbiano en ausencia del material como control, C.

La inspección bacteriana se realizó mediante observaciones de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para este experimento se tomó 1 mL de la dispersión bacteriana luego de 48 h de contacto con el material, se fijó con solución de glutaraldehído (Grado I, solución al 25% en H_2O , CAS no. 111-30-8, Sigma-Aldrich), se tiñó con una solución acuosa de acetato de uranilo al 2% en peso (pH 4,2 a 4,5) y se observó en un microscopio electrónico de transmisión Philips CM-12 operado a 120 kV. Las observaciones se realizaron con una cámara digital MEGA VIEW-II DOCU en campo brillante; las muestras en polvo se colocaron sobre soportes de cobre (2000 *mesh*).

5.2.8 Degradación hidrolítica *in vitro*

Se pesó 200 mg de cada una de las plataformas (W_0) y se depositó en vasos de cristal con 50 mL de PBS (pH = 7,4). Posteriormente, se incubaron a $37 \pm 0,1$ °C durante 10 días; PBS se renovó cada 3 días. En cada punto de tiempo, las muestras se recolectaron por triplicado, se limpiaron cuidadosamente con agua Milli-Q, se secaron con papel de filtro y se secaron en horno hasta peso constante (W_t). La degradabilidad de las plataformas se calculó a partir de la tasa de pérdida de peso (% W_L) siguiendo la metodología de *Tampieri y col.* [63]:

$$\%W_L = \frac{(W_0 - W_t)}{W_0} \times 100 \quad (\text{ec. 5.13})$$

Las concentraciones de Ca^{2+} en el sobrenadante se determinaron mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) utilizando el método 6010C (EPA, 2007). La constante de equilibrio termodinámico de la disolución de nano- HA_{II} , K_{ps}^0 , se estimó como:

$$K_{ps}^0 = (a_{\text{Ca}^{+2}})^{10-x} (a_{\text{PO}_4^{-3}})^{6-x} (a_{\text{HPO}_4^{-2}})^x (a_{\text{OH}^-})^{2-x}$$

donde x corresponde al resultado del microanálisis elemental, *Sección 5.3.1*. Las actividades se calcularon en base a las concentraciones medidas y la ley límite de Debye-Hückel:

$$-\log(\gamma_i) = AZ_i m^{1/2} \left(1 + Ba_i m^{1/2} \right) \quad (\text{ec. 5.14})$$

donde γ_i , a_i y Z_i son el coeficiente de actividad, el diámetro efectivo y la valencia para la especie i respectivamente; $m = \frac{1}{2} \sum_i^n c_i^2 Z_i^2$ es la fuerza iónica total de la solución; $A = 0,51144$ y $B = 10^{7,515}$ son parámetros de la ley límite de Debye-Hückel.

Como la concentración de calcio medida después de la degradación de los materiales no presentó diferencias estadísticamente significativas, Fig. 5.6, asumimos que

las concentraciones de los otros iones liberados de la disolución de nano-HA_{II} también son similares; las mismas se calcularon según el producto de solubilidad de HA. La concentración de MoO₄²⁻ se estimó a partir del producto de solubilidad de powellita para muestras HA_{II}/MoO_x (III-IV); la cual será menor para la muestra HA_{II}/MoO_x (II) y cero para nano-HA_{II}.

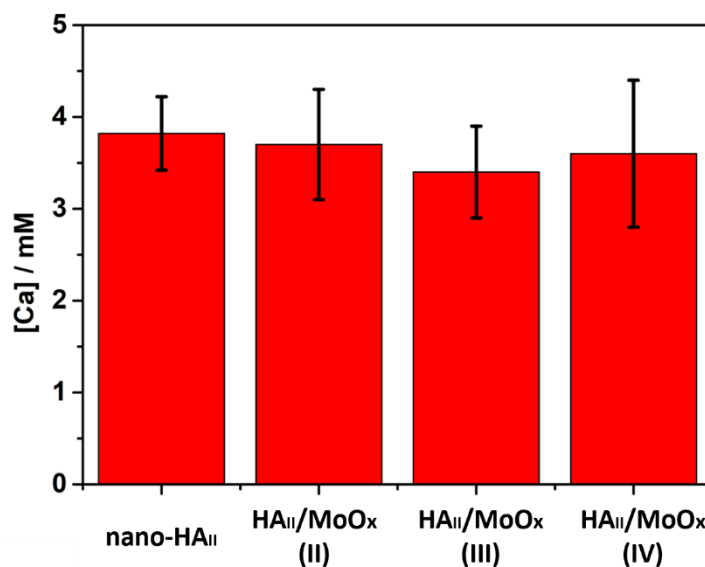


Figura 5.6: Concentración de calcio medida después de 10 días de degradación del material a pH = 7,4 y 37 °C.

5.2.9 Análisis estadístico de los datos

Todas las evaluaciones cuantitativas se tomaron al menos por triplicado y los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE). El análisis estadístico de los datos se realizó mediante análisis de varianza de un factor (ANOVA). La prueba t de Student y los valores de probabilidad por debajo de 0,05 ($p < 0,05$) se consideraron como una diferencia significativa.

5.3 Resultados y discusión

Los iones fosfato (PO₄)³⁻ pueden sustituirse por complejos metálicos como vanadato (VO₄)³⁻ y molibdato (MoO₄)²⁻ en la red cristalina de hidroxiapatitas no

estequiométricas deficientes en calcio, $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ [32]. Sería de esperar que la modificación de este material mediante dopaje metálico produjera la “sintonización” de múltiples sitios activos. Esta hipótesis se probará a lo largo de las siguientes secciones.

5.3.1 Plataformas nano- HA_{II} / MoO_x : procesamiento de cambios microestructurales

La interrupción de la transformación de fase de estado sólido y las fluctuaciones de la microestructura de los materiales cristalinos están directamente relacionadas con la interacción o sustitución iónica [64], [65]. Las micrografías FE-SEM de polvos de nano- HA_{II} y nano- HA_{II} / MoO_x se muestran en la Fig. 5.7.

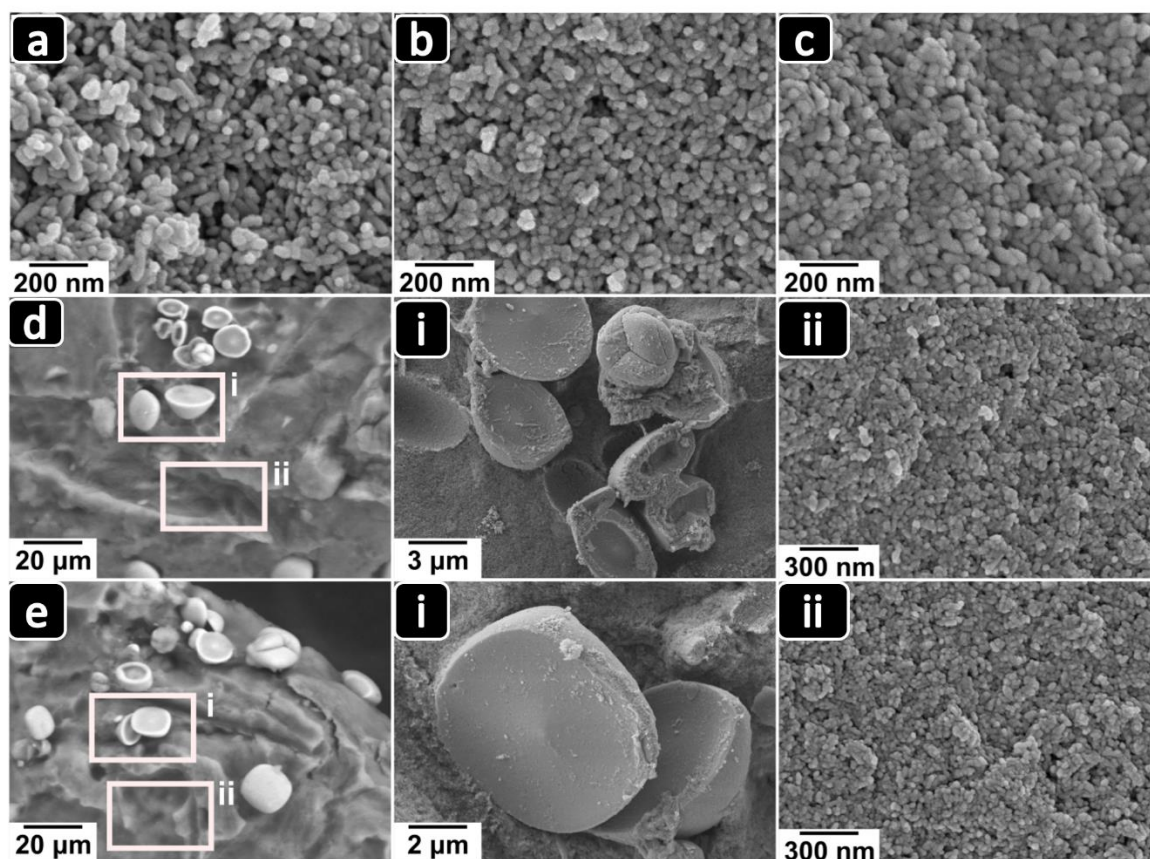


Figura 5.7: Micrografías FE-SEM de (a) nano- HA_{II} , (b) HA_{II} / MoO_x (I), (c) HA_{II} / MoO_x (II), (d) HA_{II} / MoO_x (III) y (e) HA_{II} / MoO_x (IV); (i) Depósitos ricos en Mo y (ii) nano- HA_{II} . Figura adaptada de referencia [66].

Se puede observar que las muestras HA_{II}/MoO_x (I) y HA_{II}/MoO_x (II), Fig. 5.7 b y c, exhiben una red nanoestructurada dada por el ensamblaje de nanopartículas uniformes en forma de rodillo o varilla con relaciones de aspecto similares (longitud/diámetro) en comparación con las observadas en nano-HA_{II}, Figura 5.7a. Se apreció una ligera reducción en la longitud de las nanopartículas para las muestras HA_{II}/MoO_x (III) y HA_{II}/MoO_x (IV), Tabla 5.1. El análisis de distribución de tamaños se realizó mediante la aplicación de software Image J a las micrografías FE-SEM, Fig. 5.8 y 5.9.

Tabla 5.1: diámetro y longitud promedio de las plataformas nano-HA_{II} y nano-HA_{II}/MoO_x

<i>Plataformas</i>	<i>diámetro/ nm</i>	<i>longitud /nm</i>
nano-HA _{II}	31,8 ± 4,1	60,8 ± 3,9
HA _{II} /MoO _x (I)	33,4 ± 3,4	60,1 ± 6,4
HA _{II} /MoO _x (II)	31,3 ± 3,4	60,1 ± 3,1
HA _{II} /MoO _x (III)	31,5 ± 3,7	27,8 ± 4,6
HA _{II} /MoO _x (IV)	32,2 ± 3,8	24,9 ± 1,9

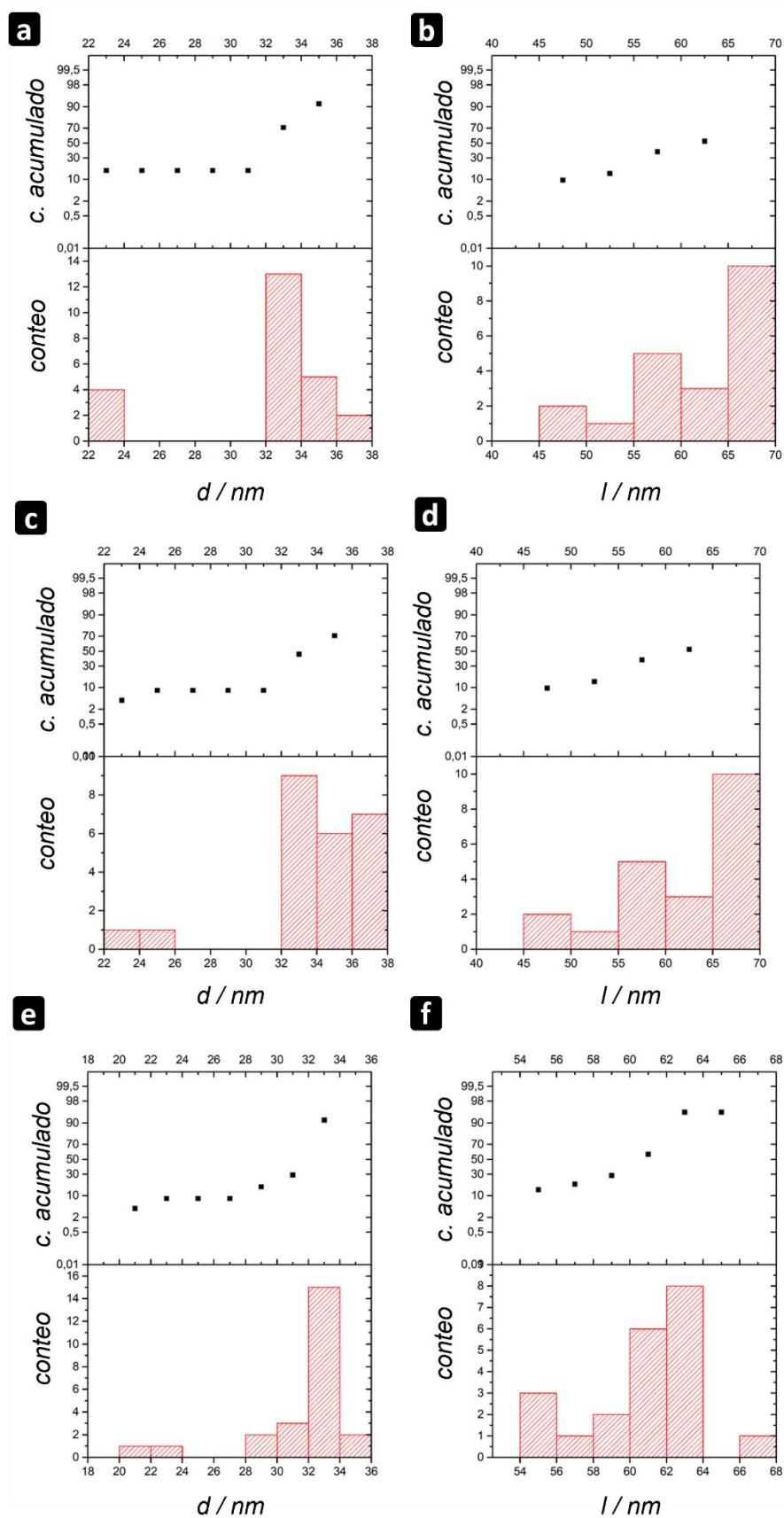


Figura 5.8: histogramas de distribución de diámetro (d/ nm) y longitud (l/ nm) de (a,b) nano-HA_{II}, (c,d) HA_{II}/MoO_x (I) y (e,f) HA_{II}/MoO_x (II).

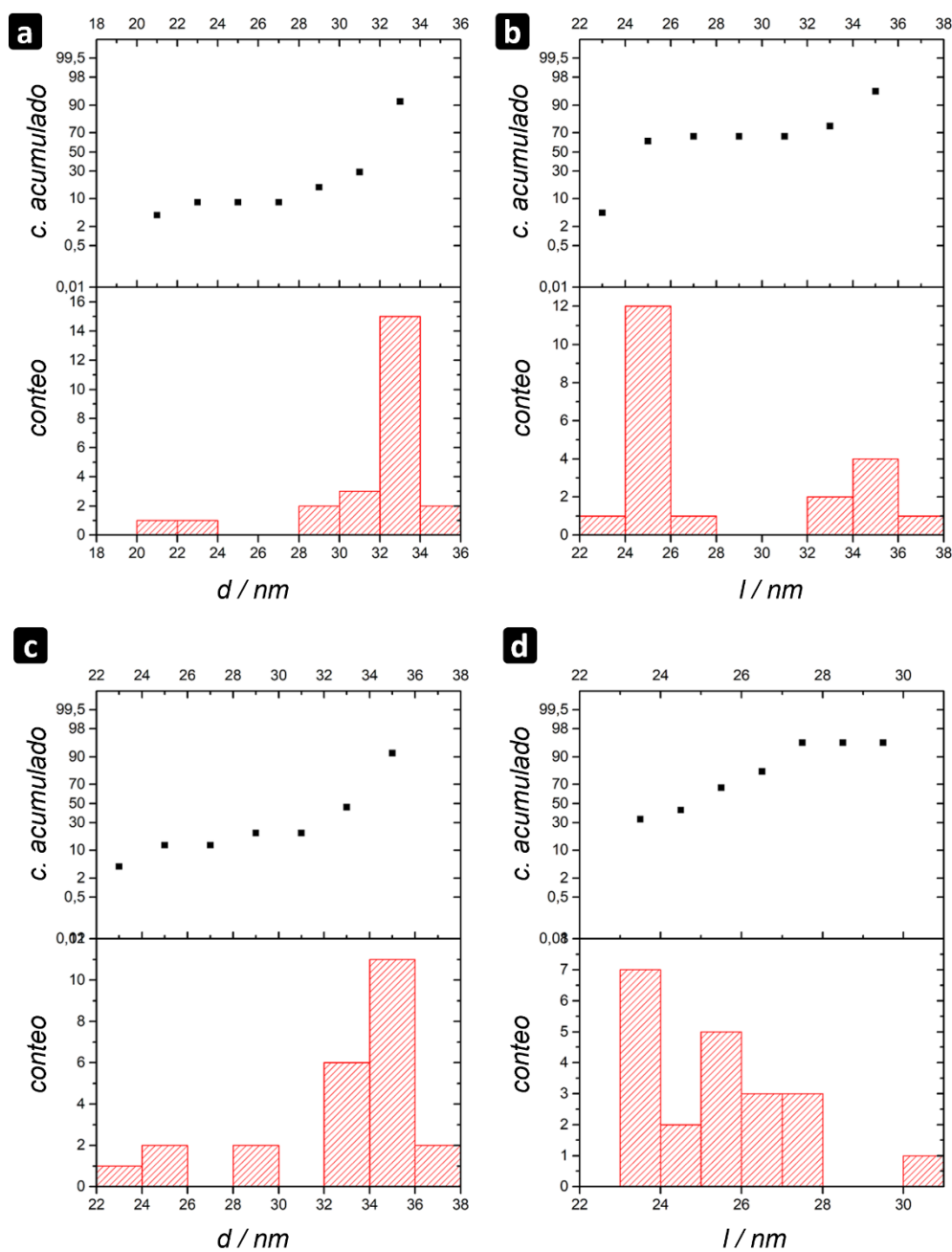


Figura 5.9: histogramas de distribución de diámetro (d / nm) y longitud (l / nm) de (a,b) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III) y (c,d) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (IV).

Las mediciones de espectroscopia dispersiva de rayos X (EDX) confirmaron que nano- HA_{II} posee una relación elemental Ca/P de aproximadamente 1,52 que es característica de la fase cristalina de la hidroxiapatita no estequiométrica; el espectro se ilustra en la Fig. 5.9a. Por el contrario, el microanálisis elemental de muestras de

HA_{II}/MoO_x (I–IV) a granel reveló una relación Ca/P superior en comparación con HA estequiométrico (Ca/P ≈ 1,67); en todos los casos se detectó Mo elemental, Fig. 5.9 b y c. Tanto para muestras de HA_{II}/MoO_x (III) como de HA_{II}/MoO_x (IV), se encontró la presencia de depósitos esféricos o semiesféricos de gran tamaño sobre la superficie de nano-HA_{II}, Fig. 5.6 d y e; el microanálisis EDX reveló que estaban constituidos por una fase rica en molibdeno, Fig. 5.9c.

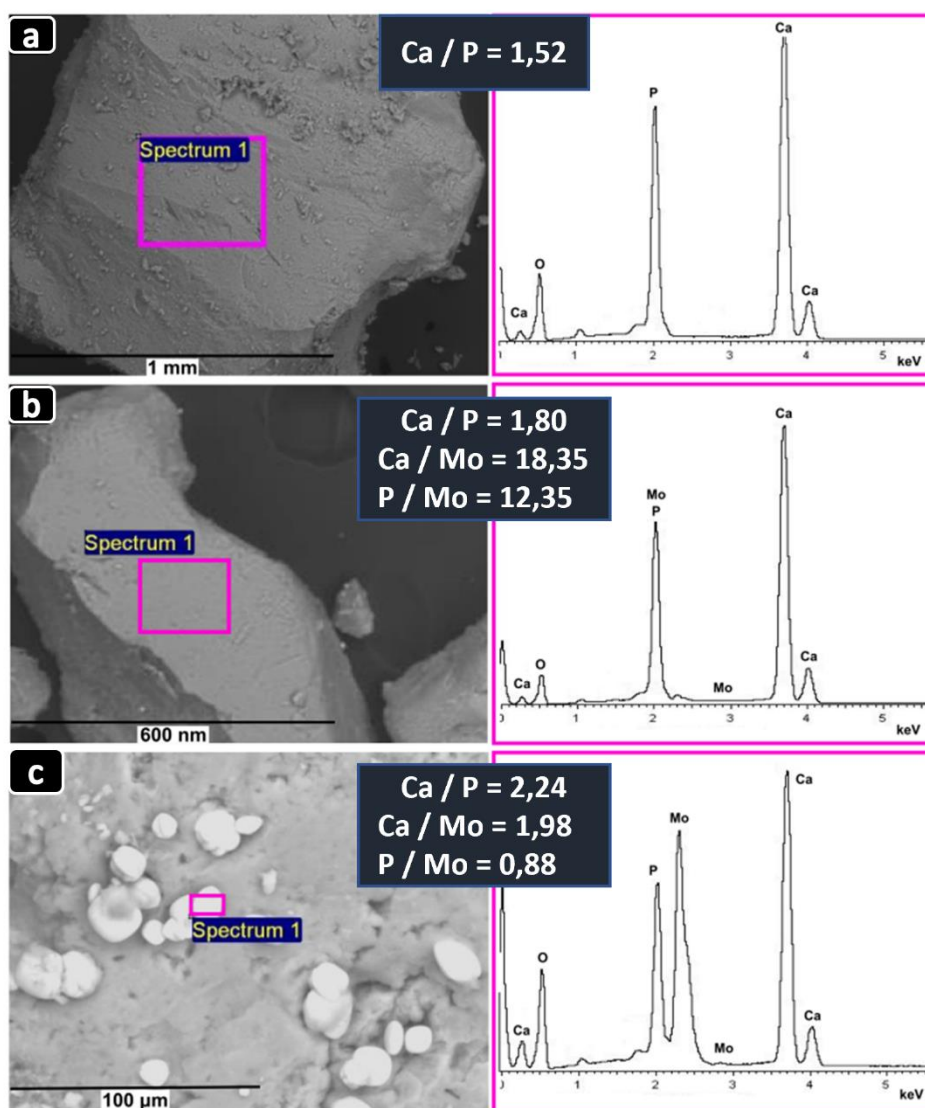


Figura 5.10: microanálisis EDX de muestras de (a) nano-HA_{II} (b) HA_{II}/MoO_x (II) y (c) HA_{II}/MoO_x (III).

La estructura microcristalina se verificó después de la inspección de micrografías H-TEM y patrones de difracción de rayos X, Fig. 5.11.

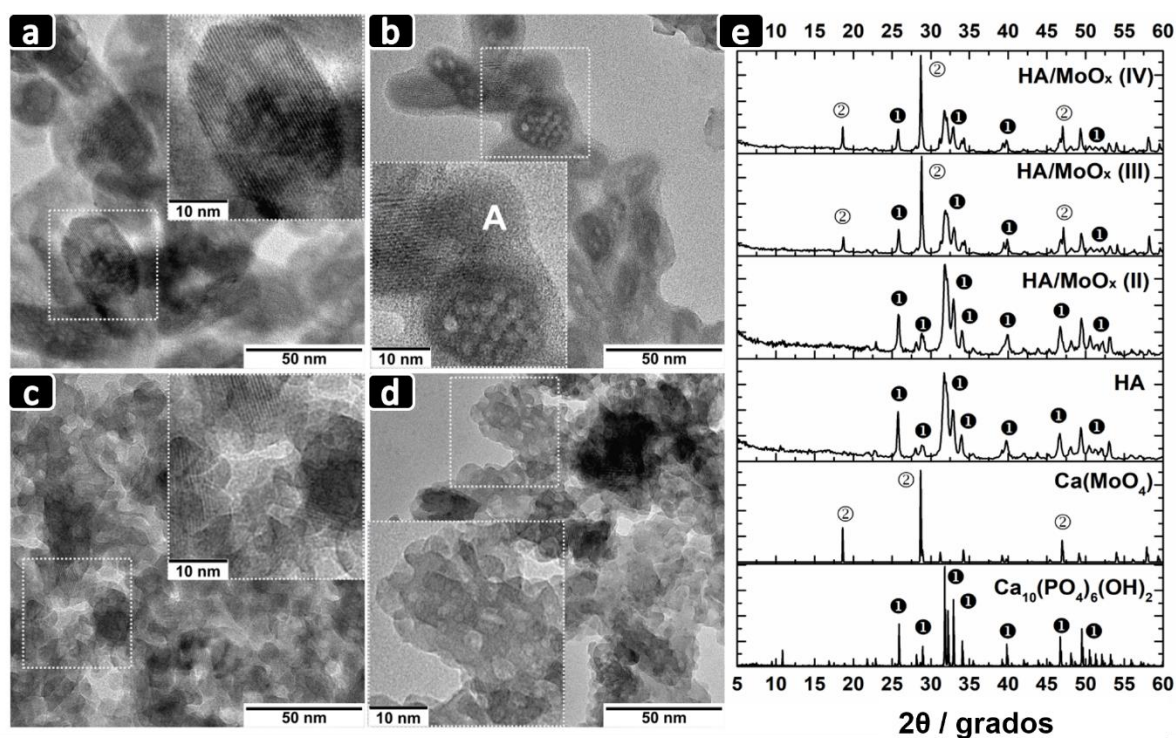


Fig. 5.11: Micrografías H-TEM de las plataformas (a) nano- HA_{II} , (b) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II), (c) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III) y (d) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (IV); A: fase amorfa. Para simplificar el diagrama y debido a la similitud morfológica entre las muestras de $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (I) y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II), no se muestran las fotografías de $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (I). (e) patrones DRX de polvos $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$; se utilizan como referencias la hidroxiapatita estequiométrica ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, R130713.9) y la powellita ($\text{Ca}(\text{MoO}_4)$, R100180) de la base de datos RRUFF [40]. Figura adaptada de referencia [66].

Las muestras relativas a nano- HA_{II} y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (I y II), Fig. 5.11a y b, mostraron la presencia de nanopartículas cristalinas con forma de rodillos, mientras que las muestras $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III) y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (IV) mostraron zonas cristalinas incrustadas en una matriz amorfa, Fig. 5.11c y d. De acuerdo con los resultados de H-TEM, los espectros DRX, Fig. 5.11e, exhibieron picos asociados con hidroxiapatita pobremente cristalina deficiente en calcio, similar a la existente en muestras biológicas [67] y disminuyendo en intensidad y cristalinidad de las muestras $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II) a $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (IV). Además, los polvos de $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III) y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (IV) expusieron un segundo patrón de difracción de rayos X que se identificó como powellita, $\text{Ca}(\text{MoO}_4)$, lo que ratifica la presencia de una fase rica en molibdeno amalgamada con nano- HA_{II} . Una inspección profunda de los patrones de difracción de electrones de área seleccionada (SAED) para muestras de $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III y IV) reveló la presencia de fases de HA y powellita en una combinación completa dentro de la estructura del material, Fig. 5.12. Las matrices SAED mostraron una

configuración hexagonal perfecta, Fig. 5.12a-i y b-i, que se indexaron a los planos (300) de HA vistos a lo largo de la dirección cristalográfica "c", y el diseño tetragonal característico de los planos (112) de powellita a lo largo de la dirección "b", Fig. 5.12a-ii y b-ii.

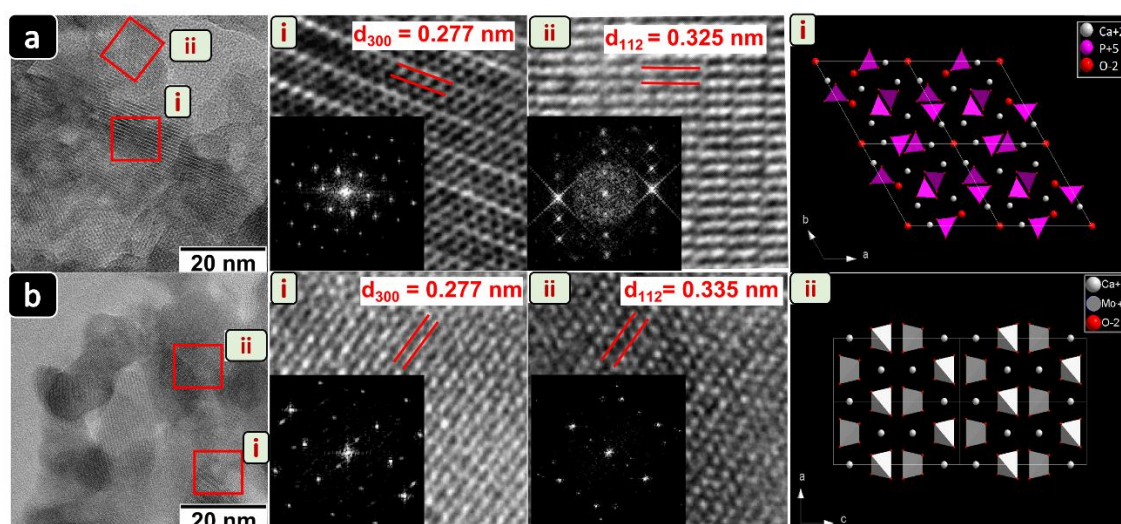


Figura 5.12: Micrografías H-TEM de las plataformas (a) HA_{II}/MoO_x (III) y (b) HA_{II}/MoO_x (IV). Las áreas cristalinas seleccionadas se señalan en cuadros rojos. Los patrones de difracción de electrones de área seleccionada (SAED) se extrajeron de la transformada de Fourier (FFT) de las micrografías H-TEM mediante el procesamiento de imágenes utilizando el software Image J [39] y se compararon con estructuras teóricas de celdas unitarias directas generadas por el método *ab initio* [46] (i) Planos cristalinos de hidroxiapatita y (ii) powellita. Figura adaptada de referencia [66].

A pesar de la semejanza de los perfiles DRX de HA en todas las muestras, se observaron ligeras divergencias a partir de un examen más profundo de los espacios interplanares "d". Se utilizaron modelos moleculares semiempíricos *ab initio*, Fig. 5.13 y 5.14, así como cálculos de parámetros cristalográficos para validar la distorsión de la celda unitaria de HA y la posible incorporación de átomos de Mo.

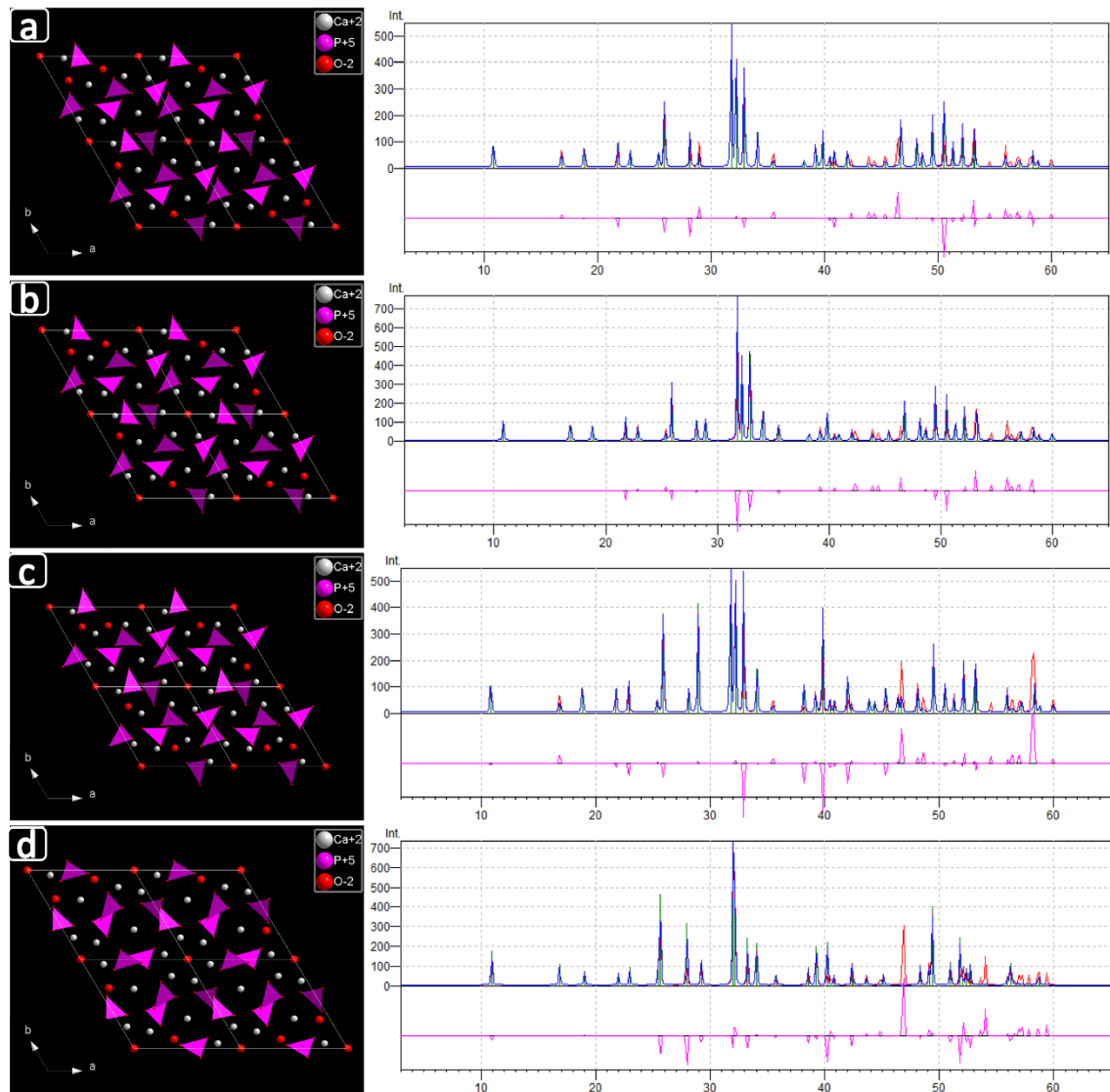


Figura 5.13: Vista de la celda unitaria de HA modelada a lo largo del eje cristalográfico "c" para muestras de (a) nano-HA_{II} (b) HA_{II}/MoO_x (II), (c) HA_{II}/MoO_x (III) y (d) HA_{II}/MoO_x (IV). Comparación DRX: datos DRX teóricos (azul), datos DRX experimentales (rojo) y coincidencia de datos DRX teóricos y experimentales (rosa); la correlación total debe dar una línea recta. Figura adaptada de referencia [66].

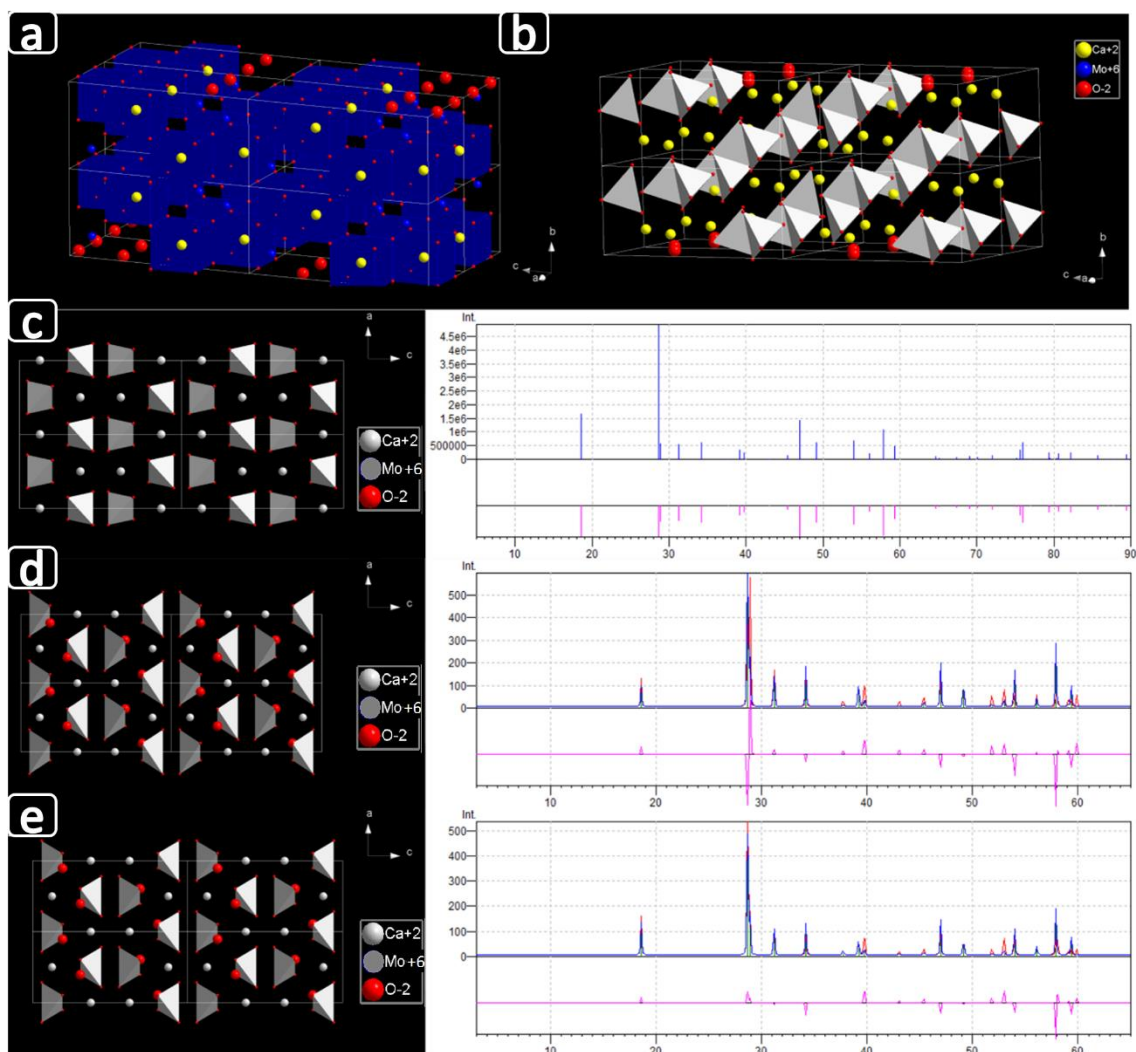


Figura 5.14: la powellita cristaliza en la estructura de scheelita con el grupo espacial $I41/a$ donde el ion central Ca^{2+} está coordinado por ocho grupos molibdato unidos de forma sencilla. (a) Vista de la coordinación central de Ca^{2+} y (b) de los iones MoO_4^{2-} tetraédricos en la estructura de la powellita. Comparación de (c) estructura estequiométrica teórica de la celda unitaria directa de powellita y análogos modelados para muestras de (d) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III) y (e) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (IV); vista a lo largo del eje cristalográfico "b". Comparación DRX: datos DRX teóricos (azul), datos DRX experimentales (rojo) y coincidencia de datos DRX teóricos y experimentales (rosa); la correlación total debe dar una línea recta. Figura adaptada de referencia [66].

Los valores de los parámetros geométricos de red y del volumen de celda unitaria para nano- HA_{II} fueron comparables con los estándares de referencia (R130713.9)[42] y con los datos obtenidos previamente [30], [37] ($a = b = 9,439 \text{ \AA}$; $c = 6,914 \text{ \AA}$; y $533,1 \text{ \AA}^3$), mientras que para las plataformas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ sus magnitudes disminuyeron siempre que pasamos de las muestras (I) a (IV), Tabla 5.2. Los resultados obtenidos se atribuyeron a la sustitución de $(\text{PO}_4)^{3-}$ por $(\text{MoO}_4)^{2-}$. Ambos iones tienen una disposición

espacial tetraédrica y una superficie polar topológica similar, [68], [69] lo que propicia un reemplazo estereoquímica y electrostáticamente compatible. La contracción de los parámetros de red se produciría porque el anión $(\text{MoO}_4)^{2-}$ presenta una ligera reducción en su superficie polar topológica, $\sim 80,3 \text{ \AA}^2$, [68] respecto al $(\text{PO}_4)^{3-}$, $\sim 86,2 \text{ \AA}^2$, [69]. El ligero aumento de la relación Ca/P a lo largo de las muestras de $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (I y II) se deriva indudablemente de un cierto grado de reemplazo de P-Mo en la red de nano- HA_{II} . Además, para las muestras $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III y IV), que mostraron patrones de difracción tanto de powellita como de HA, la relación Ca/Mo elemental adquirida en los depósitos esféricos fue de aproximadamente dos, Fig. 5.10c. Este valor es superior al de la powellita estequiométrica, $\text{Ca}/\text{Mo} = 1$, por lo que asumimos que estábamos en presencia de una fase de powellita rica en Ca^{2+} [70]. La celda unitaria tetragonal modelada y los parámetros cristalográficos computados de la fase powellita para las muestras $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III y IV) eran comparables a los valores estándar, Tabla 5.2. Sabiendo que había exceso de Ca^{2+} , Fig. 5.10c, asumimos que casi todos los átomos de Mo cristalizaron en una estructura de powellita y el Ca^{2+} restante quedaría atrapado en una forma amorfa de CaMoO_4 o en un ensamblaje amorfo de calcio desconocido [30].

Tabla 5.2: Parámetros cristalográficos de plataformas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$.

	<i>HA esteq.</i>		<i>Powellita</i>	<i>Muestras / HA_{II}: (Ca²⁺)_{9.12}(PO₄³⁻)_{5.12}(HPO₄²⁻)_{0.88}(OH⁻)_{1.12}</i>				
	(JCP DS 9-436)	(R130 713.9)	(R100180)	nano HA _{II}	HA _{II} /MoO _x (I)	HA _{II} /MoO _x (II)	HA _{II} /MoO _x (III)	HA _{II} /MoO _x (IV)
<i>PMA/HA_{II} ratio</i>	---	---	---	---	4/1	2/1	1/1	1/2
<i>Mo/Ca ratio^(*)</i>	---	---	---	---	2,17	1,07	0,54	0,26
<i>Mo/Ca ratio (EDX)</i>	---	---	---	---	0,05	0,05	0,45	0,23
<i>Fase Hidroxiapatita</i>								
<i>X_{c,HA} (ec. 5.5)</i>	1	1	1	0,51	0,50	0,50	0,42	0,37
<i>X_{c,HA} (ec 5.6)</i>	1	1	1	0,50	0,48	0,48	0,41	0,35
<i>d₍₀₀₂₎/Å</i>	3,441	3,456	---	3,457	3,455	3,449	3,447	3,445
<i>d₍₃₀₀₎/Å</i>	2,719	2,725	---	2,725	2,722	2,719	2,713	2,711
<i>a = b / Å</i>	9,418	9,438	---	9,439	9,429	9,421	9,398	9,391
<i>c / Å</i>	6,881	6,911	---	6,914	6,910	6,898	6,894	6,890
<i>V / Å³</i>	528,6	533,1	---	533,5	532,0	530,2	527,3	526,2

<i>Fase Powellita</i>								
$d_{(101)}/\text{Å}$	---	---	4,764	---	---	---	4,751	4,763
$d_{(112)}/\text{Å}$	---	---	3,111	---	---	---	3,105	3,109
$a = b/\text{Å}$	---	---	5,239	---	---	---	5,217	5,239
$c/\text{Å}$	---	---	11,457	---	---	---	11,502	11,434
$V/\text{Å}^3$	---	---	314,49	---	---	---	313,03	313,86

(*) Calculado a partir de las cantidades de Ca^{2+} y Mo^{+6} añadidas a las soluciones iniciales de síntesis del material; EDX: Calculado por los resultados de EDX-Microanálisis.

Se encontró que las plataformas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ eran muy sensibles a las condiciones de síntesis. Razonamos que las diferencias entre las muestras finales obtenidas se debían a la interacción PMA/nano-HA en un medio de reacción de pH preciso que influyó simultáneamente en los procesos de formación de los aniones molibdato [71] y los mecanismos de disolución de las nanopartículas de HA [72]. En contra de lo previsto, los materiales desarrollados con una menor cantidad de PMA ($\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III) y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (IV)) resultaron en una amalgama de fases powellita/nano-HA, mientras que los elaborados con una mayor proporción de PMA/HA ($\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (I) y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II)) dieron lugar a HA sustituida con MoO_4^{2-} . Durante la obtención de muestras de $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (I) y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II), se determinó que el pH inicial de las soluciones de PMA era de alrededor de 1,5 y, luego de la adición de las dispersiones de nanopartículas de HA_{II} (pH = 9) [1], [73] se convirtió en 2,3 y 3,4 para $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (I) y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II), respectivamente. Bajo tales condiciones, la disolución de nano-HA es muy favorecida y ese efecto es acelerado por la intensificación de la temperatura durante el tratamiento hidrotermal [30], [37]. Se sabe poco sobre los modelos de disolución de HA y su validez bajo soluciones de ácidos inorgánicos fuertes (pH < 2, y T > 70 °C [72]). Sin embargo, existe un acuerdo general de que la disolución progresa en las siguientes etapas: (i) difusión de reactivos químicos (H^+ , aniones ácidos) desde la solución a granel hasta la interfase sólido/líquido; (ii) adsorción de reactivos químicos sobre la superficie de apatita; (iii) transformación química superficial; (iv) desorción de productos de apatita (F^- , Ca^{2+} y PO_4^{3-}) y (v) difusión en la solución a granel. Un análisis por espectrofotometría UV-vis del medio de reacción al final de la síntesis reveló dos picos alrededor de 215 y 310 nm característicos de los aniones oligomolibdato de estructura Keggin intacta [74], Fig. 5.15. Este hallazgo está de acuerdo con la formación de complejos solubles de calcio-fosfomolibdato entre los aniones fosfomolibdicos de PMA y los iones Ca^{2+} extraídos de

HA [74]. A pesar de las condiciones extremas de reacción, las nanopartículas de HA se disolvieron parcialmente, probablemente debido a una estabilización adicional de su estructura mediante el reemplazo de los iones ortofosfato extraídos (PO_4^{3-}) por molibdato (MoO_4^{2-}) de acuerdo con la formación de un cristal de HA sustituido por MoO_4^{2-} . Se obtuvo una estabilización similar para HA sustituido con Mg en un estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación [30]. La cantidad final de molibdeno incorporada en los materiales HA/MoO_x (I) y HA/MoO_x (II) fue muy pequeña en contraste con lo que se agregó inicialmente, Tabla 5.2. Casi el 98 % del Mo añadido inicialmente permaneció en solución. En este punto, tenemos que exponer que debido a la alta disolución de HA, se recolectó una cantidad muy pequeña de muestra HA_{II}/MoO_x (I). Como consecuencia de este hecho y de la similitud fisicoquímica con la muestra HA_{II}/MoO_x (II), la muestra HA_{II}/MoO_x (I) fue descartada en el análisis que se expone a continuación.

Los materiales HA_{II}/MoO_x (III) y HA_{II}/MoO_x (IV) se sintetizaron con soluciones de PMA menos concentradas (pH = 4,5) y el pH del medio después de la integración de todos los reactivos fue de aproximadamente 7,5. En tales condiciones, nano-HA se disuelve lentamente [37] liberando Ca^{2+} , mientras que se favorece la formación de MoO_4^{2-} [71]. Ambos hechos apoyaron la precipitación de la fase powellita (CaMoO_4). Dado que la relación molar Mo/Ca en los depósitos de powellita coincidía relativamente bien con las cantidades añadidas inicialmente, Tabla 5.2, se podría afirmar que todo el Mo precipitó como powellita, ya sea cristalina o amorfa.

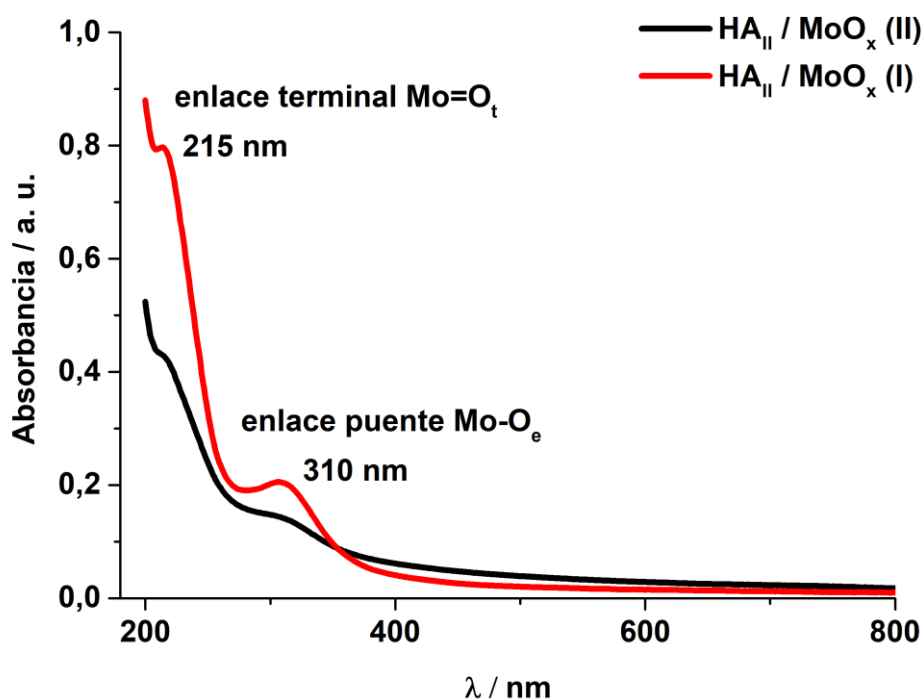


Figura 5.15: espectros de absorción UV-vis de los medios de reacción al final de la síntesis de las muestras de $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (I) y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II). Los picos característicos a 215 y 310 nm son representativos de la estructura de los heteropolianiones de Keggin. Las bandas se asignan respectivamente a las vibraciones de los enlaces terminales $\text{Mo}=\text{O}_t$ y enlaces puente $\text{Mo}-\text{O}_e$. [41].

5.3.2 Defectos puntuales intrínsecos dentro de las plataformas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$: inducción de fluorescencia autoactivada y capacidad de respuesta redox

En la sección anterior, hemos demostrado que, bajo condiciones de reacción definidas, PMA introdujo iones MoO_4^{2-} dentro de la red cristalina de la hidroxiapatita (muestras $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (I y II)) o generó amalgamas CaMoO_4/HA (muestras $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III y IV)). A lo largo de este proceso, se crean defectos electrónicos puntuales intrínsecos en el cristal de HA primario. Estos defectos serán los responsables de las propiedades optoelectrónicas del material y, como demostraremos al final de este trabajo, serán cruciales para sus interacciones con los microorganismos. La energía de banda prohibida (E_g) de las plataformas nano- HA_{II} y nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ se estimó trazando $(\alpha h\nu)^m$ frente a la energía del fotón ($h\nu$), como se muestra en la Fig. 5.16.

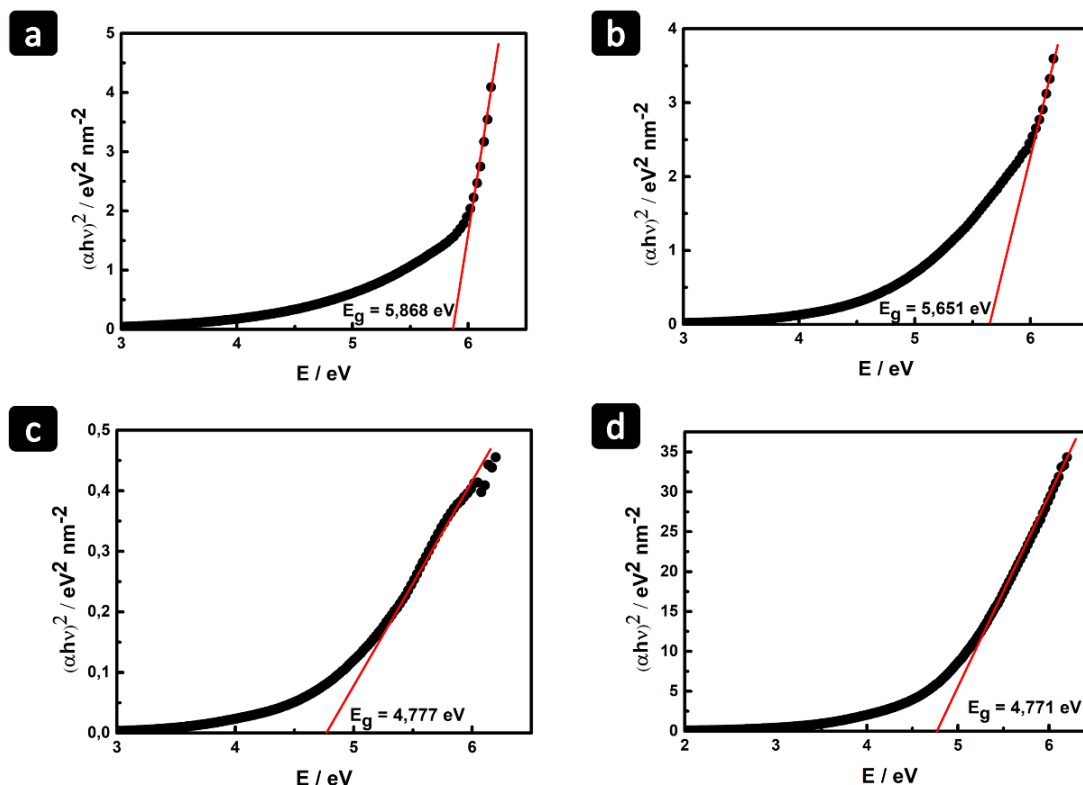


Figura 5.16: energía de banda prohibida óptica (E_g) de (a) nano- HA_{II} , (b) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II), (c) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III) y (d) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (IV) estimados mediante trazado $(\alpha h\nu)^m$ vs la energía del fotón ($h\nu$) [35].

Las muestras correspondientes para nano- HA_{II} y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II) presentaron valores de E_g de $5,868 \pm 0,135$ y $5,651 \pm 0,211$ eV, respectivamente; aproximadamente 2 eV inferior a la información reportada en literatura para la HA teórica hexagonal libre de defectos ($E_g = 7,7 \pm 0,2$ eV) [75], [76]. Sin embargo, los datos coincidieron con los valores experimentales informados para la celda de HA con vacancia de -OH ($E_g = 5,5$ eV) [22], en total acuerdo con la estructura de nuestra HA no estequiométrica (nano- HA_{II}), $(\text{Ca}^{+2})_{9.12}(\text{PO}_4^{-3})_{5.12}(\text{HPO}_4^{-2})_{0.88}(\text{OH})_{1.12}$. Exhibiendo un $E_g > 5,5$ eV, las muestras nano- HA_{II} y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II) deberían ser transparentes a la luz visible y las excitaciones electrónicas ser posibles solo bajo iluminación ultravioleta media o lejana, muy probablemente con $h\nu_{\text{EX}} > 6$ eV. Los patrones fotoluminiscentes (FL) de muestras nano- HA_{II} y nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ a temperatura ambiente se muestran en la Fig. 5.17 a-d;

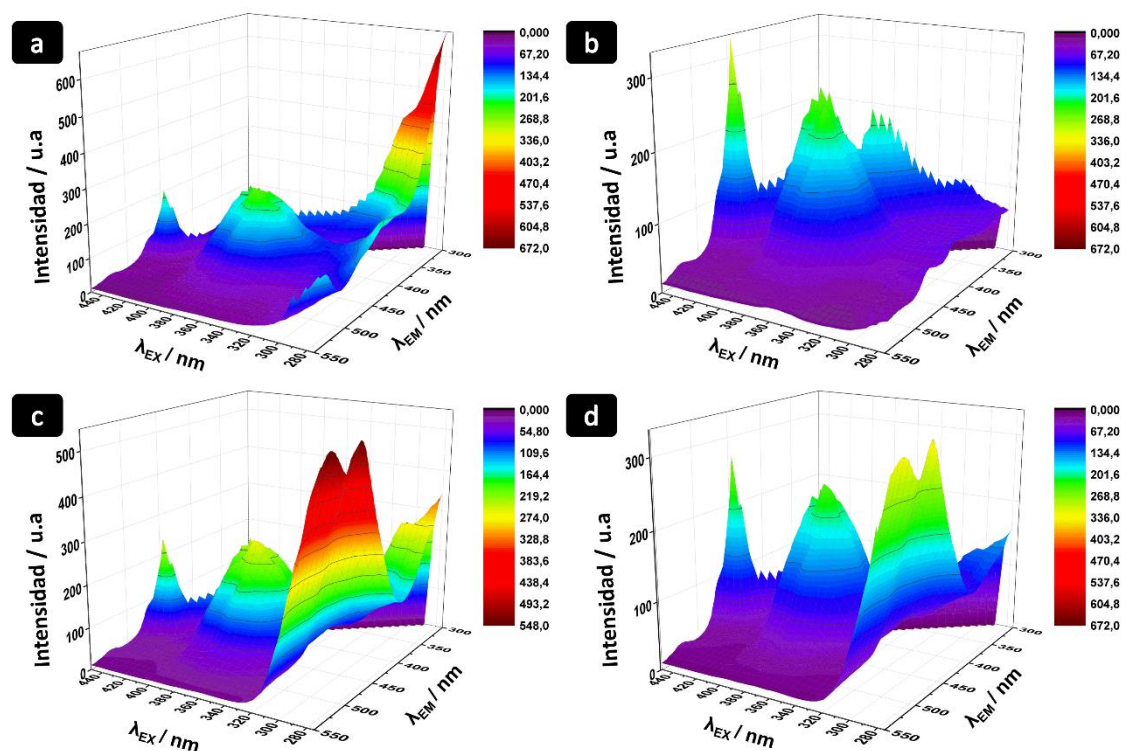


Figura 5.17: Patrones de excitación-emisión de fotoluminiscencia (FL) 3D a temperatura ambiente para muestras de (a) nano- HA_{II} , (b) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II), (c) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III) y (d) $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (IV). Figura adaptada de referencia [66].

Las emisiones primarias de FL se resumen en la Tabla 5.3. La emisión más alta de nano- HA_{II} se detectó en $\lambda_{\text{EM}} = 310$ nm (4,00 eV) después de una excitación con $\lambda_{\text{EX}} = 280$ nm (4,42 eV), Fig. 5.17a. Las energías de banda prohibida aumentan linealmente con el orden estructural [77], por lo que el requerimiento de una energía de excitación de alrededor de 1,5 eV menos que el E_g implica que detrás de este efecto deberíamos tener una transición que involucre al menos un estado ubicado en la zona de banda prohibida, muy probablemente asociado a la presencia de defectos. En la sección anterior, hemos demostrado que tanto las plataformas nano- HA_{II} como nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ presentan distorsiones en su red y en su composición interatómica. Estos están asociados a sustituciones, vacancias, defectos intersticiales, entre otros [22], con una redistribución de los electrones en los niveles electrónicos de energía ocupados/desocupados. Esta redistribución cambiaría los niveles electrónicos (incluidos los cambios de la parte superior de la banda de valencia, E_v , la parte inferior de la banda de conducción, E_c y, por lo tanto, el ancho de la zona de banda prohibida, $E_g = E_c - E_v$), y crearía nuevos niveles

de energía, E_i , dentro de esta brecha de energía. La formación de estos diversos tipos de defectos en HA da lugar a varios procesos de fotoexcitación en el ultravioleta cercano y en la región de luz visible [25].

Los datos obtenidos en el espectro FL para nano- HA_{II} sugirieron que había un nivel de energía recombinante en la zona de banda prohibida con un valor de $E_g^* \approx 4,0$ eV ($E_g^* = E_c - E_i$) (o línea de 310 nm) desde el fondo de la banda de conductancia [22].

Tabla 5.3: Emisiones fotoluminiscentes más altas, energía de banda prohibida (E_g) y valores de potencial ζ para las plataformas nano- HA_{II} y nano- HA_{II}/MoO_x .

	<i>Fotoluminiscencia</i>		<i>Potencial ζ</i> <i>/ mV</i>	<i>E_g / eV</i>
	λ_{EX} / nm; hv/ eV	λ_{EM} / nm; hv/eV		
<i>nano-HA_{II}</i>	440; 2,82 372; 3,33 280; 4,42	460; 2,69 439; 2,82 310; 4,00	$-19,8 \pm 1,9$	$5,868 \pm 0,135$
<i>$HA_{II}/MoO_x(II)$</i>	440; 2,82 391; 3,17 362,5; 3,42	460; 2,69 411; 3,02 382; 3,24	$-18,3 \pm 0,9$	$5,651 \pm 0,211$
<i>$HA_{II}/MoO_x(III)$</i>	440; 2,82 372; 3,33 280; 4,42	460; 2,69 436; 2,84 522; 2,37 477; 2,60	$-17,0 \pm 0,9$	$4,777 \pm 0,145$
<i>$HA_{II}/MoO_x(IV)$</i>	440; 2,82 372; 3,33 280; 4,42	460; 2,69 439; 2,82 523; 2,37 473; 2,62	$-22,3 \pm 0,4$	$4,771 \pm 0,109$

Asimismo, se observaron dos emisiones fotoluminiscentes de menor intensidad correspondientes a niveles de $E_i = 2,82$ y $2,69$ eV, lo que confirió al material un cierto grado de epifluorescencia azul y, en mucha menor proporción, epifluorescencia verde, Fig. 5.18.

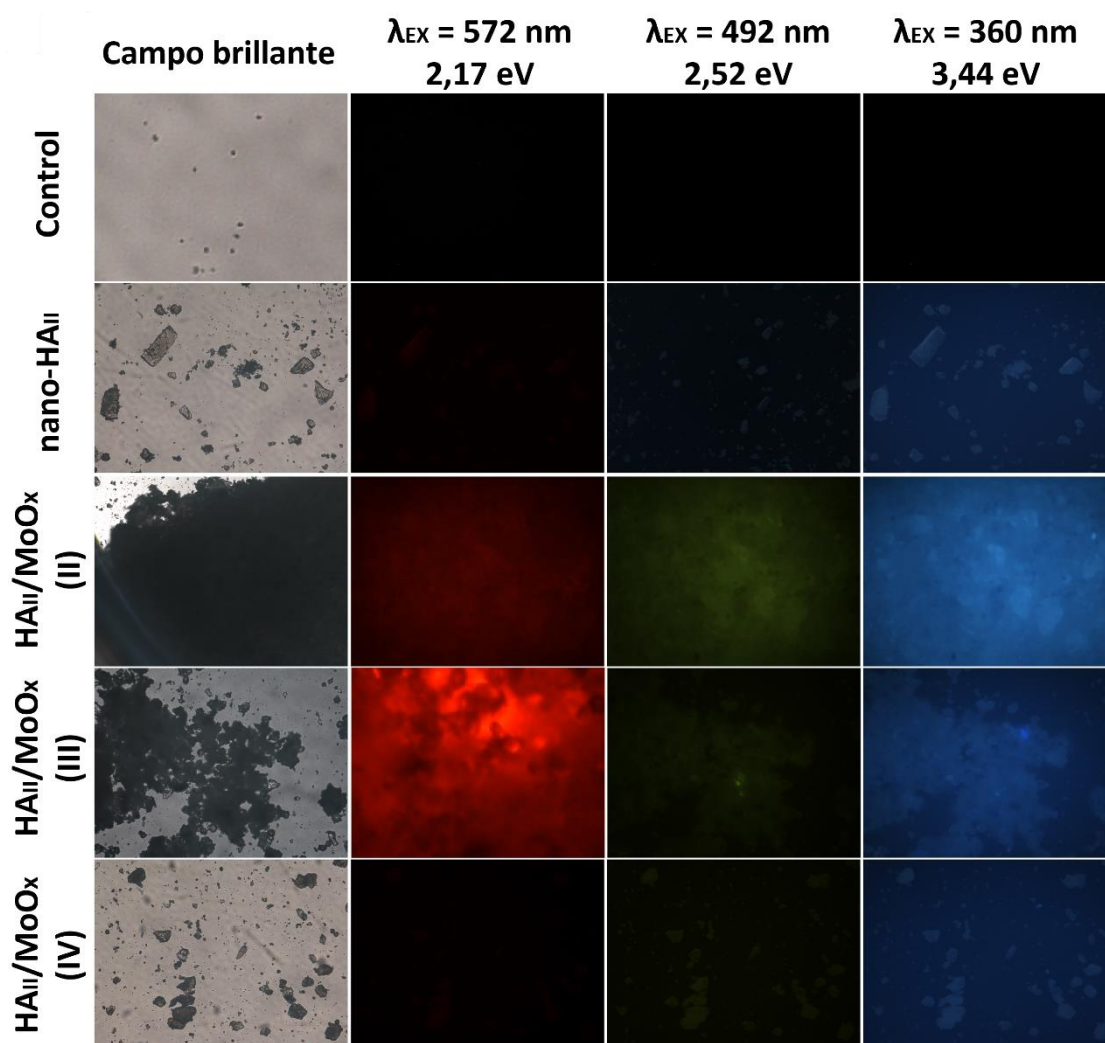


Figura 5.18: Imágenes de microscopía de epifluorescencia de las plataformas nano-HA_{II} y nano-HA_{II}/MoO_x a temperatura ambiente. Se usaron pocillos sin recubrir como control (C). Figura adaptada de referencia [66].

En base a los datos de literatura, se propone que el origen de estos defectos podría derivarse de la presencia de vacancias de $-\text{OH}$, defecto puntual frecuentemente presente en HA no estequiométricas [25], [78], [79] (con valores reportados de $E_g^* \approx 2,71, 2,92$ y $3,31$ eV) [25], [26], así como vacancias de O y/o H intersticial ($E_g^* \approx 4,03$ eV y $3,92$ eV, respectivamente) [25]. La incorporación de Mo^{6+} como MoO_4^{2-} en la estructura de la hidroxiapatita a lo largo de la muestra HA_{II}/MoO_x (II), indujo la desaparición de emisiones asociadas a estos últimos (4,0 eV), conservando aquellas relacionadas con las vacancias $-\text{OH}$, $E_g^* \approx 2,69, 3,00$ y $3,24$ eV. La presencia de defectos puntuales metálicos cambiaría tanto el rendimiento cuántico de emisión como el tiempo de vida de la

fluorescencia [80], observándose en este caso particular una epifluorescencia azul amplificada, Fig. 5.18.

Las muestras de HA_{II}/MoO_x (III y IV) presentaron valores de energía de banda prohibida ($E_g = 4,77$ eV) inferiores a los encontrados para nano-HA_{II} y HA_{II}/MoO_x (II); estos valores se asociaron con la presencia de la fase powellita ($E_g \approx 4.70$ eV) [77]. Se mantuvieron algunas emisiones de FL asociadas a la presencia de vacancias de $-OH$ (2,69 eV y 3,00 eV), aunque las emisiones más relevantes de estas muestras ocurrieron a $\lambda_{EM} = 523$ nm y $\lambda_{EM} = 473$ nm (2,37 y 2,62 eV), en acuerdo con lo presentado por otros trabajos realizados con powellita [77], [81]. De acuerdo con la información de literatura, los perfiles FL, Fig. 5.17c y d, son típicos de un proceso multifonónico y multinivel, es decir, un sistema en el que la relajación ocurre por varios caminos, involucrando la participación de numerosos estados dentro de la zona de banda prohibida del material [77]. La interferencia de nuevos niveles electrónicos a $E_g^* = 2,37$ y 2,62 eV con aquellos asociados a las vacantes de $-OH$, podría ser responsable de la reducción de la epifluorescencia azul. Adicionalmente, la muestra HA_{II}/MoO_x (III), Fig. 5.18, mostró una intensa epifluorescencia roja, la cual ha sido asociada en muestras de powellita al desplazamiento de O hacia un sitio intersticial con la creación de una vacante (defecto de tipo Frenkel) [77], [81].

La disrupción de los niveles electrónicos puede conducir a variaciones en las cargas superficiales [25]. En este sentido, se midió el potencial ζ superficial de todas las plataformas como se muestra en la Tabla 5.3. Los datos obtenidos fueron similares a los reportados en literatura y en nuestros estudios previos [73], [82]; no encontramos ninguna evidencia de la alteración de la carga superficial debido a la sustitución de $MoO_4^{2-} - PO_4^{3-}$ o a la fusión HA/Ca(MoO₄).

La influencia de la presencia de defectos cristalinos tales como las vacancias $-OH$ es muy importante, porque no solo afectan los valores de E_g , sino que también crean niveles de captura de electrones de la banda de conducción en el medio de la zona prohibida [25]. La formación de este tipo de defecto estaría relacionada con la capacidad de un material para aceptar electrones y, por lo tanto, regularía su capacidad de respuesta redox. Sabiendo que los procesos internos de una célula involucran reacciones de reducción-oxidación (redox) y que el potencial redox es bien reconocido como un factor regulador de las actividades celulares [83], se analizó el estado biológico redox de las plataformas nano-HA_{II} y nano-HA_{II}/MoO_x. Las muestras se contrastaron con la sonda

redox de ácido L-ascórbico (AA) para evaluar su potencial redox (componente de intensidad redox) y el conjunto de electrones capaces de transferirse (componente de capacidad redox). Las curvas de voltamperometría cíclica obtenidas para los electrodos de carbono vítreo (GC) modificados con nano- HA_{II} y nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ a 50 mV s^{-1} se muestran en la Fig. 5.19a. Bajo las condiciones operativas, AA siempre mostró su pico de oxidación único característico en la región potencial entre 0,0 y 0,8 V, lo que demuestra que todos los materiales probados actuaron como aceptores de electrones. Se observó que el pico anódico, consistente con la transformación electroquímica irreversible del AA en ácido dehidroascórbico [50], aumentó con la presencia de Mo. Los valores máximos correspondieron a las muestras de $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III) y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (IV), mientras que como era de esperar, la muestra de $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II) con un contenido más bajo de Mo combinado con la estructura de HA mostró el valor mínimo. Sin embargo, para todos los materiales $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$, el potencial anódico máximo (E_p) se desplazó gradualmente a valores menos positivos después de la incorporación de Mo en comparación con el electrodo de nano- HA_{II} ($E_p = 0,48 \text{ V}$).

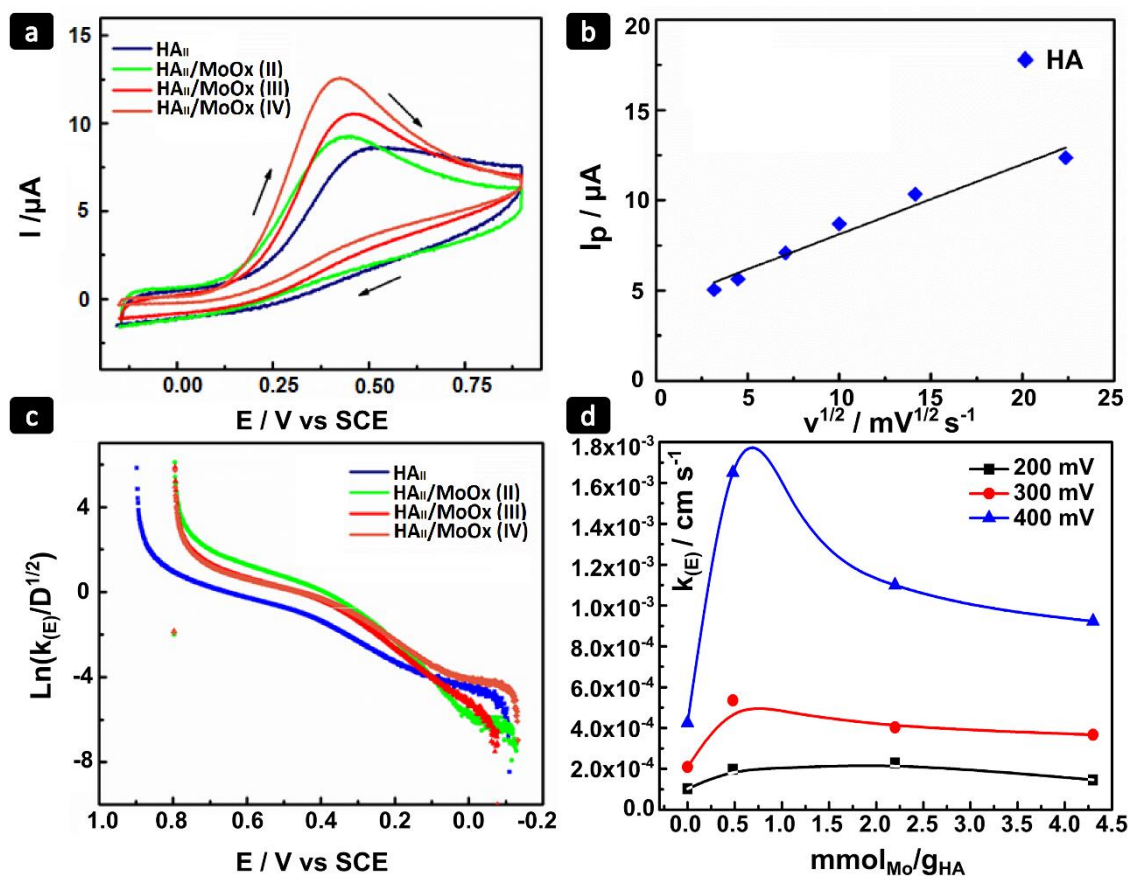


Figura 5.19: (a) Curvas de voltamperometría cíclica (CV) de electrodos de GC modificados con las plataformas en una solución de AA 10 mM en PBS (pH = 7,2) a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} . Las flechas indican la dirección de barrido. (b) Gráfico de Randles-Ševčík obtenido de los datos de CV para el electrodo correspondiente a nano-HA_{II}; las velocidades de barrido van de 10 a 500 mV s^{-1} . (c) Voltamograma cíclico semiintegral (rama anódica) para la electrooxidación de AA en los electrodos de GC modificados con nano-HA_{II} y nano-HA_{II}/MoO_x. (d) Variación de la constante de velocidad heterogénea aparente, $k_{(E)}$, en función de la cantidad efectiva de Mo, $E = 200, 300$ y 400 mV .

La Fig. 5.19b muestra el diagrama de Randles-Ševčík para nano-HA_{II}; se obtuvo una correlación lineal similar para las muestras nano-HA_{II}/MoO_x. La variación lineal del pico de corriente con la raíz cuadrada de la velocidad de barrido durante todo el ciclo inspeccionado, confirmó que el proceso de oxidación irreversible de AA en todos los electrodos de GC modificados con las plataformas estaba regulado por un mecanismo de difusión. De acuerdo con este mecanismo, la transferencia del primer electrón de AA para formar el anión radical ascorbilo es el paso determinante de la velocidad (rds) de la reacción [53]. La constante de velocidad heterogénea aparente, $k_{(E)}$, se estimó a partir del análisis semi-integral de la rama anódica de los voltamogramas, Fig. 5.19c; los valores

obtenidos se resumen en la Fig. 5.19d. Se puede notar que $k_{(E)}$ fue fuertemente influenciado por la sustitución $\text{MoO}_4^{2-} - \text{PO}_4^{3-}$ y que respondió a la intensidad del campo eléctrico aplicado (E). Luego del incremento de la intensidad del campo eléctrico, se observó que $k_{(E)}$ adquirió un valor máximo para el material $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II), que no contenía fases cristalinas extra de MoO_4^{2-} . Dado lo observado en los espectros de FL que denotan un aumento aparente de las vacantes de $-\text{OH}$ en la muestra $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (II) y este hecho está, a su vez, relacionado con la creación de niveles de atrapamiento de electrones, esto efecto también podría explicar el aumento de $k_{(E)}$ en la reacción de electro-oxidación de AA, Fig. 5.19d. Las muestras de $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III) y $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (IV) compuestas de una mezcla de fases de hidroxiapatita y powellita mostraron valores de $k_{(E)}$ similares para todos los E. Teniendo en cuenta que $k_{(E)}$ disminuyó en las muestras de $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ (III y IV), Fig. 5.18d, así como su epi-fluorescencia azul, Fig. 5.18; ambos hechos se asociaron con la reducción de la influencia de la vacancia $-\text{OH}$.

5.3.3 Biocompatibilidad y actividad antimicrobiana de las plataformas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$

En varios estudios, hemos establecido la biocompatibilidad de nuestras nanopartículas de HA sintetizadas y su capacidad de reparación ósea [30], [37], [73], [84]. Sin embargo, como se reveló anteriormente, la presencia de molibdeno altera su composición química, morfología, grado de cristalinidad, parámetros de celdas unitarias cristalográficas y defectos electrónicos, que pueden conducir a una posible toxicidad. Así, antes de continuar, se comprobó la inocuidad de las plataformas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ tras 24 y 48 h de contacto con células provenientes de cultivo primario de rOBs. Los osteoblastos son cruciales para la expansión, el crecimiento, la función, la reparación y el mantenimiento del tejido óseo [85] y los materiales nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ se proponen como nuevas plataformas para la reparación del tejido óseo; entonces es fundamental verificar su biocompatibilidad en presencia de este tipo de células.

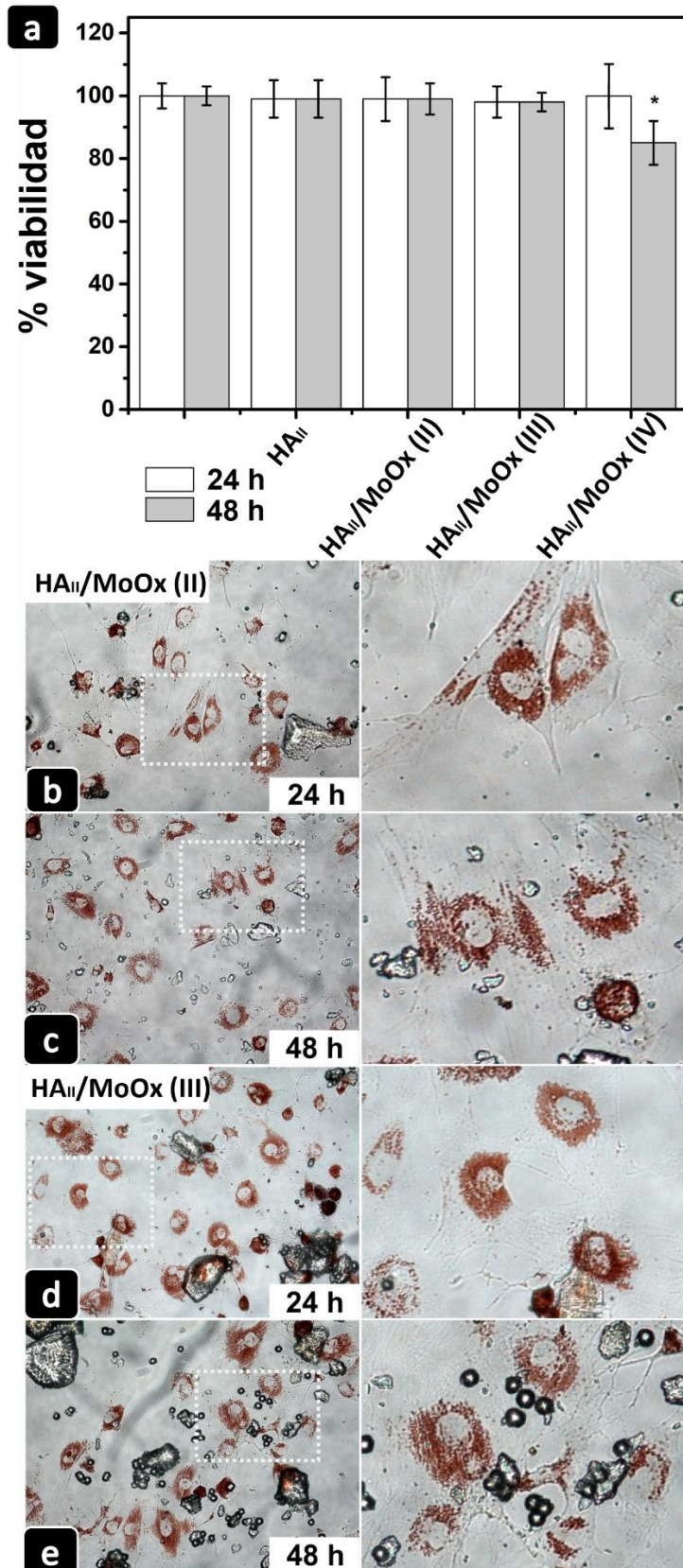


Figura 5.20: (a) Viabilidad de rOBs provenientes de cultivo primario; (b – e) Fotografías obtenidas por microscopía óptica representativas de rOBs adheridos teñidos con el colorante rojo neutro después de 24 y 48 h de cultivo.

La capacidad de las células para asimilar moléculas de colorante en sus lisosomas se examinó mediante el ensayo de Rojo Neutro; solo las células viables son capaces de completar este esfuerzo, por lo que la actividad lisosomal se considera como una cuantificación indirecta de la viabilidad celular. Los resultados obtenidos, Fig. 5.20a, mostraron que la actividad de los lisosomas de los rOBs cultivados después de 24 y 48 h en presencia de plataformas nano-HA_{II}/MoO_x no tuvo diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (C) o a la muestra relativa a nano-HA_{II}. Sí se pudo apreciar una ligera reducción de la actividad de los lisosomas estadísticamente significativa después de 48 h de cultivo en presencia del material HA_{II}/MoO_x (IV), aunque no se encontró significativa con respecto a las otras muestras. El estado de proliferación celular activa se confirmó mediante observaciones por microscopía óptica, Fig. 5.20 b-e. Los rOBs siempre exhibieron su característica morfología poligonal, plana y estirada con fuerte adhesión a la superficie.

Luego de confirmar la biocompatibilidad de las plataformas nano-HA_{II}/MoO_x, se analizó su actividad antibacteriana. Las Fig. 5.21 a y b muestran el porcentaje de reducción de la proliferación de bacterias grampositivas (*S. aureus*) y gramnegativas (*P. aeruginosa*) después de 24–48 h de incubación en presencia de muestras de nano-HA_{II} y nano-HA_{II}/MoO_x. Todos los materiales probados mostraron un R% \approx 100 a una concentración de 100 mg mL⁻¹ después de 48 h de contacto contra ambos microorganismos estudiados sin ninguna diferencia estadísticamente significativa. La muestra de HA_{II}/MoO_x (II) también ejerció actividad antibacteriana completa a 50 mg mL⁻¹ contra ambas cepas después de 24 y 48 h de exposición. El efecto del material HA_{II}/MoO_x (II) fue ligeramente superior al de la muestra nano-HA_{II} contra las bacterias Gram-positivas, ya que esta última mostró solo una reducción del \approx 75% de la proliferación bacteriana después de 24 h de tratamiento en todas las concentraciones probadas. Las muestras de HA_{II}/MoO_x (III y IV) mostraron una clara reducción de su actividad antibacteriana a una concentración de 50 mg mL⁻¹ después de 48 h de tratamiento contra *P. aeruginosa* (R% \approx 34). Este efecto también se evidenció, pero a menor aumento, frente a *S. aureus*; en esta última situación, solo la muestra HA_{II}/MoO_x (IV) experimentó una reducción de su actividad antibacteriana y el efecto fue similar a los observados para la muestra nano-HA_{II}.

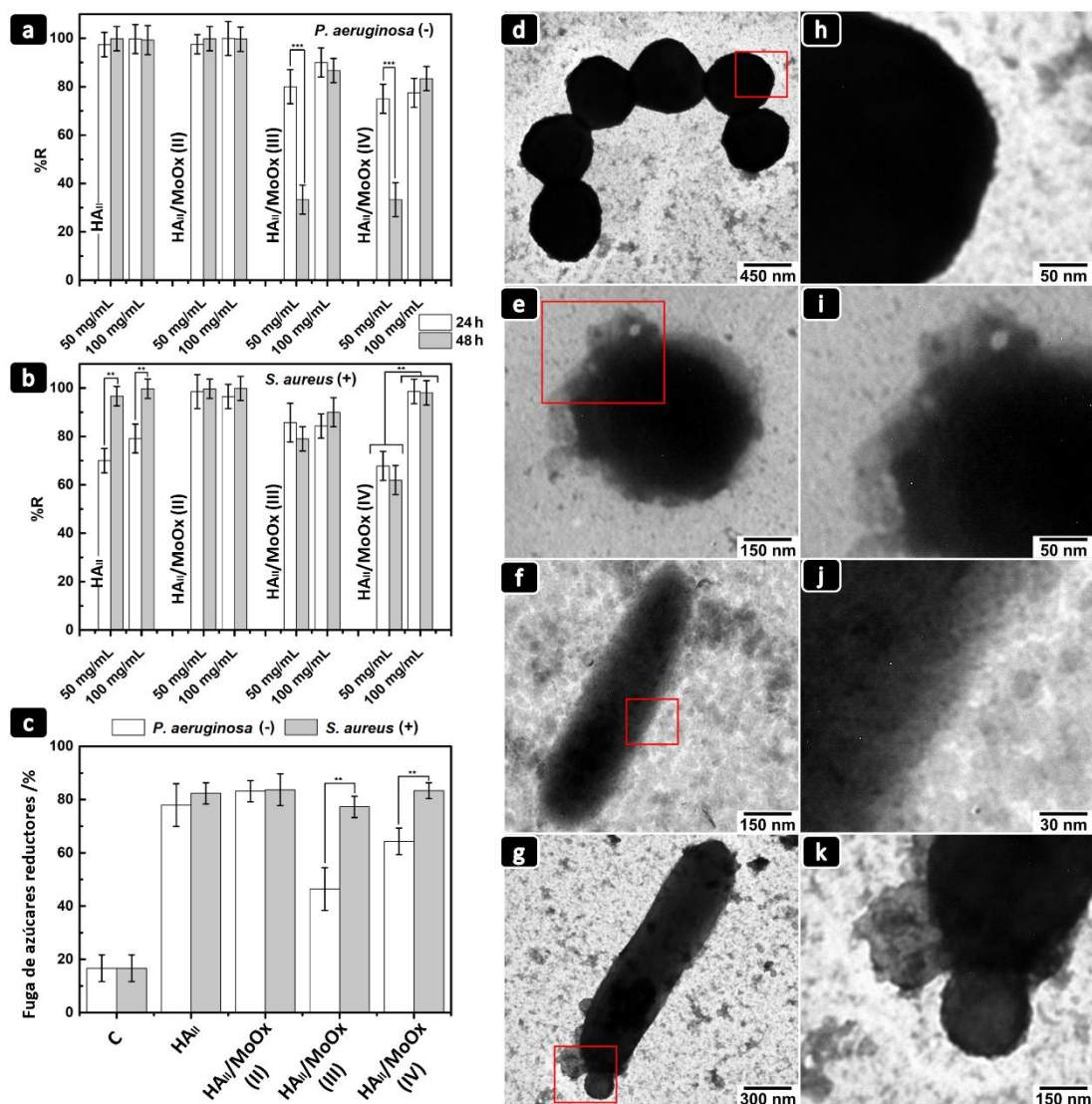


Figura 5.21: Actividad antibacteriana de nano-HA_{II} y nano-HA_{II}/MoO_x contra (a) *P. aeruginosa* y (b) *S. aureus* en función de la concentración de material; contacto: 24 y 48 h. Los resultados se expresan como porcentaje de reducción (R%). (c) Fuga de azúcares reductores después de 48 h de contacto bacteriano con 100 mg mL⁻¹ de las plataformas; las bacterias cultivadas sin la presencia del material se utilizaron como control, C. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (**p < 0,01, ***p < 0,001); las diferencias significativas entre las muestras se indican entre corchetes. Micrografías TEM de *S. aureus* después del cultivo solo (d y h) y en presencia de muestra de HA_{II}/MoO_x (II) (e y i). Micrografías TEM de *P. aeruginosa* después del cultivo solo (f y j) y en presencia de muestra de HA_{II}/MoO_x (II) (g y k). Figura adaptada de referencia [66].

El análisis de los datos obtenidos, Fig. 5.21 a y b, reveló que incluso si existía una conexión entre la reducción bacteriana y la presencia de molibdeno dentro de la red de HA, no había una correlación lineal con su cantidad incorporada (HA_{II}/MoO_x(III) >

$\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x(\text{IV}) > \text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x(\text{II})$, Tabla 5.2). Para analizar los resultados obtenidos, debemos tener en cuenta que un sistema con posibles propiedades antibacterianas puede ejercer acción sobre al menos uno de los siguientes puntos clave que afectan la supervivencia del microorganismo: (i) microambiente, (ii) adhesión y (iii) estado metabólico [29]. El primer efecto a analizar fue la influencia de las plataformas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ sobre los medios de cultivo microbianos. De acuerdo con los productos de solubilidad de las fases HA y powellita a 37 °C y 1 bar, $pK_{ps}^{0,HA} = -\log K_{ps}^{0,HA} = 54,86$ y $pK_{ps}^{0,pow} = -\log K_{ps}^{0,pow} = 8,44$ [86], las plataformas nano- HA_{II} y nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ se comportan como sales insolubles en condiciones fisiológicas. Sin embargo, como base estructural de todos los materiales, las nanopartículas de HA están diseñadas para ser biodegradables [30], [37], por lo que pueden liberar una cantidad de iones que pueden afectar las propiedades físicas y químicas del caldo y, en consecuencia, las condiciones óptimas del medio de proliferación de las bacterias. Se analizó la degradación de las plataformas en condiciones fisiológicas durante los primeros 10 días, Fig. 5.22, así como la liberación de iones al medio por parte de las mismas, Tabla 5.4.

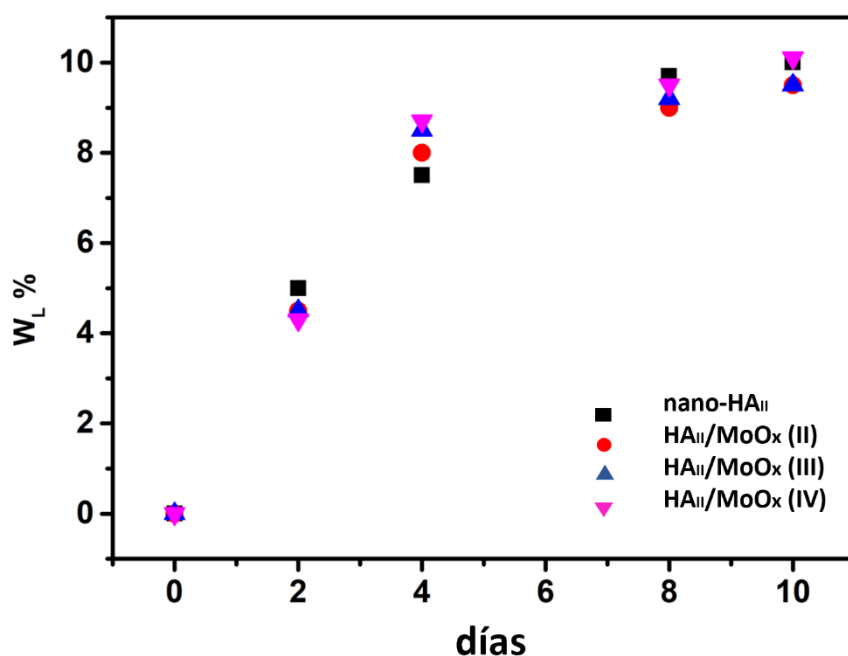


Figura 5.22: Degradación de las plataformas nano- HA_{II} y nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ a pH = 7,4 y 37 °C.

Tabla 5.4: concentración iónica calculada liberada de las muestras después de 10 días de degradación en PBS (pH = 7,4) a 37 °C.

	[Ca ²⁺] / mM	[PO ₄ ³⁻] / mM	[HPO ₄ ²⁻] / mM	[OH ⁻] / mM	[MoO ₄ ²⁻] / mM
<i>nano-HA_{II}</i>	3,82 ± 0,40	2,14 ± 0,22	0,37 ± 0,04	0,47 ± 0,05	0
<i>HA_{II}/MoO_x (II)</i>	3,70 ± 0,61	2,08 ± 0,21	0,35 ± 0,04	0,45 ± 0,05	< 0,001
<i>HA_{II}/MoO_x (III)</i>	3,41 ± 0,50	1,91 ± 0,19	0,33 ± 0,04	0,42 ± 0,05	0,001
<i>HA_{II}/MoO_x (IV)</i>	3,62 ± 0,81	2,03 ± 0,20	0,35 ± 0,04	0,44 ± 0,05	0,001

La liberación de iones [OH⁻] = 0,47 mM, [PO₄³⁻] = 2,14 mM, [HPO₄²⁻] = 0,37 mM y [MoO₄²⁻] < 1 μM, Tabla 5.4, alcalinizó ligeramente el caldo. Después de la incorporación de los materiales, el valor de pH del caldo de cultivo bacteriano aumentó a un valor máximo de 8,1 ± 0,2 en todos los casos, lo cual no termina siendo suficiente como para impedir el desarrollo bacteriano [87]. En cuanto a las concentraciones iónicas, durante las pruebas de biocompatibilidad se confirmó que las mismas estuvieron dentro del rango de no toxicidad [29] y no fueron suficientes para ejercer una acción restrictiva sobre la disponibilidad de agua a los organismos [88]. Por lo tanto, no se puede asociar con los resultados experimentales resumidos en la Fig. 5.21a y b, donde se evidenció un claro efecto antibacteriano.

Debido a la diferencia entre la energía superficial de las bacterias y el caldo en el que están suspendidas, las células se adhieren preferentemente a sustratos de menor energía superficial. El siguiente punto a considerar está relacionado con la interacción microorganismo-superficie del material; aquí la carga superficial juega un papel distintivo. Está bien establecido que el uso de sustancias catiónicas perturba la negatividad de la superficie de la membrana del microorganismo (potencial ζ) mediante una alteración de la señalización mediada por lípidos que, finalmente, conduce a una desestabilización de la membrana seguida de muerte [89]. *S. aureus* y *P. aeruginosa* poseen valores de potencial ζ de aproximadamente -35,6 y -14,4 mV [29] respectivamente; al ser negativamente cargados se puede esperar algún grado de repulsión electrostática entre los microorganismos y las superficies de los materiales, Tabla 5.3. Los resultados obtenidos no evidenciaron una correlación directa entre la carga superficial de las plataformas y la reducción de la proliferación bacteriana. Por lo tanto,

en términos de señales electrostáticas, no habría ningún efecto de las muestras de nano-HA_{II} y nano-HA_{II}/MoO_x contra la progresión de bacterias.

El paso final de nuestro trabajo condujo a conectar las propiedades electrónicas de las plataformas con la reducción bacteriana y, en consecuencia, analizar su capacidad para influir en el mecanismo redox por el cual la cadena de transporte de electrones permite que las células procariotas generen la energía (ATP) que necesitan para su metabolismo y desarrollo. Al examinar la variación de la constante de velocidad heterogénea aparente ($k_{(E)}$) durante el estudio voltamperométrico, se pudo observar que la muestra HA_{II}/MoO_x (II) que exhibió el máximo valor de $k_{(E)}$ también mostró la mayor y más rápida capacidad de reducción bacteriana de para las concentraciones empleadas y contra ambas cepas analizadas. Las muestras correspondientes para nano-HA_{II} y HA_{II}/MoO_x (III y IV) también exhibieron capacidad aceptora de electrones, pero sus constantes cinéticas fueron menos significativas (Fig. 5.19d), por lo que su efecto antibacteriano requirió más tiempo. En esta situación, los microorganismos tendrían tiempo suficiente para recuperar su población, lo que perjudicaría su efectividad antibacteriana y podría explicar la reducción en los R% observados para HA_{II}/MoO_x (III y IV) así como el retardo en la acción de nano-HA_{II} (tenga en cuenta que después de 48 h de tratamiento el R% disminuyó) Fig. 5.21a y b. El incremento de $k_{(E)}$ fue máximo después de la sustitución de MoO₄²⁻ - PO₄³⁻ en la red cristalina de HA y la consiguiente creación de vacantes de -OH. Además, nano-HA_{II} ejerció una actividad antibacteriana similar a la muestra de HA_{II}/MoO_x (II) (aunque más lenta para *S. aureus*, lo cual tendría relación con su $k_{(E)}$) y un efecto ligeramente superior a las muestras de HA_{II}/MoO_x (III y IV), lo que concuerda con la presencia de vacantes de -OH y sus capacidades como aceptor de electrones. Como se demostró en la sección anterior, la sustitución MoO₄²⁻ - PO₄³⁻ en la muestra HA_{II}/MoO_x (II) potenció el efecto de las vacantes -OH, presentando varias emisiones que han sido asociadas en literatura a este tipo de defecto y reduciendo otras, como aquellas relativas a H-intersticiales. Por otro lado, las amalgamas de HA/powellita, muestras HA_{II}/MoO_x (III y IV), si bien demostraron capacidad para aceptar electrones y presencia de algunas emisiones FL asociables a vacantes -OH, creemos que su efecto secuestrador de electrones estaría disminuido dada la presencia de más niveles electrónicos, los cuales fueron responsables de sus principales emisiones (E_i = 2.37 y 2.62 eV). Esto estuvo en armonía con la disminución de sus capacidades antibióticas en comparación con sus contrapartes: nano-HA_{II} y HA_{II}/MoO_x (II).

La transferencia electrónica metabólica de las células procariotas ocurre a través de su membrana citoplasmática; por tanto, la aniquilación del microorganismo puede estar asociada a la perturbación y ruptura de la misma. Si este fuera el caso, debería ocurrir una fuga de constituyentes citoplasmáticos, por ejemplo, la fuga de azúcares reductores [62]. La Fig. 5.21c reveló que las plataformas nano- HA_{II} y nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ aumentaron la fuga de azúcares reductores desde el citoplasma bacteriano al medio de cultivo, mostrando diferencias significativas con respecto al control; con concentraciones halladas para las células tratadas que se correlacionan bien con los valores de R%, Fig. 5.21a y b. El daño a los elementos estructurales externos de la célula bacteriana (pared celular y membrana plasmática) fue confirmada por inspección TEM, Fig. 5.21d-k. En comparación con las células de control, las bacterias tratadas mostraron daños en su superficie externa con pérdida de material interno. El mecanismo de actividad antibacteriana asociado con la transferencia extracelular de electrones, estuvo razonablemente de acuerdo con la información de literatura y con nuestros resultados obtenidos previamente [29], [90]. Podemos suponer que la transferencia electrónica a las plataformas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ no afectó a las células eucariotas analizadas (rOBs) debido a que este proceso metabólico esencial de generación de energía está más preservado, evolucionado y compartimentalizado en las mitocondrias, orgánulo citoplasmático especializado para esta función; por ello, como pudimos verificar, los materiales fueron biocompatibles, Fig. 5.20.

5.4 Conclusión

Aquí hemos mostrado el efecto de la asimilación de molibdeno (Mo) dentro de la red cristalina y en la configuración electrónica de la hidroxiapatita mimética ósea (hidroxiapatita deficiente en calcio no estequiométrica, nano- HA_{II}). La incorporación de Mo en nano- HA_{II} está sujeta a las condiciones de síntesis que influyen directamente en las propiedades finales de los materiales. A través del control de las condiciones de reacción, fue posible obtener nanomateriales biocompatibles que exhibieron simultáneamente actividad antibacteriana y fluorescencia azul y roja a temperatura ambiente. Las plataformas $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ fluorescentes pueden ser prometedoras para la obtención de imágenes biológicas debido a sus buenas propiedades ópticas y su toxicidad sustancialmente reducida. El mejor rendimiento de la integración multifunción se obtuvo

de las muestras HA_{II}/MoO_x (II) y HA_{II}/MoO_x (III). Se determinó que las propiedades optoelectrónicas y antibacterianas tenían su origen en la generación y modulación de los defectos electrónicos dentro del cristal primario de HA; específicamente, se plantea la asociación con vacantes de grupos -OH que actúan como centros aceptores de electrones. Los centros electrónicos se detectaron originalmente en nano-HA_{II}, pero su efecto se intensificó después de la sustitución de MoO₄²⁻ – PO₄³⁻ (HA_{II}/MoO_x (II)) y en menor medida después de la amalgama con la fase powellita (HA_{II}/MoO_x (III)). Nuestros resultados también reafirman la importancia de las propiedades de transferencia electrónica a través de biomateriales que, hasta donde sabemos, son poco consideradas en los diseños de implantes. Se propuso un mecanismo putativo, por el cual la interrupción de la transferencia de electrones metabólicos a lo largo de la membrana citoplasmática procariota después de la interacción con la superficie inorgánica de las plataformas sería la ruta potencial de aniquilación. A partir de aquí, se abren nuevos caminos hacia el desarrollo de plataformas multifuncionales que puedan utilizarse para impulsar estrategias innovadoras de reparación ósea.

5.5 Referencias:

- [1] F. Ye, H. Guo, H. Zhang, and X. He, “Polymeric micelle-templated synthesis of hydroxyapatite hollow nanoparticles for a drug delivery system,” *Acta Biomaterialia*, vol. 6, no. 6, pp. 2212–2218, 2010.
- [2] J. Yu, H. Qiu, S. Yin, H. Wang, and Y. Li, “Polymeric Drug Delivery System Based on Pluronics for Cancer Treatment,” *Molecules*, vol. 26, no. 12, p. 3610, 2021.
- [3] J. Wang, L. S. del Rosario, B. Demirdirek, A. Bae, and K. E. Uhrich, “Comparison of PEG chain length and density on amphiphilic macromolecular nanocarriers: Self-assembled and unimolecular micelles,” *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 3, pp. 883–892, 2009.
- [4] B. Dutta *et al.*, “PEG coated vesicles from mixtures of Pluronic P123 and L- α -phosphatidylcholine: structure, rheology and curcumin encapsulation,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 19, no. 39, pp. 26821–26832, 2017.

- [5] M. Kumbhakar, T. Goel, S. Nath, T. Mukherjee, and H. Pal, "Microenvironment in the corona region of triblock copolymer micelles: temperature dependent solvation and rotational relaxation dynamics of coumarin dyes," *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 110, no. 51, pp. 25646–25655, 2006.
- [6] Y. Su, J. Wang, and H. Liu, "FTIR Spectroscopic Study on Effects of Temperature and Polymer Composition on the Structural Properties of PEO–PPO–PEO Block Copolymer Micelles," *Langmuir*, vol. 18, no. 14, pp. 5370–5374, 2002.
- [7] A. A. Al-Saden, T. L. Whateley, and A. T. Florence, "Poloxamer association in aqueous solution," *J. Colloid Interface Science*, vol. 90, no. 2, pp. 303–309, 1982.
- [8] P. Alexandridis and T. Alan Hatton, "Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 96, no. 1–2, pp. 1–46, 1995.
- [9] H. Vu Dang, A. I. Gray, D. Watson, C. D. Bates, P. Scholes, and G. M. Eccleston, "Composition analysis of two batches of polysorbate 60 using MS and NMR techniques," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 40, no. 5, pp. 1155–1165, 2006.
- [10] R. C. Rowe and P. Sheskey, *Handbook of pharmaceutical excipients*. Pharmaceutical Press, 2003.
- [11] G. Kaur and S. K. Mehta, "Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 529, no. 1–2, pp. 134–160, 2017.
- [12] T. Kijima *et al.*, "Noble-Metal Nanotubes (Pt, Pd, Ag) from Lyotropic Mixed-Surfactant Liquid-Crystal Templates," *Angewandte Chemie*, vol. 116, no. 2, pp. 230–234, 2004.
- [13] G. Sakai *et al.*, "Synthesis of nanogroove-network-structured platinum nanosheets and their carbon-supported forms using a mixed-surfactant templating approach," *Advanced Materials*, vol. 19, no. 2, pp. 237–241, 2007.
- [14] T. Kijima, Y. Nishida, D. Fujikawa, M. Uota, T. Yoshimura, and G. Sakai, "Long-chain alcohol induced phase transition in lyotropic mixed polyoxyethylene-type surfactant liquid-crystals," *Journal of molecular liquids.*, vol. 133, no. 1–3, pp. 54–60, 2007.
- [15] A. G. Denkova, E. Mendes, and M.-O. Coppens, "Non-equilibrium dynamics of block copolymer micelles in solution: recent insights and open questions," *Soft Matter*, vol. 6, no. 11, p. 2351, 2010.

- [16] Y. F. Zhao and J. Ma, "Triblock co-polymer templating synthesis of mesostructured hydroxyapatite," *Microporous and Mesoporous Materials*, vol. 87, no. 2, pp. 110–117, 2005.
- [17] D. Zhao, Q. Huo, J. Feng, B. F. Chmelka, and G. D. Stucky, "Nonionic Triblock and Star Diblock Copolymer and Oligomeric Surfactant Syntheses of Highly Ordered, Hydrothermally Stable, Mesoporous Silica Structures," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 120, no. 24, pp. 6024–6036, 1998.
- [18] S. A. M. Tofail, D. Haverty, K. T. Stanton, and J. B. McMonagle, "Structural Order and Dielectric Behaviour of Hydroxyapatite," *Ferroelectrics*, vol. 319, no. 1, pp. 117–123, 2005.
- [19] K. Matsunaga and A. Kuwabara, "First-principles study of vacancy formation in hydroxyapatite," *Phys. Rev. B*, vol. 75, no. 1, pp. 1–9, 2007.
- [20] S. Nakamura, H. Takeda, and K. Yamashita, "Proton transport polarization and depolarization of hydroxyapatite ceramics," *Journal of Applied Physics*, vol. 89, no. 10, pp. 5386–5392, 2001.
- [21] M. I. Kay, R. A. Young, and A. S. Posner, "Crystal Structure of Hydroxyapatite," *Nature*, vol. 204, no. 4963, pp. 1050–1052, 1964.
- [22] A. v. Bystrova, Yu. D. Dekhtyar, A. I. Popov, J. Coutinho, and V. S. Bystrov, "Modified Hydroxyapatite Structure and Properties: Modeling and Synchrotron Data Analysis of Modified Hydroxyapatite Structure," *Ferroelectrics*, vol. 475, no. 1, pp. 135–147, 2015.
- [23] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials Science*, Fourth Edition. UK: Academic Press: Oxford, 2013.
- [24] B. Leon and J. A. Janson, *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*, 1st ed. New York, NY: Springer New York, 2009.
- [25] V. Bystrov, E. Paramonova, L. Avakyan, J. Coutinho, and N. Bulina, "Simulation and Computer Study of Structures and Physical Properties of Hydroxyapatite with Various Defects," *Nanomaterials*, vol. 11, no. 10, p. 2752, 2021.
- [26] D. Aronov *et al.*, "Electronic states spectroscopy of Hydroxyapatite ceramics," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 18, no. 5, pp. 865–870, 2007.
- [27] C. Rey and C. Combes, "Physical chemistry of biological apatites," in *Biomineralization and Biomaterials*, Elsevier, pp. 95–127, 2016.
- [28] G. Cho, Y. Wu, and J. L. Ackerman, "Detection of Hydroxyl Ions in Bone Mineral by Solid-State NMR Spectroscopy," *Science (1979)*, vol. 300, no. 5622, pp. 1123–1127, 2003.
- [29] N. C. Andrés, J. M. Sieben, M. Baldini, C. H. Rodríguez, Á. Famiglietti, and P. V. Messina, "Electroactive Mg²⁺-Hydroxyapatite Nanostructured

- Networks against Drug-Resistant Bone Infection Strains,” *ACS applied materials & interfaces*, vol. 10, no. 23, pp. 19534–19544, 2018.
- [30] N. C. Andrés, N. L. D’Elía, J. M. Ruso, A. E. Campelo, V. L. Massheimer, and P. v. Messina, “Manipulation of Mg^{2+} - Ca^{2+} Switch on the Development of Bone Mimetic Hydroxyapatite,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 9, no. 18, pp. 15698–15710, 2017.
- [31] C. Rey, “Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties.,” *Biomaterials*, vol. 11, pp. 13–5, 1990.
- [32] D. E. Ellis *et al.*, “A theoretical and experimental study of lead substitution in calcium hydroxyapatite,” *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 8, no. 8, pp. 967–976, 2006.
- [33] R. R. Mendel and F. Bittner, “Cell biology of molybdenum,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1763, no. 7, pp. 621–635, 2006.
- [34] I. A. de Castro *et al.*, “Molybdenum Oxides – from fundamentals to functionality,” *Advanced Materials*, vol. 29, no. 40, pp. 1-31, 2017.
- [35] A. M. Ribeiro, T. H. S. Flores-Sahagun, and R. C. Paredes, “A perspective on molybdenum biocompatibility and antimicrobial activity for applications in implants,” *Journal of materials science*, vol. 51, no. 6, pp. 2806–2816, 2016.
- [36] K. Krishnamoorthy, M. Veerapandian, K. Yun, and S. J. Kim, “New function of molybdenum trioxide nanoplates: Toxicity towards pathogenic bacteria through membrane stress,” *Colloids Surface B Biointerfaces*, vol. 112, pp. 521–524, 2013.
- [37] N. L. D’Elía, C. Mathieu, C. D. Hoemann, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. v. Messina, “Bone-repair properties of biodegradable hydroxyapatite nano-rod superstructures,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 44, pp. 18751–18762, 2015.
- [38] J. R. A. Sietsma, A. Jos van Dillen, P. E. de Jongh, and K. P. de Jong, “Application of ordered mesoporous materials as model supports to study catalyst preparation by impregnation and drying,” vol. 162, pp. 95–102, 2006.
- [39] C. A. Schneider, W. S. Rasband, and K. W. Eliceiri, “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis,” *Nature Methods*, vol. 9, no. 7, pp. 671–675, 2012.
- [40] T. Armbruster and R. M. Danisi, Eds., *Highlights in Mineralogical Crystallography*. De Gruyter, 2015.
- [41] B. Hunter, “Rietica - a visual Rietveld program.” Australia, 2000.
- [42] R. J. D. Tilley, *Crystals and Crystal Structures*. John Wiley & Sons, 2006.

- [43] S. K. Padmanabhan, A. Balakrishnan, M.-C. Chu, Y. J. Lee, T. N. Kim, and S.-J. Cho, "Sol-gel synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods," *Particuology*, vol. 7, no. 6, pp. 466–470, 2009.
- [44] E. Bouyer, F. Gitzhofer, and M. I. Boulos, "Morphological study of hydroxyapatite nanocrystal suspension," *Journal of Materials Science Mater Med*, vol. 11, no. 8, pp. 523–531, 2000.
- [45] I. Cacciotti, A. Bianco, M. Lombardi, and L. Montanaro, "Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour," *J. Eur. Ceram. Soc.*, vol. 29, no. 14, pp. 2969–2978, 2009.
- [46] H. Putz, J. C. Schön, and M. Jansen, "Combined method for ab initio structure solution from powder diffraction data," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 32, no. 5, pp. 864–870, 1999.
- [47] N. L. D'Elía, "Materiales nanoestructurados en base a fosfatos de calcio: hacia la regeneración de tejido óseo," Universidad Nacional del Sur (Argentina), 2016. Ed. UNS.
- [48] S. E. Bohndiek *et al.*, "Hyperpolarized [1- ¹³C]-Ascorbic and Dehydroascorbic Acid: Vitamin C as a Probe for Imaging Redox Status in Vivo," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, no. 30, pp. 11795–11801, 2011.
- [49] J. Hrbac, V. Halouzka, L. Trnkova, and J. Vacek, "eL-Chem Viewer: A Freeware Package for the Analysis of Electroanalytical Data and Their Post-Acquisition Processing," *Sensors*, vol. 14, no. 8, pp. 13943–13954, 2014.
- [50] M. R. Deakin, P. M. Kovach, K. J. Stutts, and R. Mark. Wightman, "Heterogeneous mechanisms of the oxidation of catechols and ascorbic acid at carbon electrodes," *Anal. Chem.*, vol. 58, no. 7, pp. 1474–1480, 1986.
- [51] C. G. Zosky, *Handbook of electrochemistry*. Elsevier, 2006.
- [52] A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods*, 2nd ed. John. Wiley & Sons Ltd, 2001.
- [53] I. Feng. Hu and Theodore. Kuwana, "Oxidative mechanism of ascorbic acid at glassy carbon electrodes," *Analytical Chemistry*, vol. 58, no. 14, pp. 3235–3239, 1986.
- [54] J. Tauc and A. Menth, "States in the gap," *J Non Cryst Solids*, vol. 8–10, pp. 569–585, 1972.
- [55] J. M. Ruso *et al.*, "Photoluminescent SBA-16 Rhombic Dodecahedral Particles: Assembly, Characterization, and ab Initio Modeling," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 7, no. 23, pp. 12740–12750, 2015.
- [56] N. Serpone, D. Lawless, and R. Khairutdinov, "Size Effects on the Photophysical Properties of Colloidal Anatase TiO₂ Particles: Size Quantization versus Direct Transitions in This Indirect Semiconductor?," *J. Phys. Chem.*, vol. 99, no. 45, pp. 16646–16654, 1995.

- [57] B. He, S. Huang, J. Jing, and Y. Hao, "Measurement of hydroxyapatite density and Knoop hardness in sound human enamel and a correlational analysis between them," *Arch Oral Biol*, vol. 55, no. 2, pp. 134–141, 2010.
- [58] G. Repetto, A. del Peso, and J. L. Zurita, "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity," *Nature Protocols*, vol. 3, no. 7, pp. 1125–1131, 2008.
- [59] N. B. Shah *et al.*, "Pseudomonas Prosthetic Joint Infections: A Review of 102 Episodes," *Journal of Bone and Joint Infection*, vol. 1, no. 1, pp. 25–30, 2016.
- [60] M. E. A. de Kraker, P. G. Davey, and H. Grundmann, "Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant Staphylococcus aureus and Escherichia coli Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe," *PLoS Med*, vol. 8, no. 10, p. e1001104, 2011.
- [61] A. A. Miles, S. S. Misra, and J. O. Irwin, "The estimation of the bactericidal power of the blood," *Epidemiol. Infect.*, vol. 38, no. 6, pp. 732–749, 1938.
- [62] A. M. Mattson and C. O. Jensen, "Colorimetric Determination of Reducing Sugars with Triphenyltetrazolium Chloride.," *Anal. Chem.*, vol. 22, no. 1, pp. 182–185, 1950.
- [63] A. Tampieri *et al.*, "Magnetic Bioinspired Hybrid Nanostructured Collagen–Hydroxyapatite Scaffolds Supporting Cell Proliferation and Tuning Regenerative Process," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 6, no. 18, pp. 15697–15707, 2014.
- [64] N. Gravina *et al.*, "Effect of ceria on the organization and bio-ability of anatase fullerene-like crystals," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 11, pp. 8077–8087, 2015.
- [65] J. M. Ruso *et al.*, "Photoluminescent SBA-16 Rhombic Dodecahedral Particles: Assembly, Characterization, and ab Initio Modeling," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 7, no. 23, pp. 12740–12750, 2015.
- [66] D. Placente *et al.*, "Self-fluorescent antibiotic MoOx-hydroxyapatite: A nano-theranostic platform for bone infection therapies," *Nanoscale*, vol. 11, no. 37, pp. 17277–17292, 2019.
- [67] C. Meneghini, M. C. Dalconi, S. Nuzzo, S. Mobilio, and R. H. Wenk, "Rietveld Refinement on X-Ray Diffraction Patterns of Bioapatite in Human Fetal Bones," *Biophys. J.*, vol. 84, no. 3, pp. 2021–2029, 2003.
- [68] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Database; CID = 24621, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/molybdate>.
- [69] National Center for Biotechnology Information, PubChem Compound Database; CID = 1061, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1061>.

- [70] J. V. Crum, J. J. Neeway, B. J. Riley, Z. Zhu, M. J. Olszta, and M. Tang, "Dilute condition corrosion behavior of glass-ceramic waste form," *Journal of Nuclear Materials*, vol. 482, pp. 1–11, 2016.
- [71] H. Wan *et al.*, "The Interaction between Ca²⁺ and Molybdenite Edges and Its Effect on Molybdenum Flotation," *Minerals*, vol. 7, no. 8, pp. 141–151, 2017.
- [72] S. V. Dorozhkin, "Dissolution mechanism of calcium apatites in acids: A review of literature," *World J Methodol*, vol. 2, no. 1, pp. 1-17, 2012.
- [73] N. L. D'Elía, A. N. Gravina, J. M. Ruso, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. V. Messina, "Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic," *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1830, no. 11, pp. 5014–5026, 2013.
- [74] J. Javidi, M. Esmailpour, Z. Rahiminezhad, and F. N. Dodeji, "Synthesis and Characterization of H₃PW₁₂O₄₀ and H₃PMo₁₂O₄₀ Nanoparticles by a Simple Method," *Journal of Cluster Science*, vol. 25, no. 6, pp. 1511–1524, 2014.
- [75] M. Corno, C. Busco, B. Civalleri, and P. Ugliengo, "Periodic ab initio study of structural and vibrational features of hexagonal hydroxyapatite Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 8, no. 21, pp. 2464–2472, 2006.
- [76] L. A. Avakyan, E. v. Paramonova, J. Coutinho, S. Öberg, V. S. Bystrov, and L. A. Bugaev, "Optoelectronics and defect levels in hydroxyapatite by first-principles," *The Journal of chemical physics*, vol. 148, no. 15, pp. 1–13, 2018.
- [77] J.-W. Yoon, C.-J. Choi, and D. Kim, "Laser-Induced Synthesis of CaMoO₄ nano-colloidal Suspension and Its Optical Properties," *Mater. Trans.*, vol. 52, no. 4, pp. 768–771, 2011.
- [78] H. Fujimori, H. Toya, K. Ioku, S. Goto, and M. Yoshimura, "In situ observation of defects in hydroxyapatite up to 1200°C by ultraviolet Raman spectroscopy," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 325, no. 4, pp. 383–388, 2000.
- [79] J. C. Trombe and G. Montel, "Some features of the incorporation of oxygen in different oxidation states in the apatitic lattice," *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, vol. 40, no. 1, pp. 15–21, 1978.
- [80] Z. Gryczynski *et al.*, "Metal-enhanced fluorescence: a novel approach to ultra-sensitive fluorescence sensing assay platforms," *Biomedical Vibrational Spectroscopy and Biohazard Detection Technologies*, vol. 5321, pp. 275-282, 2004.
- [81] V. B. Mikhailik, H. Kraus, D. Wahl, and M. S. Mykhaylyk, "Studies of electronic excitations in MgMoO₄, CaMoO₄ and CdMoO₄ crystals using

- VUV synchrotron radiation,” *physica status solidi (b)*, vol. 242, no. 2, pp. 17–19, 2005.
- [82] D. Placente, L. A. Benedini, M. Baldini, J. A. Laiuppa, G. E. Santillán, and P. V. Messina, “Multi-drug delivery system based on lipid membrane mimetic coated nano-hydroxyapatite formulations,” *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 548, no. 1, pp. 559–570, 2018.
- [83] Y. Hatori, S. Inouye, R. Akagi, and T. Seyama, “Local redox environment beneath biological membranes probed by palmitoylated-roGFP,” *Redox Biology*, vol. 14, pp. 679–685, 2018.
- [84] J. Sartuqui, C. Gardin, L. Ferroni, B. Zavan, and P. V. Messina, “Nanostructured hydroxyapatite networks: Synergy of physical and chemical cues to induce an osteogenic fate in an additive-free medium,” *Materials Today Communications*, vol. 16, pp. 152–163, 2018.
- [85] P. Jayakumar and L. di Silvio, “Osteoblasts in bone tissue engineering,” *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol. 224, no. 12, pp. 1415–1440, 2010.
- [86] T. P. Dadze, G. A. Kashirtseva, M. P. Novikov, and A. v. Plyasunov, “Solubility of calcium molybdate in aqueous solutions at 573 K and thermodynamics of monomer hydrolysis of Mo(VI) at elevated temperatures,” *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*, vol. 149, no. 2, pp. 261–282, 2018.
- [87] L. R. Bennison, C. N. Miller, R. J. Summers, A. Minnis, G. Sussman, and W. McGuinness, “The pH of wounds during healing and infection: a descriptive literature review,” *Wound Practice & Research: Journal of the Australian Wound Management Association*, vol. 25, no. 2, pp. 1–7, 2017.
- [88] W. M. Sattley and M. T. Madigan, “Microbiology,” in *eLS*, John Wiley and Sons, pp. 1–10, 2015.
- [89] S. Halder *et al.*, “Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: a study with cationic agents,” *Springerplus*, vol. 4, no. 1, pp. 672–684, 2015.
- [90] G. Wang *et al.*, “Extracellular Electron Transfer from Aerobic Bacteria to Au-Loaded TiO₂ Semiconductor without Light: A New Bacteria-Killing Mechanism Other than Localized Surface Plasmon Resonance or Microbial Fuel Cells,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 8, no. 37, pp. 24509–24516, 2016.

Capítulo 6

Conclusiones generales y perspectivas a futuro

A lo largo de este trabajo de tesis se ha pretendido añadir a las capacidades de la hidroxiapatita nanoestructurada como regenerador óseo, propiedades de relevancia para la profilaxis y/o tratamiento de afecciones ligadas al tejido óseo. Para ello, se han abordado diferentes estrategias como el desarrollo de plataformas y/o formulaciones portadoras de fármacos (plataformas HA_I/CIP, HA_I/L-ARG/IBU y la formulación multifármaco LMm/nano-HA_I), así como el estudio de mecanismos alternativos para impedir la colonización de superficies de implantes por parte de microorganismos patógenos sin la incorporación de principios activos (plataformas HA_{II}/MoO_x), con la integración simultánea de propiedades fotoluminiscentes a nano-HA.

6.1. Sistemas portadores de fármacos: plataformas HA_I/CIP, HA_I/L-ARG/IBU y formulación multifármaco LMm/nano-HA_I

Para conferirle a las nanopartículas de hidroxiapatita la capacidad de actuar como sistemas portadores de fármacos, se recurrió a dos estrategias distintas. Ambas estrategias abordadas tomaron como punto de partida nanopartículas de hidroxiapatita que han sido producto de investigaciones anteriores realizadas en nuestro grupo de investigación (nano-HA_I), cuya caracterización ha demostrado sus aptitudes como regenerador óseo: bioactividad, biocompatibilidad, propiedades osteoconductoras y biodegradabilidad.

Se comenzó por la adsorción de los fármacos ciprofloxacina e ibuprofeno en la superficie de nano-HA_I, lo cual dio origen a las plataformas HA_I/CIP y HA_I/L-ARG/IBU.

Esta estrategia representó un buen primer paso para entender cómo interactúan ambos fármacos con nano- HA_I . Posteriormente, se evaluó una nueva estrategia para el desarrollo de un sistema que permita la carga y liberación múltiple de fármacos. Se desarrolló, así, una formulación multifármaco biocompatible basado en nano-hidroxiapatita con un recubrimiento lipídico mimético de membrana: LMm/nano- HA_I (0,05 mg LS75·mg HA^- ¹). Para ello, se hizo uso de lecitina de soja como portador de los fármacos, vehículo con una composición lipídica apropiada para recrear estructuras miméticas de membrana y con capacidad para favorecer la regeneración de heridas.

Tanto las plataformas, como la formulación multifármaco, demostraron ser estrategias válidas y con potencial para su aplicabilidad como biomateriales para el recubrimiento de superficies implantables y/o relleno de pequeños defectos óseos; proveyendo los fármacos IBU y CIP dentro de los rangos de concentración terapéuticos, con una cinética controlada dependiente del pH y en los tiempos adecuados en relación al proceso normal de curación de heridas. Las cinéticas de liberación de los fármacos demostraron aptitudes de los distintos tipos de sistemas portadores para propiciar una descarga inicial rápida de fármacos seguida de una liberación sostenida de los mismos. El mayor contraste observado se presentó con respecto a la liberación de IBU a pH fisiológico, donde la formulación multifármaco produce una liberación rápida del 60% del fármaco en la primera hora, con una descarga total a las 4 h de ensayo; mientras que la plataforma $\text{HA}_I/\text{L-ARG}/\text{IBU}$ se comportó mejor como reservorio de la droga (liberación del 11% en 1 h; liberación máxima acumulada del 36%), permitiendo una descarga prolongada del principio activo. Las cantidades de fármaco presentes por miligramo de HA_I (DL_{HA}) fueron adecuadas para ambos sistemas portadores, con valores superiores para las plataformas HA_I/CIP y $\text{HA}_I/\text{L-ARG}/\text{IBU}$. Sin embargo, el vehículo lipídico empleado en la formulación LMm/nano- HA_I nos permitió aumentar considerablemente la eficiencia de encapsulación (EE%) de IBU y CIP, reuniendo ambos fármacos en un único sistema y evitando la necesidad de utilizar L-ARG como agente enlazante para IBU. Estas ventajas mencionadas cobran relevancia a la hora de pensar en una producción a mayor escala de estas formulaciones. En la siguiente tabla se presentan valores que acompañan estas observaciones relativas a ambos sistemas portadores.

Tabla 6.1: valores comparativos de parámetros obtenidos para los sistemas portadores de fármaco desarrollados.

	<i>Plataformas</i>		<i>LMm/nano-HA_I</i>	
	<i>HA_I/CIP</i>	<i>HA_I/L-ARG/IBU</i>	<i>CIP</i>	<i>IBU</i>
<i>EE % individual</i>	16,1	7,2	45,1	57,3
<i>EE % simultánea</i>	-	-	34,3	26,2
<i>DL_{HA} indiv. /ug mg⁻¹_{HA}</i>	2,3	24,7	2,2	2,8
<i>DL_{HA} simult. /ug mg⁻¹_{HA}</i>	-	-	1,7	1,3
<i>DR% (pH 7,4)</i>	82,1	36,3	61,2	97,6
<i>DR% (pH 6,2)</i>	26,3	99,6	31,9	101,9
<i>DR% (pH 4,2)</i>	58,2	1,1	52,8	10,0

EE% representa la eficiencia de encapsulación de los fármacos; DL_{HA}, la capacidad de carga de los fármacos relativa a HA_I; DR%, el porcentaje máximo de liberación acumulada alcanzado por ambos sistemas portadores.

*Los valores de EE% y DL_{HA}, se presentaron todos relativos al mismo pH (7,4) para fines comparativos. La plataforma HA_I/CIP tuvo mucho mejor rendimiento a pH 6 (EE%=49,7 ± 5,4); y DL_{HA}= 7,3 ± 0,8).

Por otra parte, si bien el hecho de trabajar con formulaciones con contenido lipídico conlleva un desafío en términos de estabilidad y esterilidad, LMm/nano-HA_I demostró estabilidad de almacenamiento en un marco temporal apropiado y beneficiarse de la interacción lípido – nanoHA_I, la cual estabilizó la formulación frente a la peroxidación y/o degradación hidrolítica confiriéndole resistencia a la esterilización por radiación ultravioleta. Asimismo, la biocompatibilidad, requisito imprescindible para un biomaterial implantable, fue evaluada a partir de ensayos de viabilidad celular *in vitro*, frente a un cultivo primario de osteoblastos de calvaria de rata (rOBs) luego de 48 h de tratamiento. Los rOBs en presencia de LMm/nano-HA_I se adhirieron por completo y su actividad lisosomal (indicador de viabilidad) en presencia de la formulación, tanto cargada como desprovista de fármaco, no tuvo diferencias significativas con respecto al control.

Además, la formulación multifármaco, si bien constituye un buen prototipo inicial, abre la puerta a pensar en nuevas alternativas que podrían ser interesantes pensando en su aplicabilidad. Entre ellas, la posibilidad de ampliar su espectro de utilidad y acción al incorporar, por ejemplo, un antifúngico o un antibiótico adicional específico

para el control de microorganismos anaerobios. Si bien estos últimos no constituyen los agentes causantes mayoritarios, se han identificado casos donde estos microorganismos han generado complicaciones en superficies de implantes óseos y cubrir este espectro podría hacer más robusta la formulación. O bien, construir a partir de la formulación LMm/nano-HA_I sistemas dirigidos a otras patologías para las cuales la administración localizada de principios activos represente un gran valor, por ejemplo, incorporando agentes quimioterápicos para tratamiento de osteosarcoma.

Adicionalmente, la posibilidad de potenciar la estabilidad de la formulación mediante la incorporación de un antioxidante en la bicapa lipídica, así como modificar la composición de lípidos utilizados a fin de obtener perfiles de liberación adaptados, establece a la formulación como prototipo versátil y manipulable para su optimización.

6.2. Plataformas con actividad antibacteriana sin la incorporación de principios activos: plataformas nano-HA_{II}/MoO_x

En el último trabajo presentado hemos abordado un nuevo enfoque alineado con la búsqueda de reunir múltiples funciones en un mismo sistema. En esa dirección, hemos desarrollado un nuevo diseño de plataformas generando cambios químicos y físicos en nano-HA_{II} utilizando óxidos de molibdeno (MoO_x). Así, hemos confirmado que las propiedades de fluorescencia autoactivadas pueden inducirse fusionando MoO_x con cristales de HA, ofreciendo un valor agregado adicional a las habilidades de las nanopartículas como regeneradores óseos. En comparación con otras técnicas, las imágenes de fluorescencia son ventajosas por su alta sensibilidad, mínima invasividad y seguridad, constituyendo uno de los métodos preferidos para observar eventos biológicos; con lo cual creemos que representa una propiedad de interés para desafíos futuros con estas plataformas. Demostramos que la inserción de molibdeno, un oligoelemento esencial, en la red de hidroxiapatita genera defectos electrónicos puntuales que exacerban su emisión azul de epifluorescencia y provocan nuevas emisiones en el espectro del rojo, lo que las hace prometedoras para la obtención de imágenes biológicas y el seguimiento de ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Los defectos puntuales inducidos en nano-HA_{II} a través del control de las condiciones de síntesis, actúan como aceptores de electrones, propiciándole propiedades redox al material que explicarían la actividad antibacteriana de las plataformas al originar

altos porcentajes de reducción de cepas bacterianas fármaco - resistentes responsables de infecciones óseas de relevancia clínica: *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Se propuso un mecanismo putativo por el cual la interrupción de la transferencia de electrones metabólicos a lo largo de la membrana citoplasmática procariota después de la interacción con la superficie inorgánica de los sistemas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$, sería la ruta potencial de acción para el efecto bacteriostático observado.

Creemos que esto constituye un aporte a la búsqueda de estrategias innovadoras para el diseño de biomateriales implantables al poner el foco en la importancia del control de las propiedades de transferencia electrónica que pueden tener lugar a través de los mismos, con el fin de explotar sus potencialidades o de potenciar sus funcionalidades. La inducción de las propiedades mencionadas no afectó la biocompatibilidad de nano-HA, la cual fue verificada por la interacción de las plataformas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$ con cultivos primarios de osteoblastos de calota de rata.

6.3. Perspectivas a futuro

Cabe destacar que los estudios presentados en este trabajo de tesis, si bien han permitido arribar con éxito a formulaciones y/o plataformas con potencial aplicabilidad en lo que respecta a afecciones del tejido óseo y con componentes acordes a las demandas actuales de regiones en desarrollo en términos de costo, los mismos constituyen muy buenos puntos de partida para continuar su estudio, optimizando sus propiedades y potenciando su aplicabilidad.

En cuanto a perspectivas a futuro de todos los sistemas desarrollados, pero en especial, de la formulación multifármaco (LMm/nano- HA_{I}) y las plataformas nano- $\text{HA}_{\text{II}}/\text{MoO}_x$, proponemos como primer paso profundizar en el estudio de la respuesta celular *in vitro* en presencia de los mismos. Esto se podría abordar añadiendo a los ensayos de viabilidad realizados, ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación de cultivos de células madre, analizando la inducción a nivel transcripcional y la expresión de proteínas (Runx2, fosfatasa alcalina, colágeno tipo I) que permitan verificar la capacidad de los sistemas para inducir la diferenciación hacia linajes osteogénicos.

Como paso siguiente, estudiar la respuesta de los sistemas desarrollados en un entorno biológico real mediante experimentación animal, donde poder analizar la

capacidad tanto de regeneración ósea *in vivo* como su efectividad para contrarrestar infecciones inducidas, con análisis histológico de los tejidos implicados y cuantificación de los niveles de fármacos alcanzados localmente en hueso (esto último para los sistemas portadores de fármacos). Además, y en relación a la efectividad de los sistemas para impedir el desarrollo bacteriano, queda camino por recorrer en términos de investigación para profundizar en el estudio del mecanismo de acción que estaría proveyendo a las plataformas nano-HA_{II}/MoO_x su efecto bacteriostático. En ese sentido, se propone el estudio del comportamiento redox de los materiales en ensayos electroquímicos en presencia de biofilms bacterianos desarrollados sobre la superficie de electrodos con los materiales (plataformas HA_{II}/MoO_x) adsorbidos a su superficie, a fin de poder tener un conocimiento más profundo de cómo estos afectan el proceso de transferencia de electrones.

Por último y en virtud de las aptitudes mostradas por los sistemas propuestos, se plantea una nueva línea de trabajo futura a partir de la incorporación de los sistemas desarrollados en materiales con propiedades mecánicas específicas que permitan su utilización para relleno de grandes defectos óseos y/o para la construcción de estructuras que puedan sustituir a una prótesis metálica. Como se ha mencionado en varias oportunidades a lo largo de este trabajo, la hidroxiapatita sintética constituye una muy buena opción para la construcción de sistemas pensados para relleno de pequeños defectos óseos, aumento de volumen y recubrimiento de implantes metálicos; sin embargo, su baja resistencia mecánica restringe su uso a aplicaciones de baja carga. Creemos que la inclusión de la formulación multifármaco (LMm/nano-HA_I) o las plataformas nano-HA_{II}/MoO_x en cementos óseos autoajustables, puede representar una estrategia prometedora para conferirle una resistencia adecuada para resistir al estrés mecánico y físico al cual se ve sometido funcionalmente el hueso.

Capítulo 7

Producción Científica

El contenido de este trabajo forma parte de las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos y/o reuniones científicas.

Publicaciones

- 2020 *Tomorrow's Healthcare by Nano-sized approaches: a bold future for medicine.* Messina Paula V, Benedini Luciano, Placente Damián. Taylor and Francis Group, CRC Press; 2020; ISBN 9780367023010; 286 páginas.
- 2019 *Self-fluorescent Antibiotic MoO_x-Hydroxyapatite: A Nano-theranostic Platform for Bone Infection Therapies.* D. Placente, J. M. Ruso, M. Baldini, J. A. Laiuppa, J. M. Sieben, G. E. Santillán, P. V. Messina. *Nanoscale*. 2019, 11, 17277-17292. Royal Society of Chemistry. DOI: 10.1039/c9nr01236b.
- 2019 *Adsorption/desorption study of antibiotic and anti-inflammatory drugs onto bioactive hydroxyapatite nano-rods.* L. Benedini, D. Placente, J. Ruso, P. Messina. *Materials Science & Engineering C*. 2019, 99, 180–190. Elsevier. DOI: 10.1016 /j.msec.2019.01.098.
- 2018 *Multi-drug delivery system based on lipid membrane mimetic coated nanohydroxyapatite formulations.* D. Placente, L. Benedini, M. Baldini,

J. Laiuppa, G. Santillan, P. Messina. International Journal of Pharmaceutics. 2018, 548, 559–570. Elsevier. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.07.036.

2017 *Assessment of synergistic interactions on self-assembled sodium alginate/nano-hydroxyapatite composites: to the conception of new bone tissue dressings.* L. Benedini, D. Placente, O. Pieroni, P. Messina. Colloid and Polymer Science. 2017, 295:11, 2109 – 2121. Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/s00396-017-4190-x.

Presentaciones en congresos y/o reuniones científicas

2018 *Sistemas de Liberación Múltiple de Antibióticos con Acción Selectiva al Tejido Óseo;* D. Placente, L.A. Benedini, P.V. Messina; COMAT 2018, VII International Conference on Composite Materials; Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina; 25 – 27 de Abril de 2018.

2018 *Evaluación de liberación de ciprofloxacina y de la bioactividad de materiales compuestos en base a hidroxiapatita y alginato de sodio;* L.A. Benedini, A. Mazzarini, D. Placente, O. Pieroni, P.V. Messina; BIOPOLI 2018, III Workshop on Bio-degradable Polymers and Biocomposites; Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina; 23 – 25 de Abril de 2018.

2017 *Materiales Nano-Estructurados con aplicación al tratamiento de afecciones de tejidos calcificados;* D. Placente, L.A. Benedini, N.L. D'Elía, N.C. Andrés, J. Sartuqui, P.V. Messina; Workshop Iberoamericano sobre Biomateriales para Aplicaciones Médicas; CCT (CONICET), Ciudad de La Plata, Buenos Aires, Argentina; 1 y 2 de Noviembre de 2017.

- 2016 *Ciprofloxacin-hydroxyapatite nanoparticles with potential application into bone diseases*; L. Benedini, D. Placente, R. Rial, J. Ruso, P. Messina; RICiFa 2016, 4° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas; Centro Cultural Roberto Fontanarrosa, Ciudad de Rosario, Santa Fe, Argentina; 27 y 28 de Octubre de 2016.
- 2015 *Alginate Hydroxyapatite Films with Potential Use in Bone Disease*; L. Benedini, D. Placente, O. Pieroni, P. Messina; BioPoli 2015, II Workshop on Bio-degradable Polymers and Biocomposites, III Workshop BIOPURFIL, Bio-based Polyurethane Composites with Natural Fillers; Facultad de Ciencias Económicas de la UBA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; 11 – 13 de Noviembre de 2015.