



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

“Obtención y caracterización de
recubrimientos nanoestructurados de
hidroxiapatita y su uso como matrices
portadoras de antibióticos”

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

Presenta:

Luis Sergio Escamilla Atriano



Ciudad Universitaria, CDMX

2022



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: JESÚS GRACIA MORA
VOCAL: JOSEFA BERNAD BERNAD
SECRETARIO: ANA LAURA MALDONADO HERMEREGLDO
1ER SUPLENTE: CARLOS JUÁREZ OSORNIO
2º SUPLENTE: HUGO CESAR HERNANDEZ TOLEDO

Esta tesis se realizó en el laboratorio 100, de la unidad de posgrado, del departamento de química inorgánica y nuclear en el edificio B y en el laboratorio 001 del departamento de farmacia en el edificio F-1 de la Facultad de Química, en la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor:

Dr. Jesús Gracia Mora

Supervisor técnico:

Dr. Iván Darío Rojas Montoya

Sustentante:

Luis Sergio Escamilla Atriano

INDICE GENERAL:

1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
3.1 Fisiología y química de los huesos	5
3.2 Implantes ortopédicos	6
3.3 Síntesis de hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio de interés médico	10
3.3.1 Síntesis en estado sólido	11
3.3.2 Síntesis mecanoquímica	11
3.3.3 Síntesis por precipitación	12
3.3.4 Hidrólisis	12
3.3.5 Plasma a presión atmosférica	13
3.3.6 Sol-Gel	13
3.3.7 Recubrimientos por electrodeposición	14
3.3.8 Recubrimientos por inmersión	14
3.3.9 Spray pirolítico	15
3.4 Infecciones asociadas a implantes	16
3.5 Quinolonas	17
3.6 Sistemas de liberación de fármacos	18
4. Objetivos	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos particulares	21
5. Hipótesis de trabajo	21
6. Metodología	22
6.1 Materiales	22
6.2 Métodos de análisis	22
6.2.1 Microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión	22
6.2.2 Difracción de rayos X (XRD)	22
6.2.3 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier	23
6.2.4 Espectroscopia de ultravioleta	23
6.3 Spray Pirolítico asistido por ultrasonido	23
6.4 Síntesis de fosfatos de calcio	24
6.5 Obtención de depósitos	25
6.6 Cargas con enrofloxacino	26
6.6.1 Carga por inmersión	26
6.6.2 Carga por centrifugación	28
6.6.3 Carga mediante plasma a presión atmosférica:	29
6.7 Cuantificación del enrofloxacino cargado en los recubrimientos	29
6.8 Evaluación de la liberación del antibiótico	29
7. Resultados y discusión	31

7.1 Síntesis y caracterización del depósito control de hidroxiapatita bovina	31
7.1.1 Caracterización por FT-IR	31
7.1.2 Caracterización por difracción de rayos X (XRD)	32
7.1.3 Caracterización por microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión	33
7.2 Síntesis de fosfatos de calcio en fase acuosa y su caracterización.	35
7.3 Obtención y caracterización de los recubrimientos de hidroxiapatita a partir de los fosfatos de calcio sintetizados en fase acuosa y mezclas de soluciones con iones calcio y fosfato.	37
7.3.1 Caracterización por infrarrojo.	37
7.3.2 Caracterización por difracción de rayos X	39
7.3.3 Caracterización por microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión	40
7.4 Obtención y caracterización de los recubrimientos de hidroxiapatita a partir de la mezcla de soluciones con iones calcio y fosfato manteniendo la proporción presente en la hidroxiapatita.	41
7.4.1 Caracterización por FT-IR	42
7.4.2 Caracterización por difracción de rayos X	43
7.4.3 Caracterización por microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión	44
7.5 Cargas con antibiótico.	48
7.5.1 Carga por inmersión	48
7.5.2 Carga por centrifugación	49
7.5.3 Carga mediante plasma a presión atmosférica	51
7.6 Perfiles de liberación <i>in-vitro</i>	52
7.6.1 Depósitos cargados por la técnica de centrifugación	52
7.6.2 Depósitos cargados por la técnica de inmersión	58
7.6.3 Depósitos cargados por la técnica de plasma a presión atmosférica	63
8. Conclusiones	69
9. Perspectivas	69
10. Bibliografía	70

Glosario de abreviaturas:

HA	Hidroxiapatita
FT-IR	Espectroscopia de Infrarrojo por Transformada de Fourier
XRD	Difracción de Rayos X
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
β -TCP	β -Fosfato tricálcico
CC	Carga por centrifugación
PPA	Plasma a presión atmosférica
CI	Carga por inmersión
CaP	Fosfato de calcio
α -TCP	Fosfatito tricálcico
API	Principio activo
HAB	Hidroxiapatita bovina
ENR	Enrofloxacino
RPM	Revoluciones por minuto
EDS	Espectroscopia de rayos X de energía dispersiva
AIC	Criterio de Información Akaike
MSC	Criterio de Selección del Modelo
Cap-1	Fosfato de calcio sintetizado por precipitación a pH alcalino (pH=10)
Cap-2	Fosfato de calcio sintetizado por precipitación sin modificar el pH de la mezcla de soluciones de Cloruro de calcio y Fosfato de sodio dibásico.
Rec-1	Depósito obtenido por la técnica espray pirolítico asistido por ultrasonido a partir de una dispersión acuosa del fosfato de calcio sintetizado por precipitación en pH=10 (CaP-1)
Rec-2	Depósito obtenido por la técnica espray pirolítico asistido por ultrasonido a partir de una dispersión acuosa del fosfato de calcio sintetizado por precipitación sin modificar el pH (CaP-2)
Rec-3	Depósito obtenido por la técnica espray pirolítico a partir de la mezcla de soluciones de Cloruro de calcio y Fosfato de sodio dibásico ajustada a pH=10
Rec-4	Depósito obtenido por la técnica espray pirolítico a partir de la mezcla de soluciones de Cloruro de calcio y Fosfato de sodio dibásico sin modificar el pH (pH \approx 6.6)
Rec-5	Depósito obtenido por la técnica espray pirolítico a partir de la mezcla de soluciones de Cloruro de calcio y Fosfato de sodio dibásico ajustada a pH \approx 2

1. Resumen:

La remoción de implantes ortopédicos hoy en día es uno de los procedimientos quirúrgicos más comunes en el sistema músculo esquelético. Las principales razones por las cuales es necesaria la remoción de los implantes son el dolor, alergias y perturbación de algunas funciones biológicas. Sin embargo, al extraer un dispositivo ortopédico del organismo es posible generar daños en tejidos, inflamación e infecciones, además de que un 30% de los casos implican la fractura del hueso. Con el propósito de evitar la remoción y rechazo de implantes, se han propuesto diversas estrategias que permiten su incorporación en hueso y a su vez previenen la degradación de estos permitiendo la liberación de sustancias tóxicas al organismo. Entre estas estrategias se encuentra el recubrimiento de los implantes con materiales biocompatibles, tales como polímeros y fosfatos de calcio. La hidroxiapatita (HA) es uno de los fosfatos de calcio con mayor interés médico, debido a que es el mineral de los huesos, y por tanto es biocompatible y osteoconductor, lo cual quiere decir que favorece el crecimiento de hueso en su superficie. En este trabajo, se desarrollaron recubrimientos con hidroxiapatita, mediante la técnica de spray pirolítico asistido por ultrasonido. Se elaboraron recubrimientos con mezclas de soluciones acuosas de fosfato de sodio dibásico y cloruro de calcio, a distintos valores de pH, manteniendo la relación estequiométrica de la hidroxiapatita $Ca/P=1.67$. Estos depósitos se estudiaron mediante espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), difracción de rayos X (XRD, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), encontrándose la presencia de cloruro de sodio sobre los depósitos el cual se buscó remover de los depósitos, debido a que los volvía inestables, desprendiéndose la hidroxiapatita de los sustratos. Tras remover el NaCl con agua desionizada generó recubrimientos porosos, de los cuales el depósito obtenido a pH alcalino tuvo mejores propiedades físicas y químicas, por tal motivo este depósito se seleccionó para estudios posteriores. Por otro lado, se prepararon depósitos con hidroxiapatita bobina dispersada en agua (control) y depósitos con fosfatos de calcio sintetizados en fase acuosa a distintos valores de pH (10 y pH sin modificar), para ser estudiados mediante las técnicas FT-IR, XRD, SEM y TEM.

Tras analizar los depósitos elaborados a partir de fosfatos de calcio previamente sintetizados en fase acuosa, se observó que el fosfato de calcio sintetizado a pH alcalino genera recubrimientos de hidroxiapatita, en comparación con el fosfato sintetizado a pH sin modificar, el cual produjo recubrimientos con β -Fosfato tricálcico (β -TCP), por tal motivo, los depósitos obtenidos con el fosfato de calcio sintetizado a pH alcalino se seleccionaron para estudios posteriores.

Los depósitos elaborados con hidroxiapatita bovina, mezcla de soluciones a pH alcalino y el fosfato de calcio sintetizado a pH alcalino, se cargaron con enrofloxacino (una fluoroquinolona), mediante las técnicas de centrifugación **(CC)**, plasma a presión atmosférica **(PPA)** e inmersión **(CI)**, para cuantificar el antibiótico cargado y evaluar el perfil de liberación de los depósitos. En esta parte del estudio se encontró que el depósito obtenido por mezcla de soluciones a pH alcalino retiene menos antibiótico que los otros depósitos al ser cargado **CC** y **CI**, no obstante, al emplear la técnica de **PPA**, este es el recubrimiento que más antibiótico retiene, además de que el antibiótico no se queda adherido al recubrimiento de manera indeterminada, liberando la mayor parte del antibiótico durante de las primeras 6 horas.

2. Introducción:

Los fosfatos de calcio (**CaP**) son materiales de alto interés en distintos campos, tales como en la biología, geología, industria, medicina, etc. El empleo de estos materiales se asocia principalmente a su estructura, composición, solubilidad y propiedades fisicoquímicas.^[1] Desde el punto de vista médico, algunos CaP con el sistema ternario $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ son altamente estudiados debido a que presentan una naturaleza bioinerte, dado que no daña el organismo y no produce reacciones de rechazo en el organismo, y bioactiva debido a que favorece la osteoconductividad y osteointegración, entendiéndose por osteoconductividad a la capacidad de mejorar el crecimiento del hueso cuando los CaPs externos entran en contacto con el tejido óseo, y por osteointegración a la capacidad de generar un anclaje estable entre el hueso y los fosfatos de calcio externos.^[1-2]

Los CaP pueden dar lugar a diferentes cristales dependiendo de su estequiometría y las condiciones para su obtención. La conformación química de estos cristales está dada por aniones PO_4^{3-} y cationes Ca^{2+} , en diferentes proporciones de Ca/P, por ejemplo, 1.67 para hidroxiapatita (HA), 1.5 en α -TCP (fosfato tricálcico) y 1.0 para brushita (fosfato dicálcico dihidratado) y monetita (fosfato dicálcico).^[3] La $\text{HA}(\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2)$ en su estado cristalino es termodinámicamente más estable el CaP dentro de los fluidos corporales y posee la mayor similitud al mineral óseo,^[4] por esta razón es considerado el CaP de mayor relevancia.^[1]

La HA es un material muy estudiado para el desarrollo de implantes ortopédicos, ya que conforma el principal componente inorgánico de huesos y dientes; sin embargo, tiene limitaciones por sus pobres propiedades mecánicas y baja resistencia a la fatiga. Con el propósito de evitar este problema se ha sugerido el recubrimiento de implantes metálicos con este material, lo cual implica combinar la resistencia mecánica de los metales con el potencial biológico de la HA.^[5]

Desde el punto de vista microbiológico, la introducción de implantes al cuerpo se encuentra asociada a un elevado riesgo de infecciones, capaces de producir el fracaso del dispositivo ortopédico, afectando la salud y economía del paciente. El paso decisivo en infecciones asociadas a implantes es la adhesión

bacteriana en las superficies de los implantes, seguida de una formación de una biopelícula, (biofilm) capaz de proteger a las bacterias infecciosas del sistema inmunitario.^[6] Con el propósito de evitar este inconveniente, se ha requerido la administración a nivel sistémico de cantidades elevadas de antibióticos de amplio espectro, lo cual desemboca en la aparición de efectos indeseados en los pacientes.^[7] Dentro de los antibióticos de elección para el tratamiento de infecciones óseas se encuentran las fluoroquinolonas, las cuales son capaces de permear en hueso gracias a su grupo carboxilato el cual es capaz de coordinarse con el calcio de los huesos.^[8]

En estudios recientes, los recubrimientos de HA no solamente han sido empleados por sus propiedades osteoconductoras, ya que también se han utilizado como una forma farmacéutica para la liberación *in-situ* de antibióticos y otras sustancias de interés biológico, ofreciendo la ventaja de requerir dosis bajas de fármacos comparadas con las administradas a nivel sistémico, lo cual ayuda a evitar efectos tóxicos asociados con dosis altas; otra ventaja de la liberación *in-situ* es su alta eficiencia por las altas concentraciones de fármaco alcanzadas en el sitio de acción, lo cual reduce el periodo de tratamiento.^[9]

Los implantes al ser usados como formas farmacéuticas requieren ser estudiados con ensayos que ayuden a predecir su comportamiento en el organismo, dentro de estos ensayos, la prueba de disolución es una de las más importantes, ya que ayuda a conocer la cinética y el mecanismo de liberación del fármaco dentro del organismo. Con este propósito se han desarrollado diversos modelos matemáticos, capaces de describir la liberación inmediata y modificada de las formas farmacéuticas, los cuales se basan en la representación del perfil de liberación en función del tiempo, con la capacidad de brindar parámetros de la forma farmacéutica.^[10] Con el propósito de llevar a cabo estos estudios, es necesario controlar factores como el pH, la presencia de tensoactivos, el tipo de solvente empleado, la temperatura y mantener siempre condiciones *Sink*. En este sentido las condiciones *Sink* de un medio, es donde se asegura que la concentración del fármaco siempre se encontrará por debajo del 10% de la saturación del medio, esta es una recomendación bien vista ya que asegura que la saturación del medio no interferirá en la disolución del fármaco.^[11]

3. Antecedentes:

Los daños a hueso tanto por enfermedades, como por accidentes traumáticos, son problemas de salud con alta incidencia en la población, los cuales además implicar una alta morbilidad, son costosos y requieren atención médica y/o intervención quirúrgica.^{[12] [13]}

El hueso es un tejido en constante remodelación, la cual consiste en la degradación y regeneración del mismo. Gracias al fenómeno de remodelación el organismo reduce el estrés mecánico y mantiene la homeostasis de los huesos. Sin embargo, en ocasiones los defectos óseos son tan grandes que no pueden sanarse por sí mismos, y por esta razón es necesaria la intervención quirúrgica con injertos (autoinjertos, aloinjertos y sustitutos artificiales de hueso). Los autoinjertos son aquellos con mayor probabilidad de éxito, sin embargo, requieren el sacrificio de tejido normal y sano; Por otro lado, los xenoinjertos de personas y animales tienen una baja probabilidad de éxito por la facilidad con la que se deforman, los problemas infecciosos e inmunológicos que suponen, además de los problemas éticos a los que se asocian. Por esta razón ha sido necesario el desarrollo de sustitutos artificiales de hueso con materiales capaces de mimetizar los huesos y reducir el impacto a la salud.^[12]

3.1 Fisiología y química de los huesos

Los huesos son tejidos altamente vascularizado y son el resultado de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos, los cuales se encargan de mantener la homeostasis ósea.^[14]

Los huesos pueden ser considerados compositos bioinorgánicos formados principalmente por nanocristales de HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) de 20-40nm y fibras de colágeno, con cantidades significativamente menores de agua y proteínas diferentes al colágeno (Figura 1). La HA inorgánica tiene una buena resistencia a la compresión, es frágil a la torsión y tiene un alto módulo de elasticidad, para compensar, el colágeno ofrece una alta resistencia a la tensión.^[15] La unión

entre la HA y el colágeno está controlada en parte por la presencia de glicoproteínas y proteoglicanos con una alta capacidad de fijación de iones.^[16]

El cociente Ca/P en los huesos se encuentra en el intervalo de 1.3-2.0 y es dependiente de las condiciones nutricionales y el peso corporal.^[17] Los nanocristales de HA ósea tienen baja cristalinidad y diversas sustituciones de iones dentro de su estructura, lo cual da como resultado una HA con composición $(Ca,Mg,Na)_{10}(PO_4,CO_3,HPO_4)_6(CO_3,OH)_2$.^[18]

3.2 Implantes ortopédicos

Los implantes ortopédicos se definen como dispositivos médicos empleados en el remplazo o fijación de hueso, o remplazo de superficies en articulaciones.

Los implantes ortopédicos se elaboran principalmente de acero inoxidable, aleaciones de titanio, aleaciones de cobalto-cromo-molibdeno, polímeros, o materiales cerámicos. Estos dispositivos pueden ser introducidos en huesos o unidos a la superficie ósea.^[19] Algunos ejemplos de implantes son placas, tornillos, etc. y algunos se muestran en la Figura 2.^[20]

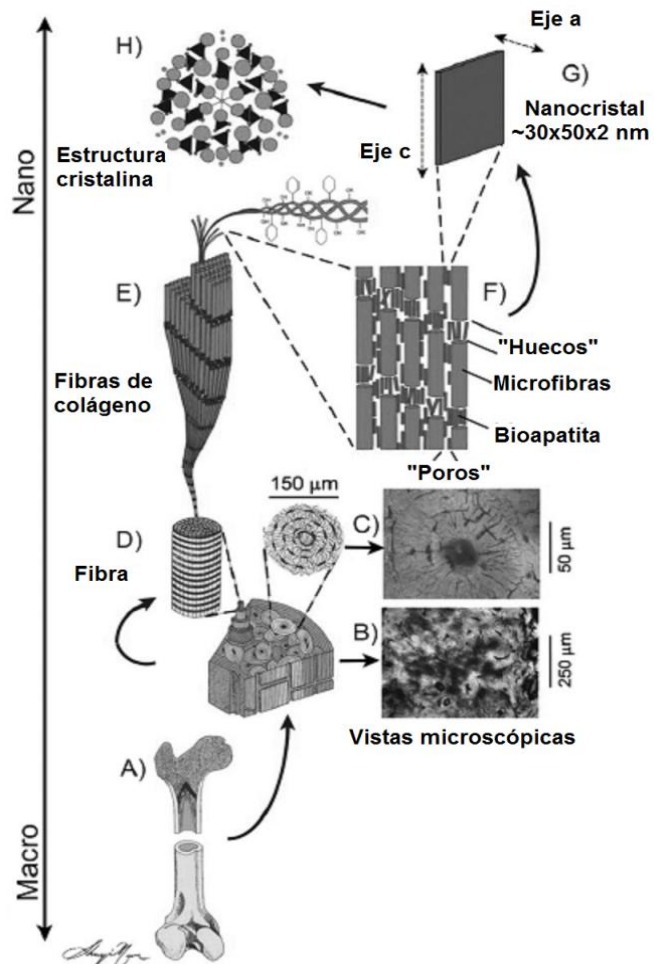


Figura 1. Composición de los huesos.^[15]

Para la introducción de implantes ortopédicos en el organismo, es necesario considerar el sitio al que va dirigido, así como el material que se va a emplear, el cuál debe ser inerte y mostrar propiedades mecánicas similares o mejores que las estructuras a las que van dirigidos. Dentro de las propiedades mecánicas a considerar se encuentran el módulo de Young, el cual se define como la resistencia de un material a ser deformado tras estirarlo o comprimirlo y posteriormente retirar dicha tensión; la resistencia a tracción, la cual es la máxima fuerza que se puede aplicar a un material antes de que este se rompa; la dureza, o bien la resistencia del material a ser rayado.

[22] [23]

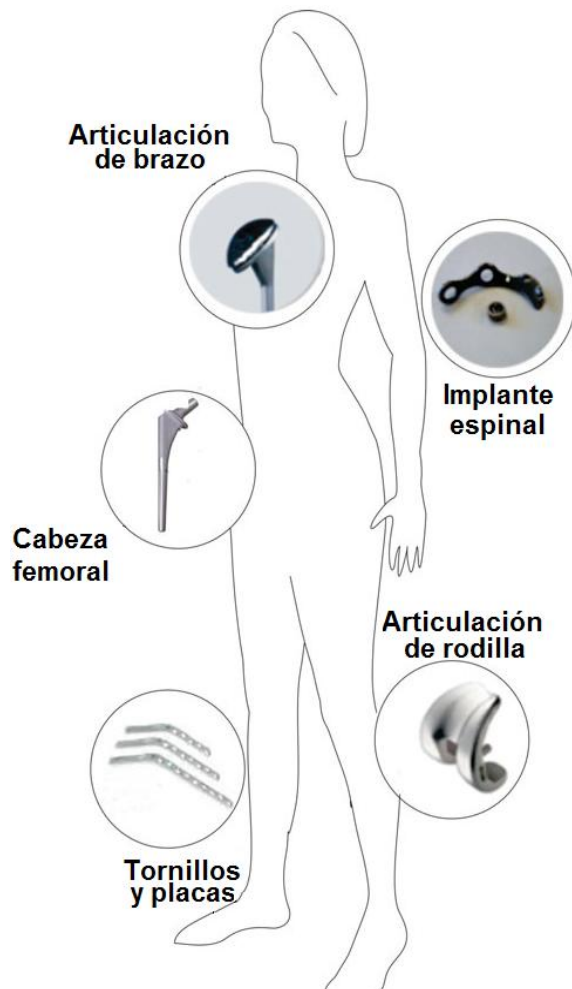


Figura 2. Ejemplos de Implantes ortopédicos ^[21]

Debido a que los metales poseen buenas propiedades mecánicas, son fáciles de manufacturar y son baratos, por esta razón, se han empleado desde mucho tiempo atrás para la elaboración de dispositivos ortopédicos, ^{[20] [24]} sin embargo, los implantes metálicos poseen una baja osteoconductividad y osteointegración, por lo que las células óseas no proliferan en su superficie y no puede haber una conexión directa entra la superficie del implante y la parte viva del hueso, por tal motivo, los dispositivos ortopédicos tienden a ser encapsulados por tejido fibroso el cual genera el fallo del implante a largo plazo. Por otro lado, todas las superficies metálicas son susceptibles a la corrosión e ionización dentro de los fluidos corporales, teniendo 2 consecuencias principales, la primera consiste en el debilitamiento del

implante, comprometiendo su integridad; la segunda consiste en la liberación de sustancias tóxicas, tales como iones metálicos, sales inorgánicas, óxidos metálicos, complejos orgánicos (P. ej. hemosiderina) y partículas metálicas. Además, debido al desgaste mecánico, se producen partículas metálicas con una alta superficie de contacto, la cual les facilita su interacción con los tejidos circundantes, produciendo inflamación y osteólisis. Las células fagocitarias del sistema inmunitario juegan un papel crucial en este punto, pues ingieren las nanopartículas metálicas producidas por desgaste, promoviendo su oxidación y diseminación por todo el organismo, lo que conlleva a efectos como: citotoxicidad, genotoxicidad, neurotoxicidad y problemas inmunitarios.^{[21] [24]}

Una forma de abordar los problemas asociados a implantes metálicos, es el desarrollo de implantes biodegradables a base de magnesio, no obstante, la principal desventaja de este material es la facilidad con la que se degrada, desintegrándose antes de que el hueso se regenere, además de favorecer la aparición de hidrógeno gaseoso y el aumentando del pH en la zona. Como una alternativa se han desarrollado aleaciones con zinc y calcio que reducen la producción de hidrógeno.^[20]

Por otra parte, con los avances en la nanotecnología se han propuesto alternativas a los implantes de calcio, magnesio y zinc, las cuales consisten en el desarrollo de recubrimientos nanoestructurados sobre superficies metálicas. Los materiales más empleados con este propósito son los óxidos de titanio y los CaP.^[20] En este sentido la HA es el material más importante al poseer una composición química similar a la de los huesos y ser el CaP más estable termodinámicamente (Ver tabla 1). Los recubrimientos elaborados a partir de HA muestran diversas ventajas, ya que por un lado la aleación metálica brinda buenas propiedades mecánicas y por otro lado la HA aporta resistencia a la corrosión y funciona como barrera ante la liberación de iones tóxicos, además de mejorar las propiedades biológicas, permitiendo la osteogénesis (Generación de hueso nuevo) y angiogénesis (Formación de nuevos vasos sanguíneos).^{[4] [25]}

Tabla 1. Composición química y solubilidad de los diferentes CaP.^{[5] [25]}

Fosfato de calcio	Formula química	Nombre del mineral	Proporción Ca/P	Solubilidad -Log(Ks)
Fosfato monohidratado de monocálcio	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	—	0.5	1.14
Fosfato de monocálcio	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	—	0.5	1.14
Fosfato dicálcico dihidratado	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Brushita	1.0	6.59
Fosfato dicálcico	CaHPO_4	Monetita	1.0	6.90
Fosfato octacálcico	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	—	1.33	96.6
Fosfato α -tricálcico	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	—	1.5	25.5
Fosfato β -tricálcico	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Whitelockita	1.5	28.9
Fosfato de calcio amorfo	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	—	1.2-2.2	A
Hidroxiapatita deficiente de calcio	$\text{Ca}_{10x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6x}(\text{OH})_{2x}$ ($0 < x < 1$)	—	1.5-1.67	B
Apatita carbonatada	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_3$	Dhalita	1.67	—
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	—	1.67	116.8
Oxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6^0$	—	1.67	—
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	Hilgenstockita	2.0	38-44

a = Solubilidad variable dada su naturaleza metaestable

b = Solubilidad variable según su estequiometría

Con la finalidad de asegurar el crecimiento óseo sobre los implantes, así como una buena aceptación por el organismo, es de gran importancia asegurar que

los recubrimientos elaborados a partir de HA sean altamente cristalinos, nanoporosos, presentar alta adherencia al sustrato y buenas propiedades mecánicas. Con este propósito se han descrito diversas metodologías, dentro de las cuales, las más comunes son plasma a presión atmosférica (PPA), spray pirolítico, depósito por láser pulsátil, recubrimiento por inmersión (CI), sol-gel, depósito electroquímico, etc.^[26]

3.3 Síntesis de hidroxiapatita y otros fosfatos de calcio de interés médico

La HA y los CaP relacionados tienen una composición similar a la parte mineral de los huesos y dientes, por tal razón son empleados satisfactoriamente para rellenar defectos óseos y ayudar a la regeneración ósea.^[5] Los fosfatos de calcio pueden emplearse de manera selectiva dependiendo el uso al que se destinen; por ejemplo, en la síntesis de cementos óseos preferentemente se utilizan materiales como brushita y monetita, dado que en el organismo se disuelven y vuelven a precipitar en forma de otros fosfatos de calcio menos solubles, como HA, favoreciendo su incorporación en el organismo. Es posible utilizar la HA para recubrimientos sobre implantes, ya que es el fosfato de calcio más estable y se mantiene adherido sobre el implante, permitiendo el crecimiento de hueso en su superficie, lo cual, gracias a los avances en la nanotecnología se ha ido mejorando y con ello aumenta la aceptación de los implantes por parte del organismo. En otros casos se emplea hidroxiapatita y otros CaP en nanopartículas acarreadoras de fármaco y material genético, las cuales al ser solubles en medio ácido, pueden liberar el fármaco en secciones específicas del organismo (P.ej. vesículas endocíticas, o tumores).^{[25] [27]}

La hidroxiapatita sintética es posible obtenerla a partir de materiales orgánicos, tales como cascarones de huevo, hueso bovino, conchas, etc, así como de materiales inorgánicos (Sales y compuestos químicos). La principal desventaja de la síntesis de HA a partir de componentes orgánicos es la fácil contaminación con otros iones presentes en la materia orgánica, obteniendo una hidroxiapatita con sustitución de iones, tales como Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Si^{2+} , Ba^{2+} , F^- , CO_3^{2-} , así como la formación de otros fosfatos de calcio menos estables. Por otro lado la síntesis de hidroxiapatita a partir de fuentes

inorgánicas ofrece la ventaja de obtener una mayor pureza, sin embargo su principal inconveniente es el costo por la naturaleza de los reactivos, así como por las técnicas empleadas. [28]

Debido a la importancia de los fosfatos de calcio nanoestructurados en la regeneración ósea, se han descrito distintas técnicas en fase sólida, acuosa, y a altas temperaturas para su síntesis, algunas de ellas se explican en los siguientes apartados al igual que algunos métodos para obtener recubrimientos nanoestructurados, dado que fueron el objetivo de esta tesis. [29] [25] [30]

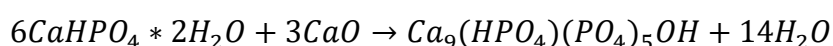
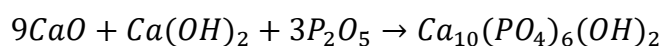
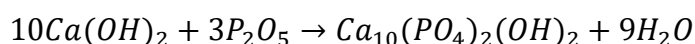
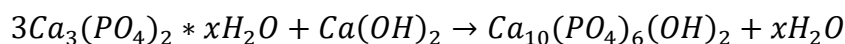
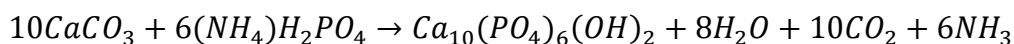
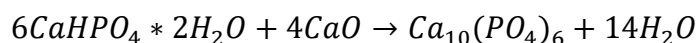
3.3.1 Síntesis en estado sólido

La síntesis en fase sólida es relativamente simple y se puede escalar fácilmente, consiste en la calcinación de una molienda de materia orgánica que contenga iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} , o bien, de compuestos inorgánicos con los mismos iones. La principal desventaja de este método en la síntesis es la formación de distintos fosfatos de calcio, tales como el β -TCP, lo cual se debe a una pobre difusión de los iones en fase sólida. [31] Es posible modificar el grado de cristalinidad y el grado de pureza de la hidroxiapatita controlando la temperatura y el tiempo de calcinación. [32]

3.3.2 Síntesis mecanoquímica

A diferencia de la síntesis en estado sólido, este método ofrece partículas de composición más homogénea con formas más regulares, esto se debe principalmente tanto al movimiento y a la presión ejercida sobre los reactivos, favoreciendo a su vez la cinética de reacción. Las principales variables en este proceso de síntesis son el tipo de reactivos, tipo de medio de molienda, el tipo y diámetro de las bolas de molienda, el tipo de atmósfera, la duración de los pasos de molienda y la duración de las pausas, la relación de masa entre el polvo y las bolas de molienda, y la velocidad de rotación. [4] Para este tipo de síntesis se debe mantener la relación estequiométrica $\text{Ca/P}=1.62$, con la finalidad de evitar la formación de otros CaPs, así mismo, también es importante tomar en cuenta el tiempo de molienda, para ello se han reportado periodos de hasta 30 horas con la finalidad de evitar la formación de diferentes

CaPs. A continuación, se muestran algunas reacciones químicas empleadas en la síntesis mecanoquímica a partir de compuestos inorgánicos. ^[4]



En el caso de que se parta de materia orgánica, tal como cascarones de huevo es fácil obtener una hidroxiapatita no estequiométrica, contaminada con otros fosfatos de calcio, sustituida con iones CO_3^{2-} y Mg^{2+} , ya que el 94% de su composición es $CaCO_3$, el 1% es $Ca_3(PO_4)_2$, el 4% es materia orgánica y el 1% es $MgCO_3$. ^{[33] [4]}

3.3.3 Síntesis por precipitación

Entre la gran variedad de métodos en fase acuosa, el método convencional de precipitación química es la forma más simple de obtener fosfatos de calcio de tamaño nanométrico. El método consiste en la mezcla de soluciones con iones fosfato e iones calcio a distintas proporciones estequiométricas y valores de pH, para favorecer la presencia de distintas especies de fosfatos de calcio. ^[34] Este método presenta la desventaja de que es fácil obtener impurezas como fosfatos distintos al deseado, además que es posible obtener como impureza la presencia de productos secundarios de las reacciones químicas, las cuales dependen principalmente de los reactivos empleados.

Se han descrito algunas estrategias para el control de la morfología, tales como el control en la temperatura, velocidad de adición de reactivos, velocidad de agitación, empleo de disolventes, concentración, tensoactivos y viscosantes, sin embargo agregan más variables que pueden dificultar la síntesis. ^[4]

3.3.4 Hidrólisis

Se introduce materia orgánica con iones PO_4^{3-} y Ca^{2+} , o bien reactivos químicos con los mismos iones dentro de un baño que favorezca su redisolución y precipitación en el fosfato de calcio deseado. Para eso se ajusta el baño a un pH y temperatura adecuados, por ejemplo, para la obtención de HA es necesario un pH alcalino que permita la presencia de los iones PO_4^{3-} en solución que puedan reaccionar con el calcio y los iones hidroxilo. Este método no ha sido muy estudiado dado que es muy lento y fácilmente se puede contaminar el producto resultante con otros iones en solución, dando lugar a una apatita sustituida con distintos iones.^[4]

3.3.5 Plasma a presión atmosférica

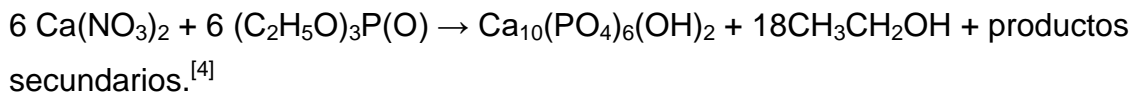
El plasma se considera el cuarto estado de la materia y consiste en la ionización de un gas, donde los átomos se encuentran ionizados mediante altas temperaturas, corrientes eléctricas o radiaciones electromagnéticas. Esta técnica puede ser empleada para la síntesis de distintos materiales, tales como la hidroxiapatita, así como para elaborar recubrimientos con alta adherencia a distintos sustratos. En el caso de realizar recubrimientos con moléculas sensibles a la temperatura, es posible emplear plasmas fríos, los cuales pueden ser generados mediante corriente eléctrica, y un gas ionizable, tal como el helio, el cual, pese a ser un gas difícilmente ionizable produce un plasma muy estable, argón o nitrógeno, los cuales son más fáciles de ionizar, sin embargo, los plasmas son menos estables que los formados con helio. Este gas al ser excitado con la corriente, transfiere su carga a las partículas con las que se desea hacer el recubrimiento, y estas al entrar en contacto con el sustrato se funden y adhieren.^{[25] [35] [36] [37]}

3.3.6 Sol-gel

El método consiste en la obtención de redes inorgánicas tridimensionales, partiendo de mezclas de alcóxidos (u otros precursores adecuados) dispersos en una fase acuosa u orgánica, seguidos de agitación a temperatura ambiente, para que se lleve a cabo una gelación.

En la mayor parte de los casos para la obtención de HA mediante este método se emplean como reactivos dietóxido de calcio o nitrato de calcio con trietilfosfito o trietilfosfato en solución acuosa u orgánica, los alcóxidos se

hidrolizan fácilmente para dar los hidróxido u óxidos y los correspondientes alcoholes. La reacción general es:



Para el recubrimiento de implantes, es necesario introducirlos dentro del gel obtenido y se extrae a velocidad constante para asegurar un recubrimiento uniforme, posteriormente el recubrimiento se seca a temperatura constante y se calcina para eliminar los productos de reacción no deseados como los alcoholes. En ocasiones es necesario lavar el recubrimiento con una solución acidulada para eliminar el óxido de calcio formado.^[4]

3.3.7 Recubrimientos por electrodeposición

El electrodeposición consiste en la obtención de un recubrimiento dentro de una celda electrolítica. En el caso de un recubrimiento con HA, la celda electrolítica está conformada por un electrodo (el implante metálico a recubrir), un contraelectrodo y un electrodo de referencia (p.ej. calomelanos), inmersos en una solución ácida (pH≈4) de fosfatos de calcio.

Para llevar a cabo el recubrimiento, el implante se somete a una señal catódica capaz de reducir el H⁺ presente en la solución, produciendo un aumento en el pH en la interfase del electrodo (Implante), dando lugar a la precipitación de los CaPs en la superficie del implante. Como paso final, el implante recubierto se somete a un tratamiento térmico capaz de transformar los fosfatos de calcio en HA cristalina.^[25]

3.3.8 Recubrimientos por inmersión

Se obtienen recubrimientos homogéneos con esta técnica mediante la inmersión del implante en una dispersión con HA o fosfatos de calcio, la cual puede contener agentes viscosantes como el glicerol que brinden estabilidad a la dispersión y favorezcan la adhesión sobre el implante. Posteriormente el implante es retirado de la dispersión a velocidad constante para después proceder a secar a temperatura constante. Una vez obtenido el recubrimiento

seco se debe calcinar el implante para favorecer la nucleación y adhesión de la HA. [38]

El grosor de las películas formadas con esta técnica se puede modificar con la tensión superficial, la viscosidad de la dispersión y la velocidad con la que se remueve el sustrato a recubrir. [39]

3.3.9 Espray pirolítico

Se conoce como espray pirolítico al método por el cual un espray de una solución o una dispersión líquida se asperja en una flama o una superficie caliente. Éste puede ser generado por ráfaga de aire (líquido expuesto a una fuente de aire), ultrasonido (se expone el líquido a altas frecuencias de ultrasonido) o electrostática (se expone el líquido a una corriente eléctrica elevada). [4] [40] El recubrimiento se puede dividir en la generación del espray, su transporte y descomposición sobre el sustrato.

Dependiendo la temperatura del sustrato pueden ocurrir los siguientes 4 procesos, que se ilustran en la Figura 3:

- **Proceso A.** Temperatura tan baja que las gotas del espray chocan sobre el sustrato y luego sucede la reacción química.
- **Proceso B.** La temperatura del sustrato es lo suficientemente alta como para evaporar el solvente del espray y el precipitado seco impacta sobre el sustrato, donde posteriormente ocurre la reacción química.
- **Proceso C.** La temperatura del sustrato es lo suficientemente alta como para evaporar por completo el disolvente del espray, generando un precipitado que se funde antes de incidir sobre el sustrato, sobre el cual se lleva a cabo la reacción.
- **Proceso D.** La temperatura del sustrato es tan alta que las partículas sólidas se producen tras la evaporación del solvente. La reacción química sucede en fase de vapor.

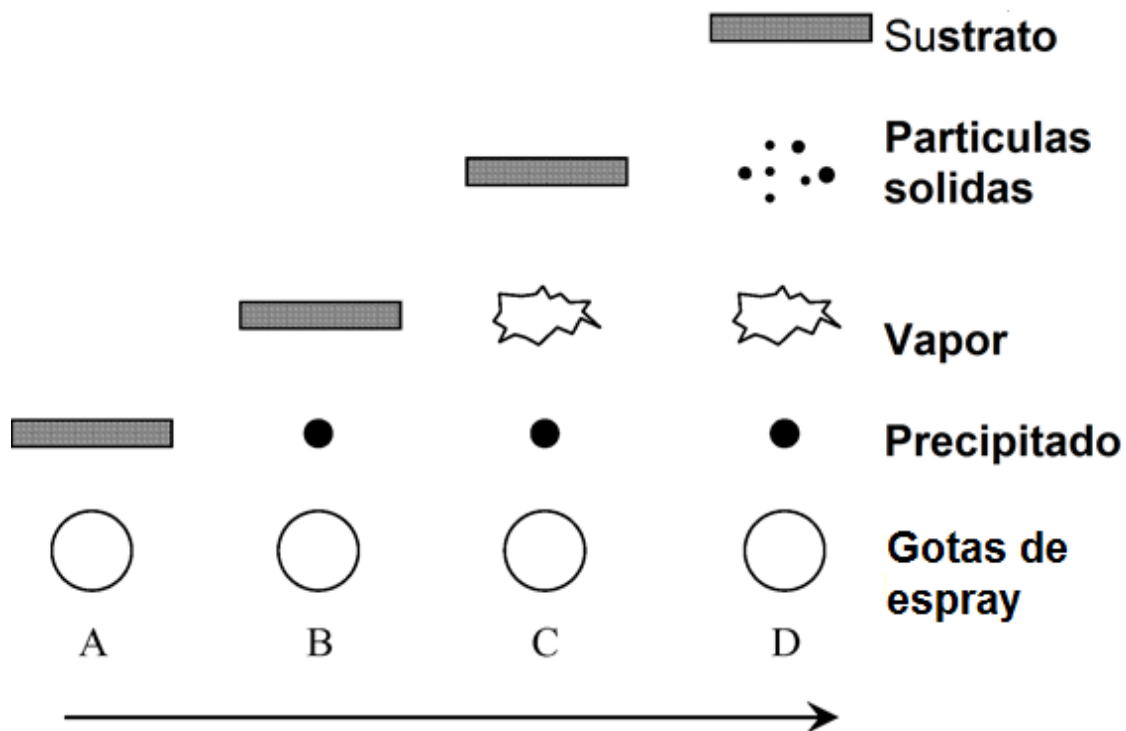


Figura 3. Descripción de los procesos ocurridos durante el depósito a diferentes temperaturas del sustrato.^[40]

Los procesos A, B y C dan origen a depósitos adherente, la única diferencia es que en el A y B la reacción química sucede en fase líquida, y en el proceso C la reacción sucede en fase vapor.^[40]

3.4 Infecciones asociadas a implantes

La principal razón asociada al fracaso de los implantes ortopédicos es el riesgo a infecciones, lo que puede implicar la remoción del implante, la amputación del miembro infectado o hasta la muerte del paciente. En este sentido, las principales fuentes de bacterias infecciosas son el ambiente del quirófano, el equipo quirúrgico, la vestimenta del personal y bacterias residentes del paciente. Las infecciones asociadas a implantes son el resultado de la adhesión de las bacterias sobre la superficie de los implantes, seguida de la formación de un biofilm en el sitio de implantación.^[6]

Recientes estudios proponen el uso de los recubrimientos de HA como un sistema de liberación *in-situ* para antibióticos y sustancias de interés biológico, con la finalidad de prevenir las infecciones y mejorar las propiedades biológicas de los implantes.^[41] Al administrar un fármaco *in-situ* se evitan algunos

problemas de toxicidad y se reducen los tiempos de recuperación, en comparación con la administración sistémica de las mismas sustancias. Esto se debe a que el principio activo no se diluye en el organismo, y en consecuencia no se requieren dosis elevadas. Por otro lado, debido a que la concentración de principio activo en el sitio de acción es elevada se puede reducir el tiempo del tratamiento.^{[9] [42]}

3.5 Quinolonas

Las fluoroquinolonas son antibióticos del grupo de las quinolonas ampliamente utilizados por su amplio espectro. El principal mecanismo de acción asociado a las quinolonas consiste en la inhibición de la topoisomerasa de ADN de tipo II (girasa), lo cual previene el desenrollamiento del DNA y por consiguiente su replicación.^[43] Este grupo de antibióticos son el resultado de la modificación del núcleo quinolona, al cual se le adicionó un átomo de flúor en la posición 6, lo cual, al igual que otras modificaciones, brinda un amplio espectro de acción, comparado con sus predecesores, tales como el ácido nalidíxico.^[44] En la figura 4, se muestra la diferencia estructural entre la molécula del ácido nalidíxico, y las fluoroquinolonas ciprofloxacino y enrofloxacino, de interés médico y veterinario respectivamente.

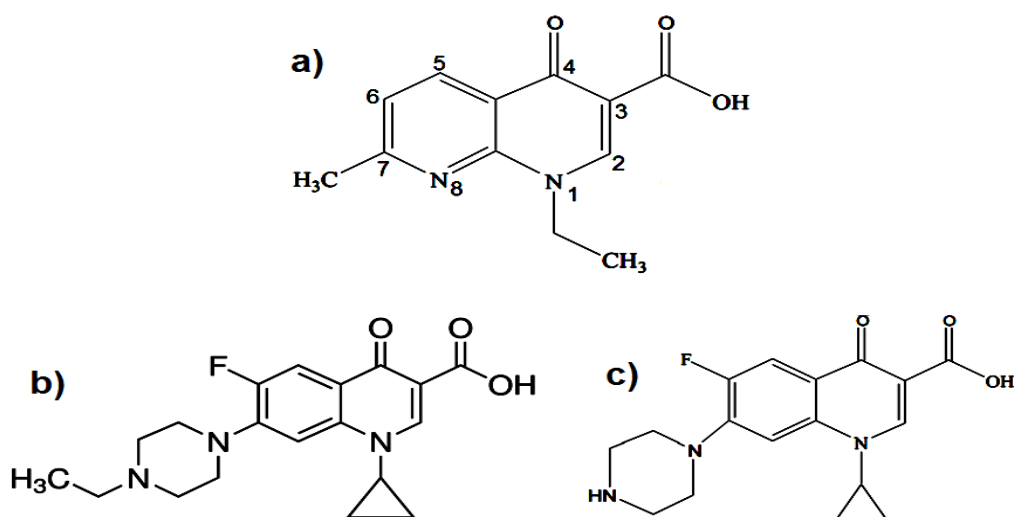


Figura 4. a) Ácido nalidíxico b) Enrofloxacino c) Ciprofloxacino

Debido a su amplio espectro y su capacidad de penetrar huesos, el ciprofloxacino y otras quinolonas son fármacos de elección para tratar y

prevenir infecciones óseas.^[8] El ciprofloxacino tiene una concentración mínima inhibitoria de 0.25 a 2 µg/mL sobre patógenos asociados a osteomielitis, tales como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*. Como medida profiláctica postquirúrgica se administra una sola dosis de 400mg de este fármaco por vía intravenosa, alcanzando una concentración plasmática de 3.7µg y 0.2µg a los 30 minutos y 12 horas respectivamente; en ocasiones, por cirugías largas y la alta exposición a patógenos, es necesario prolongar el tratamiento, lo que aumenta el riesgo a efectos tóxicos en el paciente.^[45]

La administración *in situ* de antibióticos puede producir concentraciones de antibiótico entre 10-100 veces superior a la concentración inhibitoria de microorganismos en el sitio de acción.^[46] Se ha demostrado que la exposición prolongada a concentraciones elevadas de ciprofloxacino puede generar efectos indeseados durante la remineralización ósea, afectando primordialmente a los osteoblastos,^[47] por esta razón es necesario regular la cantidad de ciprofloxacino administrada y la liberación del mismo.

3.6 Sistemas de liberación de fármacos

Se define como medicamento o forma farmacéutica a aquella formulación farmacéutica que contiene uno o más principios activos, destinada al diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades o síntomas. El concepto formulación se introdujo tras observar que rara vez los medicamentos se conforman únicamente de las sustancias activas.^[48]

La implementación de una terapia racional consiste en adecuar la administración de los medicamentos dependiendo de las necesidades, optimizando la frecuencia de dosificación y las cantidades de principios activos, para curar o controlar un estado patológico. Esto supone que bajo algunas circunstancias debe haber una liberación en un corto periodo, mientras que en otras situaciones debe controlarse el periodo de tiempo y el sitio de liberación.^[42]

Las formas farmacéuticas convencionales se limitan a la administración de grandes cantidades de fármacos a nivel sistémico, de los cuales solo una pequeña fracción ejerce su efecto y el resto se excreta. Adicionalmente, estas

formas farmacéuticas se asocian a una gran serie de inconvenientes, los cuales están íntimamente ligados a las fluctuaciones en la concentración del fármaco dentro del organismo (concentración plasmática), lo cual expone al paciente a sobredosis y dosis inferiores a las requeridas.^[48] En ocasiones es necesario el empleo de sustancias terapéuticas con vida media corta dentro del organismo, lo cual hace necesario el empleo de regímenes de administración incómodos para el paciente, capaces de provocar el incumplimiento en el tratamiento y en consecuencia el fallo terapéutico.^{[42] [48]}

Un sistema de liberación modificada se puede definir como una forma farmacéutica capaz de liberar el principio activo en sitios y tiempos diferentes a una forma farmacéutica convencional. Con este propósito ha sido necesario el desarrollo de un enfoque multidisciplinario entre la ingeniería y la ciencia de los polímeros; sin embargo, el principal problema en estas formas farmacéuticas es la gran variabilidad del efecto que pueden producir entre pacientes. Por lo tanto muchos productos de liberación modificada no son sistemas de liberación controlada ideales.^[48]

Con el avance en los sistemas de liberación controlada han surgido clasificaciones que especifican la manera en la que se libera el principio activo (API), y cómo se logra; algunas de estas clasificaciones se mencionan en la tabla 2.

Tabla 2. Sistemas de liberación controlada.

Clasificación	Características
Sistemas de liberación retardada	La liberación no ocurre inmediatamente; sucede transcurrido un tiempo del medicamento en el organismo.
Sistemas con acción repetida	El API se libera en distintas dosis de manera intermitente.
Sistemas de liberación prolongada	La liberación ocurre de manera más lenta que en una forma farmacéutica convencional.
Sistemas de liberación sostenida	Estos sistemas aseguran una liberación inicial capaz de ejercer un efecto terapéutico pronto, seguido de una liberación gradual por un periodo prolongado.
Liberación extendida	La liberación en estos sistemas ocurre de manera lenta, manteniendo la concentración plasmática del principio activo dentro de un nivel terapéutico por un periodo de tiempo prolongado.

El objetivo de los sistemas de liberación controlada es la liberación precisa de pequeñas cantidades de fármaco dentro de zonas ubicadas de manera específica en el cuerpo, con el fin de optimizar el tratamiento. Para la selección y desarrollo de un sistema eficiente es necesario conocer las propiedades del fármaco y su concentración deseada en el plasma o sitio de acción.^{[48] [49]}

Los sistemas de liberación dirigida, a comparación de los sistemas de liberación convencional, son capaces de reducir los efectos colaterales, disminuir la toxicidad de los fármacos, evitar el metabolismo de primer paso (previenen la degradación), incrementar la biodisponibilidad, reducir las fluctuaciones en la concentración en el sitio de acción, aumentar la permeabilidad de moléculas grandes como proteínas y péptidos, y disminuir la frecuencia de administración disminuyendo los costos del tratamiento.^[49]

En esta tesis se elaboraron y caracterizaron recubrimientos nanoestructurados de hidroxiapatita, haciendo uso de la técnica de spray pirolítico asistido por ultrasonido, los cuales se cargaron con enrofloxacino, una molécula análoga al ciprofloxacino, el cual como ya se mencionó con anterioridad, es de los fármacos de elección en la prevención de infecciones óseas. Para llevar a cabo la carga con enrofloxacino se emplearon las técnicas de centrifugación, plasma a presión atmosférica e inmersión.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Elaborar depósitos nanoestructurados de hidroxiapatita mediante la técnica de spray pirolítico asistido por ultrasonido, y caracterizarlos mediante espectroscopia de infrarrojo, microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión y difracción de rayos X, para su posterior carga con una fluoroquinolona y evaluar la liberación del fármaco en estos sistemas.

4.2 Objetivos particulares

- 1) Determinar el efecto del pH en la mezcla de soluciones precursoras con iones calcio y fosfato para la obtención de depósitos de hidroxiapatita mediante la técnica spray pirolítico asistido por ultrasonido.
- 2) Elaborar fosfatos de calcio mediante precipitación, conocer su composición mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier y emplearlos para elaborar depósitos mediante la técnica spray pirolítico asistido por ultrasonido para conocer su composición y morfología.
- 3) Caracterizar los recubrimientos obtenidos mediante microscopía electrónica de barrido, microscopía electrónica de transmisión, difracción de rayos X y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier.
- 4) Llevar a cabo la incorporación de enrofloxacino en los depósitos de hidroxiapatita con mejores propiedades fisicoquímicas, haciendo uso de las técnicas de carga por inmersión, centrifugación y plasma a presión atmosférica.
- 5) Evaluar el perfil de liberación para el antibiótico cargado en los depósitos.

5. Hipótesis de trabajo

Mediante la técnica spray pirolítico asistido por ultrasonido se obtendrán recubrimientos con nanopartículas de hidroxiapatita, los cuales gracias a sus propiedades fisicoquímicas podrán retener enrofloxacino, y liberarlo en su totalidad en los ensayos de liberación.

6. Metodología

6.1 Materiales

Fosfato de sodio dibásico anhidro (Na_2HPO_4 , pureza 99.8%), ácido clorhídrico (HCl, pureza 36.5-38%), alcohol etílico absoluto ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, pureza 99.8%), fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4 pureza>99.9%) adquiridos de J.T. Baker (Edo. Méx, Méx), cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, pureza >99.5%) obtenido de Merck (Edo. Méx., Méx.), cloruro de potasio (KCl, pureza >99.9%), alcohol isopropílico ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$, pureza>99%) adquiridos de Omnicem (Puebla, PUE, México); cloruro de sodio Q.P. (NaCl, pureza>99%), hidróxido de sodio (NaOH, pureza \geq 95%), acetona Q.P. ($(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, pureza 99%) adquiridos de distribuidora química ALVI (Edo. Méx, Méx.); hexano Q.P. (C_6H_{14}) adquirido de Química Rique (Edo. Mex, Méx); enrofloxacino, adquirido de BasicosFeed Grade (CDMX, Méx); grasa de alto vacío adquirida de Dow Corning (Midland USA); agua desionizada obtenida de un equipo NanopureDiamond (Barnstead ®); hidroxiapatita bovina amablemente donada por Bio CeramicsLab; Membranas de diálisis de 12-14KDa spectra/por 4, adquiridas de Fisher scientific (Broadwick Street, USA)

6.2 Métodos de análisis

6.2.1 Microscopia electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión

El tamaño y la morfología de los depósitos se observó empleando un equipo Jeol ARM-200F, operado a 200 kV.

Para la caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) el material de depósito se dispersó en etanol y se sonicó por 30 minutos para evitar su agregado.

6.2.2 Difracción de rayos X (XRD)

Se obtuvo información sobre la cristalinidad del material de recubrimiento, así como de la identidad de este con un equipo difractómetro Bruker AXS, D8 Advance, usando radiación $\text{K}\alpha\text{-Cu}$ a 1.54\AA , en un intervalo 2θ de 5° a 70° . La identificación estructural se llevó a cabo con el programa MATCH®.

6.2.3 Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier

Para este análisis se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo por transformada de Fourier Perkin Elmer UATR (FT-IR Spectrometer) con un intervalo de 4000-500 cm^{-1} y una resolución espectral de 1 cm^{-1} . Se empleó como fondo la señal de un disco de diamante. Para llevar a cabo la caracterización de los depósitos, estos se rasparon con una espátula y el material desprendido se analizó.

6.2.4 Espectroscopía de Ultravioleta

Para las cuantificaciones de antibiótico se empleó un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-Visible, UV-Visible Chemstation, empleando una celda de cuarzo.

6.3 Spray pirolítico asistido por ultrasonido

Este equipo se ensambló y diseñó en el laboratorio, con este propósito se probaron distintos arreglos para modificar el flujo del spray y con ello asegurar que este llegara a la superficie del sustrato calentado a 500°C, e inmediatamente se genere el recubrimiento. Dentro de los primeros arreglos que se hicieron, fue la adaptación de una chaqueta térmica a lo largo del ducto que transfiere el spray hasta el sustrato, con el propósito de evitar la condensación de la neblina. Otra consideración que se tomó fue la necesidad de suministrar el gas de arrastre, que en este caso fue aire, a través de dos entradas del equipo, para favorecer la llegada de la neblina de manera eficiente hasta la superficie de los sustratos, y permitir así la formación de una película uniforme de hidroxiapatita, ya que se observó que al suministrar gas de arrastre en una sola entrada, el spray no llega con la fuerza suficiente a los sustratos, evaporándose así todo el disolvente antes de llegar a los sustratos a recubrir, por lo que se produjo un recubrimiento heterogéneo y poco adherente. El equipo final ensamblado para la generación de depósitos de hidroxiapatita se muestra en la figura 5. ^[40]

En la primera entrada de aire del equipo (4) de spray pirolítico asistido por ultrasonido, se suministró un flujo de aire de $\approx 52.67 \text{ mL/s}$, con una bomba KNF LABPORT, en la segunda entrada se suministró un flujo de $\approx 485.32 \text{ mL/s}$, con ayuda de una bomba BuchiV-700. Para generar el spray que dará lugar a la formación de hidroxiapatita, se utilizó un nebulizador Vitallys plus de 60Hz. De

esta manera el gas de arrastre entra por (4) y arrastra la neblina producida con el disolvente y reactivos empleando ultrasonido y es conducida en el sistema a 120 °C para evitar la condensación hasta la boquilla de salida que se orienta hacia la parrilla a 500 °C.

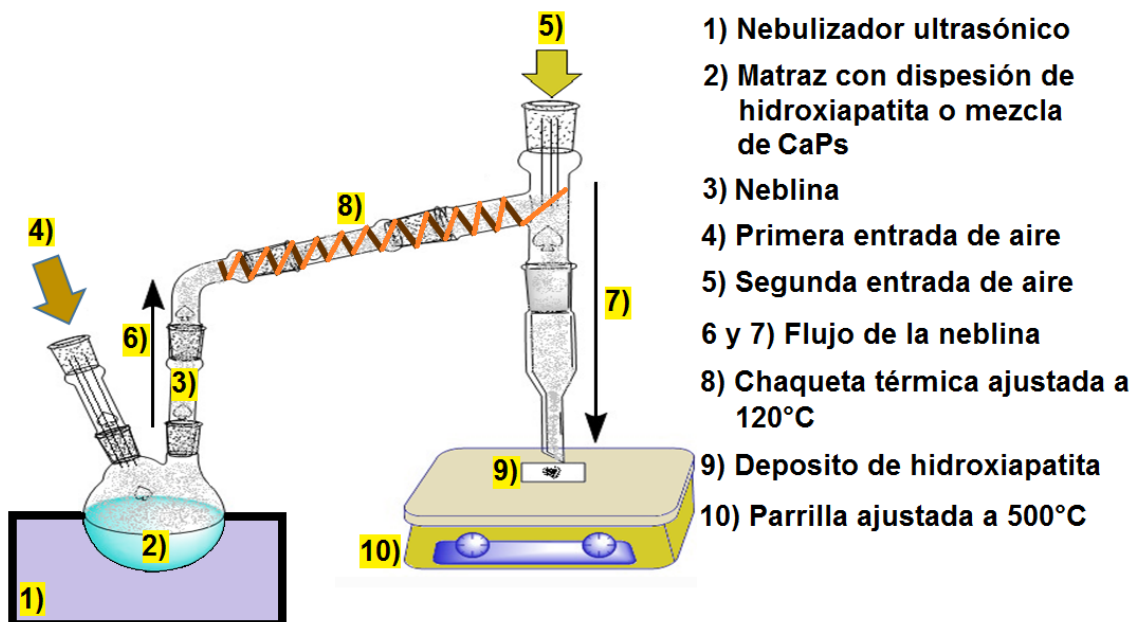


Figura 5. Equipo de spray pirolítico asistido por ultrasonido.

6.4 Síntesis de fosfatos de calcio

CaP-1

Se prepararon 500mL de una solución de cloruro de calcio 0.1M y 500mL de fosfato de sodio dibásico 0.06M. La solución de cloruro de calcio se mantuvo bajo agitación constante y se adicionó lentamente la solución de fosfato de sodio dibásico (0.06M), posteriormente se agregó hidróxido de sodio 1M hasta ajustar el pH a un valor de 10. Esta mezcla se mantuvo bajo agitación por 2 días; se midió el pH final y se filtró el precipitado, para después enjuagarlo con agua desionizada y eliminar impurezas. El precipitado enjuagado se secó a 60 °C y 20 mPA, y posteriormente se trituró en mortero. El polvo resultante (CaP-1) se estudió mediante espectroscopía de infrarrojo FT-IR para determinar su composición química.

CaP-2

Al igual que en la síntesis anterior se mezclaron 500 mL de soluciones de cloruro de calcio y fosfato dibásico de sodio 0.1 M y 0.06 M respectivamente,

posteriormente se midió el pH inicial de la mezcla y se agitó durante 2 días. Concluido este tiempo se midió el pH final de la mezcla y se procedió a filtrar el precipitado, para lavarlo con agua desionizada y eliminar impurezas. El filtrado se dejó secar a 60°C y 20 mPa, y se trituroó en mortero. Se determinó la composición química del polvo obtenido (CaP-2) mediante espectroscopía de infrarrojo FT-IR.

6.5 Obtención de depósitos

Control:

Se preparó una mezcla acuosa de hidroxiapatita bovina (HAB) de 1.2 mg/mL, la cual se dispersó por ultrasonido durante una hora. A partir de esta dispersión se preparó un recubrimiento de 10 minutos mediante la técnica de spray pirolítico asistido por ultrasonido, para analizarlo por SEM, y otros depósitos de 50 minutos para analizarlos por XRD, FT-IR y TEM.

REC-1:

Se preparó una mezcla acuosa de 1.2 mg/mL de CaP-1, la cual se dispersó mediante ultrasonido durante una hora. Con la dispersión generada se realizaron depósitos de 10 minutos para el análisis por SEM y 50 minutos para el análisis por XRD, TEM y FT-IR.

REC-2:

Se preparó una mezcla acuosa de 1.2 mg/mL de CaP-2, la cual se dispersó mediante ultrasonido durante una hora. Con la dispersión generada se realizaron depósitos de 10 minutos para el análisis por SEM, y 50 minutos para el análisis por XRD, TEM y FT-IR.

REC-3:

Se sometió a agitación constante 175mL de una solución de cloruro de calcio $2.4 \cdot 10^{-2}$ M y se adicionó lentamente 175mL de una solución de fosfato de sodio dibásico $1.44 \cdot 10^{-2}$ M. Posteriormente la dispersión se ajustó a pH = 10 con NaOH 0.1 N y se sometió a un baño ultrasónico por 1 hora. La dispersión

resultante se empleó en la obtención de recubrimientos de 10 minutos para ser estudiados por SEM y 50 minutos para TEM, FT-IR y XRD.

REC-4:

Se mezclaron mediante agitación constante 175 mL de una solución de cloruro de calcio $2.4 \cdot 10^{-2}$ M con 175 mL de una solución de fosfato de sodio dibásico $1.44 \cdot 10^{-2}$ M, la cual se agregó lentamente. La mezcla resultante se sonicó durante 1 hora y se empleó para generar recubrimientos de 10 minutos para el análisis de SEM y 50 minutos para los análisis de TEM, FT-IR y XRD.

REC-5:

Se mezclaron bajo agitación constante 175 mL de una solución de cloruro de calcio $2.4 \cdot 10^{-2}$ M y 175 mL de una solución de fosfato de sodio dibásico $1.44 \cdot 10^{-2}$ M. Posteriormente se agregó gota a gota HCl 0.1 N hasta disolver el precipitado. La solución generada se utilizó para obtener depósitos de 10 minutos para el análisis de SEM y 50 minutos para los análisis de TEM, FT-IR y XRD.

6.6 Cargas con enrofloxacino

A partir de los depósitos previamente elaborados y caracterizados se seleccionó el control y aquellos con mejores propiedades físicas y químicas para elaborar depósitos de 30 minutos sobre sustratos de cuarzo. Posteriormente estos depósitos se cargaron con enrofloxacino (ENR).

6.6.1 Carga por inmersión:

La carga con antibiótico se llevó a cabo por triplicado tanto con los depósitos control de hidroxiapatita, como con los depósitos de hidroxiapatita seleccionados a lo largo del estudio.

Se tomaron 2 cuarzos con depósito de hidroxiapatita y se pegaron del lado sin recubrimiento con ayuda de grasa de alto vacío, tal como se muestra en la figura 6 (a y b). Posteriormente se introdujeron dentro de 2 mL de una solución etanólica de enrofloxacino (2.5 mg/mL), la cual con anterioridad se atemperó a 25°C en un baño maría (Figura 6c), y se sometieron durante 10 minutos

(Tiempo previamente estandarizado donde se demuestra que no hay desorción del fármaco ni desprendimiento del recubrimiento de hidroxiapatita) a una agitación constante de 100 RPM con ayuda de un agitador digital rotatorio (DSR) tal como se observa en la figura 6 (d y e). Una vez transcurridos los 10 minutos de agitación se retiraron los depósitos de la solución de enrofloxacin y se retiró el excedente con ayuda de 10 mL de agua desionizada, para proceder a secarlos bajo presión reducida a 60°C.

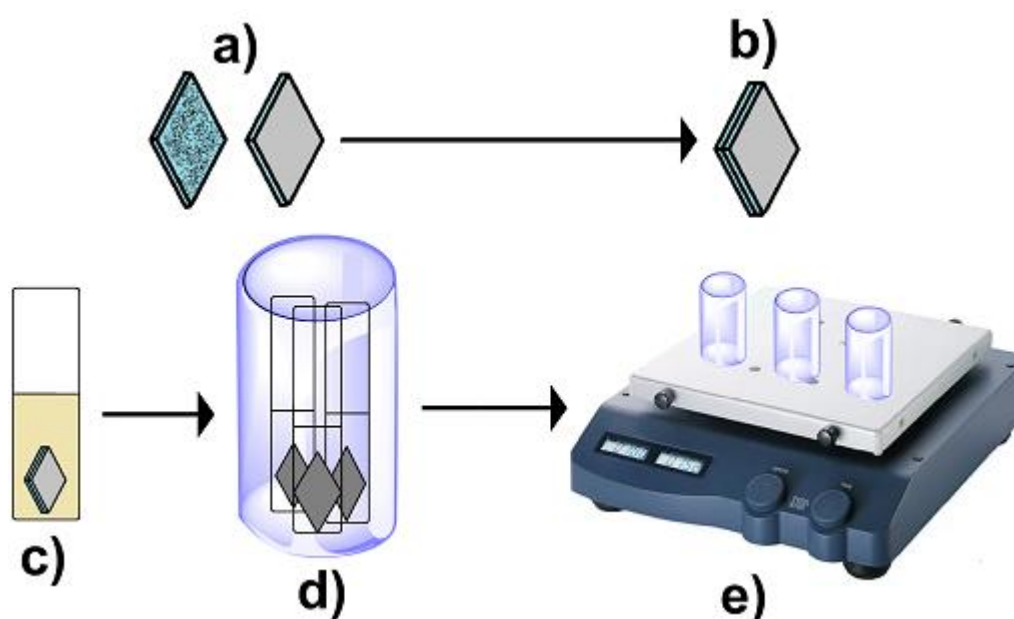


Figura 6. Carga de antibiótico por inmersión. a) Pegado de los depósitos del lado libre de recubrimiento con hidroxiapatita. b) depósitos pegados. c) Inmersión de depósitos en 2 mL de enrofloxacin, 2.5 mg/mL, a 25°C. d) Introducción de viales con depósitos en un baño María a 25°C. e) Agitación de los depósitos a 100 RPM.

6.6.2 Carga por centrifugación:

Para aplicar esta metodología, previamente se observó que es necesario modificar la velocidad de rotación de los depósitos para asegurar un recubrimiento con la máxima cantidad posible de antibiótico. Por tal motivo en esta metodología se sujetaron los depósitos sobre una superficie rotatoria, la cual se ajustó a 3050 RPM. Posteriormente con ayuda de una micropipeta se suministraron 50 μL de una solución de enrofloxacin 2.5

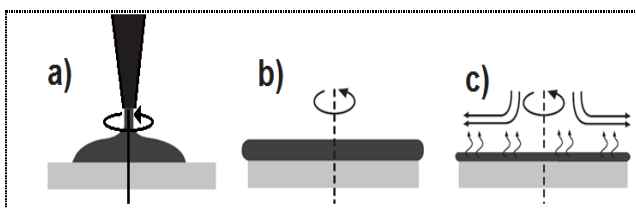


Figura 7. Recubrimiento por centrifugación:

- Aplicación de 50 μL de solución de enrofloxacin sobre el depósito girando a 3500 RPM.
- Aumento en la velocidad del depósito a 4800 RPM, y formación de una película homogénea de enrofloxacin.
- Evaporación del etanol.

mg/mL en el centro de la superficie del sustrato rotatorio, e inmediatamente se cambió la velocidad de rotación al depósito a 4800 RPM. Tras modificar la velocidad del depósito, se dio un lapso de 1 minuto de centrifugación, para permitir la evaporación del disolvente en su superficie, y una vez transcurrido este tiempo, se regresó la velocidad de rotación a 3050 RPM al sustrato y se aplicó nuevamente 50 μL de la solución de enrofloxacin, y de igual modo se cambió la velocidad de rotación a 4800 RPM, dicho proceso se repitió hasta completar 8 capas con la solución de enrofloxacin, dado que previamente se validó que la mayor cantidad de antibiótico retenido se obtiene tras aplicar 8 capas de antibiótico sobre los depósitos. El procedimiento para la carga con antibiótico por centrifugación se ilustra en la figura 7.

La carga de antibiótico mediante este método se realizó por triplicado, tanto con el recubrimiento control de hidroxiapatita bovina, como con los depósitos de hidroxiapatita seleccionados tras la caracterización de REC-1, REC-2, REC-3, REC-4 y REC-5. Una vez recubiertos los depósitos, se calentaron a 300°C por 2 horas para fundir el antibiótico y mejorar su interacción con la hidroxiapatita.

6.6.3 Carga mediante plasma a presión atmosférica:

Se montó un equipo de plasma a presión atmosférica (PPA) como el que se muestra en la figura 8. Dentro del matraz del nebulizador se agregó una solución etanólica de ENR (2.5 mg/mL). La neblina generada, se transportó con gas argón a través de un ducto a 90°C (para evitar su condensación) hasta la superficie de los depósitos. Se suministró gas argón a través de un ducto intermedio Fig. 8.6), hasta una boquilla con dos electrodos de cobre, a los que se les aplicó alto voltaje (50 kV) sinusoidal de 32 kHz para ionizar el argón y generar el plasma encargado de excitar las moléculas de enrofloxacin y la superficie del depósito, y de esta manera mejorar la interacción entre ambas.

Se realizó la carga de enrofloxacin con el PPA por triplicado sobre los depósitos control, y los depósitos de hidroxiapatita seleccionados tras la caracterización de REC-1, REC-2, REC-3, REC-4, REC-5, haciendo incidir el plasma sobre 9 puntos diferentes del depósito por 30 segundos, tal como se muestra en la figura 8.

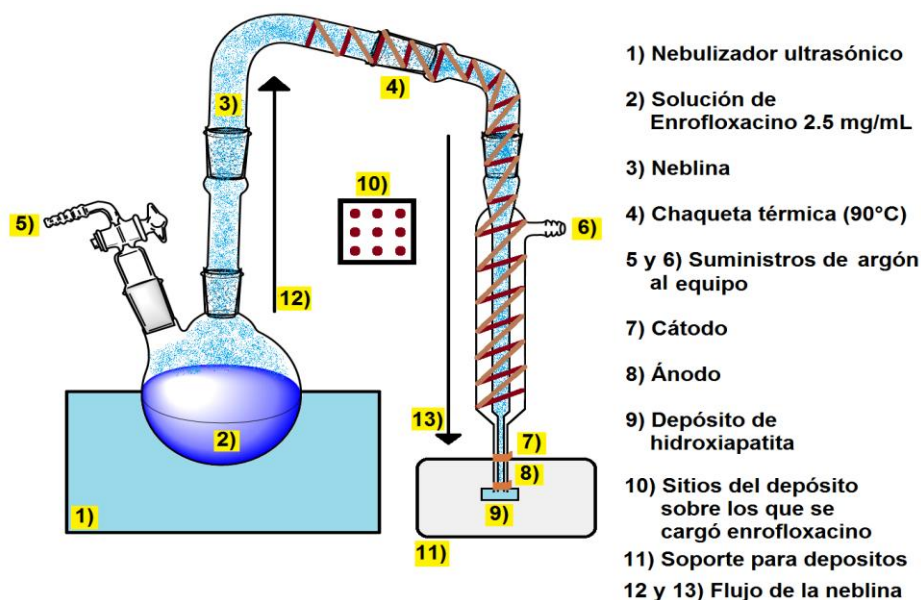


Figura 8. Equipo empleado para cargar por PPA

6.7 Cuantificación del enrofloxacinó cargado en los recubrimientos

La cuantificación de antibiótico se llevó a cabo por triplicado, mediante la disolución de los depósitos cargados con enrofloxacinó, en 2 mL de HCl 1M (preparado en agua:etanol (1:1)) y las soluciones resultantes se transfirieron a matraces volumétrico de 10 mL, donde se completó el volumen con una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y etanol 3:2, a pH=7.4, y se determinó por espectroscopía de UV la cantidad de antibiótico presente en cada depósito.

Para el caso de los depósitos cargados con enrofloxacinó por inmersión, se sacó el promedio de antibiótico cargado en los 2 depósitos pegados con grasa de alto vacío.

6.8 Evaluación de la liberación del antibiótico

Se evaluó el perfil de liberación para cada depósito cargado con enrofloxacinó por triplicado. Con esta finalidad se empleó como medio de disolución una mezcla de PBS y etanol con la proporción 3:2, dicha mezcla se ajustó a pH 7.4 y 37°C.

Para cada ensayo de liberación se pegó un par de depósitos con grasa de alto vacío por el lado sin recubrimiento de hidroxiapatita con antibiótico (tal como se describe con anterioridad para la carga por inmersión) y se introdujeron en una bolsa de diálisis Spectrapor 4, rellena con 4 mL del medio, posteriormente se selló la bolsa con hilo de nylon y se introdujo en un recipiente con 13 mL de la solución de PBS:Etanol bajo agitación constante, así como se muestra en la figura 9.

Para determinar la cantidad de fármaco liberado se tomaron alícuotas de 2 mL, con reposición constante del medio, durante 38 horas (10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 1440, 1560 y 1680 minutos). Finalmente se cuantificó por espectroscopía de UV a 277nm, el antibiótico liberado. Los datos obtenidos se analizaron con diferentes modelos de liberación mediante el macro DDSolver 1.0 para Excel para obtener más información acerca de la interacción entre el fármaco y los depósitos, así como el mecanismo de liberación.

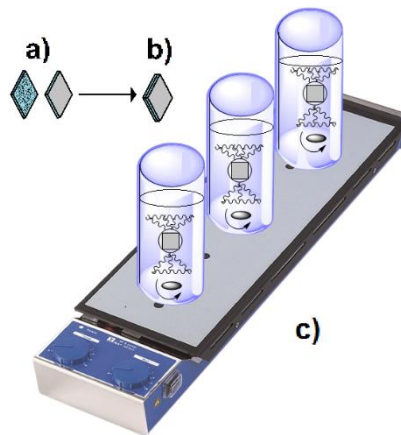


Figura 9.

- a) Pegado de sustratos con hidroxiapatita cargada con enrofloxacin
- b) Cuarzos adheridos
- c) Liberación de antibiótico en membranas de diálisis a 37°C

7. Resultados y discusión

7.1 Síntesis y caracterización del depósito control de hidroxiapatita bovina

Para la síntesis de estos depósitos, se partió de hidroxiapatita bovina amablemente donada por Bio CeramicsLab, la cual se dispersó y homogeneizó por ultrasonido, para tener una mezcla fácilmente nebulizable en el equipo de spray pirolítico asistido por ultrasonido.

7.1.1 Caracterización por FT-IR

Tras realizar los depósitos con hidroxiapatita bovina, con ayuda de una espátula se desprendió el material de recubrimiento y se analizó su composición por espectroscopía FT-IR. El espectro de infrarrojo se muestra en la figura 10, donde es posible observar el espectro característico de la hidroxiapatita con las señales descritas en la tabla 3. Este resultado es el esperado puesto que la hidroxiapatita es un fosfato de calcio bastante estable, y durante el proceso de recubrimiento no se supera la temperatura crítica necesaria para su descomposición, haciendo los recubrimientos a partir de hidroxiapatita dispersa en agua sobre sustratos de cuarzo a 500°C. En la literatura se reporta la pérdida gradual de los iones hidroxilo en la estructura de la hidroxiapatita a partir de los 650°C, y a temperaturas superiores a 1350°C esta se descompone en distintos fosfatos de calcio amorfos, tales como el beta trifosfato de calcio. [50] [51]

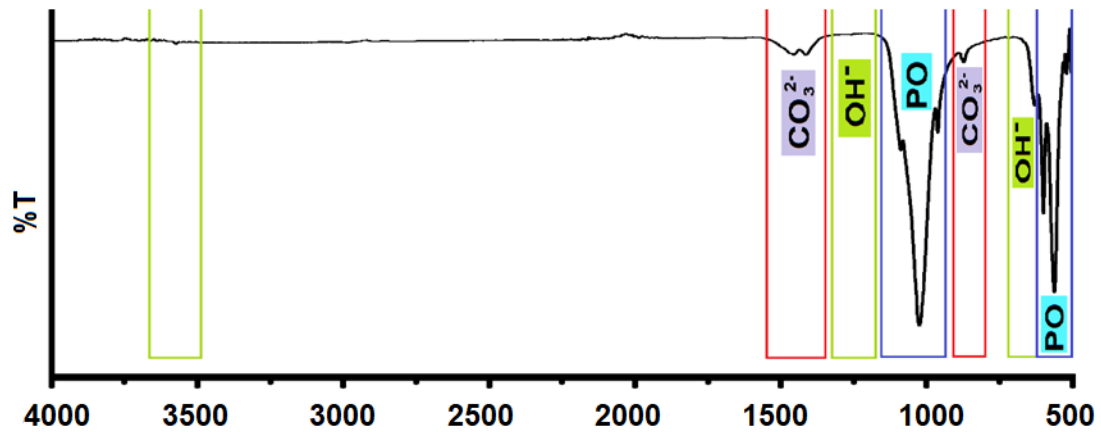


Figura 10. Espectro de IR para el material de depósito en los recubrimientos con hidroxiapatita bovina.

Tabla 3. Bandas características de la hidroxiapatita ^{[52] [53] [54] [55] [56]}

Hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)	
Banda	Grupo funcional correspondiente
3573 cm^{-1}	OH estiramiento
631 cm^{-1}	OH estiramiento
1090 cm^{-1}	Estiramiento [$\nu_3 PO_4^{3-}$]
1027 cm^{-1}	Estiramiento [$\nu_3 PO_4^{3-}$]
963 cm^{-1}	Estiramiento simétrico [PO_4^{3-}]
563 cm^{-1}	Flexión [$\nu_4 PO_4^{3-}$]
1455 cm^{-1}	Estiramiento asimétrico [$\nu_3 CO_3^{2-}$]*
1414 cm^{-1}	Estiramiento asimétrico [$\nu_3 CO_3^{2-}$]*
872 cm^{-1}	Flexión asimétrica [$\nu_2 CO_3^{2-}$]*
*Sustitución de iones por grupos carbonato [CO_3^{2-}]	

7.1.2 Caracterización por difracción de rayos X

Para corroborar la composición de los depósitos control realizados con hidroxiapatita bovina, estos se analizaron por difracción de rayos X, obteniendo el difractograma de la figura 11, y que con ayuda del programa Match [®], comparándolo con la base de datos de referencia COD, se corrobora que la hidroxiapatita bovina una vez depositada sobre los sustratos de cuarzo se mantiene estable, debido a la presencia de sus reflexiones características en $2\theta = 25.9, 31.62, 32.22$ y 32.5 , correspondientes a los índices de Miller (hkl) (0,0,2), (1,2,1), (1,1,2) y (3,0,0) respectivamente.

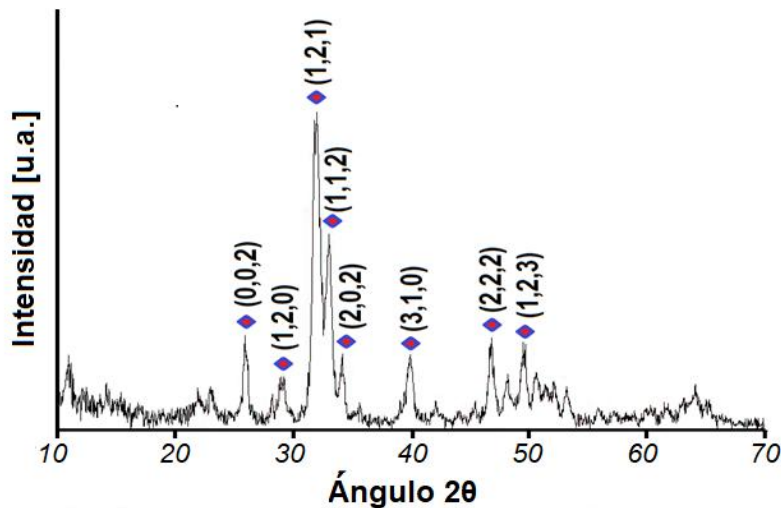


Figura 11. Difractograma de Rayos X para los depósitos control de hidroxiapatita bovina.

7.1.3 Caracterización por microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión

Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se obtuvo información respecto a la morfología de los depósitos control elaborados a partir de hidroxiapatita bovina, la cual se muestra en la figura 12. Aquí es posible observar un recubrimiento homogéneo generado por la fusión de las partículas dispersadas por el equipo de spray pirolítico sobre los sustratos.

Esta información se complementa con los resultados obtenidos por microscopía electrónica de transmisión (TEM), en la figura 13a se observa que las partículas fusionadas en el recubrimiento presentan una morfología esferoide, cuya distribución de tamaño se muestra en la figura 14 y oscila entre los 10 y 55 nm, encontrándose en su mayoría partículas de entre 20 y 30 nm.

Este resultado es de esperarse, ya que, haciendo uso de la misma técnica para la obtención de depósitos de hidroxiapatita, en la literatura se han encontrado casos similares de recubrimientos de nanopartículas esferoides, las cuales se funden y aglomeran conforme se genera el depósito mediante la técnica de spray pirolítico asistido por ultrasonido. ^[57] ^[58]

Por otro lado, a partir de la indexación de los patrones de difracción electrónica mostrada en la figura 13b es posible corroborar que el material de recubrimiento es hidroxiapatita debido a las reflexiones correspondientes a los planos (102), (312) y (210), y un eje de zona en $[2,4,1]$. ^[58] ^[59] ^[60]

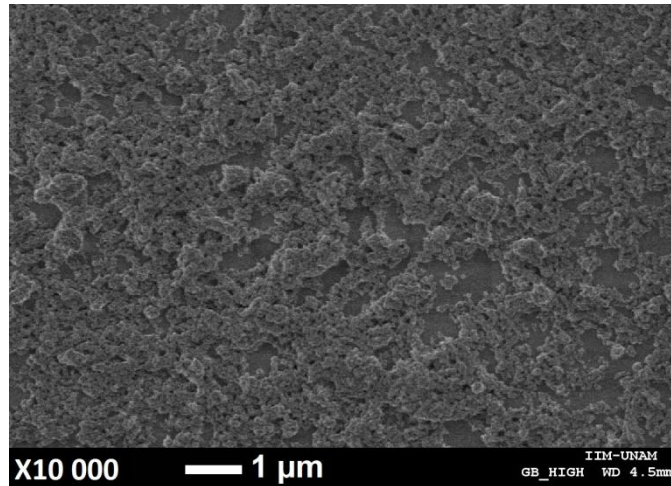


Figura 12. Micrografía SEM de depósitos control

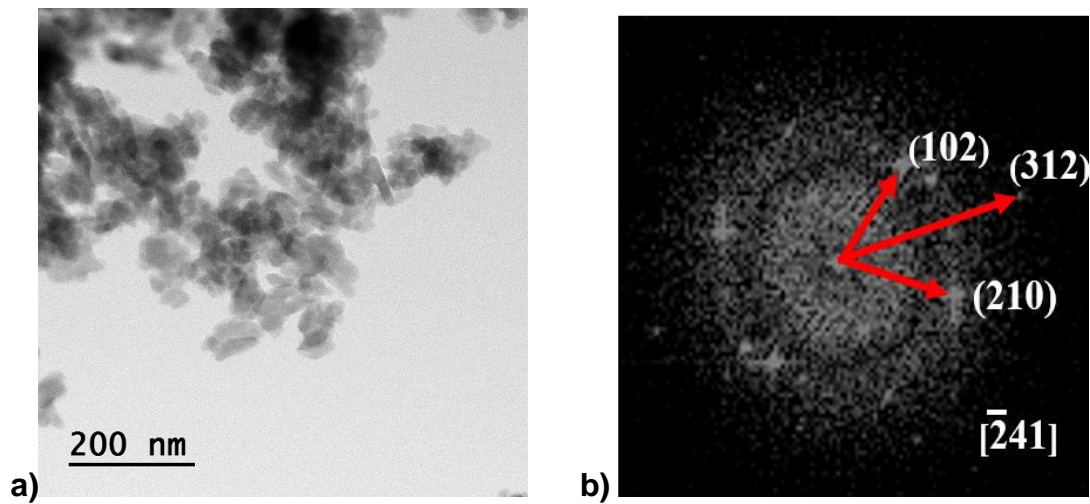


Figura 13. Micrografía de TEM de los depósitos control (a) y su patrón de difracción indexado (b).

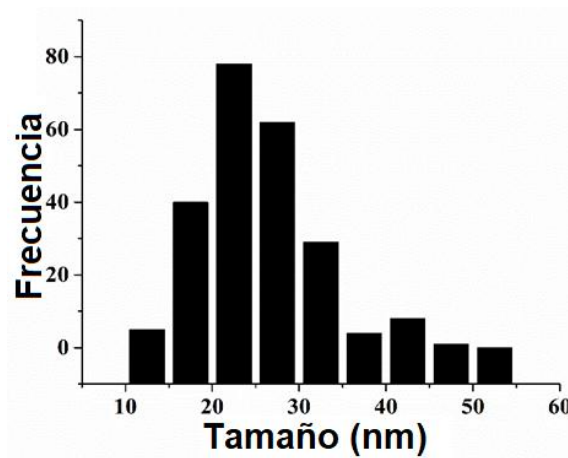


Figura 14. Histograma con la distribución del tamaño de partículas de hidroxiapatita presentes en el depósito control.

7.2 Síntesis de fosfatos de calcio en fase acuosa y su caracterización.

Con la finalidad de elaborar depósitos a partir de fosfatos de calcio previamente sintetizados y analizar la posibilidad de obtener hidroxiapatita a partir de ellos haciendo uso de la técnica de spray pirolítico asistido por ultrasonido, se llevó a cabo su síntesis mediante precipitación en fase acuosa mezclando fosfato de sodio dibásico y cloruro de calcio en solución manteniendo la relación estequiométrica Ca/P=1.67 correspondiente a la hidroxiapatita, para esto, la reacción se realizó a pH=10 y pH≈5.68 (pH control, sin agregar NaOH), etiquetándose estos fosfatos de calcio como CaP-1 y CaP-2 respectivamente.

En la tabla 4, se muestra el seguimiento de las condiciones de pH bajo las que se llevó a cabo la síntesis de ambos CaP, donde es posible observar la disminución en el pH en las mezclas acuosas, esto se explica mediante la siguiente reacción, donde se genera ácido clorhídrico tras la formación de hidroxiapatita.

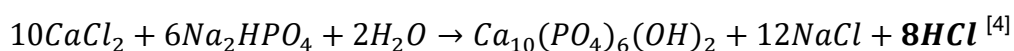


Tabla 4. Mediciones de pH antes y después de la formación del CaP.

	CaP-1	CaP-2
pH inicial	10	5.68
pH final	9.78	4.88

Una vez sintetizados, lavados y secados los fosfatos de calcio CaP-1 y CaP-2, se determinó su composición química mediante espectroscopía de infrarrojo FT-IR, los resultados se muestran en la figura 15 y la tabla 5, donde se observa que CaP-1 presenta las señales características de la hidroxiapatita, mientras que el espectro de CaP-2 presenta las señales características de la brushita. La diferencia en la composición química de CaP-1 y CaP-2 se explica por el efecto del pH en el equilibrio químico para la formación de distintos fosfatos de calcio, ya que al trabajar a pH inferior a 6 aumenta la proporción de iones HPO_4^{2-} , los cuales reaccionan con el calcio en solución y el agua y dan lugar a la formación de brushita ($CaHPO_4 \cdot 2H_2O$), mientras que cuando se trabaja a valores de pH alcalinos aumenta la proporción de iones PO_4^{3-} y OH^- , los cuales al reaccionar con el calcio circundante en solución dan lugar a la formación de hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$).^{[61] [62] [63]}

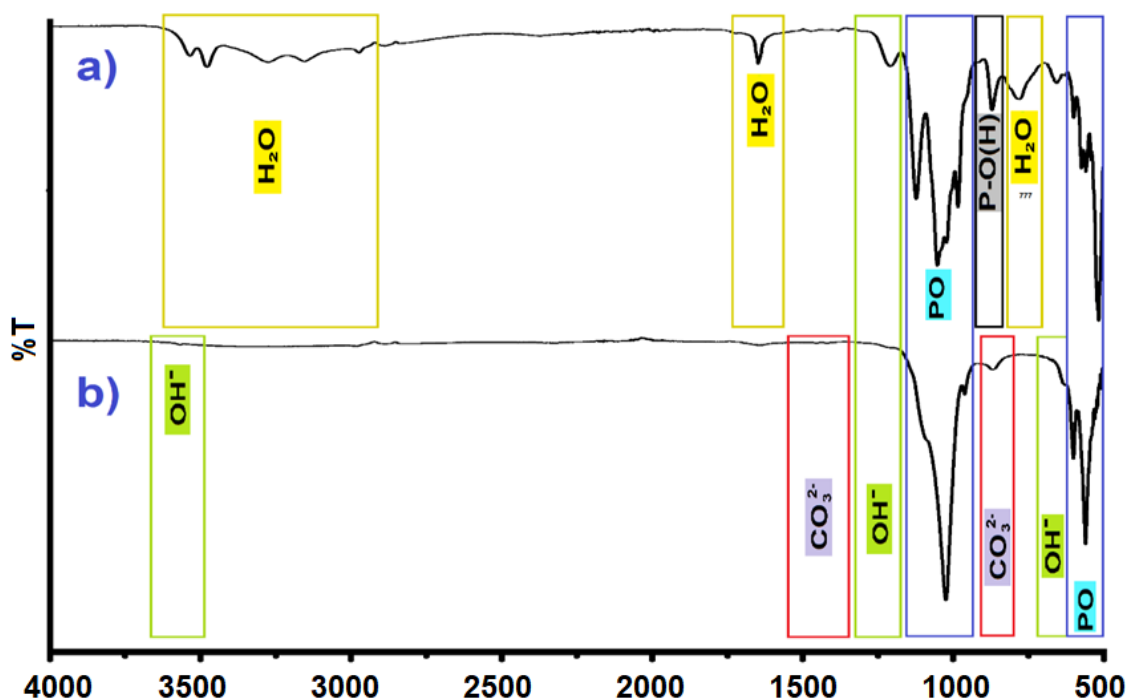


Figura 15. Espectro de IR para los fosfatos de calcio sintetizados en fase acuosa. a) CaP-2; b) CaP-1

Tabla 5. Señales en el espectro de infrarrojo características de la brushita e hidroxiapatita. [52] [53] [54] [55] [56] [62] [64]

Hidroxiapatita ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$)		Brushita ($CaHPO_4$)	
Banda	Grupo funcional correspondiente	Banda	Grupo funcional correspondiente
3573 cm^{-1}	OH estiramiento	3537 cm^{-1}	OH estiramiento [$\nu_s(O-H)$]
631 cm^{-1}	OH estiramiento	3480 cm^{-1}	OH estiramiento del agua [$\nu_s(O-H)$]
1090 cm^{-1}	Estiramiento [$\nu_3 PO_4^{3-}$]	3270 cm^{-1}	OH estiramiento del agua
1027 cm^{-1}	Estiramiento [$\nu_3 PO_4^{3-}$]	3160 cm^{-1}	OH estiramiento del agua
963 cm^{-1}	Estiramiento simétrico [PO_4^{3-}]	1648 cm^{-1}	Estiramiento del agua en plano $\delta(O-H)$
563 cm^{-1}	Flexión [$\nu_4 PO_4^{3-}$]	1212 cm^{-1}	Flexión en plano O-H
1455 cm^{-1}	Estiramiento asimétrico [$\nu_3 CO_3^{2-}$]*	872 cm^{-1}	P-O(H) estiramiento
1414 cm^{-1}	Estiramiento asimétrico [$\nu_3 CO_3^{2-}$]*	1125 cm^{-1}	ν_0' & ν_0'' estiramiento degenerado de [HPO_4^{2-}]
872 cm^{-1}	Flexión asimétrica [$\nu_2 CO_3^{2-}$]*	1053 cm^{-1}	P-O estiramiento (ν_3)
		984 cm^{-1}	P-O(H) estiramiento (ν_1)
*Sustitución de iones por grupos carbonato [CO_3^{2-}]			

7.3 Obtención y caracterización de los recubrimientos de hidroxiapatita a partir de los fosfatos de calcio sintetizados en fase acuosa y mezclas de soluciones con iones calcio y fosfato.

Tras la síntesis y caracterización de CaP-1 y CaP-2 se realizaron depósitos Rec-1 y Rec-2 con dichos CaP respectivamente para conocer su composición. A continuación, se muestran los resultados para los recubrimientos.

7.3.1 Caracterización por FT-IR

Tras desprender mediante raspado el material presente en los depósitos Rec-1 y Rec-2, y analizarlos mediante espectroscopía de infrarrojo se obtuvieron los espectros que se muestran en la figura 16, donde es posible observar que el depósito Rec-1 muestra las señales características de la hidroxiapatita, mientras que el depósito Rec-2 presenta las señales correspondientes al beta pirofosfato de calcio ($\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), dichas señales se describen con mayor detalle en la tabla 6. Este resultado es el esperado de acuerdo con la literatura, dado que para Rec-1 se parte de CaP-1, cuya composición corresponde a hidroxiapatita, la cual durante el proceso de recubrimiento, no se sometió a una temperatura superior a la necesaria para su descomposición por pérdida de iones hidroxilo a 650°C o por transformación en fosfatos de calcio amorfos a más de 1350°C .^{[50] [51]} En cambio para la síntesis de Rec-2 se emplea de una dispersión acuosa de brushita, la cual durante el proceso de recubrimiento se transfiere a una superficie a 500°C , temperatura que se encuentra dentro del rango necesario (350°C a 700°C) para su deshidratación total y transformación en $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$.^{[61] [63]} Con esto se comprueba que el fosfato de calcio precursor de los depósitos si determina la composición final del material de recubrimiento. Debido a que los recubrimientos Rec-1 obtenidos a partir de CaP-1 se componen de HA, dichos recubrimientos se seleccionan para estudios posteriores de carga y liberación del fármaco enrofloxacino.

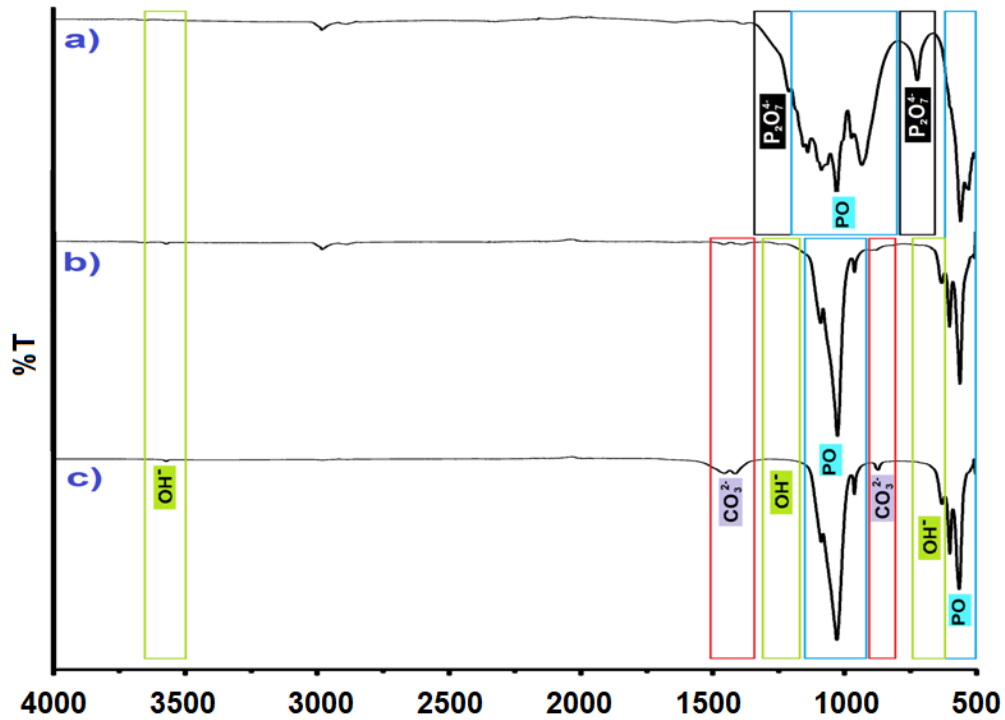


Figura 16. Infrarrojos para a) Rec-2 b) Rec-1 y c) Hidroxiapatita bovina

Tabla 6. Bandas características de la hidroxiapatita y β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ [52] [53] [54] [55] [56] [65] [66]

Hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)		Beta pirofosfato de calcio (β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$)	
Banda	Grupo funcional correspondiente	Banda	Grupo funcional correspondiente
3573 cm^{-1}	OH estiramiento		
631 cm^{-1}	OH estiramiento		
1090 cm^{-1}	Estiramiento [$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$]	721 cm^{-1}	Estiramiento P-O-P [P_2O_7]
1027 cm^{-1}	Estiramiento [$\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$]	1212 cm^{-1}	
963 cm^{-1}	Estiramiento simétrico [PO_4^{3-}]		
563 cm^{-1}	Flexión [$\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$]		
1455 cm^{-1}	Estiramiento asimétrico [$\nu_3 \text{CO}_3^{2-}$]*	1125 cm^{-1}	Estiramiento simétrico [P-O]
1414 cm^{-1}	Estiramiento asimétrico [$\nu_3 \text{CO}_3^{2-}$]*	1053 cm^{-1}	
872 cm^{-1}	Flexión asimétrica [$\nu_2 \text{CO}_3^{2-}$]*	984 cm^{-1}	
*Sustitución de iones por grupos carbonato [CO_3^{2-}]			

7.3.2 Caracterización por difracción de rayos X

Con la finalidad de obtener más información sobre la composición y la cristalinidad de los depósitos Rec-1 y Rec-2, se analizaron por difracción de rayos X (XRD). Los difractogramas se analizaron con el programa Match®, obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 17, donde se observa que los depósitos Rec-1 muestran un alto grado de cristalinidad, mientras que los depósitos Rec-2 presentan una baja cristalinidad. Dicho resultado es de esperarse, dado que la brushita se deshidrata de manera irregular, dando lugar a una fase amorfa conformada por $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ [67]; Mientras que por otro lado en el caso la hidroxiapatita al ser expuesta a altas temperaturas se favorece su cristalinidad. [68] Debido a que los fosfatos de calcio amorfos se disuelven con facilidad, por lo que su adherencia al sustrato es baja, aumentando el riesgo del fallo en dispositivos ortopédicos, [69] se seleccionó a Rec-1 como candidato para estudios posteriores con antibiótico y se descartan los depósitos Rec-2.

Por otro lado, en la figura 17 se corrobora la obtención de hidroxiapatita en los recubrimientos Rec-1, debido a que al igual que los depósitos control presenta las señales características de la hidroxiapatita en $2\theta = 25.9, 31.62, 32.22$ y 32.5 , que corresponden con los índices de Miller (hkl) (0,0,2), (1,2,1), (1,1,2) y (3,0,0) respectivamente.

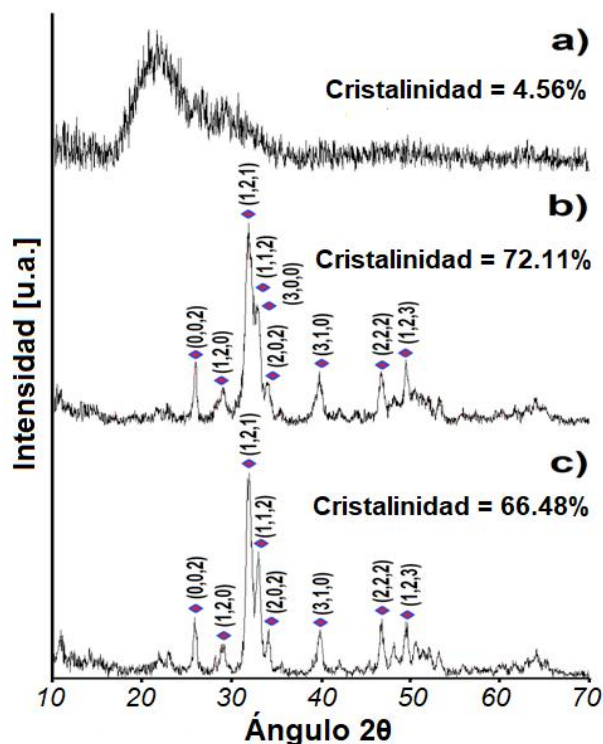


Figura 17.XRD de depósitos
a) Rec-2,
b) Rec-1
c) Control (HAB)

7.3.3 Caracterización por microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión

Adicionalmente a las pruebas ya mencionadas, se caracterizó la morfología de Rec-1 y Rec-2 mediante SEM. Las micrografías obtenidas se muestran en la figura 18, donde se corrobora la estructura amorfa de los depósitos Rec-2, descrita en los estudios de difracción de rayos X, mientras que en los depósitos Rec-1, se observa un material nanoporoso, el cual se observa con más detalle en la micrografía de TEM presentada en la figura 19, donde se percibe el andamiaje de nanopartículas esféricas, primordialmente de entre 35 y 45 nm (Figura 20), a las cuales se les indexaron sus patrones de difracción y se obtuvieron las reflexiones en los planos (112), (323) y (211), así como un eje de zona $[4,3,4]$, corroborándose la obtención de hidroxiapatita. Dado lo anterior se descarta continuar trabajando con los depósitos Rec-2 y se continuará con los estudios de carga y liberación de enrofloxacin en los depósitos Rec-1.

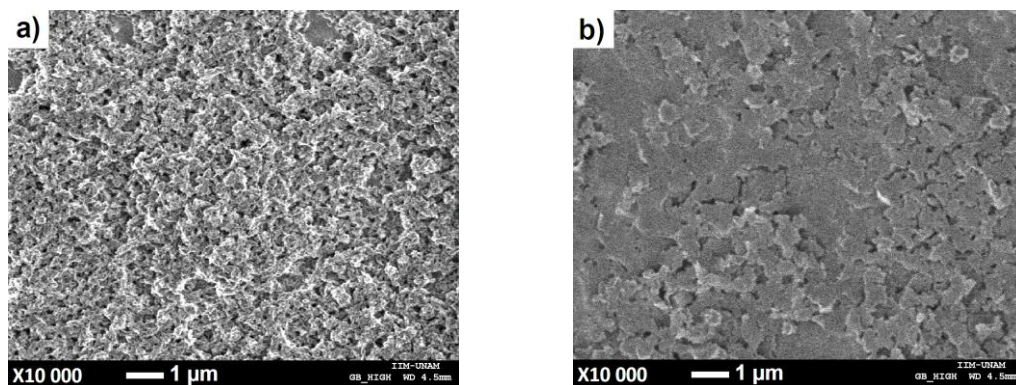


Figura 18. Micrografías de SEM para los recubrimientos
a) Rec-1 b) Rec-2

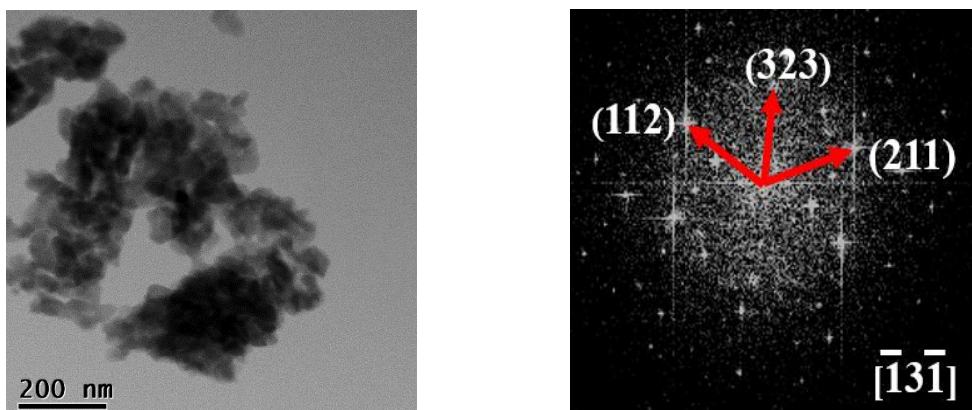


Figura 19. Micrografía de TEM de los depósitos Rec-1 (a) y su patrón de difracción indexado (b).

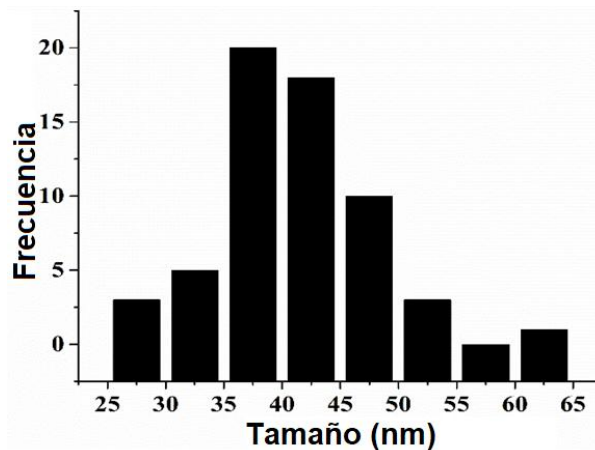


Figura 20. Histograma con la distribución del tamaño de partículas de hidroxiapatita presentes en Rec-1.

7.4 Obtención y caracterización de los recubrimientos de hidroxiapatita a partir de la mezcla de soluciones con iones calcio y fosfato manteniendo la proporción presente en la hidroxiapatita.

En un estudio paralelo al anterior, se elaboraron los recubrimientos Rec-3, Rec-4 y Rec-5 a partir de una mezcla de soluciones con iones calcio e iones fosfato bajo la proporción $Ca/P = 1.67$, a $pH=10$, $pH\approx 6.68$ y $pH\approx 2$ respectivamente. Posteriormente estos depósitos se caracterizaron para seleccionar aquel con mejores propiedades fisicoquímicas y ser empleado en estudios de carga y liberación con enrofloxacino.

Durante el proceso de recubrimiento descrito para Rec-3, Rec-4 y Rec-5, se observó que no es posible realizar depósitos por periodos muy largos, debido a que el material al enfriarse se agrieta y se desprende de los sustratos. La razón por la cual ocurre este fenómeno se desconoce, sin embargo, se sabe que, durante la síntesis de hidroxiapatita a partir de cloruro de calcio y fosfato de sodio dibásico, se produce como impureza cloruro de sodio,^[4] en la literatura se menciona que al someter a cambios de temperatura recubrimientos elaborados a partir de distintos materiales, estos tienden a expandirse y contraerse desproporcionalmente, lo que ocasiona daño en las películas de recubrimiento.^[70]

Debido a lo anterior, se modificó la metodología previamente establecida para la obtención de recubrimientos gruesos por 50 minutos con el equipo de spray

pirolítico asistido por ultrasonido; dicha modificación consistió la aplicación de varias capas del material de recubrimiento sobre un mismo sustrato, las aplicaciones fueron cada 3 minutos con el spray pirolítico hasta completar depósitos de 51 minutos. Entre cada capa se enjuagaron los depósitos con agua desionizada para remover el cloruro de sodio formado y de esta manera evitar el desprendimiento de la hidroxiapatita.

7.4.1 Caracterización por FT-IR

Con la finalidad de conocer la composición de los depósitos Rec-3, Rec-4 y Rec-5, se obtuvieron sus espectros de infrarrojo respectivos, los cuales se presentan en la figura 21

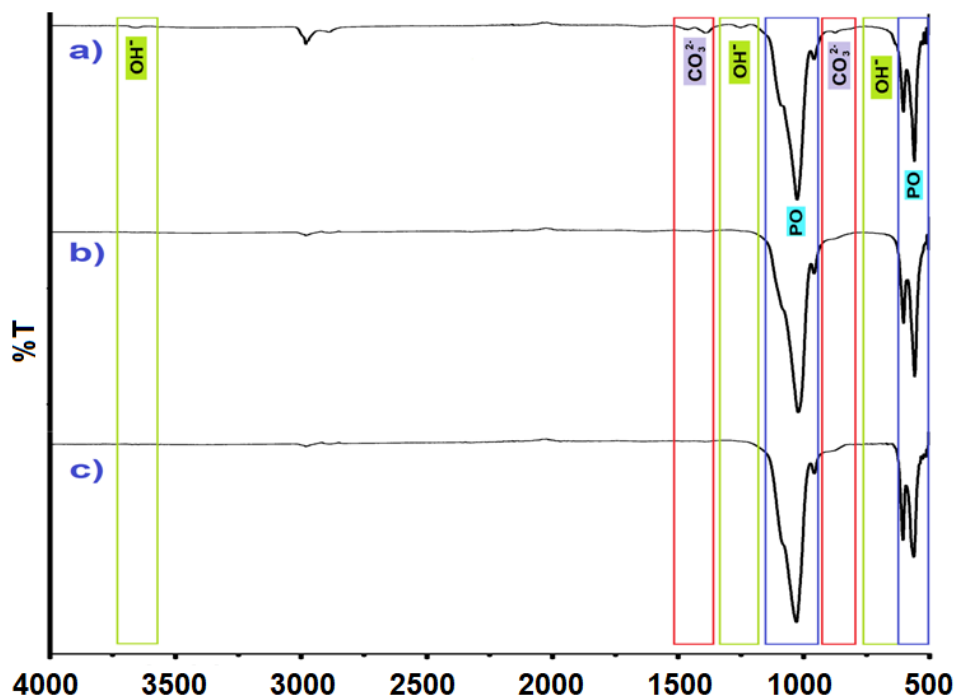


Figura21. Infrarrojos de recubrimientos elaborados a partir de la mezcla de soluciones con cloruro de calcio y fosfato de sodio dibásico ajustada a distintos valores de pH. a) Rec-3 b) Rec-4 c) Rec-5

Mediante los espectros de infrarrojo presentes en la figura 21, es posible observar que el pH de la mezcla de soluciones con iones calcio y fosfato, no interfiere en la obtención de hidroxiapatita sobre los depósitos, resultado diferente al obtenido en el apartado 7.2, para la síntesis de CaP-1 y CaP-2, en el cual se muestra que el pH es un factor decisivo en el producto final de la

síntesis por precipitación en fase acuosa de fosfatos de calcio. Esta divergencia entre resultados se explica en la literatura, donde se menciona que cuando el spray se aproxima a la superficie de los sustratos a altas temperaturas, se evaporan tanto el disolvente como el ácido presente en la mezcla, dando lugar a nanopartículas saturadas de hidroxiapatita, las cuales se adhieren a la superficie del sustrato (Figura 22).^[71] Los resultados obtenidos en este trabajo se adecuan muy bien con esta explicación.

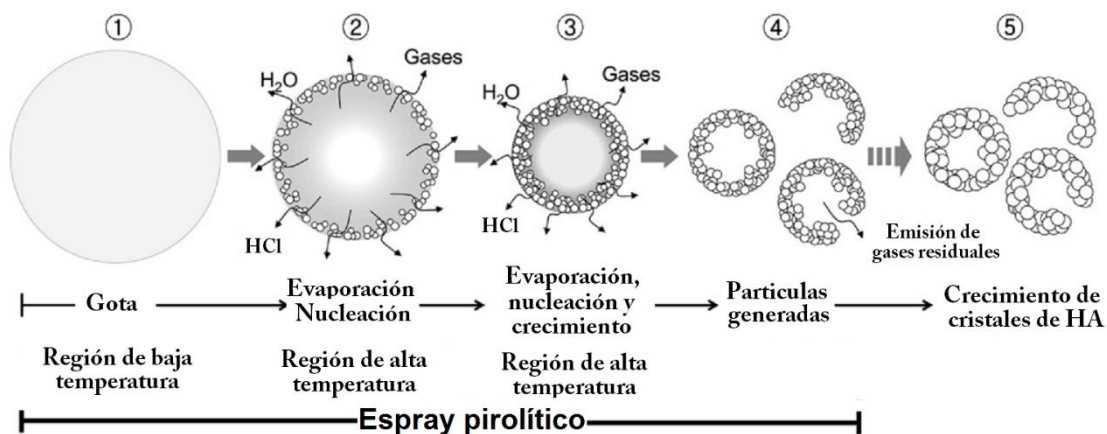


Figura 22. Proceso de formación de HA mediante spray pirolítico.

7.4.2 Caracterización por difracción de rayos X

Con el propósito de corroborar la composición química de los depósitos Rec-1, Rec-2 y Rec-3 y conocer su grado de cristalinidad se llevó a cabo la difracción de rayos X de los mismos. Los difractogramas obtenidos se muestran en la figura 23, que con la ayuda del programa Match ®, se identificaron las señales características de la hidroxiapatita en $2\theta = 25.9, 31.62, 32.22$ y 32.5 , correspondientes a los índices de Miller (hkl) (0,0,2), (1,2,1), (1,1,2) y (3,0,0) respectivamente. También se observa en esta figura, que la cristalinidad de los depósitos aumenta bajo pH alcalino.

Debido a que la cristalinidad es un factor importante para asegurar que el CaP será más estable y no se va a disolver, y, en consecuencia, desprender del sustrato, se decidió seleccionar el recubrimiento Rec-1 para estudios posteriores de carga y liberación del fármaco enrofloxacino.

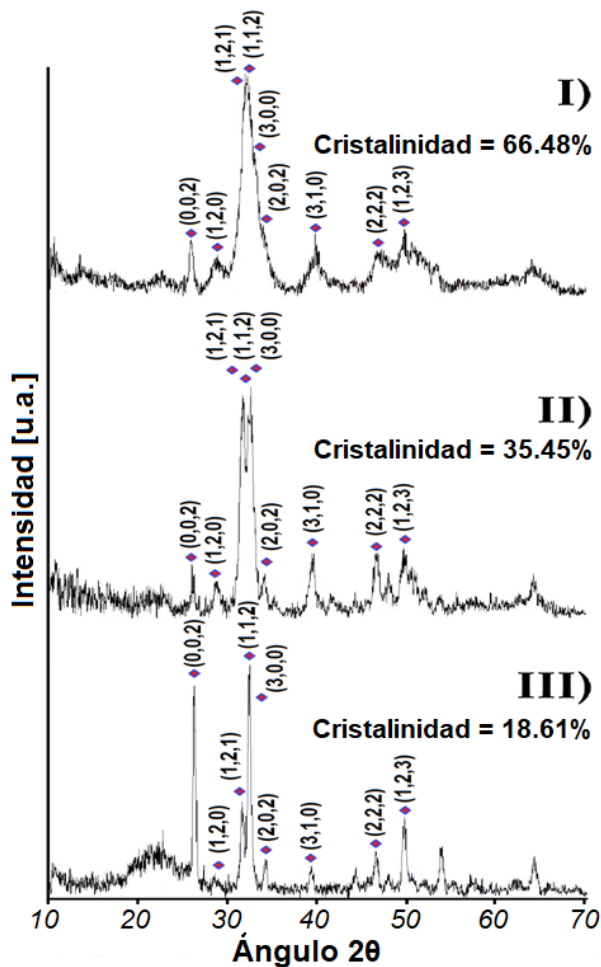


Figura 23. XRD de los depósitos I) pH alcalino II) pH control (pH=6.6) III) pH ácido

7.4.3 Caracterización por microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión

Con el propósito de conocer la morfología de los depósitos elaborados a partir de la mezcla de soluciones de cloruro de calcio y fosfato de sodio dibásico ajustada a distintos valores de pH (Rec-3, Rec-4 y Rec-5), así como el efecto del lavado con agua desionizada, propuesto como una modificación a la metodología por el desprendimiento del material de recubrimiento, se elaboraron estos depósitos durante 3 minutos, lavados y sin lavar, y se obtuvieron sus micrografías por SEM, las cuales se muestran en la figura 24.

En la figura 24 (a, b y c), se muestran los depósitos sin lavar, los cuales a diferencia de los depósitos lavados mostrados en la figura 24 (d, e y f), muestran en su superficie cristales cúbicos, a los que se les realizó un análisis elemental para conocer su composición, el cual se muestra en la figura 25, donde se presenta un alto contenido en átomos de cloro y sodio, lo cual corrobora la obtención de cloruro de sodio durante los recubrimiento.

Adicionalmente cómo es posible observar, tras el lavado de los depósitos con agua desionizada, los depósitos se vuelven más homogéneos y se observa un aumento en la porosidad aparente. Esto en la literatura se asocia con el uso del cloruro de sodio como un agente porógeno durante la síntesis de hidroxiapatita, el cual, tras ser removido por disolución, genera poros en la estructura.^[72]

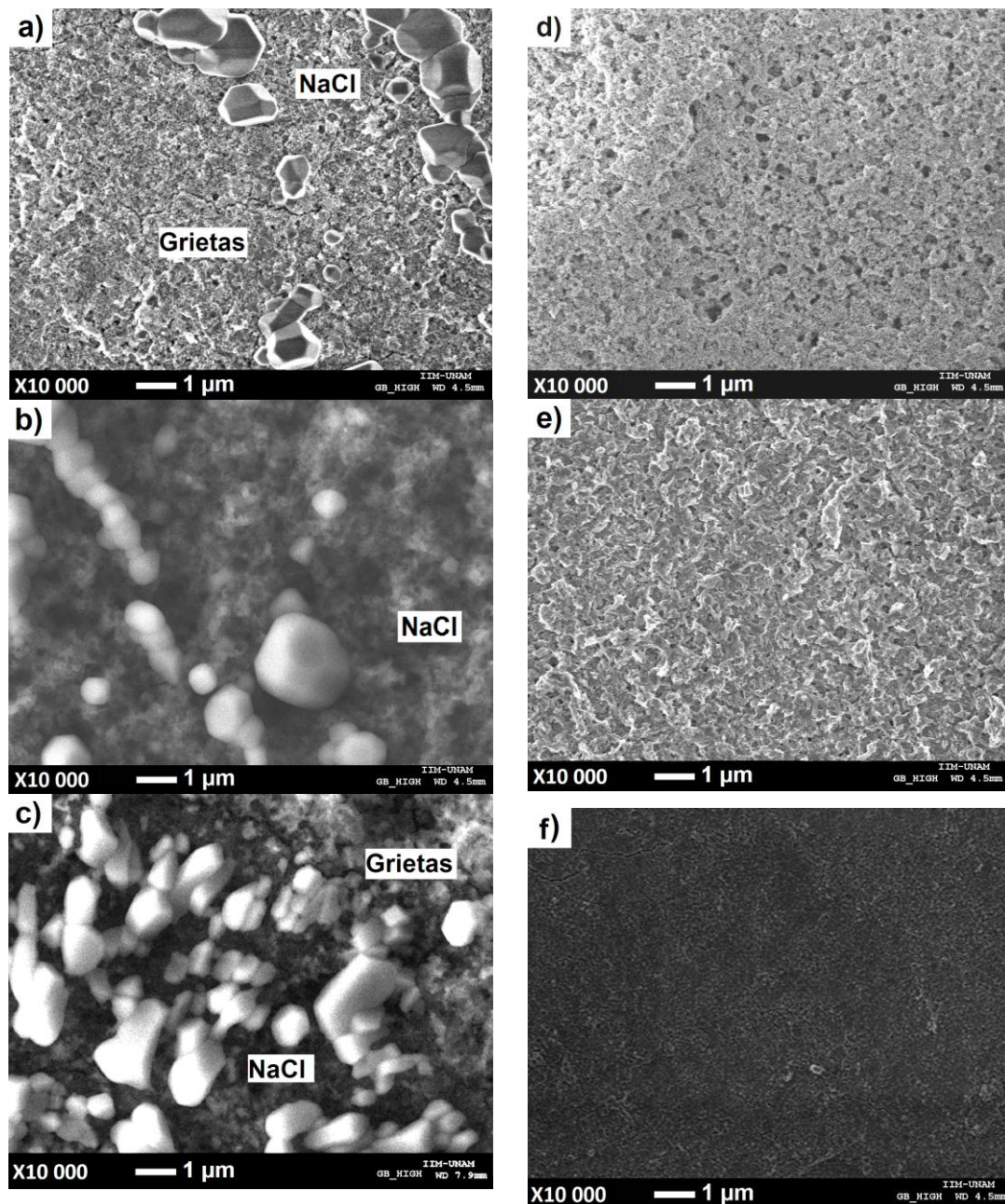


Figura 24. Depósitos sin lavar a) Rec-3 (pH=10) b) Rec-4 (pH=6.6) c) Rec-5; depósitos lavados con agua desionizada a) Rec-3 b) Rec-4 c) Rec-5

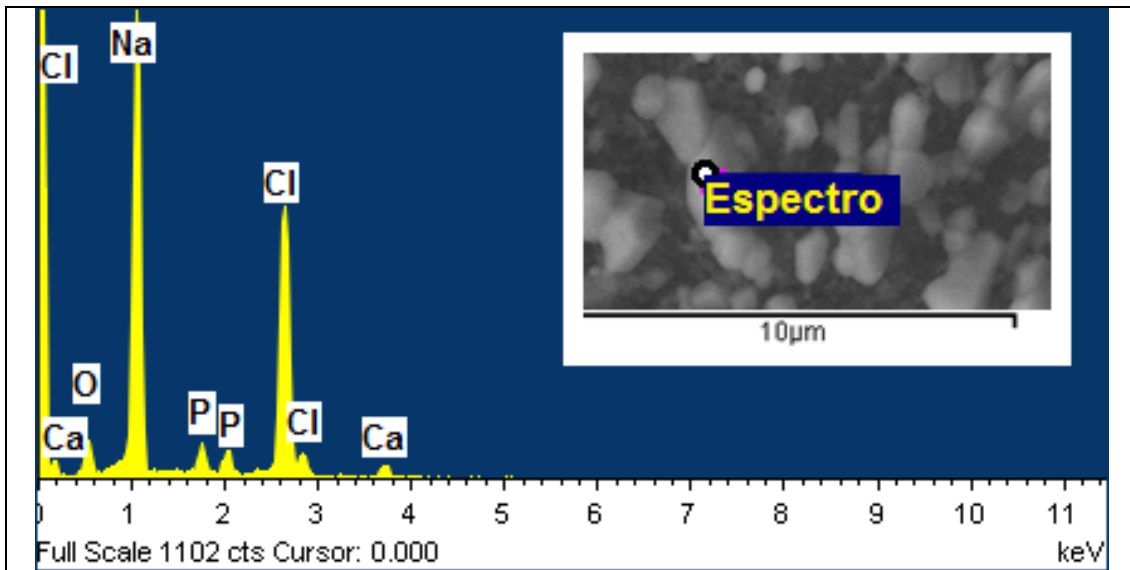


Figura 25. Composición química de los cristales presentes en la superficie de los depósitos, obtenida mediante microscopía electrónica de barrido con espectroscopia de rayos X dispersivos de energía.

Tabla 7. Composición porcentual en la composición de los cristales cúbicos sobre la superficie de los depósitos

Elemento	Proporción de átomos (%)
O	15.97
Na	40.09
P	2.9
Cl	38.32
Ca	2.71
Total	99.99

Debido a que los depósitos Rec-3 mostraron mejores resultados que los depósitos Rec-4 y Rec-5, es decir, la mezcla de soluciones de fosfato de sodio dibásico y cloruro de calcio favoreció la formación de recubrimientos con mejor cristalinidad (Ver apartado 7.4.2) y porosidad aparente en la micrografía SEM, estos se seleccionaron para continuar el análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM), generando la micrografía que se observa en la figura 26, donde es posible observar el aglomerado de nanopartículas esferoides con un tamaño de partícula principalmente de entre 15 y 30 nm (Fig. 27), lo cual concuerda con la literatura, donde se menciona que haciendo uso de la técnica de spray pirolítico asistido por ultrasonido, se obtienen recubrimientos de nanopartículas esferoides aglomeradas. De igual manera en la figura 26b, tras la indexación de los patrones de difracción electrónica, se obtuvieron las reflexiones de los planos (001), (211) y (210), así como un eje de zona [1,2,0] [58] [59] [60], lo cual nos confirma la obtención de hidroxiapatita.

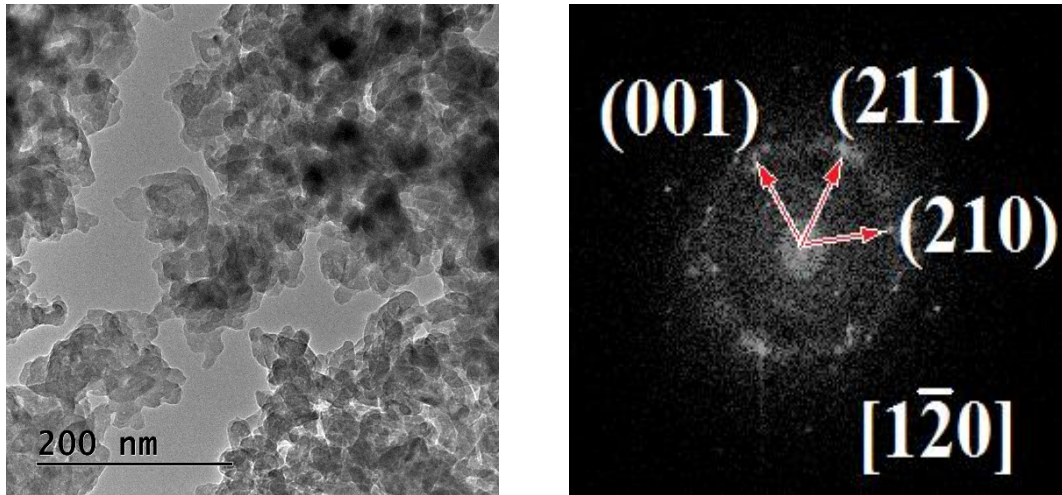


Figura 26. Micrografía de TEM de los depósitos Rec-3 (a) y su patrón de difracción indexado (b).

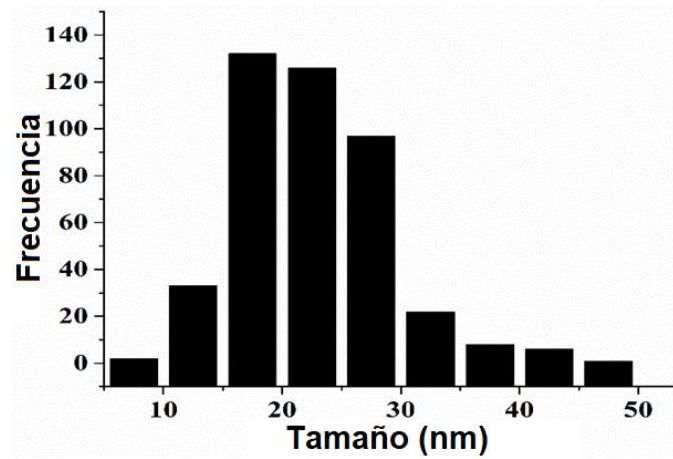


Figura 27. Histograma de la distribución de tamaño de partícula, para Rec-3.

7.5 Cargas con antibiótico.

Como ya se mencionó con anterioridad, se seccionaron los depósitos Rec-1 (Elaborado a partir de la hidroxiapatita llamada CaP-1 sintetizada en fase acuosa a pH=10) y Rec-3 (Elaborado a partir de la mezcla de soluciones de cloruro de calcio y fosfato de sodio dibásico ajustada a pH=10) para ser cargados con enrofloxacino, y compararlos con los depósitos control (elaborados a partir de hidroxiapatita bovina), igualmente cargados. A continuación, se describen los resultados obtenidos mediante las distintas metodologías de carga.

7.5.1 Carga por Inmersión

La cantidad de fármaco adsorbido por los recubrimientos de HA, se representa en las tablas 8 y 9. En estas tablas se observa que los depósitos que retienen más antibiótico por unidad de superficie, son los depósitos Rec-1, sin embargo, al comparar la cantidad de material de recubrimiento, con la cantidad de fármaco adsorbido, se observa que estos depósitos son los que menos fármaco retienen, en comparación con los depósitos control de hidroxiapatita bovina y los depósitos Rec-3, los cuales muestran resultados similares entre sí con respecto al fármaco adsorbido por unidad de superficie y de fármaco adsorbido por miligramo de hidroxiapatita.

Tabla 8. Cuantificación indirecta del antibiótico adsorbido en los depósitos.

Sistema	ENR inicial en solución (mg)	ENR final en solución (mg)	Peso del material de recubrimiento (mg)	ENR adsorbido por unidad de peso de HA ($\mu\text{g/g}$)	ENR adsorbido por unidad de superficie ($\mu\text{g/cm}^2$)
Rec-1	5.13716	5.11441	1.4	16.25	11.4
Rec-3	5.13716	5.13325	0.2	1.96	1.96
Control	5.13716	5.127612	0.4	23.87	4.77

Tabla 9. Cuantificación directa del antibiótico adsorbido en los depósitos.

Depósito	Hidroxiapatita por cm^2 (mg)	Enrofloxacino/ Unidad de superficie ($\mu\text{g/cm}^2$)	Enrofloxacino/ miligramo de hidroxiapatita ($\mu\text{g/mg}$)
Rec-1	0.7	11.57	16.53
Rec-3	0.1	1.97	19.7
Control	0.2	4.82	24.10

7.5.2 Carga por centrifugación

Esta técnica consiste en aplicar un volumen determinado de una solución/dispersión del material con el que se desea realizar el recubrimiento/carga (Ver figura 28). En este caso se aplicó una solución etanólica de enrofloxacino sobre los depósitos de hidroxiapatita previamente seleccionados. La cuantificación se llevó a cabo disolviendo los depósitos sobre los sustratos de cuarzo con HCl 1M (1:1 Agua/etanol), diluyendo hasta completar 10 mL con PBS:etanol 3:2 y cuantificando mediante espectroscopia de ultravioleta, tal como se describe en el apartado 6.7.

La cantidad de líquido necesaria para realizar los recubrimientos por centrifugación, es dependiente de la viscosidad y el área de la superficie a recubrir. Por otro lado, el grosor del recubrimiento es dependiente de la velocidad con la que se centrifuga el sustrato.^[73] Debido a esto, se optimizaron previamente las condiciones para generar un recubrimiento con la mayor cantidad de enrofloxacino sobre los depósitos de hidroxiapatita (1 cm X 1 cm), en primera instancia se probó la aplicación de distintos volúmenes entre 50 y 500 μ L de la solución de enrofloxacino, observando que la cantidad mínima de la solución es de 50 μ L; por otro lado también se determinó la velocidad óptima de rotación, haciendo uso de un rotor con una velocidad ajustable entre 3000 y 12000 revoluciones por minuto (RPM), probando al mismo tiempo el impacto del cambio de la velocidad de rotación inmediatamente tras aplicar la solución de enrofloxacino, encontrando que para una mayor retención de antibiótico, es necesario aplicar la solución de enrofloxacino sobre los depósitos girando 3000 RPM, e inmediatamente aumentar la velocidad de rotación a 4800 RPM;

Por otro lado, en estudios previos se buscó estandarizar la cantidad de capas con enrofloxacino sobre los depósitos, con la finalidad de retener la mayor cantidad de antibiótico posible. Para esto se recubrieron sustratos de cuarzo, aplicando distinto número de capas (Entre 1 y 10 capas) con la solución de enrofloxacino, para posteriormente cuantificar el antibiótico retenido mediante espectroscopia UV. Aquí se observó que luego de aplicar más de 8 capas de enrofloxacino, la cantidad de antibiótico retenida en lugar de incrementar,

disminuye, esto se puede explicar debido a que no se sigue la condición de ortogonalidad de los disolventes, la cual nos indica que para generar un recubrimiento multicapas, es necesario hacer uso de disolventes que no disuelvan las capas anteriores, lo cual no se sigue, ya que en todo momento se emplea enrofloxacin disuelto en etanol, permitiendo la redisolución de la capa anterior del antibiótico presente en los sustratos.^[74]

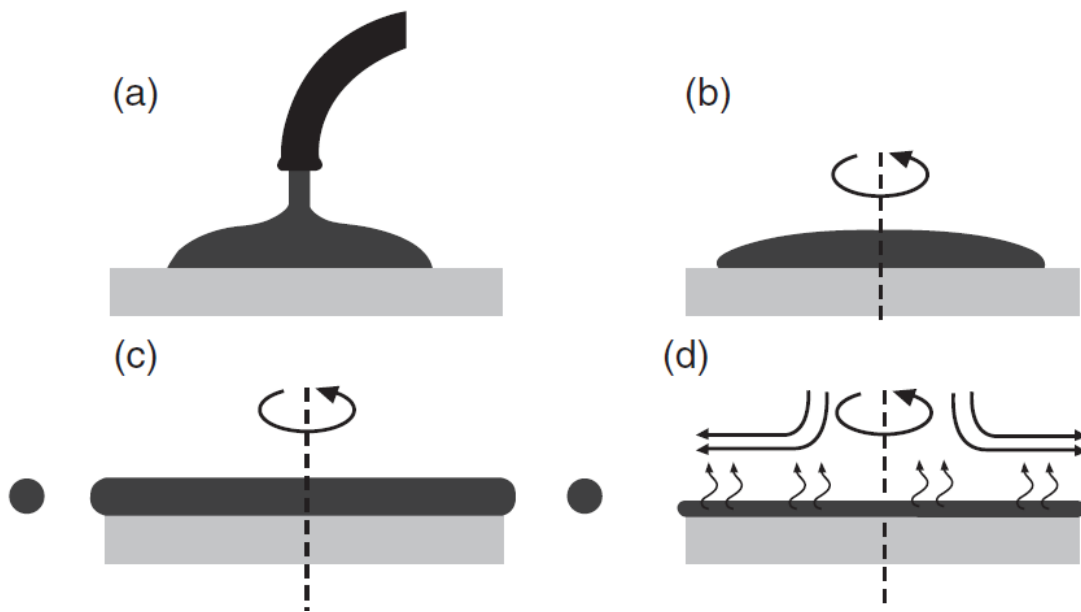


Figura 28. a) Depósito de la sustancia líquida b) centrifugación del líquido c) Formación de una capa homogénea por fuerza centrífuga d) evaporación del disolvente.

Tras realizar las cargas con enrofloxacin se cuantificó mediante el antibiótico cargado sobre los depósitos Control, Rec-1 y Rec-3, tal como se describe en el apartado 6.7, disolviendo los depósitos en HCl 1M (1:1 Agua/etanol), diluyendo hasta completar 10 mL con PBS:etanol 3:2 y cuantificando mediante espectroscopia de ultravioleta. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 10, donde se observa que los depósitos que más antibiótico retienen por unidad de superficie, son los depósitos Rec-1, sin embargo, son aquellos que menos antibiótico retienen por cantidad de hidroxiapatita, siendo los depósitos control aquellos que más antibiótico retienen por cantidad de hidroxiapatita, seguido de los depósitos Rec-1.

Tabla 10. Antibiótico cargado en los depósitos de hidroxiapatita mediante la técnica de centrifugación.

Depósito	Hidroxiapatita por cm ² (mg)	Enrofloxacino/Unidad de superficie (µg/cm ²)
Rec-1	0.7	14.4
Rec-3	0.1	2.69
Control	0.2	6.41

7.5.3 Carga mediante plasma a presión atmosférica

Tras realizar las cargas de enrofloxacino con plasma a presión atmosférica, se cuantificó mediante espectroscopía UV el antibiótico tras disolver los depósitos, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11, donde se observa un aumento considerable en la cantidad de enrofloxacino con respecto a las cargas del mismo mediante las técnicas de centrifugación e inmersión, esto se explica debido a que durante el proceso de carga por plasma el argón ionizado favorece una mayor interacción y unión entre los iones Ca²⁺ y PO₄³⁻ de la hidroxiapatita y los grupos -CO₂⁻, y -NH₃⁺ del enrofloxacino.^[75] La ventaja de este método es que debido a las bajas temperaturas del gas generador de plasma, las sustancias termosensibles, tales como el enrofloxacino no se degradan.^[76]

En la tabla 11 se observa que los depósitos que más enrofloxacino retienen, son los depósitos Rec-3, mientras que los depósitos control y los depósitos Rec-1 retienen enrofloxacino en menor medida. Es por este motivo que los depósitos Rec-3 pueden ser considerados como más aptos para la prevención de infecciones óseas cuando el proyecto se lleve a seres vivos, ya que se puede evitar con mayor certeza la proliferación de microorganismos en su superficie, la formación de films y con ello el rechazo de los implantes.

Tabla 11. Enrofloxacino cargado sobre los depósitos de hidroxiapatita mediante plasma a presión atmosférica.

Depósito	Hidroxiapatita por cm ² (mg)	Enrofloxacino/ Unidad de superficie (µg/cm ²)
Rec-1	0.7	34.63
Rec-3	0.1	110.35
Control	0.2	24.82

7.6 Perfiles de liberación *in-vitro*

A pesar de que los depósitos de hidroxiapatita cargados con enrofloxacino no son sistemas poliméricos, se evaluaron los perfiles de liberación mediante el macro para Excel DDSolver 1.0, con la finalidad de obtener mayor información sobre la interacción entre el antibiótico y los recubrimientos, así como para conocer el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la liberación del antibiótico, para esto se empleó un ajuste matemático a los modelos cinéticos de orden cero, primer orden, Korsmeyer Peppas e Higuchi.

Para llevar a cabo el ajuste matemático con el modelo de Korsmeyer-Peppas y determinar el mecanismo de liberación de la enrofloxacino, es necesario emplear únicamente los datos hasta obtener una liberación del 60% del principio activo.^[77]

Para determinar el modelo con mejor ajuste, se empleó el coeficiente de correlación R^2 , el coeficiente de correlación ajustado $R^2_{ajustado}$, el menor valor en el criterio de información Akaike (AIC) y el mayor valor en el criterio de selección del modelo (MSC).^[78]

7.6.1 Depósitos cargados por la técnica de centrifugación.

A continuación, en las figuras 29, 30 y 31 se muestran las cinéticas de liberación para los depósitos Rec-1 (Obtenido a partir de hidroxiapatita preformada, llamada CaP-1), Rec-3 (Obtenido a partir de la mezcla de soluciones de cloruro de calcio y fosfato de sodio dibásico ajustada a pH=10) y control (Obtenido a partir de hidroxiapatita bovina) respectivamente, cargados con enrofloxacino mediante la técnica de centrifugación. Así mismo, en las tablas 12, 13 y 14 se muestran los resultados con respecto a los criterios para la selección del modelo con mayor ajuste por parte de las cinéticas de liberación.

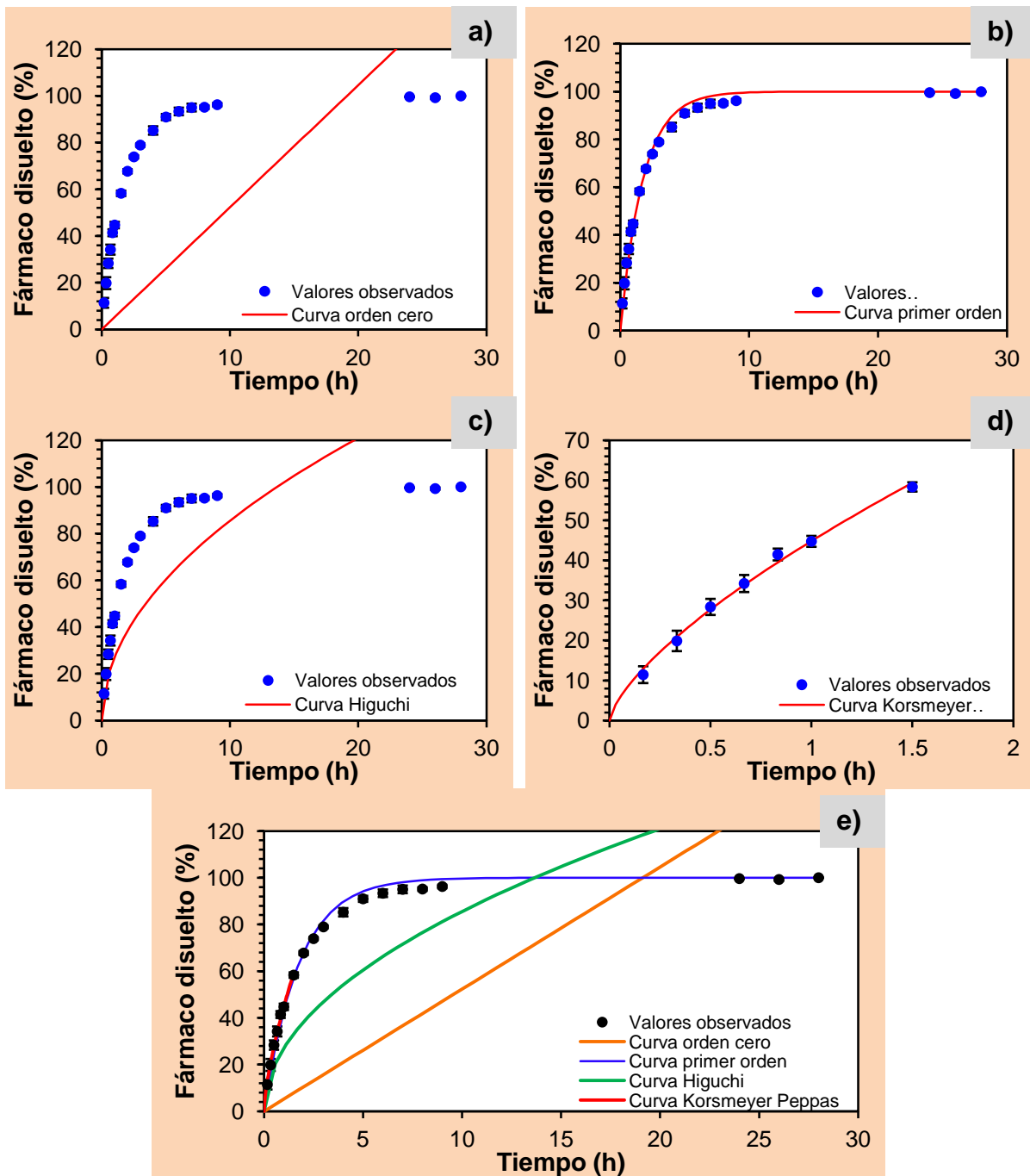


Figura 29. Perfil de liberación experimental de los depósitos Rec-1 y modelos matemáticos para la descripción de la liberación del sistema. a) Orden cero b) Primer Orden c) Higuchi d) Korsmeier Peppas e) Agrupación de los modelos matemáticos y el perfil experimental de liberación.

Tabla 12. Criterios para determinar el modelo matemático con mejor ajuste para la liberación de enrofloxacin, a partir de los depósitos Rec-1 cargados por centrifugación.

Parámetro	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeier Peppas
R	-1.6546	0.9900	0.2342	0.9914
R ajustada	-1.6546	0.9900	0.2342	0.9897
AIC	204.9570	95.4154	181.3372	18.6836
MSC	-1.0799	4.6854	0.1632	4.6475

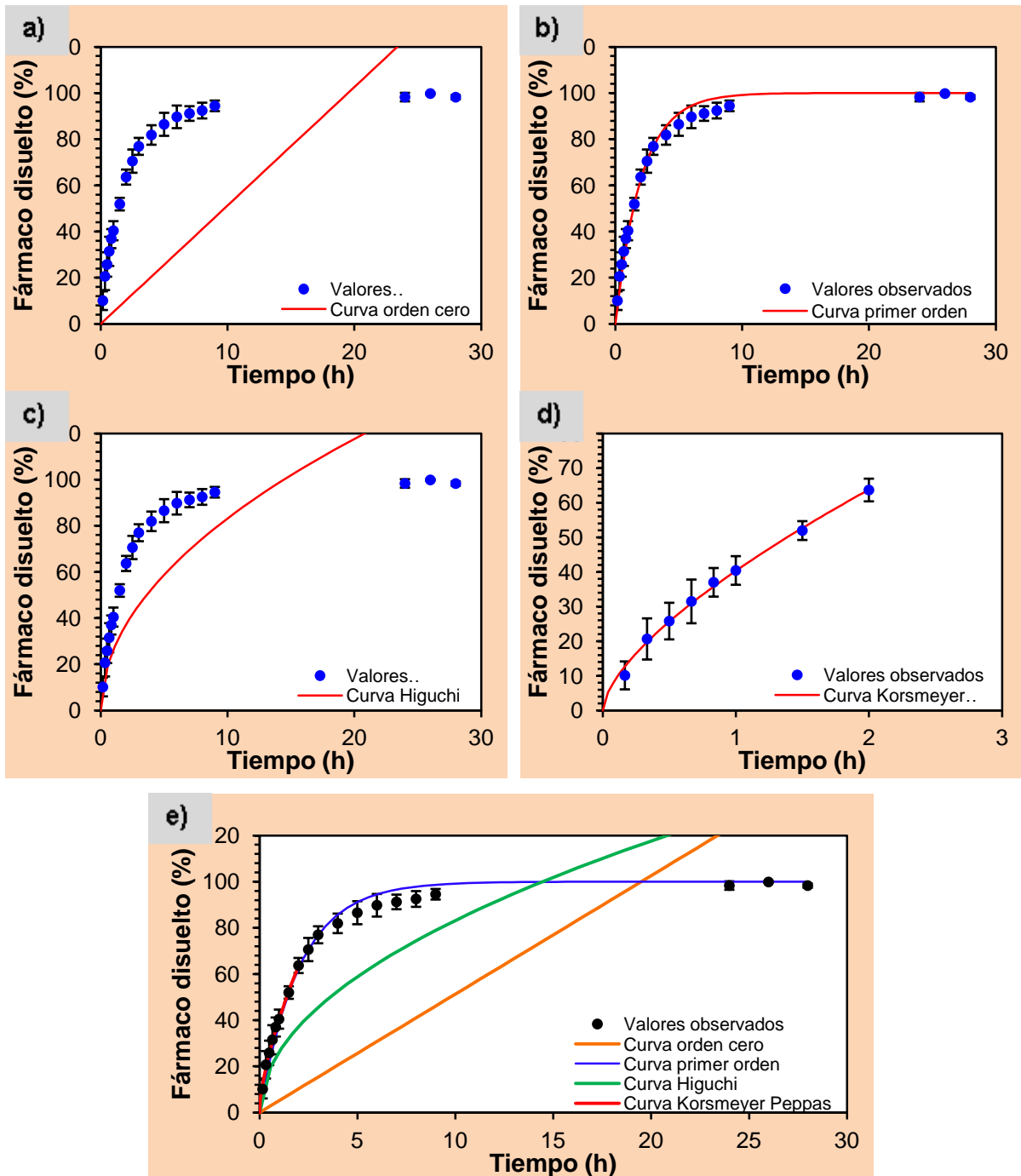


Figura 30. Perfil de liberación experimental de los depósitos Rec-3 y modelos matemáticos para la descripción de la liberación del sistema. a) Orden cero b) Primer Orden c) Higuchi d) Korsmeier Peppas e) Agrupación de los modelos matemáticos y el perfil experimental de liberación.

Tabla 13. Criterios para la selección del modelo matemático que mejor se ajusta a la liberación del ENR a partir de los depósitos Rec-3, cargados por centrifugación.

Parámetro	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeier Peppas
R	-1.3890	0.9802	0.3429	0.9896
R ajustada	-1.3890	0.9802	0.3429	0.9878
AIC	202.7448	105.9415	178.0637	26.6240
MSC	-0.9626	4.1323	0.3364	4.3023

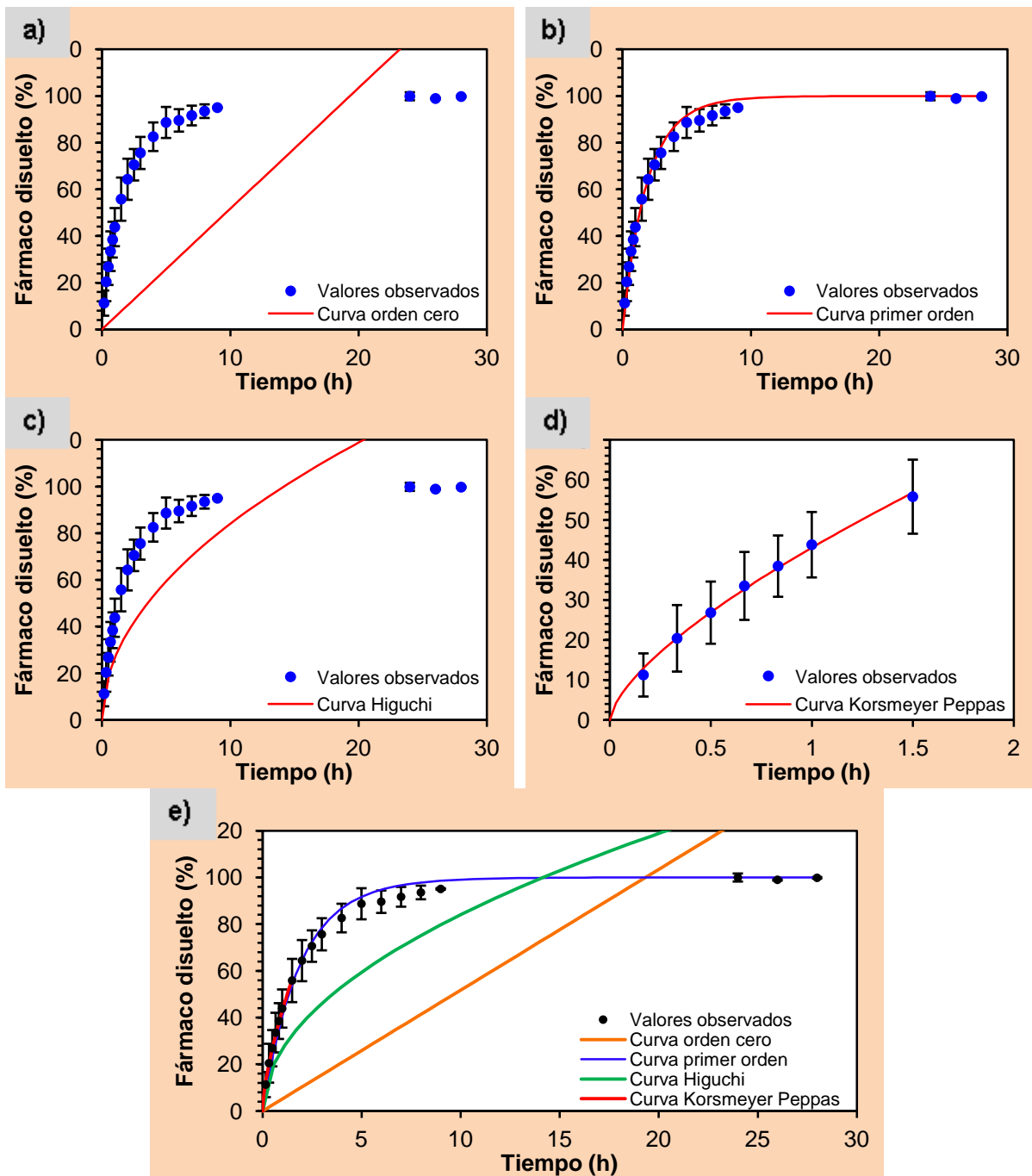


Figura 31. Perfil de liberación experimental de los depósitos Control y modelos matemáticos para la descripción de la liberación del sistema. a) Orden cero b) Primer Orden c) Higuchi d) Korsmeier Peppas e) Agrupación de los modelos matemáticos y el perfil experimental de liberación.

Tabla 14. Criterios para la selección del modelo matemático que mejor se ajusta a la liberación del ENR a partir de los depósitos control cargados por centrifugación.

Parámetro	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeier Peppas
R	-1.5849	0.9839	0.2691	0.9922
R ajustada	-1.5849	0.9839	0.2691	0.9906
AIC	203.2648	105.6876	178.6839	18.2941
MSC	-1.0127	4.1229	0.2810	4.5844

Tomando en cuenta las tablas 12, 13 y 14 los modelos matemáticos con mejor ajuste a la cinética de liberación del enrofloxacino a partir de los depósitos cargados mediante la técnica de centrifugación son el de primer orden y Korsmeyer Peppas.

La cinética de liberación de primer orden se describe mediante la ecuación $\ln(C_f) = \ln(C_i) - kt$; donde C_f = Concentración final del fármaco a determinado tiempo (t), C_i = Concentración inicial del fármaco y k es la constante de liberación del fármaco. La cual puede reajustarse de la siguiente manera: $C_f - C_i = e^{-kt} = F$, donde F es igual a la cantidad de fármaco liberada. [77] [78] [79]

Teniendo en cuenta lo anterior, los depósitos Rec-1, Rec-3 y control se comportan como sistemas porosos matriciales donde la liberación es dependiente del gradiente de concentración entre el fármaco presente en la superficie de los depósitos y el medio de disolución.

Por otro lado, el ajuste matemático mediante la Ecuación de Korsmeyer-Peppas viene dado por la ecuación $\frac{C_f}{C_i} = k_{KP}t^n = F$; donde C_f = Concentración final del fármaco a determinado tiempo (t), C_i = Concentración inicial del fármaco, k_{KP} es la constante de liberación del fármaco y F es igual a la cantidad de fármaco liberada. Esta ecuación brinda la posibilidad de determinar si el fármaco se libera primordialmente por difusión, por transporte anómalo (erosión) o por transporte de Super-Caso tipo II (difusión y desintegración del sistema matricial) mediante el valor de la constante n , el cual adquiere distintos valores dependiendo la geometría del sistema matricial, adquiriendo para recubrimientos delgados los siguientes valores: [10] [48] [79] [80]

$n < 0.5$ = Difusión Fickiana

$0.5 < n < 1.0$ = Transporte anómalo (No Fickiano)

$n > 1$ = Transporte Super-Caso tipo II

De acuerdo con lo anterior y con los valores para “ n ” descritos en la tabla 15, es posible observar que la liberación del enrofloxacino a partir de los depósitos

se debe primordialmente a una difusión no Fickiana, donde la liberación viene dada tanto por la difusión del fármaco, así como por la erosión de los recubrimientos de hidroxiapatita.

Tomando en cuenta los tiempos de vida media obtenidos tanto por la ecuación de primer orden como por la ecuación de Korsmeyer Peppas es posible observar que los recubrimientos que retienen por más tiempo el fármaco son los Rec-3, seguidos de los depósitos control elaborados con hidroxiapatita bovina y los depósitos Rec-1 elaborados con hidroxiapatita previamente sintetizada en fase acuosa. Esto es de esperarse debido a que los depósitos Rec-3 se sintetizaron mediante la mezcla de soluciones de $CaCl_2$ y Na_2HPO_4 en condiciones alcalinas, lo cual da como resultado la formación de cloruro de sodio, el cual tras ser removido mediante el lavado constante de los depósitos generó estructuras porosas a través de las cuales el fármaco permeó con mayor facilidad a los largo de la matriz, favoreciendo su retención.

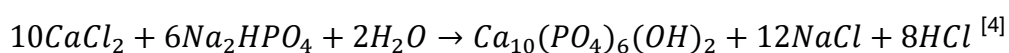


Tabla 15. Parámetros cinéticos determinados mediante los modelos de primer orden y Korsmeyer-Peppas para la liberación de enrofloxacino en depósitos de hidroxiapatita cargados mediante la técnica de centrifugación.

Modelo	Parámetro	Depósito		
		Control	Rec-1	Rec3
Primer Orden	k1	0.5346	0.5679	0.4946
	T50	1.3736	1.2211	1.4233
Korsmeyer Peppas	k_{kp}	43.0349	44.8007	40.3338
	n	0.7013	0.6957	0.6648
	T50	1.2493	1.1703	1.3787

En conclusión, con respecto a este apartado, los depósitos de hidroxiapatita elaborados mediante la técnica de espray pirolítico asistido por ultrasonido, cargados mediante la técnica de centrifugación no muestran diferencia significativa en cuanto a las cinéticas de liberación, ajustándose al mismo modelo sin importar el origen de la hidroxiapatita. Esto se puede atribuir a una baja adherencia del antibiótico al depósito, lo cual es favorable, ya que en un implante es deseable que el antibiótico se libere en su totalidad y de esta manera no interfiera con la formación y regeneración del hueso. [47]

7.6.2 Depósitos cargados por la técnica de inmersión.

A continuación, en las figuras 32, 33 y 34 se muestran las cinéticas de liberación para los depósitos Rec-1 (Obtenido a partir de hidroxiapatita preformada, llamada CaP-1), Rec-3 (Obtenido a partir de la mezcla de soluciones de cloruro de calcio y fosfato de sodio dibásico ajustada a pH=10) y control (Obtenido a partir de hidroxiapatita bovina) respectivamente, cargados con enrofloxacino mediante la técnica de inmersión. Así mismo, en las tablas 16, 17 y 18 se muestran los resultados con respecto a los criterios para la selección del modelo con mayor ajuste por parte de las cinéticas de liberación.

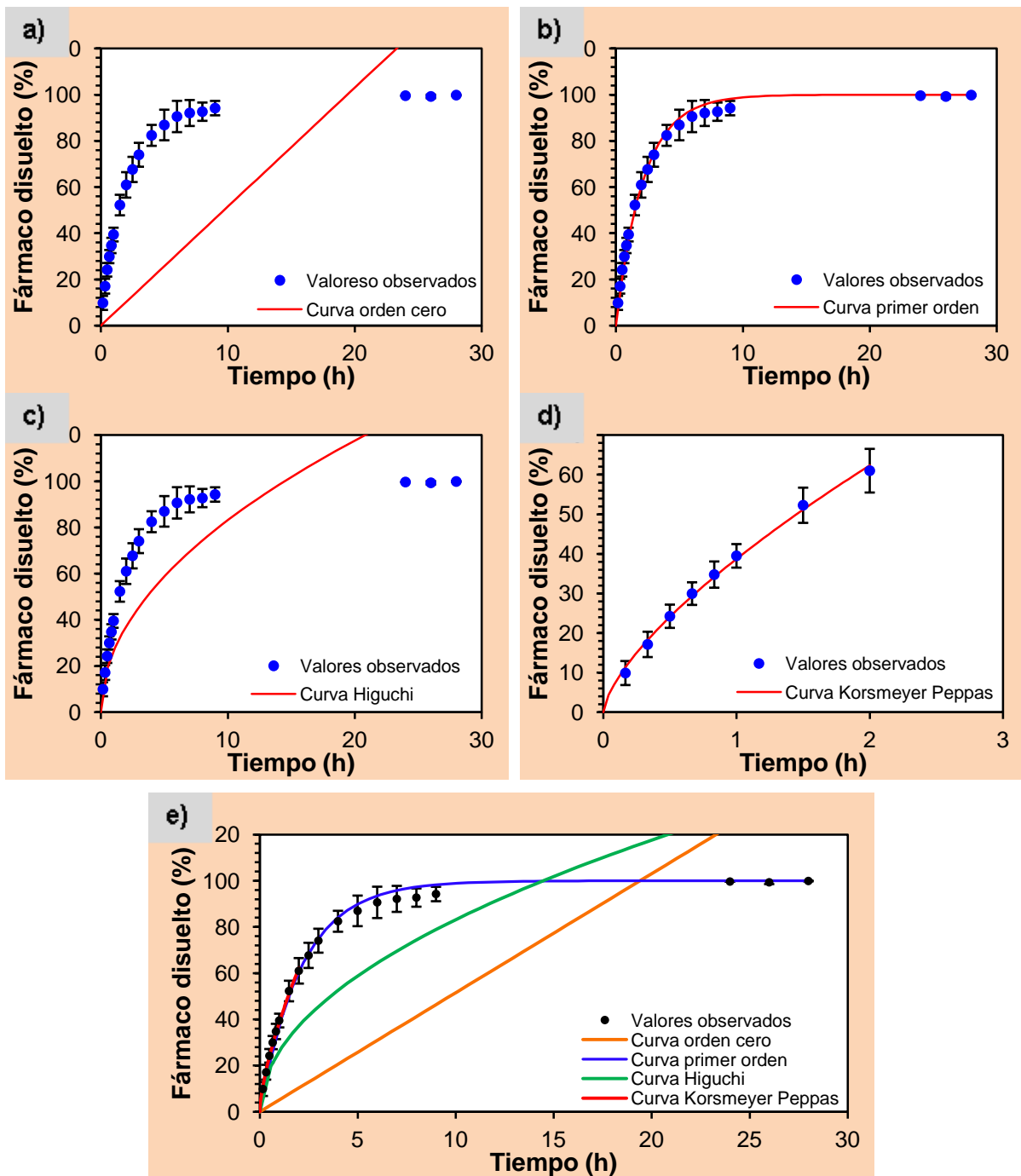


Figura 32. Perfil de liberación experimental de los depósitos Rec-1 y modelos matemáticos para la descripción de la liberación del sistema. a) Orden cero b) Primer Orden c) Higuchi d) Korsmeyer Peppas e) Agrupación de los modelos matemáticos y el perfil experimental de liberación.

Tabla 16. Criterios para la selección del modelo matemático que mejor se ajusta a la liberación del ENR a partir de los depósitos Rec-1 cargados por inmersión.

Parámetro	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeyer Peppas
R	-1.1521	0.9894	0.4277	0.9937
R ajustada	-1.1521	0.9894	0.4277	0.9926
AIC	202.0550	92.2414	176.6297	22.5120
MSC	-0.8643	4.9153	0.4739	4.8130

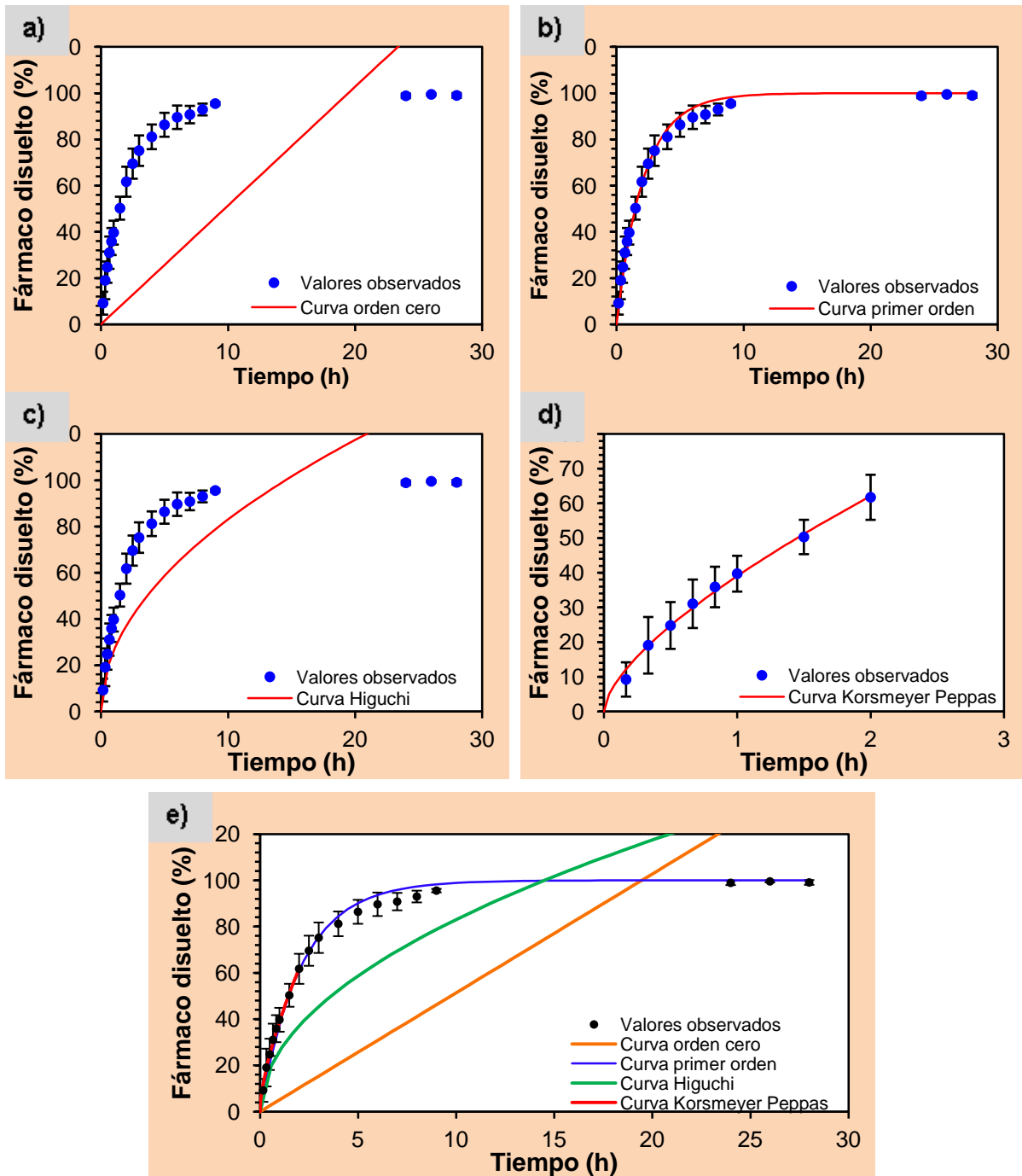


Figura 33. Perfil de liberación experimental de los depósitos Rec-3 y modelos matemáticos para la descripción de la liberación del sistema. a) Orden cero b) Primer Orden c) Higuchi d) Korsmeier Peppas e) Agrupación de los modelos matemáticos y el perfil experimental de liberación.

Tabla 17. Criterios para la selección del modelo matemático que mejor se ajusta a la liberación del ENR a partir de los depósitos Rec-3 cargados por inmersión.

Parámetro	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeier Peppas
R	-1.2778	0.9839	0.3796212	0.9868
R ajustada	-1.2778	0.9839	0.3796212	0.9846
AIC	202.2220	100.8194	177.1329	29.4514
MSC	-0.9001	4.4368	0.4203361	3.9190

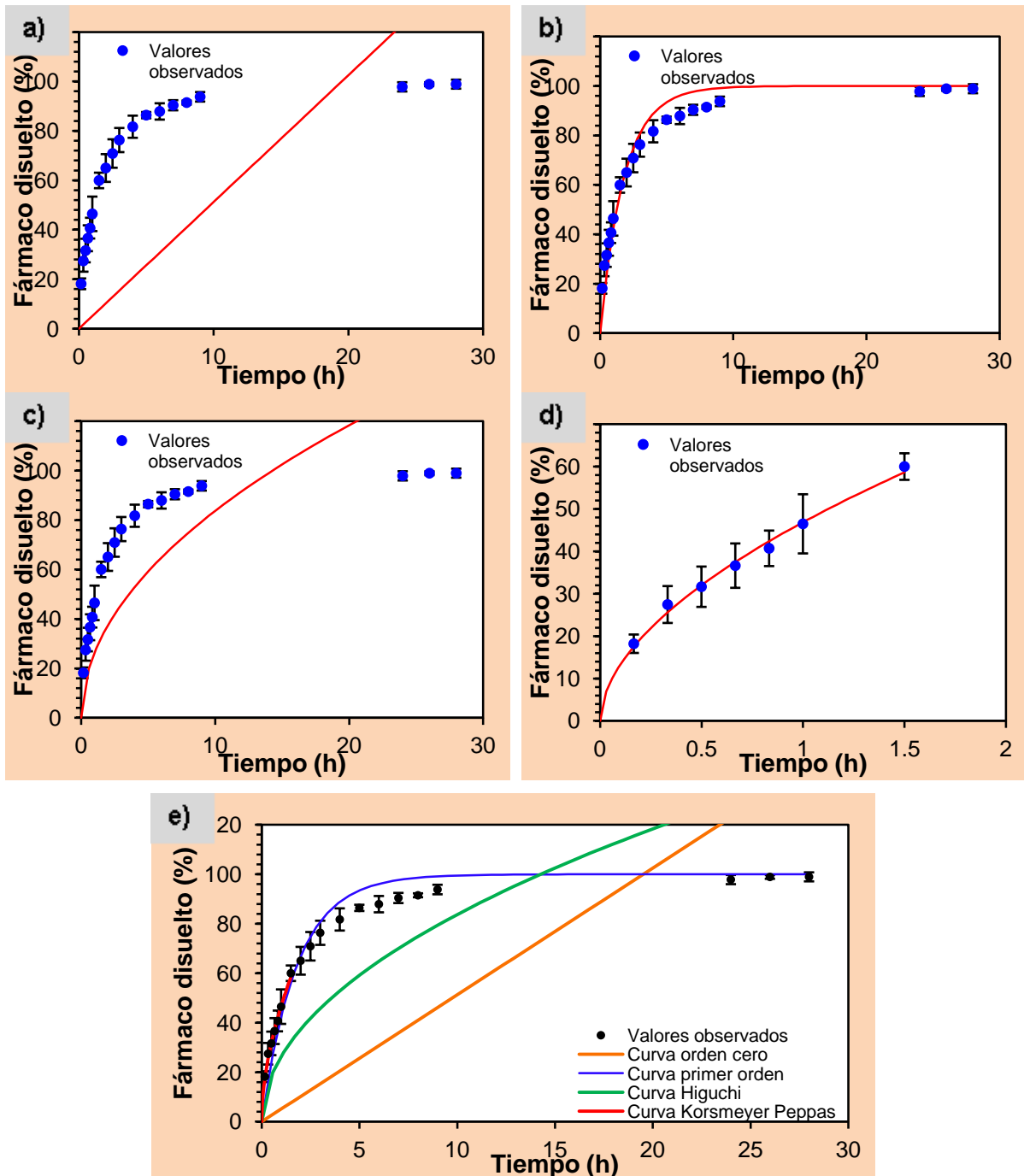


Figura 34. Perfil de liberación experimental de los depósitos Control y modelos matemáticos para la descripción de la liberación del sistema. a) Orden cero b) Primer Orden c) Higuchi d) Korsmeier Peppas e) Agrupación de los modelos matemáticos y el perfil experimental de liberación.

Tabla 18. Criterios para la selección del modelo matemático que mejor se ajusta a la liberación del ENR a partir de los depósitos Control, cargados por inmersión.

Parámetro	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeier Peppas
R	-2.1356	0.9471	0.1063	0.9812
R ajustada	-2.1356	0.9471	0.1063	0.9775
AIC	203.8209	126.1034	179.7417	24.5948
MSC	-1.2338	2.8565	0.0335	3.5013

Tras observar las tablas 16, 17 y 18, de igual modo que con los depósitos cargados mediante la técnica de centrifugación, los modelos matemáticos con mejor ajuste para la liberación de enrofloxacino a través de los depósitos cargados mediante la carga de inmersión son el modelo de primer orden y el modelo de Korsmeyer-Peppas. Por un lado, esto indica que los depósitos cuentan con un comportamiento como sistemas matriciales, donde la liberación es dependiente del gradiente entre la concentración del fármaco en la superficie de los depósitos y la concentración que hay en el medio de disolución. [77] [78] [79] Por otro lado, teniendo en cuenta el ajuste al modelo Korsmeyer-Peppas y los resultados que se muestran en la tabla 19, se puede observar que los depósitos control muestran una liberación más Fickiana en comparación con los depósitos Rec-1 y Rec-2, lo cual nos indica que estos depósitos son más estables y se desintegran menos.

Tomando en cuenta los tiempos de vida media se puede observar que en esta ocasión los depósitos Rec-1 son aquellos que retienen el fármaco por más tiempo, lo cual puede explicarse debido a que al sumergir los depósitos en una solución de enrofloxacino se favorece que el fármaco penetre e interactúe con la estructura de hidroxapatita, aumentando el tiempo de residencia del enrofloxacino en la hidroxapatita, caso contrario a los depósitos cargados mediante la técnica de centrifugación.

Tabla 19. Parámetros cinéticos determinados mediante los modelos de primer orden y Korsmeyer-Peppas para la liberación de enrofloxacino en depósitos de hidroxapatita cargados mediante la técnica de inmersión.

Modelo	Parámetro	Depósito		
		Control	Rec-1	Rec-3
Primer Orden	k1	0.5641	0.4688	0.4801
	T50	1.2603	1.5095	1.4890
Korsmeyer Peppas	kKP	46.8802	38.7269	39.0595
	n	0.5548	0.6869	0.6778
	T50	1.1298	1.4668	1.4433

En conclusión, con respecto a este apartado, los depósitos de hidroxapatita elaborados mediante la técnica de spray pirolítico asistido por ultrasonido, cargados mediante la técnica de inmersión no muestran diferencia significativa en cuanto a las cinéticas de liberación, ajustándose al mismo modelo sin

importar el origen de la hidroxiapatita. Esto se puede atribuir a una baja adherencia del antibiótico al depósito, lo cual es favorable, ya que en un implante es deseable que el antibiótico se libere en su totalidad y de esta manera no interfiera con la formación y regeneración del hueso. ^[47]

7.6.3 Depósitos cargados por la técnica de Plasma a Presión Atmosférica.

A continuación, en las figuras 35, 36 y 37 se muestran las cinéticas de liberación para los depósitos Rec-1 (Obtenido a partir de hidroxiapatita preformada, llamada CaP-1), Rec-3 (Obtenido a partir de la mezcla de soluciones de cloruro de calcio y fosfato de sodio dibásico ajustada a pH=10) y control (Obtenido a partir de hidroxiapatita bovina) respectivamente, cargados con enrofloxacino mediante la técnica de plasma a presión atmosférica. Así mismo, en las tablas 20, 21 y 22 se muestran los resultados con respecto a los criterios para la selección del modelo con mayor ajuste por parte de las cinéticas de liberación.

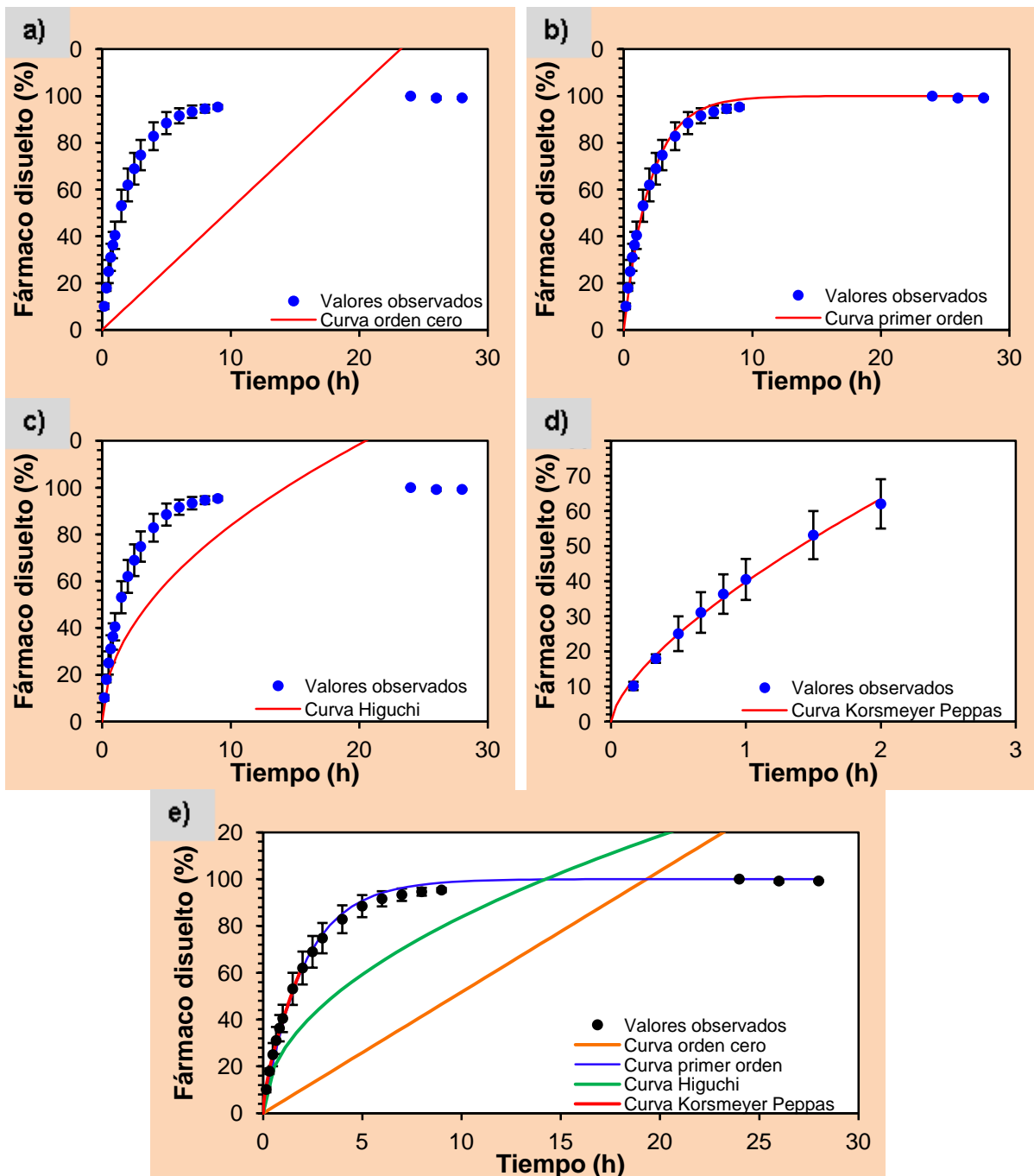


Figura 35. Perfil de liberación experimental de los depósitos Rec-1 y modelos matemáticos para la descripción de la liberación del sistema. a) Orden cero b) Primer Orden c) Higuchi d) Korsmeier Peppas e) Agrupación de los modelos matemáticos y el perfil experimental de liberación.

Tabla 20. Criterios para la selección del modelo matemático que mejor se ajusta a la liberación del ENR a partir de los depósitos Rec-1 cargados por PPA.

Parámetro	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeier Peppas
R	-1.2745	0.9941	0.3749	0.9936
R ajustada	-1.2745	0.9941	0.3749	0.9925
AIC	202.8440	89.8284	177.9445	23.2384
MSC	-0.9103	5.0379	0.4002	4.7449

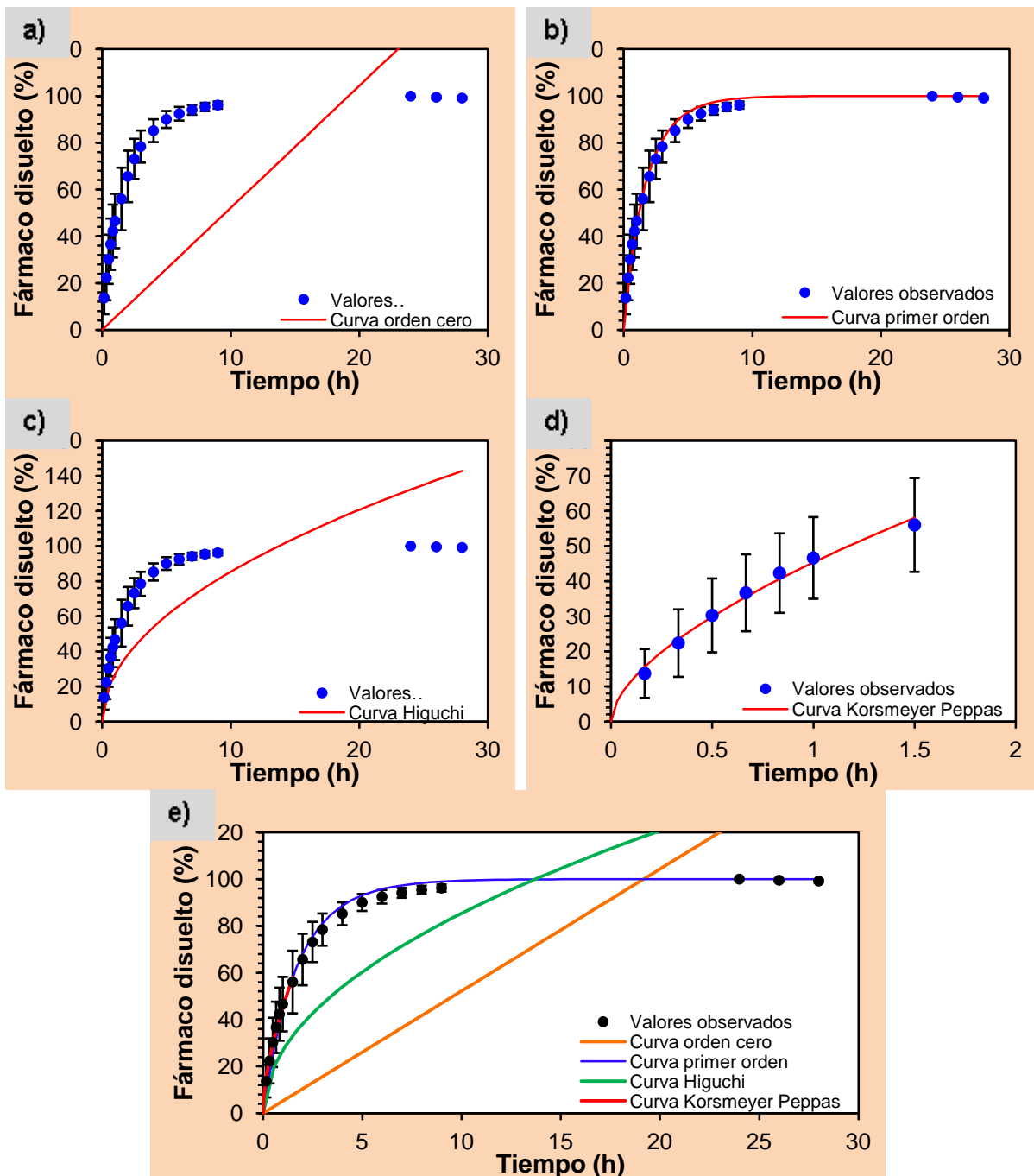


Figura 36. Perfil de liberación experimental de los depósitos Rec-3 y modelos matemáticos para la descripción de la liberación del sistema. a) Orden cero b) Primer Orden c) Higuchi d) Korsmeier Peppas e) Agrupación de los modelos matemáticos y el perfil experimental de liberación.

Tabla 21. Criterios para la selección del modelo matemático que mejor se ajusta a la liberación del ENR a partir de los depósitos Rec-3 cargados por PPA.

Parámetro	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeier Peppas
R	-2.0523	0.9828	0.0757	0.9823
R ajustada	-2.0523	0.9828	0.0757	0.9788
AIC	204.8039	102.1619	181.1118	21.6379
MSC	-1.1396	4.2627	0.1074	4.0491

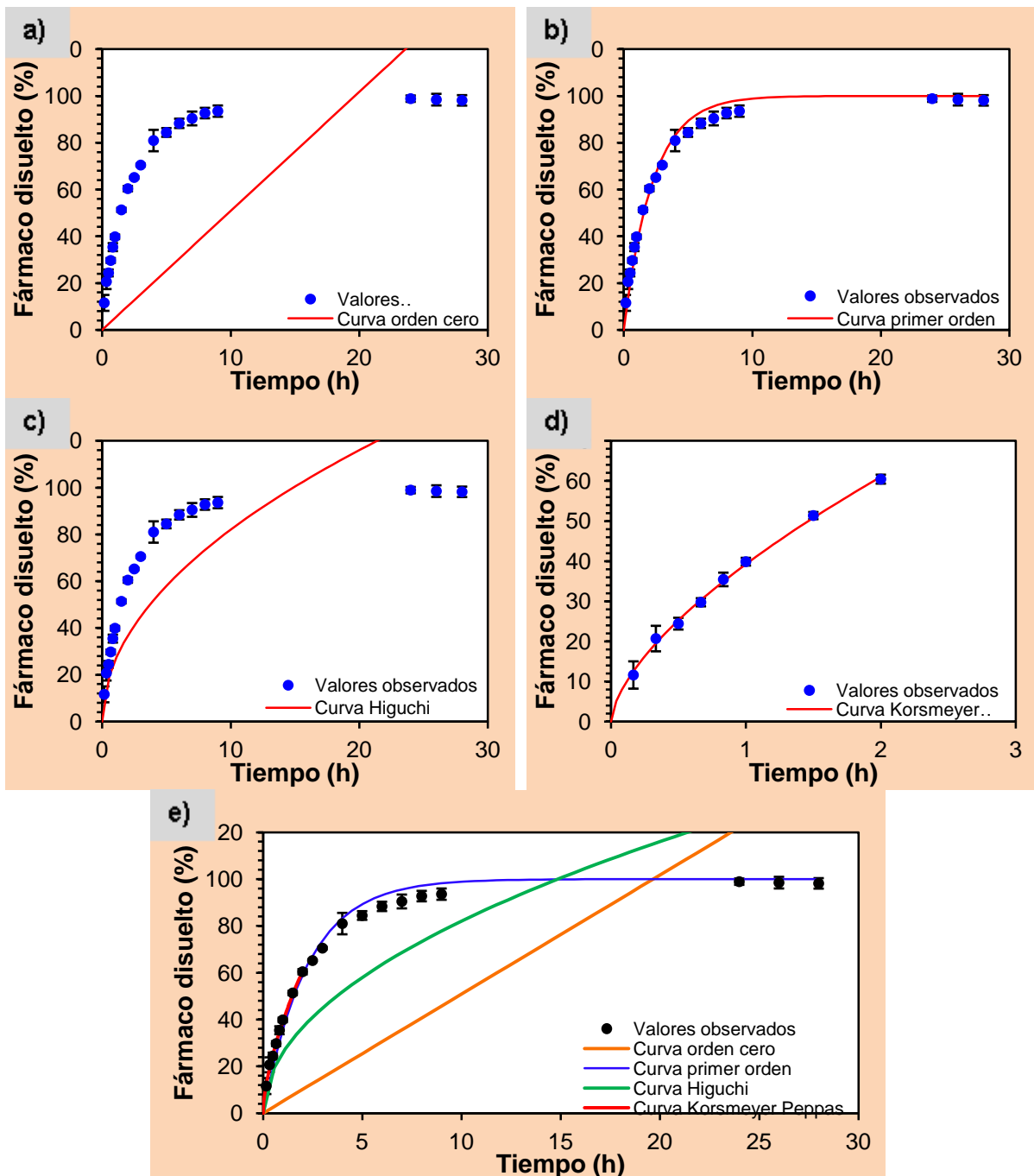


Figura 37. Perfil de liberación experimental de los depósitos Control y modelos matemáticos para la descripción de la liberación del sistema. a) Orden cero b) Primer Orden c) Higuchi d) Korsmeyer Peppas e) Agrupación de los modelos matemáticos y el perfil experimental de liberación.

Tabla 22. Criterios para la selección del modelo matemático que mejor se ajusta a la liberación del ENR a partir de los depósitos control cargados por PPA.

Parámetro	Orden cero	Primer orden	Higuchi	Korsmeyer Peppas
R	-1.2398	0.9783	0.4172	0.9934
R ajustada	-1.2398	0.9783	0.4172	0.9923
AIC	201.4541	109.8279	175.8378	23.2196
MSC	-0.9082	3.9142	0.4400	4.6091

Tras observar los resultados de las tablas 20, 21 y 22, al igual que con los depósitos cargados mediante las técnicas de centrifugación e inmersión, los perfiles de liberación de los depósitos cargados mediante la técnica de plasma a presión atmosférica se ajustan a una cinética de primer orden y al modelo de Korsmeyer-Peppas, indicando que los depósitos se comparan como sistemas matriciales en los cuales la liberación es dependiente del gradiente de la concentración del fármaco presente en la superficie de los depósitos y la concentración del mismo en solución. [77] [78] [79] Tomando en cuenta los resultados mostrados en la tabla 23 para el valor de “n” del ajuste Korsmeyer Peppas, los depósitos de manera similar liberan el fármaco tanto por difusión de Fick así como por la desintegración de los depósitos siendo los depósitos Rec-1 aquellos que se erosionan con mayor facilidad, por otro lado, considerando los tiempos de vida media calculados en este caso los depósitos con mayor tiempo de retención del principio activo son los depósitos control, seguidos de los depósitos Rec-1 y Rec-3. Esta diferencia en comparación a los depósitos cargados por centrifugación y por inmersión puede explicarse debido a que los depósitos control pueden interactuar con mayor facilidad con el enrofloxacino debido a que el plasma transmite su energía a las moléculas del antibiótico y a las moléculas de hidroxiapatita favoreciendo su interacción, al mismo tiempo que genera grietas en los depósitos, en las que puede integrarse mayor cantidad de Enrofloxacino. [25] [81] [82]

Tabla 23. Parámetros determinados por los modelos matemáticos con mejor ajuste a los perfiles de liberación experimentales de los depósitos de HA.

Modelo	Parámetro	Control	Rec-1	Rec-3
Primer Orden	k1	0.4481	0.4947	0.6111
	T50	1.5488	1.4456	1.2510
Korsmeyer Peppas	kKP	39.2458	39.7947	45.3644
	n	0.6378	0.6752	0.6237
	T50	1.4614	1.4267	1.2285

En conclusión, con respecto a este apartado, los depósitos de hidroxiapatita elaborados mediante la técnica de espray pirolítico asistido por ultrasonido, cargados mediante plasma a presión atmosférica no muestran diferencia significativa en cuanto a las cinéticas de liberación, ajustándose al mismo modelo sin importar el origen de la hidroxiapatita. Esto se puede atribuir a una

baja adherencia del antibiótico al depósito, lo cual es favorable, ya que en un implante es deseable que el antibiótico se libere en su totalidad y de esta manera no interfiera con la formación y regeneración del hueso. ^[47]

Comparando los depósitos de hidroxiapatita cargados liberaron de manera eficaz el antibiótico, el cual, sin importar el origen de la hidroxiapatita de los depósitos o la técnica de carga con el fármaco, se liberó en su mayoría durante las primeras 5 horas. Para estudios biológicos posteriores se plantea el uso de los depósitos que retuvieron más antibiótico mediante las diferentes técnicas de carga. Entre estos se encuentran los depósitos Rec-3 (obtenidos a partir de la mezcla de soluciones de cloruro de calcio y fosfato de sodio dibásico a pH=10) cargados mediante la técnica de plasma a presión atmosférica, los depósitos Rec-1 (Obtenidos a partir de hidroxiapatita sintetizada mediante la técnica de precipitación a pH alcalino) cargados por las técnicas de centrifugación e inmersión.

8 Conclusiones

- Se demostró que el pH no es determinante en la producción de hidroxiapatita, mediante la técnica de espray pirolítico, partiendo de la mezcla de soluciones precursoras con iones calcio y fosfato, manteniendo la relación estequiométrica $Ca/P=1.67$. No obstante la sustitución de los iones OH^- por iones Cl^- aumenta tras bajar el pH.
- Se logró obtener depósitos de hidroxiapatita libres de cloruro de sodio, haciendo lavado de los depósitos elaborados mediante la mezcla de soluciones con iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} .
- A diferencia de la síntesis por espray pirolítico, se evidenció que, en fase acuosa el control en el pH es determinante para la obtención de hidroxiapatita y no de otros fosfatos de calcio.
- Se logró obtener depósitos de hidroxiapatita, partiendo de hidroxiapatita bovina e hidroxiapatita previamente sintetizada en fase acuosa, bajo condiciones alcalinas.
- Se demostró que es posible aumentar la cantidad de enrofloxacino sobre los depósitos, realizando varias aplicaciones de la solución sobre su superficie, al mismo tiempo que se modifica la velocidad del sustrato tras las aplicaciones, teniendo un máximo de antibiótico tras aplicar 8 capas.
- Tras la inmersión de los depósitos en la solución de enrofloxacino se demostró que el fármaco se adsorbe con gran facilidad en la HA.
- Se demostró que el método más eficiente para cargar enrofloxacino sobre los depósitos es el de plasma a presión atmosférica, ofreciendo recubrimientos que liberan exitosamente el fármaco.

9 Perspectivas:

A pesar de lograr la obtención de depósitos de HA cargados con enrofloxacino (Antibiótico análogo al ciprofloxacino), se requiere en un futuro llevar a cabo estudios donde se evalúe y demuestre la osteoconductividad y osteointegración del implante recubierto, así como sus propiedades antimicrobianas.

Así mismo, se deberán realizar los estudios biológicos pertinentes donde se evalúe la capacidad antimicrobiana de los depósitos que retuvieron más antibiótico cargados con enrofloxacino mediante las diferentes técnicas empleadas en este trabajo.

10 Bibliografía:

- [1] M. S. Tung in *Calcium Phosphates: Structure, Composition, Solubility, and Stability*, Vol. (Ed. Z. Amjad), Springer US, Boston, MA, **1998**, pp. 1-19.
- [2] T. Albrektsson and C. Johansson, *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society* **2001**, 10 Suppl 2, S96-101.
- [3] K. Lin, C. Wu and J. Chang, *Acta Biomaterialia* **2014**, 10, 4071-4102.
- [4] M. Sadat-Shojai, M.-T. Khorasani, E. Dinpanah-Khoshdargi and A. Jamshidi, *Acta Biomaterialia* **2013**, 9, 7591-7621.
- [5] B. León and J. Jansen, *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*, Springer New York, **2009**, p. 1-23.
- [6] M. Ribeiro, F. J. Monteiro and M. P. Ferraz, *Biomatter* **2012**, 2, 176-194.
- [7] T. Stefanos in *Local antibiotic therapy in the treatment of bone and soft tissue infections*, Vol. (Ed. S. Danilla), University of Chile, Chile, Chile, **2012**, p. 244.
- [8] A. K. Nayak, A. Bhattacharyya and K. K. Sen, *ISRN orthopedics* **2011**, 2011, 420549-420549.
- [9] U. Gbureck, E. Vorndran and J. E. Barralet, *Acta Biomaterialia* **2008**, 4, 1480-1486.
- [10] G. Singhvi and M. Sing, *Int J Pharm Sci Res* **2011**, 2, 77-84.
- [11] C. Washington, *Int. J. Pharm.* **1990**, 58, 1-12.
- [12] F. Chen, X. Ma, Y. Yu and C. Liu in *Calcium Phosphate Bone Cements: Their Development and Clinical Applications*, Vol. Eds.: C. Liu and H. He), Springer Singapore, Singapore, **2018**, pp. 1-39.
- [13] A. Atala, *Principles of Regenerative Medicine*, Elsevier/Academic Press, **2008**, p. 580-593.
- [14] W. S. Khan, F. Rayan, B. S. Dhinsa and D. Marsh, *Stem Cells Int* **2012**, 7.
- [15] K. Fox, P. A. Tran and N. Tran, *ChemPhysChem* **2012**, 13, 2495-2506.
- [16] M. H. Dominiczak and W. D. Fraser in *Metabolismo del hueso y homeostasis del calcio*, Vol. Eds.: J. W. Baynes and M. H. Dominiczak), Elsevier España, Barcelona, **2015**, pp. 343-352.
- [17] J. E. Hall and A. C. Guyton in *Hormona paratiroidea, calcitonina, metabolismo del calcio y el fosfato, vitamina D, huesos y dientes*, Vol. Eds.: J. E. Hall and A. C. Guyton), Elsevier España, Barcelona, **2011**, pp. 955-972.
- [18] R. Z. LeGeros and B. Ben-Nissan in *Introduction to Synthetic and Biologic Apatites*, Vol. (Ed. B. Ben-Nissan), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2014**, pp. 1-17.
- [19] M. Saini, Y. Singh, P. Arora, V. Arora and K. Jain, *World journal of clinical cases* **2015**, 3, 52-57.
- [20] E. Pellicer, M. Lorenzetti, J. Fornell, M. D. Baró, S. Novak and J. Sort in *Progress Beyond the State-of-the-Art in the Field of Metallic Materials for Bioimplant Applications*, Vol. Eds.: F. Zivic, S. Affatato, M. Trajanovic, M. Schnabelrauch, N. Grujovic and K. L. Choy), Springer International Publishing, Cham, **2018**, pp. 25-46.
- [21] F. Zivic, S. Affatato, M. Trajanovic, M. Schnabelrauch, N. Grujovic and K. L. Choy, *Biomaterials in Clinical Practice: Advances in Clinical Research and Medical Devices*, Springer International Publishing, **2017**, p. 25-46 y 183-224.
- [22] L. C. Jones, L. D. Timmie Topoleski and A. K. Tsao in *2 - Biomaterials in orthopaedic implants*, Vol. (Ed. E. Friis), Woodhead Publishing, **2017**, pp. 17-32.

- [23] Q. Chen and G. A. Thouas, *Materials Science and Engineering: R: Reports* **2015**, *87*, 1-57.
- [24] V. Sansone, D. Pagani and M. Melato, *Clin Cases Miner Bone Metab* **2013**, *10*, 34-40.
- [25] S. Bose and S. Tarafder, *Acta Biomaterialia* **2012**, *8*, 1401-1421.
- [26] W. K. Hamoudi, R. A. Ismail and H. F. Abbas, *IJAP* **2014**, *10*, 11-16.
- [27] V. Uskoković and D. P. Uskoković, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2011**, *96B*, 152-191.
- [28] N. A. S. Mohd Pu'ad, P. Koshy, H. Z. Abdullah, M. I. Idris and T. C. Lee, *Heliyon* **2019**, *5*, e01588.
- [29] D. Alves Cardoso, J. A. Jansen and S. C. G. Leeuwenburgh, *J. Biomed. Mater. Res., Part B* **2012**, *100B*, 2316-2326.
- [30] C. P. Fosado Esquivel in *Fosfatos cálcicos como sustitutos oseos: Diseño, caracterización y sistema de liberación de fármacos, Vol. Licenciatura* Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de química, **2018**, p. 99.
- [31] M. Bahraminasab, N. Doostmohammadi and A. Alizadeh, *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* **2021**, *18*, 573-582.
- [32] S.-C. Wu, H.-C. Hsu, S.-K. Hsu, C.-P. Tseng and W.-F. Ho, *Journal of the Australian Ceramic Society* **2019**, *55*, 1051-1058.
- [33] S.-C. Wu, H.-C. Hsu, S.-K. Hsu, Y.-C. Chang and W.-F. Ho, *Journal of Asian Ceramic Societies* **2016**, *4*, 85-90.
- [34] E. C. Moreno, T. M. Gregory and W. E. Brown, *Journal of Research of the National Bureau of Standards* **1968**, *72A*, 773.
- [35] C. Tendero, C. Tixier, P. Tristant, J. Desmaison and P. Leprince, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **2006**, *61*, 2-30.
- [36] M. Xaubet, J. S. Baudler, T. Gerling, L. Giuliani, F. Minotti, D. Grondona, T. Von Woedtke and K. D. Weltmann, *Plasma Processes Polym.* **2018**, *15*, 1700211.
- [37] I. G. Demnati, D.: Errassifi, F.; Combes, C.; Rey, C.; Le Bolay, N., *Powder Technol.* **2014**, *255*, 22-28.
- [38] B. Mavis and A. C. Taş, *J. Am. Ceram. Soc.* **2000**, *83*, 989-991.
- [39] M. J. Soufiani in *Investigation And Modeling of Dip-Coating Process for Dispersions, Vol. Doctor of Philosophy* University of Western Ontario, **2016**, p. 134.
- [40] D. Perednis and L. Gauckler, *Thin Film Deposition Using Spray Pyrolysis*, **2005**, p. 103-111.
- [41] S. B. Goodman, Z. Yao, M. Keeney and F. Yang, *Biomaterials* **2013**, *34*, 3174-3183.
- [42] V. José, *Tecnología Farmacéutica*, Sintesis S.A., Madrid, España, **2001**, p. 379-381.
- [43] P. R. Murray, K. S. Rosenthal and M. A. Pfaller, *Microbiología médica*, Elsevier, **2006**, p. 203-212.
- [44] M. Martinez, P. McDermott and R. Walker, *The Veterinary Journal* **2006**, *172*, 10-28.
- [45] A. F. Hanafy, H. S. M. Ali, S. N. El Achy and E. L. S. E. Habib, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2018**, *44*, 1023-1033.
- [46] J. Ferguson, M. Diefenbeck and M. McNally, *Journal of bone and joint infection* **2017**, *2*, 38-51.
- [47] F. Kupczik, L. R. G. Vialle, L. O. Nobre, L. d. A. Vieira and A. E. O. Fernandes, *Acta Ortopédica Brasileira* **2009**, *17*, 228-231.

- [48] M. L. Bruschi, *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Elsevier Science, **2015**, p. 63-83.
- [49] H. R. Rezaie, M. Esnaashary, A. A. arjmand and A. Öchsner, *A Review of Biomaterials and Their Applications in Drug Delivery*, Springer Singapore, **2018**, p. 10-19.
- [50] J. Kamieniak, P. J. Kelly, C. E. Banks and A. M. Doyle, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.* **2018**, *28*, 84-91.
- [51] C.-J. Liao, F.-H. Lin, K.-S. Chen and J.-S. Sun, *Biomaterials* **1999**, *20*, 1807-1813.
- [52] S. Meski, S. Ziani, H. Khireddine, F. Yataghane and N. Ferguene, *Water Sci. Technol.* **2011**, *63*, 2087-2096.
- [53] B. O. Fowler, E. C. Moreno and W. E. Brown, *Arch. Oral Biol.* **1966**, *11*, 477-492.
- [54] N. Pleshko, A. Boskey and R. Mendelsohn, *Biophys. J.* **1991**, *60*, 786-793.
- [55] M. Markovic, B. O. Fowler and M. S. Tung, *J Res Natl Inst Stand Technol* **2004**, *109*, 553-568.
- [56] J. A. Jansen and B. León in *Introduction, Vol.* Eds.: B. León and J. A. Jansen), Springer New York, New York, NY, **2009**, pp. 1-8.
- [57] M. Aguilar-Frutis, S. Kumar and C. Falcony, *Surf. Coat. Technol.* **2009**, *204*, 1116-1120.
- [58] V. Jokanovi and D. P. Uskokovj *Mater. Trans.* **2005**, *46*, 228-235.
- [59] K. Itatani, T. Tsugawa, T. Umeda, Y. Musha, I. Davies and S. Koda, *J. Ceram. Soc. Jpn.* **2010**, *118*, 462-466.
- [60] G. Ye and T. Troczynski, *Ceram. Int.* **2008**, *34*, 511-516.
- [61] T. Theophile, *Infrared Spectroscopy: Materials Science, Engineering and Technology*, IntechOpen, **2012**, p. 123-148.
- [62] S. Singh, V. Singh, S. Aggarwal and U. K. Mandal, *Chem. Pap.* **2010**, *64*, 491-498.
- [63] J. P. Maity, T. J. Lin, H. P. Cheng, C. Y. Chen, A. S. Reddy, S. B. Atla, Y. F. Chang, H. R. Chen and C. C. Chen, *Int J Mol Sci* **2011**, *12*, 3821-3830.
- [64] S. Mandel and A. C. Tas, *Materials Science and Engineering: C* **2010**, *30*, 245-254.
- [65] A. Destainville, E. Champion, D. Bernache-Assollant and E. Laborde, *Mater. Chem. Phys.* **2003**, *80*, 269-277.
- [66] T. H. A. Corrêa and J. Holanda, *Cerâmica* **2016**, *62*, 278-280.
- [67] A. Dosen and R. F. Giese, *Am. Mineral.* **2011**, *96*, 368-373.
- [68] D. J. Indrani, B. Soegijono, W. A. Adi and N. Trout, *International Journal of Applied Pharmaceutics* **2018**, *9*, 87-91.
- [69] I. Demnati, D. Grossin, O. Marsan, G. Bertrand, G. Collonges, C. Combes, M. Parco, I. Braceras, J. Alexis, Y. Balcaen and C. Rey, *The open biomedical engineering journal* **2015**, *9*, 42-55.
- [70] H. Nishikawa, R. Hatanaka, M. Kusunoki, T. Hayami and S. Hontsu, *Preparation of Freestanding Hydroxyapatite Membranes with Excellent Biocompatibility and Flexibility*, **2008**, p. 088001.
- [71] J. S. Cho and S.-H. Rhee, *J. Eur. Ceram. Soc.* **2013**, *33*, 233-241.
- [72] I. Sopyan, M. Mel, R. Singh and K. A. Khalid, *Porous Hydroxyapatite for Artificial Bone Applications*, **2007**, p. 116-123.
- [73] M. D. Tyona, *Advances in materials Research* **2013**, *2*, 195-208.
- [74] D. Comoretto, *Organic and Hybrid Photonic Crystals*, Springer International Publishing, **2015**, p. 77-101.

- [75] O. Geuli, N. Metoki, T. Zada, M. Reches, N. Eliaz and D. Mandler, *Journal of Materials Chemistry B* **2017**, *5*, 7819-7830.
- [76] A. S. H. Makhlof and I. Tiginyanu, *Nanocoatings and Ultra-Thin Films: Technologies and Applications*, Elsevier Science, **2011**, p. 3-23.
- [77] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath and P. Chowdhury, *Acta poloniae pharmaceutica* **2010**, *67*, 217-223.
- [78] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, A. Zou, W. Li, C. Yao and S. Xie, *The AAPS Journal* **2010**, *12*, 263-271.
- [79] P. M. Padmaa, J. Preethy Ani, S. Cm and C. G.V. Peter, *IJPRT* **2018**, *8*, 12.
- [80] T. S. P. Cellet, G. M. Pereira, E. C. Muniz, R. Silva and A. F. Rubira, *Journal of Materials Chemistry B* **2015**, *3*, 6837-6846.
- [81] J. L. Ong, Y. Yang, S. Oh, M. Appleford, W. Chen, Y. Liu, K.-H. Kim, S. Park, J. Bumgardner, W. Haggard, C. M. Agrawal, D. L. Carner and N. Oh in *Calcium Phosphate Coating Produced by a Sputter Deposition Process, Vol. Eds.: B. León and J. Jansen*), Springer New York, New York, NY, **2009**, pp. 175-198.
- [82] P. Kuppusami and V. S. Raghunathan, *Surf. Eng.* **2006**, *22*, 81-83.