



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

SÍNTESIS DE NUEVOS MATERIALES PARA EL TRANSPORTE Y LA
LIBERACIÓN PROLONGADA DE FÁRMACOS

NICOLAS A. LOPEZ

DIRECTOR: Dr. MARCELO J. AVENA
CODIRECTORA: Dra. CARINA V. LUENGO

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2023

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 01/04/2017 y el 31/03/2023, bajo la dirección del Dr. Marcelo Avena y la codirección de la Dra. Carina Luengo.

Farm. Nicolas A. Lopez



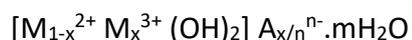
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

RESUMEN

Para que un fármaco ejerza un efecto clínico, debe actuar dentro de un margen terapéutico. Existen muchos fármacos que, por sus características químicas, poseen propiedades biofarmacéuticas inadecuadas, como baja solubilidad y permeabilidad. Para mejorar estas características y controlar que se mantengan dentro de los límites terapéuticos pueden utilizarse nanotransportadores.

Los hidróxidos dobles laminares (HDL) son materiales prometedores para este tipo de aplicaciones. Su estructura deriva de la sustitución isomórfica de la brucita ($Mg(OH)_2$), donde cierta cantidad de Mg es reemplazado por un metal trivalente, generando una carga estructural positiva en la lámina del HDL. Para mantener la neutralidad, estas cargas positivas son neutralizadas con aniones que se ubican entre las láminas de la estructura. Los HDL son representados por la siguiente fórmula:



donde M^{2+} y M^{3+} son los iones divalentes y trivalentes respectivamente y A^{n-} es el anión interlamina. Éste, puede ser un fármaco, el cual es intercalado en la estructura del HDL para neutralizar las cargas. Los HDL pueden sintetizarse por diferentes métodos: coprecipitación, reconstrucción e intercambio iónico.

En este trabajo de tesis se sintetizaron complejos de diferentes fármacos como vancomicina, ciprofloxacina y valproato de sodio con un HDL a través de diferentes métodos.

Las muestras sintetizadas fueron caracterizadas por diferentes técnicas para tener un abordaje integral, como difracción de rayos X, espectroscopia IR, microscopia electrónica de barrido y de transmisión, movilidad electroforética, entre otras. Los análisis demostraron la formación de la estructura del HDL en todos los casos, pero con algunas consideraciones en cuanto a la disposición de cada fármaco en esa estructura: la vancomicina y parte de la ciprofloxacina quedaron adsorbidas en la superficie externa y la parte restante de ciprofloxacina y el valproato de sodio lograron intercalarse dentro del HDL, ocupando las superficies internas de las partículas.

Para la vancomicina se observan diferentes comportamientos cinéticos según el método de síntesis, donde la liberación del principio activo en la muestra obtenida por coprecipitación ocurre principalmente como consecuencia de la disolución de la estructura del HDL, fenómeno que no se observa en la muestra obtenida por reconstrucción. Para la muestra con ciprofloxacina se observa que a pH ácidos la liberación del fármaco se da por la disolución del HDL mientras que a valores de pH neutros-básicos depende del intercambio iónico o desorción de la droga del HDL. Y para el caso del sólido con valproato, la liberación del mismo depende exclusivamente del intercambio que se produce con los aniones presentes en la solución. Debido a la sensibilidad de los HDL en medios ácidos sería necesario algún tipo de recubrimiento entérico que los proteja de esa degradación.

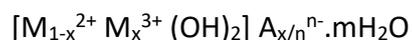
Es importante destacar algunas consideraciones respecto a las características fisicoquímicas que deben poseer los fármacos a la hora de seleccionarlos para su estudio con un HDL:

- Deben ionizarse negativamente a los valores de pH de síntesis;
- Deben ser estables y evitar su degradación en las condiciones de síntesis;
- Mientras mayor sea la relación carga/tamaño de la molécula se lograrán mejores resultados con respecto al intercalado del fármaco.

ABSTRACT

Drugs must act within a therapeutic framework in order to exert a clinical effect. Many drugs possess inadequate biopharmaceutical properties, such as low solubility and permeability, due to their chemical characteristics. Nanocarriers can be employed to improve these characteristics and ensure that the drugs remain within therapeutic limits.

Layered double hydroxides (LDHs) are promising materials for such applications. Their structure derives from the isomorphic substitution of brucite ($\text{Mg}(\text{OH})_2$), where a certain amount of $\text{Mg}(\text{II})$ is replaced by a trivalent metal, generating a positive structural charge in the LDH layer. To maintain neutrality, these positive charges are neutralized with anions located between the layers of the structure. LDHs can be represented by the following formula:



where M^{2+} and M^{3+} are divalent and trivalent ions respectively and A^{n-} is the interlayer anion. The interlayer anion can be a drug, which is intercalated into the LDH structure to neutralize the positive charges. LDHs can be synthesized through different methods: coprecipitation, reconstruction, and ion exchange.

In this thesis, complexes of different drugs such as vancomycin, ciprofloxacin, and sodium valproate were synthesized with an LDH using various methods. All synthesized samples were characterized using different techniques to obtain a comprehensive approach, including X-ray diffraction, IR spectroscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, and electrophoretic mobility, among others. The analyses demonstrated the formation of the LDH structure in all cases, but with some differences regarding the arrangement of each drug within that structure: vancomycin and a portion of ciprofloxacin were adsorbed on the external surface, while the remaining part of ciprofloxacin and sodium valproate were successfully intercalated into the LDH, occupying the internal surfaces of the crystallites.

Different kinetic behaviors were observed for vancomycin depending on the synthesis method, where the release of the active principle in the coprecipitation sample occurred mainly due to the dissolution of the LDH structure, a phenomenon not observed in the reconstruction sample. For the ciprofloxacin sample, drug release at acid pH was due to LDH dissolution, while at neutral to basic pH values, it depended on ion exchange or desorption of the drug from the LDH. In the case of the solid with valproate, its release depended exclusively on the exchange with the anions present in the solution. Due to the sensitivity of LDHs to acidic environments, some enteric coating would be necessary to protect them from degradation.

It is important to highlight some considerations regarding the physicochemical characteristics that drugs must possess when selecting them for study with LDHs:

- Drugs should ionize negatively at the pH values of synthesis.
- They should be stable and avoid degradation under synthesis conditions.
- Better results in terms of drug intercalation can be achieved with a higher charge-to-size ratio of the molecule of interest.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar estos agradecimientos con un énfasis especial hacia mis directores de beca; Dr. Marcelo Avena y la Dra. Carina Luengo por haberme permitido realizar una beca de investigación, por su guía en este mundo que era completamente nuevo para mí y por su apoyo e incondicionalidad.

También ocupan un lugar muy importante en estos agradecimientos mis compañeros de oficina, por el acompañamiento y su sostén en el día a día, compartiendo alegrías y frustraciones en este proceso que ha sido desarrollar esta tesis de investigación.

Quiero realizar una mención especial también a todas las personas que forman parte de los grupos de investigación NANOSUP y MASIB, ya que he encontrado en ellos una ayuda constante frente a los desafíos surgidos en estos años.

También quiero agradecer a las instituciones y el personal de INQUISUR-CONICET y del departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur, por haberme cedido el espacio y los recursos necesarios para desarrollar esta tesis hasta el final.

Y finalmente a ellos, los que siempre están, los que uno pudo confiar en cada momento vivido, a mi familia y amigos por ser pilares fundamentales en este largo recorrido.

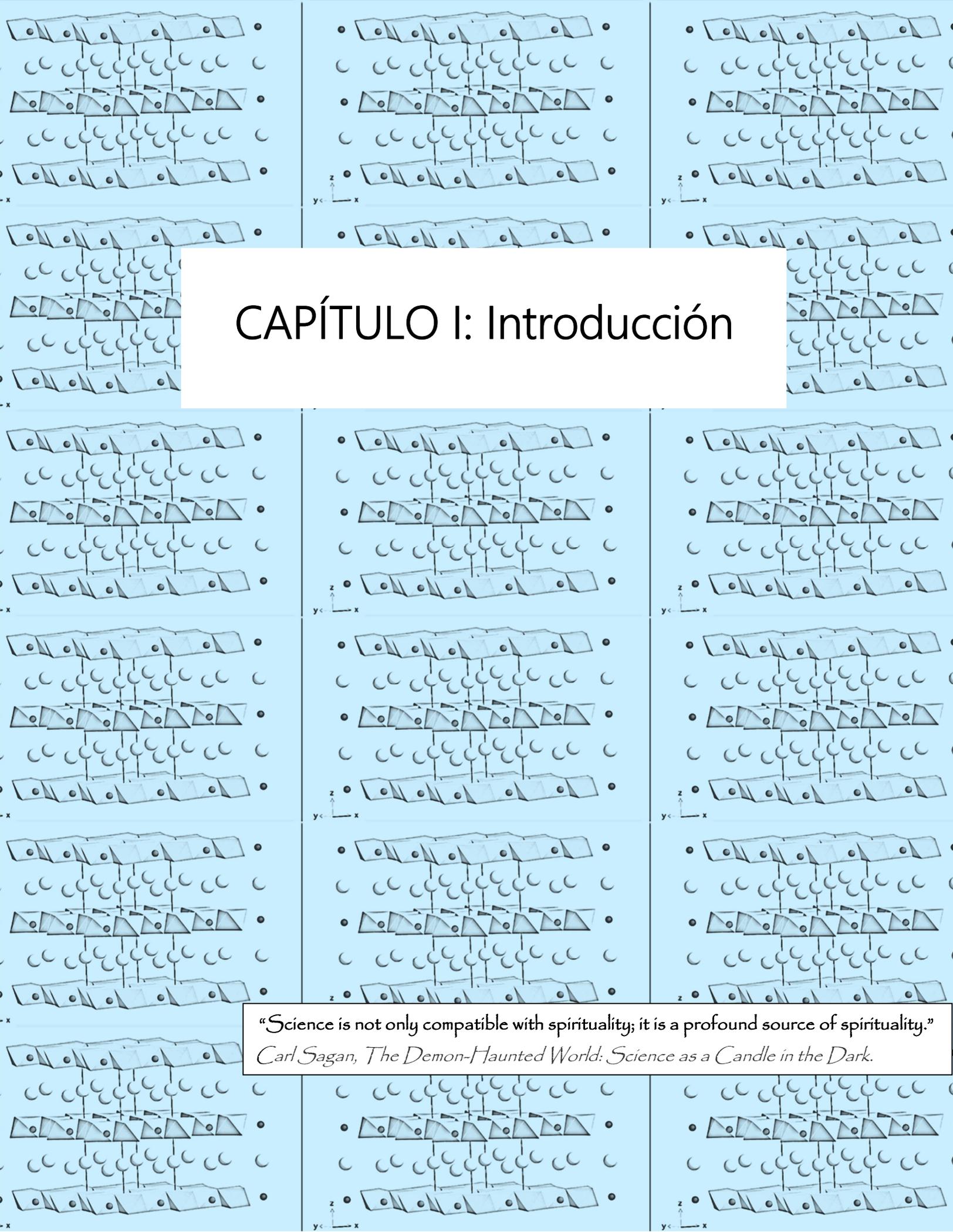
Es por eso que esta tesis no es sólo del que la redacta, sino de todas las personas nombradas anteriormente que la hicieron posible de manera directa o indirecta. A ellos/as, mi gratitud eterna.

Nicolas A. Lopez

ÍNDICE

CAPITULO I: Introducción	Pág. 1
I.1. Consideraciones generales	Pág. 2
I.2. Objetivos de la tesis	Pág. 14
I.3. Referencias	Pág. 16
CAPÍTULO II: Materiales y Métodos	Pág. 23
II.1. Reactivos	Pág. 24
II.2. Métodos experimentales y técnicas de caracterización	Pág. 25
II.3. Cinéticas de liberación y de disolución	Pág. 30
II.4. Métodos de síntesis	Pág. 34
II.5. Modelos cinéticos	Pág. 39
II.6. Referencias	Pág. 41
CAPÍTULO III: Hidróxidos Dobles Laminares-Vancomicina (HDL-VAN)	Pág. 44
III.1. Vancomicina	Pág. 46
III.2. Caracterización de las muestras HDL-VAN	Pág. 47
III.3. Cinéticas de liberación y de disolución	Pág. 59
III.4. Conclusiones	Pág. 65
III.5. Referencias	Pág. 66
CAPÍTULO IV: Hidróxidos Dobles Laminares-Ciprofloxacina (HDL-CIP)	Pág. 69
IV.1. Ciprofloxacina	Pág. 71
IV.2. Caracterización de las muestras HDL-CIP	Pág. 72
IV.3. Cinéticas de liberación y de disolución	Pág. 82
III.4. Conclusiones	Pág. 87

III.5. Referencias	Pág. 88
CAPÍTULO V: Hidróxidos Dobles Laminares-Valproato (HDL-VAL)	Pág. 93
IV.1. Valproato	Pág. 95
IV.2. Caracterización de las muestras HDL-VAL	Pág. 95
IV.3. Cinéticas de liberación y de disolución	Pág. 104
III.4. Conclusiones	Pág. 107
III.5. Referencias	Pág. 108
CAPÍTULO VI: Conclusiones Finales	Pág. 112



CAPÍTULO I: Introducción

“Science is not only compatible with spirituality; it is a profound source of spirituality.”

Carl Sagan, The Demon-Haunted World: Science as a Candle in the Dark.

I.1. CONSIDERACIONES GENERALES

Un fármaco, o principio activo (PA), es definido por la Farmacopea Nacional Argentina como toda sustancia química o mezcla de sustancias relacionadas, de origen natural o sintético, que poseyendo un efecto farmacológico específico, se emplea en medicina humana (*Farmacopea Argentina (Vol. I)*, 2013).

La administración de un fármaco por vía oral somete al mismo a diferentes procesos en el organismo: liberación (L), absorción (A), distribución (D), metabolismo (M) y excreción (E). El conjunto de todos estos procesos se conoce como proceso LADME (por sus siglas), y el comportamiento de cada fármaco en este proceso determinará su farmacocinética, desde la administración del mismo hasta su completa eliminación. La liberación del fármaco es el primer paso, donde las moléculas del PA se “separan” del excipiente y son disueltas. El siguiente paso, el de la absorción, describe el acceso del fármaco a la circulación sistémica a través de membranas biológicas donde, según la característica química de cada molécula, será por absorción pasiva o activa. El proceso de distribución implica el transporte del PA a todo el organismo y también estará condicionado por las características del mismo: peso molecular, grado de ionización, liposolubilidad, etc. Una vez que el fármaco se encuentra en el sistema circulatorio comienza su metabolismo, conjunto de procesos enzimáticos donde el PA sufre diferentes biotransformaciones que originan la formación de metabolitos de mayor solubilidad para favorecer la eliminación del organismo. El último paso, de excreción, describe la eliminación del fármaco inalterado o sus metabolitos del organismo. Estos últimos dos son procesos continuos, y ocurren desde el inicio de la distribución hasta su completa eliminación (Ruiz-García et al., 2008; Somvanshi et al., 2021). Teniendo en cuenta esto, la absorción sistémica de un fármaco y, por lo tanto, su concentración en el organismo dependerá principalmente de (Talevi et al., 2016):

- Las características fisicoquímicas del PA;
- La naturaleza del medicamento en el que se encuentra incluido (excipientes, matrices, etc.);
- Las características anatómicas y fisiológicas del sitio de absorción.

Para que las concentraciones de un PA ejerzan un efecto farmacológico, siempre es necesario que la relación entre concentraciones y efectos, terapéuticos o tóxicos, sea conocida. Este margen terapéutico, o ventana terapéutica, es definido entonces por el rango limitado entre la mínima concentración efectiva terapéutica y la máxima concentración tolerada de un fármaco (Gamundi Planas, 2002). Para garantizar que las concentraciones de un PA se encuentren dentro de esos márgenes y evitar los comportamientos erráticos en la dosificación, se buscan estrategias de diseño de fármacos que alteren alguna de las etapas del proceso LADME. Las etapas de liberación/absorción del fármaco son, quizás, donde más desarrollo hay en el diseño de medicamentos, donde coexisten diferentes excipientes y sistemas de liberación modificada (SLM) (prolongada, retardada, etc.) que cambian el comportamiento habitual del PA. Con respecto a la etapa de distribución, existe hoy en día desarrollo de formulaciones que pueden ser “dirigidas” hacia el sitio de interés de acción, llevadas a cabo por partículas magnéticas (Satarkar & Hilt, 2008), o nanopartículas con anticuerpos en su superficie que reconocen un tipo específico de células (por ejemplo, distintos tipos de células cancerosas) (Arslan et al., 2021; Saggari et al., 2013). Hay diseños de formulaciones donde utilizan el proceso metabólico de una sustancia para que su metabolito obtenido tenga actividad farmacológica (Rautio et al., 2008). Este tipo de moléculas se llaman profármacos y existen numerosos ejemplos que se utilizan en la actualidad: alfa metildopa, clopidogrel, etc.

Los SLM contemplan a las especialidades farmacéuticas diseñadas de manera tal que se ha cambiado la velocidad con la que se libera el fármaco, el lugar de acción o ambas cosas. Según la bibliografía consultada hay diversas formas de clasificar a los SLM; extendida, controlada, prolongada, sostenida, etc., pero para evitar confusiones utilizaremos la clasificación de la Farmacopea de Estados Unidos, USP por sus siglas en inglés y de la Farmacopea Nacional Argentina (FNA). Según la USP existen dos formas de SLM (USP, 2020):

- Liberación retardada: son productos que están modificados adrede con el objetivo de retrasar la liberación del fármaco por un período de tiempo luego de la administración;
- Liberación extendida: son formulaciones que fueron diseñadas de manera tal que el fármaco esté disponible durante un período de tiempo prolongado tras su administración comparado con lo observado o previsto para una forma farmacéutica de liberación inmediata (evitar usar sinónimos como sostenida, controlada, repetida, etc.). Ver Figura 1.1.

Según la FNA el término utilizado para este tipo de sistemas son: retardada y prolongada, respectivamente (Farmacopea Nacional Argentina Vol IV, 2013). Es por esto que, a fines prácticos, sólo nos referiremos como liberación extendida o prolongada y liberación retardada. Entre las principales ventajas que se encuentran al utilizar este tipo de sistemas encontramos:

- Reducción de la frecuencia de administración para mejorar el cumplimiento terapéutico. Los SLM permiten que los PA con una duración de acción corta puedan ser administrados con menor frecuencia, algo especialmente importante en la adherencia de un tratamiento;
- Reducción de las fluctuaciones en las concentraciones plasmáticas, ya que la disminución de picos plasmáticos elevados puede minimizar los efectos adversos, especialmente en medicamentos de absorción rápida. También contribuyen a evitar las

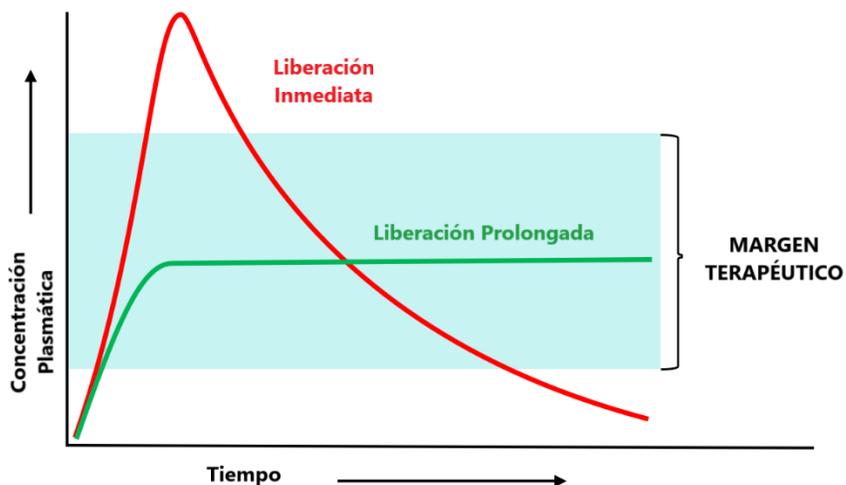


Figura 1.1. Perfiles farmacocinéticos en un sistema de liberación inmediata y prolongada

concentraciones subterapéuticas al final del intervalo posológico, con la consiguiente pérdida de eficacia.

- Control del sitio de liberación del fármaco en el tracto gastrointestinal; éste es el caso de los fármacos con cubierta entérica, que liberan el PA directamente en el intestino delgado. De esta forma se protege el fármaco de la degradación por el ácido del estómago y también se protege, teóricamente, al estómago de fármacos gastrolesivos.

Y entre las principales desventajas podemos nombrar:

- Posibles problemas de dosificación, debido a la liberación inmediata de la dosis si se trocea, mastica o existe un fallo en la formulación, pues los SLM pueden contener una mayor dosis de fármaco;

- Costo más elevado por unidad, ya que estas formulaciones son más complejas y sofisticadas.

- Tamaño de la forma farmacéutica, ya que a veces el uso de mayor cantidad de excipientes, o tipo de SLM usada aumenta el volumen de la dosis a administrar.

- Posible disminución de la biodisponibilidad, debido a un incremento del metabolismo por el primer paso hepático, o a una reducción del tiempo de permanencia de la forma de dosificación del tracto gastrointestinal (Bhowmik et al., 2018; Seftel et al., 2008).

Existen muchos fármacos que, por sus características químicas, poseen propiedades biofarmacéuticas inadecuadas, como baja solubilidad y permeabilidad. El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB), propuesto por Amidon et al., clasifica un fármaco considerando estos parámetros que se encuentran estrechamente relacionados con el proceso de absorción y plantea como objetivo la posibilidad de establecer correlaciones in vitro-in vivo que permitan sustituir los ensayos realizados en humanos por ensayos de disolución in vitro. La Figura 1.2 muestra la división entre las diferentes clases del SCB (Amidon & Lennernas, 1995).

Una estrategia para mejorar estas limitaciones es el uso de nanovehículos o nanotransportadores que mejoren los perfiles farmacocinéticos y biofarmacéuticos. Estos nanosistemas son sistemas transportadores de fármacos en los que el vehículo es un

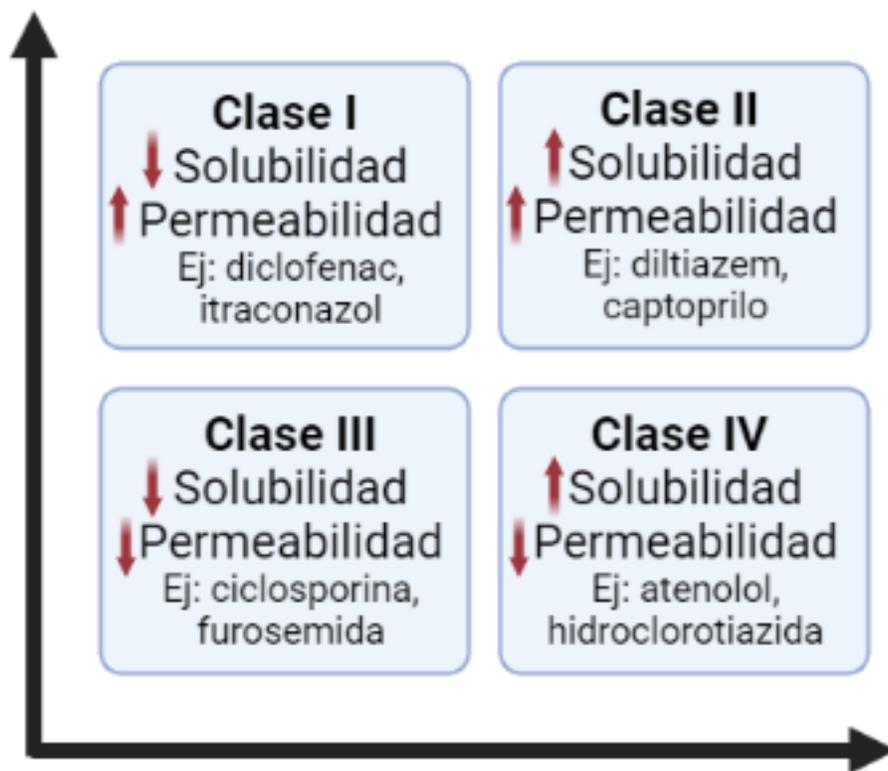


Figura 1.2. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

dispositivo de escala nanométrica. La nanotecnología nos permite manipular, estudiar y diseñar estructuras y dispositivos en escala nanométrica (materiales cuyo tamaño se encuentra entre 1-1000 nm). La expectativa generada con respecto al transporte de PA utilizando la nanotecnología se correlaciona con el hecho de que una vez que el fármaco se encuentra adherido o dentro del nanosistema, su biodistribución y farmacocinética dejarán de estar condicionadas solamente por sus propiedades fisicoquímicas, para ser en función de la carga, composición y estructura del nanocompuesto obtenido (Talevi et al., 2016).

El fármaco en un nanosistema puede encontrarse incorporado al mismo de diferentes maneras: encapsulado, unido químicamente a la superficie del vehículo o incluso, puede estar directamente integrado sólo por PA, pero de forma nanoestructurada, en cuyo caso se lo denomina nanocristales del fármaco. Desde el punto de vista de la forma o estructura de los nanovehículos, como se observa en la Figura 1.3 creada por Senapati et al. (Senapati, 2018), encontramos materiales 2-D, mesoporosos, dendrímeros, liposomas, nanopartículas poliméricas, etc. Estos sistemas están compuestos por diversos tipos de

materiales como polímeros, materiales inorgánicos o lipídicos (Adepu & Seeram, 2021; Huang et al., 2021).

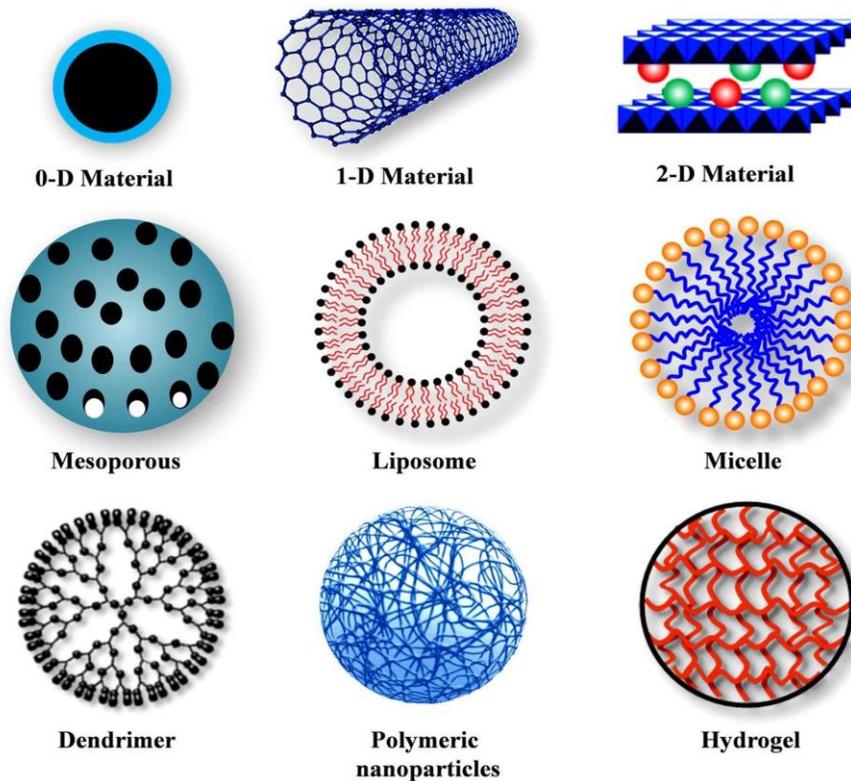


Figura 1.3. Distintos sistemas nanotransportadores de fármacos.

Los hidróxidos dobles laminares (HDL), también conocidos como hidróxidos “tipo” hidrotalcitas o arcillas aniónicas pueden ser de origen natural o sintético, y poseen un altísimo potencial para ser utilizados como vehículos de PA. Su estructura es una de las más estudiadas y con mayor información disponible en la literatura (Baskaran et al., 2015). La fórmula química del mineral hidrotalcita es $Mg_6Al_2(OH)_{16}(CO_3) \cdot 4H_2O$, y se conoce desde hace más de 100 años, pero no fue hasta la década del 60 que su estructura comenzó a tener relevancia a través del estudio por difracción de rayos X (DRX).

La estructura de la hidrotalcita y la de todos los HDL deriva de la estructura de la brucita: $Mg(OH)_2$, donde el Mg ocupa el lugar central y es rodeado por grupos hidroxilos (OH^-) formando un octaedro. Estas unidades octaédricas forman una lámina continua

donde los iones hidroxilo ocupan un lugar perpendicular al plano de la lámina y luego se disponen lámina sobre lámina para formar una estructura tridimensional (Sierra-Fernandez et al., 2014).

La estructura de los HDL deriva de la sustitución isomórfica de una cierta cantidad de Mg por un metal trivalente, generando una carga estructural positiva en la lámina del HDL (una carga positiva por cada ion de Mg reemplazado). Para mantener la neutralidad, estas cargas positivas son neutralizadas con aniones (que pueden ser de naturaleza inorgánica u orgánica) que se ubican entre las láminas de la estructura. En el caso de la hidrotalcita mencionada anteriormente $Mg_6Al_2(OH)_{16}(CO_3) \cdot 4H_2O$, 2 iones Mg fueron reemplazados por 2 iones Al (catión trivalente) y estas dos cargas positivas generadas son neutralizadas por un ion carbonato. El agua descrita en la fórmula refiere a las moléculas de agua que quedan retenidas en la interlámina, junto al anión que neutraliza las cargas positivas (Rives, 2001a; Sato et al., 1988).

Los HDL son representados por la siguiente fórmula:



donde M^{2+} y M^{3+} son los iones divalentes y trivalentes respectivamente y A^{n-} es el anión interlamina. Como iones divalentes pueden ser usados Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} y entre los iones trivalentes se pueden encontrar Al^{3+} , Cr^{3+} , Mn^{3+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , La^{3+} , Y^{3+} . Según esta fórmula, x podría tomar valores de 0 a 1 variando de esa manera la relación M^{2+}/M^{3+} , y si bien esto puede ocurrir, los límites más fiables se basan en una evolución de los parámetros de red correspondiendo a $0,2 \leq x \leq 0,4$ (Rives, 2001b). También se han descrito en la literatura situaciones donde el HDL posee más de dos cationes en su estructura, como puede ser el caso de Mg/Al/Fe (Jia et al., 2018; Rives et al., 1998).

La Figura 1.4, que es una modificación de la creada por Li et al. (Li et al., 2017), detalla una estructura típica de un HDL, formado por dos cationes con una determinada relación M^{2+}/M^{3+} y con aniones y agua que se alojan en el espacio interlaminar. Este espacio interlaminar, sumado al espesor de una lámina del HDL representa el espacio basal (d), valor que es obtenido experimentalmente por difracción de rayos X (DRX). Asumiendo un empaquetamiento romboédrico (politipo 3R) de las láminas, se pueden calcular los parámetros cristalográficos a y c , donde el primero permite obtener la distancia entre los dos cationes metálicos, a partir de $a = 2d_{(110)}$ y el segundo corresponde a 3 veces la distancia de una lámina a otra, y se obtiene de $c = 3d_{(003)}$ (Evans & Slade, 2006; Rives, 2002).

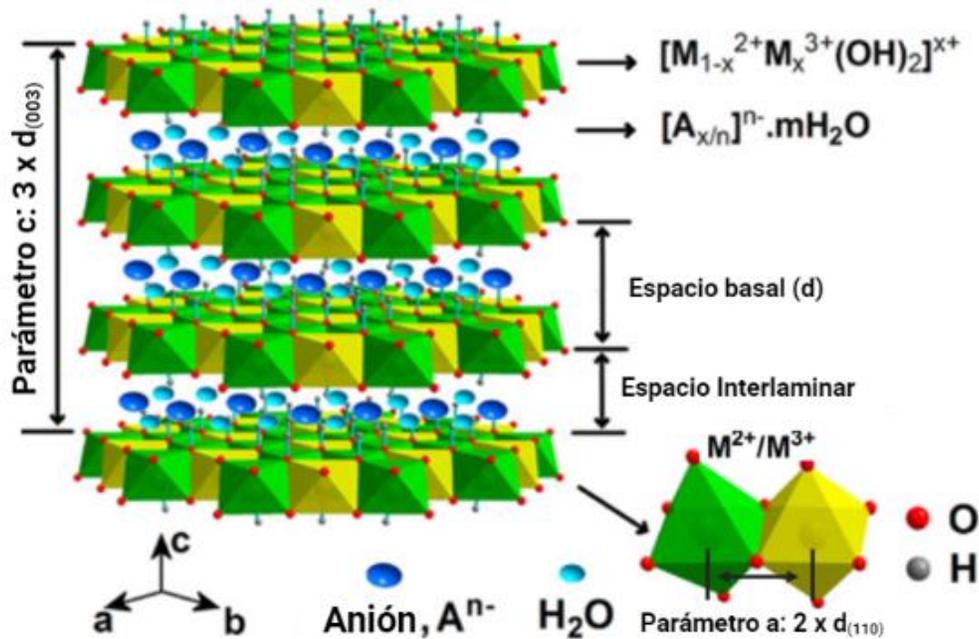


Figura 1.4. Estructura de un HDL.

Una de las principales características de estos materiales es que en la mayoría de los casos los aniones que se alojan en la interlámina interactúan a través de uniones relativamente débiles con la estructura del HDL. Estos pueden ser ubicados en este espacio durante el proceso de formación o por intercambio iónico. Los aniones pueden ser de naturaleza variada, y dentro de los de origen inorgánico encontramos:

- Halógenos: cloruro, fluoruro (Yue et al., 2017).

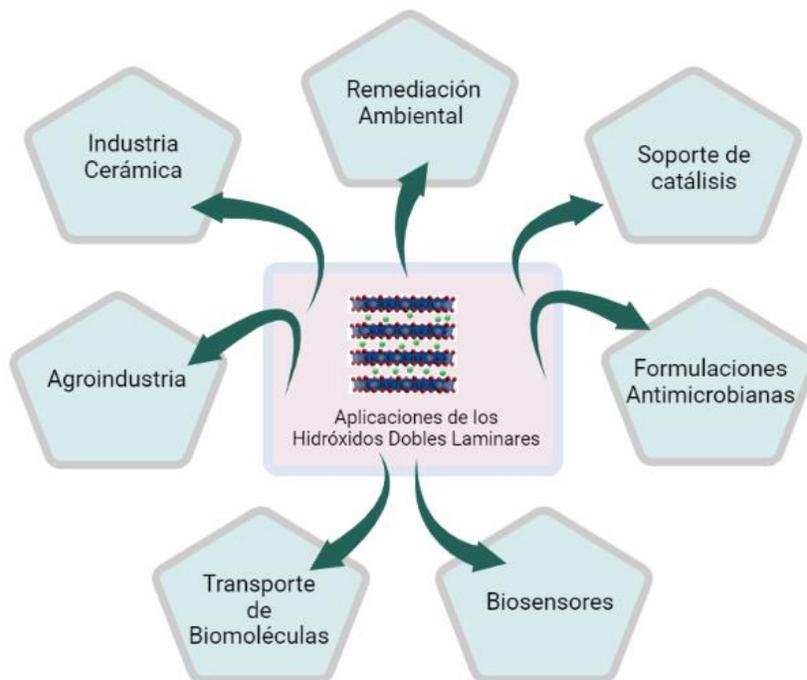


Figura 1.5. Aplicaciones de los HDL.

- Oxoaniones: carbonato, nitrato, sulfato (Bukhtiyarova, 2019a).
- Oxo y polioxometalatos: cromato, dicromato, (Mo_7O_{24}) (Kaneko & Ogawa, 2013).
- Complejos aniónicos: ferrocianuro, $(\text{PdCl}_4)_2$ (Unal, 2007).
- Aniones orgánicos: carboxilatos, fosfonatos, alquil sulfatos.

Además, los HDL poseen otras características importantes como gran área superficial ($>1000 \text{ m}^2/\text{g}$), excelentes propiedades reológicas, muy buena capacidad adsortiva (Del Hoyo, 2007). Debido a esto, los HDL son utilizados en un amplio campo de aplicaciones como es mostrado en la Figura 1.5. Entre sus potenciales usos podemos destacar:

- Industria cerámica: HDL compuestos por metales de transición son estudiados para producir cerámicos coloreados (Pérez-Bernal et al., 2009);
- Remediación ambiental: debido a su gran capacidad adsortiva pueden ser utilizados para remover sustancias tóxicas presentes en el agua. Varios autores publicaron trabajos utilizando HDL como ad/absorbente de compuestos como arsénico, cromo,

selenio y otros metales pesados (Kang et al., 2013; Peligro et al., 2016; Tran et al., 2019);

- Agroindustria: se estudian sus potenciales usos como adsorbentes de pesticidas para su remediación ambiental y también como liberadores de pesticidas, ya que lograrían hacerlo lentamente evitando la contaminación de los suelos y el agua (Cardozo & Celiz, 2006);
- Formulaciones antimicrobianas: se estudian a los HDL como soportes de nanopartículas de plata, las cuales tienen actividad antimicrobiana (Chen et al., 2012);
- Biosensores: se investigan compuestos nano híbridos de HDL aplicados al desarrollo de biosensores de urea (Vial et al., 2006);
- Catálisis: varios autores reportaron que los óxidos mixtos obtenidos de la calcinación de los HDL pueden ser utilizados para diversos procesos catalíticos (Baskaran et al., 2015; Bukhtiyarova, 2019a; Zhang et al., 2020);
- Transportadores de biomoléculas: debido a su capacidad de intercambiar aniones, inclusive de naturaleza orgánica, se estudia a los HDL como transportadores de biomoléculas que van desde vitaminas (Gasser, 2009), enzimas (Romano et al., 2023), fármacos (Del Arco et al., 2004; Li et al., 2014; Rives et al., 2014) hasta ácidos nucleicos (ADN o ARN) (Oh et al., 2006).

El uso de estos materiales como soporte y vehículo de fármacos se encuentra en amplio desarrollo, y en la literatura podemos encontrar estudios con diferentes clases de fármacos como antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) (Rives et al., 2013; Rojas et al., 2012), antibióticos (Khan et al., 2018; Latip et al., 2013; Wang & Zhang, 2012), antitumorales (Andrade et al., 2019; Dai et al., 2015), etc. Varios autores investigaron la biocompatibilidad de los HDL para poder ser utilizados en organismos humanos. Por ejemplo, Cunha et al. estudiaron a través de ensayos in vivo la biocompatibilidad de estos materiales cuando son administrados por vía intramuscular (Cunha et al., 2016), Saifullah et al. investigaron el uso de los HDL en algunas líneas celulares (Saifullah et al., 2014), Gu et al. estudiaron el

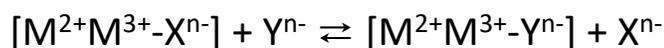
comportamiento con células del torrente sanguíneo como vasculares o endoteliales y complementos de activación (Gu et al., 2018), entre otros. Todos estos trabajos ratifican a estos materiales como inocuos y bioseguros. La biocompatibilidad de los HDL va a depender también de su composición estructural, ya que las dosis toleradas no son las mismas para todos los cationes según la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Zhou & Chen, 2004).

Los HDL pueden ser sintetizados a través de diferentes métodos, entre los que se destacan:

- Coprecipitación: este es uno de los métodos de síntesis más comunes. Se basa en adicionar lentamente una solución conteniendo una mezcla de metales di y trivalentes en adecuada proporción dentro de un reactor conteniendo agua. Una segunda solución (solución alcalina) es agregada para mantener el valor de pH seleccionado dentro del reactor. De esta manera resulta la coprecipitación de las dos sales metálicas y la formación espontánea del HDL. Los aniones que se intercalan son normalmente los contraiones de las sales metálicas, pero si se trabaja a valores de pH muy elevados, una buena proporción de los aniones intercalados pueden ser iones OH⁻. También hay casos donde se intercala el ion carbonato proveniente de la contaminación atmosférica con CO₂. Es por eso que se recomienda llevar a cabo la reacción bajo una atmósfera de nitrógeno si se quiere evitar el carbonato. En el método de coprecipitación también es posible colocar en el reactor una solución con el anión de interés a intercalar al comienzo del experimento, a una concentración suficientemente elevada como para que compita con los contraiones de las sales metálicas. Debido a que generalmente hay una competencia entre aniones, el control de las condiciones experimentales es fundamental para direccionar la intercalación selectiva del anión de interés. Entre los principales parámetros a controlar dentro de la síntesis se pueden destacar: temperatura, pH de la reacción, concentración de las disoluciones de las sales metálicas, concentración de la solución alcalina, velocidad de agregado de los reactivos,

velocidad de agitación y tiempo de síntesis (envejecimiento) (Ang et al., 2019; Del Arco et al., 2004).

- Intercambio iónico: la estructura laminar de los HDL, basada en el apilamiento de láminas positivas que atrapan especies aniónicas en el espacio interlaminar es altamente favorable a la difusión de estos aniones en ese espacio, y es por esto que estos materiales son una de las principales clases de intercambiadores de aniones. La reacción de intercambio puede ser descrita como:



Desde un punto de vista termodinámico, el intercambio en la estructura del HDL depende principalmente de las interacciones electrostáticas de las láminas cargadas positivamente y los aniones intercambiables, y en menor medida, de la energía libre involucrada en los cambios de hidratación. Un aspecto importante a remarcar es que la constante de equilibrio incrementa cuando el radio iónico del anión Y disminuye, y es favorecido para aniones con alta densidad de carga. Comparando algunos aniones inorgánicos monovalentes, la afinidad es: $OH^- > F^- > Cl^- > Br^- > NO_3^- > I^-$. Acorde a estos resultados, un HDL con I^- , NO_3^- o Cl^- serían los mejores precursores para reacciones de intercambio. Desde el punto de vista experimental, la síntesis presenta una simple implementación: una suspensión acuosa del HDL precursor es agitado en presencia de una cantidad en exceso (10 a 20 veces) del anión que se desea intercalar. Éste método es útil de aplicar cuando el método de coprecipitación es inaplicable, por ejemplo cuando los cationes o aniones son inestables en el pH utilizado o la reacción (Bukhtiyarova, 2019b; Del Arco et al., 2004; Duan & Evans, 2006).

- Reconstrucción: este método involucra primeramente una calcinación de un HDL precursor, teniendo generalmente carbonato como anión intercalado, seguido posteriormente por la inmersión del sólido resultante en una solución acuosa conteniendo el anión que se quiere intercalar. Durante el proceso de calcinación

de un HDL con carbonato como anión intercalado primero se pierden las moléculas de agua de la superficie, luego el agua interlaminar y, finalmente, entre los 200 – 350 °C se produce la deshidroxilación de las láminas, conduciendo a un colapso de la estructura. Los aniones carbonatos generalmente son removidos a temperaturas de 300-450 °C, generando como producto una mezcla de óxidos mixtos. Esta mezcla puede regenerar la estructura de un HDL al ser colocada en una solución acuosa con el anión de interés a intercalar. Esta capacidad que tiene el HDL para “reconstruirse” o “regenerarse” es llamado “efecto memoria” y es una de las características más importantes a resaltar de estos sólidos. Es importante destacar que es necesario emplear una atmósfera de nitrógeno para evitar la contaminación con aniones carbonato (He et al., 2006).

I.2. OBJETIVO DE LA TESIS

Considerando las características descritas anteriormente que poseen los HDL y su potencial aplicación en biomedicina como vehículos portadores de PA, el objetivo de esta tesis es implementar estos materiales para su uso en liberación prolongada de fármacos y lograr modificar los perfiles farmacocinéticos de las drogas estudiadas.

Se investiga el desarrollo de diferentes nanocompuestos de HDL con 3 fármacos diferentes, dos antibióticos (vancomicina y ciprofloxacina) y un antiepiléptico (valproato de sodio). Se sintetizaron por los métodos de síntesis mencionados anteriormente y se caracterizaron a través de diferentes técnicas como difracción de rayos X (DRX), espectroscopía infrarroja (IR), microscopía electrónica de barrido y de transmisión (SEM y TEM), análisis elemental, movilidad electroforética, cinéticas de liberación del fármaco “in vitro” y de disolución de la estructura, etc.

Para una mejor lectura de esta tesis, se ha organizado la misma de la siguiente manera: en el capítulo II, se encuentran detallados todas las materias primas utilizadas, los parámetros fijados en cada técnica de caracterización y el procedimiento de síntesis de los nanocompuestos. En los capítulos III, IV y V se analizan los sólidos obtenidos con

vancomicina (HDL-VAN), ciprofloxacina (HDL-CIP) y valproato de sodio (HDL-VAL), respectivamente. Por último, el capítulo VI contiene las conclusiones finales de la tesis.

I.3. REFERENCIAS

- Adepu, S., & Seeram, R. (2021). Controlled Drug Delivery Systems : Current Status and Future directions. *Molecules*, 26, 5905.
- Amidon, G., & Lennernas, H. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 12, Issue 3).
- Andrade, K. N., Pérez, A. M. P., & Arízaga, G. G. C. (2019). Passive and active targeting strategies in hybrid layered double hydroxides nanoparticles for tumor bioimaging and therapy. *Applied Clay Science*, 181, 105214. <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2019.105214>.
- Ang, H., Wu, Y., Wang, X., Hu, B., & Wang, X. (2019). Recent Advances in Composites of Graphene and Layered Double Hydroxides for Water Remediation:AReview. *Chem. Asian J*, 14, 2542–2552. <https://doi.org/10.1002/asia.201900493>.
- Arslan, F. B., Ozturk, K., & Calis, S. (2021). Antibody-mediated drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 596, 120268. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120268>.
- Baskaran, T., Christopher, J., & Sakthivel, A. (2015). Progress on layered hydrotalcite (HT) materials as potential support and catalytic materials. *RSC Advances*, 5(120), 98853–98875. <https://doi.org/10.1039/c5ra19909c>.
- Bhowmik, D., Bhanot, R., & Kumar, K. P. S. (2018). Extended Release Drug Delivery-An Effective Way of Novel Drug Delivery System. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*, 10(4), 233. <https://doi.org/10.5958/0975-4377.2018.00035.6>.
- Bukhtiyarova, M. V. (2019a). A review on effect of synthesis conditions on the formation of layered double hydroxides. *Journal of Solid State Chemistry*, 269, 494–506. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2018.10.018>.
- Bukhtiyarova, M. V. (2019b). A review on effect of synthesis conditions on the formation of layered double hydroxides. *Journal of Solid State Chemistry*, 269, 494–506. <https://doi.org/10.1016/J.JSSC.2018.10.018>.

- Cardozo, L., & Celiz, R. (2006). Layered Double Hydroxides as Supports for the Slow Release of Acid Herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 5968–5975.
- Chen, C., Gunawan, P., Lou, X. W., & Xu, R. (2012). Silver nanoparticles deposited layered double hydroxide nanoporous coatings with excellent antimicrobial activities. *Advanced Functional Materials*, 22(4), 780–787. <https://doi.org/10.1002/adfm.201102333>.
- Cunha, V. R. R., De Souza, R. B., Da Fonseca Martins, A. M. C. R. P., Koh, I. H. J., & Constantino, V. R. L. (2016). Accessing the biocompatibility of layered double hydroxide by intramuscular implantation: Histological and microcirculation evaluation. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP30547>.
- Dai, C. F., Tian, D. Y., Li, S. P., & Li, X. D. (2015). Methotrexate intercalated layered double hydroxides with the mediation of surfactants: Mechanism exploration and bioassay study. *Materials Science and Engineering C*, 57, 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.040>.
- Del Arco, M., Gutiérrez, S., Martín, C., Rives, V., & Rocha, J. (2004). Synthesis and characterization of layered double hydroxides (LDH) intercalated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). *Journal of Solid State Chemistry*, 177(11), 3954–3962. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2004.08.006>.
- Del Hoyo, C. (2007). Layered double hydroxides and human health: An overview. *Applied Clay Science*, 36(1–3), 103–121. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.06.010>
- Duan, X., & Evans, D. G. (2006). *Layered Double Hydroxides* (X. E. D. G. Duan (Ed.)). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/b100426>.
- Evans, D. G., & Slade, R. C. T. (2006). Structural Aspects of Layered Double Hydroxides. *Structure & Bonding*, 119(December 2005), 1–87. https://doi.org/10.1007/430_005
- Farmacopea Argentina (Vol. I)* (7ma Edicio). (2013).
- Farmacopea Nacional Argentina Vol IV. (2013). *Farmacopea Argentina (Vol. IV)*. In *Farmacopea VII Edicion*.
- Gamundi Planas, M. C. (2002). Farmacocinética clínica. In *Farmacía Hospitalaria* (pp. 625–665).

- Gasser, M. S. (2009). Inorganic layered double hydroxides as ascorbic acid (vitamin C) delivery system—Intercalation and their controlled release properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(1), 103–109. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2009.05.005>.
- Gu, Z., Yan, S., Cheong, S., Cao, Z., Zuo, H., Thomas, A. C., Rolfe, B. E., & Xu, Z. P. (2018). Layered double hydroxide nanoparticles: Impact on vascular cells, blood cells and the complement system. *Journal of Colloid and Interface Science*, 512, 404–410. <https://doi.org/10.1016/J.JCIS.2017.10.069>.
- He, J., Wei, M., Li, B., Kang, Y., Evans, D. G., & Duan, X. (2006). Preparation of layered double hydroxides. *Layered Double Hydroxides*, 119(September 2005), 89–119. https://doi.org/10.1007/430_006.
- Huang, X., Ma, Y., Li, Y., Han, F., & Lin, W. (2021). Targeted Drug Delivery Systems for Kidney Diseases. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9(May), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.683247>.
- Jia, Z., Hao, S., & Lu, X. (2018). Exfoliated Mg–Al–Fe layered double hydroxides/polyether sulfone mixed matrix membranes for adsorption of phosphate and fluoride from aqueous solutions. *Journal of Environmental Sciences*, 70, 63–73. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2017.11.012>.
- Kaneko, S., & Ogawa, M. (2013). Effective concentration of dichromate anions using layered double hydroxides from acidic solutions. *Applied Clay Science*, 75–76, 109–113. <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2012.11.011>.
- Kang, D., Yu, X., Tong, S., Ge, M., Zuo, J., Cao, C., & Song, W. (2013). Performance and mechanism of Mg/Fe layered double hydroxides for fluoride and arsenate removal from aqueous solution. *Chemical Engineering Journal*, 228, 731–740. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2013.05.041>.
- Khan, S. B., Alamry, K. A., Alyahyaw, N. A., & Asiri, A. M. (2018). Controlled release of organic–inorganic nanohybrid:Cefadroxil intercalated Zn–Al-Layered double hydroxide. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 3203–3222. <https://doi.org/10.2147/IJN.S138840>.

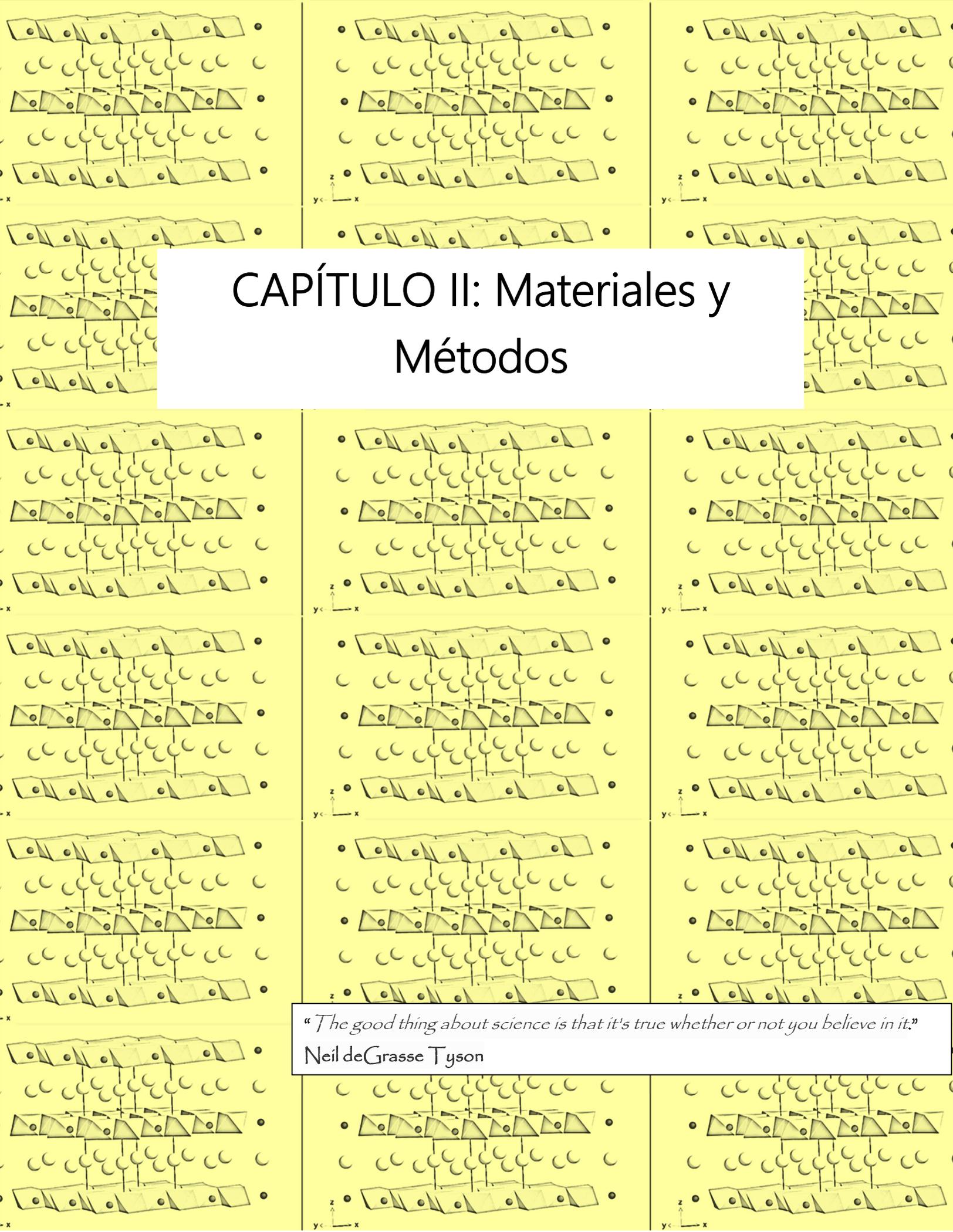
- Latip, A. F., Hussein, M. Z., Stanslas, J., Wong, C. C., & Adnan, R. (2013). Release behavior and toxicity profiles towards A549 cell lines of ciprofloxacin from its layered zinc hydroxide intercalation compound. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-119>.
- Li, L., Gu, W., Chen, J., Chen, W., & Xu, Z. P. (2014). Co-delivery of siRNAs and anti-cancer drugs using layered double hydroxide nanoparticles. *Biomaterials*, 35(10), 3331–3339. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.12.095>.
- Li, T., Miras, H. N., & Song, Y. F. (2017). Polyoxometalate (POM)-Layered Double Hydroxides (LDH) composite materials: Design and catalytic applications. *Catalysts*, 7(9), 7–10. <https://doi.org/10.3390/catal7090260>.
- Oh, J. M., Kwak, S. Y., & Choy, J. H. (2006). Intracrystalline structure of DNA molecules stabilized in the layered double hydroxide. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 67(5–6), 1028–1031. <https://doi.org/10.1016/J.JPCS.2006.01.080>.
- Peligro, F. R., Pavlovic, I., Rojas, R., & Barriga, C. (2016). Removal of heavy metals from simulated wastewater by in situ formation of layered double hydroxides. *Chemical Engineering Journal*, 306, 1035–1040. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2016.08.054>.
- Pérez-Bernal, M. E., Ruano-Casero, R. J., Benito, F., & Rives, V. (2009). Nickel–aluminum layered double hydroxides prepared via inverse micelles formation. *Journal of Solid State Chemistry*, 182(6), 1593–1601. <https://doi.org/10.1016/J.JSSC.2009.03.005>.
- Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Järvinen, T., & Savolainen, J. (2008). Prodrugs: Design and clinical applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(3), 255–270. <https://doi.org/10.1038/nrd2468>.
- Rives, V. (2001a). *Layered double hydroxides : present and future*. Nova Science Publishers.
- Rives, V. (2001b). *Layered Double Hydroxides- Past, present and Future*.
- Rives, V. (2002). Characterisation of layered double hydroxides and their decomposition products. *Materials Chemistry and Physics*, 75(1–3), 19–25. [https://doi.org/10.1016/S0254-0584\(02\)00024-X](https://doi.org/10.1016/S0254-0584(02)00024-X).
- Rives, V., del Arco, M., & Martín, C. (2014). Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review. *Applied Clay Science*, 88–89, 239–

269. <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2013.12.002>.
- Rives, V., Del Arco, M., & Martín, C. (2013). Layered double hydroxides as drug carriers and for controlled release of non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): A review. *Journal of Controlled Release*, 169(1–2), 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.03.034>.
- Rives, V., Labajos, F. M., Trujillano, R., Romeo, E., Royo, C., & Monzón, A. (1998). Acetylene hydrogenation on Ni–Al–Cr oxide catalysts: the role of added Zn. *Applied Clay Science*, 13(5–6), 363–379. [https://doi.org/10.1016/S0169-1317\(98\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0169-1317(98)00033-7).
- Rojas, R., Palena, M. C., Jimenez-Kairuz, A. F., Manzo, R. H., & Giacomelli, C. E. (2012). Modeling drug release from a layered double hydroxide-ibuprofen complex. *Applied Clay Science*, 62–63, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.04.004>.
- Romano, A., Rosato, A., Totaro, G., Zanaroli, G., Celli, A., & Sisti, L. (2023). Recycling by-design of plastic through formulation with thermally protected enzymes in layered double hydroxide structures. *Journal of Cleaner Production*, 384, 135517. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2022.135517>.
- Ruiz-Garcia, A., Bermejo, M., Moss, A., & Casabo, V. G. (2008). Pharmacokinetics in Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(2), 654–690. <https://doi.org/10.1002/JPS.21009>.
- Saggari, J. K., Yu, M., Tan, Q., & Tannock, I. F. (2013). The tumor microenvironment and strategies to improve drug distribution. *Frontiers in Oncology*, 3 JUN(June), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00154>.
- Saifullah, B., El Zowalaty, M. E., Arulselvan, P., Fakurazi, S., Webster, T. J., Geilich, B. M., & Hussein, M. Z. (2014). Antimycobacterial, antimicrobial, and biocompatibility properties of para-aminosalicylic acid with zinc layered hydroxide and Zn/Al layered double hydroxide nanocomposites. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 1029–1036. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S63753>.
- Satarkar, N. S., & Hilt, J. Z. (2008). Magnetic hydrogel nanocomposites for remote controlled pulsatile drug release. *Journal of Controlled Release*, 130(3), 246–251. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2008.06.008>.

- Sato, T., Fujita, H., Endo, T., Shimada, M., & Tsunashima, A. (1988). Synthesis of hydrotalcite-like compounds and their physico-chemical properties. *Reactivity of Solids*, 5(2–3), 219–228. [https://doi.org/10.1016/0168-7336\(88\)80089-5](https://doi.org/10.1016/0168-7336(88)80089-5).
- Seftel, E. M., Popovici, E., Mertens, M., Witte, K. De, Tendeloo, G. Van, Cool, P., & Vansant, E. F. (2008). Zn–Al layered double hydroxides: Synthesis, characterization and photocatalytic application. *Microporous and Mesoporous Materials*, 113(1–3), 296–304. <https://doi.org/10.1016/J.MICROMESO.2007.11.029>.
- Senapati, S. (2018). Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Nature*, May 2017, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>.
- Sierra-Fernandez, A., Gomez-Villalba, L. S., Milosevic, O., Fort, R., & Rabanal, M. E. (2014). Synthesis and morpho-structural characterization of nanostructured magnesium hydroxide obtained by a hydrothermal method. *Ceramics International*, 40(8), 12285–12292. <https://doi.org/10.1016/J.CERAMINT.2014.04.073>.
- Somvanshi, S. B., Kharat, P. B., Jadhav, K. M., Thorat, N. D., & Townley, H. (2021). Nanomaterials and pharmacokinetics. *Nano-Pharmacokinetics and Theranostics: Advancing Cancer Therapy*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85050-6.00007-4>.
- Talevi, A., Quiroga, P., & Ruiz, M. E. (2016). Procesos biofarmacéuticos. In *Procesos biofarmacéuticos*. Editorial de la Universidad de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/51907>.
- Tran, H. N., Nguyen, D. T., Le, G. T., Tomul, F., Lima, E. C., Woo, S. H., Sarmah, A. K., Nguyen, H. Q., Nguyen, P. T., Nguyen, D. D., Nguyen, T. V., Vigneswaran, S., Vo, D. V. N., & Chao, H. P. (2019). Adsorption mechanism of hexavalent chromium onto layered double hydroxides-based adsorbents: A systematic in-depth review. *Journal of Hazardous Materials*, 373, 258–270. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2019.03.018>.
- Unal, U. (2007). Short-time hydrothermal synthesis and delamination of ion exchangeable Mg/Ga layered double hydroxides. *Journal of Solid State Chemistry*, 180(9), 2525–2533. <https://doi.org/10.1016/J.JSSC.2007.07.005>.
- USP. (2020). Nomenclature Guidelines. In *United States Pharmacopeia* (pp. 1–36).

<https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/usp-nomenclature-guidelines.pdf>.

- Vial, S., Forano, C., Shan, D., Mousty, C., Barhoumi, H., Martelet, C., & Jaffrezic, N. (2006). Nanohybrid-layered double hydroxides/urease materials: Synthesis and application to urea biosensors. *Materials Science and Engineering: C*, 26(2–3), 387–393. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2005.10.069>.
- Wang, Y., & Zhang, D. (2012). Synthesis, characterization, and controlled release antibacterial behavior of antibiotic intercalated Mg-Al layered double hydroxides. *Materials Research Bulletin*, 47(11), 3185–3194. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2012.08.029>.
- Yue, X., Liu, W., Chen, Z., & Lin, Z. (2017). Simultaneous removal of Cu(II) and Cr(VI) by Mg–Al–Cl layered double hydroxide and mechanism insight. *Journal of Environmental Sciences*, 53, 16–26. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2016.01.015>.
- Zhang, G., Zhang, X., Meng, Y., Pan, G., Ni, Z., & Xia, S. (2020). Layered double hydroxides-based photocatalysts and visible-light driven photodegradation of organic pollutants: A review. *Chemical Engineering Journal*, 392, 123684. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2019.123684>.
- Zhou, J., & Chen, X. (2004). Tolerable upper intake level on vitamins and minerals. In *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research* (Vol. 33, Issue 6).



CAPÍTULO II: Materiales y Métodos

"The good thing about science is that it's true whether or not you believe in it."

Neil deGrasse Tyson

II.1. REACTIVOS

Los reactivos químicos utilizados para la síntesis, caracterización, ensayos de disolución y de liberación se detallan a continuación:

- Acetonitrilo (Carlo Erba, Reactivo HPLC, Ref: UN1648)
- Ácido clorhídrico 37%, HCl (Fisher, Reactivo analítico, Ref: UN1789)
- Ácido fosfórico 85%, H₃PO₄ (Douglas, Reactivo analítico, Ref: 010323)
- Ácido nítrico 65%, HNO₃ (Cicarelli, Reactivo analítico, Ref: 7697-37-2)
- Cloruro de aluminio hexahidrato, AlCl₃.6H₂O (Anedra, Reactivo analítico, Ref.: AN00621508)
- Buffer pH 4 (Anedra, Ref: AN00640925)
- Buffer pH 7 (Anedra, Ref: AN00641325)
- Buffer pH 10 (Anedra, Ref: AN00641625)
- Cápsula de gelatina tamaño 0 (Parafarm)
- Carbonato de sodio, Na₂CO₃ (Anedra, Reactivo analítico, Ref: AN00716509)
- Clorhidrato de ciprofloxacina, C₁₇H₁₉ClFN₃O₃ (Parafarm, Ref: 160513)
- Clorhidrato de vancomicina, C₆₆H₇₆Cl₃N₉O₂₄ (Klonal, Ref: K0619)
- Ciprofloxacina 500 mg, comprimidos (Savant)
- Cloruro de magnesio hexahidrato, MgCl₂.6H₂O (Anedra, reactivo analítico, Ref: AN00687107)
- Cloruro de sodio, NaCl (Anedra, grado analítico, Ref: AN00716909)
- Cloruro de potasio, KCl (Anedra, Reactivo analítico, Ref: AN00921909)
- Cloruro de estroncio hexahidrato, SrCl₂.6H₂O (Cicarelli, reactivo analítico, Ref 10049769)
- Fosfato de potasio fosfato, KH₂PO₄ (Cicarelli, Reactivo analítico, Ref:1057)
- Fosfato de sodio monobásico, NaH₂PO₄ (Anedra, Reactivo analítico, Ref: AN00718207)
- Fosfato de sodio dibásico, Na₂HPO₄ (Anedra, reactivo analítico, Ref: AN00718207)
- Hidróxido de sodio, NaOH (Anedra, reactivo analítico, Ref: AN00648209)
- Nitrato de aluminio nonahidrato, AlNO₃.9H₂O (Biopack, Reactivo analítico, Ref.: 9996.06)
- Nitrato de magnesio hexahidrato, MgNO₃.6H₂O (Anedra, reactivo analítico, Ref: AN00687707)

- Nitrato de plata, AgNO_3
- Nitrógeno 5.0 (Pureza > 99.999%)
- Valproato de sodio, $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NaO}_2$ (Parafarm, Ref: V16046-1)

II.2. MÉTODOS EXPERIMENTALES Y TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

II.2.1. MEDICIÓN DE PH

El pH se controló en todas las síntesis de compuestos y estudios cinéticos. Se llevó a cabo utilizando un pHmetro multiparamétrico ADWA AD1030, con un electrodo estándar ADWA AD1131 con cuerpo de vidrio. En todos los estudios el pH deseado fue obtenido mediante la adición de soluciones diluidas de HCl y NaOH.

II.2.2. ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Los fármacos fueron cuantificados por espectroscopía UV-VIS, utilizando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible con arreglo de diodos y una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. En todos los casos se obtuvo el espectro de la muestra en el intervalo de longitudes de onda de 190-1100 nm, y se utilizó la absorbancia en el máximo de la banda de absorción seleccionada para la cuantificación. Las curvas de calibrado fueron obtenidas con soluciones estándares de concentración conocida.

II.2.3. ANÁLISIS ELEMENTAL

El análisis elemental fue utilizado para la determinación de la fórmula elemental de los sólidos sintetizados.

La cuantificación de C, H y N se hizo a través de un analizador elemental Exeter Analytical INC, modelo CE 440, a una temperatura de combustión de 980°C y un tiempo de 20 segundos.

La cuantificación de Mg y Al se realizó previa digestión del sólido en ácido nítrico (para los hidróxidos dobles laminares sintetizados a partir de sales con cloruro) o en ácido clorhídrico (para hidróxidos dobles laminares sintetizados a partir de sales con

nitrate). El Mg se cuantificó mediante absorción atómica en un equipo GBC avanta 932 y el Al por plasma acoplado inductivamente (ICP) en un equipo Shimadzu simultaneous 9000.

La cuantificación de Cl (para las muestras sintetizadas a partir de sales de cloruro) se realizó mediante turbidimetría con nitrato de plata en un equipo Hach 2100Q.

II.2.4. DIFRACCIÓN DE RAYOS X (DRX)

La difracción de rayos X es una de las técnicas de caracterización más importante en el estudio de los hidróxidos dobles laminares. En un cristal sencillo los átomos están arreglados de manera regular y separados entre sí por una distancia interplanar d_{hkl} , donde h, k y l son los índices de Miller del plano cristalográfico en cuestión. Un haz de rayos X, de longitud de onda λ (1,54 Å) incide sobre el cristal con un ángulo θ con respecto a la superficie. La interferencia constructiva se lleva a cabo cuando:

$$n\lambda = 2d_{hkl}\sin\theta \quad (2.1)$$

siendo n un número entero. La fórmula 2.1 se la conoce como la ecuación de Bragg (Drenth, 2002). Cada compuesto tiene su propio set característico de valores d_{hkl} e intensidades las cuales pueden ser usadas para su identificación. La identificación de los planos cristalográficos correspondientes a cada pico de difracción de los HDL se realizó comparando los mismos con los datos del JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

Para ello se hicieron las mediciones en:

-Un equipo Rigaku D-Max III-C con radiación de Cu K α ($\lambda = 1,54$ Å) y monocromador de grafito, operado con un voltaje de 35 Kv y una corriente de 15 mA. Se utilizó un paso de 0,04 con un tiempo de conteo de 1 segundo. El barrido fue de 4° a 70° 2 θ .

-Un equipo PANalytical Empyrean con radiación Cu K α ($\lambda = 1,54$ Å), filtro de Ni y un detector PIXcel3D. Operado con un voltaje de 45Kv y una corriente de 40mA. Para las muestras a bajo ángulo (0,7°-10° 2 θ) se utilizó un paso de 0,0131303 y tiempo de 480 segundos. Para las muestras a 10°-80° 2 θ se utilizó un paso de 0,0131303 y un tiempo de conteo de 80 segundos.

Además de la información brindada sobre la posición en 2θ de los principales planos de los HDL, también es posible estimar el tamaño de los cristales a través de la ecuación de Scherrer (Uvarov & Popov, 2007):

$$D = \frac{k\lambda}{B \cos \theta} \quad (2.2)$$

Siendo D el tamaño del cristal en la dirección perpendicular al plano que está difractando, K es un factor de forma, λ la longitud de onda utilizada en el experimento y B es el ancho a media altura del pico (en inglés por sus siglas FWHM).

II.2.5. ESPECTROSCOPIA INFRAROJA (IR)

La espectroscopia infrarroja se basa en la absorción de radiación infrarroja por la muestra. Esta permite analizar todas las longitudes de onda del espectro infrarrojo simultáneamente, siendo las que pertenecen a la región media la de mayor utilidad práctica, cuya extensión se encuentra entre un rango de 4000 y 650 cm^{-1} , ofreciendo un método rápido y confiable para el análisis de compuestos orgánicos e inorgánicos (Theophanides, 2012).

Los espectros de absorción en el infrarrojo de las muestras fueron obtenidos con un equipo Thermo Fisher Nicolet is50, acoplado a una PC y ejecutado con el programa Omnic.

Las muestras fueron preparadas en forma de pastillas con bromuro de potasio (KBr). EL contenido de muestra por pastilla fue del 1%.

Para los espectros IR que se presentan en los posteriores capítulos, las muestras fueron analizadas con un accesorio de reflexión total atenuada (ATR), con el mismo equipo Nicolet is50. Este accesorio consta de un cristal de diamante donde se coloca directamente la muestra a medir, por lo que no es necesario la elaboración de pastillas en KBr para su análisis.

II.2.6. MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (POTENCIAL ZETA)

La movilidad electroforética de las muestras estudiadas se obtuvo utilizando un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS90. Para ello 0,05 g de muestra se dispersaron con un sonicador en 50 ml de una solución de NaCl 0,01 M. La dispersión se llevó a un pH de 12 con NaOH y luego se descendió poco a poco hasta un valor de pH 3 con HCl y en cada punto de la escala de pH se midió la movilidad electroforética. Estos valores se utilizaron para obtener el potencial zeta (ζ) usando la ecuación de Smoluchowski (Sze et al., 2003).

II.2.7. ESTRUCTURA Y GEOMETRÍA MOLECULAR

Las geometrías moleculares de los fármacos se optimizaron utilizando la Teoría Funcional de la Densidad (DFT). Se llevó a cabo con el software Gaussian 09, empleando el conjunto de bases de datos 6-31G** para todos los átomos. Primero se optimizó la geometría en fase gaseosa y luego se tuvo en cuenta la solvatación de la superficie para calcular las estructuras optimizadas. El modelo continuo polarizable (PCM) se utilizó para evaluar el efecto del disolvente.

II.2.8. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC) Y TERMOGRAVIMETRÍA (TG)

Bajo la denominación de Análisis Térmico se engloban un conjunto de técnicas analíticas que estudian el comportamiento térmico de los materiales. Cuando un material se calienta o se enfría, su estructura cristalina y su composición química pueden sufrir cambios más o menos importantes. La mayor parte de estos cambios se pueden estudiar midiendo la variación de distintas propiedades de la materia en función de la temperatura (Le Parlouër, 1987).

La Termogravimetría (TG) está basada en la medida de la variación de la masa de una muestra cuando se la somete a un cambio de temperatura en una atmósfera controlada. Esta variación puede ser una pérdida o una ganancia de masa.

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica experimental dinámica que permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, cuando es mantenida a temperatura constante, durante un tiempo determinado, o cuando es

calentada o enfriada a velocidad constante, en un determinado intervalo de temperaturas. Es uno de los análisis térmicos más usados en la industria farmacéutica, ya que permite obtener información sobre las propiedades físicas y energéticas de una sustancia (Clas et al., 1999).

Los análisis térmicos de DSC y TG se realizaron con un equipo DSC-SDT TA Q600, a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en aire desde temperatura ambiente hasta 1000°C.

II.2.9. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM-EDS)

Esta técnica fue llevada a cabo en un equipo LEO EVO 40XVP que posee acoplado un analizador de energía de rayos X, pudiendo analizar de manera semicuantitativa la composición de las muestras estudiadas. Las mismas fueron colocadas sobre una cinta doble faz de carbono y, posteriormente, metalizada con oro por plasma de argón.

La observación se hizo con una corriente de 20 Kv y a distintas magnificaciones.

II.2.10. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISION (TEM)

Para la microscopía electrónica de transmisión se utilizó un equipo JEOL 100 CX. Las muestras estudiadas fueron preparadas suspendiendo el material en etanol y luego colocadas 5 minutos en ultrasonido. Unas gotas de esta suspensión se colocaron en grillas de cobre de 200 mesh provistas de film Formvar. Se utilizó una corriente de 100 kv.

II.2.11. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA CON DETECTOR ULTRAVIOLETA (HPLC-UV)

El contenido de valproato de sodio fue determinado usando un equipo HPLC Termofisher Ultimate 3000, empleando un volumen de inyección de 20 µl, usando un método isocrático con fase reversa y un flujo de 2 mL/min. La fase móvil estaba compuesta en un 63 % (p/v) por una solución de sodio fosfato monobásico 25 mM y un 37 % (p/v) de acetonitrilo. El pH de la fase móvil fue ajustado a un valor de 2,3 usando

ácido fosfórico. La forma ionizada del fármaco es convertida a su forma ácida con este valor de pH durante el análisis HPLC. El ácido valproico obtenido fue separado usando una columna Zorbax SB-Aq de 4.6 x 250 mm. La absorbancia del detector UV fue configurada a un valor de 210 nm.

II.3. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN Y DE DISOLUCIÓN

II.3.1. ENSAYOS DE LIBERACIÓN Y DISOLUCIÓN EN EQUIPO TIPO BATCH

Para estudiar el comportamiento cinético de la disolución de la estructura de los HDL y la liberación de los fármacos en un rango de pH de 3 a 9, se utilizó un equipo termostatzado modelo Ballus (Fábrica Aparatos Científicos) con un reactor de doble camisa cilíndrico tipo Batch de 100 ml y un agitador magnético Dragon Lab Ms-Pa (Figura 2.1). El procedimiento se realizó bajo burbujeo de nitrógeno para evitar la presencia de iones CO_3^{2-} (Aguilera et al., 2019) a una velocidad de agitación de 400 rpm y a una temperatura de $25,0 \pm 0,2$ °C en una solución de NaCl 0,9 % (0,15 M), simulando la fuerza iónica del plasma (Bychkova et al., 2022). Se realizó una cinética por cada punto de pH especificado anteriormente.

Una vez establecidos y controlados los parámetros antes mencionados se pesaron 0,01 g de la muestra a analizar y se colocaron en el reactor, considerándose este como el tiempo cero ($t=0$) de la reacción. Las variaciones de pH fueron corregidas con soluciones diluidas de NaOH y HCl, con el objeto de mantener su valor constante durante todo el experimento.

Se extrajeron alícuotas de 4 ml en los tiempos 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420 y 480 min y se centrifugaron durante 15 min a 3000 rpm en una centrífuga Roto Silenta III. El sobrenadante de estos puntos fue retirado y guardado para posterior análisis. En el caso de fármacos fotosensibles los tubos con los que se trabajó y el reactor se cubrieron con papel aluminio para evitar la fotodegradación.

A los sobrenadantes se les cuantificó Mg por absorción atómica y el fármaco estudiado por espectroscopía UV/Vis (en el caso de vancomicina y ciprofloxacina) o HPLC-UV (en el caso del valproato de sodio). Los datos de Mg permitieron construir un perfil cinético de la disolución de la estructura de los HDL; los datos de concentración de fármaco fueron utilizados para construir curvas de cinética de liberación del mismo.



Figura 2.1. Termostato Ballus con agitador Dragon Lab y pHímetro ADWA AD1030

El mismo equipamiento fue utilizado para estudiar el comportamiento cinético de las muestras en condiciones “in vitro”, que serán detalladas en la próxima sección. Las condiciones de muestreo fueron iguales a las utilizadas en los estudios en NaCl 0,9 % y los ensayos fueron realizados por triplicado.

II.3.2. ENSAYOS DE LIBERACIÓN Y DISOLUCIÓN IN VITRO

Para estudiar el comportamiento en condiciones más parecidas a las situaciones “in vivo” de las muestras preparadas como formulaciones farmacéuticas orales, se han realizado estudios de disolución “in vitro” de acuerdo con las monografías de la USP (Farmacopea de los Estados Unidos). En este caso la temperatura de trabajo fue de $37,0 \pm 0,5$ °C, y los valores de pH seleccionados fueron 1,2, 4,5, 6,8 y 7,4. En la tabla 2.1 se detallan las composiciones de cada medio buffer, realizado según USP30-NF25.

Reactivos	pH
Cloruro de potasio, KCl/ Ácido clorhídrico, HCl	1,2
Fosfato de potasio monobásico, KH_2PO_4	4,5
Fosfato de sodio monobásico, NaH_2PO_4	6,8
Fosfato de sodio dibásico, Na_2HPO_4	
Fosfato de sodio monobásico, NaH_2PO_4	7,4
Fosfato de sodio dibásico, Na_2HPO_4	

Tabla 2.1. Reactivos utilizados en la preparación de soluciones buffer para los estudios “in vitro”

Se utilizó un equipo de disolución marca Erweka DT60 fabricado según reglamentación de la USP (Figura 2.2). En estos casos se empleó el aparato 1 (Aparato con canastilla. Figura 2.3) que consta de:

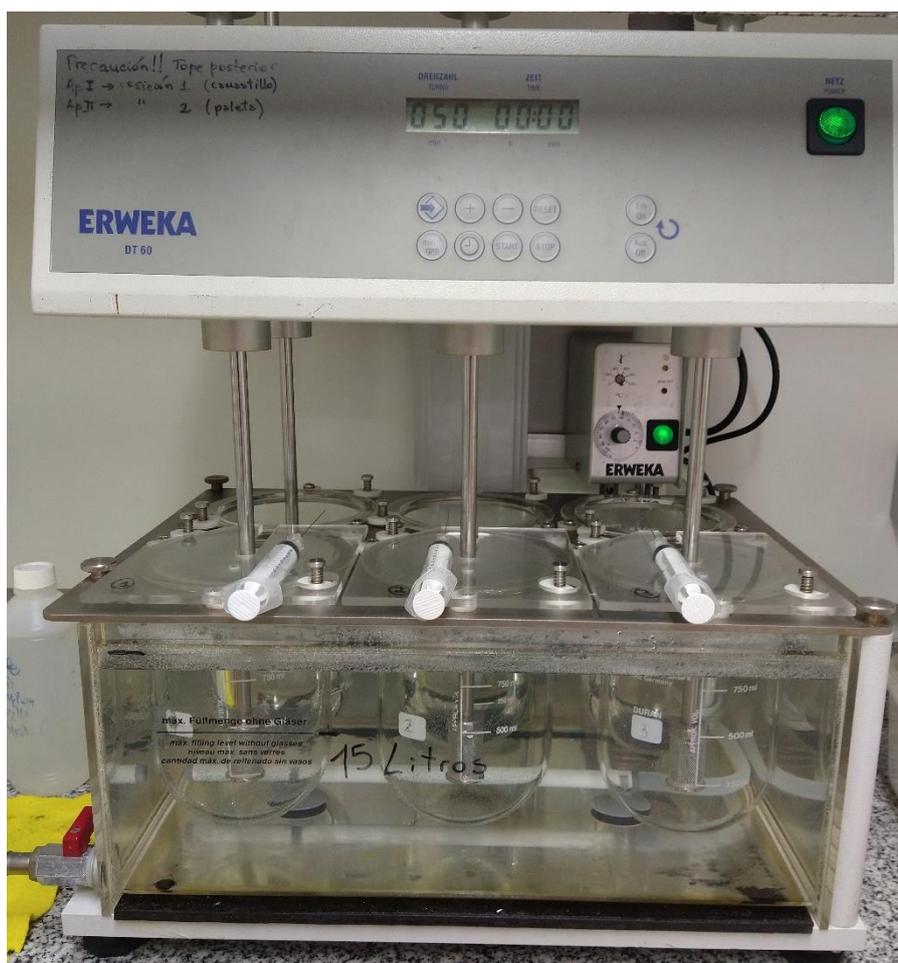


Figura 2.2. Disolutor empleado en ensayos de liberación.

- Un vaso de vidrio u otro material inerte con fondo semiesférico de 1000 ml;
- Tapa del mismo material para evitar la evaporación del líquido;
- Motor;
- Eje propulsor metálico;
- Canastilla cilíndrica;

En esta técnica de estudio se estableció una temperatura de trabajo de $37,0 \pm 0,5$ °C, una velocidad de agitación de 50 rpm que simula el peristaltismo intestinal y 900 ml de soluciones buffers cuyos valores de pH son: 1,2, 4,5 y 6,8. Las mismas fueron elaboradas como se detalla en la Tabla 1.

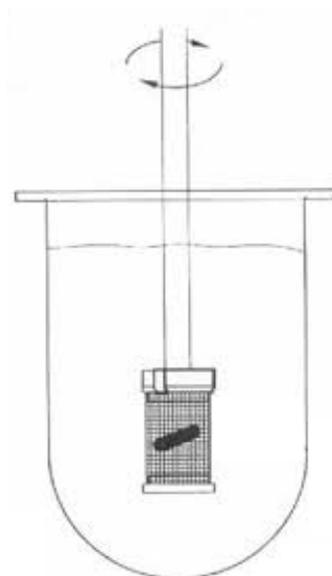


Figura 2.3. Aparato N° 1. USP

Para efectuar el ensayo de disolución se colocaron 0,1 gr de muestra en una cápsula de gelatina de tamaño 0. Posteriormente se introdujeron en la canastilla y con los parámetros anteriormente mencionados ya fijados se comenzó el estudio. La inmersión de la canastilla se consideró como tiempo cero ($t=0$) de la reacción y se extrajeron alícuotas de 4 ml en los tiempos 5, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300, 360, 420 y 480 min. Estas alícuotas fueron filtradas con filtro de $0,45 \mu\text{m}$ marca Microclar y el volumen extraído fue repuesto con la solución buffer correspondiente.

Bajo las mismas condiciones se estudió el perfil de disolución de comprimidos de ciprofloxacina para comparar el comportamiento cinético con las muestras sintetizadas.

II.4. MÉTODOS DE SÍNTESIS

Las muestras sintetizadas fueron obtenidas a través de los métodos tradicionales de síntesis de los HDL (Rives, 2001): coprecipitación o síntesis directa, intercambio iónico y reconstrucción. A continuación, se detalla para cada caso las técnicas utilizadas.

II.4.1. SÍNTESIS HDL-VANCOMICINA (HDL-VAN)

Las síntesis de estas muestras fueron llevadas a cabo mediante dos de los métodos especificados anteriormente: coprecipitación y reconstrucción.

II.4.1.1. COPRECIPITACIÓN

Este método, como fue detallado anteriormente, consiste en el agregado de una solución con una mezcla de metales di y trivalentes, en una determinada relación, al reactor de reacción conteniendo una solución del anión de interés que se quiere intercalar. Paralelamente, una segunda solución de una base es agregada simultáneamente para mantener constante el pH de síntesis.

En este caso, se prepararon dos muestras de HDL-VAN, variando la concentración del fármaco en la síntesis. Las mismas fueron $2,15 \times 10^{-2}$ M y $4,31 \times 10^{-2}$ M y corresponden al 32 % y 64 % de la solubilidad de la droga en agua respectivamente (P. Faustino, 2008). Teniendo en cuenta la magnitud de la carga estructural y la masa de HDL que se pretendió sintetizar, las concentraciones de fármaco empleadas excedieron con creces las cargas estructurales a neutralizar por los mismos en la fase sólida a preparar.

Para la síntesis de las muestras, 10 ml de una solución de $MgCl_2$ y $AlCl_3$ con una relación $[Mg^{2+}]/[Al^{3+}] = R = 2$ y concentraciones 1 M para cada sal fueron agregados a una velocidad de 3 ml/min con una bomba peristáltica Gilson minipulse 3, en un frasco de teflón conteniendo 10 ml de la solución de vancomicina. Paralelamente, se adicionó una solución de NaOH 2 M, cuya velocidad de goteo fue regulada de manera de mantener el pH de síntesis en un valor de 9. Una vez que se agregaron todos los

reactivos, la mezcla siguió bajo agitación, control de pH y burbujeo de nitrógeno durante 2 horas. El sólido obtenido fue separado por centrifugación, lavado con agua bidestilada hervida 4 veces y secado en estufa a 30 °C en aire.

Las muestras se llaman HDL-VAN-C1 y HDL-VAN-C2, siendo la primera obtenida con la solución de vancomicina de concentración $4,31 \times 10^{-2}$ M y la segunda con la concentración $2,15 \times 10^{-2}$ M.

II.4.1.2. RECONSTRUCCIÓN

El método de síntesis por reconstrucción consiste en una calcinación de un HDL sintetizado previamente, con el objetivo de remover el agua interlaminar, los aniones intercalados y los grupos hidroxilos, resultando en un óxido mixto. La reconstrucción de la estructura del HDL se produce por reinmersión de ese óxido mixto en una nueva solución acuosa, conteniendo ahora el anión de interés que se quiere intercalar (Zhi & Guo, 2005). En esa reinmersión el óxido mixto regenera el HDL, pero conteniendo el nuevo anión.

Para la síntesis por el método de reconstrucción, primeramente se sintetizó un HDL por el método de coprecipitación como fue descrito anteriormente, pero sin el fármaco a intercalar. La solución con $[Mg^{2+}]/[Al^{3+}] = R = 2$ y concentraciones 1 M de $MgCl_2$ y $AlCl_3$ fueron agregados a una solución 1 M de NaCl, al pH y en las condiciones ya descritas. El sólido obtenido fue un HDL con cloruros como aniones intercalados. Este sólido fue lavado, secado y calcinado a 550 °C.

Luego, 1 g del HDL calcinado fue agregado en un frasco de teflón conteniendo 50 ml de la solución del fármaco y se mantuvo bajo agitación, burbujeo de nitrógeno y un pH de 7. El tiempo total de síntesis fue de 24 horas. La muestra obtenida fue lavada con agua bidestilada hervida 4 veces y luego secada en estufa a 30 °C en aire.

Esta técnica fue llevada a cabo utilizando las mismas concentraciones del fármaco que en el método de coprecipitación: $4,31 \times 10^{-2}$ y $2,15 \times 10^{-2}$ M y fueron denominadas HDL-VAN-R₁ y HDL-VAN-R₂, respectivamente.

II.4.2. SÍNTESIS HDL-CIPROFLOXACINA (HDL-CIP)

Para la síntesis de muestras conteniendo ciprofloxacina como fármaco a intercalar se probaron 3 métodos de síntesis. A continuación, se detallarán las condiciones de cada caso.

II.4.2.1. COPRECIPITACIÓN

20 ml de una solución acuosa conteniendo $MgCl_2$ y $AlCl_3$ con $[Mg^{2+}]/[Al^{3+}] = R = 2$ y concentraciones 1 M de cada sal fueron agregadas a una velocidad de 0,75 ml/min dentro de un frasco de teflón conteniendo 1000 ml de una solución de ciprofloxacina 3 mM. Esta concentración es la máxima solubilidad del fármaco al pH de síntesis (Webb et al., 1998). Paralelamente al agregado de la mezcla de sales, se agregó una solución de NaOH 2 M para mantener el pH en un valor de 9,5. Una vez finalizado el agregado de los reactivos, el producto de la reacción siguió bajo agitación, control de pH y burbujeo de nitrógeno durante 1 hora. Luego, la muestra fue colocada en estufa para envejecimiento a 40 °C durante 70 horas.

El sólido obtenido fue separado por centrifugación, lavado 4 veces con agua bidestilada hervida y finalmente secado mediante liofilización. La muestra obtenida por este método fue denominada HDL-CIP-C.

II.4.2.2. RECONSTRUCCIÓN

Un HDL de Mg-Al intercalado con el ion carbonato (HDL- CO_3) fue preparado por el método de coprecipitación. La elección del este anión interlamina se basa en que es fácilmente eliminado por el proceso de calcinación (Millange et al., 2000). Para ello, una solución con $[Mg^{2+}]/[Al^{3+}] = R = 2$ y concentraciones de $MgCl_2$ y $AlCl_3$ 1 M fue agregada a un frasco de teflón conteniendo una solución de Na_2CO_3 2 M. La síntesis fue llevada a cabo con agitación y burbujeo de nitrógeno. El pH de síntesis se mantuvo en un valor de 10 con el agregado de una solución de NaOH 2 M. Posteriormente, a la muestra se le realizó un tratamiento hidrotermal a 70 °C durante 20 horas (Ang et al., 2019). El sólido

obtenido fue centrifugado, lavado con agua bidestilada hervida, secado en estufa a 60 °C y luego calcinado a 550 °C (Rocha et al., 1999).

Se pesaron 0,86 g de la muestra calcinada y se introdujeron en un recipiente de teflón conteniendo 2000 ml de una solución de ciprofloxacina 3,3 mM. La síntesis fue llevada a cabo a pH 10 con el objetivo de reconstruir la estructura del HDL y lograr la intercalación del fármaco. El pH fue mantenido, como siempre, con el agregado de una solución de NaOH 2 M. Todo el procedimiento fue llevado a cabo con agitación, burbujeo de nitrógeno y control de pH durante 1 hora. Posteriormente fue colocado en estufa a 40 °C durante 70 horas.

El sólido obtenido fue separado por centrifugación, lavado 4 veces con agua bidestilada hervida y finalmente secado por liofilización. Esta muestra se llamará HDL-CIP-R.

II.4.2.2. INTERCAMBIO IÓNICO

Este método se basa, como fue detallado anteriormente, en la síntesis de un HDL con un determinado anión interlaminar (Cl^- , NO_3^- , I^-) que luego es intercambiado por el anión de interés.

En este caso, se sintetizó un HDL por el método de coprecipitación con soluciones de MgCl_2 y AlCl_3 de concentración 1 M y con $[\text{Mg}^{2+}]/[\text{Al}^{3+}] = R = 2$. Estas fueron agregadas a un frasco de teflón conteniendo una solución 1 M de NaCl. Se mantuvo un pH de síntesis de 9 con el agregado en paralelo de una solución de NaOH 2 M, agitación y burbujeo con nitrógeno. El sólido obtenido fue lavado y secado en aire. La muestra se llamará HDL-Cl, y fue utilizada como precursor de la síntesis de la muestra con el fármaco.

Para obtener la nueva muestra con ciprofloxacina, 1,78 g de HDL-Cl fueron colocados en un recipiente de teflón con 750 ml de una solución 6,6 mM de ciprofloxacina y un valor de pH de 10,5 para inducir el intercambio iónico. El procedimiento fue llevado a cabo bajo agitación, burbujeo de nitrógeno y control de pH durante 2 horas. La mezcla resultante fue mantenida como suspensión durante 24 horas y luego el sólido fue separado por centrifugación, lavado con agua bidestilada hervida 4

veces y finalmente secada por liofilización. Esta muestra obtenida por intercambio iónico es llamada HDL-CIP-II.

II.4.3. SÍNTESIS HDL-VALPROATO (HDL-VAL)

En este caso sintetizamos una muestra de un HDL con el fármaco valproato intercalado en su estructura. Se utilizó el método de intercambio iónico.

II.4.3.1. INTERCAMBIO IÓNICO

En este caso como precursor se sintetizó un HDL con el ion nitrato como anión interlaminar. Para ello, se utilizó una solución de $Mg(NO_3)_2$ y $Al(NO_3)_3$ con una relación $[Mg^{2+}]/[Al^{3+}] = R = 2$. 25,6 g de $Mg(NO_3)_2$ y 18 g de $Al(NO_3)_3$ fueron disueltos en 50 ml de



Figura 2.4. Equipo de síntesis utilizado en HDL-VAL

agua bidestilada hervida y fueron agregados en conjunto al frasco de reacción con una solución de NaOH/NaNO₃ 2 M. De esta manera se mantuvo el pH de síntesis en un valor de 9,5. Todo el procedimiento fue llevado a cabo bajo atmósfera de nitrógeno, agitación y calentamiento con un equipo IKA RH digital KT/C a una temperatura de 50 °C. Una vez finalizado el procedimiento, se dejó bajo atmósfera de nitrógeno y a una temperatura de 70 °C durante 24 horas. Posteriormente, el sólido resultante se lavó con agua bidestilada hervida y se mantuvo en suspensión en un recipiente cerrado herméticamente bajo atmósfera de nitrógeno.

Para obtener la muestra con el fármaco intercalado, 100 ml de la suspensión de HDL-NO₃ (correspondiendo a 4,96 g de sólido) se colocaron en el recipiente de síntesis. Se colocó en la ampolla de decantación 50 ml de una solución de valproato de sodio 0,4 M, y se selló bajo atmósfera de nitrógeno. Cuando terminó el agregado del fármaco, se retiró la ampolla de decantación y se agregó el globo al equipo de síntesis. La presencia del globo inflado nos indica que el ambiente bajo atmósfera de nitrógeno se encuentra sellado y sin posibilidad de contaminación con carbonato. El pH de síntesis se mantuvo en un valor de 9,5 y se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 120 horas. Una vez finalizado el procedimiento, la dispersión resultante se centrifugó, se lavó con agua bidestilada hervida y se secó mediante liofilización.

En estas síntesis, se utilizó un equipamiento diferente a los procedimientos anteriores (Fig. 2.4), compuesto por: frasco reactor, ampolla de decantación de presión compensada y tubo refrigerante. De esta manera es posible mantener un ambiente hermético disminuyendo la potencial contaminación con el anión carbonato y brindando la posibilidad de trabajar a diferentes temperaturas.

II.5. MODELOS CINÉTICOS

Los datos obtenidos de las cinéticas de liberación de los fármacos y disolución de la estructura del HDL en el capítulo V expresan la cantidad de principio activo y Mg liberado en función del tiempo. Para ello, diferentes modelos cinéticos se utilizaron con el fin de determinar cuál es la ecuación de velocidad que mejor se ajuste a estos

resultados experimentales (Abdul Amir et al., 2016; Sandoval et al., 2008). Los modelos utilizados fueron:

- **Cinética de orden cero:** donde la velocidad de liberación no depende de la concentración del fármaco. Se encuentra expresada por la siguiente fórmula:

$$Q = kt \quad (2.3)$$

donde Q es la cantidad de fármaco liberado, k es la constante de velocidad y t es el tiempo.

- **Cinética Higuchi:** fue uno de los primeros modelos matemáticos con el objetivo de describir la liberación de un fármaco desde una matriz. Se describe como:

$$Q = kt^{1/2} \quad (2.4)$$

donde Q es la cantidad de fármaco liberado al tiempo t, y k es la constante de Higuchi (Higuchi, 1961).

- **Cinética de pseudo primer orden:** este modelo es definido por la siguiente ecuación:

$$Q = Q_e(1 - e^{-kt}) \quad (2.5)$$

donde Q es la cantidad de fármaco al tiempo t, Q_e es la cantidad de fármaco liberado en el equilibrio y k es la constante de velocidad.

- **Cinética de pseudo segundo orden:** esta ecuación se encuentra representada por la fórmula:

$$\frac{t}{Q} = \frac{1}{Q_e k} + \frac{t}{Q_e} \quad (2.6)$$

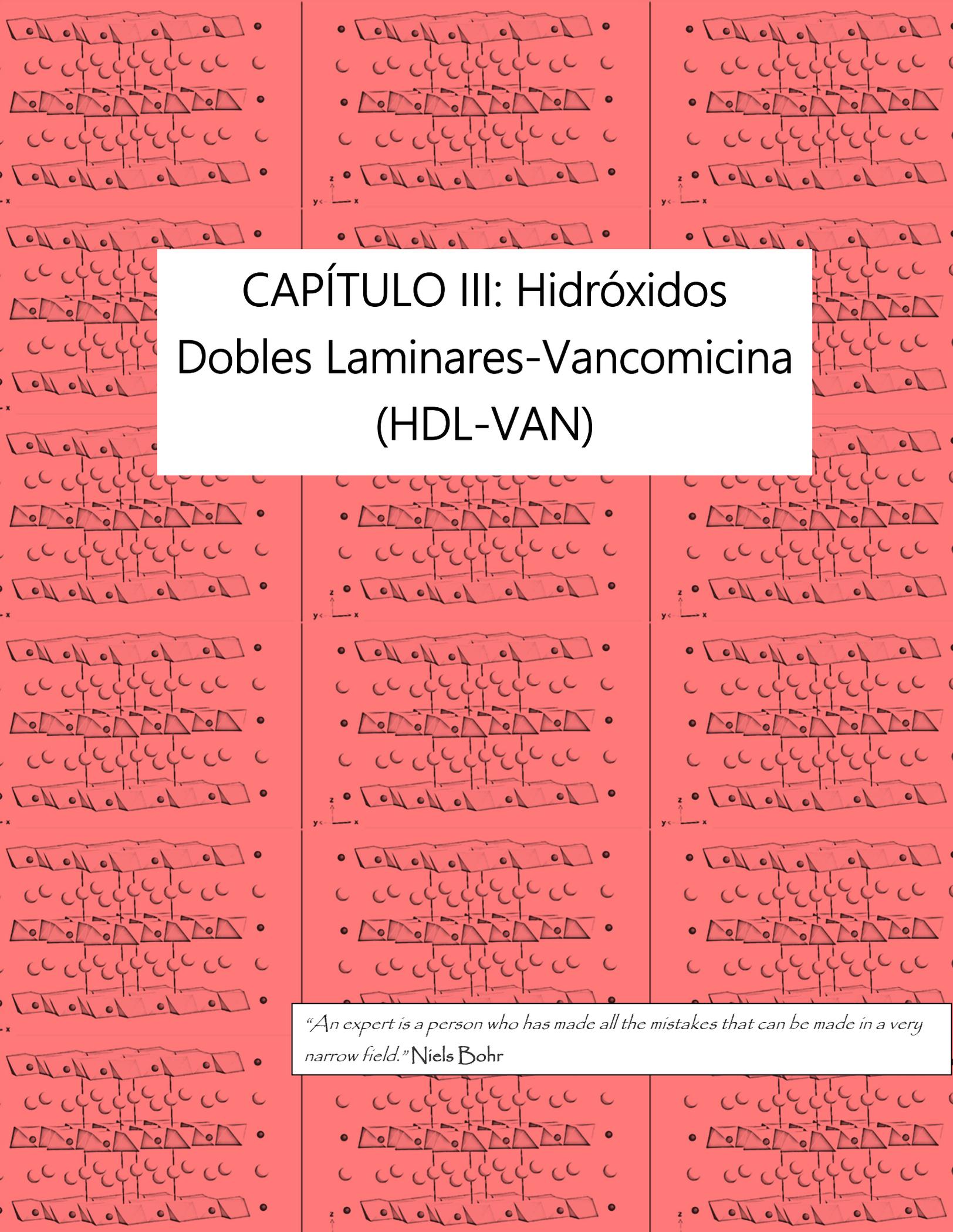
donde Q es la cantidad de fármaco liberado al tiempo t y Q_e es la cantidad de fármaco en el equilibrio y k es la constante de velocidad (Kumar et al., 2010).

II.6. REFERENCIAS

- Abdul Amir, Y. K., Alsouz, M. A. K., & Salim, A. J. (2016). Formulation and evaluation of controlled release cefixime-cmc biopolymer using ion cross linking technique. *International Journal of Chemical Sciences*, *14*(2), 874–890.
- Aguilera, L. J., Palacio, L. A., & Faro, A. C. (2019). Synthesis of NiAl layered double hydroxides intercalated with aliphatic dibasic anions and their exchange with heptamolybdate. *Applied Clay Science*, *176*, 29–37. <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2019.04.021>.
- Ang, H., Wu, Y., Wang, X., Hu, B., & Wang, X. (2019). Recent Advances in Composites of Graphene and Layered Double Hydroxides for Water Remediation: A Review. *Chem. Asian J*, *14*, 2542–2552. <https://doi.org/10.1002/asia.201900493>.
- Bychkova, A. V., Lopukhova, M. V., Wasserman, L. A., Degtyarev, Y. N., Kovarski, A. L., Chakraborti, S., & Mitkevich, V. A. (2022). The influence of pH and ionic strength on the interactions between human serum albumin and magnetic iron oxide nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, *194*, 654–665. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.11.110>.
- Clas, S. D., Dalton, C. R., & Hancock, B. C. (1999). Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, *2*(8), 311–320. [https://doi.org/10.1016/S1461-5347\(99\)00181-9](https://doi.org/10.1016/S1461-5347(99)00181-9).
- Drenth, J. (University of G. (2002). X-Ray Diffraction: Principles. In *Encyclopedia of life sciences*. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002721>.
- Higuchi, T. (1961). Rate of Release of Medicaments from Ointment Bases Containing Drugs in Suspension. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *50*(10), 874–875. <https://doi.org/10.1002/JPS.2600501018>.
- Kumar, K. V., Khaddour, I. A., & Gupta, V. K. (2010). A pseudo second-order kinetic expression for dissolution kinetic profiles of solids in solutions. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, *49*(16), 7257–7262. <https://doi.org/10.1021/ie1010228>.
- Le Parlouër, P. (1987). Simultaneous TG-DSC: a new technique for thermal analysis. *Thermochimica Acta*, *121*(C), 307–322. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(87\)80181-8](https://doi.org/10.1016/0040-6031(87)80181-8).

- Millange, F., Walton, R. I., & O'Hare, D. (2000). Time-resolved in situ X-ray diffraction study of the liquid-phase reconstruction of Mg–Al–carbonate hydroxalcalite-like compounds. *Journal of Materials Chemistry*, 10(7), 1713–1720. <https://doi.org/10.1039/b002827o>.
- P. Faustino. (2008). Vancomycin solubility study. In *Report to office of generic drugs-division of product quality research office of testing and research for drug evaluation and research food and drug administration*.
- Rives, V. (2001). *Layered Double Hydroxides- Past, present and Future*.
- Rocha, J., Rives, V., & Ulibarri, M. A. (1999). Reconstruction of layered double hydroxides from calcined precursors: a powder XRD and ²⁷Al MAS NMR study. *Journal of Materials Chemistry*, 3, 2499–2503. <https://doi.org/10.1039/A903231B>.
- Sandoval, P. A., Baena, Y., Aragón, M., Rosas, J. E., & Ponce D 'león, L. F. (2008). Mecanismos generales de cesión de principios activos a partir de matrices monolíticas hidrofílicas preparadas con éteres de celulosa. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm*, 37(2), 105–121. www.farmacia.unal.edu.co.
- Sze, A., Erickson, D., Ren, L., & Li, D. (2003). Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current–time relationship in electroosmotic flow. *Journal of Colloid and Interface Science*, 261(2), 402–410. [https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(03)00142-5).
- Theophanides, T. (2012). Introduction to Infrared Spectroscopy. In *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology* (pp. 1–10). <https://doi.org/10.5772/49106>.
- Uvarov, V., & Popov, I. (2007). Metrological characterization of X-ray diffraction methods for determination of crystallite size in nano-scale materials. *Materials Characterization*, 58(10), 883–891. <https://doi.org/10.1016/J.MATCHAR.2006.09.002>.
- Webb, M. S., Boman, N. L., Wiseman, D. J., Saxon, D., Sutton, K., Wong, K. F., Logan, P., & Hope, M. J. (1998). Antibacterial efficacy against an in vivo Salmonella typhimurium infection model and pharmacokinetics of a liposomal ciprofloxacin formulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(1), 45–52. <https://doi.org/10.1128/aac.42.1.45>.
- Zhi, P. X., & Guo, Q. L. (2005). Hydrothermal synthesis of layered double hydroxides

(LDHs) from mixed MgO and Al₂O₃: LDH formation mechanism. *Chemistry of Materials*, 17(5), 1055–1062. <https://doi.org/10.1021/cm048085g>.



CAPÍTULO III: Hidróxidos
Dobles Laminares-Vancomicina
(HDL-VAN)

"An expert is a person who has made all the mistakes that can be made in a very narrow field." Niels Bohr

La resistencia antimicrobiana es reconocida como uno de los principales problemas de la salud pública, ya que impacta en todas las áreas de la salud y afecta a toda la sociedad (Frieri et al., 2017; World Health Organization, 2015). Este problema es atribuido al sobreuso y mal uso de los antibióticos y a la falta de desarrollo de nuevos fármacos por la industria farmacéutica (MacGowan & Macnaughton, 2017; Ventola, 2015). Para evitar la resistencia antimicrobiana es necesario enfocarse en un uso racional y efectivo de los fármacos ya disponibles. Una terapia racional requiere optimizar regímenes de dosaje (dosis, intervalos, duración del tratamiento, ruta y condiciones de administración), no solo para garantizar la eficacia clínica, sino también para minimizar la propagación y selección de patógenos resistentes (Li et al., 2012; Toutain et al., 2002).

Los regímenes de dosificación pueden ser optimizados con un sistema de liberación controlada, el cual ofrece numerosos avances en comparación con la forma convencional, mejorando la eficacia, reduciendo la toxicidad, incrementando la actividad terapéutica y reduciendo el número de administraciones durante el tratamiento (Huh & Kwon, 2011; Uhrich et al., 1999).

El objetivo de este trabajo es sintetizar compuestos de HDL a través de los métodos de coprecipitación y reconstrucción en presencia de vancomicina como el anión a intercalar. Este antibiótico, ampliamente usado en infecciones severas hospitalarias, es un glucopeptido tricíclico producido por *Streptococcus orientalis*. La administración oral del mismo usualmente requiere de 4 dosis por día, el cual puede ser reemplazado por una toma diaria con el correcto material desarrollado para su liberación controlada. La absorción/adsorción de vancomicina y su posterior liberación desde los compuestos sintetizados son estudiados en este capítulo. La cantidad de vancomicina liberada en función del tiempo (cinética) es usada para comprender el estado (adsorbido, intercalado o agregado) del fármaco en la estructura del HDL.

III.1. VANCOMICINA

La estructura optimizada de la molécula vancomicina obtenida por cálculos DFT es mostrada en la Figura 3.1. Esta puede ser imaginada como una molécula triangular y plana, siendo sus medidas 23,17 Å, 22,95 Å, 23,04 Å y un espesor de 4,28 Å. No existen reportes en la literatura de estos cálculos de estructura y geometría. Estos resultados obtenidos por cálculos DFT serán de ayuda para interpretar si la molécula se intercala en el HDL o si es adsorbida en la superficie de la estructura.

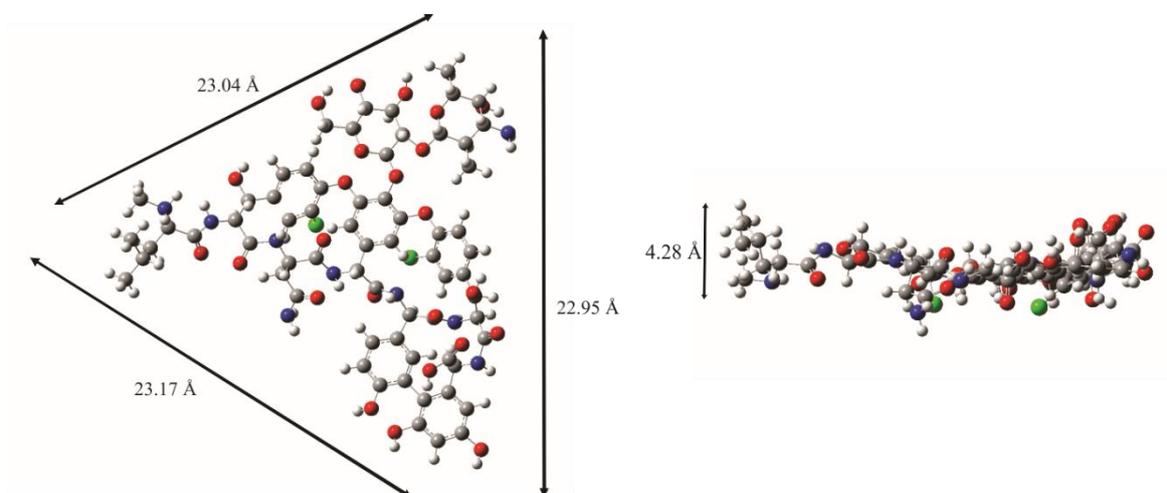


Figura 3.1. Molécula de vancomicina neutra optimizada. Figura izquierda: vista desde arriba. Figura derecha: vista desde un costado. Esferas rojas: oxígeno; esferas grises: carbono; esferas blancas: hidrógeno; esferas verdes: cloro y esferas azules: nitrógeno.

La molécula de vancomicina contiene varios grupos funcionales en su estructura, capaces de unirse al HDL o de liberar protones dependiendo del pH de la solución. Posee un grupo carboxilato, dos aminas y tres fenoles. Las reacciones de protonación-desprotonación de esos grupos generan cargas positivas y negativas en la molécula, resultando en una carga neta que varía con el pH. Los valores de pKa reportados por Jia et al. fueron: 2,2, 7,8, 8,9, 9,6, 10,4 y 12 para los grupos descritos anteriormente (Jia et al., 2013). La Figura 3.2 muestra la distribución de especies en base a estos valores, y podemos observar que predomina su forma aniónica en los valores de pH de síntesis asegurándonos la interacción con la estructura del HDL.

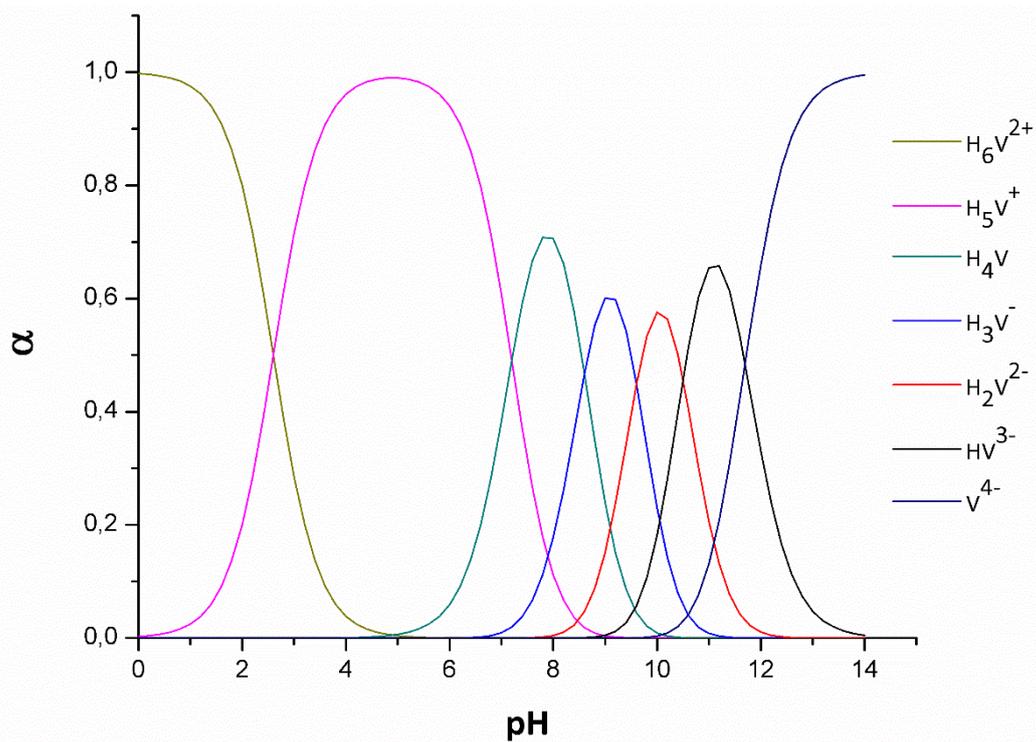


Figura 3.2. Distribución de especies de vancomicina

III.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS HDL-VAN

La composición química y las fórmulas químicas teóricas de las 4 muestras de HDL-VAN estudiadas y de la muestra HDL-Cl están detalladas en la Tabla 3.1. El contenido de agua molecular que se informa fue obtenido a partir de los datos de termogravimetría. Las 4 muestras con vancomicina muestran una composición similar, con una relación Mg/Al cerca de 3, el cual es un valor mayor a la relación utilizada en la síntesis. Obtener una relación Mg/Al de 3 partiendo de una relación Mg/Al de 2 es algo a resaltar. En la mayoría de las publicaciones, la relación M(II)/M(III) obtenida experimentalmente es cercana a la relación M(II)/M(III) utilizada en las soluciones iniciales de síntesis, especialmente cuando son intercalados aniones inorgánicos como nitratos, cloruros o carbonatos. De hecho, para el HDL sintetizado inicialmente con una relación Mg/Al de 2, en ausencia de vancomicina, experimentalmente dio como resultado una relación de 1,8 (Tabla 3.1).

Muestra	% Mg	% Al	% C	% N	% Cl	% H ₂ O	% VAN	Fórmula Química
HDL	23,98	15,25	1,25	-	1,56	13,90	-	[Mg _{0,64} Al _{0,36} (OH) ₂]Cl _{0,03} (CO ₃) _{0,01} . (OH) _{0,31} .0,50H ₂ O
HDL- VAN-C ₁	12,32	4,97	19,73	2,94	1,05	18,52	34	[Mg _{0,73} Al _{0,27} (OH) ₂]Cl _{0,04} (CO ₃) _{0,16} VAN _{0,03} .1,48H ₂ O
HDL- VAN-C ₂	17,51	6,53	13,13	1,89	0,83	17,51	22	[Mg _{0,75} Al _{0,25} (OH) ₂]Cl _{0,02} (CO ₃) _{0,11} VAN _{0,02} .H ₂ O
HDL- VAN-R ₁	9,70	3,55	37,97	5,87	0,38	13,89	69	[Mg _{0,75} Al _{0,25} (OH) ₂]Cl _{0,02} (CO ₃) _{0,18} VAN _{0,09} .1,45H ₂ O
HDL- VAN-R ₂	9,41	3,13	37,53	5,89	0,52	16,71	69	[Mg _{0,77} Al _{0,23} (OH) ₂]Cl _{0,03} (CO ₃) _{0,10} VAN _{0,09} .1,84H ₂ O

Tabla 3.1. Composición elemental, contenido de agua interlaminar y Fórmula teórica de las muestras estudiadas.

Hay, sin embargo, algunos reportes en la literatura donde la relación M(II)/M(III) cambia significativamente al trabajar con aniones orgánicos. Vucelic et al., por ejemplo, comenzó la síntesis con una relación Mg/Al de 2 en la mezcla de reactivos y obtuvo una relación igual a 3 usando como aniones benzoato y tereftalato (Vucelic et al., 1995). Rojas et al., por otra parte, comenzó la síntesis con una relación Mg/Al de 3, y obtuvo relaciones cercanas a 2,4-2,5 usando ketoprofeno e ibuprofeno como aniones, respectivamente (Rojas et al., 2014).

No hay una clara explicación en la literatura con respecto a este comportamiento. Acorde a lo publicado por Vucelic et al., este cambio en la relación Mg/Al se da cuando la muestra es sometida a un tratamiento hidrotermal ya que una relación Mg/Al de 3 es más estable termodinámicamente. Sin embargo, ninguna de las 4 muestras que sintetizamos fueron sometidas a un tratamiento hidrotermal, por lo que es necesario otra explicación. Una posibilidad es que los aniones orgánicos que poseen grupos funcionales como carboxilatos en la vancomicina, benzoato, etc. se unan selectivamente a especies de Al³⁺ en solución. Esta unión preferencial por el Al sobre el Mg impediría que una fracción de los iones Al³⁺ estén disponibles para la síntesis del HDL y, por lo tanto, aumente la relación Mg/Al en la fase sólida formada. Esta es una interesante hipótesis que deberá ser explorada en posteriores estudios.

La información sobre la composición de las muestras confirma la presencia de vancomicina, donde aquellas obtenidas por el método de reconstrucción presentan un mayor contenido del fármaco que las obtenidas por coprecipitación. El porcentaje en peso se encuentra entre el 22 % y 69 %, indicando una gran cantidad del antibiótico en las muestras. Sería interesante comparar esos contenidos con las cantidades de vancomicina usadas en las soluciones de las síntesis. Pero esa comparación se torna dificultosa ya que no es fácil calcular el contenido del fármaco esperado debido a que no todo el Al y Mg participa en la reacción. A pesar de esto, se pueden realizar algunos simples cálculos para tener una idea aproximada de la cantidad de vancomicina esperada. Por ejemplo, para la muestra HDL-VAN-C1, asumiendo que todo el Al, Mg y vancomicina usados en la síntesis terminan formando parte de la muestra, el porcentaje del antibiótico se encontraría en un 46 %. El hecho de que en la muestra HDL-VAN-C1 el 34 % corresponda al fármaco indica que una fracción inicial de éste permaneció en la solución o fue fácilmente removido durante el procedimiento de lavado. Esta cantidad podría ser la responsable de capturar los iones Al^{3+} que luego no formaron parte de la estructura del HDL, como fue descrito en el párrafo anterior. Las mismas conclusiones se alcanzan analizando la composición de las otras muestras obtenidas. Aunque en todas las muestras las cantidades del fármaco fueron menores que las esperadas, siguen siendo importantes desde un punto de vista clínico, por lo que son materiales prometedores cuya capacidad de liberar el antibiótico debe ser estudiada.

La Tabla 3.1 muestra que todas las muestras contienen CO_3^{2-} , que proviene originalmente del CO_2 atmosférico. Esta contaminación con carbonato es bastante común en las síntesis de los HDL (Johnston et al., 2021). En todos los casos, la carga negativa total que aportan los iones CO_3^{2-} y Cl^- es suficiente para compensar la carga positiva de las láminas, sugiriendo que el fármaco no influye en la compensación de estas cargas. El estado de la vancomicina en estas muestras estudiadas será discutido posteriormente.

La Figura 3.3 y la Tabla 3.2 muestran los difractogramas, la información con respecto a la posición de los picos característicos de los HDL y los parámetros cristalográficos (a y c) de las muestras estudiadas.

Muestras	Posición pico ($2\theta/^\circ$)	$d_{(003)}$ (Å)	a (Å)	c (Å)
HDL	11,4	7,72	3,04	23,16
HDL-VAN-C ₁	11,0	8,03	3,04	24,09
HDL-VAN-C ₂	10,8	8,15	3,04	24,45
HDL-VAN-R ₁	11,2	7,91	3,05	23,73
HDL-VAN-R ₂	11,3	7,83	3,05	23,49

Tabla 3.2. Posición del pico del plano (003), espaciado interplanar del plano (003) (d_{003}) y parámetros cristalográficos (a y c) de las muestras estudiadas.

El valor del parámetro a se obtiene de $a=2d_{(110)}$ y corresponde a la distancia entre los 2 cationes metálicos y su valor indica el radio de los mismos. También se ha indicado que con este valor podemos inferir la relación entre los metales M(II)/M(III), y que el valor de $a= 3.04 \text{ \AA}$ corresponde a una relación M(II)/M(III)=2 (Rives, 2001). Esto se corresponde con los valores del HDL basal, pero no para las otras muestras con el fármaco. Evans et al. explica que como este valor se obtiene del plano (110), que suele ser una señal débil y hasta puede estar solapada por el plano (113), los valores de a obtenidos por este método pueden ser imprecisos (Evans & Slade, 2006).

El parámetro c, se obtiene de $c=3d_{(003)}$ y corresponde a 3 veces la distancia de una lámina a otra. Por lo tanto dependerá del espesor de la lámina y de la altura del espaciado interlaminar, definida por el espacio entre dos láminas consecutivas (Li et al., 2005).

Los difractogramas de la Figura 3.3 muestran que en todas las muestras sintetizadas aparecen los planos típicos de una hidrotalcita, confirmando la formación de la estructura del HDL (Rocha et al., 1999). La presencia de vancomicina en las muestras no cambió las posiciones del plano (003) en comparación con el HDL sin fármaco, sugiriendo que el mismo no fue intercalado en la estructura del HDL. Se ve claramente que las muestras que contienen vancomicina exhiben reflexiones más amplias que el HDL puro. Esto puede ser observado, por ejemplo, para el plano (003) ($11^\circ 2\theta$) donde el ancho del pico a la mitad de altura (en inglés FWHM) es $0,66^\circ 2\theta$ para el HDL puro y entre $0,86^\circ$ y $0,96^\circ 2\theta$ para las muestras con el fármaco. Estos resultados revelan menos cristalinidad en las muestras HDL-VAN sugiriendo que la presencia de la vancomicina resulta en una mayor desorganización del “apilado” de las láminas. Este

desorden en el apilamiento se puede categorizar en: HDL puro < HDL-VAN-C < HDL-VAN-R.

La ecuación de Scherrer es normalmente usada en los sólidos cristalinos para estimar el tamaño promedio de los cristales que difractan en los rayos X (Li et al., 2005; Zhao et al., 2002). Esta ecuación fue detallada en la sección II.2.4. y la aplicación de esta fórmula a la reflexión correspondiente al plano (003) del HDL puro da un espesor de 118 Å, indicando un apilamiento de 16 láminas en promedio del cristal. Para las muestras HDL-VAN-C1 y HDL-VAN-C2 el espesor del cristal fue de 81 Å (10 láminas) y 91 Å (11 láminas), respectivamente. Para las muestras HDL-VAN-R1 y HDL-VAN-R2 la ecuación de Scherrer no pudo ser aplicada debido a la poca cristalinidad de las muestras y por lo tanto los resultados no son confiables.

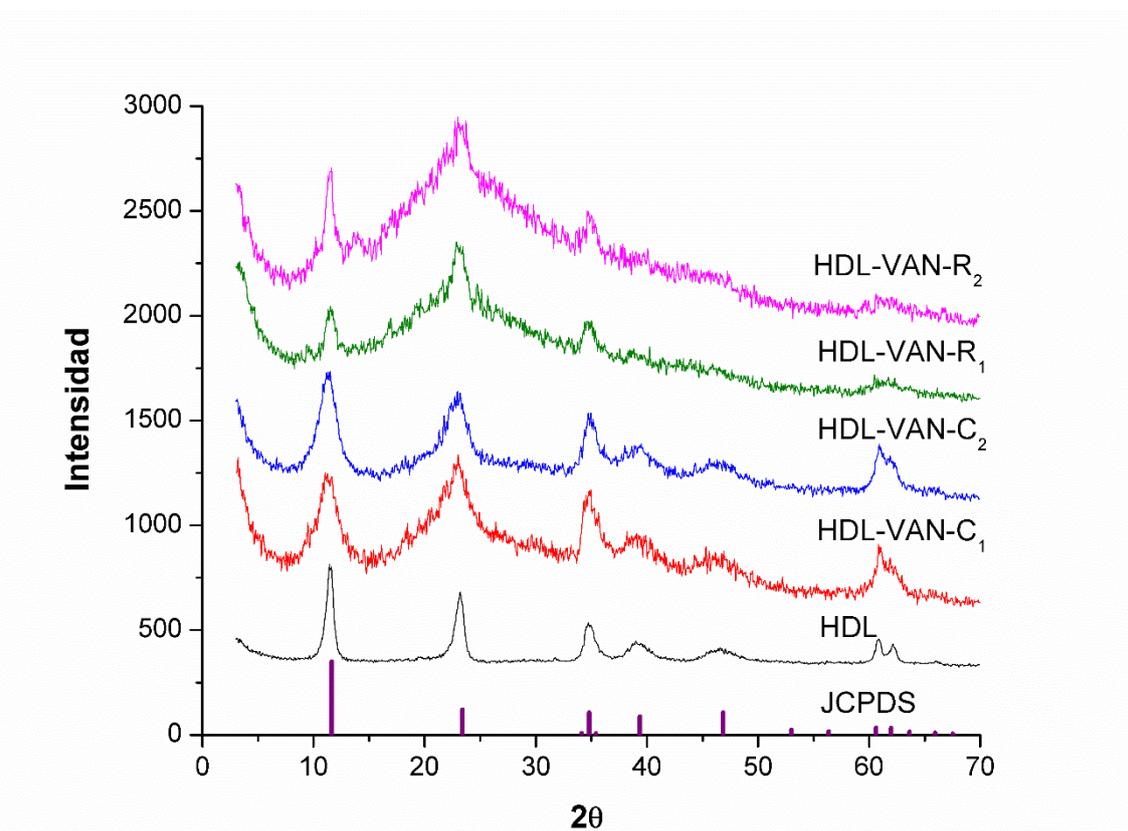


Figura 3.3. Difractogramas de las muestras estudiadas y su referencia con el patrón del Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS), mostrando los ángulos típicos de difracción de una hidrotalcita.

Los espectros FTIR de las muestras son mostrados en la Figura 3.4. El espectro de la vancomicina muestra las bandas típicas a $2700-3500\text{ cm}^{-1}$, 1655 cm^{-1} , 1505 cm^{-1} , 1230 cm^{-1} y 1065 cm^{-1} , correspondiendo al estiramiento del grupo hidroxilo (OH), estiramiento del grupo carbonilo (C=O), estiramiento de la unión doble del enlace C-C (C=C), flexión del enlace O-H del grupo fenol y el estiramiento C-N de una amina, respectivamente (Yang et al., 2015; Zarif et al., 2012). El HDL puro muestra una banda en el rango $2700-3500\text{ cm}^{-1}$ que corresponde al estiramiento del grupo OH, una banda a 1356 cm^{-1} debido al estiramiento asimétrico del grupo carbonato (CO_3^{2-}) y varias bandas en el rango de $450-650\text{ cm}^{-1}$ correspondientes a las vibraciones de la unión Mg-O (Aramendía M., 1999; Obadiah et al., 2012). A partir de los resultados mostrados en la Figura 3.4, se puede observar que las muestras HDL-VAN poseen las bandas características tanto del HDL como del fármaco, confirmando la presencia de ambos.

Los gráficos de los análisis termogravimétricos y de calorimetría diferencial de barrido de todas los sólidos son mostrados en el Figura 3.5. La muestra del HDL puro muestra 4 pérdidas de peso, estando las dos primeras (que suman una pérdida de 16,4

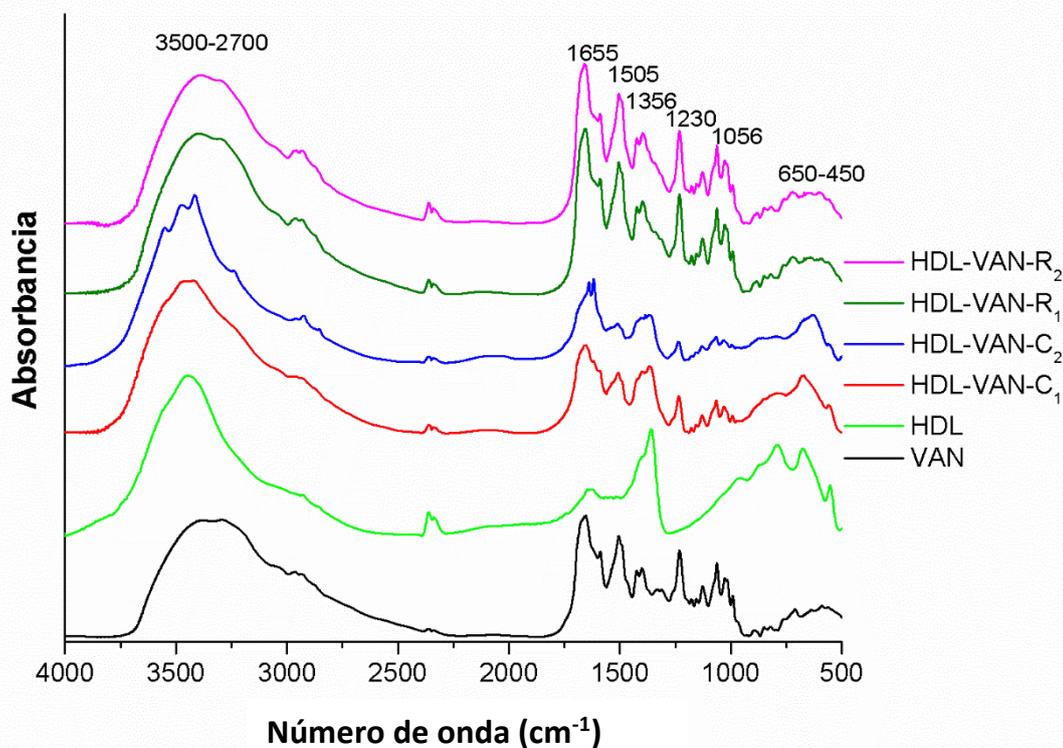


Figura 3.4. FTIR de vancomicina, HDL puro y las muestras HDL-VAN

%) comprendidas entre la temperatura ambiente y 220 °C, y que corresponden principalmente a la pérdida de agua libre y agua superficial. Las otras dos transiciones (que suman 27,9 %) ocurren entre 220 °C y 700 °C correspondiendo a la pérdida de agua interlaminar y deshidroxilación. La pérdida total de masa a 1000 °C fue de 47,3 %. Estos datos coinciden con lo descrito en la literatura (Prinetto et al., 2000). El perfil de la vancomicina muestra un pico endotérmico con una pérdida de masa del 9 % en un rango que va desde la temperatura ambiente hasta 196 °C, atribuido a un proceso de deshidratación y fusión del fármaco. La principal transición corresponde a la degradación del mismo, vista como dos picos exotérmicos a 341 °C y 473 °C y una degradación completa a temperaturas superiores a 626 °C. Los análisis TG y DSC de las muestras HDL-VAN muestran pérdidas de peso asociadas a procesos endotérmicos a baja temperatura, pero aquellos que corresponden a la evaporación del agua interlaminar se encuentran solapados con los procesos exotérmicos de degradación del fármaco. El peso total perdido para HDL-VAN-C1, HDL-VAN-C2, HDL-VAN-R1 y HDL-VAN-R2 fueron respectivamente 69,69 %, 61,97 %, 83,30 % y 89,98 %. Las menores pérdidas de masa en las muestras obtenidas por el método de coprecipitación se deben a su menor contenido del fármaco. Es importante remarcar que en las muestras obtenidas por coprecipitación el pico exotérmico a 341 °C no se detectó, mientras que el pico exotérmico a 473 °C se desplazó a temperaturas más altas (493 °C y 524 °C) en la muestra HDL-VAN-C1 y a temperaturas aún mayores (508 °C y 542 °C) para la muestra HDL-VAN-C2. Esto apunta a una acción protectora del HDL, que hace que la degradación ocurra a temperaturas mayores que cuando el fármaco está puro. Este efecto no es tan evidente para las muestras obtenidas por el método de reconstrucción, donde las transiciones a 341 °C y 473 °C se siguen observando. Tales resultados evidencian que la disposición del fármaco en la estructura de los HDL obtenidos por reconstrucción y por coprecipitación es diferente. Esto será discutido posteriormente.

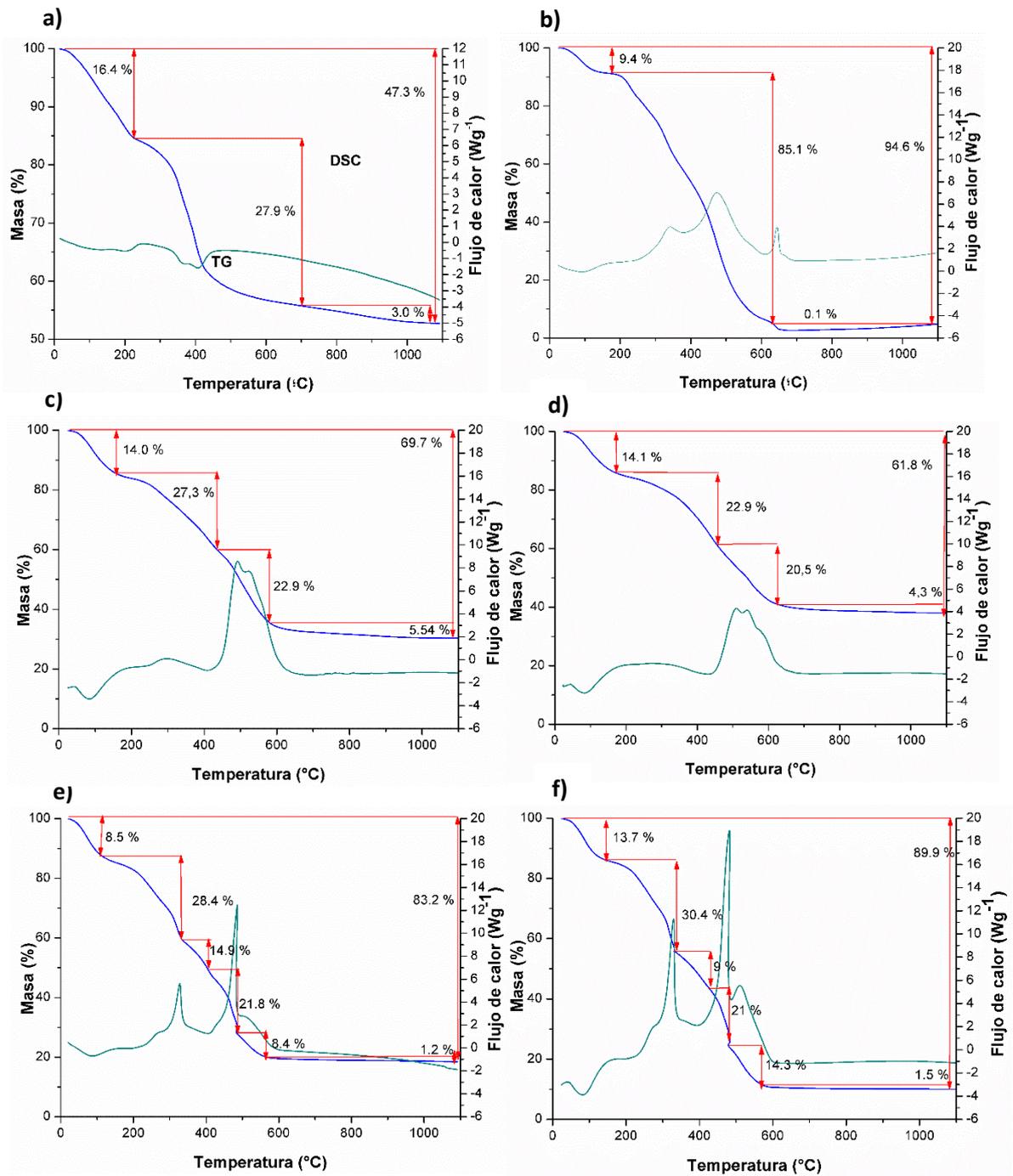


Figura 3.5. Gráficos de los análisis TG y DSC de: a) HDL puro, b) VAN, c) HDL-VAN-C1, d) HDL-VAN-C2, e) HDL-VAN-R1, f) HDL-VAN-R2

Las imágenes SEM de las muestras obtenidas por coprecipitación y reconstrucción se muestran en la Figura 3.6, con distintas magnificaciones.

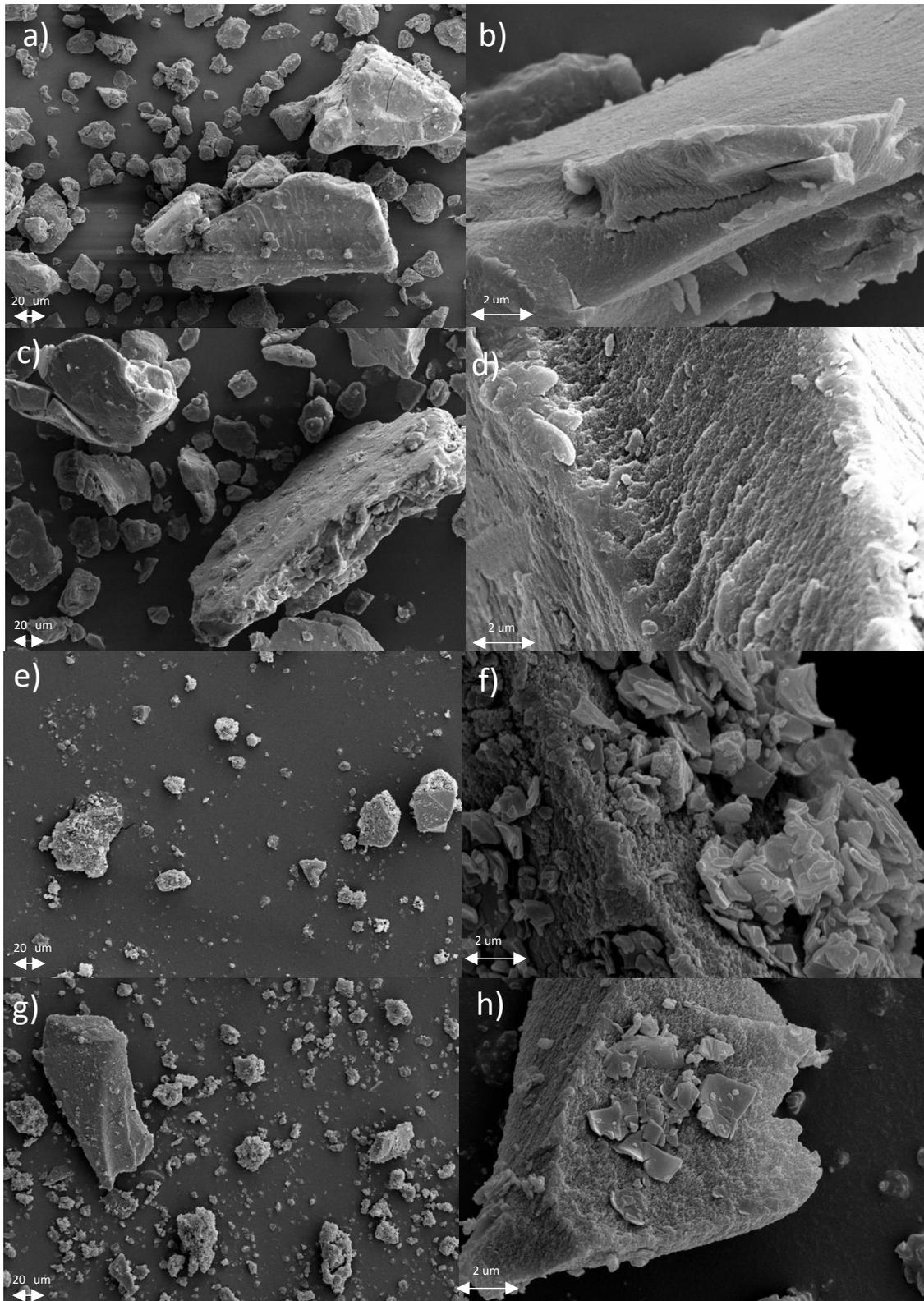


Figura 3.6. Imágenes SEM a distintas magnificaciones de: a-b) HDL-VAN-C1; c-d) HDL-VAN-C2; e-f) HDL-VAN-R1; g-h) HDL-VAN-R2.

Las magnificaciones elegidas en la Figura 3.6 fueron seleccionadas porque muestran claramente las características de los HDL obtenidas por ambos métodos. Se observan partículas de distinta forma y tamaño en todas las muestras, teniendo las obtenidas por el método de coprecipitación un tamaño de 10-200 μm y las obtenidas por el método de reconstrucción entre 10-50 μm .

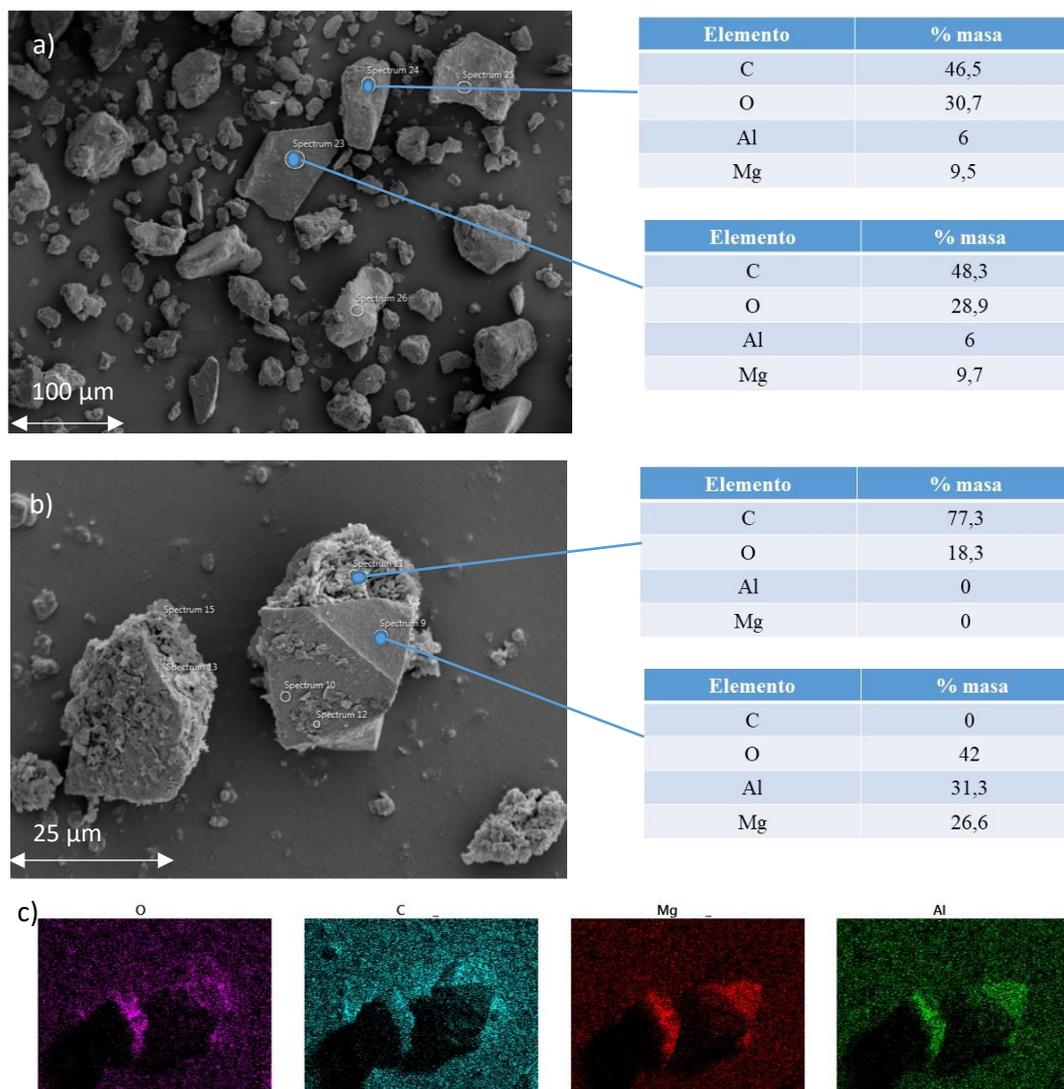


Figura 3.7. SEM y EDS de las muestras: a) HDL-VAN-C1; b) HDL-VAN-R2. Las líneas indican el lugar donde se hacen los análisis EDS, con sus respectivos valores al lado. c) Mapeo elemental de la muestra HDL-VAN-R1.

La Figura 3.7 muestra las imágenes SEM de las muestras HDL-VAN-C1 y HDL-VAN-R1 con una composición elemental aproximada estimada por EDS. Ambas imágenes son representativas de las muestras obtenidas por coprecipitación y reconstrucción. Los

análisis EDS, si bien son cualitativos, muestran una composición similar y homogénea en las muestras obtenidas por coprecipitación, pero no en el caso de las muestras obtenidas por reconstrucción. Por ejemplo, la Figura 3.7-b) muestra un cristal poliédrico de aproximadamente 20 μm de tamaño con un agregado de partículas unidas. El cristal está compuesto principalmente por Al, Mg y O, lo cual es característico de la composición de los HDL, y el agregado de partículas está compuesto principalmente por C y O y que correspondería a agregados de vancomicina. Si bien puede que el fármaco se encuentre en parte adsorbido a la estructura del HDL, las imágenes SEM y el análisis EDS muestran dos fases sólidas bien diferenciadas; una correspondiente a la estructura del HDL y la otra correspondiente a la vancomicina. Por el contrario, los datos de composición por EDS no presentaron variaciones importantes en los diferentes puntos analizados. Un ejemplo de ello se presenta con la Figura 3.7-a).

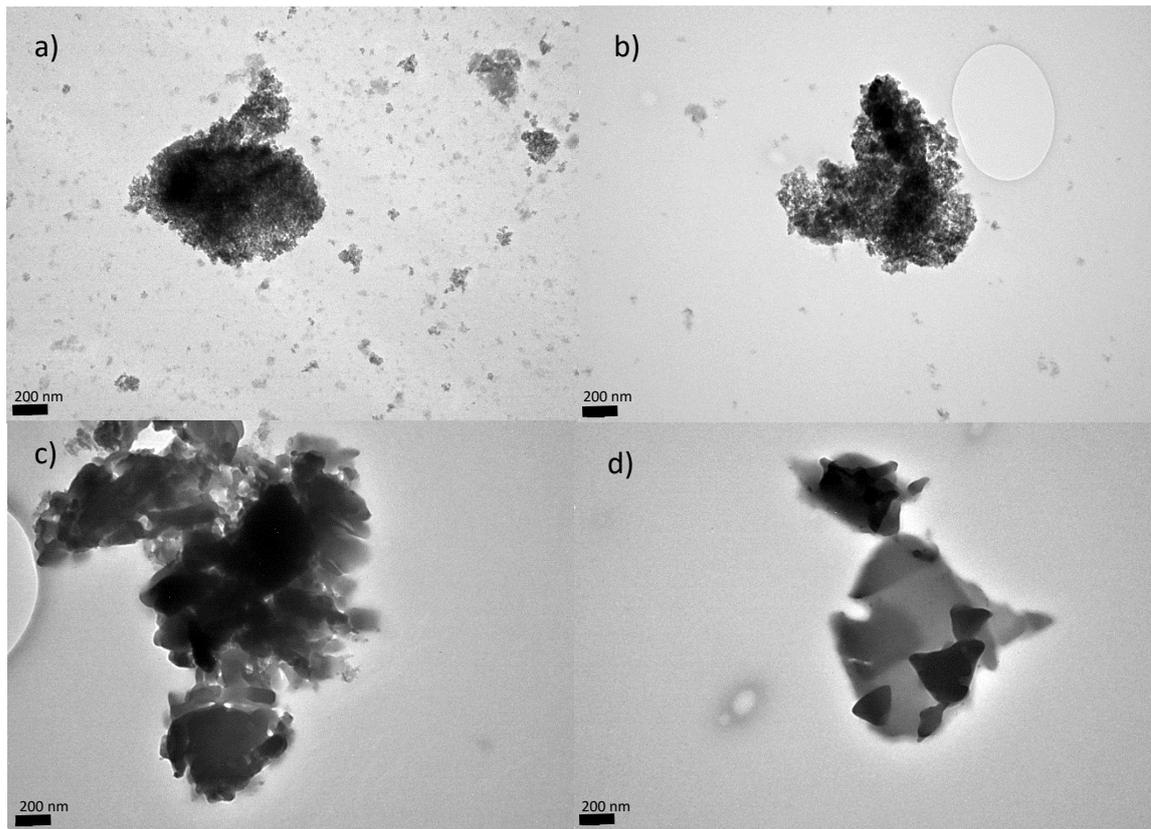


Figura 3.8. Imágenes TEM a) HDL-VAN-C1; b) HDL-VAN-C2; c) HDL-VAN-R1; d) HDL-VAN-R2

La Figura 3.8 muestra las imágenes TEM de las muestras estudiadas. En las muestras obtenidas por coprecipitación los tamaños de las láminas van desde 10 nm a 300 nm, y se encuentran formando agregados. En las muestras por reconstrucción el tamaño de las láminas se ubica entre los 100 nm y 400 nm, y las láminas se presentan con formas irregulares.

La Figura 3.9 muestra el potencial zeta (ζ) de las muestras estudiadas en función del pH. El HDL puro muestra un ζ positivo en todo el rango de pH estudiado, con un valor casi constante de entre 33 y 39 mV hasta un pH de 11, que luego decrece significativamente, sin llegar a hacerse negativo. El punto isoeléctrico (PIE) se ubicaría por encima de un valor de 12,5, lo cual es normal para este tipo de muestras (Rojas Delgado et al., 2008). La presencia de la vancomicina disminuye el potencial en todo el rango de pH, y los cambios son acordes a la concentración del fármaco. Las muestras obtenidas por coprecipitación, con un contenido de 0,02-0,03 moles por unidad fórmula tienen un PIE alrededor de 10, mientras que las muestras obtenidas por reconstrucción, con una concentración de 0,09 moles por unidad fórmula tienen un PIE cerca de 6. El

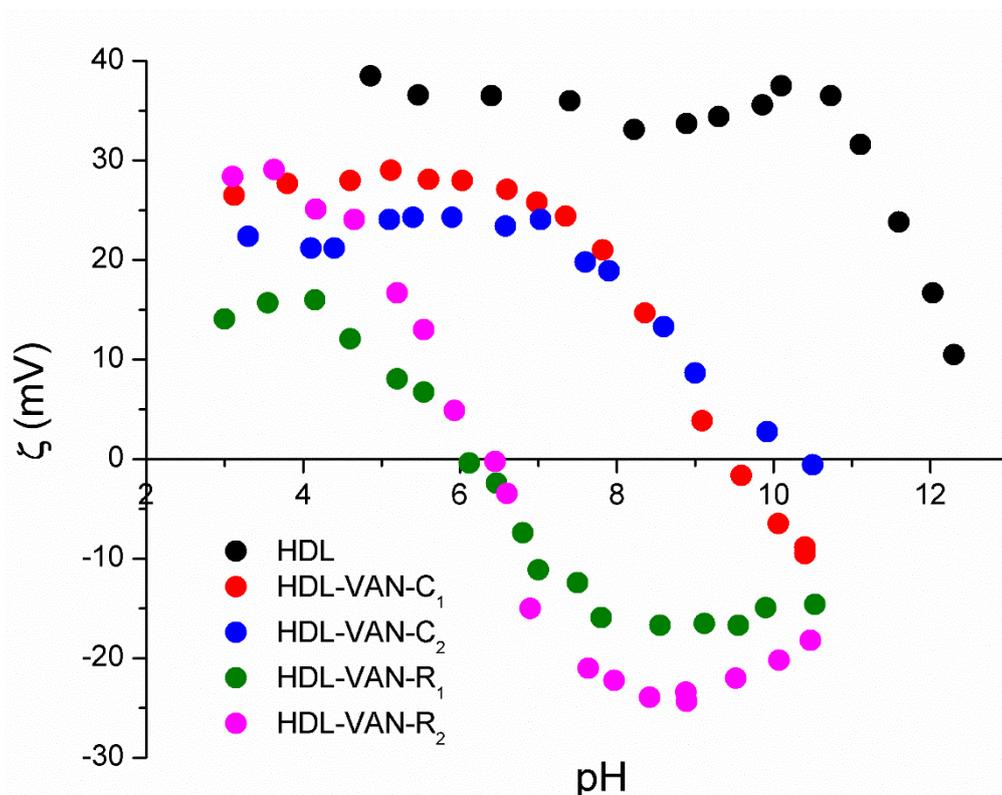


Figura 3.9. Potencial zeta de las muestras estudiadas

comportamiento del HDL puro en todo el rango de pH es típico de los HDL teniendo cloruros o hidroxilos como aniones interlaminares (Xu et al., 2008). Éstos no llegan a neutralizar completamente la carga positiva de las láminas, y es por eso que se observa un ζ positivo en todo el rango de pH. A altos valores de pH, la desprotonación de los grupos OH ubicados en los bordes de la estructura disminuyen el valor del potencial. En el caso de los HDL con vancomicina, además de los procesos antes mencionados para el HDL puro, la adsorción del fármaco y la ionización del mismo a altos pH contribuyen también a neutralizar las cargas positivas de las láminas, desplazando el PIE a valores cada vez menores.

III.3. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN Y DE DISOLUCIÓN

La liberación del Mg desde la fase sólida hacia la solución acuosa en función del tiempo refleja la cinética de disolución de la estructura del HDL de las muestras estudiadas. La información obtenida es mostrada en la Figura 3.10, donde la línea punteada indica la disolución completa calculada a partir del contenido de Mg de las muestras.

En ningún caso ocurrió una disolución completa del sólido. En las muestras obtenidas por coprecipitación la disolución aumentó hasta llegar a un valor constante a los 150 min. En las muestras por reconstrucción la disolución fue más lenta y no alcanzó una disolución constante incluso hasta los 400 min. En ambos tipos de muestras, las cinéticas fueron más lentas en el rango de pH 5-9, en comparación con el rango de pH 3-4.

Con el objetivo de determinar la velocidad inicial de disolución, las cinéticas fueron ajustadas con una ecuación cinética de primer orden:

$$A = A_1(1 - e^{-kt}) \quad (3.1)$$

Donde A representa el Mg liberado al tiempo t, A_1 es el Mg liberado a tiempos mayores y k es la constante de pseudo-primer orden del proceso de disolución. Entonces, ajustando la información con la ecuación 3.1, el valor de A_1 y k puede ser

estimado para cada cinética realizada. En todos los casos se obtuvieron buenos ajustes (ver Figura 3.10). La velocidad de disolución del proceso, R , puede ser conocida diferenciando la ecuación 3.1 con respecto al tiempo:

$$R = kA_1e^{-kt} \quad (3.2)$$

De esta ecuación, la velocidad inicial de disolución R_0 , puede ser estimada evaluando la ecuación 2 a $t=0$, resultando ser el producto de las dos constantes que se obtienen al ajustar la ecuación 3.1 a los datos experimentales.

$$R_0 = kA_1 \quad (3.3)$$

Esta ecuación permite calcular la velocidad inicial de disolución ajustando toda la curva de disolución, utilizando todos los datos del experimento, superando así los

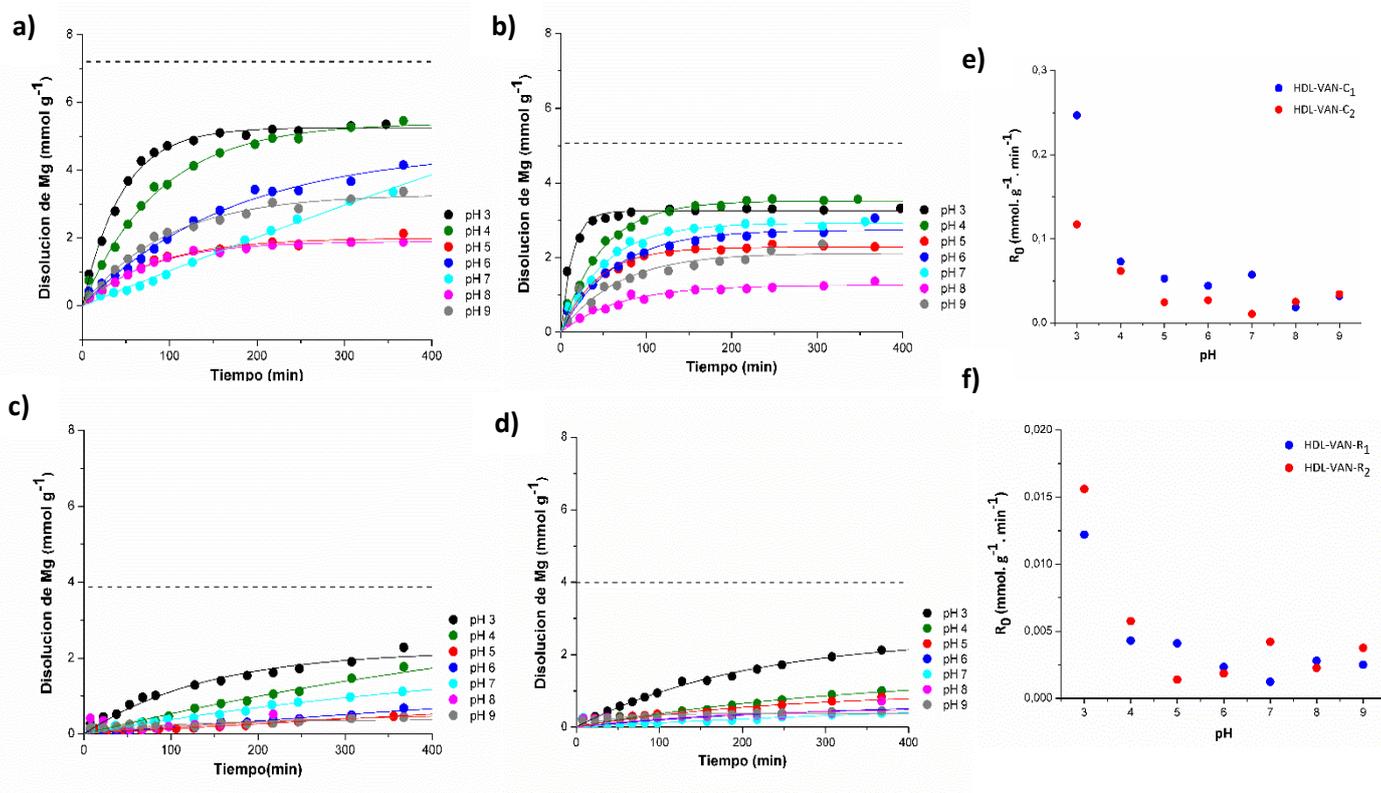


Figura 3.10. Cinéticas de disolución de Mg de: a) HDL-VAN-C1; b) HDL-VAN-C2; c) HDL-VAN-R1; d) HDL-VAN R2 y tasa de disolución inicial vs pH de: e) HDL-VAN-C; f) DHL-VAN-R. Las líneas corresponden a las predicciones de la Ecuación 1, con los parámetros que se presentan en la Tabla 3.

inconvenientes de estimar la pendiente inicial de la curva solo con los primeros datos experimentales. Los valores de R_0 de las muestras en todos los valores de pH estudiados se muestran en la Tabla 3.3 y en la Figura 3.10 se muestran gráficos de R_0 vs. pH. La velocidad de disolución fue bastante similar a valores de pH mayores o iguales a 5, e incrementó

rápidamente a valores menores a éste. Las muestras obtenidas por coprecipitación se disolvieron 10 veces más rápido que las obtenidas por reconstrucción. La liberación de vancomicina en función del tiempo es graficada y mostrada en la Figura 3.11. Antes de discutir esta información, debe ser destacado que la vancomicina es un antibiótico altamente soluble en agua, y se disuelve rápidamente. Experimentos en nuestro laboratorio (no mostrados aquí) indicaron que el 100% del fármaco puro se disuelve en menos de 2 seg, en coincidencia con lo reportado por López et al. (López-Iglesias et al., 2019).

Muestras						
	HDL-VAN-C ₁			HDL-VAN-C ₂		
pH	A1 (mmol.g ⁻¹)	R ₀ (mmol.g ⁻¹ min ⁻¹)	k (min ⁻¹)	A1 (mmol.g ⁻¹)	R ₀ (mmol.g ⁻¹ min ⁻¹)	k (min ⁻¹)
3	3,25	0,2468	0,07594	5,26	0,1171	0,02227
4	3,52	0,0723	0,02073	5,4	0,0617	0,01142
5	2,28	0,0528	0,02314	2	0,0244	0,01219
6	2,74	0,0441	0,0161	4,62	0,0270	0,00585
7	2,92	0,0571	0,01957	2,4	0,0106	0,00044
8	1,26	0,0185	0,01467	1,9	0,0249	0,01313
9	2,12	0,0317	0,01497	3,29	0,0341	0,01037
	HDL-VAN-R ₁			HDL-VAN-R ₂		
pH	A1 (mmol.g ⁻¹)	R ₀ (mmol.g ⁻¹ min ⁻¹)	k (min ⁻¹)	A1 (mmol.g ⁻¹)	R ₀ (mmol.g ⁻¹ min ⁻¹)	k (min ⁻¹)
3	2,48	0,0122016	0,00492	2,2	0,015576	0,00708
4	1,49	0,0043061	0,00289	3,86	0,0057514	0,00149
5	0,95	0,004104	0,00432	4,35	0,001392	0,00032
6	0,69	0,0023322	0,00338	3,55	0,001846	0,00052
7	1,51	0,0012342	0,00102	2,17	0,0042098	0,00194
8	0,55	0,002805	0,0051	0,6	0,002262	0,00377
9	0,25	0,00225	0,009	0,38	0,0037544	0,00988

Tabla 3.3. Cantidad de Mg liberado, velocidad inicial de disolución, constante de velocidad vs pH de las muestras estudiadas.

La Figura 3.11a-b muestra que la liberación de vancomicina de las muestras HDL-VAN-C, como ocurre con el Mg, aumenta sostenidamente con el tiempo hasta hacerse constante por encima de los 150 min. Las líneas punteadas corresponden al 100 % del fármaco presente en las muestras. Por el contrario, en las muestras HDL-VAN-R, se observa una liberación muy rápida. Esta liberación es tan rápida que la gran mayoría del fármaco que se disuelve a un cierto pH, lo hace ya antes del primer punto extraído a los 5 min de la reacción, por lo que las curvas de liberación se presentan en muchos casos como líneas prácticamente planas, casi paralelas al eje x.

El porcentaje de droga que fue liberada varió con el pH y el tipo de muestra. Casi todo el fármaco fue liberado a valores de pH 3 para todas las muestras debido a la rápida

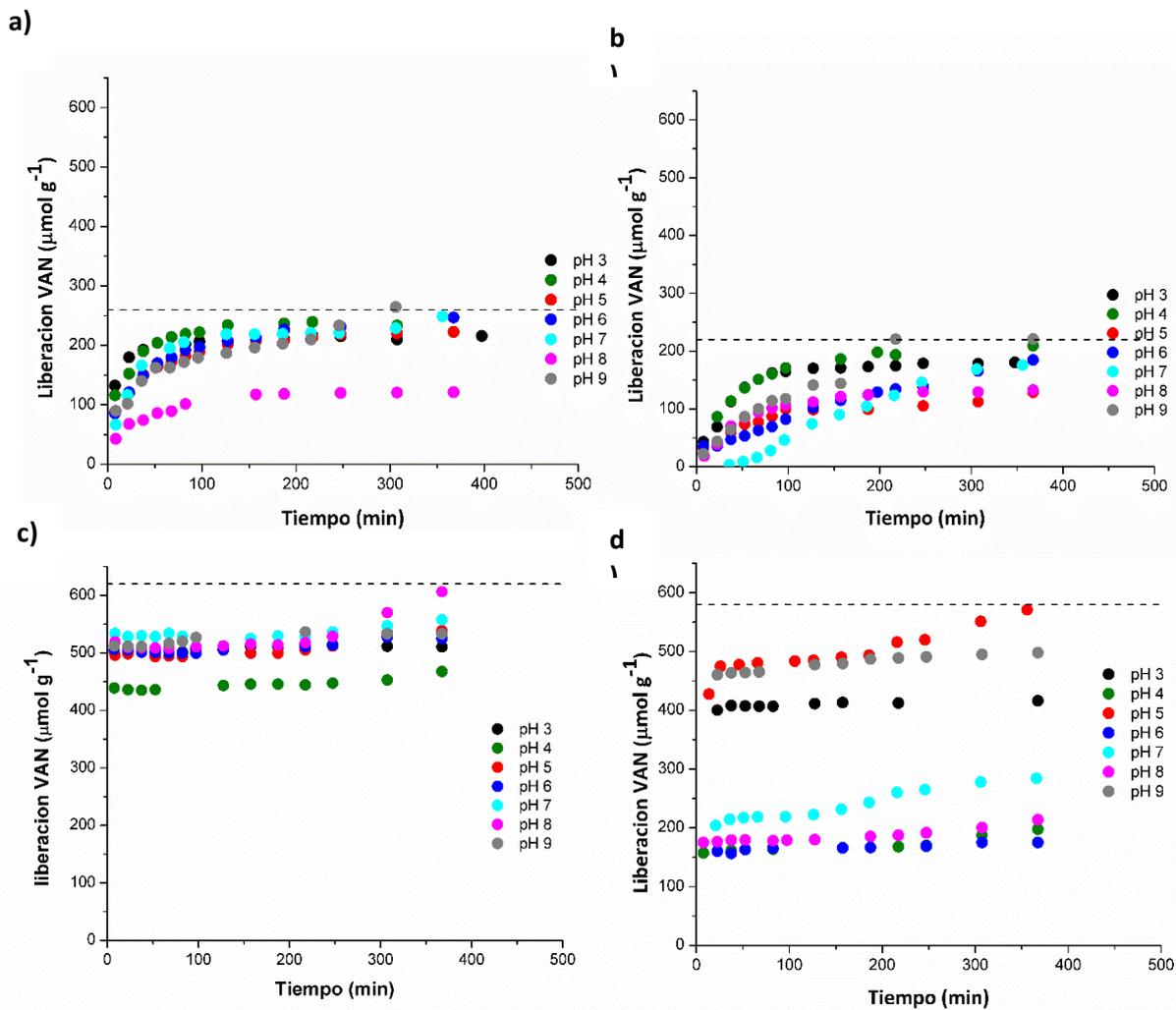


Figura 3.11. Cinética de liberación de vancomicina de: a) HDL-VAN-C1; b) HDL-VAN-C2; c) HDL-VAN-R1; d) HDL-VAN-R2

disolución de la estructura del HDL. Para las muestras obtenidas por coprecipitación, a los 400 min de la reacción, la liberación de vancomicina estuvo entre el 80 % y 100 %, excepto a pH 8 donde fue menor. Para las muestras obtenidas por reconstrucción, la liberación del fármaco estuvo entre 90 y 100 % en HDL-VAN-R1. Para el caso de HDL-VAN-R2, no hubo una tendencia específica en la liberación, con porcentajes que variaron entre 40 y 100% sugiriendo una alta heterogeneidad en la muestra.

La Figura 3.12 compara la liberación del fármaco con la disolución del Mg. En las muestras obtenidas por coprecipitación la liberación de vancomicina fue congruente con la disolución del Mg de la estructura del HDL. Estos resultados indican que el fármaco y la estructura del HDL están distribuidos homogéneamente, ya que tanto Mg como el fármaco van pasando de manera simultánea hacia la solución acuosa. Por el

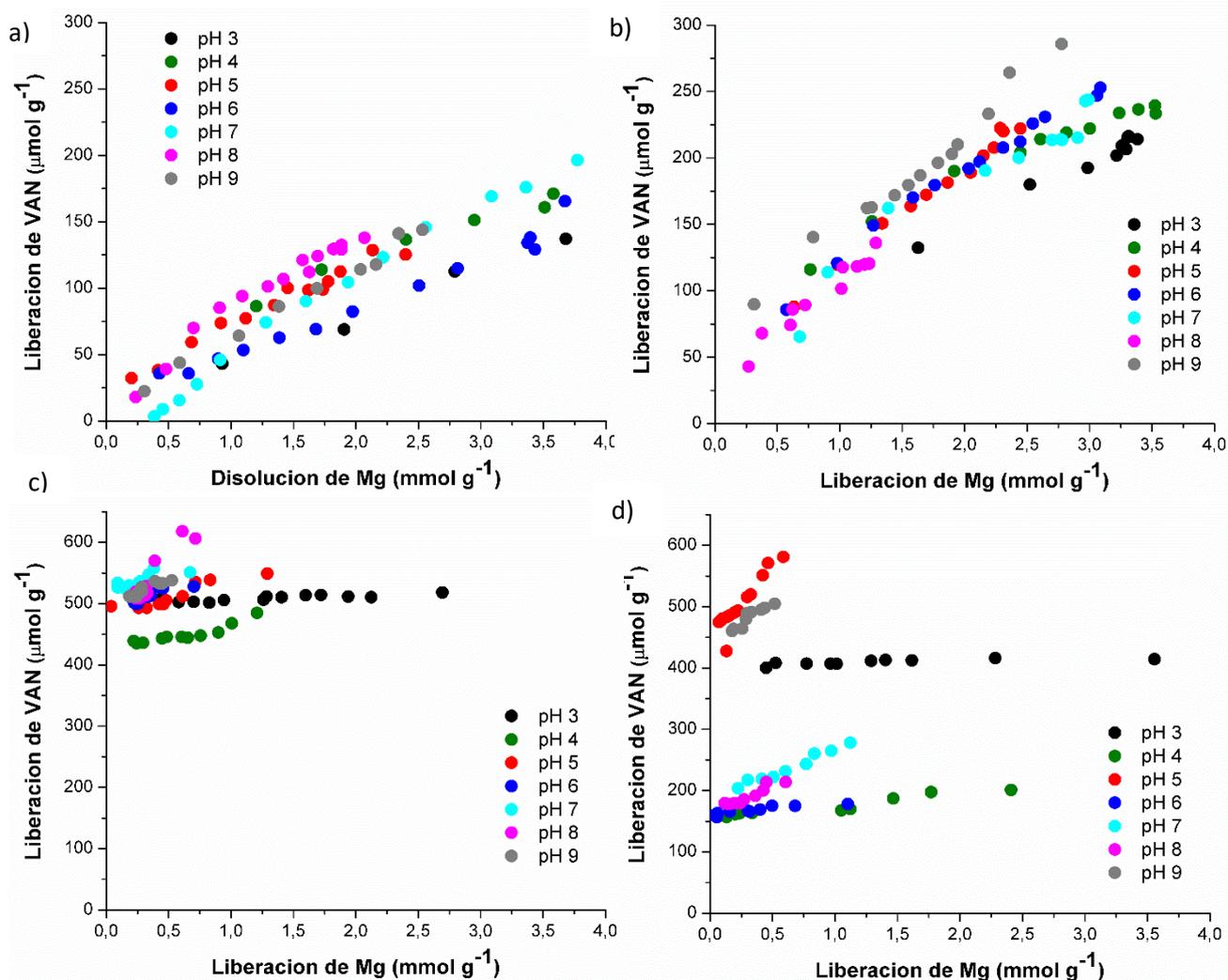


Figura 3.12. Cinética de liberación de vancomicina vs disolución de Mg: a) HDL-VAN-C1; b) HDL-VAN-C2; c) HDL-VAN-R1; d) HDL-VAN-R2

contrario, en las muestras obtenidas por reconstrucción no hay una relación congruente, ya que el fármaco se libera rápidamente a comparación de lo que ocurre con la disolución del Mg de la estructura del HDL. Estos resultados están en concordancia con las imágenes SEM, y puede ser explicado por la presencia de dos fases separadas en los sólidos obtenidos por reconstrucción: la fase cristalina del HDL y la fase de la vancomicina, donde cada una se comporta independientemente cuando entra en contacto con el agua.

Toda la información brindada anteriormente necesita ser analizada/entendida desde un punto de vista de disposición/arreglos estructural/estructurales de las muestras HDL-VAN que explique los resultados obtenidos. Estas disposiciones, tanto para las muestras por coprecipitación o reconstrucción son mostradas esquemáticamente en la Figura 3.13. La Figura 3.13a muestra un agregado de una muestra obtenida por coprecipitación, donde se observa el apilamiento de láminas de HDL con moléculas de vancomicina adsorbidas y distribuidas homogéneamente sobre la superficie externa. Entre las láminas, en el espacio interlaminar, se ubican los iones cloruro y carbonato que neutralizan la mayor parte de la carga de las mismas. La Figura 3.13b representa un agregado de una muestra obtenida por reconstrucción. El apilamiento de las láminas es menor y más desorganizado que en el caso anterior, pero con los mismos iones interlaminares neutralizando la carga estructural del HDL. La principal diferencia con la muestra anterior es que el fármaco se encuentra distribuido de una manera más heterogénea, donde una gran cantidad de moléculas de vancomicina forman una fase sólida por separado y otras se encuentran adsorbidas en la superficie del HDL.

Ambas disposiciones están en concordancia con la información proporcionada por los difractogramas, donde se observa una estructura más organizada en las muestras obtenidas por coprecipitación y sin intercalación del fármaco en ambos sólidos. Hay casos reportados en la literatura donde se intercalan aniones en la estructura del HDL, pero sin desplazamiento de los picos de difracción en el difractograma. Esto puede ser posible para moléculas o iones que son pequeños y planos (Dong et al., 2010; Liu et al., 2008; Wang et al., 2005), pero el ancho calculado de

la molécula de vancomicina sigue siendo demasiado grande como para no generar desplazamiento de la reflexión correspondiente al plano $d_{(003)}$.

Las estructuras y disposiciones propuestas están en concordancia también con los resultados obtenidos por SEM y EDS, donde se observa homogeneidad en la composición química de las muestras obtenidas por coprecipitación y heterogeneidad en la composición de las muestras obtenidas por reconstrucción. Esto también explica el comportamiento de cada muestra en las cinéticas de liberación y disolución del sólido.

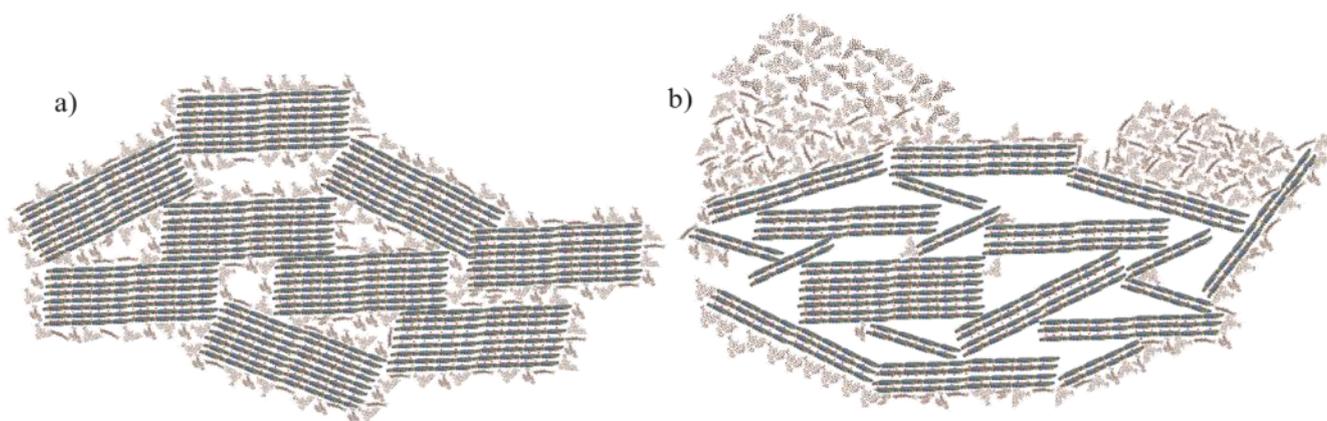


Figura 3.13. Dibujo esquemático de: a) Muestras obtenidas por coprecipitación; b) Muestras obtenidas por reconstrucción.

III.4. CONCLUSIONES

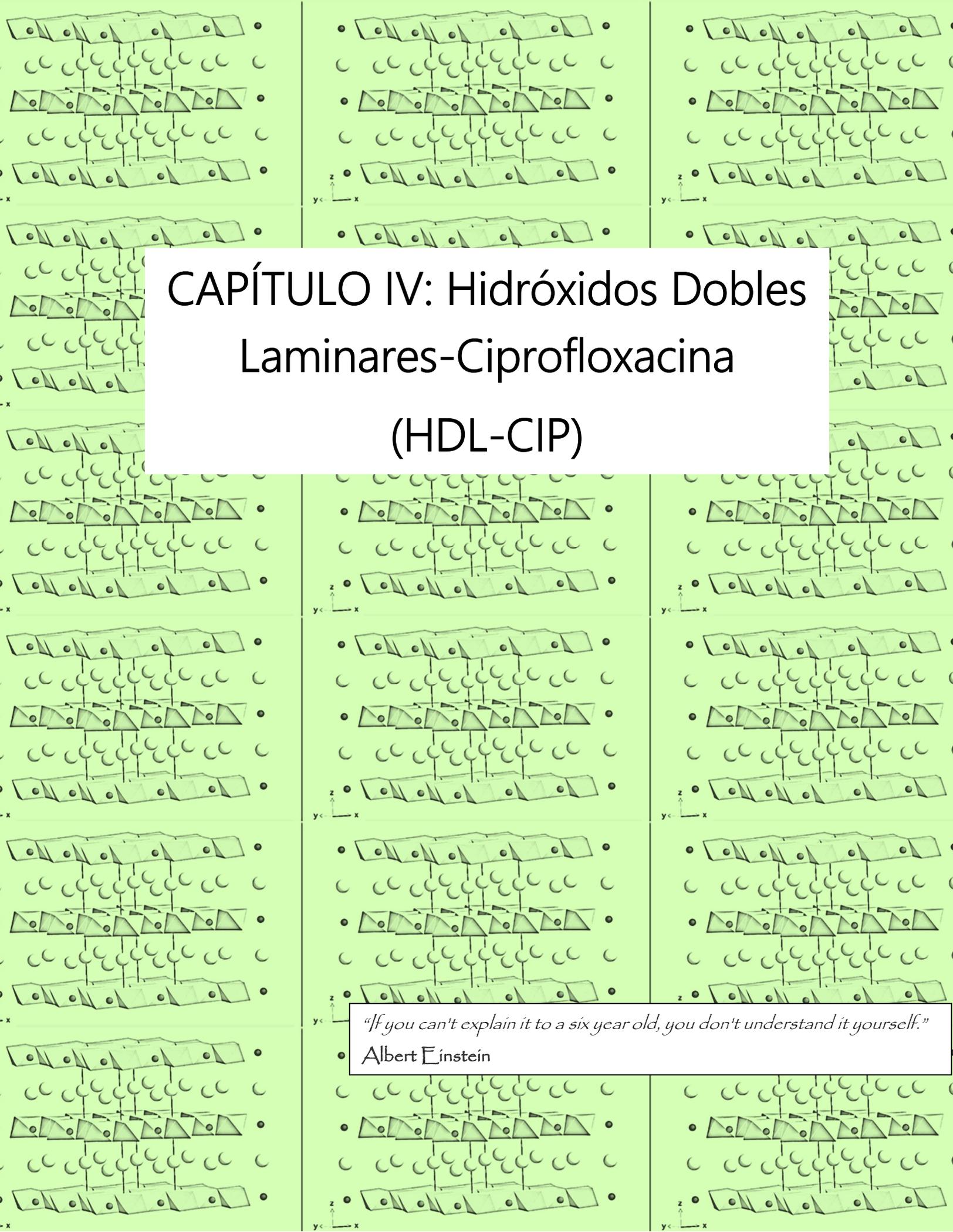
Cuatro complejos biocompatibles HDL-VAN fueron sintetizados, caracterizados y testeados para la liberación controlada del fármaco bajo diferentes condiciones. Una combinación de cinéticas de disolución, cinéticas de liberación, SEM, EDS, TG, DSC, FTIR y movilidad electroforética permitieron establecer que las muestras sintetizadas por coprecipitación presentan una distribución homogénea de vancomicina y Mg, llevando a una disolución congruente. Por el contrario, las muestras sintetizadas por reconstrucción no fueron homogéneas, presentando dos fases diferentes y una disolución incongruente. Los complejos obtenidos por coprecipitación son compuestos prometedores para ser usados en sistemas in vitro para su estudio de liberación controlada.

III.5. REFERENCIAS

- Aramendía M., et. al. (1999). Thermal decomposition of Mg/Al and Mg/Ga layered-double hydroxides: a spectroscopic study. *Journal of Materials Chemistry*, 9, 1603–1607.
- Dong, L., Yan, L., Hou, W. G., & Liu, S. J. (2010). Synthesis and release behavior of composites of camptothecin and layered double hydroxide. *Journal of Solid State Chemistry*, 183(8), 1811–1816. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2010.05.035>
- Evans, D. G., & Slade, R. C. T. (2006). Structural Aspects of Layered Double Hydroxides. *Structure & Bonding*, 119(December 2005), 1–87. https://doi.org/10.1007/430_005.
- Frieri, M., Kumar, K., & Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Huh, A. J., & Kwon, Y. J. (2011). “Nanoantibiotics”: A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2), 128–145. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.07.002>.
- Jia, Z., O’Mara, M. L., Zuegg, J., Cooper, M. A., & Mark, A. E. (2013). Vancomycin: Ligand recognition, dimerization and super-complex formation. *FEBS Journal*, 280(5), 1294–1307. <https://doi.org/10.1111/febs.12121>.
- Johnston, A. L., Lester, E., Williams, O., & Gomes, R. L. (2021). Understanding Layered Double Hydroxide properties as sorbent materials for removing organic pollutants from environmental waters. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(4), 105197. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.105197>.
- Li, F., Jiang, X., Evans, D. G., & Duan, X. (2005). Structure and basicity of mesoporous materials from Mg/Al/In layered double hydroxides prepared by separate nucleation and aging steps method. *Journal of Porous Materials*, 12(1), 55–63. <https://doi.org/10.1007/s10934-005-5234-z>.
- Li, Xu, J., Wang, F., Wang, B., Liu, L., Hou, W., Fan, H., Tong, Y., Zhang, J., & Lu, Z. (2012). Overprescribing in China, driven by financial incentives, results in very high use of antibiotics, injections, and corticosteroids. *Health Affairs*, 31(5), 1075–1082.

- <https://doi.org/10.1377/hlthaff.2010.0965>.
- Liu, C., Hou, W., Li, L., Li, Y., & Liu, S. (2008). Synthesis and characterization of 5-fluorocytosine intercalated Zn-Al layered double hydroxide. *Journal of Solid State Chemistry*, 181(8), 1792–1797. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2008.03.032>.
- López-Iglesias, C., Barros, J., Ardao, I., Monteiro, F. J., Alvarez-Lorenzo, C., Gómez-Amoza, J. L., & García-González, C. A. (2019). Vancomycin-loaded chitosan aerogel particles for chronic wound applications. *Carbohydrate Polymers*, 204, 223–231. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2018.10.012>.
- MacGowan, A., & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine (United Kingdom)*, 45(10), 622–628. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>
- Obadiah, A., Kannan, R., Ravichandran, P., Ramasubbu, A., & Vasanth Kumar, S. (2012). Nano hydrocalcite as a novel catalyst for biodiesel conversion. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7(1), 321–327.
- Prinetto, F., Ghiotti, G., Graffin, P., & Tichit, D. (2000). Synthesis and characterization of sol-gel Mg/Al and Ni/Al layered double hydroxides and comparison with co-precipitated samples. *Microporous and Mesoporous Materials*, 39(1–2), 229–247. [https://doi.org/10.1016/S1387-1811\(00\)00197-9](https://doi.org/10.1016/S1387-1811(00)00197-9).
- Rives, V. (2001). *Layered double hydroxides: present and future*. Nova Science Publishers.
- Rocha, J., Rives, V., & Ulibarri, M. A. (1999). Reconstruction of layered double hydroxides from calcined precursors: a powder XRD and ²⁷Al MAS NMR study. *Journal of Materials Chemistry*, 3, 2499–2503. <https://doi.org/10.1039/A903231B>.
- Rojas Delgado, R., De Pauli, C. P., Carrasco, C. B., & Avena, M. J. (2008). Influence of MII/MIII ratio in surface-charging behavior of Zn-Al layered double hydroxides. *Applied Clay Science*, 40(1–4), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2007.06.010>.
- Rojas, R., Jimenez-Kairuz, A. F., Manzo, R. H., & Giacomelli, C. E. (2014). Release kinetics from LDH-drug hybrids: Effect of layers stacking and drug solubility and polarity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 463, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.09.031>.
- Toutain, P. L., Del Castillo, J. R. E., & Bousquet-Mélou, A. (2002). The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research*

- in Veterinary Science*, 73(2), 105–114. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00039-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00039-5).
- Uhrich, K. E., Cannizzaro, S. M., Langer, R. S., & Shakesheff, K. M. (1999). Polymeric Systems for Controlled Drug Release. *Chemical Reviews*, 99(11), 3181–3198. <https://doi.org/10.1021/cr940351u>.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management (2015)*, 40(4), 277–283. <https://doi.org/Article>.
- Vucelic, M., Moggridge, G. D., & Jones, W. (1995). Thermal properties of terephthalate- and benzoate-intercalated LDH. *Journal of Physical Chemistry*, 99(20), 8328–8337. <https://doi.org/10.1021/j100020a068>.
- Wang, Z., Wang, E., Gao, L., & Xu, L. (2005). Synthesis and properties of Mg₂Al layered double hydroxides containing 5-fluorouracil. *Journal of Solid State Chemistry*, 178(3), 736–741. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2004.11.005>.
- World Health Organization. (2015). Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. *WHO Press, April*, 1–50. <https://doi.org/ISBN:9789241564946>.
- Xu, Z. P., Jin, Y., Liu, S., Hao, Z. P., & Lu, G. Q. (Max). (2008). Surface charging of layered double hydroxides during dynamic interactions of anions at the interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 326(2), 522–529. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.06.062>.
- Yang, Z., Liu, J., Gao, J., Chen, S., & Huang, G. (2015). Chitosan coated vancomycin hydrochloride liposomes: Characterizations and evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 495(1), 508–515. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.08.085>.
- Zarif, M. S., Afidah, A. R., Abdullah, J. M., & Shariza, A. R. (2012). Physicochemical characterization of vancomycin and its complexes with β -cyclodextrin. *Biomedical Research (India)*, 23(4), 513–520.
- Zhao, Y., Jiao, Q. Z., Evans, D. G., & Duan, X. (2002). Mechanism of pore formation and structural characterization for mesoporous Mg-Al composite oxides. *Science in China Series B-Chemistry*, 45(1), 37–45. <https://doi.org/10.1360/02yb9006>.



CAPÍTULO IV: Hidróxidos Dobles Laminares-Ciprofloxacina (HDL-CIP)

"If you can't explain it to a six year old, you don't understand it yourself."

Albert Einstein

La ciprofloxacina es un agente antimicrobiano que pertenece al grupo de las fluoroquinolonas, con un amplio espectro de acción frente a bacterias gram positivas y gram negativas, incluyendo pseudomonas y especies estafilocócicas (Mcghan et al., 1990) y además se ha demostrado que esta molécula decrece la proliferación e induce la apoptosis de células de carcinoma de colon (Herold et al., 2002). Este antibiótico funciona inhibiendo la ADN girasa, y las enzimas topoisomerasa II y IV, necesarias para la replicación bacteriana (Sanders, 1988).

Como se describió en el capítulo anterior, es necesario un uso racional de la antibioticoterapia para evitar efectos subterapéuticos y secundarios, y esto se logra alcanzando concentraciones plasmáticas del fármaco entre los límites subterapéuticos y de toxicidad. Estos niveles pueden alcanzarse con una liberación controlada del fármaco, evitando los picos y valles en el perfil farmacocinético (Toutain et al., 2002). Los hidróxidos dobles laminares, como se mencionó anteriormente, pueden ser usados como excipientes que modifiquen el perfil de liberación/disolución del fármaco (de Sousa et al., 2021).

En este trabajo, se sintetizaron complejos de HDL intercalados con Ciprofloxacina, con Mg (II) y Al (III) como cationes metálicos en su estructura. El objetivo es comparar las muestras obtenidas a través de los distintos métodos de síntesis: coprecipitación, reconstrucción e intercambio iónico. Según la bibliografía disponible no todos los métodos conducen a un mismo resultado, dependiendo del anión a intercalar un método puede ser eficiente mientras que otro puede conducir a resultados indeseados. Muy pocos estudios se pueden encontrar en la literatura en la cual se compare el rendimiento de estos tres métodos de síntesis con un fármaco a intercalar. Gordijo et al., por ejemplo, realizó este tipo de comparación con un HDL intercalado con ibuprofeno. Encontraron que las muestras obtenidas por coprecipitación e intercambio iónico podían ser buenos transportadores del fármaco, pero sus propiedades antiácidas disminuyeron respecto de la muestra obtenida por reconstrucción. Por el contrario, con la muestra obtenida por el método de reconstrucción, el HDL funcionó como buen transportador de la droga manteniendo sus propiedades antiácidas (Gordijo et al., 2005). Del Arco et al. sintetizó por estos métodos muestras de HDL intercalados con ácido mefenámico y meclofenámico. Aunque, en general, se obtuvieron resultados

similares en los tres casos, en el método de reconstrucción se obtuvo una mezcla de HDL intercalado con el fármaco y iones carbonato. En un experimento similar, estos autores no encontraron diferencias significativas en las muestras obtenidas por estos métodos de un HDL intercalado con fenbufeno (del Arco et al., 2007; Del Arco et al., 2010). Para el caso de un HDL intercalado con ciprofloxacina no se han encontrado estudios que comparen estos métodos de síntesis.

Las muestras de ciprofloxacina intercaladas en HDL obtenidas por los métodos de coprecipitación (HDL-CIP-C), reconstrucción (HDL-CIP-R) e intercambio iónico (HDL-CIP-II) en este trabajo fueron caracterizadas por DRX, FTIR, SEM, TEM, TG/DSC, movilidad electroforética y estudios cinéticos de disolución de la estructura del HDL y liberación del fármaco entre valores de pH de 3-9 y bajo condiciones fisiológicas: pH 1,2, 4,5, 6,8 (para una potencial administración vía oral) y pH 7,4 (para una potencial administración intravenosa).

IV.1. CIPROFLOXACINA (CIP)

La CIP ($C_{17}H_{18}FN_3O_3$) es una quinolina que contiene grupos ciclopropilo, carboxilo, fluoro y piperacínilo en las posiciones 1, 3, 6 y 7 respectivamente. Tiene dos grupos ionizables: carboxilo y amina, y sus respectivos valores de pKa son 5,9 y 8,9. Por lo tanto, la distribución de especies a diferentes valores de pH indica que a $pH < 5,9$

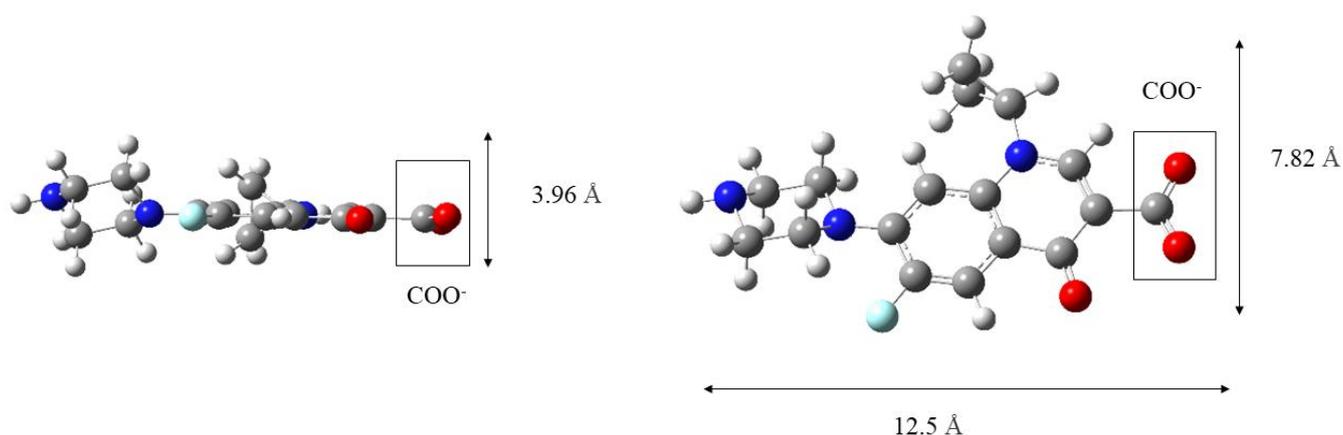


Figura 4.1. Molécula de ciprofloxacina optimizada. Figura izquierda: vista desde el costado. Figura derecha: vista desde arriba. Esferas rojas: oxígeno; esferas grises: carbono; esferas blancas: hidrógeno; esferas celestes: flúor y esferas azules: nitrógeno.

prevalece una especie monocatiónica, con ambos grupos protonados; a $\text{pH} > 8,9$ prevalece una especie monoaniónica, con ambos grupos desprotonados; y entre valores de pH de 5,9 y 8,9 más del 50 % del fármaco prevalece en su forma zwitteriónica (Roca Jalil et al., 2015), con el carboxilo desprotonado y la amina protonada (ver Figura 4.2).

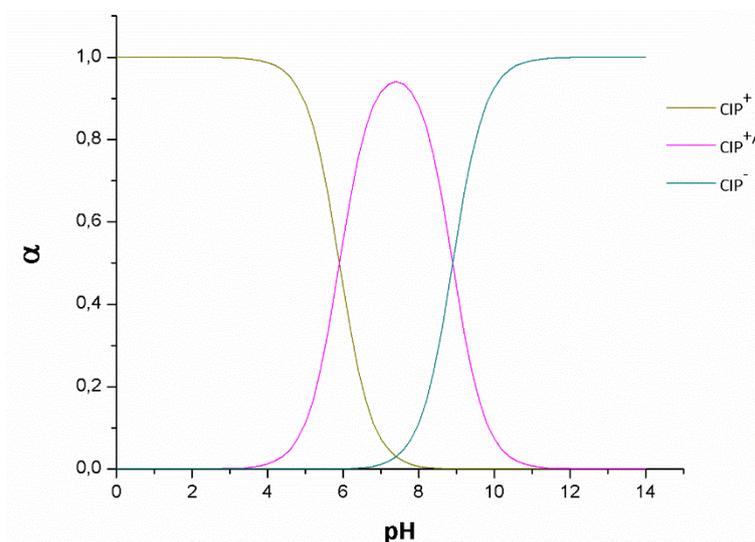


Figura 4.2. Distribución de especies de CIP

La Figura 4.1 muestra la estructura de la CIP optimizada por DFT. El tamaño de la molécula es de 12,5 Å y 7,82 Å, y el ancho de la misma es de 3,96 Å. Estas dimensiones deben ser consideradas a la hora de analizar el intercalado del antibiótico en la estructura del HDL.

IV.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS HDL-CIP

Las imágenes TEM de las muestras sintetizadas son mostradas en la Figura 4.3. HDL-CIP-C está formada principalmente por partículas laminares de tamaños y formas irregulares con tamaños que varían desde los 50 nm a los 500 nm. Algunas partículas

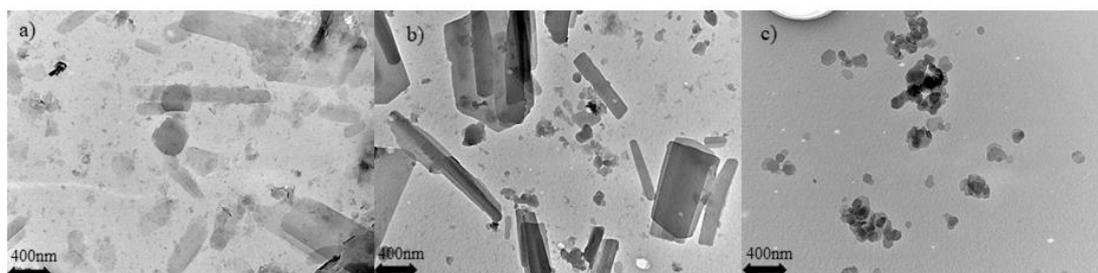


Figura 4.3. Imágenes TEM de: a) HDL-CIP-C; b) HDL-CIP-R; c) HDL-CIP-II

con forma de agujas son observadas también en las microfotografías. De manera similar, HDL-CIP-R está formada principalmente por partículas laminares de diferentes tamaños, con un importante contenido también de partículas en forma de agujas. HDL-CIP-II, por el contrario, está formada principalmente por láminas con diámetros entre 50 y 200 nm. La forma de esas láminas es hexagonal, como puede ser observado con mayores magnificaciones en la Figura 4.4. Las láminas hexagonales son la morfología característica de los hidróxidos dobles laminares (Galvão et al., 2016). Además, parece que solo esta última muestra presenta esa homogeneidad de forma en todas sus partículas, mientras que las de HDL-CIP-C y HDL-CIP-R contienen estructuras adicionales. De acuerdo con la literatura, las partículas con forma de agujas son cristales formados por complejos de ciprofloxacina y metales (Liu et al., 2005; Sarwade et al., 2015), y por lo tanto, es probable que la formación de estos complejos se dé entre el antibiótico y los iones de Mg^{2+} o Al^{3+} disueltos durante la síntesis (Urbaniak et al., 2007). Las imágenes TEM mostradas en la Figura 4.3, según lo descrito anteriormente, sugieren que las muestras HDL-CIP-C y HDL-CIP-R podrían contener una proporción significativa de estos complejos.

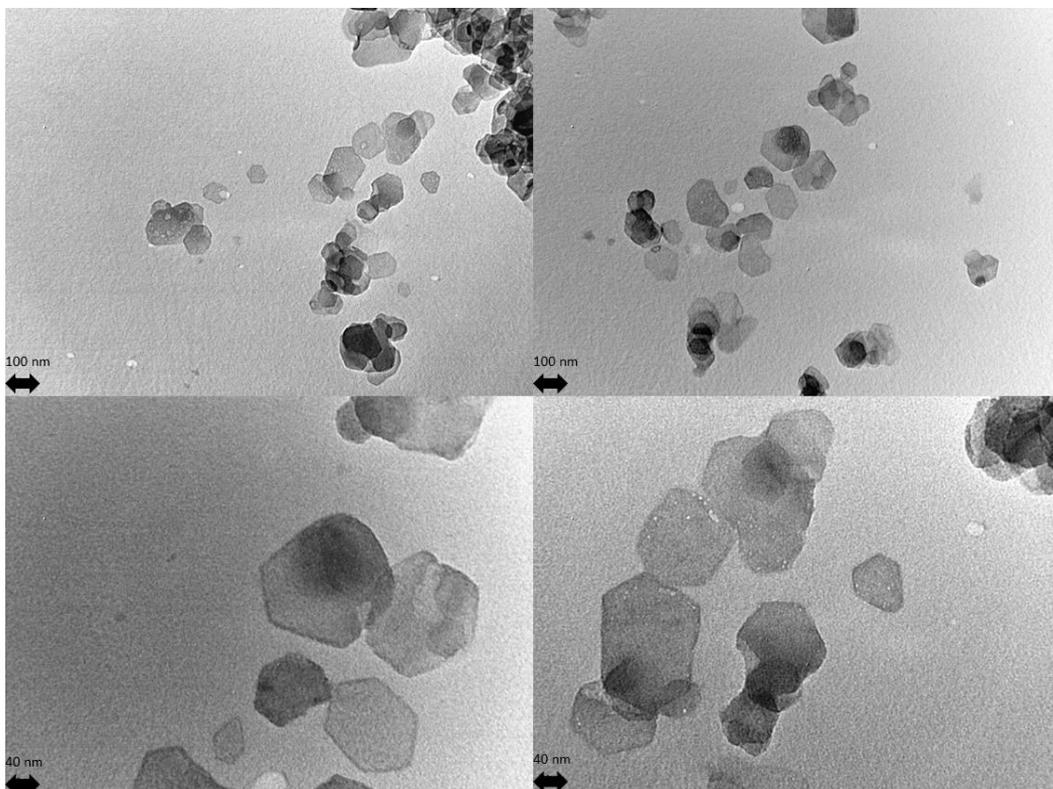


Figura 4.4. Imágenes TEM a diferentes magnificaciones de HDL-CIP-II

La Figura 4.5 muestra los difractogramas de Rayos X de las muestras de HDL sintetizadas y del antibiótico puro. La posición e intensidad de las reflexiones de la muestra HDL-Cl (plano (003) a $11,4^\circ 2\theta$, plano (006) a $23^\circ 2\theta$ y planos (110) y (113) a $60,7^\circ 2\theta$ y $62^\circ 2\theta$, respectivamente) están en concordancia con lo reportado por otros autores en la literatura (Constantino & Pinnavaia, 1995; del Arco et al., 2007), y la cristalinidad en la muestra es alta debido a que la misma fue expuesta a un tratamiento hidrotermal (Del Arco et al., 2004; Gu et al., 2014). Todas las muestras que contienen ciprofloxacina, por el contrario, mostraron una cristalinidad menor, sugiriendo un apilamiento menos ordenado de las láminas con respecto a HDL-Cl.

La muestra HDL-CIP-II muestra un pico a muy bajo ángulo ($3,3^\circ 2\theta$). Este corresponde al plano (003), indicando que el espacio basal (d_{003}) se incrementó desde $7,7 \text{ \AA}$ a $26,5 \text{ \AA}$. Este desplazamiento revela que la molécula de ciprofloxacina se intercaló en la estructura del HDL por intercambio iónico, desplazando a los iones cloruro. Se observa, además, en el difractograma de HDL-CIP-II que también aparecen los picos característicos de HDL-Cl. Este comportamiento es bastante común en los HDL (Li et al.,

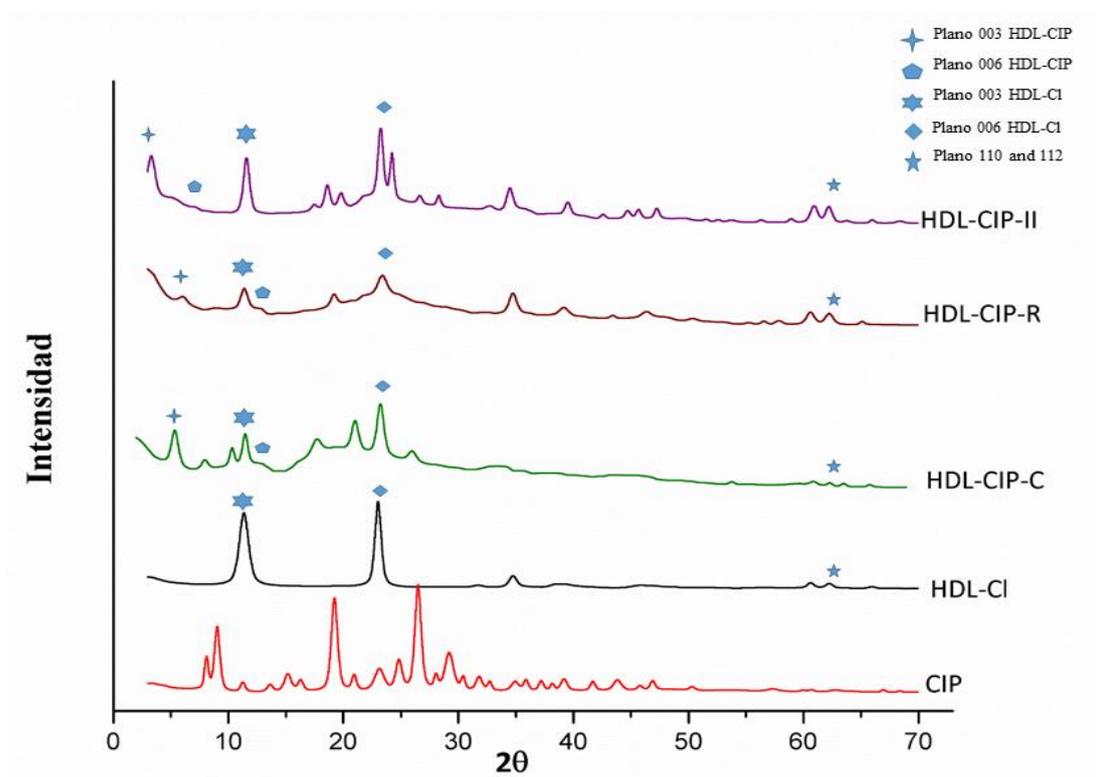


Figura 4.5. Difractogramas de las muestras estudiadas.

2016) e indica que el sólido formado es una mezcla de dos estructuras, una correspondiente a HDL-CIP y otra correspondiente a HDL-Cl.

La muestra HDL-CIP-R muestra una débil reflexión a $6^\circ 2\theta$, resultando en un espacio basal (d_{003})= 14,5 Å, el cual es diferente al obtenido en la muestra HDL-CIP-II e indica un modo de intercalación diferente. Además, puede observarse que una gran cantidad de HDL-Cl permanece en el sólido. Las anchas reflexiones ubicadas entre $20^\circ 2\theta$ y $30^\circ 2\theta$ puede sugerir que la reconstrucción no fue completa en la muestra, con algunos residuos sólidos amorfos.

El caso de la muestra HDL-CIP-C es similar a la anterior, aunque la reflexión a los $6^\circ 2\theta$ es más intensa, indicando una intercalación más efectiva. Sin embargo, otras reflexiones aparecen en la muestra, lo que indica que el sólido es una mezcla de HDL intercalado con el antibiótico, HDL intercalado con cloruros y otros sólidos. Estos pueden ser diferentes tipos de complejos de ciprofloxacina con iones Mg^{2+} y Al^{3+} , como sugieren las imágenes TEM. Con respecto a los resultados mostrados anteriormente, queda claro

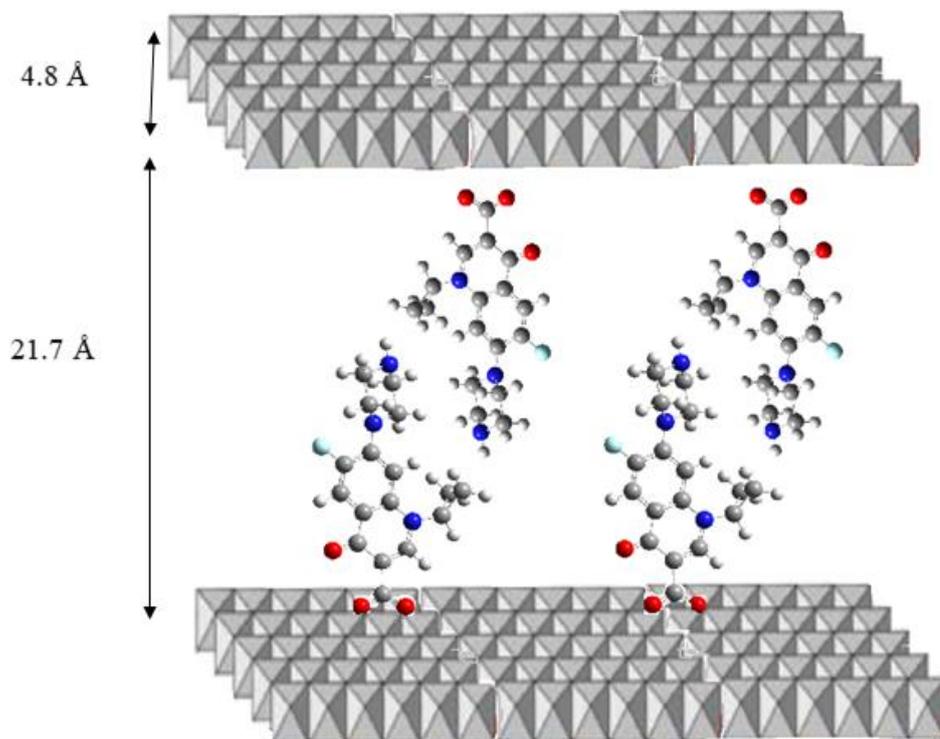


Figura 4.6. Dibujo esquemático de la disposición de ciprofloxacina en la estructura del HDL según Mishra et al.

que en ningún método de síntesis se obtiene un HDL en el cual la única especie intercalada sea el antibiótico. Las muestras HDL-CIP-C y HDL-CIP-R resultaron en una mezcla de diferentes clases de HDL y otros sólidos amorfos no identificados. En un estudio cinético de liberación del fármaco y disolución de la estructura del HDL, estas muestras de heterogeneidad no muy bien definida no nos permitirían obtener una interpretación sencilla de los datos. Los mejores resultados se encontraron para la muestra HDL-CIP-II, ya que está formada solo por dos fases de HDL bien definidas, con cloruros o ciprofloxacina. Es por esto que esta muestra es la seleccionada para realizar estudios de caracterización y liberación de antibiótico de aquí en adelante.

Teniendo en cuenta que el espaciado del plano (003) (d_{003}) en la muestra HDL-CIP-II fue de 26,5 Å, y sabiendo que el ancho de una capa inorgánica del HDL es de 4,8 Å (Aisawa et al., 2003), se puede obtener el espaciado interlaminar, siendo en este caso de 21,7 Å. Esto está en concordancia con los resultados obtenidos por Mishra et al. (Mishra et al., 2017), que realizó un estudio detallado de ciprofloxacina intercalada en distintas muestras de HDL obtenidas a diferentes temperaturas. El mismo concluye que las moléculas del antibiótico están ubicadas en el espacio interlaminar como una bicapa, donde los grupos carboxilatos interactúan hacia arriba y hacia abajo con las láminas inorgánicas del HDL, y donde los grupos bencenos de cada molécula interactúan entre ellos. Esta disposición de las moléculas, que es mostrada en la Figura 4.6, está respaldada por la información brindada en el difractograma, el tamaño calculado del antibiótico por DFT y es coincidente con datos reportados por otros autores (Latip et al., 2013).

La ecuación de Scherrer permite estimar el tamaño promedio de las partículas (Li et al., 2005; Zhao et al., 2002). La aplicación de esta ecuación al plano (003) da como resultado un ancho de 194 Å (un apilamiento aproximado de 25 láminas) para HDL-CI, y 124 Å (un apilamiento de 4 láminas) para la muestra HDL-CIP-II, evidenciando un apilamiento menor o menos organizado en el caso del sólido intercalado con el antibiótico en el espacio interlaminar.

La Tabla 4.1 muestra la composición química y la fórmula química teórica de HDL-CIP-II. Para poder comparar, se presenta también la misma información para la muestra HDL-CI. HDL-CIP-II tiene una relación Mg/Al de 3,1, en comparación con la del HDL-CI que es de 2, siendo esta última la precursora de la primera. Esto parece ser

Muestra	% Mg	% Al	% Cl	% H ₂ O	% CIP	% C	% N	Fórmula química
HDL-CI	19,0	10,1	13,6	12,0	-	-	-	[Mg _{0,67} Al _{0,33} (OH) ₂]Cl _{0,33} ·0,56H ₂ O
HDL-CIP-II	10,5	3,8	0,7	19,6	51,4	32,8	6,5	[Mg _{0,76} Al _{0,24} (OH) ₂]Cl _{0,03} CIP _{0,27} ·1,9H ₂ O

Tabla 4.1. Composición elemental, contenido de agua interlaminar y fórmula teórica de las muestras estudiadas

bastante normal en las muestras de HDL, tal como ha sido reportado por otros autores. Rojas et al. obtuvo una relación Mg/Al de 2,4, partiendo de reactivos en una relación de 2 (Rojas et al., 2014). En el capítulo III de esta tesis se detalla que las muestras HDL-VAN obtenidas por los métodos de coprecipitación y reconstrucción resultaron en una relación de Mg/Al de 3, partiendo también de reactivos con una relación de 2 (Lopez et

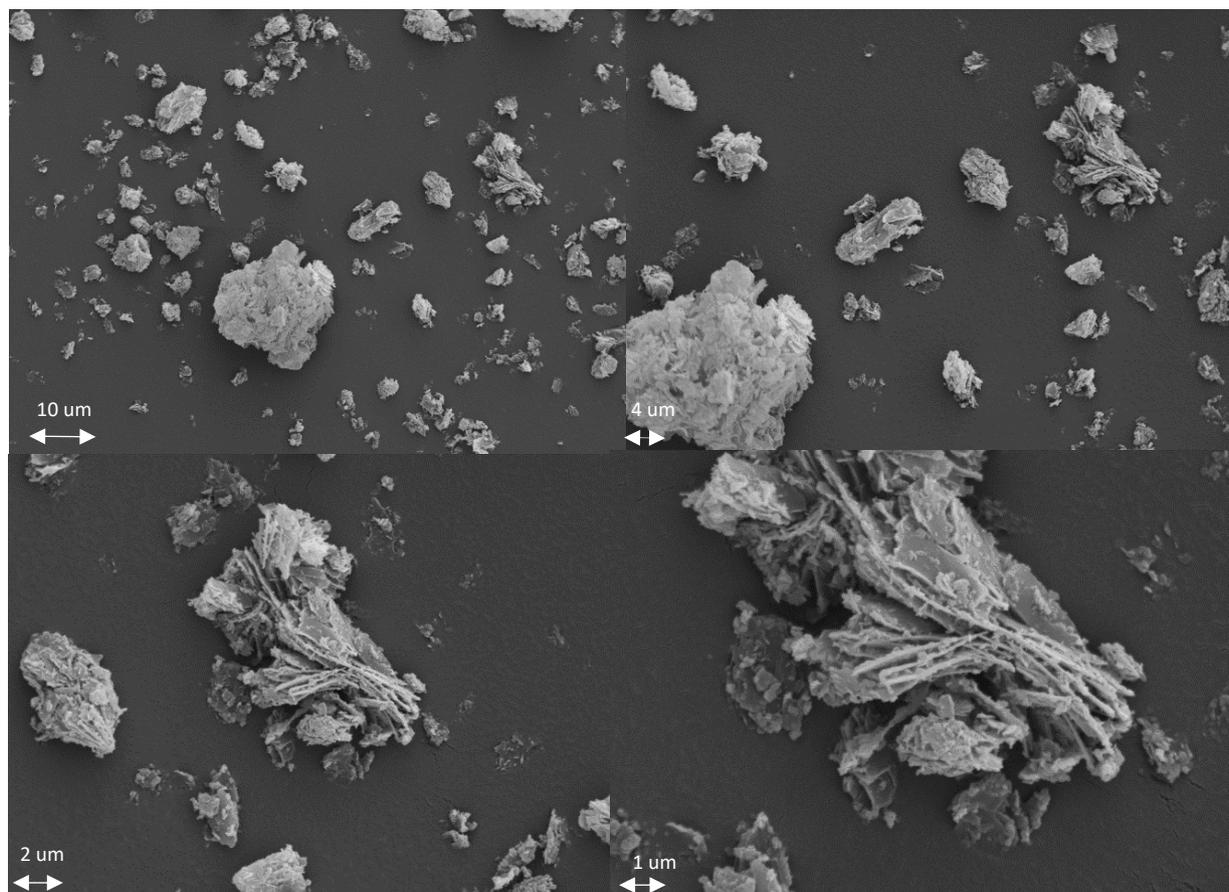


Figura 4.7. Imágenes SEM de la muestra HDL-CIP-II a diferentes magnificaciones.

al., 2019). Vucelic et al., por otra parte, demostraron un cambio en esta relación de 2 a 3 luego de someter a la muestra a un tratamiento hidrotermal (Vucelic et al., 1995). Estos autores argumentaron que la relación Mg/Al=3 es la más estable durante las condiciones estudiadas. Similarmente, Tronto et al. obtuvieron un HDL con una relación Mg/Al mayor a la de sus reactivos y atribuyó estos resultados a la solubilización del Al (III) desde la estructura del HDL (Tronto et al., 2004). La información de la Tabla 4.1 confirma la presencia del antibiótico en la muestra HDL-CIP-II, con algunos iones cloruros presentes también. Es interesante destacar que la suma de estos dos aniones (Cl+CIP=0,30) excede la carga total superficial positiva de la estructura (0,24). Esto sugiere que la ciprofloxacina está presente principalmente como anión monovalente y también, en menor medida, como molécula neutra (zwitterion).

La Figura 4.7 muestra las imágenes SEM a diferentes magnificaciones de la muestra HDL-CIP-II. Como se observa en la misma, los agregados son de diferentes

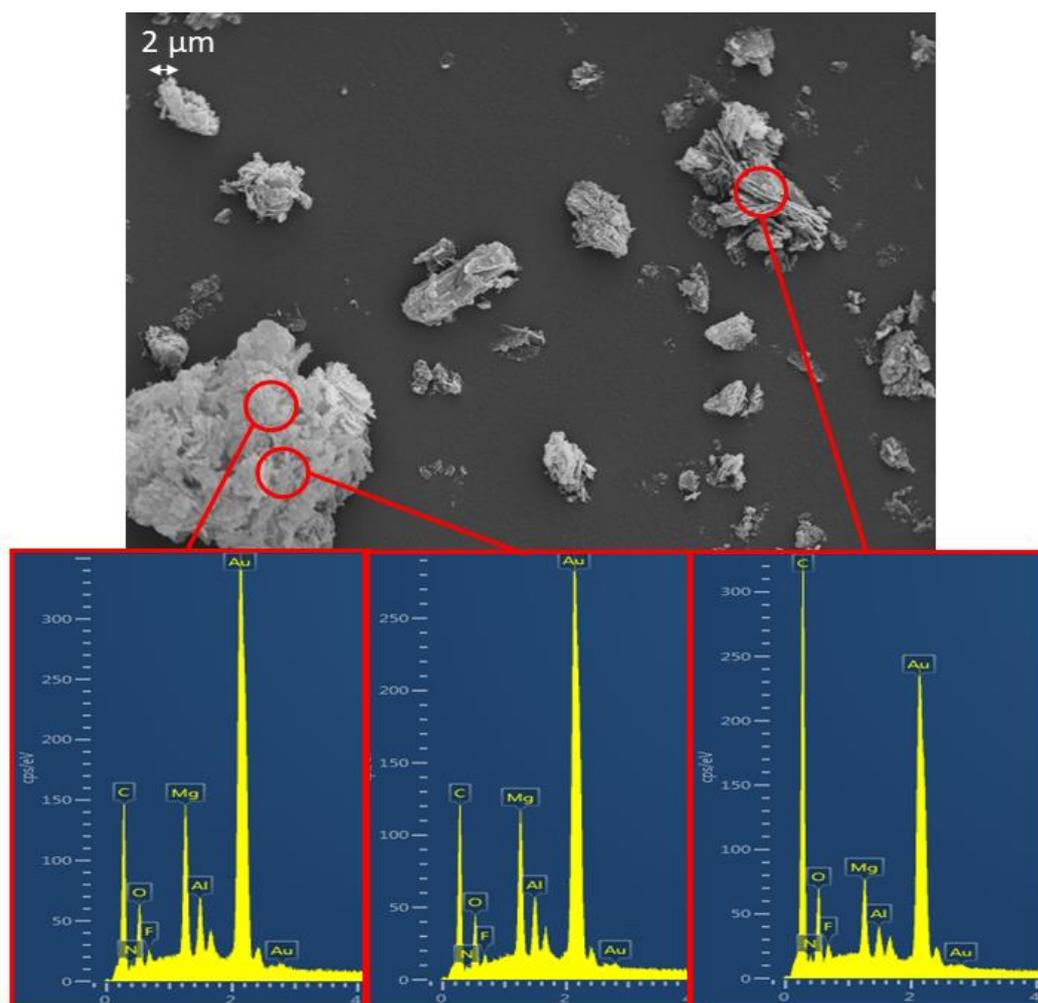


Figura 4.8. Imagen SEM de HDL-CIP-II con análisis EDS.

tamaños, variando de 1 a 15 μm . La Figura 4.8, por otra parte, muestra el análisis EDS realizado a diferentes agregados. La composición química obtenida por EDS está en concordancia con la composición elemental de la muestra presentada en la Tabla 4.1, mostrando la presencia de Mg, Al, O, C, N y F, todos elementos presentes en las láminas de los HDL y/o la ciprofloxacina.

Los espectros FTIR de las muestras HDL-CIP-II y HDL-CI son mostrados en la Figura 4.9. Ambos son comparados con el espectro del antibiótico puro y una mezcla física (en concentraciones similares) de HDL-CI y ciprofloxacina. HDL-CI presenta las bandas típicas de una hidrotalcita: estiramiento del enlace O-H entre 2700-3500 cm^{-1} , vibraciones correspondientes a la flexión H-O-H del agua interlamilar a 1630 cm^{-1} y vibraciones de red de M-O y M-O-M (M= Mg o Al) a 400-800 cm^{-1} (Jaymand, 2011; Zhang et al., 2011). El antibiótico puro muestra también sus bandas características: estiramiento O-H a 3500 cm^{-1} , estiramiento N-H del grupo piperacínilo a 3320 cm^{-1} , estiramiento C-H del anillo aromático a 2930 cm^{-1} , vibraciones C=O del grupo carboxilo a 1707 cm^{-1} , estiramiento

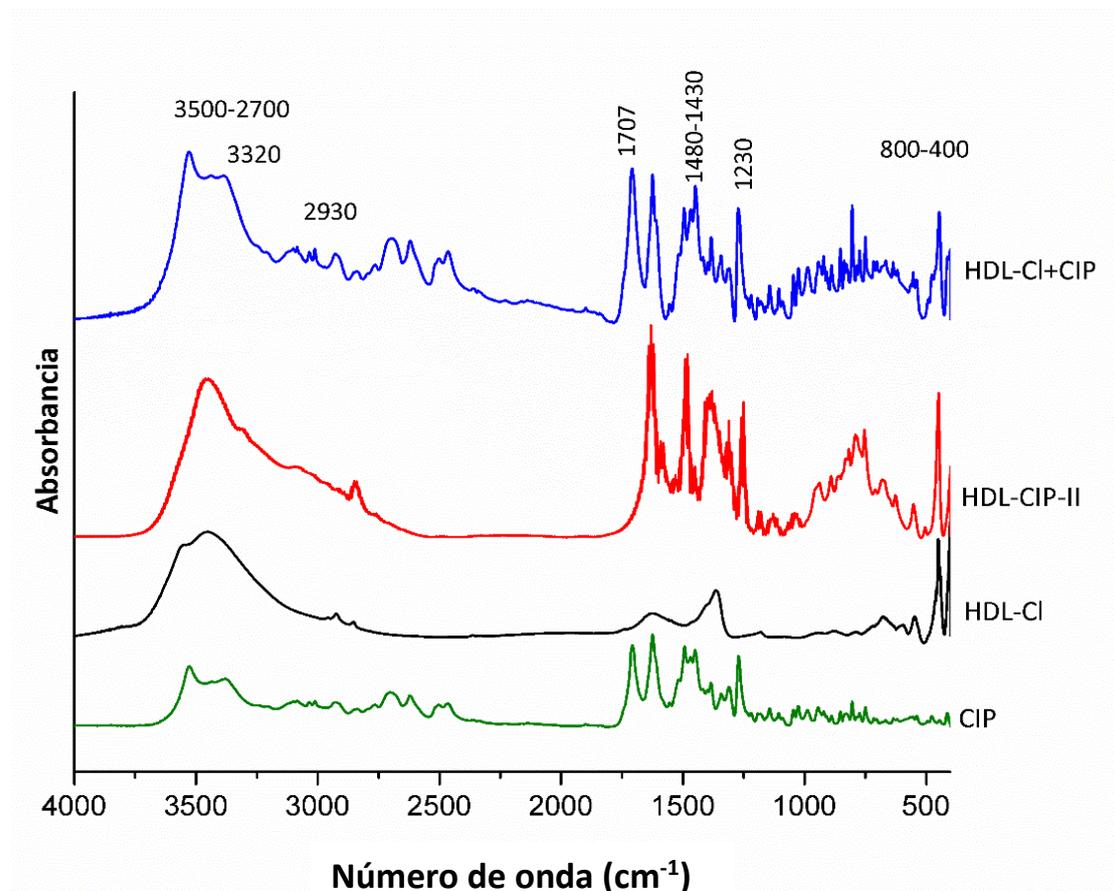


Figura 4.9. Espectros IR de las muestras estudiadas

de las uniones C-N del anillo de quinolona a $1430-1480\text{ cm}^{-1}$, y vibraciones C-O del grupo carboxilo a 1270 cm^{-1} (Al-Omar, 2004; Sultana et al., 2019). El espectro de la muestra HDL-CIP-II contiene todas las bandas mencionadas anteriormente, excepto la banda de 1707 cm^{-1} sugiriendo que hay interacción del grupo COO^- con la estructura del HDL. Esta conclusión es argumentada también analizando el espectro de la mezcla física del HDL-Cl+CIP, donde esta banda sí se encuentra presente ya que no existe interacción entre la estructura del HDL y el grupo carboxilo (Rojas et al., 2012; Sultana et al., 2019). Estos resultados concuerdan con la representación mostrada en la Figura 4.6.

Los análisis termogravimétricos y de calorimetría diferencial de barrido de las muestras son mostrados en la Figura 4.10. La ciprofloxacina muestra dos picos endotérmicos: uno a $150\text{ }^\circ\text{C}$ con una pérdida de peso del 6,8 % y otro a $325\text{ }^\circ\text{C}$ con una pérdida de 93,2 %, correspondiendo a la descomposición del fármaco en un 100% (Liu et al., 2005). En la muestra HDL-Cl se observan dos picos endotérmicos a temperaturas

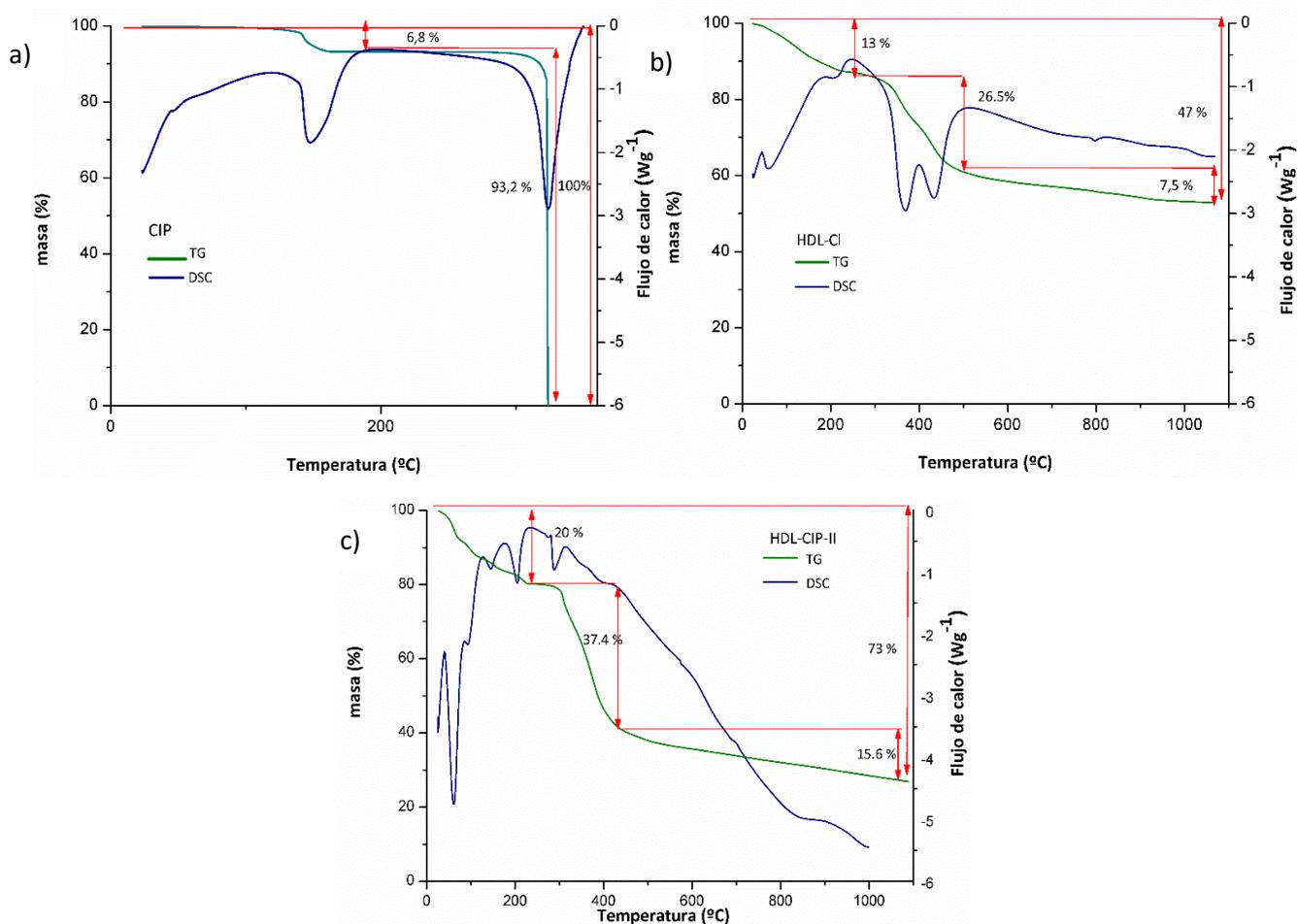


Figura 4.10. Gráficos de los análisis TG y DSC de: a) CIP; b) HDL-Cl; c) HDL-CIP-II

menores a 220 °C con una pérdida de peso del 13 %, debidos a la deshidratación del agua superficial e interlaminar del HDL. Otros dos picos endotérmicos son detectados a 350 °C y 430 °C finalizando en 500 °C, con una pérdida de peso del 26,5 %. Esto ocurre debido al proceso de deshidroxilación de la estructura. A temperaturas superiores a 500 °C la estructura del HDL colapsa, formándose una mezcla de óxidos de Mg y Al (Seftel et al., 2008) con una pérdida de masa de 7,5 %. A 1100 °C la pérdida de masa total de la muestra fue de 47 %. En el caso de la muestra HDL-CIP-II se observan varios procesos de deshidratación hasta los 250 °C, con una pérdida de peso del 20 %. Excepto por un pequeño pico endotérmico a 310 °C, la pérdida de masa por encima de los 300 °C fue continua y gradual, con un comportamiento muy diferente a los observados en el fármaco y la muestra HDL-Cl. Esto es normalmente atribuido a una degradación más “lenta” de la droga como consecuencia de su interacción con la estructura del HDL (Tamaro et al., 2007). A 1100 °C, la pérdida de masa total fue de 73 % (51 % debido al fármaco y 22 % debido a la estructura del HDL, acorde a los datos observados en el análisis elemental).

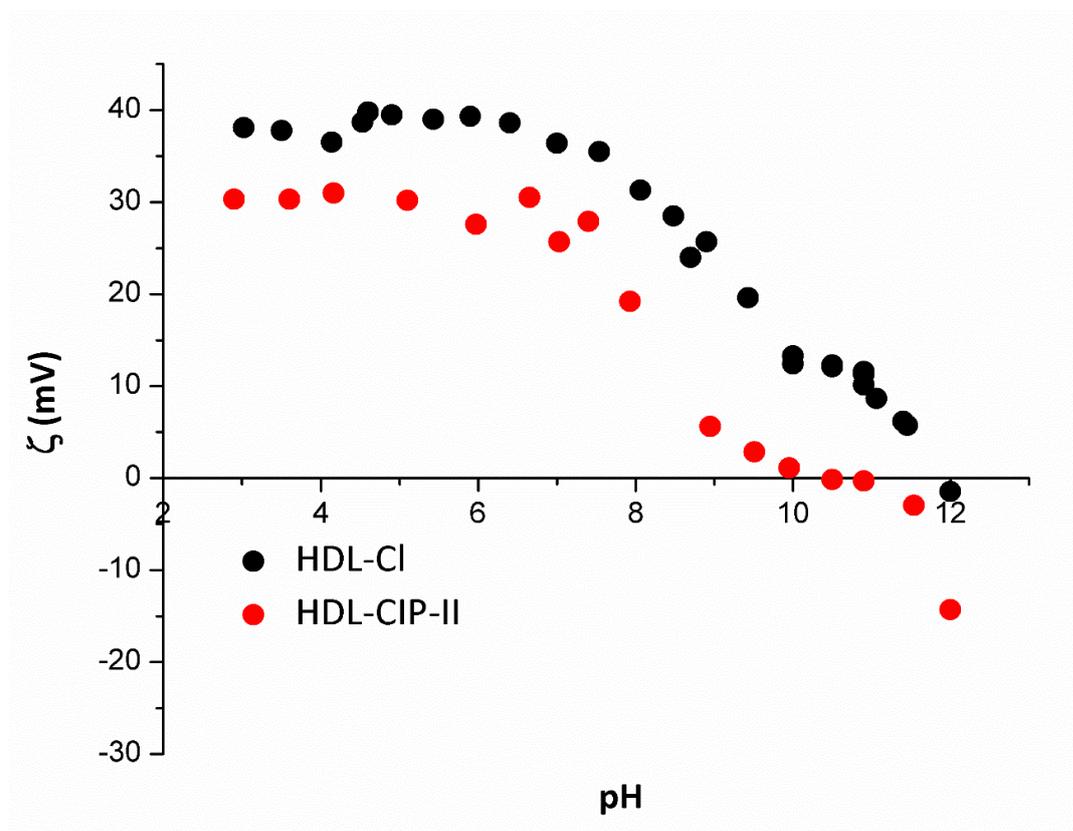


Figura 4.11. Potencia zeta de las muestras estudiadas en función del pH.

La Figura 4.11 muestra el potencial zeta (ζ) de las muestras analizadas en función del pH. Para HDL-CI, se observa un valor constante de 38 mV en un rango de pH de 3 a 7. Luego, hay un decrecimiento constante hasta un pH de 12, donde se encuentra su punto isoeléctrico (PIE), valor que es normal para este tipo de muestras (Rojas Delgado et al., 2008). Para la muestra HDL-CIP-II, la forma de la curva es similar a la muestra sin el antibiótico, pero desplazada hacia valores menores de ζ , comenzando con un valor de 30 mV entre valores de pH de 3 y 7 y decayendo de manera constante hasta su punto isoeléctrico, en un valor de pH de 10. Hay dos factores principales que conducen a este desplazamiento hacia valores de ζ menores: la diferencia en la relación Mg/Al, la cual es menor en la muestra HDL-CIP-II y por lo tanto disminuye la carga estructural (Rojas Delgado et al., 2008) y la presencia de ciprofloxacina en su forma aniónica adsorbida en la superficie. Ambos factores influyen en el decrecimiento (o crecimiento) de la carga positiva (o negativa) de las partículas.

IV.3. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN Y DE DISOLUCIÓN

Las cinéticas de liberación del fármaco y de disolución del HDL llevadas a cabo en NaCl 0,9 % y soluciones buffer para la muestra HDL-CIP-II se presentan en la Figura 4.12. Hay una rápida liberación de la droga en NaCl a valores de pH entre 3 y 6, con más del 80 % liberado en los primeros minutos (Figura 4.12a). A pH 7 la liberación del fármaco fue un poco menos rápida que a pH más ácidos, con un 60 % liberado al principio del proceso y alcanzando valores del 90% después de los 30 min. A pH 8, el 38 % de la droga se liberó rápidamente y luego lo hizo de manera constante en el tiempo hasta alcanzar un valor del 70 %. A pH 9, hubo una rápida liberación del 20 % pero sin una posterior liberación continua. Este comportamiento general, presentando una rápida liberación inicial (también llamado efecto “burst”) es bien conocido en estudios de liberación/disolución de fármacos, y como se puede observar ocurre a todos los valores

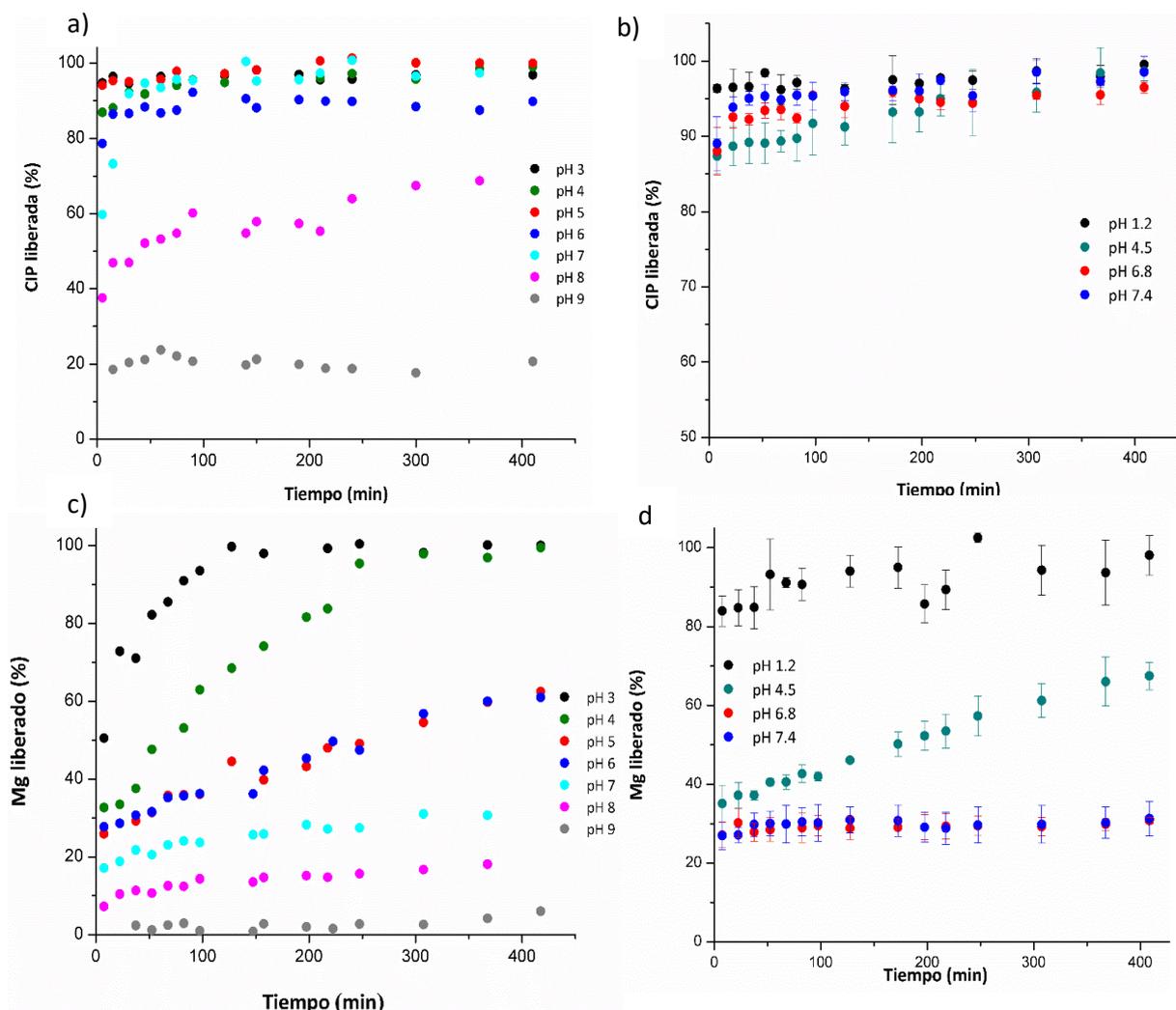


Figura 4.12. Cinéticas de liberación del fármaco de HDL-CIP-II en: a) Buffer; b) NaCl 0,9 % y disolución de Mg en: c) Buffer; d) NaCl 0,9 %

de pH (Huang & Brazel, 2001; Tronto et al., 2004). Por otra parte, la liberación de Mg, que refleja la disolución de la estructura del HDL, siguió un comportamiento típico para los HDL; siendo rápida para pH ácidos y tornándose más lenta a medida que se aumentó el valor de pH (Figura 4.12c). A pH 3 y 4 la disolución fue rápida hasta alcanzar el 100 % luego de 130 min y 240 min de reacción, respectivamente. Por el contrario, a pH 9 la disolución fue muy poco significativa.

En los experimentos llevados a cabo bajo condiciones fisiológicas, la liberación del fármaco fue bastante rápida a todos los pH, con una liberación inmediata del 85 % o más, seguida de una liberación continua. La tendencia de disolución de Mg, por el contrario, fue diferente a la liberación de la droga. La disolución fue rápida a pH 1,2, más

lenta y continua (desde el 35 al 65 % de disolución) a pH 4,5, mientras que a pH 6,8 y 7,4 tuvo lugar una disolución inicial del 28 % pero sin cambios posteriores.

La liberación del fármaco y la disolución de Mg necesitan ser analizadas en base a tres procesos principales: desorción del fármaco, intercambio iónico y disolución de la estructura del HDL (Parello et al., 2010). La desorción desde la superficie externa de la partícula del HDL y el intercambio iónico son analizados en conjunto ya que ambos involucran la liberación del fármaco, pero no del Mg. Por el contrario, el proceso de disolución involucra la liberación de ciprofloxacina conjuntamente con el pasaje de Mg a la solución acuosa. Los tres procesos podrían ser afectados por el tipo y concentración de aniones en el medio acuoso. Por ejemplo, los aniones que tienen buena afinidad por la estructura del HDL pueden producir un rápido y efectivo intercambio y/o desorción. Además, los aniones con buena capacidad de formar complejos con Mg y Al pueden conducir a una rápida disolución de la estructura. Teniendo estos factores en cuenta, los resultados de liberación de Mg y ciprofloxacina en NaCl 0,9 % y bajo condiciones fisiológicas pueden ser fácilmente entendidos en términos de intercambio iónico (en conjunto con la desorción del fármaco desde la superficie del HDL) y de disolución, tal

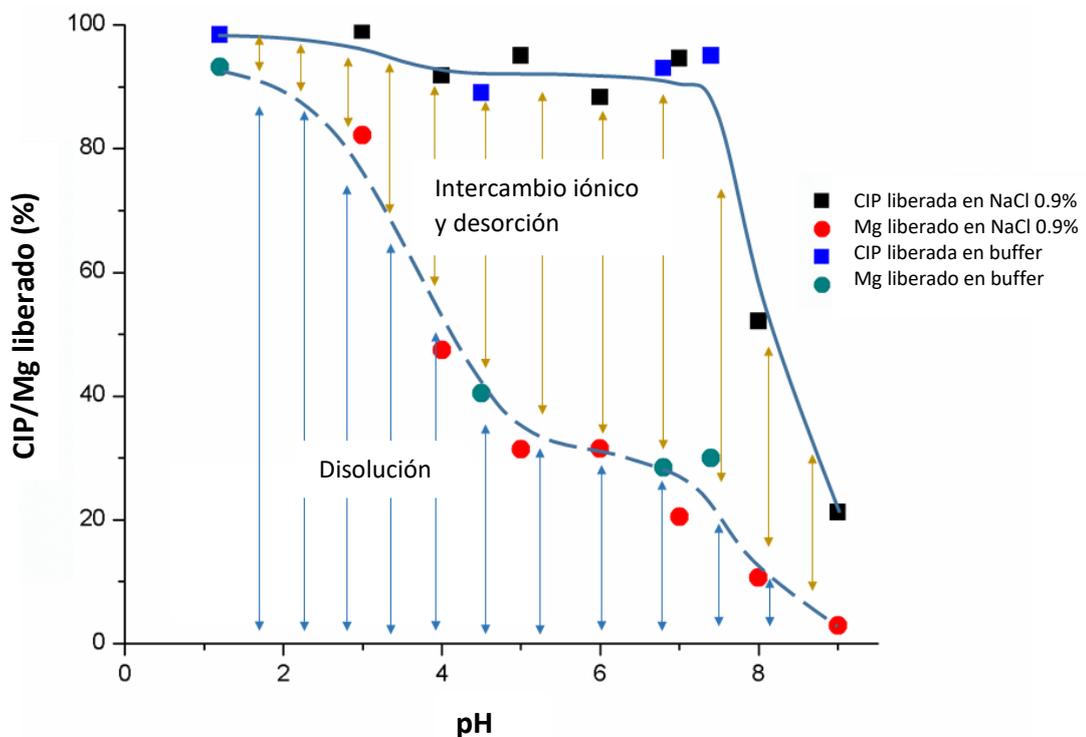


Figura 4.13. Esquema de CIP (cuadrados, línea sólida) y Mg (círculos, línea punteada) liberados en función del pH a los 60 min.

como se representa en la Figura 4.13. A modo ilustrativo, esta figura muestra conjuntamente la liberación de CIP y Mg en función del pH a los 60 min de reacción. Los círculos y líneas punteadas muestran la liberación de Mg (que representa la disolución de la estructura del HDL) mientras que los cuadrados y línea sólida muestran la CIP liberada (que representa la suma de desorción, intercambio y disolución). Aunque los experimentos fueron llevados a cabo a diferentes temperaturas y en presencia de distintos iones en las soluciones, los resultados son similares para los experimentos obtenidos en NaCl y en soluciones buffer. La figura claramente muestra que a valores de pH bajos (2-3) la liberación de la droga fue debida principalmente a la disolución de la estructura del HDL (80-90 %), a valores de pH intermedios (4-7) la liberación de ciprofloxacina estuvo controlada principalmente por los procesos de desorción e intercambio iónico, y a valores de pH altos (8-9) como la disolución de la estructura del HDL fue muy baja, la liberación del fármaco se produjo principalmente por intercambio iónico y desorción, aunque no se alcanzó el 100 % de liberación. Las similitudes en el comportamiento entre las soluciones buffer y NaCl 0,9 % indican que la variable que más afecta los procesos es el pH, ya que no se han visto cambios significativos con respecto a la temperatura (25 o 37 °C) o el tipo y concentración de iones.

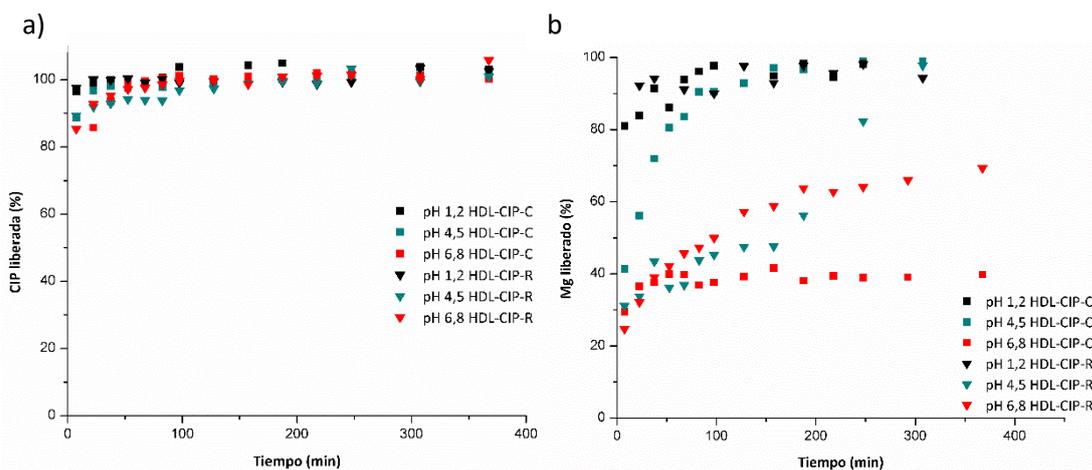


Figura 4.14. a) Cinética de liberación de CIP; b) cinética de liberación de Mg. En las muestras HDL-CIP-C y HDL-CIP-R

Aunque las muestras sintetizadas por los métodos de coprecipitación y reconstrucción (HDL-CIP-C y HDL-CIP-R) fueron menos cristalinas y con fases poco definidas, se estudió el comportamiento cinético de liberación del fármaco y disolución

del HDL bajo condiciones fisiológicas (ver Figura 4.14). La liberación de ciprofloxacina en estos dos compuestos fue más rápida que en la muestra HDL-CIP-II, y para las cinéticas de disolución a pH 1,2 la liberación del Mg alcanzó rápidamente el 100 %, como en la muestra HDL-CIP-II. A pH 4,5 y 6,8, la liberación de Mg no alcanzó el 100 %, pero en todos los casos fue mayor que en la muestra HDL-CIP-II. Estos resultados indican que en estas dos muestras la disolución de la estructura del HDL y la liberación de ciprofloxacina es más rápida que en HDL-CIP-II, debido posiblemente a su baja cristalinidad.

La liberación de ciprofloxacina de la muestra HDL-CIP-II es comparada con la disolución de un comprimido comercial y graficada en la Figura 4.15. A pH 1,2 el comportamiento fue bastante similar en los dos casos, con una rápida liberación del fármaco alcanzando el 100 % a los 50 min. También fue muy rápida la disolución de ciprofloxacina del comprimido a pH 4,5, mientras que en el caso de la muestra HDL-CIP-II se observó una liberación más lenta, alcanzando recién el 90 % de liberación pasados los 120 min. A pH 6,8 hubo una rápida disolución del comprimido en un 24 % seguido de

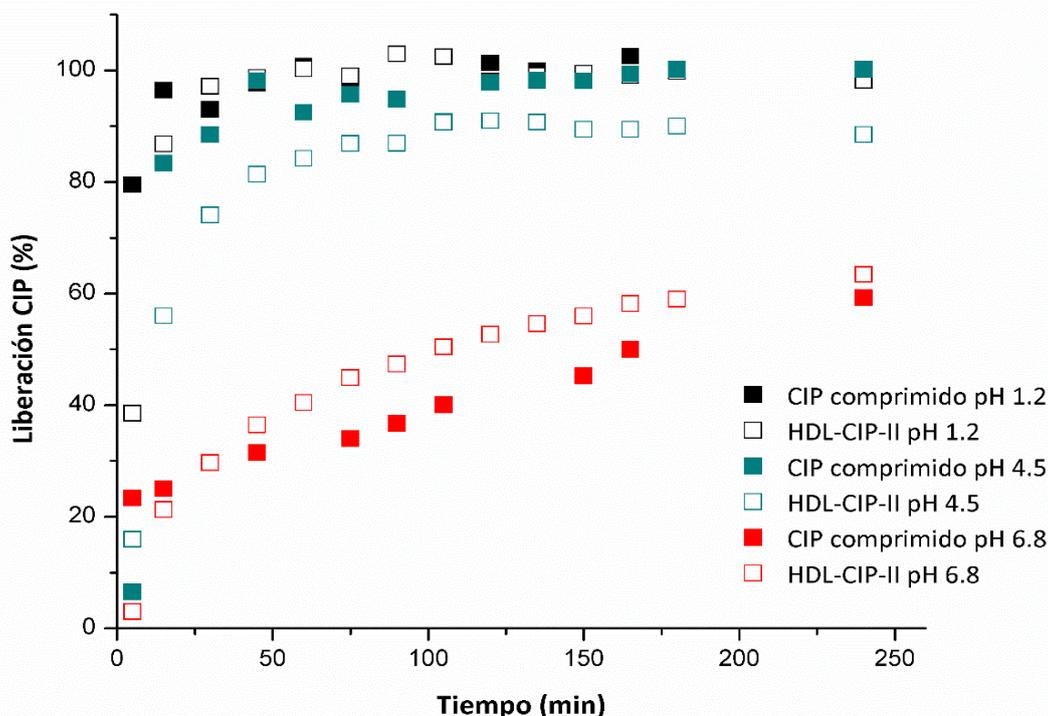


Figura 4.15. Cinéticas de liberación de CIP in vitro de la muestra HDL-CIP-II y comprimido comercial

un proceso lineal hasta alcanzar el 60 % a los 240 min, y en el caso de la muestra HDL-CIP-II se observó un comportamiento diferente donde se atenuó la liberación inicial del fármaco, pero llegó a un valor del 60 % a los 240 min. Hay que tener en cuenta para realizar un análisis completo que la muestra HDL-CIP-II se encuentra presente como un polvo fino y, por lo tanto, no presenta el paso de desintegración como ocurre en el caso de comprimido para la liberación/disolución del fármaco.

IV.4. CONCLUSIONES

Tres métodos diferentes fueron utilizados para sintetizar un HDL intercalado con ciprofloxacina. Los análisis químicos, la difracción de rayos X, la espectroscopia IR y otras técnicas de caracterización demostraron que este fármaco puede ser intercalado en la estructura del HDL. En los métodos de coprecipitación y reconstrucción se obtuvieron impurezas no deseadas y en el método de intercambio iónico se observó el mejor resultado, en lo que respecta a cantidad intercalada y baja heterogeneidad en las fases cristalinas obtenidas.

Un estudio combinado de liberación del fármaco y disolución de la estructura del HDL permite concluir que a pH bajos (menor a 3) la liberación de ciprofloxacina fue debida al proceso de disolución, mientras que a valores de pH intermedios y altos predominaron los procesos de desorción e intercambio iónico. Paralelamente, se observó también que los cambios de temperatura (25 o 37 °C) o tipos y concentraciones de iones no afectaron el comportamiento cinético. En comparación con la formulación comercial, HDL-CIP-II presenta un perfil de liberación más lento. Debido a la rápida disolución de la estructura del HDL (y por lo tanto liberación del fármaco) a valores de pH ácidos, es necesario desarrollar algún tipo de recubrimiento para esta clase de materiales que eviten esta degradación. A pesar de esto, la muestra obtenida presenta una buena relación fármaco/HDL, lo cual es necesario para un correcto tratamiento médico.

IV.5. REFERENCIAS

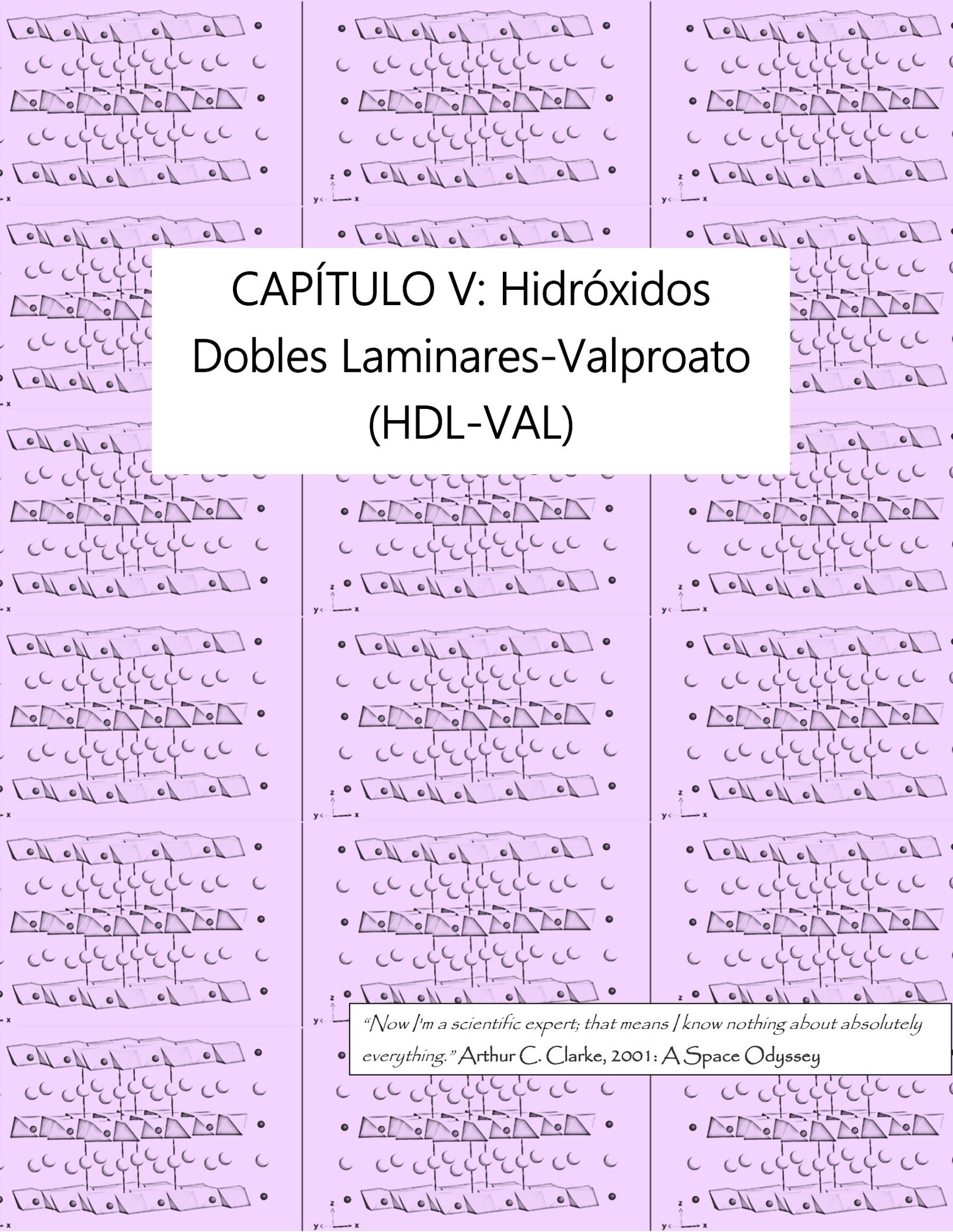
- Aisawa, S., Hirahara, H., Ishiyama, K., Ogasawara, W., Umetsu, Y., & Narita, E. (2003). Sugar-anionic clay composite materials: intercalation of pentoses in layered double hydroxide. *Journal of Solid State Chemistry*, 174(2), 342–348. [https://doi.org/10.1016/S0022-4596\(03\)00234-2](https://doi.org/10.1016/S0022-4596(03)00234-2).
- Al-Omar, M. A. (2004). Ciprofloxacin: Physical Profile. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Excipients*, 31, 163–178. [https://doi.org/10.1016/S0000-0000\(00\)00000-0](https://doi.org/10.1016/S0000-0000(00)00000-0).
- Constantino, V. R. L., & Pinnavaia, T. J. (1995). Basic Properties of $Mg_{2+1-x}Al_{3+x}$ Layered Double Hydroxides Intercalated by Carbonate, Hydroxide, Chloride, and Sulfate Anions. *Inorganic Chemistry*, 34(4), 883–892. <https://doi.org/10.1021/ic00108a020>.
- de Sousa, A. L. M. D., dos Santos, W. M., de Souza, M. L., Silva, L. C. P. B. B., Yun, A. E. H. K., Aguilera, C. S. B., Chagas, B. de F., Rolim, L. A., da Silva, R. M. F., & Neto, P. J. R. (2021). Layered Double Hydroxides as Promising Excipients for Drug Delivery Purposes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 165, 105922. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2021.105922>.
- del Arco, M., Fernández, A., Martín, C., & Rives, V. (2007). Intercalation of mefenamic and meclofenamic acid anions in hydrotalcite-like matrixes. *Applied Clay Science*, 36(1–3), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2006.04.011>.
- Del Arco, M., Fernández, A., Martín, C., & Rives, V. (2010). Solubility and release of fenbufen intercalated in Mg, Al and Mg, Al, Fe layered double hydroxides (LDH): The effect of Eudragit® S 100 covering. *Journal of Solid State Chemistry*, 183(12), 3002–3009. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2010.10.017>.
- Del Arco, M., Gutiérrez, S., Martín, C., Rives, V., & Rocha, J. (2004). Synthesis and characterization of layered double hydroxides (LDH) intercalated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID). *Journal of Solid State Chemistry*, 177(11), 3954–3962. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2004.08.006>.
- Galvão, T. L. P., Neves, C. S., Caetano, A. P. F., Maia, F., Mata, D., Malheiro, E., Ferreira, M. J., Bastos, A. C., Salak, A. N., Gomes, J. R. B., Tedim, J., & Ferreira, M. G. S. (2016).

- Control of crystallite and particle size in the synthesis of layered double hydroxides: Macromolecular insights and a complementary modeling tool. *Journal of Colloid and Interface Science*, 468, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.01.038>.
- Gordijo, C. R., Barbosa, C. A. S., Da Costa Ferreira, A. M., Constantino, V. R. L., & De Oliveira Silva, D. (2005). Immobilization of ibuprofen and copper-ibuprofen drugs on layered double hydroxides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(5), 1135–1148. <https://doi.org/10.1002/jps.20336>.
- Gu, Z., Wu, A., Li, L., & Xu, Z. P. (2014). Influence of hydrothermal treatment on physicochemical properties and drug release of anti-inflammatory drugs of intercalated layered double hydroxide nanoparticles. *Pharmaceutics*, 6(2), 235–248. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6020235>.
- Herold, C., Ocker, M., Ganslmayer, M., Gerauer, H., Hahn, E. G., Schuppan, D., & Elisa, B. (2002). Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. *British Journal of Cancer*, 443–448. <https://doi.org/10.1038/sj/bjc/6600079>.
- Huang, X., & Brazel, C. S. (2001). On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 73(2–3), 121–136. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00248-6](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00248-6).
- Jaymand, M. (2011). Synthesis and characterization of an exfoliated modified syndiotactic polystyrene/Mg-Al-layered double-hydroxide nanocomposite. *Polymer Journal*, 43(2), 186–193. <https://doi.org/10.1038/pj.2010.127>.
- Latip, A. F., Hussein, M. Z., Stanslas, J., Wong, C. C., & Adnan, R. (2013). Release behavior and toxicity profiles towards A549 cell lines of ciprofloxacin from its layered zinc hydroxide intercalation compound. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-119>.
- Li, Bi, H. Y., Wang, G. W., Wang, N., Chen, C. X., Li, Z. Z., & Fan, X. M. (2016). Intercalation of Norfloxacin into Layered Double Hydroxides by Delamination/Restacking Process and its Controlled-Release Property. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 37(3), 366–373. <https://doi.org/10.1080/01932691.2015.1025906>.
- Li, F., Jiang, X., Evans, D. G., & Duan, X. (2005). Structure and basicity of mesoporous materials from Mg/Al/In layered double hydroxides prepared by separate

- nucleation and aging steps method. *Journal of Porous Materials*, 12(1), 55–63. <https://doi.org/10.1007/s10934-005-5234-z>.
- Liu, Y., Wang, J., & Yin, Q. (2005). The crystal habit of ciprofloxacin hydrochloride monohydrate crystal. *Journal of Crystal Growth*, 276(1–2), 237–242. <https://doi.org/10.1016/j.jcrysgr.2004.11.323>.
- Lopez, N. A., Luengo, C. V., & Avena, M. J. (2019). Uptake/release of vancomycin on/from Mg–Al layered double hydroxides. *Adsorption*, 25(7), 1349–1360. <https://doi.org/10.1007/s10450-019-00097-3>.
- Mcghan, W. F., Bootman, J. L., Townsend, R. J., & Goldman, M. P. (1990). Prospective drug use evaluation. *DICP, The Annals of Pharmacotherapy*, 24, 82–86.
- Mishra, G., Dash, B., Sethi, D., Pandey, S., & Mishra, B. K. (2017). Orientation of Organic Anions in Zn-Al Layered Double Hydroxides with Enhanced Antibacterial Property. *Environmental Engineering Science*, 34(7), 516–527. <https://doi.org/10.1089/ees.2016.0531>.
- Parello, M. L., Rojas, R., & Giacomelli, C. E. (2010). Dissolution kinetics and mechanism of Mg-Al layered double hydroxides: A simple approach to describe drug release in acid media. *Journal of Colloid and Interface Science*, 351(1), 134–139. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.07.053>.
- Roca Jalil, M. E., Baschini, M., & Sapag, K. (2015). Influence of pH and antibiotic solubility on the removal of ciprofloxacin from aqueous media using montmorillonite. *Applied Clay Science*, 114, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2015.05.010>.
- Rojas Delgado, R., De Pauli, C. P., Carrasco, C. B., & Avena, M. J. (2008). Influence of MII/MIII ratio in surface-charging behavior of Zn-Al layered double hydroxides. *Applied Clay Science*, 40(1–4), 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2007.06.010>.
- Rojas, R., Jimenez-Kairuz, A. F., Manzo, R. H., & Giacomelli, C. E. (2014). Release kinetics from LDH-drug hybrids: Effect of layers stacking and drug solubility and polarity. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 463, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.09.031>.
- Rojas, R., Palena, M. C., Jimenez-Kairuz, A. F., Manzo, R. H., & Giacomelli, C. E. (2012). Modeling drug release from a layered double hydroxide-ibuprofen complex. *Applied Clay Science*, 62–63, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.04.004>.

- Sanders, C. C. (1988). Ciprofloxacin: In Vitro Activity, Mechanism of Action, and Resistance. *Reviews Of Infectious Diseases*, 10(3), 516–527.
- Sarwade, S., Jadhav, W. N., & Khade, B. C. (2015). Characterization of novel complex Ciprofloxacin Ag (I). 7(1), 36–41.
- Seftel, E. M., Popovici, E., Mertens, M., Witte, K. De, Tendeloo, G. Van, Cool, P., & Vansant, E. F. (2008). Zn–Al layered double hydroxides: Synthesis, characterization and photocatalytic application. *Microporous and Mesoporous Materials*, 113(1–3), 296–304. <https://doi.org/10.1016/J.MICROMESO.2007.11.029>.
- Sultana, N., Arayne, M. S., Siddiqi, A. Z., & Mirza, A. Z. (2019). Synthesis and antibacterial studies of ciprofloxacin-metal complexes. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 422–429.
- Tammaro, L., Costantino, U., Bolognese, A., Sammartino, G., Marenzi, G., Calignano, A., Tetè, S., Mastrangelo, F., Califano, L., & Vittoria, V. (2007). Nanohybrids for controlled antibiotic release in topical applications. In *International Journal of Antimicrobial Agents* (Vol. 29, Issue 4, pp. 417–423). <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.11.019>.
- Toutain, P. L., Del Castillo, J. R. E., & Bousquet-Mélou, A. (2002). The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Research in Veterinary Science*, 73(2), 105–114. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(02\)00039-5](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(02)00039-5).
- Tronto, J., José Dos Reis, M., Silvério, F., Balbo, R., Maldonado Marchetti, J., & Barros Valim, J. (2004). In vitro release of citrate anions intercalated in magnesium aluminium layered double hydroxides. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 65(2–3), 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.jpics.2003.09.019>.
- Urbaniak, B., Mrestani, Y., Kokot, Z. J., & Neubert, R. H. H. (2007). Investigation of interaction of fluoroquinolones with aluminum, iron and magnesium ions using capillary zone eletrophoresis. *Chromatographia*, 65(7–8), 489–492. <https://doi.org/10.1365/s10337-007-0180-3>.
- Vucelic, M., Moggridge, G. D., & Jones, W. (1995). Thermal properties of terephthalate- and benzoate-intercalated LDH. *Journal of Physical Chemistry*, 99(20), 8328–8337. <https://doi.org/10.1021/j100020a068>.

- Zhang, P., Qian, G., Cheng, H., Yang, J., Shi, H., & Frost, R. L. (2011). Near-infrared and mid-infrared investigations of Na-dodecylbenzenesulfate intercalated into hydrocalumite chloride (CaAl-LDH-Cl). *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 79(3), 548–553. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.03.031>.
- Zhao, Y., Li, F., Zhang, R., Evans, D. G., & Duan, X. (2002). Preparation of layered double-hydroxide nanomaterials with a uniform crystallite size using a new method involving separate nucleation and aging steps. *Chemistry of Materials*, 14(10), 4286–4291. <https://doi.org/10.1021/cm020370h>.



CAPÍTULO V: Hidróxidos Dobles Laminares-Valproato (HDL-VAL)

"Now I'm a scientific expert; that means I know nothing about absolutely everything." Arthur C. Clarke, 2001: A Space Odyssey

El valproato de sodio (VAL) es la sal del ácido valproico, y es un fármaco de amplio espectro usado por más de 40 años para tratamientos como epilepsia, desórdenes bipolares, migrañas y con potencial uso para enfermedades neurodegenerativas. Su uso durante todo este tiempo ha demostrado un buen perfil de seguridad, por lo que es muy utilizado en poblaciones pediátricas (Nalivaeva et al., 2009).

En este capítulo de la tesis el objetivo es intercalar este fármaco dentro de la estructura de los HDL para su posterior estudio en la liberación del mismo en diversas condiciones de pH. Esta necesidad radica en que es un fármaco que sigue siendo vigente y ampliamente utilizado en la clínica, y los trabajos encontrados en la literatura de esta molécula combinados con HDL no detallan estos procesos farmacocinéticos (Nagaraj et al., 2015; Nakayama & Hayashi, 2014).

Para esto, se sintetizó un compuesto HDL-VAL por el método de intercambio iónico a partir de un HDL con Mg (II) y Al (III) como cationes metálicos en su estructura y aniones nitrato en su interlámina. Como fue explicado en la introducción de esta tesis, el método de intercambio iónico es uno de los más utilizados en la síntesis de compuestos HDL-fármacos, ya que fácilmente pueden intercambiar el anión inorgánico que se encuentra en la estructura original por el fármaco de interés (Del Arco et al., 2010; Rojas et al., 2012). A diferencia de los capítulos anteriores, en este caso se utilizó anión nitrato, el cual posee una menor afinidad por la estructura del HDL y, por lo tanto, es más fácil de intercambiar que otros aniones (cloruros, carbonatos, etc.) (Chao et al., 2008).

Vale destacar también que el suplemento de Mg(II) ha demostrado beneficios en el tratamiento de la epilepsia y trastornos bipolares, por lo que el aporte conjunto de Mg(II) y VAL del HDL-VAL sintetizado podría potenciar el tratamiento de VAL en estas patologías (Eby & Eby, 2006; Osborn et al., 2016).

La muestra HDL-VAL obtenida por el método de intercambio iónico (HDL-VAL-II) en este trabajo fue caracterizada por DRX, FTIR, SEM, TEM, TG/DSC, movilidad electroforética y estudios cinéticos de disolución de la estructura del HDL y liberación del fármaco entre valores de pH de 3-9 y bajo condiciones fisiológicas: pH 1,2, 4,5, 6,8 (para una potencial administración vía oral).

V.1. VALPROATO (VAL)

La fórmula química de VAL (también llamado 2-propilvalerato) es $C_8H_{15}O_2$, con un peso molecular de 143,2 g/mol. Posee un grupo carboxilo ionizable, con un pKa de 4,8, por lo que a valores superiores del mismo la molécula se encontrará principalmente en su forma aniónica, con el grupo carboxilo desprotonado (Alsarra et al., 2005).

La Figura 5.1 muestra la molécula de valproato optimizada por DFT. El tamaño de la molécula es de 7,71 Å por 5,75 Å y un espesor de 2,4 Å. Los resultados obtenidos están en concordancia con lo mostrado por Nagaraj et al. (Nagaraj et al., 2015), y serán considerados para analizar el intercalado de este fármaco en la estructura del HDL.

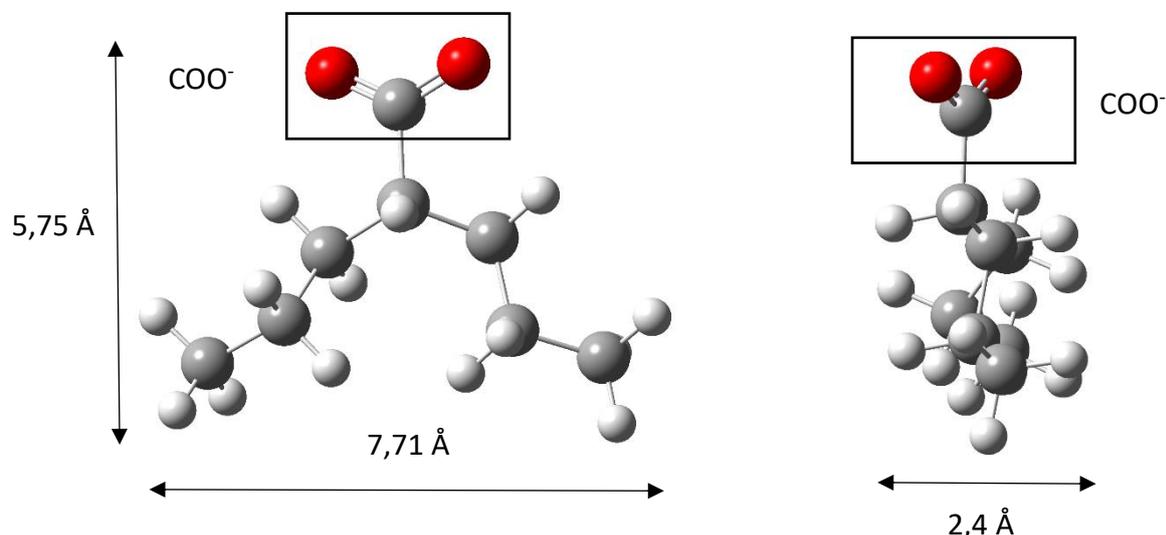


Figura 5.1. Molécula de valproato ionizada optimizada. Figura izquierda: vista desde el costado. Figura derecha: vista desde frente. Esferas rojas: oxígeno; esferas grises: carbono; esferas blancas: hidrógeno.

V.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUESTRAS HDL-VAL

La Figura 5.2 muestra los difractogramas de los HDL sintetizados y del fármaco puro. La posición e intensidad de las reflexiones típicas del HDL-NO₃ coinciden con lo reportado por otros autores en la literatura (Olanrewaju et al., 2000; Xu & Zeng, 2001) y están de acuerdo con el difractograma referencia del Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS), que corresponde a la hidrotalcita, con aniones carbonatos en la interlámina, por lo que los valores de los ángulos de difracción se encuentran

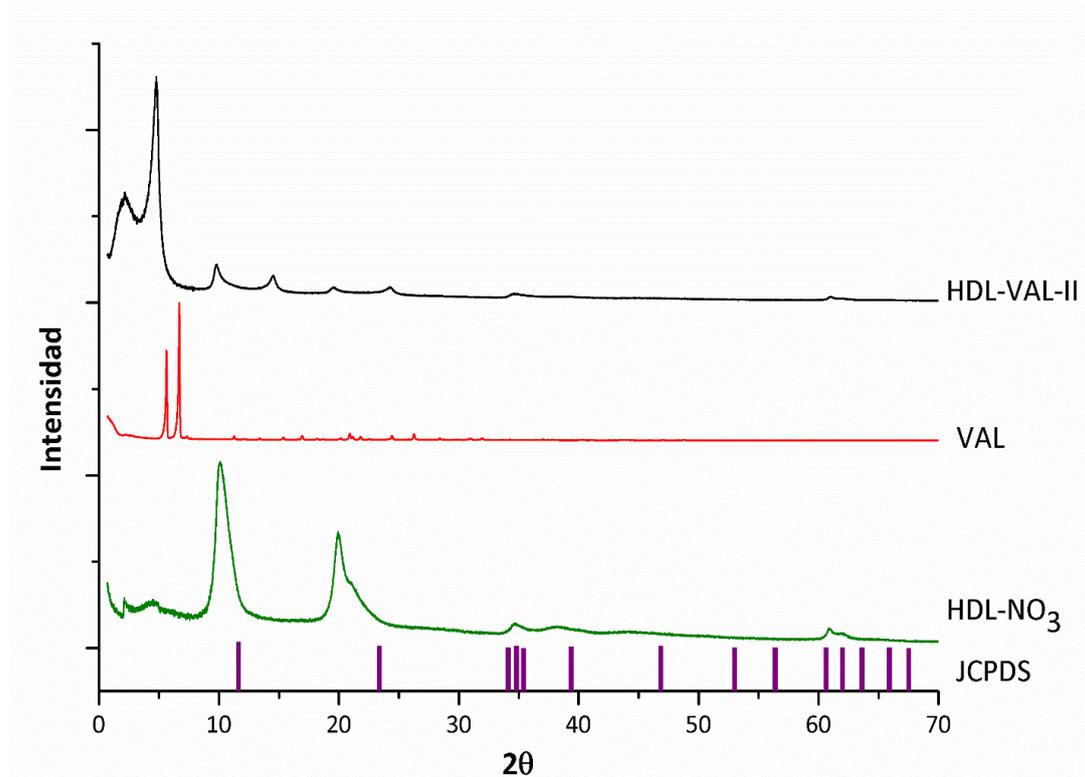


Figura 5.2. Diffractogramas de las muestras HDL-VAL-II, VAL, HDL-NO₃ y el estándar de referencia de éste último.

levemente desplazados. Los valores de las reflexiones de HDL-NO₃ son: 10,18 ° 2θ para el plano (003), 19,9 ° 2θ para el plano (006), 60,8 ° 2θ para el plano (110) y 62,1 ° 2θ para el plano (113). Teniendo en cuenta estos datos, el espacio basal del plano (003) resultó ser de 8,8 Å. El ion nitrato, por su geometría planar, puede ubicarse de dos maneras en la interlámina del HDL; en forma horizontal (o “acostada”) o en forma vertical (o “parada”) y esto determina dos espacios interlaminares diferentes, 7,9 Å y 8,8 Å, respectivamente. Es importante obtener siempre un resultado de 8,8 Å, ya que luego esto permite una mayor difusión del ion por la interlámina mejorando el intercambio iónico (Rives et al., 2014).

El difractograma del valproato de sodio fue realizado para corroborar que no existe presencia del fármaco libre en la muestra HDL-VAL-II. Para esta muestra, se observa un desplazamiento de los planos característicos del HDL-NO₃ a valores de 2θ menores, siendo los ángulos de difracción de los planos (003) y (006) de 4,8 ° 2θ y 9,7 ° 2θ, respectivamente. Esto da como resultado un aumento del espacio basal, con un

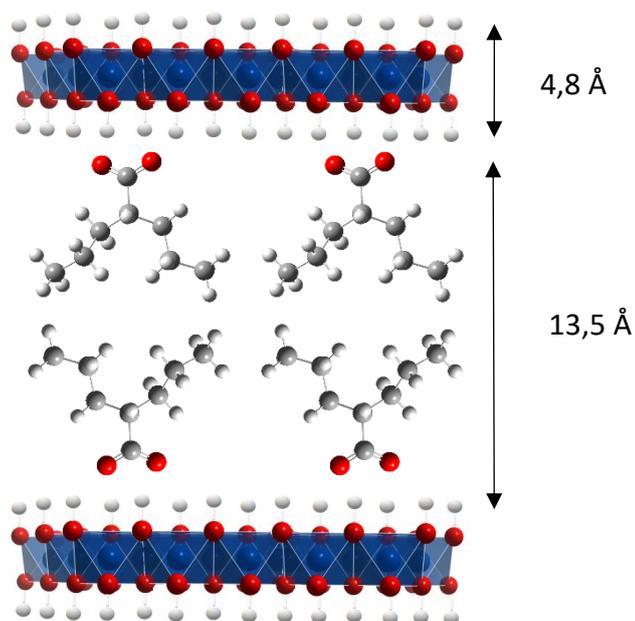


Figura 5.3. Dibujo esquemático de la disposición de la molécula de valproato en la estructura del HDL

(d_{003}) de 18,3 Å, en coincidencia con los datos informados por Nakayama et al. con un (d_{003}) de 18,5 Å y por Nagaraj et al. con un (d_{003}) de 18,7 Å (Nagaraj et al., 2015; Nakayama & Hayashi, 2014). Teniendo en cuenta que la capa del HDL posee un tamaño de 4,8 Å (Aisawa et al., 2003) el espacio interlaminar neto es 13,5 Å. Considerando este espacio interlaminar, y las dimensiones moleculares del valproato, la Figura 5.3 muestra la posible distribución de la molécula en la estructura del HDL, formando una doble capa con los grupos carboxilatos orientados hacia las láminas del HDL (arriba y abajo) y con el resto de la molécula orientada hacia el interior del espacio interlaminar. Esta disposición se encuentra acorde a lo publicado en la literatura (Nagaraj et al., 2015), y tiene en cuenta que la carga negativa del grupo carboxilato se encuentra cercana a las cargas positivas de las láminas, y que la región más hidrofóbica de la molécula interactúa con la correspondiente región hidrofóbica de la otra molécula en el centro del espacio interlaminar.

La ecuación de Scherrer (explicada en la sección II.2.4) permite estimar el tamaño promedio de las partículas (Li et al., 2005; Zhao et al., 2002). La aplicación de esta ecuación al plano (003) da como resultado un espesor de 192 Å (un apilamiento aproximado de 22 láminas) para HDL-NO₃, y 279 Å (un apilamiento de 15 láminas) para

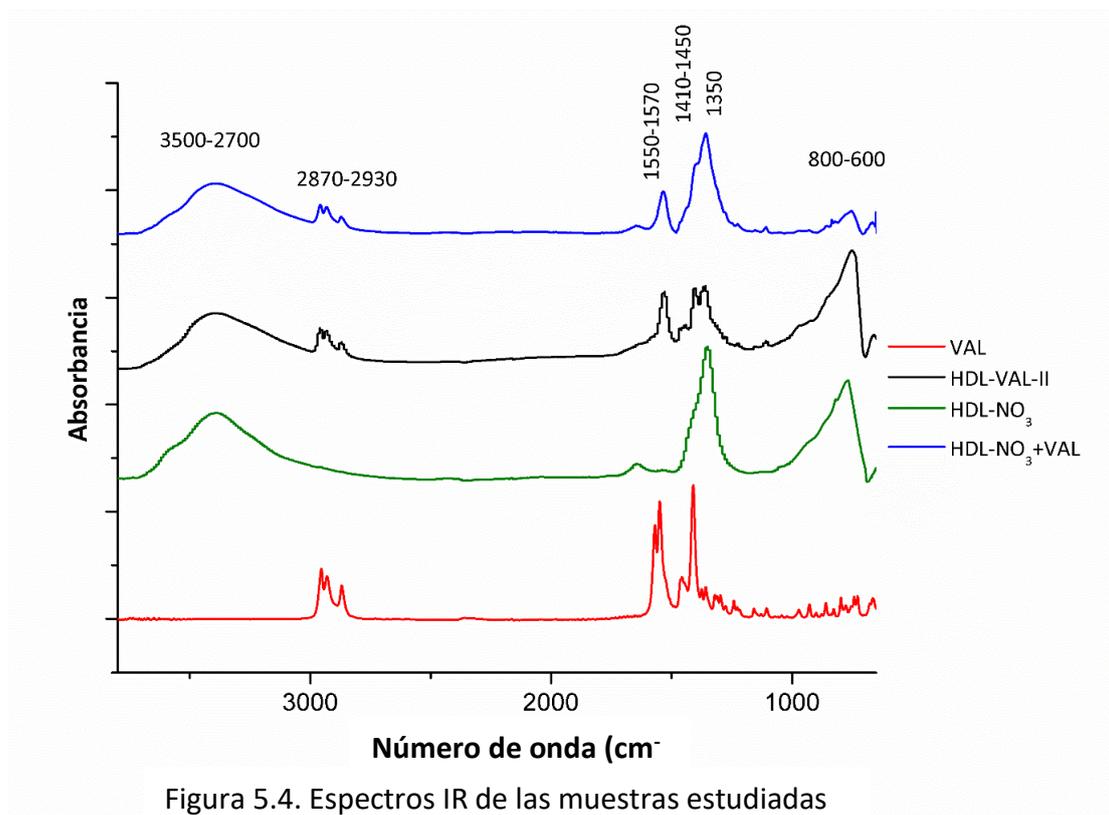
la muestra HDL-VAL-II, evidenciando un apilamiento organizado como en el material original. Esto puede observarse en la cristalinidad del difractograma obtenido.

Muestra	% Mg	% Al	% H ₂ O	% VAL	% C	% N	Fórmula química
HDL-NO ₃	16,7	9,4	11,4	-	0,46	3,82	[Mg _{0,66} Al _{0,33} (OH) ₂](NO ₃ ⁻) _{0,27} (CO ₃ ²⁻) _{0,03} ·0,56H ₂ O
HDL-VAL-II	9,1	5,1	16,5	25	20	0,4	[Mg _{0,66} Al _{0,33} (OH) ₂]VAL _{0,29} (NO ₃ ⁻) _{0,05} ·1,58H ₂ O

Tabla 5.1. Composición elemental, contenido de agua interlaminar y fórmula teórica de las muestras estudiadas

La Tabla 5.1 muestra la composición química y fórmula teórica para la muestra HDL-NO₃ y para la obtenida luego del intercambio iónico. La relación obtenida de Mg/Al es de 2 para la muestra HDL-NO₃ (igual a la relación seleccionada en la síntesis de la muestra. Ver sección II.4.3) y se mantiene constante luego de la síntesis de la muestra HDL-VAL-II, ya que esa proporción no varía. También se observa un aumento en el porcentaje de C y una disminución del porcentaje de N en la muestra HDL-VAL-II, debido principalmente al intercambio de los iones NO₃⁻ por moléculas de VAL. Para la muestra de HDL- NO₃, se observa un pequeño porcentaje de C, debido seguramente a la contaminación con iones carbonato en la síntesis de la muestra. Para la muestra HDL-VAL-II se observa que existe una pequeña cantidad de iones NO₃⁻ que no han sido desplazados en su totalidad por el fármaco. Para ambos casos, la carga estructural positiva del HDL generada por los cationes trivalentes se encuentra balanceada en su totalidad con la presencia de estos aniones.

Los espectros FTIR son mostrados en la Figura 5.4. Son analizadas las muestras HDL-NO₃, HDL-VAL-II, VAL y una mezcla física de HDL-NO₃ y VAL en las mismas proporciones que HDL-VAL-II para ser comparadas. Para la molécula de VAL, se observan las vibraciones simétricas y asimétricas del grupo carboxilato a 1450 cm⁻¹ y 1550-1569 cm⁻¹, respectivamente y un grupo de bandas a 2870-2950 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento C-H (Alsarra et al., 2005; Chang, 1979). Para la muestra HDL-NO₃ se encuentran bandas a 660-770 cm⁻¹ correspondientes a las vibraciones M-O y M-O-M (M= Mg o Al), a 1351 cm⁻¹ debido al estiramiento asimétrico de NO₃⁻ y una banda amplia a 2700-3500 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento O-H del agua interlaminar del HDL (Goebbert et al., 2009; Olanrewaju et al., 2000). En la muestra HDL-VAL-II se manifiestan



todas las bandas descritas anteriormente, confirmando la presencia del fármaco en la misma. Como ya fue mencionado, sigue existiendo una pequeña cantidad de iones NO₃⁻ en esta muestra y se corrobora con lo mostrado en la Figura 5.4, que muestra la banda a 1350 cm⁻¹ aunque con mucho menos intensidad. En el capítulo anterior (sección IV.2) se comparó la muestra sintetizada (HDL-CIP-II) con una mezcla física y se observó un cambio en la banda a 1700 cm⁻¹ debido a la ionización del grupo ácido (COOH) y, por lo

tanto, se corroboró su interacción con la estructura del HDL. En este caso, no es posible detectar esa variación debido a que el COOH de la molécula de VAL ya se encuentra ionizado y por lo tanto la banda a 1700 cm^{-1} correspondiente al carbonilo (C=O) no se observa (Bellamy L., 1975).

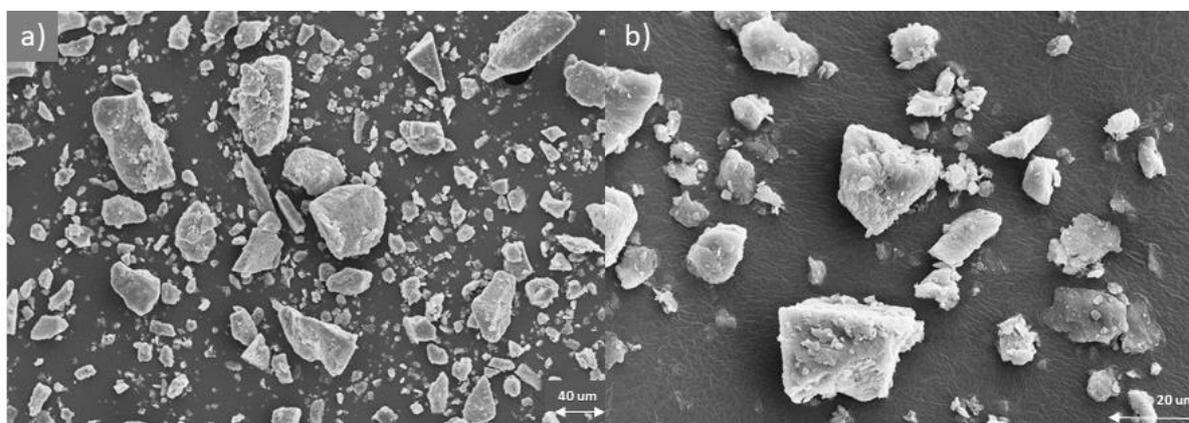


Figura 5.5. Imágenes SEM de la muestra HDL-NO₃ a diferentes magnificaciones

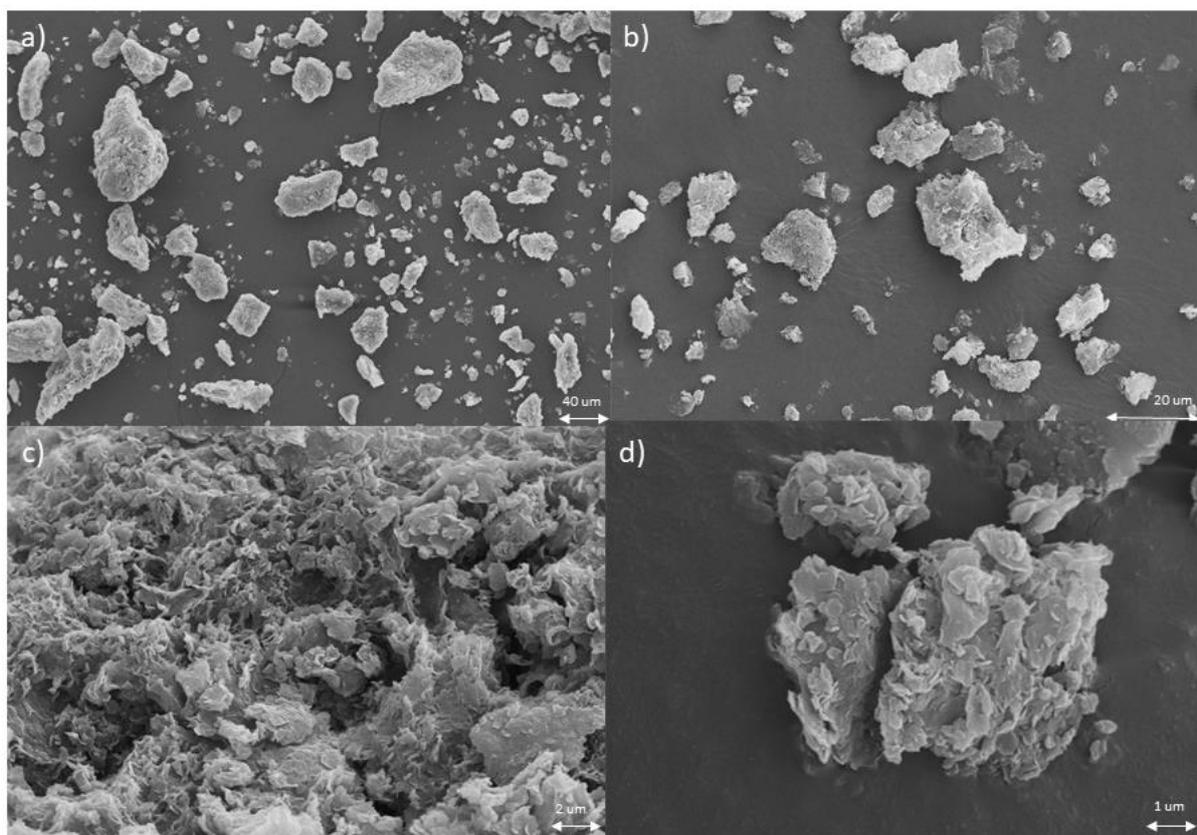


Figura 5.6. Imágenes SEM de la muestra HDL-CIP-II a diferentes magnificaciones.

Las imágenes SEM de la muestra HDL-NO₃ y la muestra HDL-VAL-II se presentan en diferentes magnificaciones en la Figura 5.5 y 5.6 respectivamente. Para una misma muestra, los agregados varían en forma y tamaño, que van desde 2 a 80 μm, sin encontrarse diferencias significativas en forma y tamaño entre ambas muestras.

En la Figura 5.7 se muestra una de las imágenes de HDL-NO₃ y una de las imágenes de HDL-VAL-II, con los correspondientes análisis EDS. En los mismos se corrobora, aunque de manera cualitativa, la composición química de la muestra detallada en la Tabla 5.1. HDL-NO₃ presenta predominancia de los elementos Mg, Al y O, que corresponden a la estructura del HDL, y menor proporción de N y C que corresponden a los iones nitrato y carbonato. Y con respecto a HDL-VAL-II se observa también una abundante presencia de Mg, Al y O, con el C que corresponde principalmente a la molécula de VAL.

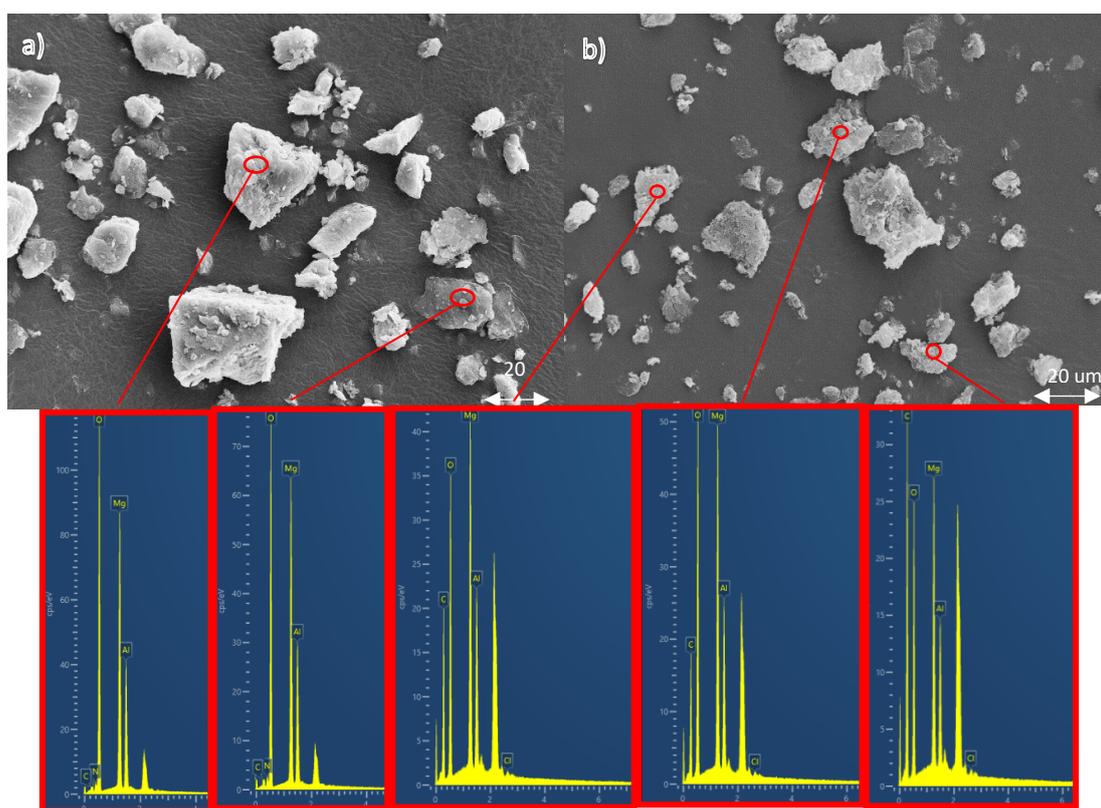


Figura 5.7. Imagen SEM con análisis EDS de: a) HDL-NO₃; b) HDL-VAL-II

La Figura 5.8 muestra las imágenes TEM a dos diferentes magnificaciones tanto de HDL-NO₃ como de HDL-VAL-II. Se observa claramente la forma de plaquetas hexagonales con bordes redondeados, característica de los HDL. La principal diferencia

que se observa entre ambas muestras es en el tamaño de las mismas, siendo de 20-50 nm para HDL-NO₃ y de 50-200 nm para HDL-VAL-II. Esto es seguramente debido a las distintas condiciones de síntesis de ambos sólidos (ver sección II.4.3), ya que el tratamiento hidrotermal y el envejecimiento dan como resultado una mayor cristalinidad y tamaño (Kovanda et al., 2005; Saiah et al., 2009; Tao et al., 2006).

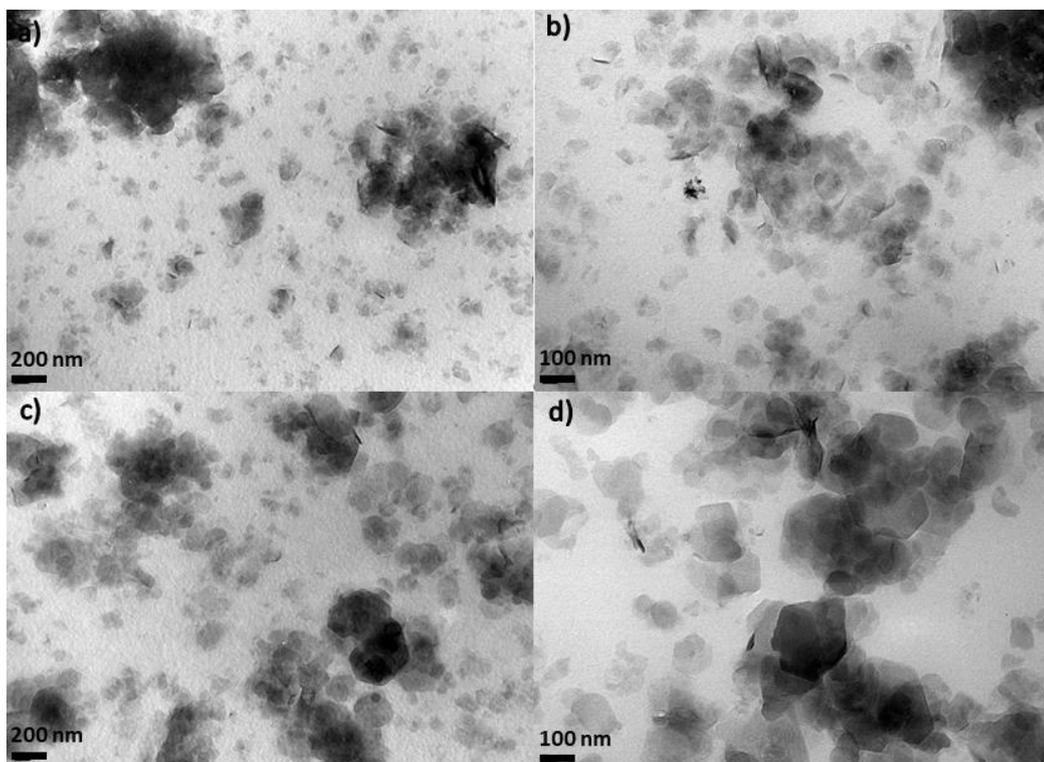


Figura 5.8. Imagen TEM de: a y b) HDL-NO₃; c y d) HDL-VAL-II.

En la Figura 5.9 se presentan los análisis termogravimétricos y de calorimetría diferencial de barrido de HDL-NO₃, VAL y HDL-VAL-II. Para la muestra HDL-NO₃ se observan dos picos endotérmicos: uno a 220 °C, con una pérdida de masa del 10,2 %, y otro a 430 °C, con una pérdida de masa del 36,2 %. El primer proceso se debe a la pérdida de agua superficial e interlaminar. El segundo proceso, con una mayor disminución de masa, se debe a la deshidroxilación del sólido conjuntamente con la descomposición de los iones nitrato, resultando en un colapso de la estructura del HDL y en la formación de los óxidos mixtos de Mg y Al. En esta muestra la pérdida total de masa fue del 49,7 %, en concordancia con lo aportado por la literatura (Benício et al., 2017; Prinetto et al., 2000; Zuo et al., 2019). Para la molécula de VAL, observamos un pico exotérmico entre los 400-500 °C, debiéndose principalmente a la descomposición del fármaco, con una

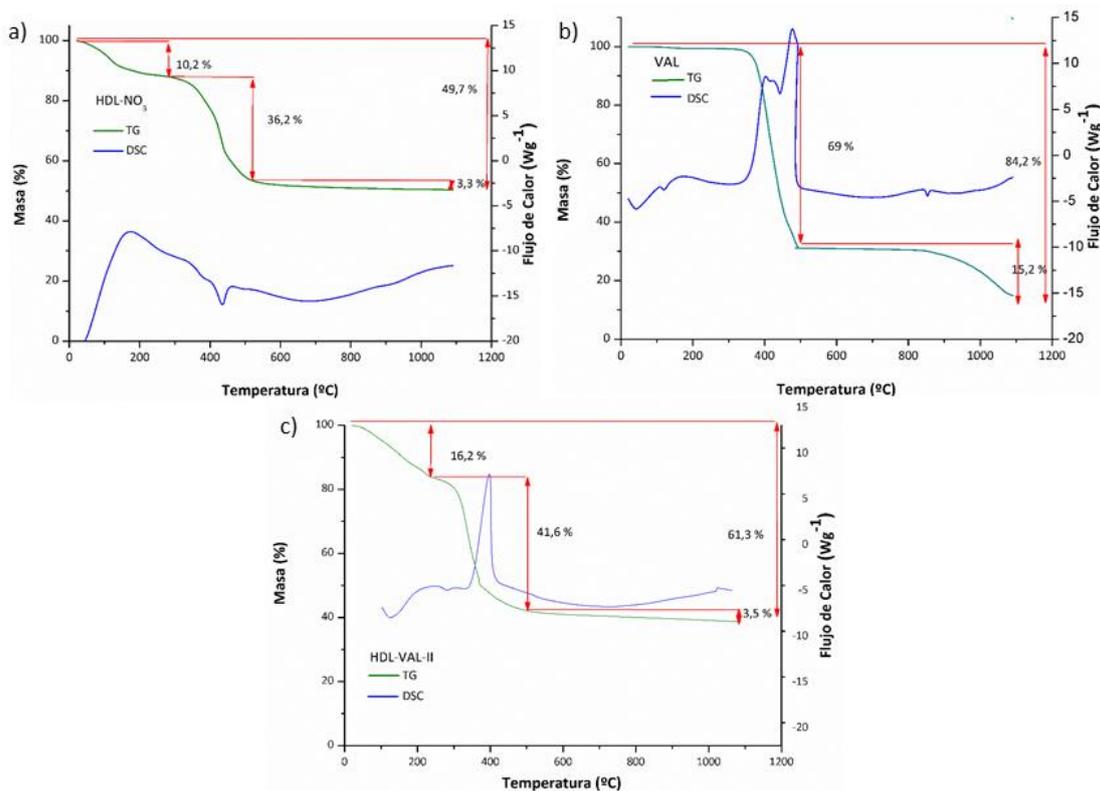


Figura 5.9. DSC y TG de: a) HDL-NO₃; b) VAL; y c) HDL-VAL-II

pérdida de masa total del 84,2 % (Teixeira et al., 2006). Para HDL-VAL-II se detallan dos pérdidas de masa importantes: una que llega hasta los 230 °C con una merma del 16,2 % y otra en el rango de 300-500 °C con una pérdida del 41,6 %. La pérdida total de masa de esta muestra es del 61,3 %. De este porcentaje, y considerando los datos analizados anteriormente en las muestras por separado, se deduce que el 33 % corresponde a la degradación del fármaco y el 67 % corresponde a la degradación de la estructura del HDL. Esto está en concordancia con los datos de composición elemental detallado en la Tabla 5.1.

La Figura 5.10 detalla el potencial zeta (ζ) de HDL-NO₃ y HDL-VAL-II. Para todo el rango de pH estudiado, los sólidos poseen potenciales positivos con valores que van desde los 30 mV hasta los 10 mV. Esto es acorde a lo informado en la literatura (Luengo et al., 2017) ya que los HDL poseen una carga neta positiva. No se observan diferencias importantes entre el comportamiento de las dos muestras en todo el rango de pH estudiado, lo que se corrobora con la información brindada en la Tabla 5.1, que indica que la cantidad de fármaco incorporado en HDL-VAL-II es similar a la cantidad de iones

nitrate en HDL-NO₃. Esto se debe principalmente a que la relación Mg/Al es la misma para ambas muestras.

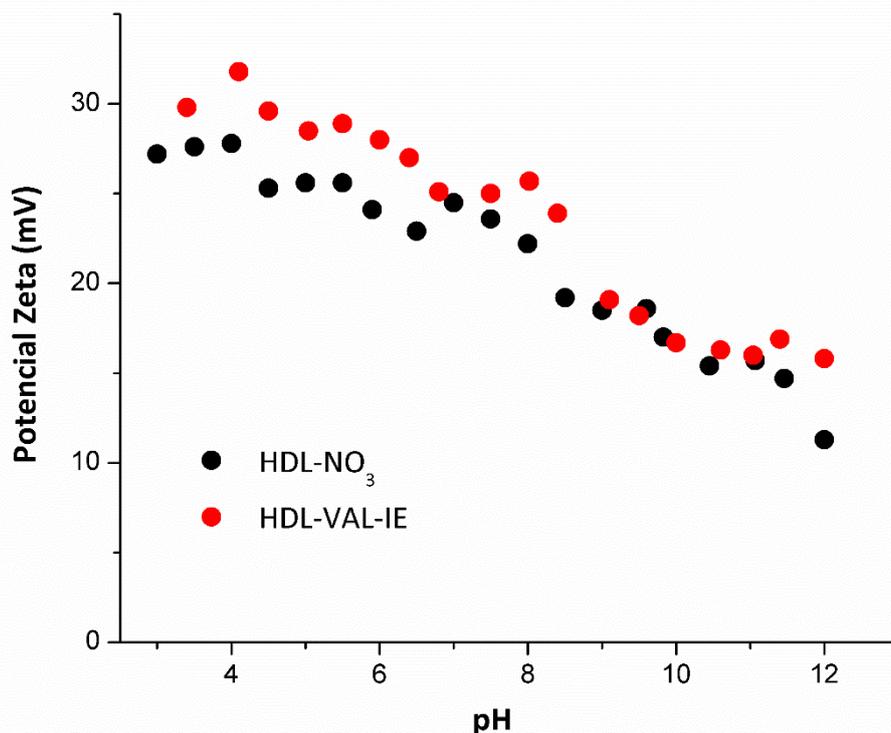


Figura 5.10. Potencial zeta (ζ) de las muestras estudiadas en función del pH

V.3. CINÉTICAS DE LIBERACIÓN Y DE DISOLUCIÓN

La Figura 5.11 muestra las cinéticas de liberación del fármaco y de disolución de la estructura del HDL en NaCl 0,9 % en un rango de estudio de pH 3 a 9. El fármaco es liberado en un 50% en los primeros 5 min, alcanzando el 100 % a los 120 min, aproximadamente. La disolución de la estructura del HDL, cuantificada a través de la aparición de Mg en solución, presenta un comportamiento típico con respecto al pH; una mayor y más rápida disolución a pH ácido y una mayor estabilidad a pH neutros-básicos (Mishra et al., 2018). La estructura alcanza una disolución del 80 % a pH 3, un 40 % a pH 4, un 20 % a pH 5 y solo un 10 % a valores de pH entre 6-9, en el tiempo estudiado. La liberación de VAL puede explicarse por dos procesos: por disolución del mismo HDL o por intercambio iónico con los aniones cloruros presentes en la solución (Rojas et al., 2012). La Figura 5.12 permite visualizar los datos cinéticos de distinta manera al graficar liberación de VAL vs Mg liberado en función del pH estudiado. Como se observa en la

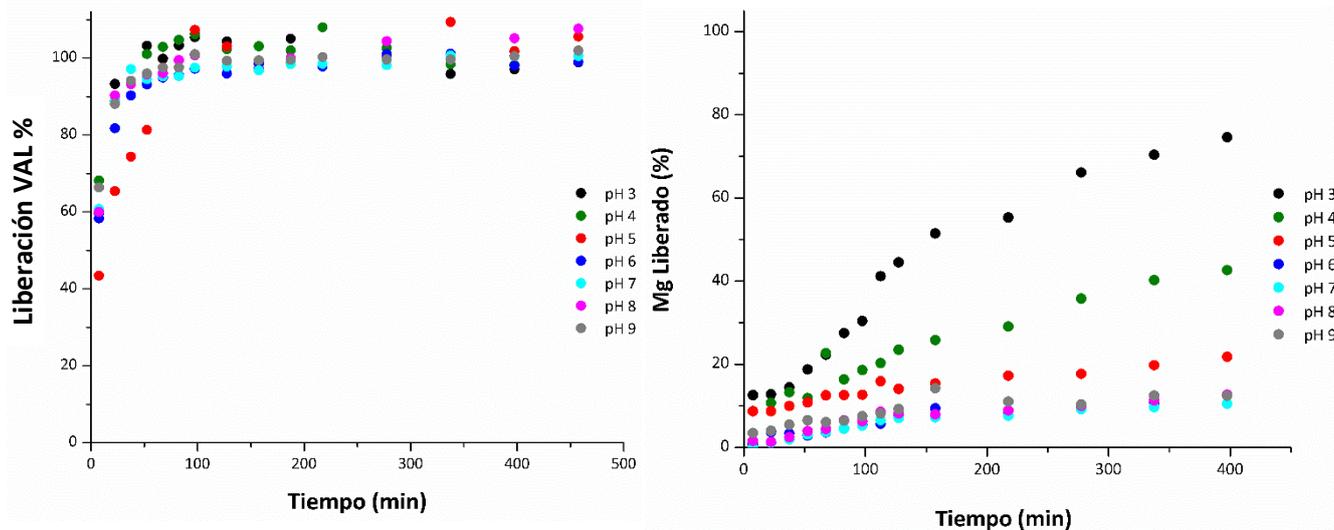


Figura 5.11. Cinéticas de liberación del fármaco y de disolución del HDL en NaCl 0,9 %

misma, cuando la liberación del fármaco alcanza el 90 %, la disolución llegó solamente a un 15 %. Esto indica que la estructura es estable en ese punto, y por lo tanto el proceso que gobernaría la liberación de VAL sería el intercambio iónico y no la disolución del HDL.

Las cinéticas de liberación del fármaco fueron ajustadas con diferentes modelos matemáticos con el fin de establecer la evolución de la concentración con respecto al tiempo. Se aplicaron ecuaciones de orden cero, pseudo primer orden, pseudo segundo orden e Higuchi (el desarrollo matemático de cada ecuación fue detallado en la sección II.5). La Tabla 2 muestra los valores de las constantes (k) y su coeficiente de correlación para cada modelo (r^2). Observando estos parámetros, el modelo que mejor ajusta a los datos experimentales obtenidos es la fórmula de pseudo segundo orden, y que los

	Orden Cero		Higuchi		Pseudo primer orden		Pseudo segundo orden	
	k (mg min ⁻¹)	r ²	k (mg min ^{-1/2})	r ²	k (min ⁻¹)	r ²	k (mg ⁻¹ min ⁻¹)	r ²
pH 3	1,25	0,87	10,5	0,76	0,16	0,89	0,01	0,999
pH 4	1,38	0,65	8,9	0,94	0,2	0,92	0,01	0,998
pH 5	1,11	0,71	8,2	0,94	0,06	0,93	0,0093	0,996
pH 6	1,23	0,83	9,87	0,93	0,16	0,95	0,01	0,999
pH 7	1,05	0,87	11,24	0,91	0,18	0,97	0,0099	0,999
pH 8	0,8	0,78	10,3	0,82	0,17	0,94	0,0093	0,999
pH 9	0,87	0,82	13,2	1	0,2	0,99	0,0098	0,999

Tabla 5.2. Parámetros cinéticos correspondientes a cada valor de pH.

valores de las constantes no varían más de 5 % entre sí, por lo que se podría concluir que la variación de pH no afecta la liberación de VAL.

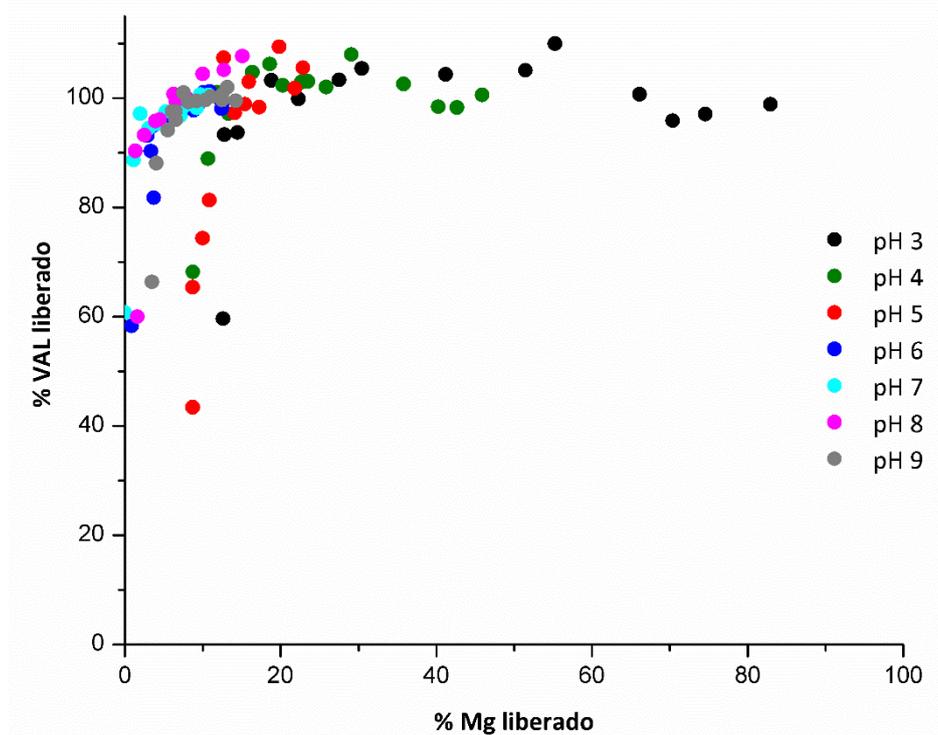


Figura 5.12. Cinéticas de liberación VAL vs Mg.

La liberación del fármaco y la disolución de la estructura del HDL también fueron estudiadas en condiciones “in vitro”, y los resultados se muestran en la Figura 5.12. La liberación de VAL alcanza el 100% en todos los casos, y este valor es alcanzado a los 15 min a pH 1,2 y 150 min a pH 4,5 y 6,8. La disolución de la estructura del HDL a los 360 min es completa para pH 1,2, un 49 % para pH 4,5 y sólo un 19 % para pH 6,8. Considerando estos valores se observa un comportamiento similar a lo analizado anteriormente, donde no hay una correlación entre la disolución de la estructura del HDL y la liberación del fármaco; a pH 1,2 se libera el 100 % de VAL cuando la disolución del HDL alcanza el 10 %, a pH 4,5 el 100 % del fármaco se alcanza cuando se disuelve solo el 20% de la estructura y a pH 6,8 el 100 % de VAL liberado se corresponde con un 14 % del HDL disuelto. Analizando estos datos se podría suponer también que en

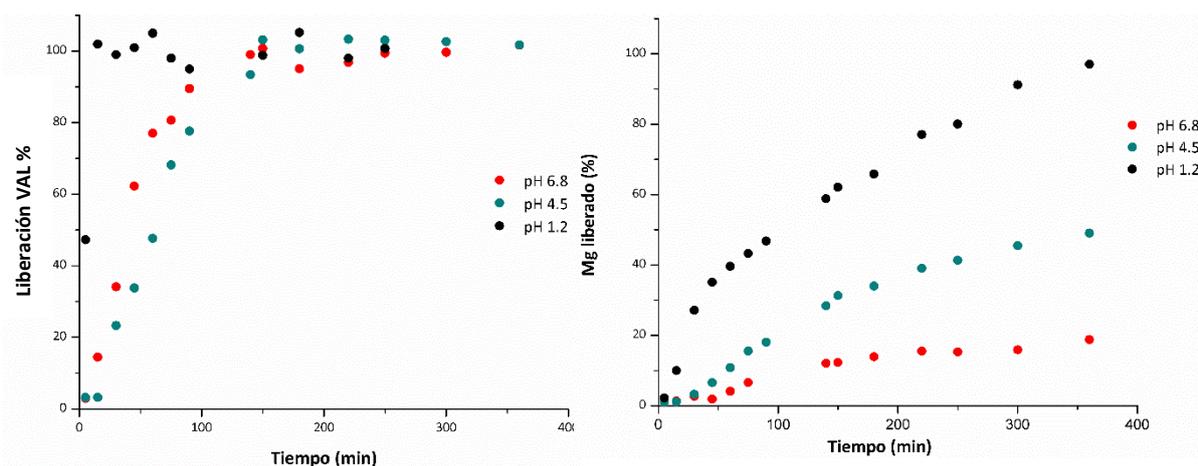


Figura 5.13. Liberación de VAL y Mg a valores de pH fisiológicos.

condiciones “in vitro” el proceso que determina la liberación del fármaco es el intercambio iónico y no la disolución del HDL.

V.4. CONCLUSIONES

Se sintetizó un HDL con el fármaco VAL intercalado en su estructura por el método de intercambio iónico partiendo de un HDL con iones nitrato como su anión interlaminar original. Los análisis de caracterización de la muestra demostraron que el fármaco efectivamente se intercala en la estructura del HDL, ampliando su espaciado interlaminar de manera considerable. A través de un análisis elemental completo se pudo determinar la fórmula del nuevo complejo sintetizado donde se observa una casi completa remoción de los iones nitrato.

Los estudios cinéticos de liberación del fármaco y de disolución de la estructura tanto en NaCl 0,9 % como en buffers fisiológicos en un amplio rango de pH demostraron que el proceso que predomina en la liberación del VAL es el intercambio iónico y no la disolución del HDL, ya que la misma permanece casi intacta (con pérdidas solo de hasta el 20 %) cuando la liberación del fármaco es total.

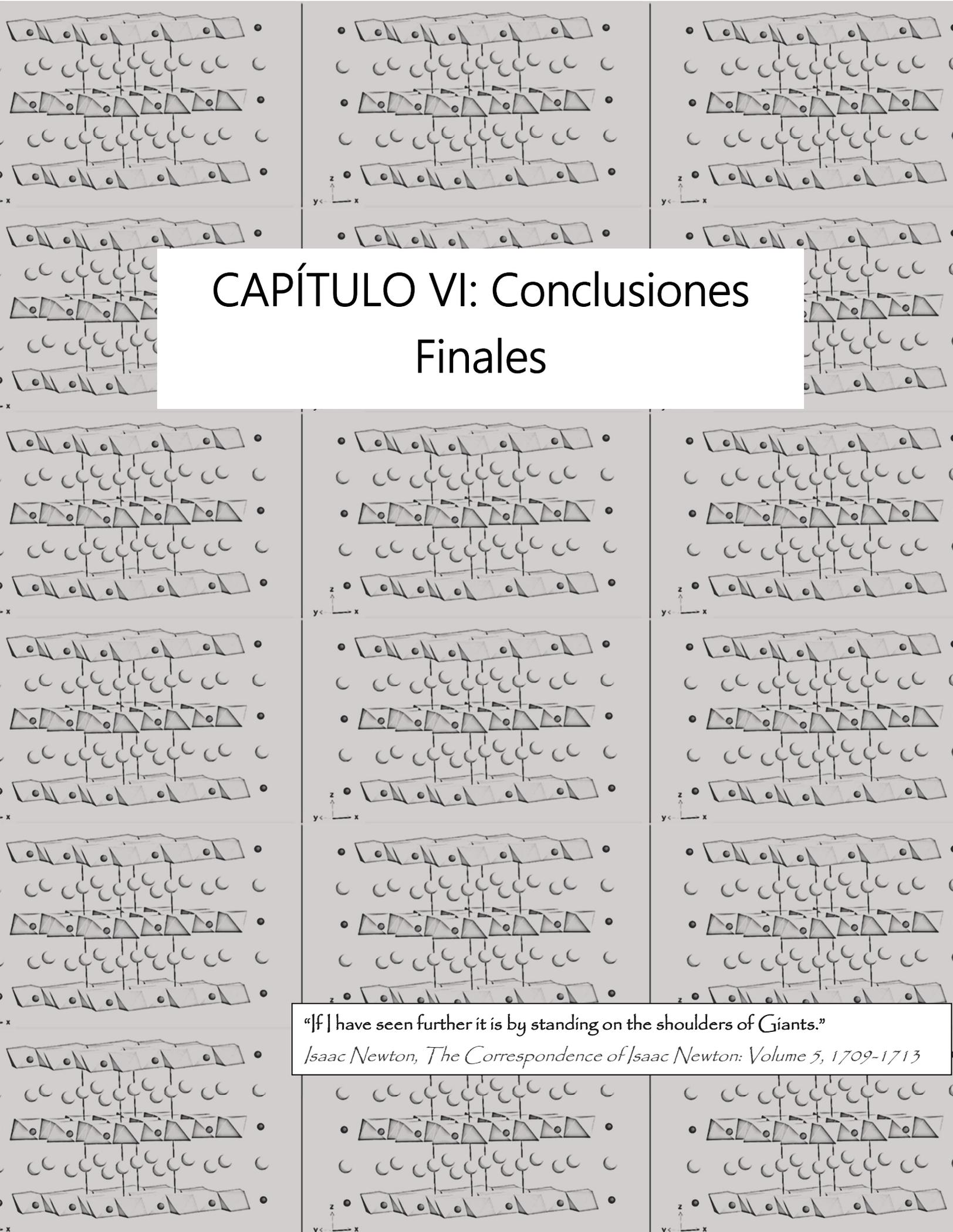
V.5. REFERENCIAS

- Aisawa, S., Hirahara, H., Ishiyama, K., Ogasawara, W., Umetsu, Y., & Narita, E. (2003). Sugar-anionic clay composite materials: intercalation of pentoses in layered double hydroxide. *Journal of Solid State Chemistry*, 174(2), 342–348. [https://doi.org/10.1016/S0022-4596\(03\)00234-2](https://doi.org/10.1016/S0022-4596(03)00234-2).
- Alsarra, I. A., Al-Omar, M., & Belal, F. (2005). Valproic Acid and Sodium Valproate: Comprehensive Profile. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*, 32(05), 209–240. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(05\)32008-9](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(05)32008-9)
- Bellamy L. (1975). Carboxylic Acids. In *The Infra-red Spectra of Complex Molecules* (Issue 10, pp. 183–202). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-388438-1.00008-x>.
- Benício, L. P. F., Constantino, V. R. L., Pinto, F. G., Vergütz, L., Tronto, J., & Da Costa, L. M. (2017). Layered Double Hydroxides: New Technology in Phosphate Fertilizers Based on Nanostructured Materials. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5(1), 399–409. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b01784>.
- Chang, Z. L. (1979). Sodium Valproate and Valproic Acid. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, 8(C), 529–556. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60128-8](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60128-8).
- Chao, Y.-F., Chen, P.-C., & Wang, S.-L. (2008). Adsorption of 2,4-D on Mg/Al-NO₃ layered double hydroxides with varying layer charge density. *Applied Clay Science*, 40(1), 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2007.09.003>.
- Del Arco, M., Fernández, A., Martín, C., & Rives, V. (2010). Solubility and release of fenbufen intercalated in Mg, Al and Mg, Al, Fe layered double hydroxides (LDH): The effect of Eudragit® S 100 covering. *Journal of Solid State Chemistry*, 183(12), 3002–3009. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2010.10.017>.
- Eby, G. A., & Eby, K. L. (2006). Rapid recovery from major depression using magnesium treatment. *Medical Hypotheses*, 67(2), 362–370. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2006.01.047>.
- Goebbert, D. J., Garand, E., Wende, T., Bergmann, R., Meijer, G., Asmis, K. R., & Neumark, D. M. (2009). Infrared spectroscopy of the microhydrated nitrate ions NO₃⁻ (H₂O). *Journal of Physical Chemistry A*, 113(26), 7584–7592.

- <https://doi.org/10.1021/jp9017103>.
- Kovanda, F., Koloušek, D., Cílová, Z., & Hulínský, V. (2005). Crystallization of synthetic hydrotalcite under hydrothermal conditions. *Applied Clay Science*, 28(1-4 SPEC. ISS.), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2004.01.009>.
- Li, F., Jiang, X., Evans, D. G., & Duan, X. (2005). Structure and basicity of mesoporous materials from Mg/Al/In layered double hydroxides prepared by separate nucleation and aging steps method. *Journal of Porous Materials*, 12(1), 55–63. <https://doi.org/10.1007/s10934-005-5234-z>.
- Luengo, C. V., Volpe, M. A., & Avena, M. J. (2017). High sorption of phosphate on Mg-Al layered double hydroxides: Kinetics and equilibrium. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(5), 4656–4662. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.08.051>.
- Mishra, G., Dash, B., & Pandey, S. (2018). Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials. *Applied Clay Science*, 153, 172–186. <https://doi.org/10.1016/J.CLAY.2017.12.021>.
- Nagaraj, V. J., Sun, X., Mehta, J., Martin, M., Ngo, T., & Dey, S. K. (2015). Delivery capabilities of (Zn,Al)-based layered double hydroxide nanoparticles. *Journal of Nanotechnology*, 2015, 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2015/350370>.
- Nakayama, H., & Hayashi, A. (2014). Mixing acid salts and layered double hydroxides in nanoscale under solid condition. *Pharmaceutics*, 6(3), 436–446. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics6030436>.
- Nalivaeva, N. N., Belyaev, N. D., & Turner, A. J. (2009). Sodium valproate: an old drug with new roles. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30(10), 509–514. <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2009.07.002>.
- Olanrewaju, J., Newalkar, B. L., Mancino, C., & Komarneni, S. (2000). Simplified synthesis of nitrate form of layered double hydroxide. *Materials Letters*, 45(6), 307–310. [https://doi.org/10.1016/S0167-577X\(00\)00123-3](https://doi.org/10.1016/S0167-577X(00)00123-3).
- Osborn, K. E., Shytle, R. D., Frontera, A. T., Soble, J. R., & Schoenberg, M. R. (2016). Addressing potential role of magnesium dyshomeostasis to improve treatment efficacy for epilepsy: A reexamination of the literature. *Journal of Clinical*

- Pharmacology*, 56(3), 260–265. <https://doi.org/10.1002/jcph.626>.
- Prinetto, F., Ghiotti, G., Graffin, P., & Tichit, D. (2000). Synthesis and characterization of sol-gel Mg/Al and Ni/Al layered double hydroxides and comparison with co-precipitated samples. *Microporous and Mesoporous Materials*, 39(1–2), 229–247. [https://doi.org/10.1016/S1387-1811\(00\)00197-9](https://doi.org/10.1016/S1387-1811(00)00197-9).
- Rives, V., del Arco, M., & Martín, C. (2014). Intercalation of drugs in layered double hydroxides and their controlled release: A review. *Applied Clay Science*, 88–89, 239–269. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2013.12.002>.
- Rojas, R., Palena, M. C., Jimenez-Kairuz, A. F., Manzo, R. H., & Giacomelli, C. E. (2012). Modeling drug release from a layered double hydroxide-ibuprofen complex. *Applied Clay Science*, 62–63, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2012.04.004>
- Saiah, F. B. D., Su, B. L., & Bettahar, N. (2009). Nickel-iron layered double hydroxide (LDH): Textural properties upon hydrothermal treatments and application on dye sorption. *Journal of Hazardous Materials*, 165(1–3), 206–217. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2008.09.125>.
- Tao, Q., Zhang, Y., Zhang, X., Yuan, P., & He, H. (2006). Synthesis and characterization of layered double hydroxides with a high aspect ratio. *Journal of Solid State Chemistry*, 179(3), 708–715. <https://doi.org/10.1016/J.JSSC.2005.11.023>.
- Teixeira, L. R., Sinisterra, R. D., Vieira, R. P., Scarlatelli-Lima, A., Moraes, M. F. D., Doretto, M. C., Denadai, Â. M., & Beraldo, H. (2006). An inclusion compound of the anticonvulsant sodium valproate into α -cyclodextrin: Physico-chemical characterization. *Journal of Inclusion Phenomena*, 54(1–2), 133–138. <https://doi.org/10.1007/s10847-005-5817-y>.
- Xu, Z. P., & Zeng, H. C. (2001). Abrupt Structural Transformation in Hydrotalcite-like Compounds $Mg_{1-x}Al_x(OH)_2(NO_3)_x \cdot nH_2O$ as a Continuous Function of Nitrate Anions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(9), 1743–1749. <https://doi.org/10.1021/jp0029257>.
- Zhao, Y., Jiao, Q. Z., Evans, D. G., & Duan, X. (2002). Mechanism of pore formation and structural characterization for mesoporous Mg-Al composite oxides. *Science in China Series B-Chemistry*, 45(1), 37–45. <https://doi.org/10.1360/02yb9006>.
- Zuo, J., Wu, B., Luo, C., Dong, B., & Xing, F. (2019). Preparation of MgAl layered double

hydroxides intercalated with nitrite ions and corrosion protection of steel bars in simulated carbonated concrete pore solution. *Corrosion Science*, 152(March), 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2019.03.007>.



CAPÍTULO VI: Conclusiones Finales

“[f] have seen further it is by standing on the shoulders of Giants.”

Isaac Newton, The Correspondence of Isaac Newton: Volume 5, 1709-1713

Si bien cada capítulo de esta tesis posee sus propias conclusiones, es posible entablar algunas conclusiones generales con respecto al uso de los HDL como transportadores de fármacos.

Se han utilizado todos los métodos de síntesis descritos en el capítulo II: coprecipitación, intercambio iónico y reconstrucción. Los resultados obtenidos muestran siempre la formación de la estructura típica de una hidrotalcita, con variaciones con respecto a su cristalinidad y relación de Mg/Al. Estos parámetros se encuentran principalmente condicionados por el pH, temperatura y tiempo de síntesis utilizado en la preparación de cada sólido, pero es claro que el producto espontáneo de la síntesis es el HDL, lo que lo hace muy simple de preparar, propiedad muy deseable si se busca una aplicación. Es necesario también considerar el uso de sales con nitrato como contraion ya que su afinidad por la estructura del HDL es menor que la de los iones cloruro, facilitando el intercambio iónico en el homónimo método de síntesis.

La caracterización por DRX de todas las muestras nos permitieron analizar si los principios activos se intercalan en el HDL o siguen siendo los contraiones originales de las sales los que ocupan ese lugar. No en todos los casos se logró intercalar el fármaco ya que, por ejemplo, en el caso de la vancomicina la misma quedó adsorbida sobre el HDL en los productos obtenidos por ambos métodos de síntesis, siendo el cloruro el anión interlamina. Con respecto a la molécula de ciprofloxacina, una parte se intercala y el resto de la droga se encuentra adsorbida, y en este caso se ven dos tipos de estructuras de HDL con distintos aniones interlaminares: el fármaco y los cloruros. Para la muestra obtenida con valproato se encuentra un intercambio completo donde el único anión interlaminares es el fármaco de interés. El análisis DRX en complemento con otras técnicas de caracterización como FTIR, SEM (acoplado con EDS), TEM, movilidad electroforética y un análisis elemental completo nos permitieron hacer una evaluación integral con respecto a las muestras sintetizadas, pudiendo saber cuál es la relación Mg/Al, cantidad de fármaco presente, tamaño de los cristales y carga superficial.

Las cinéticas de liberación de los fármacos y de disolución de la estructura permitieron observar los comportamientos cinéticos de las muestras analizadas bajo

diversas condiciones experimentales. Para el caso de vancomicina se ven diferentes comportamientos según el método de síntesis, donde la liberación del principio activo en la muestra obtenida por coprecipitación depende principalmente de la disolución de la estructura del HDL, mientras que, en la muestra obtenida por reconstrucción, no. Para la muestra con ciprofloxacina se observa que a pH ácidos la liberación del fármaco se da por la disolución del HDL mientras que a valores de pH neutros-básicos depende del intercambio iónico o desorción de la droga del HDL. Y para el caso del sólido con valproato, la liberación del mismo depende exclusivamente del intercambio que se produce con los aniones presentes en la solución. Debido a la sensibilidad de los HDL en medios ácidos sería necesario algún tipo de recubrimiento entérico que los proteja de esa degradación.

Para finalizar y englobar lo discutido anteriormente, se concluye que los HDL pueden ser efectivos transportadores de fármacos, pero no para todos. A continuación, detallaremos algunas consideraciones con respecto a las características fisicoquímicas que deben poseer los principios activos a la hora de seleccionarlos para su estudio con un HDL:

- Los fármacos deben ionizarse negativamente a los valores de pH de síntesis;
- Deben ser estables y evitar su degradación en las condiciones de síntesis;
- Mientras mayor sea la relación carga/tamaño de la molécula de interés se lograrán mejores resultados con respecto al intercalado del fármaco.