



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA DE LA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS:**

TITULO:

**NANOSISTEMAS BASADOS EN FOSFATOS DE CALCIO COMO
VEHÍCULOS PARA LA ADMINISTRACIÓN ESPECÍFICA DE FÁRMACOS**

Tesista: Ing. Darlin Johana Pérez Enríquez

Directora: Dra. Mónica González

Codirectora: Dra. María Laura Dell'Arciprete

Año: 2024

El presente trabajo de tesis, para optar al grado académico de Doctora en Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, se llevó a cabo en el Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Prof. Dra. Mónica González y la codirección de la Dra. María Laura Dell'Arciprete.

Ingeniera Darlin Johana Pérez Enríquez

E-mail: djohanap@gmail.com

Contenido

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y OBJETIVOS

Contenido	3
INDICE DE FIGURAS	7
INDICE DE TABLAS.....	12
INDICE DE ECUACIONES	13
INDICE DE SIGLAS Y ABREVIACIONES	14
AGRADECIMIENTOS.....	16
CAPÍTULO 1.	19
1. INTRODUCCIÓN.....	20
1.1. Tejido óseo.....	20
1.1.1. Enfermedades óseas.....	21
1.1.2. Caso de la osteoporosis.	22
1.2. Sistemas de entrega controlada.....	25
1.2.1. Liposomas recubiertos.....	27
1.3.2. Antibióticos.	30
1.3.3. Bisfosfonatos.	32
1.3.4. Fluoróforos.	34
1.3.5. Implantes modificados.....	36
2. HIPÓTESIS.....	38
2.1. Fundamentación.....	38
2.2. Objetivos específicos.	39
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y EQUIPAMIENTO	40
1. REACTIVOS.....	41
2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN EMPLEADAS.	42
2.1. Microscopía Electrónica de Transmisión.....	42
2.1.1. Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución.	43
2.2. Microscopía Electrónica de Barrido.	44
2.3. Difracción de Rayos X.....	45
2.4. Dispersión de rayos X de ángulo amplio.	46
2.5. Medidas de fotoluminiscencia.	47
2.5.1. Emisión resuelta en el tiempo.....	49
2.5.2. Anisotropía resuelta en el tiempo.	51

2.6.	Espectroscopía UV-Vis.....	54
2.7.	Espectroscopía IR por ATR-FTIR.....	55
2.8.	Dispersión Dinámica de Luz y Potencial <i>zeta</i>	57
2.9.	Microscopía de Epifluorescencia.....	59
2.10.	Espectroscopía ICP-OES para cuantificación de calcio.....	61
2.11.	Espectroscopía ¹ H RMN.....	61
2.12.	Microscopía de Fuerza Atómica.....	63

CAPÍTULO 3. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS RECUBIERTOS.....

		65
1.	INTRODUCCIÓN.....	66
2.	METODOLOGÍA.....	67
2.1.	Síntesis de liposomas.....	67
2.1.1.	Extrusión.....	68
2.1.2.	Inyección etanólica.....	69
2.1.3.	Sonicación.....	69
2.2.	Recubrimiento con fosfato de calcio.....	70
2.3.	Funcionalización superficial.....	73
2.3.1.	Bisfosfonato.....	75
2.3.2.	Fluoróforos.....	76
2.4.	Cuantificación de lípidos.....	77
2.5.	Determinación de alendronato por UV-Vis.....	78
2.6.	Eficiencia de encapsulación.....	80
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	80
3.1.	Elección del método de síntesis de liposomas.....	80
3.2.	Encapsulación y localización de drogas dentro del liposoma.....	85
3.2.1.	Levofloxacin.....	85
3.2.2.	Ciprofloxacina.....	96
3.2.3.	Alendronato.....	100
3.3.	Diámetro hidrodinámico y carga superficial.....	108
3.4.	Caracterización de la cobertura de fosfato de calcio.....	112
3.4.1.	Microscopía electrónica de transmisión.....	113
3.4.2.	Espectros ATR-FTIR.....	114
3.4.3.	Determinación de cristalinidad por DRX y WAXS.....	116
3.4.4.	Estimación de la cantidad de liposomas recubiertos y determinación de calcio por ICP-OES.....	119
3.5.	Funcionalización superficial de liposomas recubiertos.....	125

3.5.1.	Alendronato.....	125
3.5.2.	Fluoróforos.....	132
4.	CONCLUSIONES PARCIALES.....	145
CAPÍTULO 4. ESTUDIOS DE LIBERACIÓN E INTERACCIÓN CON SUPERFICIES		148
1.	INTRODUCCIÓN.....	149
2.	METODOLOGÍA.....	150
2.1.	Liberación en solución.....	150
2.1.1.	Levofloxacin.....	150
2.1.2.	Alendronato.....	151
2.2.	Interacción con superficies ricas en calcio.....	151
2.2.1.	Interacción con mica modificada.....	151
2.2.2.	Interacción con nanopartículas de HAp sobre vidrio y ruptura de CaPLi.....	152
2.2.3.	Interacción con andamios de biovidrio modificados con nanopartículas de HAp.....	153
2.3.	Retención de CaPLiLX en andamios de seda.....	153
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	154
3.1.	Liberación de LX en función del pH y modelado matemático.....	154
3.1.1.	Efecto del contenido de iones del medio.....	160
3.2.	Liberación de AD.....	163
3.3.	Interacción con superficies de mica estudiadas por AFM.....	166
3.3.1.	Efecto del alendronato en AD-CaPLiLX.....	170
3.4.	Interacción con andamios de biovidrio estudiadas por SEM.....	173
3.5.	Interacción con superficies de vidrio estudiada por microscopía de Epifluorescencia.....	175
3.6.	Interacción con andamios de seda.....	177
4.	CONCLUSIONES PARCIALES.....	181
CAPÍTULO 5. INTERACCIÓN CON SISTEMAS BIOLÓGICOS		184
1.	INTRODUCCIÓN.....	185
2.	METODOLOGÍA.....	187
2.1.	Ensayos de actividad antimicrobiana.....	187
2.1.1.	Antibiogramas.....	187
2.1.2.	Curvas de muerte.....	189
2.2.	Interacción con células de origen óseo.....	190
2.2.1.	Reactivos.....	190

2.2.2.	Cultivo celular.	191
2.2.3.	Ensayo de viabilidad celular.....	191
2.2.4.	Ensayo de internalización de nanovehículos.	192
2.3.	Biocompatibilidad con larvas de pejerrey.	194
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	195
3.1.	Susceptibilidad antibiótica.....	195
3.1.1.	Antibiogramas.	195
3.1.2.	Curvas de muerte.....	200
3.2.	Interacción con células.....	202
3.2.1.	Viabilidad celular.	202
3.2.2.	Estudio de la internalización de los nanovehículos.....	204
3.3.	Biocompatibilidad con larvas	209
4.	CONCLUSIONES PARCIALES	213
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS FUTURAS..		214
1.	CONCLUSIONES.....	215
2.	PERSPECTIVAS	219
BIBLIOGRAFÍA.....		221

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura jerárquica del tejido óseo. Tomado de [2].	20
Figura 2. Estructura de la molécula de DOPA.	30
Figura 3. Estructuras de las moléculas de ciprofloxacina (izquierda) y levofloxacina.	32
Figura 4. Estructura de la molécula de alendronato.	33
Figura 5. Estructura de los colorantes utilizados para la funcionalización superficial: A) Violeta de cresilo, B) Fucsina básica y C) FITC.	35
Figura 6. Imágenes microscópicas del andamio de BG. Izquierda: microscopía óptica. Tomado de [1]. Derecha: microscopía electrónica de barrido. Tomado de [52].	37
Figura 7. Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental, FEI Quanta 200 y Diagrama esquemático. Tomado de [56].	44
Figura 8. Diagrama de Jablonski para distintos estados excitados. Tomado de [63].	48
Figura 9. Fluorómetro SpexFluorolog FL3-11 Horriba-JovinYbon.	49
Figura 10. Esquema de polarización de moléculas.	52
Figura 11. Esquema de la interacción de la luz IR con la muestra es espectroscopía con ATR.	56
Figura 12. Esquema de funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia. Tomado de [15].	60
Figura 13. Funcionamiento del AFM. Tomado de [12].	64
Figura 14. Pequeño extrusor manual que se utiliza en la fabricación de nanoliposomas.	68
Figura 15. Estructuras de CEPA (izquierda) y AEPA.	70
Figura 16. Esquema general de liposoma, en este caso conteniendo LX, recubierto con una capa de fosfato de calcio. Se muestran los grupos superficiales que quedan expuestos por agregado de CEPA. Nótese que se propone la presencia de grupos fosfatídicos propios del fosfato.	71
Figura 17. Esquema de síntesis y recubrimiento de liposomas conteniendo LX.	72
Figura 18. A. Ejemplo de estructura de CaPLi funcionalizado con AD. B. Esquema de la reacción de entrecruzamiento usando EDC y S-NHS.	74
Figura 19. Reacción de derivatización de alendronato con DNFB.	79
Figura 20. Imágenes TEM de liposomas sin recubrir (lado izquierdo) y recubiertos, sintetizados por cada método. Las barras representan 100nm.	81

Figura 21. Curva de calibración por absorbancia para LX/H ₂ O a 330nm.....	86
Figura 22. Espectros de emisión de fluorescencia de LX y efecto de la diálisis: (A) LX en H ₂ O 100 μM, (B) LiLX y (C) espectros normalizados, pH=6,0-7,0. λ _{exc} = 330 nm.	87
Figura 23. Espectro de emisión de CaPLiLX con LX 9x10 ⁻⁶ M normalizado, pH=6,0-6,5.	88
Figura 24. Equilibrios ácido-base de la levofloxacin.	89
Figura 25. Estructura general de quelatos de quinolona 1:2 (metal:ligando) con cationes divalentes. Tomado de [96].	91
Figura 26. Espectros de emisión de LX 6μM en distintos solventes (líneas continuas) y de las especies emisoras determinadas por TRES (puntos). λ _{exc} =341 nm.....	92
Figura 27. Espectro de emisión de CaPLiLX 9x10 ⁻⁶ M pH=6,0-6,5; y Combinación de espectros de LX a pH 4,0, 7,4 y en hexano.	93
Figura 28. Decaimiento de anisotropía de fluorescencia resuelta en el tiempo de LX en medio acuoso y encapsulado en LiLX 100μM a pH 7,40, λ _{exc} = 341 nm.	94
Figura 29. Curva de calibración por absorbancia para CX en H ₂ O a 275nm.....	96
Figura 30. Espectros de emisión de fluorescencia de CX en liposomas y efecto de la diálisis: (A) CX en solución 20μM, (B) LiCX 20μM y (C) espectros normalizados; pH=4-5. λ _{exc} = 275 nm.....	98
Figura 31. Espectros de emisión de fluorescencia de CX en liposomas recubiertos (CaPLiCX, pH=7,0) y sin recubrir (LiCX pH=4-5). λ _{exc} = 275 nm.	99
Figura 32. Espectros ¹ H RMN de AD en PBS y citrato de sodio. Se muestran sobre las estructuras los desplazamientos correspondientes cuantificados para el AD y el citrato.	103
Figura 33. Espectros de ¹ H NMR para muestras de CaPLiAD sintetizadas por el método 1 y el método 2.	104
Figura 34. Espectro del complejo DNFB + AD luego de reaccionar. El blanco corresponde a los liposomas sin AD.....	106
Figura 35. Imágenes HR-STEM de CaPLiLX (a y b), imágenes de mapeo elemental EDS de Ca, P y N (c, d y e, respectivamente).	113
Figura 36. Imágenes TEM (a) y SEM (b) de CaPLiLX y LiLX (recuadro (a)). Estructura núcleo-capa de CaPLiLX observada por TEM (c).	114
Figura 37. Espectros ATR-FTIR de LX, DOPA y LiLX.	115
Figura 38. Espectros ATR-FTIR de CaPLiLX y partículas de CaP.....	116

Figura 39. Patrones DRX de nanocápsulas de CaP depositadas en portaobjetos de vidrio en presencia y en ausencia de Ca^{2+}	117
Figura 40. Patrones WAXS obtenidos de suspensiones coloidales CaPLiLX en ausencia y en presencia de iones Ca^{2+}	118
Figura 41. Esquema de las dimensiones estimadas para LiLX.	121
Figura 42. Esquema de las dimensiones estimadas para CaPLiLX.....	123
Figura 43. Espectros de AD-CaPLiLX funcionalizado por Método A y Método B (mayor tiempo y proporción).....	126
Figura 44. Esquema de anclaje del AD a CaPLi mediante enlace amida.....	127
Figura 45. Espectros ATR-FTRI de CaPLiLX, AD-CaPLiLX y AD en solución PBS $5 \times 10^{-3} \text{M}$	129
Figura 46. Equilibrios ácido-base del alendronato.	131
Figura 47. Espectro de fluorescencia de VCCaPLiLX con $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{nm}$	133
Figura 48. Espectro de fluorescencia de VC en PBS $2,94 \times 10^{-4} \text{M}$, VC+CaPLiLX y VC-CaPLiLX, $\lambda_{\text{exc}} = 580 \text{nm}$. Recuadro: Espectros normalizados.	133
Figura 49. Perfiles de decaimiento TRES para VC en solución ($2,94 \times 10^{-4} \text{M}$) y unido a CaPLiLX. Señal del NanoLED en negro. $\lambda_{\text{exc}} = 580 \text{nm}$	135
Figura 50. Espectro de emisión de FB-CaPLiLX con $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{nm}$	137
Figura 51. Espectro de fluorescencia de FB-CaPLiLX y FB en PBS y etanol ($[\text{FB}] = 3,6 \times 10^{-4}$). $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{nm}$	138
Figura 52. (izq.) Espectros de fluorescencia de FBCaPLiLX y FB+CaPLiLX resuspendidos y FB/etanol, con $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{nm}$. (der.) Imágenes de membranas utilizadas para la filtración luego de lavar con etanol.....	139
Figura 53. Esquema propuesto del anclaje de FITC a CaPLiLX con AEPA superficial.	140
Figura 54. Espectros ATR-FTIR de AEPA y CaPLiLX con AEPA y CEPA en la cobertura.	141
Figura 55. Espectro de emisión de FITC-CaPLiLX con $\lambda_{\text{exc}} = 330 \text{nm}$. $[\text{FITC}] = 5,3 \times 10^{-7} \text{M}$	143
Figura 56. Espectros de emisión de FITC-CaPLiLX ($[\text{FITC}]_{\text{max.}} = 5,3 \times 10^{-7} \text{M}$) y FITC/PBS $7,7 \times 10^{-6} \text{M}$ con $\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{nm}$	144
Figura 57. Arriba: Perfiles de liberación de LX en solución. Las líneas representan el ajuste al modelo Kosmeyer-Peppas. abajo: Liberación de LX adsorbido sobre CaPLi vacíos.	155

Figura 58. Perfiles de liberación para LX encapsulado en CaPLiLX. Las curvas representan el ajuste al modelo Kosmeyer-Peppas (hasta aproximadamente 0,6). Las barras son la desviación estándar.....	157
Figura 59. Espectro de absorción de alícuotas de AD (arriba) y CaPLiAD en PBS (abajo).....	164
Figura 60. Imágenes AFM de LiLX, CaPLiLX y AD-CaPLiLX sobre mica con y sin Ca^{2+}	167
Figura 61. Imágenes AFM de CaPLiLX sobre mica con y sin Ca^{2+} con sus respectivos perfiles de altura.	168
Figura 62. Imágenes AFM de AD-CaPLiLX sobre mica con y sin Ca^{2+} con sus respectivos perfiles de altura.	169
Figura 63. Perfiles de liberación para LX encapsulado en CaPLiLX y AD-CaPLiLX en PBS.	170
Figura 64. Mecanismo de quelación de bisfosfonatos al hueso del cuerpo humano. Tomado de [143]. Recuadro: molécula de alendronato.....	172
Figura 65. Imágenes SEM de la interacción de CaPLiLX con biovidrio modificado con HAp (abajo) y sin modificar (arriba) a 10 min y 120 min de tiempo de contacto. También se muestran imágenes de control del biovidrio antes de la deposición de CaPLiLX.....	174
Figura 66. Imágenes de epifluorescencia de la interacción de CaPLiNA con vidrio modificado con HAp (abajo) y sin modificar (arriba) a 0 min, 10 min y 180 min de tiempo de contacto. También se muestran imágenes de control. La barra de escala es de 10 μm	176
Figura 67. Análisis por fluorescencia del área cubierta en portaobjetos de vidrio no modificado y modificado con HAp en función del tiempo de contacto: 0 min (negro), 10 min (rojo) y 180 min (verde). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.	176
Figura 68. Imágenes SEM de andamios de seda. Blancos A)100X y B)20000X. C) Andamios luego de estar en contacto con CaPLiLX 40000X-50000X.....	178
Figura 69. Espectro de emisión de CaPLiLX antes y después de sumergir el andamio de SL. $\lambda_{exc} = 330nm$	179
Figura 70. Espectro de emisión de la suspensión de PBS luego de sumergir el andamio de SL. $\lambda_{exc} = 330nm$	180
Figura 71. Reacción del MTT con enzimas celulares.	192

Figura 72. Imágenes de antibiogramas obtenidos por duplicado para cada bacteria. El disco central en cada caja corresponde al blanco y del disco 1 hacia la izquierda los tratamientos, en orden descendiente de concentración (ver Tabla 17).....	197
Figura 73. Efecto de LX 1,0 µg/mL y CaPLiLX 1,0 µg LX/mL sobre la viabilidad de <i>S. aureus</i>	201
Figura 74. Viabilidad celular de precursores osteoblásticos MC-3T3 en presencia de suspensiones de nanopartículas de CaPLi y CaPLiLX luego de 24 y 48h de exposición. El porcentaje es respecto a la dilución de la solución madre de nanopartículas. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.....	203
Figura 75. Estructura de la naranja de acridina.	205
Figura 76. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células U2OS. A) Blanco. B) Con NA 3x10 ⁻⁸ M. C) Con CaPLiNA 3x10 ⁻⁸ M. D1) Imagen aumentada de C en canal verde. D2) Imagen aumentada de C en canal rojo.....	206
Figura 77. Estructura de la fluoresceína.	207
Figura 78. Internalización de nanopartículas por citometría de flujo. Se seleccionó una población de células por tamaño y complejidad y se analizó su fluorescencia en el canal FL1.	208
Figura 79. Efecto de tratamientos de CaPLi sobre las larvas de pejerrey.	210
Figura 80. Larva de pejerrey (<i>Odontesthes bonariensis</i>) de 12 días de edad en vista dorsal, luego de 24h de exposición a CaPLiNA. 1- Aleta caudal; 2- Aleta dorsal; 3, 3'- Aletas pectorales; 4, 4'-Opérculos; 5, 5'- Globos oculares; 6- Maxila.	211

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Eficiencia de encapsulación de LX por distintos métodos de síntesis.	82
Tabla 2. Parámetros determinados por TRES para CaPLiLX y comparación con la emisión de soluciones de LX en distintos medios.	90
Tabla 3. Parámetros obtenidos por anisotropía para LX y LiLX	95
Tabla 4. Resultados de DLS para LiAD sintetizados por dos métodos.	101
Tabla 5. Eficiencias de encapsulación de AD en CaPLiAD determinadas por espectroscopía ¹ H NMR.	105
Tabla 6. Eficiencias de encapsulación en LiAD determinadas por absorbancia.	107
Tabla 7. Resultados de medidas de DLS y potencial zeta. NA: No Aplica.	109
Tabla 8. Concentración de AD en AD-CaPLiLX determinada por espectroscopía ¹ H NMR.	127
Tabla 9. Resultados de DLS y potencial zeta para muestras funcionalizadas con alendronato.	130
Tabla 10. Resultados de DLS y potencial zeta para muestras funcionalizadas con VC: Violeta de cresilo, y FB: Fucsina básica.	136
Tabla 11. Resultados de DLS y potencial zeta para muestras funcionalizadas con FITC.	143
Tabla 12. Parámetros obtenidos a partir de datos ajustados a los modelos de liberación de fármacos Korsmeyer-Peppas y Weibull, para la cinética de liberación de LX desde CaPLiLX en distintos fluidos, adsorbido sobre CaPLi y en solución de PBS.	158
Tabla 13. Diámetro y movilidad electroforética de CaPLiLX en ausencia y presencia de Ca ²⁺ y Mg ²⁺	162
Tabla 14. Concentración estimada de AD en CaPLiAD por Uv-Vis luego de liberación.	165
Tabla 15. Concentración estimada de AD en CaPLiAD por ¹ H RMN luego de liberación. ND: No detectado.	165
Tabla 16. Concentraciones mínimas inhibitorias de LX y CX reportadas para distintas bacterias.	187
Tabla 17. Concentración de antibióticos en solución y de antibióticos encapsulados en los nanovehículos.	189
Tabla 18. Resultados de susceptibilidad antibacteriana. N.O: No se observa halo o es menor a 9mm.	198

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Intensidad de emisión en función del tiempo.	50
Ecuación 2. Intensidad de emisión con ajuste multiexponencial.	50
Ecuación 3. Ecuación de Perrin.	52
Ecuación 4. Ecuación de Stokes-Einstein.	53
Ecuación 5. Ecuaciones consideradas para los parámetros de espectroscopía UV-Vis.	54
Ecuación 6. Ecuación de Henry.	58
Ecuación 7. Cálculo de la concentración de alendronato por ^1H RMN.	63
Ecuación 8. Eficiencia de encapsulación de CX.	99
Ecuación 9. Ecuación de Koenig.	120
Ecuación 10. Cálculo para la liberación de LX en solución.	150

INDICE DE SIGLAS Y ABREVIACIONES

AD	Alendronato sódico
AD-CaPLiLX	Liposoma con LX encapsulado, recubierto con CaP y funcionalizado superficialmente con AD
AEPA	Ácido 2-aminoetilfosfónico
ATR-FTIR	Espectroscopía IR por Transformada de Fourier acoplada a Reflexión Total Atenuada
BG	Vidrio bioactivo
CaP	Fosfato de calcio
CaPLi	Liposoma recubierto con fosfato de calcio sin droga encapsulada
CaPLiAD	Liposoma con AD encapsulado y recubierto con CaP
CaPLiCX	Liposoma con CX encapsulado y recubierto con CaP
CaPLiFL	Liposoma con FL encapsulado y recubierto con CaP
CaPLiLX	Liposoma con LX encapsulado y recubierto con CaP
CaPLiNA	Liposoma con NA encapsulado y recubierto con CaP
CEPA	Ácido 2-carboxietanofosfónico
CPA	Fosfato de calcio amorfo
CX	Ciprofloxacina
DLS	Dispersión dinámica de luz
DOPA	1,2-dioleoil-sn-Glicero-3-fosfato
DRX	Difracción de rayos X
EDC	Carbodiimida
FB	Fucsina básica
FB-CaPLiLX	Liposoma con LX encapsulado, recubierto con CaP y funcionalizado superficialmente con FB
FITC	fluoresceína isotiocianato
FITC-CaPLiLX	Liposoma con LX encapsulado, recubierto con CaP (AEPA) y funcionalizado superficialmente con FITC
FL	Fluoresceína
GL	Andamios de seda por síntesis acuosa en glicerol
HAp	Hidroxiapatita
HAp-BGS	Andamios de biovidrio dopados con nanopartículas de hidroxiapatita

HR-TEM	Microscopía electrónica de transmisión de alta definición
Li	Liposoma
LiAD	Liposoma con AD encapsulado
LiCX	Liposoma con CX encapsulado
LiLX	Liposoma con LX encapsulado
LX	Levofloxacina
NA	Naranja de acridina
PBS	Buffer de fosfatos
SBF	Fluido fisiológico simulado
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SFB	Suero Fetal Bovino
SL	Andamios de seda lixiviados con sal
S-NHS	Sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida
Tc	Temperatura de transición de lípidos
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TRES	Espectroscopia de emisión resuelta en el tiempo (<i>Time resolved emission spectroscopy</i>)
VC	Violeta de cresilo
VC-CaPLiLX	Liposoma con LX encapsulado, recubierto con CaP y funcionalizado superficialmente con VC
WAXS	Dispersión de rayos X de ángulo amplio

AGRADECIMIENTOS

Desde el inicio, la realización de este doctorado fue impulsado por la M.Sc Angélica María Payán Aristizábal, quien me contó sobre la oportunidad de la beca, me visitó en un país ajeno y se convirtió en mi compañera permanente y principal motivadora para terminar esta tesis. A vos, gracias.

Gracias a las doctoras Mónica González y María Laura Dell’Arciprete, quienes además de ser mis guías académicas, me abrieron las puertas de sus casas y sus vidas para enseñarme cómo vivir en la Argentina. Admiro profundamente las grandes profesionales y personas que son y me siento totalmente afortunada de coincidir con ustedes. Gracias por la paciencia y excelente disposición corrigiendo esta tesis.

Al LEAR, el mejor grupo de trabajo que pude tener. Gracias por hacerme desear llegar a la oficina para compartir con ustedes, reírnos, culturizarnos, cebar el mate, saber del clima, de la evolución del Covid y la inflación. Gracias por hacerme parte de ustedes, enseñarme y aprender de mí. Lu, Lau, Belu, Emi, Colo, Fran, mis primeros amigos argentinos.

Gracias a la Doctora Cristina Valencia, quien ha abierto camino para muchos profesionales de la Universidad Nacional de Colombia que hemos querido continuar con nuestra carrera académica, ha creado lazos y sobre todo nos ha acompañado todo el tiempo en el proceso, desde la instalación en el país extranjero hasta la revisión de la tesis doctoral, pues no sólo es una excelente tutora sino una amiga incondicional.

Gracias a la educación pública, universal y gratuita argentina por demostrar que la educación superior es un derecho y defenderlo a capa y espada, acogiendo no solo a los suyos sino a quienes quieran venir a aprender y contribuir a la sociedad. Gracias al CONICET, Agencia, UNLP, INIFTA y todas las instituciones que contribuyeron con fondos e instalaciones a la realización de este proyecto.

Gracias a todas las personas que colaboraron con experimentos, análisis y conocimientos invaluable para la realización de esta tesis, en especial al Doctor Sergio Ezquerro, al Doctor Alejandro Miñán, al Doctor Eduardo Prieto, al Doctor Leandro Miranda, a la Doctora Roxana Gorjod, a la Doctora Cristina Valencia, a la Doctora María Laura Dittler y a la Licenciada Victoria Machaín, cuyos aportes fueron esenciales para alcanzar los objetivos propuestos.

Gracias a mi familia que ha creído en mí desde siempre, ha confiado y apoyado mis decisiones y sienten como suyo cada logro, aunque haya significado la distancia en momentos difíciles. Mi núcleo y mi motor. Gracias Celeste por ser mi secretaria.

Gracias a mi padre, mi tío y mi abuelo quienes, a pesar de no poder ver este logro terminado, me dieron siempre las palabras de aliento y las herramientas que necesité para continuar.

Gracias a la familia disfuncional que he ido formando en estos siete años, en la que siempre nos apoyamos los que se fueron, los que llegan y los que nos hemos quedado. Michelle, María José, Faber, Sara, Edwin, Carolina, Sol, Jimena... Gracias a este país por permitirme conocer gente invaluable y nutrir mi vida.

Gracias especiales a la candidata a PhD. María José Arenas y a la Doctora Juliana Ospina-Serna por contribuir con el análisis de resultados relacionados con sus áreas de conocimiento. Gracias a la Lic. Jimena Carpinelli por hospedarme en su casa y amenizar mis visitas al laboratorio.

Gracias a mí, gracias por realizar este trabajo y consignarlo aquí luego de entender y analizar lo sucedido; gracias por darme la oportunidad de aprender tanto sobre la química y aprender de tantas personas brillantes.

La química es geometría; lo nano se mide como lo macro.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

GENERAL Y OBJETIVOS

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Tejido óseo.

El hueso es un tejido conectivo mineralizado muy dinámico y vascularizado, de composición heterogénea y estructura compleja, como se puede observar en la Figura 1. En el hueso se pueden reconocer tres componentes principales: una matriz orgánica constituida en gran proporción por colágeno, una matriz inorgánica formada mayoritariamente por cristales de hidroxapatita (HAp), y un componente celular que representa el 2% de la materia orgánica del hueso. Este componente celular está formado por los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos que son los responsables de la formación, modelización y remodelación ósea, respectivamente [1].

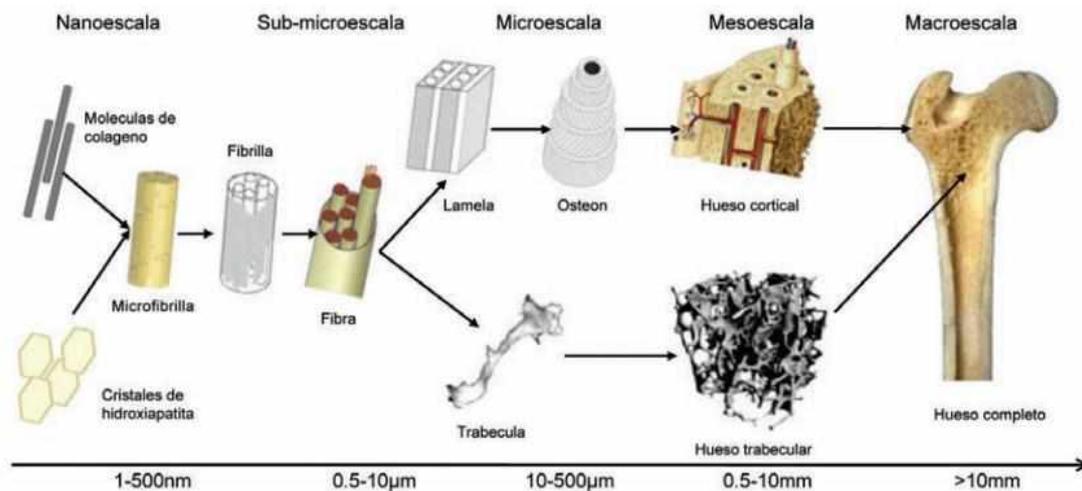


Figura 1. Estructura jerárquica del tejido óseo. Tomado de [2].

El tejido óseo es metabólicamente muy activo, sometido a un proceso de resorción y formación ósea que durante la infancia y adolescencia se conoce como “modelado” y en la edad adulta como “remodelado” [3]. A nivel microscópico, el remodelado óseo se produce en unidades básicas multicelulares conformadas por osteoclastos, macrófagos,

preosteoblastos y osteoblastos conducidos por una serie de factores genéticos, mecánicos, vasculares, nutricionales, hormonales y locales (sobrecarga mecánica, pH, factores de crecimiento y citoquinas, entre otros), que permiten el normal funcionamiento del hueso y balance entre la reabsorción y la formación ósea. Cuando este proceso se desequilibra aparecen las patologías, como la osteoesclerosis por exceso o la osteoporosis por defecto de masa ósea [4].

1.1.1. Enfermedades óseas.

Las enfermedades musculoesqueléticas abarcan una amplia gama de trastornos que afectan el sistema esquelético, incluyendo los huesos, articulaciones, músculos, ligamentos y tendones. Estas enfermedades pueden tener un impacto significativo en la calidad de vida de las personas limitando su movilidad, causando dolor crónico y aumentando el riesgo de discapacidad. El envejecimiento de la población, los cambios en el estilo de vida y la falta de actividad física adecuada son factores que contribuyen al aumento de las enfermedades óseas, por lo que el diagnóstico temprano, la prevención y el tratamiento adecuado son fundamentales para abordarlas.

Las enfermedades óseas más comunes se pueden clasificar como alteraciones cuantitativas o cualitativas del tejido óseo. Dentro de las alteraciones cualitativas destacan la osteomalacia y raquitismo, que se caracterizan por la disminución de la mineralización del hueso por un déficit local de iones calcio y fósforo. En el raquitismo, el defecto de mineralización ocurre tanto en el hueso recién formado que tiende a deformarse, como en la matriz cartilaginosa del cartílago de crecimiento, produciendo una disminución del crecimiento en longitud de los huesos largos. El término de osteomalacia se reserva para dicho trastorno en el adulto [3]. También se destaca la enfermedad de Paget del hueso, una enfermedad crónica que produce una excesiva destrucción y regeneración en el tejido óseo, cuyo resultado es un hueso más frágil, que puede doler, deformarse y fracturarse. Después de la osteoporosis, la enfermedad de

Paget es la osteopatía más frecuente, predomina en varones y afecta al 3% de la población mayor de 40 años, y al 10% de los mayores de 70 años [5].

Se encuentran también enfermedades de tipo congénito como la osteogénesis imperfecta, en la cual existe una alteración en la formación del colágeno tipo I. Este defecto ocasiona una excesiva fragilidad de los huesos produciéndose con frecuencia fracturas tras un traumatismo mínimo e incluso inexistente [3]. Así mismo, las enfermedades reumatológicas autoinmunes (ERA) alteran el ciclo de remodelado óseo y por sí mismas afectan negativamente la masa ósea por mecanismos inflamatorios [6].

Por su parte, las alteraciones cuantitativas incluyen la osteoesclerosis que es el aumento de masa ósea por unidad de volumen, causada por insuficiencia funcional de los osteoclastos con disminución de la osteólisis y/o aumento de osteogénesis; la osteodistrofia renal que se manifiesta como consecuencia de la insuficiencia renal crónica, provocando la retención de fosfato, disminución de la absorción de calcio y un aumento de la hormona paratiroidea (PTH), por lo cual la osteopatía más frecuente es la osteítis fibrosa (hiperparatiroidismo). El resultado es también una descalcificación de grado variable. La incidencia de esta enfermedad en mujeres es tres veces más alta que en los hombres y aumenta con la edad [3].

1.1.2. Caso de la osteoporosis.

Las enfermedades óseas representan un importante desafío para el sistema de salud, principalmente la osteoporosis y las fracturas resultantes, que además de la morbilidad y la mortalidad, se asocian con costos económicos significativos relacionados a internaciones, cirugías, cuidados ambulatorios, cuidados crónicos en instituciones, incapacidad y muerte prematura. A medida que aumenta la expectativa de vida, se

incrementa la población añosa propensa a fracturarse, por lo que es claro que la carga sanitaria y financiera de la osteoporosis crecerá en todo el mundo.

La osteoporosis hace parte de las alteraciones cuantitativas y se define como una enfermedad esquelética sistémica caracterizada por una baja masa ósea y deterioro de la microarquitectura de los tejidos óseos, lo cual da como resultado un aumento de la fragilidad ósea y el consiguiente riesgo acumulado de fracturas. En la práctica clínica, la osteoporosis suele diagnosticarse por los criterios de densidad mineral ósea (DMO) o por la aparición de una fractura por fragilidad. Según este criterio, la osteoporosis se diagnostica con una DMO de 2,5 desviaciones estándar o más por debajo de la media de una población de referencia de mujeres adultas jóvenes sanas ($T\text{-score} \leq -2,5$) [7]. Con la disminución de la DMO a medida que se envejece, la osteoporosis se vuelve más frecuente entre las personas mayores y el número de fracturas osteoporóticas crece sustancialmente [8], las cuales suelen ir seguidas de hospitalización, atención a largo plazo, deterioro de la calidad de vida, discapacidad y muerte [9].

A nivel mundial, la osteoporosis causa más de 8,9 millones de fracturas anualmente, lo que resulta en una fractura osteoporótica cada 3 segundos. Se estima que la osteoporosis afecta a 200 millones de mujeres en todo el mundo y que una de cada tres mujeres experimentará una fractura osteoporótica después de los 50 años. Debido a que tanto el hueso como el músculo son órganos sensibles a las hormonas, la eliminación de estrógenos en la menopausia hace que el riesgo de padecer la enfermedad sea mucho mayor en mujeres que en hombres de edad similar, de hecho la proporción de fracturas osteoporóticas entre mujeres y hombres es de aproximadamente 1,6 [10].

En el caso de Argentina, los estudios sobre incidencia de la osteoporosis son escasos y datan de hace 10 años aproximadamente [11]. Sin embargo, la preocupación actual sobre la enfermedad en la sociedad, se refleja en la difusión de informes y pautas de

prevención en distintos medios de comunicación [12]–[14]. Para el 2009 la población total era de 40 millones, con 10 millones de habitantes de 50 o más años. Estudios densitométricos locales revelaron que dos de cada cuatro mujeres postmenopáusicas tenían osteopenia (densidad mineral ósea más baja que la normal), una tenía osteoporosis y una tenía densidad mineral ósea normal. Para esa fecha se estimaba que más de 34.000 fracturas de cadera ocurrieron cada año en la población añosa, con un promedio de 90 por día. Los costos de internación de fracturas de cadera y vertebrales excedieron los 190 millones de dólares estadounidenses por año [15]. Para el 2019, el 75% de las mujeres mayores a 50 años padecía osteoporosis u osteopenia [16].

Por otro lado, un reporte del 2022 ha mostrado que durante las últimas cinco décadas la osteoporosis ha pasado de ser una consecuencia inevitable del envejecimiento a ser una enfermedad crónica no transmisible bien caracterizada, con criterios de diagnóstico, métodos validados de evaluación de riesgos y una variedad de medicamentos terapéuticos efectivos [17]. Existen también herramientas como FRAX[®], un algoritmo que, basado en la edad, el índice de masa corporal, los factores de riesgo y la DMO del cuello femoral del paciente, calcula la probabilidad de que sufra una fractura osteoporótica mayor (fractura de cadera, columna clínica, húmero o muñeca) en 10 años. Anualmente se realizan alrededor de 6 millones de cálculos en 173 países y se ha establecido como la herramienta global estándar para la evaluación del riesgo de fractura [18].

Como es evidente, son muchas las patologías óseas que requieren atención en la población y particularmente en la población adulta, que cada vez representa una mayor proporción a nivel global, ya que, según datos demográficos de la Organización de las Naciones Unidas, hoy en día una de cada diez personas tiene 60 años o más, pero en el año 2050 se prevé que será una de cada cinco, y se prevé también que el número de los que tienen al menos 80 años se multiplicará por cinco [19]. Es por ello que es prioritaria la investigación y desarrollo de formas eficientes de prevención y tratamiento de las enfermedades óseas, debido a que es un problema de salud pública que no sólo afecta

la vida de los pacientes, sino que impacta en el desarrollo general a niveles sociales y económicos.

1.2. Sistemas de entrega controlada.

Para que cualquier fármaco logre su efecto terapéutico óptimo, es importante que el compuesto alcance y sea retenido en el sitio de acción previsto (tejido, receptor o moléculas) sin perder su integridad química o función biológica [20]. El método tradicional para la administración de fármacos ha sido la administración sistémica, en la cual los medicamentos se absorben en el torrente sanguíneo y se distribuyen a través del sistema de circulación del propio cuerpo, lo que puede dar como resultado una toxicidad también sistémica con complicaciones de hígado y una mala penetración en el tejido objetivo [21].

En respuesta a esta problemática, han surgido sistemas de administración controlada de fármacos (DDS, *Drug Delivery System*) para mejorar las concentraciones en los tejidos mientras se previenen los cambios estructurales de los fármacos incorporados. Los DDS suelen ser construcciones a nanoescala que se pueden inyectar por vía intravenosa, administrar por vía oral o incluso se pueden introducir *in vivo* mediante inhalación pulmonar. Su tamaño les permite llegar incluso a los capilares sanguíneos más pequeños y su eliminación de la sangre por parte de los macrófagos es limitada, lo que resulta en tiempos prolongados de circulación en el sistema sanguíneo. Estos sistemas también ofrecen la posibilidad de aumentar el rango de aplicaciones de los fármacos hidrofóbicos al mejorar su solubilidad, prolongar la eficacia de los medicamentos con una vida media biológica corta mediante mecanismos de liberación sostenida, y mejorar la captación celular específica del fármaco al reducir la opsonización por macrófagos [20].

En la administración de fármacos a un sitio objetivo, se puede alcanzar una concentración mucho mayor de la droga en la zona de interés, llegando a ser 200 veces más en comparación con la administración sistémica [21]. Adicionalmente, se trabaja en el diseño de DDS capaces de alcanzar, penetrar y concentrarse activamente en el sitio de acción previsto, implementando estrategias de orientación como la combinación con moléculas afines que permitan la unión activa a tejidos específicos [20].

Durante las últimas décadas, se han realizado importantes avances con el desarrollo de formas de dosificación y liberación controladas, por lo cual existe una gran variedad de formulaciones y propiedades físicas que influyen en dicha liberación y en la prevención de cambios estructurales de los fármacos incorporados. Los patrones de liberación se pueden dividir en aquellos que liberan el fármaco a una velocidad lenta de primer orden o cero y aquellos que proporcionan una dosis inicial rápida, seguida de una liberación sostenida lenta de orden cero o de primer orden [21].

El propósito de los sistemas de liberación controlada es mantener la concentración del fármaco en la sangre o en los tejidos diana en el valor deseado durante el mayor tiempo posible. Para ello, generalmente, los sistemas de liberación controlada dispensan inicialmente parte de la dosis contenida para alcanzar rápidamente la concentración terapéutica eficaz del fármaco. Luego, la cinética de liberación del fármaco sigue un comportamiento bien definido para suministrar la dosis de mantenimiento que permita alcanzar la concentración deseada. Para este propósito, el uso de modelos matemáticos resulta muy útil en la predicción de la cinética de liberación. En particular, la determinación de algunos parámetros físicos importantes, como el coeficiente de difusión del fármaco, permite ajustar los modelos con los datos de liberación experimental. Así, la modelización matemática, cuyo desarrollo requiere la comprensión de todos los fenómenos que afectan la cinética de liberación de fármacos, tiene un valor muy importante en la optimización de las formulaciones [22].

1.2.1. Liposomas recubiertos.

Los liposomas son vesículas de forma esférica compuestas por una bicapa de lípidos y una cavidad acuosa interna. Su estructura está formada por fosfolípidos sintéticos o naturales y su tamaño varía entre 50 nm y 2,5 micras [23]. Los liposomas funcionan principalmente como vehículos ya que son biocompatibles, pueden encapsular moléculas hidrofílicas en su núcleo e hidrofóbicas en su bicapa, y modificar la farmacocinética de los fármacos encapsulados, permitiendo controlar su administración. Existen diferentes formulaciones liposomales que transportan fármacos antivirales, antiparasitarios, antibacterianos y algunas vacunas. De hecho, varios han sido aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, *Food And Drug Administration*) para tratamientos como el sarcoma de Kaposi, leucemia, cáncer de páncreas, de ovario, de mama y mieloma múltiple, destacando medicamentos como el Doxil[®], Myocet[®], DaunoXome[®], DepoCyte[®], y Lipoplatin[®] [24].

Sin embargo, debido a que son estructuras lábiles, el tiempo de vida de las formulaciones es limitado, por lo cual los liposomas se han recubierto con biopolímeros como el polietilenglicol, el quitosano y el colágeno [25], al igual que con compuestos inorgánicos como nanopartículas de sílice, óxidos metálicos y fosfatos de calcio [26] para superar dicha desventaja.

La entrega de fármacos al hueso está limitada por las características del tejido compuesto por el conjunto de minerales a nanoescala ($\approx 69\%$) y matriz orgánica, siendo la hidroxiapatita (HAp), un tipo particular de fosfato de calcio, el principal componente inorgánico, como se ha mencionado anteriormente [27]. Los recubrimientos de fosfato de calcio, abreviado como CaP, otorgan estabilidad y rigidez a los liposomas en los medios biológicos. De esta forma, los fármacos atrapados en el interior de estas

nanoestructuras se encuentran protegidos de la acción oxidante y del estrés mecánico provocado por el medio circundante [28], [29]. La utilización de nanopartículas de HAp en el transporte de fármacos al tejido óseo es de especial interés debido a su similitud estructural, a su capacidad de solubilizarse *in vivo* y de penetrar las membranas celulares, de hecho, debido a esta interacción se investigan para el reparto controlado de drogas en cáncer de hueso y de otros agentes terapéuticos que presentan poca penetración ósea [30]. El uso de recubrimientos poliméricos sobre nanomateriales basados en la HAp también puede mejorar los procesos de encapsulación, prolongar los perfiles cinéticos de liberación de drogas y mediar la interacción entre la hidroxiapatita y el ambiente biológico [31]–[33]. En particular, los materiales de fosfato de calcio han recibido mucho interés en el campo de la administración de fármacos debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad en sistemas biológicos, así como a la capacidad de promover la adhesión de osteoblastos y la osteoconductividad [29][28], [34]–[36].

A su vez, los recubrimientos en base a fosfatos de calcio proporcionan al nanoportador una superficie capaz de funcionalizarse con moléculas adecuadas que faciliten la orientación activa en el transporte de drogas [37] y/o le otorguen propiedades especiales en aplicaciones biomédicas específicas, tales como imágenes celulares y visualización cuantitativa no invasiva de procesos que ocurren a nivel celular y subcelular [38]. Dependiendo de su funcionalización con moléculas fluorescentes y dopado con iones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, los nanoportadores pueden presentar propiedades luminiscentes, magnéticas o ambas [39]. La funcionalización con moléculas específicas para el reconocimiento de tejidos les otorga potencial adicional como vehículos para el transporte de fármacos.

Dentro de las moléculas utilizadas para recubrir los materiales de fosfato de calcio, las que tienen grupos funcionales carboxilo (-COOH) merecen especial atención ya que se ha demostrado que los carboxilatos promueven importantes procesos biológicos en la ingeniería del tejido óseo, como la mejora de la carga de proteínas morfogenéticas y de

factores de crecimiento de fibroblastos básicos, necesarios para promover la diferenciación y proliferación de osteoblastos e inducir la mineralización de fosfato de calcio [40]. Además, los grupos funcionales carboxilo pueden activarse fácilmente para formar enlaces peptídicos con aminoácidos y proteínas para producir materiales de CaP con actividad biológica mejorada. En línea con lo anterior, en el presente trabajo se tomó como estrategia la funcionalización de los liposomas recubiertos con ácido 2-carboxietanofosfónico (CEPA), que a la vez de exponer los grupos carboxilo, permite controlar el crecimiento de coberturas de fosfato de calcio, como se verá más adelante.

Lípidos

Actualmente existe gran variedad de lípidos y fosfolípidos disponibles para la síntesis de liposomas, por lo que su elección debe estar encaminada a mejorar las aplicaciones específicas de las vesículas. Dos parámetros importantes para tener en cuenta son la temperatura de transición de fase (T_c) y el grado de saturación de los lípidos. En función de la temperatura, los lípidos de membrana pueden encontrarse en dos estados o fases diferentes: gel, similar a un sólido, con las cadenas hidrocarbonadas más rígidas, y cristal líquido, más fluido, con las cadenas hidrocarbonadas más móviles. La temperatura a la cual se produce el paso de un estado a otro es la temperatura de transición de fase; a valores por debajo de la T_c , la bicapa se encuentra en el estado gel y a valores superiores pasa a cristal líquido [41]. Para un sistema de liberación, es conveniente el estado de cristal líquido durante la síntesis para que ingrese el fármaco, así como durante la liberación para que salga el contenido. Por su parte, el estado gel es deseado mientras el liposoma viaja en dirección al sitio objetivo, protegiendo la carga del nanovehículo.

Por otro lado, debido a las interacciones moleculares, la presencia de ácidos grasos de cadena corta o con insaturaciones *cis* reduce la temperatura de transición, mientras que

los ácidos grasos saturados y el aumento de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas hacen que esta temperatura se incremente [41]. Los lípidos con una cola insaturada interrumpen el empaquetamiento de aquellos con colas saturadas. La bicapa resultante tiene más espacio libre y, en consecuencia, es más permeable al agua y otras moléculas pequeñas.

El 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato (DOPA, PM 722,96 g/mol, $T_c = -8^\circ\text{C}$ y saturación 18:1) se eligió como bloque de construcción de la bicapa porque forma fácilmente liposomas, tiene una T_c menor de 45°C que lo hace susceptible a la extrusión a mano, y tiene como grupo polar al ácido fosfatídico con carga negativa que ayuda en la localización de los iones Ca^{2+} alrededor del liposoma, lo que facilita la deposición de fosfatos cálcicos. En efecto, se ha confirmado la capacidad de conjugación del DOPA con HAp y fosfatos de calcio [28], [42]. En la Figura 2 se muestra su estructura.

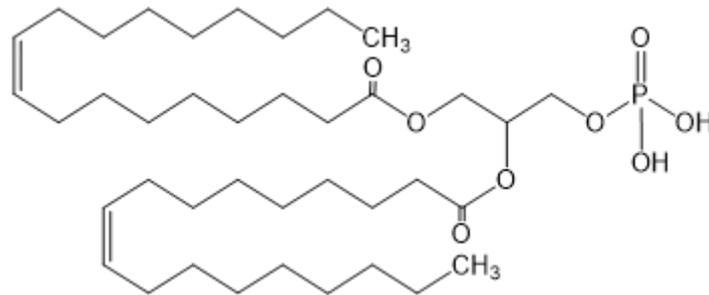


Figura 2. Estructura de la molécula de DOPA.

1.3.2. Antibióticos.

Las quinolonas son fármacos antibacterianos ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones. La primera quinolona usada en clínica, el ácido nalidíxico fue desarrollado en 1962 por Lesher. La actividad antimicrobiana de las quinolonas se debe

a la presencia de la porción γ -piridona- β -carboxílica, la cual es fundamental para su unión a la enzima DNA girasa, enzima responsable del superenrollamiento negativo del ADN bacteriano y por ende de la supervivencia de estos organismos. Las quinolonas de segunda generación (fluoroquinolonas) mejoran su espectro de acción y farmacocinética por medio de modificaciones estructurales, como la introducción de un anillo piperazínico en posición 7, lo que permite una mayor concentración en el sitio de acción, y una disminución de los efectos fototóxicos en el modelo del glóbulo rojo y en el de *Artemia salina*. La sustitución de un hidrógeno por un flúor en posición 6 aumenta de 10 a 100 veces la capacidad de inhibición de la enzima DNA girasa [43].

La levofloxacin (LX) se describe como una quinolona de tercera generación junto con la ciprofloxacina (CX) y la ofloxacina. Como isómero levo de la ofloxacina, la levofloxacin posee una actividad antibacteriana más eficaz que la ofloxacina y es un fármaco de primera línea para tratar diversas inflamaciones, como infecciones pulmonares, urinarias e intestinales debido a su amplia distribución [44]. Además, es uno de los agentes antimicrobianos de mejor perfil farmacocinético y más utilizados en el tratamiento de infecciones óseas [45].

Por su parte, la ciprofloxacina es un antibiótico de amplio espectro de la familia de las quinolonas y tiene una buena actividad antibacteriana contra la mayoría de las bacterias gramnegativas y cocos grampositivos. Ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) como agente antiinfeccioso y se usa ampliamente para el tratamiento de una variedad de infecciones bacterianas [46]. En la Figura 3 pueden ver las estructuras de ambos antibióticos.

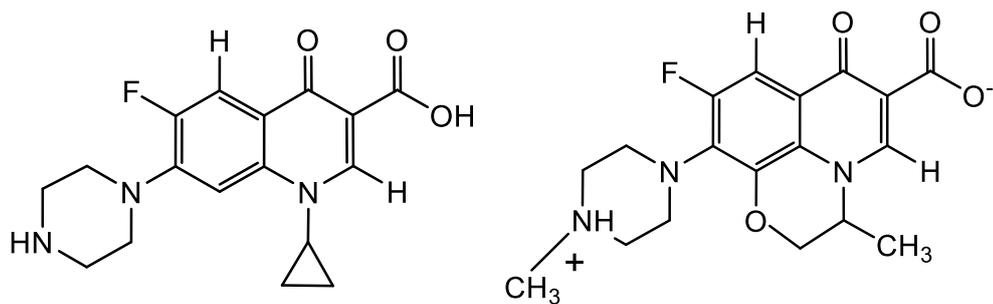


Figura 3. Estructuras de las moléculas de ciprofloxacina (izquierda) y levofloxacina.

Adicionalmente, CX y LX se utilizan en el tratamiento de osteomielitis [47], y se ha comprobado su encapsulación en liposomas [44], [46]. Por otro lado, estas moléculas presentan fluorescencia, lo que resulta en una ventaja adicional para los estudios propuestos, ya que podrá determinarse la eficiencia de encapsulación en función de la concentración de las fluoroquinolonas, y estudiar la distribución de la droga en los distintos entornos liposomales mediante técnicas basadas en fluorescencia.

1.3.3. Bisfosfonatos.

Debido a que modulan el metabolismo del calcio, los bisfosfonatos suprimen la resorción ósea mediada por osteoclastos, lo que conduce a largo plazo al aumento de masa en el hueso. Esto les da un alto potencial para el manejo de diversas enfermedades del metabolismo óseo, por lo que se aplican ampliamente en el tratamiento de diversas formas de osteoporosis, hipercalcemia maligna y enfermedad ósea de Paget. Sin embargo, se han reportado efectos adversos en su uso extensivo, lo que hace imperativo el desarrollo de estrategias que permitan controlar su método de administración. Una de esas estrategias sería incluirlos en sistemas de liberación controlada [48].

Los bisfosfonatos son moléculas muy hidrofílicas sin capacidad de permear a través de las membranas biológicas de los tejidos blandos y no son susceptibles de ser metabolizadas. Por estas razones, su excreción urinaria y biliar tiene lugar sin modificación de la molécula. Estas propiedades contribuyen a la disposición preferencial del bisfosfonato y sus derivados en el tejido óseo. Los bisfosfonatos se localizan rápidamente en la superficie del hueso principalmente debido a que su estructura P-C-P posee gran afinidad por la hidroxiapatita. Por esta razón, la modificación superficial de vehículos conteniendo fármacos con bisfosfonatos es una forma eficiente de dirigirlos al tejido óseo. Se ha demostrado que nanopartículas de polímeros recubiertas con bisfosfonatos y conteniendo curcumina y bortezomib encapsulados, presentan efectos sinérgicos sobre la inhibición del avance de tumores tanto *in vitro* como *in vivo*, debido a que las nanopartículas recubiertas alcanzan el tejido óseo más rápido que aquellas sin recubrir y, a su vez, permanecen en el sitio por períodos de tiempo más extensos [49].

Debe remarcarse la doble función de los bisfosfonatos, la de facilitar el direccionamiento de vehículos con fármacos hacia el hueso y la de cumplir funciones terapéuticas al inhibir la resorción osteoclástica del hueso. En la Figura 4 se puede observar la estructura del alendronato sódico (AD), un bisfosfonato de amplio uso estudiado en este trabajo de tesis.

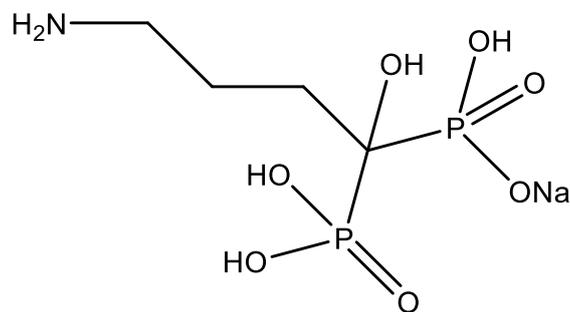


Figura 4. Estructura de la molécula de alendronato.

Los bisfosfonatos son análogos del pirofosfato en los que el oxígeno puente ha sido reemplazado por carbono. Además, varios compuestos tienen una cadena lateral de alquilamina. Se ha demostrado que el AD se absorbe deficientemente en animales y humanos debido a sus propiedades altamente hidrófilas y baja biodisponibilidad oral, que es menos del 2% en todas las especies investigadas, incluidos los humanos. De la dosis absorbida, sólo el 10% se absorbe en el intestino y aproximadamente entre el 20 y el 50% de la dosis absorbida es tomada por el esqueleto, sumado a que el tratamiento prolongado con altas dosis de bisfosfonatos *vía* intravenosa puede resultar en el desarrollo de osteonecrosis de mandíbula [48]. El alendronato se administra por *vía* oral como su sal monosódica en forma de comprimidos. Cuando entra en contacto con el agua, el ácido alendrónico se libera inmediatamente en la solución. Como consecuencia, la disolución de los comprimidos comienza ya durante la deglución y puede inducir esofagitis. Por tanto, el fármaco debe ingerirse en condiciones rigurosas para evitar la rápida liberación del ácido alendrónico que representa un potencial riesgo para la salud [50]. Es por ello que su encapsulación y liberación específica en el sitio dañado es de gran interés médico.

1.3.4. Fluoróforos.

Como se describió anteriormente, la superficie de los liposomas recubiertos con fosfato de calcio y moléculas orgánicas como el CEPA, es apta a la modificación con colorantes de referencia que otorguen características fluorescentes a los nanovehículos. De esta forma, se podrán utilizar técnicas fluorescentes para el seguimiento de los mismos. Como se puede ver en la Figura 5, los colorantes violeta de cresilo (VC) y fucsina básica (FB) poseen grupos amino que, en medio acuoso y con reactivos adecuados que funcionen como activadores, pueden participar en la reacción de condensación con los grupos carboxilo terminales del liposoma recubierto y formar enlaces amida estables. Estos fluoróforos permiten su identificación por fluorescencia, con longitudes de onda

de excitación y emisión ($\lambda_{exc}, \lambda_{em}$)=(580nm, 630 nm) para VC y ($\lambda_{exc}, \lambda_{em}$)=(550nm, 620 nm) para FB. De igual manera, la cobertura de CaPLi puede ser funcionalizada con grupos amino en lugar de carboxilatos mediante el anclaje de ácido 2-aminoetilfosfónico (AEPA), a los cuales se puede unir el fluoróforo fluoresceína isotiocianato (Figura 5) (FITC, $\lambda_{exc}, \lambda_{em}$ = 490nm, 520 nm), a través de su grupo –COOH activado que forma un enlace amida con los grupos –NH₂ en la superficie del liposoma recubierto.

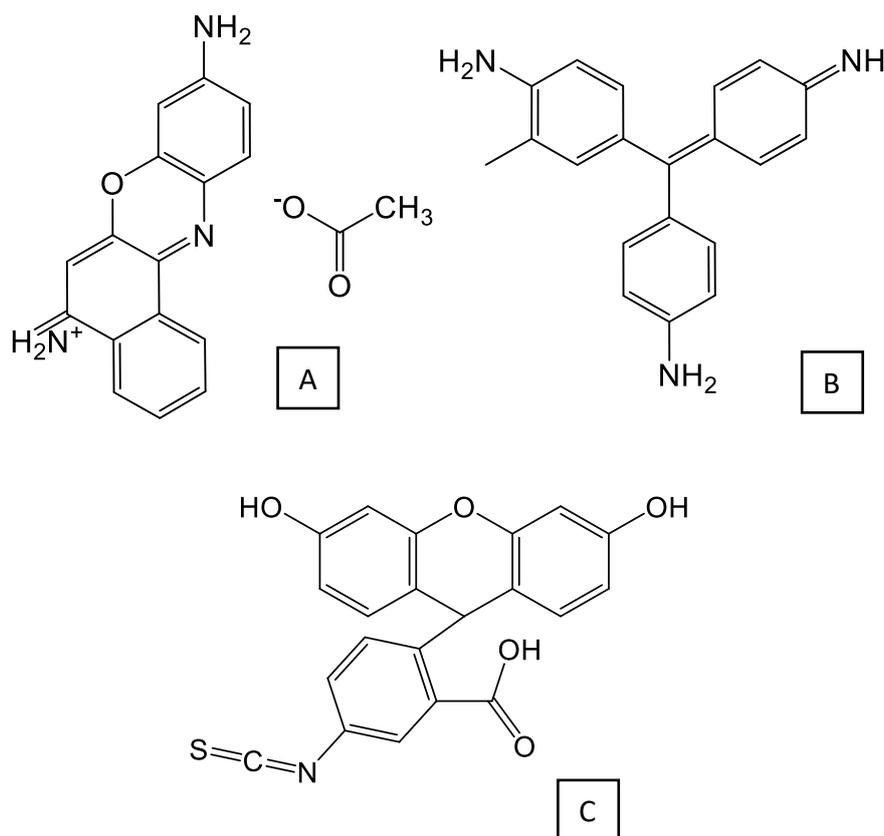


Figura 5. Estructura de los colorantes utilizados para la funcionalización superficial: A) Violeta de cresilo, B) Fucsina básica y C) FITC.

La modificación con los fluoróforos también permite el seguimiento de los nanovehículos y su uso como sondas fluorescentes, ya que sus espectros de excitación y emisión no se superponen con los de los de los antibióticos encapsulados (LX y CX). De esta forma, puede evaluarse simultánea o diferencialmente la emisión de los fluoróforos contenidos en el interior de los liposomas recubiertos ($\lambda_{em}<500$ nm) y la de los fluoróforos anclados en su superficie ($\lambda_{em} >500$ nm).

1.3.5. Implantes modificados.

El tratamiento para las enfermedades óseas degenerativas y las fracturas involucra intervenciones quirúrgicas que suelen presentar serias desventajas, como necesidad de una segunda cirugía, rechazo inmunogénico y transferencia de enfermedades, entre otras [21]. Una alternativa es la ingeniería de tejidos, también conocida como medicina regenerativa, que tiene como objetivo desarrollar implantes bioactivos que puedan reparar o mejorar la estructura y funcionalidad de los defectos de los tejidos [51]. La ingeniería de tejidos óseos implica el cultivo de nuevos tejidos mediante la combinación de andamios capaces de soportar la angiogénesis, células tisulares nativas y moléculas bioactivas para emular los procesos biológicos del organismo. La angiogénesis se trata de la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tejido diseñado, mientras que el andamio fabricado con biomateriales proporciona soporte temporal a las células, su proliferación, diferenciación, unión y producción de matriz extracelular para la formación de hueso nuevo [21]. Existen principalmente tres tipos de andamios: andamios metálicos, como los andamios de metal alcalino, aleaciones y dióxido de titanio; andamios inorgánicos, como el vidrio bioactivo (BG) y la hidroxiapatita; y andamios orgánicos, como los andamios basados en polímeros [51].

Un grupo muy relevante de biomateriales para la regeneración ósea son los vidrios bioactivos, que pueden transformarse en andamios 3D de porosidad adecuada para la regeneración ósea. En particular, el BG utilizado con mayor frecuencia es el denominado 45S5 BG, de composición: 45% SiO₂, 24.5% Na₂O, 24.5% CaO y 6% P₂O₅ (en peso), que ha demostrado una rápida formación de una capa similar a la hidroxiapatita sustituida con carbonato en su superficie, tanto *in vitro* como *in vivo*, mediando la unión al hueso y los tejidos circundantes [52]. En la Figura 6 se observan imágenes microscópicas del andamio. Entre varios enfoques informados en la literatura para mejorar sus propiedades osteogénicas, se ha encontrado que la incorporación de partículas de HAp en andamios presenta gran potencial [51].

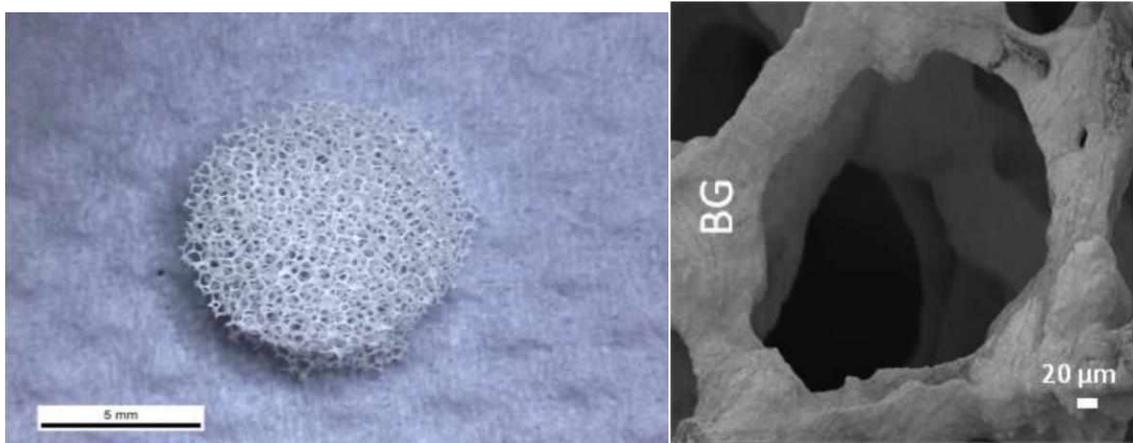


Figura 6. Imágenes microscópicas del andamio de BG. Izquierda: microscopía óptica. Tomado de [1]. Derecha: microscopía electrónica de barrido. Tomado de [52].

Los andamios de polímeros naturales tienen ventajas potenciales de biocompatibilidad, versatilidad química y degradabilidad controlada por células e interacciones celulares intrínsecas. Un ejemplo de polímero natural es la fibroína de seda de gusano de seda (*Bombyx mori*) que consta de polipéptidos de cadena ligera y pesada de 25 y 350 kDa, respectivamente, conectados por un enlace disulfuro. La fibroína es una proteína dominada en su composición por los aminoácidos glicina, alanina y serina que forman láminas β antiparalelas en las fibras hiladas, lo que conduce a la estabilidad y características mecánicas de las fibras [53]. De hecho, los andamios de proteínas de seda han tenido resultados positivos en la formación de tejido óseo *in vitro* con células madre mesenquimales derivadas de médula ósea humana [54].

Por otro lado, hay gran interés en los sistemas compuestos de andamios y liposomas, diseñados para aprovechar la biocompatibilidad de los liposomas y la resistencia de los andamios, proporcionando un sistema novedoso que sea más adecuado para aplicaciones clínicas en diferentes enfermedades, como cáncer, diabetes, enfermedades relacionadas con la piel, infección y virus de la inmunodeficiencia humana, y en la

regeneración de tejidos como hueso, dientes, médula espinal y cicatrización de heridas [51].

2. HIPÓTESIS.

El plan de trabajo propuesto en esta tesis tiene como objetivo general el desarrollo de nanosistemas basados en fosfatos de calcio como vehículos para la administración específica de fármacos y moléculas en hueso. Estos sistemas se acoplarán a fluoróforos, que permitirán la utilización de los vehículos como sensores fluorescentes, y a moléculas direccionadoras en los sistemas biológicos. Se tendrá como hipótesis de trabajo:

“Los nanosistemas en base a fosfatos de calcio funcionalizados con fluoróforos son aptos para su utilización como vehículos de reparto para la administración de fármacos y moléculas.”

2.1.Fundamentación.

Los liposomas comprenden uno de los nanoportadores de primera generación más eficaces debido a su composición intrínseca y capacidad para encapsular fármacos hidrofílicos en el núcleo acuoso o moléculas hidrofóbicas en la bicapa lipídica. Para superar su pobre estabilidad mecánica y rápida descarga de su contenido, se propone recubrirlos con fosfatos de calcio (CaP). Estos materiales han recibido mucho interés en el campo de la administración de fármacos debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad en sistemas biológicos, así como su afinidad con la hidroxiapatita, el principal componente inorgánico del tejido óseo. Mediante la inclusión de fármacos como antibióticos y pruebas de liberación en distintos medios simulados y biológicos, se

pretende comprobar el potencial de liposomas recubiertos con fosfato de calcio en la administración específica en tejido óseo.

2.2. Objetivos específicos.

Para probar la hipótesis planteada, debieron llevarse a cabo los siguientes estudios experimentales:

- Desarrollar y optimizar la síntesis de nanovehículos en base a fosfatos de calcio, derivatizados superficialmente con grupos funcionales adecuados para el posterior anclaje de moléculas de reconocimiento del tejido óseo y fluoróforos que le otorguen capacidad fluorescente para su utilización como sensores ópticos.
- Determinar la capacidad de carga de fármacos (bisfosfonatos, antibióticos y colorantes de referencia) durante el proceso de síntesis de los nanovehículos y optimizarla.
- Funcionalizar la superficie de los nanovehículos cargados, con moléculas aptas para el reconocimiento óseo y fluoróforos que permitan la visualización de los nanovehículos mediante su fluorescencia.
- Determinar la cinética de liberación de los fármacos encapsulados en suspensión acuosa y en medios fisiológicos simulados. Determinar la influencia del pH y contenido de iones en la cinética de liberación.
- Estudiar la interacción de nanovehículos con diversas superficies, en presencia y ausencia de calcio.
- Evaluar la capacidad de los nanovehículos de liberar fármacos en medio bacteriano.
- Evaluar la biocompatibilidad de los nanovehículos conteniendo distintos fármacos *in vitro*.

CAPÍTULO 2.
MATERIALES Y
EQUIPAMIENTO

1. REACTIVOS.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron: Lípidos liofilizados de 1,2-dioleoil-sn-Glicerol-3-fosfato (DOPA) marca Avanti Polar Lipids; levofloxacin (LX), ciprofloxacina 98% (CX), ácido 2-carboxietanofosfónico 94% (CEPA), ácido 2-aminoetilfosfónico 99% (AEPA), alendronato sódico 97% (AD), fucsina básica (FB), fluoresceína isotiocianato 90% (FITC), violeta de cresilo (VC), naranja de acridina (NA), sal sódica de N-hidroxisulfosuccinimida 98% (S-NHS) y carbodiimida (EDC), todos de la marca Sigma-Aldrich.

También se emplearon cloruro de calcio y cloruro de sodio marca Anedra; fluoresceína (FL) marca Fluka; hidróxido de sodio, ácido fosfórico 85%, fosfato dibásico de potasio trihidratado 99%, etanol grado reactivo 99,5%, acetato de sodio anhidro 99%, cloruro de magnesio hexahidratado 99%, ácido clorhídrico 36,5% y tiocianato de amonio 97,5% marca Cicarelli; cloruro de potasio y tris hidroximetil aminometano 99,8% marca Biopack; bromuro de potasio, fosfato monopotásico 99,3%, fosfato dibásico de sodio 99,96%, cloroformo 99,9% y cloruro de hierro 98,3%, marca JT Baker; ácido acético 99% marca Tejon; sulfato de sodio 99% marca Carlo Erba; y etanol comercial.

Todas las soluciones se prepararon en agua ultrapura ($0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$) obtenida de un sistema de purificación OSMOION™. Para la purificación de los nanovehículos mediante diálisis se utilizó una membrana de celulosa regenerada Spectra Por 1 con un MWCO de 6000-8000 Da, obtenida de Spectrum Labs.

Como medios de liberación, se prepararon buffers de fosfatos (PBS) y acetato. Para preparar PBS se mezclaron 8,02g de NaCl, 2,68g de Na_2HPO_4 , 0,20g de KCl y 0,24g de KH_2PO_4 , ajustando el pH a 7,4 con HCl 0,1M (fuerza iónica $I=0,16 \text{ M}$) y se llevó a un volumen final de 1L con agua ultrapura. El buffer acetato ($I=0,009\text{M}$, pH 4,35) se preparó

con 410 mL de solución A (ácido acético en agua 1,2% v/v) y 90 mL de solución B (2,72g de acetato de sodio en 100mL de agua), llevando a un litro con agua ultrapura. Finalmente se preparó también fluido fisiológico simulado (SBF) de pH 7,4 siguiendo el protocolo de Kokubo [55].

Para los estudios de liberación sobre superficies, se usaron dos tipos diferentes de andamios. Andamios de biovidrio dopados con nanopartículas de hidroxiapatita, denominados HAp-BGS, fueron preparados y gentilmente suministrados por la Dra. M.L. Dittler en el Instituto de Biomateriales, Universidad de Erlangen-Nuremberg, Alemania, según protocolos descritos en la literatura [52]. Por otro lado, se usaron dos tipos de andamios de seda, denominados de síntesis acuosa en glicerol (GL) y lixiviados con sal (SL). Estos andamios fueron preparados y suministrados por la Lic. Victoria Machaín del Instituto de Física, Universidad Nacional de La Plata, Argentina, según protocolos publicados en la literatura y optimizados en dicho laboratorio [53].

2. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN EMPLEADAS.

2.1. Microscopía Electrónica de Transmisión.

La Microscopía Electrónica de Transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) es una técnica que permite observar y obtener información sobre la microestructura de una muestra. El microscopio dirige un haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar, pudiendo obtenerse un aumento de hasta un millón de veces. Los electrones del haz pueden atravesar la muestra o chocar con los núcleos atómicos, permitiendo obtener información estructural según las pérdidas específicas de los diferentes

electrones del haz. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando la imagen aumentada de la muestra. Tanto el difractograma de electrones como la imagen reconstruida se pueden proyectar en una pantalla. Las imágenes se pueden producir a partir de los electrones difractados (imágenes de campo oscuro) o a partir de los electrones directos que han atravesado la muestra sin interacción (imágenes de campo claro/brillante). Una limitación de la técnica TEM es que muchos materiales no sobreviven a las condiciones que existen en la cámara del microscópico debido al alto vacío y al impacto de electrones acelerados [56].

Las imágenes de TEM de los liposomas recubiertos y sin recubrir, se tomaron con un microscopio JEOL JEM 1200 EX II. Las muestras se prepararon goteando sobre una grilla de cobre de 300 mallas recubierta de carbono, dejando evaporar el agua en aire. Alternativamente, las muestras se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 2% o acetato de uranilo. Cuando fue posible, se realizó el análisis estadístico de las imágenes para encontrar la distribución de tamaños de partícula empleando el software ImageJ.

2.1.1. Microscopía Electrónica de Transmisión de Alta Resolución.

Se utilizó un microscopio FEI Talos 1162 equipado con un espectrómetro de rayos X de energía dispersiva (detector EDS Si (Li) Jeol) en modo TEM de barrido (STEM) para adquirir imágenes de liposomas recubiertos con CaP. En el modo STEM se adquieren imágenes con electrones de alta energía que permiten identificar materiales de distinta composición química. La muestra se preparó depositando la suspensión en una rejilla de cobre de malla 400 recubierta de carbono y se evaporó en aire. Las imágenes fueron analizadas por el software Image J.

2.2. Microscopía Electrónica de Barrido.

Las imágenes de un microscopio electrónico de barrido o SEM (*Scanning Electron Microscope*) se obtienen mediante la detección, procesamiento y visualización de las señales resultantes de las interacciones entre el haz de electrones de alta energía con la materia. Estas interacciones pueden proporcionar información sobre topografía, composición y estructura cristalográfica. Para la obtención de imágenes es necesario asegurar que las muestras sean limpias, secas, resistentes al alto vacío del instrumento y buenas conductoras eléctricas. Si se trata de observar un material no conductor, normalmente se recubren las muestras con una delgada capa metálica de oro, por ejemplo, y desecando previamente las muestras que tuviesen altos contenidos de vapor de agua. El equipo utilizado en esta tesis se muestra en la Figura 7.



Figura 7. Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental, FEI Quanta 200 y Diagrama esquemático.
Tomado de [56].

La imagen se obtiene a partir de las señales emitidas por la muestra y se va formando a medida que el haz de electrones se desplaza sobre una porción de su superficie. Este barrido (*scanning*) se realiza línea por línea sobre una pequeña zona de forma rectangular (*raster*). Esta zona es la que se visualiza ampliificada en la imagen final. A

diferencia de una imagen óptica, el SEM no forma una imagen real del objeto, sino que construye una imagen virtual a partir de alguna de las señales emitidas por la muestra. La intensidad de la señal generada varía según el punto particular analizado en cada instante. La señal detectada puede ser entonces analizada y amplificada, tanto en su forma analógica como digital, y finalmente procesada convenientemente. La imagen se visualiza en un tubo de rayos catódicos donde las bobinas de deflexión del haz están sincronizadas con el barrido del haz de electrones en el microscopio. Modulando la intensidad del haz del tubo de rayos catódicos se obtiene finalmente un registro punto a punto en la pantalla que es precisamente la imagen electrónica proporcionada por el microscopio [57].

2.3. Difracción de Rayos X.

La difracción de rayos X (DRX) es una de las herramientas no destructivas más efectivas para identificar y caracterizar materiales policristalinos con respecto a su cristalografía, estructuras polimórficas, fases y cambios de cristalinidad, siendo una técnica fundamental en la ciencia del estado sólido. La técnica consiste en hacer incidir un haz de rayos X sobre el sólido a estudiar. La interacción entre el vector eléctrico de la radiación X y los electrones de la materia que atraviesa dan lugar a una dispersión. Al producirse la dispersión tienen lugar interferencias (tanto constructivas como destructivas) entre los rayos dispersados, ya que las distancias entre los centros de dispersión son del mismo orden de magnitud que la longitud de onda de la radiación. Midiendo el ángulo de difracción de un haz primario de rayos X de acuerdo con la Ley de Bragg ($\lambda = 2d \sin\theta$, con λ : longitud de onda, d : distancia entre capas atómicas en un cristal y θ : ángulo de difracción), es posible caracterizar e identificar el material, ya que el patrón de interferencia es específico de cada sustancia [58].

La DRX se aplica en el área de nanociencias debido a que la información que se obtiene a partir de los difractogramas permite determinar el sistema cristalino al que pertenece un compuesto, así como los parámetros de celda, es decir, la unidad fundamental de repetición del cristal. Con las intensidades de las reflexiones es posible determinar la distribución de los átomos dentro de la celda. La geometría de los perfiles en los picos (o máximos de difracción), permite determinar el tamaño de los cristales [59].

En esta tesis se utilizó DRX como herramienta para identificar las fases de CaP presentes en los nanovehículos sintetizados. Las medidas se realizaron en un difractómetro Philips PW 1011/00 usando radiación $\text{CuK}\alpha$, operado a 30 mÅ y 35 kV. Los patrones DRX fueron escaneados en pasos de $0,02^\circ/2s$ en el rango de 5° a 60° .

2.4. Dispersión de rayos X de ángulo amplio.

La dispersión de rayos X de ángulo amplio (*Wide angle X-ray scattering, WAXS*) es una técnica utilizada para la investigación de materiales parcialmente ordenados. A menudo se emplea para caracterizar la estructura cristalina de los polímeros, midiendo los espacios interatómicos dentro de la celda unitaria. Esta técnica se refiere específicamente al análisis de picos de Bragg dispersos en ángulos amplios ($2\theta > 1^\circ$), lo que según la ley de Bragg implica que son causados por estructuras de tamaño subnanométrico [60]. Se pueden identificar y cuantificar las fases cristalinas presentes en una muestra determinada, además de calcular el tamaño de nanocristalitos [61].

En este trabajo se realizaron experimentos para determinar el carácter cristalino de las muestras recubiertas con fosfato de calcio, utilizando un difractómetro Siemens D500 equipado con un tubo de rayos X convencional que funciona a una longitud de onda de $\lambda = 0,15418 \text{ nm}$ ($\text{Cu K}\alpha$). El haz de rayos X fue colimado por dos rendijas antes de incidir

en la muestra y se colocó un cristal monocromador delante del detector (contador de centelleo). El patrón de difracción resultante se corrigió por la dispersión de la celda de muestra.

2.5. Medidas de fotoluminiscencia.

La fotoluminiscencia es la emisión de luz desde los estados electrónicamente excitados de una sustancia como consecuencia de la absorción de radiación electromagnética en el espectro UV-visible. Se divide formalmente en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia, según la naturaleza del estado excitado. La fluorescencia se presenta en estados singletes excitados, cuando el electrón en el orbital excitado está emparejado (por espín opuesto) con el segundo electrón en el orbital del estado fundamental. En consecuencia, se permite el retorno al estado fundamental rápidamente por emisión de un fotón. Las tasas de emisión de fluorescencia son normalmente del orden de 10^8 s^{-1} , de modo que un tiempo de vida de fluorescencia típico en moléculas es cercano a los 10 ns, por lo cual es un fenómeno muy corto. Por su parte, la fosforescencia es la emisión de luz desde estados excitados tripletes, en los que el electrón en el orbital excitado tiene la misma orientación de espín que el electrón en estado fundamental. Las transiciones al estado fundamental singlete están prohibidas y las tasas de emisión son lentas (10^3 a 10^0 s^{-1}), por lo que los tiempos de vida de la fosforescencia suelen ser de milisegundos a segundos [62].

Los procesos que ocurren entre la absorción y la emisión de luz suelen ilustrarse mediante el diagrama de Jablonski, que permite ilustrar diversos procesos moleculares que pueden ocurrir en estados excitados. En un diagrama típico como el que se ve en la Figura 8, los estados electrónicos singlete fundamental, primero y segundo se representan mediante S_0 , S_1 y S_2 , respectivamente. En cada uno de estos niveles de energía electrónica, las moléculas capaces de sufrir estos procesos, denominadas fluoróforos, pueden existir en varios niveles de energía vibracional, representados por

0, 1, 2, etc. Las transiciones entre estados se representan como líneas verticales para ilustrar la naturaleza instantánea de la absorción de luz.

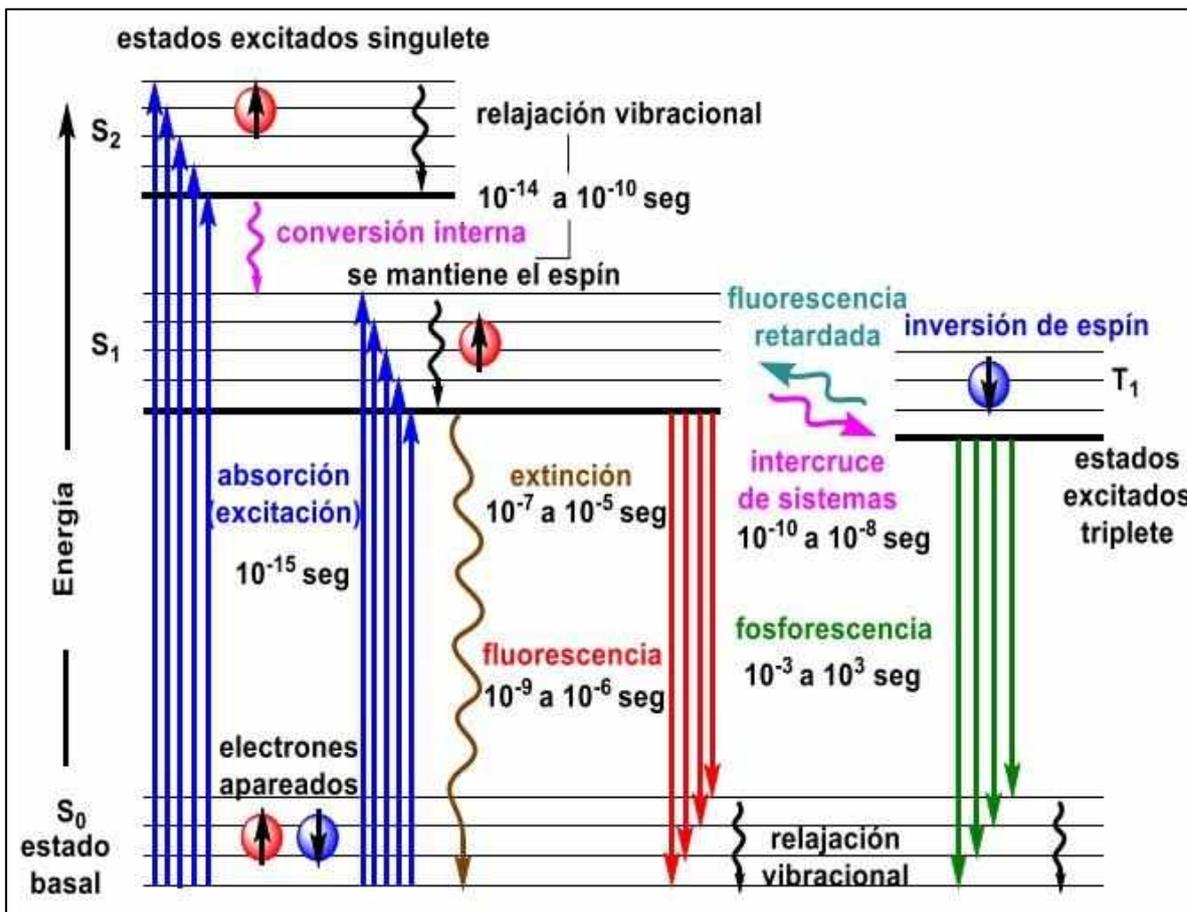


Figura 8. Diagrama de Jablonski para distintos estados excitados. Tomado de [63].

Las medidas basadas en fotoluminiscencia se realizaron utilizando un espectrómetro Jobin-Yvon Spex Fluorolog FL3-11 (Figura 9) equipado con una lámpara de Xe como fuente de excitación, un monocromador con un paso de banda de 1 nm para seleccionar las longitudes de onda de excitación y emisión, y un detector R928 PM sensible al rojo. Se emplearon celdas de cuarzo con camino óptico de 10 mm y un paso de longitud de onda de barrido de 2 nm. Los espectros se corrigieron dependiendo de la sensibilidad de longitud de onda del detector y la fuente y por dispersión Raman, utilizando el espectro de emisión del disolvente de la muestra. Todos los espectros de emisión de

fluorescencia se tomaron luego de verificar que la absorbancia de la muestra estuviera por debajo de 0,05 a la longitud de onda de excitación, para no saturar el detector y evitar el efecto de filtro interno de los fluoróforos.

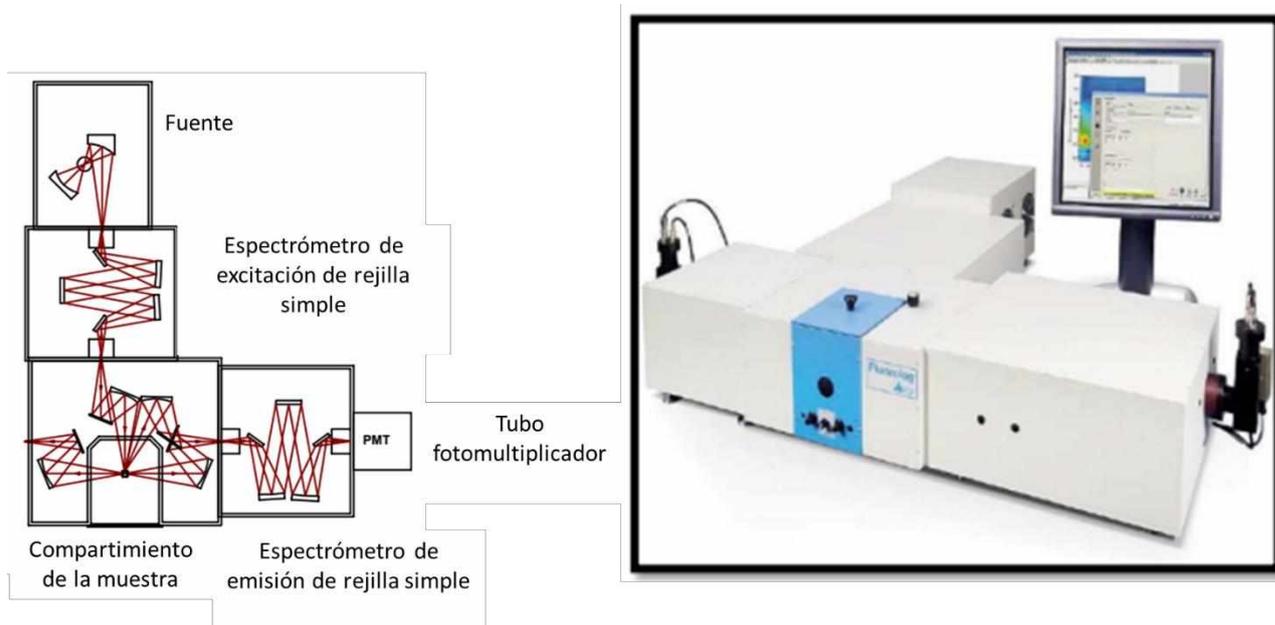


Figura 9. Fluorómetro SpexFluorolog FL3-11 Horriba-JovinYbon.

2.5.1. Emisión resuelta en el tiempo.

Además de las medidas de fluorescencia en estado estacionario, se realizaron experimentos resueltos en el tiempo para obtener información sobre el entorno de los fluoróforos encapsulados y las posibles especies emisivas presentes en los nanovehículos. Por un lado, se obtuvieron los espectros de emisión resueltos en el tiempo (*Time resolved emission spectra, TRES*), es decir, los espectros de emisión que se observarían si se midieran en algún instante después de una excitación pulsada y dan cuenta de las especies emisivas y sus tiempos de vida. El tiempo de vida (τ) de un fluoróforo es el tiempo promedio que pasa entre su excitación y su regreso al estado fundamental. En caso de encontrarse especies moleculares diferentes (con diferentes

estados electrónicos o estructura química, por ejemplo) sus respectivos tiempos de vida también serán distintos [62].

Las muestras se excitaron con un NanoLED de 341 nm y se utilizó un detector de alta resolución temporal (*Time Correlated Single Photon Counting*, TCSPC). Las medidas experimentales incluyen la contribución del pulso de excitación, por lo que se debió realizar la deconvolución de la señal para eliminarla y obtener los decaimientos de fluorescencia corregidos. Para ello, se determinó el perfil temporal del pulso de excitación bajo las mismas condiciones de las muestras, remplazándolas por una suspensión de nanopartículas de sílice (Ludox®). Los datos son recogidos en un gráfico del logaritmo de la intensidad versus el tiempo (canales). Luego, el tiempo de decaimiento (τ) es calculado a partir de la Ecuación 1:

$$I_{\lambda}(t) = I_0 \exp(-t/\tau)$$

Ecuación 1. Intensidad de emisión en función del tiempo.

Donde I_{λ} es la intensidad de emisión la longitud de onda determinada, I_0 es la intensidad en el tiempo cero, t es el tiempo y τ el tiempo de decaimiento. En caso de tener la contribución de varios tiempos de decaimiento, las señales pueden ajustarse con una ecuación multiexponencial, como muestra la Ecuación 2:

$$I_{\lambda}(t) = I_0 \sum_{i=1}^N C_{i,\lambda} \exp_i^{(-t/\tau_i)} \text{ bajo la condición } \sum_{i=1}^N C_{i,\lambda} = 1$$

Ecuación 2. Intensidad de emisión con ajuste multiexponencial.

Donde τ_i es el i -ésimo tiempo de decaimiento, y C_i es la fracción con la cual contribuye a la emisión el i -ésimo componente del decaimiento. Estas magnitudes se hallan ajustando a un modelo exponencial hasta obtener valores de χ^2 y residuos óptimos [64]. El espectro de emisión asociado a cada tiempo de vida de decaimiento por fluorescencia

puede obtenerse tomando la contribución de cada τ a la emisión global a una longitud de onda dada, ponderada por la intensidad de emisión en el máximo de emisión [64].

2.5.2. Anisotropía resuelta en el tiempo.

Por otro lado, se utilizó la anisotropía de fluorescencia resuelta en el tiempo para estudiar las propiedades rotacionales del antibiótico LX en solución acuosa e incorporado dentro de los liposomas. La anisotropía hace referencia a las propiedades de la materia que varían según la dirección en que son examinadas. Por su parte, la anisotropía de fluorescencia es un fenómeno que se produce cuando la emisión de un fluoróforo posee diferentes intensidades en diferentes ejes de polarización. La técnica consiste entonces en excitar una muestra con luz polarizada, usualmente orientada paralelamente al eje vertical o eje z, y medir la emisión resultante en dicho eje. Aquí se da un fenómeno llamado fotoselección, en el cual aquellas moléculas con momentos de transición alineados de forma paralela al vector eléctrico de la excitación tienen la mayor probabilidad de excitación [62], obteniéndose una población excitada parcialmente polarizada y, por lo tanto, una emisión de fluorescencia también parcialmente polarizada. En la Figura 10 se muestra un esquema del efecto de la luz polarizada sobre las moléculas del fluoróforo.

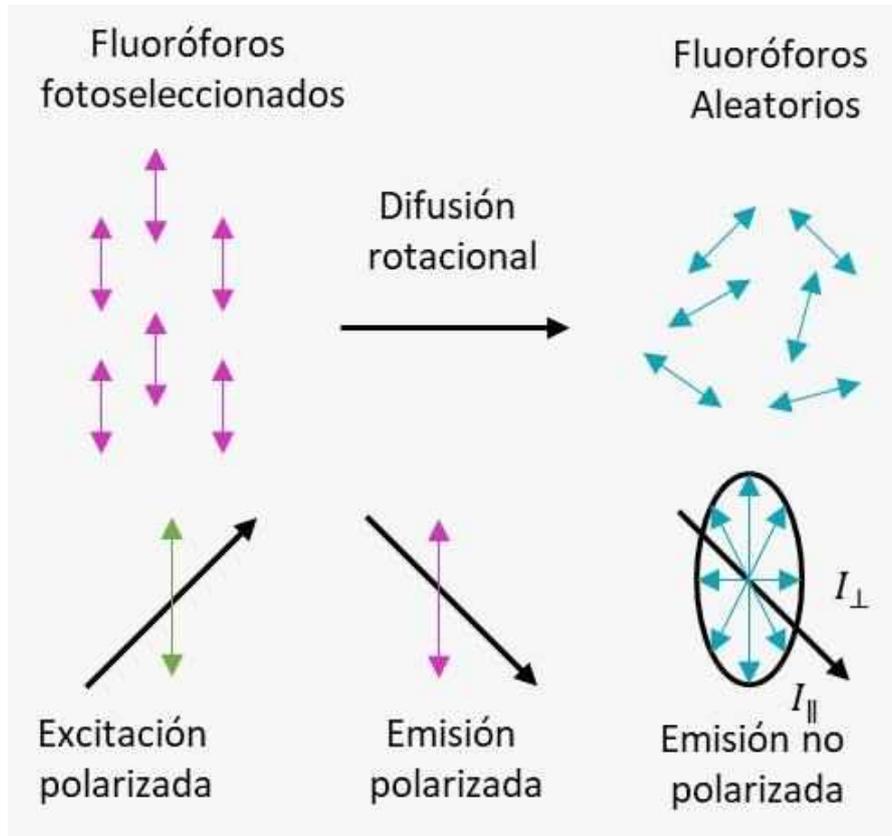


Figura 10. Esquema de polarización de moléculas.

La fluorescencia de las moléculas fotoseleccionadas se puede despolarizar por los movimientos de difusión rotacional de las mismas, por lo que la mayoría de las aplicaciones dependen de cambios en la velocidad de rotación. Un parámetro de referencia es el tiempo de correlación rotacional, característico del fluoróforo en el medio de difusión en el que se encuentre. La despolarización por difusión rotacional de moléculas esféricas se describe mediante la ecuación de Perrin:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau}{\theta} = 1 + 6D\tau$$

Ecuación 3. Ecuación de Perrin.

Donde r es la anisotropía observada mediante irradiación continua, r_0 es la anisotropía fundamental, θ es el tiempo de correlación rotacional, τ es el tiempo de decaimiento

fluorescente y D es el coeficiente de difusión rotacional. A partir del valor de θ es posible evaluar el radio hidrodinámico de las especies emisivas, utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = kT/6\pi\eta R$$

Ecuación 4. Ecuación de Stokes-Einstein.

Donde D es el coeficiente de difusión rotacional, k es la constante de Boltzmann, η es la viscosidad del solvente y R es el radio. El tiempo de correlación rotacional y el coeficiente de difusión rotacional se relacionan mediante la expresión $\theta=1/6D$ [62]. En este trabajo se utilizó esta técnica con el objetivo de obtener información sobre el efecto del entorno en el comportamiento anisotrópico del antibiótico. Para ello se analizó el comportamiento de LX en solución acuosa a pH 7,4 y dentro del liposoma analizando una suspensión de LiLX al mismo pH. Se obtuvieron las curvas de decaimientos de anisotropía en función del tiempo t . En el caso de una total depolarización de la anisotropía a tiempos largos ($r_{\infty} = 0$), los decaimientos se ajustaron de acuerdo con la ecuación:

$$r(t) = r_0 \times e^{-t/\theta}$$

Donde la anisotropía inicial r_0 puede tomar valores entre 0,4 (para momentos de transición paralelos) y 0,2 (para momentos de transición perpendiculares). Cuando el fluoróforo se encuentra impedido de rotar y se observa que la anisotropía a tiempos largos tiende a un valor distinto de cero ($r_{\infty} \neq 0$), se considera la ecuación siguiente para el ajuste de los decaimientos:

$$r(t) = r_{\infty} + (r_0 - r_{\infty}) \times e^{-t/\theta}$$

2.6. Espectroscopía UV-Vis.

Esta técnica se basa en la interacción de la materia con la fracción del espectro electromagnético entre las longitudes de onda de 100 y 800 nm, ya que en este rango se dan transiciones electrónicas de promoción de electrones externos, que son excitados a estados de mayor energía gracias a la absorción de fotones. La Ley de Lambert - Beer establece que la absorbancia depende logarítmicamente de la transmisión (T) de la luz a través de una sustancia. A su vez, también se define como el producto del coeficiente de absorción de la sustancia (ϵ) por su concentración (c) y el camino óptico de la luz (L) a través del material [65]. Las siguientes ecuaciones muestran las relaciones entre los parámetros considerados (Ecuación 5):

$$A(\lambda) = -\ln T(\lambda)$$

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda) \cdot L \cdot c$$

$$1 - T(\lambda) = 1 - P(\lambda)/P_0$$

$$P(\lambda)/P_0 = 1 - 10^{-A(\lambda)}$$

Ecuación 5. Ecuaciones consideradas para los parámetros de espectroscopía UV-Vis.

Donde $P(\lambda)$ es la intensidad de la luz luego de pasar por el camino óptico L, y P_0 es la intensidad de luz incidente. Debido a ello, es posible conocer la concentración de una especie conociendo su absorbancia en cierta longitud de onda y el coeficiente de absorción de la misma. Esta ley se cumple solo cuando P_0 es pequeño y los procesos multifotónicos y las reacciones fotoquímicas son también despreciables [66]. Para los ensayos de UV-Vis se utilizó un equipo espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 de doble haz con celdas de cuarzo de un paso óptico de 10 mm. Todos los espectros fueron tomados a temperatura ambiente, aproximadamente 25°C.

2.7. Espectroscopía IR por ATR-FTIR.

La espectroscopía infrarroja debe su nombre a que utiliza la fracción media del espectro infrarrojo correspondido entre $(4000 - 400) \text{ cm}^{-1}$. Se basa en el hecho de que la mayoría de las moléculas absorben la luz en la región infrarroja convirtiéndola en vibración molecular, por lo que la absorción es característica del tipo de enlaces químicos presentes en la muestra. Dado que los grupos funcionales poseen modos vibracionales con frecuencias características, esta espectroscopía es típicamente utilizada para la identificación de grupos funcionales presentes en una muestra. El método básico de la técnica utiliza un haz de luz infrarroja dividido en dos fracciones, una utilizada como referencia y otra que atraviesa la muestra. Ambos haces son reflejados hacia un detector y a continuación se comparan los haces y se registran los cambios en la intensidad para cada longitud de onda, graficándose luego en función del número de onda ($\nu = 1/\lambda$).

La espectroscopía IR por Transformada de Fourier (FTIR) es una modificación en cuanto a la forma de detección en la técnica de espectroscopia IR básica. En el FTIR, en lugar de registrar los datos modificando la frecuencia de luz infrarroja monocromática, se utiliza un haz de luz IR que pasa a través de un interferómetro. Una vez el haz pasa a través de la muestra se obtiene un interferograma a partir del cual mediante una transformada de Fourier se obtiene un espectro idéntico al que se obtendría por la vía convencional. Debido a la forma en la que funciona la adquisición de datos en el FTIR, todas las frecuencias son detectadas al mismo tiempo, lo que permite realizar múltiples lecturas de una sola muestra aumentando así la sensibilidad de la medida. Comúnmente, para la toma del espectro de muestras en estado sólido, éstas son diluidas en una solución sólida con alguna sal transparente al IR, usualmente KBr, para ajustar la transmitancia de la muestra dentro del rango de detección del equipo [67].

Por su parte, la espectroscopia IR acoplada a Reflexión Total Atenuada (ATR) usa la reflectancia de la muestra para generar el espectro. En una medida típica, se monitorean

los cambios que ocurren en el haz de luz IR, que viaja a través de un cristal y se refleja totalmente en la interfaz cristal-muestra; luego la luz reflejada viaja al detector FTIR. Para ello se utiliza un cristal ópticamente denso con un índice de refracción alto y se irradia a un ángulo conocido. Durante la reflexión interna, una parte de la luz IR viaja hacia la muestra, donde puede ser absorbida. A esto se le llama onda evanescente (ver Figura 11). La profundidad de penetración de la onda evanescente en la muestra está definida por la diferencia del índice de refracción entre la muestra y el cristal y puede tener una penetración de entre 0,5 y 5 μm [68].

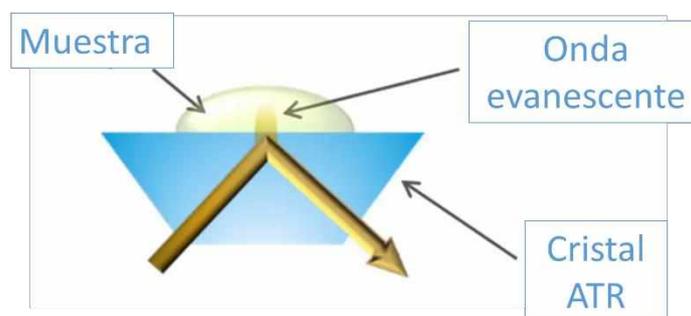


Figura 11. Esquema de la interacción de la luz IR con la muestra es espectroscopía con ATR.

En este trabajo, las medidas de ATR-FTIR para determinar la composición superficial de las nanopartículas se realizaron en un espectrómetro Agilent Cary Serie 630, equipado con el accesorio ZnSe. En todos los casos, las muestras se gotearon sobre sólidos de bromuro de potasio y se dejaron secar al aire. Se realizaron cincuenta escaneos en el rango de 600 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} . Todos los espectros fueron tomados a temperatura ambiente, aproximadamente 25°C.

2.8. Dispersión Dinámica de Luz y Potencial zeta.

La Dispersión Dinámica de Luz (*Dynamic Light Scattering*, DLS) es una técnica que permite la determinación del radio hidrodinámico de partículas hasta la región del nanómetro. Para ello se utiliza un láser de luz monocromática y coherente, y haciéndolo incidir sobre la muestra de estudio suspendida en un solvente adecuado, se observa una fluctuación en la intensidad de luz dispersada dependiente del tiempo debido a los movimientos de tipo Brownianos de las partículas en la suspensión.

El movimiento Browniano es el movimiento aleatorio que se observa en las partículas dentro de un medio fluido (líquido o gas), como resultado de los choques de las moléculas de dicho fluido contra las partículas. Su velocidad depende del coeficiente de difusión traslacional (D). El tamaño de las partículas se calcula a partir de la ecuación de Stokes-Einstein ($D = kT/6\pi\eta R$), ya vista en la sección 2.5.2 del presente capítulo. El diámetro obtenido aplicando la técnica de DLS corresponde al diámetro de una esfera hipotética que posee el mismo coeficiente de difusión que las partículas [68].

Por su parte, el potencial zeta (ζ) es una medida que provee información sobre la carga eléctrica de las partículas en los sistemas coloidales, que están conformados por dos o más fases, normalmente una fluida (líquido o gas) y otra dispersa en forma de partículas generalmente sólidas y muy finas. Su valor está relacionado con la carga de las partículas, lo que determina las estabilidad y tendencia de las partículas en suspensión a aglomerarse, por lo cual se puede utilizar para optimizar las formulaciones de suspensiones y emulsiones.

La aglomeración en un coloide depende de las colisiones entre las partículas, provocadas por el movimiento Browniano, y el equilibrio entre las fuerzas de atracción y repulsión que actúan sobre ellas. Las fuerzas de atracción son las de fuerzas de Van der Waals

mientras que las fuerzas de repulsión provienen de la interacción entre las dobles capas eléctricas que rodean a las partículas en el fluido. La teoría DLVO (llamada así por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) fundamenta la formación de aglomerados de coloides en función de la relación de dichas fuerzas. Luego de la colisión entre partículas, si las fuerzas de atracción predominan, las partículas se aglomeran, mientras que si predomina la repulsión entre ellas, permanecen separadas dentro del medio [69]. Los coloides con bajos potenciales *zeta* tienden a coagular mientras que los de alto potencial *zeta* se estabilizan eléctricamente [70].

Es deseable maximizar las fuerzas repulsivas entre las partículas del coloide para producir suspensiones estables. Para ello se pueden utilizar varios métodos que alteran el entorno del coloide como cambios en la atmósfera iónica, el pH o agregando compuestos activos para afectar directamente su carga [69].

Para obtener el valor del potencial *zeta*, se utiliza una celda con electrodos en sus extremos, que permite realizar una electroforesis mediante la aplicación de un potencial eléctrico. La velocidad de migración de las partículas cargadas se mide con el sistema de análisis del instrumento para DLS, obteniéndose así la movilidad electroforética (μ_e) y, por aplicación de la ecuación de Henry (Ecuación 6), se calcula el potencial *zeta* [71].

$$\mu_e = [2\varepsilon z f(\kappa a)]/3\eta$$

Ecuación 6. Ecuación de Henry.

Donde:

- z: Potencial *zeta*.
- μ_e : Movilidad electroforética.
- ε : Constante dieléctrica.
- η : Viscosidad.
- $f(\kappa a)$: Función de Henry.

En este trabajo se utilizó esta técnica para conocer los efectos de las diversas funcionalizaciones sobre la estabilidad de las formulaciones liposomales preparadas. Las muestras fueron diluidas al 50% con KCl 0,2 M para fijar la conductividad. Las medidas de DLS y Potencial *zeta* se realizaron a 25°C. Se empleó un equipo Zetasizer Nano (Nano ZSizer-ZEN3600, Malvern, U.K.), equipado con un Láser He-Ne 633 nm con un voltaje de excitación de celda de 30V utilizando un modelo de análisis monomodal. El equipo permite realizar dos tipos de análisis: "*cumulant analysis*" y "*distribution analysis*". Del primero se obtienen el Diámetro Promedio-Z y el Índice de Polidispersidad (PDI) y del segundo el/los Máximo de distribución. Cuando hay un solo pico los dos análisis tienen sentido, pero cuando hay más de un pico sólo el de "*distribution analysis*" tiene sentido. Cabe resaltar que la aparición de dos máximos en la distribución en intensidad indica la presencia de dos poblaciones bien definidas en la muestra [72]. Un índice de polidispersidad de 0 indica que el sistema en estudio es monodisperso y un valor de 0,7 indica un sistema absolutamente heterodisperso [73].

2.9. Microscopía de Epifluorescencia.

La microscopía de fluorescencia se basa en los mismos principios de óptica de la microscopía común, con diferencias en el manejo y el diseño relacionadas con la generación y transmisión de longitudes de onda adecuadas a los fluoróforos que se quieren excitar y visualizar, ya sean propios de la muestra o de la coloración utilizada [74]. Cuando a un microscopio convencional se le añade el adaptador de fluorescencia, se le denomina epifluorescencia, ya que la pieza se inserta por sobre el sistema óptico, logrando trabajar por reflexión lumínica [75]. Los microscopios de epifluorescencia generalmente utilizan lámparas halógenas de alta potencia (~300 Watts) de luz blanca. La luz procedente de la fuente atraviesa un primer filtro que selecciona la longitud de onda necesaria para excitar al fluoróforo (espectro de excitación). Esta luz se refleja en un espejo dicróico e incide sobre la muestra, excitando al fluoróforo, el que emite fotones de una longitud de onda mayor que la luz incidente. La luz emitida (espectro de

emisión), atraviesa el espejo dicroico y llega a un segundo filtro que deja pasar únicamente la longitud de onda de emisión del fluoróforo (ver Figura 12) [76].

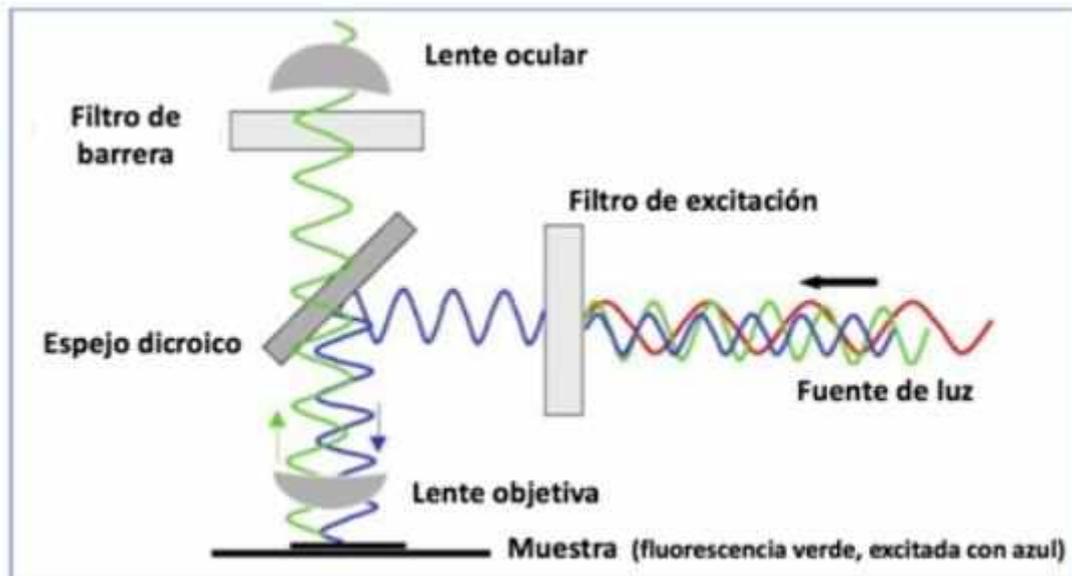


Figura 12. Esquema de funcionamiento de un microscopio de epifluorescencia. Tomado de [15].

Esta técnica se utilizó para evaluar la interacción de los liposomas recubiertos con superficies modificadas con nanopartículas de hidroxiapatita (HAp). Para ello se prepararon muestras que portaban el colorante naranja de acridina, denominadas CaPLiNA, y se depositaron sobre portaobjetos de vidrio modificados y sin modificar. Las superficies se observaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, Olympus Corp., Tokio, Japón) equipado con un filtro #WB (espejo dicroico DM500, filtro de excitación BP450-480, filtro de emisión BA515). El microscopio se conectó a una cámara de vídeo en color Olympus DP71 (Olympus Corp., Tokio, Japón). Las imágenes se tomaron instantáneamente después de abrir el obturador del microscopio en el monitor de la computadora y en condiciones experimentales idénticas. El ensayo se realizó por duplicado y las imágenes fueron analizadas con el software Image J.

2.10. Espectroscopía ICP-OES para cuantificación de calcio.

El plasma de acoplamiento inductivo (ICP) es una fuente de ionización que junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (OES) constituye el equipo de ICP-OES. Esta técnica de análisis multielemental es capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica, a excepción de C, N, O, H, F, gases nobles, algunas tierras raras y otros elementos poco frecuentes, con capacidad de detección hasta en el orden de las ppb. En esta técnica, la introducción de la muestra líquida y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el argón a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido a las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generándose los espectros de Emisión atómicos de líneas características. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. La información es procesada por el sistema informático [77].

En esta tesis se utilizó ICP-OES para determinar el contenido de calcio en suspensiones acuosas de los nanovehículos CaPLiLX utilizando un instrumento Shimadzu, ICPE-9820. Las muestras fueron digeridas utilizando la Norma EPA 3052 y la determinación cuantitativa se realizó según la Norma EPA 6010.

2.11. Espectroscopía ^1H RMN.

La resonancia magnética nuclear se basa en la interacción que se genera al aplicar un campo magnético externo sobre un núcleo atómico, orientando el momento magnético del núcleo bajo su influencia. Todos los núcleos con número cuántico de espín distinto de cero presentan propiedades magnéticas, siendo los núcleos con número de spin $\frac{1}{2}$ los más apropiados para su estudio en RMN (^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F , etc.). Los núcleos con espín

$\frac{1}{2}$ pueden orientarse de forma paralela o antiparalela al campo externo. Estas dos orientaciones permitidas presentan diferente energía y, como consecuencia, la orientación de menor energía estará más poblada, creando un efecto de magnetización neta en la dirección del campo magnético externo [78].

Específicamente, la espectroscopía ^1H NMR es la técnica de referencia para ayudar a identificar o confirmar la estructura de los compuestos orgánicos o aquellos que contienen protones. Un espectro ^1H NMR es relativamente rápido de adquirir y permite obtener, mediante un análisis minucioso de la posición de los picos, información sobre la estructura de un compuesto. El llamado desplazamiento químico es la posición relativa de los picos de protones en el eje horizontal de un espectro de RMN y una de las formas en que se extrae la información estructural de los espectros. La densidad de electrones alrededor del protón da como resultado efectos de apantallamiento/desapantallamiento, por lo que diferentes tipos de protones (alifáticos, aromáticos o aldehídos, etc.) se presentan en diferentes rangos de desplazamientos químicos. Los grupos electronegativos unidos a $-\text{CH}$ disminuyen la densidad de electrones alrededor del protón, lo que lleva al desapantallamiento, por lo que aumenta el desplazamiento químico. El tetrametilsilano (TMS) es un estándar común utilizado en RMN en el que el protón está altamente protegido y se le atribuye un desplazamiento de 0 ppm. El desplazamiento químico (o frecuencia de resonancia) de los protones para la muestra dada se expresa luego como valores delta (δ) relativos a TMS (en lugar de Hz absolutos)[79].

El alendronato contenido en las muestras de los nanovehículos, ya sea encapsulado o en su superficie (CaPLiAD y AD-CaPLi, respectivamente), se determinó en un equipo NMR Bruker AVANCE III 600 MHz (14.1 T) Spectrometer con una temperatura de operación de 25 ± 2 °C. Los desplazamientos químicos (δ) están reportados usando como referencia la señal del TMS. Se usó citrato de sodio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) como estándar interno para determinar la concentración de AD en las muestras, para lo cual se tuvo en cuenta la Ecuación 7:

$$C_M = \frac{I_M}{I_{SD}} \times \frac{N_{SD}}{N_M} \times C_{SD}$$

Ecuación 7. Cálculo de la concentración de alendronato por ¹H RMN.

Dónde C_M es la concentración de la muestra evaluada, I_M corresponde a las integrales evaluadas en las señales asociadas al alendronato, I_{SD} a las integrales evaluadas en la señal del citrato, N_{SD} es el número de hidrógenos del citrato, N_M el número de hidrógenos del alendronato y C_{SD} la concentración de la solución de citrato. Las medidas se realizaron en una mezcla de H₂O y D₂O 520:20 V:V.

2.12. Microscopía de Fuerza Atómica.

La principal aplicación de la microscopía de fuerza atómica o AFM por sus siglas en inglés (*Atomic Force Microscopy*) es la creación de imágenes de superficies en alta resolución, aunque también permite obtener información de las propiedades mecánicas de materiales como la adhesión, la rigidez, la fuerza máxima, entre otras, con una resolución atómica. El microscopio de AFM combina un foto-detector (4 cuadrantes), un voladizo o cantiléver con una punta, los posicionadores de materiales piezoeléctricos, el láser y la muestra (Figura 13). Su funcionamiento corresponde a una pequeña punta de un par de micras de largo sujeta a una viga en voladizo (cantilever); esta realiza un barrido sobre la superficie de la muestra a ser evaluada, de forma que va tomando los datos para determinar las características topográficas y de fases. Con esa configuración, el voladizo detecta las fuerzas de interacción que se generan entre la punta y la superficie de la muestra; es decir, las fuerzas de van der Waals, electrostáticas y repulsiones electrónicas que surgen a distancias nanométricas [80].

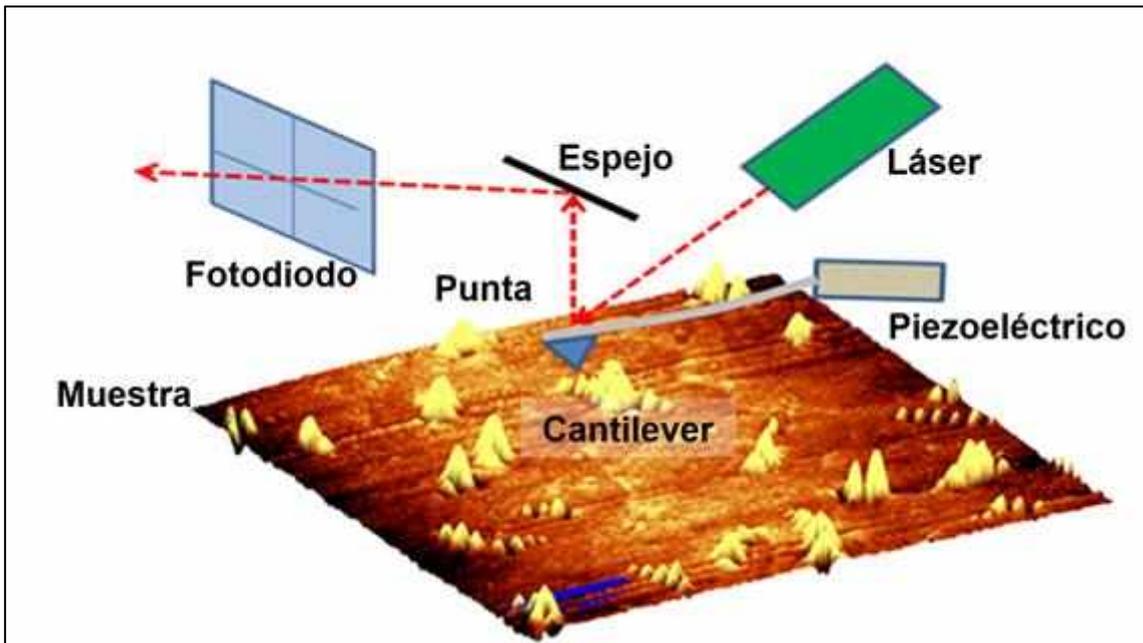


Figura 13. Funcionamiento del AFM. Tomado de [12].

Además, el AFM usa un sistema de deflexión láser que es reflejado por la parte posterior de la viga en voladizo a un detector de posicionamiento que está compuesto por un fotodiodo de cuatro cuadrantes. De forma que el desplazamiento de la viga resulta en una diferencia en la señal recolectada entre los fotodiodos superior, inferior, el de la derecha y el de la izquierda; y esta se traduce a una deflexión proporcional de la viga. Por tanto, se da una retroalimentación debida a la diferencia de señal relativa entre el fotodiodo por medio del control de un software; esto logra que la punta pueda trabajar manteniendo la altura o fuerza constante [80].

En este trabajo se utilizó AFM para abordar la interacción de las muestras de liposomas recubiertos (CaPLiLX) y funcionalizados con alendronato (AD-CaPLiLX), con superficies de mica con y sin depósito de sales de Ca^{2+} .

CAPÍTULO 3.
SÍNTESIS Y
CARACTERIZACIÓN DE
LIPOSOMAS
RECUBIERTOS

1. INTRODUCCIÓN.

Los liposomas son estructuras autoensambladas a partir de fosfolípidos que permiten la incorporación de diversas moléculas y son compatibles con las membranas biológicas. Es por esto que han sido ampliamente estudiados para su uso en el reparto de drogas en distintos tejidos. Sin embargo, su labilidad y riesgo de disrupción significan una desventaja para su utilización. Para el tratamiento de enfermedades óseas, el recubrimiento de liposomas con compuestos en base a fosfato de calcio puede subsanar las desventajas y producir un nanovehículo estable y compatible con el hueso. A su vez, la modificación superficial de los nanovehículos con carboxilatos y/o grupos amino, sirve de plataforma para su funcionalización posterior con distintas moléculas de direccionamiento y/o de rastreo, permitiendo su control y visualización al interactuar con el sitio objetivo.

En el presente capítulo se describirán tres metodologías utilizadas inicialmente para la síntesis de los liposomas, así como el procedimiento de recubrimiento con fosfato de calcio para la síntesis de los nanovehículos, los cuales llevan encapsulados los antibióticos levofloxacin y ciprofloxacina, y el bisfosfonato alendronato. Se mostrarán los resultados de caracterización estructural, morfológica y de capacidad de carga de las nanovesículas por técnicas de microscopía, espectroscopía, resonancia y luminiscencia, entre otras. También se describe y se evalúa la funcionalización superficial con alendronato y con los fluoróforos violeta de cresilo, fucsina básica y fluoresceína isotiocianato.

2. METODOLOGÍA.

2.1. Síntesis de liposomas.

Con el objetivo de lograr síntesis compatibles con sistemas biológicos, los liposomas (Li) se sintetizaron en medio acuoso por tres métodos que no requieren la inclusión de solventes orgánicos. En todos los casos, se utilizaron suspensiones de lípidos de 1 mg DOPA/mL. Tal como se discutió anteriormente, se encapsularon los antibióticos levofloxacina y ciprofloxacina, y el bisfosfonato alendronato. Para ello, se prepararon soluciones acuosas de concentraciones definidas para cada compuesto (LX 100 μ M, CX 20 μ M, y AD en PBS 0,015 M), que se mezclaron con la suspensión de DOPA. Luego se formaron las vesículas mediante los distintos métodos de síntesis que se describen a continuación (secciones 2.1.1 a 2.1.3) con el objetivo de optimizar la carga de fármacos. Los nanoliposomas obtenidos fueron nombrados como LiLX, LiCX y LiAD para los liposomas encapsulando LX, CX y AD, respectivamente. Un esquema general de los distintos métodos de síntesis puede observarse en la Figura 17 ejemplificado para la encapsulación de LX.

La encapsulación de LX y CX se confirmó por fluorescencia estacionaria. En el caso de la CX, puede observarse su emisión a 450 nm bajo excitación a 275 nm, y en el caso de LX registrando la emisión a 450 nm bajo excitación a 330 nm. Por otro lado, la encapsulación de AD se determinó por resonancia $^1\text{H-NMR}$ y espectroscopía UV-Vis.

2.1.1. Extrusión.

La extrusión es un proceso mediante el cual, las vesículas micrométricas autoensambladas que se forman cuando los lípidos se dispersan en agua, se reordenan para formar vesículas unilaminares grandes (LUV) o nanoliposomas, según el tamaño de poro de las membranas utilizadas. Las vesículas se extruyen físicamente bajo presión a través de filtros de policarbonato de tamaños de poro definidos [81]. Los liposomas se prepararon por extrusión de 1 mL de suspensión acuosa de DOPA y LX 100 μM a través de un filtro de politetrafluoroetileno de 100 nm de poro, usando un extrusor de Avanti Polar Lípids, con jeringas Hamilton Gastight #1001 de 1000 μL (Reno, Nevada, USA). La suspensión se pasó 11 veces por el filtro a temperatura ambiente. En la Figura 14 se puede ver un esquema del extrusor utilizado. Después del procedimiento, la suspensión se volvió translúcida, indicando el ensamblaje de los liposomas.

Para remover el exceso de las drogas no encapsuladas, se dializó la suspensión usando una membrana de celulosa y manteniendo una proporción de 1:100 con el medio de diálisis (agua ultrapura), por un intervalo de dos horas. Posteriormente se cambió el medio de diálisis y se continuó por otras 12 horas. La suspensión de liposomas obtenida fue almacenada en frascos de color ámbar a 4°C, con el fin de proteger los liposomas de la luz y reducir la degradación oxidativa.

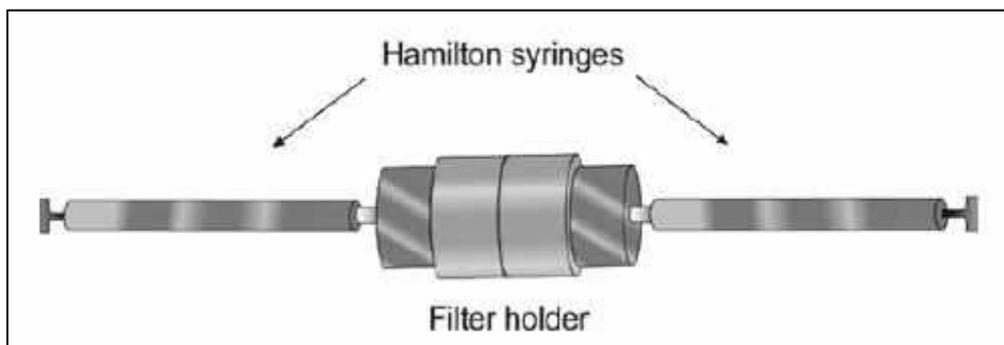


Figura 14. Pequeño extrusor manual que se utiliza en la fabricación de nanoliposomas.

2.1.2. Inyección etanólica.

Este método permite obtener liposomas mediante la inyección de una solución lípido-etanol en agua, aprovechando la precipitación de los lípidos y la rápida difusión del solvente a través de la interfase solvente-lípido con la fase acuosa [23]. Primero se disolvió el DOPA en 2,7 mL de etanol absoluto, luego se inyectaron 900 $\mu\text{L}/\text{min}$ de esta solución a un balón con 5,4 mL de agua y LX 100 μM , bajo agitación a 800 rpm. Al terminar la adición se mantuvo bajo agitación por 15 minutos más. Por último, la suspensión resultante fue dializada como se describió anteriormente.

2.1.3. Sonicación.

La sonicación es un método de síntesis de liposomas ampliamente utilizado, particularmente para vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) ya que se aprovecha la energía mecánica proveniente del ultrasonido para formarlas. Los fosfolípidos en medio acuoso tienen la capacidad de formar vesículas multilamelares. Al someter la suspensión a un baño de ultrasonido o sonicador de punta, la presión inducida rompe las vesículas multilamelares más grandes de la muestra para formar vesículas más pequeñas [82]. Para la síntesis de los liposomas, se utilizó un sonicador de punta P-1 Microprobe de 1/8" de diámetro, alimentado por una fuente Q-Sonica, LIC (Misonix Sonicator XL-2000) a 10W. En un vial se preparó la suspensión acuosa de DOPA y LX y se homogenizó utilizando un agitador tipo vórtex. Luego, la mezcla fue sometida a 5 ciclos de 30 segundos de sonicación y 30 segundos de descanso en baño de hielo para evitar el sobrecalentamiento de la muestra. El cambio de la opalescencia de la suspensión sugirió la formación de liposomas. La muestra se purgó con argón por 15 minutos en baño de hielo, buscando mantener a la temperatura de transición del DOPA. Posteriormente, con el fin de retirar trazas metálicas que se hubieran desprendido de la sonda se

centrifugó la mezcla en una microcentrífuga CAPP CR-1512 a 12000 rpm durante 5 minutos, en tubos eppendorf de 2 mL. El sobrenadante se dializó y se almacenó igual que con los métodos anteriores.

2.2. Recubrimiento con fosfato de calcio.

El recubrimiento se realizó por el método de coprecipitación de sales que considera la formación de un material de fosfato de calcio deficiente en Ca^{2+} [34]. El crecimiento de la capa de fosfato de calcio (CaP) se controló con la adición de CEPA, el cual no sólo detiene la formación de CaP sino que deja grupos carboxilo expuestos en la superficie de las nanopartículas [28], otorgando una carga negativa que brinda estabilidad frente a la aglomeración y además permite la posterior funcionalización con moléculas de rastreo y/o direccionamiento. De manera análoga, se recubrieron liposomas deteniendo el crecimiento de la capa de fosfato de calcio con el agregado de ácido 2-aminoetilfosfónico (AEPA), que deja expuestos en la superficie grupos amino a los que también pueden unirse moléculas de rastreo. En la Figura 15 se pueden ver las estructuras del CEPA y AEPA.

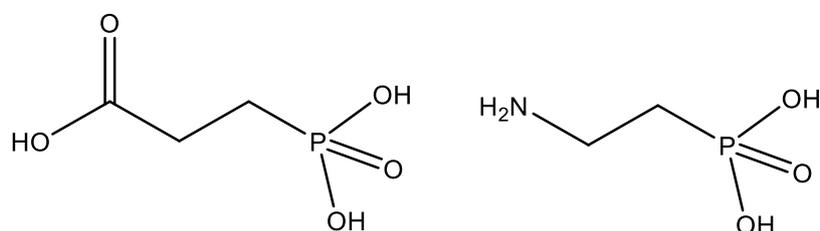


Figura 15. Estructuras de CEPA (izquierda) y AEPA.

El procedimiento consistió en agregar a 5 mL de agua ultrapura, 10 μL de H_3PO_4 1M y 40 μL de NaOH 1 M, luego se midió el pH con un equipo Consort C830, el cual se mantuvo entre 11,5 y 12,5, garantizando un medio básico para la precipitación del fosfato de calcio sobre los liposomas. Posteriormente se agregaron 100 μL de CaCl_2 0,1 M y 5 segundos después, 1 mL de suspensión de liposomas previamente sintetizados. La mezcla se dejó en agitación durante 10 minutos, luego de ese tiempo se adicionaron 50 μL de CEPA 0,1 M para detener el crecimiento de la capa de CaP y se dejó homogenizando por 10 minutos más. Finalmente, la suspensión se sometió a diálisis por tres horas y se almacenó en frascos ámbar a 4°C. En la Figura 16 se muestra un esquema general del liposoma recubierto una vez agregado el CEPA.

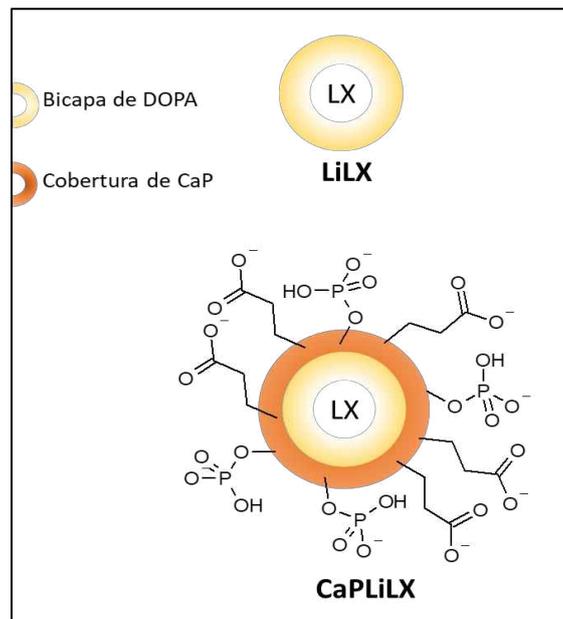


Figura 16. Esquema general de liposoma, en este caso conteniendo LX, recubierto con una capa de fosfato de calcio. Se muestran los grupos superficiales que quedan expuestos por agregado de CEPA.

Nótese que se propone la presencia de grupos fosfatídicos propios del fosfato.

En la Figura 17 se resumen los procedimientos de síntesis y recubrimiento, usando LX como droga modelo. Los nanoliposomas recubiertos obtenidos fueron nombrados como: CaPLi, CaPLiLX, CaPLiCX y CaPLiAD para los liposomas vacíos y con LX, CX y AD encapsulados, respectivamente. Cabe aclarar que, a menos que se especifique lo

contrario, cuando se mencionan liposomas recubiertos se trata de liposomas en los que se utilizó CEPA para finalizar el crecimiento de la capa de fosfato de calcio, ya que fue el reactivo usado en la mayoría de los ensayos.

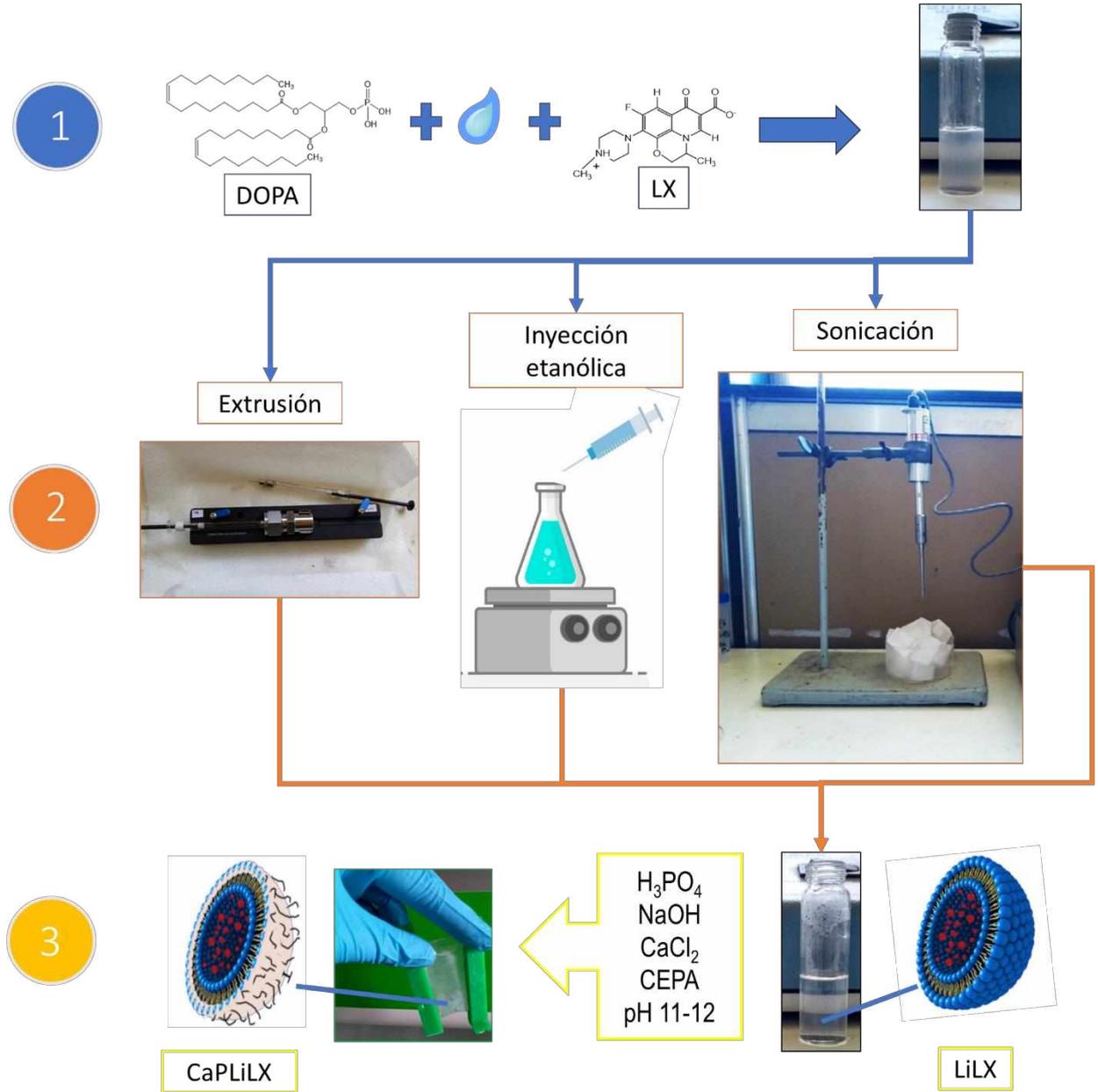


Figura 17. Esquema de síntesis y recubrimiento de liposomas conteniendo LX.

2.3. Funcionalización superficial.

Con el objetivo de utilizar los nanovehículos como sondas de rastreo y direccionar su trayectoria, se aprovechó la exposición de los grupos carboxilo del CEPA, o alternativamente, los grupos amino del AEPA, en los liposomas recubiertos para anclar distintas moléculas en su superficie. La funcionalización superficial se realizó por conjugación, específicamente por *crosslinking* o entrecruzamiento, que es un método utilizado para generar la unión química de dos o más moléculas mediante un enlace covalente, particularmente aplicado en la bioconjugación de marcadores a proteínas para su rastreo. Para generar estos enlaces, se utilizan agentes reticulantes o *crosslinkers* que actúan como intermediarios en la unión de dos o más moléculas de interés, a través de la formación de enlaces estables entre grupos funcionales que puedan reaccionar [83].

Al finalizar el recubrimiento de los CaPLi con CEPA quedan expuestos grupos carboxilo terminales, los cuales pueden unirse a los grupos amino terminales presentes en las moléculas de colorantes y bisfosfonatos con los que se desea funcionalizar la superficie de las nanopartículas. Esta unión se genera por la formación de enlaces amida entre dichos grupos $-COOH$ y $-NH_2$ mediante el uso de agentes de entrecruzamiento específicos. En este trabajo se utilizaron los reticulantes N-hidroxisulfosuccinimida (S-NHS) y carbodiimida (EDC). La EDC provoca la conjugación directa de carboxilatos y aminas primarias, sin convertirse en parte del enlace amida final que se forma. La N-hidroxisuccinimida (NHS) o su análogo soluble en agua (S-NHS) a menudo se incluyen en los protocolos de acoplamiento de EDC para mejorar la eficiencia de la reacción ya que forman ésteres estables como productos intermedios.

Como se explica en la Figura 18-B, se inicia con la reacción del $-COOH$ del reactivo 1 y el EDC formándose un intermedio inestable, luego el S-NHS sustituye la molécula de EDC para formar un éster de S-NHS más estable y soluble en agua, el cual posteriormente se

conjuga con el grupo amino del reactivo 2 a pH fisiológico. En este caso, el reactivo 1 corresponde a CaPLi mientras que el reactivo 2 es alendronato (AD), violeta de cresilo (VC) o fucsina básica (FB). La reacción libera N-hidroxisuccinimida, la que puede eliminarse fácilmente mediante diálisis o desalinización [83]. La reacción análoga ocurre entre los grupos amino del AEPA superficial en los CaPLi y los grupos carboxilo del FITC.

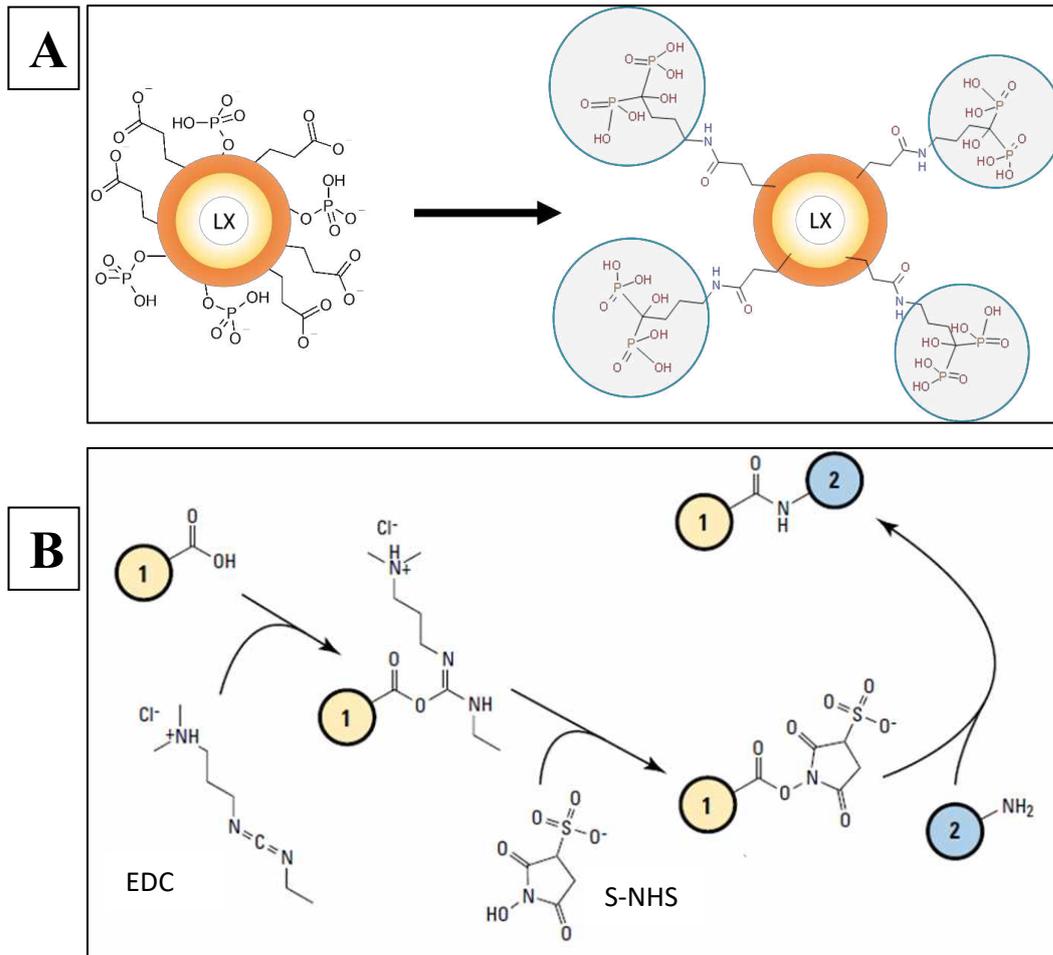


Figura 18. A. Ejemplo de estructura de CaPLi funcionalizado con AD. B. Esquema de la reacción de entrecruzamiento usando EDC y S-NHS.

2.3.1. Bisfosfonato.

Como se describió anteriormente, se utilizó alendronato sódico como bisfosfonato de referencia, el cual no sólo fue encapsulado en los nanoliposomas, sino que se probó su anclaje a la superficie de las nanopartículas dada su capacidad de servir como molécula de direccionamiento hacia las superficies óseas [84]. Para ello, se probaron dos procedimientos para la funcionalización superficial sugeridas en la bibliografía, donde se varían las cantidades relativas de liposomas, activadores, AD y temperatura.

Método A: A 4 mL de una suspensión de pH 7,22 conteniendo liposomas recubiertos con levofloxacina encapsulada (CaPLiX), se agregaron 708,97 μL de EDC $4,55 \times 10^{-2}$ M y 941,80 μL de S-NHS 0,03 M y se agitó la mezcla por 15 minutos a temperatura ambiente. En esta etapa se daría la formación del éster de S-NHS. Posteriormente, para la introducción del grupo amino, se agregaron 645 μL de AD 5×10^{-3} M en PBS, se agitó por 2 horas y se dejó dializando en agua ultrapura durante un día. [85]

Método B: A 1 mL de CaPLiX se agregaron 351,69 μL de EDC $4,55 \times 10^{-2}$ M y 533,40 μL de S-NHS 0,03 M, se agitó la mezcla por 30 minutos en baño de hielo y luego por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 2363 μL de AD 5×10^{-3} M en PBS, se dejó agitando la mezcla por 24 horas a 37°C y se dializó en agua ultrapura durante 24 horas [84].

La presencia y porcentaje del AD superficial se determinó mediante espectroscopía ATR-FTIR y resonancia $^1\text{H-NMR}$. Los nanoliposomas modificados superficialmente se denotaron como AD-CaPLiX.

2.3.2. Fluoróforos.

Con el fin de rastrear los nanovehículos, se funcionalizó su superficie con fluoróforos que permitan su visualización mediante técnicas de emisión de fluorescencia. El protocolo de síntesis fue similar al descrito para el bisfosfonato (Figura 18), con algunas variaciones según el fluoróforo utilizado y las recomendaciones encontradas en bibliografía:

Para la funcionalización con **violeta de cresilo (VC)**, a 9 mL de CaPLiX se agregaron 295 μL de S-NHS 1,7 5mM y 234 μL de EDC 3,96 mM y se agitó por 1,5 horas. Luego se agregaron 138 μL de VC 1,8 mM y se dejó en agitación durante 3h, a temperatura ambiente. Finalmente se sometió a diálisis por 2 horas, se cambió el medio y luego se dejó en diálisis 12h adicionales.

Para la funcionalización con **fucsina básica (FB)**, a 6,030 mL de una suspensión de CaPLiX se agregaron 1,098 mL de EDC $4,55 \times 10^{-2}$ M (10 veces más que los moles de CEPA usados durante la síntesis de la cobertura de CaP [85]) y 1,006 mL de S-NHS 0,03 M y se agitó por 15 minutos lentamente. Se preparó una solución de FB $8,67 \times 10^{-4}$ M en PBS y se tomó una alícuota de 5,77mL (igual número de moles del CEPA en la síntesis) para agregar a la mezcla anterior. Se dejó agitando por 2 horas y luego se dializó 12h.

Adicionalmente, para los fluoróforos anteriores, se evaluaron las diferencias entre un anclaje físico y un anclaje químico del fluoróforo. Para ello, se mezclaron los nanoliposomas y soluciones acuosas de VC o FB, sin el uso de los reactivos de entrecruzamiento, respetando los tiempos y proporciones descritos anteriormente para cada fluoróforo.

Finalmente, para la **fluoresceína isotiocianato (FITC)**, se utilizaron liposomas recubiertos en los cuales se controló el crecimiento de la capa de fosfato de calcio mediante el agregado de AEPA en vez de CEPA. Para la síntesis se agregaron 224 μL de FITC $7,7 \times 10^{-6}$ M en PBS a 3 mL de CaPLiLX, se agitó la mezcla resultante por 2 horas cubriendo el recipiente de la mezcla con papel aluminio a temperatura ambiente; finalmente se sometió a diálisis durante 12h.

Los nanovehículos modificados superficialmente se nombraron como VC-CaPLiLX, FB-CaPLiLX y FITC-CaPLiLX, para violeta de cresilo, fucsina básica y fluoresceína isotiocianato, respectivamente. Estas muestras fueron caracterizadas mediante medidas de su diámetro hidrodinámico, movilidad electroforética y espectroscopías de absorción UV-vis, fluorescencia y ATR-FTIR.

2.4. Cuantificación de lípidos.

Con el objetivo de cuantificar la cantidad de fosfolípidos que efectivamente conforman a los liposomas, se desarrolló el ensayo de Stewart para la determinación de lípidos a partir de la formación de un complejo con una sal de ferrocianato de amonio [86], el cual absorbe a 488 nm. Para ello, se elaboró una curva de calibración con concentraciones entre 0,01-0,1 mg/mL de DOPA en cloroformo. Luego, se sintetizaron liposomas (LiLX) por sonicación utilizando 4,6 mg de DOPA (1mg/ mL), 230 μL de LX 2×10^{-3} M y 4,370 mL de agua, como se describió anteriormente. Por último, se dejó dializar toda la noche contra agua ultrapura. Posteriormente se procedió a destruir los liposomas y liberar los lípidos antes de las mediciones en el UV-Vis.

Para las medidas de absorbancia, se tomaron 2 mL de muestras de LiLX diluidas al 10% (0,1mg/mL DOPA inicial) y de liposomas sin diluir; cada una se mezcló con 2 mL de etanol absoluto y se dejó evaporar el solvente a 80°C, luego se agregaron 2 mL de cloroformo y 2 mL de solución de sal de ferrocianato, la cual se preparó mezclando 1,352 g de FeCl_3

y 1,52 g de NH_4SCN en 50 mL de agua. Finalmente, se agitaron las muestras durante 1 minuto y se dejaron separar las fases 10 minutos antes de medir. Se extrajo la fase orgánica de CH_3Cl y se determinó su absorbancia. La concentración de DOPA en LiLX determinada se encontró dentro del 70-100% respecto a la inicial, lo que indica una alta eficiencia del fosfolípido en la formación de vesículas.

2.5. Determinación de alendronato por UV-Vis.

Debido a que el alendronato no posee ningún cromóforo en su estructura, su determinación por métodos espectrofotométricos ordinarios no es posible. Algunos métodos sugeridos en la literatura para dicha determinación incluyen la cromatografía líquida con diferentes modos de detección, la electroforesis capilar, la oxidación con sulfato de cerio (IV), la espectrofotometría a través de formación de complejos y la derivatización de su grupo amino primario libre, entre otros [87]. En esta tesis, se hizo reaccionar el grupo amino del AD con el 2,4-dinitrofluorobenceno (DNFB, reactivo de Sanger), dando como resultado un producto coloreado estable que permite seguir la concentración de alendronato de forma indirecta. El DNFB reacciona mediante una reacción de sustitución aromática nucleofílica con el grupo amino alifático primario de AD en medio acuoso alcalino. La reacción es muy lenta a temperatura ambiente y requiere calentamiento para acelerarla. Se genera un producto de color amarillo con un máximo de absorción reportado en 378 nm [87]. En la Figura 19 se observan las estructuras del AD y el DNFB y la reacción propuesta [87].

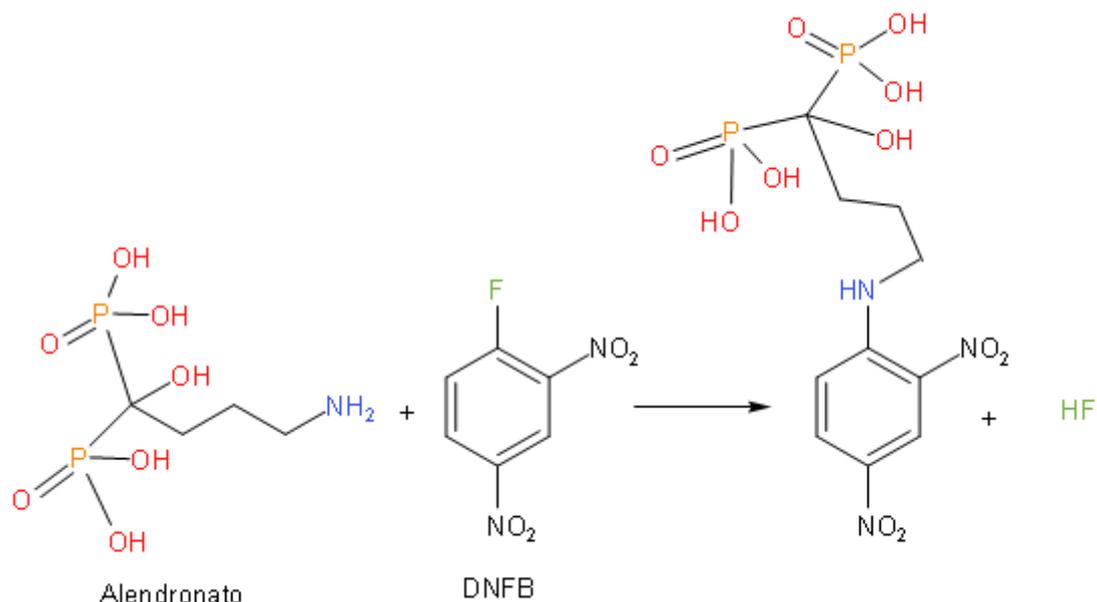


Figura 19. Reacción de derivatización de alendronato con DNFB.

Inicialmente se construyó una curva de calibración de absorbancia del complejo en función de la concentración de AD. Para ello, en matraces de 5 mL conteniendo alícuotas de 250, 500, 750, 1000, 1250 y 1500 μL de una solución acuosa de AD (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se agregaron 0,5 mL de buffer borato 0,2M (pH=10,50) y 0,6 mL de DNFB en metanol al 0,3% v/v. La mezcla se agitó y se llevó a un baño térmico a 60°C por 15 minutos. Pasado el tiempo, la reacción se detuvo sumergiendo los matraces en agua fría. Seguidamente se añadieron 0,1 mL de HCl 37% p/p, se completó con agua hasta el aforo del matraz y se midió la absorbancia de cada muestra. El máximo de absorción reportado es 378 nm [87]. Para determinar la concentración de AD en los nanovehículos, se realizó el mismo procedimiento descrito tomando alícuotas de 100 μL de LiAD. Dado el calentamiento y el uso de ácido concentrado, se asume que los nanovehículos se destruyen y el AD que reacciona con DNFB es el que estaba contenido en los LiAD.

2.6. Eficiencia de encapsulación de antibióticos.

La eficiencia de encapsulación de LX y CX (%EE) en los liposomas se determinó a partir de la relación de áreas bajo la curva del espectro de fluorescencia de cada antibiótico en mezclas con DOPA justo después de la síntesis de liposomas (C_{ini}) y después de dializar en agua ultrapura durante 24h (C_{lipo}), siendo $\%EE = 100 * C_{lipo} / C_{ini}$. La emisión del antibiótico en C_{lipo} corresponde a la suspensión de LiLX o LiCX dentro de la bolsa de diálisis, es decir, la que permanece en los nanovehículos. Para ello la excitación de los antibióticos se realizó a 330 y 275 nm para LX y CX, respectivamente. Este cálculo presupone que la intensidad de fluorescencia es proporcional a la concentración de antibiótico y que esta no se ve modificada al encapsular el antibiótico en el liposoma. La estrategia utilizada para la determinación de la eficiencia de encapsulación minimiza los efectos de la dispersión de la luz y el apagamiento (*quenching*) de la fluorescencia debido a la presencia de liposomas. Dado que no se realizó ninguna otra corrección, el %EE obtenido es un valor límite inferior.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Elección del método de síntesis de liposomas.

Para determinar el método de síntesis de liposomas más conveniente, se evaluaron muestras de LiLX sintetizadas por extrusión, inyección etanólica y sonicación usando un sonicador de punta. La primera técnica de caracterización utilizada fue la microscopía TEM, con la cual se espera analizar la morfología, tamaño, espesor de la capa de fosfato de calcio y posibles deformaciones de los nanovehículos. Las imágenes obtenidas para liposomas sin recubrir (LiLX) y recubiertos (CaPLiLX) se muestran en la Figura 20.

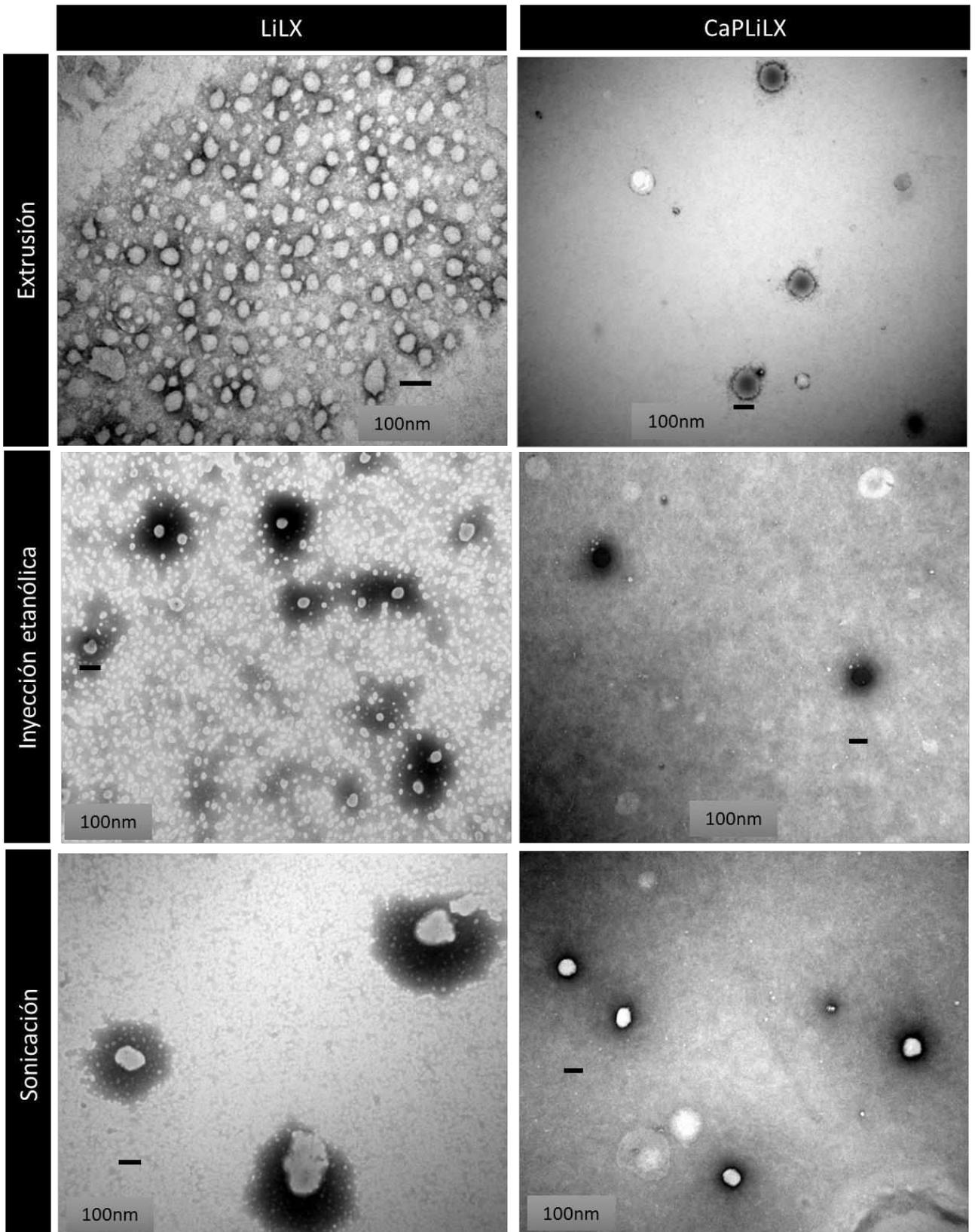


Figura 20. Imágenes TEM de liposomas sin recubrir (lado izquierdo) y recubiertos, sintetizados por cada método. Las barras representan 100nm.

Se puede observar la formación de vesículas esféricas atribuibles a liposomas con LX encapsulado por los tres métodos, con tamaños similares. Los liposomas extruídos tienen un tamaño y forma aparentemente homogénea, lo cual es esperable por el tamaño de poro de la membrana utilizada para su síntesis. La imagen de LiLX por inyección etanólica evidencia una porosidad en la membrana de colodión de la grilla soporte, lo cual está relacionado con que el solvente es etanol y afecta su integridad, siendo los liposomas los que están teñidos con el ácido fosfotúngstico, reconocibles por el halo negro. Por su parte, los liposomas sintetizados con el sonicador de punta tienen una forma menos regular. En cuanto a los liposomas recubiertos con fosfato de calcio (lado derecho), es reconocible el efecto de la cobertura en la separación y forma de las nanopartículas, además de la mejora en el contraste de las imágenes, atribuible a la presencia de los elementos que forman la cobertura de fosfato de calcio.

Las eficiencias de encapsulación de LX para las tres formas investigadas de generar los liposomas, determinada como se describió en la sección 2.6 del presente capítulo, se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Eficiencia de encapsulación de LX por distintos métodos de síntesis.

Método de síntesis	% Eficiencia de encapsulación
Extrusión	11,5
Inyección etanólica	17,7
Sonicación	56,5

Es conocido de la literatura [88], que las eficiencias de encapsulación de fármacos solubles en agua, como la levofloxacina (solubilidad en agua de 10-33,3 g/L), están limitadas por el volumen del núcleo acuoso de los liposomas, ya que en su mayoría, los fármacos están atrapados en las cavidades acuosas. Por otro lado, la capacidad de interacción del fármaco con los lípidos también puede condicionar su incorporación. Por

ejemplo, por el método de inyección etanólica, dónde la interacción lipido-fármaco podría ser importante en la incorporación, se han reportado eficiencias de encapsulación bajas para agentes quimioterapéuticos acuosos, tal es el caso de la citarabina que presenta una eficiencia de incorporación del 16% por este método [89]. En este trabajo, la eficiencia de incorporación de LX por inyección está en ese orden de magnitud (17%). Es interesante notar que, mediante extrusión se obtuvo la carga más baja de antibiótico, lo cual está relacionado con el carácter hidrófilo de LX y con el estrés mecánico que sufre la vesícula en su formación, que facilita la salida de LX. En cuanto a las nanopartículas sintetizadas por sonicación, se obtuvo una eficiencia mínima de encapsulación de LX del 56,5% para concentraciones iniciales de LX de 100 μ M, del orden informado para la encapsulación de LX en partículas lipídicas de miristato de miristilo nanoestructuradas empleando métodos de sonicación [90], y para la obtenida en liposomas de lecitina de soja y colesterol sintetizados por los llamados métodos de carga remota, es decir, donde se introducen las moléculas cargo luego de la formación de las vesículas [91].

Las medidas anteriores demuestran la formación de los liposomas y la efectiva encapsulación de la levofloxacin, además de confirmar que, independientemente del método de síntesis, las vesículas permiten el recubrimiento con fosfato de calcio; sin embargo, es posible destacar algunas características importantes en el procedimiento experimental requerido por cada método.

La extrusión permite la obtención de liposomas de tamaño relativamente uniforme porque se obliga a las vesículas a tomar la forma de poro de la membrana que atraviesan; sin embargo, la cantidad de antibiótico encapsulado y el rendimiento del método son limitados, ya que sólo se puede sintetizar 1mL por lote (capacidad de la jeringa); además, se requiere hacer atravesar la suspensión liposomal una y otra vez por los filtros de 100nm de diámetro de poro. Por su parte, la inyección etanólica permite la obtención de mayores volúmenes de suspensión liposomal, mayor carga de droga y es

un método escalable; no obstante, la solubilidad del DOPA en etanol es baja y requiere de calentamiento y mezclas adicionales para su adecuada dispersión.

En cuanto a la síntesis con el sonicador de punta, se obtuvo la eficiencia de encapsulación más alta. La síntesis es sencilla, rápida, utilizando solo medio acuoso y permite la producción de mayores volúmenes de Li. Se tiene en cuenta que las moléculas a encapsular deben tener un tamaño inferior a 40.000 Da [92], por lo que la encapsulación de LX (370,38 Da) y CX (331,34 Da) en liposomas de DOPA sintetizados por sonicación con sonda es óptima. Dentro de las precauciones importantes que deben tenerse en cuenta para la formación y estabilidad de los liposomas, resulta necesario sonicar a una temperatura superior a la temperatura de transición del lípido utilizado, ya que sonicar por debajo de la T_c produce estructuras con defectos en la bicapa, lo cual conlleva a una rápida permeación de iones y, cuando se lleva a una temperatura superior a la T_c , a la fusión de las vesículas [92]. También conviene mantener los liposomas en atmósfera inerte para prevenir la oxidación, y centrifugar la suspensión para eliminar los agregados de lípidos más grandes y las partículas metálicas que se pueden desprender de la sonda. No obstante, la sonicación por punta podría incorporar pequeñas cantidades de metales disueltos a la muestra.

Teniendo en cuenta que el objetivo de sintetizar liposomas en esta tesis es garantizar la encapsulación de distintas moléculas y que puedan servir como plantillas para el recubrimiento con fosfato de calcio, se elige la síntesis por sonicación como método para la continuación de los experimentos, ya que cumple con los requisitos mencionados y es una técnica atractiva por su practicidad, capacidad de encapsulación y cantidad de suspensión obtenida en cada lote.

3.2. Encapsulación y localización de drogas dentro del liposoma.

3.2.1. Levofloxacin.

La concentración de antibiótico utilizada para incorporar en los nanovehículos se eligió teniendo en cuenta dos razones prácticas. Por un lado, la concentración plasmática médicamente relevante y no tóxica a algunas células es del orden inferior a los 30 mg/L [93]. Considerando una eficiencia de incorporación cercana al 55% por el método de sonicación, si se parte de soluciones de LX de 300 mg/L, se obtendrían concentraciones del orden de los 150 mg/L de LX dentro de los liposomas, una cantidad razonable para investigar la liberación controlada del fármaco. Por otro lado, dado que la detección de LX se seguirá por la absorbancia del fármaco a 330 nm, resulta práctico y sencillo experimentalmente, utilizar intervalos de concentración que mantengan la linealidad con la absorbancia. La Figura 21 muestra la linealidad de la curva de calibración de la absorbancia vs concentración de LX medida en celdas de Cuarzo de 1 cm de camino óptico. Teniendo en cuenta el rango de linealidad y la discusión previa, se eligió una concentración de 360 mg/L (equivalente a 100 μ M) como concentración de LX de partida para la carga de los liposomas.

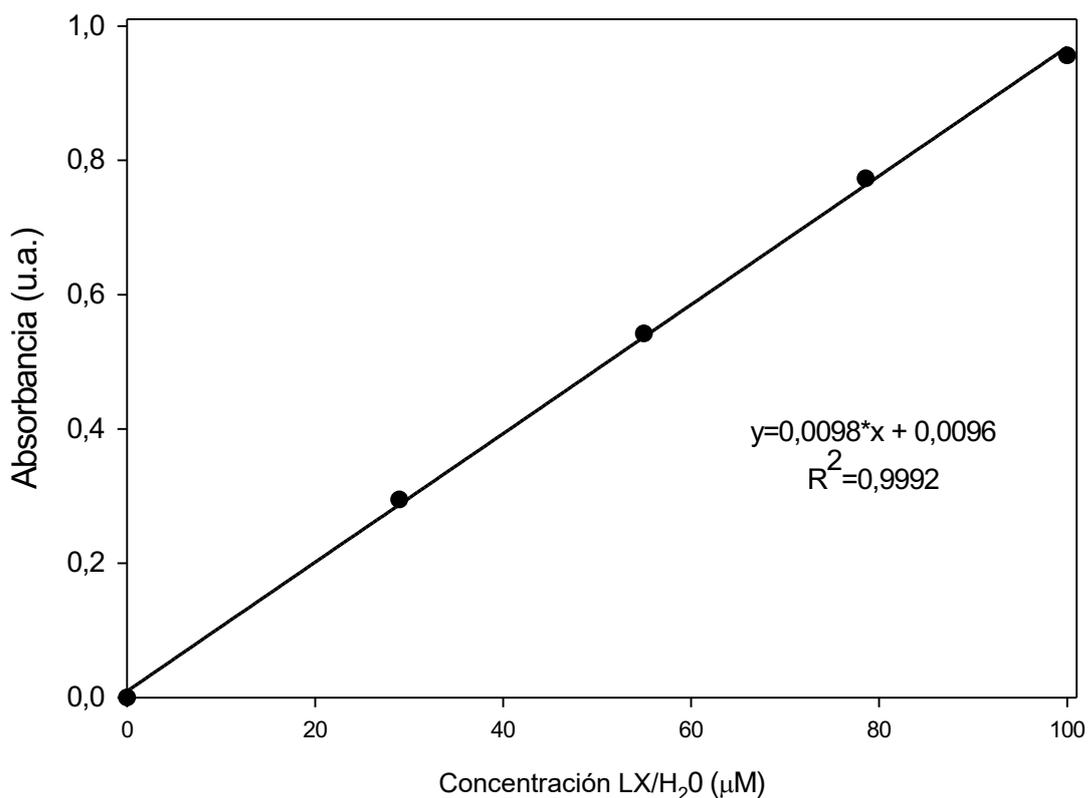


Figura 21. Curva de calibración por absorbancia para LX/H₂O a 330nm.

La efectividad de la diálisis como método de remoción de la droga no encapsulada se comprobó en un experimento en el que se dializó una solución de LX 100µM, la misma concentración usada para la carga del antibiótico en los LiLX. Como se ve en Figura 22-A, el antibiótico atraviesa la membrana casi por completo luego de 24h de diálisis, mientras que en la Figura 22-B se observa la retención dentro de la bolsa de diálisis cuando el LX se encuentra atrapado en el liposoma. Como se mostró en la Tabla 1, la eficiencia de encapsulación de LX determinada para liposomas sonicados fue de 56,5%, lo que se traduce en una concentración mínima aproximada de $5,6 \times 10^{-5}$ M en 1 mL de suspensión de LiLX y de 9×10^{-6} M en 1 mL de suspensión de CaPLiLX, debido a la dilución 1:5 que se realiza durante el proceso de recubrimiento.

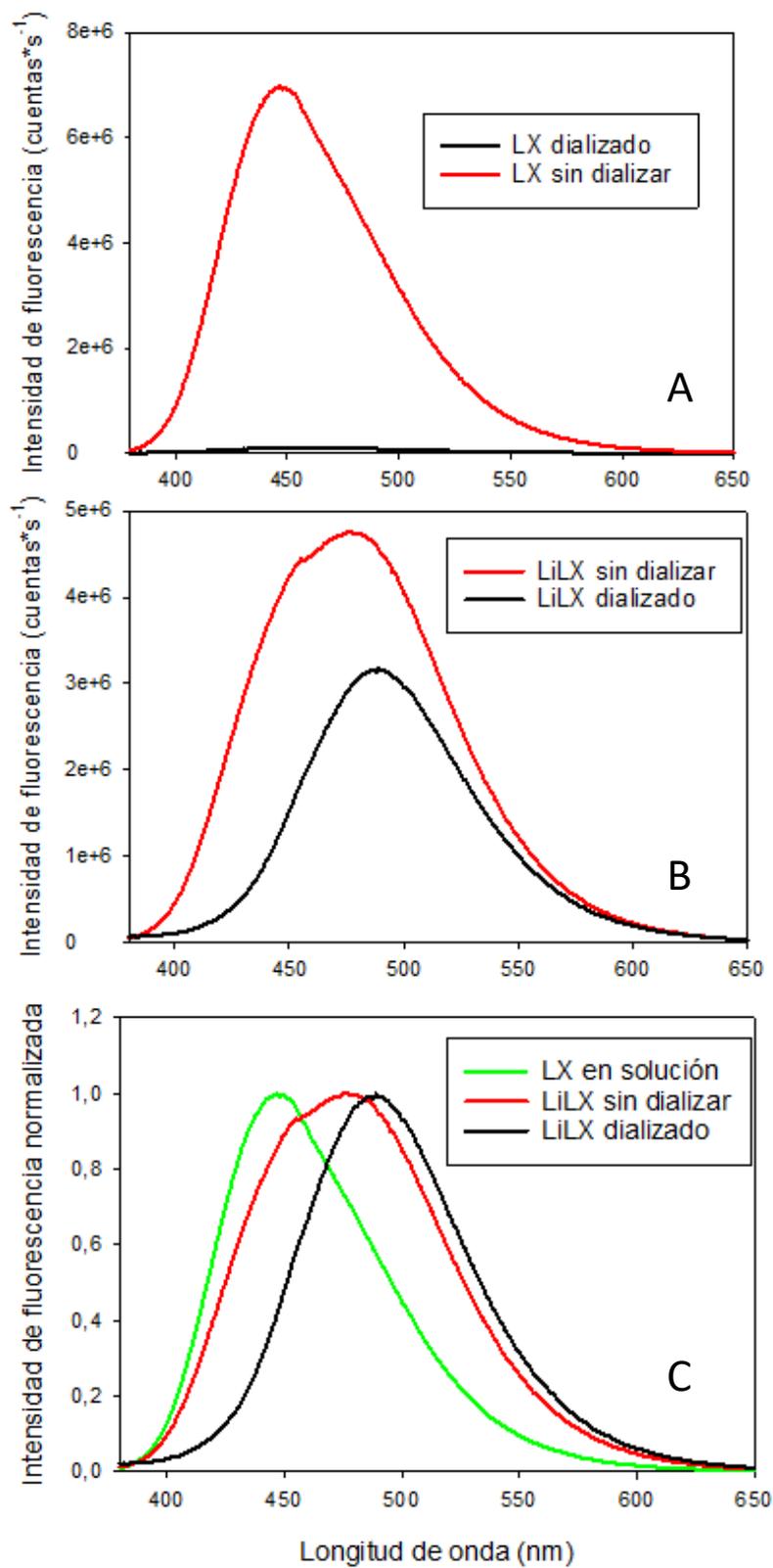


Figura 22. Espectros de emisión de fluorescencia de LX y efecto de la diálisis: (A) LX en H₂O 100 μM, (B) LiLX y (C) espectros normalizados, pH=6,0-7,0. λ exc= 330 nm.

La fotoluminiscencia de una molécula es sensible al entorno en el cual se encuentre la misma, por ello, se graficaron los espectros normalizados en la Figura 22-C, es decir, llevando todos los espectros a la misma escala al dividir cada uno por su máximo de emisión. Esto facilita la comparación. La diferencia en la posición de los máximos de emisión y el ancho de los espectros de emisión de LX cuando se encuentra libre en solución o luego de ser encapsulado, es un indicio de que efectivamente existe una encapsulación de LX o que el mismo se encuentra interaccionando con el liposoma. Más aún, el espectro de emisión de LX obtenido a partir de suspensiones acuosas de CaPLiLX tras una excitación de 340 nm (ver Figura 23), es muy amplio y también sugiere la localización de LX en diferentes entornos del nanovehículo.

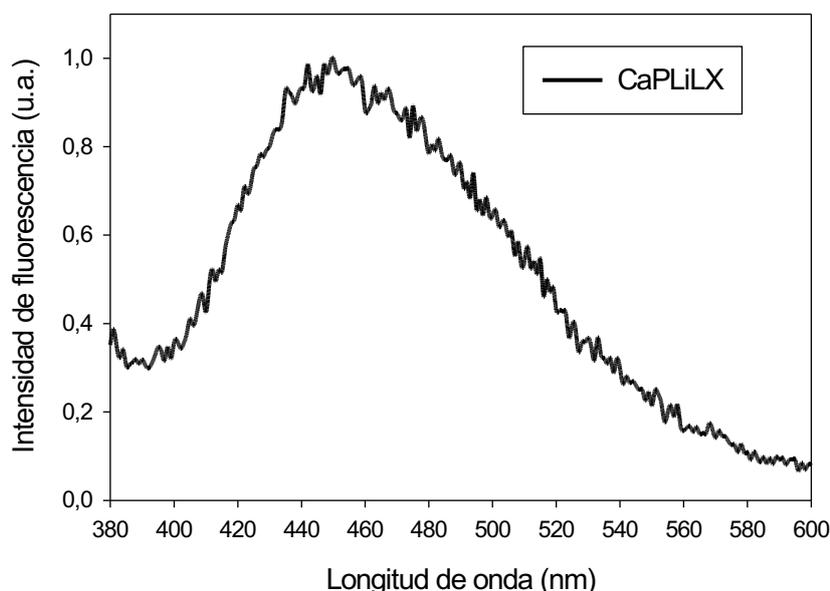


Figura 23. Espectro de emisión de CaPLiLX con LX $9 \times 10^{-6} M$ normalizado, pH=6,0-6,5.

Para confirmar la hipótesis de que el antibiótico se aloja en distintos entornos y comprender el efecto del medio sobre la fotoluminiscencia, se realizaron medidas de fluorescencia resuelta en el tiempo (TRES) tanto a las muestras de CaPLiLX como a soluciones de LX $6 \mu M$ (similar a la concentración esperada en CaPLiLX) preparadas en distintos medios que pudieran reproducir el espectro obtenido experimentalmente (Figura 23). Para ello, se diluyó LX en soluciones acuosas amortiguadoras a pH 4,0 (buffer

acetato) y 7,4 (PBS), y también de LX en hexano para asemejar el entorno no polar de la bicapa lipídica. La Figura 24 muestra los equilibrios ácido-base de la levofloxacin que ilustran los cambios en función del pH. Para preparar estas soluciones de referencia, se utilizó una menor concentración del antibiótico, buscando evitar la saturación del detector del equipo y el efecto de filtro interno en la fotoluminiscencia. Esto se logró controlando que la absorbancia de las soluciones evaluadas fuera menor a 0,05.

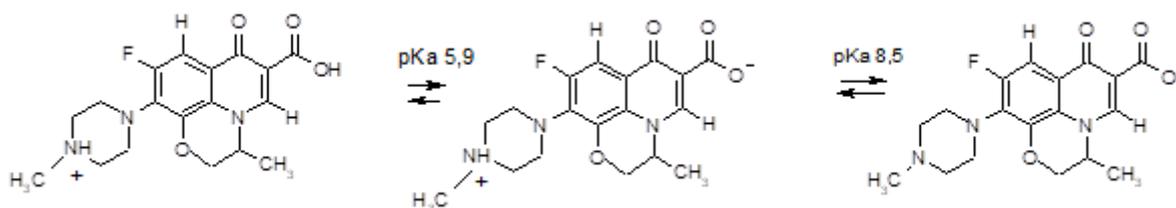


Figura 24. Equilibrios ácido-base de la levofloxacin.

El experimento consistió en irradiar las muestras de CaPLiLX con un NanoLED de 341nm y realizar un análisis TRES para obtener los máximos de emisión y tiempos de vida de fluorescencia de las posibles especies presentes de LX. El análisis TRES sugirió la contribución de tres especies emisoras bien diferenciados denominados E1, E2 y E3, cuyos máximos de emisión y tiempos de vida de fluorescencia se listan en la Tabla 2. Se calculó también la contribución C_i de cada especie a la emisión global, ajustando la ecuación $I_{\lambda}(t) = I_0 \sum_{i=1}^N C_{i,\lambda} \exp_i^{(-t/\tau_i)}$ a un modelo multiexponencial hasta obtener valores de χ^2 y residuos mínimos. De igual manera, se muestran los parámetros obtenidos por TRES para las soluciones de LX a pH 4,0, 7,4 y en hexano, que también fueron irradiadas con un NanoLED de 341nm.

Tabla 2. Parámetros determinados por TRES para CaPLiLX y comparación con la emisión de soluciones de LX en distintos medios.

Especie emisora	Máximo de emisión (nm)	Tiempo de vida τ (ns)	Contribución a τ (%)	Solución	Máximo de emisión (nm)	Tiempo de vida τ (ns)
E1	430	$1,7 \pm 0,1$	16	LX en hexano	425	$1,4 \pm 0,1$
E2	455	$6,5 \pm 0,1$	60	LX a pH 7,4	460	$6,2 \pm 0,1$
E3	495	$10,8 \pm 0,1$	24	LX a pH 4,0	500	$7,8 \pm 0,1$

Como se puede observar, el espectro de emisión de E1 y el tiempo de decaimiento son similares a los observados en un medio no polar como el hexano ($\tau_{hexano} = (1,4 \pm 0,1)$ ns y $\lambda_{max}^{em} = 425$ nm), en línea con el hecho de que el hexano puede asemejarse al entorno de baja polaridad de la bicapa del DOPA. El máximo de emisión de E2 y el tiempo de vida correspondiente están en excelente acuerdo con los de la solución acuosa de LX a pH 7,4 que muestra un máximo de emisión a 460 nm con un tiempo de decaimiento $\tau_{pH 7,4}$ de $(6,2 \pm 0,1)$ ns bajo excitación 341 nm. El tercer componente, E3, con un máximo de emisión a 495 nm puede atribuirse a la molécula de levofloxacin protonada LXH⁺ [94], coincidiendo con el espectro de LX en medio ácido ($\lambda_{max}^{em} = 500$ nm). Además, el tiempo de vida de E3 resulta mayor a 8 ns, en buen acuerdo con el tiempo obtenido para LX a pH 4. Cabe resaltar que la mayor contribución corresponde a la especie emisora E2 (60%), sugiriendo una ubicación preferencial del antibiótico en el núcleo acuoso del nanosistema.

Por otro lado, no se puede descartar la adsorción física del antibiótico en la interfase de fosfato de calcio que recubre al liposoma, mediada por la presencia de iones alcalinotérreos, como se ha visto en la superficie de polvos de CaP [95]. De hecho, teniendo en cuenta los grupos funcionales que se encuentran en el núcleo de las

quinolonas (un ácido carboxílico en la posición 3, un anillo piperazinilo básico en la posición 7, en la mayoría de los casos, y un átomo de oxígeno carbonílico en la posición 4), se pueden unir a iones metálicos formando complejos en los que pueden actuar como ligando bidentado, unidentado y como ligando puente, respectivamente. La Figura 25 ilustra la formación de complejos entre un ion metálico divalente y dos moléculas de quinolona.

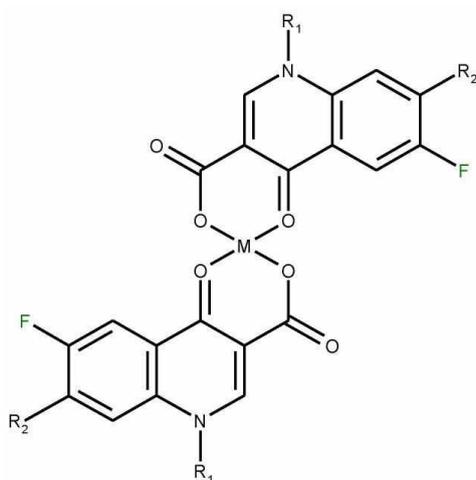


Figura 25. Estructura general de quelatos de quinolona 1:2 (metal:ligando) con cationes divalentes.
Tomado de [96].

La interacción con iones metálicos tiene consecuencias importantes para la solubilidad, farmacocinética y biodisponibilidad de las quinolonas, y también está implicada en el mecanismo de acción de estos agentes bactericidas [97]. Además, puede haber un efecto sobre las propiedades fotofísicas, de acuerdo con lo observado en los resultados del TRES, ya que la especie emisora E3, asociada con un estado de LX protonado a pH 4, puede tener también una contribución de los complejos formados entre la levofloxacin y los iones Ca^{2+} de la cobertura de fosfato de calcio. En otras palabras, puede haber una interacción entre grupos -COO^- e iones Ca^{2+} , similar a la que hay entre COO^- y H^+ , dando lugar al mismo tipo de desplazamiento en la fluorescencia, lo cual explicaría la diferencia entre el tiempo de vida de la especie E3 en CaPLiLX (10,8 ns) y LX a pH 4 (7,8 ns).

La Figura 26 reúne los espectros de emisión obtenidos por el análisis TRES, E1, E2 y E3; así como los espectros de LX en los distintos entornos, bajo una excitación a 341nm, facilitando la comparación y evidenciando una buena correlación de los resultados listados en la Tabla 2.

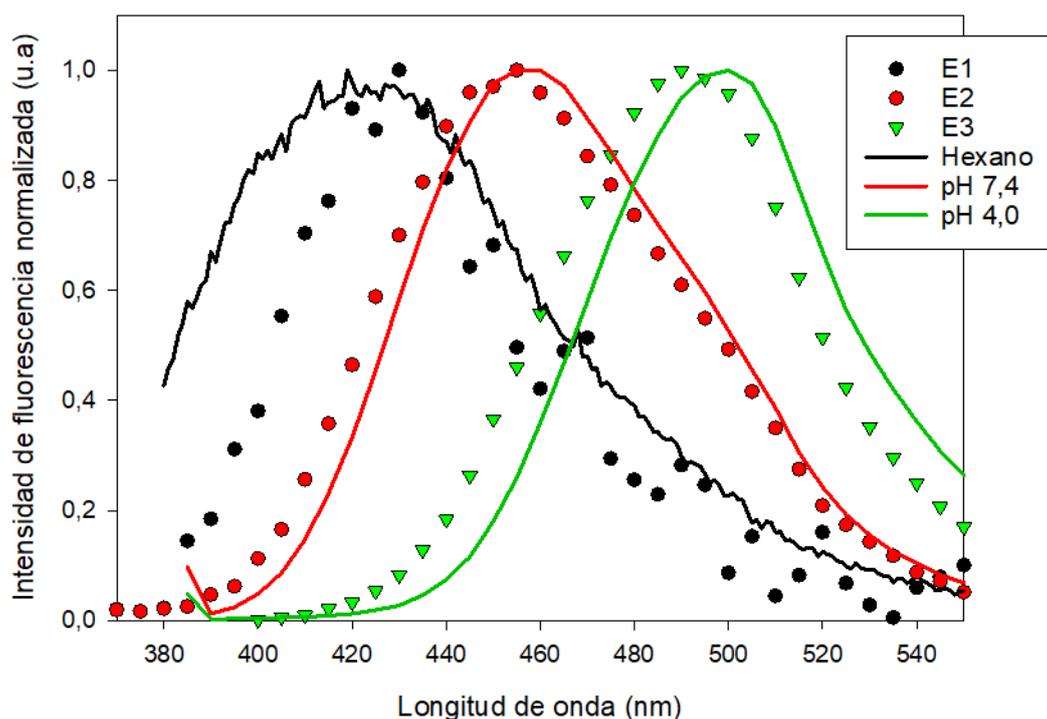


Figura 26. Espectros de emisión de LX 6 μ M en distintos solventes (líneas continuas) y de las especies emisoras determinadas por TRES (puntos). $\lambda_{exc}=341$ nm.

Finalmente, la Figura 27 muestra el espectro obtenido por la combinación lineal de los espectros de LX a pH 4, a pH 7,4 y en hexano, de forma de reproducir el espectro experimental de CaPLiLX obtenido. Esto se logra combinando un 77% del espectro de LX a pH 7,4, un 18,5% del espectro de LX a pH 4,0 y un 4,5% del espectro de LX en hexano. Como se ve en la Tabla 2, aunque los valores de contribución obtenidos de la simple combinación lineal de los espectros no coinciden exactamente con las contribuciones de las especies E1, E2 y E3, obtenidos mediante la técnica resuelta en el tiempo TRES, ambos resultados dan cuenta del aporte de los diferentes entornos a la emisión global de LX, y de una contribución mayoritaria cuando el fluoróforo se encuentra en un medio acuoso de pH cercano a la neutralidad. Lo anterior permite concluir que el antibiótico se

distribuye tanto en los compartimientos acuosos del liposoma y su superficie, como en la bicapa lipídica de naturaleza hidrofóbica.

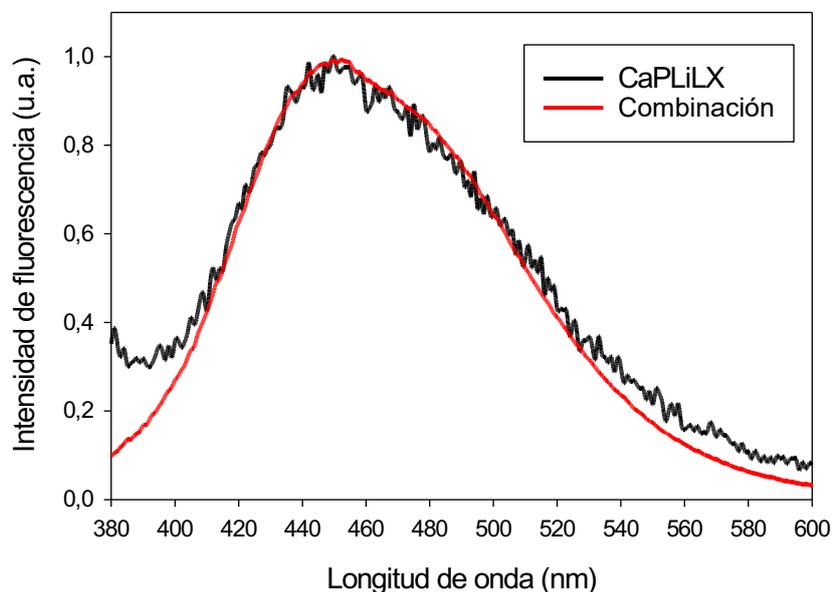


Figura 27. Espectro de emisión de CaPLiLX $9 \times 10^{-6} M$ pH=6,0-6,5; y Combinación de espectros de LX a pH 4,0, 7,4 y en hexano.

Para finalizar con el estudio de la fotoluminiscencia del antibiótico levofloxacin y su distribución en los entornos liposomales, se realizaron experimentos de anisotropía resueltos en el tiempo de suspensiones acuosas a pH 7,4 de LX y LiLX $100 \mu M$ bajo excitación con NanoLED a 341 nm. Esta técnica permite obtener información tanto de los entornos como de los impedimentos estéricos y de rotación que puede tener el fluoróforo, en función de su respuesta a la excitación con luz polarizada. A medida que el fluoróforo rota, cambia la polarización y se obtiene información sobre si el LX está difundiendo libremente en el solvente, o si está encapsulado o interaccionando con la vesícula, caso en el cual su movimiento rotacional se vería limitado. Cabe mencionar que, debido a la alta dispersión de la luz en ensayos con CaPLiLX y a la baja intensidad de la luz cuando la misma es polarizada en ensayos de anisotropía, no es posible la realización de este análisis con suspensiones de CaPLiLX, y por ello se comparó con la muestra de LiLX.

Los decaimientos anisotrópicos resueltos en el tiempo obtenidos pueden ajustarse bien a un decaimiento monoexponencial para ambas muestras, como se observa en la Figura 28. Se obtuvieron valores de anisotropía fundamental (r_0) de 0,12 y 0,14 para LX y LiLX respectivamente, lo que da cuenta de que hay diferencia entre los momentos de transición de excitación y emisión [98]. El hecho de que ambos valores sean coincidentes dentro del error experimental de la medida, indica que la molécula de LX en muestras de LiLX no ha sido oxidada o descompuesta.

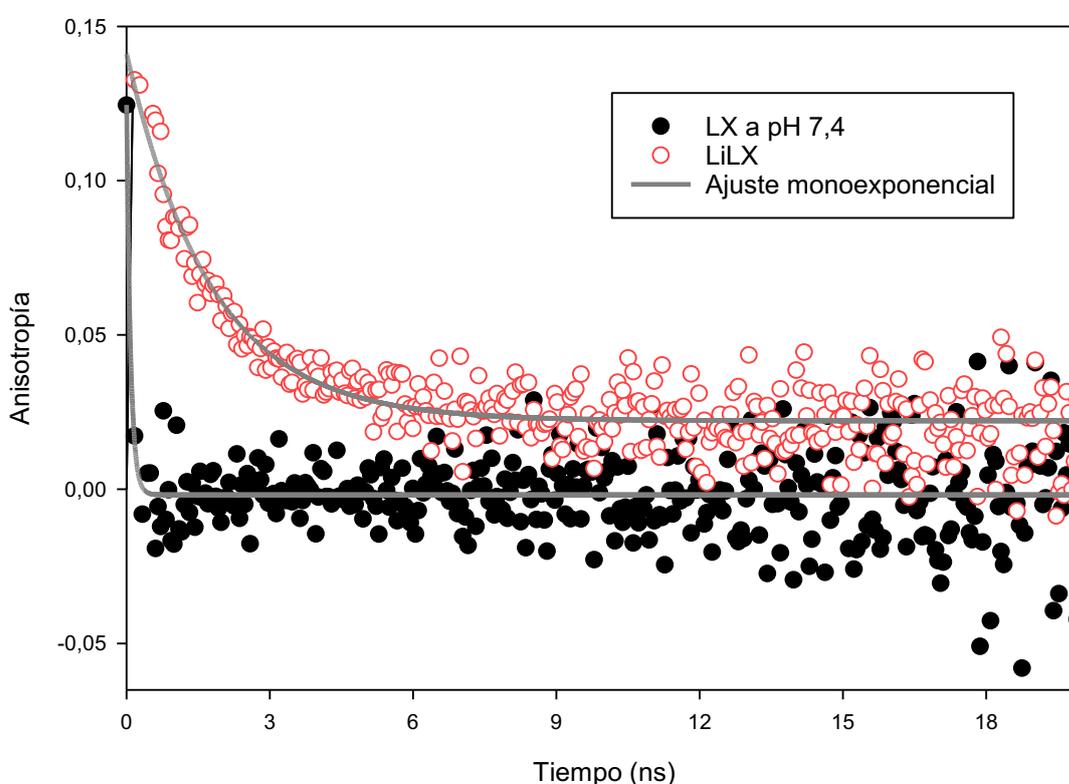


Figura 28. Decaimiento de anisotropía de fluorescencia resuelta en el tiempo de LX en medio acuoso y encapsulado en LiLX 100 μ M a pH 7,40, $\lambda_{exc} = 341$ nm.

Por otro lado, puede observarse una diferencia importante en el decaimiento exponencial de anisotropía. A partir del ajuste de estos decaimientos a la ecuación de Perrin ($r(t) = r_{\infty} + r_0 e^{-t/\theta}$) se obtuvieron los tiempos de correlación rotacional para las muestras, siendo $\theta_{LX} = 0,08 \pm 0,09$ ns y $\theta_{LiLX} = 1,8 \pm 0,5$ ns para LX y LiLX respectivamente, como se resume en la Tabla 3.

Tabla 3. Parámetros obtenidos por anisotropía para LX y LiLX

Muestra	r_0	θ (ns)	r_h (Å)
LX	0,12	$0,08 \pm 0,09$	4,5
LiLX	0,14	$1,8 \pm 0,5$	12,5

Es notable que el tiempo para LX libre es mucho menor que para LiLX, indicando una diferencia en el entorno y movilidad del fluoróforo al estar incluido en los liposomas. Adicionalmente, reemplazando los valores de θ en la ecuación de Stokes-Einstein ($D = kT/6\pi\eta R$) y considerando especies esféricas [99], se estimaron radios hidrodinámicos (r_h) de 4,5 y 12,5 Å para las especies emisoras LX y LiLX, respectivamente. Mientras que el valor obtenido para LX en soluciones acuosas es del orden esperado para moléculas orgánicas pequeñas, el obtenido para LX encapsulado en el liposoma sugiere una restricción de movimiento, en línea con lo reportado para la quinolona norfloxacin en micelas invertidas de dioctilsulfosuccinato (AOT) [100]. Por otro lado, para la quinolona ciprofloxacina se reportó un comportamiento similar con liposomas de L- α -1,2-dipalmitoil-sn-glicerofosfolina, evidenciando que CX interactúa con los liposomas a nivel de superficie y modifica su anisotropía de fluorescencia [101].

En conjunto, los resultados anteriores respaldan la localización de LX dentro del liposoma, con una ubicación preferencial en el núcleo acuoso y cantidades menores ubicadas dentro de la bicapa lipídica; no obstante, no puede descartarse que estén adsorbidas o interaccionando con el recubrimiento de CaP.

3.2.2. Ciprofloxacina.

La ciprofloxacina es una molécula zwitteriónica con punto isoeléctrico en 7,14, por lo que presenta una solubilidad en agua cercana a 0,015 M a pH 5 y del orden de 3×10^{-4} M a pH 7 [102]. Su concentración máxima en plasma es del orden de 1,7 mg/L [103], por lo que la concentración en los liposomas deberá superar este orden de magnitud. Considerando que se determinará la concentración de ciprofloxacina mediante su absorción a 275 nm, se definió el rango de linealidad adecuado usando una celda con camino óptico de 1 cm. Para ello se construyó una curva de calibración por UV-Vis, midiendo la absorbancia en función de la concentración de CX; cabe resaltar que las diluciones se realizaron a partir de una solución acuosa madre de CX $5,67 \times 10^{-4}$ M de pH=2 ajustado con HCl. La Figura 29 muestra la curva obtenida, a partir de la cual se estableció 20 μ M (menor que su solubilidad a pH 7 y cuatro veces más grande que la concentración en plasma) como concentración de referencia para CX dentro de los liposomas.

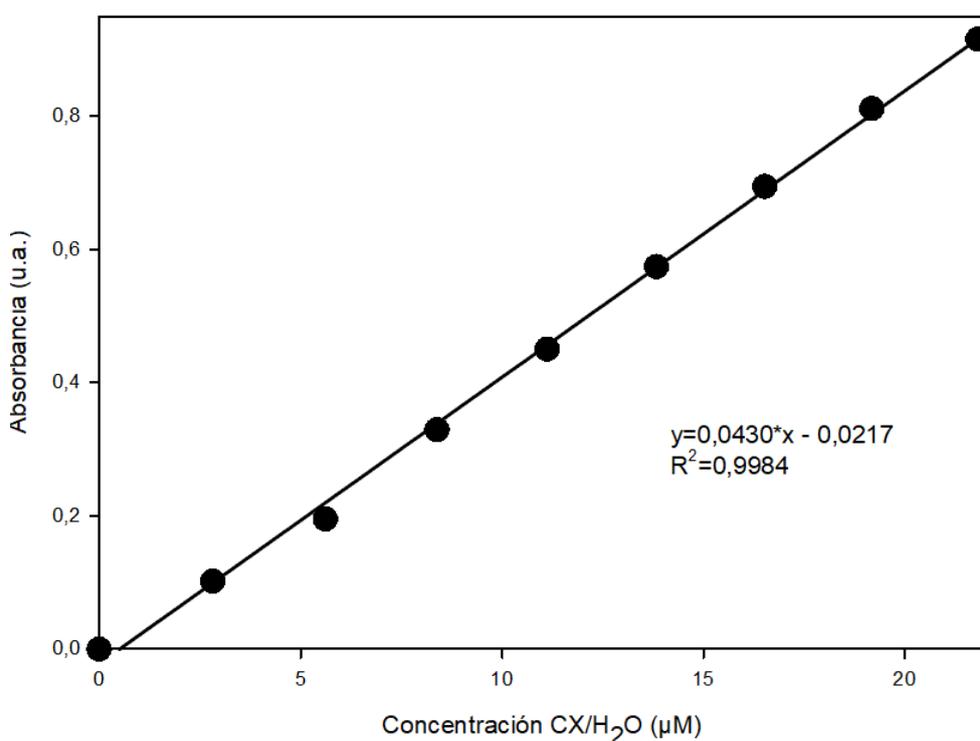


Figura 29. Curva de calibración por absorbancia para CX en H₂O a 275nm.

Luego, se tomaron los espectros de emisión de fluorescencia de diferentes soluciones de LiCX y CX para evaluar la efectiva incorporación y remanencia del antibiótico en los liposomas después de 24h de diálisis. Como se ve en la Figura 30-A, al dializar CX 20 μ M en solución, el antibiótico atraviesa la membrana casi por completo, mientras que la Figura 30-B sugiere la permanencia de CX en la suspensión de liposomas sintetizados.

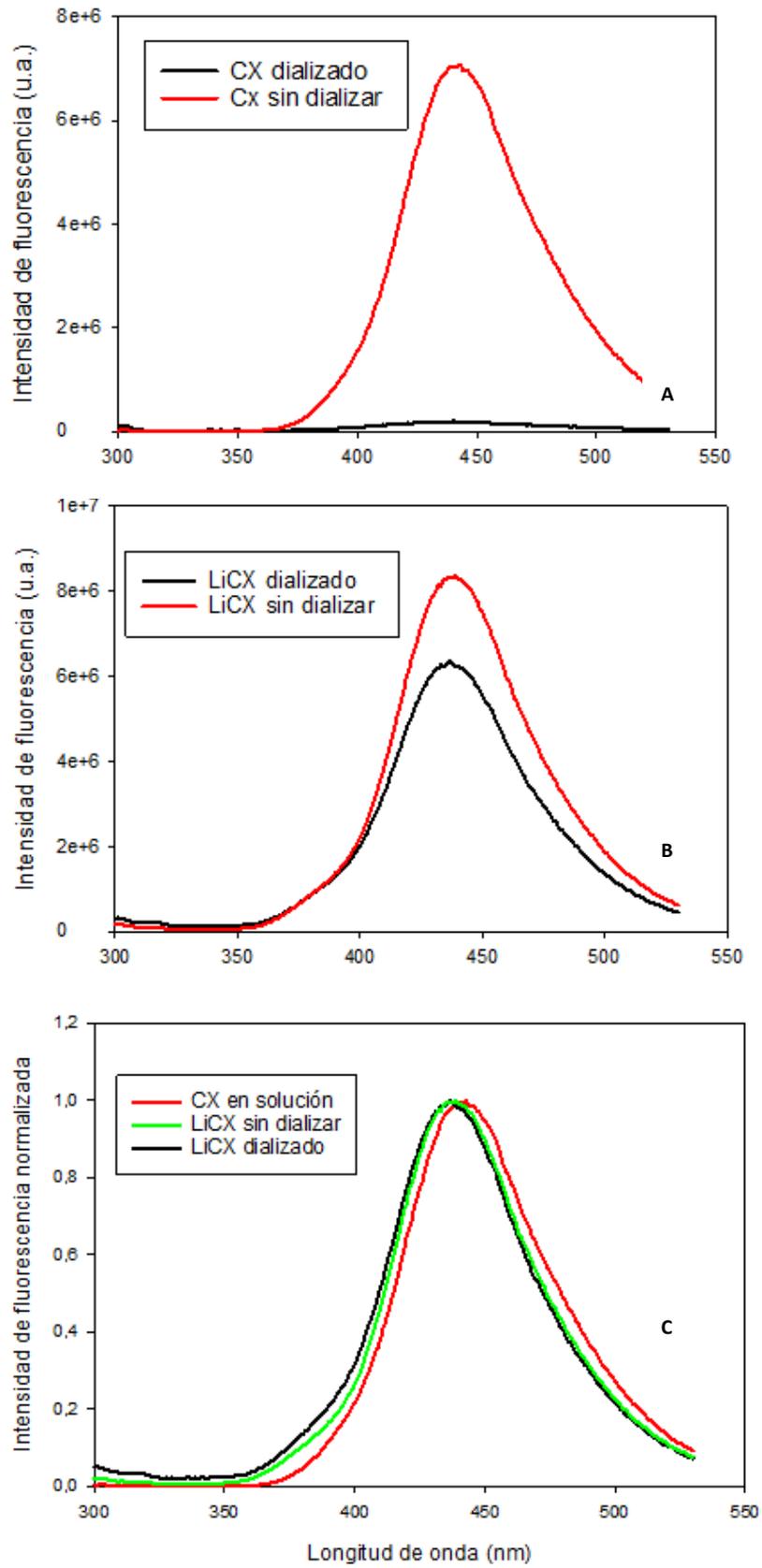


Figura 30. Espectros de emisión de fluorescencia de CX en liposomas y efecto de la diálisis: (A) CX en solución 20 μ M, (B) LiCX 20 μ M y (C) espectros normalizados; pH=4-5. λ_{exc} = 275 nm.

Para cuantificar la cantidad de antibiótico que permanece en los LiCX, se determinó el porcentaje de encapsulación (%EE) calculando la relación de área de los espectros de LiCX dializado en agua ultrapura por 24h (C_{lipo}) y sin dializar (C_{ini}) (ver la Figura 30-B), como describe la Ecuación 8.

$$\%EE = 100 * C_{lipo} / C_{ini} = 100 * (476204767,5 / 606545789,5) = 78,5\%$$

Ecuación 8. Eficiencia de encapsulación de CX.

Se observa que un alto porcentaje del antibiótico quedó retenido en los liposomas, lo cual coincide con resultados obtenidos de una eficacia para atrapamiento de CX en liposomas de hasta 93,96% [46]. Por otro lado, de acuerdo con la Figura 30-C, el máximo de emisión de los espectros de LiCX (437 nm) presenta un corrimiento hacia el azul respecto al máximo de CX en solución (441 nm), indicando una leve modificación del entorno del antibiótico, antes y después de ser incluido en las vesículas. Este corrimiento del máximo también se ha observado cuando el pH del medio se hace más neutro [104], por lo que es probable que haya ocurrido una deprotonación del antibiótico durante la síntesis. Adicionalmente, se tomó el espectro de emisión de los liposomas recubiertos (ver Figura 31) para evaluar el comportamiento del CX en presencia de fosfato de calcio.

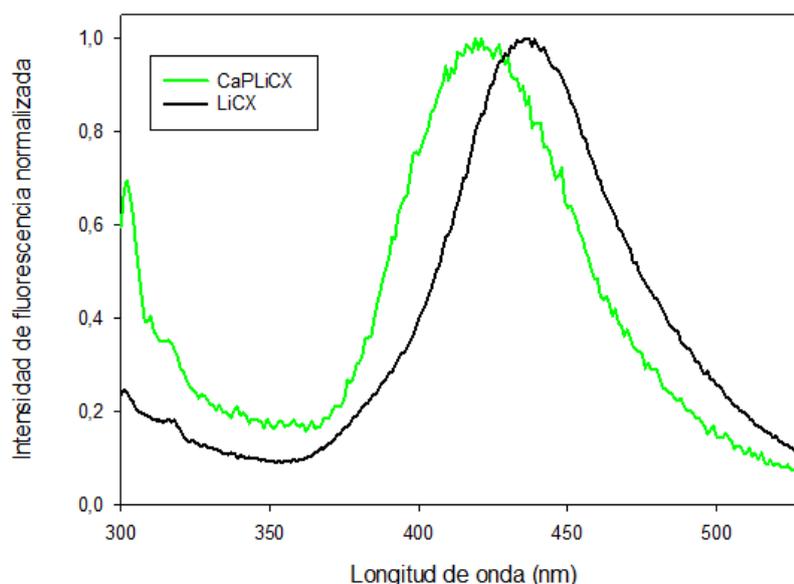


Figura 31. Espectros de emisión de fluorescencia de CX en liposomas recubiertos (CaPLiCX, pH=7,0) y sin recubrir (LiCX pH=4-5). $\lambda_{exc} = 275 \text{ nm}$.

La Figura 31 muestra que el máximo de emisión de CaPLiCX (420 nm) se desplaza hacia el azul respecto a los LiCX (437 nm), mostrando la influencia de la deposición de la capa de CaP sobre el entorno del CX. Debido a que ambos espectros fueron tomados luego de dializar las muestras, se respalda el hecho de que el CX fue efectivamente encapsulado en las formulaciones. No obstante, no puede descartarse la posible interacción de CX con la superficie de los liposomas a través de la coordinación del grupo carboxilo de CX con el calcio superficial. Dada su complejidad, queda pendiente en esta tesis, el estudio de la distribución del antibiótico en los diferentes compartimientos de los nanovehículos, como se evaluó en la sección anterior para la levofloxacin.

3.2.3. Alendronato.

Para la síntesis de liposomas conteniendo el bisfosfonato alendronato (LiAD) se probaron dos metodologías. La primera fue la descrita anteriormente para la encapsulación de LX y CX; en la segunda, se hizo una modificación para incluir un calentamiento previo de la mezcla de DOPA y AD antes de sonicar, ya que se ha informado en la bibliografía una mejora en la inclusión del AD dentro de los liposomas a temperaturas entre 55-60°C [105], [106].

El **método 1** consistió entonces en mezclar en vórtex DOPA (1 mg/mL) y una solución de AD en PBS para una concentración final de alendronato de 0,015 M. Luego se efectuaron cinco ciclos de sonicado de 30s de trabajo y 30s de reposo, se burbujeó con argón por 15min y finalmente se centrifugó por 5min a 12000 rpm. Por su parte, el **método 2** consistió en mezclar DOPA (1mg/mL) y una solución de AD en PBS (0,015 M final) por 30 min a 310 rpm y 60°C. Posteriormente, la mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10min, luego se efectuaron los cinco ciclos de sonicado de 30s de trabajo y 30s de reposo, se burbujeó con argón por 15min y se centrifugó por 5min a 12000 rpm.

Inicialmente se utilizó DLS para dilucidar la formación de los liposomas por cada método. Los resultados evidencian dos poblaciones de liposomas bien diferenciados en su tamaño, tal como se muestra en la Tabla 4. Esto indica la presencia de dos poblaciones bien definidas en la muestra. Los porcentajes entre paréntesis indican cuanto contribuye cada pico a la intensidad total.

Tabla 4. Resultados de DLS para LiAD sintetizados por dos métodos.

Muestra LiAD	Índice de polidispersidad \pm SD Rango 0,05- 0,7	Distribución de tamaño por intensidad \pm SD (nm)	
		Pico 1	Pico 2
Método 1	0,238 \pm 0,006	98 \pm 3 (89,7%)	25 \pm 2 (10,3%)
Método 2	0,253 \pm 0,007	97 \pm 4 (82,6%)	28 \pm 4 (17,4%)

Ambas muestras presentan baja polidispersidad con un máximo de distribución alrededor de 100nm para el 80-90% de la intensidad detectada (valores entre paréntesis). Tamaños similares fueron informados en la bibliografía para liposomas de HSPC (fosfatidilcolina de soja hidrogenada), mPEG-DSPE (metil polietilenglicol 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina) y colesterol, conteniendo alendronato, preparados por el método de inyección de etanol seguido de extrusión, los cuales tuvieron un diámetro medio que oscilaba entre 75-100 nm con valores de PDI \leq 0,10 [106].

Con el objetivo de determinar los porcentajes de encapsulación de alendronato dentro de los liposomas obtenidos por los dos métodos, se utilizaron dos técnicas para medir la concentración de AD, antes y después de diálisis. La primera técnica utilizada fue ^1H NMR, con la que se midió la concentración de AD en muestras de CaPLiAD y se pudo cuantificar el bisfosfonato detectado. La segunda técnica fue la espectroscopía UV-Vis, con la cual se estimó la concentración del alendronato de forma indirecta, ya que se

midió la absorbancia del complejo resultante de la reacción de AD con DNFB, descrita en la Figura 19. En ambos casos, la eficiencia de encapsulación se calculó como %EE = (Concentración final) / (Concentración inicial) *100%.

¹H NMR

Los espectros ¹H NMR que se presentan en la Figura 32 corresponden a muestras de CaPLiAD obtenidas recubriendo los LiAD sintetizados por los métodos 1 y 2. En estas muestras se detectó y se cuantificó el bisfosfonato. Para ello se utilizó una solución de citrato de sodio (C₆H₅O₇Na₃.2 H₂O) 15,9 mM como estándar interno. El procedimiento consistió en mezclar en un eppendorf 500 μL de muestra, 20 μL de D₂O y 20 μL de solución 0,0159 M de citrato de sodio; luego de agitar, la solución se llevó a un tubo de RMN y se tomó el espectro.

Si bien para el citrato de sodio se diferencian los H de acuerdo a su posición cis-trans al grupo -OH del C3, como se muestra en la Figura 32, se tomó la integral de las señales en el rango 2,4-2,6 ppm asociada a los 4 hidrógenos en conjunto de los carbonos 2 y 4. Para el alendronato, se tomaron las señales a 1,87 ppm y 2,94 ppm que aparecen en el espectro del AD en PBS (ver Figura 32), asociadas a los cuatro hidrógenos de los carbonos 2 y 3 y a los dos hidrógenos del carbono 1, respectivamente. El desapantallamiento del grupo NH₂ provoca que la señal del H de C1 se encuentre a desplazamientos mayores que las señales equivalentes de los hidrógenos de C2 y C3. Estas señales están en correspondencia con lo reportado para alendronato sódico [107], [108].

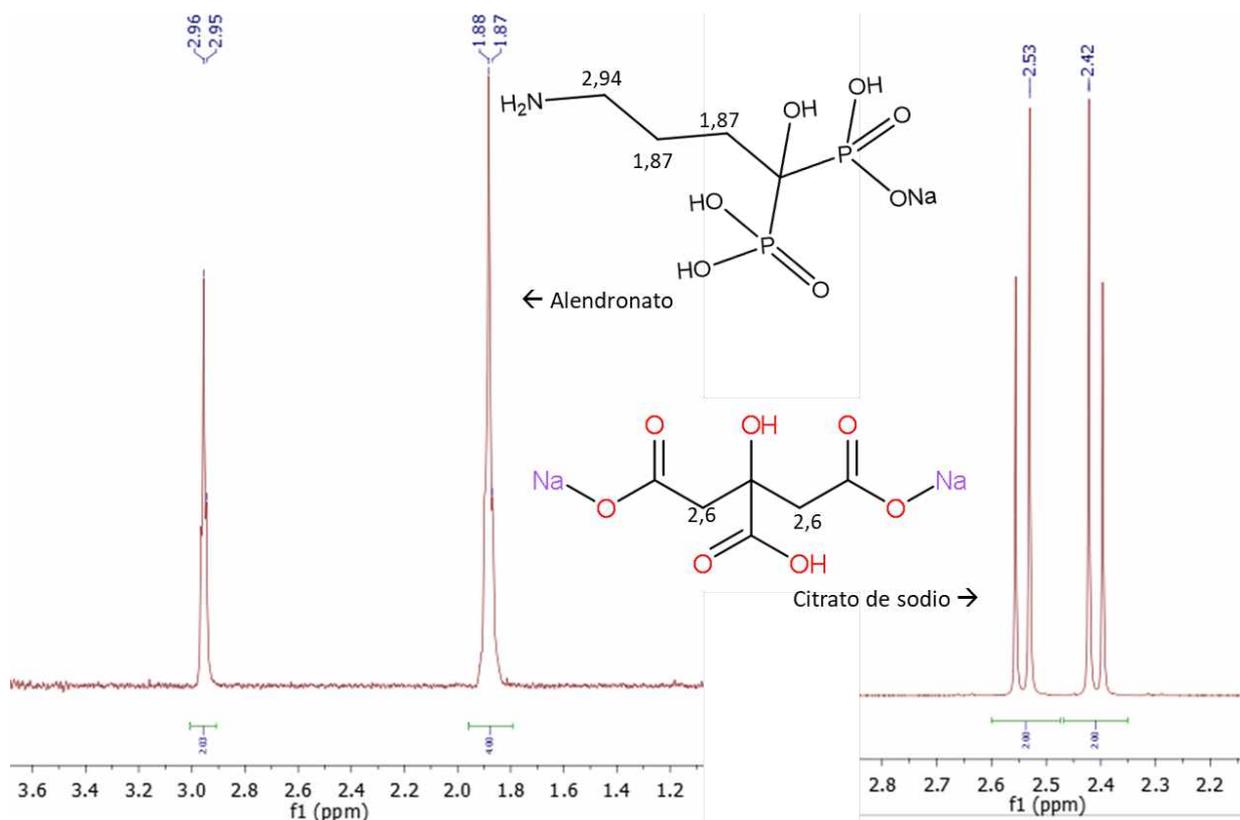


Figura 32. Espectros ¹H RMN de AD en PBS y citrato de sodio. Se muestran sobre las estructuras los desplazamientos correspondientes cuantificados para el AD y el citrato.

Para determinar la concentración de AD en las muestras de CaPLiAD, se tomó un promedio de la concentración calculada para cada desplazamiento químico (1,87 ppm con 4H y 2,94 ppm con 2H). La Figura 33 muestra los espectros de CaPLiAD sintetizados a partir de los LiAD obtenidos por el método 1 y el método 2. En ambos casos aparecen las señales asociadas al bisfosfonato. Las señales alrededor de 2,6 ppm asociadas en la bibliografía a carbonos α y β en moléculas de polietilenglicol derivatizadas con grupos –COOH [84], se asignaron al citrato de sodio.

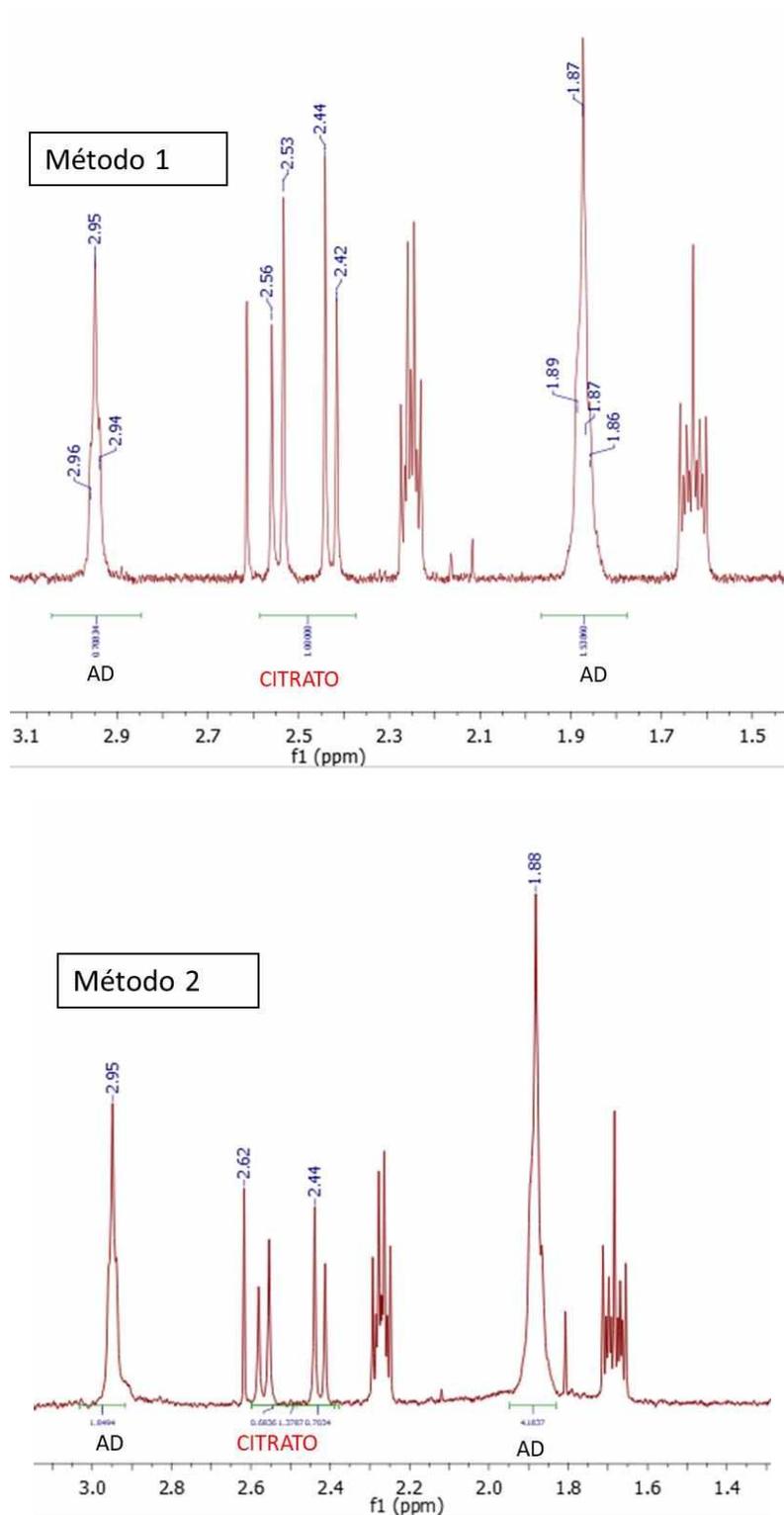


Figura 33. Espectros de ^1H NMR para muestras de CaPLiAD sintetizadas por el método 1 y el método 2.

Es de notar que tanto en el espectro de la muestra de CaPLiAD obtenida por el método 1 como del método 2 aparecen multipletes a 1,65 y 2,25 ppm aproximadamente; sin

embargo, no se han identificado exactamente a qué corresponden dichas señales dada la complejidad de la matriz de los nanosistemas conformada por LX y DOPA. La utilización del patrón de AD en PBS permite comparar e identificar las señales cuantificables del bisfosfonato a 1,87 ppm y 2,94 ppm. En la Tabla 5 se resumen los valores calculados para la capacidad de encapsulación, en función de la integral de las señales detectadas para los espectros por cada método, determinadas por duplicado y triplicado.

Tabla 5. Eficiencias de encapsulación de AD en CaPLiAD determinadas por espectroscopía ¹H NMR.

Muestra	Área de la integral			Concentración de AD (mM)		%EE
	Citrato	AD 1,87 ppm	AD 2,94 ppm	Calculada	Teórica	
Método 1	1	1,5386	0,70834	0,94 ± 0,04	2,4	39
	0,99894	1,53621	0,71853			
Método 2	0,7034	4,1837	No detectada	1,28 ± 0,07		53
	0,7541	3,9434	2			
	0,7382	3,8064	2			

Puede observarse que la carga del bisfosfonato aumenta más del 10% cuando se incluye agitación y calentamiento controlado en la síntesis (método 2), coherente con lo esperado según lo hallado en bibliografía. Esto puede atribuirse a que la permeabilidad de la bicapa formada por los fosfolípidos de DOPA es sensible al aumento de la temperatura.

Espectroscopía UV-Vis

Por otro lado, el método que involucra la reacción de AD con DNFB se basa en la reacción para formar un complejo coloreado, el cual presenta un máximo de absorción a 378 nm y un hombro a 420 nm [87]. En este trabajo, luego de diversos ensayos, se obtuvo el complejo coloreado, pero en el espectro no se distingue el máximo de 378 nm. Por ello, se seleccionó la longitud de onda de 420 nm para la comparación y cuantificación del AD (Figura 34). Adicionalmente, la absorbancia del complejo AD-DNFB es altamente sensible al pH, temperatura, concentración de DNFB y solvente [87], por lo que la ausencia del pico también puede atribuirse a diferencias de los reactivos utilizados y fluctuaciones de la temperatura ambiental a la hora de realizar las medidas. En la Tabla 6 se muestran los resultados de la eficiencia de encapsulación de AD dentro de los liposomas. Los resultados de absorbancia (por duplicado y triplicado) corresponden a diluciones de las muestras para poder medir en el rango lineal de la curva de calibración (10-60 $\mu\text{g AD/mL}$).

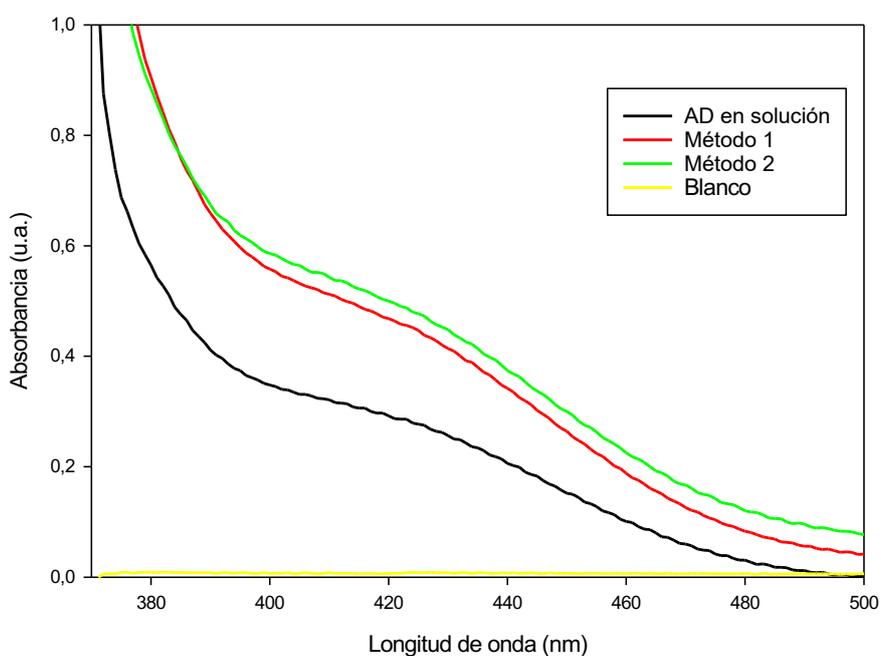


Figura 34. Espectro del complejo DNFB + AD luego de reaccionar. El blanco corresponde a los liposomas sin AD.

Tabla 6. Eficiencias de encapsulación en LiAD determinadas por absorbancia.

Muestra	Antes de diálisis		Después de diálisis		%EE	%EE promedio
	Abs a 420nm	[M]	Abs a 420nm	[M]		
Método 1	0,4730	0,0217	0,3230	0,0074	34	35 ± 2
	0,5180	0,0238	0,3770	0,0087	37	
Método 2	0,4680	0,0215	0,5000	0,0115	54	55 ± 4
	0,5360	0,0246	0,6420	0,0147	60	
	0,4490	0,0206	0,4690	0,0107	52	
	0,4720	0,0217	0,5040	0,0116	54	

Comparando el porcentaje de encapsulación de ambos métodos de síntesis de LiAD, se puede concluir que hay correspondencia entre los resultados de las dos técnicas utilizadas para determinar la concentración, ^1H RMN y espectrofotométrica. Para el método 1 se obtuvo una eficiencia de encapsulación de alendronato del 39 y 35 ± 2% por ^1H RMN y espectrofotometría, respectivamente, mientras que para el método 2 la %EE fue del 53 y 55 ± 4%.

Por otro lado, es evidente la mejora en la capacidad cuando se incluye un calentamiento previo a la sonicación, lo cual permite mayor interacción entre el lípido y el bisfosfonato que ingresa a las vesículas. Por lo tanto, el método que involucra calentamiento se elige para continuar los estudios con AD.

Finalmente, para constatar si las concentraciones de alendronato encapsuladas en los liposomas son adecuadas, se contrastaron con las que se encuentran en las formulaciones comerciales. La concentración utilizada de alendronato sódico en tabletas para el tratamiento de enfermedades óseas varía entre 13,05mg (Osteonate®) y 52,2mg (Alendex®) [87]. La concentración obtenida para CaPLiAD por ^1H RMN es

0,4148 mg/mL, por lo cual con 100mL de suspensión liposomal se obtendrían 41,48mg de alendronato, valor comparable con la concentración reportada en las formulaciones mencionadas.

3.3. Diámetro hidrodinámico y carga superficial.

Se midieron los valores de diámetro hidrodinámico y carga superficial de los liposomas vacíos, con drogas encapsuladas y recubiertos con CaP, mediante medidas de DLS y potencial *zeta*. Los liposomas se sintetizaron por sonicación, aunque también se incluyen los resultados de las medidas de CaPLiLX sintetizados por inyección etanólica con fines comparativos. Todos los resultados se muestran en la Tabla 7. Cabe aclarar que la aparición de dos máximos en la distribución de tamaño por intensidad indica la presencia de dos poblaciones bien definidas en la muestra. Los porcentajes entre paréntesis indican cuanto contribuye cada pico a la intensidad total.

Tabla 7. Resultados de medidas de DLS y potencial zeta. NA: No Aplica.

Método de síntesis	Inyección etanólica	Sonicación						
Muestra	CaPLiX	Li vacíos	LiLX	CaPLiX	LiCX	CaPLiCX	LiAD	CaPLiAD
Diámetro promedio Z ± SD (nm)	171 ± 13	NA	100,6 ± 0,6	171,8 ± 0,6	136 ± 4	191 ± 3	NA	NA
Índice de polidispersidad ±SD (Rango 0,05-0,7)	0,21 ± 0,02	0,361 ± 0,006	0,259 ± 0,004	0,204 ± 0,004	0,24 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,238 ± 0,006	0,22 ± 0,02
Distribución de tamaño por intensidad ± SD (nm)	213 ± 14	91 ± 1 (89,9%)	135 ± 1	212 ± 3	186 ± 2	262 ± 5	98 ± 3 (89,7%)	227 ± 17 (74,7%)
		24 ± 3 (7,4%)					25 ± 2 (10,3%)	83 ± 17 (25,3%)
Potencial zeta ± SD (mV)	-35 ± 2	-63 ± 3	-58,2 ± 0,2	-51,2 ± 0,8	-49 ± 4	-34 ± 2	-35 ± 3	-17 ± 1
Movilidad electroforética ± SD (µmcm/Vs)	-2,7 ± 0,2	-5,0 ± 0,2	-4,6 ± 0,2	-4,01 ± 0,06	-3,9 ± 0,1	-2,7 ± 0,2	-2,8 ± 0,2	-1,3 ± 0,1

De los resultados expresados en la Tabla 7 pueden obtenerse varias conclusiones interesantes. Para la suspensión de liposomas vacíos obtenidos por el método de sonicación se detectaron dos poblaciones; la de mayor contribución, con 91 nm de diámetro en el máximo de la distribución, se correlaciona con los Li vacíos en concordancia con las observaciones de TEM. La población con menor contribución y de 24 nm de diámetro en el máximo, se corresponde con estructuras menores no necesariamente debidas a liposomas, sino que pueden deberse a pequeños agregados

de lípidos. Es interesante notar que estas estructuras desaparecen al incorporar los antibióticos LX y CX a los liposomas. Además, los liposomas aumentan su tamaño al agregar estos fármacos. Esto no sucede al incorporar AD en el interior de estos, manteniéndose las dos poblaciones con contribución y diámetros máximos equivalentes a los liposomas vacíos. La naturaleza y tamaño de los fármacos es relevante en el tamaño final de los Li cargados, demostrando la importancia que tiene la interacción e intercalado de los fármacos con las colas lipídicas [109]. Los fármacos con grupos aromáticos son propicios para este tipo de interacción. La constancia en el diámetro de las LiAD y Li, se ha visto también para liposomas de 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina, distearoil-fosfatidilglicerol y colesterol con y sin alendronato encapsulado [105].

Al cubrir los liposomas con CaP, las nanopartículas resultantes CaPLiLX y CaPLiCX ven aumentado su diámetro hidrodinámico promedio en aproximadamente 70 y 55 nm, respectivamente. Esto indicaría que las coberturas de CaP en estos liposomas poseen un ancho promedio de ~ 35 y 27 nm, respectivamente, aunque no se podría descartar con estas medidas la compresión de los liposomas al recubrir con CaP. Por su parte, las muestras de LiAD también aumentan considerablemente de tamaño (~ 130 nm) al recubrirlas con una capa de CaP. Si existiesen moléculas de AD ubicadas en el exterior de los liposomas, estas podrían servir de núcleos para la formación de la capa de CaP, y explicar el gran crecimiento de los CaPLiAD.

Por otro lado, se observa que el diámetro no depende del método de síntesis de los liposomas para CaPLiLX, ya que por inyección etanólica (segunda columna) o sonicación, los parámetros dimensionales obtenidos son muy cercanos. Sin embargo, en las medidas de movilidad electroforética sí se evidencia la influencia del solvente en el entorno del liposoma, siendo más bajos los valores obtenidos mediante síntesis por inyección etanólica respecto a las muestras sonicadas en agua, lo que puede atribuirse a la menor polaridad del alcohol. Además, teniendo en cuenta que una carga superficial

negativa favorece la estabilidad de la suspensión liposomal, la síntesis mediante sonicación en presencia sólo de agua resulta óptima a estos fines.

Los liposomas generados a partir del DOPA poseen potenciales *zeta* negativos debido a los grupos fosfatos que penden de su superficie, tal como se describió anteriormente. Como se observa en la Tabla 7, las muestras de LiLX presentan potenciales *zeta* negativos apenas menores a los de los liposomas vacíos, sugiriendo una densidad parecida de grupos fosfato en la superficie de estos liposomas. Esta observación se soporta en la preferencia de las moléculas de LX por ubicarse en el núcleo de los nanovehículos, más que de adsorberse en su superficie.

En el otro extremo, hay una disminución importante en el potencial *zeta* de LiAD, indicando una menor densidad de grupos fosfato superficiales en estos liposomas. Esto puede deberse al hecho de que las drogas con carácter más hidrofílico, como el alendronato, son más difíciles de encapsular [110] y el carácter menos negativo de LiAD podría sugerir una adsorción superficial de AD en los liposomas, provocando la disminución en la densidad de grupos fosfato superficiales. Un valor del potencial *zeta* de -35 ± 3 mV para LiAD está en concordancia con lo publicado para liposomas de 1,2-Distearoilsn-glicero-3-fosfocolina, distearoil-fosfatidilglicerol y colesterol conteniendo alendronato ($-26,4 \pm 2,1$ mV) [105].

Para CaPLiLX sintetizado por sonicación, el tamaño promedio de $171,8 \pm 0,6$ nm medido por DLS está en línea con los tamaños observados por los datos TEM, STEM y SEM, que rondan entre los 90-160 nm (ver sección 3.4.1 del presente capítulo). Cabe destacar que las nanopartículas suelen presentar menor tamaño cuando se mide por SEM o TEM que por DLS, lo cual se debe a que las medidas por espectroscopías electrónicas se realizan en seco y a bajas presiones mientras que en la técnica de DLS se observa el radio hidrodinámico. Las medidas de DLS para suspensiones acuosas de CaPLiLX, al presentar un único máximo de tamaño coincidente con las medidas del tamaño de los liposomas individuales por TEM, permite inferir una baja aglomeración en suspensión y una

polidispersidad de tamaño media. De hecho, se determinó el tamaño promedio mediante DLS 11 días después de su síntesis, almacenando las suspensiones de CaPLiLX a 4°C, y se obtuvo un valor de 176 ± 2 nm, lo que también sugiere una buena estabilidad de las formulaciones. Por otro lado, la cobertura de fosfato de calcio contribuye a la mencionada estabilidad en suspensión de los nanovehículos ya que los LiLX almacenados el mismo tiempo, pasaron de $100,6 \pm 0,6$ nm de diámetro a $82,4 \pm 0,2$ nm, consecuencia de la reestructuración dinámica que sufren los liposomas cuando se mantienen en suspensión.

Para actuar como agente de nucleación del fosfato de calcio, los liposomas deben ser estables y poseer grupos superficiales adecuados. Se ha demostrado que el grupo fosfato del DOPA puede ayudar a la localización de iones calcio alrededor del liposoma y mejorar la sobresaturación local de CaP [28][111]. Las tres muestras (CaPLiLX, CaPLiCX y CaPLiAD) exhibieron una disminución en la carga negativa superficial tras el recubrimiento con CaP, lo cual sugiere la deposición de la sal, ya que las HAp suelen presentar potenciales *zeta* muy bajos (entre +5 a -15 mV, dependiendo de la síntesis [112], [113]); sin embargo, los grupos carboxilo del CEPA, agregado en la etapa final del recubrimiento, conservan una mayor densidad de carga negativa a pH 7,4 como es deseable para mejorar la estabilidad y evitar la aglomeración y/o floculación de partículas [114].

3.4. Caracterización de la cobertura de fosfato de calcio.

Para confirmar la formación y la estructura de la capa de fosfato de calcio depositada sobre liposomas, se utilizaron diversas técnicas espectroscópicas e imágenes de microscopía electrónica, cuyos resultados se muestran a continuación. En este caso, todas las medidas corresponden a muestras de CaPLiLX.

3.4.1. Microscopía electrónica de transmisión.

Las imágenes de microscopía electrónica STEM, TEM y SEM de muestras de CaPLiLX (ver Figura 35-a, b y Figura 36) mostraron nanopartículas de forma esférica polidispersas de 90-160 nm de tamaño. Se observa una estructura típica de núcleo-capa en la imagen TEM en la Figura 36-c, con un espesor de capa alrededor de 25 - 30 nm, en concordancia con lo discutido en base a medidas de DLS y coincidente con datos publicados para los mismos liposomas recubiertos [34]. Las imágenes de mapeo EDS (Figura 35-c,d) muestran la distribución homogénea de Ca y P en las nanocapas [115]. La presencia de N, que sólo podría atribuirse a la presencia de LX, también se distribuye uniformemente en las nanoesferas (Figura 35-d), lo que confirma la inclusión de LX en la nanoestructura de CaPLiLX. Adicionalmente, las únicas partículas observadas en todas las imágenes de microscopía electrónica son nanoesferas, antes y después del recubrimiento de CaP, lo que respalda firmemente que no se forman partículas separadas de fosfato de calcio y que todo se deposita sobre el liposoma. Cabe resaltar que no se observó contribución de Ti en el mapeo EDS, lo que sugiere que no se desprende de la sonda durante la síntesis por sonicación o se elimina por centrifugación.

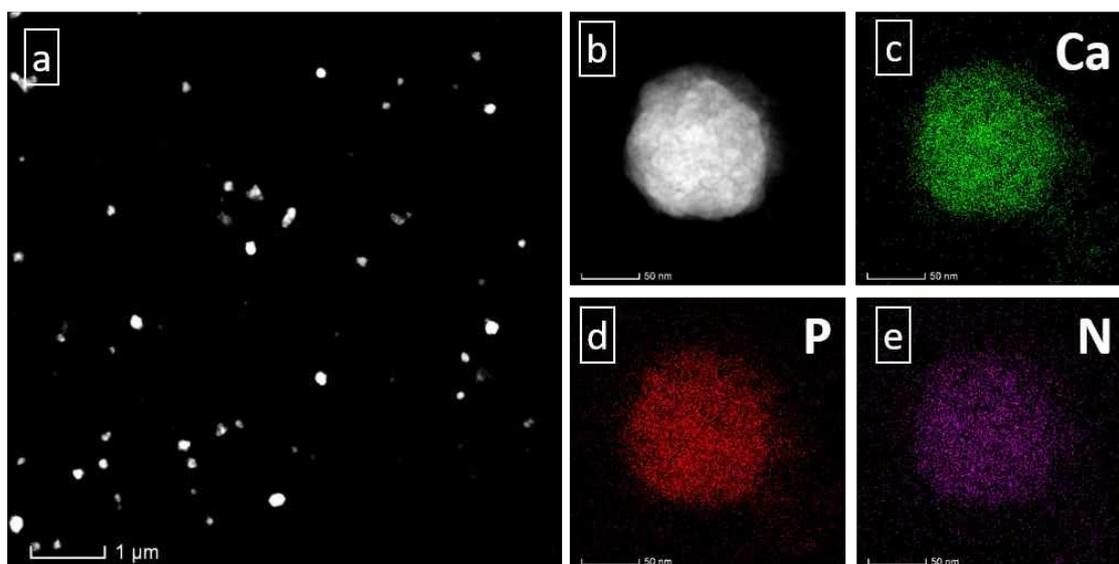


Figura 35. Imágenes HR-STEM de CaPLiLX (a y b), imágenes de mapeo elemental EDS de Ca, P y N (c, d y e, respectivamente).

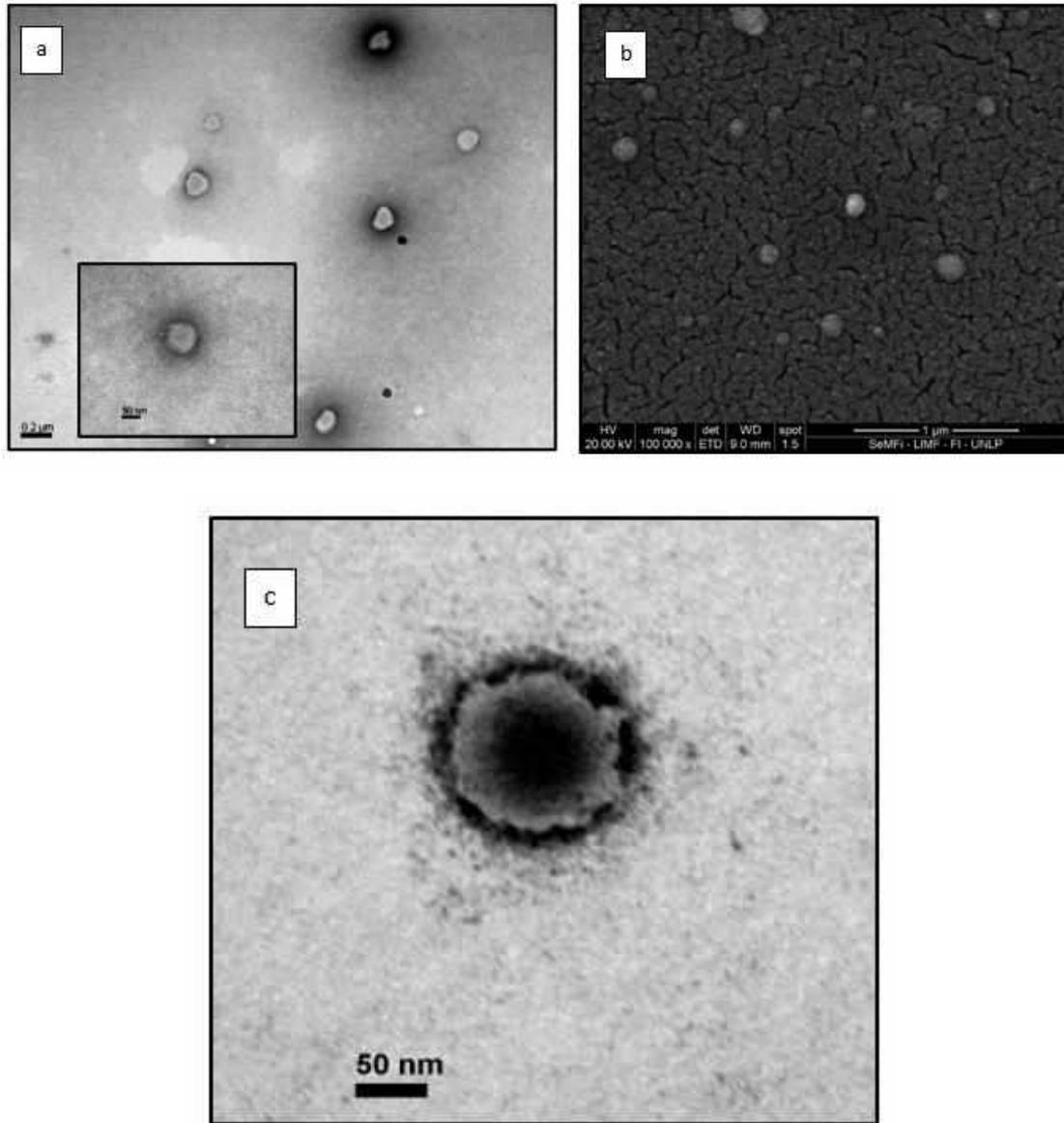


Figura 36. Imágenes TEM (a) y SEM (b) de CaPLiLX y LiLX (recuadro (a)). Estructura núcleo-capa de CaPLiLX observada por TEM (c).

3.4.2. Espectros ATR-FTIR.

Con el objetivo de identificar los grupos funcionales y verificar la presencia de los reactivos en los liposomas sintetizados, se tomaron los espectros de ATR-FTIR de LiLX, LX y DOPA, representados en la Figura 37. La muestra de LiLX presenta bandas características de DOPA a 1465 cm^{-1} y 1175 cm^{-1} asignados a la flexión (δ) de $-\text{CH}_2$ y la

tensión (ν) simétrica C-O de ésteres presentes en la estructura lipídica; además, muestra bandas características de LX en 1625, 1250-1300 y 1085 cm^{-1} asignadas al grupo cetónico aromático de LX, estiramiento de aminas y grupo C-F, respectivamente, lo que confirma la presencia simultánea de LX y liposomas de DOPA en las muestras.

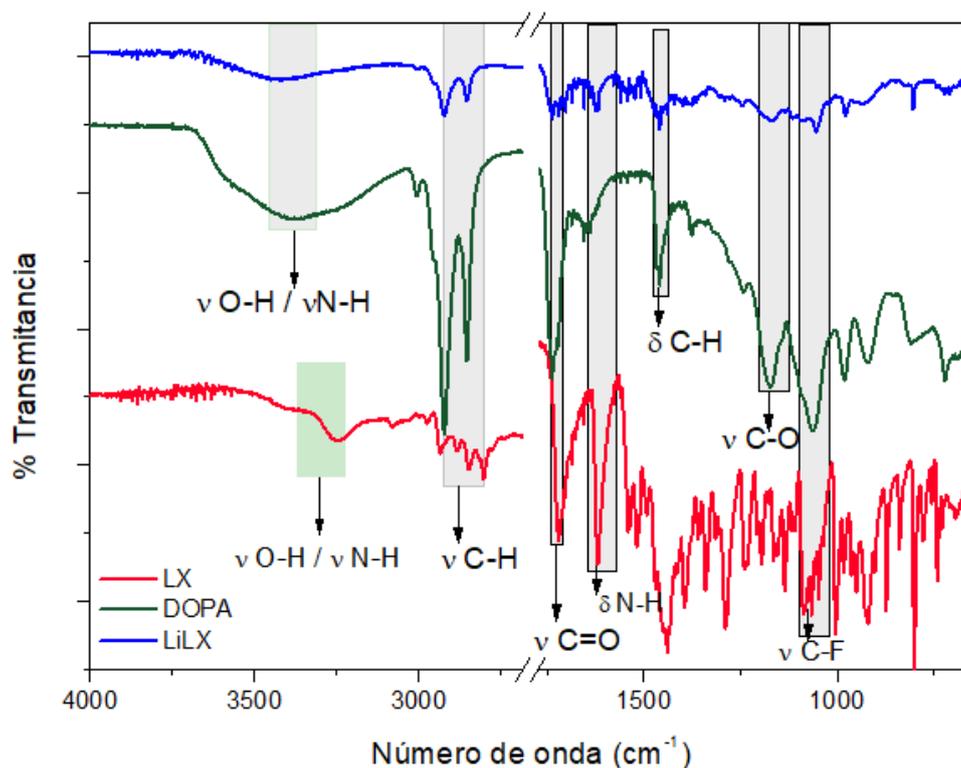


Figura 37. Espectros ATR-FTIR de LX, DOPA y LiLX.

Por otro lado, se tomó el espectro ATR-FTIR de los liposomas recubiertos (CaPLiLX) y de nanopartículas de fosfato de calcio (CaP) depositadas en iguales condiciones que el recubrimiento, pero en ausencia de liposomas como plantillas, como se ve en la Figura 38. El espectro de CaPLiLX exhibió bandas en 896, 1060 (muy intensa) y 1118 cm^{-1} características del estiramiento de P-OH y P-O en fosfatos; también se observan bandas características del DOPA en 2695, 1740 y 1465 (pequeño) cm^{-1} asociadas a vibraciones HO- de grupos O=P-OH [116], estiramiento de carbonilos de éster en lípidos y movimiento de flexión tipo tijera del -CH. Las bandas asociadas al estiramiento asimétrico y simétrico de los grupos carboxilato [117] a 1577 y 1406 cm^{-1} ,

respectivamente, pueden deberse a la contaminación con carbonatos y a grupos carboxilato de las terminaciones CEPA unidas a la superficie CaPLiLX. La doble banda en 2857-2927 cm^{-1} se asigna al estiramiento C-H y confirma la presencia de cadenas de carbono en la superficie de la nanocáscara asociadas al CEPA.

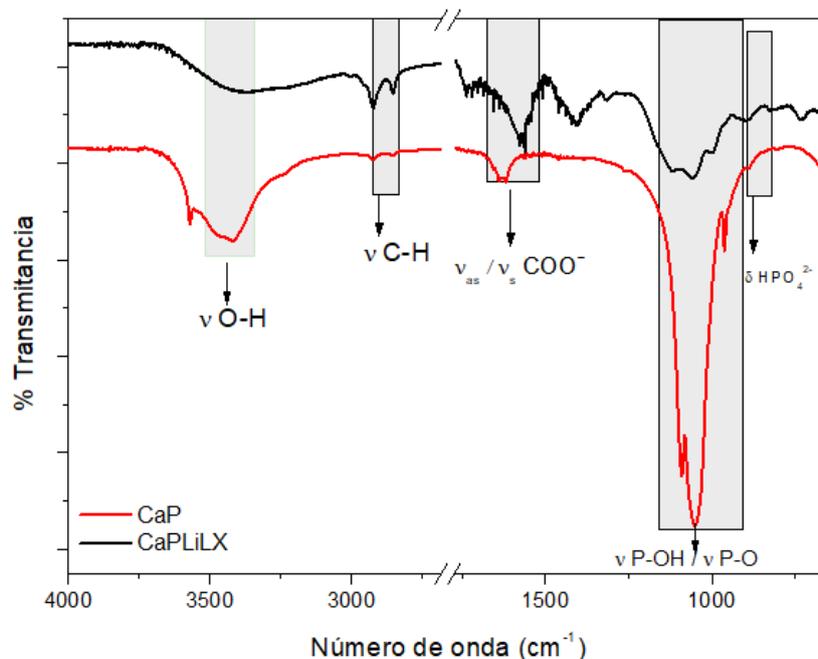


Figura 38. Espectros ATR-FTIR de CaPLiLX y partículas de CaP.

Es interesante resaltar que el espectro de las nanopartículas de CaP, depositadas en condiciones experimentales idénticas a CaPLiLX pero en ausencia de liposomas, presenta un pico distintivo y definido a 3570 cm^{-1} debido al estiramiento de OH en polvos de CaP altamente cristalinos [118], [119], que coincide con el de la hidroxiapatita; mientras que en el espectro de CaPLiLX no aparece un picos similar. Lo anterior sugiere que la capa de CaP depositada en la superficie del liposoma presenta carácter amorfo. Con el objetivo de indagar en las fases de CaP depositadas se realizaron ensayos de DRX y WAXS como se detalla a continuación.

3.4.3. Determinación de cristalinidad por DRX y WAXS.

Los difractogramas DRX (Figura 39) y WAXS (Figura 40) de polvos de CaPLiLX y suspensiones acuosas de CaPLiLX, respectivamente, muestran patrones amplios y difusos a aproximadamente $2\theta=25^\circ$ característicos de las fases no cristalinas, en concordancia con lo sugerido por los espectros ATR-FTIR. Tampoco se observaron patrones de difracción en imágenes STEM de alta resolución [119]–[121].

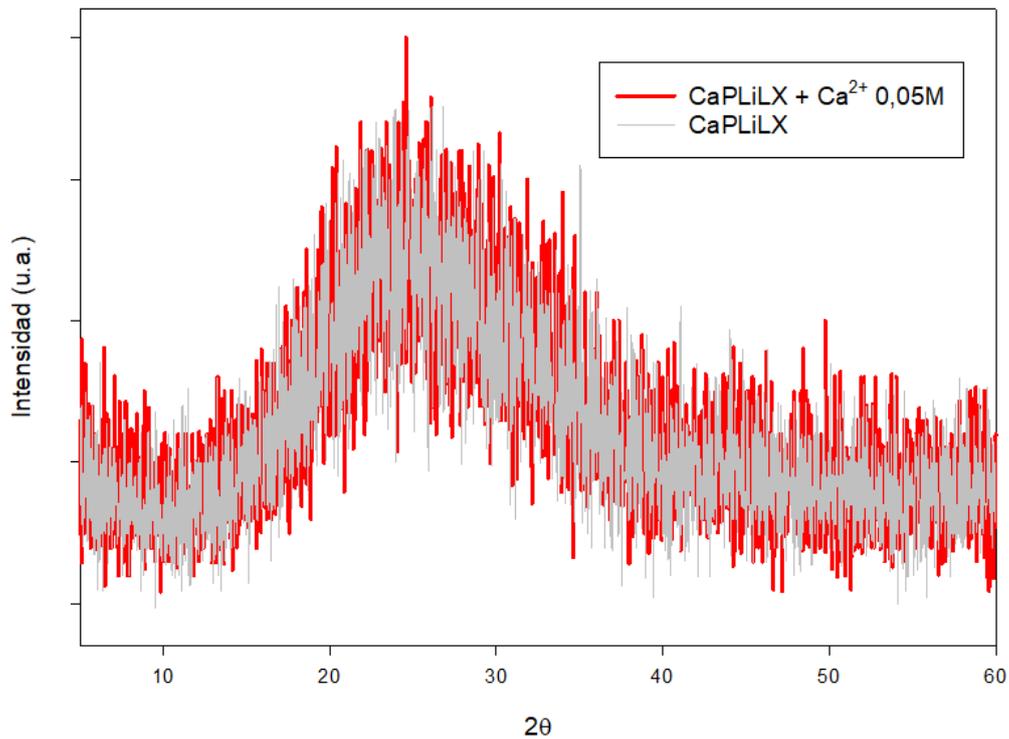


Figura 39. Patrones DRX de nanocápsulas de CaP depositadas en portaobjetos de vidrio en presencia y en ausencia de Ca^{2+} .

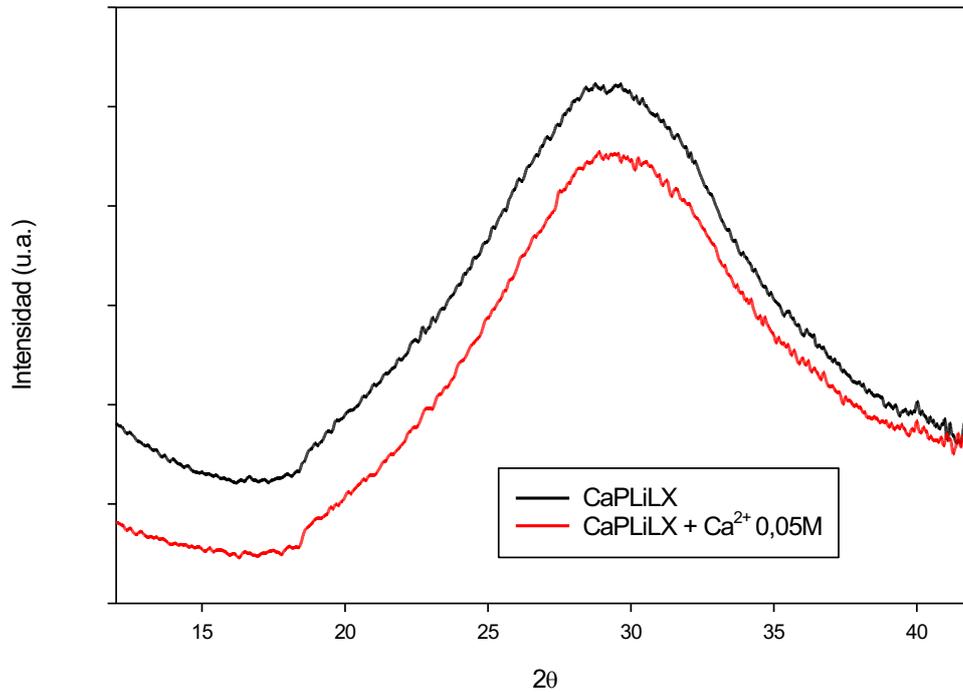


Figura 40. Patrones WAXS obtenidos de suspensiones coloidales CaPLiLX en ausencia y en presencia de iones Ca^{2+} .

Además, se tomaron difractogramas de muestras de CaPLiLX en presencia de iones Ca^{2+} para analizar si induciría a alguna cristalización sobre la cobertura, ya que ha sido descrito en la bibliografía que el exceso de calcio en solución acelera la transformación de fosfato de calcio amorfo (CPA) en hidroxiapatita deficiente de calcio (CDHA) cristalina [121]; sin embargo, el resultado de tal experiencia coincide con aquella en ausencia de calcio, manteniendo el carácter amorfo. Ambas técnicas, tanto DRX sobre polvos como WAXS sobre suspensiones, sugieren entonces que la cobertura de CaP sobre los liposomas sintetizados corresponde a fosfato de calcio amorfo.

En el protocolo experimental seguido existen dos condiciones que podrían favorecer la precipitación de una capa amorfa de CaP (CPA). Por un lado, la relación molar Ca/P añadida a los liposomas para depositar la cobertura de CaP es de 1,0, sin considerar los grupos fosfato en la cabeza polar de los lípidos. Esta relación se encuentra en el rango límite inferior de 1 a 2,2 informado para las fases amorfas [121]. Por otro lado, la

presencia de compuestos orgánicos (como los lípidos) disminuye la solubilidad de los iones debido a un cambio en la constante dieléctrica del medio [121]; por ello puede ocurrir un aumento en la cinética de precipitación de Ca^{2+} y PO_4^{3-} , lo que favorece la amorfización. Esta fase amorfa se estabilizó adicionalmente por derivatización superficial con CEPA.

3.4.4. Estimación de la cantidad de liposomas recubiertos y determinación de calcio por ICP-OES.

El dimensionamiento de partículas nanométricas suele estar enfocado a determinar su tamaño por técnicas microscópicas y de difracción láser. Sin embargo, es de gran importancia conocer la concentración numérica de dichas partículas para una caracterización integral de las preparaciones, ya que la cantidad de las mismas podría afectar su absorción, acumulación y eliminación en los sistemas de interés, como bacterias, células y tejidos. Algunos métodos experimentales reportados parten de la investigación de aerosoles para contar el número de partículas en suspensiones de nanopartículas poliméricas y liposomas de tamaño nanométrico, en el cual se nebulizan las partículas suspendidas para secar el aerosol y luego se dimensionan y se cuentan con medidores de movilidad de barrido [122]. En el caso de los fosfolípidos que forman el liposoma, se ha determinado el volumen de una molécula de lípido en la fase laminar cristalina líquida mediante el estudio de la flotabilidad neutra de los liposomas en mezclas de $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ por centrifugación, utilizando densitómetros diferenciales de tubo vibratorio, dilatómetros diferenciales y picnómetros capilares [123].

Por otro lado, también se pueden realizar estimaciones teóricas para aproximar el número de partículas de una preparación liposomal, asumiendo un tamaño promedio de las partículas, una geometría regular y partiendo del volumen ocupado por las moléculas del fosfolípido.

Un enfoque común para estimar el volumen específico de lípidos, V_L , es representarlo como la suma de los volúmenes de sus segmentos moleculares. Estos segmentos se pueden dividir en: V_H , que representa el grupo fosfato de cabeza, el resto de lípido glicerol y los dos grupos carboxílicos de las cadenas de hidrocarburos; V_{CH} , volumen por carbono en los dobles enlaces de las cadenas; V_{CH_2} volumen de los grupos metileno y V_{CH_3} el volumen de los grupos metilo terminales. Esta aproximación supone que los valores de volúmenes de los segmentos de la cadena están cerca de los correspondientes a las moléculas en los respectivos hidrocarburos líquidos [123].

En este trabajo se estimó el orden de magnitud de la cantidad de liposomas presentes en 1 mL de suspensión de CaPLiLX luego de diálisis, a partir del volumen ocupado por una molécula del fosfolípido DOPA y cálculos posteriores. Primero se determinó el volumen de una molécula de DOPA considerando la aproximación postulada por Koenig para los lípidos de fosfatidilcolina insaturados en fase lamelar líquida cristalina [123], ya que, como la temperatura de transición crítica del DOPA es -8°C , a 25°C se encuentra en estado de cristal líquido. La ecuación de Koenig es la siguiente:

$$V_L(T) = V_H + n_{CH} \times V_{CH}(T) + n_{CH_2} \times V_{CH_2}(T) + n_{CH_3} \times V_{CH_3}(T)$$

Ecuación 9. Ecuación de Koenig.

Donde n_{CH} , n_{CH_2} y n_{CH_3} son el número de carbonos en enlaces dobles, grupos metileno y metilo, respectivamente, en las cadenas carbonadas; V_H representa el grupo fosfato de cabeza, el resto de lípido glicerol y los dos grupos carboxílicos de las cadenas de hidrocarburos; y V_{CH} , V_{CH_2} y V_{CH_3} son los respectivos volúmenes segmentarios de Koenig a $T=25^\circ\text{C}$ [123]. Reemplazando los valores para las dos cadenas del DOPA se estima un volumen del lípido de 1294 \AA^3 , considerando $V_H=348 \text{ \AA}^3$, $n_{CH}=4$, $V_{CH}=20,5 \text{ \AA}^3$, $n_{CH_2}=28$, $V_{CH_2}=27,0 \text{ \AA}^3$, $n_{CH_3}=2$ y $V_{CH_3}=54,0 \text{ \AA}^3$.

El volumen ocupado por moléculas de DOPA, que corresponde al volumen de la bicapa lipídica, puede calcularse a partir del diámetro medio de LiLX (100 nm) medido por TEM (ver Figura 20). Tomando el valor del radio (50 nm), considerando una estructura esférica y el espesor de una bicapa lipídica basada en DOPA publicado en la bibliografía de ≈ 4 nm [124], [125], se obtiene un volumen lipídico de $1,1 \times 10^8 \text{ \AA}^3$, como esquematiza la Figura 41. Los valores señalados en **negrita** corresponden a valores medidos experimentalmente, y aquellos estimados se ponen en **gris**. Adicionalmente, sabiendo que el volumen de una molécula de DOPA es 1294 \AA^3 , se estiman $8,5 \times 10^4$ moléculas de DOPA por cada liposoma. A su vez, considerando la masa molecular del DOPA ($722,96 \text{ g/mol}$), se estima una masa de $1,0 \times 10^{-13} \text{ mg}$ de DOPA por liposoma.

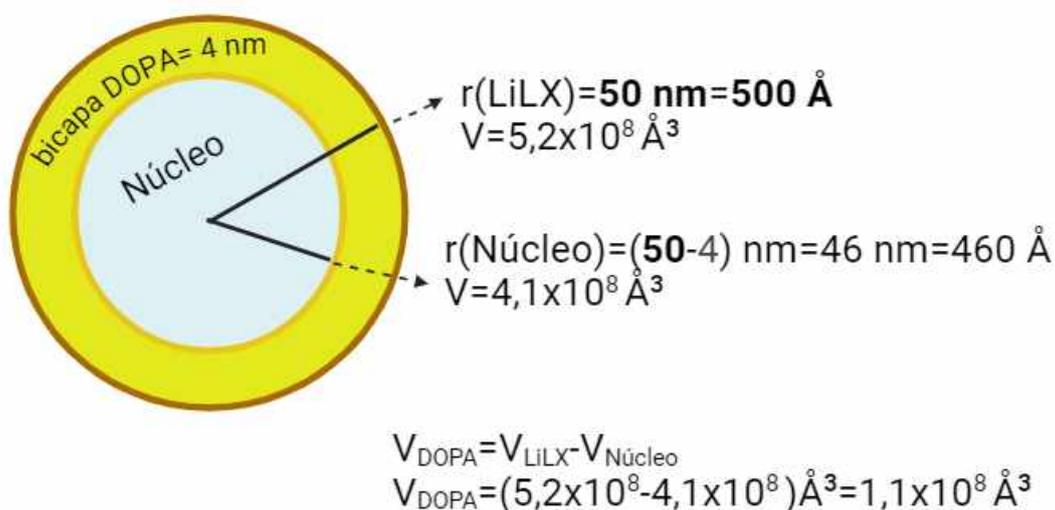


Figura 41. Esquema de las dimensiones estimadas para LiLX.

Ahora, teniendo en cuenta que la concentración utilizada de DOPA para la síntesis en los liposomas fue de 1 mg/mL (ver Sección 2.1 de este capítulo), y que al desarrollar el recubrimiento se terminó con un volumen de mezcla de $6,2 \text{ mL}$, la concentración de DOPA por mL de suspensión de CaPLiLX fue de $0,16 \text{ mg/mL}$. Como se demostró anteriormente (ver sección 2.4 del presente capítulo), se puede suponer que todo el DOPA pasó a formar parte de los liposomas, lo que permite afirmar que en 1 mL de suspensión de CaPLiLX los liposomas tienen un total de $0,16 \text{ mg}$ de DOPA. Considerando

que la estimación anterior arrojó que cada liposoma contiene $1,0 \times 10^{-13}$ mg de DOPA, se puede estimar una concentración de $1,6 \times 10^{12}$ liposomas por mL de solución. A continuación, se resumen los cálculos realizados:

$$\frac{1,1 \times 10^8 \text{ \AA}^3 \text{ bi capa DOPA}}{1 \text{ Li po}} * \frac{1 \text{ moleculas DOPA}}{1294 \text{ \AA}^3} = 8,5 \times 10^4 \frac{\text{moleculas DOPA}}{\text{Li po}}$$

$$722,96 \times 10^3 \frac{\text{mg DOPA}}{1 \text{ mol}} * \frac{1 \text{ mol}}{6,02 \times 10^{23} \text{ moléculas}} = 1,02 \times 10^{-18} \frac{\text{mg DOPA}}{\text{molécula}}$$

$$8,5 \times 10^4 \frac{\text{moleculas DOPA}}{1 \text{ Li po}} * \frac{1,2 \times 10^{-18} \text{ mg DOPA}}{1 \text{ moleculas DOPA}} = 1,02 \times 10^{-13} \frac{\text{mg DOPA}}{\text{Li po}}$$

$$\frac{0,16 \text{ mg DOPA}}{\text{mL CaPLi LX}} * \frac{1 \text{ Li po}}{1,02 \times 10^{-13} \text{ mg DOPA}} = 1,6 \times 10^{12} \frac{\text{Li po}}{\text{mL CaPLi LX}}$$

Calcio por ICP-OES

Para corroborar si el número de liposomas por mL de suspensión obtenido es un valor aceptable, se comparó con la cantidad de liposomas estimada a partir de los gramos de Ca por mL de suspensión medidos por ICP-OES, el diámetro de CaPLiX y el carácter amorfo de la cobertura de CaP, tal como se describe a continuación.

La concentración de calcio en la suspensión de CaPLiX determinada por ICP-OES fue de 34,5 mg/kg, un 53,5% respecto a la cantidad de calcio adicionado en la síntesis para obtener el recubrimiento. Dado que la densidad de la suspensión de liposomas es muy cercana a 1, puede considerarse un contenido de calcio de 34,5 µg/mL.

Luego, según lo observado por TEM, el diámetro de los CaPLiLX se encuentra entre 90-160 nm, por lo cual se toma un valor promedio de 125 nm para las estimaciones; y el espesor del recubrimiento de CaP es cercano a 25 nm según datos de TEM y DLS, en coincidencia con datos de bibliografía [34]. Partiendo de una estructura esférica y de que todos los liposomas están uniformemente cubiertos por CaP, ya que no se observa deposición de fosfato de calcio por separado, se estimará la cantidad de Ca contenido en un liposoma, considerando una partícula de radio 62,5 nm y una capa de CaP de 25 nm, tal como se discutió anteriormente. Esto arroja un volumen de $8 \times 10^8 \text{ \AA}^3$ de CaP /liposoma, como se ve en la Figura 42.

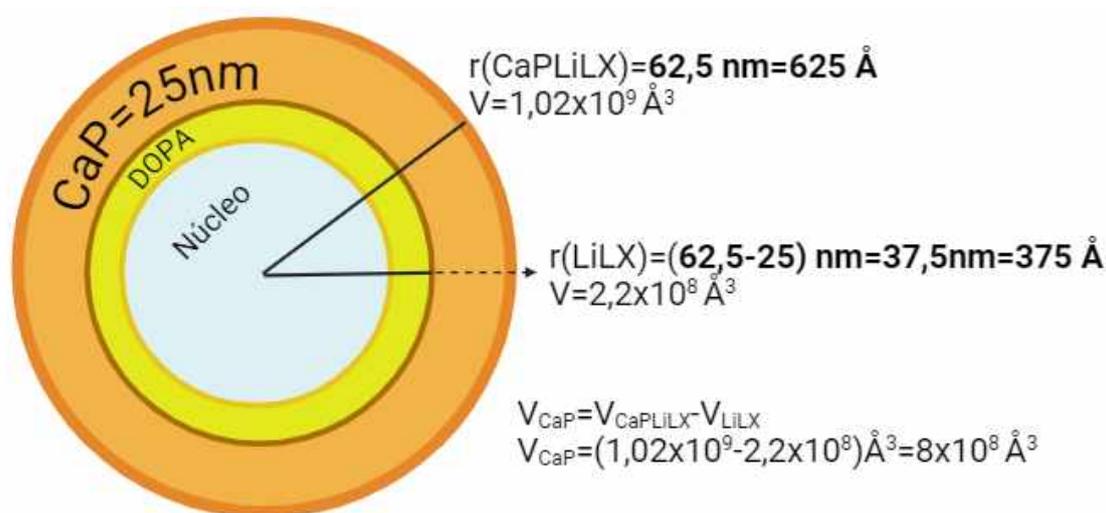


Figura 42. Esquema de las dimensiones estimadas para CaPLiLX.

Adicionalmente, si se considera que la fase mineral está compuesta por fosfato dicálcico amorfo dihidratado (DCP, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), con un $\text{PM} = 172,09 \text{ g/mol}$, donde la relación molar de calcio y DCP es 1:1, y suponiendo que se mantiene esta proporción para los nanovehículos de CaPLiLX luego de la diálisis, podrían estimarse los gramos de la capa de CaP por liposoma. Si se considera la densidad de $2,31 \text{ g/cm}^3$ para este mineral, se obtendrían $1,9 \times 10^{-9} \text{ \mu g CaP/liposoma}$, lo que equivale a $4,4 \times 10^{-10} \text{ \mu g Ca/liposoma}$. Si, como se midió en el ICP-OES, la concentración de calcio por mL de muestra es de $34,5 \text{ \mu g/mL}$, se estiman $8 \times 10^{10} \text{ Lipo/mL}$. Este número es aproximadamente un orden menor

al estimado para la concentración de liposomas a partir de datos del DOPA ($1,6 \times 10^{12}$ Lipo/mL).

Es interesante notar que, a pesar de la magnitud de las suposiciones realizadas para el cálculo de la concentración de liposomas en la suspensión final, ambos arrojan un orden de magnitud de 10^{11} - 10^{12} liposomas de DOPA/mL. Este orden es coherente con la concentración determinada por métodos experimentales para liposomas de distearoil-fosfatidilglicerol, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina y 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolinas, de tamaños de 30-900 nm, reportada como 10^{12} partículas/mL de solución [122] [123]. Por otro lado, cabe aclarar que los valores obtenidos sólo dan un resultado estimativo, ya que se realizaron diversas suposiciones sobre parámetros geométricos y fisicoquímicos de los nanovehículos para el desarrollo de los cálculos. Resta como tarea posterior a esta tesis, el cálculo experimental mediante otras técnicas como se describió en la introducción de esta sección.

Adicionalmente, considerando que la concentración de LX encapsulado fue del 56,5%, equivalente a 9×10^{-6} M, y considerando una concentración de liposomas por mL en el rango entre 10^{11} y 10^{12} , se estima una concentración de antibiótico en el orden de 6×10^{-15} y 1×10^{-13} μmol LX por liposoma, equivalentes a 2×10^{-12} y 4×10^{-11} μg LX/liposoma. A continuación, se muestra el cálculo para una de las concentraciones de liposomas estimadas:

$$9 \times 10^{-6} \frac{\text{mol LX}}{1000 \text{ mL CaPLi LX}} * \frac{1 \text{ mL CaPLi LX}}{1,6 \times 10^{12} \text{ Lipo}} * \frac{10^6 \mu\text{mol LX}}{1 \text{ mol}} = 5,6 \times 10^{-15} \frac{\mu\text{mol LX}}{\text{Lipo}}$$

$$5,6 \times 10^{-15} \frac{\mu\text{mol LX}}{\text{Lipo}} * \frac{361,67 \mu\text{g LX}}{1 \mu\text{mol LX}} = 2 \times 10^{-12} \frac{\mu\text{g LX}}{\text{Lipo}}$$

Para estimar la cantidad de CaP en los liposomas vacíos a utilizar posteriormente en los ensayos biológicos, se asume válida la composición del CaP amorfo como DCP. Esto permite una estimación de 150 μg CaP/mL de suspensión.

3.5. Funcionalización superficial de liposomas recubiertos.

3.5.1. Alendronato.

Determinación de la concentración en la superficie de los CaPLi por ^1H RMN

Como se describió anteriormente en este capítulo (Sección 2.3.1), la funcionalización superficial con alendronato se llevó a cabo con dos metodologías diferentes, denominadas A y B, cuya principal diferencia es que el método B incluyó una incubación por 24h a 37°C luego de agregar el alendronato a los CaPLiX conjugados con S-NHS y EDC, además de una mayor cantidad de AD respecto al método A. Para establecer la funcionalización más conveniente, primero se calculó la concentración remanente de AD superficial mediante ^1H RMN, a partir de la relación entre las integrales del alendronato y el estándar interno (citrato), tal como se describió en la sección 3.2.3 del presente capítulo.

En la Figura 43 se pueden ver los espectros obtenidos. Los espectros correspondientes al Método A muestran una señal a 2,11 ppm, que no se observó en los espectros del método B y que se asigna a alguna traza de reactivo adsorbida sobre los liposomas recubiertos. Dado que la diferencia principal entre ambos métodos consiste en el calentamiento de la mezcla de reacción, esta traza desaparece en el Método B.

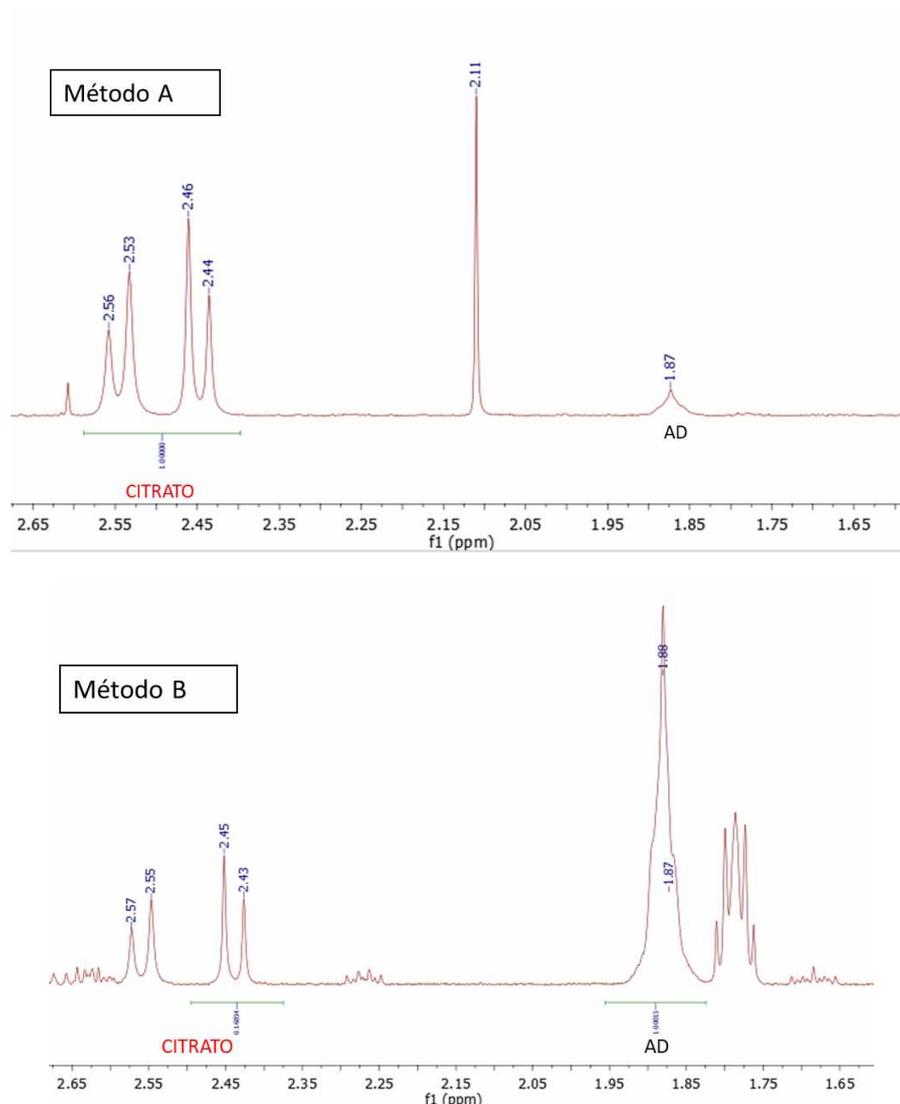


Figura 43. Espectros de AD-CaPLiLX funcionalizado por Método A y Método B (mayor tiempo y proporción).

Previamente, para determinar la concentración de AD encapsulado en los liposomas, se tomó un promedio de la concentración calculada para cada desplazamiento químico propio del AD (1,87 ppm con 4H y 2,94 ppm con 2H). Sin embargo, en la Figura 42 no se detectan las señales a 2,94 ppm, por lo que la cuantificación de AD se basó sólo en la señal a 1,87 ppm. La ausencia de señal a 2,94 ppm puede atribuirse al corrimiento de la señal de estos H metilénicos a mayores ppm como consecuencia de la formación de un enlace amida entre el alendronato y el CEPA (~ 0,6 ppm más que el grupo amino), como se esquematiza en la Figura 44.

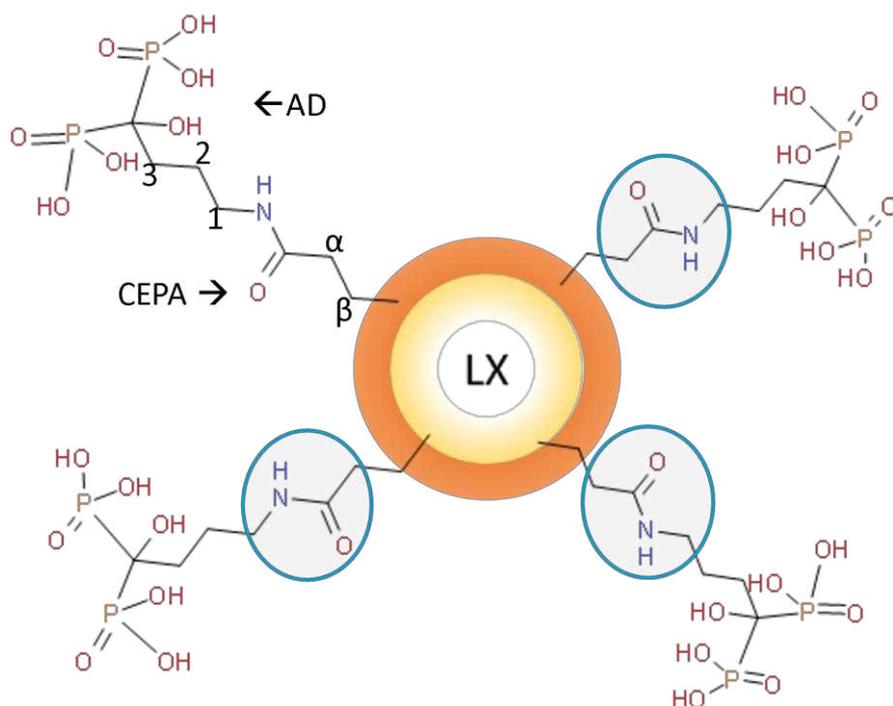


Figura 44. Esquema de anclaje del AD a CaPLi mediante enlace amida.

Por otro lado, la integral de la señal a 1,87 ppm para el Método A no pudo cuantificarse debido a la baja intensidad. Los resultados se resumen en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentración de AD en AD-CaPLiLX determinada por espectroscopia 1H NMR.

Muestra	Área de la integral		Concentración de AD (mM)		% Remanencia
	Citrato	AD 1,87 ppm	Calculada	Teórica	
Método A	No detectada	No detectada	--	0,52	--
Método B	0,19405	1,18625	1,92 ± 0,04	2,77	69,3
	0,16854	1,00015			

Es evidente que el método B es más adecuado para la modificación superficial con el bisfosfonato, con un porcentaje de permanencia del 69,3%, lo que demuestra la mejora en la síntesis al agregar una mayor proporción de AD y dejar en contacto por mayor tiempo.

Identificación del AD anclado en la superficie de los CaPLi por técnicas de ATR-FTIR

Se tomó el espectro ATR-FTIR de las muestras de AD-CaPLiLX sintetizadas por cada método y si bien ambas presentaron picos característicos de AD, se elige el método B para continuar con los ensayos ya que se pudo cuantificar el bisfosfonato presente. La Figura 45 muestra los espectros de AD en PBS, CaPLiLX y AD-CaPLiLX, los cuales dan prueba de la exitosa reacción de amidación de CaPLiLX con alendronato, ya que aparece una señal a 1630 cm^{-1} atribuible al grupo -NH-C=O . Además, en los espectros de AD-CaPLiLX no se observan las bandas asociadas al estiramiento simétrico de los grupos carboxilato a 1406 cm^{-1} debidas a terminaciones CEPA adheridas a la superficie de las nanopartículas, lo que aporta mayor evidencia a la efectividad en el anclaje de AD mediante uniones amida al carboxilato del CEPA. Por otro lado, también se observan picos a 1230 cm^{-1} que corresponden a modos vibracionales de enlaces C-P del AD y que no se observan en el liposoma sin funcionalizar.

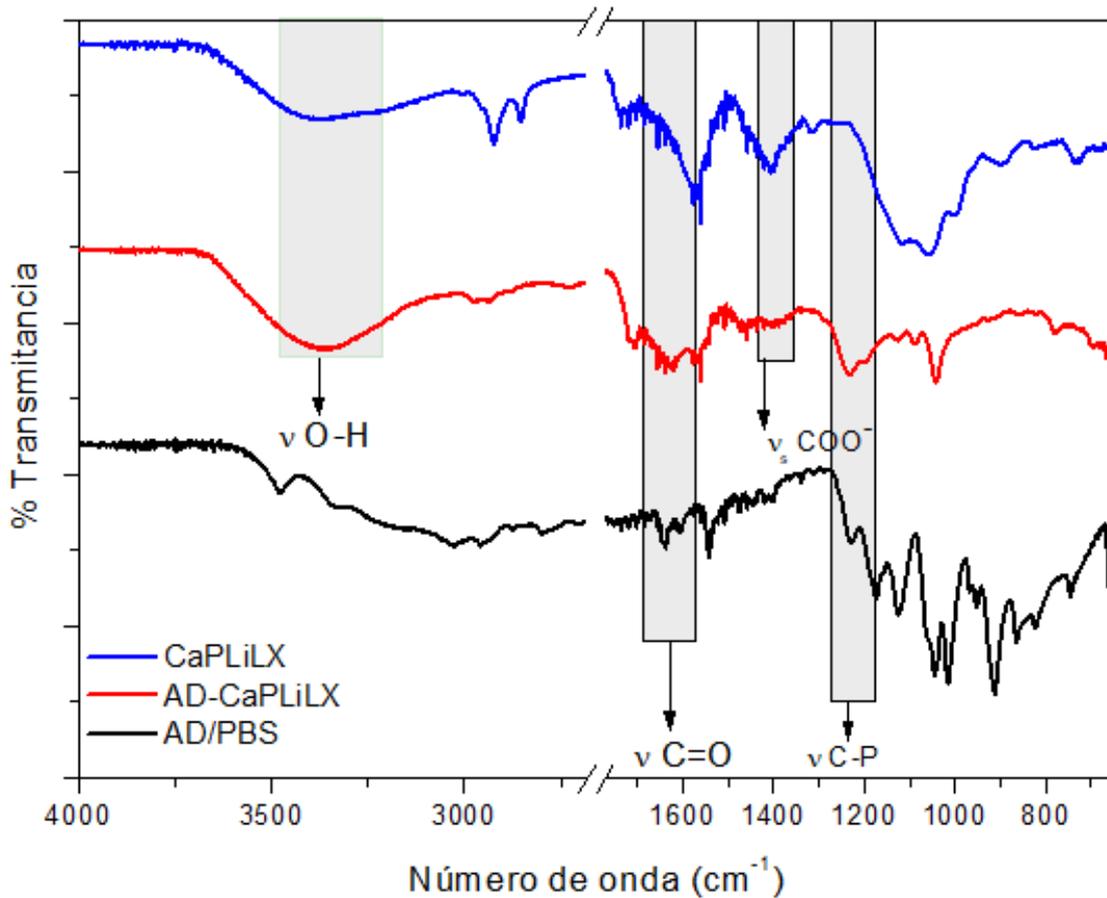


Figura 45. Espectros ATR-FTRI de CaPLiX, AD-CaPLiX y AD en solución PBS $5 \times 10^{-3} M$.

En conclusión, los resultados de ^1H RMN y ATR-FTIR respaldan fuertemente la formación del enlace químico entre los grupos amino del alendronato y los carboxilatos del CEPA expuestos en los CaPLiX, demostrando el potencial de los nanovehículos para ser modificados y funcionalizados superficialmente con drogas tipo bisfosfonatos.

Cambios en la naturaleza química de la superficie observables por DLS y potencial zeta

Con el fin de complementar el estudio de la funcionalización superficial de los nanovehículos con alendronato, se realizaron ensayos de determinación de diámetro

hidrodinámico por DLS y movilidad electroforética. En la Tabla 9 se resumen los resultados para las muestras de AD-CaPLiLX, además de una columna con datos de CaPLiLX sin funcionalizar para facilitar su comparación.

Tabla 9. Resultados de DLS y potencial zeta para muestras funcionalizadas con alendronato.

Muestra	CaPLiLX	AD-CaPLiLX
Diámetro promedio Z ± SD (nm)	171,8 ± 0,6	212 ± 4
Índice de polidispersidad ± SD (Rango 0,05- 0,7)	0,204 ± 0,004	0,29 ± 0,01
Distribución de tamaño por intensidad ± SD (nm)	212 ± 3	223 ± 5
Potencial zeta ± SD (mV)	-51,2 ± 0,8	-18 ± 1
Movilidad electroforética ± SD (μmcm/Vs)	-4,01 ± 0,06	-1,38 ± 0,08

Se puede notar un aumento en el diámetro hidrodinámico y una disminución en el carácter negativo de la carga superficial para todas los nanovehículos con AD superficial en comparación con CaPLiLX. El crecimiento del radio se debe precisamente a la contribución de las moléculas de bisfosfonato unidas a la superficie.

En cuanto a las medidas de carga superficial, cabe destacar que el AD posee cuatro grupos OH de los fosfatos libres y un grupo amino capaz de protonarse, por lo cual presenta varias constantes de disociación: $pK_a = 0,8$ para pasar del ácido alendrónico a la forma zwitteriónica (NH_3^+ y PO_3H^-); $pK_{a1} = 2,4$ que considera el paso de la molécula en su forma zwitterionica a una con otro PO_3H^- más; $pK_{a2} = 7,6$ para pasar a la forma zwitterionica más otros dos PO_3H^- ; y $pK_{a3} = 10,8$ para obtener los 4 grupos OH de los fosfatos deprotonados [126]. La Figura 46 muestra el equilibrio descrito.

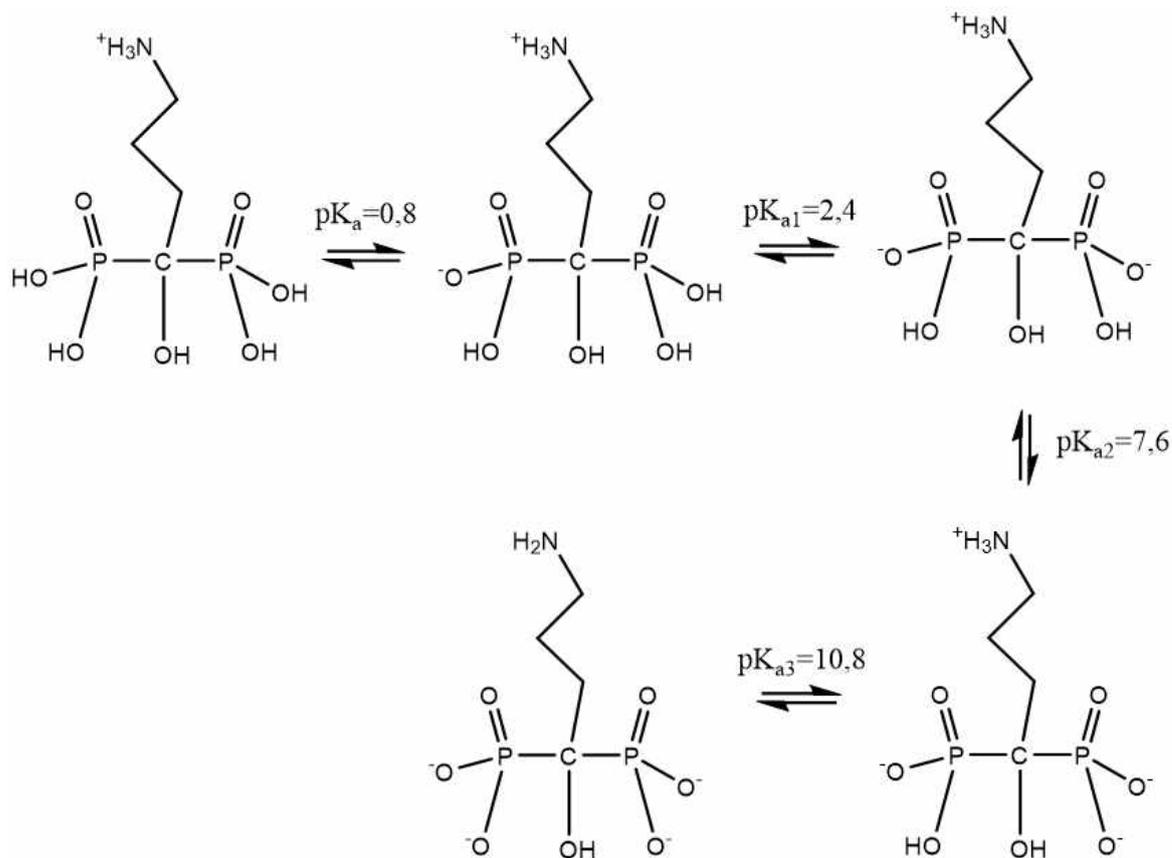


Figura 46. Equilibrios ácido-base del alendronato.

Considerando lo anterior y asumiendo que las constantes de acidez fueran las mismas para el alendronato unido a la superficie del liposoma recubierto, es de esperar que, en el intervalo de pH en que se desarrollaron las medidas (6-7), éste se encuentre en su forma con al menos dos grupos OH de los fosfatos deprotonados, es decir, con al menos dos cargas negativas. Por ello, resulta incongruente la observación de una densidad de carga para AD-CaPLiLX considerablemente menor que para CaPLiLX. Se hubiese esperado al menos una densidad de carga equivalente.

3.5.2. Fluoróforos.

Con el objetivo de obtener vehículos con propiedades luminiscentes se procedió a funcionalizar superficialmente con fluoróforos con máximos de emisión $\lambda_{em}>500$ nm, para evitar una superposición con los máximos de emisión de los antibióticos estudiados, en particular con levofloxacin. Para tal fin se eligieron, por un lado, violeta de cresilo (VC) y fucsina básica (FB) que además de cumplir con $\lambda_{em}>500$ nm, poseen un grupo $-NH_2$ adecuado para el anclaje sobre los nanovehículos preparados con CEPA a través de un enlace amida (ver Figura 44). Por otro lado, se utilizó la fluoresceína isotiocianato (FITC), que presenta grupos carboxilo en su estructura, aptos de ser unidos a los grupos $-NH_2$, expuestos cuando se utiliza AEPA en el recubrimiento. A continuación, se reportan los resultados de los estudios con cada fluoróforo.

Violeta de cresilo

En la Figura 47 se presenta el espectro de fluorescencia de los nanovehículos recubiertos con fosfato de calcio y funcionalizados superficialmente con violeta de cresilo, VC-CaPLiLX. Dado que, en la síntesis se utilizó una concentración final de VC $2,57 \times 10^{-5} M$, este sería un valor teórico máximo observable si todo el VC estuviese enlazado al liposoma. Al excitar con una longitud de onda de 330 nm, el espectro de emisión de la suspensión acuosa de VC-CaPLiLX muestra la presencia tanto de LX como de VC en la suspensión, ya que se pueden reconocer los dos máximos de emisión centrados en 430 nm y 620 nm, relacionados respectivamente con cada fluoróforo.

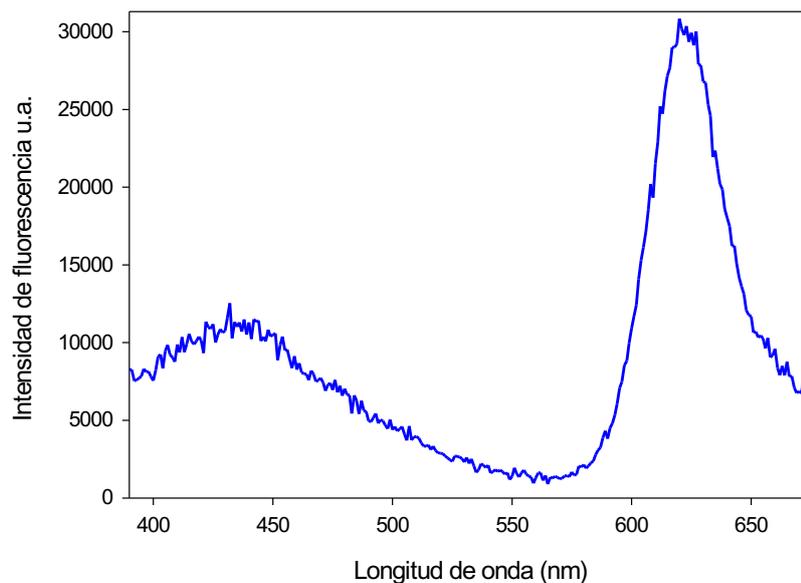


Figura 47. Espectro de fluorescencia de VCCaPLiLX con $\lambda_{exc} = 330nm$.

En la Figura 48 se comparan los espectros de emisión de VC en PBS $2,94 \times 10^{-4} M$, VC-CaPLiLX y VC+CaPLiLX, donde sólo se mezclaron VC ($2,57 \times 10^{-5} M$) y CaPLiLX, con el objetivo de identificar alguna diferencia entre el anclaje químico propuesto y la simple mezcla de los nanovehículos con el fluoróforo. La longitud de onda de excitación del VC fue $\lambda_{exc} = 580 nm$ y el pH de las suspensiones alrededor de 7,3.

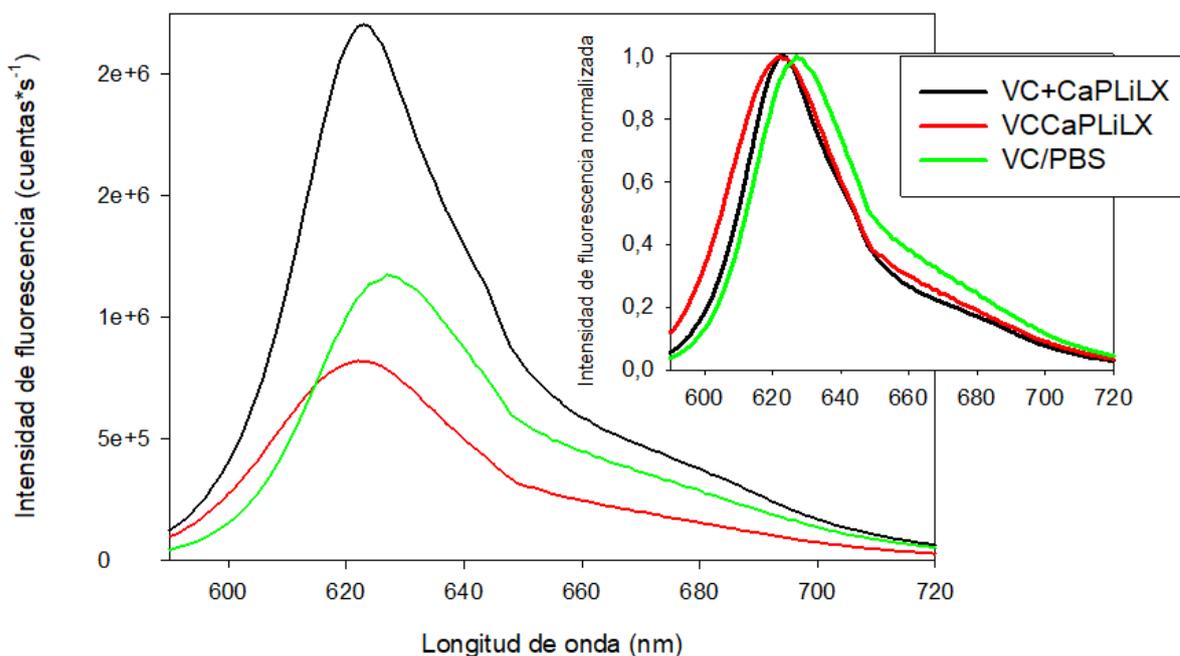


Figura 48. Espectro de fluorescencia de VC en PBS $2,94 \times 10^{-4} M$, VC+CaPLiLX y VC-CaPLiLX, $\lambda_{exc} = 580 nm$. Recuadro: Espectros normalizados.

Como se ve en el recuadro de la Figura 48, al normalizar los espectros se evidencia una mayor similitud entre los espectros de VC-CaPLiLX y VC en presencia de CaPLiLX, respecto al espectro de VC en PBS. Ambas muestras con liposomas observan un corrimiento del máximo de emisión hacia el azul, pasando de $\lambda_{em}=627\text{nm}$ en VC en PBS a $\lambda_{em}=622\text{nm}$ en VC-CaPLiLX y VC en presencia de CaPLiLX. Además, VC-CaPLiLX también presenta un ensanchamiento del espectro. Estas observaciones sugieren la interacción del fluoróforo con la superficie de los nanovehículos, independientemente de si se encuentran unidos químicamente o no. Dada la carga positiva del fluoróforo al pH de trabajo, no se descarta la interacción electrostática con la superficie de los CaPLiLX cargada negativamente. De hecho, se observó el mismo comportamiento entre el VC en solución acuosa y unido a una superficie de SiO_2 nanolitografiada [127].

Por otro lado, en la Figura 48 se evidencia una mayor intensidad de emisión de VC en la mezcla con CaPLiLX que en solución de PBS, a pesar de que la concentración de VC es más de 10 veces mayor. Esto puede asociarse con estudios publicados para la emisión del colorante cuando es incorporado en micelas, donde se observa un aumento de la fluorescencia cuando el VC, que a pH neutro se encuentra en forma catiónica, interactúa electrostáticamente con grupos aniónicos de micelas de dodecil sulfato de sodio (SDS) [128], en línea con la discusión anterior. En contraste, estudios publicados, observaron un apagamiento en la emisión en micelas de TX-100, atribuida a la formación de complejos entre el VC y los grupos polioxietileno del surfactante [128]. En este sentido, la estabilización electrostática entre el VC y los grupos superficiales aniónicos expuestos en los nanovehículos llevaría a un mayor rendimiento fluorescente.

Adicionalmente, se midió el tiempo de vida de la fluorescencia para VC en PBS y VC-CaPLiLX (unión química), a partir de los decaimientos de la Figura 49.

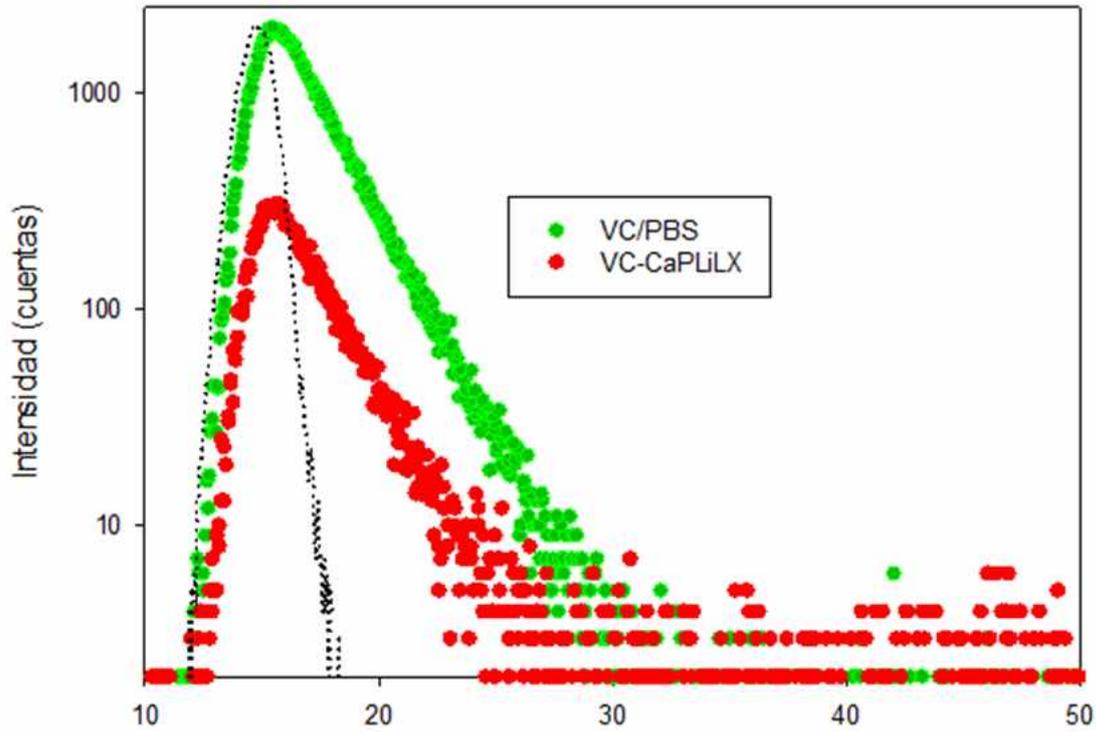


Figura 49. Perfiles de decaimiento TRES para VC en solución ($2,94 \times 10^{-4} M$) y unido a CaPLiX. Señal del NanoLED en negro. $\lambda_{exc} = 580 \text{ nm}$.

Para la muestra de VC en PBS, el análisis de las curvas de decaimiento permitió un ajustarse a un decaimiento monoexponencial con un tiempo de vida de fluorescencia de $\tau \approx 2,04 \pm 0,01 \text{ ns}$. El análisis del perfil de decaimiento fluorescente de la muestra de VC-CaPLiX, se ajustó con un decaimiento biexponencial, del que se obtuvo $\tau_1 \approx 2,04 \pm 0,03 \text{ ns}$ y $\tau_2 \approx (6,40 \pm 0,04) \times 10^{-3} \text{ ns}$. En este caso, se tomó τ_1 como el tiempo de vida para VC-CaPLiX, ya que tiempos de vida menores a $0,1 \text{ ns}$ se asocian a la dispersión de la luz, provocada por los nanovehículos recubiertos. Como se ve, los resultados muestran los mismos tiempos de vida para VC en solución e incorporada a VC-CaPLiX. En este sentido, se puede concluir que, si bien la interacción electrostática entre el VC y la superficie de CaP aumenta el rendimiento cuántico fluorescente, no cambia su tiempo de vida de emisión.

Por su parte, en la Tabla 10 se puede ver que hay un leve aumento en el diámetro hidrodinámico de los nanovehículos cuando se modifica superficialmente con VC y una importante disminución en el potencial *zeta*, relacionada con la disminución de los grupos carboxilo del CEPA expuestos debido a la unión con los grupos amino del VC de carga positiva al pH de trabajo.

Tabla 10. Resultados de DLS y potencial zeta para muestras funcionalizadas con VC: Violeta de cresilo, y FB: Fucsina básica.

Muestra	CaPLiLX	VC-CaPLiLX	FB-CaPLiLX
Diámetro promedio Z ± SD (nm)	171,8 ± 0,6	188 ± 3	NA
Índice de polidispersidad ±SD (Rango 0,05- 0,7)	0,204 ± 0,004	0,20 ± 0,02	0,69 ± 0,04
Distribución de tamaño por intensidad ± SD (nm)	212 ± 3	218 ± 1	219 ± 5
Potencial zeta ± SD (mV)	-51,2 ± 0,8	-20 ± 1	-15 ± 2
Movilidad electroforética ± SD (μmcm/Vs)	-4,01 ± 0,06	-1,60 ± 0,09	-1,2 ± 0,2

Se pudo corroborar que el violeta de cresilo se une efectivamente a la superficie modificada con CEPA de los nanovehículos recubiertos y encapsulando LX, lo cual muestra el potencial de los CaPLi para ser utilizados como sonda fluorescente mientras transportan fármacos de interés.

Fucsina básica

Se modificó la superficie de CaPLiLX con FB, utilizando el protocolo descrito anteriormente. Como puede verse en la Tabla 10, se dió una importante disminución de

la carga superficial de los nanovehículos cuando se funcionalizaron con fucsina básica, tal como se observó con el violeta de cresilo, sugiriendo el anclaje.

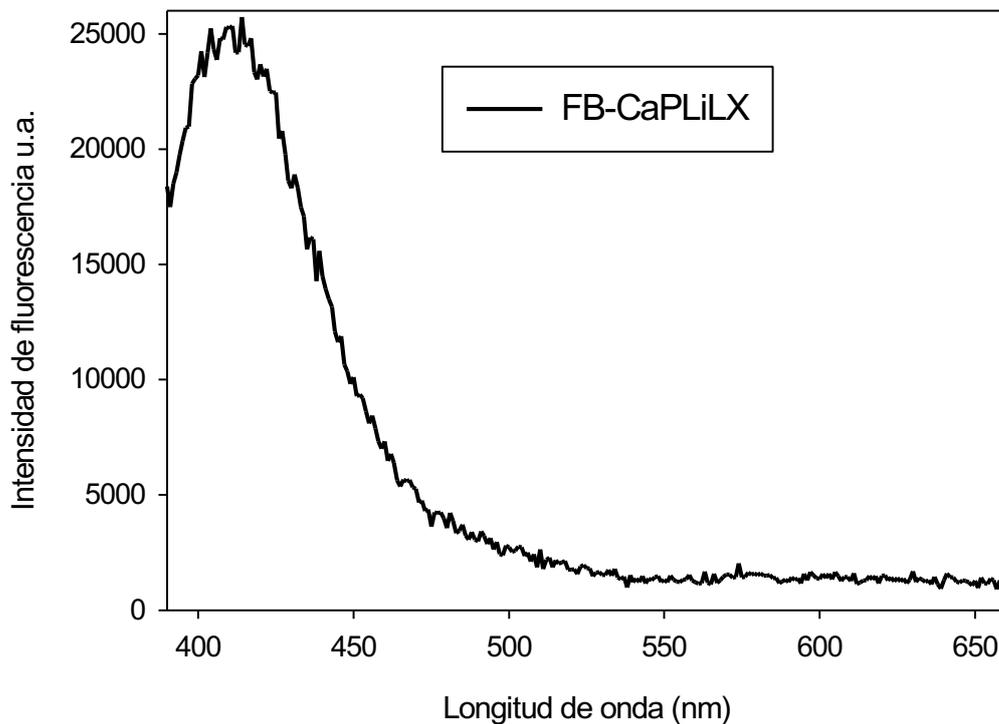


Figura 50. Espectro de emisión de FB-CaPLiLX con $\lambda_{exc}=330$ nm

De forma complementaria, se realizaron medidas de fotoluminiscencia de FB que permitieran constatar su unión a los nanovehículos de CaPLiLX. Inicialmente se tomó el espectro de FB-CaPLiLX a $\lambda_{exc}=330$ nm, esperando ver la emisión asociada a LX y a FB en simultáneo, como sucedió con VC-CaPLiLX. La Figura 50 evidencia sólo un máximo relacionado con la emisión de LX. En principio, es esperable no observar la emisión característica de FB ya que su intensidad de emisión de fluorescencia en soluciones acuosas es baja, como se ve en la Figura 51 para una solución $3,6 \times 10^{-4}$ M de FB en PBS bajo excitación a 550 nm [40].

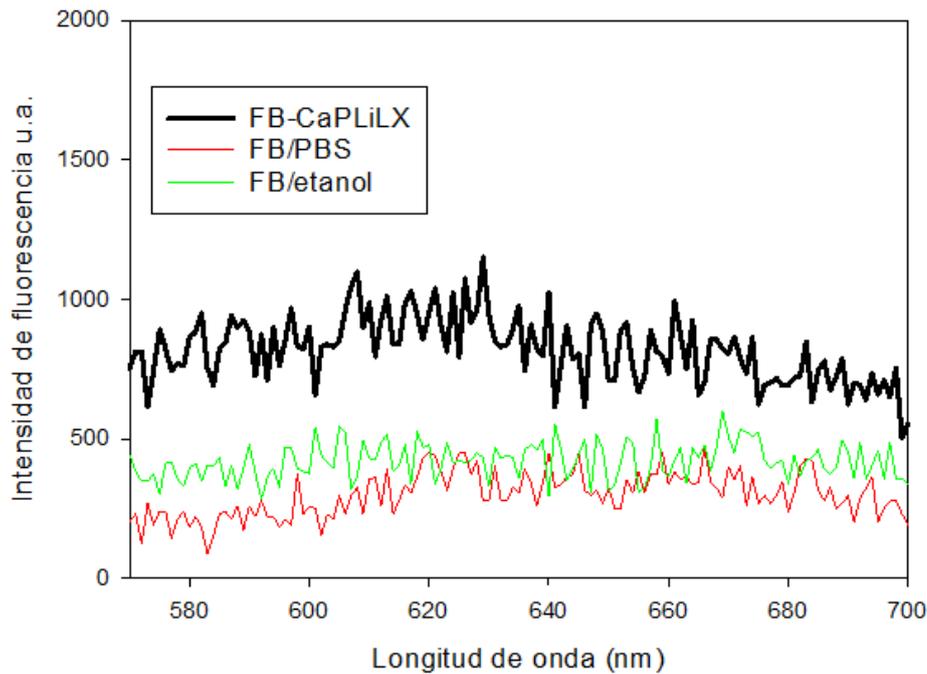


Figura 51. Espectro de fluorescencia de FB-CaPLiLX y FB en PBS y etanol ($[FB]=3,6 \times 10^{-4}$). $\lambda_{exc}=550$ nm.

Por otro lado, con $\lambda_{exc}=550$ nm tampoco se evidencia la emisión asociada a FB en el espectro, por lo cual este resultado no es concluyente para sugerir la presencia del fluoróforo. Por ende, se procedió a filtrar las muestras y cambiar el solvente a etanol, con el objetivo de determinar cualitativamente el anclaje de FB a los nanovehículos de CaPLiLX, tanto por unión química como por interacción física, ya que se ha reportado que la intensidad de fluorescencia de FB anclado a superficies de hidroxapatita aumenta en etanol respecto a su emisión en PBS, con un máximo característico a $\lambda_{emi}=620$ nm [40].

Para ello, se filtraron las muestras de FB-CaPLiLX y FB + CaPLiLX (mezcla) por membranas de politetrafluoroetileno de 100 nm y se lavaron repetidamente con etanol hasta que el filtrado no evidenció la presencia de FB mediante la banda de absorción UV-Vis a 550nm. La Figura 52 derecha muestra las imágenes de las membranas después de los lavados. Se puede observar la persistencia del color cuando FB se une químicamente en

presencia de EDC/S-NHS, mostrando que la fucsina permanece adsorbida en CaPLiLX después de un lavado completo. En cambio, la coloración se vio muy disminuida después del lavado de la mezcla FB+CaPLiLX y ausente cuando se tiene FB en solución etanólica.

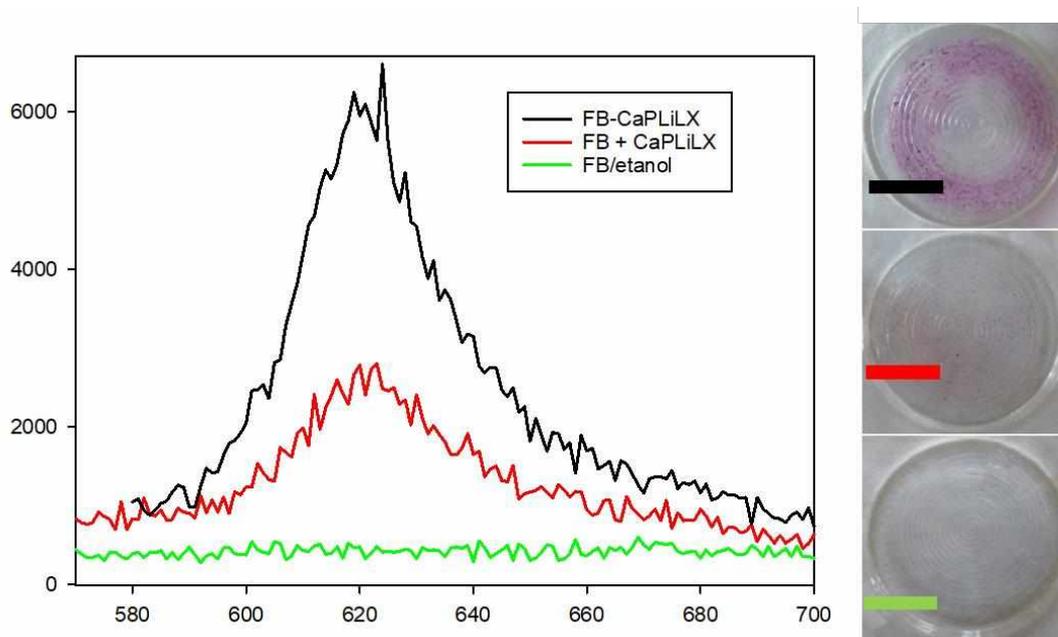


Figura 52. (izq.) Espectros de fluorescencia de FBCaPLiLX y FB+CaPLiLX resuspendidos y FB/etanol, con $\lambda_{exc}=550$ nm. (der.) Imágenes de membranas utilizadas para la filtración luego de lavar con etanol.

Adicionalmente, las membranas se sumergieron en 2 mL de etanol absoluto y se sometieron a baño ultrasónico durante 15 min. Luego, se tomó el espectro de emisión del material resuspendido en etanol para ambas muestras (unida químicamente y por simple mezcla), con una $\lambda_{exc}=550$ nm, como se muestra en la Figura 52 izquierda. Los espectros de estas muestras presentan una emisión centrada en 620 nm, donde, la intensidad de emisión de la muestra unida químicamente (FB-CaPLiLX) es mayor que la de la mezcla física, que evidentemente perdió FB durante los lavados. El aumento de la emisión de la FB interactuando con superficies, ya sea a través de una unión química como adsorbida físicamente puede explicarse por la mayor rigidez molecular que sufre la FB en esta condición. Se conoce que el rendimiento cuántico de fluorescencia de los colorantes de triarilmetano, como la fucsina básica, es mayor en una matriz sólida que

en medio líquido. La rigidez molecular del colorante en medio sólido parece reducir los procesos de relajación no radiativa que compiten con la fluorescencia [39]. Estos ensayos, por la tanto, comprueban la funcionalización superficial de los nanovehículos con FB y su adsorción sobre la superficie de los liposomas recubiertos.

Fluoresceína Isotiocianato y AEPA

Como se describió en la metodología de este capítulo, el anclaje de fluoresceína isotiocianato (FITC) se realizó sobre suspensiones de liposomas cuya cobertura de fosfato de calcio se controló con AEPA en vez de CEPA, lo cual deja grupos amino expuestos en la superficie de los nanovehículos, aptos para unirse a los grupos carboxilo del FITC mediante enlace amida. En este caso se activaron primero los grupos carboxilo del colorante con los entrecruzadores y luego se agregó la suspensión de (AEPA)CaPLiX. En la Figura 53 se muestra un esquema propuesto para dicho enlace.

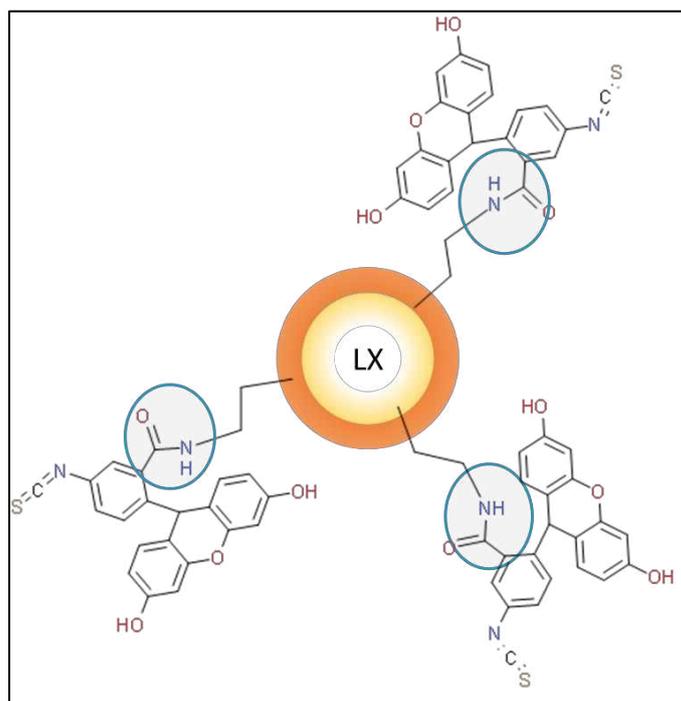


Figura 53. Esquema propuesto del anclaje de FITC a CaPLiX con AEPA superficial.

Para confirmar la presencia de AEPA sobre la cobertura, se tomó el espectro ATR-FTIR de muestras de AEPA-CaPLiLX, el cual se compara en la Figura 54 con el espectro de AEPA en solución y CaPLiLX (recubierto con CEPA). La muestra de AEPA presenta los picos en la región 930 - 1060 cm^{-1} característicos de los modos vibracionales de P-O, 1240 - 1265 cm^{-1} para C-H y 2930 cm^{-1} debido a vibraciones de estiramiento del enlace CH_2 . Para la muestra de AEPA-CaPLiLX, a parte de las bandas en la región 1040- 1060 cm^{-1} , características de los grupos P-O presentes en las coberturas de CaP, se pueden observar los modos vibracionales característicos de los grupos terminales NH_2 a 3400, 1650 y 1580 cm^{-1} , de CN a 1150-1100 cm^{-1} y la deformación CO- en enlaces amida a 1030 y 997 cm^{-1} , además de los picos a 2931 cm^{-1} característicos de vibraciones de los CH_2 del AEPA. Estos resultados respaldan el hecho de que el AEPA se encuentra sobre la capa de fosfato de calcio de los liposomas. Por otro lado, es interesante observar como la banda a 1560 cm^{-1} , que corresponde a carboxilato, aparece solamente para la muestra CaPLiLX.

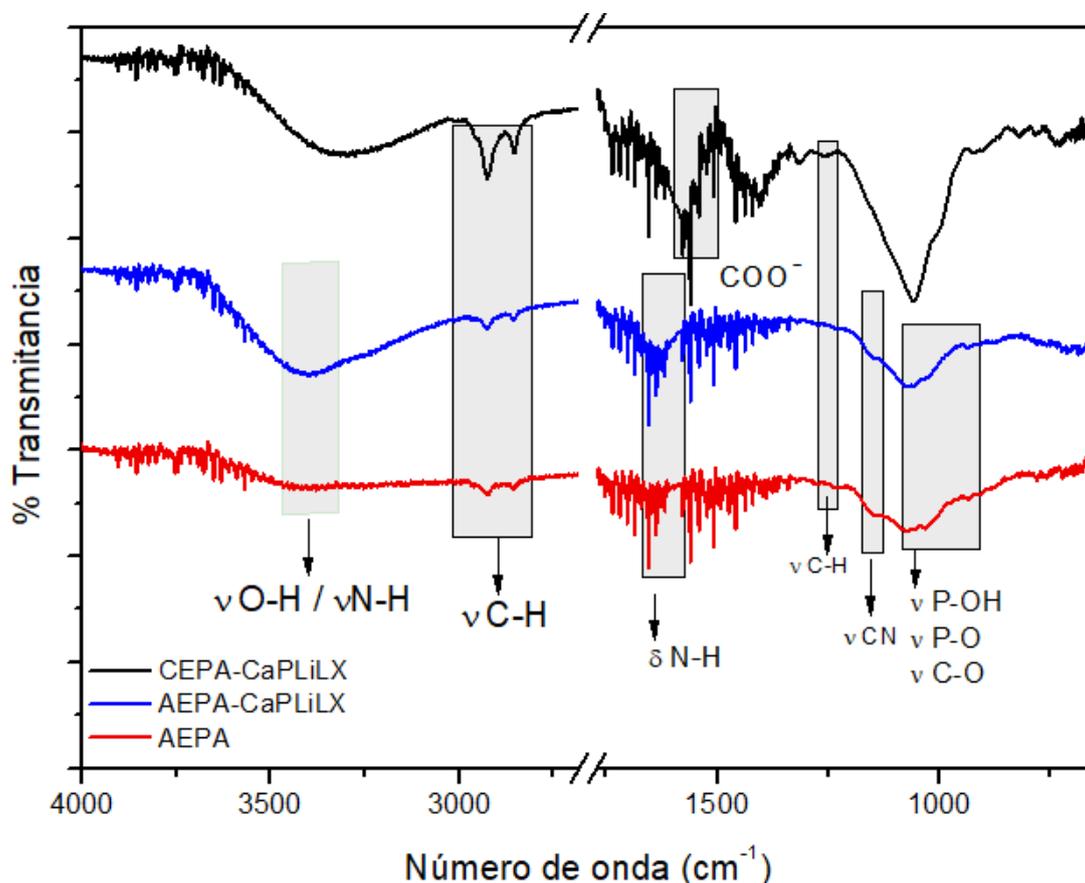


Figura 54. Espectros ATR-FTIR de AEPA y CaPLiLX con AEPA y CEPA en la cobertura.

Seguidamente, se midió el diámetro hidrodinámico y la carga superficial de los nanovehículos AEPA-CaPLiX y FITC-CaPLiX, cuyos resultados se resumen en la Tabla 11, en la que también se incluyó una columna con los resultados para CEPA con fines comparativos. Como se observa, hay una disminución en el carácter negativo de la movilidad electroforética cuando el control de la cobertura de CaP se hace con AEPA en vez de CEPA, lo cual se debe a la posible exposición de grupos amino superficiales menos negativos en lugar de grupos COO^- . Esto puede explicarse por el hecho de que las medidas de potencial *zeta* se tomaron a pH neutro y los grupos amino se encuentren parcialmente protonados a ese pH. Por otro lado, la carga negativa de CaPLi no sólo se debe a la presencia de los grupos superficiales del CEPA, sino también a grupos fosfato de la cobertura de CaP, lo que indicaría que se tiene una cobertura parcial de la superficie con AEPA. A pesar de ello, la carga superficial neta garantiza la estabilidad coloidal de las formulaciones.

Llama la atención el tamaño mucho menor de los liposomas recubiertos con AEPA respecto de aquellos recubiertos con CEPA. Pareciera que el AEPA termina el proceso de cobertura de los liposomas con la capa amorfa de CaP antes que el CEPA. Dado que no se optimizó el proceso de terminación con AEPA y solo se repitió en su síntesis el proceso optimizado para CEPA, resta optimizar el crecimiento de la capa de CaP y su terminación con AEPA de forma de obtener capas lo suficientemente anchas para los fines buscados, tal como se discute en los próximos capítulos de esta tesis.

Cuando se funcionaliza con FITC, hay un leve aumento de la carga negativa en la movilidad y un aumento en el diámetro hidrodinámico que sugieren la conjugación de los grupos amino del AEPA superficial y, por lo tanto, la incorporación del colorante FITC.

Tabla 11. Resultados de DLS y potencial zeta para muestras funcionalizadas con FITC.

Muestra	(CEPA) CaPLiLX	(AEPA) CaPLiLX	FITC-CaPLiLX
Diámetro promedio Z ± SD (nm)	171,8 ± 0,6	NA	NA
Índice de polidispersidad ±SD (Rango 0,05- 0,7)	0,204 ± 0,004	0,213 ± 0,007	0,32 ± 0,01
Distribución de tamaño por intensidad ± SD (nm)	212 ± 3	117 ± 6	165 ± 38
Potencial zeta ± SD (mV)	-51,2 ± 0,8	-31 ± 2	-37 ± 3
Movilidad electroforética ± SD (μmcm/Vs)	-4,01 ± 0,06	-2,4 ± 0,1	-2,9 ± 0,3

Adicionalmente, se realizaron medidas de luminiscencia y se analizaron los espectros de emisión de fluorescencia de FITC, tanto en PBS como unido químicamente en FITC-CaPLiLX. Primero se excitó la muestra de FITC-CaPLiLX a 330nm (Figura 55), obteniendo un espectro de emisión donde se pueden ver los máximos asociados a LX (450 nm) y a FITC (517 nm), confirmando la presencia del colorante y del antibiótico encapsulado.

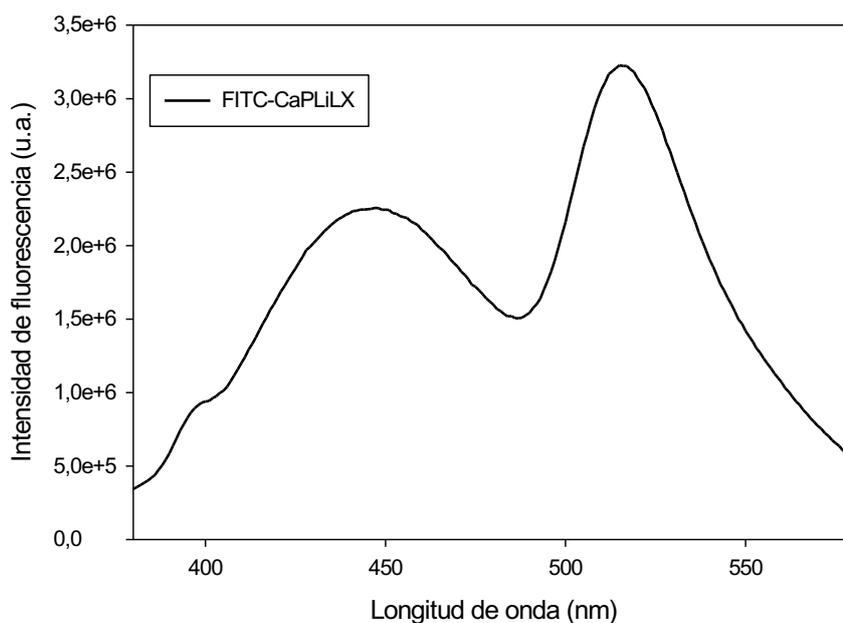


Figura 55. Espectro de emisión de FITC-CaPLiLX con $\lambda_{exc}=330$ nm. $[FITC]=5,3 \times 10^{-7} M$

Luego se comparó el espectro normalizado del fluoróforo en solución con el de FITC-CaPLiLX, excitando a la longitud de onda de máxima absorción del FITC ($\lambda_{exc}=470$ nm) y tomando la emisión en el rango 490-680 nm (Figura 56).

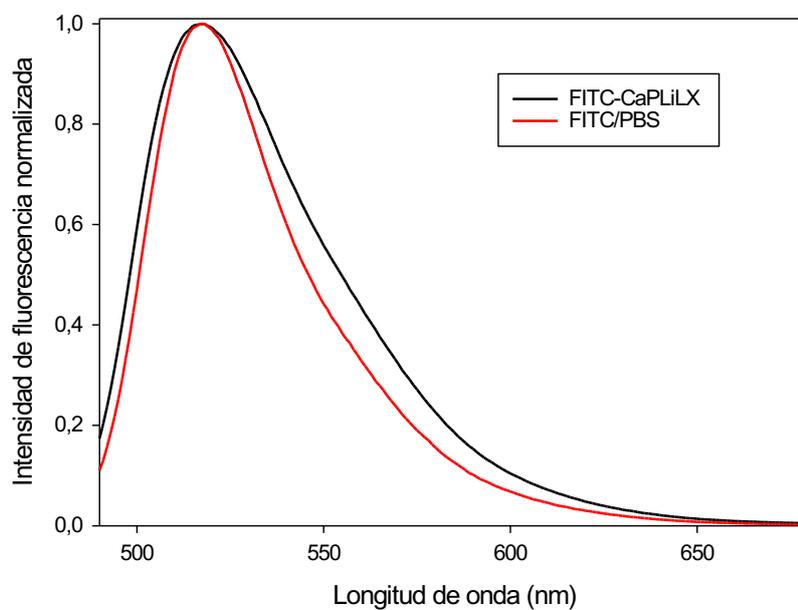


Figura 56. Espectros de emisión de FITC-CaPLiLX ($[FITC]_{max.} 5,3 \times 10^{-7} M$) y FITC/PBS $7,7 \times 10^{-6} M$ con $\lambda_{exc}=470$ nm.

Si bien se observa el máximo de emisión característico del FITC a 517 nm en ambas muestras, hay un ensanchamiento del espectro de FITC-CaPLiLX que coincide con lo observado cuando el colorante se une a proteínas, asociado con el efecto del ambiente local y posible agregación del fluoróforo [129]. En conjunto, los resultados anteriores sugieren la presencia de AEPA en la superficie de los nanovehículos sintetizados, así como la unión del FITC que permitiría su uso como sonda fluorescente.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

Con respecto a los métodos probados para la síntesis de los nanovehículos se pudo determinar que, para el uso de los liposomas como portadores de carga y plantillas para el recubrimiento, la mejor forma de síntesis fue la sonicación, ya que permite la obtención de mayores volúmenes de suspensión liposomal y mayor porcentaje de encapsulación con un procedimiento simple y reproducible. Además, no se detectó la presencia de metales desprendidos de la sonda por técnicas de difracción ni EDS, por lo cual la sonicación fue adecuada. Por otro lado, la elección del DOPA como fosfolípido para la formación de los liposomas favorece la deposición de la capa de fosfato de calcio gracias a los grupos fosfato en la cabeza polar. La carga superficial negativa de los liposomas contribuye a su estabilidad y evita la agregación de partículas.

Se sintetizaron liposomas recubiertos con fosfato de calcio amorfo esféricos y de tamaño 90 -160 nm de acuerdo con lo visto por técnicas microscópicas, DLS, potencial *zeta* y espectroscopía ATR-FTIR. También se confirmó la presencia de calcio en la cobertura mediante ICP-OES y se estimó una concentración de CaP de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$; sin embargo, resta conocer la concentración de fósforo, mediante técnicas como ICP-MS y espectroscopía ^{31}P RMN, por ejemplo, que permita conocer la relación Ca/P en los nanovehículos.

Se demostró la capacidad de los liposomas recubiertos de incorporar fármacos modelo como los antibióticos fluoroquinolónicos levofloxacin y ciprofloxacina. La distribución de los fármacos dentro del núcleo acuoso y/o en las bicapas se determinó mediante técnicas basadas en fluorescencia. Se pudo concluir que los antibióticos se encapsulan en diferentes entornos de los liposomas y permiten el seguimiento por su fluorescencia intrínseca.

Se comprobó la incorporación del bisfosfonato alendronato dentro de los nanovehículos de CaPLiAD en cantidades detectables por ^1H RMN. Además, tales concentraciones son semejantes a las encontradas en fármacos comerciales como Osteonate[®] y Alendex[®]. También se pudo evaluar un método espectrofotométrico para la cuantificación indirecta de AD mediante su derivatización con DNFB, el cual fue efectivo para determinar concentraciones de AD en el rango de 7,4-14,7 mM de los liposomas LiAD. Además, la eficiencia de encapsulación está en excelente acuerdo con lo determinado mediante ^1H RMN.

Se pudo ver que el uso de CEPA para la posterior funcionalización superficial de los nanovehículos fue adecuado. Se derivatizó y caracterizó la superficie de los liposomas con AD, VC y FB, en la cual se dio la formación de enlaces amida entre los carboxilatos superficiales de los CaPLiLX con los grupos aminos de estas moléculas en fase acuosa, utilizando entrecruzadores comerciales. Por su parte, también se obtuvieron nanovehículos recubiertos con una capa de CaP y terminados con grupos amino. En este caso, los liposomas recubiertos pudieron derivatizarse con FITC utilizando también entrecruzadores comerciales que propiciaron la formación del enlace amida entre los grupos carboxilos del FITC y los grupos amino del AEPA.

Vale discutir, que técnicas como la termogravimetría (TGA), isothermas de adsorción de nitrógeno (BET), y XPS, accesibles en el ámbito de trabajo, hubiesen sido de gran ayuda para determinar la composición química de los grupos superficiales y el grado de recubrimiento por moléculas orgánicas en los nanovehículos. Lamentablemente, estas no pudieron utilizarse en este trabajo debido al contenido acuoso de las muestras y baja cantidad de materia (1 mg DOPA/mL), que dificultaron su filtración para separar el sólido y analizarlas por estas técnicas.

En conjunto, los resultados de este capítulo muestran que se pudieron obtener los nanosistemas de liposomas recubiertos con fosfato de calcio amorfo, se pudieron

incorporar distintas drogas y modificarlos superficialmente con otras, mostrando la versatilidad de estos nanovehículos para el potencial desarrollo de formulaciones que permitan encapsular y transportar fármacos. Además, la funcionalización de las nanopartículas recubiertas con CEPA y AEPA permitió derivatizar la superficie de los liposomas con colorantes y AD, que amplían la potencial utilización de estos vehículos para el direccionamiento al tejido óseo y seguimiento de su ubicación mediante medidas de microscopía de fluorescencia.

En el capítulo siguiente se mostrarán los resultados de ensayos de liberación en solución y del estudio del comportamiento de los CaPLi sobre distintas superficies para continuar evaluando su potencialidad.

CAPÍTULO 4.
ESTUDIOS DE
LIBERACIÓN E
INTERACCIÓN CON
SUPERFICIES

1. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de entrega controlada de fármacos deben ser estudiados respetando los parámetros fisiológicos y fisicoquímicos que debe cumplir la droga usada como tratamiento de una determinada enfermedad para que resulte efectiva. Para ello, es de vital importancia conocer la cinética de liberación, concentración y permanencia de los fármacos en los sitios de interés, tanto cuando se la administra como droga sólida, en solución o a través de vehículos que las contengan y liberen bajo estímulos específicos.

Para el tratamiento de enfermedades en el hueso, es deseable que los vehículos para el transporte de fármacos sean capaces de dirigirse hasta el sitio dañado donde deberán liberar su contenido. Para ello, la compatibilidad con la matriz inorgánica del hueso, mayoritariamente formada por hidroxiapatita, es un requisito importante. En el caso de traumatismos óseos que requieren la reparación del hueso fracturado, es de interés la incorporación de nanosistemas de reparto en andamios o injertos que se utilicen en ingeniería de tejidos. Esto produciría un sistema completo y sinérgico de rehabilitación ósea y suministro de drogas y biomoléculas de interés.

En este capítulo se describen estudios para elucidar la cinética de liberación del antibiótico levofloxacina y del bisfosfonato alendronato desde nanovehículos de CaPLi en distintos medios, variando el pH y la concentración de iones en solución. También se evaluó la interacción entre CaPLiX y distintas superficies modificadas con calcio, y la posible inclusión de los nanovehículos dentro de andamios de biovidrio y de seda, materiales que se utilizan en implantes en hueso, desde donde pudieran liberar su contenido y formar un sistema sinérgico con las estructuras.

Las muestras de andamios de biovidrio y de nanopartículas de hidroxiapatita utilizadas para los ensayos de este capítulo fueron sintetizadas y provistas por la Dra. Maria Laura Dittler. Por otro lado, las muestras de andamios de seda fueron sintetizadas y provistas por la Lic. Victoria Machaín.

2. METODOLOGÍA.

2.1. Liberación en solución.

2.1.1. Levofloxacin.

Los liposomas recubiertos sintetizados por sonicación se incubaron en PBS, buffer acetato y SBF para estudiar la liberación en función del pH y contenido de iones en el medio. Se utilizó levofloxacin como droga modelo. El experimento consistió en introducir en bolsas de diálisis de 2,7cm x 4,7cm (área expuesta), 3mL de suspensión de CaPLiLX dializada y, en otro ensayo, 3 mL de LX en solución como control. Luego, las bolsas de diálisis se sumergieron en vasos de precipitado de 250mL con 200mL del medio de liberación elegido y se incubaron a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ y se agitaron a 80rpm durante 75 horas [91]. A diferentes intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas de 2mL del medio de liberación y se reemplazaron con medio fresco para mantener constante el volumen. Los ensayos se realizaron por duplicado.

La concentración de LX en las alícuotas se determinó midiendo la intensidad de la fluorescencia a 450 nm (tampón PBS y SBF) o 495 nm (tampón de acetato), y comparando con una curva de calibración de concentración de LX en los mismos medios. La tasa de liberación de LX (RR) se calculó mediante $RR=(Q_n/W)$ donde W es el contenido de moles de LX en 3mL de una suspensión de CaPLiLX $9 \times 10^{-6}\text{M}$ y Q_n es la masa liberada acumulada en cada intervalo de tiempo “n” [44]. Q_n puede calcularse como se ve en la Ecuación 10:

$$Q_n = C_n \times V_0 + \sum_{i=0}^{n-1} C_i \times V_i$$

Ecuación 10. Cálculo para la liberación de LX en solución.

Donde C_n =Concentración molar de la alícuota tomada en el tiempo n , V_0 =200 mL (volumen del medio de liberación), C_i = Concentración molar de la alícuota i y V_i =2mL de volumen de las alícuotas tomadas.

2.1.2. Alendronato.

De manera análoga, se estudió la liberación de alendronato desde 3mL de suspensión de CaPLiAD, cuya concentración de AD estimada por ^1H RMN fue $1,28 \times 10^{-3}$ M, a distintos tiempos en buffer PBS, con el objetivo de dilucidar su cinética a pH fisiológico. Las condiciones experimentales fueron las mismas descritas en la sección anterior para LX, con variaciones en los tiempos de toma de las alícuotas. Para la detección del bisfosfonato se utilizaron las dos técnicas ya descritas. Por un lado, las alícuotas fueron derivatizadas con DNFB y medidas por espectrofotometría (Capítulo 3, sección 2.5); y por el otro la presencia de AD en las alícuotas se determinó por ^1H NMR.

2.2. Interacción con superficies ricas en calcio.

2.2.1. Interacción con mica modificada.

Se utilizó AFM para estudiar la interacción de las muestras de LiLX, CaPLiLX y AD-CaPLiLX con superficies de mica ricas en Ca^{2+} . La medida se realizó en modo dinámico (*tapping*) evitando así cambios inducidos por fuerzas laterales. En todos los casos, se gotearon 10 μl de las muestras sobre sustratos de mica recién escindida con y sin la adición previa de 10 μL de CaCl_2 0,1 M. Las muestras se secaron con N_2 durante 10 minutos y se analizaron mediante el uso de sondas dopadas con nitruro de silicio (Modelo RTESP, Bruker, Santa Barbara, CA, EE. UU.; radios de punta, 8–12 nm, 271–311 kHz, constante de fuerza 40 N m^{-1}). Las imágenes se obtuvieron a 25°C con un microscopio de sonda de

barrido multimodo equipado con un controlador Nanoscope V a la velocidad de barrido típica (1 Hz).

2.2.2. Interacción con nanopartículas de HAp sobre vidrio y ruptura de CaPLi.

Para confirmar la interacción de los liposomas recubiertos con las superficies enriquecidas con Ca^{2+} , específicamente con nanopartículas de hidroxiapatita (HAp), se prepararon muestras que portaban el colorante naranja de acridina, denominadas CaPLiNA. La síntesis se realizó por sonicación, tal como se describe en la sección 2.1.3 del capítulo anterior para los nanovehículos cargados con antibióticos y AD. En este caso, se obtuvieron CaPLiNA con una concentración de carga de $100 \mu\text{M}$ de NA antes de diálisis [34]. Esto con el objetivo de poder seguir una posible liberación del contenido en caso de ruptura de los CaPLi, ya que el colorante NA permite una excelente observación a través del microscopio de epifluorescencia.

El experimento consistió en depositar las muestras sobre portaobjetos de vidrio y portaobjetos de vidrio previamente modificados con nanopartículas de HAp, las cuales presentaron una relación $\text{Ca/P}=1,67 (\pm 0,1)$, estructura cristalina y longitudes de 50-100nm [1]. La modificación se realizó depositando por goteo suspensiones de las nanopartículas de HAp sintetizadas y provistas también por la Dra. Dittler [52], sobre la superficie del vidrio previamente lavado y dejando secar por 24h.

Inmediatamente después de la deposición de CaPLiNA (tomado como tiempo inicial) y después de 10 y 180 minutos de tiempo de contacto, las superficies se observaron con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX51, Olympus Corp., Tokio, Japón) equipado con un filtro #WB (espejo dicróico DM500, filtro de excitación BP450-480, filtro de emisión BA515). El microscopio se conectó a una cámara de vídeo en color Olympus

DP71 (Olympus Corp., Tokio, Japón). Las imágenes se tomaron instantáneamente después de abrir el obturador del microscopio en el monitor de la computadora y en condiciones experimentales idénticas. Se observaron también los portaobjetos modificados y sin modificar con HAp antes de la deposición. El ensayo se realizó por duplicado y las imágenes fueron analizadas con el software Image J.

2.2.3. Interacción con andamios de biovidrio modificados con nanopartículas de HAp.

Usando un microscopio electrónico de barrido ambiental se observó la interacción de liposomas recubiertos con andamios de biovidrio prístinos y modificados con nanopartículas de hidroxiapatita. El experimento, por duplicado, consistió en sumergir los andamios (BGS y HAp-BGS) en 2 mL de CaPLiLX por 10 y 120 minutos. Luego, la preparación de la muestra para visualizar por SEM involucró pasos de fijación y deshidratación. La fijación se realizó sumergiendo los andamios en una solución de glutaraldehído al 2% a 4°C durante 2 h y lavando con una solución tampón de PBS (pH 7,4). La deshidratación se realizó mediante inmersión secuencial en mezclas frías de etanol y agua (30%, 50%, 70%, 90% y 95% de EtOH), seguido de dos procesos de inmersión en etanol absoluto a temperatura ambiente durante 20 min. Las muestras se trataron mediante secado en punto crítico para reemplazar los líquidos por CO₂ y luego se metalizaron con Au.

2.3. Retención de CaPLiLX en andamios de seda.

La interacción de los liposomas recubiertos con andamios de seda se evaluó a través de la visualización por microscopía electrónica de barrido y a través de la retención del

antibiótico levofloxacin en el andamio, siguiendo su fluorescencia. El primer ensayo consistió en preparar una solución 1:1 de CaPLiLX con agua y sumergir los andamios preparados por síntesis acuosa en glicerol (GL) o lixiviados con sal (*salt-leaching* SL). Ambas muestras se dejaron agitando a 80rpm y temperatura ambiente durante 20 horas, luego se extrajeron los andamios y se pusieron a secar en cajas de Petri cubiertas con aluminio en estufa a 60°C durante 50 horas. Posteriormente fueron cortados y metalizados para su visualización por SEM.

El segundo ensayo consistió en probar la liberación de LX desde los CaPLiLX depositados en los andamios de seda. Se probó entonces sumergir un andamio sintetizado por *salt leaching* (SL) en 5mL de CaPLiLX y dejarlo en contacto por 24 horas. Luego se secó en estufa a 60°C por un día. Seguidamente el andamio SL se incubó en 50mL de PBS (pH 7,4) a 37°C y 80rpm por 48 horas. Finalmente se midió la intensidad de fluorescencia de CaPLiLX antes del ensayo y la de LX en el medio de liberación (PBS) finalizado el experimento.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Liberación de LX en función del pH y modelado matemático.

En la Figura 57 se presentan los perfiles de liberación de LX en solución acuosa desde bolsas de membrana de diálisis, sumergidas en buffers PBS y acetato. Se observa que la liberación en PBS se produce casi por completo en menos de 3 horas en condiciones de agitación constante y fuerza iónica de 0,16 M y pH 7,4. Por otro lado, en solución tampón de acetato de $I=0,009$ M y pH 4,35; el fármaco se transfirió completamente al medio en menos de una hora. Estas observaciones sugieren que la difusión fuera de la membrana de diálisis puede limitar los estudios de liberación de LX desde CaPLiLX para tiempos de liberación de unas pocas horas, dependiendo del medio. En línea con esta hipótesis, se

graficó también el perfil de liberación de LX desde muestras preparadas por mezcla de LX y CaPLi vacíos, en PBS y SBF.

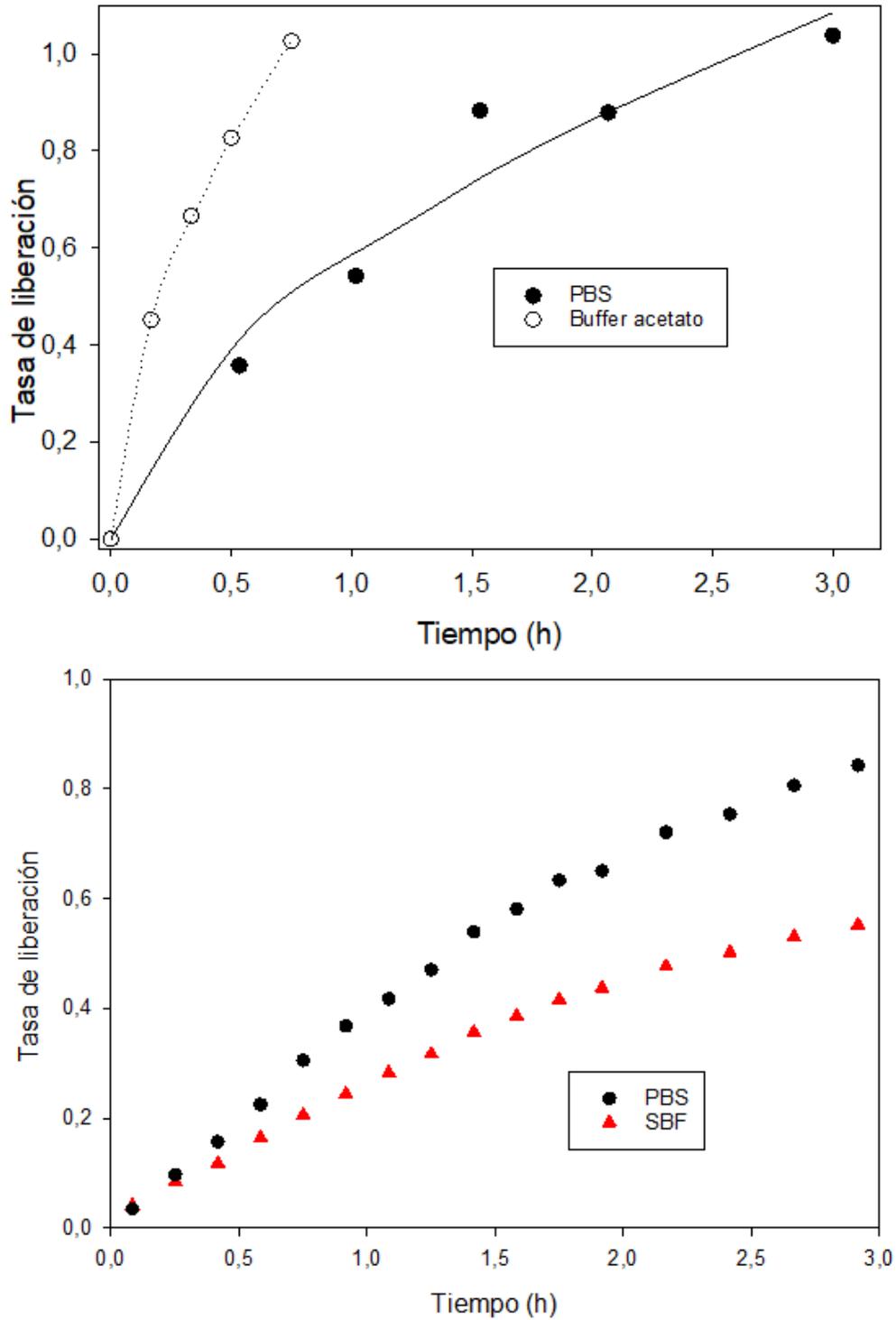


Figura 57. Arriba: Perfiles de liberación de LX en solución. Las líneas representan el ajuste al modelo Kosmeyer-Peppas. abajo: Liberación de LX adsorbido sobre CaPLi vacíos.

El ensayo experimental consistió en poner en contacto CaPLi vacíos con una solución acuosa de LX para una concentración final de $100\mu\text{M}$ (la carga habitual de los LiLX). Se dejó agitando a 80rpm por un día. Se procedió a estudiar la liberación del sistema CaPLi+LX en SBF y PBS a 37° y 80rpm para estudiar la cinética del LX adsorbido en la superficie exterior del nanovehículo. Se pudo observar que, dentro de las tres primeras horas, difunde aproximadamente el 80% del LX en PBS, mientras que sólo lo hace un 50% desde SBF, mostrando que una parte del LX puede quedar adsorbido externamente sobre los CaPLi en ese tiempo.

El fármaco encapsulado en vesículas de CaPLiLX y sumergido en PBS, tampón de acetato y medio SBF (ver Figura 58), mostró una liberación inicial rápida del orden de 35-45% en todos los medios estudiados durante las primeras horas. Esta liberación coincide con la observada para la muestra de LX adsorbida en la capa externa de los liposomas vacíos en medio PBS [95], [130], [131]. Dado que la liberación masiva tiene lugar en la misma ventana de tiempo que la difusión de LX desde la membrana de diálisis, como se puede observar en la Figura 57 para experimentos en PBS, debe considerarse en el análisis de los mecanismos de liberación de fármacos de estos experimentos.

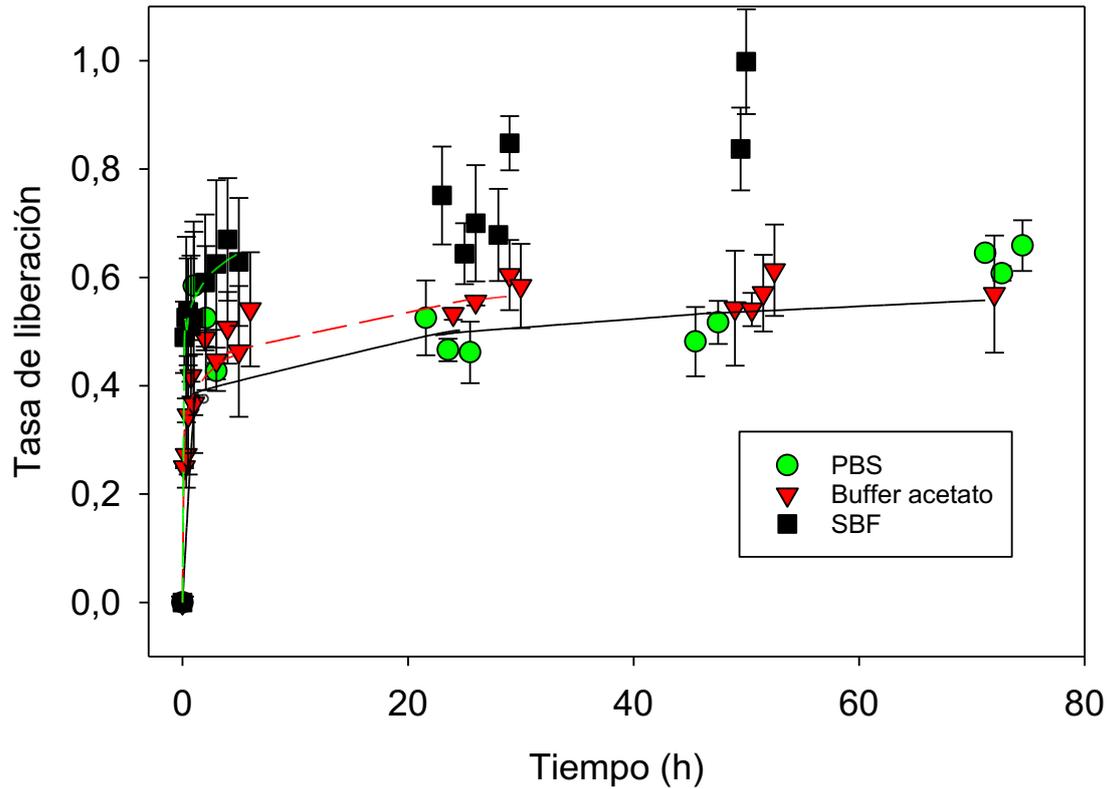


Figura 58. Perfiles de liberación para LX encapsulado en CaPLiLX. Las curvas representan el ajuste al modelo Korsmeyer-Peppas (hasta aproximadamente 0,6). Las barras son la desviación estándar.

Para obtener información sobre los mecanismos de liberación implicados, la fracción de fármaco liberada en el tiempo t (RR) hasta $RR=0,6$ de todas las curvas de la Figura 58, se ajustó al modelo de Korsmeyer-Peppas (KP), desarrollado con base en la liberación de fármacos hidrosolubles desde matrices poliméricas y también aplicado a materiales y compositos CaP-cerámicos porosos [22], [132]. El modelo es de utilidad para describir la liberación de principios activos cuando no se conoce el proceso que controla su liberación o bien este es la combinación de un proceso de liberación difusional que sigue las leyes de Fick y otro tipo de transporte no Fickiano.

Para ello, se ajustaron las curvas de RR frente al tiempo (ver líneas en la Figura 58) a la relación de KP $RR = k_{KP} \times t^n$, donde k_{KP} es la constante de velocidad de liberación que depende de las características físicas y estructurales del vehículo y del fármaco, y n es el exponente de liberación que depende del mecanismo de liberación del fármaco y de la geometría del vehículo. Los parámetros ajustados se muestran en la Tabla 12 y se obtuvieron con un coeficiente de determinación $r^2 > 0,90$. Los valores de k_{KP} obtenidos son, dentro del error experimental, similares para LX adsorbido en la superficie de CaPLi y para CaPLiLX, ambos en solución tampón PBS (pH 7,4) y acetato (pH 4,35), apoyando así que el vehículo tiene la misma naturaleza en todos los casos. Sin embargo, el ajuste para la liberación desde CaPLiLX en SBF presenta un valor $k_{KP} = 0,55$, lo que podría asociarse a una modificación en la estructura del nanovehículo, mediada por la presencia de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} en el medio de liberación, que no están presentes en los otros medios estudiados.

Tabla 12. Parámetros obtenidos a partir de datos ajustados a los modelos de liberación de fármacos Korsmeyer-Peppas y Weibull, para la cinética de liberación de LX desde CaPLiLX en distintos fluidos, adsorbido sobre CaPLi y en solución de PBS.

Modelo	Korsmeyer-Peppas $RR = k_{KP} \times t^n$		Weibull $RR = 1 - \exp(-t^b/a)$	
	k_{KP}	n	a	b
CaPLiLX en SBF	0,55±0,01	0,14±0,02	1,23±0,06	0,13±0,02
CaPLiLX en Buffer acetato	0,39±0,02	0,11±0,02	2,0±0,1	0,15±0,02
CaPLiLX en PBS	0,35±0,02	0,11±0,02	2,4±0,2	0,17±0,03
LX libre en PBS	0,59±0,05	0,6±0,1	--	--
LX adsorbido sobre CaPLi en PBS	0,39±0,01	0,88±0,02	--	--

Por otro lado, los valores del exponente de liberación n fueron, dentro del error experimental, del orden de 0,11 para la liberación de LX encapsulado en CaPLiLX en los tres medios estudiados. Según la bibliografía, esto indica que en todos los medios ocurre el mismo fenómeno de transporte, asociado a un mecanismo difusional de Fick, ya que $n \leq 0,43$ se reporta como el valor límite para este mecanismo en muestras esféricas monodispersas [133]. En este caso, el valor de n observado puede estar parcialmente relacionado con distintas formas de interacción de LX sobre la superficie del nanovehículo, teniendo en cuenta que el antibiótico tiene que salir desde los distintos entornos del liposoma, incluida la capa de CaP, lo que puede conducir a un proceso de liberación acelerado en tiempos cortos y a un transporte desacelerado en tiempos largos [133].

La ecuación de KP ($RR=k_{KP} \times t^n$) tiene dos casos especiales con significado físico: cuando $n=0,5$, que indica liberación de fármaco controlada por difusión y cuando $n=1,0$, que indica liberación de fármaco de orden cero [134]. El modelo cinético de orden cero, también conocido como transporte de caso II en ciencia de polímeros o modelo de cinética ideal, se utiliza para describir fármacos que se liberan lentamente y mantienen constantes los niveles de concentración durante la administración, por lo cual la tasa de entrega no depende de su concentración; se puede aplicar para describir la liberación de fármacos a partir de formas de dosificación recubiertas, productos con baja solubilidad en agua y sistemas osmóticos [135]. Para vehículos con geometría esférica se ha determinado que los casos especiales de n son 0,43 y 0,85, por lo cual, un valor de $0,43 < n < 0,85$ puede considerarse como un indicador de la superposición de ambos fenómenos descritos, llamado también transporte anómalo. En este trabajo, la liberación de LX libre muestra una $k_{KP}=0,59$ y $n=0,6 \pm 0,1$, dominada por la difusión; mientras que LX adsorbido sobre la superficie externa de CaPLi ($n=0,88 \pm 0,02$), más cercano a $n=0,85$, se asemeja a un caso II de transporte, en consonancia con la desorción del fármaco desde la superficie y difusión a través de la bolsa de diálisis.

Adicionalmente, para efectos comparativos, el conjunto completo de datos también se ajustó al modelo de Weibull que considera la difusión de drogas a través de materiales porosos [136], como se observa en la Tabla 12. En este caso se utilizó la relación $RR=1-\exp(-t^b/a)$, donde el valor del parámetro b es indicativo del tipo de mecanismo de liberación y “ a ” es un factor de escala. El ajuste de los datos de liberación al modelo de Weibull corresponde a $r^2>0,91$ para todos los medios. Sin embargo, los valores de $b<0,35$ obtenidos para todas las muestras no se encuentran con frecuencia en la literatura y se atribuyen a materiales altamente desordenados.

En conjunto, estos resultados respaldan que cualquier liberación de LX desde vesículas de CaPLiLX en PBS y tampón de acetato se produce inicialmente a partir de LX adsorbido en la capa exterior de CaP de la nanoestructura. Tal liberación de fármaco se produce dentro de la misma ventana de tiempo que la difusión de LX libre en el medio fuera de la membrana de diálisis. Teniendo en cuenta que, después de la primera liberación en masa, no se observa este fenómeno desde CaPLiLX en PBS y tampones de acetato, se puede concluir que LX adsorbido en la superficie de la capa exterior del vehículo equivale a un 40 a 45% del antibiótico total contenida en los CaPLiLX.

3.1.1. Efecto del contenido de iones del medio.

Como se observa en los resultados previos, la respuesta de CaPLiLX en SBF evidencia una situación diferente, puesto que hay una liberación preferencial del fármaco, cercana al 90% luego de 50 horas en este medio, lo que indica que la composición iónica del SBF es responsable de la liberación mejorada, ya que el pH es el mismo que en PBS. Además, el parámetro del modelo de Korsmeyer-Peppas $k_{KP}=0,55$ sugiere una alteración en el nanovehículo que facilita la entrega del fármaco.

Teniendo en cuenta el carácter amorfo del recubrimiento de CaP según lo determinado por los experimentos de DRX, se planteó la hipótesis de que la presencia de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} en SBF puede estar involucrada en la liberación mejorada de fármacos de los nanoportadores. En una primera instancia, mediante DRX y WAXS se exploró la posible transformación del fosfato de calcio amorfo (ACP) en apatita cristalina en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} , en línea con estudios en la literatura que indican la transformación de fosfatos de calcio amorfos conteniendo aminoácidos en apatita cuando se los sumerge en una solución que contiene una sal de calcio [137].

El patrón DRX (Figura 39) obtenido para CaPLiLX depositado en un portaobjetos de vidrio con una solución que contiene Ca^{2+} (como CaCl_2 0,05 M) coincide con el obtenido en ausencia de la sal de iones divalentes. Ambas muestras presentan una banda ancha a $2\theta \sim 25^\circ$ típica de una muestra amorfa. Además, los patrones experimentales de WAXS que se muestran en la Figura 40 presentan la misma banda ancha en el rango $20-40^\circ$, típico de las muestras amorfas, tanto para CaPLiLX en PBS como suspendidas en una solución de Ca^{2+} (CaCl_2 0,05 M). En conjunto, los datos DRX y WAXS confirman que no se produce una formación significativa de una fase cristalina de fosfato de calcio cuando la capa de CaP entra en contacto con los iones de calcio.

Por otra parte, la formación de un complejo de coordinación entre los grupos carboxilo superficiales de las nanopartículas y los iones Ca^{2+} está bien documentada en la bibliografía [138]. Teniendo en cuenta que la superficie de CaP de las nanocápsulas termina con la unión de moléculas de CEPA, dicha superficie es abundante en grupos carboxilo (ver resultados ATR-FTIR). Por ello, se propone la hipótesis de que la unión de los iones Ca^{2+} a estos grupos carboxilo superficiales puede desencadenar el desmontaje de toda la estructura, lo que finalmente conduce a la liberación del fármaco. En ese sentido, se demostró en literatura que la presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} puede conducir al colapso de las terminaciones carboxílicas de coloides esféricos y provocar también su agregación [139], [140].

Con el propósito de confirmar dicha hipótesis, se evaluaron el diámetro hidrodinámico y la carga superficial de las muestras de CaPLiLX luego de estar en presencia de iones divalentes (Ca^{2+} y Mg^{2+}) a una concentración de 0,05M por 24 horas, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Diámetro y movilidad electroforética de CaPLiLX en ausencia y presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} .

Muestra	Diámetro (nm)(±SD)	Movilidad electroforética ($\mu\text{mcm/Vs}$) (±SD)	PDI
CaPLiLX	171,8 ± 0,6	-4,01 ± 0,06	0,204 ± 0,004
CaPLiLX+ Ca^{2+}	832 ± 86	-0,49 ± 0,06	0,75 ± 0,05
CaPLiLX+ Mg^{2+}	1182 ± 134 (64%) 228 ± 33 (36%)	--	0,79 ± 0,04

Se observó un aumento del diámetro hidrodinámico del nanomaterial en suspensión y la consiguiente disminución de la movilidad electroforética en presencia tanto de Ca^{2+} como de Mg^{2+} , respecto a las muestras de CaPLiLX en ausencia de cationes divalentes. Estas observaciones respaldan la formación de nanomaterial aglomerado mediada por complejos carboxilo-cación divalente [141]. También se observó un aumento significativo de la movilidad (menos negativa) en presencia de cationes divalentes. El orden del índice de polidispersidad PDI ($\geq 0,70$) en presencia de los iones divalentes indica una muestra extremadamente polidispersa.

Teniendo en cuenta lo anterior y la liberación mejorada de LX en SBF (ver Figura 58), el efecto de los cationes divalentes en la aglomeración y el consiguiente desmontaje de las nanocápsulas en solución están fuertemente respaldados. En vista de estos resultados y teniendo en cuenta el objetivo de desarrollar un nanoportador de fármacos que responda a las superficies de Ca^{2+} , se exploró más a fondo el comportamiento de las

nanocápsulas de CaP sobre superficies enriquecidas con Ca^{2+} mediante diversos estudios de microscopía, como se verá a partir de la sección 3.3 de este capítulo.

3.2. Liberación de AD.

Con el objetivo de elucidar la cinética de liberación del bisfosfonato alendronato a partir de liposomas recubiertos CaPLiAD, se realizaron ensayos de liberación en PBS (pH=7,4) de manera análoga a los ensayos de la sección anterior con LX, por 24h a 37°C y 80rpm. El ensayo se hizo por duplicado tomando alícuotas de 2mL de PBS (medio de liberación) a 0,5, 1, 2, 4 y 24h. También se realizó el ensayo para el blanco de AD en H_2O . Como primer resultado, se midió la concentración de AD en las alícuotas mediante UV-Vis, previa derivatización con DNFB, como se ve en la Figura 59. Cabe aclarar que la absorbancia detectada corresponde a la dilución de las muestras para realizar la derivatización con DNFB (ver Sección 2.5 Capítulo 3).

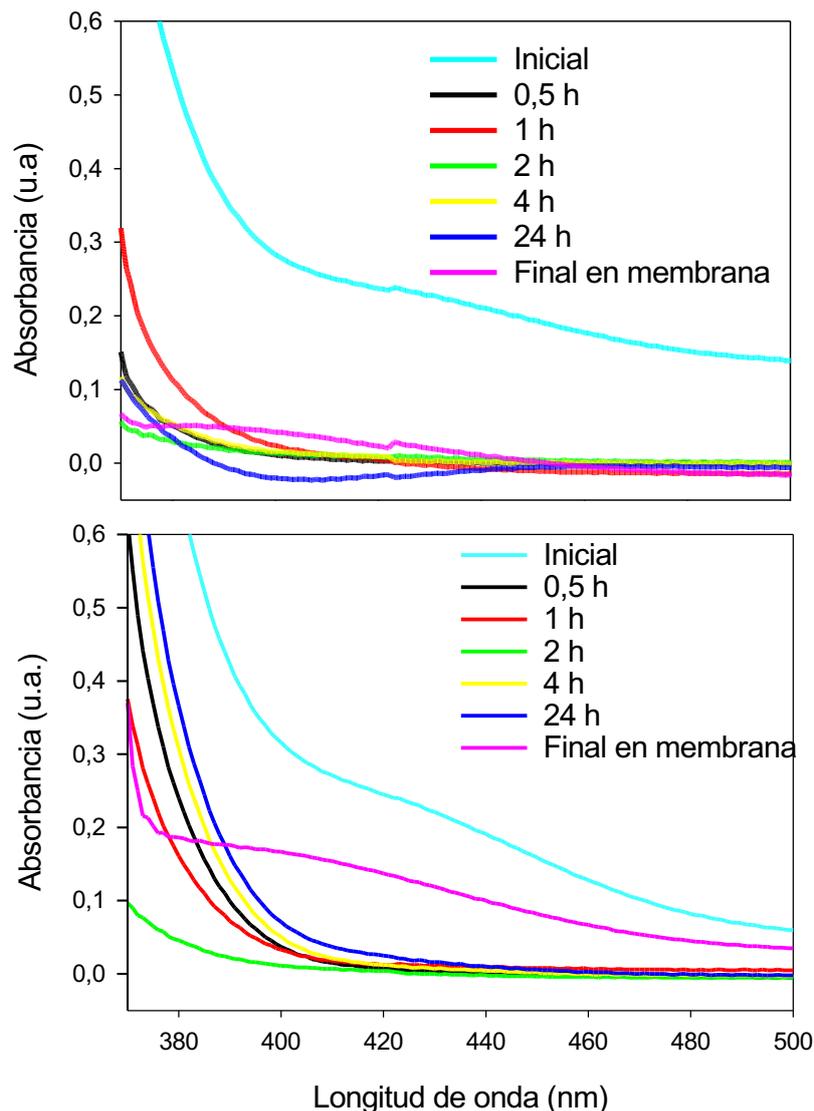


Figura 59. Espectro de absorción de alícuotas de AD (arriba) y CaPLiAD en PBS (abajo).

La Figura 59 muestra que, para ambos ensayos, el método UV-vis no resultó lo suficientemente sensible para medir la cantidad de Alendronato liberada en el tiempo. No obstante, se pudo comparar la concentración de AD en la bolsa de diálisis, antes y después de 24 h en que se concluyó el ensayo (final en membrana). Mientras que para AD libre en solución, todo el fármaco salió de la membrana luego de 24 hs, para CaPLiAD se observa AD remanente en los liposomas luego de este tiempo. Estos resultados se muestran en la Tabla 14. Se observa que hay una permanencia estimada del 5% del alendronato luego de 24h de liberación bajo condiciones controladas de temperatura y agitación.

Tabla 14. Concentración estimada de AD en CaPLiAD por Uv-Vis luego de liberación.

Muestra	Abs a 420nm	[mM] detectada	[mM] real	% Permanencia
CaPLiAD inicial	0,2450	0,113	5,6	5,5 %
CaPLiAD final en membrana (24h)	0,1370	0,063	0,3	

Por otro lado, se reprodujo el ensayo de liberación y se tomaron muestras a tiempos cero, 2, 24 y 48h, esta vez para medir por ^1H RMN la concentración de alendronato y contrastar con lo obtenido por espectroscopía UV-Vis. Las muestras medidas corresponden a la suspensión de CaPLiAD dentro de la membrana de diálisis en los tiempos mencionados, pues la concentración de AD que sale al medio de liberación no pudo ser detectada. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Concentración estimada de AD en CaPLiAD por ^1H RMN luego de liberación. ND: No detectado.

Tiempo (h)	0	2	24	48
[mM]	$1,28 \pm 0,07$	$0,61 \pm 0,05$	ND	ND
% Permanencia	--	48 %	--	--

Como indican los resultados, existe una diferencia entre la concentración de alendronato que puede ser detectada por cada método, ya que por UV-Vis aparece un porcentaje de permanencia del 5% de AD en CaPLiAD a las 24h, mientras que por ^1H RMN, la cantidad de AD no fue detectable en ese tiempo. Esto se debe a la diferencia en los rangos de concentración que detecta cada técnica para las muestras estudiadas. Por un lado, el rango de linealidad para la curva de calibración por absorbancia es 10-60 μg AD/mL, equivalente a 0,03-0,18 mM, y por el otro, la mínima concentración que se pudo detectar de alendronato por ^1H RMN fue de aproximadamente 0,2 mg AD/mL, equivalente a 0,615 mM. En consecuencia, la presencia de AD a las 24h pudo ser detectada por absorbancia y no por ^1H RMN ya que la concentración estimada de 0,063

mM AD (ver Tabla 14), está dentro del rango de linealidad del método por UV-Vis pero es inferior al valor mínimo del método por resonancia magnética nuclear. Este resultado es de utilidad a la hora de elegir una metodología de medición de acuerdo con la concentración esperada del bisfosfonato.

Finalmente, con el objetivo de evaluar la pérdida espontánea de carga de los nanovehículos de CaPLiAD, se midió por ^1H RMN la concentración de AD en la muestra inicial del ensayo luego de 40 días en condiciones de almacenamiento (heladera a 4°C en frasco ámbar). El resultado fue $0,89 \pm 0,03$ mM, lo que indica que permanece hasta un 70% de la carga de AD en los nanovehículos, en comparación con $1,28 \pm 0,07$ mM de concentración inicial. Por otro lado, en el ensayo de liberación a 37°C y 80rpm, se libera casi un 50% de la carga en las primeras 2 horas (ver Tabla 15). Esto indica que la entrega del bisfosfonato a partir de CaPLiAD es altamente sensible a la temperatura, pH y condiciones mecánicas en las que se encuentre.

El alendronato es un compuesto muy hidrofílico que no puede ser detectado mediante técnicas de fotoluminiscencia, por lo cual su incorporación dentro de nanosistemas de entrega controlada y el desarrollo de metodologías para su detección son desafíos en los que se continúa trabajando. Los ensayos de liberación aquí realizados solo permiten estimar la incorporación y condiciones de entrega de AD en medio neutro, además de comparar su cuantificación por dos metodologías independientes.

3.3. Interacción con superficies de mica estudiadas por AFM.

Se tomaron imágenes de AFM de los nanovehículos de LiLX, CaPLiLX y AD-CaPLiLX depositadas sobre la mica con y sin el uso de CaCl_2 , con el objetivo de estudiar las diferencias y el posible efecto del Ca^{2+} . En la Figura 60 se pueden ver las imágenes topográficas tomadas por AFM.

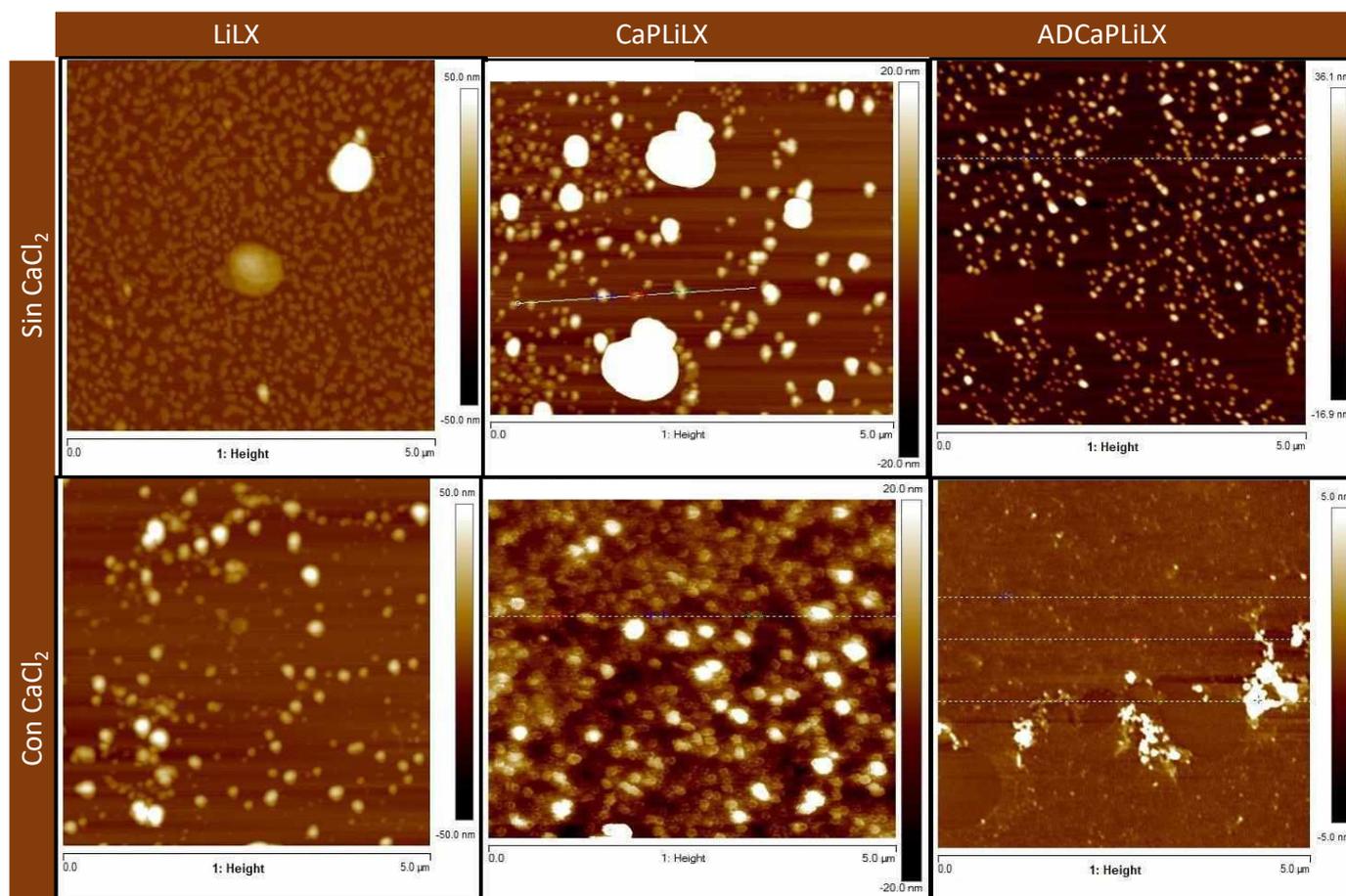


Figura 60. Imágenes AFM de LiLX, CaPLiX y AD-CaPLiX sobre mica con y sin Ca^{2+} .

Efectivamente, las imágenes en la Figura 60 tomadas para LiLX depositadas sobre la mica enriquecida con CaCl_2 muestran que las vesículas permanecen en la superficie manteniendo su forma, en concordancia con lo visto por TEM (ver Figura 20). Es una práctica frecuente en AFM utilizar CaCl_2 para fijar las vesículas sobre la superficie de mica y así evitar que la punta del microscopio las desprenda. Sin embargo, las imágenes de CaPLiX y AD-CaPLiX depositadas en presencia de CaCl_2 muestran la agregación y formación de cúmulos de partículas que dificultaron el recorrido de la punta por la superficie, tal como se deduce de los perfiles de altura de dichas muestras mostradas en las Figura 61 y Figura 62, respectivamente. Los perfiles de altura corresponden a la sección transversal de la imagen, donde se representan con una línea que atraviesa de forma horizontal. Las líneas punteadas en el perfil de altura se trazan para medir el

diámetro de los nanovehículos del color correspondiente, tomando la longitud de la base de cada pico.

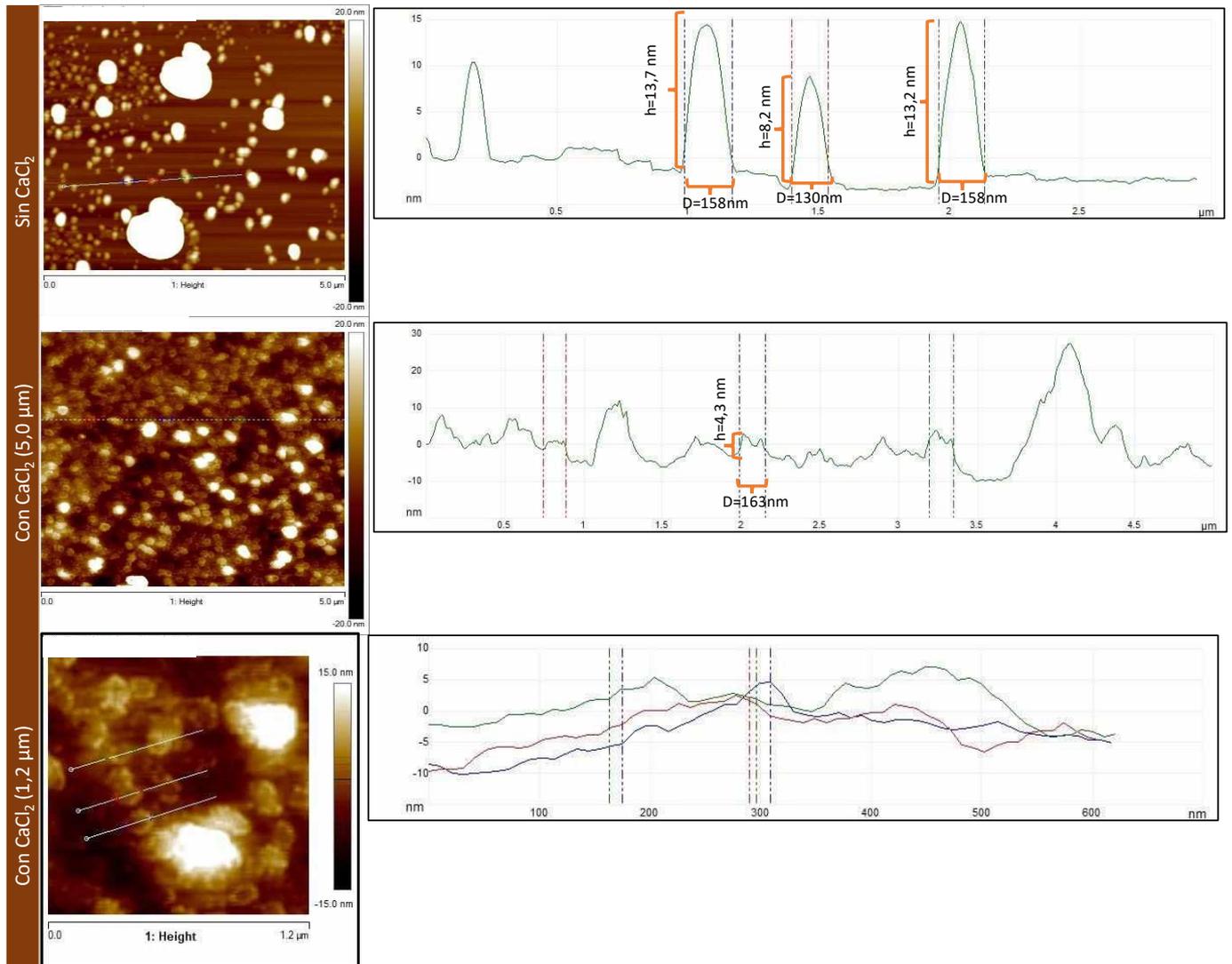


Figura 61. Imágenes AFM de CaPLiX sobre mica con y sin Ca²⁺ con sus respectivos perfiles de altura.

Como se puede observar en la imagen de nanocáscaras de CaPLiX depositadas en ausencia de calcio, están presentes nanovehículos y algunos aglomerados, mientras que el perfil de altura mostró nanopartículas bien definidas con una altura promedio de 9,8 nm y un diámetro promedio de 132,5 nm, en línea con los resultados de DLS y microscopía electrónica. En contraposición, las imágenes de CaPLiX depositadas sobre mica con el tratamiento previo con iones Ca²⁺, mostraron la agregación, aplastamiento

y arrastre de las nanocáscaras en la superficie. Además, las formas irregulares registradas por la sonda son evidentes en el perfil de altura, tanto para 5,0 como para 1,2 μm , donde se presenta una altura de cerca de 4 nm, en coincidencia con lo observado para un espesor de bicapa de fosfolípidos [125], [142]. El resultado sugiere la ruptura de la cubierta de CaP cuando la muestra está en contacto con una superficie rica en Ca^{2+} , dejando los liposomas expuestos y provocando su desacoplamiento en la superficie.

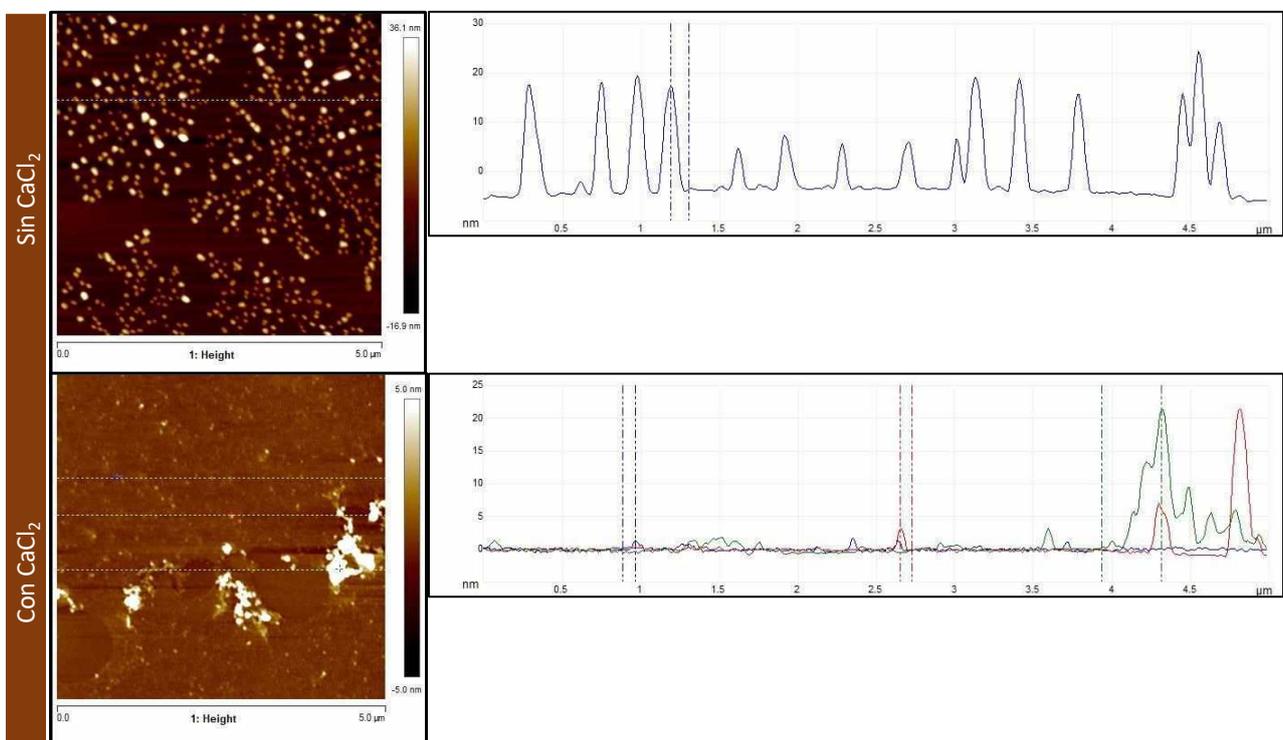


Figura 62. Imágenes AFM de AD-CaPLiLX sobre mica con y sin Ca^{2+} con sus respectivos perfiles de altura.

En el caso de los nanovehículos funcionalizados de AD-CaPLiLX, también hay una influencia notable de los iones Ca^{2+} sobre la agregación de los liposomas, observada tanto en las imágenes topográficas como en los perfiles de altura, donde se presentan vesículas definidas y distribuidas con una altura promedio de 20 nm cuando no hay calcio, mientras que la presencia del ion genera cúmulos de liposomas recubiertos. Cabe

notar que el anclaje del alendronato en la superficie podría amortiguar el rompimiento de las nanopartículas en presencia de calcio, ya que en comparación con los CaPLiLX sin funcionalizar, la disrupción observada para AD-CaPLiLX es menos agresiva.

3.3.1. Efecto del alendronato en AD-CaPLiLX

De acuerdo con los resultados de AFM, hay un posible efecto del alendronato superficial en la disrupción del liposoma recubierto al interactuar con calcio sobre la mica, haciendo que la ruptura de los CaPLiLX se vea amortiguada en cierta medida por el AD anclado en los AD-CaPLiLX. Con el objetivo de profundizar en dicho efecto y confirmar si hay una ralentización en la liberación de la carga de los nanovehículos por la presencia del bisfosfonato superficial, se realizaron ensayos de liberación de levofloxacin a partir de AD-CaPLiLX en PBS y se compararon los resultados con los obtenidos previamente para CaPLiLX en el mismo medio. El procedimiento experimental fue el mismo descrito en la sección 2.1.1 del presente capítulo, tomando alícuotas a tiempos 0, 1, 2, 4 y 24 horas. El resultado se muestra en la Figura 63.

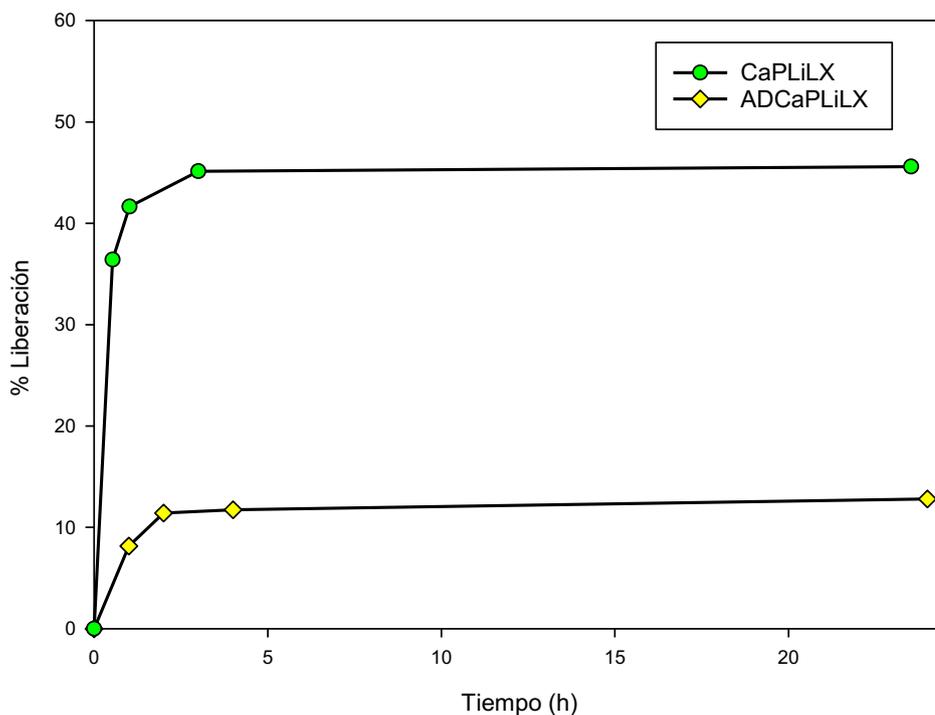


Figura 63. Perfiles de liberación para LX encapsulado en CaPLiLX y AD-CaPLiLX en PBS.

Se puede observar una liberación inicial rápida para LX desde AD-CaPLiLX tal como ocurre para CaPLiLX; sin embargo, hay una diferencia considerable en la carga que sale de los nanovehículos cuando están modificados superficialmente con alendronato, reduciéndose aproximadamente 30% en las primeras 3-4 horas. Además, dentro de las 24h del ensayo, no se detecta más del 12% del antibiótico liberado al medio, lo que indica una notable limitación en la entrega de la carga a partir del vehículo funcionalizado. Esto puede deberse a la interacción entre el bisfosfonato y el calcio de la cobertura de CaP en la superficie del nanovehículo, como se discutirá a continuación.

El tejido óseo sufre una reconstrucción constante y se equilibra gracias a los osteoblastos que producen hueso y a los osteoclastos que destruyen el hueso (resorción ósea). Cuando esta relación está desbalanceada, se presenta una actividad de los osteoclastos mayor a la tasa en la que los osteoblastos pueden generar nuevo tejido óseo, provocando enfermedades como la osteoporosis. Es entonces cuando intervienen los bisfosfonatos como droga de tratamiento, ya que previenen la digestión del hueso al inducir apoptosis o muerte celular en los osteoclastos, lo que disminuye la velocidad de destrucción ósea [143]. Debido a su gran afinidad por el calcio, los bisfosfonatos una vez ingeridos son rápidamente aclarados de la sangre y selectivamente adsorbidos por las superficies minerales óseas, formando quelatos con el ion Ca^{2+} como esquematiza la Figura 64. Los bisfosfonatos permanecen en la superficie mineral hasta que son liberados y “engullidos” por los osteoclastos [144].

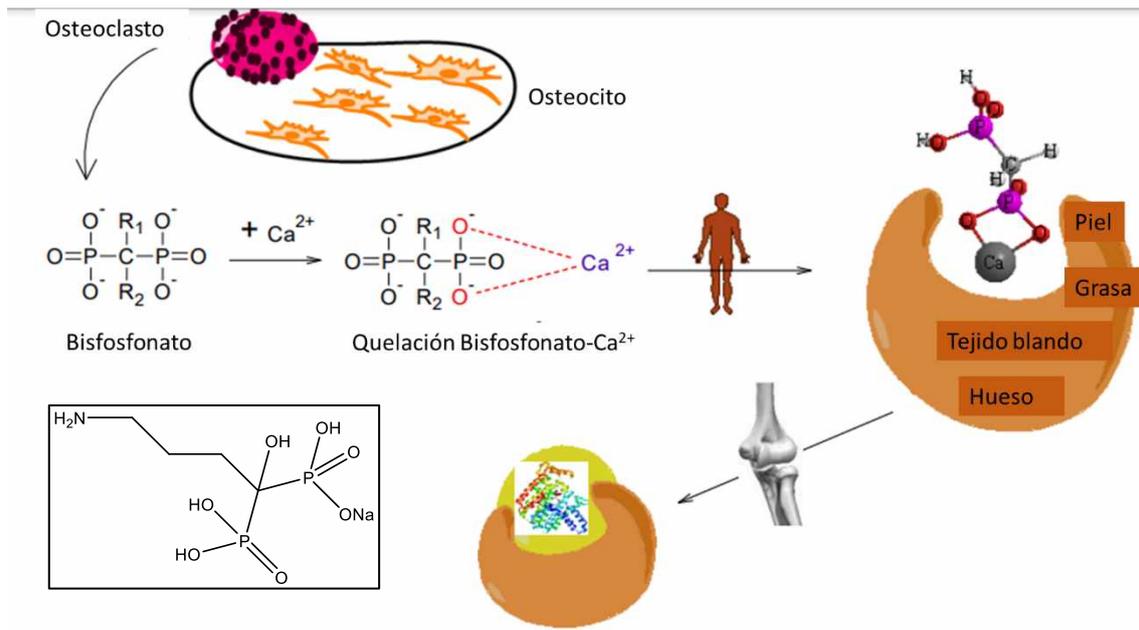


Figura 64. Mecanismo de quelación de bisfosfonatos al hueso del cuerpo humano. Tomado de [143].
Recuadro: molécula de alendronato.

La capacidad de los bisfosfonatos para inhibir la resorción ósea depende fundamentalmente de dos propiedades de la molécula: a) la acción de anclaje de los dos grupos fosfonados que se ve potenciada cuando hay un grupo hidroxilo en posición R1, ya que dan una mayor unión a la superficie ósea conformando una estructura tridentada quelante de los iones de calcio; y b) la conformación estructural y tridimensional de la cadena lateral en R2, que influencia la capacidad para interactuar con otras moléculas específicas, determina su actividad biológica e influye en gran parte en la potencia de la resorción ósea del compuesto, como se ha demostrado con compuestos como el pamidronato y el alendronato, que son del orden de 10-100 veces más potentes por la característica de contener un nitrógeno en su secuencia [144]. Se puede ver entonces que en particular el alendronato es un bisfosfonato muy afín al tejido óseo y con alta tendencia a formar quelatos con el calcio, por la presencia del grupo OH en R1 y de -(CH₂)₃-NH₂ en R2.

En el caso de los sistemas de AD-CaPLiX sintetizados en este trabajo, se propuso un mecanismo de unión del alendronato a la superficie del nanovehículo mediante un

enlace amida entre el $-NH_2$ del AD y los grupos $-COOH$ del CEPA (ver Sección 3.5.1 Capítulo 3). No obstante, también puede presentarse la quelación entre los grupos fosfato del AD y el calcio presente en la cobertura, dando lugar a un complejo estable e insoluble entre el AD y los CaPLi que limita la disrupción de las nanovesículas y la liberación de la carga, como indican los resultados de AFM y liberación en PBS. Estos resultados son de gran interés a la hora de diseñar nanovehículos compuestos, que además de alojar fármacos en su interior, permitan ejercer un control sobre la cinética de entrega a través de la modificación con grupos superficiales compatibles.

3.4. Interacción con andamios de biovidrio estudiadas por SEM.

Para explorar el efecto de la especiación del calcio en la interacción de los nanovehículos con superficies enriquecidas con distintas sales de calcio, se obtuvieron imágenes SEM de CaPLiX depositadas sobre andamios de biovidrio (BG) y andamios de biovidrio con hidroxiapatita (HAp-BG) después de 10 y 120 minutos de contacto (Figura 65). Para una mejor comparación, también se muestran imágenes del andamio BG sin modificar y modificado con HAp antes del contacto con los nanovehículos.

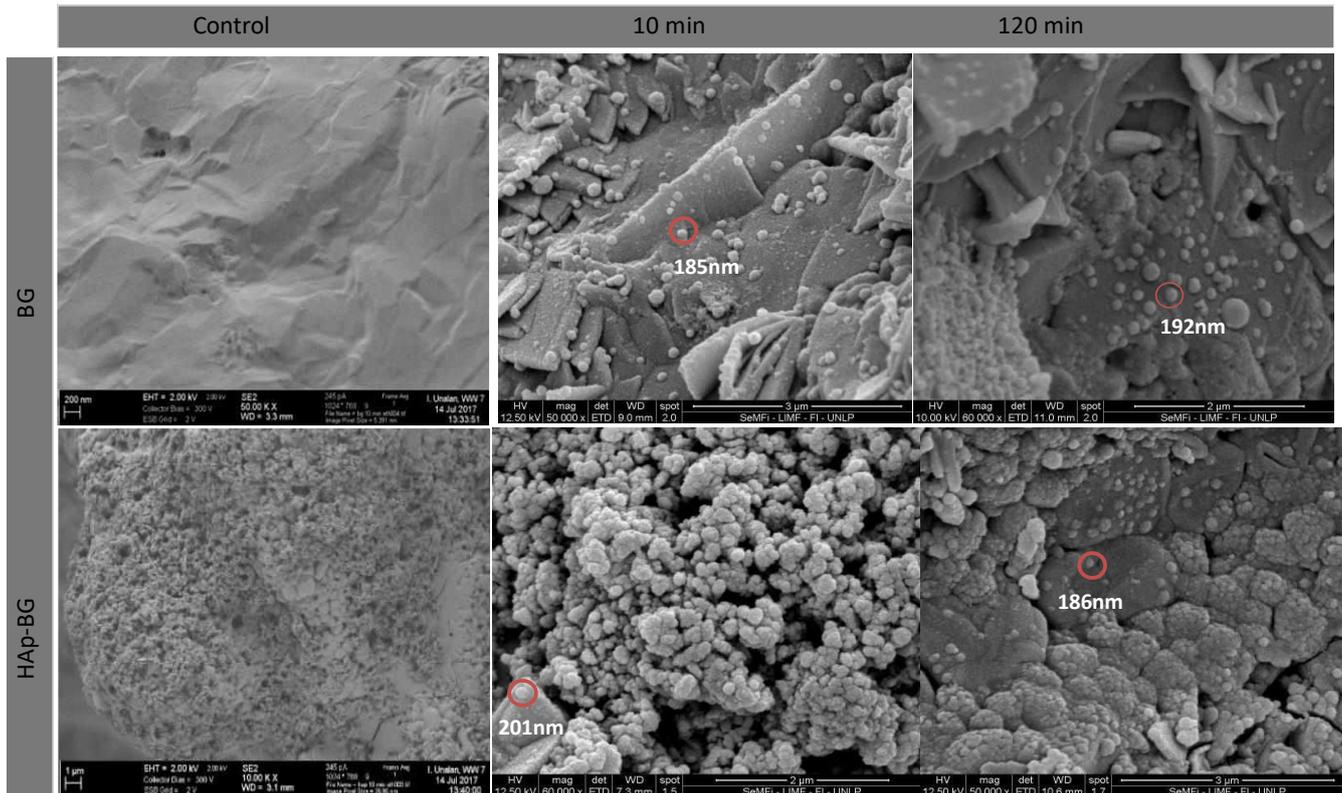


Figura 65. Imágenes SEM de la interacción de CaPLiX con biovidrio modificado con HAp (abajo) y sin modificar (arriba) a 10 min y 120 min de tiempo de contacto. También se muestran imágenes de control del biovidrio antes de la deposición de CaPLiX.

Como se puede observar en las imágenes, hay una adhesión y acumulación de CaPLiX sobre ambas superficies estudiadas casi inmediata, a partir de los 10 min de contacto. En el caso del andamio sin modificar, los nanovehículos muestran una distribución uniforme sobre la superficie, mientras que para HAp-BG, se observa la adsorción de los CaPLiX tanto sobre la superficie de BG como sobre las nanopartículas de HAp, para ambos tiempos de contacto, pudiéndose ver algunos nanoliposomas enteros. En principio, ambas superficies son aptas para la adsorción de los nanovehículos, aunque nada se puede concluir con las imágenes de SEM sobre la ruptura de las nanocápsulas.

3.5. Interacción con superficies de vidrio estudiada por microscopía de Epifluorescencia.

Finalmente, para confirmar la ruptura de las nanocápsulas de CaPLi y la liberación de su contenido, se preparó una nueva suspensión de liposomas recubiertos de CaP que contenían el fluoróforo naranja de acridina (CaPLiNA) y se observaron en un microscopio de epifluorescencia. La liberación de naranja de acridina se estudió en portaobjetos de vidrio sin recubrimiento y con recubrimiento previo de nanopartículas de HAp, observando la morfología y los cambios en la intensidad de emisión del fluoróforo en diferentes tiempos de contacto. Para ello, se depositaron 2 mL de suspensión de CaPLiNA sobre los vidrios y se observó todo el sistema inmediatamente (0 min) y después de 10 minutos y 180 min de tiempo de contacto. También se obtuvieron imágenes de control antes de añadir la suspensión de CaPLiNA para comprobar la ausencia de emisión en superficies de vidrio no modificadas y modificadas con HAp.

Las imágenes, tomadas por triplicado, mostraron la liberación del fluoróforo NA de los nanovehículos en los vidrios modificados con HAp desde los primeros minutos de contacto, lo que llevó a la tinción de toda la superficie del vidrio modificado con HAp después de 180 min (Figura 66). Por otro lado, la emisión observada sobre la superficie no modificada se concentra en pequeñas áreas correspondientes al fluoróforo contenido en los CaPLiNA o sus agregados.

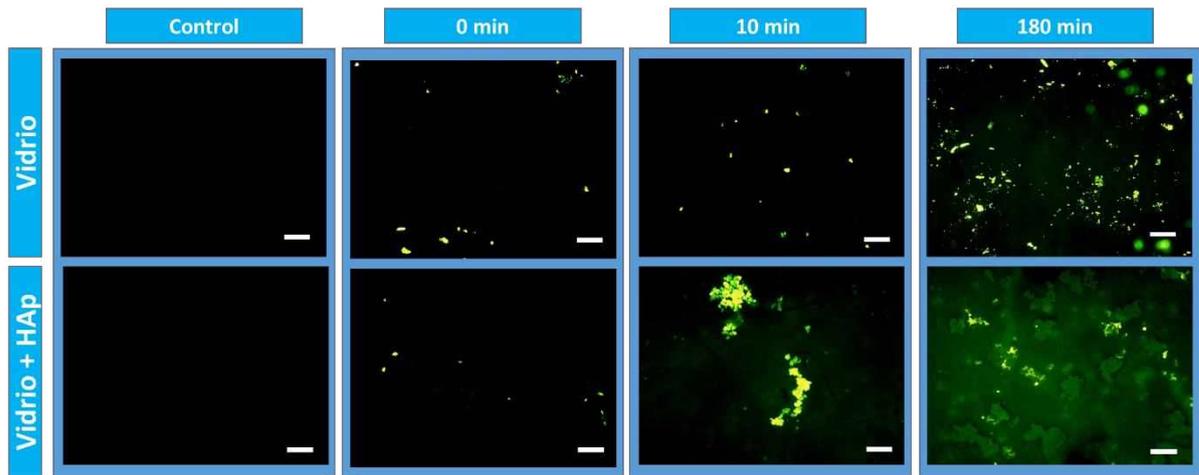


Figura 66. Imágenes de epifluorescencia de la interacción de CaPLiNA con vidrio modificado con HAp (abajo) y sin modificar (arriba) a 0 min, 10 min y 180 min de tiempo de contacto. También se muestran imágenes de control. La barra de escala es de 10 μ m.

La intensidad de la fluorescencia en función de la superficie y el tiempo de contacto se evaluó mediante el cálculo del área cubierta en la imagen utilizando el software Image J. Los resultados presentados en la Figura 67 demostraron claramente la liberación mejorada del fluoróforo NA desde los nanovehículos CaPLiNA depositados sobre la superficie modificada con HAp.

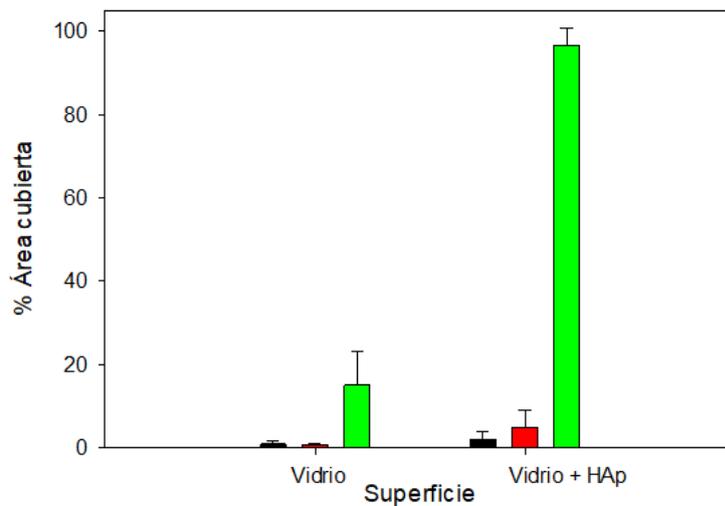


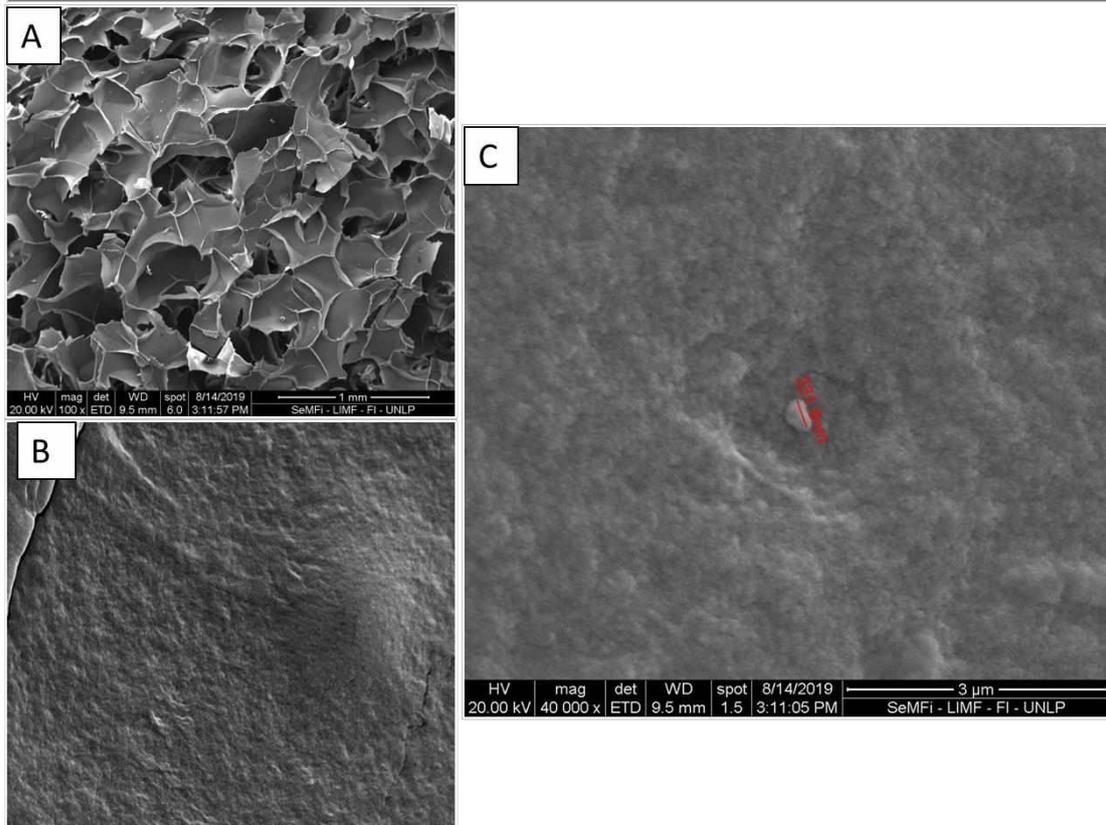
Figura 67. Análisis por fluorescencia del área cubierta en portaobjetos de vidrio no modificado y modificado con HAp en función del tiempo de contacto: 0 min (negro), 10 min (rojo) y 180 min (verde). Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

En conjunto, los resultados de la microscopía de fuerza atómica y epifluorescencia respaldan la hipótesis de que las capas de CaP se acumulan inmediatamente después del contacto y se rompen sobre diversas superficies que contienen calcio, exponiendo los liposomas, que se desmontan, liberando entonces el contenido de fármaco al entorno en pocas horas.

3.6. Interacción con andamios de seda.

Como se mencionó anteriormente, se realizó la carga de los nanovehículos sobre andamios de seda sintetizados por dos métodos diferentes, por síntesis acuosa con glicerol (GL) o lixiviados con sal (SL). La Figura 68 corresponde a imágenes tomadas por microscopía electrónica de barrido de los andamios con y sin CaPLiLX. Tanto para andamios de GL como de SL, se notó que las estructuras de seda no se modificaron por la interacción con las suspensiones de nanovehículos y se observaron vesículas que coinciden en tamaño y forma con CaPLiLX y agregados de los mismos, que permanecen adheridos a la superficie de la seda.

Glicerol (GL)



Lixiviados con sal (SL)

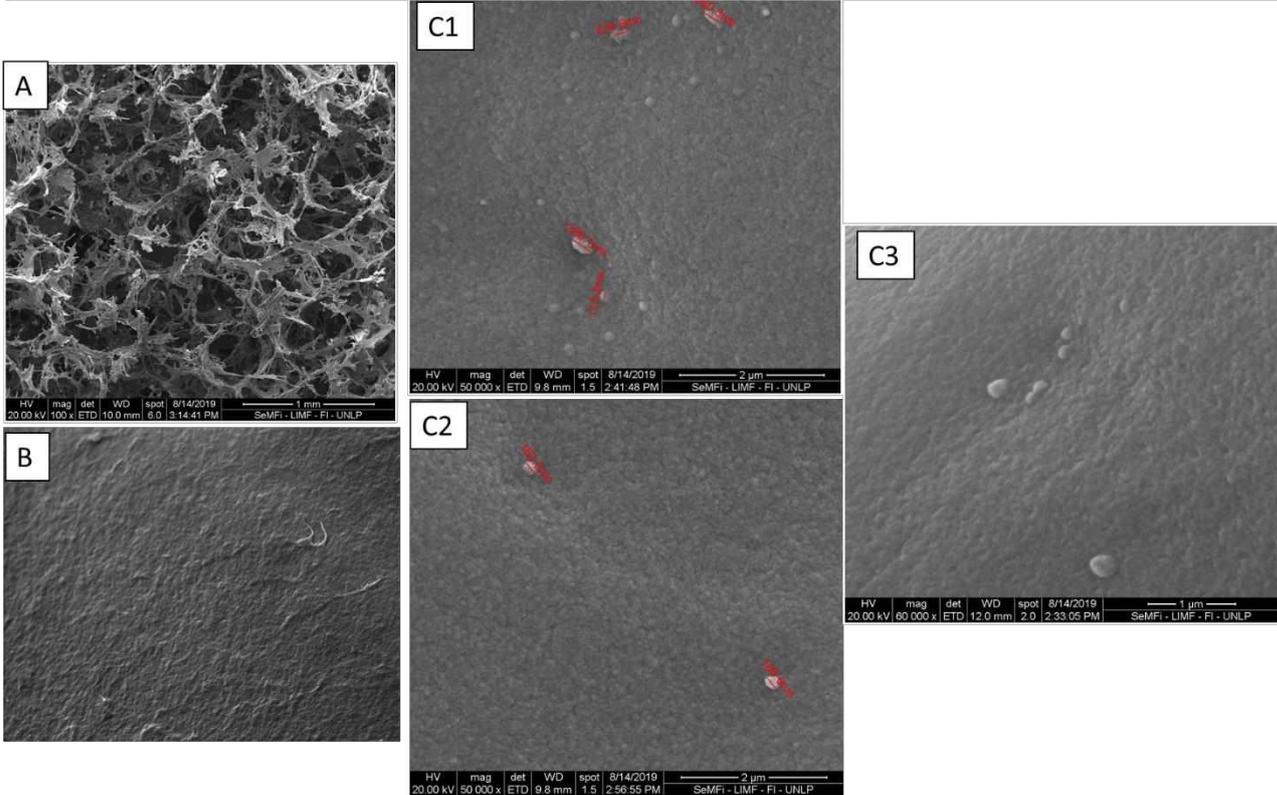


Figura 68. Imágenes SEM de andamios de seda. Blancos A)100X y B)20000X. C) Andamios luego de estar en contacto con CaPLiX 40000X-50000X.

Por otro lado, para confirmar la presencia de los liposomas recubiertos sobre la seda, se estudió la fluorescencia de la levofloxacin encapsulada en la suspensión de CaPLiLX, antes y después de la inmersión del andamio de SL utilizado para este ensayo. Cabe aclarar que no se midió la emisión directamente sobre el andamio porque la seda presenta una alta fluorescencia en todo el intervalo de análisis, así que no se pudo distinguir la emisión del antibiótico. De acuerdo con los espectros de emisión que se observan en la Figura 69, hay una disminución en la intensidad de fluorescencia de LX, lo cual puede corresponder a que parte de los nanovehículos CaPLiLX se adsorbieron sobre el andamio.

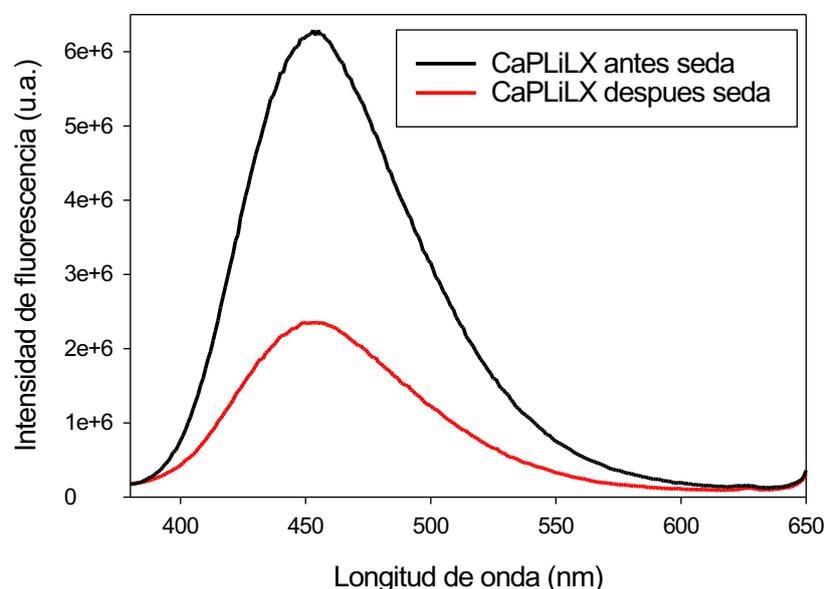


Figura 69. Espectro de emisión de CaPLiLX antes y después de sumergir el andamio de SL. λ_{exc}
=330nm.

En adición, se realizó un ensayo de liberación de LX desde los liposomas anclados en el andamio de SL. Para ello se incubaron los andamios SL con una suspensión de CaPLiLX, se retiraron los andamios, se secaron y finalmente se pusieron en contacto con PBS fresco por 48 horas. Finalmente se retiraron los andamios y se midió la fluorescencia de la solución de PBS remanente. La Figura 70 muestra el espectro de la solución de PBS remanente, normalizado, junto con el espectro de LX en PBS para fines comparativos.

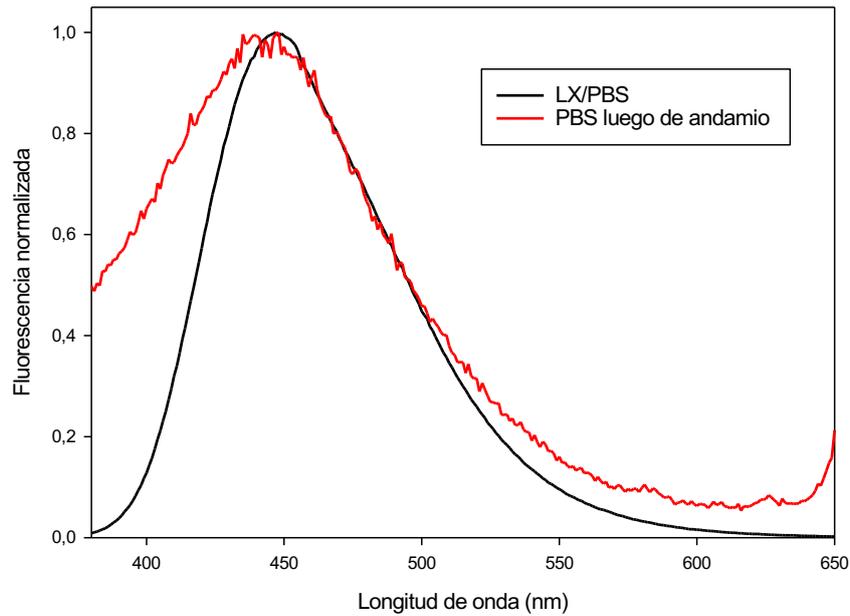


Figura 70. Espectro de emisión de la suspensión de PBS luego de sumergir el andamio de SL. $\lambda_{exc} = 330nm$.

Como se observa en la Figura 70, la solución remanente de PBS luego del ensayo de liberación muestra el máximo de emisión característico del antibiótico en este solvente, respaldando el hecho de que los nanovehículos retenidos en la estructura del andamio fueron capaces de liberar LX al medio. En conjunto, estos resultados dan una aproximación cualitativa de la efectiva interacción de los CaPLiX con andamios de seda.

4. CONCLUSIONES PARCIALES.

Tanto las condiciones fisicoquímicas del medio de liberación como el diseño estructural de los nanovehículos influyen fuertemente en la cinética de liberación de los fármacos encapsulados. Se pudo observar que los CaPLiLX son sensibles al pH y al contenido y naturaleza de los iones del medio. También se pudo establecer que, de acuerdo con el modelo de Korsmeyer-Peppas, las características físicas y estructurales de los nanovehículos son de la misma naturaleza en todos los medios estudiados. En cuanto al mecanismo de liberación, se encontró que para CaPLiLX en PBS, buffer acetato y SBF, ocurre un fenómeno de transporte difusional de Fick, acorde con lo esperado para muestras esféricas monodispersas. Esto respalda el hecho de que el LX debe salir de los distintos entornos del liposoma, incluida la capa de fosfato de calcio en donde puede estar adsorbido el antibiótico, por lo que se observa una rápida liberación inicial seguida de un transporte desacelerado a tiempos prolongados.

El carácter amorfo de la capa de CaP de los vehículos es una condición decisiva que desencadena la liberación de cualquier fármaco incluido en los liposomas. Es bien conocido por la literatura que el CaP amorfo se disuelve más fácilmente que los sólidos de fosfato de calcio cristalino, potenciando entonces su disolución en el medio fisiológico [145][146], [147].

La liberación de fármacos desde la superficie de las nanopartículas sólidas de CaP depende de los grupos anclados en la superficie y del tipo de interacción física que mantienen la superficie del CaP amorfo con las distintas moléculas. En este caso, la liberación rápida de levofloxacin observada desde la superficie de CaPLiLX, puede deberse a una débil adsorción de LX en la capa externa amorfa de CaP. Esta condición está en línea con el hecho de que los sistemas de liberación controlada dispensan inicialmente parte de la dosis contenida para alcanzar rápidamente la concentración terapéutica eficaz del fármaco. Luego, la cinética de liberación del fármaco debe seguir

un comportamiento bien definido para suministrar la dosis de mantenimiento que permita alcanzar la concentración deseada. En consecuencia, el compromiso entre una liberación inicial rápida de LX y una optimización de la cinética de liberación posterior podría satisfacer las necesidades terapéuticas, lo cual es un desafío que se debe continuar explorando.

La respuesta de liberación de las capas de CaP sobre los nanovehículos a los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} en solución mostró que estos iones divalentes fueron capaces de provocar la agregación y desencadenar la ruptura de la capa de CaP. En línea con este comportamiento, se observó una respuesta inmediata de la localización de las nanocápsulas de CaP en diversas superficies modificadas con sales Ca^{2+} y nanopartículas de hidroxiapatita (mica, vidrio y andamios de biovidrio). Además, los resultados de AFM y microscopía de epifluorescencia permitieron observar la ruptura de la cáscara de CaP y la fusión del liposoma, lo que condujo a la liberación de su contenido en pocas horas.

Por su parte, el ensayo de liberación de alendronato desde las vesículas de CaPLiAD presentó un comportamiento diferente al de LX, como era de esperarse por la naturaleza de los fármacos. La medida del AD en solución fue más compleja debido a la baja concentración en el medio que dificultó su cuantificación; sin embargo, se pudo estimar una liberación relativamente rápida, ya que al cabo de dos horas había salido la mitad de la carga, en coherencia con la alta hidrofiliidad del AD. En cuanto al papel del bisfosfonato superficial, hay un efecto de barrera en la disrupción de las nanovesículas, como se observó en los resultados de AFM y también en la liberación de LX desde vehículos de AD-CaPLiLX a pH neutro, que fue relativamente más lenta que desde CaPLiLX. Dicho efecto puede ser atribuido a la quelación que se presenta entre el AD y los iones Ca^{2+} presentes. Esto es un indicativo del potencial sinérgico que tienen los nanovehículos y el alendronato, tanto encapsulado como modificando la superficie, por lo que es crucial profundizar en la detección de este fármaco y su cinética de liberación en medio fisiológico y a tiempos mayores.

Los CaPLi presentan clara afinidad por la hidroxiapatita y superficies con calcio, acumulándose sobre ellas, disrumpiendo su estructura y liberando el material transportado, tal como se desea para la entrega de fármacos y otras moléculas sobre el tejido óseo.

También presentan afinidad por estructuras orgánicas e inorgánicas utilizadas en la regeneración ósea, como los son los andamios de biovidrio y de seda, a los cuales los CaPLiLX pueden adherirse, lo que muestra su potencial para generar un efecto sinérgico de reparto de drogas *in situ* al estar incluidos en la estructura del implante.

CAPÍTULO 5.
INTERACCIÓN CON
SISTEMAS
BIOLÓGICOS

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de un medicamento requiere de sucesivas y complejas etapas, que van desde su formulación y síntesis en el laboratorio, ensayos preclínicos, ensayos clínicos en sus tres fases que involucran estudios en personas, etapa de aprobación y revisión, hasta su producción y comercialización y la farmacovigilancia posterior. Por ello, luego de la síntesis, caracterización fisicoquímica y ensayos de concepto que evalúan el potencial del nanovehículo para ser utilizado con los fines previstos, se requiere evaluar su eficacia y toxicidad en modelos celulares *in vitro* e *in vivo* en animales (ensayos preclínicos) [148].

En el caso de las enfermedades en el hueso, se realizan estudios específicos con células del tejido óseo para evaluar la posible toxicidad del tratamiento, así como en células dañinas relacionadas con afecciones particulares, como el osteosarcoma, para determinar la interacción del sistema estudiado y su capacidad de combatirlas. Por otro lado, los estudios en animales suelen iniciar con organismos pequeños y menos complejos, como los peces, y van escalando a modelos de la enfermedad cada vez más similares al ser humano. Estos ensayos proporcionan una idea de qué tan eficaz y seguro es el nuevo tratamiento en un ser vivo.

Adicionalmente, en sistemas de entrega controlada de antibióticos, aun cuando los antibióticos sean de actividad microbiana conocida, resulta de importancia realizar ensayos de actividad antimicrobiana con los antibióticos encapsulados. Los antibiogramas permiten conocer la sensibilidad de determinadas bacterias al tratamiento y las curvas de muerte con las que se puede cuantificar la acción bactericida.

Los ensayos de antibiogramas, cuyos resultados se muestran en este capítulo, fueron realizados en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, en colaboración con la Doctora Cristina Valencia y la Magíster Isabel Ortega. Los ensayos de curva de muerte fueron realizados en el INIFTA en colaboración con el Doctor Alejandro Miñán. Los ensayos con células fueron realizados en el Departamento de Química Biológica de la Universidad de Buenos Aires en colaboración con la Doctora Roxana Gorojod y los ensayos con peces fueron realizados en el Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH) en colaboración con el Doctor Leandro Miranda.

En este capítulo se describen los resultados de la interacción de nanovehículos de CaPLi con distintos sistemas biológicos. En primer lugar, se evaluó la actividad antimicrobiana de CaPLiLX y CaPLiCX con cuatro cepas distintas de bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Echerichia coli* y *Salmonella thypimurium*). En particular, también se estudió la capacidad bactericida de CaPLiLX contra *Staphylococcus aureus* en ensayos de curva de muerte. Por otro lado, se determinó la viabilidad celular de la línea celular de precursores osteoblásticos murinos MC-3T3 en presencia de nanovehículos recubiertos, con y sin carga de levofloxacin. Seguidamente, se realizaron estudios de internalización de nanopartículas cargadas con los colorantes naranja de acridina y fluoresceína en células de osteosarcoma humano U2OS. Finalmente, se probó la biocompatibilidad de las nanocápsulas con larvas de pejerrey luego de incubar los organismos con suspensiones liposomales cargadas con naranja de acridina que permitiera su visualización.

2. METODOLOGÍA

2.1. Ensayos de actividad antimicrobiana.

2.1.1. Antibiógramas.

Con el objetivo de evaluar el efecto bactericida de los nanovehículos conteniendo los antibióticos levofloxacin y ciprofloxacina, se realizaron estudios de susceptibilidad antibacteriana utilizando el método de difusión en disco propuesto por Kirby-Bauer [149]. Se sometieron a la prueba bacterias tipo Gram positivo (*Staphylococcus aureus* ATCC 49775 y *Bacillus cereus* ATCC 10987) y Gram negativo (*Echerichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella thypimurium* ATCC 14028), cuyas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para LX y CX halladas en bibliografía se resumen en la Tabla 16. Se realizó un análisis de tipo cualitativo para determinar la susceptibilidad de los microorganismos frente a un agente con potencial antimicrobiano.

Tabla 16. Concentraciones mínimas inhibitorias de LX y CX reportadas para distintas bacterias.

Organismo	CMI LX [µg/mL]	CMI CX [µg/mL]
<i>Salmonella thypimurium</i>	0,03 [150]	0,50 [151]
<i>Echerichia coli</i>	0,03 [150]	0,10 [152]
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,25-4,00 [153]	0,13-2,00 [154]
<i>Bacillus cereus</i>	0,50 [155]	0,50 [152]

Primero se activaron las cuatro cepas bacterianas, que estaban almacenadas a -20°C en viales con glicerina y medio nutritivo LB (Luria-Bertani o caldo de Lisogenia) para mantener su actividad metabólica al mínimo. Para activarlas, se vertió el contenido del vial en un erlenmeyer con medio LB (aproximadamente 50µL en 50mL de medio) y se

dejaron agitando por 24 horas a 30°C. Pasado el tiempo, se observó turbidez característica del crecimiento bacteriano. Las soluciones se trasvasaron a tubos Falcon (aproximadamente 13mL) y se centrifugaron por 10 minutos a 3500rpm para obtener un pellet rico en bacterias. El pellet se suspendió en 10mL de solución salina (NaCl) al 0,8%, se agitó y midió la D.O (densidad óptica) hasta obtener absorbancia a 625nm entre 0,08-0,12; que es equivalente a una concentración de $(1-2) \times 10^8$ UFC (unidades formadoras de colonias) por mL, de acuerdo con el patrón 0,5 de McFarland.

Luego, con hisopo estéril impregnado de cada solución de bacterias se realizó una siembra en superficie en agar Mueller Hinton, previamente dispuesto en cajas de Petri bajo condiciones adecuadas para conseguir un crecimiento de bacterias masivo y homogéneo. Posteriormente, se depositaron 60µL de cada una de las muestras de CaPLiLX, LX, CaPLiCX y CX sobre discos MN 827 ATD de 9 mm de diámetro, los cuales se ubicaron sobre el cultivo de bacterias en sentido antihorario iniciando por la dosis 1 en la parte superior. Las concentraciones usadas de cada muestra se ven en la Tabla 17. Cabe aclarar que para las soluciones de LX y CX se tomaron dosis estándar de antibiótico, mientras que para los nanovehículos de CaPLiLX y CaPLiCX, las dosis de antibiótico se calcularon con base en la capacidad de encapsulación determinada en el Capítulo 3. Se cuidó que todas las dosis utilizadas fueran superiores a la CMI reportada para las cepas en la Tabla 16.

Como blanco positivo (disco en parte central de las cajas) se utilizaron 30 µL de Tego 51 (Merck), un bactericida de referencia de amplio espectro. Para facilitar la difusión del material contenido en los discos al agar y evitar que la condensación caiga encima del cultivo y haya crecimiento cruzado de otras bacterias, se colocaron las cajas de Petri de forma invertida en heladera a 4°C por 2 horas y luego se incubaron a 36°C por 24 horas, temperatura óptima para el crecimiento bacteriano. Los ensayos se hicieron por duplicado para cada cepa estudiada.

Tabla 17. Concentración de antibióticos en solución y de antibióticos encapsulados en los nanovehículos.

Disco	Dosis [μg antibiótico/mL]			
	CaPLiLX	LX	CaPLiCX	CX
1	2,91	6,00	3,74	5,50
2	2,18	4,50	2,81	4,13
3	1,46	3,00	1,87	2,75
4	0,73	1,50	0,94	1,38
Central	Blanco positivo: Tego 51			

2.1.2. Curvas de muerte.

Una curva de muerte o curva de letalidad es un método mediante el cual se determina la actividad *in vitro* de diferentes concentraciones de un antibiótico frente a un microorganismo durante un período de tiempo que suele ser de 24 horas; por tanto, se trata de una técnica que mide la cinética de muerte bacteriana mediante el recuento de colonias que permanecen viables tras la exposición al antibiótico en relación al inóculo original [156]. En este caso se evaluó la actividad de levofloxacina en solución y encapsulada en CaPLiLX frente a *Staphylococcus aureus*.

La cepa de *S. aureus* ATCC-25923 se inoculó en 150 mL de medio de cultivo NB (Britania, Argentina) y fue incubado durante la noche mediante agitación (170 rpm) a 37°C. Posteriormente la suspensión bacteriana se ajustó con NB fresco a una concentración de 1×10^5 bacterias/mL. La CMI de LX frente a *S. aureus* planctónico se determinó mediante el método de microdilución en caldo según las directrices del CLSI (*Clinical And Laboratory Standards Institute*) [157]. La CMI se definió como la concentración más baja de LX a la que no se detecta crecimiento bacteriano después de 20 h. La concentración mínima bactericida (CMB) de LX para bacterias planctónicas se determinó mediante el método de recuento en placa. Se consideró como CMB a la concentración de antibiótico

que produjo el 99,9% de mortalidad. Los ensayos se realizaron por triplicado a partir de cultivos bacterianos independientes.

Para evaluar la actividad antimicrobiana de las nanocápsulas que contenían LX, se realizaron estudios de curvas de muerte de acuerdo con un método previamente informado [158]. El ensayo se realizó con un inóculo inicial de *S. aureus* de $\sim 5,0 \times 10^4$ bacterias/mL a 37°C, en medio NB, al cual se adicionaron alternativamente una solución de LX o una suspensión de CaPLiLX, ambas muestras con una concentración de LX equivalente a 2x CMI (1,0 µg/mL). Las pruebas se realizaron por duplicado.

A intervalos de tiempo definidos (0, 3, 6, 24h), el crecimiento bacteriano se cuantificó sembrando diluciones de 10 veces en agar nutritivo (Britania, Argentina). Además, se realizó un control de crecimiento que consistió en una suspensión bacteriana con NB fresco que se cuantificó en el mismo intervalo de tiempo. Finalmente, se graficó la relación de UFC (Unidades Formadoras de Colonia) frente al tiempo para cada formulación evaluada.

2.2. Interacción con células de origen óseo.

2.2.1. Reactivos.

Se utilizaron los reactivos cuya procedencia se describe a continuación: medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), medio de cultivo α -MEM (*Minimum Essential Medium*), glutamina (Thermo Fisher Scientific, MA, USA); tripsina (Sigma-Aldrich Co., MO, USA); bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); suero fetal bovino (SFB) (NATOCOR, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina); estreptomycin, penicilina y anfotericina (Richet, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina); paraformaldehído (Carlo Erba, Milan,

Italia). Todos los demás reactivos utilizados fueron de grado biología molecular o grado analítico según el caso.

2.2.2. Cultivo celular.

La línea celular de precursores osteoblásticos murinos MC-3T3 fue mantenida en medio de cultivo α -MEM. La línea celular de osteosarcoma humano U2OS se cultivó en medio DMEM. En ambos casos, los medios se suplementaron con 10% SFB, penicilina (100 unidades/ mL), estreptomycin (100 μ g/ mL) y anfotericina B (0,25 μ g/mL). Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera húmeda de 5% CO₂- 95% aire y el medio de cultivo fue renovado 3 veces por semana. Para llevar a cabo los experimentos, las células se tripsinizaron (tripsina 0,05%- EDTA 0,5 mM), se diluyeron en medio de cultivo y se plaquearon nuevamente en cajas de 96 pocillos (10.000 células/pocillo), sobre cubreobjetos en cajas de 24 pocillos (60.000 células por pocillo) o en cajas de 12 pocillos (120.000 células por pocillo).

2.2.3. Ensayo de viabilidad celular.

Se estudió la interacción de los liposomas recubiertos vacíos (CaPLi) y con levofloxacin (CaPLiLX) con la línea celular de precursores osteoblásticos MC-3T3. La concentración estimada de fosfato de calcio en ambas muestras fue de 150 μ g CaP/mL de acuerdo con caracterizaciones anteriores (ver Capítulo 3). Para los tratamientos se preparó una dilución al 20% de las nanocápsulas en medio de cultivo. La suspensión se sumergió en baño de ultrasonido durante 10 minutos y luego se realizaron las demás diluciones empleadas en los experimentos (1%, 5% y 10%). Se analizó la viabilidad celular en cultivos de células MC-3T3 expuestas durante 24-48h a concentraciones crecientes de nanopartículas, usando el método MTT. Como control, se determinó la viabilidad celular en cultivos en el mismo medio en el que se encuentran suspendidos los nanovehículos CaPLi, es decir, en agua bidestilada estéril, preparando diluciones del medio de cultivo y midiendo la viabilidad.

Para medir la actividad metabólica celular, se utilizó el ensayo de MTT que consiste en la reducción de las sales de tetrazolio por deshidrogenasas celulares generando formazán, un producto azul oscuro y parcialmente insoluble. Dicha reacción (Figura 71) tiene lugar en todas las células metabólicamente activas y es, por lo tanto, un indicador de viabilidad celular [159].

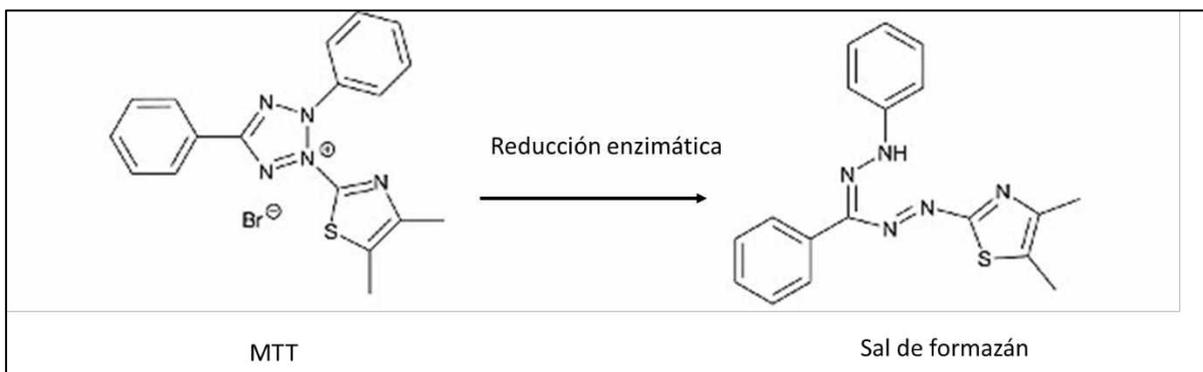


Figura 71. Reacción del MTT con enzimas celulares.

Luego de los tratamientos, las células crecidas en placas de 96 pocillos se lavaron con PBS y se incubaron con MTT 0,250 mg/mL en medio de cultivo a 37°C. Una vez transcurridas 4 horas, el medio se removió y el formazán se solubilizó en 100 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido). La absorbancia de las placas se midió a 570nm y se le restó la absorbancia de una referencia medida a 655nm. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas DR-2000Bs (Diatek Instruments Co. China). Se graficó la viabilidad relativa al control en función de la concentración de nanopartículas.

2.2.4. Ensayo de internalización de nanovehículos.

Microscopía de fluorescencia

Se evaluó la capacidad de los nanovehículos de ingresar a las células y liberar su contenido. Para ello, se sintetizaron nanocápsulas cargadas con levofloxacin, naranja de acridina y fluoresceína (CaPLiX, CaPLiNA y CaPLiFL, respectivamente). La síntesis se realizó de forma idéntica a lo descrito en la Sección 2.1 del Capítulo 3. Se utilizó NA ya que es común en este tipo de ensayos [34] y FL porque tiene la particularidad de no permear membranas celulares. Para el ensayo se utilizaron células U2-OS de osteosarcoma que se incubaron durante distintos tiempos con CaPLi vacíos o cargados con fluoróforos. Luego, fueron observadas en un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX71 usando los siguientes filtros de excitación y de emisión: levofloxacin (λ_{exc} , λ_{em}) = (330-385nm, LP 420 nm), naranja de acridina verde (λ_{exc} , λ_{em}) = (460-495nm, 510-550nm) y rojo (λ_{exc} , λ_{em}) = (510-550nm, LP 590 nm) y fluoresceína (λ_{exc} , λ_{em}) = (460-495nm, 510-550nm).

Citometría de flujo

Las células crecidas en placas de 12 pocillos se incubaron a distintos tiempos con fluoresceína en solución, nanovehículos encapsulando fluoresceína (CaPLiFL) y medio de cultivo como control. Finalizada la incubación, las células se tripsinizaron, se diluyeron con PBS y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. Los pellets obtenidos se resuspendieron en PBS y los tubos se mantuvieron en hielo hasta el momento de la medición. Se determinó la emisión de fluorescencia en 10.000 células empleando un citómetro de flujo BD accuri C6 Plus (BD Biosciences, NJ, USA). Los datos se analizaron empleando el software FlowJo Vx.0.7 (TreeStar, Ashland, USA). Se realizó un gráfico de puntos (*dot plot*) en función del tamaño (FSC) y la complejidad (SSC) y se seleccionó una región que excluyera el debris celular (núcleos fragmentados). Luego, se analizó la fluorescencia del grupo de células seleccionado en FL1 (λ_{exc} , λ_{em}) = (488nm, 533/30nm) bajo las siguientes condiciones: incubación de 15 minutos sin fijar, incubación de 2 horas con y sin fijación con paraformaldehído 4%, e incubación de 2 horas, con y sin SFB.

2.3. Biocompatibilidad con larvas de pejerrey.

Se estudió el efecto y la biocompatibilidad de los liposomas recubiertos, vacíos (CaPLi) y cargados con naranja de acridina (CaPLiNA), con larvas de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). Inicialmente se evaluó la concentración óptima de una solución de CaPLi vacíos (150 µg CaP/mL) sobre larvas de pejerrey de 12 días de post eclosión (pe) mantenidas en agua de pozo con una salinidad de 3 g/L y ≈18°C en el bioterio de acuicultura del Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH- Buenos Aires, Argentina) durante el mes de septiembre del año 2021.

El experimento consistió en incubar las nanopartículas de CaPLi con las larvas a 20°C y con fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (12L12O). Se probaron 4 concentraciones de CaP de las nanopartículas partiendo de la solución madre de CaPLi de 150 µg CaP/mL, denominadas T1, T2, T3 y T4 y correspondientes a 3,75; 7,5; 37,5 y 75 µg/mL, respectivamente, además del tratamiento control en medio de cultivo para pejerrey (agua destilada con NaCl 5g/L). Se colocaron 4 larvas por pocillo de 4 mL de volumen en una placa multipozos. Se realizó el ensayo de dosis letal 50 (DL50) por triplicado, que corresponde al tiempo en el que la mitad de los organismos expuestos siguen vivos. Para el análisis estadístico se utilizó el programa InfoStat en donde se realizó un ANOVA de una sola vía, $p < 0,05$ y para las comparaciones se utilizó el Test de Tukey.

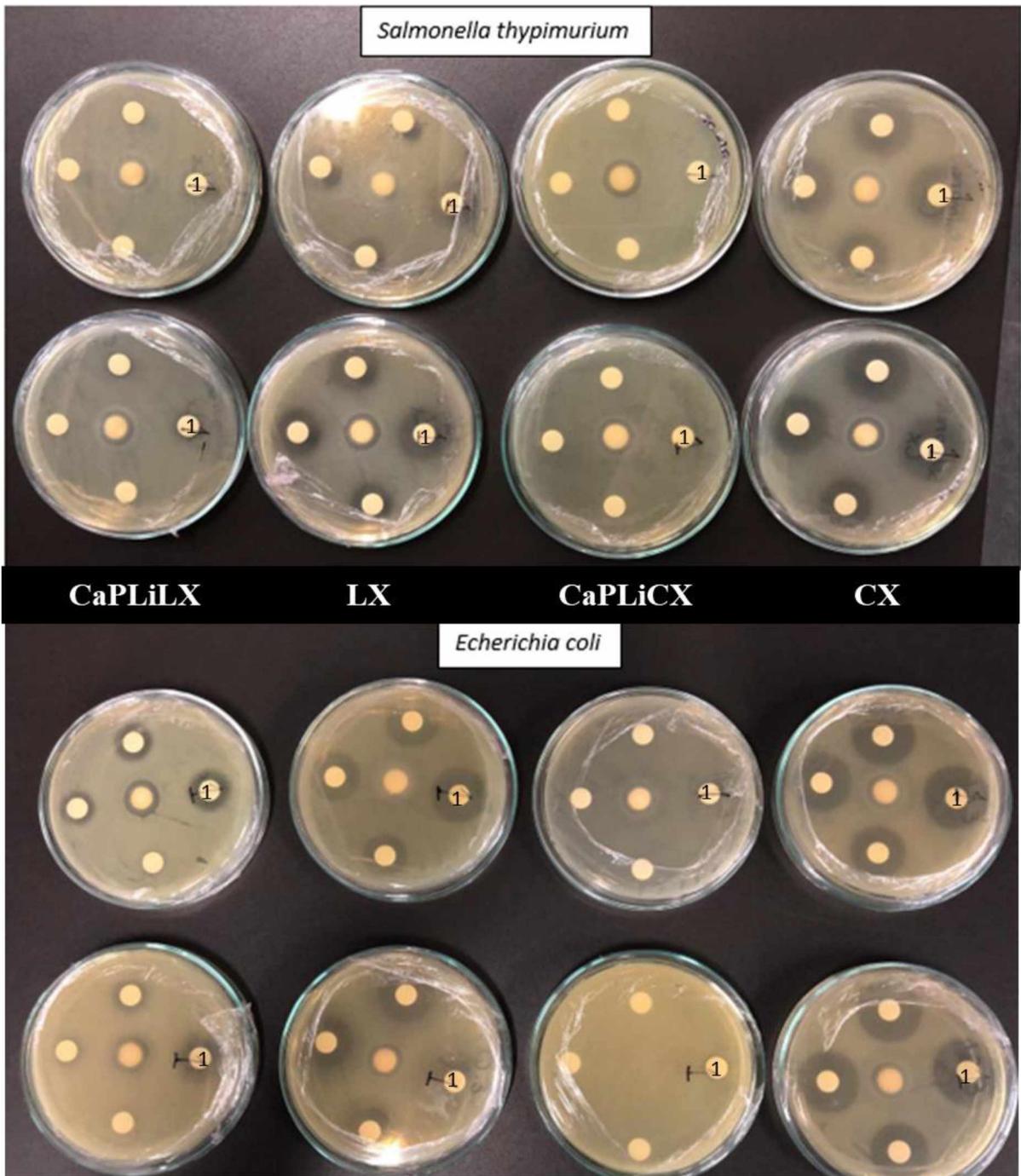
Posteriormente se evaluó el tiempo de exposición óptimo de las larvas a nanocáscaras con naranja de acridina $3 \times 10^{-6} \text{M}$ (CaPLiNA), siendo el criterio una mejor visualización de los tejidos óseos teñidos con el fluoróforo. Para dicha visualización, las larvas se fijaron con PAF (Fenol-alcohol-formaldehído) y se observaron con una lupa de fluorescencia (marca Zeiss).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Susceptibilidad antibiótica.

3.1.1. Antibiogramas.

Se realizaron antibiogramas con el objetivo de evaluar el efecto de los nanovehículos conteniendo levofloxacin y ciprofloxacina sobre la susceptibilidad antibiótica de distintas bacterias. La Figura 72 muestra las fotografías de las cajas de Petri luego de 24 horas de incubación de los nanovehículos de CaPLiLX y CaPLiCX, y de los antibióticos LX y CX con cada una de las cepas estudiadas, por duplicado, en las que se observan los halos de inhibición de crecimiento bacteriano. Debido a que las imágenes se tomaron con las cajas invertidas, la lectura se hace desde el disco 1 hacia la derecha, en orden descendente de la concentración de la dosis aplicada.



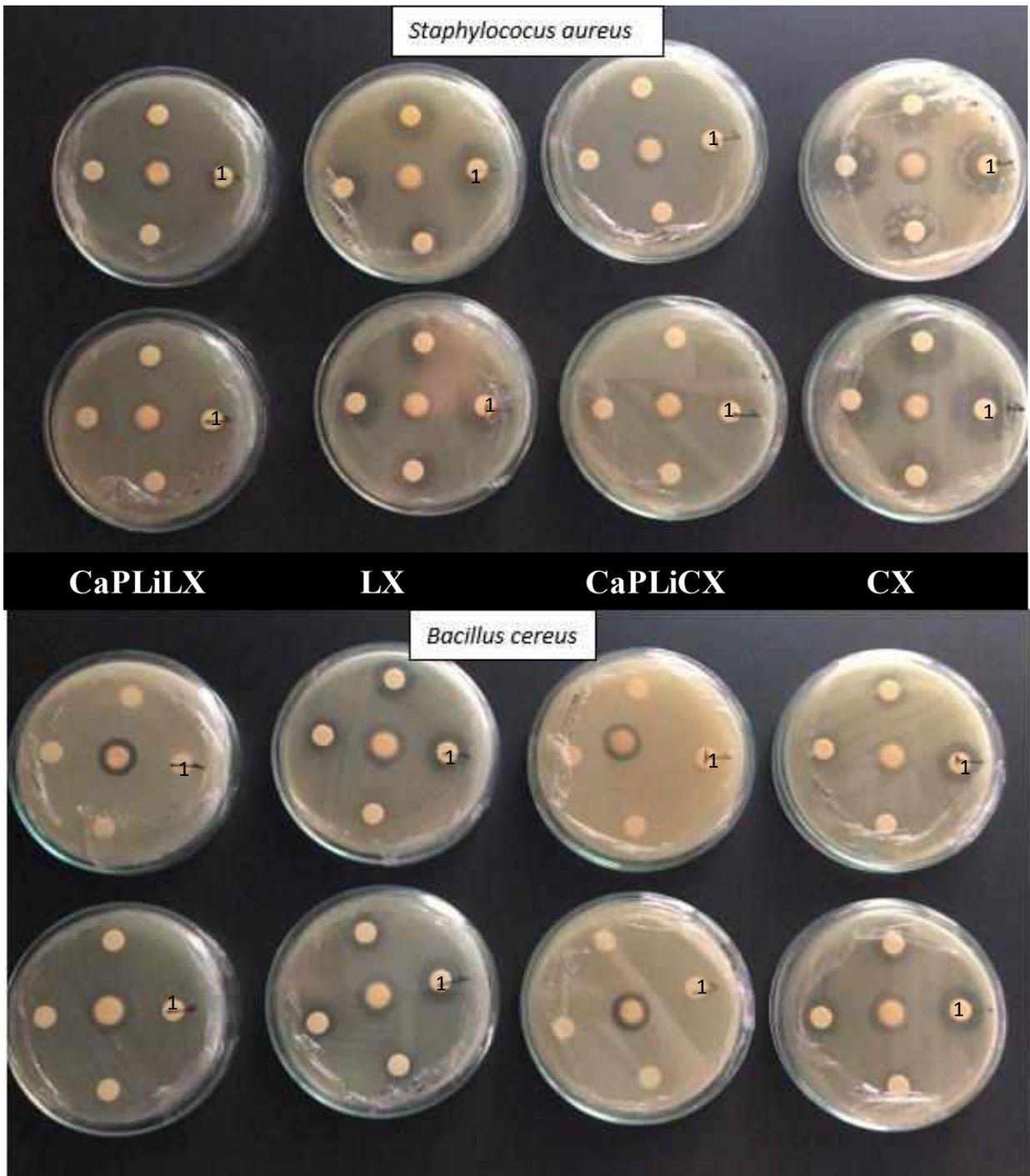


Figura 72. Imágenes de antibiogramas obtenidos por duplicado para cada bacteria. El disco central en cada caja corresponde al blanco y del disco 1 hacia la izquierda los tratamientos, en orden descendiente de concentración (ver

Tabla 17).

Los resultados del análisis de susceptibilidad antibacteriana frente a las dosis utilizadas de los antibióticos en solución y encapsulados dentro de los liposomas recubiertos se muestran en la Tabla 18. Los halos de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos determinan si la dosis ejerce un efecto bactericida alto (mayor a 17 mm, celda verde), intermedio (entre 14 y 16 mm, celda amarilla) o bajo (menor de 13 mm, celda roja), o si las bacterias utilizadas presentan resistencia y no se ve afectado su crecimiento. La resistencia se puede identificar cuando dentro del halo se observan crecimientos de bacterias aislados.

Tabla 18. Resultados de susceptibilidad antibacteriana. N.O: No se observa halo o es menor a 9mm.

Muestra	Disco	Dosis [μg /mL]	Diámetro del halo (mm)							
			S. thypimurium		E. coli		S. aureus		B. cereus	
CaPLiLX	1	2,91	N.O	N.O	18	N.O	14	13	N.O	N.O
	2	2,18	N.O	N.O	17	15,5	N.O	N.O	N.O	N.O
	3	1,46	N.O	N.O	15,5	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
	4	0,73	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
LX	1	6,00	20,7	22,3	25	N.O	22,5	20,4	17,6	19,2
	2	4,50	N.O	21,5	23	25	22	22,8	16,3	16,3
	3	3,00	19,6	20,3	23	22	19,8	21,2	14	14,3
	4	1,50	16,4	18	20	N.O	17	17,6	N.O	N.O
CaPLiCX	1	3,74	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
	2	2,81	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
	3	1,87	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
	4	0,94	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O	N.O
CX	1	5,50	28	29	29	30	27	29	18	20
	2	4,13	26,6	28,5	29	27	27	28	15,5	16,3
	3	2,75	24	24,2	28	28	28,6	28	13	15,5
	4	1,38	20,7	21,5	23	25	25,3	24,5	N.O	N.O

De acuerdo con los resultados, los antibióticos en solución ejercen un efecto bactericida alto sobre todas las cepas para la dosis 1, el cual decrece al disminuir la concentración de los mismos como era de esperarse. No obstante, se observó resistencia por parte de *S. aureus* a ciprofloxacina para las dosis estudiadas en uno de los ensayos, ya que se formaron colonias dentro del halo de inhibición, lo cual es un indicativo de que debe repetirse el experimento para determinar si deben usarse dosis mayores. Por su parte, el efecto de CX encapsulado no pudo observarse o el diámetro del halo de inhibición fue menor a 9mm (el diámetro del disco) para todas las cepas. Este resultado es inesperado y puede atribuirse a contaminación de los nanovehículos y/o pérdida de la carga de CX, ya que las dosis utilizadas fueron superiores a la CMI y se han reportado resultados favorables de la actividad antimicrobiana de liposomas conteniendo ciprofloxacina [160]. Se debe profundizar en el estudio de la difusión de CX a partir de los nanovehículos de CaPLi y su posible interacción con la cobertura de CaP.

En el caso de CaPLiLX, se observó un efecto bactericida alto y medio de la dosis 1 sobre las cepas de *E. coli* y *S. aureus*, respectivamente. Si bien la *E. coli* es Gram-negativa y la *S. aureus* es Gram-positiva, ambas pueden presentar una limitación en su movilidad dada su morfología, ya que *E. coli* es un bacilo con flagelo que no siempre tiene movilidad y *S. aureus* es un coco que se puede encontrar en una conformación variada, que va desde una sola hasta una forma de racimo de uvas [161]. Esta limitación en la movilidad puede influir en que sean sensibles a los nanovehículos y se vean inhibidas por el antibiótico encapsulado. De hecho, para estas dos bacterias se han reportado resultados positivos en la interacción con superficies de fosfato de calcio amorfo, ya que existe una relación sinérgica entre el CaP y una variedad de antibióticos administrados concomitantemente [162].

Es evidente que la cobertura de fosfato de calcio de los liposomas retrasa la salida del antibiótico y su posterior difusión en el disco y en el agar, para el tiempo y volumen de la alícuota estudiados. La actividad bactericida observada es coherente con la liberación inicial de *c.a.* 40% del contenido de LX desde CaPLiLX en los distintos medios testeados

(ver Capítulo 4), que corresponde a una concentración estimada de $3,6 \times 10^{-6}$ M, equivalente a $1,3 \mu\text{g LX/mL}$, valor que supera la CMI para todas las cepas. Por otro lado, la difusión de LX desde dentro del CaPLiLX puede ser diferente en los medios acuosos testeados (SBF, PBS y buffer acetato) y en el medio agar que se prueba en estos ensayos. Los resultados también dan cuenta de la capacidad de los nanovehículos de proteger el contenido encapsulado y liberarlo en forma controlada al medio.

3.1.2. Curvas de muerte.

De acuerdo con los resultados de sensibilidad de *S. aureus* a las nanocápsulas conteniendo LX, se realizaron ensayos *in vitro* para determinar las curvas de tiempo de muerte de células planctónicas de *S. aureus* en presencia de LX y CaPLiLX, con el objetivo de evaluar y cuantificar la actividad bactericida del nanovehículo. Considerando que, los valores de CMI y CMB obtenidos para LX fueron $0,5 \mu\text{g/mL}$ y $1,0 \mu\text{g/mL}$, respectivamente (ver Sección 2.1.2 del presente capítulo), se utilizó una concentración de LX del orden de la CMB para la determinación de las curvas de muerte. Se estima que una concentración de LX igual a la CMB está contenida en aproximadamente $1,6 \times 10^{12}$ liposomas recubiertos con fosfato de calcio, es decir, en los liposomas contenidos en 1 mL de suspensión de CaPLiLX 9×10^{-6} M (ver Capítulo 3).

La curva de tiempo de muerte para *S. aureus* mostró que la actividad bactericida se alcanzó a las 6 horas y la erradicación total de bacterias se logró dentro de las 24 horas tanto para LX en solución como para CaPLiLX (Figura 73). Sin embargo, aunque la actividad antimicrobiana se conserva para la formulación encapsulada, se observó una pequeña diferencia en la cinética correspondiente a las primeras 3 horas. Estos resultados son consistentes con la liberación sostenida de LX observada desde las nanocápsulas en suspensión, alcanzando aproximadamente un 40% de liberación en 3 horas ($\sim 1,3 \mu\text{g LX/mL}$, ver Figura 58), lo que explica que tanto CaPLiLX como LX exhibieran una acción antimicrobiana similar contra *S. aureus*.

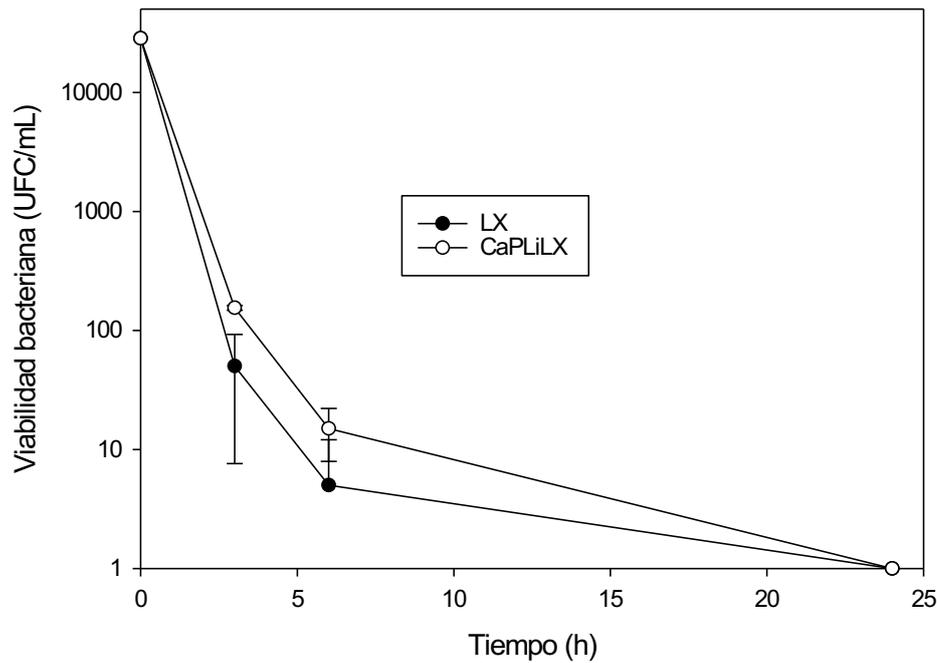


Figura 73. Efecto de LX 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y CaPLiLX 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre la viabilidad de *S. aureus*.

La observación de un mayor efecto de CaPLiLX sobre *S. aureus* por el método de curva de muerte que en los antibiogramas, podría estar relacionada con las diferencias intrínsecas de las metodologías utilizadas. Por un lado, en los ensayos en caldo como es el caso de la curva de muerte, hay una concentración de 1×10^5 bacterias frente a determinada concentración de tratamiento con antibiótico, la cantidad de bacterias no aumenta cuando ya no hay medio nutritivo, así que se puede ver la inhibición y determinar la concentración bactericida. Por otro lado, en la prueba de difusión en disco los microorganismos en la placa superan las 1×10^5 bacterias, más allá de que al momento de hacer el ensayo se haya colocado un inóculo de ese orden, ya que están en un agar nutritivo y crecen como césped. En este ensayo, se impregna una cantidad de antibiótico que difunde y, cuando logra un halo de determinado diámetro, se puede decir que el tratamiento es efectivo o no, sólo de forma cualitativa.

Por otro lado, se trató de correlacionar las propiedades superficiales de las nananocápsulas con su acción bactericida. La carga superficial de CaPLiLX es negativa y aun así han mostrado interactuar con las membranas externas de las bacterias Gram-

positivas provocando su muerte. Esta interacción se observó previamente en nanocápsulas de CaPLi conteniendo naranja de acridina y 5,10,15,20-Tetrakis(1-metil-4-piridinio)porfirina encapsuladas [34]. El ácido teicoico y los componentes de peptidoglicano de la pared celular bacteriana contribuyen a la carga negativa de la superficie de las células estafilocócicas. Además, estos polímeros de azúcar que contienen fosfato son los principales componentes bacterianos para secuestrar iones metálicos del medio, principalmente Ca^{2+} y Mg^{2+} [163]. En otro trabajo del grupo [34], se planteó que los grupos fosfato de la pared celular bacteriana y los iones calcio y magnesio externos, pueden ser responsables de la acumulación preferencial de los nanovehículos en las biopelículas y frotis de *S. aureus*. Como se demostró ampliamente en el Capítulo 4, los iones de calcio y magnesio también juegan un papel importante en la aglomeración y el consiguiente desmontaje de las nanocapas. Se puede concluir que la localización de estos iones metálicos divalentes en la vecindad de la pared bacteriana puede atraer las nanocápsulas y finalmente provocar su disrupción y la liberación del contenido de antibiótico cerca de la célula bacteriana, de acuerdo con el mecanismo de liberación propuesto.

3.2. Interacción con células

3.2.1. Viabilidad celular.

Con el objetivo de determinar la posible toxicidad de los liposomas recubiertos en células óseas, se estudió su interacción con la línea celular de precursores osteoblásticos MC-3T3, derivada de la bóveda craneal de ratón común (*Mus Musculus*) y ampliamente utilizada como sistema modelo en biología ósea. De acuerdo con los resultados mostrados en la Figura 74, las nanopartículas de CaPLi no afectan la viabilidad de células MC-3T3 luego de 24 y 48 horas de incubación. Si bien se observa una disminución significativa en la viabilidad con la dilución al 10% (48h: $10 \pm 2\%$; $p < 0,001$) y al 20% (24h: $17 \pm 3\%$; 48h: $22 \pm 2\%$; $p < 0,001$) de CaPLi, la misma es atribuible al medio en el que están

suspendidos los CaPLi ya que, como puede observarse en el panel derecho, al relativizar la viabilidad obtenida para cada dilución de nanopartículas respecto a su control (agua bidestilada estéril), no se observan variaciones significativas en la sobrevida.

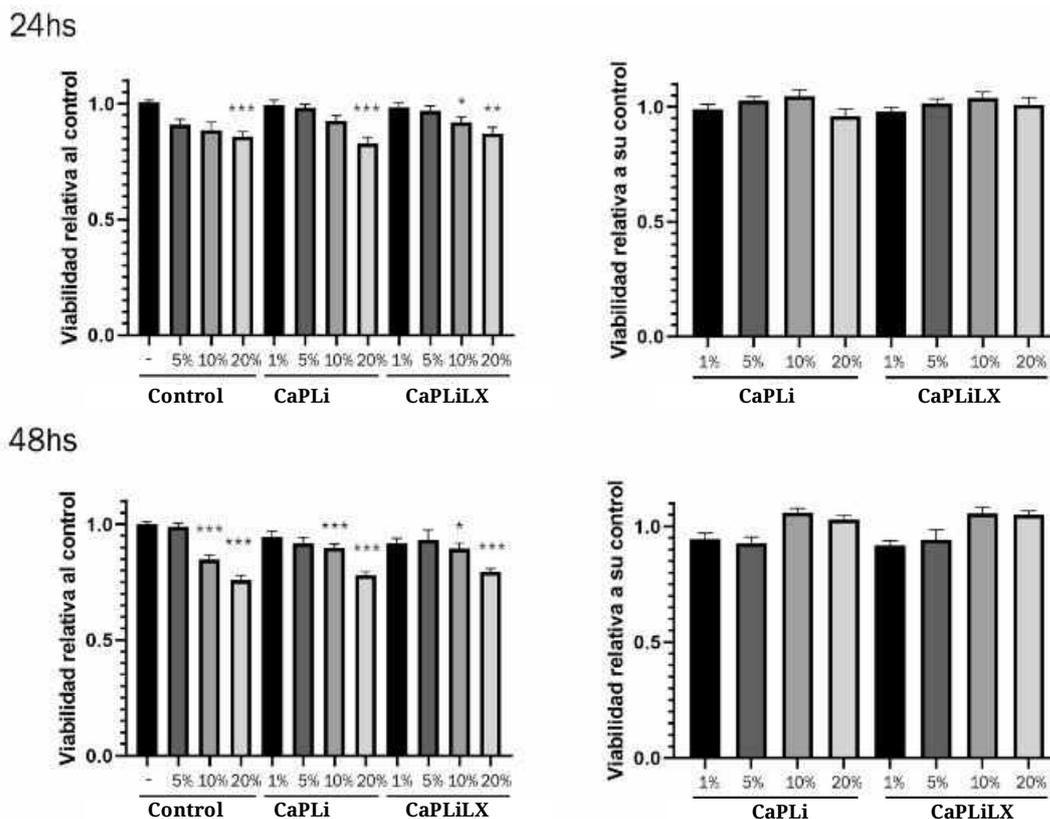


Figura 74. Viabilidad celular de precursores osteoblásticos MC-3T3 en presencia de suspensiones de nanopartículas de CaPLi y CaPLiLX luego de 24 y 48h de exposición. El porcentaje es respecto a la dilución de la solución madre de nanopartículas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Las diluciones al 1%, 5%, 10% y 20% de los nanovehículos corresponden a concentraciones de fosfato de calcio de 1,5; 7,5; 15 y 30 $\mu\text{g CaP/mL}$ respectivamente para ambas muestras. Para las muestras de CaPLiLX, las diluciones corresponden a concentraciones del antibiótico de 0,0325; 0,1625; 0,325 y 0,975 $\mu\text{g LX/mL}$.

Para el caso de las nanopartículas conteniendo levofloxacina (CaPLiLX), los resultados de viabilidad celular fueron similares, lo cual indicaría que la incorporación del antibiótico

no le confiere acciones citotóxicas adicionales a los CaPLi bajo las condiciones evaluadas. Estos resultados sugieren una buena biocompatibilidad e inocuidad de los nanovehículos al interactuar con células formadoras del tejido óseo en el rango de concentraciones evaluadas.

3.2.2. Estudio de la internalización de los nanovehículos.

CaPLiLX

Uno de los principales objetivos de los nanovehículos recubiertos es transportar y entregar medicamentos y/o biomoléculas al tejido óseo dañado, por lo cual se evaluó la capacidad de los CaPLi de internalizarse en células de osteosarcoma humano U2-OS y liberar su contenido. Inicialmente se observaron las células incubadas con nanopartículas vacías o con CaPLiLX (10% en medio de cultivo) en el microscopio de fluorescencia. La observación se realizó tanto fijando con paraformaldehído 4%, en metanol o sin fijar. Como era de esperar, las nanopartículas vacías no presentaron emisión; sin embargo, tampoco fue posible visualizar la emisión de CaPLiLX, ni de las partículas solas o con las células. Esto es atribuible a la baja intensidad de emisión del LX que, si bien es detectable en el espectrofluorómetro, no se ha podido detectar en el microscopio utilizado.

CaPLiNA

El naranja de acridina (NA) es un colorante catiónico y metacromático cuya longitud de onda de emisión varía, entre otros factores, con la concentración. A baja concentración (aproximadamente 0,1 mM), se encuentra en forma de monómeros y emite fluorescencia verde. A altas concentraciones (mayores a 100 mM), las moléculas del colorante interactúan entre sí y emiten fluorescencia roja [164]. Este efecto también se observa en la tinción de ARN y ADN. Al ARN lo tiñe metacromáticamente de rojo ya que

el naranja de acridina interactúa con la cadena simple en espiral aleatoria permitiendo el acercamiento e interacción entre las moléculas del colorante. Por su parte, cuando los cationes del naranja de acridina se unen en la doble cadena de ADN, forman un complejo estable en el cual la distancia entre las moléculas de NA es lo suficientemente grande para evitar su interacción y se da una tinción verde ortocromática [165]. En la Figura 75 se puede ver la estructura del colorante.

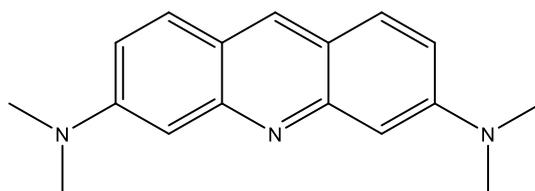


Figura 75. Estructura de la naranja de acridina.

Las células de osteosarcoma U2-OS se incubaron durante 2h con nanopartículas de CaPLiNA con una concentración de 3×10^{-8} M de NA (1% en medio de cultivo). Dado que la fijación afecta la fluorescencia del naranja de acridina en lisosomas [165], se observaron las células vivas en el microscopio. La Figura 76-A corresponde al blanco de las células sin colorante, mientras que la Figura 76-B corresponde al control de las células luego de ser incubadas con naranja de acridina libre a la misma concentración que la contenida en las nanopartículas. Como se aprecia en la Figura 76-C, las células se ven teñidas con intensidad similar tanto cuando son incubadas con los nanovehículos CaPLiNA como con el colorante libre. Por otro lado, en la Figura 76-D1 y D2, se puede ver que el NA se acumula en vesículas citoplasmáticas que pueden observarse tanto en el canal de fluorescencia verde como en el rojo.

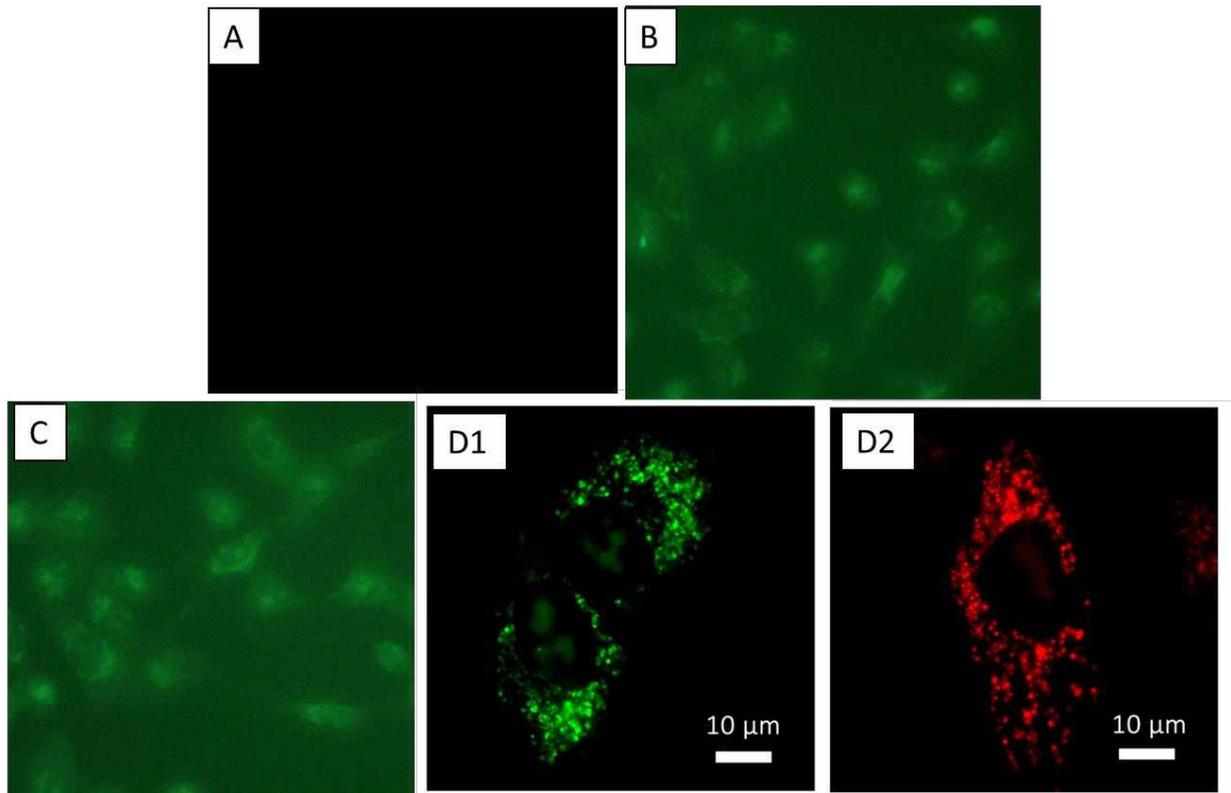


Figura 76. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células U2OS. A) Blanco. B) Con NA $3 \times 10^{-8} M$. C) Con CaPLiNA $3 \times 10^{-8} M$. D1) Imagen aumentada de C en canal verde. D2) Imagen aumentada de C en canal rojo.

El naranja de acridina es permeable a las membranas biológicas, por lo que ingresa libremente a la célula y a las distintas organelas. Lo que ocurre dentro de las vesículas ácidas (lisosomas o endosomas tardías) es que se protona y queda retenido. Por consiguiente, al aumentar la concentración en el lumen de estas vesículas se las puede detectar en el canal rojo.

En experimentos con CaPLiNA, la acumulación de NA dentro de las células podría indicar la internalización de los nanovehículos y posterior liberación de los colorantes. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que las CaPLiNA podrían iniciar parcialmente su disrupción durante los períodos de incubación, debido a la presencia de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} en los caldos de cultivo (ver Sección 3.1.1 del Capítulo 4). Por ello, estos ensayos

no son concluyentes en este aspecto. Restaría confirmar la internalización en experimentos de microscopía electrónica de transmisión que permitan observar los nanovehículos en la célula. Es de destacar el hecho de que la intensidad de fluorescencia dentro de las células es similar en los ensayos control con NA en el cultivo y en ensayos con CaPLiNA (Figura 76), lo que indicaría que la disrupción de los nanovehículos no mantiene el colorante adsorbido en las cáscaras de CaP ni en los restos de liposomas, ya que este puede acumularse completamente en las vesículas celulares.

CaPLiFL

Con el fin de determinar si el patrón de marcación observado con NA se debe a la internalización de las nanopartículas o a una captación directa del colorante, se estudió la incubación de las células de U2-OS con nanopartículas cargadas con fluoresceína, cuya concentración estimada de FL fue $1 \times 10^{-6} \text{M}$. Este colorante no es permeable a la membrana celular, por lo cual, si es detectada su fluorescencia, es debido a que ingresó a la célula a través de los nanovehículos CaPLiFL [166]. En la Figura 77 se puede ver su estructura. Inicialmente se observó que la solución de incubación se veía de un verde muy intenso en el microscopio de fluorescencia. Sin embargo, al lavar las células y observarlas, no se lograron distinguir vesículas en ninguno de los casos evaluados.

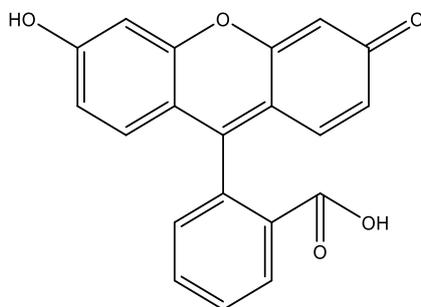


Figura 77. Estructura de la fluoresceína.

Para descartar que una mínima cantidad de fluoresceína haya ingresado a las células sin poder ser detectada por la sensibilidad inherente a la microscopía, se comparó por citometría de flujo una población de células incubadas con nanopartículas en 10% de SFB, con una concentración de CaPLiFL de $1 \times 10^{-6} \text{M}$, con otra población de células control. En este caso, como se observa en la Figura 78, tampoco se encontraron diferencias entre los dos ensayos. Los histogramas para ambas poblaciones están prácticamente superpuestos. Si bien se ve un mínimo cambio en la mediana, no es relevante, ya que las marcas positivas aumentan generalmente varias veces respecto al control.

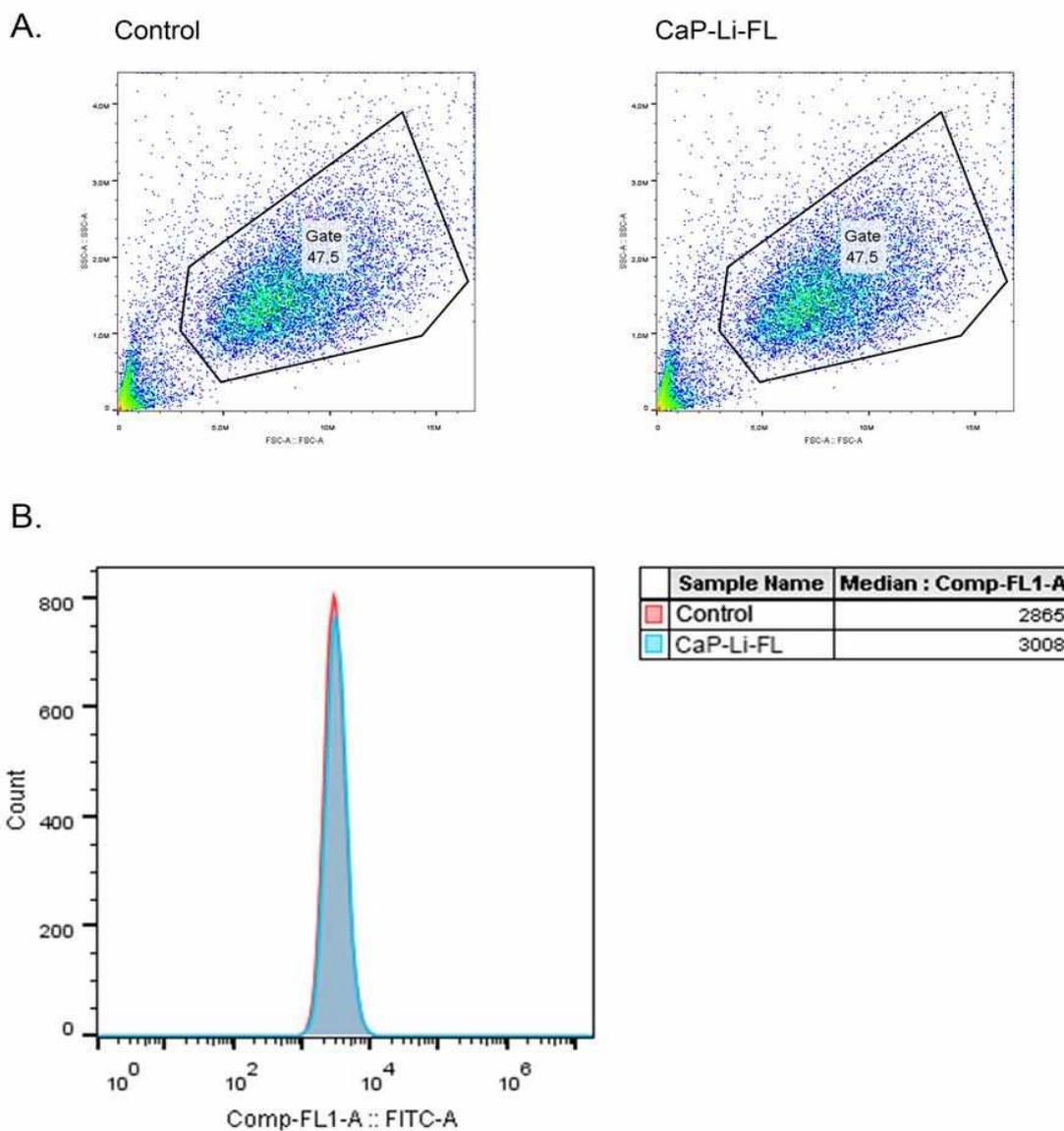


Figura 78. Internalización de nanopartículas por citometría de flujo. Se seleccionó una población de células por tamaño y complejidad y se analizó su fluorescencia en el canal FL1.

Estos resultados sugieren que los nanovehículos no son internalizados por las células óseas U2-OS, o bien la cantidad es baja y se dificulta la detección de cambios en la intensidad de emisión de fluorescencia de la FL. Sin embargo, tal como se mencionó anteriormente, restan realizar ensayos de internalización observando las células por TEM. Además, la interacción de células U2-OS con superficies nanoestructuradas cubiertas con CaP es compleja y no está bien dilucidada [167].

3.3. Biocompatibilidad con larvas

Con el objetivo de elucidar el efecto que tienen los nanovehículos sobre organismos complejos y determinar si hay una interacción específica con el tejido óseo, se realizaron pruebas de biocompatibilidad con larvas de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*), tanto de liposomas recubiertos vacíos como conteniendo el colorante naranja de acridina, el cual cumple el papel de sonda fluorescente. Como primera medida, se evaluó el efecto de los CaPLi sobre el crecimiento de las larvas, específicamente en el punto de no retorno (PNR) o dosis letal 50 (DL50). Este parámetro corresponde a que el 50% de la población continúe con vida después del tratamiento. Un PNR por debajo de 50 indica que la proporción de larvas que no retorna a sus capacidades físicas, llevándolas irreversiblemente a la muerte, es superior a la mitad de la población.

De acuerdo con la Figura 79, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos y el control, ya que todos superaron el PNR (50% de la población); sin embargo, pudo observarse una tendencia a un menor tiempo de supervivencia en los tratamientos con 37,5 µg CaP/mL y 75 µg CaP/mL, (T3 y T4 respectivamente) por lo que para los ensayos siguientes se utilizó una concentración de fosfato de calcio de 7,5 µg CaP/mL (T2).

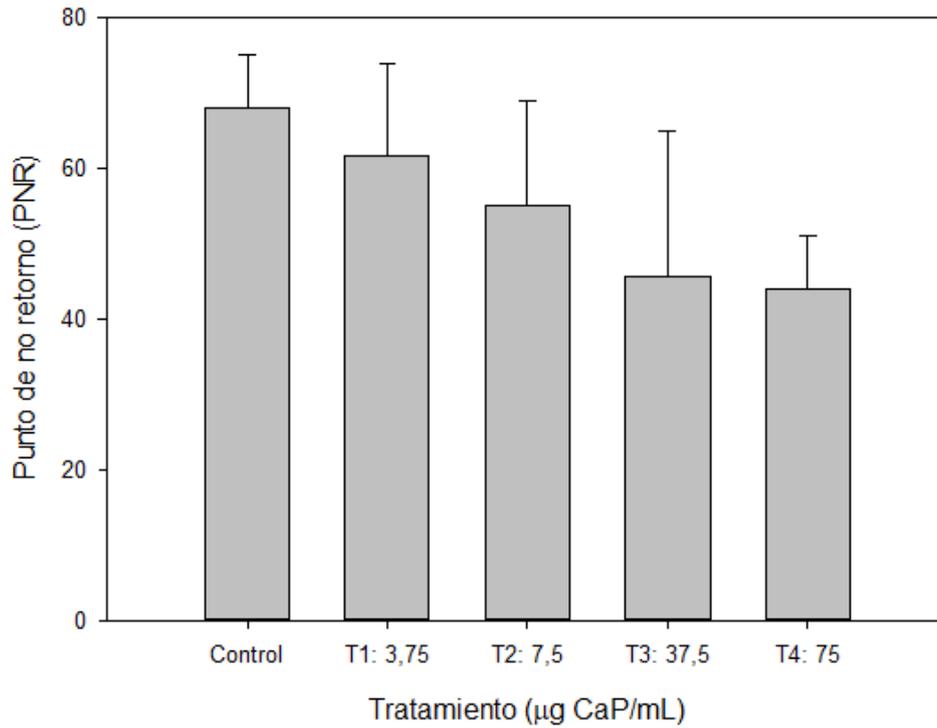


Figura 79. Efecto de tratamientos de CaPLi sobre las larvas de pejerrey.

Seguidamente, se expusieron las larvas a nanopartículas de CaPLiNA diluídas al 10% (3×10^{-7} M de NA) y se observaron en distintos momentos, con el objetivo de establecer el tiempo óptimo que permitiera una mejor visualización. El tiempo en el que se encontró una mejor definición e intensidad de fluorescencia verde en las larvas fue de $24\text{h} \pm 3\text{h}$ y el resultado puede apreciarse en la Figura 80.

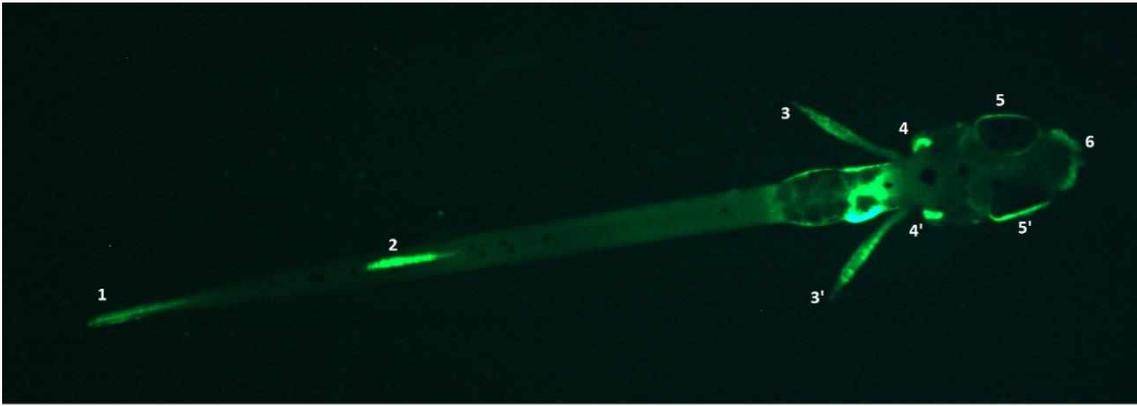


Figura 80. Larva de pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) de 12 días de edad en vista dorsal, luego de 24h de exposición a CaPLiNA. 1- Aleta caudal; 2- Aleta dorsal; 3, 3'- Aletas pectorales; 4, 4'-Opérculos; 5, 5'- Globos oculares; 6- Maxila.

Aunque en todos los casos el abdomen de las larvas se vio fuertemente coloreado, sobresale en la imagen el grupo de huesos del opérculo, los cuales se utilizan comúnmente para analizar la interacción y tinción en tejido óseo. Restaría repetir el ensayo incubando las larvas de pejerrey en presencia del colorante para observar si en su forma libre es capaz de acumularse en este tejido óseo de las larvas. Cabe resaltar que estos ensayos están limitados al ciclo anual del crecimiento del *Odontesthes bonariensis*, lo cual dificultó la realización de más experimentos.

Investigaciones publicadas en la bibliografía han empleado la coloración con naranja de acridina en tejidos de pejerrey sobre secciones de las gónadas extraídas luego de diseccionar individuos estresados por calor, con el objetivo identificar las células afectadas, ya que el NA tiñe de manera diferencial el ADN bicatenario de células normales (fluorescencia verde) y el ADN monocatenario anormal de células apoptóticas (fluorescencia de color rojo anaranjado) [168]. También se utilizó sobre células hepáticas de pez payaso de cola amarilla antes y después de la exposición a la radiación UV [169]. No obstante, no se han reportado ensayos en los que se use el colorante para la tinción preferencial de hueso ni para la observación de larvas *in vivo*.

Por otro lado, se ha utilizado para la tinción de médula femoral de ratones *post mortem*, luego de sembrar en portaobjetos para posteriormente ver la fluorescencia de micronúcleos, eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocromáticos [170]–[172], así como en la tinción de osteoclastos bajo condiciones similares [173]. Adicionalmente, se reporta la tinción de fluorescencia con naranja de acridina de esperma para determinar la fertilidad masculina; la tinción de tejidos de mama, pulmón, riñón e hígado para la posterior obtención de imágenes con microscopía láser confocal; y se ha utilizado para obtener imágenes rápidas no destructivas de biopsias de próstata completa, utilizando microscopía de iluminación estructurada de fluorescencia a velocidad de video [174].

De acuerdo con lo anterior, el NA ha sido utilizado para la tinción de células específicas, la mayoría no relacionadas con el tejido óseo, luego de extraer y tratar los tejidos a visualizarse, en condiciones histológicas; por lo tanto, no se han encontrado registros del uso del colorante en ensayos *in vivo*. Con base en lo descrito sobre el colorante solo, se puede presumir que la emisión en verde observada en la Figura 80, mayormente sobre las partes osificadas, corresponde a un posible direccionamiento del naranja de acridina a través de los nanovehículos. Este resultado respalda la fuerte atracción e interacción de las nanovesículas recubiertas con fosfato de calcio con el hueso y su potencial uso como vehículo de carga y entrega al tejido óseo.

4. CONCLUSIONES PARCIALES

Los nanovehículos de CaPLiLX fueron efectivos para la inhibición del crecimiento bacteriano sobre *Echerichia coli* y *Staphylococcus aureus*, con una dosis de LX de 2,91 $\mu\text{g}/\text{mL}$, comparable con el efecto del antibiótico solo a la misma concentración. Más aún, se obtuvieron curvas de tiempo de muerte bacteriana de células planctónicas de *S. aureus* similares para formulaciones de CaPLiLX y del antibiótico LX libre, probablemente como consecuencia de la interacción de cationes divalentes presentes en la vecindad de las bacterias Gram-positivas con CaPLiLX, lo que llevaría a la interrupción y liberación de los antibióticos. Esto demuestra el potencial de los nanoportadores para aplicaciones de administración de fármacos en solución.

Las nanopartículas de CaPLi y CaPLiLX no presentaron toxicidad en células óseas cuando se incubaron durante 24-48h en concentraciones hasta 30 $\mu\text{g CaP}/\text{mL}$. Por otro lado, si bien se evaluaron diferentes condiciones de incubación, no se logró comprobar la internalización de las CaPLiLX ni de las CaPLiFL, aunque sí se observó un patrón de vesículas intracelulares con alta concentración de colorante cuando se evaluó la internalización de CaPLiNA. Teniendo en cuenta que este patrón podría ser generado por NA libre, se respalda el mecanismo de interrupción de las nanocápsulas al entrar en contacto con la superficie celular.

Los ensayos con larvas de pejerrey demostraron la biocompatibilidad y fuerte atracción de las nanopartículas recubiertas con fosfato de calcio por el tejido óseo. Se presume una potencial capacidad de los nanovehículos de desensamblarse y entregar la carga en el tejido óseo en un experimento *in vivo*. En efecto, la coloración con el colorante NA se observó preferencialmente en el opérculo y otras partes osificadas de las larvas de pejerrey, a pesar de la capacidad del NA de teñir otros tejidos.

CAPÍTULO 6.
CONCLUSIONES
GENERALES Y
PERSPECTIVAS
FUTURAS

1. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se sintetizaron exitosamente nanovehículos formados por liposomas recubiertos con una capa de fosfato de calcio amorfo, capaces de entrapar moléculas hidrófobas e hidrófilas, ya sea en su interior acuoso, en la bicapa lipídica o en su interfase con CaP. Por su parte, la capa de CaP aumenta su afinidad con el tejido inorgánico del hueso. Posteriormente, estas nanocápsulas fueron modificadas superficialmente con moléculas que actúan como vectores de direccionamiento y sondas fluorescentes, tal como lo son el bisfosfonato alendronato y los colorantes violeta de cresilo, fucsina básica y fluoresceína isotiocianato. Los nanovehículos obtenidos poseen condiciones y propiedades adecuadas para funcionar como vehículos de reparto de drogas al hueso, destacando su capacidad de respuesta a las superficies conteniendo calcio. No obstante, resta optimizar diversos parámetros de diseño que permitan el control eficiente de la cinética de liberación para determinar su utilidad como alternativa a la administración inespecífica de fármacos en el tratamiento de enfermedades óseas.

Las nanocápsulas conteniendo distintos fármacos atrapados fueron ampliamente caracterizadas y evaluadas por microscopía electrónica de transmisión y de barrido, técnicas espectroscópicas y de fotoluminiscencia, así como resonancia magnética, difracción de rayos X, entre otras, que en conjunto permitieron confirmar la síntesis de los liposomas a partir de fosfolípidos de DOPA, la formación y carácter amorfo del recubrimiento de fosfato de calcio mediante el método de coprecipitación de sales, y la posibilidad de los nanovehículos de ser modificados superficialmente con moléculas de direccionamiento como los bisfosfonatos y con fluoróforos que permiten su rastreo y visualización mediante técnicas de microscopía de fluorescencia.

Se pudo comprobar la capacidad de los CaPLi de contener y transportar antibióticos, bisfosfonatos y colorantes en su interior; estos últimos fueron además liberados al

entrar en contacto con superficies enriquecidas con hidroxiapatita o iones divalentes como el calcio. Adicionalmente, se pudo establecer que la cinética de liberación en solución de levofloxacina, utilizado como medicamento modelo y contenido en CaPLiLX, responde a un mecanismo difusional típico de partículas esféricas en los medios estudiados (buffer acetato, PBS y SBF); además, es sensible al contenido de iones del medio, como lo evidenció la liberación acelerada en SBF, en cuya preparación se utilizan calcio y magnesio, en comparación con PBS al mismo pH. Los nanovehículos también presentaron un potencial efecto sinérgico al incorporarse en andamios en desarrollo para ingeniería de tejido óseo, con los cuales podría generar sistemas completos de regeneración y reparto controlado de drogas o biomoléculas, necesarias para la recuperación de fracturas y afecciones relacionadas.

En cuanto a la capacidad antimicrobiana de las nanocápsulas, se pudo confirmar que el antibiótico LX conserva su efecto bactericida, aún estando contenido en los CaPLiLX, contra bacterias planctónicas de *S. aureus*, presentando tiempos de muerte cercanos al del antibiótico libre. Por otro lado, se confirmó que las nanopartículas no son tóxicas ni afectan la viabilidad de células formadoras de tejido óseo como lo es la línea celular MC-3T3. En cuanto a los experimentos de inclusión celular de CaPLiNA y CaPLiFL, los resultados no fueron contundentes en indicar la internalización de los nanovehículos en la línea celular U2OS de osteosarcoma humano. Sin embargo, ambos ensayos muestran claramente la ruptura de las vesículas y liberación del contenido en el medio de cultivo, es decir que el colorante libre penetró en las células. Restaría realizar ensayos con microscopía TEM para registrar la interacción real de las células con los nanovehículos antes y después de la incubación.

Finalmente se pudo ver el efecto que tienen los nanovehículos sintetizados sobre larvas de pejerrey, con las cuales se realizaron ensayos de biocompatibilidad y direccionamiento de CaPLiNA al tejido óseo, dando como resultado que no afectan la supervivencia de dichos organismos y, por el contrario, se dirigen específicamente a las partes formadoras de hueso de los peces como es deseado.

Las nanocápsulas de CaPLi conteniendo diversos fármacos y moléculas modelo constituyen un potencial sistema de contención y reparto controlado de antibióticos, bisfosfonatos y otras moléculas de interés, tanto sobre superficies simuladas como sobre el tejido óseo de modelos biológicos sencillos.

También se presentaron muchos desafíos en el desarrollo de esta tesis doctoral, tanto en la síntesis y caracterización de los nanovehículos, como en la evaluación y aplicación *in vitro* e *in vivo*, en los cuales se debe trabajar para optimizar los nanosistemas aquí obtenidos. Algunos de los principales problemas y desafíos encontrados fueron:

Con el objetivo de purificar los CaPLi por un método que permitiera obtener material sólido y facilitar la caracterización fisicoquímica, se intentó centrifugar y secar las muestras sin resultados positivos. También se probó la liofilización, pero las medidas de DLS de CaPLi luego del procedimiento mostraron que se desintegran las nanocápsulas bajo las condiciones probadas, por lo cual siempre se usó la diálisis. Al obtener una muestra sólida podría mejorar la caracterización, transporte y estabilidad de las formulaciones.

Si bien los nanovehículos son biodegradables por su composición, al contener antibióticos y colorantes, significan una fuente de contaminantes emergentes, por lo cual se debe controlar su disposición a nivel laboratorio y reducir la contaminación en la fuente. La diálisis resulta ser un método poco eficiente en ese sentido, por la cantidad de agua requerida para la purificación y su posterior descarte. Es importante pensar en el uso de métodos que minimicen los recursos utilizados y permitan el aprovechamiento de residuos.

Una característica deseada de los nanovehículos es que puedan permanecer en el tejido óseo hasta que entreguen la dosis de fármaco correspondiente, por lo

que se requieren tiempos más largos de liberación para que puedan ser evaluados como droga en el tratamiento de enfermedades crónicas, ya que los CaPLiLX sintetizados producen su mayor descarga en tiempos cortos y son muy reactivos a la presencia de iones divalentes, lo que los hace muy susceptibles a los medios biológicos. Una estrategia posible sería controlar el espesor de la capa de fosfato de calcio que recubre los CaPLi, bajo la hipótesis de que una capa de mayor espesor retrasaría la disrupción de las nanocápsulas e influiría en la cinética de liberación. Para probar lo anterior se sintetizaron nanovehículos de CaPLiLX en los cuales se aumentó el tiempo de coprecipitación de sales de fosfato y calcio y se agregó el CEPA luego de 30, 90 y 120 minutos, en vez de 10 minutos como se hizo en el experimento original. Posteriormente se evaluó la liberación de LX en PBS desde estos CaPLiLX modificados; sin embargo, los resultados no permitieron modelar una cinética por la baja detección de LX en el medio. La optimización del espesor de la capa de CaP es una estrategia para evaluar en el control fehaciente del tiempo de descarga, con miras a obtener sistemas integrados de carga, direccionamiento y seguimiento mediante imágenes para el reparto de drogas en el hueso. Otra estrategia a ser abordada para el control de la cinética de liberación podría ser el recubrimiento posterior de los nanovehículos CaPLi con polímeros de interés para tratamientos óseos [175]–[177].

También se abordó el estudio de la cinética de liberación de LX desde los CaPLiLX adheridos a los andamios de seda, pensando en un sistema sinérgico entre el andamio, como parte estructural, y los nanovehículos como transportadores de carga. Al realizar este ensayo sumergiendo los andamios en PBS bajo agitación, la seda se empezó a diluir en el medio de liberación afectando la lectura de concentración de LX mediante fluorescencia, por lo que no fue concluyente. Una alternativa a probar consistiría en la inclusión de los CaPLi en los andamios al momento de la síntesis, además de estudiar las propiedades fotofísicas que pueda tener la seda.

2. PERSPECTIVAS

Con base en los resultados y conclusiones del presente trabajo de tesis, se abren múltiples posibilidades a la continuación de ensayos experimentales para ampliar el alcance de los hallazgos, explicar en mayor profundidad los fenómenos observados y optimizar el diseño de los nanovehículos para transporte de fármacos al hueso. Por un lado, dentro de los ensayos a continuar en esta tesis se destacan:

- Probar métodos de purificación como la liofilización con crioprotectores para extender la vida útil de las formulaciones de nanovehículos CaPLi.
- Probar la liberación de LX a partir de nanovehículos recubiertos y modificados superficialmente con alendronato y distintos fluoróforos, para determinar cómo los grupos funcionales introducidos afectan la ruptura de la estructura y la cinética de liberación.
- Evaluar recubrimientos poliméricos adicionales o alternativos para los liposomas, como PEG o colágeno, que permitan mejorar la interacción con el tejido óseo y moderar la liberación de los fármacos contenidos. En el caso del PEG, su uso como recubrimiento adicional es de especial interés ya que retrasa la captación de partículas del sistema inmune del cuerpo.
- Continuar ensayos con células para confirmar el mecanismo de interacción y posible internalización de las nanopartículas.
- Optimizar el protocolo del estudio de biocompatibilidad de CaPLi con larvas de pejerrey. Inocular las larvas con el colorante naranja de acridina para tener resultados más rigurosos.

Por otro lado, dentro de los ensayos de validación preclínica y clínica para la evaluación farmacológica del vehículo se pueden mencionar:

- Evaluación de la interacción de los nanovehículos con andamios e injertos óseos, realizando pruebas *in vitro* a profundidad e *in vivo* con los implantes.
- Continuar ensayos con larvas de pejerrey. Evaluar la inducción de osteoporosis en larvas con glucocorticoides y posteriormente tratarlas con nanovehículos cargados con alendronato para estudiar el efecto del bisfosfonato contenido en CaPLiAD y el posible rescate de la osteoporosis, a través de protocolos de tinción específica de tejidos, usando, por ejemplo, el colorante rojo de alizarina.
- Evaluar la estabilidad y seguridad de los nanovehículos a largo plazo, monitoreando los efectos en los modelos biológicos utilizados para evaluar su eficacia.
- Ensayos de farmacocinética exhaustivos que permitan evaluar cómo el cuerpo podría absorber, distribuir, metabolizar y excretar los nanovehículos. Esto ayudaría a determinar la dosificación adecuada y el intervalo de administración para las afecciones tratada

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. L. Dittler, “Desarrollo de nanocompositos basados en hidroxiapatita/hidroxiapatita dopada con metales y/o biomoléculas como materiales de recubrimiento de andamios para implantes ortopédicos,” Universidad Nacional de La Plata, 2020.
- [2] Y. Liu, M. Zhou, Y. Tang, Y. Zhao, and G. Zheng, “Material-Unit Network for Multi-Material-Property and Multiscale Components,” *Comput. Aided. Des. Appl.*, vol. 17, no. 3, pp. 547–560, Sep. 2019, doi: 10.14733/cadaps.2020.547-560.
- [3] J. Castillo Solano and C. Camacho Jañez, “ENFERMEDADES METABÓLICAS Y ÓSEAS(EXCEPTO OSTEOPOROSIS).”
- [4] I. Fernández-Tresguerres Hernández-Gil, M. A. Alobera Gracia, M. del Canto Pingarrón, and L. Blanco Jerez, “Bases fisiológicas de la regeneración ósea I. Histología y fisiología del tejido óseo,” *Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal*, vol. 11, no. 1, pp. 47–51, 2006.
- [5] Asociación Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral, “Enfermedades de los huesos: Mucho más que Osteoporosis,” 2005. .
- [6] M. L. Brance and M. S. Larroudé, “Masa ósea y fracturas en enfermedades reumatológicas autoinmunes,” *Rev. Argent. Reumatol.*, vol. 28, no. 1, 2017.
- [7] World Health Organization, “Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis : report of a WHO study group,” 1994.
- [8] O. Johnell and J. A. Kanis, “An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures,” *Osteoporos. Int.*, vol. 17, no. 12, pp. 1726–1733, Oct. 2006, doi: 10.1007/s00198-006-0172-4.
- [9] G. Li, L. Thabane, A. Papaioannou, G. Ioannidis, M. A. H. Levine, and J. D. Adachi, “An overview of osteoporosis and frailty in the elderly,” *BMC Musculoskelet. Disord.*, vol. 18, no. 1, p. 46, Dec. 2017, doi: 10.1186/s12891-017-1403-x.
- [10] T. J. de Villiers and S. R. Goldstein, “Bone health 2022: an update,” *Climacteric*, vol. 25, no. 1, pp. 1–3, Jan. 2022, doi: 10.1080/13697137.2021.1965408.

- [11] L. Schurman *et al.*, “Guías argentinas para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de la osteoporosis 2015,” *Actualizaciones en Osteología*, vol. 13, no. 2. Asociacion Argentina de Osteología y Metabolismo Mineral, pp. 136–156, 2017.
- [12] “Osteoporosis: la importancia de la detección temprana y los hábitos saludables para minimizar sus riesgos,” 2021.
<https://www.infobae.com/salud/2021/06/22/osteoporosis-la-importancia-de-la-deteccion-temprana-y-los-habitos-saludables-para-minimizar-sus-riesgos/> (accessed Jun. 23, 2023).
- [13] “Día Mundial de la Osteoporosis: hay una fractura de cadera cada 16 minutos en el país y falta control,” 2022. https://www.clarin.com/sociedad/dia-mundial-osteoporosis-fractura-cadera-16-minutos-pais-falta-control_0_CrCy5QZ74X.html (accessed Jun. 23, 2023).
- [14] “Osteoporosis: en Argentina se producen 90 fracturas de cadera por día,” 2022. <https://www.infobae.com/salud/2022/04/06/osteoporosis-en-argentina-se-producen-90-fracturas-de-cadera-por-dia/> (accessed Jun. 23, 2023).
- [15] F. Spivacow and A. Sanchez, “EPIDEMIOLOGÍA Y COSTOS FINANCIEROS DE LA OSTEOPOROSIS EN ARGENTINA, 2009,” *Actual. Osteol*, vol. 6, no. 3, pp. 184–193, 2009.
- [16] Sociedad Argentina de Osteoporosis, “No Title,” 2021.
<https://www.osteoporosis.org.ar/index.php/publicaciones/trabajos-cientificos>.
- [17] E. M. Curtis, E. M. Dennison, C. Cooper, and N. C. Harvey, “Osteoporosis in 2022: Care gaps to screening and personalised medicine,” *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, vol. 36, no. 3, p. 101754, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.berh.2022.101754.
- [18] J. A. Kanis, H. Johansson, N. C. Harvey, and E. V. McCloskey, “A brief history of FRAX,” *Arch. Osteoporos.*, vol. 13, no. 1, p. 118, Dec. 2018, doi: 10.1007/s11657-018-0510-0.
- [19] United Nations, “World Population Prospects 2022.”
<https://population.un.org/wpp/> (accessed May 06, 2023).
- [20] S. G. Rotman, D. W. Grijpma, R. G. Richards, T. F. Moriarty, D. Eglin, and O. Guillaume, “Drug delivery systems functionalized with bone mineral seeking

- agents for bone targeted therapeutics," *J. Control. Release*, vol. 269, pp. 88–99, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.JCONREL.2017.11.009.
- [21] A. D. Bagde *et al.*, "State of the Art Technology for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery," *IRBM*, vol. 40, no. 3, pp. 133–144, Jun. 2019, doi: 10.1016/J.IRBM.2019.03.001.
- [22] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, and P. Chowdhury, "Review kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems," *Acta Pol. Pharm. Drug Res.*, vol. 67, no. 3, pp. 217–223, 2010.
- [23] J. Batalla Mayoral, A. Cuadros Moreno, and E. San Martín-Martínez, "Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas," *Am. J. Phys. Educ*, vol. 8, no. 4, 2014, Accessed: Jan. 03, 2023. [Online]. Available: <http://www.lajpe.org>.
- [24] L. D. Martínez Madero, "Contexto actual de los medicamentos nanotecnológicos a base de liposomas," UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS, 2022.
- [25] C. Gutierrez Bacilio, "Análisis fenomenológico de la interacción de quitosano como recubrimiento biopolimérico de liposomas," INSTITUTO TECNOLÓGICO DE ORIZABA, 2016.
- [26] H. Cheng *et al.*, "Development of nanomaterials for bone-targeted drug delivery," *Drug Discov. Today*, vol. 22, no. 9, pp. 1336–1350, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.drudis.2017.04.021.
- [27] L. Dang *et al.*, "Targeted Delivery Systems for Molecular Therapy in Skeletal Disorders," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 3, p. 428, 2016, doi: 10.3390/ijms17030428.
- [28] H. T. Schmidt, B. L. Gray, P. A. Wingert, and A. E. Ostafin, "Assembly of Aqueous-Cored Calcium Phosphate Nanoparticles for Drug Delivery," no. 19, pp. 4942–4947, 2004.
- [29] Q. Xu, Y. Tanaka, and J. T. Czernuszka, "Encapsulation and release of a hydrophobic drug from hydroxyapatite coated liposomes," *Biomaterials*, vol. 28, no. 16, pp. 2687–2694, 2007, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.02.007.
- [30] M. . Ferraz, A. Y. Mateus, J. C. Sousa, and F. J. Monteiro, "Nanohydroxyapatite microspheres as delivery system for antibiotics: Release kinetics, antimicrobial

- activity, and interaction with osteoblasts," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 81A, no. 4, pp. 994–1004, 2007, doi: 10.1002/jbm.a.31151.
- [31] G. R., G. S. Kumar, and E. K. Girija, "Polymer coated phosphate glass/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering applications," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 74, pp. 60188–60198, 2015, doi: 10.1039/C5RA09258B.
- [32] T. L Moore, "Polymer-Coated Hydroxyapatite Nanoparticles for the Delivery of Statins," *J. Nanomed. Nanotechnol.*, vol. 05, no. 05, 2014, doi: 10.4172/2157-7439.1000237.
- [33] W.-H. Lee, C.-Y. Loo, and R. Rohanizadeh, "A review of chemical surface modification of bioceramics: Effects on protein adsorption and cellular response," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 122, pp. 823–834, 2014, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.07.029.
- [34] I. Rivero Berti, M. L. Dell' Arciprete, M. L. Dittler, A. Miñan, M. Fernández Lorenzo de Mele, and M. Gonzalez, "Delivery of fluorophores by calcium phosphate-coated nanoliposomes and interaction with *Staphylococcus aureus* biofilms," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 142, pp. 214–222, 2016, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.003.
- [35] C. H. Yeo, S. H. S. Zein, A. L. Ahmad, and D. S. McPhail, "Investigation into the role of NaOH and calcium ions in the synthesis of calcium phosphate nanoshells," *Brazilian J. Chem. Eng.*, vol. 29, no. 1, pp. 147–158, 2012, doi: 10.1590/S0104-66322012000100016.
- [36] V. M. Wu, J. Mickens, and V. Uskoković, "Bisphosphonate-Functionalized Hydroxyapatite Nanoparticles for the Delivery of the Bromodomain Inhibitor JQ1 in the Treatment of Osteosarcoma," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 31, pp. 25887–25904, 2017, doi: 10.1021/acsami.7b08108.
- [37] D. Huang, B. He, and P. Mi, "Calcium phosphate nanocarriers for drug delivery to tumors: imaging, therapy and theranostics," *Biomater. Sci.*, 2019, doi: 10.1039/c9bm00831d.
- [38] N. P. Praetorius and T. K. Mandal, "Engineered nanoparticles in cancer therapy," *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, vol. 1, no. 1, pp. 37–51, 2007.
- [39] M. L. Dittler *et al.*, "Magnetic 3D scaffolds for tissue engineering applications:

- bioactive glass (45S5) coated with iron-loaded hydroxyapatite nanoparticles,” *Biomed. Mater.*, vol. 16, no. 5, p. 055006, Sep. 2021, doi: 10.1088/1748-605X/ac14cc.
- [40] M. L. Dittler, H. Rodríguez, M. Cippollone, C. Grillo, and M. C. González, “Phosphonopropionic acid coating as platform for the efficient grafting of (bio)molecules to hydroxyapatite nanoparticles,” *Biomed. Eng. Int.*, vol. 2, 2020.
- [41] “Fluidez.” <http://biomodel.uah.es/model2/lip/fluidez.htm> (accessed Jan. 18, 2023).
- [42] Q. Chang, R. Geng, S. Wang, D. Qu, and X. Kong, “DOPA-based paclitaxel-loaded liposomes with modifications of transferrin and alendronate for bone and myeloma targeting transferrin and alendronate for bone and myeloma targeting,” vol. 7544, no. March, 2017, doi: 10.1080/10717544.2016.1214989.
- [43] E. Fernández, G. Sánchez, E. Navarrete, and F. Del Alcázar, “Pérdida de la actividad antibacteriana de quinolonas por efecto de la radiación UVA,” *Ars Pharm.*, vol. 45, no. 2, pp. 111–119, 2004.
- [44] X. Zhang, P. Sun, R. Bi, J. Wang, N. Zhang, and G. Huang, “Targeted delivery of levofloxacin-liposomes for the treatment of pulmonary inflammation,” vol. 17, no. January, pp. 399–407, 2009, doi: 10.1080/10611860902795407.
- [45] E. Canovas Alcazar, “Infecciones sobre prótesis articulares. Epidemiología, factores pronóstico, estudio de las recidivas e influencia del tratamiento antibiótico en su evolución, con especial referencia a linezolid. Estudio prospectivo 2000-2007,” 2011.
- [46] C. Liu, J. Shi, Q. Dai, X. Yin, X. Zhang, and A. Zheng, “In-vitro and in-vivo evaluation of ciprofloxacin liposomes for pulmonary administration,” vol. 9045, pp. 1–7, 2013, doi: 10.3109/03639045.2013.858740.
- [47] A. A. Kadry, S. A. Al-Suwayeh, A. R. A. Abd-Allah, and M. A. Bayomi, “Treatment of experimental osteomyelitis by liposomal antibiotics,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 54, no. 6, pp. 1103–1108, 2004, doi: 10.1093/jac/dkh465.
- [48] H. H. Yu Wang¹, Jing Yang¹, Yanfang Guo², Haipeng Wang¹, Yalan Liu¹ and B. Xie¹, “A Novel HPLC-UV Method for Determining Alendronate in Rat Plasma through Pre-Column Derivatization with Phenyl Isothiocyanate: Application to Pharmacokinetics,” pp. 1–23.

- [49] S. I. Thamake, S. L. Raut, Z. Gryczynski, A. P. Ranjan, and J. K. Vishwanatha, "Alendronate coated poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles for active targeting of metastatic breast cancer," *Biomaterials*, vol. 33, no. 29, pp. 7164–7173, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.026.
- [50] G. LAMPRECHT, "In Vitro Determination of the Release of Alendronic Acid from Alendronate Tablets of Different Brands during Deglutition," *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 7, pp. 2271–2280, 2012, doi: 10.1002/jps.
- [51] R. Cheng *et al.*, "Advanced liposome-loaded scaffolds for therapeutic and tissue engineering applications," *Biomaterials*, vol. 232, p. 119706, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119706.
- [52] M. L. Dittler *et al.*, "Bioactive glass (45S5)-based 3D scaffolds coated with magnesium and zinc-loaded hydroxyapatite nanoparticles for tissue engineering applications," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 182, no. July, p. 110346, 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110346.
- [53] U. J. Kim, J. Park, H. Joo Kim, M. Wada, and D. L. Kaplan, "Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin," *Biomaterials*, vol. 26, no. 15, pp. 2775–2785, 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.07.044.
- [54] S. H. Park, E. S. Gil, H. Shi, H. J. Kim, K. Lee, and D. L. Kaplan, "Relationships between degradability of silk scaffolds and osteogenesis," *Biomaterials*, vol. 31, no. 24, pp. 6162–6172, 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.028.
- [55] T. K. A and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity ? \$," vol. 27, pp. 2907–2915, 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.017.
- [56] S. J. Pennycook, "Transmission Electron Microscopy," in *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*, Elsevier, 2005, pp. 240–247.
- [57] M. Ipohorski and P. B. Bozzano, "MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO," *Cienc. Invest.*, vol. 3, pp. 43–53, 2013.
- [58] B. D. Cullity and S. R. Stock, *Elements of X-Ray Diffraction*. 2001.
- [59] M. E. Aparicio Ceja and G. G. Carbajal Arizaga, "Utilidad de la difracción de rayos x en las nanociencias," *Mundo Nano. Rev. Interdiscip. en Nanociencias y Nanotecnología*, vol. 3, no. 2, 2015, doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2010.2.52223.

- [60] D. Lamba, "Wide-Angle X-Ray Scattering (WAXS)," in *Encyclopedia of Membranes*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016, pp. 2040–2042.
- [61] "WAXS: Wide Angle X-ray Scattering - - Diamond Light Source." <https://www.diamond.ac.uk/Instruments/Techniques/Scattering/WAXS.html> (accessed Jan. 03, 2023).
- [62] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US, 1999.
- [63] C. A. Briones-Vázquez and A. Álvarez-Hernández, "Sondas fluorescentes, una revisión general: propiedades, diseño y aplicaciones," *Pädi Boletín Científico Ciencias Básicas e Ing. del ICBI*, vol. 9, no. 17, pp. 9–16, Jul. 2021, doi: 10.29057/icbi.v9i17.7143.
- [64] D. E. Wolf, "Fundamentals of Fluorescence and Fluorescence Microscopy," 2007, pp. 63–91.
- [65] S. E. Braslavsky *et al.*, "Glossary of terms used in photocatalysis and radiation catalysis (IUPAC Recommendations 2011)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 83, no. 4, pp. 931–1014, Mar. 2011, doi: 10.1351/PAC-REC-09-09-36.
- [66] C. De Caro and H. Claudia, *UV/VIS Spectrophotometry - Fundamentals and Applications*. 2015.
- [67] S. G. Kazarian and K. L. A. Chan, "ATR-FTIR spectroscopic imaging: recent advances and applications to biological systems," *Analyst*, vol. 138, no. 7, p. 1940, 2013, doi: 10.1039/c3an36865c.
- [68] D. F. Mercado Castro, "USO DE RESIDUOS ORGÁNICOS DOMICILIARIOS EN LA OBTENCIÓN DE MATERIALES ÚTILES DE INTERÉS AMBIENTAL Y NANOTECNOLÓGICO," Universidad Nacional de La Plata, 2016.
- [69] L. Sandoval, L. Montellano, M. Piña, and L. Sánchez, "POTENCIAL ZETA COMO UNA HERRAMIENTA PARA DETERMINAR LA AGLOMERACIÓN DE LAS PARTÍCULAS EN LA REDUCCIÓN DEL VOLUMEN DEL LODO A DISPONER," *Inst. Mex. Technol. del Agua*.
- [70] J. Batalla Mayoral, A. Cuadros Moreno, and E. San Martin-Martínez, "Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas," *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, vol. 8, no. 4, pp. 4319-1–6, 2014, doi: .1037//0033-2909.I26.1.78.

- [71] R. Pecora, *Dynamic Light Scattering*. 1985.
- [72] A. Cuadros-Moreno, R. Casañas Pimentel, E. San Martín-Martínez, and J. Yañes Fernández, “Dispersión de luz dinámica en la determinación de tamaño de nanopartículas poliméricas,” *Lat. Am. J. Phys. Educ.*, vol. 8, no. 4, pp. 4314-1-4, 2014, doi: .1037//0033-2909.126.1.78.
- [73] V. Hengst, C. Oussoren, T. Kissel, and G. Storm, “Bone targeting potential of bisphosphonate-targeted liposomes. Preparation, characterization and hydroxyapatite binding in vitro,” *Int. J. Pharm.*, vol. 331, no. 2, pp. 224-227, 2007, doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.11.024.
- [74] Y. F. Cardoza, “LA MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y SU APLICACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS.”
- [75] “Así funciona un microscopio de fluorescencia - Cromtek.”
<https://www.cromtek.cl/2021/01/12/asi-funciona-un-microscopio-de-fluorescencia/> (accessed Jan. 23, 2023).
- [76] O. Ormachea and A. Villazón, “DESARROLLO DE UN MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA DE BAJO COSTO,” *Investig. Desarro.*, vol. 17, no. 1, pp. 5-14, Jul. 2017, doi: 10.23881/idupbo.017.1-1i.
- [77] S. R. Khan, B. Sharma, P. A. Chawla, and R. Bhatia, “Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES): a Powerful Analytical Technique for Elemental Analysis,” *Food Anal. Methods*, vol. 15, no. 3, pp. 666-688, Mar. 2022, doi: 10.1007/s12161-021-02148-4.
- [78] E. San Martín García, “Aplicación de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear al análisis de embutidos,” Universidad Nacional de La Rioja, 2019.
- [79] “The Basics of Interpreting a Proton (1H) NMR Spectrum - ACD/Labs.”
<https://www.acdlabs.com/blog/nmr/the-basics-of-interpreting-a-proton-nmr-spectrum/> (accessed Jan. 06, 2023).
- [80] A. García and K. Kikut Cruz, “Microscopía de fuerza atómica como herramienta en la investigación de asfaltos,” *Infraestruct. Vial*, vol. 22, no. 40, pp. 20-27, Dec. 2020, doi: 10.15517/iv.v22i40.42057.
- [81] M. R. Mozafari, “Nanoliposomes: preparation and analysis.,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 605, pp. 29-50, 2010, doi: 10.1007/978-1-60327-360-2_2.
- [82] M. M. Lapinski, A. Castro-Forero, A. J. Greiner, R. Y. Ofoli, and G. J. Blanchard,

- “Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: Rotational and translational diffusion of an embedded chromophore,” *Langmuir*, vol. 23, no. 23, pp. 11677–11683, 2007, doi: 10.1021/la7020963.
- [83] Thermo Fisher, “Chemical Reactivity of Crosslinkers and Modification Reagents,” *Crosslink. Technol. React. Chem. Appl. Struct. Ref.*, pp. 3–4, 2012, [Online]. Available: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1602163-Crosslinking-Reagents-Handbook.pdf>.
- [84] W. Chu *et al.*, “Calcium phosphate nanoparticles functionalized with alendronate-conjugated polyethylene glycol (PEG) for the treatment of bone metastasis,” *Int. J. Pharm.*, vol. 516, no. 1–2, pp. 352–363, 2017, doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.11.051.
- [85] T. Scientific, “INSTRUCTIONS NHS and Sulfo-NHS,” in https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011309_NHS_Sulfo_NHS_UG.pdf, vol. 0747, no. 24500.
- [86] A. Elhissi, H. Gill, W. Ahmed, and K. Taylor, “Vibrating-mesh nebulization of liposomes generated using an ethanol-based proliposome technology,” vol. 21, no. June 2010, pp. 173–180, 2011, doi: 10.3109/08982104.2010.505574.
- [87] M. I. Walash, M. E. S. Metwally, M. Eid, and R. N. El-Shaheny, “Validated spectrophotometric methods for determination of Alendronate sodium in tablets through nucleophilic aromatic substitution reactions,” *Chem. Cent. J.*, vol. 6, no. 1, p. 25, 2012, doi: 10.1186/1752-153X-6-25.
- [88] P. Trucillo, R. Campardelli, and E. Reverchon, “Supercritical CO₂ assisted liposomes formation: Optimization of the lipidic layer for an efficient hydrophilic drug loading,” *J. CO₂ Util.*, vol. 18, pp. 181–188, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.jcou.2017.02.001.
- [89] C. Jaafar-maalej, R. Diab, and A. Elaissari, “Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation,” vol. 20, no. September 2009, pp. 228–243, 2010, doi: 10.3109/08982100903347923.
- [90] G. A. Islan, P. C. Tornello, G. A. Abraham, N. Duran, and G. R. Castro, “Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 143, pp. 168–176, 2016, doi: 10.1016/j.colsurfb.2016.03.040.

- [91] X. Zhang, P. Sun, R. Bi, J. Wang, N. Zhang, and G. Huang, "Targeted delivery of levofloxacin-liposomes for the treatment of pulmonary inflammation," vol. 17, no. February, pp. 399–407, 2009, doi: 10.1080/10611860902795407.
- [92] F. Szoka, "AND METHODS OF PREPARATION OF LIPID VESICLES (LIPOSOMES) I," *Cancer Res.*, pp. 467–508, 1980.
- [93] W.-Y. Ding, "Toxic Effects of Levofloxacin on Rat Annulus Fibrosus Cells: An In-vitro Study," *Med. Sci. Monit.*, vol. 20, pp. 2205–2212, 2014, doi: 10.12659/MSM.892610.
- [94] A. Polishchuk, T. Emelina, E. Karaseva, O. Cramariuc, V. Chukharev, and V. Karasev, "Photochemical Behavior and Photolysis of Protonated Forms of Levo floxacin," pp. 79–84, 2014, doi: 10.1111/php.12152.
- [95] C. F. Marques, A. C. Matos, I. A. C. Ribeiro, L. M. Gonçalves, A. Bettencourt, and J. M. F. Ferreira, "Insights on the properties of levofloxacin-adsorbed Sr- and Mg- doped calcium phosphate powders," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 27, no. 123, pp. 1–12, 2016, doi: 10.1007/s10856-016-5733-2.
- [96] V. Uivarosi, "Metal Complexes of Quinolone Antibiotics and Their Applications: An Update," *Molecules*, vol. 18, no. 9, pp. 11153–11197, Sep. 2013, doi: 10.3390/molecules180911153.
- [97] V. Uivarosi, "Metal Complexes of Quinolone Antibiotics and Their Applications: An Update," *Molecules*, vol. 18, pp. 11153–11197, 2013, doi: 10.3390/molecules180911153.
- [98] M. Ameloot, M. VandeVen, A. U. Acuña, and B. Valeur, "Fluorescence anisotropy measurements in solution: Methods and reference materials (IUPAC Technical Report)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 85, no. 3, pp. 589–608, Jan. 2013, doi: 10.1351/PAC-REP-11-11-12.
- [99] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Third Edit. New York: Springer, 2006.
- [100] B. K. Paul, N. Ghosh, A. Tewary, and S. Mukherjee, "Photophysics and rotational dynamics of a fluoroquinolone drug norfloxacin in biomimetic reverse micellar nanocavities," *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.*, vol. 82, no. 4, pp. 1259–1269, 2016, doi: 10.16943/ptinsa/2016/48571.
- [101] J. Hernández-Borrell and M. T. Montero, "Does ciprofloxacin interact with

- neutral bilayers? An aspect related to its antimicrobial activity," *Int. J. Pharm.*, vol. 252, no. 1–2, pp. 149–157, 2003, doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00633-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00633-6).
- [102] C. S. Fallati, A. A. Ahumada, and R. H. Manzo, "EL PERFIL DE SOLUBILIDAD DE LA CIPROFLOXACINA EN FUNCION DEL PH," *Acta Farm. Bonaer.*, vol. 13, no. 2, pp. 73–77, 1994.
- [103] S. N. Muchohi, N. Thuo, J. Karisa, A. Muturi, G. O. Kokwaro, and K. Maitland, "Determination of ciprofloxacin in human plasma using high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection: Application to a population pharmacokinetics study in children with severe malnutrition," *J. Chromatogr. B*, vol. 879, no. 2, pp. 146–152, Jan. 2011, doi: [10.1016/j.jchromb.2010.11.032](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.032).
- [104] J. Luis Vázquez *et al.*, "Determination by Fluorimetric Titration of the Ionization Constants of Ciprofloxacin in Solution and in the Presence of Liposomes¶," *Photochem. Photobiol.*, vol. 73, no. 1, p. 14, 2001, doi: [10.1562/0031-8655\(2001\)073<0014:DBFTOT>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)073<0014:DBFTOT>2.0.CO;2).
- [105] H. Epstein *et al.*, "Preparation of alendronate liposomes for enhanced stability and bioactivity: In vitro and in vivo characterization," *AAPS J.*, vol. 10, no. 4, pp. 505–515, 2008, doi: [10.1208/s12248-008-9060-5](https://doi.org/10.1208/s12248-008-9060-5).
- [106] H. Shmeeda *et al.*, "Coencapsulation of alendronate and doxorubicin in pegylated liposomes: a novel formulation for chemoimmunotherapy of cancer," *J. Drug Target.*, vol. 24, no. 9, pp. 878–889, 2016, doi: [10.1080/1061186X.2016.1191081](https://doi.org/10.1080/1061186X.2016.1191081).
- [107] B. Xie, A. Liu, X. Fang, Y. Chen, and H. Zhong, "Rapid determination of alendronate to quality evaluation of tablets by high resolution ¹H NMR spectroscopy," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 93, pp. 73–76, May 2014, doi: [10.1016/j.jpba.2013.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.07.006).
- [108] R. Pignatello *et al.*, "A novel biomaterial for osteotropic drug nanocarriers: synthesis and biocompatibility evaluation of a PLGA–ALE conjugate," *Nanomedicine*, vol. 4, no. 2, pp. 161–175, Feb. 2009, doi: [10.2217/17435889.4.2.161](https://doi.org/10.2217/17435889.4.2.161).
- [109] A. C. Alves, D. Ribeiro, C. Nunes, and S. Reis, "Biophysics in cancer: The

- relevance of drug-membrane interaction studies," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1858, no. 9, pp. 2231–2244, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.bbamem.2016.06.025.
- [110] J. O. Eloy, M. Claro de Souza, R. Petrilli, J. P. A. Barcellos, R. J. Lee, and J. M. Marchetti, "Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 123, pp. 345–363, Nov. 2014, doi: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.029.
- [111] H. T. Schmidt and A. E. Ostafin, "Liposome Directed Growth of Calcium Phosphate Nanoshells," *Adv. Mater.*, vol. 14, no. 7, p. 532, 2002, doi: 10.1002/1521-4095(20020404)14:7<532::aid-adma532>3.3.co;2-w.
- [112] P. Oberbek *et al.*, "Characterization and influence of hydroxyapatite nanopowders on living cells," *Beilstein J. Nanotechnol.*, vol. 9, pp. 3079–3094, Dec. 2018, doi: 10.3762/bjnano.9.286.
- [113] C.-Y. Rao, X.-Y. Sun, and J.-M. Ouyang, "Effects of physical properties of nano-sized hydroxyapatite crystals on cellular toxicity in renal epithelial cells," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 103, p. 109807, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.msec.2019.109807.
- [114] C.-H. Yeo, S. H. S. Zein, A. L. Ahmad, and D. S. McPhail, "Comparison of DOPA and DPPA liposome templates for the synthesis of calcium phosphate nanoshells," *Ceram. Int.*, vol. 38, no. 1, pp. 561–570, Jan. 2012, doi: 10.1016/j.ceramint.2011.07.044.
- [115] X.-S. Tao *et al.*, "Construction of uniform ZrO₂ nanoshells by buffer solutions," *Dalt. Trans.*, vol. 47, no. 37, pp. 12843–12846, 2018, doi: 10.1039/C8DT03091J.
- [116] C.-H. Yeo, S. H. S. Zein, A. L. Ahmad, and D. S. McPhail, "Comparison of DOPA and DPPA liposome templates for the synthesis of calcium phosphate nanoshells," *Ceram. Int.*, vol. 38, no. 1, pp. 561–570, 2012, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.07.044>.
- [117] E. G. Palacios, A. J. Monhemius, and G. Jua, "Infrared spectroscopy of metal carboxylates II. Analysis of Fe (III), Ni and Zn carboxylate solutions," *Hydrometallurgy*, vol. 72, pp. 139–148, 2004, doi: 10.1016/S0304-386X(03)00137-3.
- [118] M. Manoj, D. Mangalaraj, N. Ponpandian, and C. Viswanathan, "Core-shell

- hydroxyapatite/Mg nanostructures: surfactant free facile synthesis, characterization and their in vitro cell viability studies against leukaemia cancer cells (K562)," *RSC Adv.*, vol. 5, no. May, pp. 48705–48711, 2015, doi: 10.1039/C5RA04663G.
- [119] D. Muthu, M. Gowri, G. Suresh Kumar, V. S. Kattimani, and E. K. Girija, "Repurposing of antidepressant drug sertraline for antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*: a potential approach for the treatment of osteomyelitis," *New J. Chem.*, vol. 43, no. 14, pp. 5315–5324, 2019, doi: 10.1039/C8NJ06297H.
- [120] V. Cadež, D. M. Lyons, D. Kralj, and M. D. Sikiri, "Amorphous Calcium Phosphate Formation and Aggregation Process Revealed by Light Scattering Techniques," *Crystals*, vol. 8, no. 254, 2018, doi: 10.3390/cryst8060254.
- [121] S. V Dorozhkin, "Amorphous calcium (ortho) phosphates," *Acta Biomater.*, vol. 6, no. 12, pp. 4457–4475, 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.06.031.
- [122] H. Epstein, E. Afergan, T. Moise, Y. Richter, Y. Rudich, and G. Golomb, "Number-concentration of nanoparticles in liposomal and polymeric multiparticulate preparations: Empirical and calculation methods," *Biomaterials*, vol. 27, no. 4, pp. 651–659, Feb. 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.06.006.
- [123] B. W. Koenig and K. Gawrisch, "Specific volumes of unsaturated phosphatidylcholines in the liquid crystalline lamellar phase," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1715, pp. 65–70, 2005, doi: 10.1016/j.bbamem.2005.07.006.
- [124] Z. V. Feng, T. A. Spurlin, and A. A. Gewirth, "Direct visualization of asymmetric behavior in supported lipid bilayers at the gel-fluid phase transition," *Biophys. J.*, vol. 88, no. 3, pp. 2154–2164, 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.052456.
- [125] N. Delorme and A. Fery, "Direct method to study membrane rigidity of small vesicles based on atomic force microscope force spectroscopy," *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.*, vol. 74, no. 3, pp. 3–5, 2006, doi: 10.1103/PhysRevE.74.030901.
- [126] J. Ke, H. Dou, X. Zhang, D. S. Uhagaze, X. Ding, and Y. Dong, "Determination of pKa values of alendronate sodium in aqueous solution by piecewise linear regression based on acid-base potentiometric titration," *J. Pharm. Anal.*, vol. 6, no. 6, pp. 404–409, Dec. 2016, doi: 10.1016/j.jpha.2016.07.001.

- [127] T. Baumgärtel and H. Graaf, "Spectral shift of cresyl violet luminescence on charged silicon oxide nanostructures," *Phys. status solidi*, vol. 211, no. 4, pp. 905–909, Apr. 2014, doi: 10.1002/pssa.201330075.
- [128] N. K. Das, S. Ghosh, S. Jaiswal, A. Tewary, and S. Mukherjee, "Micelles entrapped Cresyl Violet can selectively detect copper and mercury ions in solution: A fluorescence Correlation Spectroscopy investigation," *Chem. Phys. Lett.*, vol. 682, no. June, pp. 147–153, 2017, doi: 10.1016/j.cplett.2017.06.019.
- [129] G. Hungerford and J. Benesch, "Effect of the labelling ratio on the photophysics of fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated to bovine serum albumin †," pp. 152–158, 2007, doi: 10.1039/b612870j.
- [130] G. D. Venkatasubbu, S. Ramasamy, V. Ramakrishnan, and J. Kumar, "Nanocrystalline hydroxyapatite and zinc-doped hydroxyapatite as carrier material for controlled delivery of ciprofloxacin," *Biotech*, vol. 1, pp. 173–186, 2011, doi: 10.1007/s13205-011-0021-9.
- [131] A. Jain and S. K. Jain, "In vitro release kinetics model fitting of liposomes : An insight," *Chem. Phys. Lipids*, vol. 201, pp. 28–40, 2016, doi: 10.1016/j.chemphyslip.2016.10.005.
- [132] U. Gbureck, E. Vorndran, and J. E. Barralet, "Modeling vancomycin release kinetics from microporous calcium phosphate ceramics comparing static and dynamic immersion conditions," *Acta Biomater.*, vol. 4, pp. 1480–1486, 2008, doi: 10.1016/j.actbio.2008.02.027.
- [133] P. L. Ritger and N. A. Peppas, "A Simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-Fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs," *J. Control. Release*, vol. 5, pp. 23–36, 1987.
- [134] Siepmann J. and Peppas N.A., "Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 48, no. 2, p. 19, 2001.
- [135] L. Ahmed, R. Atif, T. S. Eldeen, I. Yahya, A. Omara, and M. Eltayeb, "Study the Using of Nanoparticles as Drug Delivery System Based on Mathematical Models for Controlled Release," *Int. J. Latest Technol. Eng. Manag. Appl. Sci.*, vol. 8, no. 5, pp. 52–56, 2019, [Online]. Available: www.ijltemas.in.

- [136] V. Papadopoulou, K. Kosmidis, M. Vlachou, and P. Macheras, "On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms," vol. 309, pp. 44–50, 2006, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.044.
- [137] N. Ikawa, T. Kimura, and T. Sano, "Amino acid containing amorphous calcium phosphates and the rapid transformation into apatite," *J. Mater. Chem.*, vol. 19, pp. 4906–4913, 2009, doi: 10.1039/b815154g.
- [138] A. Ethirajan, U. Ziener, and K. Landfester, "Surface-Functionalized Polymeric Nanoparticles as Templates for Biomimetic Mineralization of Hydroxyapatite," *Chem. Mater.*, vol. 21, no. 23, pp. 2218–2225, 2009.
- [139] A. Ezhova and K. Huber, "Contraction and coagulation of spherical polyelectrolyte brushes in the presence of Ag⁺, Mg²⁺, and Ca²⁺ cations," *Macromolecules*, vol. 49, no. 19, pp. 7460–7468, 2016, doi: 10.1021/acs.macromol.6b01286.
- [140] R. J. Nap, E. Gonzalez Solveyra, and I. Szleifer, "The interplay of nanointerface curvature and calcium binding in weak polyelectrolyte-coated nanoparticles," *Biomater. Sci.*, vol. 6, no. 5, pp. 1048–1058, 2018, doi: 10.1039/c8bm00135a.
- [141] D. Li, Z. Fang, H. Duan, and L. Liang, "Polydopamine-mediated synthesis of core-shell gold@calcium phosphate nanoparticles for enzyme immobilization," *Biomater. Sci.*, vol. 7, no. 7, pp. 2841–2849, 2019, doi: 10.1039/c9bm00283a.
- [142] Z. V. Feng, T. A. Spurlin, and A. A. Gewirth, "Direct visualization of asymmetric behavior in supported lipid bilayers at the gel-fluid phase transition," *Biophys. J.*, vol. 88, no. 3, pp. 2154–2164, 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.052456.
- [143] F. Mollaamin, S. Özcan, E. Özcan, and M. Monajjemi, "Biomedical Applications of Bisphosphonate Chelating Agents by Metal Cations as Drug Design for Prevention and Treatment of Osteoporosis using QM/MM Method," *Biointerface Res. Appl. Chem.*, vol. 13, no. 4, Aug. 2023, doi: 10.33263/BRIAC134.329.
- [144] F. Hawkins Carranza, E. Jodar Gimeno, and G. Martinez Diaz-Guerra, "Bases moleculares del mecanismo de accion de los bifosfonatos," *Revista Espanola de Enfermedades Metabolicas Oseas*, vol. 9, no. 5, pp. 169–171, 2000.
- [145] V. Uskoković and T. A. Desai, "Phase composition control of calcium phosphate nanoparticles for tunable drug delivery kinetics and treatment of osteomyelitis.

- I. Preparation and drug release," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 101 A, no. 5, pp. 1416–1426, 2013, doi: 10.1002/jbm.a.34426.
- [146] V. Uskoković, "Mechanism of formation governs the mechanism of release of antibiotics from calcium phosphate nanopowders and cements in a drug-dependent manner," *J. Mater. Chem. B*, vol. 7, no. 25, pp. 3982–3992, 2019, doi: 10.1039/c9tb00444k.
- [147] V. M. Wu and V. Uskoković, "Is there a relationship between solubility and resorbability of different calcium phosphate phases in vitro?," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1860, no. 10, pp. 2157–2168, 2016, doi: 10.1016/j.bbagen.2016.05.022.
- [148] C. American, "Tipos y fases de los estudios clínicos," *Am. Cancer Soc.*, p. 1, 2020, [Online]. Available: <https://www.cancer.org/es/tratamiento/tratamientos-y-efectos-secundarios/estudios-clinicos/lo-que-usted-necesita-saber/fases-de-los-estudios-clinicos.html>.
- [149] A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck, "Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 45, no. 4, pp. 493–496, Apr. 1966.
- [150] A. Bauernfeind, "Comparison of the antibacterial activities of the quinolones Bay 12-8039, gatifloxacin (AM 1155), trovafloxacin, clinafloxacin, levofloxacin and ciprofloxacin," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 40, no. 5, pp. 639–651, 1997.
- [151] I. Escribano, J. C. Rodríguez, L. Cebrian, and G. Royo, "The importance of active efflux systems in the quinolone resistance of clinical isolates of *Salmonella* spp.," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 24, no. 5, pp. 428–432, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.05.004.
- [152] S. F. van Vuuren and A. M. Viljoen, "In vitro evidence of phyto-synergy for plant part combinations of *Croton gratissimus* (Euphorbiaceae) used in African traditional healing," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 119, no. 3, pp. 700–704, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.jep.2008.06.031.
- [153] V. R. Anderson and C. M. Perry, "Levofloxacin: A review of its use as a high-dose, short-course treatment for bacterial infection," *Drugs*, vol. 68, no. 4, pp. 535–565, Sep. 2008, doi: 10.2165/00003495-200868040-00011/METRICS.
- [154] F. J. Schmitz *et al.*, "The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux

- pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 42, no. 6, pp. 807–810, Dec. 1998, doi: 10.1093/jac/42.6.807.
- [155] M. Ikeda, Y. Yagihara, K. Tatsuno, M. Okazaki, S. Okugawa, and K. Moriya, “Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility of *Bacillus cereus* blood stream infections,” *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–7, Sep. 2015, doi: 10.1186/S12941-015-0104-2/TABLES/3.
- [156] A. C. Blasco, A. C. Blanco, M. D. Aguilar, M. I. M. Reilly, A. R. Gascón, and C. S. García, *Métodos microbiológicos para la determinación in vitro de la actividad de combinaciones de antimicrobianos*. 2020.
- [157] P. Wayne, *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard; 9 Edition*, vol. 26. 2006.
- [158] P. J. Petersen, P. Labthavikul, C. H. Jones, and P. A. Bradford, “In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by checkerboard and time-kill kinetic analysis,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 57, no. 3, pp. 573–576, Jan. 2006, doi: 10.1093/jac/dki477.
- [159] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays,” *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, Dec. 1983, doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [160] M. Fegghi, B. Sharif Makhmalzadeh, F. Farrahi, M. Akmal, and N. Hasanvand, “Anti-microbial Effect and in Vivo Ocular Delivery of Ciprofloxacin-loaded Liposome through Rabbit’s Eye,” *Curr. Eye Res.*, vol. 45, no. 10, pp. 1245–1251, Oct. 2020, doi: 10.1080/02713683.2020.1728777.
- [161] C. Flores Morales, R. del C. Rocha Gracia, E. Barrios Villa, P. Lozano Zarain, and G. Cortés Cortés, “*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*: dos Bacterias Multidrogorresistentes que Podemos Compartir con Nuestras Mascotas,” *INVURNUS*, vol. 17, no. 1, Feb. 2023, doi: 10.46588/invurnus.v17i1.98.
- [162] V. M. Wu, S. Tang, and V. Uskoković, “Calcium Phosphate Nanoparticles as Intrinsic Inorganic Antimicrobials: The Antibacterial Effect,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 40, pp. 34013–34028, Oct. 2018, doi: 10.1021/acsami.8b12784.

- [163] K. J. Thomas and C. V. Rice, "Equilibrium binding behavior of magnesium to wall teichoic acid," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1848, no. 10, pp. 1981–1987, 2015, doi: 10.1016/j.bbamem.2015.05.003.
- [164] A. Pierzyńska-Mach, P. A. Janowski, and J. W. Dobrucki, "Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles," *Cytom. Part A*, vol. 85, no. 8, pp. 729–737, Aug. 2014, doi: 10.1002/cyto.a.22495.
- [165] E. M. Flores Fernandez, S. del C. Caraballo Suniaga, and L. S. Albarado Ysasis, "CARACTERÍSTICAS TINTORIALES DE *Neisseria gonorrhoeae* POR LA TINCIÓN DIFERENCIAL DE FLUORESCENCIA MODIFICADA," *Saber, Univ. Oriente, Venez.*, vol. 26, no. 3, pp. 281–288, 2014.
- [166] J. M. Jacoby *et al.*, "An Innovative Therapeutic Option for the Treatment of Skeletal Sarcomas: Elimination of Osteo- and Ewing's Sarcoma Cells Using Physical Gas Plasma," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 12, p. 4460, Jun. 2020, doi: 10.3390/ijms21124460.
- [167] P. J. ter Brugge, S. Dieudonne, and J. A. Jansen, "Initial interaction of U2OS cells with noncoated and calcium phosphate coated titanium substrates," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 61, no. 3, pp. 399–407, Sep. 2002, doi: 10.1002/jbm.10172.
- [168] L. S. Ito, C. Takahashi, M. Yamashita, and C. A. Strüssmann, "Warm Water Induces Apoptosis, Gonadal Degeneration, and Germ Cell Loss in Subadult Pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Pisces, Atheriniformes)," *Physiol. Biochem. Zool.*, vol. 81, no. 6, pp. 762–774, Nov. 2008, doi: 10.1086/590219.
- [169] H. S. Ryu, C. Y. Choi, J. A. Song, and G.-S. Kil, "Effects of UV Radiation on Oxidative Stress in Yellowtail Clownfish *Amphiprion clarkii*," *Ocean Sci. J.*, vol. 54, no. 2, pp. 205–212, Jun. 2019, doi: 10.1007/s12601-019-0010-1.
- [170] M. Hayashi, T. Sofuni, and M. Ishidate, "An application of Acridine Orange fluorescent staining to the micronucleus test," *Mutat. Res. Lett.*, vol. 120, no. 4, pp. 241–247, Jun. 1983, doi: 10.1016/0165-7992(83)90096-9.
- [171] A. Çelik, O. Öğenler, and Ü. Çömelekoğlu, "The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate," *Mutagenesis*, vol. 20, no. 6, pp. 411–415, Nov. 2005, doi: 10.1093/mutage/gei055.

- [172] K. . Criswell *et al.*, "Use of acridine orange in: flow cytometric assessment of micronuclei induction," *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 414, no. 1–3, pp. 63–75, May 1998, doi: 10.1016/S1383-5718(98)00042-4.
- [173] T. Both *et al.*, "Hydroxychloroquine affects bone resorption both in vitro and in vivo," *J. Cell. Physiol.*, vol. 233, no. 2, pp. 1424–1433, Feb. 2018, doi: 10.1002/jcp.26028.
- [174] V. A. Byvaltsev *et al.*, "Acridine Orange: A Review of Novel Applications for Surgical Cancer Imaging and Therapy," *Front. Oncol.*, vol. 9, Sep. 2019, doi: 10.3389/fonc.2019.00925.
- [175] T. L Moore, "Polymer-Coated Hydroxyapatite Nanoparticles for the Delivery of Statins," *J. Nanomed. Nanotechnol.*, vol. 05, no. 05, 2014, doi: 10.4172/2157-7439.1000237.
- [176] S. Wang *et al.*, "Towards sustained delivery of small molecular drugs using hydroxyapatite microspheres as the vehicle," *Adv. Powder Technol.*, vol. 21, no. 3, pp. 268–272, May 2010, doi: 10.1016/j.apt.2009.12.001.
- [177] J. Li, X. Yuan, F. He, and A. F. T. Mak, "Hybrid coating of hydroxyapatite and collagen within poly(<sc>D,L</sc> -lactic- co -glycolic acid) scaffold," *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, vol. 86B, no. 2, pp. 381–388, Aug. 2008, doi: 10.1002/jbm.b.31031.