



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Diseño, desarrollo y caracterización de nanopartículas de fosfato cálcico impregnadas en películas orgánicas como posible plataforma para regeneración ósea.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

P R E S E N T A

ARIANA EUNICE ESPERANZA VILLEGAS

DIRECTOR DE TESIS

DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: LEMUS BARAJAS MARÍA GUADALUPE**

VOCAL: **Profesor: BERNAD BERNAD MARÍA JOSEFA**

SECRETARIO: **Profesor: GÓMEZ SÁNCHEZ MARÍA EUGENIA IVETTE**

1er. SUPLENTE: **Profesor: ZELADA GUILLEN GUSTAVO ADOLFO**

2° SUPLENTE: **Profesor: GRACIA MORA MARÍA ISABEL**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA.

CIUDAD UNIVERSITARIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA:

MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

SUPERVISOR TÉCNICO:

MARÍA ISABEL GRACIA MORA

SUSTENTANTE:

ARIANA EUNICE ESPERANZA VILLEGAS

Índice:

1. Resumen.	3
2. Introducción.	5
3. Antecedentes.	7
4. Objetivos.	27
5. Hipótesis.	27
6. Materiales y metodología experimental.	28
7. Resultados	31
8. Análisis de resultados.	77
9. Conclusiones.	83
10. Bibliografía.	84

Índice de abreviaturas.

HAP	hidroxiapatita
nm	nanómetros
DSC	Calorimetría diferencial de barrido (por sus siglas en inglés)
TEM	Microscopía de transmisión electrónica (por sus siglas en inglés)
DXP	Difracción de rayos X de polvos (por sus siglas en inglés)
SA	Alginato de sodio (por sus siglas en inglés)
HYA	Ácido hialurónico (por sus siglas en inglés)
mM	micromolar
w/o	agua/aceite (por sus siglas en inglés)
PVA	Alcohol polivinílico (por sus siglas en inglés)
HPMC	Hidroxipropilmetil celulosa
N	Newton
Pa	Pascales
C	Concentración
IR	Espectro infrarrojo
mV	milivolts
mS	milisiemens
M	Molar
µg	microgramos
A	área
E	módulo de Young
ε	deformación unitaria
Σ	esfuerzo unitario

1. Resumen.

Cuando se producen fracturas traumáticas o en ciertas patologías óseas, el tejido óseo no es capaz de regenerarse por sí mismo. En estos casos, se requiere un injerto óseo o un sustituto sintético para promover la reparación ósea, siendo la mejor opción el propio hueso. Existen problemas asociados al uso de injertos óseos, como la insuficiente cantidad de tejido disponible o el riesgo de transmisión de enfermedades. Estas limitaciones han propiciado el desarrollo de materiales sintéticos que reemplacen el tejido óseo dañado. En el desarrollo de cualquiera de ellos se deben tener en cuenta dos conceptos clave: biocompatibilidad y biofuncionalidad. Las cerámicas son los materiales más biocompatibles y poseen propiedades bioestables, bioactivas o bioreabsorbibles, pero a su vez poseen cierta fragilidad y pueden generar la aparición de partículas indeseables.

En el presente trabajo de investigación se sintetizaron nanopartículas de fosfato de calcio a partir de microemulsiones agua/aceite con la intención de observar y analizar en ellas sus propiedades como acarreador de un fármaco modelo para finalmente acoplarlo con una membrana de alginato de sodio que también ha sido estudiada y caracterizada.

Se prepararon tres microemulsiones diferentes (con heptano, tolueno y ciclohexano respectivamente) que fueron caracterizadas por tamaño de partícula, potencial Z y conductividad. Después de realizar estos estudios se sintetizaron a partir de ellas nanopartículas de fosfato de calcio utilizando como reactivos fosfato dibásico de sodio y cloruro de calcio dihidratado. Las nanopartículas obtenidas se caracterizaron por tamaño de partícula, potencial Z, análisis por espectroscopia infraroja (IR), difracción de rayos X de polvos (DXP), análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y finalmente por microscopia de transmisión electrónica (TEM). Analizando los resultados de estos estudios se llegó a la conclusión de que las nanopartículas más convenientes para realizar los estudios posteriores de adsorción de fármaco y liberación del mismo, eran las obtenidas a partir de la microemulsión con heptano como su fase orgánica debido a que presenta una morfología esférica lo que nos brinda una superficie más uniforme, también porque es la que presenta un menor tamaño de partícula y en principio son más estables mecánicamente.

Una vez sintetizadas las nanopartículas, a partir de la microemulsión antes mencionada, se procede al estudio de adsorción del fármaco sobre la superficie de éstas dejándolas en contacto con una solución de norfloxacin de una concentración conocida por determinado tiempo. Después se mide el sobrenadante en un equipo de espectroscopia UV para saber la concentración de fármaco libre y por lo tanto de fármaco adsorbido. Para saber esta concentración previamente se realizó una curva patrón de norfloxacin en metanol. Finalmente se realiza un

estudio para saber la cantidad máxima de norfloxacin que se puede adsorber en determinada cantidad de nanopartículas.

Para el estudio de liberación las nanopartículas con el fármaco adsorbido se ponen en contacto con metanol y se toman muestras del sobrenadante cada determinado tiempo. Se observó que la norfloxacin se libera lentamente de las nanopartículas lo que podría ser indicio de que pueden servir para un sistema de liberación modificada.

Las membranas de alginato de sodio se prepararon con cuatro diferente concentraciones de cloruro de calcio y cada muestra se secó de dos maneras diferentes: al ambiente y liofilizándolas. Posteriormente las membranas se lavaron con una solución de cloruro de calcio al 10% para evitar que se disolvieran al contacto con el agua. Una vez secas se caracterizaron con microscopio óptico, por microscopia electrónica de barrido y mediante pruebas mecánicas para estimar el módulo de Young y finalmente se estimó el porcentaje de porosidad, para saber qué membrana tenía las mejores características para formar un sistema híbrido con las nanopartículas de fosfato de calcio con el fármaco adsorbido.

2. Introducción.

La ingeniería de tejidos está investigando intensamente soluciones que tienen el potencial de reducir las complicaciones relacionadas con los métodos de tratamiento actuales. La ingeniería de tejidos se puede definir como un campo interdisciplinario que aplica los principios de ingeniería y ciencias de la vida para desarrollar sustitutos biológicos para restaurar, mantener o mejorar la función del tejido. Este concepto implica tres estrategias principales: el uso de células aisladas de células o sustitutos para reemplazar las funciones limitadas del tejido; utilización de sustancias inductoras de tejido, tales como factores de crecimiento; y andamios para dirigir el desarrollo del tejido. Un andamio ideal para ingeniería de tejido óseo es una matriz que actúa como un sustrato temporal que permite el crecimiento celular y el desarrollo de tejidos. Esto ocurre inicialmente *in vitro* y, eventualmente, *in vivo*. El andamio debe ser capaz de imitar la estructura y la función biológica de la matriz extracelular nativa (ECM) tanto en términos de composición química como de estructura física. Los andamios utilizados para aplicaciones de ingeniería de tejidos además deben ser biocompatibles; capaz de proporcionar soporte mecánico adecuado; exhibir propiedades superficiales favorables (tales como la promoción de la adhesión, la proliferación y diferenciación de las células) y proporcionar un entorno en el que las células pueden mantener sus fenotipos.¹

Recientemente, la hidroxiapatita (HAP) se ha usado para una variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo matrices para el control de liberación de fármacos y como materiales en ingeniería de tejido óseo. La hidroxiapatita tiene similitud química con el componente inorgánico de la matriz ósea, la hidroxiapatita sintética exhibe una fuerte afinidad para albergar los tejidos duros. El enlace químico con el tejido anfitrión ofrece a la hidroxiapatita una mayor ventaja en aplicaciones clínicas en comparación con la mayoría de los sustitutos óseos, tales como aloinjertos o implantes metálicos. Las principales ventajas de la hidroxiapatita sintética son su biocompatibilidad, biodegradabilidad lenta *in situ*, buena osteoconductividad y sus propiedades osteoinductoras. Estas capacidades han hecho de la hidroxiapatita un candidato ideal para implantes o componentes de implantes ortopédicos y dentales.² Los usos comunes incluyen la reparación ósea, aumento de hueso, así como recubrimiento de implantes o en calidad de carga en el hueso o los dientes. Sin embargo, la baja resistencia mecánica de las cerámicas normales de hidroxiapatita restringe su uso principalmente a aplicaciones de baja carga. Los recientes avances en nanotecnología han reavivado el interés en la formación de la nanohidroxiapatita y el estudio de sus propiedades a escala nanométrica.¹

Uno de los objetivos centrales de la nanociencia es construir pequeñas estructuras para el diseño de materiales avanzados, nanodispositivos de alto rendimiento y miniaturización de dispositivos electrónicos. Las nanopartículas inorgánicas son particularmente atractivas como piezas de construcción para tales propósitos,

debido a sus propiedades ópticas, electrónicas, magnéticas y catalíticas únicas, muchas de las cuales pueden ser moduladas simplemente cambiando su tamaño, forma, o la funcionalización de la superficie de la nanopartículas, sin cambiar la composición del material.³

En los últimos años, se han realizado diversas investigaciones en las cuales se estudian biomateriales basados en polímeros que conduzcan a la construcción, regeneración, crecimiento y mantenimiento de células y tejidos. Estos materiales no deben provocar una respuesta inflamatoria ni mostrar respuesta inmune o de citotoxicidad, deben ser biocompatibles y biodegradables. Además, las propiedades mecánicas de los biomateriales deben ser las adecuadas para la aplicación deseada y deben tener una porosidad interconectada controlable para dirigir el crecimiento celular en la forma deseada y para sostener la vascularización del tejido en crecimiento.⁴

3. Antecedentes

3.1. Características fisiológicas del hueso.

El depósito y la reabsorción continuos de hueso tienen cierto número de funciones fisiológicas importantes. Primero, el hueso suele adaptar su resistencia en proporción al grado de tensión al que se le somete. En consecuencia, el hueso aumenta de espesor cuando está sometido a cargas importantes. Segundo, incluso la forma del hueso puede cambiar de disposición para soportar adecuadamente las fuerzas mecánicas mediante el depósito y la reabsorción ósea de acuerdo con los patrones de sobrecarga. Tercero, debido a que el hueso viejo se vuelve relativamente frágil y débil, se necesita nueva matriz orgánica a medida que degenera la vieja matriz orgánica. De esta forma la dureza normal del hueso se mantiene.⁵

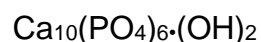
La reparación de una fractura activa al máximo todos los osteoblastos periósticos e intraóseos implicados en la misma. También se forman cantidades importantes de nuevos osteoblastos de forma casi inmediata a partir de células osteoprogenitoras, que son células madre óseas que existen en el tejido superficial que reviste al hueso, la denominada "membrana ósea". Por tanto, en poco tiempo, se forma entre los dos extremos de fractura una gran protuberancia de tejido osteoblástico y nueva matriz orgánica ósea, seguida al poco tiempo del depósito de sales de calcio. Esta protuberancia se denomina callo.⁵

3.1.1. Composición del hueso.

El hueso es una composición jerárquica de nanoplatos de HAP, colágeno y proteínas. Esta estructura tiene una función sinérgica durante la mineralización del hueso con el colágeno actuando como molécula de marco de referencia y las otras proteínas están involucradas en el desarrollo y regeneración de la estructura esquelética.⁶

El hueso compacto está compuesto en un 30% de su peso por una matriz orgánica y en un 70% por sales. El hueso neoformado puede tener un porcentaje considerablemente mayor de matriz en relación con las sales.⁵

Las sales cristalinas que se depositan en la matriz orgánica del hueso están compuestas principalmente por calcio y por fosfato. La fórmula de la principal sal cristalina, denominada hidroxiapatita, es la siguiente:



En las sales óseas también existen iones magnesio, sodio, potasio y carbonato, aunque los estudios de difracción de rayos X no muestran la formación de cristales

definidos. Por tanto, se cree que se conjugan como cristales de hidroxiapatita en vez de organizarse a sí mismos como cristales independientes.⁵

Cada fibra de colágeno del hueso compacto está formada por segmentos que se repiten en toda su longitud: los cristales de HAP están situados sobre cada segmento de la fibra, estrechamente ligados a ella. Este enlace íntimo evita el “cizallamiento” del hueso; es decir, evita que los cristales y las fibras se deslicen fuera de su posición, lo cual resulta esencial para dar resistencia al hueso. Además, los segmentos de las fibras de colágeno se superponen entre sí, lo que hace que los cristales de HAP se superpongan como ladrillos en una pared.⁵

3.1.2. Proceso de regeneración ósea

- Mecanismo de calcificación ósea: osteoblastos y osteoclastos

La fase inicial de la formación de hueso es la secreción de moléculas de colágeno (monómeros de colágenos) y sustancia fundamental (principalmente proteoglucanos) por los osteoblastos. Los monómeros de colágeno se polimerizan rápidamente para formar fibras de colágeno; el tejido resultante se convierte en osteoide, un material parecido al cartílago pero que difiere de éste en que fácilmente precipitan sales de calcio. A medida que se forma el osteoide, algunos de los osteoblastos quedan atrapados en el mismo y entran en fase de reposo, se les denomina entonces osteocitos.⁵

En pocos días tras la formación del osteoide, comienzan a precipitar sales de calcio sobre las superficies de las fibras de colágeno, formando diminutos nidos que rápidamente se multiplican y crecen durante días o semanas para formar el producto final: los cristales de HAP.⁵

Las sales de calcio que se depositan primero no son cristales de HAP, sino compuestos amorfos constituidos por una mezcla de sales. Después, por un proceso de sustitución y adición de átomos, o de reabsorción y nueva precipitación, estas sales se convierten en cristales de HAP, durante un periodo de semanas o meses. Sin embargo, un pequeño porcentaje puede seguir permaneciendo en forma amorfa. Esto es importante, porque estas sales amorfas pueden reabsorberse rápidamente cuando existe una necesidad adicional de calcio en el líquido extracelular.⁵

- Depósito del hueso por los osteoblastos.

El hueso está siendo continuamente formado por los osteoblastos, y está siendo continuamente resorbido en las zonas en donde están activos los osteoclastos. Los

osteoblastos se encuentran en las superficies externas de los huesos y las cavidades óseas. En todos los huesos vivos existe un pequeño grado de actividad osteoblástica (aproximadamente un 4% de todas las superficies en cualquier momento en el adulto), de forma que por lo menos algo de hueso nuevo se está formando continuamente.⁵

- Absorción del hueso. Función de los osteoclastos (figura 1).

El hueso también está siendo continuamente reabsorbido por los osteoclastos, que son células fagocitarias, grandes, multinucleadas (con hasta 50 núcleos), derivadas de monocitos o células análogas a monocitos que se forman en la médula ósea. Histológicamente, la absorción del hueso se produce en la inmediata vecindad de los osteoclastos. Se cree que el mecanismo de esta absorción es el siguiente; los osteoclastos emiten proyecciones análogas a vellosidades hacia el hueso, formando lo que se conoce como un borde fruncido contiguo al hueso. Las vellosidades secretan dos tipos de sustancias: enzimas proteolíticas, liberadas de los lisosomas de los osteoclastos y varios ácidos, como el ácido cítrico y el ácido láctico, liberados de las mitocondrias y de las vesículas secretoras. Las enzimas digieren o disuelven la matriz orgánica del hueso, y los ácidos disuelven las sales óseas. Las células osteoclásticas también ingieren por fagocitosis diminutas partículas de matriz ósea y de cristales, terminando también por disolverlas y liberando los productos hacia la sangre.⁵

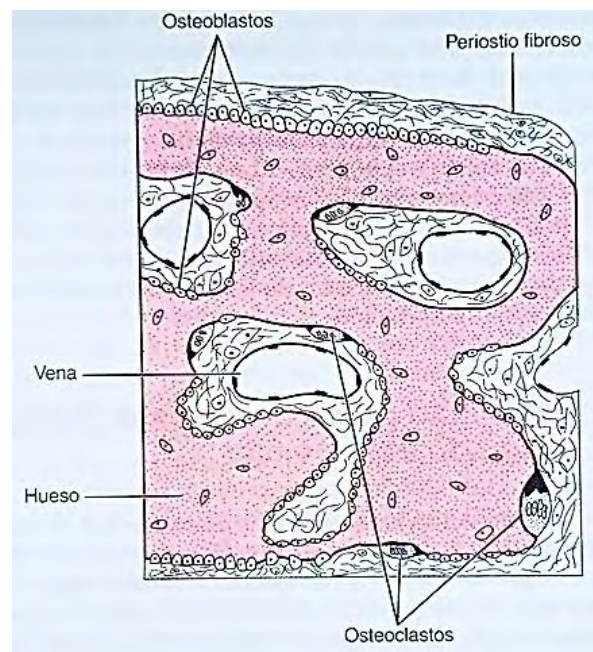


Figura 1. Actividad osteoclástica y osteoblástica en el mismo hueso.⁵

3.2 Nanopartículas de fosfatos cálcicos.

Los fosfatos cálcicos, en especial la hidroxiapatita, son los componentes que se encuentran en mayor proporción en dientes y huesos. Además, los fosfatos de calcio han sido usados en gran medida en cirugías reconstructivas de huesos y dientes en eventos de trauma.⁷

Los fosfatos de calcio son de gran relevancia en la ciencia de los materiales, la biología y la medicina, ya que constituyen la fase inorgánica importante de tejido duro humano. A excepción del esmalte, los fosfatos de calcio son siempre nanocristalinos en su estructura. A medida que el hueso natural está hecho de características a nanoescala, se cree que la adaptación deliberada del tamaño de los cristales, la morfología, la estequiometría y la composición de nanopartículas de fosfato de calcio puede conducir a la mejora de propiedades tales como la bioactividad, biocompatibilidad, área superficial, estabilidad química y física, y propiedades mecánicas. Además, la similitud de la estructura cristalográfica de hueso natural, esmalte y la dentina a la de HAP sintética junto con el análisis químico que muestra la presencia de calcio y fosfato como componentes principales en estos minerales, condujo a la creencia de que la fase inorgánica principal del hueso y los dientes son esencialmente HAP representada por la fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ con una proporción de calcio a fósforo de 1.67. La brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) se forma en los depósitos de guano y fosforita, los suelos y los cálculos humanos. Actúa como una fase precursora de la formación de huesos y dientes, así como para HAP. En la industria se usa como un intermedio en la producción de fertilizantes de fosfato, como un aditivo en alimentos y medicamentos, así como en insumos dentales.⁸

3.2.1 Características fisicoquímicas de las nanopartículas de fosfato de calcio.

Las nanopartículas pueden imitar o alterar procesos biológicos por lo que su uso en la medicina podría dar solución a viejos problemas asociados con la solubilidad, biodisponibilidad, inmunocompatibilidad y citotoxicidad de muchos de los medicamentos de uso tradicional. Las nanopartículas utilizadas en la administración de fármacos para terapia o para diagnóstico son sólidos coloidales que varían su tamaño de 2 nm a 1 000 nm. Sin embargo, partículas mayores de 200 nm no son muy utilizadas debido a que pueden activar el sistema inmunológico y ser aclaradas en la sangre por las células Kupffer. Normalmente, el fármaco de interés es disuelto, encapsulado, adsorbido o adherido dentro o sobre nanocápsulas (sistema vesicular, en el cual el fármaco es confinado a una cavidad rodeada por una membrana polimérica) o nanoesferas (sistema matricial en el que el fármaco es física y uniformemente dispersado).⁹

En cuanto a la biocompatibilidad y biodegradación las nanopartículas de fosfato de calcio son completamente biocompatibles y biodegradables comparadas con otras nanopartículas. A diferencia de nanopartículas magnéticas, de sílica y metálicas, las nanopartículas de fosfato de calcio no producen toxicidad severa. Nanopartículas metálicas de cromo, cadmio, oro, plata, selenio, telurio, cobalto, óxido de titanio, óxido de cobre y óxido de zinc muestran un incremento en la frecuencia de mutaciones, produce lesiones oxidativas, disminuye la viabilidad celular e induce daño en el ADN. Contrario a esto, las nanopartículas de calcio pertenecen a la clase de materiales más seguros, ya que subproductos de éstas como grupos Ca^{2+} , PO_4^{3-} o CO_3^{2-} están presentes de forma natural en el torrente sanguíneo dentro de un intervalo de concentración de 1-5 mM. Si se fabrican de manera apropiada, éstas pueden tener la misma química, tamaño y estructura cristalina que el tejido “blanco” y mejorar la actividad y la bioaceptabilidad del material antes de la liberación del medicamento.¹⁰

En cuanto a tamaño, su síntesis en condiciones controladas puede dar lugar a partículas con un tamaño <100 nm. Por lo tanto, estas nanopartículas tienen la principal ventaja de una mejor absorción por endocitosis directa que se limita a un intervalo de tamaño de 20-200 nm de diámetro y puede conducir a alta la eficacia de transfección (transferencia de material genético mediante vectores).¹⁰

Las partículas sensibles a estímulos pueden aumentar significativamente la eficacia de los fármacos quimioterapéuticos mediante el aumento de su acumulación en el sitio del tumor. El fosfato de calcio como material a granel, así como en nanopartículas muestra esta propiedad, es sensible a estímulos. Es escasamente soluble a pH normal de la sangre (7,4) y las condiciones más alcalinas, pero la disolución se acelera a pH bajo, que se encuentra generalmente en cualquier entorno de tumores, en regiones inflamadas o en endolisosomas, haciéndolos útiles para la administración de moléculas activas en zonas malignas. Como algunos otros sistemas de administración, pueden retener los fármacos durante un período de tiempo más largo después de la administración, debido a que tienen un tiempo de degradación más largo, una propiedad que es esencial para la cinética de liberación controlada.¹⁰

En el presente escenario de la administración de fármacos, la administración dirigida siempre es deseable ya que permite que la molécula activa pueda alcanzar sólo el sitio de destino. Las nanopartículas de fosfato de calcio proporcionan una captación física de la carga molecular útil que se puede mejorar mediante el desarrollo de nanopartículas compuestas modificadas en su superficie con lípidos y polímeros. Su superficie se puede modificar fácilmente con estas moléculas, que no sólo mejoran la estabilidad física, también proporcionan el sitio de unión para una estructura objetivo. La facilidad de modificación de la superficie hace que sean adecuadas para la administración dirigida de colorantes hidrófobos, oligonucleótidos y fármacos, así como moléculas hidrófilas.¹⁰

En la administración intravenosa, la mayor parte de los sistemas de liberación son eliminados rápidamente por los macrófagos presentes en la sangre, lo que reduce la cantidad que se requiere del fármaco en el lugar específico de destino, especialmente en enfermedades como el cáncer o el Alzheimer. El fosfato de calcio, al estar presente de forma natural en el cuerpo en general, no provoca una respuesta inmune por parte de los macrófagos.¹⁰

3.2.1.1 Hidroxiapatita y brushita como ayuda para la regeneración ósea.

Las nanopartículas de hidroxiapatita (HAP) cristalina son el mineral típico que se usa en reparaciones óseas, sin embargo las apatitas de hueso tienen diferente morfología. A pesar de que la jerarquía estructural de huesos y dientes difiere, ambos muestran bloques inorgánicos formados por nanopartículas de HAP.⁷

Estudios previos han demostrado que partículas del tamaño de entre 20-40 nm juegan un papel importante en la formación del biomineral. Esto nos sugiere que esta base inorgánica construida por bloques en diente y hueso pueden ser precisamente estas partículas de apatita. Decenas o centenas de estos nanobloques, en una matriz de colágeno, se combinan y auto ensamblan en biomateriales que tienen características físicas y químicas notables, tales como resistencia mecánica única, insensibilidad a la disolución y una estructura flexible.⁷

Así, las características de nanopartículas de HAP más pequeñas pueden tener características mucho más similares a la HAP que hay durante la biomineralización, que las partículas de HAP más grandes.⁷

Además, las nanopartículas de HAP pueden promover la adhesión, proliferación y la síntesis de fosfatasa alcalina en los osteoblastos y dirigir una rápida reparación del hueso dañado.⁷

Se ha reportado también que la nano HAP puede ser un mejor candidato en aplicaciones biomédicas.¹¹ Sin embargo, el efecto dependiente del tamaño de las nanopartículas aún no se entiende del todo (figura 3). A pesar de que los materiales de fosfato de calcio convencional han sido bien estudiados y muestran su biocompatibilidad, la utilidad de partículas de HAP más pequeñas como materiales en biomedicina han recibido una mayor atención, sin embargo la síntesis de nanopartículas de HAP de tamaño bien definido sigue siendo difícil de controlar.⁷

La HAP ha sido usada en gran manera en investigaciones de biomateriales debido a que su estructura es muy similar a los componentes inorgánicos de hueso y diente, al igual que por sus propiedades osteoconductoras y excelente biocompatibilidad.⁶

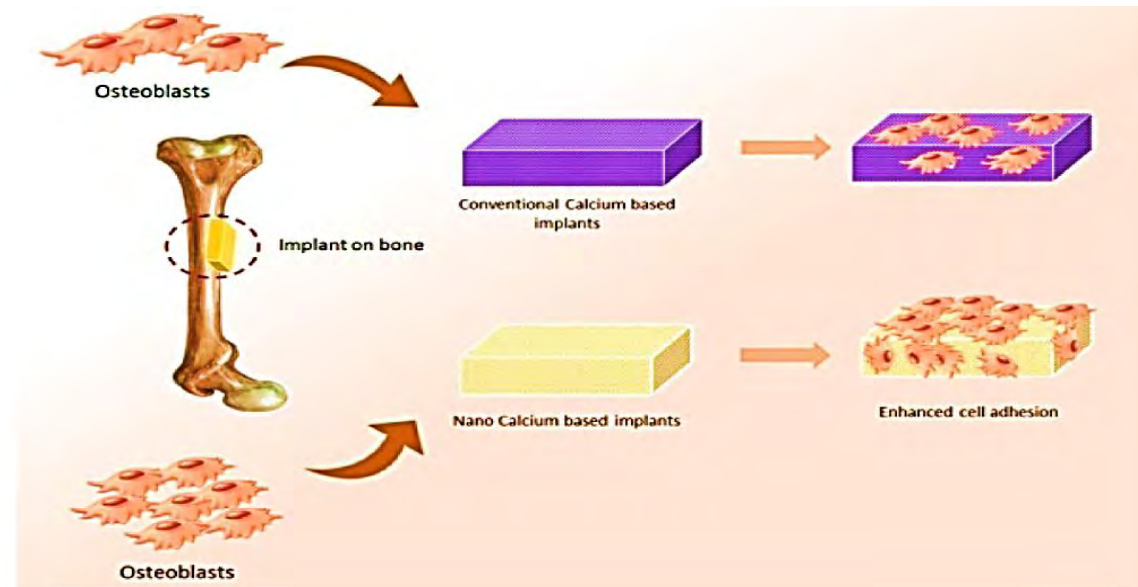


Figura 3. Los osteoblastos se adhieren en mayor proporción a los implantes a base de nanopartículas que a los implantes convencionales.¹⁰

Las partículas de HAP pueden ser sintetizadas por varios métodos, como reacciones en estado sólido, usando técnicas de plasma, por crecimiento cristalino bajo condiciones hidrotérmicas, hidrólisis en capa de otras sales de calcio y por cristalización de sol-gel. Estos métodos, sin embargo, dan como resultado partículas de HAP de tamaño y/o morfología muy irregular lo que nos puede llevar a un comportamiento biológico no controlado.⁶

Brushita es el nombre que se le otorga al mineral de fosfato cálcico dibásico dihidratado de fórmula $\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Su peso molecular es de 172,10 y su composición por peso es la siguiente: Calcio (23,29 %), fósforo (18,0 %), hidrógeno (2,93 %), oxígeno (55,78 %) o también: H_2O (26,17 %), CaO (32,59 %), P_2O_5 (41,24 %). Es prácticamente insoluble en agua, poco soluble en ácido acético y soluble en ácido clorhídrico (HCl) o en ácido nítrico (HNO_3). Se usa en odontología en la pasta de dientes, en la alimentación, en la fabricación de vidrio y en fertilizantes.¹²

La estructura cristalina de la brushita consiste de láminas compactadas de cadenas paralelas en las que los iones de calcio están coordinados por seis átomos de oxígeno de los aniones de fósforo, y por 2 átomos de oxígeno de las moléculas de agua. La brushita es el fosfato cálcico menos estable según la regla de paso de Oswald y es metaestable en condiciones fisiológicas siendo más reabsorbible que la hidroxiapatita y que el fosfato tricálcico beta. De hecho, la brushita puede reabsorberse a una velocidad ligeramente superior a la de neoformación de hueso lo cual es muy interesante en procesos de regeneración ósea. En el hueso, la brushita es una de las primeras fases de fosfato cálcico que se forma en el comienzo

de la nucleación y crecimiento de los cristales de HAP siendo un mineral importante en el crecimiento de la hidroxiapatita in vivo.¹²

3.2.2 Métodos de preparación de las nanopartículas.

- Microemulsiones.

Las microemulsiones son mezclas isotrópicas, estables, claras, constituidas por una fase oleosa, una acuosa y uno o más anfífilos. Despiertan interés a nivel farmacéutico debido a varias ventajas que ofrecen: capacidad de incorporar un amplio rango de moléculas de principios activos con mejoramiento de la biodisponibilidad, ser de fácil preparación y de excelente estabilidad.¹³

La clasificación de microemulsiones imita a la utilizada para emulsiones convencionales, es decir que aquí también se define el signo o/w para aceite en agua y w/o para agua en aceite. Pero para este caso en particular se utilizan los términos microemulsiones discretas o gotas (en inglés, droplet microemulsion). En los sistemas o/w la fracción de volumen de aceite es baja. Contrariamente, las microemulsiones gotas w/o se presentan probablemente cuando la fracción de volumen del agua es baja. Una tercera clasificación se define para sistemas en los cuales las cantidades de agua y de aceite son similares, en los que puede resultar una microemulsión bicontinua. En este último caso, ambos, el aceite y el agua existen como una fase continua en presencia de una interfase continuamente fluctuante que es estabilizada por el surfactante con una curvatura final de cero.¹³

Las microemulsiones son definidas como sistemas de agua, aceite y por lo menos un compuesto anfílico que se presenta como una solución líquida simple, ópticamente isotrópica y termodinámicamente estable. Estos sistemas son comúnmente de interés para el científico farmacéutico por el considerable potencial de actuar como vehículos de liberación de fármacos que incorporan una amplia variedad de moléculas activas.¹³

Las microemulsiones y, en particular las microemulsiones w/o (agua/aceite), han recibido considerable atención como medio de reacción para la síntesis de nanomateriales. El interés se deriva de la facilidad y reproducibilidad de la formación de la microemulsión y la diversidad de conjuntos organizados que forman en diferentes condiciones de composición y funcionamiento. La miniaturización de los materiales tiene beneficios potenciales no sólo en términos de eficiencia, sino también por las propiedades fisicoquímicas de estos materiales. Realizar cambios en la composición de la microemulsión, tales como la concentración de tensoactivo y la relación molar de agua/tensoactivo ejercen una influencia significativa en las características de las nanopartículas sintetizadas.¹⁴

El proceso de microemulsión es una técnica sencilla y fácil de usar que puede utilizarse para producir diversos tipos de fosfato de calcio. Los principales componentes del proceso de microemulsión son una mezcla de aceite, agua y tensoactivo. Además, un cotensoactivo se utiliza para crear una baja tensión interfacial, que ayuda en la producción de partículas nanométricas.¹⁵ De acuerdo con un informe anterior por Higgins¹⁶, esta técnica es factible para aplicaciones industriales para producir nanopartículas.¹⁷

Entre los diversos enfoques desarrollados para la síntesis de nanopartículas de fosfato de calcio, el método basado en microemulsión es uno de los métodos más flexible y conveniente, ya que es muy eficaz en la producción de partículas que tienen un tamaño en el intervalo de nanómetros, junto con un grado minimizado de aglomeración de partículas y morfología controlada de las mismas.¹⁸ Las microemulsiones agua en aceite son transparentes, donde interactúan el líquido isotrópico con gotas de agua de tamaño nanométrico que se dispersan en una fase continua de aceite y estas son estabilizadas por moléculas de tensoactivo en la interfase agua/aceite. Estos tensoactivos proporcionan un efecto jaula que puede controlar la nucleación y el crecimiento. Como resultado, las partículas obtenidas de tal manera son generalmente muy finas y monodispersas.⁸

- Método mecano-químico.

Las síntesis mecanicoquímicas fueron diseñadas originalmente para aleaciones reforzadas con dispersión de óxido (ODS). En los últimos 20 años, han tenido gran crecimiento y ahora se utilizan para la fabricación de una gran variedad de materiales, tanto de composición metálica como no metálica. Sin embargo, poco se ha hecho en el caso de la síntesis de HAP cristalina, aunque las reacciones mecanicoquímicas han tenido éxito en la síntesis de varios materiales cerámicos con propiedades novedosas. Los intentos de sintetizar hidroxiapatita cristalina a través de reacciones mecanicoquímicas dieron como resultado una composición catiónica de baja cristalinidad. Los materiales de partida para la síntesis mecanicoquímica de hidroxiapatita pueden ser CaHPO_4 y CaO . Se mezclan cantidades de los dos materiales en una relación molar de 3:2 en un molino de bolas convencional (con bolas de zirconio) en etanol como medio de molienda. La mezcla se muele durante 48 horas para después eliminar el etanol a 80 °C. La mezcla en polvo desecada se tritura usando un mortero para eliminar grumos grandes de polvo y luego se pasa a través de tamices de malla 200. La activación mecánica de la mezcla en polvo se lleva a cabo en un molino agitador operado a 900 r.p.m por determinadas horas. La mezcla en polvo se carga en un vial de alúmina de 37 mm de diámetro y 40 mm de longitud, junto con una bola de acero inoxidable de 12.7 mm de diámetro. La

activación mecánica se lleva a cabo en un molino de agitación de alta energía durante cierto periodo de tiempo.¹⁹

- Método sol-gel.

Para sintetizar nanopartículas de hidroxiapatita por el método de sol-gel se sigue el siguiente procedimiento: se utiliza $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y P_2O_5 con una relación molar de 10:3 y se utiliza alcohol etílico como disolvente. La secuencia de la disolución de los precursores no es importante, aunque la adición rápida de una solución a otra puede dar lugar a que haya precipitación. La disolución preparada, después de disolver los precursores, se transforma lentamente en un gel después de un período de 30 minutos a un máximo de 2 horas después de la terminación de la agitación inicial de la solución durante 30 minutos. El gel se seca a continuación en un horno a 120 °C en aire durante 15 horas después de lo cual el gel seco es posteriormente tratado térmicamente en aire estacionario a 900 °C durante 12 h.²⁰

3.2.3 Usos de las nanopartículas en hueso.

- a) Reparación de huesos.

En la ingeniería de tejidos duros los materiales con mayor resistencia mecánica, tales como metales, aleaciones o sus compuestos siempre son los preferidos. Sin embargo, la mayoría de estos materiales no son bioreabsorbibles y necesitan la extirpación quirúrgica después de la implantación. El material ideal para este tipo de tejidos debe ser uno que posea suficiente fuerza mecánica y bioactividad para estimular la actividad de regeneración.¹⁰

La HAP nanocristalina es la opción más popular de todas las categorías de fosfato de calcio que se utiliza en la ingeniería de tejidos debido a su alta estabilidad y la semejanza estructural como un componente inorgánico principal de los sistemas biológicos. Las nanopartículas de fosfato de calcio que forman compuestos en 3D con otros metales, minerales o polímeros son los principales avances en la ingeniería de tejidos duros.²¹ Estos nanocompuestos 3D están compuestos por nanopartículas de fosfato de calcio o carbonato de calcio (CaCO_3) incorporadas en una matriz de polímero biodegradable que tiene una estructura porosa interconectada que sirve de apoyo y refuerza la regeneración de tejidos o la sustitución de una forma natural. Estos compuestos mejoran las propiedades mecánicas, así como características nanotopográficas que imitan la estructura del hueso natural. En hidrogeles inyectables las nanopartículas sirven principalmente como herramienta para controlar la cinética de liberación de compuestos bioactivos mediante la reducción de la degradación rápida de los hidrogeles.¹⁰

Las nanopartículas de fosfato de calcio también están ganando atención para el tratamiento de enfermedades como osteoporosis y osteomielitis debido a que tienen la capacidad de aumentar la respuesta osteogénica de los osteoblastos.²²

Debido a que controlar su tamaño es sencillo, hay experimentos que se basan en su morfología para determinar sus propiedades terapéuticas. En el trabajo de Yurong Cai, *et. al*/se demostró que bloques de nanopartículas de HAP de 20 nm de tamaño (np20 HAP) tienen el mayor potencial para estimular la regeneración ósea (MSCs) inhibiendo el crecimiento de células de osteosarcoma *in vivo*. Esto sugiere la potencial utilidad terapéutica de la np 20 HAP en el reemplazo y la reconstrucción del hueso, especialmente después de la ablación parcial de los tumores óseos. Además, hay evidencia de que las nanopartículas se internalizan, lo que parece influir en la proliferación celular que es significativamente mayor que para las células control. Estos datos pueden proporcionar una mejor comprensión de las propiedades funcionales de los nano biominerales y también implican las aplicaciones potenciales de nano HAP en materiales biomédicos.⁷

Actualmente en la Universidad Politécnica de Catalunya se está trabajando en dos líneas de investigación de interés: el diseño de espumas de fosfato de calcio inyectables, con propiedades osteoinductivas, que tiene como objetivo el de profundizar en los mecanismos que gobiernan la osteoinducción vehiculada por el material (*in vitro* e *in vivo*), poniendo especial atención a las propiedades texturales, la reactividad del material y la combinación con diferentes moléculas para mejorar la osteoinducción; y en el diseño de nuevos fosfatos de calcio biomiméticos para la administración local de medicamentos y de iones biológicamente relevantes. Se busca el diseño y desarrollo de sustitutos óseos sintéticos con funciones adicionales de valor terapéutico (como propiedades antibacterianas y mejora de la angiogénesis) que es un punto de particular interés es el desarrollo de materiales inyectables.²³

b) Esmalte y reparación de dientes.

El fosfato de calcio nanocristalino también ha demostrado excelentes resultados en el esmalte y la dentina contra la erosión, la gingivitis, hipersensibilidad de la dentina y la periodontitis marginal. Como los huesos, el fosfato de calcio nanoestructurado también es análogo al bloque de construcción básico de esmalte que es similar a cristales en forma de aguja de apatita con diámetro entre 20-40 nm. Su naturaleza remineralizante, su capacidad para neutralizar el ácido láctico y su mayor resistencia mecánica hace que sean mejores herramientas en comparación con los compuestos dentales disponibles en el mercado. M.D. Weir, *et al.* informaron de una mayor remineralización bajo nanocompuestos de fosfato de calcio después del tratamiento de desmineralización/remineralización en comparación con los compuestos comerciales que liberan flúor.²⁴ Rellenos dentales con fosfato de calcio en nanofase también han demostrado sustancialmente reducida la formación de

caries y la pérdida mineral del esmalte cerca de las márgenes del nanocompuesto en comparación con los compuestos de control, que puede ser debido a la liberación de iones de calcio y fosfato de los compuestos.²⁵ La eficacia de estos compuestos en la caries o periodontitis puede mejorarse aún más mediante la encapsulación de las nanopartículas con moléculas como agentes antibacterianos como la clorhexidina o su utilización junto con nanopartículas de plata que son un antibacteriano inherente.¹⁰

c) Material de recubrimiento para otros implantes.

El fosfato de calcio nanoestructurado como material de recubrimiento para metales biomédicos es otra aplicación en la ingeniería de tejidos duros.²⁶ Los materiales tales como aleación de cromo-cobalto, titanio y sus aleaciones y acero inoxidable pueden recubrirse con nanofosfato de calcio para mejorar sus atributos biológicos. El recubrimiento de metales biomédicos acelera el crecimiento de las células naturales y por lo tanto aumenta la fijación haciéndolos útiles para sitios de alta carga tales como los huesos del fémur y la tibia. Este enfoque se utiliza básicamente para mejorar la unión entre los implantes y los huesos que los rodean mediante la mejora de la interacción entre las proteínas, células y tejido en la superficie del implante.¹⁰

3.3. Membranas de alginato de sodio.

Las mezclas de polímeros hidrofílicos biocompatibles son ampliamente utilizados en muchas aplicaciones farmacéuticas y médicas. Entre ellos, las formulaciones para la administración de fármacos incluyen genes, vitaminas y proteínas, por lo que han adquirido importancia, además pueden ser utilizados a través de vías de administración como la oral, nasal, ocular, e intravenosa. Esta gran versatilidad se debe fundamentalmente a las características específicas de los biopolímeros, tales como la biodegradación, adhesividad, y su sensibilidad térmica y al pH.²⁷

Los alginatos, una clase de polisacárido natural, son uno de los componentes clave usados en compuestos biocompatibles por su capacidad de formación de geles, porque pueden modular las propiedades reológicas si se añaden con otros polisacáridos, por su sensibilidad al pH y, por último, porque se pueden procesar fácilmente con tecnologías de bajo costo.²⁷

Los geles de alginato de calcio se utilizan en la industria biotecnológica para la producción de perlas para la inmovilización de enzimas o células.²⁸

La capacidad del alginato para producir membranas fuertes e insolubles con iones de calcio puede ser utilizada para mejorar tales propiedades de las membranas de alginato. Sin embargo, la formación de la membrana de alginato con iones de calcio

es tan instantánea que impide en algunos casos la formación de la misma membrana.²⁹

3.3.1 Características de las membranas de alginato.

El alginato es de gran interés como potencial componente en películas de biopolímeros o para recubrimiento debido a sus propiedades coloidales únicas, que incluyen brindar espesamiento, dar estabilidad, habilidad de suspensión, formador de membranas, producción de geles y estabilización de emulsiones.²⁹

Se encuentra en las algas pardas, tales como las especies de *Ascophyllum*, *Durvillaea*, *Ecklonia*, *Laminaria*, *Lessonia*, *Macrocystis*, *Sargassum* y *Turbinaria*. De estos, los más importantes son *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum*. Sobre una base de peso seco, el contenido de alginato son 22%-30% en *Ascophyllum*, 25-44% en *Laminaria digitata* y 17-33% y 25-30%, respectivamente, para el frondas y tallos en *Laminaria hyperborea*. El alginato puede ser extraído de algas marinas en bruto mediante un tratamiento con una solución acuosa soluciones alcalinas, típicamente NaOH, en la que el alginato naturales en diversas formas de sal se convierte en soluble en agua alginato sódico (SA). Después de la filtración, el alginato de sodio en solución se pueden precipitar por la adición de cloruro de calcio.³⁰

Es un hidrato de carbono coloidal hidrófilo obtenido a partir de las diversas especies de algas marinas pardas (*Phaeophyceae*) que en términos moleculares, es una familia de copolímeros binarios no ramificados de uniones (1->4) β -D-ácido manurónico y residuos de α -L-ácido gulurónico (figura 3.A).²⁹

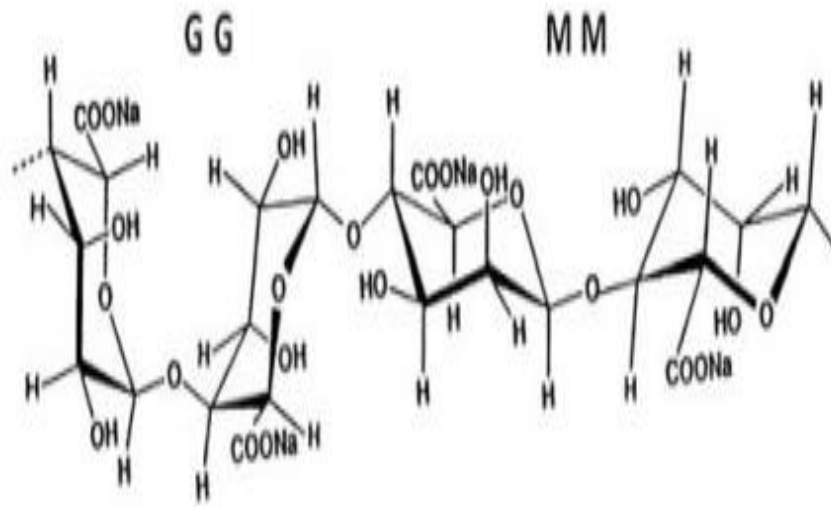


Figura 3. A) Estructura del alginato con bloques manurónico y gulurónico.²⁷

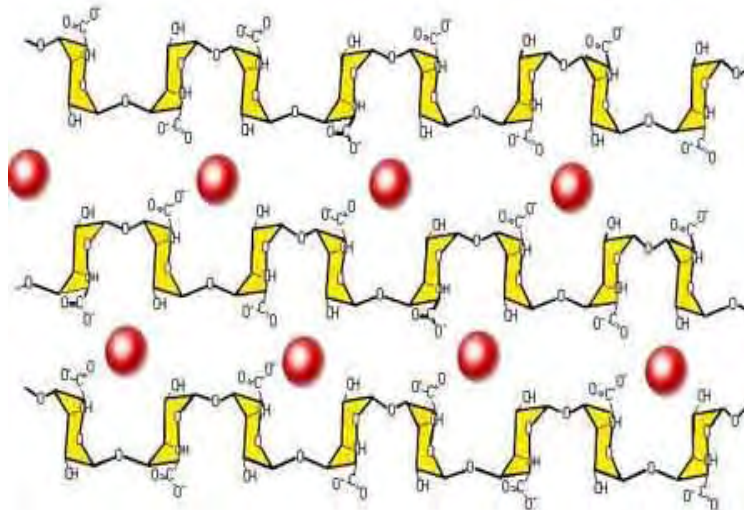


Figura 3.B) Estructura alginato de de calcio conformación caja de huevo.

Aunque las membranas preparadas a partir de hidrocoloides, como el alginato, forman membranas fuertes, presentan una mala resistencia al agua debido a su naturaleza hidrofílica. La capacidad de alginato para hacer geles fuertes e insolubles con los iones de calcio se puede utilizar para mejorar dichas propiedades de las membranas de alginato (figura 3.B). Sin embargo, la formación de gel de alginato con iones de calcio es tan instantáneo que impide fundición para hacer membranas en algunos casos. Kaletunec, Nussinovitch, y Peleg (1991) informaron de un método para aumentar la resistencia del gel por inmersión en soluciones acuosas de cationes multivalentes.²⁹

El alginato con diferentes pesos moleculares es utilizado en el campo de la medicina. El cambio del peso molecular del alginato de sodio puede alterar las propiedades mecánicas del andamio de alginato de calcio reticulado iónico. El alginato de sodio tiene un peso molecular alto. Por lo tanto, la excreción directa del alginato de sodio es difícil. La dificultad en la excreción de alginato de sodio limita su aplicación a un grado particular.³¹

Sin embargo, el alginato con un bajo peso molecular puede ser excretado por el metabolismo del cuerpo. El alginato con un peso molecular bajo puede acelerar el crecimiento de los queratinocitos, mejorar la tasa de migración de las células endoteliales, y promover la proliferación de fibroblastos. Sin embargo, las propiedades mecánicas del hidrogel o membranas porosas creadas a partir de alginato sódico con un peso molecular excesivamente baja no pueden cumplir con los requisitos básicos de vendajes médicos o andamios para la ingeniería de tejidos. Por lo tanto, debe aclararse el rango de peso molecular para que el alginato de sodio pueda usarse.³¹

3.3.2 Usos en la industria farmacéutica.

Los usos de membranas de alginato de sodio en la industria farmacéutica son extensos, a continuación se mencionan algunos ejemplos:

a) Investigación en ingeniería tisular.

Los andamios de alginato se han usado para la preparación de tejidos blandos o duros en la ingeniería de tejidos, pero la estructura del andamio necesita ser mejorado para aumentar su desempeño en los tejidos. La membrana de alginato altamente poroso se forma por reticulación iónica con alginato de alto peso molecular que muestra la mejor propiedad de formación de membrana. Con la tecnología de liofilización y precongelación a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, se construyen materiales de “nido de abeja” (porosidad = 92,06%). El cambio de la temperatura de precongelación puede regular estructura de poros en cierta medida. Con el aumento de la cantidad de alginato de sodio, la porosidad y el tamaño de poro de los materiales se redujeron, mientras que resistencia a la tracción y alargamiento a la rotura aumentaron.³⁰

b) Agente reductivo en la síntesis de nanopartículas.

La síntesis de nanopartículas asistida por polímeros proporciona un mecanismo predecible y que puede simular fácilmente diferentes rutas biológicas. Las soluciones poliméricas coloidales e hidrogeles son conocidos por ser agentes de terminación eficaces para la formación de nanopartículas de plata, que se abre de posibilidades para una variedad de aplicaciones biomédicas, tales como recubrimientos antimicrobianos, apósitos y los implantes de tejidos.³²

El alginato tiene un número de grupos hidroxilo $-\text{OH}$ libre y grupos carboxilo $-\text{COOH}$ distribuidos a lo largo de su columna vertebral. En la síntesis de nanopartículas de plata, los grupos $-\text{COOH}$ pueden interactuar electrostáticamente con Ag^+ para formar el complejo, y los grupos $-\text{OH}$ reducen Ag^+ a Ag^0 .³²

c) Combinación con otros polímeros para la síntesis de nanofibras más estables.

Para superar los obstáculos de fácil disolución de las nanofibras de PVA sin tratamiento de reticulación (crosslinking) y la poca capacidad de electrohilado de las nanofibras reticuladas de PVA a través de un proceso de electrospinning, las nanofibras electrospun de hidrogel a base de PVA se preparan con el método de entrecruzamiento posterior (post-crosslinking). Se espera que las fibras “electrospun” de hidrogel puedan ser un andamio prometedor para aplicaciones de cultivo celular y la ingeniería de tejidos. Las fibras de PVA, PVA/alginato de sodio (PVA-SA) y PVA/poli (ácido γ -glutámico) (PVA-PGA) se prepararon mediante el

método electrospinning. Se conocen estudios de PVA con la incorporación de materiales adecuados, como quitosano, alginato de sodio, colágeno y otros polímeros sintéticos en aplicaciones biomédicas tales como apósito para heridas, lentes de contacto, los sistemas de administración de fármacos y la ingeniería de tejidos.³³

d) Membranas/oblas orales para dosificación de nicotina.

Dejar de fumar es de actual importancia debido al efecto negativo en la salud y el impacto económico significativo en muchos países. Se han desarrollado membranas bucales y oblas que comprenden HPMC y alginato de sodio (SA) para su uso potencial en la terapia de reemplazo de nicotina a través de la mucosa bucal, como una alternativa barata pero efectiva a los parches de nicotina y goma de mascar que se utilizan actualmente.³⁴

Las membranas y oblas pueden poseer propiedades adhesivas cuando se formulan con polímeros mucoadhesivos tales como HPMC y alginato de sodio. Las propiedades de los polímeros mucoadhesivos tales como carga de superficie y la solubilidad juegan un papel vital en su capacidad de adherirse a las superficies mucosas. Los polímeros cargados tales como el alginato de sodio demuestran mayor adhesión que los polímeros no iónicos (por ejemplo, HPMC), debido a su capacidad de formar una fuerte interacción electrostática con la superficie cargada de mucina. El uso de sistemas poliméricos compuestos se pueden adoptar para mejorar las propiedades funcionales de una forma de dosificación polimérica. La HPMC es muy eficaz en el diseño de sistemas de administración de fármacos controlados, mientras que el alginato de sodio se puede utilizar para mejorar la mucoadhesión de una forma de dosificación polimérica dada. Además, la naturaleza aniónica del alginato de sodio proporciona un medio potencial de interacción de los grupos amino de la nicotina con las cadenas laterales de ácidos carboxílicos del alginato de sodio, lo que podría mejorar la mucoadhesión y proporcionar un mayor control de la liberación del fármaco.³⁴

e) Síntesis de membranas sensibles a cambios de pH.

Se han preparado membranas de material compuesto novedoso sensible al pH con propiedades térmicas y mecánicas mejoradas que contiene ceniza de hueso en gelatina/alginato de sodio/ácido hialurónico (Gel / SA / HYA) de estructura polimérica para diseñar un sistema de administración de fármacos por colon.³⁵

Muchos tipos diferentes de vehículos de fármacos poliméricos se han desarrollado y utilizado para proporcionar terapia dirigida en administración de fármacos. Entre estos tipos, los hidrogeles sensibles al pH están atrayendo más atención para su uso en sistemas de liberación controlada de fármacos, ya que proporcionan; (i) fácil aplicación (ii) la liberación del fármaco es dirigida para un órgano específico, (iii) la liberación del fármaco es controlada durante un largo período de una manera

deseada (iv) la reducción al mínimo de la posibilidad de efectos secundarios desfavorables en comparación con los sistemas de liberación clásicos. Los hidrogeles sensibles al pH se han fabricado usando polisacáridos naturales tales como alginato sódico (SA) y ácido hialurónico (HYA). El alginato de sodio tiene también una capacidad de formar geles en la presencia de cationes multivalentes. El ácido hialurónico es un componente principal de la matriz extracelular y glicosaminoglicano que posee N-acetil glucosamina solubles en agua y ácido glucurónico como su unidad de repetición. El ácido hialurónico y el alginato de sodio desempeñan un papel vital en la formación de la estructura polimérica sensible al pH ya que tienen un grupo ionizable (COO) en sus estructuras.³⁵

3.3.3 Módulo de Young.

El esfuerzo es una consecuencia de las fuerzas internas que se producen en un cuerpo por la aplicación de cargas exteriores. A la intensidad de la fuerza por unidad del área transversal se le llama esfuerzo unitario:

$$\sigma = \frac{dP}{dA}$$

Donde σ es el esfuerzo unitario (N/m²), P es la carga aplicada (N) y A es el área sobre la cual actúa la carga (m²). Si la resultante de las fuerzas aplicadas pasa por el centroide de la sección considerada, se puede usar la siguiente expresión para calcular el esfuerzo:

$$\sigma = \frac{P}{A}$$

El cambio de longitud que sufre un objeto bajo esfuerzo, se conoce como deformación. La deformación unitaria se define como el cambio en la longitud por unidad de longitud:

$$\varepsilon = \frac{d\delta}{dL}$$

Donde ε es la deformación unitaria (m/m), δ es la deformación total (m) y L la longitud original (m). Si se cumplen las siguientes condiciones:

- el elemento sometido a tensión debe tener una sección transversal recta constante
- el material debe ser homogéneo
- la fuerza o carga debe ser axial, es decir, producir un esfuerzo uniforme.

De esta manera, la deformación unitaria se puede expresar como:

$$\varepsilon = \frac{\delta}{L}$$

Los resultados de un ensayo a tensión suelen representarse en un gráfico XY, a este grafico se le denomina diagrama esfuerzo- deformación. Por otro lado, la elasticidad es la propiedad que hace que un objeto, que ha sido deformado, regrese a su forma original después de que se han removido las fuerzas aplicadas. Según esta definición, casi todos los materiales son elásticos (hasta cierto limite de carga). Robert Hooke estableció que el esfuerzo es proporcional a la deformación ($\sigma \propto \varepsilon$); a esto se le conoce como ley de Hooke. Esta relación es fácilmente identificable en el diagrama esfuerzo-deformación desde el origen y hasta llegar al limite de elasticidad. La pendiente de este segmento de la gráfica es el módulo de elasticidad del material en cuestión y se representa por la letra E. Por consiguiente:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}$$

Aunque da la impresión de ser una medida de las propiedades elásticas de los materiales, E es una medida de su rigidez; entre mayor es el valor de esta constante, mayor es la rigidez del material. Esta constante de proporcionalidad fue calculada a principios del siglo XIV por Thomas Young; por lo que también es llamada módulo de Young y corresponde a la constante de proporcionalidad que relaciona el esfuerzo y la deformación unitaria (mientras el material no exceda su limite elástico). El módulo de Young de un material cualquiera puede cambiar con la temperatura.³⁶

3.4. Sistemas híbridos/compuestos.

Los materiales complejos constituidos por dos o más fases sólidas reciben comúnmente el nombre de materiales compuestos ("composites"), siendo los más comunes aquellos constituidos por un polímero orgánico que constituye la fase continua (matriz) y un sólido inorgánico como fase dispersa que actúa como agente o carga reforzante del polímero. El resultado de la interacción entre ambos componentes orgánico e inorgánico es un efecto sinérgico que conduce a la mejora de las propiedades del material con respecto a las que muestran los componentes de forma individual. Cuando la fase dispersa presenta al menos una dimensión en la escala nanométrica, estos materiales híbridos de naturaleza organo-inorgánica se denominan "nanocomposites" o nanocompuestos. La nanoestructuración de los componentes incrementa el número de interacciones a nivel nanométrico entre el polímero orgánico y el sólido inorgánico, dando lugar a materiales con propiedades estructurales muy superiores a las de los microcomposites. Dependiendo de las propiedades aportadas por el polímero o por el sólido inorgánico, estos materiales híbridos nanoestructurados pueden presentar también propiedades funcionales adecuadas para muy diversas aplicaciones como catalizadores heterogéneos,

componentes de sensores químicos y en dispositivos ópticos, opto-electrónicos, magnéticos y electroquímicos.³⁷

Hace ahora dos décadas que se empezó a utilizar el término nanocomposite a raíz de la aparición de varios artículos que describían la preparación de los sistemas órgano-inorgánicos. A partir de estos trabajos, el desarrollo de este tipo de materiales híbridos ha experimentado una progresión espectacular, como demuestra el incremento de publicaciones sobre este tema en los últimos 10 años, que crece desde unos 100 artículos hasta más de 1500 publicaciones científicas por año (base de datos ISI Web of Knowledge). Aunque todavía hay pocas aplicaciones que hayan alcanzado el nivel comercial, existen ya diversos usos que aprovechan las excelentes propiedades estructurales y funcionales de los nanocomposites, principalmente los basados en arcillas. En efecto, no se han cumplido todas las expectativas que existían sobre comercialización de nanocomposites para aplicaciones estructurales. Con respecto a las aplicaciones funcionales son cada vez más prometedores los resultados dirigidos a su empleo como materiales de barrera para protección de alimentos, retardantes de llama, componentes en dispositivos ópticos, eléctricos o electroquímicos, así como en diversas aplicaciones biomédicas.³⁷

En el trabajo realizado por Takahisa Anada, Yoshitomo Honda, *et. al* se encontró que el alginato precipitado con fosfato de octacalcio (OCP) proporciona un mejor andamio para que los osteoblastos se adhieran y proliferen en un entorno tridimensional y promueva la regeneración ósea, indicando que el OCP es un material candidato para modificar la superficie de los andamios poliméricos no interactivos con células tales como el alginato, en una condición osteogénica.³⁸

En otro trabajo realizado por Yongxiang Luo, Anja Lode, *et. al* se realizaron andamios compuestos de alginato /nanoHAP con parámetros de poro diseñados y estructuras de núcleo/envoltura usando la técnica de trazado 3D y mineralización in situ bajo condiciones suaves (a temperatura ambiente y sin usar disolventes orgánicos). Los datos obtenidos indican que este método es adecuado para fabricar andamios compuestos de alginato/nanoHAP con una capa de nanoHAP, recubriendo la superficie de los hilos de alginato homogénea y completamente. La mineralización de la superficie mejoró las propiedades mecánicas y mejoró la unión celular y la extensión, así como la liberación sostenida de la proteína acoplada. Los resultados demostraron que el método proporciona una interesante opción para la aplicación de ingeniería de tejidos óseos.³⁹

3.5. Líneas celulares en estudios de regeneración ósea.

Diversas líneas celulares se emplean para estudiar las propiedades de las nanopartículas en sistemas *in vitro*. A continuación se mencionan algunos ejemplos

de líneas celulares empleadas en dichos estudios y las pruebas que se pueden realizar:

a) MC3T3 (células de la bóveda craneal derivadas de ratones recién nacidos).

Después de sintetizar polvos de hidroxiapatita, estos se presionan de manera isostática para convertirlos en pellets de 10 mm de diámetro por la aplicación de una fuerza uniaxial de 800 N. El cultivo celular de prueba se prepara sembrando las células MC3T3 con una densidad de 2×10^4 sobre los pellets previamente formados. En este cultivo se realizan pruebas de viabilidad celular, valoración de actividad metabólica, valoración de la cantidad total de ADN y un estudio de fluorescencia para visualizar la internalización de las nanopartículas a las células.⁴⁰

b) Raw 264.7 (macrófagos de ratón).

Se desarrolló un sistema híbrido de poliaryl éter cetona (PEAK) con nanopartículas de hidroxiapatita. Para realizar el estudio se preparó un medio de cultivo de células Raw 264.7 donde los cultivos madre se cultivaron en cajas de cultivo de 25 cm² y todos los experimentos se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos. Los estudios que se realizaron en este caso fueron determinación de viabilidad celular y valoración de la actividad metabólica.⁴¹

c) MG-63 (células de osteosarcoma humano).

En este estudio se observó el comportamiento de nanobastones de hidroxiapatita al estar en contacto con células MG-63. Estas células fueron sembradas en una placa de cultivo de 96 pocillos con una densidad de 5×10^3 . Al siguiente día se les adicionaron los nanobastones en concentraciones de 0, 20, 40 y 60 µg/ml. Después de tres días se estudió la viabilidad celular por una valoración de la actividad metabólica y después de cinco días se realizó una valoración de la actividad de la fosfatasa alcalina.⁴²

d) SaOS2 (células de osteosarcoma humano).

Después de recubrir una aleación de magnesio con fosfato tricálcico, las células SaOS2 fueron sembradas directamente sobre las aleaciones en una densidad de 1×10^5 . Los cultivos se incubaron en placas de seis pocillos durante 24 horas a 37 °C con CO₂ al 5% en un incubador humidificado. Tres muestras paralelas fueron probadas en este experimento. Después de diferentes períodos de incubación, las muestras se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar las células que no se adhirieron. En este experimento se realizaron estudios de proliferación celular, se obtuvieron imágenes por fluorescencia, inmunocitoquímica, análisis de microestructura y análisis por western blot.⁴³

4. Objetivos.

Objetivo general.

Elaborar nanomateriales híbridos a partir de alginato de sodio y nanopartículas de fosfatos cálcicos adsorbidas con un fármaco modelo como sistema de liberación en regeneración ósea.

Objetivos particulares.

- Preparar microemulsiones agua/aceite y caracterizarlas por tamaño de partícula, potencial Z y conductividad.
- Sintetizar nanopartículas de fosfato de calcio a partir de fosfato dibásico de sodio anhidro y cloruro de calcio dihidratado para su posterior caracterización por FT-IR, Análisis térmico (DSC), Difracción de Rayos X de polvos y TEM.
- Adsorber sobre las nanopartículas un fármaco modelo (norfloxacina) para realizar un estudio de liberación.
- Elaborar membranas de alginato de sodio con cloruro de calcio como plataforma para las nanopartículas de fosfato de calcio y caracterización de dichas membranas por microscopia SEM, cálculo del módulo de Young y porcentaje de porosidad.
- Caracterizar el sistema híbrido.

5. Hipótesis.

Si se logra obtener nanopartículas de fosfato de calcio a partir de microemulsiones agua/aceite a las cuales se les pueda acoplar un fármaco (antibiótico) y se prepara una membrana con buenas características de flexibilidad y porosidad, entonces se podría formar un sistema híbrido para regeneración ósea con propiedades antisépticas.

6. Materiales y metodología experimental.

- Microemulsiones y su caracterización.

Para realizar las microemulsiones se utilizó como fase oleosa ciclohexano (J.T. Baker), tolueno (Sigma-Aldrich), ácido oleico (Sigma-Aldrich) y heptano grado analítico (MERCK); como co-tensoactivos se utilizó propanol, 2-propanol y n-butanol (los tres de J.T. Baker) y como tensoactivos se utilizó Tween 80 (Hycel), Span 80 y TX-100 (ambos de Sigma-Aldrich). Como fase acuosa se utilizó agua destilada y filtrada con equipo Millipore. Las proporciones de cada microemulsión se observan en la tabla 1:

Microemulsión	Fase Acuosa	Fase oleosa	Tensoactivo	Co-tensoactivo
1 ⁴⁴	Agua/ 4.0 g	Ciclohexano/ 8.0 g	Span 80/ 2.136 g Tween 80/ 3.204 g	Butanol/ 2.66 g
2 ⁴⁵	Agua/ 1.5 g	Tolueno/ 6.96 g	TX-100/ 4.08 g	-
3 ⁴⁶	Agua/ 4.0 g	Heptano/ 7.4 g	TX-100/ 4.3 g	Butanol/ 4.3 g
4 ⁴⁷	Agua/ 1.5 g	Ciclohexano/ 3.5 mL	TX-100/ 1.0 mL	2-propanol/ 4.0 mL
5 ⁴⁸	Agua/ 2.0 g	Ácido oleico/ 6.6 g		Propanol/ 14.0 mg

Tabla 1. Composición de las microemulsiones a caracterizar

Para realizar las microemulsiones se mezclaron en frascos de vidrio los componentes en las proporciones indicadas en la tabla anterior a temperatura ambiente y bajo agitación constante. Cuando la mezcla adquirió una apariencia transparente y uniforme, se deja reposar por unos minutos y posteriormente se caracterizó por conductimetría, potencial Z y tamaño de partícula utilizando el equipo Zetasizer nano ZS de Malvern con rango de medición de tamaño de 0.3 nm a 100 μ m que utiliza un láser de dispersión dinámica de luz (DLS) de 4mW 632.8nm en un ángulo de 173°.

- Síntesis y caracterización de las nanopartículas.

Para la síntesis de las nanopartículas de fosfato de calcio se utilizó fosfato de sodio dibásico anhidro (J.T. Baker) y cloruro de calcio dihidratado (MERCK) Para la medición del potencial Z, conductividad y tamaño de partícula se utilizó el equipo

Nanosizer de Malvern, con las mismas características que tenía el equipo al realizar los estudios de las microemulsiones. Para el análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido (DSC) se utilizó un termoanalizador Mettler Toledo a un ciclo con temperatura inicial de 25°C hasta llegar a 500°C; para la obtención del espectro IR se usó un espectrofotómetro de FTIR / FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer; para la difracción de rayos X de polvos (DXP) se empleó un difractómetro de rayos X, modelo D8 Advance Davinvi configuración theta-theta marca Bruker AXS y para TEM se usó un microscopio de transmisión electrónica JEOL JEM-2010 (resolución: 0.23 nm-0.14 nm, voltaje de aceleración de 80-200kV, amplificación: 3000-1500k). Los estudios por DSC, TEM, FT-IR y DXP fueron realizados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria de la Facultad de Química de la UNAM (USAII). Se prepararon por separado una microemulsión con cloruro de calcio dihidratado y otra con fosfato dibásico de sodio anhidro (ambas de concentración de 0.5 M) y finalmente ambas se mezclaron para obtener las nanopartículas de HAP. Posteriormente se separaron las nanopartículas de los componentes de la microemulsión se centrifugaron en una centrifugadora Sorvall Biofuge Primo R de Thermo Electron Corporation a 3000 rpm por 10 minutos a 19°C. Una vez terminado ese proceso se eliminaron los componentes líquidos, se extrajeron las nanopartículas del tubo de centrifuga y se lavaron con metanol caliente y finalmente se secaron las nanopartículas en una parrilla a 80°C por 2 horas.

- Adsorción de norfloxacin en las nanopartículas de HAP

Se realizó una disolución madre de norfloxacin a una concentración de 1mg/mL y se diluyó a una concentración de 100 µg/mL y a partir de esta se realizaron 6 disoluciones con concentraciones de entre 1 y 12 µg/mL para realizar la curva patrón. Las concentraciones se midieron en el equipo de espectroscopia UV.

Después se elaboraron seis soluciones más con concentraciones diferentes a las anteriores para realizar un estudio de adsorción utilizando 30.0 mg de las nanopartículas obtenidas de la microemulsión 3 (ME3) sintetizadas previamente y usando 5.0 mL de cada solución en cada una de las muestras. Se midió con un equipo de espectroscopia UV a cada hora cada una de las muestras para observar la cinética de adsorción.

Una vez encontrado el tiempo de adsorción máxima se realizó un estudio para hacer la isoterma.

Se filtraron las nanopartículas y se dejaron secar para realizar posteriormente un estudio de liberación.

- Elaboración de las membranas de alginato de calcio.

Para la elaboración de las membranas se utiliza alginato de sodio y cloruro de calcio, en las proporciones que se indican en la tabla 2:

Muestra	Volumen total* (mL)	Alginato de sodio 2%(peso/volumen) (g)	Cloruro de calcio dihidratado (peso/volumen) (g)
1	200.08	4.0016	0.15 (0.075%)
2	200.109	4.0021	0.20 (0.1%)
3	200.163	4.0032	0.30 (0.15%)
4	200.218	4.0043	0.40 (0.2%)

Tabla 2. Composición de las membranas que se van a caracterizar. *En el volumen total se considera el volumen adicional que agrega el adicionar cloruro de calcio dihidratado utilizando el valor de su densidad.

Las muestras se vacían en dos cajas Petri de 8.3 cm de diámetro cada una para secar por 24 horas, una a temperatura ambiente y otra por liofilización en una liofilizadora FreeZone Triad Freeze Dry System de Labconco modelo 74000-40 con un periodo de pre-congelamiento a -20°C y un segundo a -40°C .

Las propiedades mecánicas para cada una de las membranas obtenidas se llevaron a cabo en un texturómetro Multitest 1-i, modelo Mecmesin con celda de carga de 50 N y software Emperor, para la obtención de los datos de tensión. Las determinaciones se realizaron con muestras de membranas de 2 por 4 cm, las cuales fueron sujetadas al equipo con una mordaza inferior y superior. Las condiciones empleadas para la prueba fueron: velocidad de desplazamiento de 5 mm/min, desplazamiento inicial (γ_0) de 20 mm, desplazamiento máximo ($\gamma_{\text{máx}}$) de 60 mm, carga de 40 N y tiempo de duración de 3 min. Mediante el software empleado se obtiene el desplazamiento corregida (γ_{ing}) para cada fuerza aplicada; permitiendo conocer la fuerza de corte (F_c) para las muestras. Después se selecciona la que tenga mejor elasticidad para adicionarle las nanopartículas de HAP de la ME3. Este parámetro de elasticidad se determina realizando el cálculo del módulo de Young, ya que este es un indicativo de la firmeza y rigidez de la película.

El estudio de porosidad⁴⁹ se realiza pesando en seco (P_s) las membranas y después estas se sumergen en una caja Petri con agua por 24 horas (este estudio solo se realiza en las membranas que han sido previamente lavadas con una solución de CaCl_2 al 10%). Posteriormente se retiran las membranas del agua y con un papel

filtro se les retira rápidamente el agua superficial para después volver a pesarlas (Pd). Para saber el porcentaje de porosidad se realiza el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Porosidad} = \frac{Pd - Ps}{Ps} * 100$$

7. Resultados.

- Caracterización de las microemulsiones

Las microemulsiones elaboradas (tabla 3) deben ser agua en aceite con la finalidad de albergar en la fase interna el fosfato de sodio y el cloruro de calcio, respectivamente, Este experimento se realizó por triplicado.

Microemulsión	Tamaño de partícula (nm)	Potencial Z (mV)*	Conductividad (µS/cm)
ME1	225.1	--	5.80
ME2	29.1	--	0.26
ME3	22.49	--	6.98

Tabla 3. Caracterización de las microemulsiones por tamaño de partícula, potencial Z y conductividad. Las mediciones se realizan por triplicado. * El potencial Z no pudo ser medido debido a que la concentración de las microemulsiones no son las adecuadas para realizar dicha medición.

En el estudio de las microemulsiones sólo se presentan los resultados de las primeras tres microemulsiones debido a que son las que muestran los mejores resultados. En el caso de la ME4 fue imposible medirla debido a que al más mínimo cambio de superficie la microemulsión se rompía y los componentes se separaban, lo que implica que es demasiado sensible para poder trabajar con ella. Y en cuanto a lo que respecta a la ME5, no fue posible que la microemulsión se formara como lo dice en el artículo de referencia.

- Caracterización de las nanopartículas sintetizadas.

Las nanopartículas fueron elaboradas a partir de la unión de dos microemulsiones de 20.0 mL, de los mismos componentes con fosfato de sodio dibásico anhidro y de cloruro de calcio dihidratado, respectivamente. Ambas soluciones se encontraban en una concentración de 0.5 M. Esta concentración se eligió después de hacer pruebas con las tres microemulsiones que si resultaron viables para el estudio. Esa prueba consistió en agregar a las microemulsiones soluciones de concentración de 0.25, 0.5 y 0.75 M de ambas sales por separado. Lo que se observó es que por

encima de una concentración de 0.5 M la microemulsión se rompía y los componentes se separaban, mientras que por debajo de 0.5 M éstas, mantenían su aspecto uniforme.

La tabla 4 resume los hallazgos encontrados.

Microemulsión	Tamaño de la nanopartícula obtenidas (nm)	Potencial Z (mV)	Rendimiento de la reacción (mg)
ME1	130.8	-22.8	519.17
ME2	17.7	-7.69	190.33
ME3	39.22	-2.51	526.20

Tabla 4. Caracterización de las nanopartículas obtenidas por tamaño de partícula y potencial Z. Las mediciones se realizan por intensidad con un volumen de 1.0mL

- Análisis por infrarojo por transformada de Fourier.

El análisis por FT-IR se realizó para poder obtener información estructural de las nanopartículas obtenidas en cada una de las microemulsiones. Se espera comprobar la presencia de fosfato de calcio como hidroxiapatita y en su isoforma brushita.

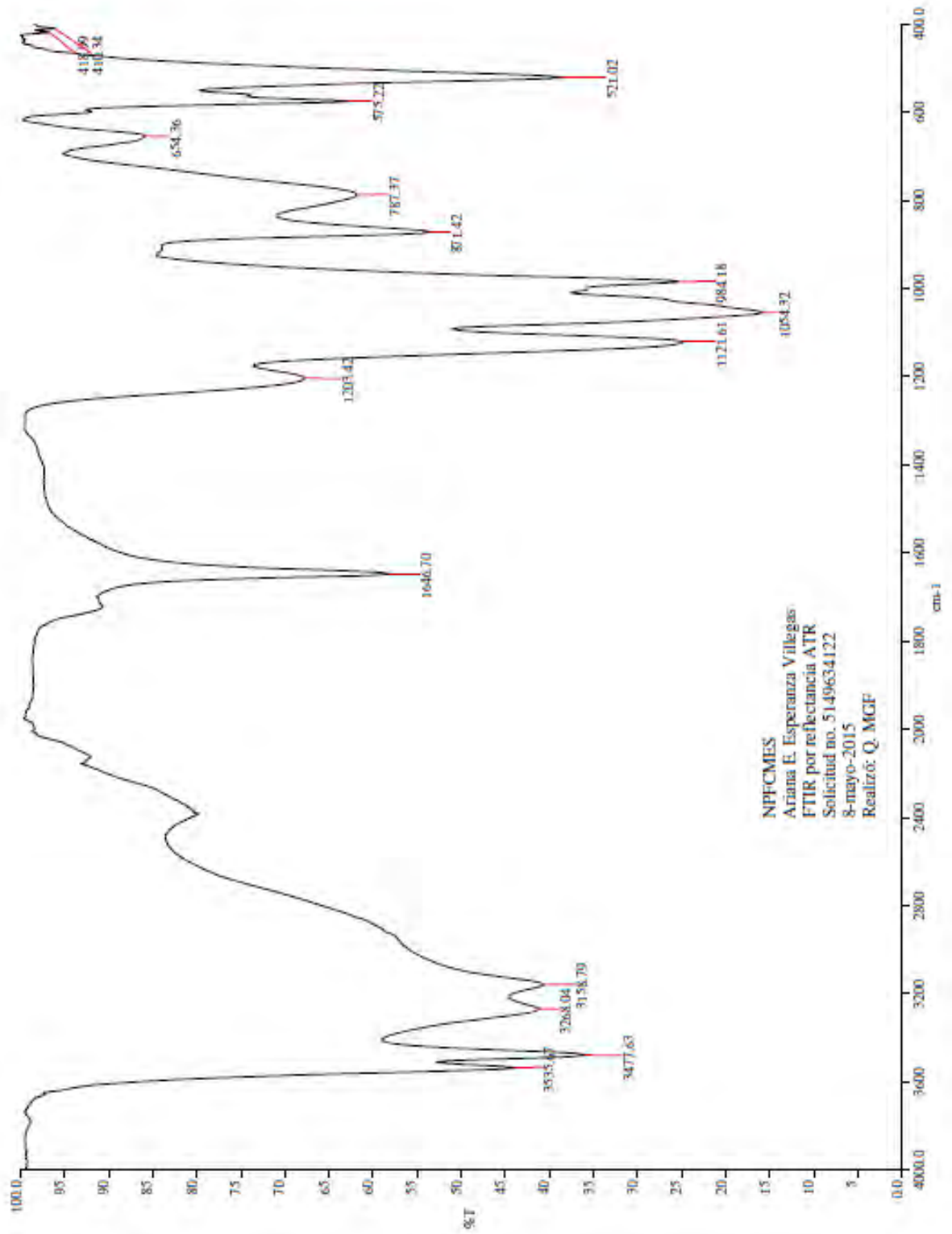


Figura 4. Espectro IR de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 1.

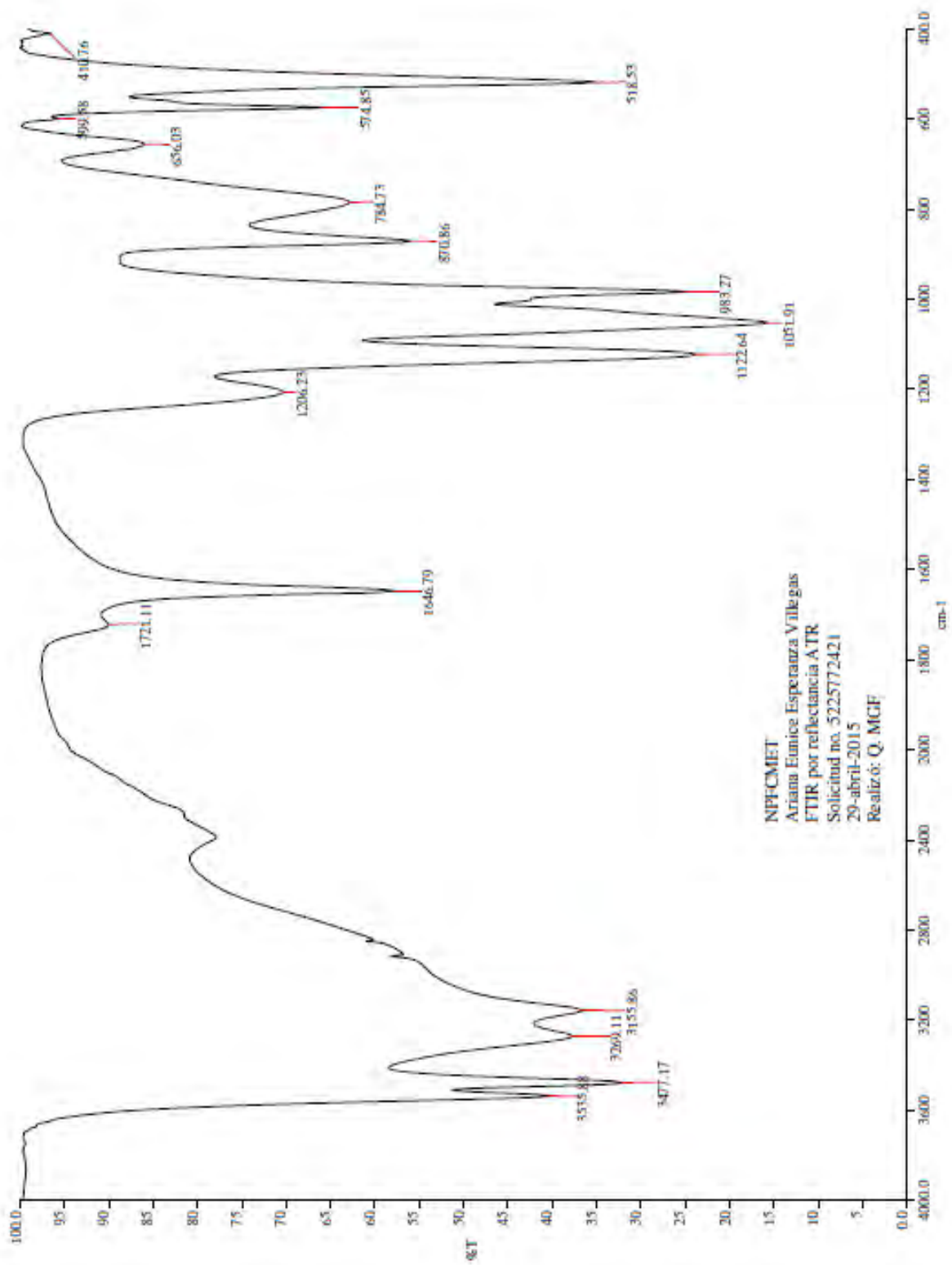


Figura 5. Espectro IR de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 2.

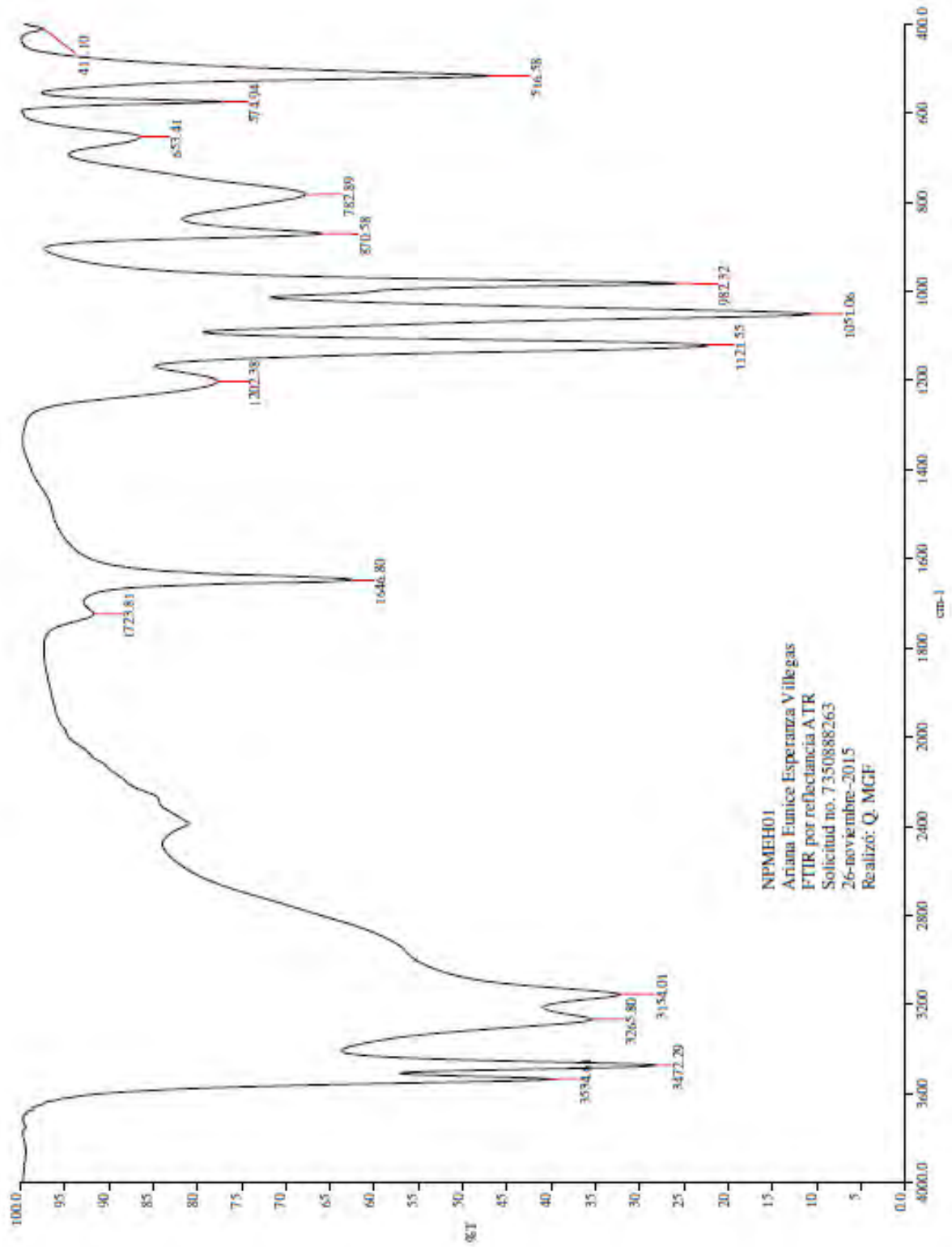


Figura 6. Espectro IR de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 3.

- Análisis por Difracción de rayos X de polvos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos del análisis de difracción de rayos X de polvos que se les realizó a las nanopartículas obtenidas a partir de las tres microemulsiones de estudio.

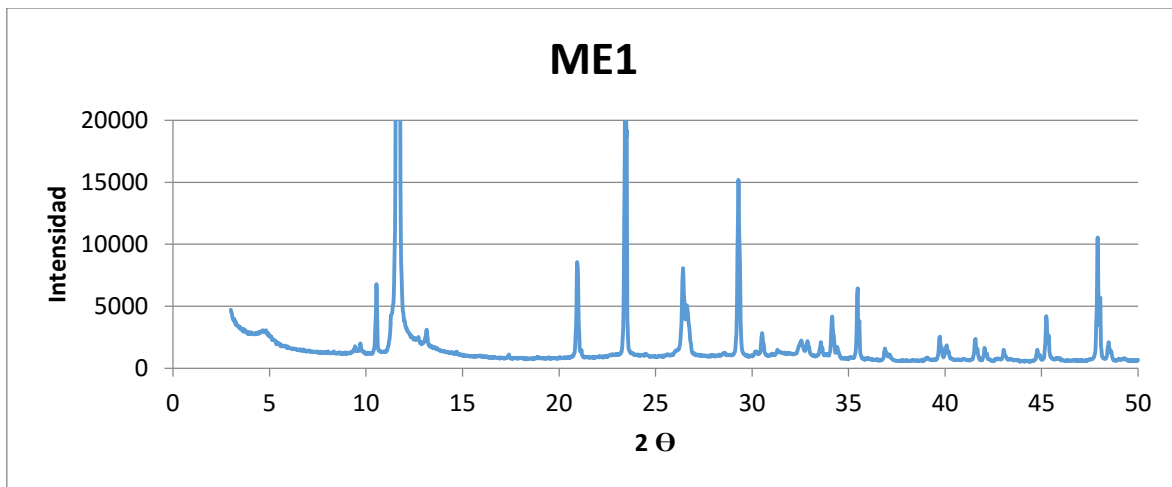


Figura 7. Resultado del análisis por difracción de rayos X de polvos de las nanopartículas obtenidas microemulsión 1.

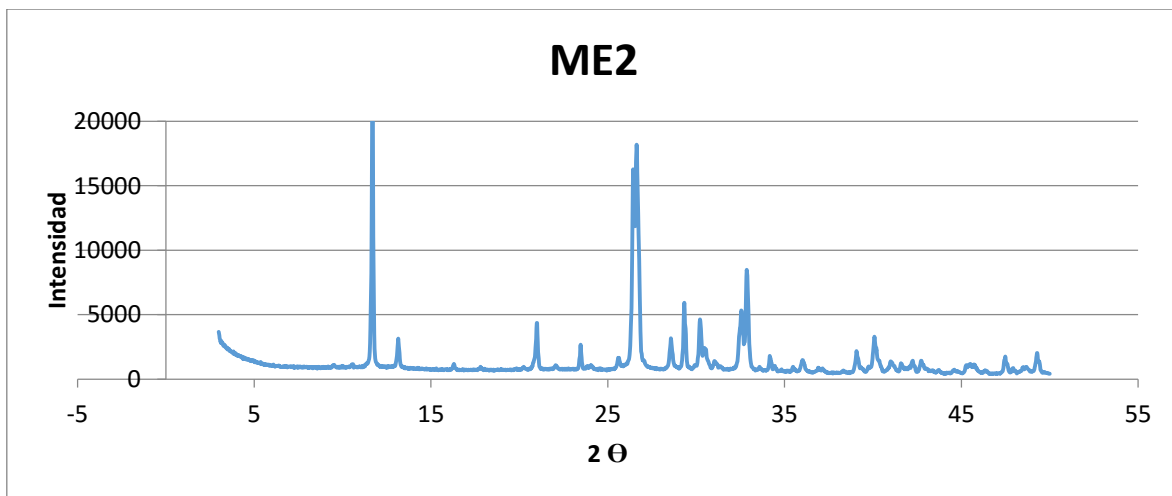


Figura 8. Resultado del análisis por difracción de rayos X de polvos de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 2.

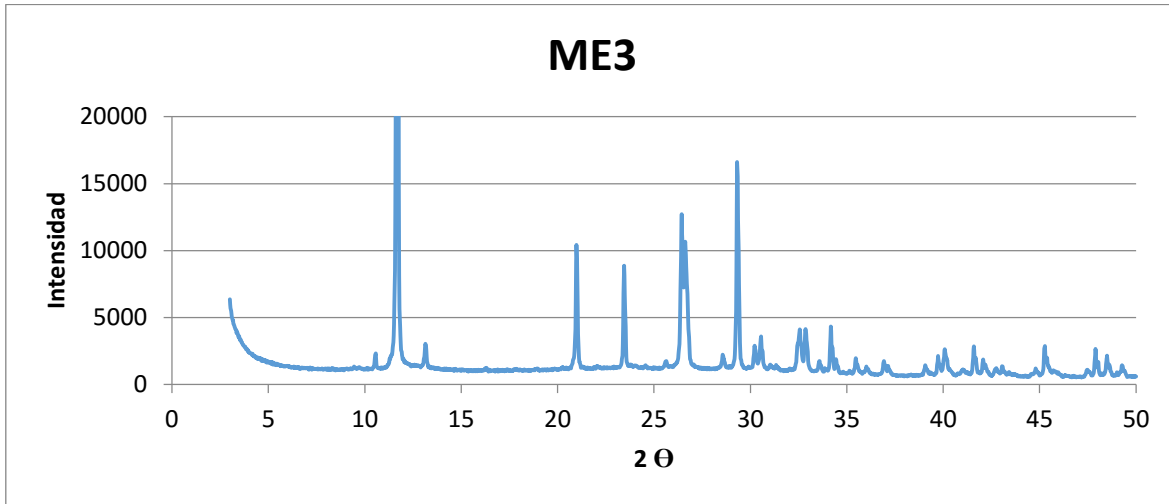


Figura 9.a. Resultado del análisis por difracción de rayos X de polvos de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 3.

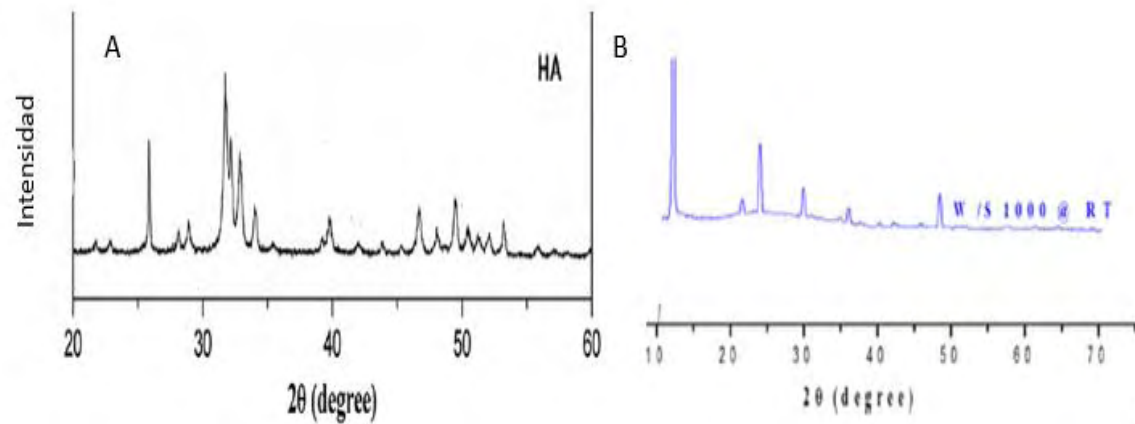


Figura 9.b. A) DXP Hidroxiapatita²⁹. B) DXP de la brusita¹¹

- Análisis por Microscopia de transmisión electrónica.

En este estudio se espera observar la morfología de las nanopartículas obtenidas para determinar después cuál es la mas convniente para realizar estudios posteriores.

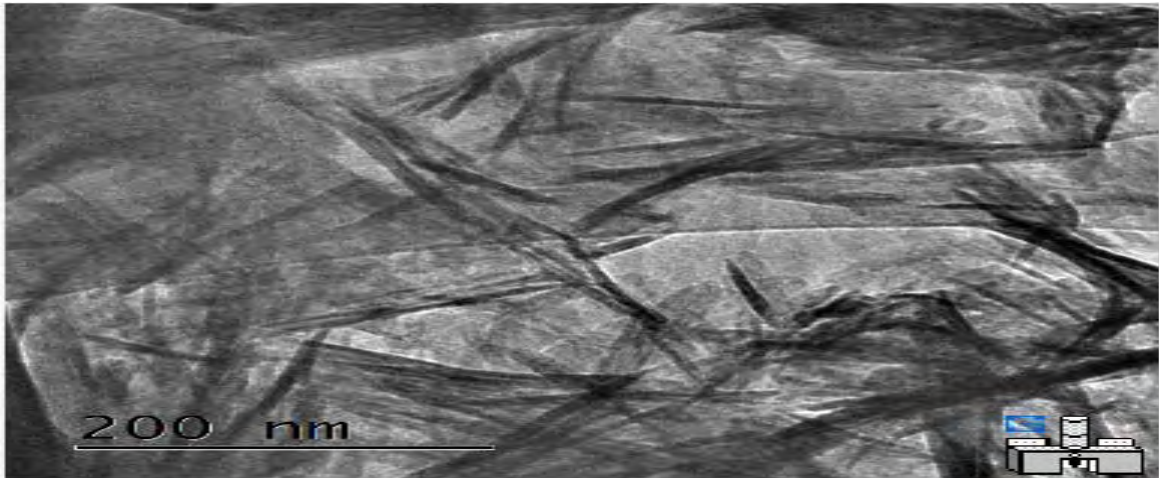


Figura 10. Resultado del análisis por TEM de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 1.

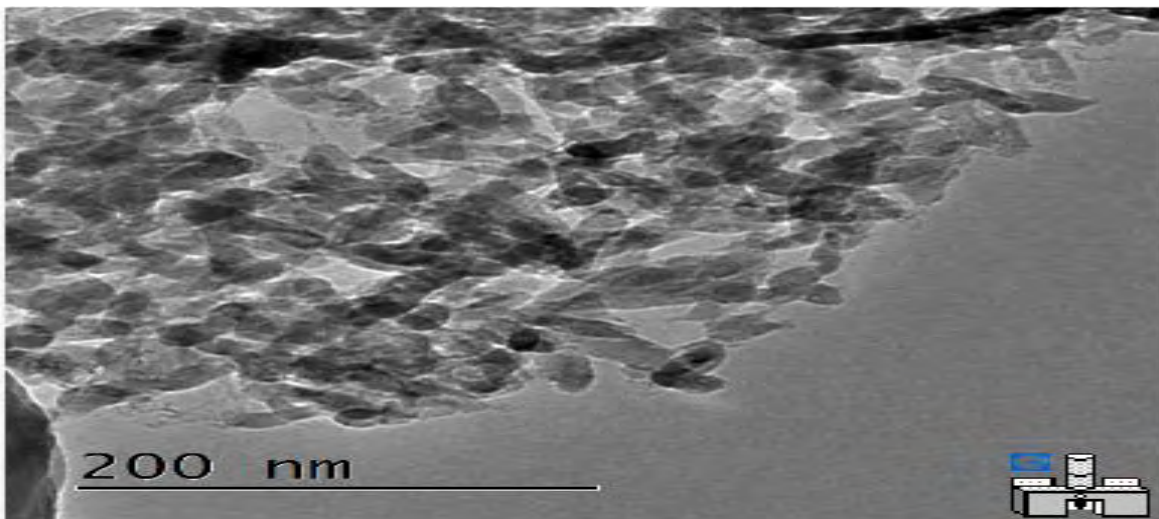


Figura 11. Resultado del análisis por TEM de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 2.

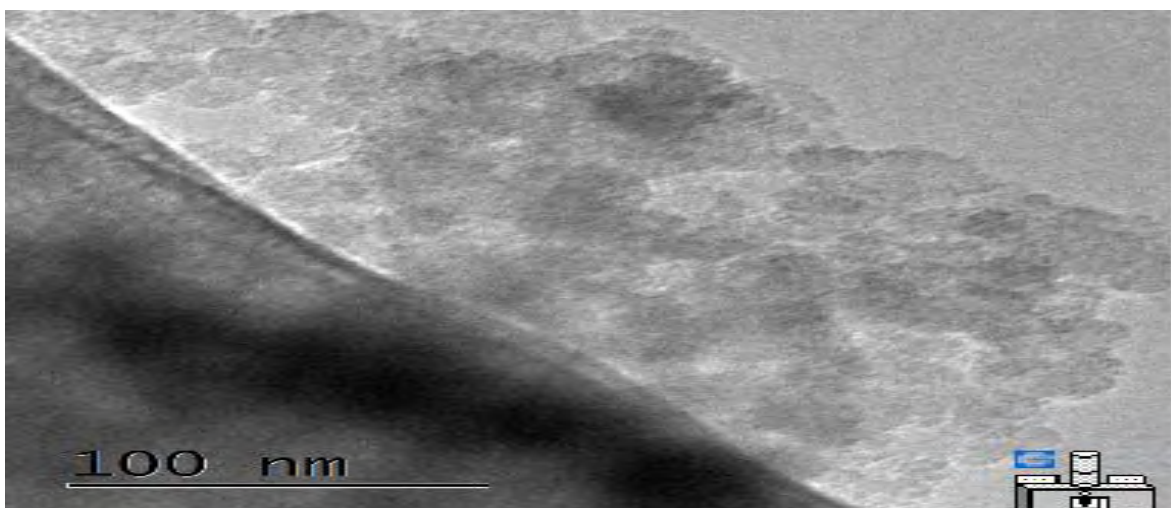


Figura 12. Resultado del análisis por TEM de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 3.

- Análisis térmico. Calorimetría diferencial de barrido.

Con este estudio se quiere comprobar la existencia de HAP en la muestra al observar su transición cristalina al aplicar calor

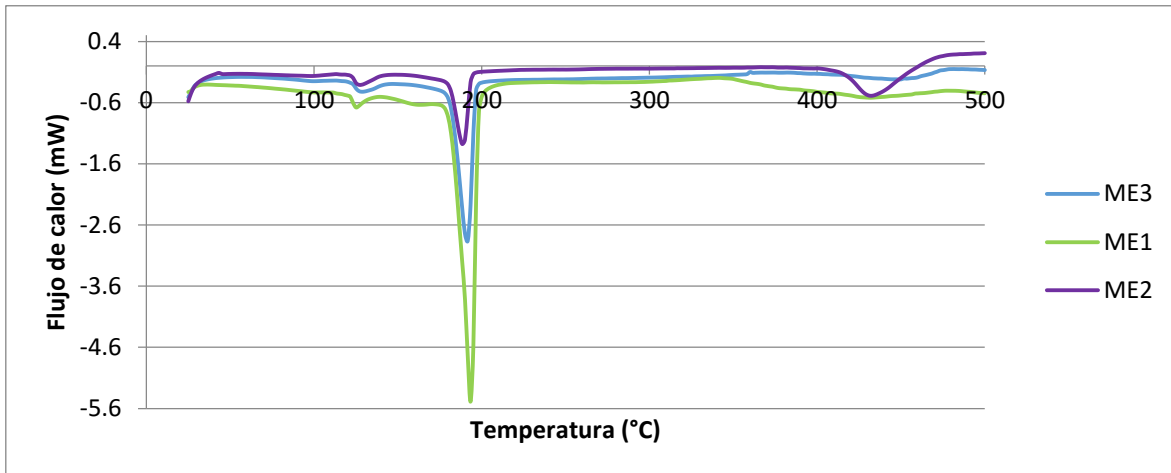


Figura 13. Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido de las nanopartículas obtenidas a partir de las tres microemulsiones.

Repetibilidad de la técnica.

- Caracterización de la microemulsión.

En la tabla 5 se observan los resultados obtenidos de tamaño de partícula, potencial zeta y conductividad para una muestra diferente de la ME3.

Tamaño de partícula	Potencial Z	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
42.01 nm	La concentración de la muestra no es adecuada para medir potencial Z	6.66

Tabla 5. Caracterización de la microemulsión por tamaño de partícula, potencial Z y conductividad. * El potencial Z no pudo ser medido debido a que la concentración de la microemulsión no es las adecuadas para realizar dicha medición.

- Caracterización de las nanopartículas formadas.

En la tabla 6 se encuentran los datos obtenidos de tamaño de partícula y potencial zeta de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión, así como el rendimiento de la reacción entre el fosfato dibásico de sodio y el cloruro de calcio.

Tamaño de la nanopartículas (nm)	Potencial Z (mV)	Rendimiento de la reacción (mg)
21.1	-4.16	530.52

Tabla 6. Caracterización de las nanopartículas obtenidas por tamaño de partícula y potencial Z.

- Análisis por infrarrojo por transformada de Fourier

En este segundo análisis por IR se espera encontrar los mismos picos característicos obtenidos en la primera muestra sintetizada de nanopartículas para verificar que se sintetizan nanopartículas muy similares en muestras diferentes de la misma microemulsión.

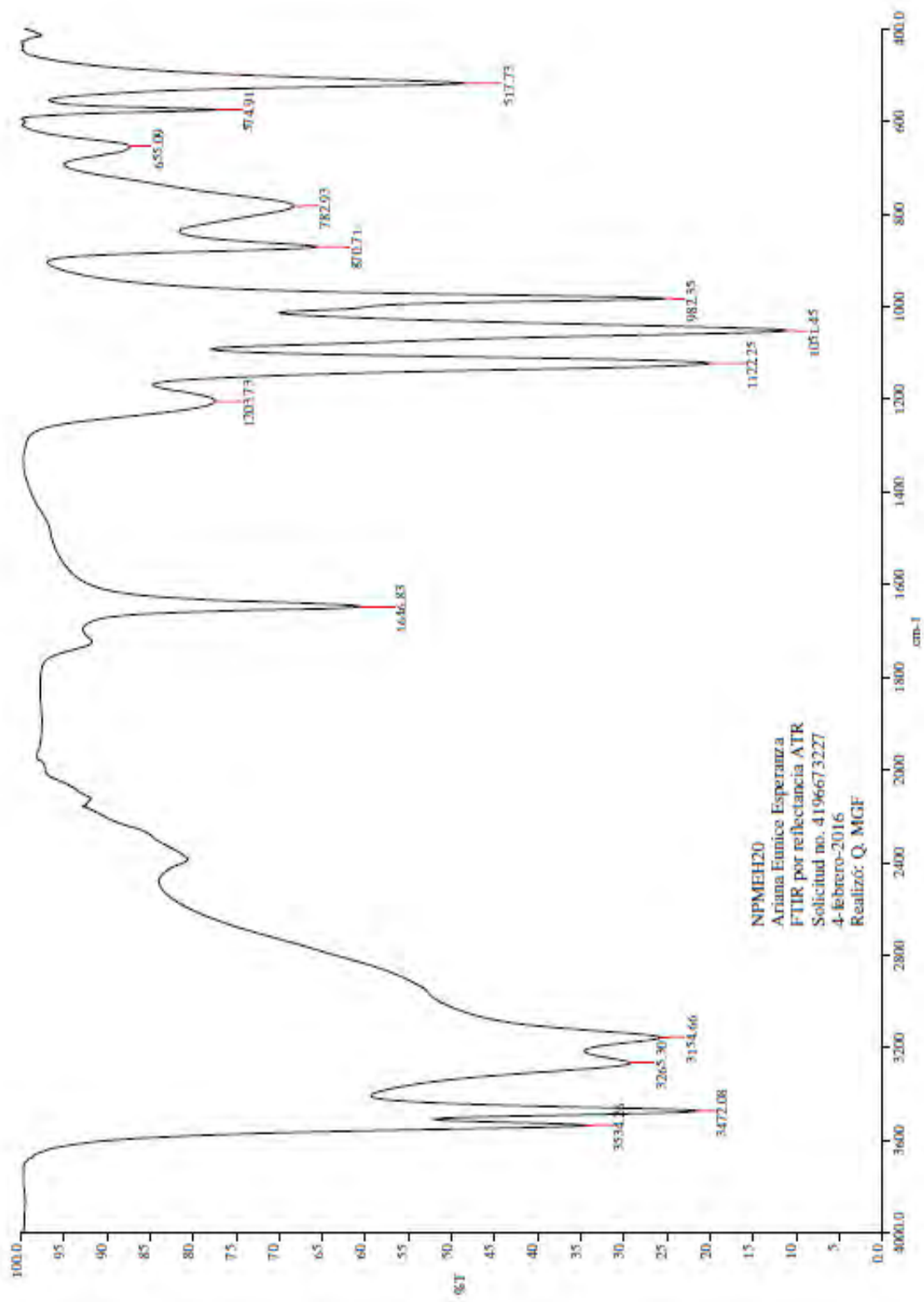


Figura 14. Analisis IR de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 3.

- Análisis de difracción de rayos X de polvos.

En este segundo análisis por DXP se espera ver los mismos picos característicos de rusita y de HAP observados en el primer difractograma, ya que ésta técnica nos permite ver los compuestos presentes en la muestra que están constituidos por los mismos elementos.

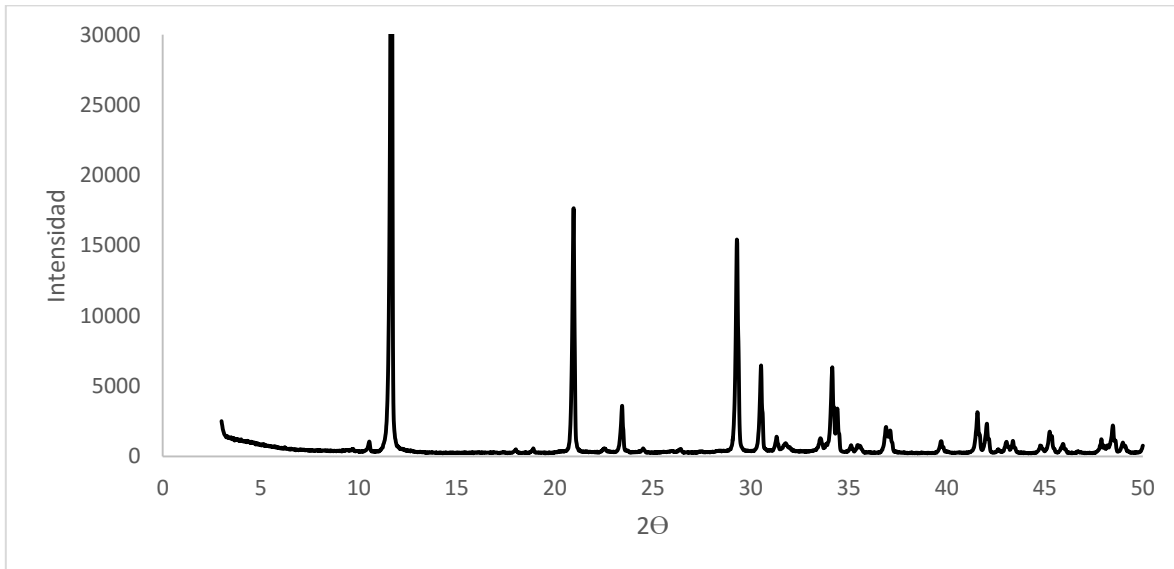


Figura 15. Resultado del análisis por difracción de rayos X de polvos de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 3.

- Análisis por microscopía de transmisión electrónica.

En este segundo análisis por TEM esperamos observar las nanopartículas con morfología redonda, pero ésta vez esperamos que la imagen nos muestre dicha morfología con mayor claridad que en el estudio previamente realizado.

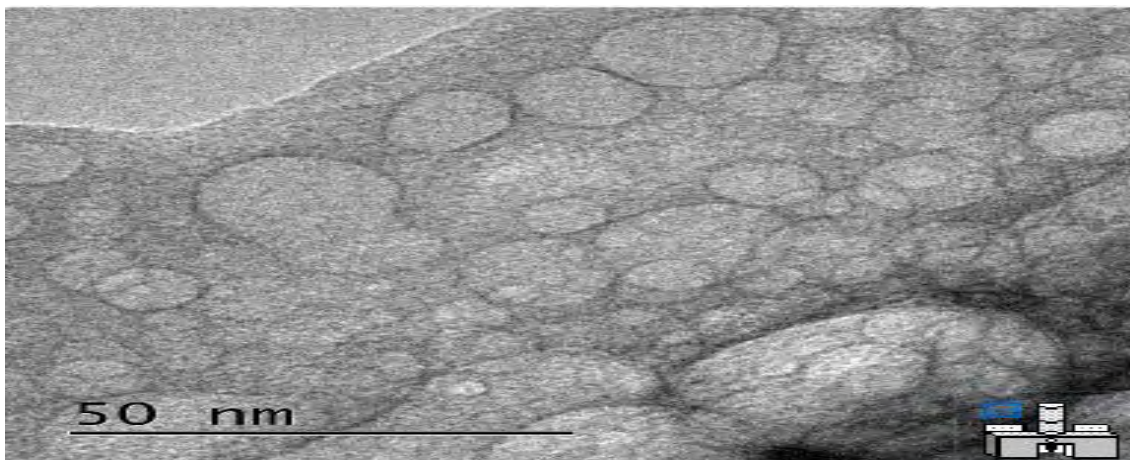


Figura 16. Resultados de análisis por TEM de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 3.

- Análisis térmico. Calorimetría diferencial de barrido

En esta segunda DSC esperamos observar las mismas transiciones cristalinas observadas previamente.

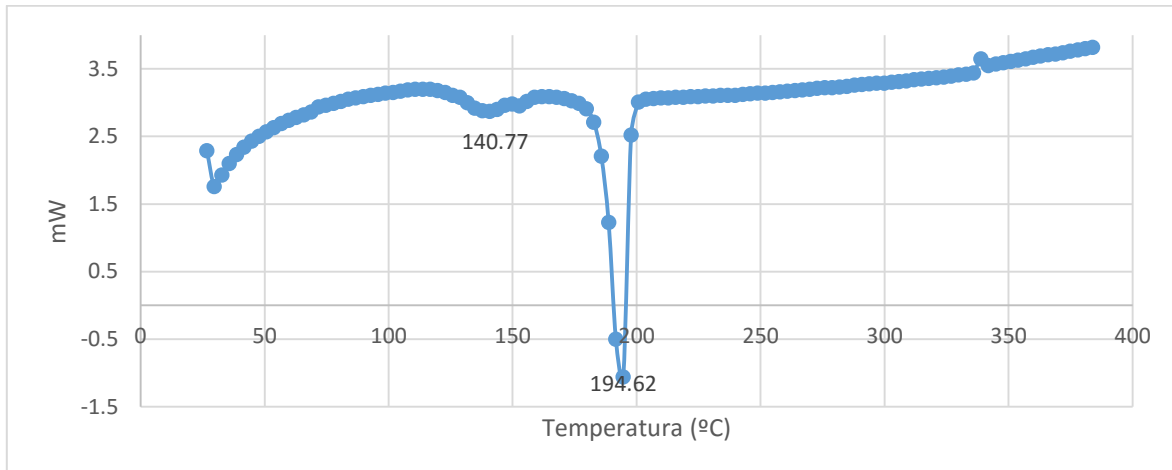


Figura 17.. Análisis térmico por calorimetría diferencial de barrido de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 3.

- Adsorción de norfloxacin en las nanopartículas de HAP.

Curva patrón.

Para realizar la curva patrón de norfloxacin se realizó una disolución madre de una concentración de 1.0 mg/mL, la cual se diluyó a una concentración de 100 µg/mL y posteriormente se realizaron 6 diluciones a las siguientes concentraciones: 1, 2, 6, 8, 10 y 12 µg/ml. Posteriormente se midió en el equipo de espectroscopía UV, a 285.41 nm. Los resultados obtenidos para la curva se muestran en la tabla 7 y la representación gráfica de dichos datos se muestran en la figura 18.

Concentración (µg/mL)	Absorbancia
1	0.171
2	0.270
6	0.699
8	0.955

10	1.192
12	1.396

Tabla 7. Absorbancia obtenida en cada una de las diferentes concentraciones de norfloxacin.

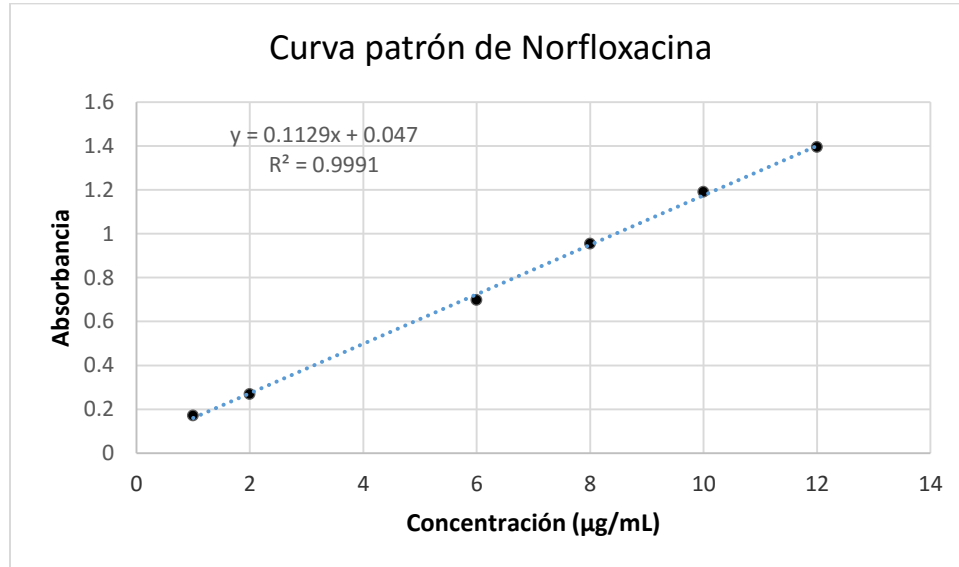


Figura 18.. Curva patrón de norfloxacin.

Estudio cinético de adsorción.

Se llevó a cabo un estudio de adsorción del fármaco (norfloxacin) con la finalidad de saber el tiempo que tardaba en adsorberse el fármaco en las nanopartículas de la ME3, usando 5.0 mL de siete concentraciones diferentes de norfloxacin y 30.0 mg de nanopartículas de HAP, en agitación constante. Terminado el determinado tiempo la agitación se detenía, se dejaban asentar las nanopartículas en la solución por quince minutos y posteriormente se extraía el sobrenadante del frasco de manera muy cuidadosa con una jeringa de 5.0 mL. Un mililitro de la muestra era centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos y finalmente se medía el sobrenadante en el equipo de UV.

En la tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de este primer estudio.

Muestra	Abs. al inicio	C inicial (µg/mL)	Abs. al T1	C (µg/mL)	T1 (min)	Abs. al T2	C (µg/mL)	T2 (min)	Abs. al T3	C (µg/mL)	T3 (min)
1	0.325	2.462	0.105	0.513	20	0.332	2.524	40			
2	0.45	3.569	0.172	1.107	30	0.143	0.850	50	0.216	1.496	80
3	0.636	5.217	0.199	1.346	40	0.203	1.381	60			
4	0.805	6.713	0.533	4.304	30	0.318	2.400	60	0.441	3.489	80
5	0.996	8.405	0.392	3.055	40	0.384	2.984	60			
6	1.198	10.194	0.419	3.294	60	0.49	3.923	80			
7	1.284	10.956	0.498	3.994	60	0.543	4.393	80			

Tabla 8. Estudio cinético de la adsorción de norfloxacin en las nanopartículas de HAP de la ME3

Calculamos la concentración de cada muestra usando la ecuación de la recta, que en este caso es:

$$y = 0.1129x + 0.047$$

Despejamos x y nos queda:

$$x = \frac{y - 0.047}{0.1129}$$

Para el primer valor de absorbancia (muestra 1):

$$x = \frac{0.325 - 0.047}{0.1129} = 2.462 \mu\text{g/mL}$$

En la figura 19 se muestran los resultados de la tabla anterior:

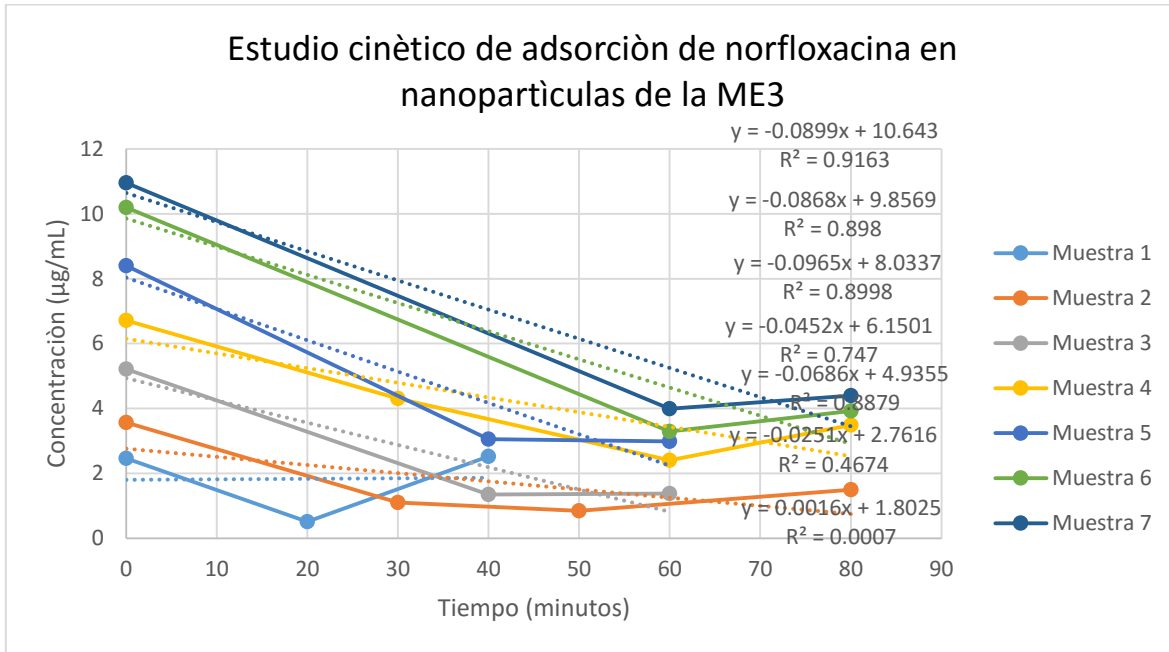


Figura 19. Estudio cinético de la adsorción de la norfloxacin en las nanopartículas de HAP de la ME3.

Isoterma de adsorción.

Posteriormente se llevó a cabo otro estudio de adsorción del fármaco (norfloxacin) en las nanopartículas de HAP de la ME3, usando 5.0 mL de siete concentraciones diferentes de norfloxacin y 30.0 mg de nanopartículas de HAP. La muestra inicial se mide en el equipo UV y se calcula la concentración como se explicó anteriormente en el estudio cinético

Para saber la concentración molar inicial, se realiza el siguiente cálculo:

$$\frac{2.542 \mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} \times \frac{1 \text{ mol norfloxacin}}{319.33 \text{ g}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 7.960 \times 10^{-6} \text{ M}$$

Para saber el número inicial de moles:

$$\frac{7.960 \times 10^{-6} \text{ mol}}{1000 \text{ mL}} \times 5.0 \text{ mL} = 3.980 \times 10^{-8} \text{ moles}$$

En la tabla 9 estan los resultados de cada medición:

Muestra	Absorbancia	Concentración inicial de norfloxacin (µg/mL)	Concentración molar (mol/L)	Numero de moles al inicio
1	0.334	2.542	7.960×10^{-6}	3.980×10^{-8}
2	0.423	3.330	1.042×10^{-5}	5.214×10^{-8}
3	0.606	4.951	1.550×10^{-5}	7.752×10^{-8}
4	0.827	6.908	2.163×10^{-5}	1.081×10^{-7}
5	1.006	8.494	2.660×10^{-5}	1.330×10^{-7}
6	1.219	10.380	3.250×10^{-5}	1.625×10^{-7}
7	1.310	11.186	3.503×10^{-5}	1.751×10^{-7}

Tabla 9. Cálculos de concentración y número de mol para cada concentración de norfloxacin.

Terminado el tiempo al equilibrio de la adsorción determinado en el estudio anterior, la agitación se detenía, se dejaban asentar las nanopartículas en la solución por quince minutos y posteriormente se extraía el sobrenadante del frasco de manera muy cuidadosa con una jeringa de 5 mL. Se toma una muestra de un mililitro y se centrifuga a 12000 rpm por 5 minutos y posteriormente se leen las muestras centrifugadas en el equipo de espectroscopía UV para obtener la absorbancia al equilibrio. La concentración al equilibrio, la concentración molar al equilibrio y el número de moles al equilibrio se obtienen realizando los mismos cálculos que se explicaron anteriormente.

Para saber cuántos moles fueron adsorbidos, se realiza la siguiente resta (ejemplo para la muestra 1):

$$\text{mol adsorbidos} = \text{mol iniciales} - \text{mol al equilibrio}$$

$$\text{mol adsorbidos} = 3.980 \times 10^{-8} \text{ mol} - 6.795 \times 10^{-9} = 3.300 \times 10^{-8} \text{ moles}$$

Para conocer el valor de Y en cada punto, se realiza lo siguiente:

$$Y = \text{moles adsorbidos} / \text{gramos de nanopartículas usadas para el experimento}$$

$$Y = \frac{3.300 \times 10^{-8} \text{ mol}}{0.030 \text{ gramos de nanopartículas}} = 1.100 \times 10^{-6} \text{ moles/gramo}$$

Los resultados de cada una de las determinaciones se muestran en la tabla 10 y su representación gráfica se puede observar en la figura 20 y 21:

Muestra	Absorbancia al equilibrio	Concentración al equilibrio (µg/mL)	Concentración molar al equilibrio (mol/L)	Número de moles al equilibrio	Moles adsorbidos	Y (moles/g de nanopartículas)
1	0.09	0.434	1.359×10^{-6}	6.795×10^{-9}	3.300×10^{-8}	1.100×10^{-6}
2	0.143	0.903	2.829×10^{-6}	1.414×10^{-8}	3.800×10^{-8}	1.266×10^{-6}
3	0.177	1.204	3.772×10^{-6}	1.886×10^{-8}	5.866×10^{-8}	1.955×10^{-6}
4	0.315	2.426	7.600×10^{-6}	3.800×10^{-8}	7.017×10^{-8}	2.339×10^{-6}
5	0.384	3.038	9.513×10^{-6}	4.756×10^{-8}	8.543×10^{-8}	2.847×10^{-6}
6	0.455	3.666	1.148×10^{-5}	5.741×10^{-8}	1.051×10^{-7}	3.504×10^{-6}
7	0.510	4.154	1.300×10^{-5}	6.504×10^{-8}	1.101×10^{-7}	3.670×10^{-6}

Tabla 10. Resultados de los cálculos realizados para la obtención del valor de Y.

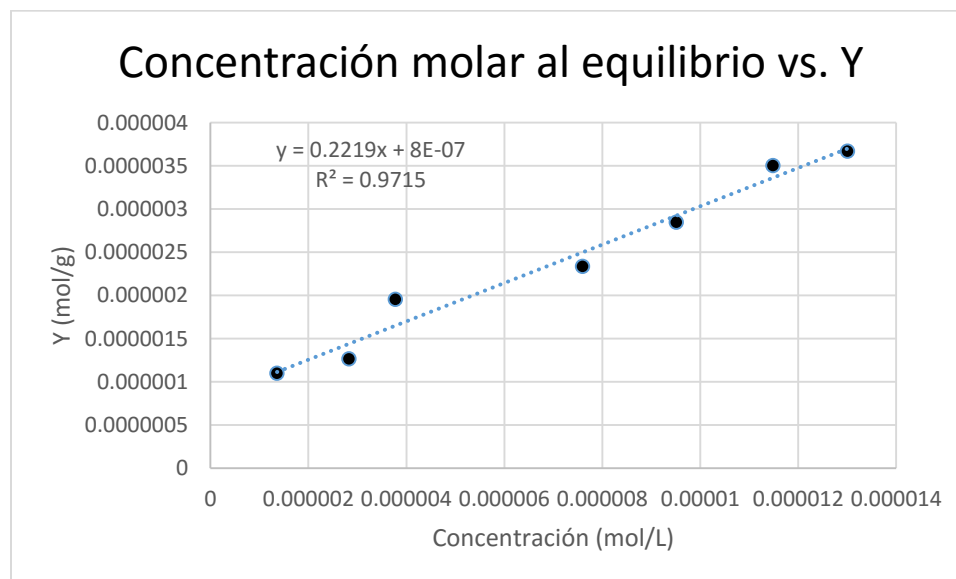


Figura 20. Concentración molar al equilibrio vs. Y

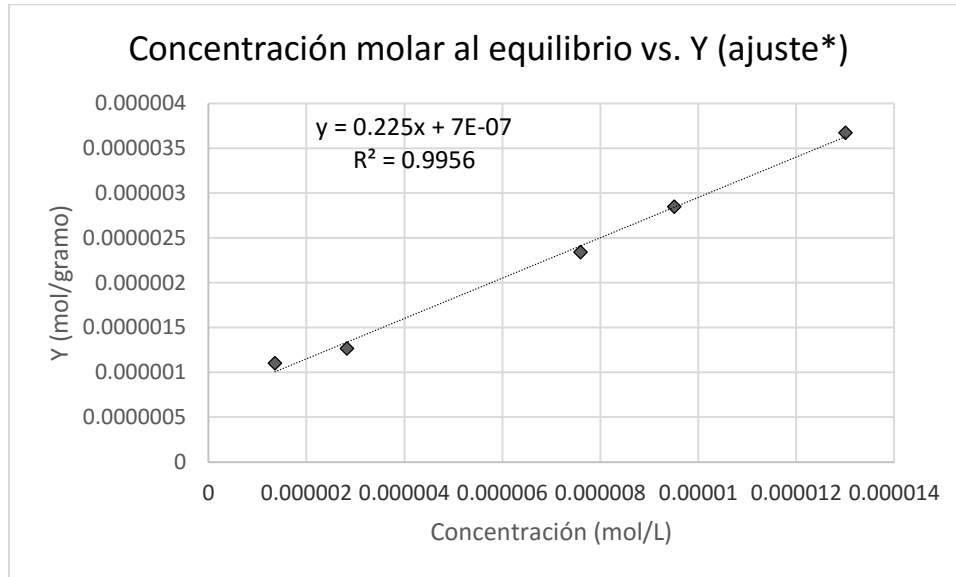


Figura 21. Concentración molar al equilibrio vs. Y. * El ajuste lineal se realizó eliminando los puntos 3 y 6

Para obtener el valor de Y_{max} (cantidad máxima de fármaco que se puede adsorber en cada gramo de nanopartículas) se realiza un ajuste lineal Isoterma de Langmuir, que dice que la cantidad adsorbida aumenta con la concentración hasta alcanzar un valor límite correspondiente al recubrimiento de la superficie por una monocapa. Este fue el primer modelo importante que trato de interpretar un proceso de adsorción basándose en el equilibrio adsorción-desorción. La rapidez de adsorción es proporcional a la presión y a la fracción de superficie no cubierta, en tanto que la desorción solo depende de la fracción de superficie cubierta. Al equilibrio ambas son iguales.

$$k_a - k_a C \theta = k_d \theta$$

Despejando θ que es la fracción de superficie cubierta y dividiendo entre k_d podemos sustituir $\frac{k_a}{k_d} = b$, la ecuación queda de la siguiente manera.

$$\theta = \frac{k_a C}{k_d + k_a C} = \frac{b C}{1 + b}$$

Aplicando el inverso, gráficamente se obtiene la ecuación lineal de Langmuir y definiendo:

$$\theta = Y/Y_{max}$$

$$Y = \frac{Y_{max}bC}{1 + bC}$$

$$\frac{1}{Y} = \frac{1}{Y_{max}bC} + \frac{1}{Y_{max}}$$

El inverso de la concentración al equilibrio para la muestra 1 es:

$$\frac{1}{1.359 \times 10^{-6} \text{ mol/litro}} = 735762.387 \text{ L/mol}$$

Para el inverso de Y de la muestra 1:

$$\frac{1}{1.100 \times 10^{-6} \text{ mol/gramo}} = 908882.949 \text{ gramo/mol}$$

C/Y de la muestra 1:

$$\frac{1.359 \times 10^{-6} \text{ mol/litro}}{1.100 \times 10^{-6} \text{ mol/gramo}} = 1.235 \text{ gramo/litro}$$

Los resultados obtenidos son los siguientes (tabla 11):

Muestra	Concentración molar al equilibrio (mol/L)	Y (mol/g)	1/C (L/mol)	1/Y (g/mol)	C/Y (g/L)
1	1.359×10^{-6}	1.100×10^{-6}	735762.387	908882.949	1.235
5	2.829×10^{-6}	1.266×10^{-6}	353454.480	789467.671	2.233
3	3.772×10^{-6}	1.955×10^{-6}	265090.860	511380.950	1.929
4	7.600×10^{-6}	2.339×10^{-6}	131577.945	427498.304	3.249
5	9.513×10^{-6}	2.847×10^{-6}	105108.912	351159.321	3.340

6	1.148×10^{-5}	3.504×10^{-6}	87082.987	285374.857	3.277
7	1.300×10^{-5}	3.670×10^{-6}	76870.697	272435.947	3.544

Tabla 11. Resultados obtenidos de los cálculos realizados para el ajuste lineal.

Las figuras 22-25 muestran los resultados gráficos de los datos de la tabla 11;

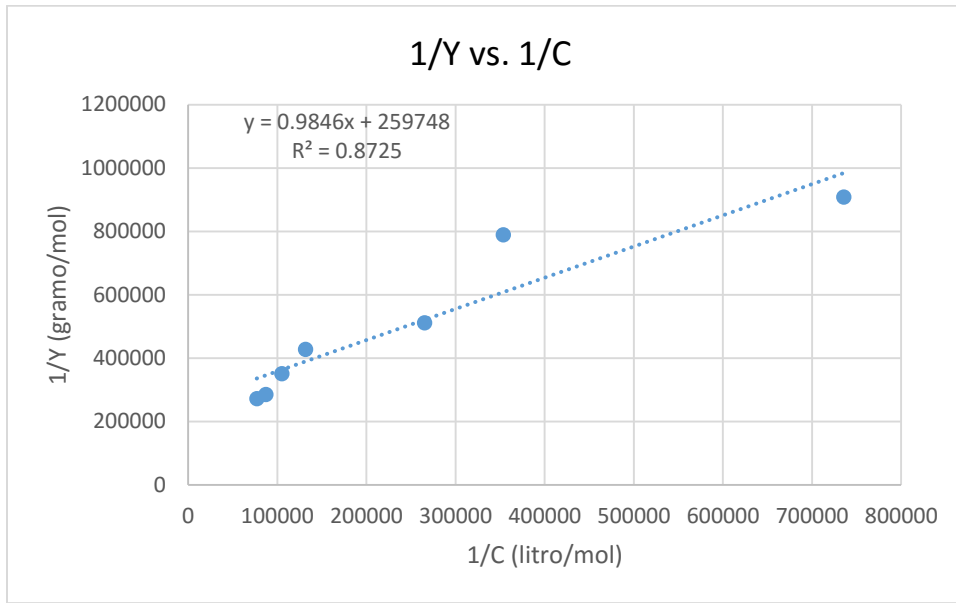


Figura 22. Inverso de Y vs. Inverso de C

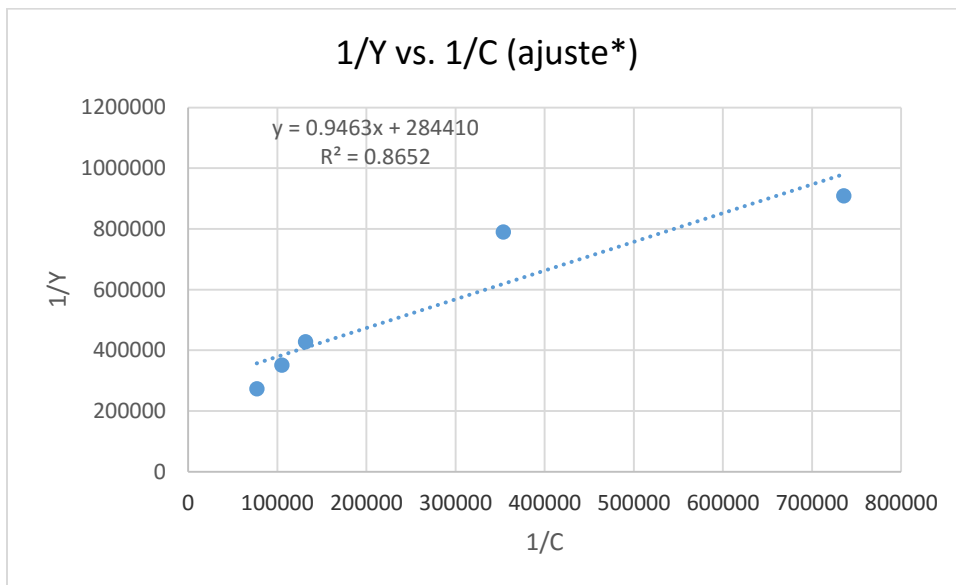


Figura 23. Inverso de Y vs. Inverso de C. * El ajuste lineal se realizó eliminando los puntos de las muestras 3 y 6

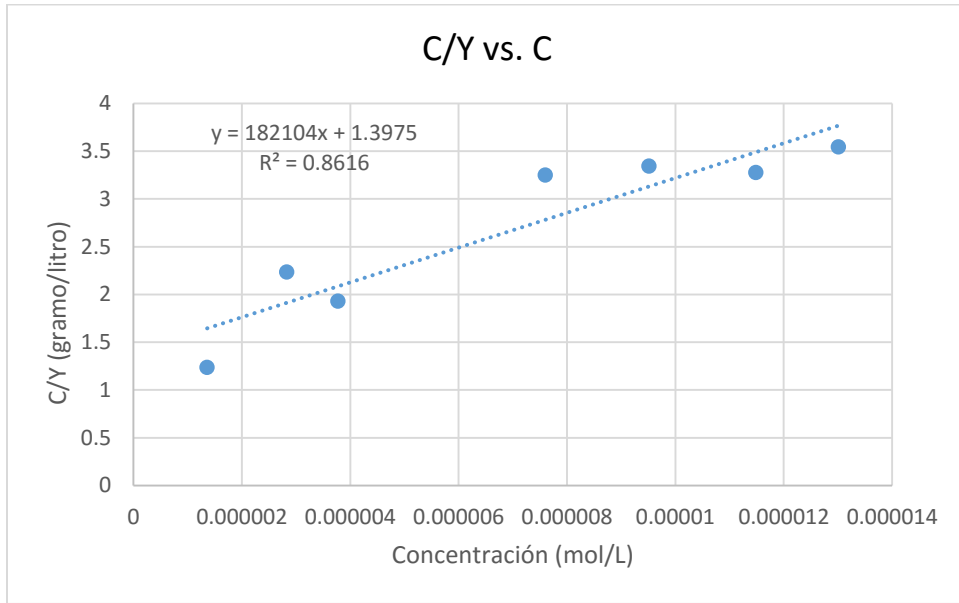


Figura 24. Valor de C/Y vs. C.

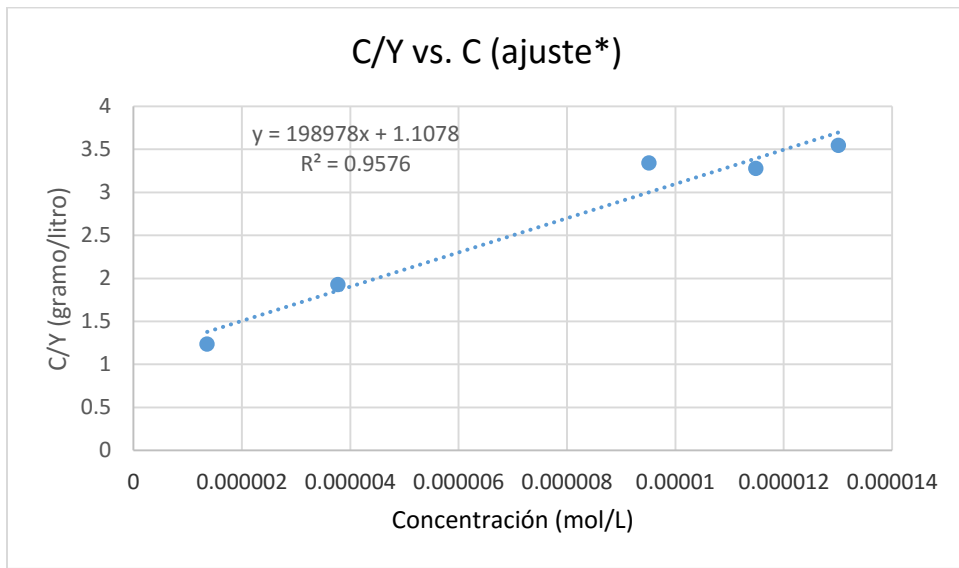


Figura 25. Valor de C/Y vs. C. * El ajuste lineal se realizó eliminando los puntos de las muestras 2 y 4

Observamos que el mejor valor de r^2 lo tiene el modelo de C/Y vs. C, por lo que de esta grafica se obtiene, de la pendiente, el valor de Y_{max} de la siguiente manera:

$$m = \frac{1}{Y_{max}}$$

$$Y_{max} = \frac{1}{198978} = 5.025 \times 10^{-6} \text{ mol/gramo}$$

Una vez obtenido el valor de Ymax, utilizamos 30.0 mg de nanopartículas y las pusimos en contacto con una solución de 5.0 mL de norfloxacin con concentración de 100 µg/mL para cargar la mayor cantidad de fármaco. Este experimento se realizó por triplicado y a continuación se muestran los resultados obtenidos:

Valor de absorbancia del sobrenadante	Concentración del sobrenadante	Concentración adsorbida	Concentración molar	Moles adsorbidos	Valor de Y
0.866	7.25	92.75	2.904×10^{-4}	1.130×10^{-7}	3.766×10^{-6}
0.852	7.13	92.87	2.908×10^{-4}	1.108×10^{-7}	3.693×10^{-6}
0.870	7.29	92.71	2.903×10^{-4}	1.135×10^{-7}	3.783×10^{-6}

Tabla 12. Resultados para el cálculo de mol adsorbidos y valor de Y

Liberación del fármaco adsorbido en las nanopartículas de HAP de la ME3.

La liberación del fármaco adsorbido se llevó a cabo usando las nanopartículas filtradas del proceso de adsorción anterior y estas se pusieron en contacto con 10.0 mL de metanol en agitación y temperatura constante de 37°C por 24 horas. Para separarlas se tomaba 1.0 mL de la muestra, se centrifugaba en tubos Eppendorf a 12000 rpm por 5 minutos y se media el sobrenadante. En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos en cada toma de muestra:

Tiempo (h)	Absorbancia	Factor de dilución de la muestra	Concentración de la muestra (µg/mL)	% de fármaco liberado
1	0.182	5	5.978	6.436
2	0.242	5	8.635	9.297
3	0.353	5	13.551	14.591

4	0.365	5	14.083	15.164
24	0.837	5	34.986	37.67
26	1.172	5	49.822	53.647

Tabla 13. Resultados de la liberación de la norfloxacin adsorbida en las nanopartículas.

A continuación (figura 26) se muestra la gráfica de la liberación de la norfloxacin de las nanopartículas:

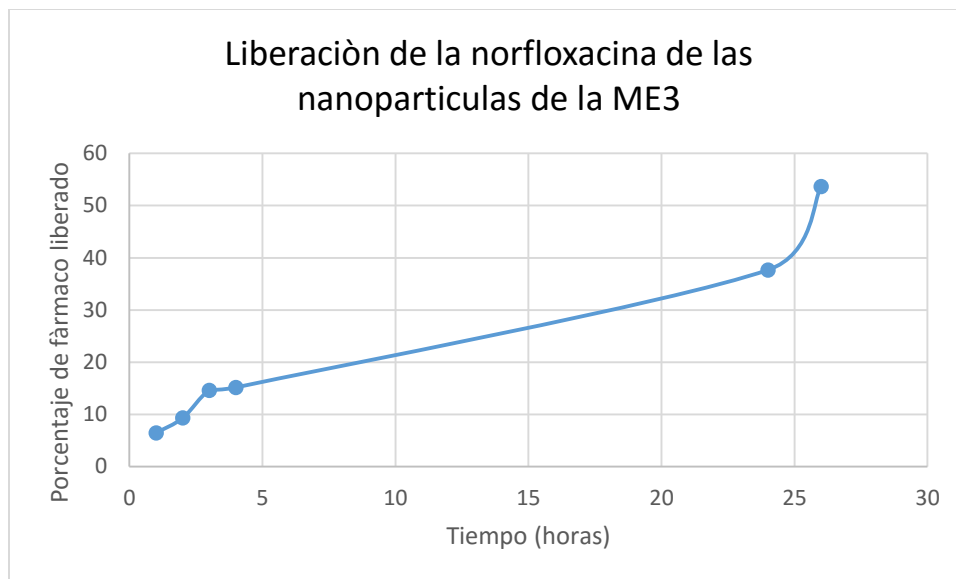


Figura 26. Liberación de la norfloxacin de las nanopartículas de HAP.

Para determinar el orden de reacción de la liberación de la norfloxacin de las nanopartículas de HAP de la ME3 se realizan las gráficas siguientes (figura 27-29):

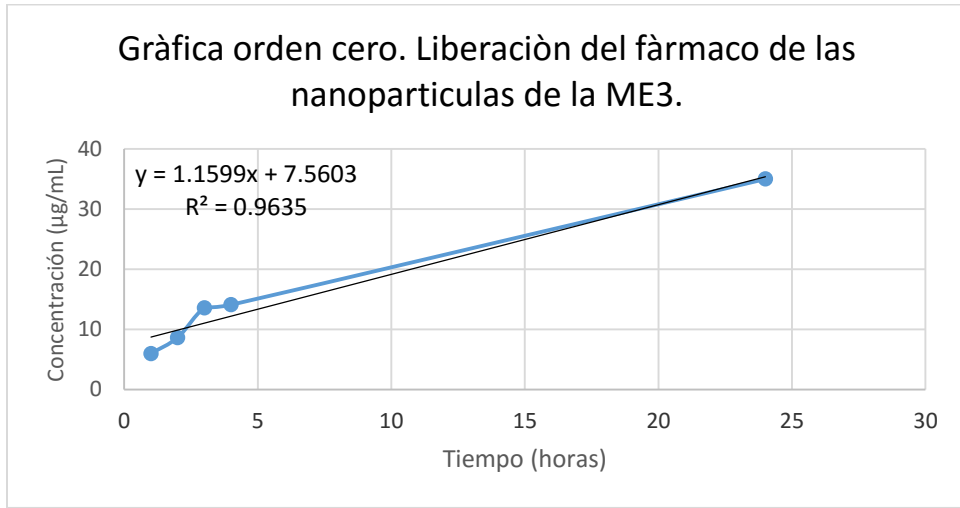


Figura 27. Gráfica orden cero. Liberación del fármaco de las nanopartículas de la ME3.

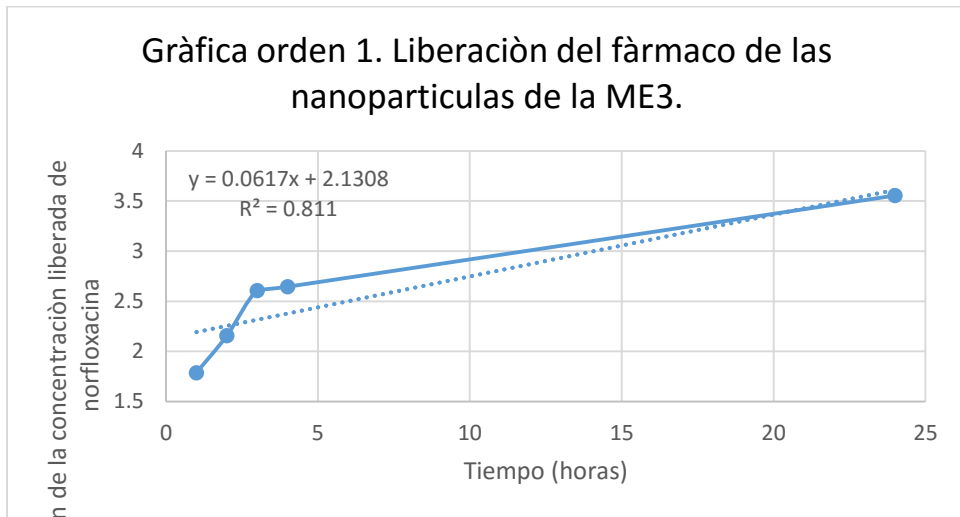


Figura 28. Gráfica orden 1. Liberación del fármaco de las nanopartículas de la ME3.

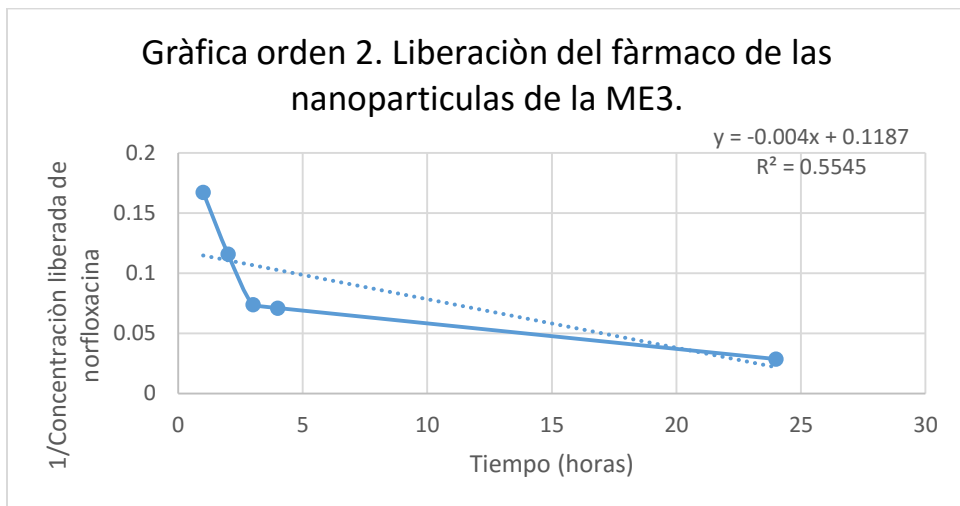


Figura 29. Gráfica orden dos. Liberación del fármaco de las nanopartículas de la ME3.

La pendiente nos proporciona el valor de k, que es una constante de proporcionalidad denominada constante cinética, constante de velocidad o coeficiente de velocidad. k es independiente de la concentración.

En una reacción de orden cero la ecuación diferencial de velocidad es:

$$v = \frac{d[A]}{dt} = k$$
$$\int_{[A_0]}^{[A]} d[A] = \int_0^t k dt$$
$$[A] = [A_0] - kt$$

La representación gráfica de [A] frente a t da una recta de pendiente - k y ordenada en el origen $[A]_0$. Por lo tanto el valor de k es:

$$k = -1.1599 \mu\text{g}/\text{mL}/\text{hora}$$

- Caracterización de las membranas de alginato de calcio.

Las membranas de alginato de calcio se secaron en las siguientes condiciones: la muestra 1, 2, 3 y 4.a se secaron a temperatura controlada de 40 °C y con vacío; las muestras 1, 2, 3 y 4.b se secaron en la liofilizadora a -40 °C con presión de 0.021 mBar por 24 horas. Las siguientes imágenes (figura 30-33) muestran el resultado de los dos procesos de secado para cada muestra:



Figura 30. Membrana con 0.075% de CaCl_2 1.a) secada al ambiente, 1.b) liofilizada.



Figura 31. Membrana con 0.1% de CaCl_2 1.a) secada al ambiente, 1.b) liofilizada.



Figura 32. Membrana con 0.15% de CaCl_2 1.a) secada al ambiente, 1.b) liofilizada.

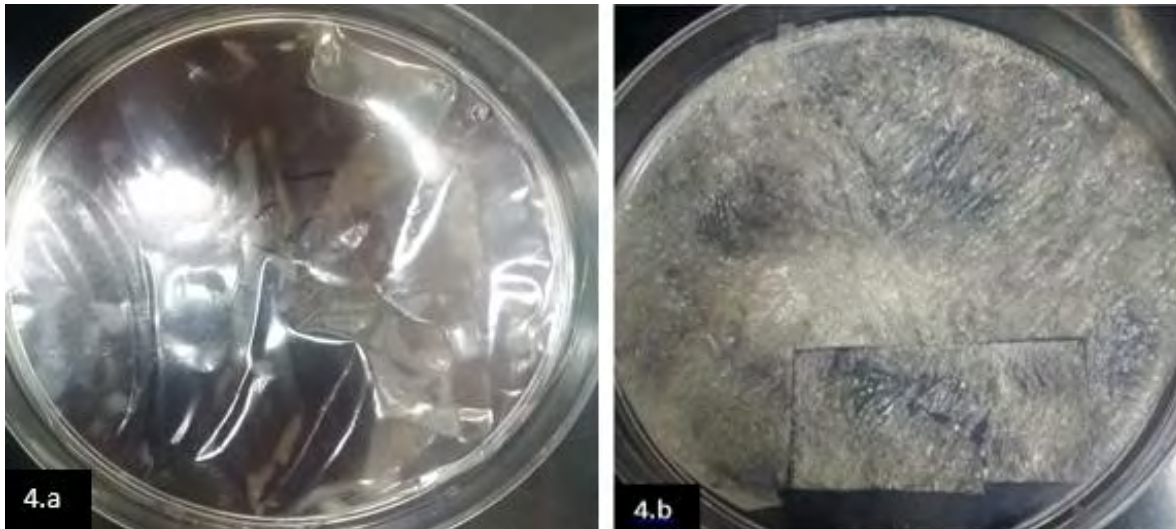


Figura 33. Membrana con 0.2% de CaCl_2 1.a) secada al ambiente, 1.b) liofilizada.

Posteriormente se realizó un corte en la membrana para observar su comportamiento al medio ambiente por una semana y para su posterior análisis en el texturometro. De manera inicial, las membranas se disuelven al contacto con el agua y para evitar que se solubilizaran, las muestras se sumergieron en una solución de cloruro de calcio al 10.0% por 10 minutos y se observó que todas mantenían su estructura después de lavarlas con agua destilada.

Las muestras liofilizadas se observaron al microscopio óptico con aumento de 10X y 40 X. En las siguientes imágenes (figura 34) se muestra lo observado:

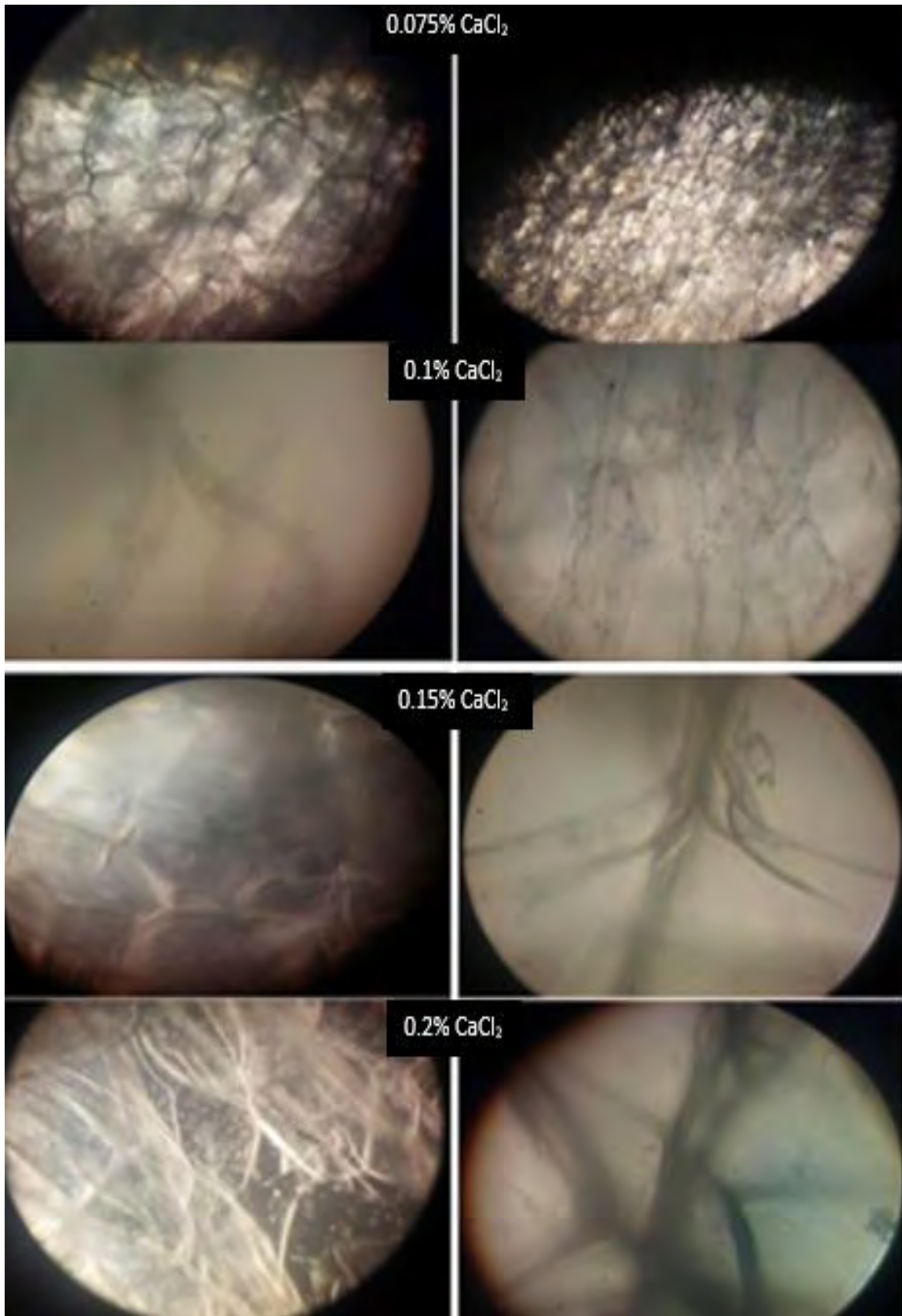


Figura 34. Membranas liofilizadas observadas con microscopio óptico. Las imágenes de la

izquierda muestran las membranas vistas con aumento de 10X y las de la derecha las muestran vistas con aumento de 40X.

Las membranas liofilizadas también se observaron con el microscopio de transmisión electrónica de barrido y las figuras 35, 36, 37 y 38 muestran las imágenes obtenidas:

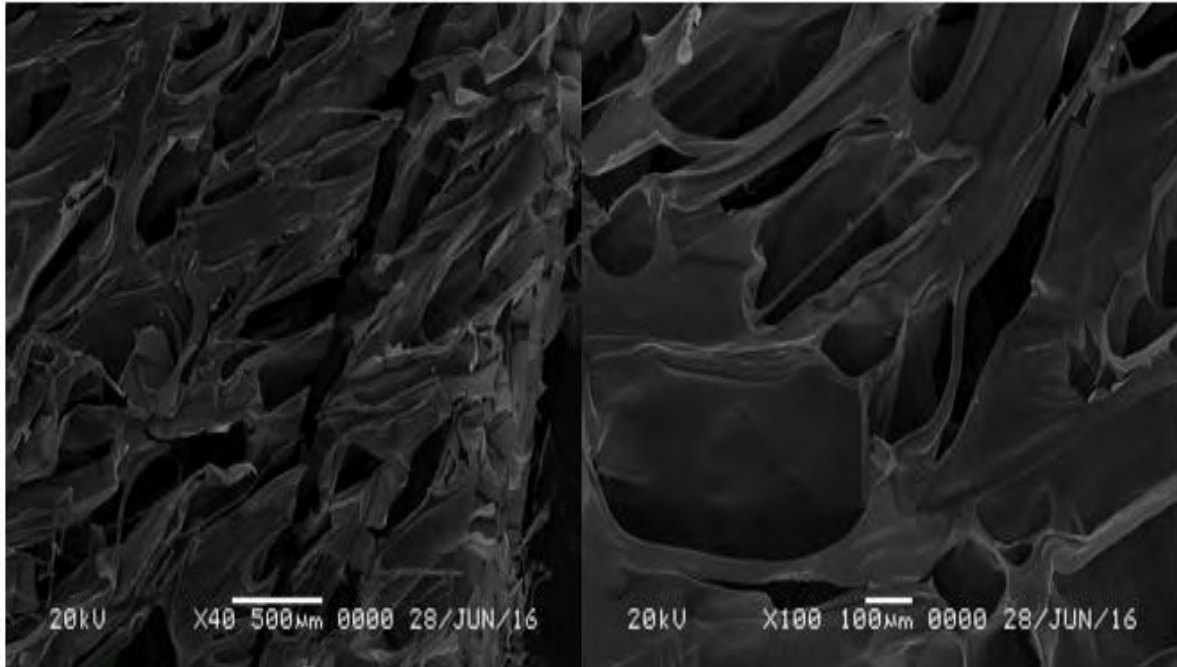


Figura 35. Resultados de análisis por TEM de la membrana 0.075% liofilizada.

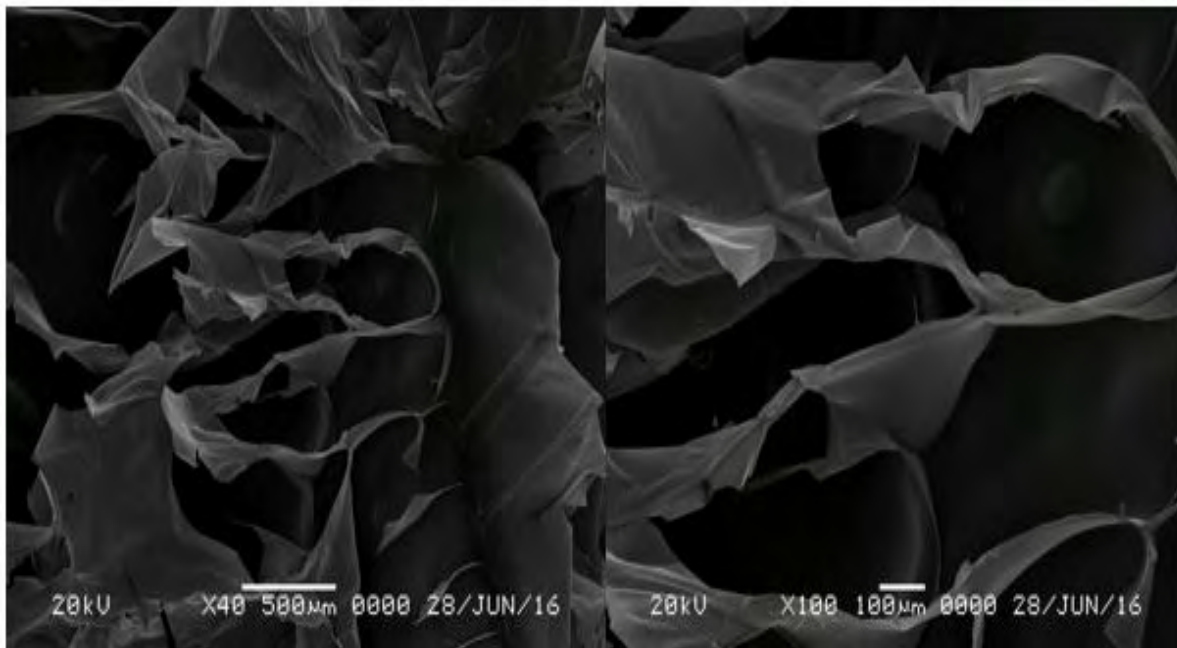


Figura 36. Resultados de análisis por TEM de la membrana 0.1% liofilizada.

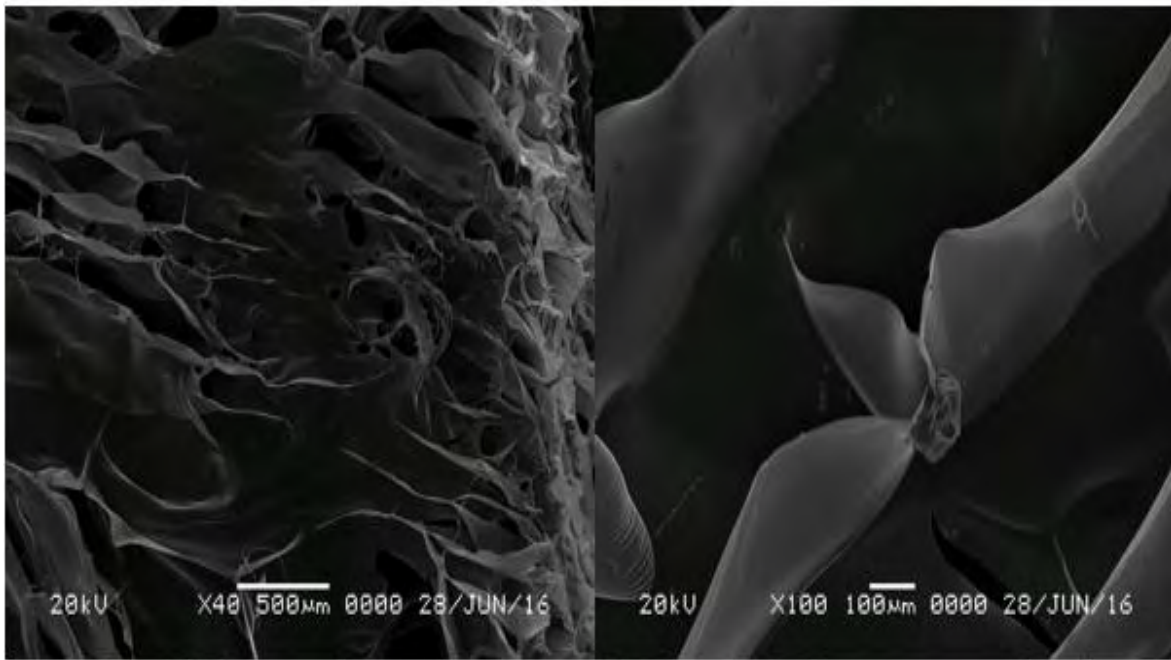


Figura 37. Resultados de análisis por TEM de la membrana 0.15% liofilizada.

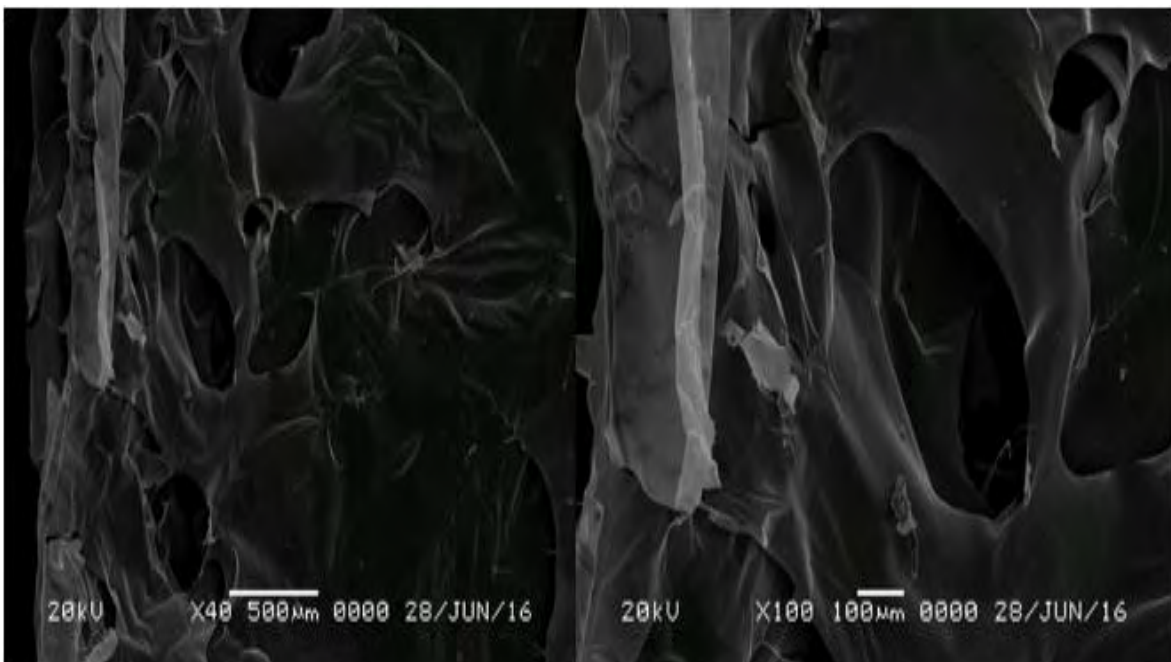


Figura 38. Resultados de análisis por TEM de la membrana 0.2% liofilizada.

- Cálculo del módulo de Young

La ecuación lineal que describe el comportamiento entre γ_v (como variable dependiente) y σ_v (como variable independiente); la pendiente obtenida es E (módulo de Young):

$$\sigma_v = E * \gamma_v$$

Las unidades manejadas son N para la fuerza; mm para los desplazamientos (γ_{ing} y γ_v) y Pa para la tensión.

Para el cálculo del módulo de Young se ocupan sólo los datos obtenidos con comportamiento lineal, estos datos representan alrededor de menos del 10% del desplazamiento total. El cambio de pendiente indica el punto de ruptura de las membranas por el equipo.

De los resultados obtenidos por el texturómetro utilizaremos los valores de carga y desplazamiento. Para un valor obtenido en el estudio de la membrana de alginato de sodio con 0.075% de $CaCl_2$, estos valores son:

Carga (N)	Desplazamiento (mm)
0.64	0.06

Tabla 14. Valores de carga y desplazamiento para un valor dado por el texturómetro.

El desplazamiento debe cambiarse a metros:

$$\frac{1 \text{ metro}}{1000 \text{ milimetros}} * 0.06 \text{ milimetros} = 0.00006 \text{ metros}$$

Para saber el desplazamiento total le sumamos al desplazamiento anterior los dos centímetros establecidos al inicio del experimento:

$$0.00006 \text{ metros} + 0.02 \text{ metros} = 0.02006 \text{ metros}$$

Para obtener el valor de la tensión, dividimos el valor de la carga entre el área transversal de la muestra:

$$\frac{0.64 \text{ N}}{0.04 \text{ m}^2} = 16 \text{ N/m}^2$$

Para saber el porcentaje de la deformación, dividimos el delta de la longitud entre la longitud final:

$$\frac{0.00006 \text{ metros}}{0.02006 \text{ metros}} * 100 \% = 0.29910 \%$$

Finalmente se grafican los datos obtenidos de tensión verdadera contra porcentaje de desplazamiento.

Los resultados de las curvas mecánicas de fuerza de tensión contra la deformación (figura 39-42) muestran la evolución del módulo de Young, en las membrana con alginato de sodio al 2.0% y con variación de cloruro de calcio de 0.075 a 2.0 %, secadas a temperatura ambiente, se puede observar en las gráficas siguientes como a diferente concentración de cloruro de calcio presente, la pendiente de la curva cambia, mostrando las membranas mayor rigidez a mayor concentración de cloruro de calcio.

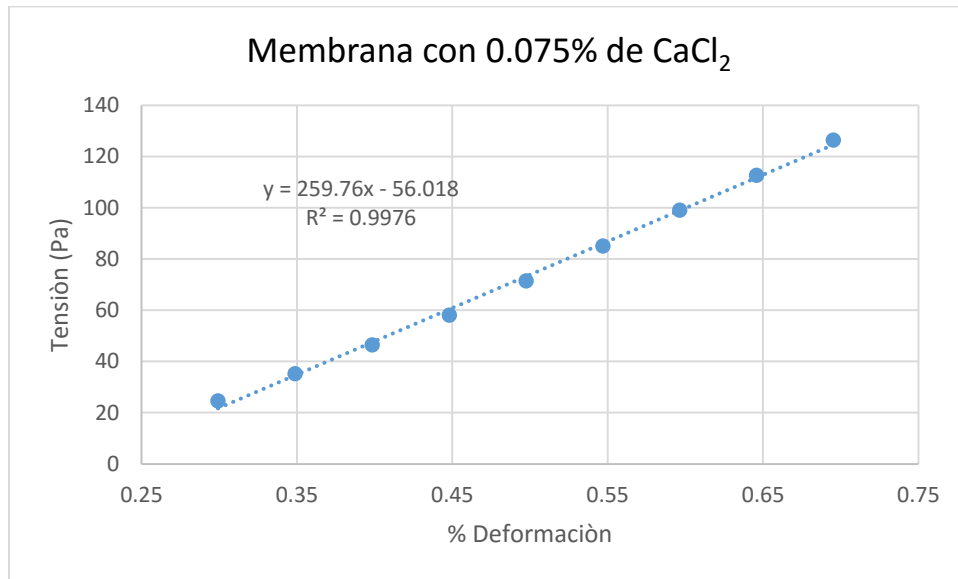


Figura 39. Cálculo de módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.075%

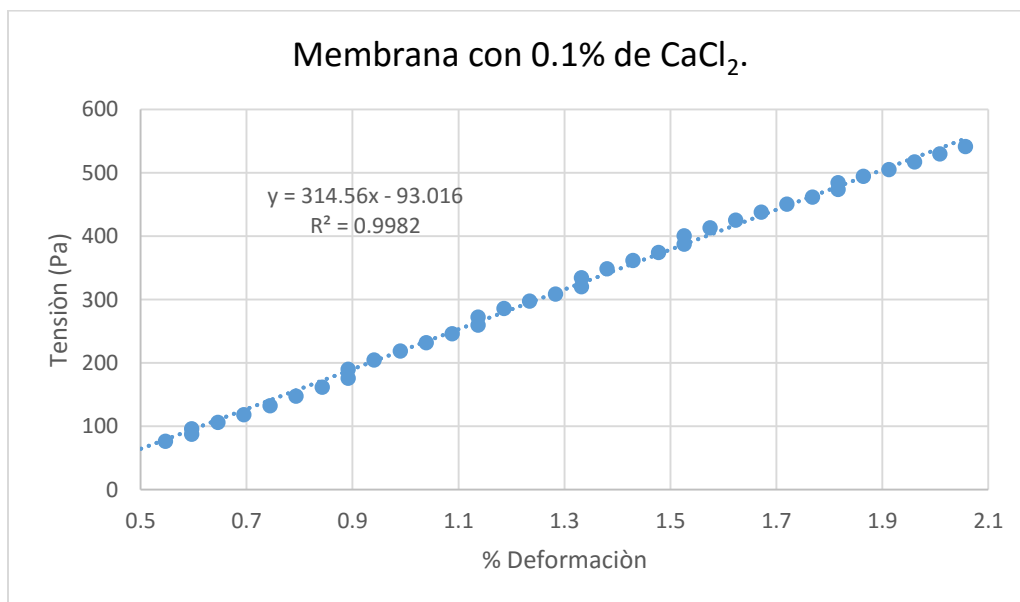


Figura 40. Cálculo de módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.1%

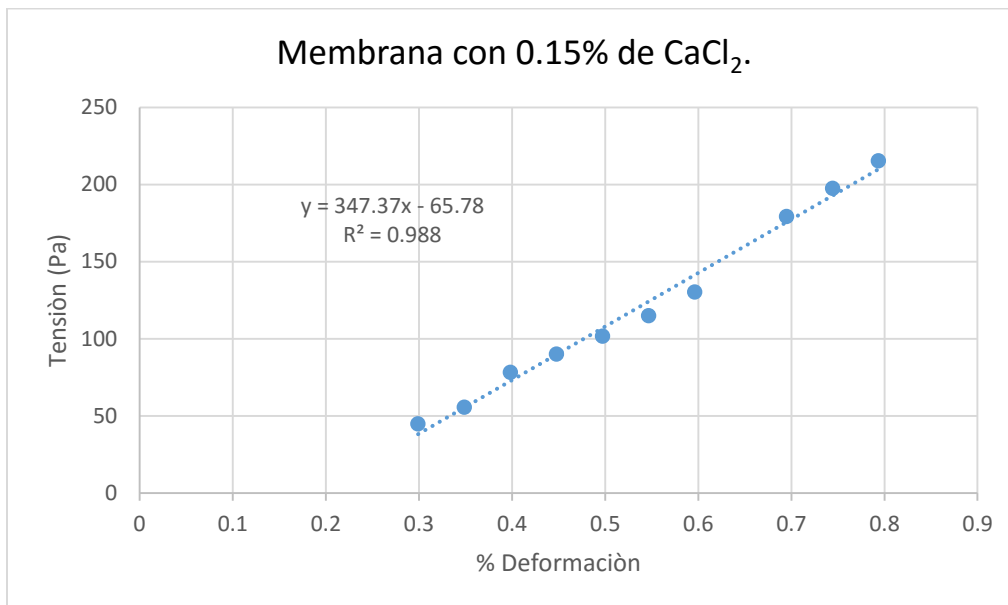


Figura 41. Cálculo de módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.15%

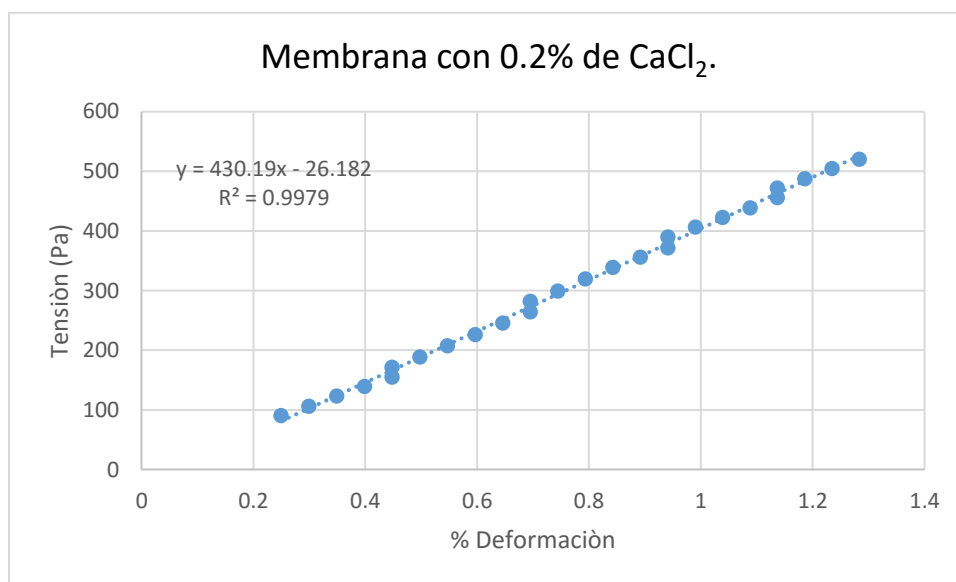


Figura 42. Cálculo de módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.2%

Por otro lado, los resultados de las membranas con alginato de sodio al 2.0% y lavadas con cloruro de calcio al 10.0 %, secadas a temperatura ambiente, presentan curvas de flujo con una rigidez mayor que va incrementando conforma aumenta la concentración de cloruro de calcio (figuras 43-46), es decir, la pendiente de la curva cambia significativamente.

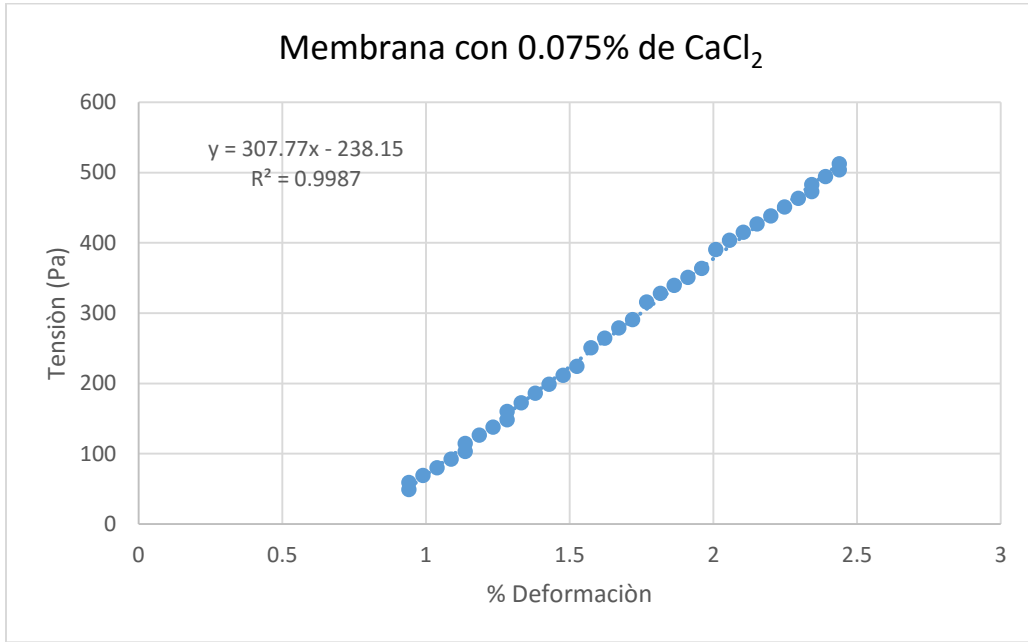


Figura 43. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.075% lavada con solución de CaCl₂ al 10%

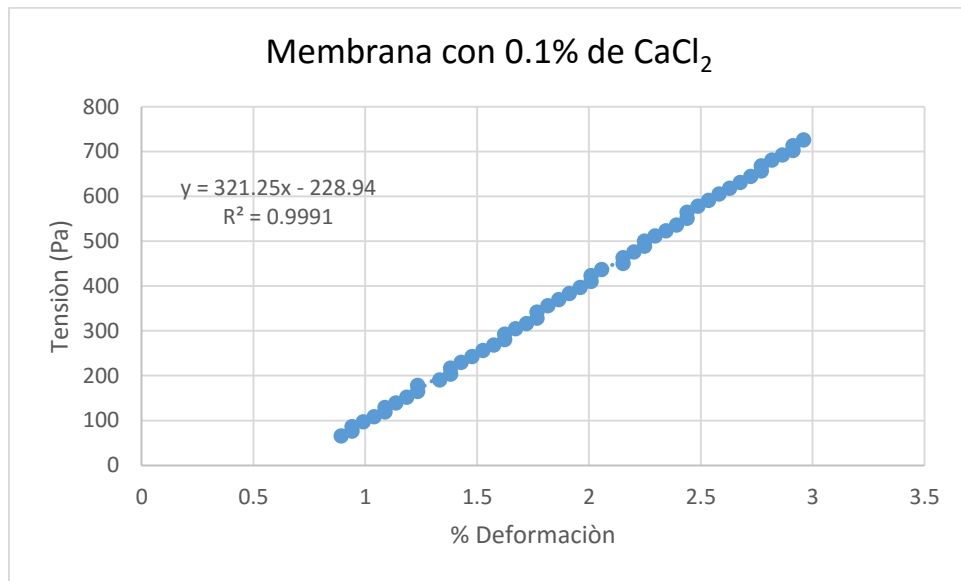


Figura 44. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.1% lavada con solución de CaCl₂ al 10%

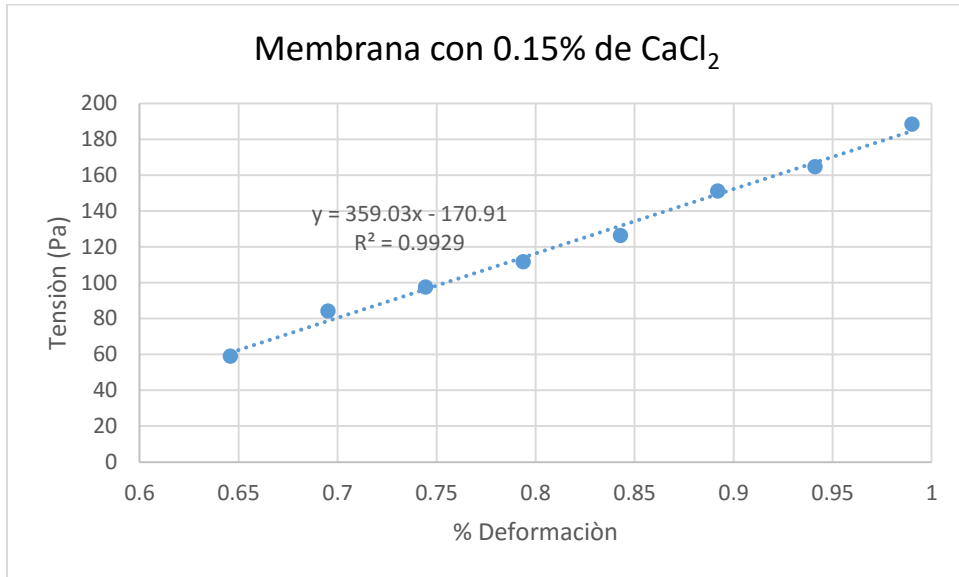


Figura 45. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.15% lavada con solución de CaCl_2 al 10%

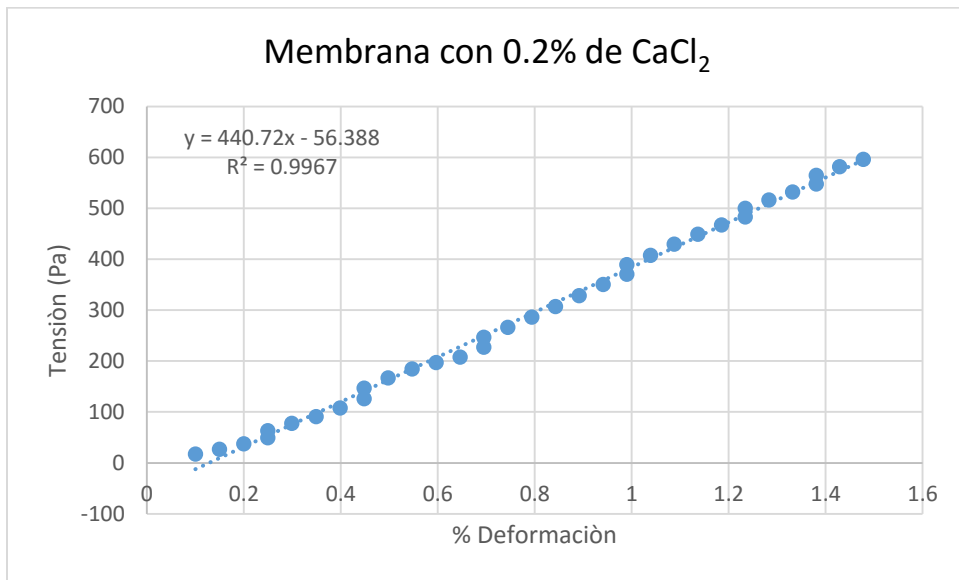


Figura 46. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.2% lavada con solución de CaCl_2 al 10%

Los resultados de las curvas mecánicas de fuerza de tensión contra la deformación en las membrana con alginato de sodio al 2.0% y cloruro de calcio de 0.075 a 2.0% secadas mediante liofilización (figuras 47-50), presentan cambios en su respuesta mecánica, respecto a las anteriores, ya que estas películas son más quebradizas y

frágiles, tal como se observa a diferente concentración de cloruro de calcio la pendiente de la curva cambia, siendo más quebradizas.

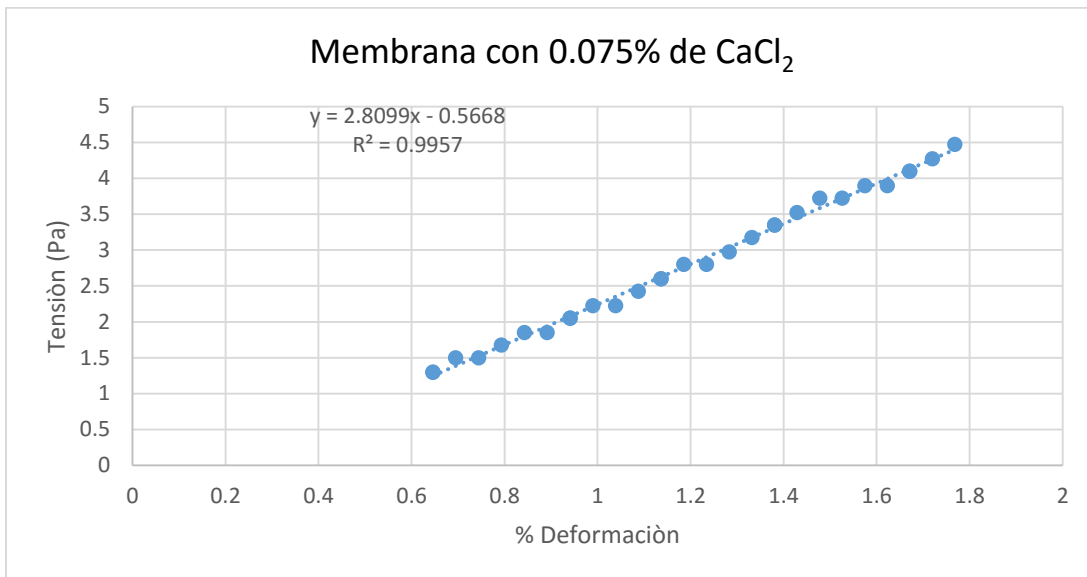


Figura 47. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.075% liofilizada.

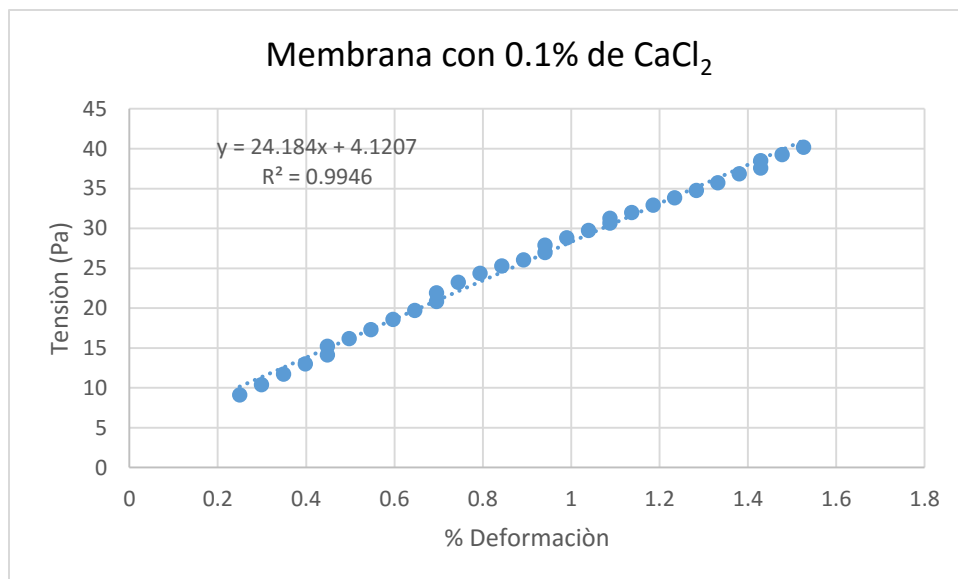


Figura 48. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.1% liofilizada

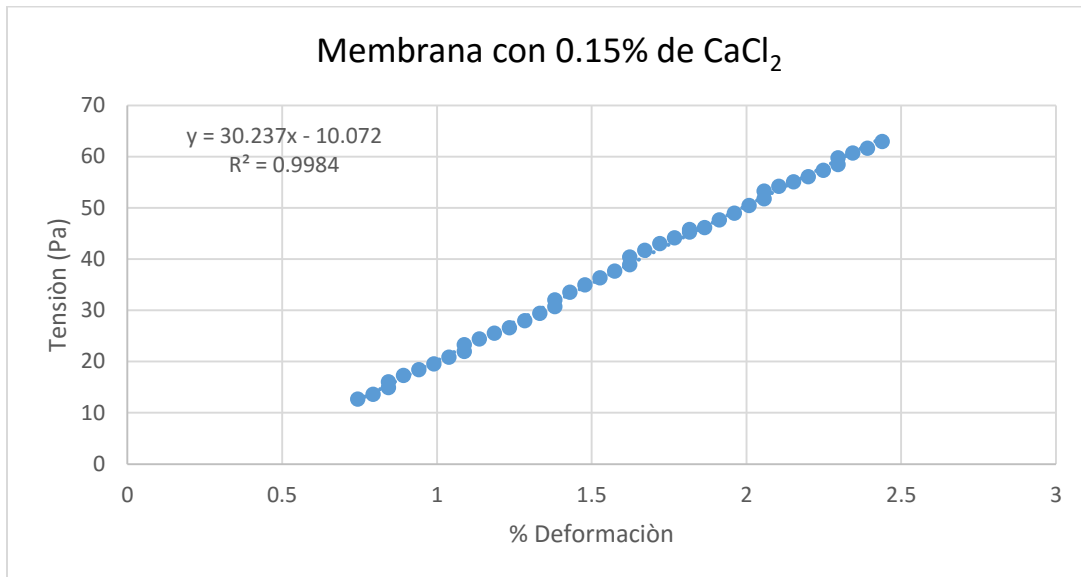


Figura 49. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.15% liofilizada.

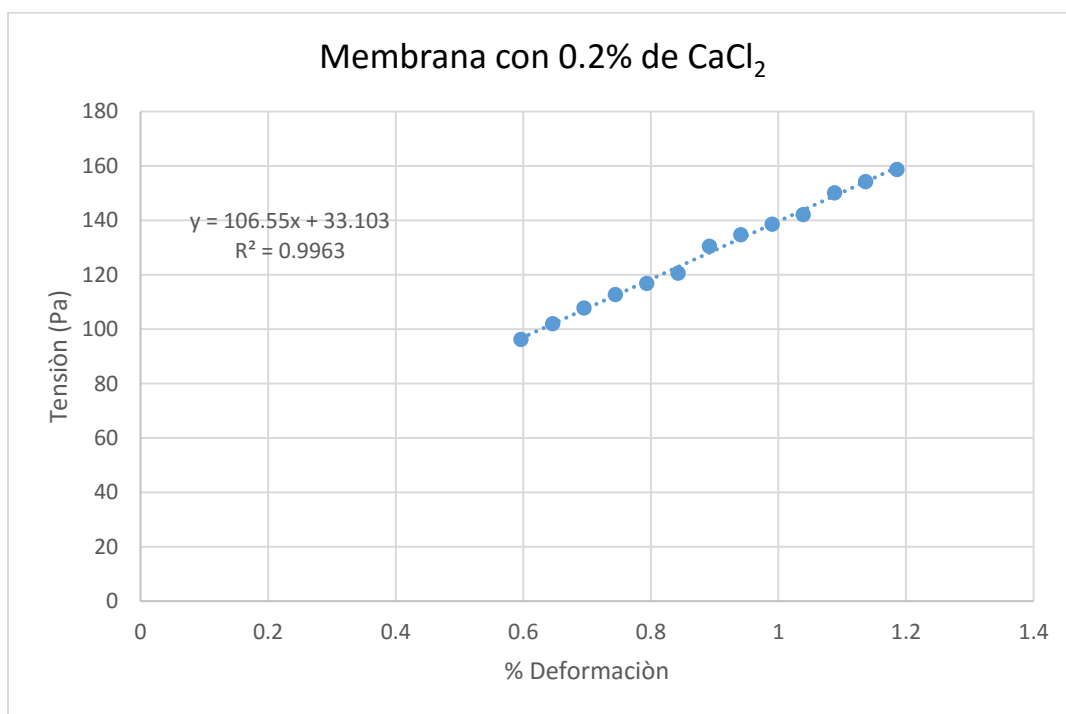


Figura 50. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.2% liofilizada.

Como puede observarse en las figuras 51-54, se presentan cambios en la respuesta mecánica de estas últimas membranas liofilizadas respecto a las anteriores, ya que

estas películas son todavía más quebradizas y frágiles, tal como se observa que a diferente concentración de cloruro de calcio, la pendiente de la curva aumenta.

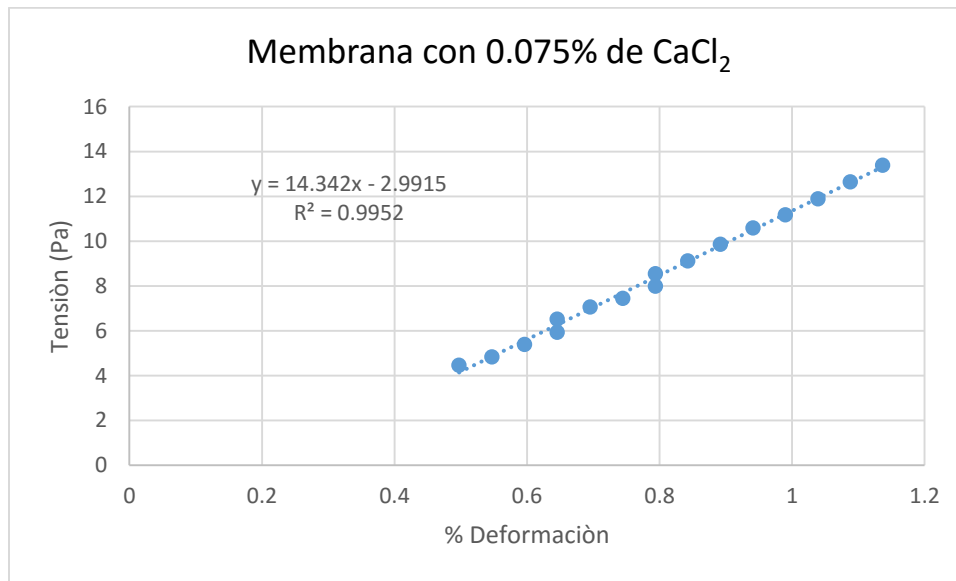


Figura 51. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.075% liofilizada lavada con solución de CaCl_2 al 10%

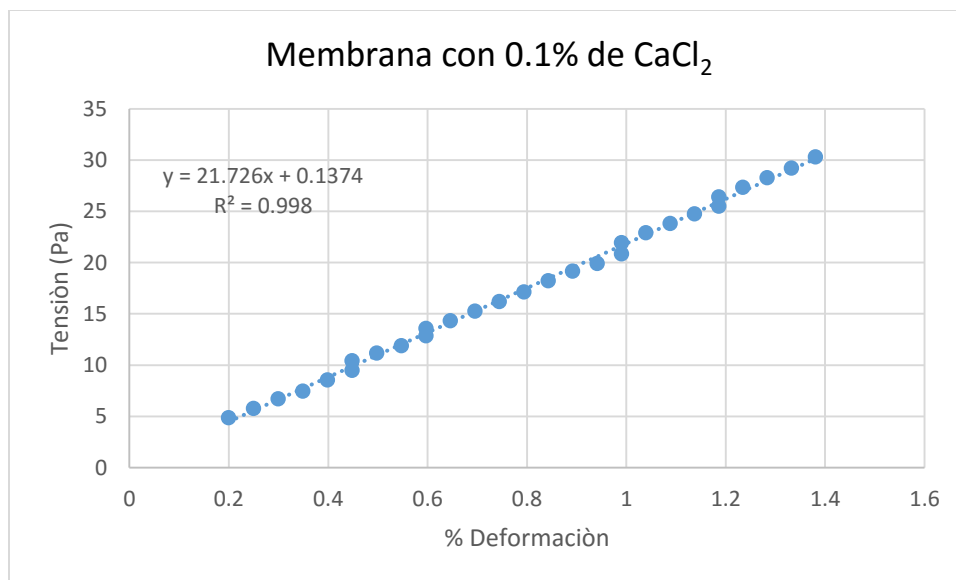


Figura 52. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.1% liofilizada lavada con solución de CaCl_2 al 10%

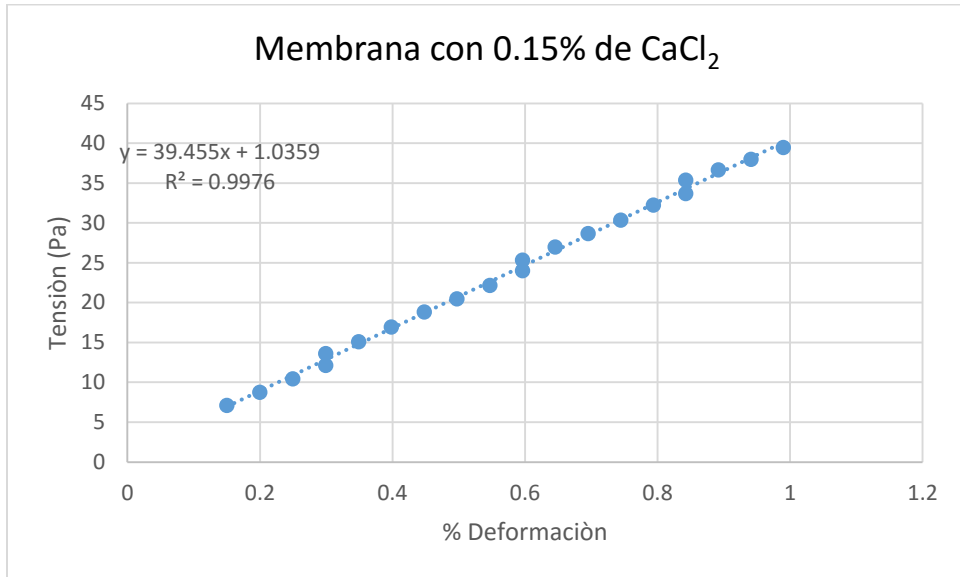


Figura 53. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.15% liofilizada lavada con solución de CaCl_2 al 10%

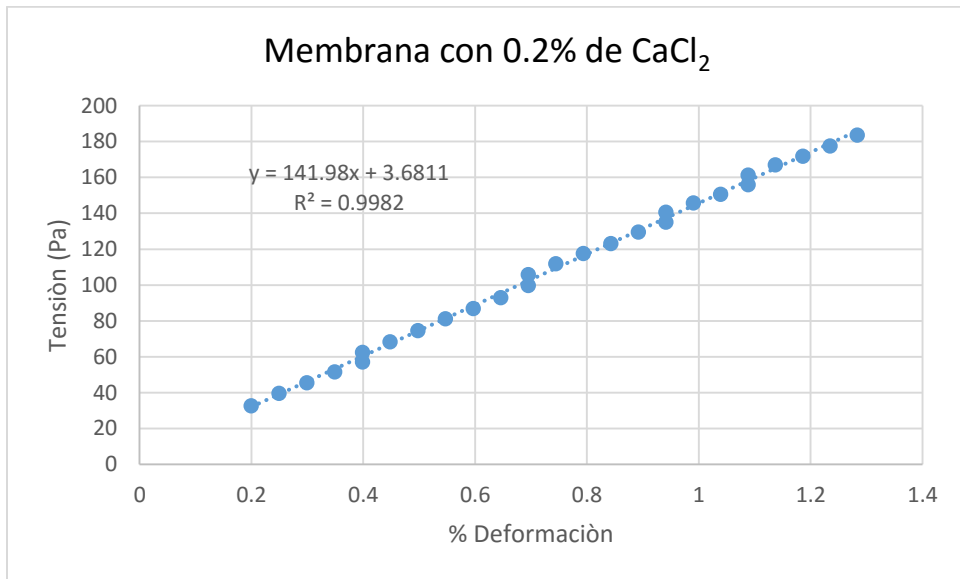


Figura 54. Cálculo del módulo de Young para la membrana con alginato de sodio al 2.0% con cloruro de calcio al 0.2% liofilizada lavada con solución de CaCl_2 al 10%

Para observar mejor el comportamiento de las membranas en cuanto a sus propiedades de rigidez, se observa en las figuras 55-58 una comparación entre los cuatro grupos de membranas del estudio.

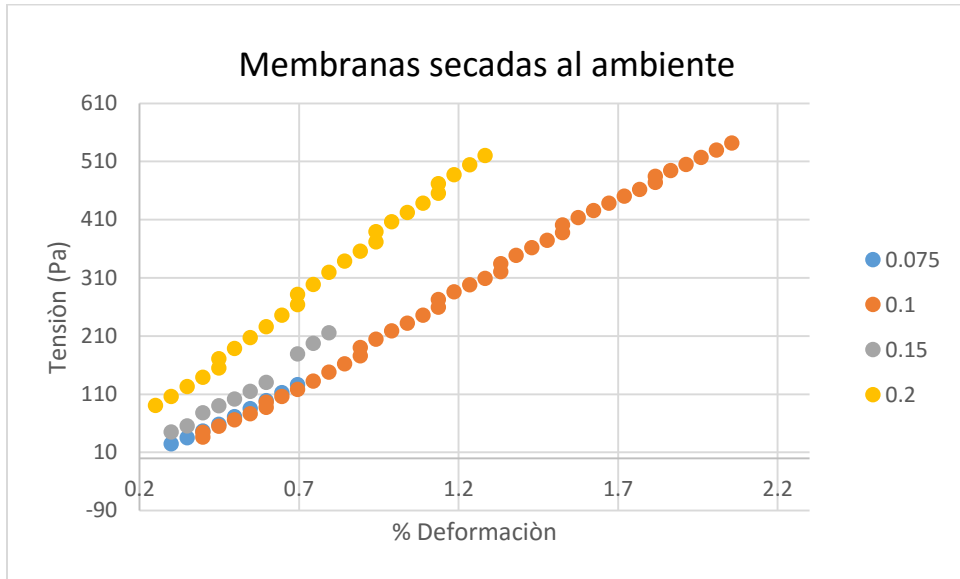


Figura 55. Comparación de los resultados obtenidos para el cálculo del módulo de Young para las cuatro membranas secadas a ambiente.

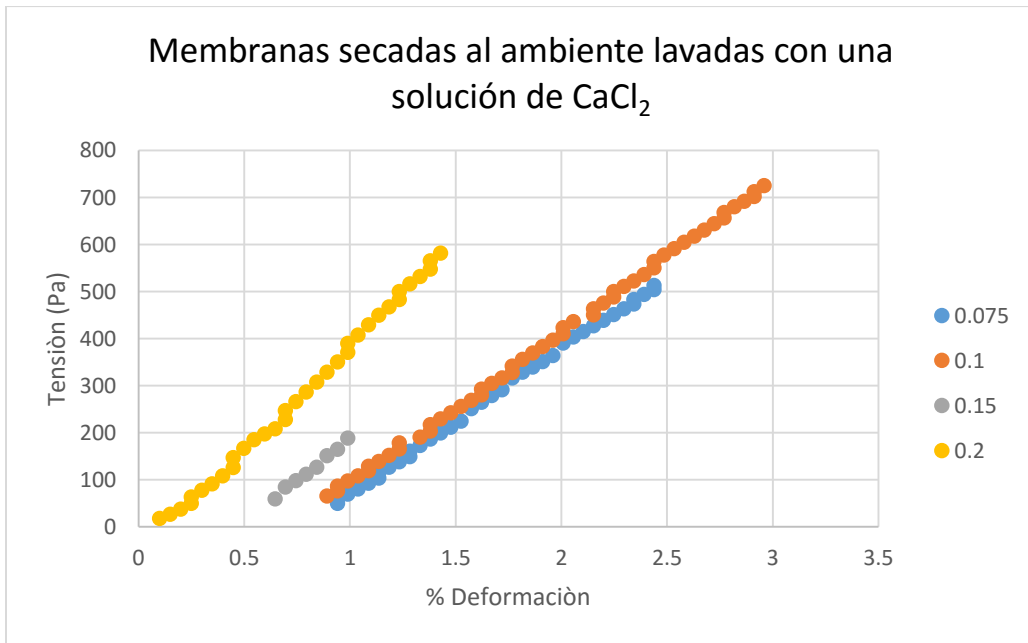


Figura 56. Comparación de los resultados obtenidos para el cálculo del módulo de Young para las cuatro membranas secadas a ambiente y lavadas con una solución de CaCl_2 al 10%

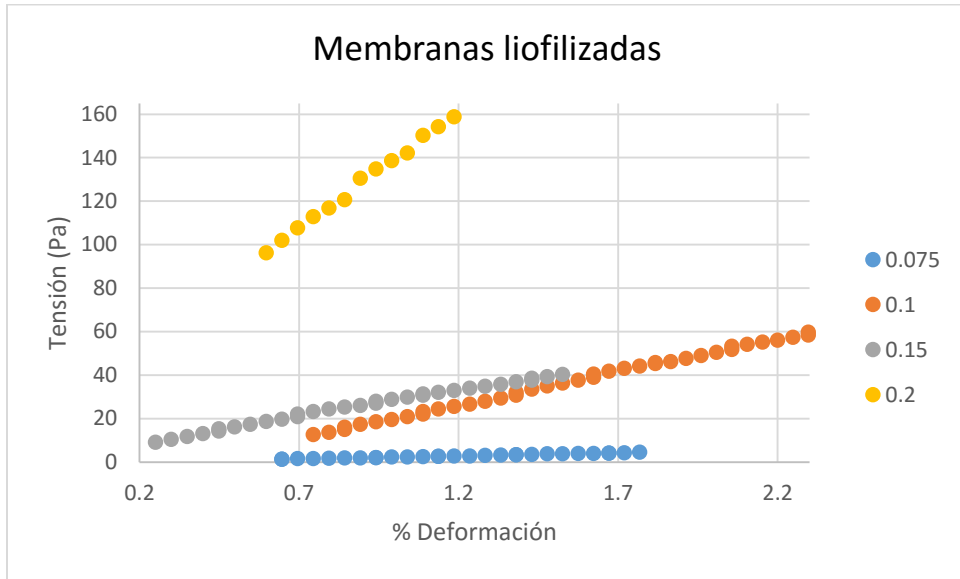


Figura 57. Comparación de los resultados obtenidos para el cálculo del módulo de Young para las cuatro membranas liofilizadas.

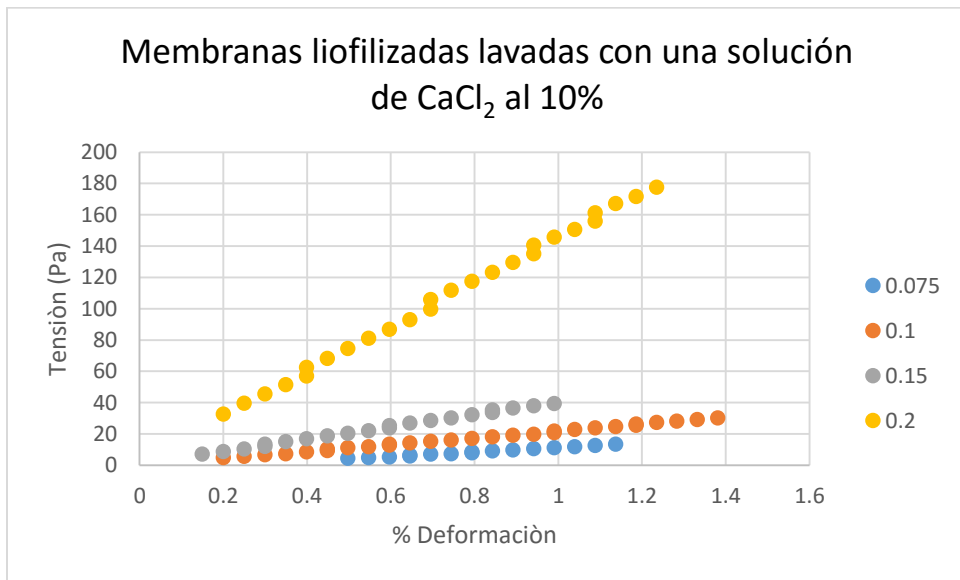


Figura 58. Comparación de los resultados obtenidos para el cálculo del módulo de Young para las cuatro membranas liofilizadas y lavadas con una solución de CaCl₂ al 10%.

En la tabla 15 se resumen los valores del módulo de Young para las 16 membranas estudiadas:

Porcentaje de CaCl_2	Módulo de Young de las Membranas secadas al ambiente (Pa)	Módulo de Young de las Membranas secadas al ambiente lavadas con solución de CaCl_2 al 10% (Pa)	Módulo de Young de las Membranas liofilizadas (Pa)	Módulo de Young de las Membranas liofilizadas lavadas con solución de CaCl_2 al 10% (Pa)
0.075	259.76	307.77	2.8099	14.342
0.1	314.56	321.25	24.184	21.726
0.15	347.37	359.03	30.237	39.455
0.2	430.19	440.72	106.550	141.980

Tabla 15. Valor del módulo de Young para cada membrana.

- Estudio de Porosidad

El estudio de porosidad se realizó por duplicado en cada una de las membranas. A continuación (tabla 16) se muestran los resultados de las membranas secadas al ambiente:

	Membrana con 0.075% de CaCl_2	Membrana con 0.1% de CaCl_2	Membrana con 0.15% de CaCl_2	Membrana con 0.2% de CaCl_2
Muestra seca 1	0.0215 g	0.0153	0.0156	0.0153
Muestra seca 2	0.0216 g	0.0137	0.0215	0.0220
Muestra húmeda 1	0.0363	0.0270	0.0290	0.0321
Muestra húmeda 2	0.0352	0.0238	0.0411	0.0446

Tabla 16. Porosidad en las membranas secadas al ambiente. Pesos de las membranas secas y húmedas.

Para saber el porcentaje de porosidad para la muestra 1 de la membrana con 0.075% de CaCl_2 , realizamos el siguiente cálculo:

$$\% \text{ Porosidad} = \frac{0.0363 \text{ g} - 0.0215 \text{ g}}{0.0215 \text{ g}} * 100 = 68.83\%$$

A continuación los resultados de cada una de las membranas (tabla 17):

	Membrana con 0.075% de CaCl₂	Membrana con 0.1% de CaCl₂	Membrana con 0.15% de CaCl₂	Membrana con 0.2% de CaCl₂
Muestra 1	68.83%	76.47%	82.89%	109.80%
Muestra 2	62.96%	73.72%	91.16	102.72%
Promedio	65.89	75.09	87.02	106.26

Tabla 17. Porcentaje de porosidad en las membranas secadas al ambiente.

En la siguiente tabla 18 se muestran los resultados de las membranas liofilizadas:

	Membrana con 0.075% de CaCl₂	Membrana con 0.1% de CaCl₂	Membrana con 0.15% de CaCl₂	Membrana con 0.2% de CaCl₂
Muestra seca 1	0.1820	0.1060	0.0745	0.0907
Muestra seca 2	0.1638	0.1096	0.0726	0.1483
Muestra húmeda 1	0.5662	0.3989	0.3015	0.4310
Muestra húmeda 2	0.5121	0.4082	0.3074	0.7342

Tabla 18. Porosidad en las membranas liofilizadas. Pesos de las membranas secas y húmedas.

En la tabla siguiente (tabla 19) se muestran los datos del porcentaje de porosidad para ambas muestras de las membranas liofilizadas:

	Membrana con 0.075% de CaCl₂	Membrana con 0.1% de CaCl₂	Membrana con 0.15% de CaCl₂	Membrana con 0.2% de CaCl₂
Muestra 1	211.09%	276.32%	304.69%	375.19%
Muestra 2	212.63%	272.44%	323.41%	395.07%

Promedio	211.86%	274.38%	314.05%	385.13%
-----------------	---------	---------	---------	---------

Tabla 19. Porcentaje de porosidad en las membranas liofilizadas.

- Acoplamiento del sistema híbrido.

Se utiliza la membrana liofilizada con 0.15% de cloruro de calcio debido a que tiene un módulo de Young bajo y una porosidad alta. Para hacer el acoplamiento de la membrana con las nanopartículas de HAP se prepara primero la membrana de alginato de sodio al 2% con la cantidad indicada de CaCl_2 y se vierte en una caja Petri para después agregar las nanopartículas cargadas con el fármaco y finalmente se precongela a -40°C para después liofilizar.

La figura 59 es la obtenida al graficar los resultados de tensión contra deformación obtenidos por dicha membrana:

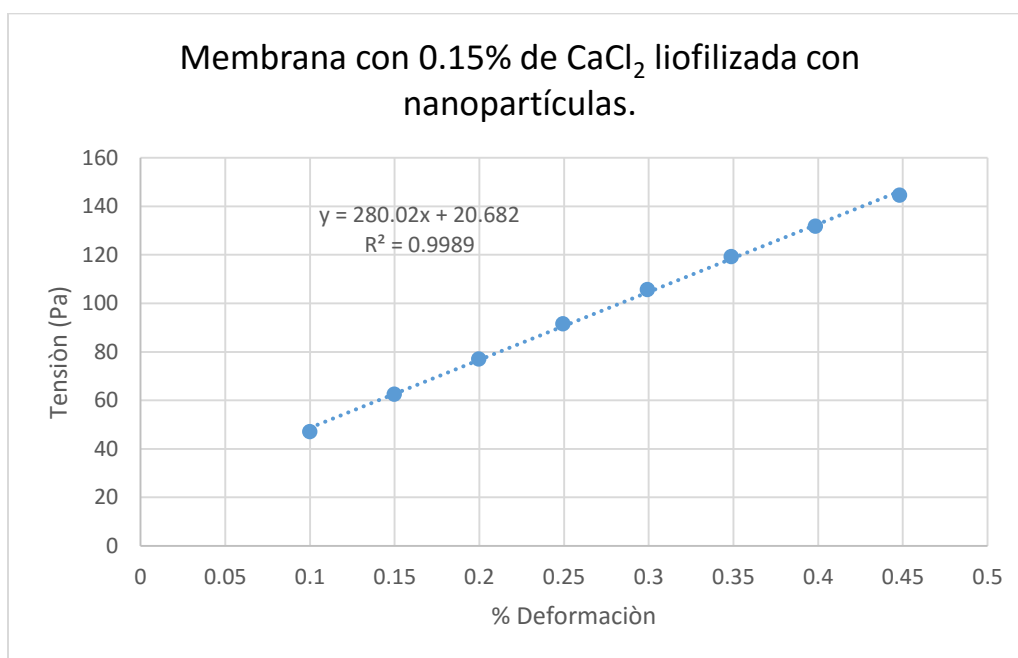


Figura 59. Módulo de Young para la membrana con 0.15% de CaCl_2 con nanopartículas.

Membranas liofilizadas	Módulo de Young (Pa)
Membrana 0.15% de CaCl_2	39.455
Membrana 0.15% de CaCl_2 con nanopartículas	280.02

Tabla 20. Comparación del módulo de Young de la membrana 0.15% de CaCl_2 sin nanopartículas y con ellas.

- Estudio de porosidad en la membrana con nanopartículas.

Muestra	Muestra seca (mg)	Muestra húmeda (mg)	Porcentaje de porosidad.	Promedio (%)
1	58.6	451.1	669.7	688.65
2	45.9	370,7	707.6	

Tabla 21. Porcentaje de porosidad en las membranas con nanopartículas.

\

8. Análisis de resultados.

Caracterización de las microemulsiones.

El valor de la conductividad (tabla 3) es importante debido a que es un valor que nos indica si efectivamente la microemulsión agua/aceite se está formando. Una emulsión fase externa agua (O/W) posee una conductividad relativamente alta (del orden de mS/cm) especialmente si hay electrolitos en su fase externa; mientras que las emulsiones fase externa aceite (W/O) poseen una baja conductividad (en el orden de μ S/cm), como corresponde a la conductividad del aceite.⁵⁰ Esto coincide con los datos obtenidos en el experimento y muestra que efectivamente el agua se encuentra como una fase dispersa en la fase orgánica.

En ninguno de los artículos utilizados para elaborar las microemulsión se dice el tamaño de partícula esperado, sin embargo es importante saber el tamaño para conocer la dimensión aproximada de las nanopartículas que se sintetizaran posteriormente.

Caracterización de las nanopartículas.

El tamaño de las nanopartículas (tabla 4) reportado para la ME1 es de 54-94 nm³¹ y el obtenido por el experimento es de 130.8 nm. Esto puede deberse a la diferencia del proceso de secado de las nanopartículas ya que en el artículo lo hacen por calcinación a 800°C y de manera experimental se secaron con una parrilla de calentamiento a 80°C.

Para las microemulsiones ME2⁴⁵ y ME3⁴⁶ no se reporta en sus respectivos artículos ni su tamaño de partícula ni su potencial Z.

Desde un punto de vista físico, el potencial zeta es el potencial eléctrico en la doble capa interfacial; es decir que es el punto donde se unen la capa difusa y la de Stern.⁵¹

También el potencial zeta es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria unido a la partícula dispersada. Este valor puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial, no pueden medirse en los fluidos. La importancia del potencial zeta es: que su valor puede estar relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales. El potencial zeta indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión.⁵¹

Para las moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeñas, un alto potencial zeta le confiere estabilidad, es decir, la solución o dispersión se resistirá a la agregación.⁵¹

Cuando el potencial es bajo, se tiene atracción entre las partículas, se supera a la repulsión y se forman flóculos, en lugar de dispersión. Por lo tanto, los coloides de alto potencial zeta se estabilizan eléctricamente, mientras que, los coloides con bajos potenciales zeta tienden a coagular o flocular.⁵¹

En la tabla 4 podemos observar que el potencial Z de las nanopartículas es muy pequeño por lo que, basado en la información anterior, estas tenderán a juntarse, esto fue especialmente problemático al momento de medir el tamaño de partícula ya que el equipo utilizado no tiene una función de agitación constante y por esto el equipo medía las partículas solas y las partículas en cúmulos, dando resultados variables. El ángulo adoptado por las nanopartículas al pasar por el láser también afecta dicha medición, ya que el equipo podía medirlas a lo largo, ancho o alto.

- Análisis por IR.

En cuanto al análisis de IR mostrado en la figura 4, observamos dos picos característicos alrededor de 523 cm^{-1} y 577 cm^{-1} , y otros dos alrededor de 1055 cm^{-1} y 1137 cm^{-1} que corresponden al grupo PO_4^{3-} , esto indica la presencia de hidroxiapatita. Vemos otros dos picos alrededor de 874 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} correspondientes al grupo HPO_4^{2-} , lo que nos indica que hay brushita en la muestra (isoforma de la hidroxiapatita). La señal observada alrededor de 1600 cm^{-1} pertenece al grupo OH. Finalmente se ve una señal amplia entre $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ que indican presencia de agua en la muestra. Esto mismo se observa en las figuras 5 y 6.⁸

- Análisis por difracción de rayos X de polvos.

Observamos en la figura 7, correspondiente al análisis de DXP, que en la ME1 hay presencia de brushita principalmente con señales características en 12° , 21° , 23.9° , 29.3° , 30.5° , 34.5° , 36.2° y se percibe una señal en 26.9° y una señal ligera a 33° características de la hidroxiapatita. En la figura 8 correspondiente a la ME2 vemos una mayor presencia de hidroxiapatita con señales claras en 26.9° y 33° . El contenido de brushita en esta ME es evidente con señal a las mismas temperaturas que la anterior. Finalmente en la figura 9.a correspondiente a la ME3 observamos presencia también tanto de brushita como de hidroxiapatita con señales a las temperaturas antes indicadas. Estos señales pueden observarse de manera más clara en los análisis de difracción de rayos X por separado de la brushita y la hidroxiapatita (figura 9.b) que confirman la presencia de ambos compuestos en las tres muestras de estudio., Una alta intensidad y definición en las señales nos indica una alta naturaleza cristalina de las nanopartículas, por lo que la señal de 12° correspondiente a brushita nos indica que es de alta cristalinidad.⁸

- Análisis por microscopía de transmisión electrónica (TEM).

Para la caracterización por TEM, está reportado que una amplia variedad de morfologías pueden encontrarse en la síntesis de nanopartículas. Puede ser nanoesferas (25-40 nm de diámetro) o similar a una lámina (3-16 nm de ancho y 50-300 nm de longitud), en forma de varilla (10-17 nm de diámetro y 24-50 nm de longitud) y en forma de aguja (4-8 nm de diámetro y 80-100 nm de longitud).⁵² Esto coincide con lo observado en la figura 10 de la ME1 que muestran forma de aguja y un tamaño de 130 nm; y en la figura 11 de la ME2 parecen varillas (estructura más corta y más ancha) con un tamaño de 17.7 nm. En la figura 12 de la ME3 no es sencillo visualizar una morfología específica, sin embargo se puede decir que son nanopartículas con una morfología más esférica, cuyo tamaño también coincide con el esperado (39.22nm).

- Análisis térmico. Calorimetría diferencial de barrido.

Con respecto a la figura 13, son evidente en las tres muestras dos picos endotérmicos, uno alrededor de 140 °C y otro más definido a 190 °C. El primero corresponde a la evaporación del agua de cristalización de la brushita y el segundo a la deshidratación total de la misma, asociado con una transición de fase del cristal y su completa transformación a monetita, según la reacción:



Se seleccionó la microemulsión 3 (agua/heptano/TX100/butanol) para realizar los estudios posteriores de adsorción y liberación del fármaco, y el acoplamiento en una membrana orgánica. Esta selección se hizo debido a que en los resultados de TEM podemos observar una morfología más esférica, lo que nos da un área superficial más uniforme y debido a que contiene hidroxiapatita y brushita en cantidades similares de acuerdo al análisis por DXP, lo que nos brinda los beneficios de tener una mayor fuerza de carga, que proporciona la HAP y una mejor eliminación, que proporciona la brushita. Además en esta microemulsión se observa el mayor rendimiento de la reacción entre el fosfato dibásico de sodio anhidro y el cloruro de calcio dihidratado, como se indica en la tabla 4.

Repetibilidad de la técnica.

- Análisis por IR.

En la figura 14 observamos dos picos característicos alrededor de 523 cm^{-1} y 577 cm^{-1} , y otros dos alrededor de 1055 cm^{-1} y 1137 cm^{-1} que corresponden al grupo PO_4^{3-} , esto indica la presencia de hidroxiapatita. Vemos otros dos picos alrededor de 874 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} correspondientes al grupo HPO_4^{2-} , lo que nos indica que hay brushita en la muestra (isoforma de la hidroxiapatita). La señal observada alrededor de 1600 cm^{-1} pertenece al grupo OH^- . Finalmente se ve una señal amplia entre $3400\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$ que indican presencia de agua en la muestra. Estas observaciones coinciden con las obtenidas en el estudio anterior por IR de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 3.

- Análisis de DXP

Observamos en la figura 15 que hay presencia de brushita (señales características en 12°C , 21°C , 23.9°C y 29.3°C) y una señal ligera a 33° característica de la hidroxiapatita.

- Análisis por TEM.

La micrografía (figura 16) nos muestra que la morfología de las nanopartículas obtenidas a partir de la microemulsión 3 es esférica, lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente.

- Análisis térmico.

Respecto a la figura 17, vuelven a ser evidentes dos picos endotérmicos, uno alrededor de 140°C y otro más definido a 190°C . El primero corresponde a la evaporación del agua de cristalización de la brushita y el segundo a la deshidratación total de la misma, asociado con una transición de fase del cristal y su completa transformación a monetita.

Finalmente en los estudios realizados para observar la reproducibilidad de la técnica podemos ver que todos coinciden con los resultados obtenidos previamente, lo que muestra que la metodología para obtener las nanopartículas de HAP es consistente.

Adsorción de norfloxacin en las nanopartículas de HAP.

- Isoterma de adsorción.

Para obtener el valor de Y_{max} se realizó un ajuste lineal Isoterma de Langmuir (figura 22-25) y observamos que el valor de r^2 es mejor en este ajuste, lo que implica que la adsorción se da en monocapa, lo que significa que la cantidad adsorbida aumenta hasta alcanzar un valor límite correspondiente al recubrimiento de la superficie por una monocapa. Es la isoterma característica de un proceso únicamente de quimisorción.

Al realizar la adsorción del fármaco en mayor cantidad observamos en la tabla 12 que el valor de Y de las tres muestras es inferior al valor de Y_{max} determinado anteriormente, lo que nos indica que el valor obtenido de ese estudio es correcto.

Liberación del fármaco adsorbido en las nanopartículas de HAP de la ME3.

En el estudio de liberación observamos en la figura 26 que la norfloxacin se libera de manera muy lenta de las nanopartículas, esto se debe principalmente a que la norfloxacin tiene baja solubilidad en el metanol. No podría atribuirse este hecho a una afinidad del fármaco por las nanopartículas debido a que estas son neutras. Observamos que después de 24 horas se ha liberado menos del 50% del fármaco adsorbido, por lo que podemos deducir que podría ser una opción para el diseño de una forma farmacéutica de liberación modificada.

Observamos en las siguientes tres graficas (figura 27, 28 y 29) que el mejor valor de r^2 es el correspondiente a la gráfica de orden cero, lo que implica que la velocidad de reacción es independiente de la concentración de reactivos.

Caracterización de las membranas de alginato de calcio.

- Morfología por microscopio óptico y por SEM

En la figura 30, 31, 32 y 33 se observa cómo el proceso de secado afecta considerablemente la morfología de las membranas. Mientras que en las membranas secadas al ambiente se observan membranas transparentes y muy delgadas, en las membranas liofilizadas vemos que son más gruesas y más porosas. Esta porosidad puede apreciarse de manera superficial en la figura 34, donde se observan poros al visualizar las membranas liofilizadas al microscopio óptico, aunque el mismo grosor de las membranas impide el paso de la luz lo que hace que no se aprecien bien los poros. Sin embargo estos poros pueden verse con mayor claridad en las figuras 35, 36, 37 y 38, en donde se analizan las membranas por SEM.

- Cálculo del Módulo de Young.

La rigidez de las membranas se obtuvo mediante el módulo de Young (E), un parámetro que indica la capacidad de deformación de un material cuando a éste se le aplica determinada tensión. Entre más pequeño sea, significa mayor grado de elasticidad. Se observa en la tabla 15 que en ambos tipos de membranas el módulo de Young se hace más grande después de lavarlas con la solución de CaCl_2 en todas las muestras. En el caso de las membranas secadas al ambiente se observa que el módulo de Young es elevado y va en crecimiento conforme aumenta el porcentaje de CaCl_2 presente en la muestra. Sin embargo, las membranas secadas al ambiente con 2% de CaCl_2 son demasiado rígidas, por lo que al aplicar la fuerza de tensión en vez de romper la membrana lo que se observa es un desplazamiento. Esta medición resulta inexacta, pero no pudo obtenerse un resultado más fiable debido a que si se apretaban más las mordazas el texturómetro marcaba un error o se observa cizallamiento en los bordes.

En el caso de las membranas liofilizadas se ve que el módulo de Young es considerablemente más bajo que en las membranas secadas al ambiente lo que implica que estas son más flexibles.

- Estudio de porosidad.

En el estudio de porosidad (tabla 17 y tabla 19) puede verse que las membranas secadas al ambiente tienen baja porosidad, esto debido principalmente a la forma de secado, pero la porosidad aumenta conforme aumenta la cantidad de CaCl_2 presente en la membrana. En el caso de las membranas liofilizadas se ve que estas, al mantener la estructura durante el proceso de eliminación de agua presentan una mayor porosidad. De igual manera que en las membranas secadas al ambiente, la porosidad aumenta conforme aumenta la cantidad de CaCl_2 presente en la membrana

Acoplamiento del sistema híbrido.

- Módulo de Young.

Para el cálculo del módulo de Young del sistema híbrido se ve que este valor aumenta en comparación con el valor obtenido por la membrana que no contiene nanopartículas (tabla 20). Sin embargo el valor no es excesivamente grande lo que implica que la membrana, aunque se vuelve más rígida, es aun lo suficientemente flexible para poder trabajar con ella. Este aumento en la fragilidad de la membrana se debe a que las nanopartículas se intercalan en la estructura de la membrana

volviendo su posición en un punto de ruptura al momento de aplicar la fuerza con el equipo.

En la figura 59 podemos observar que el valor del módulo de Young para la membrana con nanopartículas aumenta en comparación a la misma membrana sin nanopartículas, sin embargo el incremento no es exagerado, lo que significa que la membrana con nanopartículas no es tan flexible como la membrana sin ellas pero sigue siendo lo suficientemente elástica como para continuar trabajando con ella.

- Estudio de porosidad.

En cuanto a la porosidad en la membrana con nanopartículas (tabla 21) se puede ver que la porosidad se duplica. Esto se puede deber a que las nanopartículas también toman agua del medio haciendo que la captación de esta aumente.

Haciendo un pequeño análisis del estudio de porosidad y del cálculo del módulo de Young de las membranas, tanto de las secadas al ambiente como de las liofilizadas en sus ambas formas (solas y lavadas con solución de CaCl_2), se concluye que la mejor membrana para realizar los estudios en cultivos celulares es la membrana con 0.15% de CaCl_2 lavada con una solución de CaCl_2 , debido a que tiene un valor del módulo de Young bajo y un porcentaje de porosidad alto.

9. Conclusiones.

- Se logró sintetizar y caracterizar nanopartículas de fosfato de calcio a partir de microemulsiones agua/aceite, mostrando ser un método efectivo de síntesis con alta reproducibilidad.
- Se logró la adsorción del fármaco norfloxacin en las nanopartículas de HAP de manera tal que se logró estudiar la liberación del fármaco de las mismas, visualizando que estas podrían utilizarse como un sistema de liberación modificada.
- Se logró la elaboración y caracterización de las membranas de alginato de sodio con cloruro de calcio, dando como resultado que las membranas liofilizadas son más flexibles y más porosas que las membranas secadas al ambiente.
- Se logró el acoplamiento y caracterización del sistema híbrido y se observó que la adición de las nanopartículas modifican las propiedades de la membrana haciéndola más porosa y ligeramente más rígida.

10. Bibliografía.

1. Zhou Hongjian, Lee Jaebeom (2011) Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 7; 2769–2781.
2. Xu Liming, Harada Hidemitsu, Ikoma Toshiyuki y Taniguchi Akiyoshi (2008). Hydroxyapatite- and Amelogenin Protein-Induced Expression of Mineralization-Related Genes in a Dental Epithelial Cell Line. *The Open Biotechnology Journal*. 2; 116-120.
3. Zanella R. (2012) Metodologías para la síntesis de nanopartículas: controlando forma y tamaño. *Mundo Nano [Internet]*. enero-junio; 5(1): 69-81. Disponible en: <http://www.revistas.unam.mx/index.php/nano/article/viewFile/45167/40717>.
4. Olivas Armendáriz I., García Casillas P., Martel Estrada A., Martínez Sánchez R, Martínez Villafañe A., Martínez-Pérez C.A (2009). Preparación y caracterización de compositos de Quitosana/nanotubos de carbono. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 8(2): 205-211.
5. Guyton Arthur, Hall John (2001). “Tratado de fisiología médica”, 10ª edición, Mexico, McGraw-Hill Intramericana, 1084-1087.
6. Kim HL, *et. al* (2015). Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 54:20-5.
7. Cai Y, *et. al* (2007). Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation. *Journal of Materials Chemistry*. 17(36):3780.
8. Singh S, Bhardwaj P, Singh V, Aggarwal S (2007). Synthesis of nanocrystalline calcium phosphate in microemulsion--effect of nature of surfactants. *J Colloid Interface Sci*. 319(1):322-9.
9. Gong Y, *et. al* (2016). Preparation of alginate membrane for tissue engineering. *Journal of Polymer Engineering*. 36(4).
10. Sharma S, *et. al* (2015). An insight into functionalized calcium based inorganic nanomaterials in biomedicine: Trends and transitions. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 133:120-39.
11. Maity JP, *et. al* (2011). Synthesis of brushite particles in reverse microemulsions of the biosurfactant surfactin. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(6):3821-30.
12. Tamimi Mariño (2015). Síntesis, caracterización y aplicación en regeneración ósea de cementos de brushita fraguados con ácidos orgánicos, geles y coloides [tesis doctoral en Internet] España: Universidad Complutense de Madrid; 196 p. Disponible en: <http://www.ucm.es/data/cont/docs/861-2015-02-17-Tesis%20Doctoral%20Faleh%20Tamimi%20Mari%C3%B1o.pdf>
13. Carlucci Adriana M., Cicconi Vidal Marta, Bregni Carlos (2004). Las Microemulsiones como Vehículos para Administración de Drogas. *Acta Farm. Bonaerense*. 23(4):550-7.

14. Rees Gareth, Evans-Gowing Richard, Hammond Stephen J., Robinson Brian H (1999). Formation and Morphology of Calcium Sulfate Nanoparticles and Nanowires in Water-in-Oil Microemulsions. *Langmuir*. 15: 1993-2002.
15. Chen, L.; Tang, S.Q.; Wang, Y.J.; Wei, K (2005). Formation of calcium phosphate nanoparticles in reverse microemulsion. *Mater. Lett.* 59, 210–214.
16. Higgins, R.J (1997). An Economical Process for Manufacturing of Nano-Sized Powders Based on Microemulsion-Mediated Synthesis. In *Proceedings of the Joint NSF-NIST Conference on Nanoparticles*, Arlington, VA, USA, May.
17. Maity JP, *et. al* (2011). Synthesis of brushite particles in reverse microemulsions of the biosurfactant surfactin. *International Journal of Molecular Sciences*. 12(6):3821-30.
18. S.M. Arifuzzaman, S. Rohani, *J. Cryst. Growth* 267 (3–4) (2004) 624. [21] J.H. Fendler, *Chem. Rev.* 87 (1987) 877.
19. K. Yeong, J. Wang, S. Ng (2001), Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO₄, *Biomaterials* 22;2705–2712.
20. I.-S. Kim, P.N. Kumta (2004). Sol–gel synthesis and characterization of nanostructured hydroxyapatite powder, *Mater. Sci. Eng. B* 111;232–236.
21. H. Wang, M. Bongio, K. Farbod, A.W. Nijhuis, J. van den Beucken, O.C. Boerman, J.C. van Hest, Y. Li, J.A. Jansen, S.C. Leeuwenburgh (2014). Development of injectable organic/inorganic colloidal composite gels made of self-assembling gelatin nanospheres and calcium phosphate nanocrystals, *Acta Biomater.* 10;508–519.
22. T.A. Desai, V. Uskokovic (2013). Calcium phosphate nanoparticles: a future therapeutic platform for the treatment of osteomyelitis?. *Ther. Deliv.* 4;643–645.
23. Biomateriales, Biomecánica e Ingeniería de Tejidos. BBT. Biomateriales para Regeneración Ósea. Responsable de Línea: Prof. Maria Pau Ginebra. (página de la universidad en Internet), España: Universidad Politécnica de Catalunya. Disponible en: <https://biomaterials.upc.edu/es/lineas-de-investigacion/biomateriales-para-regeneracion-osea>.
24. M.D. Weir, L.C. Chow, H.H. Xu (2012). Remineralization of demineralized enamel via calcium phosphate nanocomposite. *J. Dent. Res.* 91;979–984
25. M.A. Melo, M.D. Weir, L.K. Rodrigues, H.H. Xu, Novel calcium phosphate nanocomposite with caries-inhibition in a human in situ model, *Dent. Mater.* 29 (2013) 231–240.
26. M. Okada, M. Masuda, R. Tanaka, K. Miyatake, D. Kuroda, T. Furuzono (2008). Preparation of hydroxyapatite-nanocrystal-coated stainless steel, and its cell interaction, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 86^a;589–596.
27. Dalmoro A, Barba AA, Lamberti G, Grassi M, d'Amore M (2012). Pharmaceutical applications of biocompatible polymer blends containing sodium alginate. *Advances in Polymer Technology*. 31(3):219-30.

28. Brodelius, P. (1984). Immobilization of cultural plant cells and protoplasts. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Vol. 1 (pp. 535–546). London: Academic Press.
29. Rhim J-W (2004). Physical and mechanical properties of water resistant sodium alginate films. *LWT - Food Science and Technology*. 37(3):323-30.
30. Zaman HU, Beg MDH (2013). Preparation and properties of sodium alginate films. *Journal of Polymer Engineering*. 33(9).
31. Gong Y, *et. al* (2016). Preparation of alginate membrane for tissue engineering. *Journal of Polymer Engineering*. 36(4).
32. Chinmayee Acharya, Chitta R. Panda, Prakash Kumar Bhaskara, Abhisek Sasmal, Suman Shekhar, Akhil K. Sen (2016). Physicochemical and antimicrobial properties of sodium alginate/gelatin-based silver nanoformulations. *Polym. Bull*. 289(16):1738-8.
33. Ming Yang Jen, *et. al* (2016). Cell proliferation on PVA/sodium alginate and PVA/poly(γ -glutamic acid) electrospun fiber. *Materials Science and Engineering C*. 66:170–177.
34. Okeke OC, Boateng JS (2016). Composite HPMC and sodium alginate based buccal formulations for nicotine replacement therapy. *Int J Biol Macromol*. 91:31-44.
35. Alemdar N (2016). Fabrication of a novel bone ash-reinforced gelatin/alginate/hyaluronic acid composite film for controlled drug delivery. *Carbohydr Polym*. 151:1019-26.
36. Rayas J.A., Rodríguez Vera R., Martínez A (2003). Medición del módulo de Young en el hule látex usando ESPI. *Rev. Mex. Fís*. 49(6):555–564.
37. Darder Margarita, Aranda Pilar, Ruiz-Hitzky (2007). Bio-nanocomposites: nuevos materiales ecológicos, biocompatibles y funcionales. *An. Quím*. 103(1): 21–29.
38. Takeshi Fuji, Takahisa Anada, Yoshitomo Honda, Yukari Shiwaku, Hiroko Koike, Shinji Kamakura, Keiichi Sasaki, Osamu Suzuki (2009). Octacalcium Phosphate–Precipitated Alginate Scaffold for Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part A*. 15(11): 3525-3535.
39. Luo Yongxiang, Lode Anja, Wu Chengtie, Chang Jiang y Gelinsky Michael (2015). Alginate/Nanohydroxyapatite Scaffolds with Designed Core/Shell Structures Fabricated by 3D Plotting and in Situ Mineralization for Bone Tissue Engineering. *Mater. Interfaces*, 7 (12), pp 6541–6549.
40. Cox SC, Jamshidi P, Williams RL, Grover LM, Mallick KK (2015). The importance of processing conditions on the biological response to apatites. *Powder Technology*. 284:195-203.
41. Roy P, Sailaja RR (2015). Mechanical, thermal and bio-compatibility studies of PAEK-hydroxyapatite nanocomposites. *J Mech Behav Biomed Mater*. 49:1-11.

42. Xue Caibao, Chen Yingzhi, Huang Yongzhuo, Zhu Peizhi (2015). Hydrothermal Synthesis and Biocompatibility Study of Highly Crystalline Carbonated Hydroxyapatite Nanorods. *Nanoscale Research Letters*. 10:316.
43. Tianlong Jiang, Lei Guo, Shenghui Ni, Yuyan Zhao (2015). Upregulation of cell proliferation via Shc and ERK1/2 MAPK signaling in SaOS-2 osteoblasts grown on magnesium alloy Surface coating with tricalcium phosphate. *J Mater Sci: Mater Med*. 26:158.
44. Tian Z, Huang W, Liang Y (2009). Preparation of spherical nanoparticles of LaAlO₃ via the reverse microemulsion process. *Ceramics International*. 35(2):661-4.
45. Asami Koji (2005). Dielectric Relaxation in a Water-Oil-Triton X-100 Microemulsion near Phase Inversion. *Langmuir*, 21(20): 9032-9037
46. Moulik S. P., Das M. L., Bhattacharya P. K (1992). Thermodynamics of Microemulsion Formation. 1. Enthalpy of Solution of Water in Binary (Triton X 100 + Butanol) and Ternary (Heptane + Triton X 100 + Butanol) Mixtures and Heat Capacity of the Resulting Systems. *Langmuir*, 8(9): 2135-2139.
47. Zhang Xin, Chan Kwong-Yu (2003). Water-in-Oil Microemulsion Synthesis of Platinum-Ruthenium Nanoparticles, Their Characterization and Electrocatalytic Properties. *Chem. Mater*. 15(2): 451-459.
48. Xu J, Yin A, Zhao J, Li D, Hou W (2013). Surfactant-free microemulsion composed of oleic acid, n-propanol, and H₂O. *J Phys Chem B*. 117(1):450-6.
49. Thein-Han WW, Misra RD (2009). Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 5(4):1182-97.
50. Hernández M. Carolina (2004). Formación de nanoemulsiones o/w mediante el cambio en la composición-formulación por dilución con agua de sistemas próximos a la formulación óptima. [tesis de pregrado en Internet]. Venezuela: Universidad de los Andes. 99 p. Disponible en: http://www.firp.ula.ve/archivos/tesis/04_PG_Hernandez_C.pdf.
51. Batalla Mayoral J., Cuadros Moreno A., San Martín-Martínez E (2014). Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. *Lat. Am. J. Phys. Educ*. 8(4): 4319-2.
52. Lai C, Tang S, Wang Y, Wei K (2005). Formation of calcium phosphate nanoparticles in reverse microemulsions. *Materials Letters*. 59(2-3):210-4.